

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 582.29:619.611.573.616:092.632.636.578

СОХРАННОСТЬ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ГРИБОВ
В ГЕРБАРНЫХ ОБРАЗЦАХ ЛИШАЙНИКОВ

А.А. Буркин*, Т.Ю. Толпышева, Г.П. Кононенко*

(кафедра микологии и альгологии; e-mail: tolpysheva@mail.ru)

Методом иммуноферментного анализа в гербарных и свежесобранных слоевищах эпигейных лишайников *Cladonia stellaris*, *C.rangiferina*, *Allocetraria nivalis*, *A. cucullata*, *Cetraria islandica*, *Peltigera canina* и *Nephroma arcticum* не выявлено существенных различий в содержании вторичных метаболитов, относящихся к микотоксинам — дезоксиниваленола, диацетоксисцирпенола, зеараленона, альтерналиола, цитринина, стеригматоцистина, циклопиазоновой кислоты, микофеноловой кислоты, эмолина и PR-токсина. Обнаружение этих веществ в образцах, сроки хранения которых превышают несколько десятилетий, свидетельствует об эффективной системе консервации продуктов метаболического обмена в лишайниках.

Ключевые слова: лишайники, микотоксины, гербарий.

Известно, что лишайники перед инсерацией не подвергают химической или температурной обработке, их просто хорошо просушивают на воздухе и помещают в бумажные пакеты. При длительном хранении такого материала не отмечено случаев его порчи насекомыми, поражения грибами или другими микроорганизмами. Отсутствие внешних воздействий дает возможность использовать гербарные образцы лишайников для изучения характера биохимических изменений, сопровождающих процесс хранения. Так, было показано, что у *Sticta* sp. через 4 года полиолы — рибитол, арабинитол и маннитол уже практически не удается обнаружить, а количество белка снижается с 34 до 18% [1]. Специальные эксперименты по влиянию сроков хранения на уровни содержания лишайниковых кислот не проводились, но в гербарных образцах нескольких видов р. *Evernia* показано присутствие усниновой кислоты [2]. В слоевищах *Cladonia stellaris*, хранившихся около 10 лет, содержание этой кислоты варьировало в зависимости от места и времени сбора от 0,37 до 2,17% [3]. В 66 исследованных гербарных образцах *Parmelia vagans* Nyl. [= *Xanthoparmelia camtschadalis* (Ach.) Nyl.] найдены усниновая, салациновая и норстиктовая кислоты [4].

Недавно в свежесобранных лишайниках разной таксономической принадлежности были обнаружены низкомолекулярные биологически активные вещества из группы микотоксинов [5–7]. Эти метаболиты продуцируют микроскопические грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* [8] для которых лишайники могут служить экологической нишей [9].

Цель данной работы — сравнительная оценка уровней содержания вторичных метаболитов, принадлежащих к микотоксинам, в гербарных и свежесобранных образцах нескольких видов эпигейных лишайников.

Материалы и методы

В работе использовали 7 видов эпигейных лишайников — *Cladonia stellaris* (Opiz) Pouz et Vězda, *C. rangiferina* (L.) F.H. Wigg., *Allocetraria cucullata* (Bellardi) Randl. et Saag, *A. nivalis* (L.) Randl. et Saag, *Cetraria islandica* (L.) Ach., *Peltigera canina* (L.) Willd. и *Nephroma arcticum* (L.) Torss. Исследовано 46 фрагментов от образцов лишайников, хранящихся в гербарии им. Д.П. Сырейщикова (MW) Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Для сравнения слоевища соответствующих видов лишайников в количестве 100 образцов были собраны в 2010 г. в Мурманской обл. и на полуострове Таймыр.

В образцах проводили определение количественного содержания 10 вторичных метаболитов, относящихся к группе микотоксинов: дезоксиниваленола (ДОН), диацетоксисцирпенола (ДАС), зеараленона (ЗЕН), альтерналиола (АОЛ), цитринина (ЦИТ), стеригматоцистина (СТЕ), циклопиазоновой кислоты (ЦПК), микофеноловой кислоты (МФК), эмолина (ЭМО) и PR-токсина (PR) с помощью непрямого конкурентного иммуноферментного анализа по методике, описанной в работе [7]. Слоевища лишайников измельчали, экстрагировали смесью ацетонитрила в воде в объемном соотношении 84 : 16, интен-

* Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены, экологии РАСХН, г. Москва.

