

БИОЛОГИЯ

УДК 57.04

ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА НАКОПЛЕНИЕ ЛИШАЙНИКОВЫХ ВЕЩЕСТВ

А. П. Касьянова, Е. С. Корчиков

В данной работе впервые были проведены качественные и количественные оценки содержания вторичных метаболитов лишайников следующих видов: *Cladonia fimbriata*, *Evernia mesomorpha*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*, *Xanthoria parietina* – методом микрокристаллизации и спектрофотометрическим методом, а также изучили зависимость накопления лишайниковых веществ от положения в рельефе и типа сообщества. В талломах изучаемых видов было обнаружено 6 вторичных метаболитов: атранорин, диварикатовая, салациновая, физодаловая, фумарпротоцетраровая кислоты и париедин. Метод микрокристаллизации показал, что преобладающее количество лишайниковых кислот образуется в сообществах на арене, и только фумарпротоцетраровая кислота в большем количестве обнаружена в пойменной дубраве. А метод спектрофотометрии показал, что в талломах *Parmelia sulcata*, *Hypogymnia physodes* и *Evernia mesomorpha* суммарное содержание лишайниковых кислот больше в пойменных сообществах, чем в таковых на арене, а в *Xanthoria parietina* и *Cladonia fimbriata* – наоборот.

Ключевые слова: лишайники; вторичные метаболиты; арена; пойма; экологические факторы; биотоп; фитоиндикация; спектрофотометрия.

Для мониторинга экологических факторов можно использовать разные биологические объекты: цветковые растения, мохообразные или лишайники. Лишайники же, обитая в наземно-воздушной среде, позволяют охарактеризовать экологические факторы именно в данных условиях, в частности, влажность воздуха; в отличие от сосудистых растений, которые, как правило, показывают влажность почвы. Однако, чтобы проводить фитоиндикацию биотопа с помощью лишайников, нужно для начала изучить обратный процесс влияния экологических факторов на накопление в них химических веществ.

Органические вещества, которые встречаются в лишайниках разделяют на две группы: первичные метаболиты и вторичные метаболиты лишайников. Первичные метаболиты синтезируются фотобионтом или микобионтом и находятся интрацеллюлярно, к

ним обычно относятся белки, аминокислоты, витамины, полисахариды и прочие органические соединения. Вторичные метаболиты же находятся в талломе лишайника экстрацеллюлярно, обычно они нерастворимы в воде и синтезируются в основном только микобионтом.

Вторичные метаболиты лишайников длительное время называли лишайниковыми кислотами. Однако оказалось, что к вторичным метаболитам лишайников относятся соединения различной природы, а именно: ряд производных аминокислот, сахароспирты, алифатические кислоты, γ -, δ - и макроциклические лактоны, моноциклические ароматические вещества, хиноны, хромоны, ксантоны, дибензофураны, депсиды, депсидоны, депсоны, терпеноиды, стероиды и каротиноиды. Набор лишайниковых веществ видоспецифичен [1].

© Касьянова А. П., Корчиков Е. С., 2023.

Касьянова Анастасия Павловна (anastasiakasyanova22@mail.ru),

студент III курса биологического факультета;

Корчиков Евгений Сергеевич (evkor@inbox.ru),

доцент кафедры экологии, ботаники и охраны природы Самарского университета, 443086, Россия, г. Самара, Московское шоссе, 34.

Кроме того, процессы накопления веществ в лишайниках довольно слабо изучены. Так, например, было отмечено, что концентрация усниновой кислоты в талломах *Cladonia arbuscula*, *Cladonia stellaris* и *Flavocetraria cucullata* зависит от времени года [2]: наибольшее её количество накапливается в июне, а наименьшее – в декабре. Встречаются и наблюдения, когда наибольшая концентрация выявляется в период весна – осень, но наименьшее содержание остаётся неизменным и отмечается зимой [3]. Было выявлено также, что вторичные лишайниковые вещества не накапливаются с возрастом лишайника, что они являются соединениями, которые активно используются в их обмене веществ [4]. Значение лишайниковых веществ для функционирования самих лишайников не до конца изучено. К основным функциям вторичных метаболитов лишайников сегодня можно отнести защиту от ультрафиолетового излучения и от поедания насекомыми и другими животными, влияние на проводимость клеточной стенки фотобионта, стимулирование транспорта углеводов из микобионта в фотобионт, антибиотические свойства [1].

