

**О. М. Храмченкова, А. Г. Цуриков**

*Гомельский государственный университет имени Ф. Скорины, г. Гомель, Республика Беларусь*

## **МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ АНАТОМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ЛИШАЙНИКА *HYROGYMNA PHYSODES (L.) NYL.***

*Предложена авторская модификация методики изготовления анатомических срезов лишайника *Нурогутния physodes (L.) Nyl.* Для средневозрастных и приспевающих сосняков Гомельского региона, стволов сосен, берез и опада, оценены размеры анатомических структур лишайника гипогимнии вздутой: толщина верхнего и нижнего корового слоя, диаметр клеток фикобионта и толщина гиф микобионта. Показано, что в сосняках орляковом, багульниковом и долгомошном верхний коровой слой *Нурогутния physodes* достоверно толще, чем в сосняках осоковом и миштом – 7,38–8,12 мкм и 6,40–6,70 мкм соответственно. Толщина нижнего корового слоя лишайника, произрастающего в различных типах сосновых лесов, статистически не отличается, и составляет 5,84–6,45 мкм. Толщина верхнего и нижнего коровых слоев гипогимнии вздутой, собранной на стволах сосен, берез и опаде достоверно не отличается. Диаметр клеток фотобионта (*Trebouxia Punt.*) достоверно больше в слоевищах, отобранных в сосняках осоковом и миштом (3,60–3,62 мкм), в отличие от образцов из орлякового, багульникового и долгомошного типов леса (2,97–3,25 мкм). Размеры клеток *Trebouxia* в пробах лишайника, взятых с различных субстратов, статистически достоверно не отличаются. Диаметр гиф микобионта в эпиксильных образцах лишайника (1,12 мкм) достоверно больше, чем в лишайниках, произрастающих эпифитно.*

➤ **Ключевые слова:** *Нурогутния physodes*, анатомическое строение, верхний и нижний коровой слой, фотобионт, диаметр клеток *Trebouxia*, микобионт, диаметр гиф, сосновые леса, сосняки миштые, орляковые, долгомошные, багульниковые и осоковые.

### **Введение**

Морфологические, анатомические и ультраструктурные характеристики слоевищ лишайников часто используются в качестве индикаторов атмосферного загрязнения.

Среди морфологических изменений отмечают: уменьшение размеров талломов, изменения их формы, характера поверхности и типичной окраски, некрозы слоевищ, ослабление прикрепления талломов к субстратам, повреждения гимения у апотециев, обесцвечивание и деформацию подециев [1–4].

К анатомическим перестройкам относят: изменение толщины слоевищ, гипертрофию сердцевины, наличие некротических и плазмолизированных клеток, увеличение количества клеток водорослей и их размеров, отсутствие водорослей в растущих кончиках подециев слоевища [5, 6].

Изменения ультраструктуры проявляются как в клетках фотобионта, так и микобионта. Для фотобионта отмечают: набухание и деформацию митохондрий, растяжение оболочек хлоропластов и деформацию пиреноглобул, изменение формы и уменьшение количества тилакоидов, дегенерацию пиреноидов, стромы хлоропластов, ядер, митохондрий и цитоплазмы, образование псевдокристаллических структур в хлоропластах и цитоплазме. В клетках микобионта происходит утолщение оболочек, высокая вакуолизация, накопление значительного количества липидов, возникновение гаусториальных контактов, набухание митохондрий [7–9].

Перечисленные (и другие) изменения строения талломов являются не только признаками патологии вследствие воздействия атмосферных поллютантов, но и показателями старения, или ускоренного старения лишайников [8].

В естественных местообитаниях на жизнедеятельность лишайников влияют условия освещения, свойства субстрата произрастания, состав атмосферного воздуха, доступность влаги, температура, в совокупности вызывающие комплекс адаптивных изменений, способствующих развитию приспособлений к условиям макро- и микроклимата. По-видимому, существует определенная гетерогенность экспрессии геномов фикобионта и микобионта, реализуемая в условиях «симбиоза» гриба и водоросли, проблематичность которого широко дискутируется [10, 11].

