

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 547.728.23:582.29

СОДЕРЖАНИЕ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ В РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЯХ ТАЛЛОМОВ *EVERNIA PRUNASTRI* (L.) ACH., *RAMALINA POLLINARIA* (WESTR.) ACH. И *CLADONIA ARBUSCULA* (WALLR.) FLOT.

© О. М. Храмченкова, Р. И. Новиков
V. M. Khramchankova, R. I. Novikau

Usnic acid concentration in different thallus parts of *Evernia prunastri* (L.) Ach.,
Ramalina pollinaria (Westr.) Ach. and *Cladonia arbuscula* lichens (Wallr.) Flot.

УО «Гомельский государственный университет имени Ф. Скорины»
246019, Республика Беларусь, г. Гомель, ул. Советская, д. 104. Тел.: +375 (2322) 57-89-05, e-mail: hramchenkova@gsu.by
ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси»
246007, Республика Беларусь, г. Гомель, ул. Фёдоровского, д. 4. Тел.: +375 (2322) 68-32-26, e-mail: novikovr86@mail.ru

Аннотация. Методом ВЭЖХ определяли содержание усниновой кислоты в измельчённых и неизмельчённых талломах лишайников *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria* и *Cladonia arbuscula*, а также в соредиях и апотециях. Измельчение биомассы лишайников повышало достоверность определения содержания усниновой кислоты. У *E. prunastri* и *R. pollinaria* наибольшее содержание усниновой кислоты было в соредиях – $1,0 \pm 0,05\%$ и $1,1 \pm 0,05\%$ воздушно-сухой массы соответственно; наименьшее – в нижней части таллома – $0,15 \pm 0,01\%$ и $0,26 \pm 0,01\%$ соответственно. Содержание усниновой кислоты в подециях *C. arbuscula* было наибольшим в их верхней части ($9,0 \pm 0,43\%$ воздушно-сухой массы); одинаковым – в апотециях и средней части подециев ($4,1 \pm 4,6\%$); наименьшим – в нижней части подециев ($1,9 \pm 0,09\%$).

Ключевые слова: лишайники, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria*, *Cladonia arbuscula*, ВЭЖХ, усниновая кислота, талломы, соредии, подеции, апотеции.

Abstract. HPLC was used to determine the usnic acid concentration in shredded and unshredded thalli of *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria* and *Cladonia arbuscula* lichens, as well as in soredia and apothecia. Crushing the lichens biomass increased the reliability of the usnic acid determination. For *E. prunastri* and *R. pollinaria* thalli, the highest usnic acid concentration was in the soredia $1,0 \pm 0,05\%$ and $1,1 \pm 0,05\%$ of air-dry mass, respectively; the lowest – in the lower part of the thallus – $0,15 \pm 0,01\%$ and $0,26 \pm 0,01\%$, respectively. The usnic acid concentration in the *C. arbuscula* podetia was the greatest in their upper part ($9,0 \pm 0,43\%$ of air-dry mass); equal in apothecia and podetia middle part ($4,1 \pm 4,6\%$); the lowest – in the podetia lower part ($1,9 \pm 0,09\%$).

Keywords: lichen, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria*, *Cladonia arbuscula*, HPLC, usnic acid, thalli, soredia, podetia, apothecia.

DOI: 10.22281/2307-4353-2018-3-49-53

Введение

О неравномерности распределения вторичных метаболитов в талломах лишайников исследователи догадывались ещё в те времена, когда наиболее информативными показателями их присутствия являлись цветные и микрокристаллические реакции. Интенсивность окраски, количество и вид кристаллов, образовавшихся при нанесении реактива на поверхность слоевища, свидетельствовали о наличии варибельности концентраций даже тех веществ, на чьё присутствие используемый тест указывал однозначно. Со временем были раскрыты химический состав, механизмы синтеза вторичных метаболитов лишайников, описаны зависимости образования некоторых из них от градиентов факторов внешней среды

