

Азот и азотсодержащие соединения в цианолишайниках рода *Peltigera*

© 2020. Г. Н. Табаленкова, д. б. н., доцент, в. н. с.,

О. В. Дымова, к. б. н., с. н. с.,

Т. К. Головки, д. б. н., профессор, г. н. с.,

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,
167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28,

e-mail: tabalenkova@ib.komisc.ru

В лесах таёжной зоны Республики Коми обитает около 800 видов лишайников, 13% из них являются цианолишайниками. Цианобактерии способны осуществлять процесс биологической азотфиксации, обеспечивая все компоненты лишайниковой ассоциации органическим азотом. Приведены данные о содержании азота, белковых и свободных аминокислот, пигментов в талломах 10 видов цианолишайников. Выявлена существенная межвидовая вариабельность изучаемых показателей. Содержание азота в сухой массе лишайников варьировало в пределах 20–40, белкового – от 15 до 27 мг/г. Содержание хлорофиллов изменялось от 0,24 до 1,54 мг/г. В талломах лишайников идентифицировано от 14 до 20 индивидуальных аминокислот и один амид. Вклад большинства из них в суммарный фонд свободных аминокислот был довольно низким. Выявлены видовые особенности фонда доминирующих свободных аминокислот в талломах лишайников. Содержание белковых и свободных аминокислот тесно коррелировало с фондом азота, средние величины для всей выборки равнялись 100 и 2 мг/г соответственно. Полученные результаты существенно расширяют и дополняют представления об эколого-биологических свойствах цианолишайников и роли цианобактерий в круговороте азота таёжных экосистем.

Ключевые слова: цианолишайники, азот, аминокислоты, хлорофилл, таёжная зона, Европейский Северо-Восток.

Nitrogen and nitrogen-containing compounds in cyanolichens of *Peltigera* genus

© 2020. G. N. Tabalenkova ORCID: 0000-0002-1147-2746*

O. V. Dymova ORCID: 0000-0003-2008-6350*

T. K. Golovko ORCID: 0000-0002-7993-9541*

Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of RAS,
28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,

e-mail: tabalenkova@ib.komisc.ru

The data on the content of nitrogen, protein and free amino acids, chlorophylls and carotenoids in the thalli of 10 species of cyanolichens in the taiga zone are presented. Significant inter specific variability of the studied parameters was revealed. The content of total nitrogen in the dry mass (DW) varied from 20 (*Peltigera leucophlebia*) to 40 mg/g (*P. scarbosa*), protein nitrogen – from 15 (*P. leucophlebia*) to 27 mg/g (*P. scarbosa*) and green pigments – from 0.24 (*P. malacea*) to 1.54 mg/g (*P. rufescens*). The content of protein and free amino acids was closely correlated with the nitrogen content and averaged respectively by 100 and 2 mg/g DW. Species specificity of dominant free amino acids in lichen thalli was revealed. Glutamic acid and glutamine were dominated in the free amino acid pool of *P. canina* and *P. membranacea*, alanine and aminoadipic acid – in *P. leucophlebia* and *P. malacea*. In lichen thalli five non-proteinogenic amino acids were indentified (β -alanine, ornithine, aminoadipine, α -aminobutyric, γ -aminobutyric). Their share in the free amino acid pool ranges from 2% (*P. membranacea*) to 40% (*P. malacea*). The presence of ornithine in all lichen species indicates the functioning of the ornithine cycle, which is involved in the synthesis of the proteinogenic amino acid arginine. The obtained results significantly expand and complement the understanding of the ecological and biological features of cyanolichens and role of cyanoprocaryotes in the nitrogen cycle of taiga ecosystems.

Keywords: cyanolichens, nitrogen, amino acids, chlorophyll, taiga zone, the European Northeast.

Лишайники представляют собой своеобразную и относительно слабоизученную группу фототрофных симбиотических организмов. Лишайники являются неотъемлемым компонентом многих экосистем и существенно влияют на их функционирование. Разнообразие и распространение лишайников в значительной степени зависит от условий местообитания. Бореальные леса европейского Северо-Востока России, благодаря разнообразию типов (ельники, сосняки, осинники и др.), микроклимату, наличию разнообразных субстратов, благоприятны для жизни лишайников. В лесах таёжной зоны Республики Коми обитает около 800 видов лишайников и только примерно 13% из них являются цианолишайниками, т. е. содержат цианобактерии (ЦБ) [1, 2].

