

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

ОСОБЕННОСТИ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЛИПИДОВ ТАЛЛОМА ЛИШАЙНИКА *HYPOGYMNI PHYSODES (L.) NYL.*

Ветчинникова Л.В.

*Институт леса Карельского научного центра РАН,
г. Петрозаводск, доктор биол. наук, доцент*

Андросова В.И.

*Петрозаводский государственный университет,
г. Петрозаводск, канд. биол. наук,
доцент*

Морозова И.В.

*Институт леса Карельского научного центра РАН,
г. Петрозаводск, старший биолог*

Серебрякова О.С.

*Институт леса Карельского научного центра РАН,
г. Петрозаводск, старший биолог*

PATTERNS OF FATTY ACIDS COMPOSITION OF LIPIDS IN THE THALLUS OF A LICHEN HYPOGYMNI PHYSODES (L.) NYL.

Vetchinnikova L.V., Forest Research Institute, Karelian research Centre, Russian Academy of Science Petrozavodsk, Doctor of Biological Sciences, Associate professor

Androsova V.I., Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Candidate of Biological Sciences, Associate professor

Morozova I.V., Forest Research Institute, Karelian research Centre, Russian Academy of Science Petrozavodsk, Senior biologist

Serebrjakova O.S., Forest Research Institute, Karelian research Centre, Russian Academy of Science Petrozavodsk, Senior biologist

АННОТАЦИЯ

Представлены результаты изучения жирнокислотного состава липидов талломов лишайника *Hypogymnia physodes (L.) Nyl.*, произрастающего в различных условиях антропогенной нагрузки. Выявлены особенности жирнокислотного состава нейтральных липидов, фосфо- и гликолипидов. В частности, нейтральные липиды характеризуются накоплением олеиновой (около 50%) и линолевой (около 35%) жирных кислот, в фосфолипидах преобладает линолевая (более 50%), а в гликолипидах – линоленовая (35–40%). В гликолипидах, кроме того, присутствуют тетраеновые жирные кислоты (около 15%), отсутствующие в других фракциях липидов. По всей вероятности, это обусловлено физиологическими особенностями талломов лишайника *Hypogymnia physodes*, которые реализуются на клеточном уровне. Кроме того, обнаружена тенденция возрастания количества липидов, а также доли линоленовой кислоты как в глико-, так и фосфолипидах в «условно загрязненном» районе произрастания, что свидетельствует о включении биохимических механизмов адаптации талломов лишайника в условиях повышенной антропогенной нагрузки.

ABSTRACT

The results of the study of fatty acids composition of lipids in the thallus of a lichen *Hypogymnia physodes (L.) Nyl.* under different levels of pollution are presented. The patterns of the fatty acids composition of neutral lipids, phospholipids and glycolipids were investigated. Neutral lipids were characterized by accumulation of oleic (50%) and linoleic (35%) fatty acids, phospholipids – linoleic acid (50%) and glycolipids – linolenic acid (35–40%). In addition, glycolipids contained tetraene fatty acids (about 15%) which were absent in other lipids fractions. It might be due to physiological characteristics of thallus of *Hypogymnia physodes*, which are realized at the cellular level. Moreover, under polluted conditions the trend of increasing of lipids amount, as well as the proportions of linolenic acid in the glycolipids and phospholipids was registered. Thus, obtained results showed the involving of the biochemical mechanisms of lichen thallus adaptation under high anthropogenic load.

Ключевые слова: *Hypogymnia physodes*, нейтральные липиды, фосфолипиды, гликолипиды, жирные кислоты.

Keywords: *Hypogymnia physodes*, neutral lipids, phospholipids, glycolipids, fatty acids.

Введение

Лишайники представляют собой симбиотическую ассоциацию гетеротрофного грибного организма (микобионта) и автотрофных прокариотических (синезеленых водорослей) или эукариотических (водорослей) организмов (фотобионта) [1, 2, 3, 4, 5]. Помимо специфической морфоструктурной организации лишайники характеризуются также особыми биохимическими, физиологическими и экологическими свойствами, благодаря чему они широко используются в биологическом мониторинге окружающей среды [6, 7 и др.]. Однако успешность дальнейшего усовершенствования и практического применения лишайниковых методов мониторинга антропогенной нагрузки, по всей вероятности, в значительной степени будет определяться широтой привлечения физиологических и биохимических методов исследования. Это обусловлено тем, что разные виды лишайников могут иметь различные механизмы устойчивости к действию антропогенных факторов среды [8]. В отечественной и зарубежной литературе достаточно широко освещены вопросы, касающиеся морфологии и экологии лишайников [9, 10, 11, 12, 13 и др.], однако по физиологии и биохимии этих организмов, число публикаций значительно меньше. Так, практически открытыми остаются вопросы липидного обмена, хотя именно липиды, будучи важнейшим элементом клеточных мембран, во многом определяют функциональную и биологическую активность талломов, а также особенности реакции лишайников на воздействие внешних факторов среды. Имеющиеся в этом отношении работы, посвященные анализу содержания липидов и жирных кислот в талломах *Xanthoria parietina* L. [14], *Rhizoplaca peltata* (Ramond) Leuckert & Poelt. [15, 16], до недавнего времени носили единичный