Особенности анатомического строения лишайников в настоящее время является предметом многих исследований, поскольку отражает интенсивность протекающих в них физиологических процессов, характеризуют их реакции на изменяющиеся условия окружающей среды. Сведений об осо-

бенностях анатомического строения наиболее распространенных видов лишайников, произрастающих в определённых лесорастительных условиях, в отечественной лишайниковой литературе крайне мало. Актуальность данного исследования связана также с тем, что гипогимния вздутая – *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. (Syn. *Parmelia physodes* (L.) Ach.) является весьма полиморфным и трудным для анатомического исследования видом. Лопасты ее слоевищ выпуклые, на концах часто расширенные, губовидно отогнутые, полые внутри, причем объем полостей изменяется по мере увеличения или уменьшения оводненности талломов [12–14].

В настоящей работе приводится авторская модификация методик изготовления срезов талломов *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. заданной толщины, а также результаты определения некоторых анатомических параметров слоевищ, отобранных в сосняках Гомельского региона.

### Методы исследований

Полевые исследования проводили на территории ГЛХУ «Гомельский лесхоз» на основании таксационных материалов, предоставленных Республиканским дочерним лесоустроительным предприятием «Гомельлеспроект». Было заложено 47 пробных площадей в средневозрастных и приспевающих сосняках мшистых, орляковых, долгомошных, багульниковых и осоковых. Для отбора образцов на пробной площади выбирали наиболее типичные деревья. Со стволов сосен, берёз, а также с опада отбирали образцы *Hypogymnia physodes* вместе с субстратом. Образцы с деревьев отбирали на высоте 1,3 м, с опада – в нескольких местах в пределах пробной площади. Для анализа отбирали преимущественно наиболее крупные слоевища, что обеспечивало относительную однородность выборки, так как такие слоевища считаются условно взрослыми. В качестве прототипа для разработки методики изготовления срезов *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. использовали работу [15]. На основании литературных данных и путем эмпирического подбора нами была разработана нижеприведенная схема анатомического исследования гипогимнии вздутой.

Шаг 1. Подготовка проб. Образцы лишайника тщательно отделяли от субстрата, и не подвергали сушке при высоких температурах во избежание разрушения пигментов и деформации клеток фикобιονта.

Шаг 2. Фиксация материала. Фрагменты слоевищ закладывали в марлевые мешочки, снабжали написанными мягким простым карандашом этикетками, после чего на 72 часа помещали в 96% раствор этилового спирта (рис. 1а).

Шаг 3. Обезвоживание. Для проводки использовали о-ксилол (хч) и абсолютный спирт (получали путем обезвоживания 96% раствора безводным  $\text{CuSO}_4$ ). Растворы для проводки готовили в химических колбах на 200 мл по схеме, представленной в таблице [15].

Схема проводки изучаемого материала

Концентрация раствора, %	Объем абсолютного спирта, мл	Объем о-ксилола, мл	Длительность пребывания материала в растворе, ч
10	90	10	6
20	80	20	6
30	70	30	12
50	50	50	12
75	25	75	12
100	—	100	24
100	—	100	24

Шаг 4. Заливка. Мешочки с материалом на 24 ч помещали в смесь о-ксилол + гистомикс (1:1,  $t = 37^\circ\text{C}$ ) – выдерживали в термостате. На следующий день материал выдерживали 1 час на водяной бане в смеси гистомикс + пчелиный воск ( $t = 56^\circ\text{C}$ , содержание воска – 10%). Одновременно готовили смесь для заливки препарата – гистомикс + пчелиный воск (содержание воска – 10%). Из марлевых мешочков пинцетом вынимали материал, помещали его в кассету для микротомы, и заливали смесь гистомикс + пчелиный воск (рис. 1б). После затвердевания препарат вынимали из кассеты. Кассету заливали чистым гистомиксом, при затвердевании которого перпендикулярно приплавливали препарат (рис. 1в).

Шаг 5. Изготовление срезов производили на ротационном микротоме Thermo Fisher Shandon Finesse E, толщина срезов  $15\ \mu\text{m}$ <sup>1</sup>. Смешивание гистомикса с пчелиным воском позволило получить непрерывные ленты срезов, которые затем было легко монтировать на предметные стекла (рис. 1г).

<sup>1</sup> Толщина среза может быть установлена любая – в соответствии с техническими характеристиками микротомы.

