

УДК 582.29:581.132

ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБА ЭКСТРАКЦИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ И ИХ СОДЕРЖАНИЕ В ТАЛЛОМАХ ЛИШАЙНИКОВ

© *О.В. Дымова**, *О.А. Кузиванова*

*Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, ул. Коммунистическая, 28,
Сыктывкар, 167982 (Россия), e-mail: dymovao@ib.komisc.ru*

В данной работе оптимизирован способ экстракции фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) из талломов двух видов лишайников (*Lobaria pulmonaria* and *Cladonia rangiferina*) с использованием смеси диметилсульфоксид : ацетон (2 : 1), без нагревания гомогената. Необходимость предварительного промывания талломов зависит от вида лишайника и условий местообитания (загрязнения и пр.). С применением разработанной методики определено содержание зеленых и желтых пигментов у 21 вида кустистых и листоватых хлоро- и цианолишайников, произрастающих в подзоне средней тайги Республики Коми. Выявлены значительные видовые различия между лишайниками по накоплению фонда фотосинтетических пигментов. У большей части исследованных видов лишайников таежной зоны содержание в талломах хлорофилла *a* составляло 0.4-0.6, каротиноидов – 0.15-0.30 мг/г сухой массы. Показатель содержания фотосинтетических пигментов, и особенно хлорофилла, в талломах лишайников может служить важным биоиндикатором на изменяющиеся условия среды и критерием экологической оценки местообитаний, когда реакция других компонентов еще не выражена. Это важно с целью биомониторинга оценки качества окружающей среды и с точки зрения использования лишайников как лекарственного сырья, что обусловлено их биохимическим составом (пигменты, полисахариды, лишайниковые кислоты, пр.).

Ключевые слова: лишайники, фотосинтетические пигменты, экстракция, спектрофотометрия.

Исследование выполнено в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН по направлению «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» (№15-12-4-4), Программы УрО РАН по направлению «Живая природа и климат» (№18-4-4-20) и темы НИОКТР «Физиология и стресс-устойчивость фотосинтеза растений и пойкилогидрических фотоавтотрофов в условиях Севера» (№ АААА-А17-117033010038-7).

Введение

Лишайники широко распространены на земном шаре из-за способности расти на разнообразных субстратах (почве, стволах деревьев, скалах). На территории России известно 3435 видов лишайников [1]. В силу неравномерного их распределения по обширной территории изучение лишайнофлоры затруднено и чаще носит региональный характер.

В таежных лесах Республики Коми созданы благоприятные условия для произрастания лишайников, число которых составляет 866 видов [2]. Здесь преобладают эпифиты (60% от общего числа видов), обитающие на стволах и ветвях деревьев. Эпигейные лишайники входят в состав мохово-лишайникового яруса, больше распространены в сосновых лесах.

Таллом (слоевеище) лишайника представляет собой структуру, сформированную гифами гриба, в которой располагаются клетки фотобионта. В качестве фотобионтов выступают либо эукариотная водоросль (хлоробионт), либо прокариотная цианобактерия (цианобионт). Дуалистическая природа лишайников была открыта швейцарским ботаником Симоном Швенденером в 1869 г. [3]. В биомассе талломов доминируют грибные гифы микобионта [4]. На долю фотобионта приходится менее 10% биомассы. Фотобионт снабжает

Дымова Ольга Васильевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
e-mail: dymovao@ib.komisc.ru,
Кузиванова Ольга Александровна – инженер-химик,
e-mail: Kuzivanova@ib.komisc.ru

гриб органическим углеродом и азотом (в случае цианобактерий), микобионт создает условия для функционирования фотобионта и защищает его от высыхания. Посредством совместных усилий лишайниковых партнеров осуществляется биосинтез лишайни-

* Автор, с которым следует вести переписку.

ковых веществ, которые представляют собой безазотистые соединения фенольной природы и составляют 1–5% сухой массы лишайников [5, 6].

Наряду с особенностями метаболизма наличие фотосинтезирующего партнера играет важное значение в способности этих организмов произрастать в условиях с суровым климатом. Фотосинтетические пигменты являются маркерами фотобионта в талломах лишайников. Начиная с 60-х гг. прошлого столетия фотосинтетические пигменты и их содержание в талломах лишайников привлекают все большее число исследователей [7–11]. Фотосинтетический аппарат зеленых одноклеточных водорослей аналогичен таковому высших растений. Пигментами зеленых водорослей являются хлорофиллы (Хл *a* и Хл *b*), имеющие максимумы поглощения в красной и синей области видимой части солнечного спектра. У цианобактерий присутствуют Хл *a* и каротиноиды (Кар). Функцию Хл *b* выполняют билиновые пигменты, локализованные в антенных структурах – фикобилисомах. Хлоропласты лишайниковых водорослей получают в слоевище меньше света, чем хлоропласты высших растений. Так, если эпидермис листа получает 90% падающего света, то неокрашенный коровой слой лишайникового таллома – 70%, а окрашенный – лишь 50% [5]. Показатель содержания хлорофиллов служит перспективным и оперативным методом оценки ранней диагностики состояния окружающей среды.

