

УДК 581.1;582.29;547.92

СТЕРИНОВЫЙ СОСТАВ ЛИШАЙНИКА *Peltigera canina* ПРИ ДЕЙСТВИИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ТЕМПЕРАТУР

© 2023 г. Ю. Н. Валитова^{а, *}, В. Р. Хабибрахманова^{а, b}, В. М. Бабаев^с, В. Л. Уваева^а,
А. Ф. Хайруллина^а, Д. Ф. Рахматуллина^а, Е. И. Галеева^а, М. А. Свид^а, Ф. В. Минибаева^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики –
обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра
Казанский научный центр Российской академии наук, Казань, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

^сФедеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра Казанский научный центр Российской академии наук, Казань, Россия

*e-mail: yulavalitova@mail.ru

Поступила в редакцию 02.10.2023 г.

После доработки 04.11.2023 г.

Принята к публикации 13.11.2023 г.

В настоящее время особое внимание уделяется исследованию механизмов стрессовой устойчивости организмов-экстремофилов, способных выживать в экстремальных условиях. К таким организмам относятся лишайники, представляющие собой симбиотические ассоциации грибов и водорослей и/или цианобактерий. Высокая стрессовая устойчивость лишайников обусловлена наличием у них широкого спектра биологически активных метаболитов, в том числе стерина. Известно, что лишайники обладают разнообразным и уникальным стеринным составом, отличающимся от такового у грибов и водорослей. Стерин-опосредованные биохимические механизмы стрессовой устойчивости лишайников изучены недостаточно полно и не систематизированы. Температурный стресс является достаточно привычным для лишайников, часто произрастающих в неблагоприятных условиях. Известно, что сухие талломы лишайников способны выдерживать изменения температур в больших диапазонах, тогда как гидратированные талломы гораздо более чувствительны к действию неблагоприятных температур. В настоящей работе были исследованы стресс-индуцированные изменения дыхательной активности и индекса мембранной стабильности (ИМС), а также стеринового профиля гидратированных талломов лишайника *Peltigera canina* (L.) Willd. при действии повышенной (+40°C) и пониженной (–20°C) температур. Было показано, что неблагоприятные температуры вызывали подавление интенсивности дыхания и снижение ИМС талломов лишайника. Хроматомасс-спектрометрический анализ показал наличие у лишайника *P. canina* эргостерина, дегидроэргостерина, эпистерина, лихестерина и фунгистерина. При действии обоих стрессовых факторов происходило снижение уровня эргостерина и увеличение доли эпистерина. В условиях холодового стресса также увеличивалась доля дегидроэргостерина, доля лихестерина снижалась, а относительное содержание более насыщенного стерина фунгистерина оставалось на контрольном уровне. Можно полагать, что стресс-индуцированные изменения стеринового профиля лишайника при низкотемпературном воздействии создают оптимальный баланс стерина в мембранах, который обеспечивает условия для разворачивания успешной стратегии, ведущей к адаптации лишайника к действию стрессора.

Ключевые слова: *Peltigera canina*, лишайники, стерина, фосфолипиды, ИМС, дыхание, температурный стресс

DOI: 10.31857/S0015330323600997, **EDN:** BGZAUW

ВВЕДЕНИЕ

Лишайники представляют собой симбиотические ассоциации между грибом (микобионтом) и водорослью и/или цианобактерией (фотобион-

том) и являются экстремофильными организмами, так как способны выживать в крайне неблагоприятных условиях посредством уникальных механизмов устойчивости [1–4]. Температурный стресс является достаточно привычным для лишайников, которые могут произрастать как в полярных районах Земли, так и в жарких и засушливых регионах. Известно, что в сухом виде лишайни-

Сокращения: ИМС – индекс мембранной стабильности, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, ФИ – фосфатидилинозитол, ФК – фосфатидная кислота, ФХ – фосфатидилхолин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин.

ки способны переносить изменения температур в большом диапазоне, тогда как гидратированные талломы лишайников гораздо более чувствительны к действию неблагоприятных температур. Исследование термостойкости микобионтов и фикобионтов, выделенных из пустынных лишайников *Endocarpon pusillum*, *Acarospora nodulosa* и *A. schleicheri*, показало, что во влажных условиях они могут переносить температуру 50°C. Однако, в условиях засухи микобионт и фикобионт *E. pusillum* могут переносить температуру 75°C, а микобионты двух других лишайников могут переносить температуру 80°C [5]. Хорошо известна устойчивость лишайников к низким температурам, обусловленная наличием криопротекторов в их талломах [6, 7]. Показано, что даже при очень низких температурах у лишайников активно протекают метаболические процессы. В частности, у некоторых видов лишайников процессы дыхания и фотосинтеза могут протекать при температурах –12°C и –24°C, соответственно [8]. Пельтигеровые лишайники, которые произрастают в более мягких, по сравнению с Антарктикой, условиях, не обладают повышенной устойчивостью к воздействию столь низких температур. Известно, что эти лишайники отличаются высокими темпами роста и активным редокс-метаболизмом [9]. В связи с этим, можно предположить, что пельтигеровые лишайники продемонстрируют выраженную реакцию к действию неблагоприятных температур. Высокая стрессовая устойчивость лишайников может быть обусловлена, кроме прочих факторов, уникальным стеринным составом, отличающимся от такового у грибов и водорослей. В настоящее время биохимические механизмы стрессовой устойчивости лишайников, опосредованные изменениями профиля стеринов, изучены недостаточно полно и не систематизированы. В связи с этим, актуальным является идентификация стеринов в лишайниках и выявление изменений в их профиле при действии стрессовых факторов. Понимание молекулярных и биохимических основ стрессовых ответов лишайников посредством регуляции метаболизма стеринов поможет более углубленно и детально разобраться в механизмах стрессовой устойчивости экстремофилов. Целью настоящего исследования было изучение изменений стеринового профиля пельтигерового лишайника *P. canina* при действии неблагоприятных температур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили талломы лишайника *P. canina* (L.) Willd., собранные на территории Республики Татарстан в мае 2022 года. *P. canina* является эпигейным, двухкомпонентным лишайником, фотобионтом которого является цианобактерия *Nostoc punctiforme* (Kütz.)