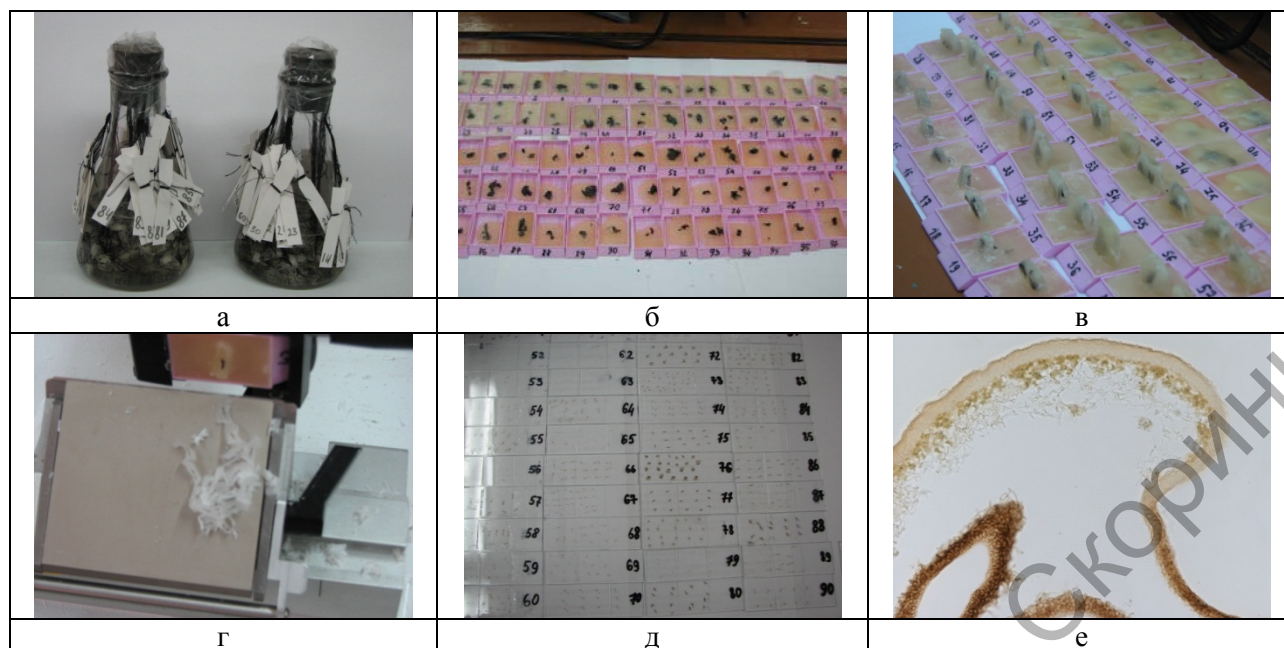


Рисунок 1 – Последовательность изготовления анатомических срезов лишайника *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. (пояснения в тексте)

Шаг 6. Наклейка срезов. Предметные стекла обезжировали в 96% этиловом спирте. Для наклейки срезов использовали белковую среду. Белок куриного яйца выливали в химический стакан на 50 мл, тщательно удаляли все пленки, взбивали до состояния пены, давали отстояться и фильтровали через влажный фильтр. В сосуд с фильтратом белка вводили кристалл фенола. Несколько капель белковой среды пипеткой наносили на предметное стекло, добавляли несколько капель дистиллированной воды, после чего препаровальной иглой переносили срезы с микротомом, располагая их продольными или поперечными рядами. Стекло слегка подогревали снизу для расплавления гистомикса.

Шаг 7. Депарафинирование срезов. Предметные стекла со срезами помещали на 10 минут последовательно в 2 стаканчика с о-ксилолом, и 2 стаканчика с 96% этиловым спиртом. Время депарафинирования одного стекла – 40 минут.

Шаг 8. Наложение покровного стекла на срезы – получение полупостоянного препарата. Предметное стекло вынимали из депарафинирующего раствора так, чтобы срезы были наверху. Нижнюю часть стекла осторожно вытирали марлей. На срез наносили 1–3 капли смеси Гойера (состав: вода – 25 мл; гуммиарабик – 15 мг; глицерин (чда) – 8 мл; хлоральгидрат – 100 г). Пинцетом брали покровное стекло, и держали его так, чтобы левый край прикасался к предметному стеклу точно вдоль левой границы срезов. Затем постепенно опускали покровное стекло, пока оно не соприкоснется с каплей смеси Гойера, нанесенной на срезы (рис. 1д). Полученные препараты являются полупостоянными, и через 9–10 месяцев после изготовления начинают растрескиваться.