Лишайниковобразующие грибы способны синтезировать биологически активные вещества, например, с антибактериальной активностью, противовирусной, антибиотической и другими формами активности, которые находят своё применение в фармакологии и медицине [5].

Условия и методы исследования

В качестве района исследования нами был избран Красносамарский лесной массив, который является уникальным и единственным достаточно крупным лесным массивом для степных зон Самарской области, а также всей территории юго-восточной европейской России [6].

Нами были выбраны четыре основные лесные формации: сосняк, березняк, осинник и дубрава. Для сравнения вторичных метаболитов эти сообщества были рассмотрены с двух позиций – на арене и в пойме (рис. 1).

Таким образом, в сосняке нами были собраны такие виды как *Evernia mesomorpha*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*; в березняке – *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*; в осиннике – *Xanthoria parietina*; в дубраве – *Cladonia fimbriata*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*.

Собранные образцы были очищены, взвешены в количестве от 0,005 до 0,006 г на весах СВЛ 220Н и залиты 0,2 и 0,24 мл ацетона соответственно в соотношении 1:40 на 7 дней. Мы выбрали в качестве элюента ацетон, так как он является неполярным растворителем, в котором лучше растворяется большинство изучаемых нами вторичных метаболитов лишайников. Кроме того, он является более доступным веществом, чем другие растворители, например, хлороформ.

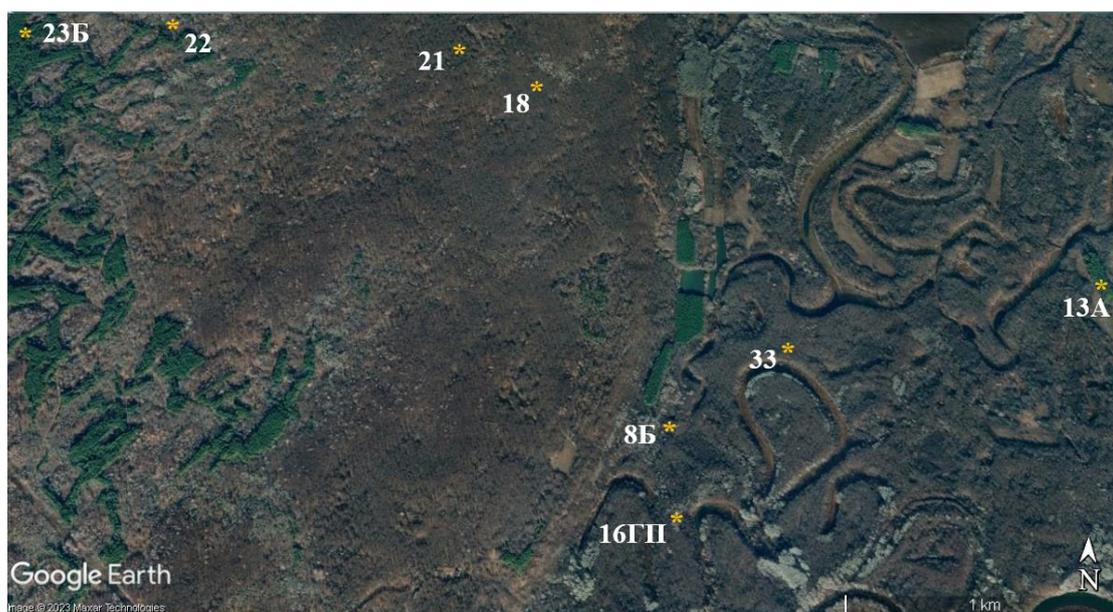


Рис. 1. Район исследования: звёздочкой (*) отмечены исследуемые пробные площади (23Б – сосняк на арене, 22 – березняк на арене, 21 – осинник на арене, 18 – дубрава на арене, 8Б – березняк в пойме, 16ГП – осинник в пойме, 33 – дубрава в пойме, 13А – сосняк в пойме)

После нам необходимо было получить чистые вещества, для чего мы использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) [7].