Помимо ассимиляции углерода, ЦБ способны осуществлять процесс биологической азотфиксации, обеспечивая тем самым все компоненты лишайниковой ассоциации органическим азотом [3]. В результате прямой фиксации N_2 из атмосферы цианолишайники вносят заметный вклад в азотный цикл экосистем, в некоторых случаях он может достигать 20 кг N/га год [4]. Азотфиксация является энергетически зависимым процессом, для превращения одной молекулы N_2 в две молекулы NH_3 необходимо 8 электронов и 16 Mg-зависимых АТФ. Ионы аммония токсичны и быстро превращаются в другие азотсодержащие продукты (например, глутамин), которые могут накапливаться, не проявляя токсичности, или используются в процессах аминирования α -кетокислот и трансаминирования. Результаты сравнительного анализа цианобионтных лишайников с хлоролишайниками, содержащими зелёную водоросль, свидетельствуют о влиянии типа фотобионта на их функциональные свойства [5, 6]. Считается, что адаптация к различным условиям обитания происходит легче у видов (*Peltigera rufescens*), содержащих в качестве фотобионта ЦБ, поскольку они способны усваивать атмосферный азот [7] и содержат фикобилины, характеризующиеся широким спектром поглощения.

В настоящей работе представлены данные о накоплении азотсодержащих соединений в талломах цианолишайников рода *Peltigera*, обитающих в таёжной зоне Республики Коми.

Объекты и методы исследований

Исследования проводили в летний период 2015–2018 гг. Талломы 10 видов довольно

распространённых цианолишайников рода *Peltigera* (табл. 1) были собраны в лесных сообществах Сыктывдинского и Княжпогостского районов Республики Коми (подзона средней тайги). Цианобактерии исследованных лишайников представлены видами рода *Nostoc*. У двух видов (*Peltigera aptosa* и *P. leucophlebia*), кроме ЦБ, присутствует также зелёная водоросль. Для характеристики азотного статуса талломов определяли содержание общего ($N_{\text{общий}}$) и белкового азота ($N_{\text{белковый}}$), белковых и свободных аминокислот, а также концентрацию фотосинтетических пигментов.

Содержание азота определяли в сухих, измельчённых пробах на элементном CHNS-O анализаторе (EA-1110 Италия). Белковые аминокислоты (БАК) определяли на аминокислотном анализаторе (AAA T-339) после гидролиза навески в 6 н HCl при 105 °C в течение 24 ч. Белковый азот рассчитывали, исходя из массовой доли азота белковых аминокислот в общем азоте. Содержание и качественный состав свободных аминокислот (САК) определяли в лиофильно высушенном материале после извлечения их 40%-ным этанолом на анализаторе AAA-400 (Чехия) в системе литиевых буферов.

Пигменты экстрагировали смесью диметилсульфоксид : ацетон в отношении 2 : 1 из высечек талломов (200–250 мг сырой массы) и определяли спектрофотометрически на приборе UV-1700 («Shimadzu», Япония). Для достижения максимального извлечения пигментов из талломов предварительно была проведена экспериментальная работа по подбору способа экстракции и растворителя [8].

Для проведения всех анализов использовали образцы в трёхкратной биологической и 2–3-кратной аналитической повторности. Данные рассчитывали на единицу сухой массы и обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

Содержание хлорофиллов варьировало в широких пределах – от 0,24 мг/г (*P. malacea*) до 1,54 мг/г (*P. rufescens*) (табл. 1). Средняя величина составляла 0,7 мг/г и была заметно выше медианного значения (0,5), что согласуется с данными других авторов [9]. Следует отметить сравнительно высокое накопление (больше 1 мг/г) фотосинтетических пигментов в талломах трёхбионтных лишайников *P. aptosa* и *P. leucophlebia*. Изученные нами виды цианолишайников превосходили одноименные виды сем. Peltigeraceae, произрас-

тающие на Западном Шпицбергене, по накоплению хлорофиллов (0,30–0,78 мг/г) [10].