Шаг 9. Изготовленные препараты просматривали под микроскопом Nikon Eclipse 80i, измеряли толщину верхней и нижней коры слоевища *Hypogymnia physodes*, диаметр клеток фотобионта и диаметр гиф микобионта (рис. 1е). Число промеров на каждом стекле – по 5 на каждый показатель. Задачи исследования и число промеров могут быть изменены по усмотрению исследователя.

Полученные результаты были обработаны методами описательной статистики, а также однофакторного дисперсионного анализа.

### Результаты и их обсуждение

На рис. 2 представлены результаты измерения толщины верхнего и нижнего корового слоя талломов *Hypogymnia physodes* (здесь и далее: ор – сосняк орляковый, баг – сосняк багульниковый, дм – сосняк долгомошный, ос – сосняк осоковый, мш – сосняк мшистый).

Было обнаружено, что толщина верхнего корового слоя лишайника *Hypogymnia physodes*, произрастающего в различных типах сосняков статистически отличается (рис. 2а). Толщина верхней коры слоевищ в сосняках орляковом, багульниковом и долгомошном составляет 7,38–8,12 мкм. Статистически установлено, что толщина верхнего корового слоя талломов в сосняках осоковом и мшистом меньше и варьирует в пределах 6,40–6,70 мкм. Обнаружено, что толщина верхней коры лишайников, взятых с различных субстратов, статистически достоверно не отличается (рис. 2в).