(Fahselt, 1994; Huneck, Yoshimura, 1996; Elix, 2014). Не растворимые в воде вторичные метаболиты на поверхности клеточных оболочек микобионта образуют гидрофобную фазу, способствующую сохранению внутри таллома некоторого количества воздуха, необходимого для функционирования клеток фотобионта (Nash, 1999; Molnar, Farkas, 2011). Лишайником регулируются процессы синтеза вторичных метаболитов, вследствие чего не происходит их неограниченного накопления. Несмотря на большой прогресс в изучении лишайниковых веществ, существует не много работ, посвящённых распределению вторичных метаболитов в талломах (Mirando, Fahselt, 1978; Hamada, 1982; Толпышева, 2014; Кононенко, Буркин, 2015). Одним из наиболее изученных лишайниковых веществ является усниновая кислота, которая в талломах выполняет ряд физиологических функций и имеет широкий спектр применения в медицине (Cocchietto et al., 2002; Sokolov, Luzina, Salakhutdinov, 2012). Целью настоящего исследования было определение содержания усниновой кислоты в различных частях талломов трёх видов лишайников: *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria* и *Cladonia arbuscula*.

Методы и материалы исследований

Для исследования были выбраны виды лишайников, часто встречающиеся на юго-востоке Беларуси (Цуриков, Храменкова, 2009; Tsurukau, Khramchankova, 2011; Цуриков, 2013): *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach. и *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot. [*Cladonia sylvatica* (L.) Hoffm.]. О присутствии усниновой кислоты в талломах данных видов лишайников упоминается в литературе (Горбач, 1973; Определитель..., 1978; Справочное..., 1990; Определитель..., 1996; The Lichens..., 2009).

Лишайники собирали на территории Государственного лесохозяйственного учреждения «Гомельский лесхоз» на типичных для каждого вида субстратах (Цуриков, 2013). К анализу принимали образцы генеративного периода онтогенеза (Сутина, Ямбердова, 2010). Талломы *E. prunastri*, *R. pollinaria* и подеции *C. arbuscula* делили на три равные части – верхнюю, среднюю и нижнюю. Из биомассы лишайников отбирали также образцы соредий и апотециев. Половину образцов измельчали до размера частиц 0,5 мм, другую – оставляли intactной. Таким образом, к анализу принимали измельчённые и неизмельчённые талломы лишайников, их фрагменты и органы размножения.

Образцы экстрагировали ацетоном по методике, изложенной в литературе (Cansaran-Duman et al., 2010; Smeds, Kytöviita, 2010); растворитель отгоняли. Экстракты из лишайников (20 мг) растворяли в 2 мл диметилсульфоксида (ДМСО), центрифугировали (10 минут, 21000 g, 15 °C). Растворы разводили в 60, 80 и 100 раз в 40% растворе ацетонитрила в 0,1% водном растворе уксусной кислоты, фильтровали через шприцевые фильтры Econofilters (размер пор 20 мкм), анализировали методом ВЭЖХ на микроколоночном хроматографе Agilent Technologies 1100 (USA) с последующей компьютерной обработкой результатов в программе ChemStation. Разделение проводили на обращённо-фазовой колонке Zorbax размером 4,6 × 150 мм, сорбент – 300SB-C18 с зернистостью 3,5 мкм. Элюировали в градиентном режиме с увеличением доли ацетонитрила от 40 до 90% в течение 20 минут при скорости потока 1 мл/мин. В качестве подвижных фаз использовали ацетонитрил и 0,1% водный раствор уксусной кислоты. Детектировали с помощью сканера с диодной матрицей при длинах волн 230 и 280 нм, объём вводимого образца – 10 мкл (Ji, Khan, 2005). Концентрацию усниновой кислоты в образцах определяли по калибровочной кривой зависимости площади пика от концентрации стандарта в диапазоне 0,4÷180 мкг/мл. Время удерживания для усниновой кислоты – 12,1 мин.