Для количественного определения Хл *a* и *b* и суммы Кар широко применяют спектрофотометрический метод [12, 13], важнейшим условием применимости которого является отсутствие в экстрактах светопоглощающих примесей. Метод основан на извлечении Хл и Кар из растительного материала различными растворителями (ацетоном, диметилсульфоксидом, диметилформамидом и др.), очистке экстракта и измерении оптической плотности растворов смеси в диапазоне длин волн 400–700 нм. Определение Хл осуществляется в области их красных максимумов поглощения, при анализе общих Кар используют синюю область спектра. В последние годы проводится все больше исследований по определению фотосинтетических пигментов в талломах лишайников [14–17], однако к настоящему времени не существует единой методики экстракции Хл и Кар в них. В связи с этим нами был предпринят поиск оптимального способа экстракции зеленых (Хл *a* и *b*) и желтых (суммы Кар) пигментов для спектрофотометрического определения.

Цель работы – сравнение разных способов экстракции фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) из талломов двух модельных видов лишайников (*Lobaria pulmonaria*, *Cladonia rangiferina*) и применения оптимального способа для анализа пигментов у разных видов лишайников, произрастающих в условиях подзоны средней тайги Республики Коми.

Экспериментальная часть

Объектами исследования для оптимизации способа экстракции фотосинтетических пигментов являлись талломы двух видов лишайников, лобарии легочной (*Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm) (листоватый эпифитный) и кладонии оленьей (*Cladonia rangiferina* (L.) Wigg) (кустистый эпигейный).

Рассмотрено четыре варианта экстракции пигментов из высечек талломов (200–250 мг сырой массы). Использовали краевые зоны талломов у *L. pulmonaria* и верхушечную часть – у *C. rangiferina*. Первый вариант экстракции (I, исходный) состоял из следующих этапов: 1) навеску растительного материала растирали в охлажденной ступке под слоем растворителя, с обязательным добавлением CaCO₃ (для нейтрализации лишайниковых кислот), Na₂SO₄ (для обезвоживания); 2) экстракт центрифугировали 10 мин при 5000 g; 3) спектры поглощения полученных экстрактов регистрировали в диапазоне 400–700 нм на спектрофотометре (Shimadzu, Япония).

Пробоподготовка по второму варианту (II) включает, дополнительно к I, предварительную стадию промывания. Образцы (кусочки таллома) помещали в пробирки с ацетоном (V=3 мл) на 1 мин, процедуру повторяли 5 раз. Промывание необходимо для удаления с поверхности талломов веществ, которые в ходе экстракции могут разрушить Хл и Кар. Третий вариант экстракции (III) согласно методике [14] включает стадию термостатирования при 65 °С в течение 40 мин. Нагревание гомогената в диметилсульфоксиде (ДМСО) необходимо для минимизации деградации хлорофиллазы [15]. В четвертом варианте пробоподготовки (IV), выполненной согласно [16], время термостатирования составило 4 ч.

В эксперименте наряду с четырьмя вариантами экстракции были использованы разные растворители: ацетон, смесь ДМСО : ацетон (2 : 1) и чистый ДМСО. Варианты с нагреванием экстракта были рассмотрены только с использованием чистого ДМСО.

Разделение каротиноидов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обращенной фазой в соответствии с модифицированным методом [18]. В комплект для ВЭЖХ входило следующее оборудование: насос для ВЭЖХ – HPLC Pump 1000 (Knauer, Германия), рефрактометри-

ческий детектор – Smartline UV Detector 2500 (Knauer, Германия), аналитическая колонка – 4.0×250 мм Диасфер-110-С₁₈NT с размером частиц 5 мкм (БиоХимМак, Россия). Часть таллома размельчали в растворителе А (ацетонитрил : метанол : вода в соотношении 75 : 12 : 4) и отфильтровывали. Отфильтрованный экстракт пигментов (100 мкл) с помощью микрошприца наносили на колонку. Пигменты элюировали при градиентом режиме в течение 34 мин в системе растворителей А и В (метанол : этилацетат в соотношении 68 : 32) со скоростью потока элюента 2 см³/мин. Температура хроматографирования составляла 25 °С. Пигменты детектировали при 440 нм (каротиноиды), 644 нм (хлорофилл *b*) и 662 нм (хлорофилл *a*). Для расчета количественного состава пигментов использована абсолютная градуировка (метод внешнего стандарта). Каротиноиды идентифицировали, используя стандарты и времена удержания. Прием и обработку хроматографических данных выполняли с помощью компьютерной программы «EuroChrom for Windows». Стандарты чистых веществ (фотосинтетических пигментов) были получены от фирм «Sigma» и «Fluka» (США).

Все измерения проводили в 4–5 биологических повторностях. Статистическая обработка данных проведена с помощью программы Statistica 10 (Statsoft Inc., USA), с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Р-величину рассчитывали при заданном уровне значимости α 0.05. В таблицах приведены средние величины со стандартной ошибкой.