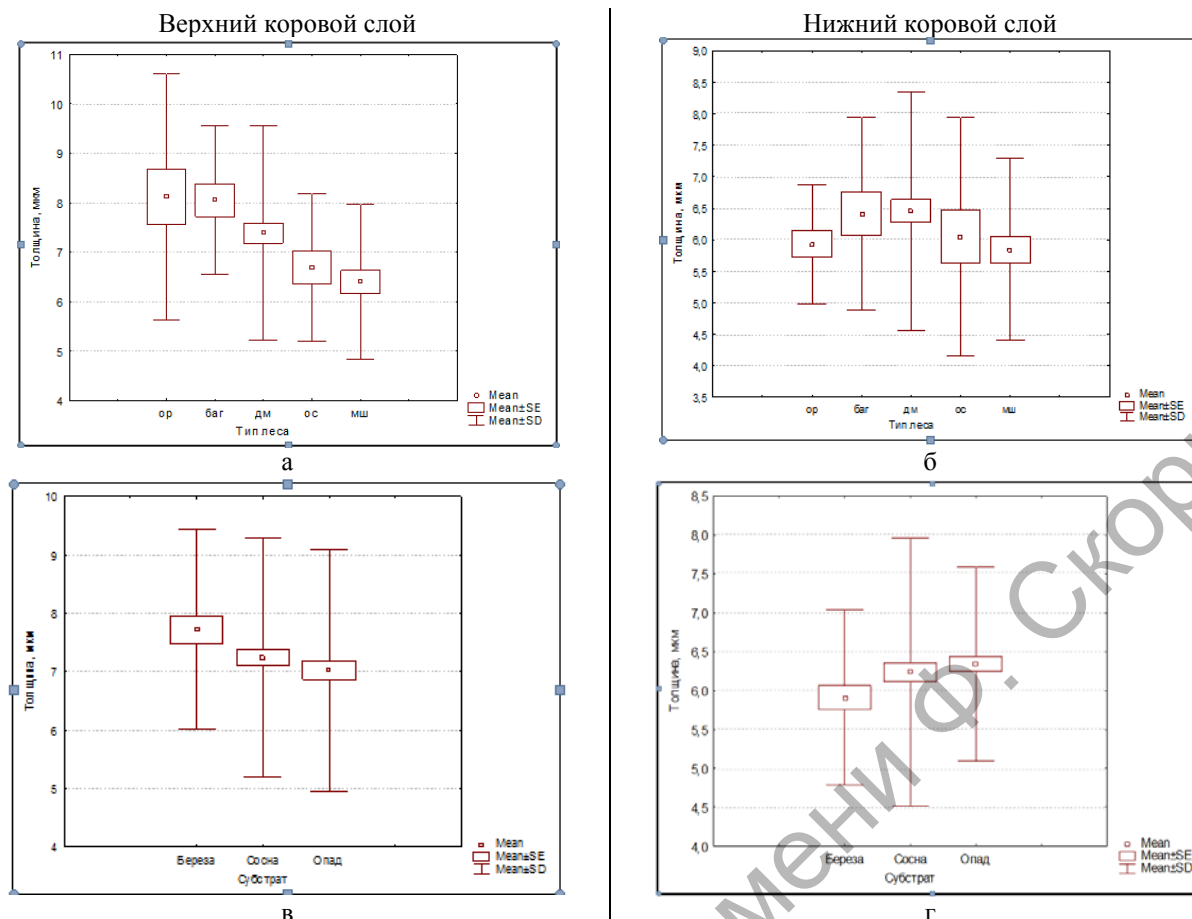


Рисунок 2 – Толщина верхнего и нижнего корового слоя слоевищ лишайника *Hypogymnia physodes*

Толщина нижнего корового слоя лишайника *Hypogymnia physodes*, произрастающего в различных типах сосновых лесов статистически не отличается и варьирует в пределах 5,84–6,45 мкм (рис. 2б). По-видимому, развитие нижнего корового слоя гипогимнии вздутой, не освещаемого солнцем, не зависит от структуры древостоя. Толщина нижней коры слоевищ, произрастающих на различных субстратах также статистически не отличается (рис. 2г). Наличие полостей в слоевищах лишайника, размер которых зависит от содержания воды в тканях, не позволяет оценить относительные значения изучаемых параметров.

На долю фикобионта, представленного коккоидной зелёной водорослью рода *Trebouxia* Ruem., приходится до 10% массы лишайника. Клетки *Trebouxia* в талломе лишайника округлые, овальные или неправильно-округлые. Большая часть объёма клетки занята крупным асимметричным центральным хлоропластом лопастной формы, в углублении которого расположено довольно крупное ядро [10].

Нами обнаружено, что диаметр клеток водорослей лишайника *Hypogymnia physodes* изменяется в зависимости от произрастания талломов в различных типах сосняков (рис. 3).

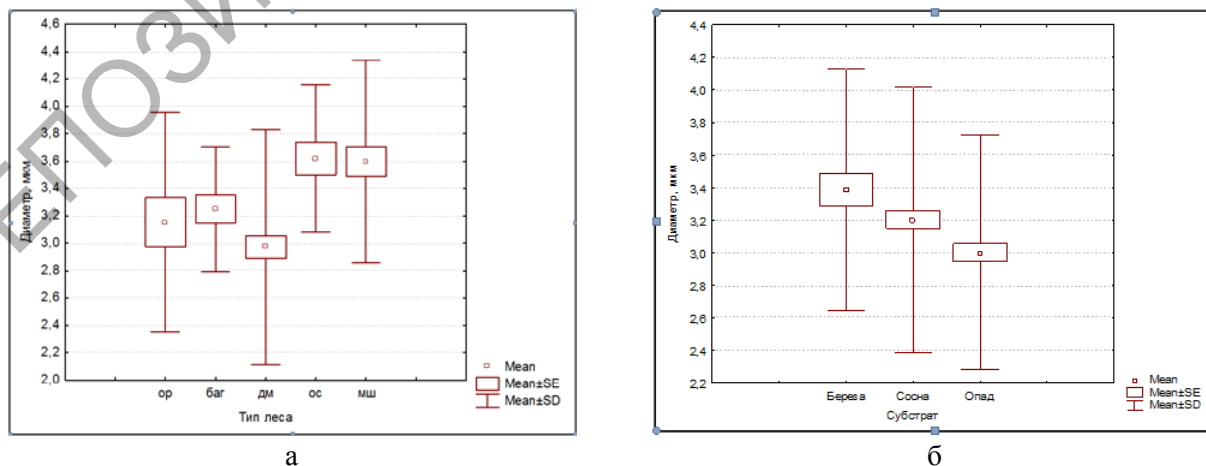


Рисунок 3 – Диаметр клеток фикобионта слоевищ лишайника *Hypogymnia physodes*

В орляковом, багульниковом и долгомошном сосняках диаметр клеток *Trebouxia* составляет 2,97–3,25 мкм. Статистически установлено, что в сосняках осоковом и мшистом диаметр клеток водорослей в слоевищах исследуемых образцов больше, чем в остальных типах сосновых лесов, и варьирует в пределах 3,60–3,62 мкм. В ходе исследования было выявлено, что размеры клеток водорослей *Trebouxia* в пробах лишайника, взятых с различных субстратов, статистически достоверно не отличаются.