Измерения выполняли в трёх повторностях; полученные данные пересчитывали в проценты воздушно-сухой массы лишайников. Статистическую обработку данных проводили с использованием программных продуктов STATISTICA 7.0, GraphPadPrism 5.02, Microsoft Excel.

Результаты исследований

Содержание усниновой кислоты в талломах изучаемых видов лишайников отличалось в зависимости от того, подвергалась ли биомасса измельчению перед экстракцией, или не подвергалась.

Для *E. prunastri* предварительное измельчение биомассы способствовало повышению эффективности извлечения усниновой кислоты в 1,6–3,2 раза (рис. 1).

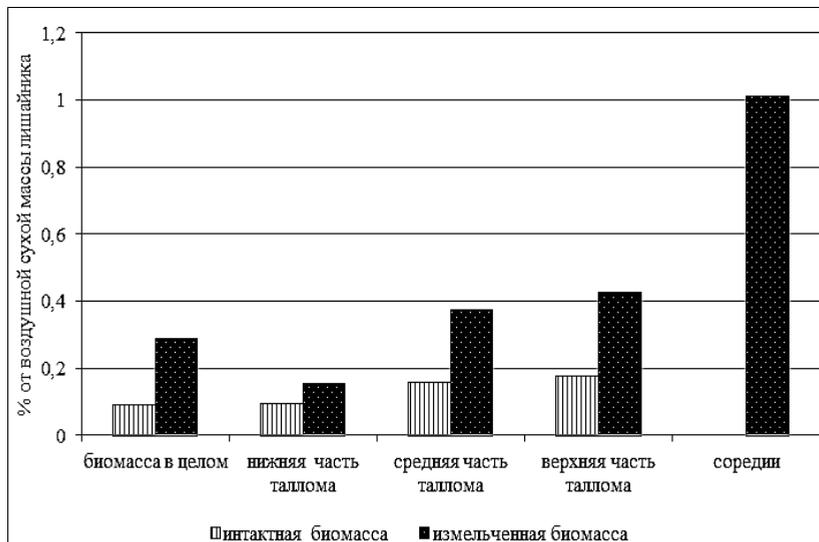


Рис. 1. Содержание усниновой кислоты в различных частях таллома *Evernia prunastri*.

Содержание усниновой кислоты было наибольшим в соредиях – $0,81 \div 1,22\%$; наименьшим – в нижней части таллома ($0,12 \div 0,19\%$); в средней и верхней частях – $0,21 \div 0,45\%$ воздушно-сухой массы лишайника.

Измельчение биомассы *R. pollinaria* в 2,7–10,4 раза повышало извлекаемость усниновой кислоты (рис. 2).

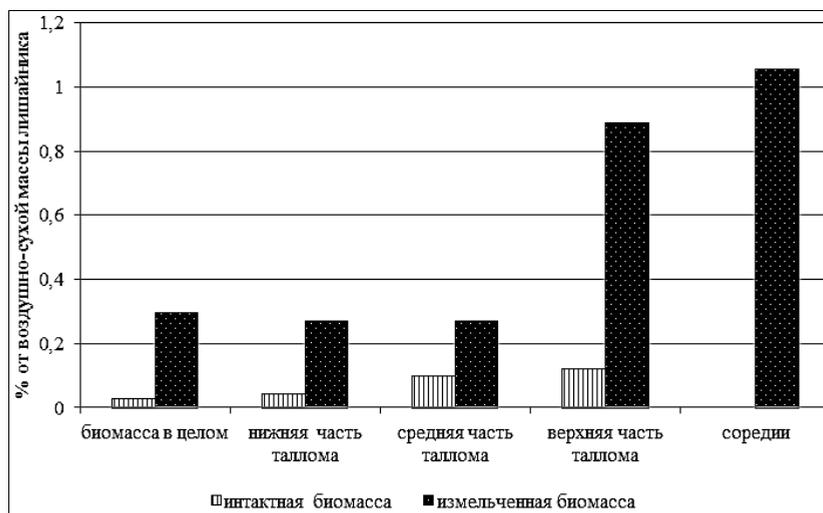


Рис. 2. Содержание усниновой кислоты в различных частях таллома *Ramalina pollinaria*.

