

БИОЛОГИЯ

УДК 57.04

ВЛИЯНИЕ ТИПА СООБЩЕСТВ И ПОЛОЖЕНИЯ В РЕЛЬЕФЕ 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*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*, *Physconia enteroxantha*, *Xanthoria parietina* – методом микрокристаллизации и спектрофотометрии, а также изучили зависимость накопления лишайниковых веществ от положения в рельефе и типа сообщества. В талломах изучаемых видов было обнаружено 9 вторичных метаболитов: атранорин, диварикатовая, салациновая, физодаловая, фумарпротоцеттаровая, усниновая, эверновая кислоты, париедин и секалоновая кислота А. Для *Cladonia fimbriata* метод микрокристаллизации не подходит для корректной оценки содержания фумарпротоцеттаровой кислоты; для *Evernia mesomorpha* данные по обоим методам анализа сопоставимы; у *Evernia prunastri* содержание атранорина и усниновой кислоты можно достоверно оценить любым методом, а содержание эверновой кислоты совпадает лишь на 75 %; точность метода микрокристаллизации для *Hypogymnia physodes* составляет 83 % у физодаловой кислоты, а у атранорина – 66 %, для салациновой кислоты и атранорина у *Parmelia sulcata* – 56 %, для *Physconia enteroxantha* – 73 %, а у *Xanthoria parietina* – 75 %. Также метод спектрофотометрии показал, что содержание фумарпротоцеттаровой кислоты в *Cladonia fimbriata* в березняках в 4 раза превышает таковое в дубравах и сосняках независимо от рельефа; наибольшее количество вторичных метаболитов в *Hypogymnia physodes* накапливается в дубравах; при произрастании в сосняках независимо от рельефа – в 2–8 раз больше, чем в березняках; у *Parmelia sulcata* содержание атранорина и салациновой кислоты в березняках, дубравах и сосняках в 1,5–4,3 раза больше, чем в осинниках; у *Physconia enteroxantha* выявляется тенденция большего накопления секалоновой кислоты А в дубравах. Двухфакторный дисперсионный анализ без повторений для *Cladonia fimbriata*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata* и *Physconia enteroxantha* показал, что тип сообщества достоверно влияет на накопление лишайниковых веществ, кроме *Physconia enteroxantha*, а положение в рельефе не выявило никакой зависимости.

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

Для фитоиндикации биотопа можно использовать разные биологические объекты: цветковые растения, мохообразные или лишайники. Лишайники же, обитая в наземно-воздушной среде, позволяют охарактеризовать экологические условия, например, аэротопа; 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, по своей природе разделяются на две основные группы: первичные и вторичные метаболиты. Первичные метаболиты – это белки, аминокислоты, полисахариды, витамины и прочие органические соединения, которые синтезируются фотобионтом

© Касьянова А. П., Корчиков Е. С., 2024.

Касьянова Анастасия Павловна (anastasiakasyanova22@mail.ru),

студент IV 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.

или микобионтом и находятся внутри их клеток – часто они растворимы в воде.

Вторичные лишайниковые вещества синтезируются микобионтом, хотя углерод, необходимый для их синтеза, грибной компонент лишайника получает от синтезирующего органические соединения фотобионта. Вторичные метаболиты находятся в талломе лишайника экстрацеллюлярно и обычно они нерастворимы в воде. 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].

Кроме того, сами процессы накопления веществ в лишайниках довольно слабо изучены. Так, например, было отмечено, что повышение количества аллопротолихестериновой и протолихестериновой кислот в талломе *Flavocetraria cucullata* происходит в период с марта по июль – это увеличение концентрации веществ, связывают именно с активацией метаболического процесса в данное время [2]. Конечно, здесь следует учитывать, что в талломах лишайников содержание воды колеблется в самых широких пределах, в связи с чем довольно сложно проводить исследования по изучению химического состава данных организмов. Тем не менее есть указания в литературе, что наибольшее содержание вторичных лишайниковых метаболитов наблюдается в местах с частым выпадением осадков, например, в условиях лесного пояса. Было выявлено также, что вторичные лишайниковые вещества не накапливаются с возрастом лишайника, что они являются соединениями, которые активно используются в их обмене веществ [3].

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].