Была отмечена тенденция уменьшения диаметра гиф микобионта у талломоов, произрастающих в различных типах сосновых лесов. В частности, наибольший диаметр гиф отмечен у лишайников, произрастающих в сосняках багульниковом и долгомошном (1,08–1,12 мкм), наименьший – в сосняке мшистом (0,97 мкм). Гифы лишайников, произрастающих в сосняках орляковом и осоковом, имеют толщину 1,00 мкм, и статистически не отличаются от таковых слоевищ, собранных в других типах лесорастительных условий. При измерении диаметра гифы гриба было установлено, что диаметр гиф в эпиксильных образцах лишайника (1,12 мкм) достоверно больше, чем в лишайниках, произрастающих эпифитно. Достоверной разницы в диаметре гиф слоевищ, произрастающих на коре березы и сосны, найдено не было.

По-видимому, описанные отличия анатомической структуры слоевища имеют адаптивный характер, и зависят от биологических особенностей вида.

### Выводы

Предложена авторская модификация методики изготовления анатомических срезов лишайника *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. Для средневозрастных и приспевающих сосняков мшистых, орляковых, долгомошных, багульниковых и осоковых Гомельского региона, стволов сосен, берез и опада, оценены размеры анатомических структур распространенного вида лишайников – гипогимнии вздутой: толщина верхнего и нижнего корового слоя, диаметр клеток фикобионта и толщина гиф микобионта.

Показано, что в сосняках орляковом, багульниковом и долгомошном верхний коровый слой *Hypogymnia physodes* достоверно толще, чем в сосняках осоковом и мшистом – 7,38–8,12 мкм и 6,40–6,70 мкм соответственно. Толщина нижнего корового слоя лишайника, произрастающего в различных типах сосновых лесов, статистически не отличается, и составляет 5,84–6,45 мкм. Толщина верхнего и нижнего коровых слоев гипогимнии вздутой, собранной на стволах сосен, берез и опаде достоверно не отличается.

Диаметр клеток фикобионта (*Trebouxia* Ruem.) достоверно больше в слоевищах гипогимнии вздутой, произрастающей в сосняках осоковом и мшистом (3,60–3,62 мкм) в отличие от образцов из орлякового, багульникового и долгомошного типов леса (2,97–3,25 мкм). Размеры клеток *Trebouxia* в пробах лишайника, взятых с различных субстратов, статистически достоверно не отличаются.

Отмечена тенденция уменьшения диаметра гиф микобионта у талломоов, произрастающих в различных типах сосновых лесов. Наибольший диаметр гиф отмечен у лишайников, произрастающих в сосняках багульниковом и долгомошном (1,08–1,12 мкм, наименьший – в сосняке мшистом (0,97 мкм). Гифы лишайников, произрастающих в сосняках орляковом и осоковом, имеют толщину 1,00 мкм, и статистически не отличаются от таковых для слоевищ, собранных в других типах леса.

Установлено, что диаметр гиф микобионта в эпиксильных образцах лишайника (1,12 мкм) достоверно больше, чем в лишайниках, произрастающих эпифитно. Достоверной разницы в диаметре гиф слоевищ, произрастающих на коре березы и сосны найдено не было.