сивно встряхивали, выдерживали 14–16 ч при комнатной температуре и еще раз перемешивали. Соотношение навески и раствора составляло 1 : 10 (г/мл). Полученные экстракты перед анализом разбавляли в 10 раз 0,15 М фосфатно-солевым буфером (рН 7,5), состоящим из 0,01 М Na_2HPO_4 , 0,14 М NaCl и 0,05% Твин 20.

Результаты и обсуждение

Из 6 метаболитов, наиболее часто встречающихся у *Cladonia stellaris*, ДАС, СТЕ и ЭМО обнаружены во всех исследованных гербарных образцах и в соответствующих количествах, а по остальным частота случаев подтверждения снижалась в ряду АОЛ, МФК, ЦИТ (табл. 1). Уровни содержания этих веществ в гербарных образцах соответствовали количественному диапазону, найденному для свежесобранных слоевищ.

У *C. rangiferina* из 4 регулярно обнаруживаемых веществ СТЕ и ЭМО находили во всех без исключения образцах, в том числе в сборе 1910 г. из Забайкалья. Количество ЭМО здесь было более чем в 2 раза выше предельного уровня накопления у свежесобранного лишайника (табл. 2). Положительными по содержанию АОЛ были два из 3 гербарных

образцов, по МФК — 1, но с количеством на порядок выше, чем в слоевищах 2010 г. Редко встречающиеся метаболиты (ДАС, ЦПК) также находили в гербарных образцах, при этом в некоторых случаях даже в больших количествах, чем в слоевищах, собранных в 2010 г. По отсутствующим в образцах сравнения ДОН и ЭА получены положительные результаты для гербарных образцов из восточных районов России.

Для лишайников р. *Allocetraria* с 5 характерными метаболитами — ДАС, АОЛ, СТЕ, МФК и ЭМО полное воспроизведение наблюдалось у *A. nivalis* по АОЛ, СТЕ, МФК и ЭМО, у *A. cucullata* — по СТЕ, МФК и ЭМО, а АОЛ не был найден ни в одном из образцов (табл. 3, 4). Такие же исключения наблюдались и для ДАС. Этим видам свойственно нерегулярное обнаружение всех других веществ, поэтому редкие положительные результаты поиска в гербарных образцах вполне понятны.

Для 3 наиболее частых в свежесобранных слоевищах *Cetraria islandica* метаболитов АОЛ, СТЕ и ЭМО представленность в гербарных образцах выражена в полной мере для ЭМО, с одним исключением для СТЕ и с тремя — для АОЛ (табл. 5). Тот факт, что редкие в образцах сравнения метаболиты — ЦИТ, ЦПК, МФК, ДАС — в гербарных образ-

Таблица 1

Содержание вторичных метаболитов грибов в образцах *Cladonia stellaris*

Место и год сбора образцов	n^+ , диапазон содержания веществ, нг/г					
	ДАС	АОЛ	ЦИТ	СТЕ	МФК	ЭМО
Мурманская обл., 2010 г. ($n = 30$)	27 100–355	17 37–1260	17 41–89	30 42–200	28 35–132	21 100–8910
Якутская АССР, 1938	251	40	—	100	78	631
Якутская АССР, 1938	100	200	—	126	—	2510
Читинская обл., 1958	285	50	—	129	—	157
Читинская обл., 1958	234	—	—	79	—	1000
Якутская АССР, 1961	282	—	—	126	—	178
Якутская АССР, 1961	151	519	—	48	63	1290
Мурманская обл., 1983	178	—	—	141	—	132
Читинская обл., 1987	288	—	50	112	56	100