Лишайникобразующие грибы способны синтезировать биологически активные вещества, например, с антибактериальной активностью, противовирусной, антибиотической и другими формами активности, которые находят своё применение в фармакологии и медицине [4].

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 [5].

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, 2).

Таким образом, в сосняках нами были собраны такие виды как *Cladonia fimbriata*, *Evernia mesomorpha*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*; в березняках – *Cladonia fimbriata*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*, *Physconia enteroxantha*; в осинниках – *Xanthoria parietina*, *Parmelia sulcata*, *Physconia enteroxantha*; в дубравах – *Cladonia fimbriata*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*, *Physconia enteroxantha*.

Собранные образцы были очищены, взвешены в количестве от 0,003 до 0,006 г на весах СВЛ 220Н и залиты в 5 мл хлороформом на 3 дня. Мы выбрали в качестве элюента хлороформ, так как он является полярным растворителем, в котором лучше растворяется большинство, изучаемых нами вторичных метаболитов лишайников.

После нам необходимо было получить чистые вещества, для чего мы использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) [6].

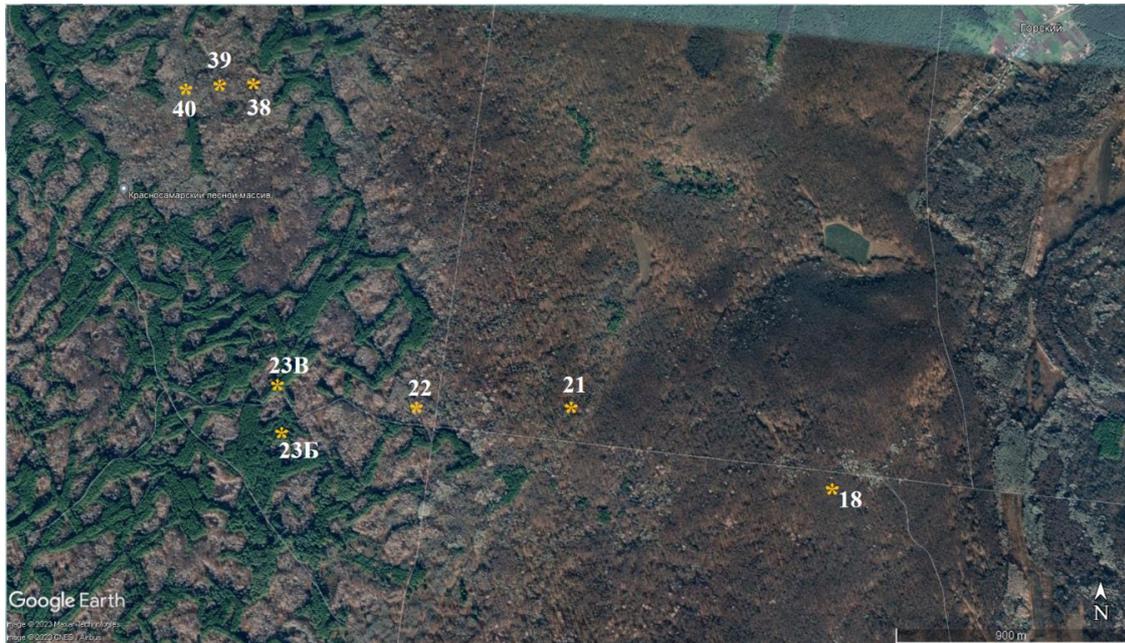


Рис. 1. Район исследования: звёздочкой (*) отмечены исследуемые пробные площади на арене (18, 38 – дубравы, 21, 39 – осинники, 22, 40 – березняки, 23Б, 23В – сосняки)



Рис. 2. Район исследования: звёздочкой (*) отмечены исследуемые пробные площади в пойме (33, 35 – дубравы, 8В, 16ГП – осинники, 8Б, 8А – березняки, 13, 13Б – сосняки)

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 50–60 °С. 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 °С 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* [6] 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 TourView 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 из лишайника, капали на предметное стекло и просматривали на микроскопе под увеличением $\times 40$, кроме секалоновой кислоты А – её рассматривали под увеличением $\times 90$. Четыре поля зрения каждой капли фотографировали, чтобы оценить количественное 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 вытяжку лишайника с хлороформом мы колориметрировали при $\lambda = 190\text{--}600$ нм с шагом сканирования 1 нм и при оптической длине кюветы 10 мм.

