

Ростстимулирующая активность листоватых лишайников

© 2020. Л. И. Домрачева^{1,2}, д. б. н., профессор, А. Л. Ковина¹, к. б. н., доцент, С. Ю. Огородникова², к. б. н., с. н. с., А. И. Коротких¹, магистрант, А. В. Короткова¹, магистрант, Е. А. Домнина^{2,3}, к. б. н., доцент,

¹Вятская государственная сельскохозяйственная академия, 610017, Россия, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 133,

²Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, 167982, Россия, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28,

³Вятский государственный университет, 610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36, e-mail: dli-ala@mail.ru

Показана возможность практического использования двух видов листоватых лишайников *Parmelia sulcata* Tayl. и *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. при выращивании люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.). При определении численности различных физиологических групп микроорганизмов, входящих в состав поверхностных микробиомов исследуемых видов лишайников, установлено, что доминирующей группой микробных комплексов являются азотфиксирующие бактерии, численность которых составляет свыше 100 тыс. КОЕ/г. В процессе хранения лишайников в высушенном состоянии количество микроорганизмов на поверхностных микробиомах и соотношение физиологических групп меняется незначительно.

Предполагается, что использование лишайников как агентов воздействия на рост и развитие высших растений обусловлено как поверхностной микрофлорой лишайников, так и веществами, вырабатываемые их слоевищами. В модельных опытах установлен ростстимулирующий эффект измельченной биомассы лишайников на биометрические и биохимические показатели высшего растения. В частности, наиболее ярко проявляется этот эффект при определении индекса роста люпина, который, по сравнению с контрольным вариантом, в случае с *P. sulcata* выше в 1,21 раза, а с *H. physodes* – в 1,36 раза. Исследования состояния растительной клетки по такому показателю, как перекисное окисление липидов, выявили разнонаправленный характер изменения интенсивности окислительных процессов в надземной и подземной частях проростков. Так, в листьях содержание малонового диальдегида (МДА) ниже, чем в контрольном варианте, тогда как в корнях концентрация этого соединения в вариантах с лишайниками более чем на 50% выше по сравнению с контролем. Вероятно, предпосевная обработка семян люпина мульчированной биомассой лишайников, обеспечивающая непосредственный контакт с прорастающими корнями растений, оказалась стресс-фактором, под влиянием которого запустился окислительный процесс в клетках, что привело к увеличению концентрации МДА в опытных вариантах.

Ключевые слова: листоватые лишайники, микробиомы лишайников, люпин узколистный, индекс роста, перекисное окисление липидов.

Growth-stimulating activity of leafy lichens

© 2020. L. I. Domracheva^{1,2} ORCID: 0000-0002-7104-3337, A. L. Kovina¹ ORCID: 0000-0003-0503-3402, S. Yu. Ogorodnikova² ORCID: 0000-0001-8865-4743, A. I. Korotkikh¹ ORCID: 0000-0002-0700-371X, A. V. Korotkova¹ ORCID: 0000-0001-7292-7655, E. A. Domnina^{2,3} ORCID: 0000-0002-5063-8606

¹Vyatka State Agricultural Academy, 133, Oktyabrskiy Prospekt, Kirov, Russia, 610017,

²Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Branch of RAS, 28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,

³Vyatka State University, 36, Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000, e-mail: dli-ala@mail.ru

The possibility of the practical use of two species of leafy lichens *Parmelia sulcata* Tayl. and *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. when growing *Lupinus angustifolius* L. When determining the number of various physiological groups of microorganisms that are part of the surface microbiomes of the studied lichen species, it was shown that nitrogen-fixing bacteria, the number of which exceeds 100 thousand CFU/g, are the dominant group of microbial complexes. Wherein, during

storage of lichens in the dried state, the number of microorganisms in surface microbiomes and the ratio of physiological groups varies slightly.