Содержание усниновой кислоты было наибольшим в соредиях и верхней части таллома – $1,1 \pm 0,51\%$ и $0,9 \pm 0,04\%$ соответственно, тогда как в средней и нижней частях – $0,21 \pm 0,32\%$.

Если для *E. prunastri* и *R. pollinaria* усниновая кислота является одним из кортикальных метаболитов (присутствуют еще, как минимум, атранорин и эверновая кислота), то для *C. arbuscula* характерно отсутствие корового слоя в подоцехиях и высокое содержание в них прежде всего усниновой кислоты, с которой сочетаются псоромовая и/или фумарпротоцетраровая кислоты (The Lichens..., 2009). Эти соображения в какой-то степени подтверждаются данными, полученными нами ранее (Храмченкова, Новиков, 2018), и обосновывают меньший размах величины влияния измельчения биомассы *C. arbuscula* на эффективность экстракции усниновой кислоты (рис. 3).

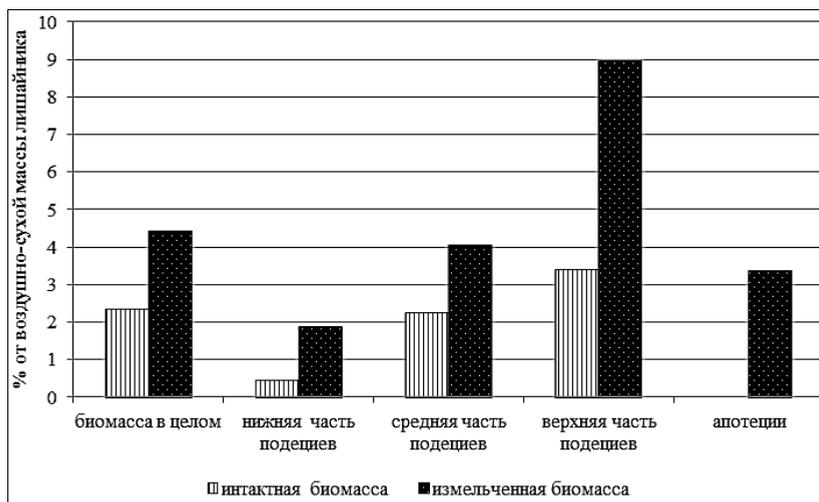


Рис. 3. Содержание усниновой кислоты в различных частях таллома *Cladonia arbuscula*.

Среднее содержание усниновой кислоты в измельчённой биомассе *C. arbuscula* более чем на порядок выше, чем в *E. prunastri* и *R. pollinaria*; и в 25–80 раз выше таковой в неизмельчённой.

Для *E. prunastri* и *R. pollinaria* содержание усниновой кислоты в биомассе лишайника не равно среднему арифметическому из концентраций метаболита в различных частях слоевища. Данный факт объясняется тем, что в экстрагируемый материал включались не только собственно талломы, но и находящиеся на них апотеции с высоким содержанием усниновой кислоты, количество которых крайне сложно учесть. Для биомассы *C. arbuscula* такой эффект не отмечен, что связано, по-видимому, с меньшим содержанием усниновой кислоты в апотециях.