Двухфакторный дисперсионный анализ без повторений был осуществлён с помощью пакета прикладных программ MS Excel 2016.

Результаты и их обсуждение

В исследуемых лишайниках после ТСХ и метода микрокристаллизации нами было обнаружено 9 видов лишайниковых веществ. К ним относятся следующие вторичные метаболиты: у *Cladonia fimbriata* – фумарпротоцеттаровая кислота, у *Evernia mesomorpha* – диварикатовая кислота, у *Evernia prunastri* – атранорин, усниновая и эверновая кислоты, у *Hypogymnia physodes* –

атранорин и физодаловая кислота, у *Parmelia sulcata* – атранорин и салациновая кислота, у *Physconia enteroxantha* – секалоновая кислота А, у *Xanthoria parietina* – париедин. Отметим, что ряд соединений, указанных в литературе, не было обнаружено в изученных образцах.

После ТСХ и микрокристаллизации были получены фотографии следующих чистых веществ: атранорин, диварикатовая кислота, париедин, салациновая кислота, секалоновая кислота А, усниновая, физодаловая, фумарпротоцеттаровая и эверновая кислоты. Ранее нами были опубликованы фотографии кристаллов атранорина, диварикатовой кислоты, париедина, салациновой, физодаловой, фумарпротоцеттаровой кислот [7], а на рисунке 3 представлены фотографии трёх новых кислот, которые мы получили в этом году.

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, секалоновой кислоты А и эверновой кислоты; на периферии капли, но не у самого края – салациновой кислоты и париедина; в центре капли обычно образуются кристаллы диварикатовой, усниновой, фумарпротоцеттаровой и физодаловой кислот.

Результаты по количественному определению лишайниковых веществ методом микрокристаллизации и методом спектрофотометрии показали следующее. Можно сказать, что для *Cladonia fimbriata* метод микрокристаллизации не подходит для корректной оценки содержания фумарпротоцеттаровой кислоты, что может быть связано с низкой концентрацией вторичного метаболита и наличием обильных соредий, которые могли помешать как микрокристаллизации, так и спектрофотометрии. Для *Evernia mesomorpha* данные по обоим методам анализа сопоставимы. У *E. prunastri* содержание атранорина и усниновой кислоты можно достоверно оценить любым изученным нами методом, а содержание эверновой кислоты совпадает лишь на 75%. Для *Hypogymnia physodes* точность метода микрокристаллизации составляет 83% у физодаловой кислоты, а у атранорина всего 66%, что касается салациновой кислоты и атранорина у *Parmelia sulcata*, то здесь она всего лишь 56%, для *Physconia enteroxantha* метод микрокристаллизации показывает точность в 73%, а у *Xanthoria parietina* – 75%.

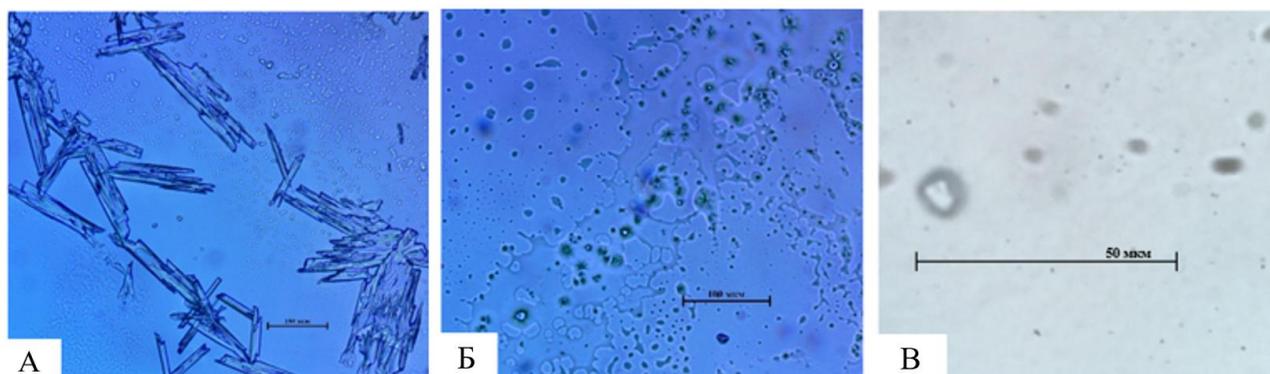


Рис. 3. Кристаллы вторичных метаболитов лишайников, полученные из ацетоновых экстрактов: А – усниновая кислота; Б – эверновая кислота; В – секалоновая кислота