Исследованные виды отличались по содержанию общего азота. Его содержание в талломах варьировало от 22 (*P. leucophlebia*) до 40 мг/г (*P. scarbosa*). Средняя величина составляла 33 мг/г и мало отличалась от медианного значения. Содержание азота в талломах *P. aphotosa* и *P. leucophlebia* – видов, содержащих помимо ЦБ и зелёную водоросль, была на 30% ниже, чем у других исследованных лишайников. Основная часть азота (свыше 60%) лишайникового симбиоза входит в белковую фракцию, преимущественно грибного компонента, биомасса которого почти на порядок превышает биомассу фотобионта. Концентрация белкового азота варьировала от 15 (*P. leucophlebia*) до 27 мг/г (*P. scarbosa*). Содержание белкового азота тесно коррелировало с содержанием общего азота ($r = 0,97$).

Как известно, азот входит в состав хлорофилла (6,27% молекулярной массы хлорофилла). Однако мы не выявили какой-либо связи между содержанием хлорофилла и общего азота. Возможно, это является следствием того, что доля фотобионта в биомассе лишайников менее 10%, а значительная часть азота заключена в хитине – полисахариде клеточной стенки грибного мицелия.

Аминокислоты выполняют в живых организмах разнообразные функции, входят в состав растворимых, структурных и запасных белков, присутствуют в виде свободной фракции. Наибольшим содержанием белковых аминокислот (190–200 мг/г) характеризовались талломы *P. scarbosa* и *P. membranacea*

(табл. 1), наименьшим – талломы *P. aphotosa* и *P. leucophlebia*.

При анализе белков было обнаружено 17 различных аминокислот, из них цистин и метионин – в следовых количествах. Основная часть белковых аминокислот (60%) была представлена моно- и дикарбоновыми кислотами.

К основным исходным веществам, обеспечивающим синтез белков, относятся свободные аминокислоты, они являются одними из самых активных участников метаболизма. Анализ свободных аминокислот в образцах четырёх видов лишайников выявил, что их концентрация была довольно низкой (табл. 2). По суммарному содержанию свободных аминокислот исследованные виды располагались в следующем порядке: *P. membranacea* > *P. canina* > *P. malacea* > *P. leucophlebia*.

В талломах лишайников было идентифицировано от 14 до 20 индивидуальных аминокислот и один амид. Вклад большинства из них в суммарный фонд свободных аминокислот был довольно низким, доминировали 3–4. В талломах *P. canina* и *P. membranacea* доминируют глутаминовая кислота и глутамин, у *P. leucophlebia* и *P. malacea* – аланин и аминокислоты.

В талломах лишайников обнаружено пять непотеиногенных кислот (β -аланин, орнитин, аминокислоты, α -аминомасляная, γ -аминомасляная). Их доля в общем пуле свободных аминокислот составляет от 2 (*P. membranacea*) до 40% (*P. malacea*). Присутствие у всех исследованных лишайников орнитина свидетельствует о функционировании в талломах орнитинового цикла, участвующего в синтезе протеиногенной аминокислоты аргинина.

Таблица 1 / Table 1

Содержание азота, белковых аминокислот и хлорофиллов в талломах лишайников рода *Peltigera*, мг/г сухой массы / Content of the nitrogen, protein amino acids and chlorophylls in the cyanolichens of *Peltigera* genus, mg/g DW

| Виды лишайников Lichen species | Азот / Nitrogen | | Белковые аминокислоты Protein amino acids | Хлорофиллы Chlorophylls |
|-----------------------------------|--|---|---|----------------------------|
| | N _{общий} N _{total} | N _{белковый} N _{protein} | | |
| <i>P. malacea</i> | 27,1±1,8 | 19,2 | 141,3 | 0,24±0,05 |
| <i>P. membranacea</i> | 36,1±2,4 | 25,0 | 191,2 | 0,44±0,06 |
| <i>P. canina</i> | 35,3±2,4 | 24,1 | 181,8 | 0,42±0,03 |
| <i>P. neopolydactyla</i> | 35,2±2,4 | 21,6 | 158,6 | 0,42±0,08 |
| <i>P. praetextata</i> | 35,2±2,4 | 24,2 | 181,7 | 0,33±0,03 |
| <i>P. rufescens</i> | 31,2±2,1 | 18,6 | 140,2 | 1,54±0,06 |
| <i>P. scarbosa</i> | 39,6±2,6 | 26,8 | 202,1 | 0,66±0,21 |
| <i>P. ponojensis</i> | 39,0±2,6 | 24,6 | 184,4 | 0,62±0,14 |
| <i>P. aphotosa</i> | 24,0±4,0 | 16,1 | 121,9 | 1,30±0,12 |
| <i>P. leucophlebia</i> | 22,0±4,0 | 14,9 | 111,8 | 1,14±0,15 |