Обсуждение результатов

Из таблицы 1 следует, что максимальное извлечение Хл и Кар произошло при промывании таллонов *L. pulmonaria* ацетоном, экстракцией ДМСО и термостатировании 4 часа при 65 °С. Остальные варианты экстракции показали примерно одинаковые результаты. Параллельно пробы, подготовленные вышеперечисленными способами экстракции (I–IV), были проанализированы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Knauer, Германия). В вариантах с термостатированием на хроматограммах наблюдали появление дополнительных пиков (рис. 1), которые принадлежат феофитинам *a* и *b*, что свидетельствует о разрушении Хл и позволяет сделать вывод о недопустимости применения нагревания при экстракции пигментов. Возрастание концентрации Хл при экстракции ДМСО, обнаруженное спектрофотометрическим методом, было связано с наложением спектров хлорофиллов и феофитина как продукта распада зеленого пигмента.

По сравнению с листоватым лишайником *L. pulmonaria*, в кустистых талломах *C. rangiferina* в расчете на сухую массу содержание Хл (0.47±0.06 мг/г) и Кар (0.14±0.02 мг/г) было низким (табл. 2). Максимальное извлечение пигментов наблюдали в варианте с промыванием таллонов в ацетоне и использовании экстрагента ДМСО : ацетон (2 : 1). Нагревание не оказало влияния на содержание Хл и Кар.

У обоих видов лишайников, независимо от способа экстракции и растворителя, среди каротиноидов на долю β-каротина приходилось 13–14%, лютеин составлял 42–50%, неоксантин – 10–14%, компоненты ксантофиллового цикла (зеаксантин, виолаксантин и антраксантин) – от 28 до 35%. Каротиноиды (β-каротин, лютеин, др.) обладают противовоспалительной [19] и антиканцерогенной [20] активностью, снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний [21].

С применением в качестве экстрагента ДМСО : ацетон = 2 : 1 было проанализировано содержание фотосинтетических пигментов в талломах 21 вида лишайников, относящихся к порядкам *Peltigerales* и *Lecanorales* (табл. 3). Выявлена существенная видовая дифференциация лишайников по содержанию Хл *a* – основного фотосинтетического пигмента, входящего в состав реакционных центров фотосистем.

Таблица 1. Содержание пигментов в талломах *Lobaria pulmonaria* в зависимости от способа экстракции и растворителя (n = 5)

Условия					Концентрация пигментов, мг/г сухой массы		
растворитель			промывание ацетоном	нагревание при 65 °С, мин	Хл <i>a</i>	Хл <i>b</i>	Сумма каротиноидов
ацетон	ДМСО : ацетон (2 : 1)	ДМСО					
+	–	–	–	0	0.94±0.12 ^a	0.47±0.19 ^{ab}	0.29±0.03 ^c
+	–	–	+	0	0.92±0.21 ^a	0.51±0.26 ^{ab}	0.28±0.04 ^c
–	+	–	–	0	1.05±0.11 ^a	0.28±0.02 ^a	0.40±0.04 ^{ab}
–	+	–	+	0	1.13±0.19 ^a	0.32±0.05 ^a	0.44±0.07 ^{ab}
–	–	+	–	0	1.12±0.15 ^a	0.37±0.05 ^{ab}	0.41±0.04 ^{ab}
–	–	+	+	40	1.08±0.19 ^a	0.31±0.04 ^a	0.35±0.05 ^{ac}
–	–	+	+	240	1.60±0.19 ^b	0.57±0.04 ^b	0.45±0.06 ^b

Примечание. Приведены среднее значение ± стандартная ошибка; разные надстрочные символы обозначают достоверность изменений параметра (тест Дункана, при уровне $p < 0.05$).

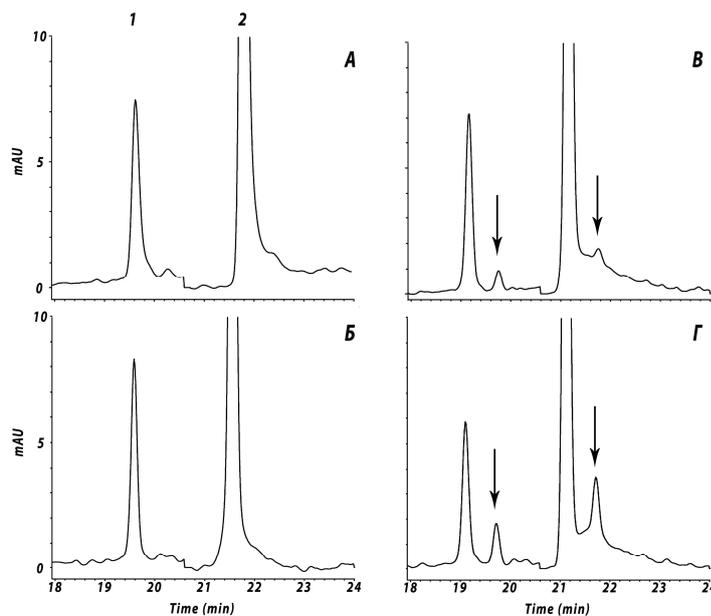


Рис. 1. Часть профилей хроматограмм экстрактов из талломов *Lobaria pulmonaria* при разных способах экстракции с использованием в качестве растворителя диметилсульфоксида (ДМСО): А – I вариант, Б – II вариант, В – III вариант, Г – IV вариант (описание в тексте). Пики пигментов: 1 – хлорофилл *b*, 2 – хлорофилл *a*, стрелками обозначен феофитин