Разберём влияние типа сообществ и рельефа на концентрацию лишайниковых веществ. Оказалось, что содержание фумарпроцеттаровой кислоты в *Cladonia fimbriata* в березняках в 4 раза превышает таковое в дубравах и сосняках независимо от рельефа. Скорее всего, это связано с гидрофобными свойствами данного лишайникового вещества [2], что даёт *Cladonia fimbriata* преимущество при произрастании в мезогигрофитных условиях березняков, по сравнению с мезофитными и ксеромезофитными условиями в дубравах и сосняках соответственно.

В связи с тем, что *Evernia mesomorpha*, *Evernia prunastri* и *Xanthoria parietina* были нами обнаружены только в одном типе сообществ (сосняках, дубравах и осинниках соответственно), то не прослеживается зависимость накопления содержания вторичных метаболитов лишайников от лесной формации для данных видов, однако, мы можем уверенно сказать, что положение в рельефе также не оказывает влияния. Наибольшее количество вторичных метаболитов в *Hypogymnia physodes* накапливается в дубравах, что может быть связано с нехарактерным субстратом в виде коры дуба черешчатого для данного вида лишайника [8]. Отметим, что при произрастании *Hypogymnia physodes* в сосняках, независимо от рельефа, накапливается в 2–8 раз больше лишайниковых веществ, чем в березняках, что может быть также связано с особенностями лишайника при произрастании на разном субстрате, хотя и схожем по кислотности, так как кора берёзы повислой для данного вида является наиболее характерным типом субстрата [8]. У *Parmelia sulcata* можно выявить влияние лишь осинников на накопление

атранорина и салациновой кислоты, несмотря на положение в рельефе – концентрация данных веществ в березняках, дубравах и сосняках в 1,5–4,3 раза превышает, чем в осинниках. Это, вероятно, связано с близкими значениями кислотности коры берёзы повислой, дуба черешчатого и сосны обыкновенной (рН = 3,7–5,4), в отличие от осины (рН = 5,6–6,4) [8]. У *Physconia enteroxantha* выявляется тенденция большего накопления секалоновой кислоты А в дубравах, по сравнению с березняками и осинниками, хотя разница по абсолютному значению невелика. Скорее всего, это результат специфической реакции на нехарактерный для неё субстрат в виде коры осины и берёзы повислой.

Рассматривая двухфакторный дисперсионный анализ без повторений для *Cladonia fimbriata*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata* и *Physconia enteroxantha*, мы можем сказать, что тип сообщества достоверно влияет на накопление лишайниковых веществ, кроме *Physconia enteroxantha*, а положение в рельефе не выявило никакой зависимости (таблица 1).

Заключение

Для *Cladonia fimbriata* метод микрокристаллизации не подходит для корректной оценки содержания фумарпроцеттаровой кислоты, для *Evernia mesomorpha* данные по обоим методам анализа сопоставимы. У *E. prunastri* содержание атранорина и усниновой кислоты можно достоверно оценить любым методом, а содержание эверновой кислоты совпадает лишь на 75 %, точность метода микрокристаллизации для *Hypogymnia physodes* составляет 83 % у физодоловой кислоты, а у атранорина – 66 %, для салациновой

кислоты и атранорина у *Parmelia sulcata* – 56 %, для *Physconia enteroxantha* – 73 %, а у *Xanthoria parietina* – 75 %.

Содержание фумарпротоцетраровой кислоты в *Cladonia fimbriata* в березняках в 4 раза превышает таковое в дубравах и сосняках независимо от рельефа. Наибольшее количество вторичных метаболитов в *Hypogymnia physodes* накапливается в дубравах; при произрастании в сосняках независимо от рельефа – в 2–8 раз больше, чем в березняках. У *Parmelia sulcata* содержание атранорина и салициновой кислоты в березняках, дубравах и сосняках в 1,5–4,3 раза больше, чем в осинниках. У *Physconia enteroxantha* выявляется тенденция большего накопления секалоновой кислоты А в дубравах. Двухфакторный дисперсионный анализ без повторений для *Cladonia fimbriata*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata* и *Physconia enteroxantha* показал, что тип сообщества достоверно влияет на накопление лишайниковых веществ, кроме *Physconia enteroxantha*, а положение в рельефе не выявило никакой зависимости.