Nar., а микобионтом – гриб *Peltigera* Willd. (тип *Ascomycota*). После сбора и предварительной очистки талломы лишайника высушивали при комнатной температуре. Высушенный материал помещали в морозильную камеру (–20°C) на хранение до использования в экспериментах.

Талломы лишайника гидратировали в течение 2 сут при температуре +10°C. Перед стрессовой обработкой контейнеры с гидратированными талломами оставляли на 2 ч при комнатной температуре. Для стрессовой обработки чашки Петри с образцами закрывали и помещали в термостат ТСО-1/80 СПУ при температуре +40°C на 3 ч, для воздействия пониженной температурой гидратированные талломы помещали в морозильную камеру при –20°C на 1 ч. Контролем служили гидратированные талломы лишайника, не подвергнутые стрессовой обработке. Оводненность талломов лишайника определяли в каждой временной точке высушиванием до постоянного веса на анализаторе влажности АВГ-60 (Госметр, Россия).

Интенсивность дыхания талломов лишайников определяли манометрическим методом в аппарате Варбурга [10]. Кусочки талломов лишайника после взвешивания (100–150 мг) помещали в сосудики Варбурга с 3 мл дистиллированной воды и после термостатирования в течение 10 мин по показаниям манометров каждые 60 мин в течение 3 ч измеряли потребление кислорода. Постоянство концентрации CO₂ в сосудике обеспечивали добавлением 300 мкл 20% NaOH в отросток сосудика. Дыхание измеряли в течение 3 ч для достижения устойчивого состояния после изменения температуры [11]. Расчеты проводили в мкл O₂ за 1 ч на 1 г сухой массы.

Выход электролитов из тканей лишайника измеряли по стандартной методике [12]. Кусочки таллома лишайника погружали в бюксы с бидистиллированной водой Milli-Q (15 мл) и выдерживали в термостате при комнатной температуре в течение 30 мин. Электропроводность раствора после инкубации (C₁) измеряли с помощью кондуктометра Ohaus ST3100C-B (США). Полный выход электролитов (C₂) определяли по электропроводности того же раствора после разрушения клеточных мембран при температуре 100°C в течение 30 мин.

Индекс мембранной стабильности (ИМС) рассчитывали по формуле:

$$\text{ИМС} = (1 - (C_1 - C_0) / (C_2 - C_0)) \times 100\%,$$

где C₀ – электропроводность бидистиллированной воды, мкСм.

Экстракцию липидов производили методом Блайя и Дайэра [13]. Талломы лишайника растирали в жидком азоте до порошкообразного состояния, отбирали пробу весом 1 г. Затем проводили

последовательную двухэтапную экстракцию смесью хлороформ–метанол (1 : 2) с обработкой в течение 5 мин в УЗ бане (Сапфир, Россия). Экстракты получали фильтрованием гомогената через фильтр Шотта. К объединенному экстракту добавляли 5 мл хлороформа и 8 мл дистиллированной воды, перемешивали, оставляли до расслоения. Далее с помощью пипетки Пастера отбирали верхний водно-метанольный слой, откидывая его, оставшийся хлороформный слой переносили в круглодонную колбу и упаривали на ротаторном испарителе (IKA RV 8, Германия). Выход липидных веществ определяли гравиметрическим методом [14]. Полученные экстракты до проведения анализов хранили в морозильной камере при температуре -20°C .

Для проведения щелочного гидролиза к экстракту липидов лишайника добавляли 1 М раствора КОН в 80% этаноле и гидролизовали на водяной бане в течение 30 мин при температуре 80°C . После гидролиза к реакционной смеси добавляли 2 мл диэтилового эфира и 3 мл дистиллированной воды, перемешивали, оставляли для разделения на слои (30 мин, 4°C). Затем верхний эфирный слой отделяли и переносили в пробирку для суммарного эфирного экстракта. К нижнему водно-спиртовому слою добавляли еще 2 мл эфира, перемешивали, оставляли для разделения на слои (30 мин, 4°C). Верхний эфирный слой отделяли и соединяли с эфирным экстрактом первой ступени. Экстракцию диэтиловым эфиром повторяли еще один раз аналогично. К суммарному эфирному экстракту добавляли небольшое количество безводного сернокислого натрия (0.01 г), перемешивали и выдерживали в течение 10 мин. После экстракт фильтровали через мембранный фильтр (PTFE, 0.45 μm , Schleicher & Schuell, Германия), эфир выпаривали, сухой остаток количественно переносили в хроматографическую вialу, используя в качестве растворителя метанол. Полученные пробы до проведения анализов хранили в морозильной камере при температуре -20°C .

Газохроматографический анализ с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) проводили на газовом хроматографе Agilent 6890N с масс-спектрометрическим детектором 5973 N (Agilent Technologies, США). Метод ионизации: электронная ионизация (70 эВ). Температура источника ионов: 230°C . Диапазон масс: 50–800 а. е. м. Капиллярная колонка HP-5MS длиной 30 м с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки фазы 0.25 мкм. Условия газохроматографического разделения: объем вводимой пробы — 2 мкл; начальная температура термостата колонки — 60°C , термостатирование при начальной температуре колонки 2 мин, подъем температуры со скоростью $15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до 300°C , термостатирование при конечной температуре колонки 15 мин; температура узла ввода проб (инжектора) —

300°C ; режим ввода пробы без деления потока, газ-носитель — гелий, расход — 1.5 мл/мин.

К пробе, полученной в ходе щелочного омыления экстракта липидов, добавляли 100 мкл смеси хлороформ–метанол (1 : 1), отбирали 20 мкл полученного раствора добавляли 5 мкл раствора нафталина (2 мг/мл), используемого в качестве внутреннего стандарта.

Идентификацию компонентов проводили с использованием стандартов стерина — эргостерина, холестерина, стигмастерина (Sigma-Aldrich, США, степень чистоты не менее 95%), библиотеки масс-спектров NIST 17 и литературных данных [15, 16].

Относительное процентное содержание индивидуальных стерина в экстрактах рассчитывали путем определения площади соответствующего пика на ГХ-хроматограмме, как процентной части от общей суммы площадей пиков всех стерина. При этом для компенсации возможных ошибок в ходе ГХ-МС анализа и получения достоверных результатов в расчетах использовали отношение площадей пиков стерина к площади пика нафталина в каждом измерении.