характер. Однако, нельзя не отметить постепенно возрастающий интерес к изучению состава и содержания липидов в талломах лишайников в последнее десятилетие [17, 18, 19], в том числе и при оценке их реакции на загрязнение окружающей среды [20, 21, 22, 23].

Исходя из вышесказанного, цель данной работы состояла в установлении особенностей жирнокислотного состава разных фракций липидов талломов лишайника *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., обитающего в различных по антропогенной нагрузке условиях.

Материалы и методы

Объектом исследования был листоватый лишайник Гипогимния вздутая *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. (рис. 1, А), широко распространенный на стволах и ветвях лиственных и хвойных деревьев. Фотобионтом этого вида являются водоросли рода *Trebouxia* [24]. Сбор образцов талломов проводился на постоянных пробных площадях, заложенных в сосняках брусничных зеленомошных в двух районах Петрозаводского городского округа с разной степенью антропогенной нагрузки (рис. 1, Б): Ботанический сад ПетрГУ (61°84.08' с.ш. 34°39.26' в.д.) и микрорайон «Перевалка» (61°79.35' с.ш. 34°29.77' в.д.). Ботанический сад ПетрГУ («условно чистый» район) является особо охраняемой природной территорией и отделен от основной части города акваторией Онежского озера. Сосновые сообщества в микрорайоне «Перевалка» («условно загрязненный» район) находятся рядом с городской объездной автомобильной дорогой и действующей ТЭЦ. Образцы талломов лишайника *Hypogymnia physodes* отбирались с 3-х учетных деревьев *Pinus sylvestris* L. с северной стороны стволов на высоте 1,3 м от земли.

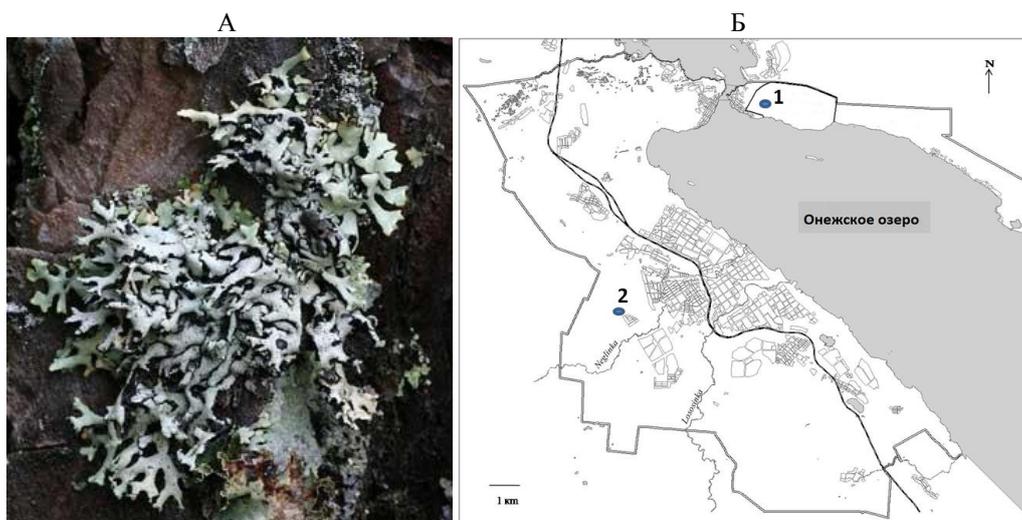


Рис. 2. Внешний вид лишайника *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. (А) и схема расположения пробных площадей (г. Петрозаводск): «условно чистый» район (Ботанический сад ПетрГУ) – 1, «условно загрязненный» район (м-н «Перевалка») – 2, (Б). По: <http://maps.edu.karelia.ru/>