На алюминиевых пластинах с силикагелем снизу прочерчивают мягким карандашом 10 точек на расстоянии 10 см друг от друга. Затем на каждую точку наносят 5 раз капилляром ацетоновый экстракт лишайника с использованием прибора УПС-1 при температуре 70–80°C. После пластины помещают на 10 минут в пары ледяной уксусной кислоты, а потом в хроматографическую камеру с сольвентом С (толуол и уксусная кислота в соотношении 17:3 мл соответственно). Через 40–50 минут, когда растворитель дойдёт почти до конца пластины, отмечают простым карандашом эту линию, достают и сушат около 30 минут. Затем пластины помещают в УФС 254/365 и просматривают в УФ-лучах, при $\lambda = 254$ нм и 380 нм. При этом карандашом обводят светящиеся пятна на всех 6 пластинах из них 3 пластины смачивают 10-% H_2SO_4 и сразу же нагревают в термостате ШС-80-01 СПУ при температуре 110°C до проявления оранжевой норстиктовой кислоты в контроле.

Определяют вещества по определителю Orange A., James P. W., White F. J. *Microchemical methods for the identification lichens* [7] и идентифицируют светящиеся пятна в УФ-лучах на бесцветных пластинах. В последующем на них скальпелем снимают силикагель с чистым веществом в пробирку Эппендорфа и сразу добавляют 4–5 капель чистого ацетона (элюируют). По прошествии двух дней капилляром берут каплю вещества из пробирки и перемещают на предметное стекло. После высыхания ацетона предметное стекло просматривают в микроскопе Микмед-6 на наличие кристаллов кислот и фотографируют при помощи камеры Levenhuk C1400 NG и программы TopView 3.7.27.74. Это является таким методом определения вторичных метаболитов лишайников как микрокристаллизация.

Зная форму и размеры конкретных веществ, мы приступили к количественной оценке лишайниковых веществ в ацетоновых вытяжках. Для чего мы брали каплю полученного экстракта, капали на предметное стекло и просматривали на микроскопе под увеличением $\times 280$. Четыре поля зрения каждой капли фотографировали, чтобы оценить количествен-

ное и качественное содержание вторичных метаболитов лишайников методом микрокристаллизации по пятибалльной шкале.

Также мы использовали другой подход – спектрофотометрия (на спектрофотометре ПЭ-5400УФ), чтобы оценить количественное содержание вторичных метаболитов лишайников. Для этого исходную ацетоновую вытяжку мы разбавили в 25 раз, что вызвано минимальным объёмом жидкости (5 мл) для исследования, а также высокой концентрацией веществ в вытяжке. В качестве контроля использовали чистый ацетон.

Для фитоиндикационной оценки экологических факторов мы обрабатывали данные кафедры экологии, ботаники и охраны природы по стационарным пробным площадям в Красносамарском лесном массиве, откуда и были собраны наши образцы. В связи с этим нами были посчитаны баллы трофотопы, гигротопы, гелиотопы и климатопы по формуле, предложенной Н. М. Матвеевым:

$$A = \frac{\sum k_i \cdot x_i}{\sum k_i},$$

где А – искомая градация определяемого экологического режима;

x_i – экологический оптимум i -го вида или i -той экоморфной группы видов; k_i – проективное покрытие в % i -го вида [8].

Математическая обработка полученных данных была осуществлена с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2016.

Результаты и их обсуждения

В исследуемых лишайниках, после ТСХ и метода микрокристаллизации нами было обнаружено 6 видов лишайниковых веществ. К ним относятся следующие вторичные метаболиты: у *Cladonia fimbriata* – фумарпроточеттаровая кислота, у *Evernia mesomorpha* – диварикатовая кислота, у *Hypogymnia physodes* – атранорин и физодаловая кислота, у *Parmelia sulcata* – атранорин и салациновая кислота, у *Xanthoria parietina* – париедин.

После ТСХ и микрокристаллизации были получены фотографии следующих чистых веществ: атранорин, диварикатовая кислота, париедин, салациновая, физодаловая, фумарпроточеттаровая кислоты (рис. 2).