Высокоэффективную тонкослойную хроматографию (ВЭТСХ) проводили в автоматизированной системе CAMAG (Швейцария). Для хроматографии использовали пластины Merck KGaA (Германия). Экстракты липидов растворяли в смеси хлороформ–метанол (1 : 1) (5 мг/мл). Для идентификации индивидуальных фосфолипидов использовали стандарт фосфолипидов (Avanti, США). Нанесение экстрактов и стандартов на пластину выполняли на автоматическом аппликаторе Linomat 5 в виде треков шириной 7 мм. Элюирование проводили в автоматической камере ADC 2, линия фронта подвижной фазы — 80 мм. В качестве подвижной фазы использовали хлороформ : метанол : вода (65 : 25 : 4). Далее ТСХ-пластины опрыскивали 5% раствором H_2SO_4 в этаноле с помощью пульверизатора (Ленхром, Россия), высушивали и нагревали 20 мин при температуре 150°C . Денситометрическое сканирование ТСХ-пластин после дериватизации проводили на TLC Scanner 4 при параметрах: режим — отражательная абсорбция, длина волны — 490 нм, щель — 6.00×0.40 мм, скорость сканирования — 20 мм/с, разрешение — 100 мкм/шаг, математический фильтр Savitsky-Golay 7. Количественное определение индивидуальных фосфолипидов в исследуемых экстрактах осуществляли по калибровочным уравнениям, полученным для чистых стандартов лизофосфатидилхолина (ЛФХ), фосфатидилинозитола (ФИ), фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидной кислоты (ФК), фосфатидилэтаноламина (ФЭ) (табл. 1).

Опыты проводили в 3–5 биологических и 3–10 аналитических повторностях. Полученные данные представлены в виде средних арифметиче-

Таблица 1. Калибровочные уравнения для количественного определения индивидуальных веществ.

Вещества — стандарты	Количество, мкг	Полученное калибровочное уравнение (по площади пиков)	<i>r</i>
Лизофосфатидилхолин	0.7; 1.4; 2.1	$y = 816 + 1683x$	0.96
Фосфатидилинозитол	1.8; 3.6; 5.4	$y = 1405 + 579x$	0.99
Фосфатидилхолин	3.8; 7.6; 11.4	$y = 4004 + 997x$	0.99
Фосфатидилэтаноламин	3; 6; 9	$y = 3824 + 1097x$	0.99

ских значений со стандартными ошибками (SE). Все экспериментальные данные по количественному определению липидов и каротиноидов имеют нормальное распределение признака. Для сравнения их средних арифметических значений использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с оценкой попарных различий с помощью критериев Тьюки, Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ физиологического состояния лишайника P. canina при действии неблагоприятных температур

Первым этапом работы было проведение экспериментов по изучению физиологического состояния лишайника при действии неблагоприятных температур. Стрессовые условия были подобраны в результате серии предварительных экспериментов, в которых были изучены изменения физиологических параметров лишайника при действии различных температур и с разным временем воздействия (данные не представлены). Было обнаружено, что самыми эффективными

температурами, индуцирующими стрессовый ответ лишайника, являются обработка талломов повышенной температурой +40°C в течение 3 ч и низкой отрицательной температурой –20°C в течение 1 ч. Контролем служили предварительно гидратированные талломы лишайника. После обработки талломов неблагоприятными температурами были измерены физиологические параметры: дыхательная активность лишайника и ИМС для оценки состояния мембран. Было показано, что в течение 3 ч после действия повышенной температуры наблюдается значительное подавление дыхания у талломов лишайника (рис. 1). Уровень потребления кислорода прогретыми талломами был на 80–90% ниже по сравнению с контрольным вариантом. Обработка пониженной температурой не вызвала столь значительных изменений дыхательной активности: через 1 ч после стрессового воздействия наблюдалась легкая стимуляция дыхания (на 30%), через 2 ч уровень дыхательной активности был уже чуть ниже контрольного и лишь к третьему часу происходило заметное подавление дыхания на 40%.

Об изменении проницаемости клеточных мембран лишайника судили по выходу электролитов из клеток, по которому рассчитывали индекс мембранной стабильности (ИМС). ИМС достоверно снижался при действии обеих неблагоприятных температур (рис. 2). Через 1 ч после действия стресса в талломах лишайника, обработанного отрицательной температурой, ИМС клеток слегка возрастал, тогда как после действия повышенной температуры наоборот происходило снижение этого показателя, свидетельствующее о повышении проницаемости клеточных мембран. Через 3 ч после стрессовой обработки ИМС полностью восстанавливался до контрольного уровня при обоих воздействиях (рис. 2).

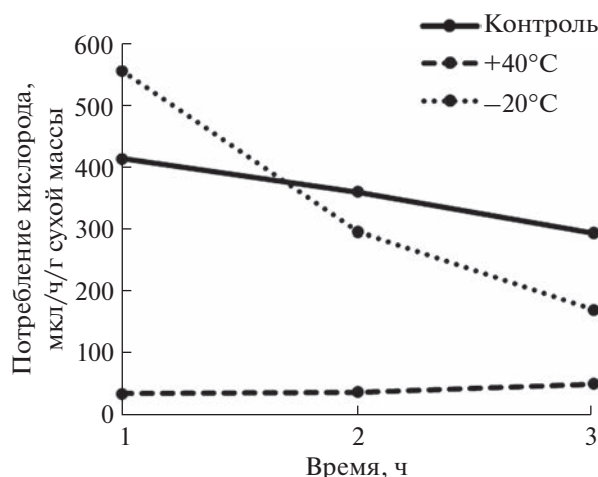


Рис. 1. Изменение потребления кислорода талломами лишайника *P. canina* в постстрессовый период, спустя 1, 2, 3 ч после стрессовой обработки неблагоприятными температурами (–20°C и +40°C), мкл/ч/г сухой массы. На рисунке представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки (SE) при $n = 5$. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) при $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***)

Анализ стеринового и фосфолипидного состава лишайника P. canina при действии неблагоприятных температур

Анализ стеринового профиля показал, что для лишайника *P. canina* характерно наличие дегидроэргостерина, лихестерина, эргостерина, фунгистерина и эпистерина (рис. 3). Было обнаружено, что преобладающим стеринном *P. canina* является эргостерин, который был точно идентифицирован