It is assumed that the use of lichens as agents affecting the growth and development of higher plants is due to both the surface microflora of lichens and the substances produced by their thalli. In model experiments, the growth-promoting effect of ground lichen biomass on the biometric and biochemical parameters of higher plants was established. In particular, the growth-stimulating effect is most pronounced in determining the growth index, which is 1.21 times higher in comparison with the control variant in *P. sulcata* and 1.36 times higher in *H. physodes*. Studies of the state of the plant cell in terms of lipid peroxidation revealed the differently directed nature of the change in the intensity of oxidative processes in the aboveground and underground parts of plants. So, the malondialdehyde (MDA) content in the leaves is lower than in the control variant, while in the roots the concentration of this compound is more than 50% higher than in the control in the lichen variants. It is likely that the pre-sowing treatment of lupine seeds with mulched lichen biomass, which provides direct contact with the germinating roots of plants, turned out to be a stress factor, under the influence of which the oxidative process in the cells started, which led to an increase in MDA compared to the control variant.

Keywords: leafy lichens, lichen microbiomes, growth index, lipid peroxidation.

Лишайники представляют собой одну из наиболее древних моделей симбиотических взаимоотношений микобионта с фототрофными партнёрами – водорослями или цианобактериями [4]. Не затихающий интерес к данной группе организмов во многом связан с тем, что, с одной стороны, метод лишеноиндикации является одним из наиболее применяемых в биодиагностике состояния окружающей среды [2, 3]. С другой стороны, интерес к лишайникам обусловлен синтезом веществ, издавна применяемых как лекарственные средства. На сегодняшний день известно более 1 тыс. вторичных метаболитов лишайников, на долю которых приходится до 5% сухой массы [4–5]. Эти вещества имеют такие свойства, как противовирусная, противобактериальная, противомикотическая, противовоспалительная, жаропонижающая, обезболивающая, антипрофелиративная и цитотоксическая активность. Противораковую активность обеспечивает такой метаболит лишайников, как усниновая кислота [6].

Вероятно, что многие свойства лишайников объясняются не только характером мутуалистических взаимоотношений между входящими в их состав фико- и микобионтами, но определённую роль в жизни лишайников играет специфический микробный комплекс, обитающий на поверхности талломов. В частности, на примере кустистых лишайников, отобранных в районе хребта Хибин Мурманской области, были установлены численность, таксономический состав, приуроченность бактерий гидролитического комплекса к определённой стадии существования конкретного вида [7–9]. Как и у высших растений, в зоне обитания лишайников формируется особая зона, обозначаемая термином «лихеносфера». Это слой лишайниковой дерновинки с условиями, создающими защитную микросреду обитания, благоприятную для

организмов-поселенцев: редуцентов, паразитов, эндемиков. Условия, создаваемые в лишайниковой дерновинке, обеспечивают питанием микроорганизмы (МО) и создают защитный барьер против низкой температуры, олиготрофии, сильных ветров и ультрафиолетового излучения, помогая МО, неприспособленным к экстремальным условиям, выжить и распространиться [10]. Микробы лихеносферы должны также обладать специфической устойчивостью к метаболитам лишайников, токсичным для посторонней микробиоты.

Одним из направлений практического использования лишайников стала разработка на их основе протравителей семян и стимуляторов роста сельскохозяйственных растений как альтернативы применению химических пестицидов и стимуляторов роста, использование которых неизбежно приводит к негативным последствиям: изменению видового состава полезных МО, нарушению биологического равновесия в агроценозах и общему ухудшению экологической обстановки [11].

Целью наших исследований было определение численности и группового состава микробиомов листовых лишайников, а также изучение возможности использования лишайников как стимуляторов роста бобовых растений на примере люпина узколистного.