Оказалось, что разные вторичные метаболиты кристаллизуются в разных частях капли экстракта при высыхании растворителя (ацетона) на предметном стекле. Так, у самого края капли

следует искать кристаллы атранорина; на периферии капли, но не у самого края – салациновой кислоты и париетина; в центре капли обычно образуются кристаллы фумарпротоцетраровой, физодаловой и диварикатовой кислот.

Результаты по количественному определению кристаллов кислот методом микрокристаллизации представлены в таблице 1. Разбирая данные таблицы 1, мы видим, что преобладающее количество лишайниковых кислот образуется в сообществах на арене, и только фумарпротоцетраровая кислота в большем количестве обнаружена в пойменной дубраве.

Результаты по количественному определению кристаллов кислот методом спектрофотометрии показали следующее, для *Parmelia sulcata*, *Hypogymnia physodes* и *Evernia mesomorpha* общее содержание вторичных метаболитов лишайников в пойменных сообществах накапливается в меньшем количестве, чем в таковых на арене.

А для *Xanthoria parietina* и *Cladonia fimbriata* общее количество вторичных метаболитов, наоборот, накапливается меньше в сообществах на арене.

Анализируя причины выявленных результатов, рассчитаем коэффициенты корреляции суммарного содержания вторичных метаболитов лишайников с экологическими режимами, которые носят предварительный характер на данный момент исследования.

Обнаруживается отрицательная связь средней силы (коэффициент корреляции $0,3 < r < 0,7$) для *Hypogymnia physodes* и слабая ($r < 0,3$) для *Parmelia sulcata* по гигротопу и гелиотопу (табл. 2). Действительно, учитывая защитную функцию лишайниковых кислот от неблагоприятных условий, например, засуха или отсутствие достаточного количества света, можно объяснить повышенное содержание вторичных метаболитов в лишайнике в менее влажных и более тенистых биотопах. Именно такие условия формируются на арене р. Самара, чем и обусловлены полученные нами результаты по количеству лишайниковых веществ. Влияние климатопы и трофотопы менее выраженное, и для разных лишайников имеет разную направленность (табл. 2).