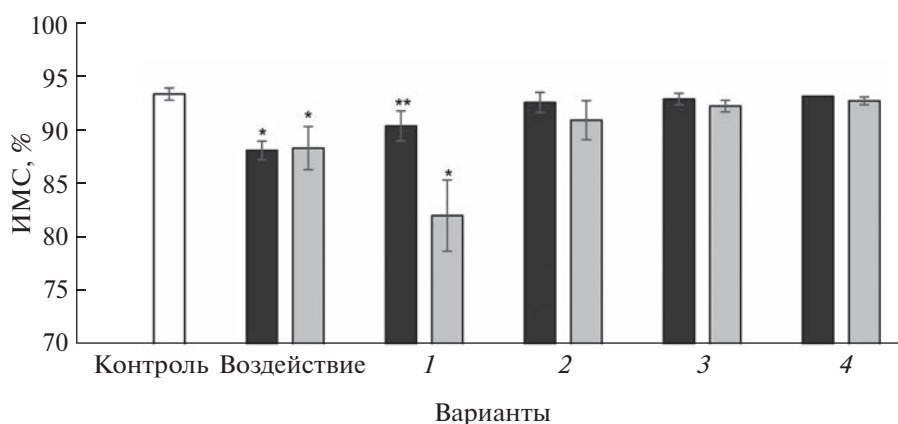


Рис. 2. Изменение ИМС в талломах лишайника *P. canina* при действии неблагоприятных температур (-20°C и $+40^{\circ}\text{C}$) и в постстрессовый период после стрессовой обработки неблагоприятными температурами (варианты: **1** — через 1 ч после стрессовой обработки, **2** — через 3 ч после стрессовой обработки, **3** — через 5 ч после стрессовой обработки, **4** — через 24 ч после стрессовой обработки). Белым цветом обозначен контрольный вариант (ИМС гидратированного лишайника), светло-серым цветом окрашены столбцы значений ИМС лишайника при действии повышенной температуры $+40^{\circ}\text{C}$, темно-серым — при действии низкой отрицательной температуры -20°C . На рисунке представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки (SE) при $n = 5$. Достоверность различий определяли с помощью однократного дисперсионного анализа (ANOVA) при $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***)

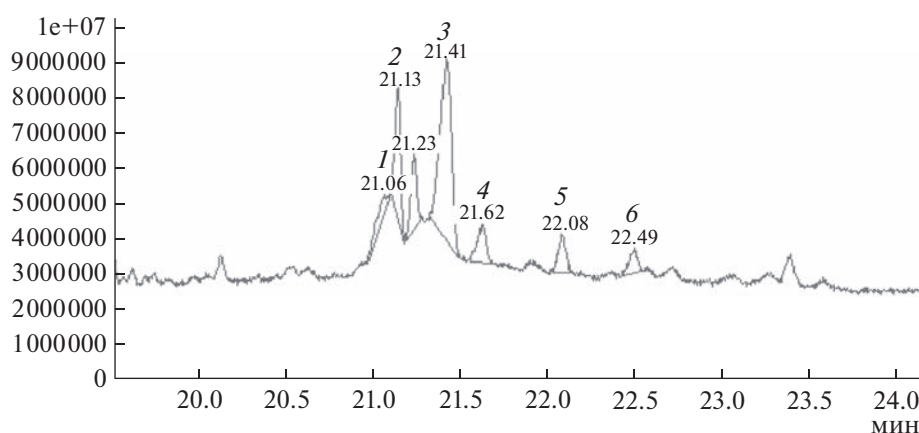


Рис. 3. ГХ-МС профиль стерина, выделенных из таллома лишайника *P. canina*. Приведен профиль стерина, идентифицированных в гидратированных талломах, не подвергавшихся действию неблагоприятных температур. Пики соединений пронумерованы, над каждым пиком указано точное время выхода соединений: **1** — дегидроэргостерин, **2** — лихестерин, **3** — эргостерин, **4** — фунгистерин, **5** — эпистерин, **6** — стерин не идентифицирован.

путем сопоставления его масс-спектра с масс-спектром стандарта эргостерина и по библиотеке масс-спектров NIST 17. Остальные стерин были идентифицированы по характерным фрагментарным ионам данных соединений, описанных в литературе [15, 16] (табл. 2). Соединение с временем выхода 22.49 мин (рис. 4, пик 6) идентифицировать не удалось, однако наличие в его масс-спектре ионов с m/z 414 и 399, характерных для стерина, позволило отнести его к этому классу. Известно, что ион m/z 414 образуется при фрагментации β -ситостерина [16].

О содержании обнаруженных в лишайнике стерина судили по площадям их пиков на ГХ-хроматограмме по отношению к общей сумме площадей пиков всех стерина (табл. 3). При дей-

ствии обеих неблагоприятных температур происходило заметное снижение доли эргостерина в стеринном пуле лишайника (табл. 3). Кроме того, наблюдались стресс-индуцированные изменения в содержании других стерина. Так, при холодной обработке наблюдалось увеличение относительного содержания дегидроэргостерина и эпистерина, происходило снижение доли лихестерина. Действие повышенной температуры вызывало увеличение доли эпистерина в талломе лишайника. Уровень более насыщенного фунгистерина оставался на контрольном уровне при всех воздействиях. Общий уровень стерина снижался при обоих воздействиях, но особенно значительно при низкотемпературной обработке (табл. 3).

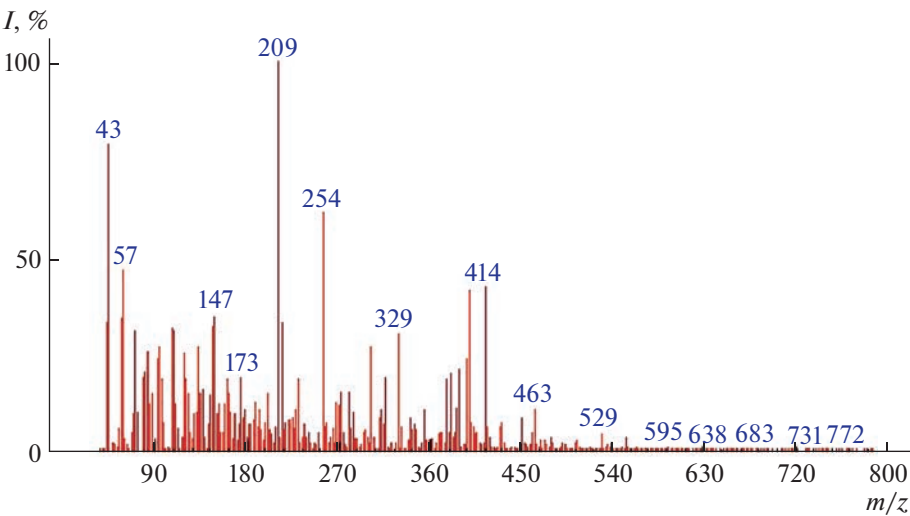


Рис. 4. Масс-спектр не идентифицированного соединения (пик 6 на рис.3 с временем выхода 22.49 мин).