Липиды экстрагировали смесью хлороформа и метанола в соотношении 2:1 по объему [25] и разделяли на фракции методом колоночной хроматографии. Нейтральные липиды элюировали хлороформом, гликолипиды – ацетоном, фосфолипиды – метанолом. Метилирование – превращение жирных кислот в их метиловые эфиры – проводили с помощью абсолютного хлороформа и ацетилхлорида. Жирные кислоты в виде их метиловых эфиров анализировали на газожидкостном хроматографе «Хроматэк – Кристалл-5000 М.1» (Россия) при температуре капиллярной колонки Zebtron ZB-FFAP – 225 °С (изотерма). Скорость потока газа-носителя (азота) 50 мл/мин. Идентификацию жирных кислот осуществляли с помощью стандартного набора метиловых эфиров жирных кислот («Supelco», 37 компонентов), а также сопоставлением эквивалентной длины цепи экспериментально полученных компонентов с известными данными. Все жирные кислоты распределяли по группам в зависимости от степени ненасыщенности: моноеновые – в углеродной цепочке имеется одна двойная связь; диеновые – две двойные связи; триеновые – три двойные связи; тетраеновые – четыре двойные связи и насы-

щенные – двойные связи в углеродной цепочке отсутствуют. Все измерения проводили в трех повторностях.

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с помощью параметрических критериев, а также непараметрического анализа, с применением критериев Спирмена и Вилкоксона-Манна-Уитни [26].

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что в липидах исследованных талломов лишайника *Hypogymnia physodes* преобладают нейтральные липиды (около 4% от абс. сух. вещества) (табл. 1). Среди мембранных содержание гликолипидов по сравнению с фосфолипидами было в два раза выше. При этом независимо от фракции отмечено более высокое накопление липидов в условиях с высокой степенью антропогенной нагрузки. Применение коэффициента ранговой корреляции Спирмена подтвердило наличие значимых различий между изученными образцами талломов (при $P=0,05$; $R_s=1$). Следует отметить, что фракция нейтральных липидов, например, у бриофитов может составлять от 30 до 85% от общих липидов, а полярных липидов – всего от 3

Таблица 1.

Содержание разных фракций липидов в талломах лишайника *Hypogymnia physodes* (в % от абс. сух. вещества) в зависимости от условий антропогенной нагрузки

Фракция липидов	Район исследования	
	«условно чистый»	«условно загрязненный»
Нейтральные	3,9±0,2	4,3±0,2
Фосфолипиды	0,8±0,0	1,7±0,1
Гликолипиды	2,7±0,1	3,0±0,3

до 30% [27]. Анализ мембранных липидов, показал, что в клетках зеленых водорослей рода *Pseudococcomyxa* также доминируют гликолипиды [28]. По всей вероятности, это связано с местом локализации липидов и их функциями, выполняемыми в клетке.

Сопоставление полученных данных также свидетельствует, что жирнокислотный состав отдельных фракций липидов талломов лишайника

Hypogymnia physodes представлен как насыщенными, так и ненасыщенными жирными кислотами, однако во всех фракциях преобладали ненасыщенные жирные кислоты (табл. 2). Наиболее заметные различия были выявлены в соотношении моно-, ди- и триеновых жирных кислот. Например, в нейтральных липидах доминирующими группами среди ненасыщенных были моноеновые (от 38 до 51% от суммы жирных кислот) и диеновые (от 34 до 45% от

Табл. 2.

Групповой состав жирных кислот (по степени ненасыщенности) в разных фракциях липидов талломов *Hypogymnia physodes* (в % от суммы жирных кислот) в условиях с разной степенью антропогенной нагрузки

Жирные кислоты	Район исследования	
	«условно чистый»	«условно загрязненный»
Нейтральные липиды		
Насыщенные	11,65±0,98	11,45±0,23
Моноеновые	51,19±1,12	38,43±2,11
Диеновые	34,35±0,89	45,64±2,75
Триеновые	2,56±0,15	4,48±0,67
Тетраеновые	0,25±0,04	0,00
Фосфолипиды		
Насыщенные	14,77±0,23	17,6±0,34
Моноеновые	21,46±1,11	19,44±0,26
Диеновые	53,85±2,15	51,61±2,16
Триеновые	9,65±0,25	11,35±0,76
Тетраеновые	0,27±0,01	0,00
Гликолипиды		
Насыщенные	11,78±0,12	10,98±0,23
Моноеновые	12,99±0,45	12,93±0,67
Диеновые	23,37±1,02	21,24±0,78
Триеновые	36,93±2,13	39,87±2,04
Тетраеновые	14,93±0,47	14,98±0,13