Таблица 2 / Table 2

Содержание основных свободных аминокислот в талломах цианолишайников рода *Peltigera*, % от суммы свободных аминокислот / Content of the individual free amino acids in the cyanolichens of *Peltigera* genus, % of total content

| Аминокислоты Amino acids | Виды лишайников / Lichen species | | | |
|--|----------------------------------|------------------|-----------------------|------------------------|
| | <i>P. malacea</i> | <i>P. canina</i> | <i>P. membranacea</i> | <i>P. leucophlebia</i> |
| Аспарагиновая / Aspartic | 3,9 | – | 0,5 | 1,6 |
| Глютаминовая / Glutamic | – | 64,0 | 66,2 | – |
| Глутамин / Glutamine | – | 24,0 | 26,8 | – |
| Аминоадипиновая / Amino adipic | 22,3 | – | – | 6,4 |
| Пролин / Proline | 0,7 | – | – | 6,4 |
| Глицин / Glicine | 1,0 | – | – | 2,3 |
| Аланин / Alanine | 36,1 | – | – | 54,5 |
| Валин / Valine | 0,8 | 0,4 | 0,3 | 2,0 |
| Лейцин / Leucine | 1,2 | 0,6 | 0,3 | 1,4 |
| Тирозин / Tyrozine | 1,3 | 1,0 | 0,6 | 1,4 |
| Фенилаланин / Phenylalanine | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,7 |
| β-аланин / β-alanine | 4,4 | – | – | – |
| γ-аминомасляная / γ-aminobutyric | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,8 |
| Орнитин / Ornithine | 13,5 | 1,8 | 1,7 | 14,7 |
| Лизин / Lysine | 1,7 | 0,8 | 0,4 | 2,7 |
| Аргинин / Arginine | 9,7 | 4,9 | 1,9 | 2,8 |
| Сумма свободных аминокислот, мг/г сухой массы / Total content of free amino acids, mg/g DW | 1,47 | 3,24 | 4,83 | 0,75 |

Примечание: В таблице представлены свободные аминокислоты, содержание которых составляет не менее 0,2% суммы всех аминокислот; прочерк означает присутствие аминокислоты в следовых количествах.

Note: The table shows the free amino acids, the content of which is at least 0.2% of the sum of all amino acids; a dash indicates the presence of an amino acid in trace amounts.

Заключение

Таким образом, полученные экспериментальные данные показывают значительную видовую вариабельность содержания хлорофиллов, различных форм азота и аминокислот в талломах лишайников рода *Peltigera*. Установлено, что содержание белковых и свободных аминокислот тесно коррелирует с концентрацией общего азота в талломах, тогда как корреляция между суммой белковых и суммой свободных аминокислот статистически незначима. В целом, полученные результаты существенно углубляют и расширяют представление об эколого-биологических особенностях цианолишайников и роли цианобактерий в круговороте азота таёжных экосистем.

Работа выполнена в рамках темы НИОКТР «Физиология и стресс-устойчивость фотосинтеза растений и пойкилогидрических фотоавтотрофов в условиях Севера» (№ АААА-А17-117033010038-7), частично поддержана грантом проектов УрО РАН (15-12-4-4 и 18-4-4-20).