Таблица 2. Основные фрагментарные ионы и их интенсивность в масс-спектрах стеринов лишайника *P. canina*.

Стерины	Время выхода, мин	Фрагментарные ионы (<i>m/z</i>) и их интенсивность (<i>I</i> , %)
Дегидроэргостерин	21.06	363 (69), 253 (41), 251 (99), 209 (97), 207 (32), 195 (29), 69 (36), 55 (53), 43 (86), 41 (33)
Лихестерин	21.13	396 (35), 364 (31), 363 (99), 253 (38), 211 (25), 157 (24), 143 (27), 69 (22), 55 (36), 43 (64)
Эргостерин	21.41	396 (52), 363 (99), 337 (34), 253 (36), 157 (37), 145 (39), 143 (50), 81 (37), 69 (78), 55 (65)
Фунгистерин	21.62	380 (41), 253 (46), 237 (99), 213 (44), 207 (33), 195 (37), 181 (34), 131 (43), 55 (47), 43 (84)
Эпистерин	22.08	314 (20), 281 (18), 272 (21), 271 (99), 105 (17), 94 (16), 79 (18), 69 (38), 55 (27), 41 (19)
Не идентифицирован	22.49	414 (43), 399 (41), 254 (61), 213 (33), 209 (99), 147 (34), 57 (47), 55 (34), 43 (79), 41 (33)

Таблица 3. Относительное содержание стеринов лишайника *P. canina* при действии неблагоприятных температур (–20°C и +40°C)

Стерины	Относительное содержание, %		
	контроль	–20°C	+40°C
Дегидроэргостерин	7.7 ± 0.4	10.3 ± 0.7*	8.0 ± 0.2
Лихестерин	23.8 ± 1.0	17.2 ± 0.7**	22.4 ± 0.6
Эргостерин	61.0 ± 1.9	53.3 ± 0.9*	48.9 ± 1.0**
Фунгистерин	7.4 ± 0.2	7.2 ± 0.7	6.4 ± 0.4
Эпистерин	6.5 ± 0.0	11.3 ± 0.2***	9.0 ± 0.5**
Не идентифицирован	4.7 ± 0.4	6.0 ± 0.8	5.9 ± 0.1*
Общая сумма стеринов	100	55.7 ± 7.2**	86.5 ± 2.1**

Примечание. В таблице представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки (*SE*) при *n* = 3. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) при *P* < 0.05 (*); *P* < 0.01 (**); *P* < 0.001 (***).

Таблица 4. Изменение содержания фосфолипидов в талломах лишайника *P. canina* при действии неблагоприятных температур (–20°C и +40°C)

Фосфолипиды	Содержание, мг/г сухой массы		
	контроль	–20°C	+40°C
ЛФХ	0.36 ± 0.08	0.13 ± 0.02*	0.06 ± 0.01***
ФИ	0.74 ± 0.08	1.52 ± 0.09**	1.92 ± 0.05***
ФХ	5.35 ± 0.10	4.74 ± 0.04**	5.06 ± 0.07
ФЭ	3.12 ± 0.13	2.98 ± 0.05	2.79 ± 0.08

Примечание. В таблице представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки (*SE*) при *n* = 3. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) при *P* < 0.05 (*); *P* < 0.01 (**); *P* < 0.001 (***).

ВЭТСХ анализ стресс-индуцированных изменений фосфолипидного состава показал, что при температурной обработке основные фосфолипиды мембран (ФХ и ФЭ) остаются на контрольном уровне, содержание ФИ значительно увеличивается, а содержание ЛФХ заметно снижается (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

В естественной среде обитания лишайники часто испытывают температурный стресс. Пельтигеровые лишайники (семейство Peltigeraceae Dumort.), произрастающие в областях умеренного климата и отличающиеся высокими темпами роста и активным редокс-метаболизмом [9], могут обладать повышенной чувствительностью к действию экстремальных температур. Эти факторы обусловили выбор лишайника *P. canina* в качестве объекта исследования. Фотобионтом лишайника является цианобактерия *Nostoc punctiforme*. *P. canina* растет в довольно тенистых местах, встречается на почве по склонам канав и на обочинах дорог, на корневых лапах и гниющих пнях. Вид распространен в Европе, Азии, Северной и Южной Америке, Африке, Австралии [17].

Значительная часть метаболически активного периода лишайников происходит при низкой интенсивности света или в полной темноте [18]. Необходимо учитывать и тот факт, что фотосинтетический партнер может составлять всего 5–10% биомассы лишайника [19]. В связи с этим дыхательная нагрузка на фотосинтетическую клетку может быть значительной у этих симбиотических организмов, а, следовательно, скорость дыхания оказывает большое влияние на прирост углерода и является важным показателем физиологического состояния лишайника. Многочисленными исследованиями показано, как факторы окружающей среды влияют на интенсивность дыхания у лишайников [20]. В наших экспериментах было показано, что при действии повышенной температуры наблюдается значительное подавление дыхания у талломов лишайника (рис. 1). Аналогичный эффект наблюдался в работе Smyth (1934)

при действии высокой температуры на лишайник *P. canina* [21]. Автор связывает ингибирование дыхания с повреждающим действием высокой температуры на компоненты дыхательной цепи. Обработка пониженной температурой не вызывала столь значительных изменений дыхательной активности лишайника в первые 2 ч, лишь к третьему часу происходило небольшое подавление дыхания (рис. 1).

Проницаемость мембран является одним из наиболее чувствительных параметров для оценки физиологической реакции лишайников на воздействие окружающей среды [22]. Так, показано, что тяжелые металлы могут повреждать биологические мембраны лишайников, вызывая утечку ионов [23, 24]. Снижение ИМС после выдерживания талломов при действии экстремальных температур в наших экспериментах свидетельствует о повреждении клеточных мембран (рис. 2).