Таблица 2

Содержание вторичных метаболитов грибов в образцах *Cladonia rangiferina*

Место и год сбора образцов	n^+ , диапазон содержания веществ, нг/г								
	ДОН	ДАС	АОЛ	ЦИТ	СТЕ	ЦПК	МФК	ЭА	ЭМО
Мурманская обл., 2010 ($n = 13$)	—	1 124	5 45–200	3 40–98	10 15–417	1 219	8 41–76	—	12 45–638
Забайкалье, 1910	—	100	—	—	15	407	562	794	1640
Читинская обл., 1987	129	153	89	—	8	—	—	—	684
Мурманская обл., 2000	—	—	62	—	48	—	—	—	119

Таблица 3

Содержание вторичных метаболитов грибов в образцах *Allocetraria nivalis*

Место и год сбора образцов	n^+ , диапазон содержания веществ, нг/г						
	ДАС	АОЛ	ЦИТ	СТЕ	ЦПК	МФК	ЭМО
Мурманская обл., 2010 ($n = 11$)	10 100—202	7 44—1000	3 45—66	11 63—631	—	11 50—151	11 193—1905
Южный Урал, 1927	—	355	61	102	—	1259	12 580
Коми АО, 1927	—	124	—	79	—	98	1290
Читинская обл., 1933	112	529	66	120	—	204	1445
Алтайский заповедник, 1935	158	298	51	282	108	110	28 185
Иркутская обл., 1941	100	59	—	98	—	102	15 850
Тувинская АО, 1946	—	71	47	74	—	72	1000
Мурманская обл., 1971	—	50	—	78	—	88	543
Магаданская обл., 1974	117	148	126	126	—	275	1820

Таблица 4

Содержание вторичных метаболитов грибов в образцах *Allocetraria cucullata*

Место и год сбора образцов	n^+ , диапазон содержания веществ, нг/г								
	ДОН	ДАС	ЗЕН	АОЛ	ЦИТ	СТЕ	МФК	ЭА	ЭМО
Таймыр, 2010, $n = 4$	—	3 135—186	2 50; 64	3 98—153	2 38; 40	4 40—90	4 36—254	—	4 63—513
Забайкалье, 1923	—	112	—	126	—	51	200	19	288
Восточные Саяны, 1929	—	—	—	40	—	78	158	—	398
Восточные Саяны, 1937	—	100	—	164	40	98	114	—	513
Мурманская обл., 1971	98	98	—	—	—	48	74	—	229
Магаданская обл., 1975	—	178	—	1259	50	66	190	—	2818

Таблица 5

Содержание вторичных метаболитов грибов в образцах *Cetraria islandica*

Место и год сбора образцов	n^+ , диапазон содержания веществ, нг/г								
	ДОН	ДАС	АОЛ	ЦИТ	СТЕ	ЦПК	МФК	ЭА	ЭМО
Мурманская обл., 2010 ($n = 12$)	—	1 170	11 54—1000	3 40—71	9 20—313	2 102; 126	2 62; 104	—	11 100—962
Московская губ., 1912	100	—	—	45	20	355	64	—	630
Московская губ., 1925	138	155	50	64	32	372	190	158	1620
Нижегородская губ., 1926	112	100	88	50	43	394	86	—	87
Архангельская губ., 1927	127	—	40	80	12	610	64	—	51
Мурманская обл., 1961	—	—	—	52	9	263	—	—	794
Мурманская обл., 1971	—	—	—	50	—	363	104	—	380

цах встречались повсеместно (ЦИТ и ЦПК), за единственным исключением (МФК) или несколько реже (ДАС), по-видимому, связан с географической неоднородностью и малыми выборками материала. Более того, ДОН и ЭА, которые не удалось найти в этом лишайнике в 2010 г., присутствовали в са-

мых старых гербарных образцах слоевищ, собранных в 1912—1927 гг.