Литература

1. Пыстина Т.Н. Лишайники таёжных лесов Европейского Северо-Востока: подзоны южной и средней тайги. Екатеринбург: УрО РАН, 2003. 239 с.
2. Пыстина Т.Н., Романов Г.Г. Видовое разнообразие цианобионтных лишайников и их азотфиксирующая активность на территории Республики Коми // Ботанический журнал. 2010. Т. 95. № 2. С. 177–182.
3. Lange O. L., Leisner J.M.R., Bilger W. Chlorophyll fluorescence characteristics of the cyanobacterial lichen *Peltigera rufescens* under field conditions. II. Diel and annual distribution of metabolic activity and possible mechanisms to avoid photoinhibition // Flora. 1999. V. 194. P. 413–430.
4. Nash III T.H. Nutrients, elemental accumulation, and mineral cycling // Lichen biology / Ed. T.N. Nash III. Cambridge: Camb. Univ. Press, 2008. P. 234–251.
5. Головкин Т.К., Дымова О.В., Табаленкова Г.Н., Пыстина Т.Н. Фотосинтетические пигменты и азот в талломах лишайников бореальной флоры // Теоретическая и прикладная экология. 2015. № 4. С. 38–44.
6. Табаленкова Г.Н., Далькэ И.В., Захойский И.Г. Аминокислотный состав биомассы некоторых видов лишайников таёжной зоны на Европейском Северо-Востоке России // Известия Самарского научного

центра Российской академии наук. 2017. Т. 19. № 2 (3). С. 556–560.

7. Rai A.N. Nitrogen metabolism // Handbook of Lichenology / Ed. M. Galun. Boca Raton: CRS Press, 1988. P. 201–237.

8. Дымова О.В., Кузиванова О.А. Оптимизация способа экстракции фотосинтетических пигментов и их содержания в талломах лишайников // Химия растительного сырья. 2018. № 2. С. 137–144.

9. Palmqvist K., Dahlman L., Valladares F., Thehler A., Sancho L.S., Mattsson J.-E. CO₂ exchange and tallus nitrogen across 75 contrasting lichen associations from different climate zones // Oecologia. 2002. V. 133. P. 295–306.

10. Марковская Е.Ф., Шмакова Н.Ю. Растения и лишайники Западного Шпицбергена: экология, физиология. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2017. 270 с.

References

1. Pystina T.N. Lichens of the taiga forests of the European Northeast: subzones of the southern and middle taiga. Ekaterinburg: URO RAN, 2003. 239 p. (in Russian).

2. Pystina T.N., Romanov G.G. Species diversity of cyanobiontic lichens and their nitrogen-fixing activity in the Komi Republic // Botanicheskiy zhurnal. 2010. V. 95. No. 2. P. 177–182 (in Russian).

3. Lange O.L., Leisner J.M.R., Bilger W. Chlorophyll fluorescence characteristics of the cyanobacterial lichen *Peltigera rufescens* under field conditions. II. Diel and annual distribution of metabolic activity and pos-

sible mechanisms to avoid photoinhibition // Flora. 1999. V. 194. P. 413–430.

4. Nash III T.H. Nutrients, elemental accumulation, and mineral cycling // Lichen biology / Ed. T.N. Nash III. Cambridge: Camb. Univ. Press, 2008. P. 234–251.

5. Golovko T.K., Dymova O.V., Tabalenkova G.N., Pystina T.N. Photosynthetic pigments in the thalli of lichens of boreal flora // Theoretical and Applied Ecology. 2015. No. 4. P. 38–44 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4304-2015-4-038-044

6. Tabalenkova G.N., Dal'ke I.V., Zahozhiy I.G. Amino acids composition of some lichen species in taiga zone of European North-East of Russia // Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra Rossiyskoy akademii nauk. 2017. V. 19. No. 2 (3). P. 556–560 (in Russian).

7. Rai A.N. Nitrogen metabolism // Handbook of Lichenology / Ed. M. Galun. Boca Raton: CRS Press, 1988. P. 201–237.

8. Dymova O.V., Kuzivanova O.A. The optimization of extraction routine of photosynthetic pigments and its content in lichens thalli // Himiya rastitelnogo syrya. 2018. No. 2. P. 137–144. doi: 10.14258/jcprm.2018023013 (in Russian).

9. Palmqvist K., Dahlman L., Valladares F., Thehler A., Sancho L.S., Mattsson J.-E. CO₂ exchange and tallus nitrogen across 75 contrasting lichen associations from different climate zones // Oecologia. 2002. V. 133. P. 295–306. doi: 10.1007/s00442-002-1019-0

10. Markovskaya E.F., Shmakova N.Yu. Plants and lichens of West Spitsbergen: ecology, physiology. Petrozavodsk: Izd-vo PetrGU, 2017. 270 p. (in Russian).