### Список литературы

1. Малышева, Н. В. Об экологической патоморфологии лишайников в окрестностях Санкт-Петербурга / Н. В. Малышева // Новости сист. низш. раст. – 1995. – Т. 30. – С. 78 – 85.
2. Отнюкова, Т. Н. Диагностика загрязнения атмосферы по состоянию ягельного лишайника / Т. Н. Отнюкова // Докл. Рос. акад. с.-х. наук. – 1997. – № 3. – С. 21 – 22.
3. Малышева, Н. В. Лишайники научного городка Пулковской обсерватории (Санкт-Петербург) / Н. В. Малышева // Новости сист. низш. раст. – 2002. – Т. 36. – С. 161–168.
4. Отнюкова, Т. Н. Морфологическое состояние *Cladina stellaris* (Cladoniaceae, Lichenes) как показатель атмосферного загрязнения / Т. Н. Отнюкова // Ботан. ж. – 1997. – Т. 82, № 3. – С. 57 – 66.
5. Scott, M. C. Morphological and chemical studies of epiphytic lichens from high elevation cloud forests as indicators of atmospheric pollution / M.C. Scott, T.C. Hutchinson // Amer. J. Bot. – 1989. – Vol. 76, № 6. – P. 13 – 14.
6. Holopainen, T. Alterations in the ultrastructure of epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Alectoria capillaris* caused by air pollution / T. Holopainen // Silva fenn. – 1981. – Vol.15, № 4. – P. 469 – 474.

7. Плакунова, О. В. Ультраструктура компонентов лишайника *Cladina stellaris* в норме и патологии при загрязнении окружающей среды SO<sub>2</sub> / О. В. Плакунова, В. Г. Плакунова // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1987. – № 3. – С. 361 – 369.
8. Holopainen, T. Injuries to lichen ultrastructure caused by sulphur dioxide fumigations / T. Holopainen, L. Kärenlampi // *New Phytol.* – 1984. – Vol. 98, № 2. – P. 285 – 294.
9. Holopainen, T. Types and distribution of ultrastructural symptoms in epiphytic lichens in several urban and industrial environments in Finland / T. Holopainen // *Ann. bot. fenn.* – 1984. – Vol. 21, № 3. – P. 213 – 229.
10. Войцехович, А. А. Фотобионты лишайников. 1: разнообразие, экологические особенности, взаимоотношения и пути совместной эволюции с микобионтом / А. А. Войцехович, Т. И. Михайлюк, Т. М. Дариенко // *Альгология.* – 2011. – Т. 21, № 1. – С. 3 – 26.
11. Войцехович, А. А. Фотобионты лишайников. 2: Происхождение и корреляция с микобионтом / А. А. Войцехович, Т. И. Михайлюк, Т. М. Дариенко // *Альгология.* – 2011. – Т. 21, № 2. – С. 151 – 177.
12. Окснер, А. Н. Определитель лишайников СССР. Вып. 2. Морфология, систематика и географическое распространение / А. Н. Окснер. – Ленинград: Наука, 1974. – 287 с.
13. Голубкова, Н. С. Определитель лишайников средней полосы Европейской части СССР: / Н. С. Голубкова. – Москва; Ленинград: Наука, 1966. – 255 с.
14. Горбач, Н. В. Определитель листоватых и кустистых лишайников БССР / Н. В. Горбач. – Минск: Наука и техника, 1965. – 180 с.
15. Фурст, Г. Г. Метода анатомо-гистохимического исследования растений / Г. Г. Фурст. – М.: Наука, 1979. – 155 с.

**V. M. Khramchankova, A. H. Tsurykau**

### **METHODICAL APPROACHES TO THE STUDY OF THE LICHEN *HYPOGYMNA PHYSODES* (L.) NYL. ANATOMICAL STRUCTURES**

*The author's modification of anatomical slices preparation technique is presented for lichen *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. thalli. Upper and lower cortical layers, photobiont and mycobiont cell diameters were measured for lichen samples collected on pines, birches and litter in middle-aged and maturing pine forests in Gomel region. We stated upper cortex of lichen thalli growing in *Pteridium*, *Polytrichum* and *Ledum* types of pine stands to be significantly thicker than this from *Pleurozium* and *Carex* types of pine forests – 7.38–8.12 μm and 6.40–6.70 μm, respectively. No differences were found for lower cortex of *Hypogymnia physodes* growing in different types of pinewoods (5.84–6.45 μm) as well as for upper and lower cortical layers in thalli collected from different substrata. The size of *Trebouxia* cells in the thalli from *Pleurozium* and *Carex* types of pine forests was larger than this in the other studied pine plots – 3.60–3.62 μm and 2.97–3.25 μm, respectively. In contrast, no differences were found for *Trebouxia* cell size in lichens growing on different substrata. The diameter of the mycobiont hyphae in lignicolous lichen samples was larger than this in corticolous ones.*