У всех рассмотренных выше видов лишайников в морфологическом строении есть как общие черты, так и некоторые отличия. *Cladonia stellaris* и *C. rangiferina* имеют кустистое слоевище с ложным ко-

Таблица 6

Содержание вторичных метаболитов грибов
в образцах *Peltigera canina*

Место и год сбора образцов	n^+ , диапазон содержания, нг/г		
	АОЛ	СТЕ	ЭМО
Мурманская обл., 2010 ($n = 5$)	2 158; 158	5 25–102	4 251–417
Иркутская губ., 1902	64	38	398
Владимирская губ., 1913	—	95	120
о. Валаам, 1915	46	18	204
Восточно-Казахстанская обл., 1953	—	316	214
Мурманская обл., 1962	—	41	331
Магаданская обл., 1974	—	335	168
Хабаровский край, 1976	—	442	309
Мурманская обл., 1994	—	72	132
Соловецкие о-ва, 1996	—	9	50

ровым слоем и полостью внутри, а в качестве фотобионта — зеленую водоросль *Trebouxia* [10]. *Allo-cetraria nivalis*, *A. cucullata* и *Cetraria islandica* — кустистое уплощенное слоевище с хорошо развитым с обеих сторон лопастей коровым слоем, с фотобионтом *Trebouxia* [11]. Сохранность веществ исследуемой группы у них одинаково высока, некоторые отличия наблюдаются только в отношении качественного состава и уровней накопления этих метаболитов.

У *Peltigera canina* в самом старом из исследованных образцов 1902 г. из Иркутской губернии присутствовали все три характерных метаболита — АОЛ, СТЕ и ЭМО, в остальных — всегда СТЕ и ЭМО и реже — АОЛ (табл. 6). Морфологической особенностью этого лишайника с листоватым слоевищем является то, что коровый слой развит только с верх-

ней стороны и фотобионтом является цианобактерия *Nostoc*. Возможно, это имеет отношение к малому числу встречающихся в нем метаболитов, но явно не влияет на их сохранность, ее следует признать высокой.

Для вида *Nephroma arcticum*, которому свойственно наибольшее многообразие в составе присутствующих метаболитов микромицетов, в гербарных образцах сохраняются эти черты (табл. 7). Из 7 наиболее типичных соединений во всех случаях обнаружены АОЛ, ЦИТ, СТЕ, МФК, ЭМО и за немногими исключениями — ЦПК и ДАС. Для остальных метаболитов встречаемость была хотя и ниже (ЗЕН, ДОН, PR), но, как правило, количества оставались в рамках ожидаемого диапазона. Листоватое слоевище этого лишайника имеет хорошо развитый с обеих сторон коровый слой и два фотобионта — зеленую водоросль *Coccomyxa* и во внутренних цетралиях — цианобактерию *Nostoc* [12]. Накопление обширного спектра вторичных метаболитов отличает его от других видов, но по сохранности этих веществ он не имеет особенностей.

Таким образом, у морфологически отличающихся видов лишайников наблюдаются особенности в разнообразии и уровнях содержания вторичных метаболитов из группы микотоксинов. Однако независимо от таксономической принадлежности организмов эти вещества одинаково хорошо сохраняются в сухих слоевищах и могут быть обнаружены даже в образцах, собранных в начале прошлого века. Результаты анализа гербарных образцов с длительными сроками хранения подтверждают возможность эффективной консервации метаболитов грибов в лишайниках. Расшифровка особых биохимических механизмов, обеспечивающих сохранность продуктов вторичного обмена при удалении организма из среды естественного обитания, может стать новым важным этапом развития фундаментальных исследований в лихенологии.

Таблица 7

Содержание вторичных метаболитов грибов в образцах *Nephroma arcticum*

Место и год сбора образцов	n^+ , диапазон содержания веществ, нг/г									
	ДОН	ДАС	ЗЕН	АОЛ	ЦИТ	СТЕ	ЦПК	МФК	ЭМО	PR
Мурманская обл., 2010 ($n = 25$)	5 200–525	25 112–785	20 40–151	25 129–2600	25 63–345	25 56–631	25 141–638	25 700–5012	25 1914–23 380	7 100–193
Коми АО, 1927	90	—	—	97	180	30	184	1000	2500	—
Тюменская обл., 1962	89	141	—	229	178	61	190	1288	3273	—
Мурманская обл., 1962	—	—	—	158	155	23	200	785	5623	—
Мурманская обл., 1971	—	190	—	305	182	28	162	977	6310	—
Мурманская обл., 1971	209	108	112	1122	127	67	174	1230	3548	153
Магаданская обл., 1974	—	251	75	363	52	23	—	1000	22 390	507
Мурманская обл., 1983	98	195	48	245	190	87	309	1905	6310	—

