РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
БОТАНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ им. В. Л. КОМАРОВА

ACADEMIA SCIENTIARUM ROSSICA
INSTITUTUM BOTANICUM NOMINE V. L. KOMAROVII

НОВОСТИ СИСТЕМАТИКИ НИЗШИХ РАСТЕНИЙ

Том 31

NOVITATES SYSTEMATICAE PLANTARUM NON VASCULARIUM

Tomus XXXI

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ (PETROPOLIS)
„НАУКА"
1996

Arctic // Graphis Scripta. 1994. Vol. 6. – Lynge B. Lichens from Novaya Zemlya (excl. Acarospora and Lecanora) // Rep. Sci. Results Norweg. Exped. Novaya Zemlya 1921. Oslo, 1928. N 43. – Malme G. Lichenes orae Sibiriae Borealis inde ab insula Minin usque ad promantorium Ryrkajpia in Expeditione Vegae lecti // Ark. Bot. 1932. Vol. 25 A, N 2. – Middendorff A. Th. Reise in den äussersten Norden und Osten Sibiriens während der Jahre 1843 und 1844 mit Allerhöchster Genehmigung auf Veranstaltung der keiserl. Akademie der Wissenschaften zu St.-Petersburg. Bd 4, Th. 2, Lfg. 1, Anh. 6. St.-Petersburg, 1867. – Nylander W. Enumeratio Lichenum Freti Behringii // Bulletin de la Société Linnéanne de Normandie. 4 sér. 1888. Vol. 1. – Pallas P. S. Reise durch verschiedene Provinzen des Russischen Reiches. St.-Petersburg, 1771–1776. – Piin T. A list of terricolous lichens of „Forest Island" of Ary Mas // Folia Criptogamica Estonica. 1977. N 8. – Ruprecht F. J. Über die Verbreitung der Pflanzen im nördlichen Ural. Nach dem Ergebnissen der geographischen Expedition im Jahre 1847–1848 // Beiträge zur Pflanzenkunde der Russischen Reiches. St.-Petersburg, 1850. Lfg. 7. – Schmidt M. F. Wissenschaftliche Resultate der zur Aufsuchung eines angekündigten Mammuthcadavers von der k. Akademie der Wissenschaften an den unteren Jenissei ausgesandten Expedition // Mem. Acad. Imp. Sci. Petersbourg. VII ser. 1872. Vol. 18, N 1. – Schrenk A. G. Reise nach dem Nordosten des europäischen Rußlands, durch die Tundren der Samojeden, zum Arktischen Uralgebirge, auf Allerhöchsten Befehl für den keis. botanischen Garten zu St.-Petersburg im Jahre 1837 ausgeführt. 2 Th. Wissenschaftliche Beilagen. Dorpat, 1854. – Vainio E. Lichenes in viciniis hibernae expeditionis Vegae prope pagum Pittlekai in Sibiria septentrionali a D-re E. Almquist collecti // Ark. Bot. 1909. Bd 8, N 4.

Е. А. Вайнштейн **E. A. Vainschtein**

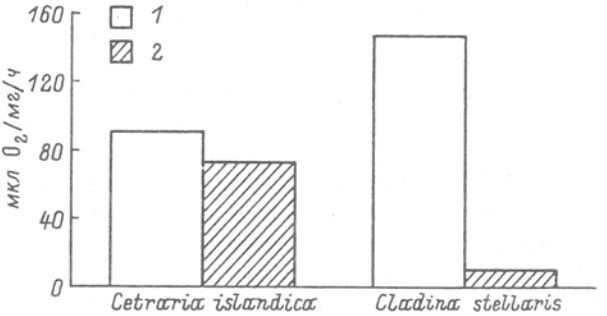
ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ЛИШАЙНИКОВ

DE METHODO FLUORESCENTE AD STATUM LICHENUM AESTIMANDUM ADHIBITA NOTULA

Флуоресцентный метод широко используется в медицине и биохимии для изучения жизнеспособности интактных клеток и тканей и количественных изменений их компонентов. Однако в ботанических исследованиях он пока еще распространен намного меньше, хотя в ряде случаев аутофлуоресценция хлорофилла дает чрезвычайно удобную возможность непосредственного наблюдения за изменениями состояния растительных клеток без каких-либо обработок.

Оценку степени жизнеспособности лишайников, как и других растений, в лабораторной практике чаще всего проводят путем определения выхода ионов калия, скорости фотосинтеза и дыхания, активности ферментов и некоторых других показателей (Tomassini et al., 1977; Schumm, Kreeb, 1979).