Объекты и методы

Объектами исследования были талломы двух видов листоватых лишайников: *Parmelia sulcata* Tayl. и *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., отобранные в конце сентября 2018 г. Пармелию собирали в окрестностях г. Кирова (село Макарье) со стволов и веток деревьев лиственных и хвойных пород, гипогимнию – вблизи пос. Мирный Оричевского района Кировской области. Данный вид в течение многих лет использовался для диагностики атмосферного

загрязнения в районе функционирования объекта по хранению и уничтожению химического оружия «Марадыковский» [12]. В качестве тестируемого растительного объекта использовали семена люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.).

Для оценки численности эпифитной микрофлоры лишайников применяли посев смывов с талломов на селективные агаризованные среды. Методом предельных разведений учитывали 3 группы МО: аммонификаторы на среде ГРМ (гидролизат рыбной муки), азотфиксаторы на среде Эшби и микромицеты на среде Чапека. Посев на каждую питательную среду проведён в трёхкратной повторности.

При выращивании люпина использовали метод рулонных культур в 4-х кратной повторности из расчёта 15 семян люпина на рулон. Слоевница листоватых лишайников высушивали до воздушно-сухого состояния, затем измельчали биомассу в мульчу. В опытных вариантах измельчённую биомассу вносили непосредственно поверх семян. Для увлажнения использовали родниковую воду. При снятии опыта через 7 суток определяли всхожесть, длину корней, высоту проростков, индекс роста по формуле:

$$I = (R+P) \cdot D,$$

где I – индекс роста, R – суммарное значение длин корней (см), P – суммарное значение длин проростков (см), D – доля проросших семян (%) [13].

Показатель интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) у проростков определяли по накоплению малонового диальдегида (МДА) [14].

Результаты и обсуждение

Определение численности эпифитной микрофлоры изучаемых видов лишайников показало, что наблюдается незначительное различие как в количественном обилии их эписионтов, так и по отдельным физиологическим группам МО (табл. 1). Наиболее обильна эпифитная микрофлора лишайника р. *Hypogymnia*, а наименее – р. *Parmelia* (в 1,5 раза). Доминируют в микробных комплексах обоих видов азотфиксирующие бактерии. При этом, как показано ранее [15], в процессе хранения лишайников в высушенном состоянии численность МО в поверхностных микробиомах лишайников и соотношение физиологических групп практически не меняется.

В дальнейшем было установлено, что биомасса лишайников незначительно повлияла на процент всхожести люпина узколистного (табл. 2). Длина корней и высота проростков в опытных вариантах выше, чем в контроле. Наибольший ростстимулирующий эффект наблюдался в варианте с использованием биомассы лишайника *H. physodes*. Вероятно, это объясняется тем, что партнёры ассоциации фотобионт-микобионт, формирующие таллом лишайника, активно взаимодействуют друг с другом и для поддержания структуры и кле-

Таблица 1 / Table 1

Численность эпифитной микробиоты лишайников (КОЕ/г · 10³, в числителе) и соотношение различных группировок (% , в знаменателе)
The number of lichen epiphytic microbiota (CFU/g · 10³, in the numerator) and the ratio of different groups (% , in the denominator)

Лишайник Lichen	Аммонификаторы Ammonifiers	Азотфиксаторы Nitrogen fixers	Микромицеты Micromycetes	Всего Total
<i>Parmelia sulcata</i>	$\frac{30,7 \pm 6,5}{19,3}$	$\frac{103,3 \pm 7,7}{65,0}$	$\frac{25,0 \pm 3,4}{15,7}$	$\frac{159,0 \pm 17,6}{100}$
<i>Hypogymnia physodes</i>	$\frac{45,7 \pm 6,8}{18,0}$	$\frac{136,0 \pm 7,0}{53,4}$	$\frac{70,7 \pm 4,5}{28,6}$	$\frac{254,4 \pm 18,3}{100}$

Таблица 2 / Table 2

Влияние листоватых лишайников на рост и развитие люпина узколистного
The influence of leafy lichens on the growth and development of *Lupinus angustifolius*