суммы жирных кислот). Триеновые ненасыщенные жирные кислоты в нейтральных липидах составили не более 4,5% от суммы жирных кислот. Это может свидетельствовать о накоплении в талломах лишайников большого количества запасных питательных веществ в изученных местообитаниях. Сравнительный анализ исследованных талломов лишайника в условиях разной антропогенной нагрузки, во фракции нейтральных липидов выявил увеличение доли диеновых жирных кислот в местообитаниях с повышенной антропогенной нагрузкой на фоне их снижения в условиях, близких к естественным. Этот факт свидетельствует о возможности накопления в талломах запасных питательных веществ в более благоприятных условиях «условно чистой» территории Ботанического сада по сравнению с условиями повышенной антропогенной нагрузки в городских условиях. По всей вероятности, жирнокислотный состав липидов является важным показателем физиологического состояния лишайников и может быть использован для характеристики места их обитания.

В фосфолипиде преобладали диеновые ненасыщенные жирные кислоты (более 50% от суммы жирных кислот) независимо от условий местообитания изученного вида (табл. 2).

В гликолипидах наблюдали преимущественное содержание триеновых жирных кислот, которые составили почти 40% от суммы жирных кислот. Отличительной особенностью гликолипидов явилось довольно высокое (до 15% от суммы жирных кислот) присутствие в них тетраеновых жирных кислот (табл. 2), что свидетельствует о включении биохимических механизмов адаптации талломов лишайника к условиям повышенной антропогенной нагрузки.

Особый интерес представляет жирнокислотный состав липидов, поскольку они определяют функциональную и биологическую активность лишайников. В талломах *Hypogymnia physodes* ненасыщенные жирные кислоты содержали преимущественно 18 атомов в углеродной цепочке, различающиеся по количеству и положению двойных связей. Так, во фракции нейтральных липидов доминировали олеиновая кислота (около 50% от суммы жирных кислот) и линолевая (35% от суммы жирных кислот) (рис. 2, А), что также свидетельствует о накоплении в талломах изученного вида большого количества запасных питательных веществ. О преобладании в липидах лишайников олеиновой и линолевой жирных кислот отмечалось ранее и в других работах [14, 29].

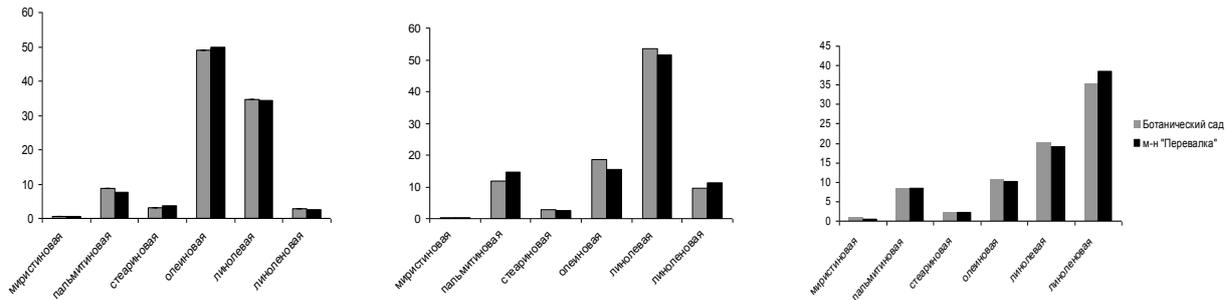


Рис. 1. Жирнокислотный состав нейтральных липидов (а), фосфолипидов (б) и гликолипидов (в) талломов *Hypogymnia physodes* в условиях с разной степенью антропогенной нагрузки

Во фракции фосфолипидов в наибольшем объеме зафиксирована линолевая кислота (более 50% от суммы жирных кислот). В талломах *Hypogymnia physodes* на «условно чистой» территории Ботанического сада, доля этой кислоты составила 54% от суммы жирных кислот, а в «условно загрязненных» сообществах (микрорайон «Перевалка») – 51% от суммы жирных кислот (рис. 2, Б). Высокое содержание линолевой кислоты, выявленное во фракции фосфолипидов, свидетельствует о высокой степени организации клеточных структур, а, следовательно, о высоком уровне адаптации талломов лишайника к окружающим условиям. По всей вероятности, это связано с физиологическими особенностями таллома, которые реализуются на клеточном уровне. Подобные данные о том, что жирные кислоты фосфолипидов отличались от нейтральных липидов уровнем ненасыщенности были также ранее обнаружены, например, в талломах лишайника *Xanthoria parietina* [14].