Лишайники представляют собой двухкомпонентный организм, состоящий из гриба и водоросли, в котором именно водорослевый компонент является наиболее чувствительным к различного рода воздействиям. Для оценки состояния водорослевых клеток в лишайниковом талломе с успехом может быть использован метод флуоресцентной микроскопии, основанный на флуоресценции хлорофилла в живых клетках. Этот метод уже давно применяется для изучения



Влияние нагрева на дыхание лишайников: *1* – контроль, *2* – нагрев до 50 °С.

состояния одноклеточных водорослей (Горюнова, 1951; Мельникова, 1960). Здоровые клетки водорослей при освещении коротковолновым светом дают ярко-красное свечение (длина волн 656 и 589–644 нм) за счет возбуждения флуоресценции хлорофилла. Повреждение клеток вызывает изменение флуоресценции: из красной она становится тускло-красной, оранжевой, бурой и наконец зеленовато-голубой. Эти изменения флуоресценции водорослевых клеток отчетливо видны и на срезах лишайникового таллома, их легко можно классифицировать визуально, что исключает помехи со стороны других пигментов (или флуоресценцию гиф гриба), неизбежные при измерении флуоресценции целого таллома. Преимуществами этого метода является небольшое количество требуемого материала, а также то, что в отличие от метода экстракции и количественного определения хлорофилла в экстракте удается избежать трудностей, связанных с сопутствующим извлечением при экстракции лишайниковых веществ фенольной природы. К достоинствам флуоресцентной микроскопии относятся ее относительная простота и быстрота по сравнению с обычными физиологическими методами.

В наших исследованиях мы использовали метод флуоресцентной микроскопии для оценки состояния лишайников после нагрева. Опыты проводили с двумя видами напочвенных лишайников, относящихся к разным родам: *Cladonia stellaris* (Opiz) Pouzar et Vězda и *Cetraria islandica* (L.) Ach. Изучали влияние сверхоптимальной температуры (50 °С) и летальной (100 °С). Влажные лишайники выдерживали при температуре 50 °С в течение 30 мин и при 100 °С – 10 мин. Критериями жизнеспособности лишайников служили определение дыхания лишайниковых талломов и свечение лишайниковых водорослей на срезах при возбуждении УФ-светом. Дыхание измеряли манометрическим методом в аппарате Варбурга и выражали в мкл O_2/ч на 1 мг сухой биомассы. Срезы талломов просматривали в люминесцентном микроскопе МЛ-1, источник света – ртутная лампа ДРШ-250, светофильтры ЖС-18, 3-УФС, ВС.

Определение дыхания показало значительное различие в реакции на нагрев при сверхоптимальной температуре (50 °С) у исследованных

двух видов лишайников (см. рисунок). Так, если у лишайника *Cetraria islandica* после нагрева наблюдалось лишь незначительное снижение дыхания, которое составляло 80 % от дыхания контрольного варианта, у *Cladonia stellaris* дыхание резко падало, до 6 % от контроля. У обоих видов лишайников нагрев при 100 °С приводил к полной остановке дыхания, т. е. наступала гибель. Лишайники, как известно, способны без ущерба для жизнедеятельности переносить очень высокие температуры, до 100 °С и выше, но лишь в сухом состоянии. Во влажном же состоянии они не отличаются по теплоустойчивости от других растений, что подтверждается и нашими данными.

Просмотр срезов таллома в люминесцентном микроскопе показал, что, как и следовало ожидать, в лишайниках, нагретых до 100 °С, все водорослевые клетки имели бурую флуоресценцию, т. е. погибли. В вариантах с нагревом до 50 °С подавляющее большинство водорослевых клеток светилось ярко-красным светом, как в контроле, у части клеток наблюдалась тускло-красная и бурая флуоресценция. Отсюда следует, что водорослевый слой лишайников представляет собой популяцию клеток с разной степенью резистентности, причем основная их масса достаточно термоустойчива. Интересно, что, согласно данным Нурушевой (1985), хлоропласты лишайниковых водорослей проявляют устойчивость к нагреву при сверхоптимальных температурах (42 °С). В первые 10 мин нагрева влажных лишайников при этой температуре наблюдается набухание хлоропластов, однако при продолжении нагрева до 40 мин они приобретают структуру, близкую к структуре водорослей в контрольном варианте. Дальнейшее увеличение экспозиции (160 мин) вызывает уже серьезные нарушения ультраструктуры хлоропластов, при этом отмечается большое разнообразие в реакции отдельных клеток.