Наблюдаемые физиологические изменения свидетельствуют о стрессовом состоянии лишайника после термической обработки. По-видимому, *P. canina* более чувствительна к действию повышенных температур, так как даже через 3 ч после воздействия дыхание остается подавленным. Однако восстановление ИМС до контрольного уровня через 3 ч после действия обеих экстремальных температур может свидетельствовать об адаптивных процессах, происходящих в мембранах клеток талломов лишайника.

В настоящее время доминирующей гипотезой о сенсоре температурных колебаний в растениях является гипотеза об изменении текучести мембраны, которая, в частности, обсуждается в обзоре Ф. Р. Гималова [25]. Предполагают, что плазматическая мембрана действует как первичный сенсор температурных колебаний вследствие динамических изменений ее физических характеристик [26]. Показано, что температурный сигнал воспринимается растением через изменение текучести мембраны, вызывающее реорганизацию цитоскелета и поток ионов кальция в цитоплазму, активацию кальций-зависимых протеинкиназ и

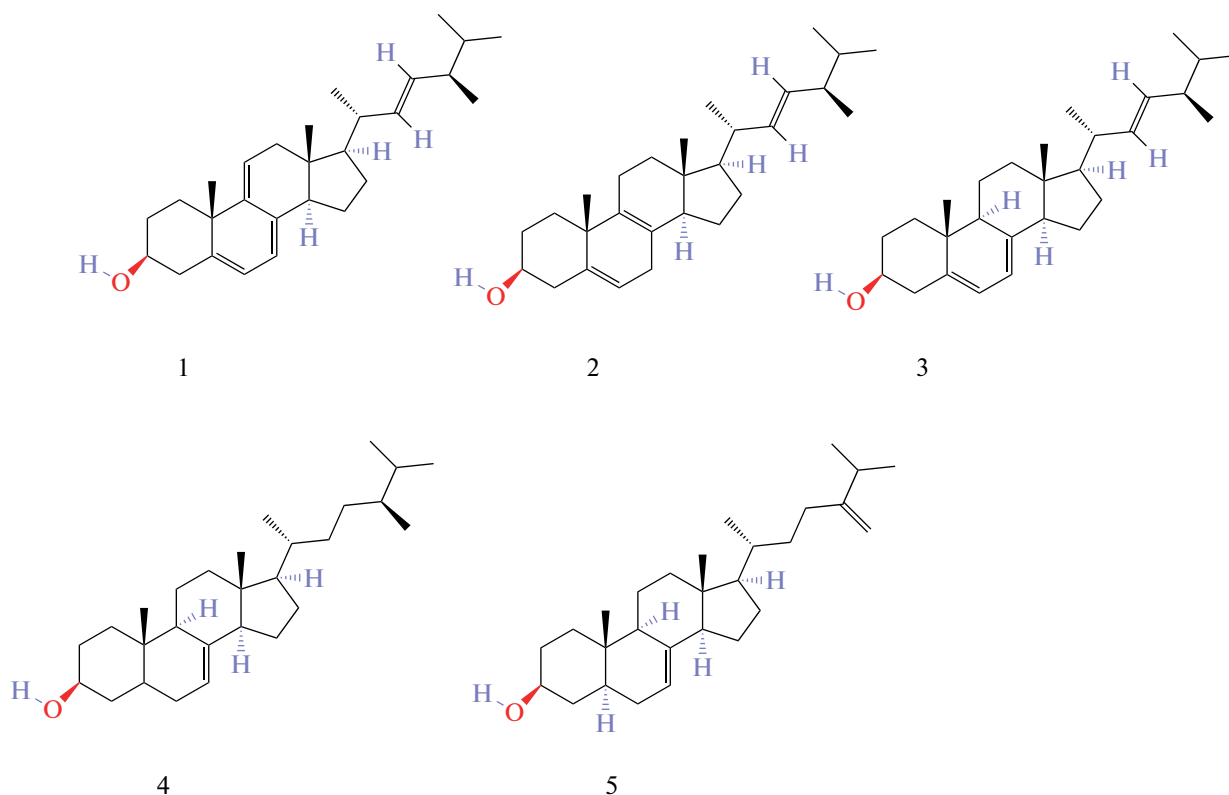


Рис. 5. Структурные формулы стерина лишайника *P. canina*. 1 – дегидроэргостерин, 2 – лихестерин, 3 – эргостерин, 4 – фунгистерин, 5 – эпистерин.

МАР-киназ [27]. Известно, что понижение температуры уменьшает, а повышение температуры, наоборот, увеличивает текучесть мембран [28, 29], то есть температура как физический параметр оказывает термодинамический эффект на биологические молекулы (белки, ДНК) и надмолекулярные структуры (мембраны, хромосомы).

Известно, что в основе регуляции текучести и проницаемости биологических мембран лежит изменение соотношения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот [30]. В экспериментах на свободноживущей цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 продемонстрировано, что при понижении температуры происходит индукция активности генов десатураз и вследствие этого увеличивается содержание ненасыщенных жирных кислот в составе мембран и, соответственно, повышается их текучесть [31]. Можно полагать, что лишайники как фотосинтезирующие организмы могут проявлять схожую реакцию на изменение температуры.

Другим важным компонентом, влияющим на текучесть клеточных мембран, являются молекулы стерина, которые взаимодействуют с головками фосфолипидов, частично иммобилизуя проксимальную часть углеводородной цепи [32]. Стабилизирующая способность молекулярных видов стерина может различаться в зависимости от

особенностей их химической структуры, в частности, от количества двойных связей, этильных и метильных групп в структуре молекулы стерина [33]. Как следствие, соотношение молекулярных видов стерина в мембране может влиять на ее текучесть и проницаемость.