Таблица 2. Содержание пигментов в талломах *Cladonia rangiferina* в зависимости от способа экстракции и растворителя (n = 5)

Условия					Концентрация пигментов, мг/г сухой массы		
растворитель			промывание ацетоном	нагревание при 65°C, мин	Хл <i>a</i>	Хл <i>b</i>	Сумма каротиноидов
ацетон	ДМСО : ацетон (2 : 1)	ДМСО					
+	–	–	–	0	0.17±0.08 ^{ac}	0.15±0.09 ^a	0.06±0.02 ^b
+	–	–	+	0	0.13±0.05 ^c	0.10±0.06 ^a	0.04±0.02 ^b
–	+	–	–	0	0.23±0.05 ^{ab}	0.07±0.01 ^a	0.10±0.02 ^a
–	+	–	+	0	0.34±0.06 ^d	0.13±0.07 ^a	0.14±0.02 ^c
–	–	+	–	0	0.27±0.07 ^{bd}	0.08±0.02 ^a	0.10±0.02 ^a
–	–	+	+	0	0.22±0.02 ^{abc}	0.06±0.01 ^a	0.09±0.01 ^a
–	–	+	+	40	0.26±0.03 ^{abd}	0.10±0.02 ^a	0.10±0.01 ^a
–	–	+	+	240	0.23±0.02 ^{ab}	0.08±0.01 ^a	0.10±0.01 ^a

Примечание. Приведены среднее значение ± стандартная ошибка; разные надстрочные символы обозначают достоверность изменений параметра (тест Дункана, при уровне $p < 0.05$).

Диапазон концентраций Хл *a* находился в пределах от 0.16 мг/г (*Peltigera malaceae*) до 1.3 мг/г (*P.rufescens*). Оба вида содержат в качестве фотобионта цианобактерии. Сравнительно высоким накоплением Хл *a* характеризовались талломы хлоролишайников *Usnea hirta* и *Evernia mesomorpha*, а также трехкомпонентные лишайники, такие как *Peltigera rufescens*, *P. aphthosa* и *Lobaria pulmonaria*. Талломы цианолишайника *P.malaceae* и хлоролишайника *Cladonia sulphuzina* отличались низким содержанием Хл *a*. У большей части исследованных видов содержание Хл *a* в талломах составляло 0.4–0.6 мг/г. Полученные нами результаты сопоставимы с имеющимися в литературе данными [10, 22] для большой группы лишайнобиоты (75 видов), у представителей которых концентрация Хл *a* варьировала от 0.5 до 3 мг/г сухой массы таллома.

Было выявлено, что содержание хлорофилла не зависит от типа фотобионта. Определенное влияние может оказывать соотношение фото- и микобионта в талломе. Поскольку считается, что природа лишайникового симбиоза – паразитическая [23], то в талломе контактирующие с грибом клетки фотобионта могут испытывать давление микобионта в большей или меньшей степени. На долю фотобионта в среднем приходится около 5% сухой массы. Чтобы нивелировать влияние этого фактора, можно отнести содержание пигментов к площади талломов. Однако такой способ не всегда удобен при работе с листоватыми формами из-за неровностей поверхности талломов и практически непригоден для кустистых лишайников. Среди обоих типов жизненной формы встречались виды с высоким и низким содержанием Хл, но диапазон варьирования между минимальным и максимальным значениями был шире среди листоватых лишайников (рис. 2А). Концентрация каротиноидов была в 2–4 раза ниже, чем хлорофиллов, и составляла в среднем 0.15–0.30 мг/г (рис. 2Б). Сходные результаты были показаны для изученных видов лишайников из порядков *Lecanorales*, в котором преобладали кустистые формы, и *Peltigerales*, представленный видами только с листоватой формой (рис. 2В–Г). Ранее нами показано [24], что прослеживается прямая связь между накоплением фонда зеленых (Хл *a+b*) и желтых (сумма Кар) пигментов ($r = 0.96$).

