

УДК 582.29:581.143.4

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ЛИШАЙНИКОВ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

А.В. Пчелкин, Т.А. Пчелкина

Литературные данные и результаты экспериментов показали, что хранение лишайников после нескольких лет при температуре от +20 до +25°C не обеспечивает их успешную трансплантацию. Хранение лишайников при температуре от –18 до –24°C сохраняет их витальность и обеспечивает успешную трансплантацию. Приведена методика сбора лишайников для криобанка. Даны сравнительные результаты трансплантации лишайников различных экологических групп и различных условий хранения. Приведена формула для оценки длительности хранения в криобанке.

Ключевые слова: лишайники, криоконсервация, трансплантация, криобанк, реинтродукция.

В лихенологии издавна используются трансплантационные методы. Первыми, вероятно, можно считать трансплантационные исследования с лишайниками, проведенные в Мюнхене (Arnold, 1892), вскоре после трансплантации лишайники погибли. В 1959 г. эпигейные лишайники из Хибинских гор (*Flavocetraria cucullata*, *Cladonia amaurocraea*, *Cl. estocyna*, *Thamnolia vermicularis*, *Nephroma arcticum*) были посажены в Ботаническом саду Тартуского университета (Трасс, 1985), лишайники также погибли. Трансплантационные эксперименты с переносом лишайников (в основном эпифитных, реже эпигейных) в загрязненные районы проведены рядом исследователей (Бязров, 2009; Brodo, 1961, 1967; LeBlanc, Rao, 1966, 1973, 1975; Ikonen, Karenlampi, 1976; Hornvedt, 1976; LeBlank et al., 1976; Steinnes, Krog, 1977; Farmer et al., 1992). Весьма подробный обзор трансплантационных методов приводит Л.Г. Бязров (2002). Известны удачные эксперименты с трансплантацией талломов широколистоватого эпифитного лишайника *Lobaria pulmonaria* (Истомина, 2006; Denison, 1988) и органов вегетативного размножения этого вида (Scheidegger, 1992, 1995). Сюда же относится и реинтродукция, которую можно рассматривать как пример трансплантационных методов. Во всех этих экспериментах важнейшее значение приобретает качество трансплантируемого материала.

Биологические объекты способны столь длительно сохранять жизнеспособность после многолетнего хранения в условиях вечной мерзлоты, что они после оттаивания способны воздействовать на современное биоразнообразие (Губин и др., 2003). Поэтому криоконсервация, как способ длительного хранения биологического материала при низкой температуре,

широко используется в мире, особенно для образцов животного происхождения при сохранении генофонда (Багиров и др., 2009; Насибов и др., 2010; Егоров, 2007). С успехом криоконсервацию применяют и для хранения семян растений (Викторов, 2009; Кокшеева, Нестерова, 2011; Воронкова, Холина, 2008, 2010, 2011; Орехова, 2010), грибов (Иванушкина и др., 2010; Шарова, Каменькова, 2012), бактерий (Грачева и др., 2011; Короткая и др., 2010), водорослей (Калинина, 1987). Отмечено, что для некоторых видов растений после криоконсервации увеличивается процент всхожести семян (Воронкова, Холина, 2011), а для микромицета *Aspergillus niger* установлено положительное влияние низкой температуры в процессе хранения на биосинтетическую способность конидий (Шарова, Каменькова, 2012). Другой способ сохранения микроорганизмов – лиофилизация (Охапкина, 2009). Иногда для консервации используют сочетание этих способов (Hamilton, Ashmore, 2008). Лишайники всей своей физиологией приспособлены к длительному существованию при отрицательных температурах и периодическому высушиванию (Kershaw, 1985), причем уменьшение содержания воды в талломах закономерно сопровождается снижением интенсивности дыхания (Вайнштейн, 1972). Поэтому заманчиво использовать для длительного хранения способность лишайников впадать в анабиотическое состояние при низкой температуре без использования криопротекторов, несмотря на то, что дыхание лишайников сохраняется и при отрицательной температуре (Kallio, Heinonnen, 1971). Эксперименты показывают, что длительное хранение лишайников при отрицательной температуре незначительно снижает их жизнеспособность. Так, хранение воздушно-сухих образцов

Alectoria ochroleuca в течение 3,5 лет при температуре -60°C лишь незначительно снижает их физиологические процессы (Larson, 1978). Наиболее интересны эксперименты немецкого лишайнолога Р. Хонеггера (Honegger, 2003), который отметил деструкцию фото- и микобионтов лишайников после трех лет хранения при комнатной температуре и сохранение витальности после 13 лет хранения при температуре -20°C , причем фрагменты таллома *Xanthoria parietina* нормально росли после недельного хранения в жидком азоте. Р. Хонеггер отмечал также безопасное для витальности лишайников перемещение образцов из минусовой (-20°C) температуры в комнатную и обратно.