Вариант Variant	Всхожесть, % Germination, % D	Длина корня, см Length of root, cm R	Высота проростков, см Height of seedlings, cm P	Индекс роста Growth Index I
Контроль / Control	95,0 ± 10,0	4,4 ± 0,5	6,0 ± 0,5	990,8
<i>Parmelia sulcata</i>	93,3 ± 7,6	5,5 ± 0,7	7,4 ± 0,9	1202,6
<i>Hypogymnia physodes</i>	93,3 ± 7,6	5,9 ± 0,7	8,5 ± 0,7	1347,2

Таблица 3 / Table 3

Накопление малонового диальдегида при перекисном окислении липидов в проростках люпина узколистного на 7-е сутки, нмоль/г
The accumulation of malondialdehyde during lipid peroxidation in seedlings of *Lupinus angustifolius* on the 7th day, nmol/g

Вариант Variant	Содержание МДА Malondialdehyde content	Процент к контролю Percent to control
Leaves / Leaves		
Контроль / Control	35,07±3,13	100,0
<i>Parmelia sulcata</i>	32,82±0,83	93,6
<i>Hypogymnia physodes</i>	29,58±1,88*	84,3
Корни / Roots		
Контроль / Control	22,43±2,74	100,0
<i>Parmelia sulcata</i>	35,82±2,35*	159,7
<i>Hypogymnia physodes</i>	34,45±1,42*	153,6

Примечание: * – различия достоверны при $P \geq 0,95$.
Note: * – the differences are significant at $P \geq 0.95$.

точного обмена используют продукты своего метаболизма [6]: лихенин, пектины, дисахариды, аминокислоты, витамины, ферменты, которые используются и высшими растениями.

Интегральным показателем состояния растений является индекс роста (I), который в наших опытах при использовании обоих лишайников существенно выше, чем в контроле (табл. 2).

Рост и развитие растений люпина во многом зависят от эффективности биохимических изменений, происходящих в клетках, направленных на адаптацию к действию лишайников, присутствующих в среде выращивания. Одним из показателей интенсивности окислительных процессов в клетках является накопление продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА).

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) – цепной процесс свободнорадикального окисления ненасыщенных жирных кислот, в норме поддерживается на определённом уровне за счёт функционирования антиоксидантной системы. Чрезмерная активация процесса ПОЛ в стрессовых условиях приводит к нарушению структуры многих молекул, в том числе белков, ДНК, уменьшается стабильность мембран, происходит инактивация ферментов, образуются дефекты в липидном слое мембран, увеличивается ионная проницаемость липидного биослоя и, как следствие, происходит утечка электролитов. Изменение интенсивности процессов ПОЛ может свидетельствовать как о патологических состояниях, так и о процессах адаптации.

По накоплению содержания МДА в корнях и листьях люпина узколистного можно

судить о положительном, либо отрицательном влиянии лишайников на развитие растения.

Выращивание люпина в присутствии биомассы лишайников вызвало изменение активности процессов ПОЛ в клетках. Содержание МДА в листьях люпина в вариантах с действием лишайников было ниже, по сравнению с контролем (табл. 3). Уменьшение накопления МДА в листьях свидетельствует о снижении интенсивности окислительных процессов в фотосинтезирующих органах люпина в присутствии лишайников. Низкий уровень накопления МДА в варианте с гипогимнией указывает на положительный эффект листоватого лишайника для роста и развития растения за счёт снижения интенсивности окислительных процессов в листьях люпина. Возможно, это связано с действием на растения комплекса соединений, которые выделяют лишайники в процессе функционирования.

Реакция корней люпина на действие лишайников отличалась от реакции надземных органов. В корнях растений отмечено увеличением МДА на 59,7% в варианте с пармелией и на 53,6% в варианте с гипогимнией. Вероятно, присутствие лишайника, непосредственно контактирующего с корнями растений, оказалось стресс-фактором, под влиянием которого запустился окислительный процесс в клетках, что привело к увеличению МДА по сравнению с контрольным вариантом.