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Corradi da Silva M., Iacomini M., Jablonski E., Gorin Ph.A.J. Carbohydrate, glycopeptide and protein components of the lichen *Sticta* sp. and effect of storage // *Phytochemistry*. 1993. Vol. 33. N 3. P. 547—552.
2. Culbertson Ch.F. The lichen substances of the genus *Evernia* // *Phytochemistry*. 1963. Vol. 2. N 4. P. 335—340.
3. Равинская А.П., Вайнштейн Е.А. Хематаксономическое значение изменений содержания лишайниковых кислот // *Новости систематики низших растений*. 1975. Т. 12. С. 266—273.
4. Шапиро И.А. Содержание усниновой кислоты в лишайнике *Parmelia vagans* Nyl. // *Растительные ресурсы*. 1977. Т. 13. Вып. 3. С. 463—466.
5. Буркин А.А., Кононенко Г.П. Первые сведения о контаминации ягеля микотоксинами // *Иммунология, аллергология, инфектология*. 2010. № 1. С. 185—186.
6. Буркин А.А., Кононенко Г.П. Контаминация ягеля микотоксинами // *Докл. Рос. акад. с.-х. наук*. 2011. № 2. С. 56—58.
7. Кононенко Г.П., Буркин А.А., Толпышева Т.Ю. Иммуноферментный анализ вторичных метаболитов микроорганизмов в составе лишайниковых веществ // *Прикладная биохим. и микробиол.* 2012. Т. 48. № 1. С. 81—89.
8. Moreau C., Mould S. *Toxins and food*. Chichester; New York; Brisbane; Toronto: John Wiley & Sons, 1979. 477 p.
9. Girlanda M., Isocrone D., Bianco C., Luppi-Mosca A.M. 1997. Two foliose lichens as microfungus ecological niches // *Mycologia*. Vol. 89. N 4. P. 531—536.
10. Трасс Х.Х. Сем. *Cladoniaceae* // *Определитель лишайников СССР*. 1978. Вып. 5. С. 7—79.
11. Рассадина К.А. Сем. *Parmeliaceae* // *Определитель лишайников СССР*. 1971. Вып. 1. С. 282—386.
12. Домбровская А.В. Сем. *Peltigeraceae* incl. *Nephromataceae* // *Определитель лишайников СССР*. 1975. Вып. 3. С. 139—196.

Поступила в редакцию
21.06.11

SAFETY OF FUNGAL SECONDARY METABOLITES IN HERBARIAL LICHEN SPECIMENS

A.A. Burkin, T.Yu. Tolpysheva, G.P. Kononenko

Fresh and taken from herbarium thalli of epigeous lichens *Cladonia stellaris*, *C. rangiferina*, *Allocetraria nivalis*, *A. cucullata*, *Cetraria islandica*, *Peltigera canina*, *Nephroma arcticum* were studied by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). There were found no significant differences in the content of secondary metabolites belonging to mycotoxins deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, zearalenone, alternariol, citrinin, sterigmatocystin, cyclopiazonic acid, mycophenolic acid, emodin, PR-toxin. Revealing of these substances in specimens kept in herbarium for some decades testify to an effective system of conservation of metabolic products in lichens.

Key words: lichens, mycotoxins, herbarium.

Сведения об авторах

Буркин Алексей Анатольевич — канд. мед. наук, ст. науч. сотр. Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН. Тел.: 8-499-256-80-31.

Толпышева Татьяна Юрьевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-22, e-mail: tolpyшева@mail.ru

Кононенко Галина Пантелеевна — докт. биол. наук, зав. лаб. микотоксикологии Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН. Тел.: 8-499-256-80-31; e-mail: kononenkogp@mail.ru