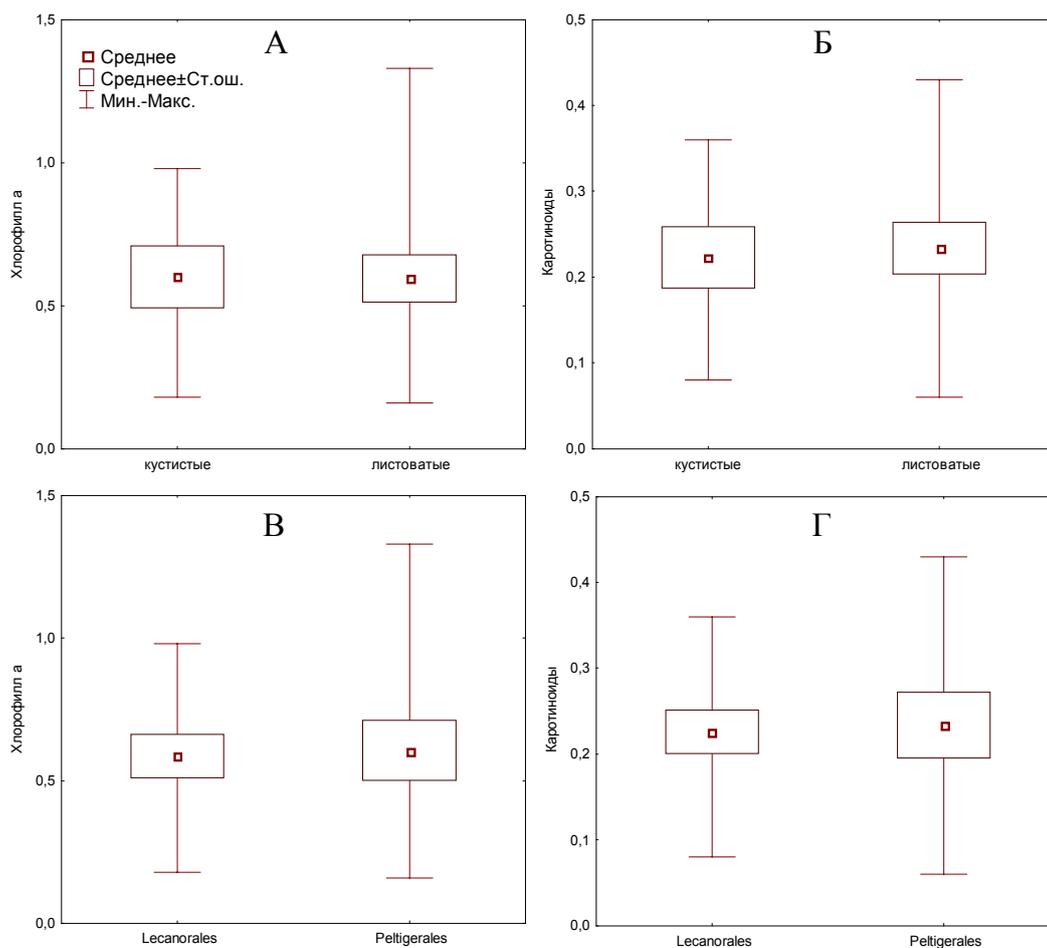


Рис. 2. Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов в талломах разных видов лишайников таежной зоны в зависимости от жизненной формы (А, Б) и таксономического положения (В, Г), 2014–2015 гг. Описательная статистика проведена на основе среднеарифметических значений для каждого вида

Таблица 3. Содержание пигментов в талломах лишайников, мг/г сухой массы (n = 5)

Порядок	Род	Вид	Жизненная форма	Фотобионт		Пигменты	
				ЗВ	ЦБ	хлорофилл <i>a</i>	сумма каротиноидов
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Lecanorales</i>	<i>Cladonia</i>	<i>Cl. stellaris</i>	кустистый	+	–	0.53 ± 0.09 ^{cd}	0.20 ± 0.02 ^{bcd}
		<i>Cl. sulphurina</i>	кустистый	+	–	0.18 ± 0.05 ^{ab}	0.08 ± 0.02 ^a
		<i>Cl. rangiferina</i>	кустистый	+	–	0.42 ± 0.08 ^{abcde}	0.16 ± 0.03 ^{abc}
		<i>C. islandica</i>	кустистый	+	–	0.58 ± 0.12 ^{def}	0.24 ± 0.02 ^{cdf}
	<i>Cetraria</i>	<i>E. mesomorpha</i>	кустистый	+	–	0.97 ± 0.06 ^k	0.32 ± 0.02 ^{efgk}
	<i>Evernia</i>	<i>H. physodes</i>	листоватый	+	–	0.57 ± 0.06 ^{def}	0.26 ± 0.04 ^{def}
	<i>Hypogimnia</i>	<i>U. hirta</i>	кустистый	+	–	0.98 ± 0.11 ^k	0.36 ± 0.04 ^{fgk}
	<i>Usnea</i>	<i>P. sulcata</i>	листоватый	+	–	0.44 ± 0.02 ^{bcd}	0.20 ± 0.01 ^{bed}
	<i>Parmelia</i>	<i>Pl. glauca</i>	листоватый	+	–	0.65 ± 0.05 ^{efg}	0.24 ± 0.02 ^{cdf}
	<i>Platismatia</i>	<i>St. condensatum</i>	кустистый	+	+	0.55 ± 0.05 ^{cd}	0.20 ± 0.04 ^{bcd}
	<i>Stereocaulon</i>	<i>Peltigera</i>	<i>P. rufescens</i>	листоватый	–	+	1.33 ± 0.04 ⁱ
<i>Peltigerales</i>	<i>Peltigera</i>	<i>P. leucophlebia</i>	листоватый	+	+	0.76 ± 0.03 ^{fgk}	0.30 ± 0.04 ^{efg}
		<i>P. malacea</i>	листоватый	–	+	0.16 ± 0.02 ^a	0.06 ± 0.02 ^a
		<i>P. membranacea</i>	листоватый	–	+	0.36 ± 0.02 ^{abcd}	0.13 ± 0.01 ^{ab}
		<i>P. aphthosa</i>	листоватый	+	+	0.95 ± 0.08 ^k	0.38 ± 0.03 ^{ski}
		<i>P. canina</i>	листоватый	–	+	0.38 ± 0.04 ^{abcd}	0.15 ± 0.01 ^{abc}
		<i>P. neopolydactila</i>	листоватый	–	+	0.37 ± 0.08 ^{abcd}	0.16 ± 0.02 ^{abc}