Литература

1. Мучник Е. Э. Учебный определитель лишайников Средней России. Рязань: Рязанский государственный университет имени С. А. Есенина, 2011. 359 с.
2. Годовая динамика вторичных метаболитов в талломах *Cetraria laevigata* и *Flavocetraria cucullata* в условиях Централь-

ной Якутии / И. А. Прокопьев [и др.] // Природные ресурсы Арктики и Субарктики. 2020. Т. 25. № 1. С. 94-100.

3. 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.

4. 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.

5. Корчиков Е. С. Разнообразие растений и лишайников в долинных лесах степной зоны (на примере Красносамарского лесного массива) // Вестник Самарского государственного университета. Естественнаучная серия. 2007. № 8 (58). С. 109–119.

6. Orange A., James P. W., White F. J. Microchemical methods for the identification lichens. London: British Lichen Society, 2010. 104 p.

7. Касьянова А. П., Корчиков Е. С. Влияние абиотических факторов на накопление лишайниковых веществ // Вестник молодых учёных и специалистов Самарского университета. 2023. № 2 (23). С. 39–45.

8. Корчиков Е. С. Лишайники Самарской Луки и Красносамарского лесного массива. Самара: Самарский государственный университет, 2011. 320 с.

Таблица 1

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа без повторений накопления вторичных метаболитов для некоторых видов лишайников в зависимости от типа сообщества и положения в рельефе

Вид лишайника	Вторичные метаболиты лишайника	Тип сообщества	Положение в рельефе
<i>Cladonia fimbriata</i>	Фумарпротоцетраровая кислота	+	–
<i>Hypogymnia physodes</i>	Атранорин	+	–
<i>Hypogymnia physodes</i>	Физодаловая кислота	+	–
<i>Parmelia sulcata</i>	Атранорин	+	–
<i>Parmelia sulcata</i>	Салициновая кислота	+	–
<i>Physconia enteroxantha</i>	Секалоновая кислота А	–	–

THE INFLUENCE OF THE TYPE OF COMMUNITIES AND THE POSITION IN THE RELIEF ON 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*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*, *Physconia enteroxantha*, *Xanthoria parietina* – by microcrystallization and spectrophotometry, 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, 9 secondary metabolites were found: atranorine, divaricatic, salacinic, physodalic, fumarprotocetraric, usnic, evernic acids, parietin and secalonic acid A. For *Cladonia fimbriata*, the microcrystallization method is not suitable for the correct assessment of the content of fumarprotocetraric acid; for *Evernia mesomorpha*, the data for both analysis methods are comparable; for *Evernia prunastri*, the content of atranorine and usnic acid can be reliably estimated by any method, and the content of evernic acid is only 75 %; the accuracy of the microcrystallization method for *Hypogymnia physodes* is 83% for physodalic acid, and for atranorine – 66%, for salacinic acid and atranorine in *Parmelia sulcata* – 56%, for *Physconia enteroxantha* – 73%, and for *Xanthoria parietina* – 75%. The spectrophotometry method also showed that the content of fumarprotocetraric acid in *Cladonia fimbriata* in birch forests is 4 times higher than that in oak forests and pine forests, regardless of terrain; the largest number of secondary metabolites in *Hypogymnia physodes* accumulates in oak forests; when growing in pine forests, regardless of the relief, it is 2–8 times more than in birch forests; in *Parmelia sulcata*, the content of atranorine and salacinic acid in birch forests, oak forests and pine forests is 1.5 – 4.3 times higher than in aspen forests; in *Physconia enteroxantha*, a tendency to greater accumulation of secalonic acid A in oak forests is revealed. Two-factor analysis of variance without repetition for *Cladonia fimbriata*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata* and *Physconia enteroxantha* showed that the type of community significantly affects the accumulation of lichen substances, except for *Physconia enteroxantha*, and the position in the relief did not reveal any dependence.

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

Статья поступила в редакцию 28.05.2024 г.

© Kasyanova A. P., Korchikov E. S., 2024.

Kasyanova Anastasia Pavlovna (anastasiakasyanova22@mail.ru), 4th year student of the faculty of biology;
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.