Фракция гликолипидов лишайника отличалась преобладанием линоленовой кислоты (более 35% от суммы жирных кислот) и характеризовалась еще более высокой степенью ненасыщенности (рис. 2, В). Линоленовая кислота, содержащаяся в гликолипидах, в значительной степени отвечает за формирование фотосистемы фотобионта. Более того, нами выявлена тенденция повышенного ее содержания в талломах лишайника в «условно загрязненной» среде по сравнению с талломами, собранными в «условно чистой» (38 и 35% от суммы жирных кислот), что, по всей вероятности, связано с активизацией процессов фотосинтеза в талломах лишайника в условиях повышенной антропогенной нагрузки. Меньшими значениями (около 20% от суммы жирных кислот) в гликолипидах характеризовалась линолевая кислота, независимо от местообитания лишайника. Использование статистического критерия рангового коэффициента корреляции Спирмена подтвердило значимые различия между содержанием указанных выше жирных кислот в отдельных фракциях. Так при сравнении линолевой и линоленовой кислот в образцах талломов, взятых из разных местообитаний вида, коэффициент Спирмена оказался равен 1 ($r_s=1$), что говорит о достоверных различиях между изучаемыми выборками.

Таким образом, в талломах лишайника *Hypogymnia physodes* наибольшее количество липидов приходится на фракцию нейтральных липидов (около 4% от абс. сух. вещества), а наименьшее – на фракцию фосфолипидов (около 1% от абс. сух. вещества). В наибольшем количестве липиды содержались в талломах лесных сообществ с повышенной степенью антропогенной нагрузки. Выявлены особенности жирнокислотного состава нейтральных липидов, фосфо- и гликолипидов. Так, нейтральные липиды характеризуются накоплением олеиновой (около 50%) и линолевой (около 35%) жирных кислот. В фосфолипидах преобладает линолевая (более 50%), а в гликолипидах – линоленовая (35–40%). В гликолипидах, кроме того, присутствуют тетраеновые жирные кислоты (около 15%), отсутствующие в других фракциях липидов. По всей вероятности, это обусловлено физиологическими особенностями талломов лишайника *Hypogymnia physodes*, которые реализуются на клеточном уровне. Кроме того, обнаружена тенденция возрастания тетраеновых жирных кислот в гликолипидах, а линоленовой кислоты – не только в глико-, но и фосфолипидах в «условно загрязненном» районе произрастания, что свидетельствует о включении биохимических механизмов адаптации талломов лишайника в условиях повышенной антропогенной нагрузки.

Публикация подготовлена по результатам работ, выполненных на оборудовании ЦКП «Аналитическая лаборатория» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института леса Карельского научного центра Российской академии наук

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственных заданий Минобрнауки России (№ 0220-2014-0002 и № 6.724.2014/К), а также при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН (проект № 0220-2015-0014).

Литература

1. Голубкова Н.С., Бязров Л.Г. Жизненные формы лишайников и лишеносинузий // Бот. журн. Т. 74, № 6. 1989. С. 794–805.
2. Зенова Г.М. Симбиотические организмы, состоящие из гриба и водоросли // Соросовский образовательный журнал. № 6. 1999. С. 30–34.