Окончание таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8
		<i>P. ponojensis</i>	листоватый	–	+	0.57 ± 0.07 ^{cdet}	0.21 ± 0.04 ^{bcd}
		<i>P. praetextata</i>	листоватый	–	+	0.30 ± 0.03 ^{abc}	0.12 ± 0.01 ^{ab}
		<i>P. scabrosa</i>	листоватый	–	+	0.60 ± 0.21 ^{def}	0.22 ± 0.07 ^{bcd}
	<i>Lobaria</i>	<i>L. pulmonaria</i>	листоватый	+	+	0.89 ± 0.19 ^{gk}	0.41 ± 0.06 ^{ki}

Для анализа образцы зафиксированы жидким азотом. ЗВ – зеленая водоросль (*Dictiochloropsis reticulata* – у *L. pulmonaria*, *Coccomyxa* – у остальных представителей пор. *Peltigerales*, *Trebouxia* – у пор. *Lecanorales*), ЦБ – цианобактерия (*Nostoc* – у представителей пор. *Peltigerales*, *Stigonema* – у *St. condensatum*). Приведены среднее значение ± стандартная ошибка; разные надстрочные символы обозначают достоверность изменений параметра (тест Дункана, при уровне $p < 0.05$).

Выводы

Установлено, что оптимальными условиями для извлечения хлорофиллов и каротиноидов из талломов лишайников являются: 1) использование экстрагента ДМСО : ацетон = 2 : 1, 2) необходимость промывания талломов зависит от вида лишайника и местообитания (загрязнения, пр.), 3) экстракцию следует проводить без нагревания гомогената. С применением оптимизированного нами способа экстракции исследовано содержание фотосинтетических пигментов в талломах 21 вида лишайников. Сопоставление лишайников с сосудистыми растениями показало, что содержание фотосинтетических пигментов в талломах на порядок ниже, чем в листьях травянистых и древесных видов [25]. По накоплению хлорофиллов лишайники существенно уступают даже плаунам. Это, согласно [26], соответствует низкому уровню их метаболической активности и проявляется в замедленном росте.

Список литературы

1. Урбанавичюс Г.П. Особенности разнообразия лишайнофлоры России // Известия РАН. Серия географическая. 2011. №1. С. 66–78.
2. Пыстина Т.Н., Херманссон Я. Разнообразие лишайников Республики Коми: важнейшие итоги и перспективы дальнейших исследований // Современная ботаника в России: труды XIII Съезда Русского ботанического общества и конференции «Научные основы охраны и рационального использования растительного покрова Волжского бассейна». Тольятти, 2013. Т. 1. С. 205–207.
3. Жизнь растений. Т. 3. Водоросли. Лишайники / под ред. М.М. Голлербаха. М., 1977. 487 с.
4. Honegger R. The symbiotic phenotype of lichen-forming *Ascomycetes* and their endo- and epibionts // *The Mycota*. Springer, 2012. Vol. IX. Pp. 228–339.
5. Шапиро И.А. Загадки растения-сфинкса. Лишайники и экологический мониторинг. Л., 1991. 82 с.
6. Huneck S., Yoshimura I. Identification of lichen substances. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1996. 493 p.
7. Wilhelmson J.B. Chlorophylls in the lichens *Peltigera*, *Parmelia* and *Xanthoria* // *Bot. Tridss.* 1959. N55. Pp. 20–36.
8. Hampton E. Photosynthetic pigments in *Peltigera canina* (L.) Willd. from sun and shade habitats // *The Bryologist* (short articles). 1973. Vol. 76. Pp. 543–545.
9. Lange O.L., Bilger W., Rimke S., Schreiber U. Chlorophyll fluorescence of lichens containing green and blue-green algae during hydration by water vapour uptake and by addition to liquid water // *Botanica Acta*. 1989. Vol. 24. N 102. Pp. 81–92.
10. Palmquist K., Dahlman L., Valladares F., Tehler A., Sancho L.G., Mattsson J.-E. CO₂ exchange and tallus nitrogen across 75 contrasting lichen associations from different climate zones // *Oecologia*. 2002. Vol. 133. Pp. 295–306.
11. Strzalka K., Szymanska R., Suwalsky M. Prenylipids and pigments content in selected Antarctic lichens and mosses // *J. Chil. Chem. Soc.* 2011. Vol. 56. № 3. Pp. 808–811.
12. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений / под ред. О.А. Павлиновой. М., 1971. С. 154–170.
13. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // *J. Plant Physiol.* 1994. Vol. 144. Pp. 307–313.
14. Ra H.S.Y., Geiser L.H., Crang R.F.E. Effects of season and low-level air pollution on physiology and element content of lichens from the U.S. Pacific Northwest // *Sci. Total Environ.*, 2005. Vol. 343. Pp. 155–167.
15. Ronen R., Galun M. Pigment extraction from lichens with dimethylsulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation // *Environ. Exp. Bot.* 1984. Vol. 24. Pp. 239–245.
16. Gaaslaa Y., Kopperud C., Solhaug K.A. Optimal quantum yield of photosystem II and chlorophyll degradation of *Lobaria pulmonaria* in relation to pH // *Lichenologist*, 1996. Vol. 28. Pp. 67–78.
17. Pfeifhofer H.W., Willfurth R., Zorn M., Kranner I. Analysis of Chlorophylls, Carotenoids, and Tocopherols in Lichens // *Protocol in Lichenology*. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2002. Pp. 363–378.