Материалы и методы

Для проверки сохранности лишайников при разных условиях хранения использованы виды разных экологических групп: эпигейные, эпифитные, а также один эпилитный вид (всего 20 видов, 2397 образцов). Наибольшим числом образцов представлены массовые виды. Эксперимент охватывал период с 1988 по 2008 г. (таблица).

Степень сохранности лишайников проверяли экспериментами по их трансплантации в экологически чистом районе Калужской обл. (большинство образцов трансплантировали в 2001, 2003, 2005 и 2008 гг.). Использовали экспедиционные сборы 2003 и 2001 гг. (Керженский, Печоро-Ильчский и Волжско-Камский заповедники), образцы лишайников, собранных в Норском заповеднике в 2005 г. (температура хранения от $+20^{\circ}\text{C}$ до $+25^{\circ}\text{C}$), а также образцы после 2, 3, 4 и 7 лет хранения в криобанке (температура хранения образцов от -18°C до -24°C). Основы этого метода заложены в 2001 г. в Институте глобального климата и экологии Росгидромета и РАН (Пчелкин, 2009). Некоторые образцы трансплантировали в год сбора. Часть образцов лишайников хранили в условиях чередования светового и темного режимов (цикл день-ночь, температура хранения от $+20$ до $+25^{\circ}\text{C}$). Эпифитные виды (вместе с субстратом) прикрепляли с помощью деревянных фиксаторов к коре березы (наклон ~ 45 град., ориентация на север), некоторые образцы, собранные без субстрата, фиксировали сеткой из бесцветного полиэтилена. Кустистые виды (*Alectoria sarmentosa*, *Bryoria fuscescens*, *Usnea filipendula*) прикрепляли к ветвям засыхающей сливы, что обеспечивало их свободное повисание и максимальное увлажнение во время дождя. Трансплантацию эпигейных видов осуществляли на насыпном песчаном холме, а также в полосе отчуждения ЛЭП на участке с подростом из сосен, с минимальным травяным покровом. Лишайники из экспедиционных сборов хранили в бу-

мажных пакетах, обезвоживание проводили воздушной сушкой. Лишайники для криобанка подвергали воздушной сушке в полевых условиях при обычной температуре окружающей среды (от $+10$ до $+15^{\circ}\text{C}$) с помощью устройства, представляющего собой два гибких металлических обруча с натянутой сеткой из инертного материала. Лишайники помещали между обручами и фиксировали сетками. Такая конструкция, подвешиваемая к дереву, позволяла эффективно высушивать лишайники на воздухе, при сильном ветре лишайники не разлетались, а при необходимости (если начинался дождь) обручи с лишайниками можно было быстро перенести в сухое место. В отличие от подготовки обычных гербарных образцов, повышение температуры сушки для размещения лишайников в криобанке недопустимо, так как наши эксперименты с лишайниками (эпилитный вид *Arctoparmelia centrifuga*), высушенными при температуре от $+70$ до $+80^{\circ}\text{C}$ (для предотвращения повреждения грибами и членистоногими) показали их низкую дальнейшую сохранность. В таблице представлены результаты трансплантации лишайников, собранных в Приокско-террасном заповеднике, в городские условия (г. Москва, Нагатинский Затон). В таблице указан процент приживаемости образцов после трансплантации. Часть трансплантируемых образцов терялась в процессе эксперимента (при повреждении птицами, искавшими пищу под зафиксированными лишайниками, повреждении градом или сильным ветром) – такие образцы исключены из расчета процента приживаемости. Часть образцов эпигейных лишайников *Cetraria islandica* и *Cladonia arbuscula*, высушенных при температуре от $+70$ до $+80^{\circ}\text{C}$, не включены в исходную таблицу, так как они погибли уже через месяц после трансплантации. В таблицу также не включены образцы *Cetraria islandica* со сроком хранения 3 года, так как пробная площадка, на которой были трансплантированы эти образцы, была уничтожена при распашке земли.