В наших опытах соотношение неповрежденных (ярко-красная флуоресценция), обратимо поврежденных (тускло-красная флуоресценция) и мертвых (бурая флуоресценция) клеток водорослей у обоих видов лишайников было сходным. Это позволяет считать, что за различие в реакции дыхания этих лишайников на нагрев несет ответственность грибной компонент. Таким образом, применение флуоресцентного анализа в данном случае дало возможность дифференцировать такой интегральный показатель жизнеспособности, как дыхание, и вычленить в нем участие каждого лишайникового симбионта.

Особую чувствительность водорослевый компонент лишайников проявляет по отношению к загрязнению атмосферы. Было показано, например, что процент поврежденных водорослевых клеток в лишайниковом талломе отражает степень загрязнения в тех местах, где собран лишайник. В зонах очень сильного загрязнения в водорослевых клетках могут даже появляться коричневые пятна феофитина или белые пятна разрушенного хлорофилла (Richardson, Nieboer, 1981). Флуоресцентный анализ позволяет достаточно четко оценить степень повреждения водорослевых клеток визуально, и, хотя для получения статистически достоверных результатов необходимо обработать

большое количество микроскопических срезов, тем не менее эффективность и доступность флуоресцентной микроскопии позволяет рекомендовать ее не только для физиолого-биохимических исследований механизмов устойчивости, но и для практического мониторинга загрязнения. Именно с этой целью ее впервые предложили использовать в лихеноиндикации Арнольд и Криб (Arnold, Kreeb, 1976) и Кауппи (Kauppi, 1976, 1980).

Перспективность использования метода флуоресценции в лихеноиндикационных исследованиях подтверждают следующие соображения.

1. Большую помощь этот метод, в сочетании с традиционными лихеноиндикационными методами, может оказать для более точной оценки состояния лишайников в зоне загрязнения, например для различения живых и мертвых слоевищ, что визуально не всегда возможно.

2. Высокая чувствительность и наглядность флуоресцентной микроскопии делают ее перспективной для ранней диагностики влияния загрязнения, особенно слабого или кратковременного, когда отсутствуют внешние признаки повреждения лишайников.

3. Флуоресцентный метод, дающий возможность быстро и объективно оценивать дозировки различных загрязнителей, их пороговые концентрации и степень воздействия, с успехом может быть применен при решении важного и практически неразработанного вопроса о репарации лишайников после воздействия повреждающих факторов.

4. Незаменимым этот метод является и в изучении физиологических механизмов ответных реакций лишайников на загрязнения, фундаментальные исследования которых только начинаются.

Литература

Горюнова С. В. Применение метода флуоресцентной микроскопии для определения живых и мертвых клеток водорослей // Вестн. АН СССР. 1951. Вып. 6. – Мельникова В. В. Влияние повреждения на первичную и вторичную флуоресценцию водорослей // Изв. отд-ния с.-х. и биол. наук АН ТаджССР. 1960. Вып. 2. – Нурушева А. М. Ультраструктура водоросли фикобионта лишайника Peltigera aphthosa (L.) Willd. и перестройка клеточных органоидов на ранних сроках при действии альтерирующих факторов // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Алма-Ата, 1985. – Arnold H., Kreeb K. Fluoreszenmikroscopischer Nachweis von Immissionschäden an Flechten // Andew. Bot. 1976. Bd 50, N 5–6. – Bauer E. Flechtenkartierung im Stadtgebiet von Esslingen unter besonderer Berücksichtigung einer Enzymkarte // Hohenheim. Arb. Schiftenr. Univ. Hohenheim. 1973. N 74. – Kauppi M. Fruticose lichen transplant technique for air pollution experiments // Flora. 1976. Vol. 165, N 5. – Kauppi M. Fluorescence microscopy and microfluorometry for the examination of pollution damage in lichens // Ann. Bot. Fenn. 1980. Vol. 17, N 2. – Richardson D. H. S., Nieboer E. Lichens and pollution monitoring // Endeavour. 1981. Vol. 5, N 3. – Schumm F., Kreeb K. Die Nettophotosynthese von Flechtentransplantaten als Mass für die Immissionsbelastund der Luft // Andew. Bot. 1979. Bd 53, H. 1–2. – Tomassini F. D., Lavoie P., Puckett K. J., Nieboer E., Richardson D. H. S. The effect of time of exposure to sulphur dioxide on potassium loss from and photosynthesis in the lichen Cladina rangiferina (L.) Hoffm. // New Phytologist. 1977. Vol. 79.