3. Мартюшов П.А., Шавнин С.А. Структура таллома лишайника *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. // Журнал общей биологии. 2004. Т. 65. № 2. С. 178–186.
4. Сони́на А.В., Степа́нова В.И., Тарасова В.Н., Лишайники, Морфология, анатомия, систематика Ч.1. Петрозаводск: изд-во ПетрГУ. – 2006. – 212 с.
5. Лобакова Е.С., Смирнов И.А. Экспериментальная лихенология // Журнал общей биологии. Т. 69. № 5. 2008. С. 364–378.
6. Андерсон Ф.К., Трешоу М. Реакция лишайников на атмосферное загрязнение // Загрязнение воздуха и жизнь растений. Л.: Гидрометеиздат, 1988. С. 296–326.
7. Бязров Л.Г. Лишайники в экологическом мониторинге. М.: Научный мир. – 2002. – 336 с.
8. Mikhailova I.N. Populations of epiphytic lichens under stress conditions: survival strategies // The Lichenologist. 2007. Vol. 39, N 1. P. 83–89. Doi:10.1017/S0024282907006305.
9. Barkman J.J. Phytosociology and Ecology of Cryptogamic Epiphytes. – Assen, Netherlandsvan Gorcum Co N.Y. – 1958. – 628p.
10. Сымермаа А.Л. Экология и ценология эпифитных лишайников в основных типах леса Эстонской ССР: Автореф. дис. канд. биол. наук. Тарту, 1970. 31с.
11. Ahmadjian V. The lichen symbiosis. New York: John Wiley & Sons. – 1993. – 240 p.
12. Тарасова В.Н., Сони́на А.В., Андросова В.И. Лишайники: физиология, экология, лихеноиндикация (учебник) // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2013. № 11-1. С. 76–77.
13. Сони́на А.В. Видовое разнообразие эпифитных лишайников на территории северо-запада России // Фундаментальные исследования. 2014. № 3 (ч. 3). С. 512–516.
14. Dertien B.K., De Kok L.J., Kuiper P.J.C. Lipid and fatty acid composition of tree-growing and terrestrial lichens // Physiol. Pl. (Copenhagen) 1977. Vol. 40. P. 175–180.
15. Bychek E.A., Baybulatova N.E., Bychek I.A. Polar and Neutral Lipids in Some Lichens from Issyk-Kul and Baikal Regions // Journal of the Hattori Botanical Laboratory. 1996. Т. 79. С. 99–106.
16. Bychek-Guschina I.A. Analysis of Lipids in Lichens // In: Protocols in Lichenology: Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring / Ilse Kranner, Richard Beckett, Ajit Varma, eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York in 2002. P. 332–347. DOI 10.1007/978-3-642-56359-1.
17. Kotlova E.R., Sinyutina N.F. Changes in the content of individual lipid classes of a lichen *Peltigera aphthosa* during dehydration and subsequent rehydration // Russian Journal of Plant Physiology. 2005. Vol. 52, № 1. P. 35–42.
18. Hanus L. O., Temina M., Dembitsky V. Biodiversity of the chemical constituents in the epiphytic lichenized ascomycete *Ramalina lacera* grown on different substrates *Crataegus sinicus*, *Pinus halepensis*, and *Quercus calliprinos* // Biomedical Papers of the Medical Faculty, University Palacký Olomouc, Czech Republic. 2008. Vol. 152, № 2. P. 203–208.
19. Temina M., Levitsky D.O., Dembitsky V.M. Chemical constituents of the epiphytic and lithophilic lichens of the genus *Collema* // Records of Natural Products. 2010. Vol. 4, № 1. P. 79–86.
20. Paoli L., Pisani T., Guttová A., Sardella G., Loppi S. Physiological and chemical response of lichens transplanted in and around an industrial area of south Italy: Relationship with the lichen diversity // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2011. Vol. 74, № 4 P. 650–657.
21. Paoli L., Fiorini E., Munzi S., Sorbo S., Basile A., Loppi S. Antimony toxicity in the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. // Chemosphere. 2013. Vol. 93, № 10. P. 2269–2275.
22. Paoli L., Fiorini E., Munzi S., Sorbo S., Basile A., Loppi S. Uptake and acute toxicity of cerium in the lichen *Xanthoria parietina* // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2014. Vol. 104, № 1. P. 379–385.
23. Corapi A., Gallo L., Nicolardi V., Lucadamo L., Loppi S. Temporal trends of element concentrations and ecophysiological parameters in the lichen *Pseudevernia furfuracea* transplanted in and around an industrial area of S Italy // Environ Monit Assess. 2014. Vol. 186. P.3149–3164. DOI 10.1007/s10661-013-3607-3/
24. Westeberg M., Ahti T., Thell A. *Hypogymnia* / In A.Thell & R. Moberg (eds), Nordic Lichen Flora. 2011.Vol., 4. P. 56-62.
25. Folch J., Lees M., Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226, N 1. P. 497–509.
26. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина. – 1969. – 29 с.
27. Бычек И.А. Особенности распределения липидов в бриофитах: таксономический и экологический аспект // Биохимия. 1994. Т. 59. С. 1646–1662.
28. Киселева М.А. Метаболизм мембранных липидов у свободноживущих и симбиотических зеленых водорослей рода *Pseudococcomyxa* в условиях дефицита фосфора: Автореф. дис. ... канд. биол. наук, Санкт-Петербург, 2008. 21 с.
29. Guschina I.A., Dobson G., Harwood J.L. Lipid metabolism in cultured lichen photobionts with different phosphorus status // Phytochemistry. 2003. Vol. 64. P. 209–217.