Заключение

Численность МО в эпифитных микробиомах листоватых лишайников находится в пределах 160–250 тыс. КОЕ/г, при этом у

обоих видов доминирующей группой являются азотфиксирующие бактерии, составляя 53–60% от общей численности МО.

Установлена возможность использования биомассы лишайников в качестве альтернативного ростстимулятора для люпина узколистного.

Тестирование ростстимулирующей активности лишайников показало, что наиболее значимым критерием их положительного влияния оказалась интегральная величина индекса роста, при которой учитывают всхожесть семян, длину корней и высоту проростков.

При использовании такого биохимического показателя, как накопление МДА при перекисном окислении липидов, установили, что листья и корни люпина узколистного по-разному реагируют на действие биомассы листоватого лишайника. В корнях, которые непосредственно контактируют с лишайниками, интенсивность процессов ПОЛ была выше.

Сравнение ростстимулирующего эффекта двух видов листоватых лишайников показало, что лучший результат выявлен при использовании *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., вероятно, он обусловлен не только биологически активными веществами таллома, но и более высокими показателями численности микробов-эпифитов, в первую очередь, азотфиксаторов.

Литература

1. Каратыгин И.В., Сингиревская Н.С., Викулин С.В. Симбиоз гриба и цианобактерий в девоне // Микология и фитопатология. 2010. № 1. С. 31–36.
2. Бязров Л.Г. Лишайники в экологическом мониторинге. М.: Научный мир, 2002. 336 с.
3. Boustiel J., Grube M. Lichens – a promising source of bioactive secondary metabolites // Plant Genetic Resources. 2005. V. 3. No. 2. P. 273–287.
4. Kosanić M., Ranković B. Lichen as possible sources of antioxidants // Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2011. V. 24. P. 165–170.
5. Щербаклова А.И., Коптина А.В., Канарский А.В. Биологически активные вещества лишайников // Лесной журнал. 2013. № 3. С. 7–16.
6. Головки Т.К., Шелякин М.А., Захожий И.Г., Табаленкова Г.Н., Пыстина Т.Н. Реакция лишайников на загрязнение среды при добыче бокситовой руды в таёжной зоне // Теоретическая и прикладная экология. 2018. № 2. С. 44–53.
7. Панкратов Т.А., Качалкин А.В., Корчиков Е.С., Добровольская Т.Г. Микробные сообщества лишайников (обзор) // Микробиология. 2017. Т. 86. № 3. С. 265–283.

8. Панкратов Т.А. Бактериальные комплексы лишайников Хибин на примере *Cladonia unciallis*, *C. portentosa*, *Alectonia ochroleuca* и *Nephroma arcticum* // Микробиология. 2018. Т. 87. № 1. С. 70–78.

9. Santiago I.F., Soares M.A., Rosa C.A., Rosa L.H. Lichensphere: a protected natural microhabitat of the non-lichenised fungal communities living in extreme environments of Antarctica // Extremophiles. 2015. V. 19. P. 1087–1097.

10. Храпченкова О.М. Влияние биомассы эпифитных лишайников на прорастание семян злаковых культур // Наука и инновации. 2017. № 5 (171). С. 68–72.

11. Иванов А.И., Дунаева Т.А., Домнина Е.А., Ашихмина Т.Я., Дудин Г.П. Поиск информативных биохимических тестов в практике экологического мониторинга особо опасных объектов // Теоретическая и прикладная экология. 2011. № 4. С. 94–98.

12. Домнина Е.А., Огородникова С.Ю., Пестов С.В., Ашихмина Т.Я. Методы лишеноиндикации в оценке загрязнения атмосферного воздуха соединениями фосфора // Теоретическая и прикладная экология. 2019. № 4. С. 37–44.

13. Abdul-Baki A.A., Anderson J.D. Vigor determination in soybean seed by multiple criteria // Crop Science. 1973. V. 13. P. 630–633.

14. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. 208 с.

15. Малинина А.И., Домрачева Л.И., Ковина А.Л., Домнина Е.А. Особенности эпифитной микрофлоры различных видов листоватых лишайников // Экология родного края: проблемы и пути их решения: Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Киров: ВятГУ, 2019. С. 213–216.

References

1. Karatygin I.V., Singirevskaya N.S., Vikulin S.V. Symbiosis of the fungus and cyanobacteria in Devon // Mikologiya i fitopatologiya. 2010. No. 1. P. 31–36 (in Russian).
2. Byazrov L.G. Lichens in environmental monitoring. Moskva: Nauchnyy mir, 2002. 336 p. (in Russian).
3. Boustiel J., Grube M. Lichens – a promising source of bioactive secondary metabolites // Plant Genetic Resources. 2005. V. 3. No. 2. P. 273–287. doi: 10.1079/PGR200572
4. Kosanić M., Ranković B. Lichen as possible sources of antioxidants // Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2011. V. 24. P. 165–170.
5. Shcherbakova A.I., Koptina A.V., Kanarsky A.V. Biologically active substances of lichens // Lesnoy zhurnal. 2013. No. 3. P. 7–16 (in Russian).
6. Golovko T.K., Shelyakin M.A., Zakhoshy I.G., Tabalenkova G.N., Pystina T.N. The response of lichens to the

environmental pollution under the bauxite mining in the taiga zone // Theoretical and Applied Ecology. 2018. No. 2. P. 44–53 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2018-2-044/2-053/1

7. Pankratov T.A., Kachalkin A.V., Korchikov E.S., Dobrovolskaya T.G. Microbial lichen communities (overview) // Mikrobiologiya. 2017. V. 86. No. 3. P. 265–283 (in Russian). doi: 10.7868/S0026365617030156

8. Pankratov T.A. Bacterial complexes lichen Hibin the example *Cladonia unciallis*, *C. portentosa*, *Alectonia ochroleuca* and *Nephroma arcticum* // Mikrobiologiya. 2018. V. 87. No. 1. P. 70–78 (in Russian). doi: 10.7868/S0026365618010081

9. Santiago I.F., Soares M.A., Rosa C.A., Rosa L.H. Lichensphere: a protected natural microhabitat of the non-lichenised fungal communities living in extreme environments of Antarctica // Extremophiles. 2015. V. 19. P. 1087–1097. doi: 10.1007/s00792-015-0781-y

10. Khranchenkova O.M. The effect of epiphytic lichen biomass on seed germination of cereal crops // Nauka i innovatsii. 2017. No. 5 (171). P. 68–72 (in Russian).

11. Ivanov A.I., Dunaeva T.A., Domnina E.A., Ashikhmina T.Ya., Dudin G.P. Search for informative

biochemical tests in the practice of environmental monitoring of especially dangerous objects // Theoretical and Applied Ecology. 2011. No. 4. P. 94–98 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2011-4-094-098

12. Domnina E.A., Ogorodnikova S.Yu., Pestov S.V., Ashikhmina T.Ya. Lichenoindication methods for assessing atmospheric air pollution by phosphorus compounds // Theoretical and Applied Ecology. 2019. No. 4. P. 37–44 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2019-4-037-044

13. Abdul-Baki A.A., Anderson J.D. Vigor determination in soybean seed by multiple criteria // Crop Science. 1973. V. 13. P. 630–633.

14. Lukatkin A.S. Cold damage to heat-loving plants and oxidative stress. Saransk: Izd-vo Mordov. un-ta, 2002. 208 p. (in Russian).

15. Malinina A.I., Domracheva L.I., Kovina A.L., Domnina E.A. Features of epiphytic microflora of various species of leafy lichens // Ecology of the native land: problems and solutions: Materialy XIV Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem. Kirov: VyatGU, 2019. P. 213–216 (in Russian).