Заключение

Таким образом, среднее содержание усниновой кислоты в талломах *E. prunastri* составило $0,09 \pm 0,004\%$ и $0,29 \pm 0,001\%$ для неизмельчённой и измельчённой биомассы соответственно. В талломах *R. pollinaria* содержалось $0,03 \pm 0,001\%$ и $0,30 \pm 0,004\%$ усниновой кислоты. В подоцехиях *C. arbuscula* – $2,35 \pm 0,112\%$ и $4,41 \pm 0,212\%$. Для нижней, средней и верхней частей таллома, а также соредиев *E. prunastri* в случае анализа интактной биомассы лишайника соотношение концентраций усниновой кислоты составило 1 : 1,6 : 1,8 : 10,5; для измельченной биомассы – 1 : 2,4 : 2,8 : 6,6. Аналогичные показатели для нижней, средней и верхней частей таллома, а также соредиев *R. pollinaria* – 1 : 2,2 : 2,8 : 24,3 и 1 : 1 : 3,3 : 3,8 для не измельченной и измельченной биомассы лишайника соответственно. Для нижней, средней и верхней частей подоцехиев, а также апотециев *C. arbuscula* соотношения концентраций усниновой кислоты были равны 1 : 4,9 : 7,4 : 7,3 и 1 : 2,2 : 4,8 : 1,8 для не измельченной и измельченной биомассы лишайника соответственно.