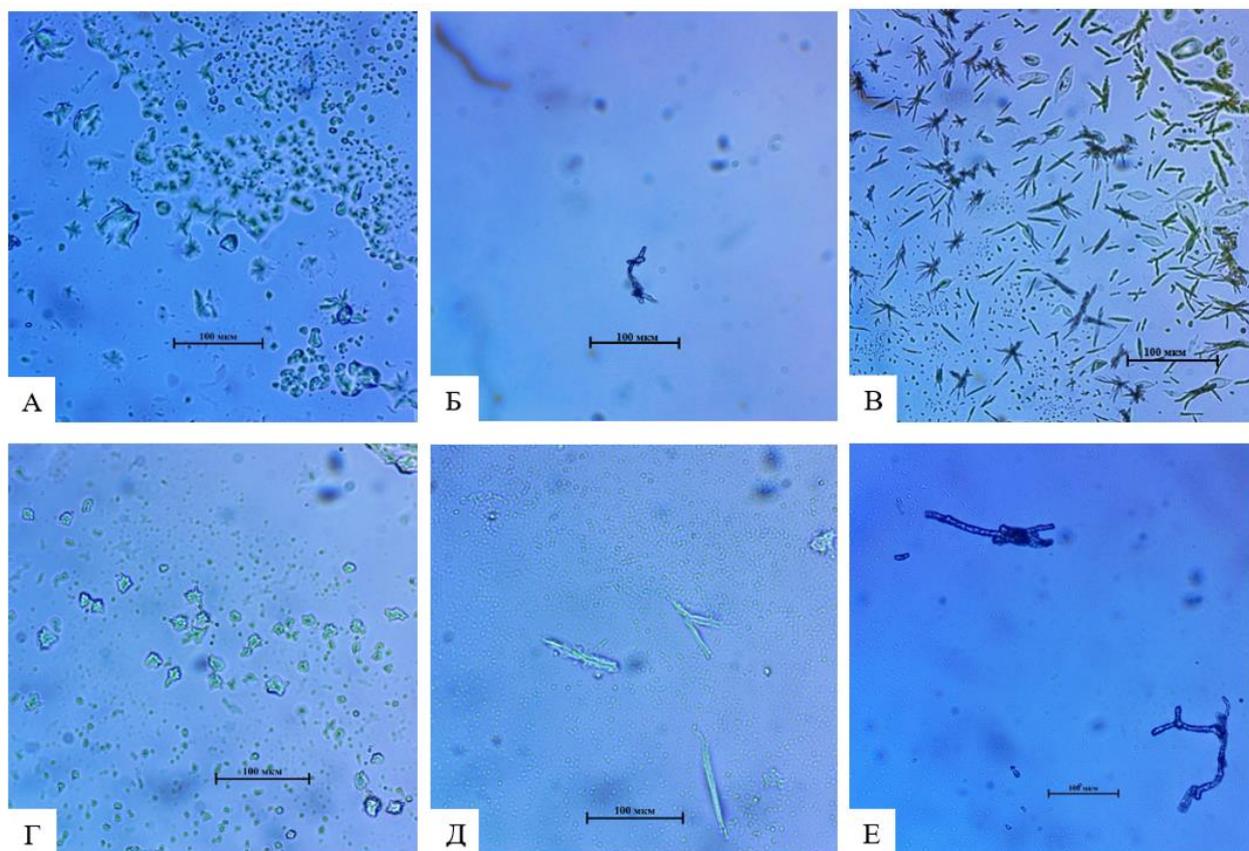


Рис. 2. – Кристаллы вторичных метаболитов лишайников, полученные из ацетоновых экстрактов: А – атранорин; Б – диварикатовая кислота; В – париетин; Г – салациновая кислота; Д – физодаловая кислота; Е – фумарпротоцетраровая кислота

Таблица 1

**Оценка количества вторичных метаболитов лишайников
в талломах в различных типах сообществ, в баллах**

Вид	Название вторичного метаболита	Тип сообщества	Положение в рельефе	
			пойма	арена
<i>Xanthoria parietina</i>	париетин	Осинник	1,50	4,25
<i>Parmelia sulcata</i>	атранорин	Березняк	0	1,25
	салациновая кислота		1,63	0,5
<i>Hypogymnia physodes</i>	атранорин		0,40	0,25
	физодаловая кислота		0	0,13
<i>Parmelia sulcata</i>	атранорин	Дубрава	0,50	0,50
	салациновая кислота		0	1,50
<i>Cladonia fimbriata</i>	фумарпрото-цетраровая кислота		1,25	0,75
<i>Hypogymnia physodes</i>	атранорин		1,00	1,00
	физодаловая кислота		1,00	1,33
<i>Parmelia sulcata</i>	атранорин		Сосняк	0,75
	салациновая кислота	0,50		1,25
<i>Evernia mesomorpha</i>	диварикатовая кислота	0,25		0,50
<i>Hypogymnia physodes</i>	атранорин	1,13		0,50
	физодаловая кислота	0,38		0,50

Таблица 2

**Результаты корреляционного анализа суммарного содержания
вторичных метаболитов лишайников с экологическими режимами биотопа**

Вид	Трофотоп	Гигротоп	Гелиотоп	Климатоп
<i>Parmelia sulcata</i>	-0,48	-0,14	-0,20	-0,16
<i>Hypogymnia physodes</i>	0,03	-0,64	-0,35	0,35

Заключение

Исходя из указания в литературе о защитной роли вторичных метаболитов лишайников, можно предположить о тенденции формирования на арене для большинства изученных нами видов крайне неблагоприятных условий. Выявленную закономерность можно использовать на практике в различных производствах при выборе мест их сбора с наибольшим содержанием действующего вещества в талломах. Так оказалось, что согласно методу микрокристаллизации преобладающее количество лишайниковых кислот образуется в сообществах на арене, и только фумарпротоцетраровая кислота

в большем количестве обнаружена в пойменной дубраве. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил влияние положения в рельефе и отсутствие такового в зависимости от типа сообществ на накопление вторичных метаболитов лишайников. В талломе *Parmelia sulcata* независимо от сообщества и типа рельефа атранорин накапливается в 1,1–2,4 раза больше, чем салациновая кислота, а у *Hypogymnia physodes* накапливается физодаловая кислота в 1,3–3,9 раза больше, чем атранорин, кроме сосняка на арене.