18. Gilmore A.M., Yamamoto H.Y. Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-encapped, lightly carbon-loaded C18 high-performance liquid chromatographic column // *Journal of Chromatography A*. 1991. Vol. 543. Pp. 137–145.
19. Bolin A.P., Macedo R.C., Marin D.P., Barros M.P., Otton R. Astaxanthin prevents *in vitro* auto-oxidative injury in human lymphocytes // *Cell Biol. Toxicol.* 2010. Vol. 26. Pp. 457–467.
20. Tanaka T., Shnimizu M., Moriwaki H. Cancer Chemoprevention by Carotenoids // *Molecules*. 2012. Vol. 17. Pp. 3202–3242.
21. Kärri J., Laukkanen J.A., Mäkilä T.H., Ronkainen K., Kurl S. Low β -carotene concentrations increase the risk of cardiovascular disease mortality among Finnish men with risk factors // *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 2012. Vol. 22 (10). Pp. 921–928.
22. Palmqvist K., Campbell D., Ekblad A., Johansson H. Photosynthetic capacity in relation to nitrogen content and its partitioning in lichens with different photobionts // *Plant, Cell and Environment*. 1998. Vol. 21. Pp. 361–372.
23. Голубкова Н.С. К вопросу о происхождении и путях эволюции лишайникового симбиоза // *Новости систематики низших растений*. 1993. Т. 29. С. 84–104.
24. Головки 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.
25. Головки Т.К., Далькэ И.В., Дымова О.В., Захой И.Г., Табаленкова Г.Н. Пигментный комплекс растений природной флоры европейского Северо-Востока // *Известия Коми научного центра УрО РАН*. 2010. №1. С. 39–46.
26. Honneger R. *Morphogenesis* // *Lichen Biology*. Cambridge Univ. Press, 2008. Pp. 69–93.

Поступило в редакцию 14 сентября 2017 г.

После переработки 17 ноября 2017 г.

Для цитирования: Дымова О.В., Кузиванова О.А. Оптимизация способа экстракции фотосинтетических пигментов И ИХ Содержание в талломах лишайников // *Химия растительного сырья*. 2018. №2. С. 137–144. DOI: 10.14258/jcrpm.2018023013

*Dymova O.V.**, *Kuzivanova O.A.* THE OPTIMIZATION OF EXTRACTION ROUTINE OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS AND ITS CONTENT IN LICHENS THALLI

Institute of Biology Komi Scientific Centre, Ural Division Russian Academy of Sciences, ul. Kommunistycheskaya, 28, Syktyvkar, 167982 (Russia), e-mail: dymovao@ib.komisc.ru

In this study the way of photosynthetic pigments extraction (chlorophylls and carotenoids) from lichens thalli of two species (*Lobaria pulmonaria* and *Cladonia rangiferina*) was optimized. Use of dimethylsulphoxide : acetone (2 : 1) mix, without heating of the pigment extract at 65 °C was recommended. Previous rinsing of thallus by acetone depends on a lichen species and habitat conditions (pollution, etc.). By means of the developed technique the chlorophylls and carotenoids content was defined in 21 different lichen species growing in a middle taiga subzone of the Komi Republic. There are foliaceous and bushy lichens among these species. The lichens were divided into three groups according to photobionts: species with green algae, species with cyanobacteria, and tripartite species with green algal photobionts and cyanobacteria in cephalodia. Across species, significant differences on accumulation of photosynthetic pigments pool was revealed. Thallus chlorophyll concentration ranged 0.4–0.6 mg/g, carotenoids – 0.15–0.30 mg/g in the most of studied lichen species. Photosynthetic pigments, especially chlorophyll *a*, in the lichens thallus can serve as the important bioindicator on the changing environment conditions and criterion of ecological assessment of habitats. It is important for biomonitoring of the environment and use of lichens as medical materials because of their biochemical structure (pigments, polysaccharides, lichen acids, etc.).