Список литературы

- Горбач Н. В. 1973. Лишайники Белоруссии. Определитель. Минск: Наука и техника. 368 с. [Gorbach N. V. 1973. Lishainiki Belorussii. Opredelitel'. Minsk: Nauka i tekhnika. 368 p.]
- Кононенко Г. П., Буркин А. А. 2015. Характер распределения микотоксинов и усниновой кислоты в слоевищах эпигейных лишайников // Известия РАН. Сер. Биол. № 3. С. 265–271. [Kononenko G. P., Burkin A. A. 2015. Charakter raspredeleniya mikotoksinov i usninovoy kisloty v sloevishchah epigeinykh lishaynikov // Izvestiya RAN. Ser. Biol. № 3. P. 265–271.]
- Определитель лишайников России. Вып. 6. Алекториевые, Пармелиевые, Стереокаулоновые. 1996. Н. С. Голубкова [и др.]; под. ред. Н. С. Голубковой. СПб.: Наука. 203 с. [Opredelitel' lishainikov Rossii. Vyp. 6. Alektorieveye, Parmelieveye, Stereokaulonove. 1996. N. S. Golubkova [i dr.]; pod. red. N. S. Golubkvoi. SPb.: Nauka. 203 p.]
- Определитель лишайников СССР. Вып. 5. Кладониевые – Акароспоровые. 1978. Н. С. Голубкова [и др.]; под. ред. И. И. Абрамова. Л.: Наука. 304 с. [Opredelitel' lishainikov SSSR. Vyp. 5. Kladonieveye – Akarosporoveye. 1978. N. S. Golubkova [i dr.]; pod. red. I. I. Abramova. L.: Nauka. 304 p.]
- Справочное пособие по хемотаксономии лишайников (методическое пособие). 1990. Е. А. Вайнштейн [и др.]; под. ред. Н. С. Голубковой. Л.: БИН АН СССР. 152 с. [Spravochnoe posobie po khemotaksonomii lishainikov (metodicheskoe posobie). 1990. E. A. Vainshtein [i dr.]; pod. red. N. S. Golubkvoi. L.: BIN AN SSSR. 152 p.]
- Суетина Ю. Г., Ямбердова Е. И. 2010. Онтогенез и возраст-витагитетная структура популяции лишайника *Evernia prunastri* (L.) Ach. // Вестник Удмуртского ун-та. Вып. 6–3. С. 44–51. [Suetina Yu. G. Yamberdova E. I. 2010. Ontogenez i vozrastno-vitalitetnaya struktura populyatsii lishaynika *Evernia prunastri* (L.) Ach. // Vestnik Udmurtskogo un-ta. Vyip. 6–3. P. 44–51.]
- Толышева Т. Ю. 2014. Микотоксины, усниновая кислота и их распределение в лишайниках родов *Cetraria*, *Flavocetraria*, *Cladonia* // Вестник Московского ун-та. Сер. 16. Биология. № 3. С. 37–40. [Tolpyshева T. Yu. 2014. Mikotoksinyi, usninovaya kislota i ih raspredelenie v lishaynikah rodov *Cetraria*, *Flavocetraria*, *Cladonia* // Vestnik Moskovskogo un-ta. Ser. 16. Biologiya. № 3. P. 37–40.]
- Цурыков А. Г. 2013. Лишайники юго-востока Беларуси (опыт лишеномониторинга). Гомель: ГГУ им. Ф. Скорины. 276 с. [Tsurykau A. G. 2013. Lishajniki yugo-vostoka Belarusi (opyt lichenomonitoringa). Gomel': GGU im. F. Skoriny. 276 p.]
- Цурыков А. Г., Храмченкова О. М. 2009. Листоватые и кустистые городские лишайники: атлас-определитель. Гомель: ГГУ им. Ф. Скорины. 123 с. [Tsurykau A. G., Hramchenkova O. M. 2009. Listovatyie i kustistyie gorodskie lishajniki: atlas-opredelitel'. Gomel': GGU im. F. Skoriny. 123 p.]
- Cansaran-Duman D., Cetin D., Simsek H., Coplu N. 2010. Antimicrobial activities of the lichens *Hypogymnia vittata*, *Hypogymnia physodes* and *Hypogymnia tubulosa* and HPLC analysis of their usnic acid content // Asian Journ. of Chemistry. Vol. 22 (8). P. 6125–6132.
- Cocchietto M., Skert N., Nimis P., Sava G. 2002. A review on usnic acid, an interesting natural compound // Naturwissenschaften. Vol. 89 (4). P. 137–146.
- Elix J. A. 2014. A Catalogue of Standardized Thin Layer Chromatographic Data and Biosynthetic Relationships for Lichen Substances. Canberra: Australian National University. 330 p.
- Fahselt D. 1994. Secondary biochemistry of lichens // Symbiosis. Vol. 16. P. 117–165.
- Hamada N. 1982. The distribution pattern of the medullary depsidone salazinic acid in the thallus of *Ramalina siliquosa* (lichens) // Canadian Journ. of Botany. Vol. 60 (4). P. 379–382.
- Huneck S., Yoshimura I. 1996. Identification of lichen substances. Berlin: Springer. 493 p.
- Mirando M., Fahselt D. 1978. The effect of thallus age and drying procedure on extractable lichen substances // Canadian Journ. of Botany. Vol. 56 (13). P. 1499–1504.
- Molnár K., Farkas E. 2011. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review // Zeitschrift für Naturforschung C. Vol. 65 (3–4). P. 157–173.
- Nash III T.H. 1999. Lichen biology. Cambridge: Cambridge University Press. 486 p.
- Smeds A. I., Kytöviita M. 2010. Determination of usnic and perlatolic acids and identification of olivetoric acids in Northern reindeer lichen (*Cladonia stellaris*) extracts // The Lichenologist. Vol. 42 (06). P. 739 – 749.
- Sokolov D. N., Luzina O. A., Salakhudinov N. F. 2012. Usnic acid: preparation, structure, properties and chemical transformations // Russian Chemical Rev. Vol. 81 (8). P. 747–768.
- The Lichens of Great Britain and Ireland. 2nd ed. 2009. Eds.: C. W. Smith [et al.]. London: British Lichen Society. 700 p.
- Tsurykau A., Hramchankova V. 2011. Lichens from Gomel region: a provisional checklist // Bot. Lith. Vol. 17 (4). P. 157–163.

Сведения об авторах

Храмченкова Ольга Михайловна

к. б. н., доцент кафедры ботаники и физиологии растений
Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, Гомель
E-mail: hramchenkova@gsu.by

Khranchankova Volga Mikhaylauna

PhD in Biology, Ass. Professor of the Dpt. of Botany and Plant Physiology
Francisk Skorina Gomel State University, Gomel
E-mail: hramchenkova@gsu.by

Новиков Роман Игоревич

младший научный сотрудник
Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель
E-mail: novikovr86@mail.ru

Novikau Roman Igorevich

Junior researcher
Institute of Radiobiology of the NAS of Belarus, Gomel
E-mail: novikovr86@mail.ru