Выявляется отрицательная связь средней силы для *Hypogymnia physodes* и слабая

для *Parmelia sulcata* по гигротопу и гелиотопу. Влияние климатопы и трофотопы менее выраженное и для разных лишайников имеет разную направленность. В талломах *Parmelia sulcata*, *Hypogymnia physodes* и *Evernia mesomorpha* суммарное содержание лишайниковых кислот больше в пойменных сообществах, чем в таковых на арене, а в *Xanthoria parietina* и *Cladonia fimbriata* – наоборот.

Литература

1. Мучник Е. Э. Учебный определитель лишайников Средней России: учебно-методическое пособие. Рязань: Рязанский государственный университет имени С. А. Есенина, 2011. 359 с.
2. Годовая динамика содержания усниновой кислоты в талломах лишайников родов *Cladonia* и *Flavocetraria*, произрастающих в Центральной Якутии / И. А. Прокопьев [и др.] // Химия растительного сырья. 2015. № 4. С. 45-49.
3. Сезонные изменения содержания усниновой кислоты в талломах некоторых лишайников, произрастающих в условиях Центральной Якутии / Н. П. Гладкина [и др.] // Новые материалы и технологии в условиях Арктики: мат-лы междунар. симпозиума. Якутск: Логос, 2014. С. 85-89.
4. Слонов Т. Л., Слонов Л. Х. Лишайниковые кислоты и фитомасса избранных видов лишайников // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2010. № 5. С. 79-82.
5. Влияние экологических условий на накопление вторичных метаболитов лишайников рода *Cladonia* и семейства Parmeliaceae / Е. С. Корчиков [и др.] // Самарский научный вестник. 2021. Т. 10, № 3. С. 58-63.
6. Корчиков Е. С. Разнообразие растений и лишайников в долинных лесах степной зоны (на примере Красносамарского лесного массива) // Вестник Самарского государственного университета. Естественная серия. 2007. № 8 (58). С. 109-119.
7. Orange A., James W., White F. J. Microchemical methods for the identification lichens. London: British Lichen Society, 2010. 104 p.
8. Матвеев Н. М. Биоэкологический анализ флоры и растительности (на примере лесостепной и степной зоны) // Самара: Самарский университет, 2006. 311 с.

ABIOTIC FACTORS INFLUENCE FOR THE ACCUMULATION OF LICHEN SUBSTANCES

A. P. Kasyanova, E. S. Korchikov

In this work, qualitative and quantitative assessments of the content of secondary metabolites of lichens of the following species were carried out for the first time: *Cladonia fimbriata*, *Evernia mesomorpha*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*, *Xanthoria parietina* – by microcrystallization and spectrophotometric method, and also studied the dependence of the accumulation of lichen substances on the position in the relief and the type of community. In the thallomas of the studied species, 6 secondary metabolites were found: atranorine, divaricatic, salacinic, physodalic, fumarprotocetraric acids and parietin. The microcrystallization method showed that the predominant amount of lichen acids is formed in communities in the arena, and only fumarprotocetraric acid is found in greater quantities in floodplain oakwood. And the method of spectrophotometry showed that in the thallomas of *Parmelia sulcata*, *Hypogymnia physodes* and *Evernia mesomorpha*, the total content of lichen acids is higher in floodplain communities than in those in the arena, and in *Xanthoria parietina* and *Cladonia fimbriata* – on the contrary.

Key words: lichens; secondary metabolites; arena; floodplain; ecological factors; biotope; phytoindication; spectrophotometry.

Статья поступила в редакцию 25.06.2023 г.

© Kasyanova A. P., Korchikov E. S., 2023.

Kasyanova Anastasia Pavlovna (anastasiakasyanova22@mail.ru), IIIth year student of the Biological Faculty;
Korchikov Evgeny Sergeevich (evkor@inbox.ru),
associate professor of the Department of Ecology, Botany and Nature Protection of Samara University,
443086, Russia, Samara, Moskovskoye shosse, 34.