Keywords: lichens, photosynthetic pigments, extraction, spectrophotometry.

References

1. Urbanavichius G.P. *Izvestiia RAN. Seriya geograficheskaya*, 2011, no. 1, pp. 66–78. (in Russ.).
2. Pystina T.N., Khermansson Ia. *Sovremennaya botanika v Rossii: Trudy XIII S"ezda Russkogo botanicheskogo obshchestva i konferentsii «Nauchnye osnovy okhrany i ratsional'nogo ispol'zovaniia rastitel'nogo pokrova Volzhskogo basseina»*. [Contemporary Botany in Russia: Proceedings of the 13th Congress of the Russian Botanical Society and the Conference "Scientific Basics of Protection and Rational Use of the Vegetation Cover of the Volga Basin"]. Tol'yatti, 2013, vol. 1, pp. 205–207. (in Russ.).
3. *Zhizn' rastenii. T. 3. Vodrosli. Lishainiki* [Life of plants. Vol. 3. Algae. Lichens], ed. M. M. Gollerbakha. Moskva, 1977, 487 p. (in Russ.).
4. Honegger R. *The Mycota*. Springer, 2012, vol. IX, pp. 228–339.
5. Shapiro I.A. *Zagadki rasteniia-sfinksa. Lishainiki i ekologicheskii monitoring*. [Riddles of the Sphinx plant. Lichens and ecological monitoring]. Leningrad, 1991, 82 p. (in Russ.).
6. Huneck S., Yoshimura I. *Identification of lichen substances*. Berlin – Heidelberg – New York: Springer-Verlag, 1996, 493 p.
7. Wilhelmsen J.B. *Bot. Tidskr.*, 1959, no. 55, pp. 20–36.
8. Hampton E. *The Bryologist (short articles)*, 1973, vol. 76, pp. 543–545.
9. Lange O.L., Bilger W., Rimke S., Schreiber U. *Botanica Acta*, 1989, vol. 24, no. 102, pp. 81–92.
10. Palmquist K., Dahlman L., Valladares F., Tehler A., Sancho L.G., Mattsson J.-E. *Oecologia*, 2002, vol. 133, pp. 295–306.
11. Strzalka K., Szymanska R., Suwalsky M. *J. Chil. Chem. Soc.*, 2011, vol. 56, no. 3, pp. 808–811.
12. Shlyk A.A. *Biokhimicheskie metody v fiziologii rastenii* [Biochemical methods in plant physiology], ed. O.A. Pavlinovoi. Moskva, 1971, pp. 154–170. (in Russ.).
13. Wellburn A.R. *J. Plant Physiol.*, 1994, vol. 144, pp. 307–313.
14. Ra H.S.Y., Geiser L.H., Crang R.F.E. *Sci. Total Environ.*, 2005, vol. 343, pp. 155–167.
15. Ronen R., Galun M. *Environ. Exp. Bot.*, 1984, vol. 24, pp. 239–245.
16. Gaaslaa Y., Kopperud C., Solhaug K.A. *Lichenologist*, 1996, vol. 28, pp. 67–278.
17. Pfeifhofer H.W., Willfurth R., Zorn M., Kranner I. *Protocol in Lichenology*. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2002, pp. 363–378.
18. Gilmore A.M., Yamamoto H.Y. *Journal of Chromatography A*, 1991, vol. 543, pp. 137–145.
19. Bolin A.P., Macedo R.C., Marin D.P., Barros M.P., Otton R. *Cell Biol. Toxicol.*, 2010, vol. 26, pp. 457–467.
20. Tanaka T., Shnimizu M., Moriwaki H. *Molecules*, 2012, vol. 17, pp. 3202–3242.
21. Karrpi J., Laukkanen J.A., Mäkilallio T.H., Ronkainen K., Kurl S. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 2012, vol. 22 (10), pp. 921–928.
22. Palmqvist K., Campbell D., Ekblad A., Johansson H. *Plant, Cell and Environment*, 1998, vol. 21, pp. 361–372.
23. Golubkova N.S. *Novosti sistematiki nizshikh rastenii*, 1993, vol. 29, pp. 84–104. (in Russ.).
24. Golovko T.K., Dymova O.V., Tabalenkova G.N., Pystina T.N. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*, 2015, no. 4, pp. 38–44. (in Russ.).
25. Golovko T.K., Dal'ke I.V., Dymova O.V., Zakhozhiy I.G., Tabalenkova G.N. *Izvestiia Komi nauchnogo tsentra UrO RAN*, 2010, no. 1, pp. 39–46. (in Russ.).
26. Honegger R. *Lichen Biology*. Cambridge Univ. Press, 2008, pp. 69–93.

Received September 14, 2017

Revised November 17, 2017

For citing: Dymova O.V., Kuzivanova O.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2018, no. 2, pp. 137–144. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2018023013

* Corresponding author.