Анализ стеринового профиля *P. canina* показал, что для этого лишайника характерно наличие дегидроэргостерина, лихестерина, эргостерина, фунгистерина и эпистерина (рис. 3). Таким образом, лишайник *P. canina* обладает достаточно богатым стеринным составом, если учесть, что у растений обычно присутствует три основных стерина, а у животных и грибов – всего лишь один основной стерин. Необходимо отметить, что все стерины *P. canina* являются метилстеринами, в отличие от растений, где преобладающими стеринами являются более гидрофобные этилстерины – β -ситостерин и стигмастерин. В целом, можно сказать, что весь пул стерина лишайника является более ненасыщенным, чем у растений, так как у большинства стерина имеют две и более двойных связей (рис. 5). Преобладающим стерин лишайника *P. canina* является эргостерин, характерный для грибов, что неудивительно, поскольку микобионт составляет до 95% биомассы лишайника [1]. Известно, что эргостерин обладает

большой реакционной способностью благодаря наличию в кольце системы сопряженных двойных связей. В грибах эргостерин является главным компонентом секреторных везикул и играет чрезвычайно важную роль в дыхании и окислительном фосфорилировании в митохондриях, что позволяет называть этот стерин метаболическим маркером [11].

В работе [11] продемонстрирована прямая корреляция между изменением содержания эргостерина и интенсивностью дыхания лишайника. В наших экспериментах мы также отчасти наблюдали корреляцию между дыхательной активностью и уровнем эргостерина: при действии обеих неблагоприятных температур происходило заметное снижение доли эргостерина в стериновом пуле лишайника (табл. 3), что сопровождалось снижением дыхательной активности таллома, особенно при действии повышенной температуры. Помимо уменьшения доли эргостерина, происходили стресс-индуцированные изменения в относительном содержании и других стеринов лишайника. При холодовой обработке наблюдалось увеличение относительного содержания деметилированных стеринов дегидроэргостерина и эпистерина, а также снижение доли лихестерина (табл. 3). Необходимо отметить, что лихестерин является уникальным стеринем, который можно обнаружить только в лишайниках [34]. Действие повышенной температуры также вызывало увеличение доли эпистерина в талломе лишайника (табл. 3). Уровень более насыщенного фунгистерина оставался на контрольном уровне при всех воздействиях. Общий уровень стеринов снижался при обоих воздействиях, но особенно значительно при низкотемпературной обработке (табл. 3), что может свидетельствовать об увеличении текучести клеточных мембран лишайника при действии экстремальных температур, что согласуется со снижением стабильности мембран (рис. 2).

Можно полагать, что в механизмы стресс-индуцированных изменений стеринового состава вовлечены фосфолипиды. Анализ фосфолипидного состава лишайника *P. canina* показал, что в условиях температурного стресса содержание основных фосфолипидов лишайника ФХ и ФЭ не изменяется, однако наблюдаются значительные изменения в содержании ФИ и ЛФХ (табл. 4). Известно, что ФИ является минорным фосфолипидом клеточных мембран, его содержание составляет от 2 до 8% от всех ФЛ, но его функциональная роль велика, особенно в процессах сигналинга [35]. В ряде работ показано существенное (в 1.5–2.5 раза) увеличение содержания этих фосфолипидов у устойчивых к стрессовому воздействию растений [36]. ФИ участвует в регуляции содержания внутриклеточного кальция, и повышение количества ФИ может быть связано с адаптационными процессами в клетках [37]. Кроме того, обнаружено,

что ФИ являются регуляторами неvesикулярного транспорта эргостерина у дрожжей, и у ФИ-мутантов транспорт стеринов замедлен [38]. Эти данные вполне согласуются с нашими данными о снижении доли эргостерина в *P. canina* при действии неблагоприятных температур, однако механизмы взаимосвязи содержания эргостерина и ФИ в лишайнике остаются неясными. В растениях лизофосфолипиды, в частности ЛФХ, образуются в ответ на стрессовые воздействия в результате активации фосфолипаз, в том числе фосфолипазы А₂ [39]. Недавние исследования свидетельствуют о роли лизофосфолипидов в термотолерантности в различных организмах [40]. Наблюдаемое в наших экспериментах заметное снижение уровня ЛФХ у лишайника в условиях температурного стресса (табл. 4) является довольно необычной стрессовой реакцией и требует дальнейшего детального изучения.

На основании полученных данных можно заключить, что лишайник *P. canina* проявляет большую чувствительность к повышению температуры, что выражается в значительном подавлении дыхательной активности и снижении стабильности мембран. Однако стериновый ответ более ярко выражен при действии на лишайник низкой отрицательной температуры, несмотря на более сдержанную физиологическую реакцию. Можно предположить, что при действии отрицательной температуры происходит замедление синтеза эргостерина и накопление его предшественников дегидроэргостерина и эпистерина. У дегидроэргостерина имеются 4 двойные связи, то есть он является самым ненасыщенным из вышеперечисленных стеринов и, по всей видимости, вносит свой вклад в увеличение проницаемости мембран таллома и, соответственно, увеличение их текучести. Возможно, стресс-индуцированные изменения стеринового профиля лишайника при холодовой обработке создают оптимальный баланс стеринов в мембранах, который способствует разворачиванию успешной стратегии, ведущей к адаптации лишайника к действию стрессора.

Таким образом, можно полагать, что разнообразный стериновый состав позволяет лишайнику тонко регулировать текучесть мембран за счет создания необходимого соотношения более насыщенных и менее насыщенных стеринов в мембране.

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания Федерального исследовательского центра Казанского научного центра Российской академии наук (оценка дыхательной активности и ИМС), а также при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда <https://rscf.ru/project/22-14-00362> (рук. Ю.Н. Валитова).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-

либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дьяков Ю.Т. Ботаника. Курс альгологии и микологии. Москва: Изд-во МГУ, 2007. 559 с.
2. Armstrong R.A. Adaptation of lichens to extreme conditions // Plant Adaptation Strategies Changing Environment / Eds Shukla V., Kumar S., Kumar N. Springer. 2017. P. 1.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-6744-0_1
3. Stocker-Wörgötter E. Stress and developmental strategies of lichens // Symbioses and Stress. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology / Eds Seckbach J., Grube M. Springer, Dordrecht. 2010. V. 17. P. 525.
https://doi.org/10.1007/978-90-481-9449-0_27
4. Stanton D.E., Ormond A., Koch N.M., Colesie C. Lichen ecophysiology in a changing climate // Am. J. Bot. 2023. V. 110. E16131.
<https://doi.org/10.1002/ajb2.16131>
5. Chen K., Wei J.-C. Heat tolerance of the mycobionts and phycobionts from three desert lichens // Mycosystema. 2015. V. 34. P. 1007.
6. Калугина Ю.В., Никитина И.И. Кробиология. Киев: Наукова думка, 1994. 432 с.
7. Порядина Л.Н., Прокопьев И.А., Конорева Л.А., Чесноков С.В., Слепцов И.В., Филиппова Г.В., Шашурин М.М. Адаптационные биохимические механизмы, обеспечивающие устойчивость лишайников к экстремальным условиям среды обитания // Природные ресурсы Арктики и Субарктики. 2018. Т. 26. С. 109.
<https://doi.org/10.31242/2618-9712-2018-26-4-109-117>
8. Вайнштейн Е.А. Некоторые вопросы физиологии лишайников. I. Дыхание // Ботанический журнал. 1972. Т. 7. С. 832.
9. Beckett R.P., Minibayeva F.V., Vylegzhanina N.N., Tolpysheva T. High rates of extracellular superoxide production by lichens in the suborder *Peltigerineae* correlate with indices of high metabolic activity // Plant, Cell Environ. 2003. V. 41. P. 1827.
10. Семихатова О.А., Чулановская М.В. Манометрические методы изучения дыхания и фотосинтеза растений. Москва: Наука, 1965. 168 с.
11. Sundberg B., Ekblad A., Näsholm T., Palmqvist K. Lichen respiration in relation to active time, temperature, nitrogen and ergosterol concentrations // Funct. Ecol. 2002. V. 13. P. 119.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1999.00295.x>
12. Грищенко Н.Н., Лукаткин А.С. Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода // Поволжский экологический журнал. 2005. № 1. С. 3.
13. Bligh E.C., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. P. 911.
14. ОФС 1.2.1.0010.15. Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1.
15. Safe S., Safe L.M., Maass W.S.G. Sterols of three lichen species: *Lobaria pulmonaria*, *Lobaria scrobiculata* and *Usnea longissima* // Phytochemistry. 1975. V. 14. P. 1821.
16. Solberg Y. Chemical constituents of the lichens *Cetraria delisei*, *Lobaria pulmonaria*, *Stereocaulon tomentosum* and *Usnea hirta* // J. Hattori Bot. Lab. 1987. V. 63. P. 357.
17. Горбач Н.В. Лишайники Белоруссии. Определитель. Минск: Наука и техника, 1973. 77 с.
18. Sundberg B., Palmqvist K., Esseen P.-A., Renhorn K.-E. Growth and vitality of epiphytic lichens. II. Modelling of carbon gain using field and laboratory data // Oecologia. 1997. V. 13. P. 10.
19. Ahmadjian V. The lichen symbiosis. Chichester: John Wiley & Sons. New York, 1993. 250 p.
20. Nash T.H. Photosynthesis, respiration, productivity and growth. Lichen Biology. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 88 p.
21. Smyth E.S. A Contribution to the physiology and ecology of *Peltigera canina* and *P. polydactyla* // Ann. Bot. 1934. V. 48. P. 781.
22. Mulgrew A., Williams P. Biomonitoring of air quality using plants. Air Hygiene Report 10. London: Kings College, 2000. 171 p.
23. Garty J., Tomer S., Levin T., Lehr H. Lichens as biomonitors around a coal-fired power station in Israel // Environ. Res. 2003. V. 91. P. 186.
[https://doi.org/10.1016/s0013-9351\(02\)00057-9](https://doi.org/10.1016/s0013-9351(02)00057-9)
24. Marques A.P., Maria C.F., Hubert T.W., Steinebach O.M., Verburg T., De Goeij J.J. Cell-membrane damage and element leaching in transplanted *Parmelia sulcata* lichen related to ambient SO₂, temperature, and precipitation // Environ. Sci. Technol. 2005. V. 39. P. 2624.
<https://doi.org/10.1021/es0498888>
25. Гималов Ф.Р. Восприятие растениями холодового сигнала, или как устроен растительный “термометр” // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. С. 19.
<https://doi.org/10.31040/2222-8349-2018-0-2-19-24>
26. Los D.A., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions // Photosynth. Res. 2013. V. 116. P. 489.
27. Sangwan V., Orvar B.J., Beyerly J., Hirt H., Dhindsa R.S. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways // The Plant Journal. 2002. V. 31. P. 629.
28. Saidi Y., Peter M., Finka A., Cicekli C., Vigh L., Goloubinoff P. Membrane lipid composition affects plant heat sensing and modulates Ca²⁺-dependent heat shock response // Plant Signaling behav. 2010. V. 5. P. 1530.
29. Rawat N., Singla-Pareek S.L., Pareek A. Membrane dynamics during individual and combined abiotic stresses in plants and tools to study the same // Physiol. Plant. 2021. V. 171. P. 653.
<https://doi.org/10.1111/ppl.13217>
30. Renne M.F., IPM de Kroon A. The role of phospholipid molecular species in determining the physical properties of yeast membranes // FEBS Lett. 2018. V. 8. P. 1330.
31. Suzuki I., Los D.A., Kanesaki Y., Mikami K., Murata N. The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis* // EMBO J. 2000. V. 19. P. 1327.

32. Мысякина И.С., Фунтикова Н.С. Роль стерина в морфогенетических процессах и диморфизме грибов // Микробиология. 2007. Т. 76. С. 5.
33. Попов А.М. Comparative study of effects of various sterols and triterpenoids on permeability of model lipid membranes // J. Evol. Biochem. Physiol. 2003. V. 39. P. 314.
34. Дембицкий В.М., Толстиков Г.А. Природные галогенированные органические соединения. Новосибирск: Изд-во СО РАН, Гео, 2003. 366 с.
35. Berridge M.J., Irvine R.F. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction // Nature. 1984. V. 312. P. 315.
36. Xue H.-W., Chen X., Me Y. Function and regulation of phospholipid signaling in plants // Biochem. J. 2009. V. 421. P. 145.
37. Su K., Bremer D.J., Jeannotte R. Membrane lipid composition and heat tolerance in cool-season turfgrasses, including a hybrid bluegrass // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 2009. V. 134. P. 511.
38. Ravchaudhuri S., Im Y.J., Hurley J.H., Prinz W.A. Non-vesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein-related proteins and phosphoinositides // J. Cell Biol. 2006. V. 173. P. 107.
39. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.
40. Fabri J., de Sa N.P., Malavazi I., Del Poeta M. The dynamics and role of sphingolipids in eukaryotic organisms upon thermal adaptation // Prog Lipid Res. 2020. V. 80. P. e101063
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101063>