Ориентировочная формула для расчета сроков хранения лишайников в криобанке следующая:

$$C_k = V \cdot C \cdot R^{(T_1 - T_2)/10},$$

где C_k – срок хранения лишайников в криобанке; V – индекс витальности со значениями от 0 (полностью погибший образец) до 1 (полностью здоровый образец, без некрозов и повреждений), с промежуточными значениями 0,1; C – срок хранения лишайников вне криобанка при температуре T_1 ; T_2 – температура в криобанке; R – видоспецифический коэффициент. Важными факторами для сохранности лишайников в

Результаты трансплантации лишайников

Вид лишайника, год сбора (число образцов)	Год трансплантации, процент приживаемости					
	1988	1998	2001	2003	2005	2008
<i>Alectoria sarmentosa</i> , 2001, N, (22)	–	–	81	–	0	–
* <i>Anaptychia ciliaris</i> 1985, N, (26)	0	–	–	–	–	–
* <i>Anaptychia ciliaris</i> 1992, N, (27)	–	0	–	–	–	–
<i>Arctoparmelia centrifuga</i> , 2005, N, (9)	–	–	–	–	0	–
<i>Bryoria fuscescens</i> , 2005, N, (50)	–	–	–	–	96	0
<i>Bryoria fuscescens</i> , 2005, C, (50)	–	–	–	–	–	98
<i>Bryoria implexa</i> , 1998, N, (16)	–	–	–	–	0	–
<i>Cetraria islandica</i> , 2001, C, (150)	–	–	–	96	100	100
<i>Cetraria islandica</i> , 2001, N, (150)	–	–	100	8	0	0
<i>Cetraria islandica</i> , 2001, N, d/n (100)	–	–	–	–	0	0
<i>Cladonia arbuscula</i> , 2001, C, (150)	–	–	–	100	96	100
<i>Cladonia arbuscula</i> , 2001, N, (100)	–	–	100	2	0	0
<i>Cladonia stellaris</i> , 2001, C, (150)	–	–	–	100	96	98
<i>Cladonia stellaris</i> , 2001, N, (100)	–	–	94	0	0	0
<i>Cladonia stellaris</i> , 2001, N, d/n (28)	–	–	–	0	–	–
<i>Evernia prunastri</i> , 2001, N, (34)	–	–	100	12	–	0
<i>Evernia prunastri</i> , 2001, C, (62)	–	–	–	97	–	98
<i>Evernia mesomorpha</i> , 2003, N, (43)	–	–	–	95	0	–
<i>Evernia mesomorpha</i> , 2003, C, (62)	–	–	–	–	94	96
<i>Flavoparmelia caperata</i> , 2005, N, (38)	–	–	–	–	95	0
<i>Flavoparmelia caperata</i> , 2005, C, (21)	–	–	–	–	–	100
<i>Hypogymnia physodes</i> , 2001, N, (140)	–	–	100	40	0	0
<i>Hypogymnia physodes</i> , 2001, C, (120)	–	–	–	98	100	100
<i>Hypotrachyna pseudosinuosa</i> , 2005, C, (6)	–	–	–	–	–	100
* <i>Parmelia sulcata</i> , 1985, N, (16)	0	–	–	–	–	–
<i>Parmelia sulcata</i> , 2001, N, (129)	–	–	100	35	6	0
<i>Parmelia sulcata</i> , 2001, C, (108)	–	–	–	100	93	96
<i>Parmelia submontana</i> , 1986, N, (6)	–	0	–	–	–	–
* <i>Phaeophyscia orbicularis</i> , 1985, N, (24)	25	–	–	–	–	–
<i>Phaeophyscia orbicularis</i> , 2001, N, (136)	–	–	100	61	28	0
<i>Phaeophyscia orbicularis</i> , 2001, C, (123)	–	–	–	100	98	100
<i>Stereocaulon paschale</i> , 2005, N, (26)	–	–	–	–	86	0
<i>Stereocaulon paschale</i> , 2005, C, (26)	–	–	–	–	92	100
<i>Stereocaulon tomentosum</i> , 2005, N, (31)	–	–	–	–	87	0
<i>Stereocaulon tomentosum</i> , 2005, C, (28)	–	–	–	–	93	93
* <i>Usnea hirta</i> , 1985, N, (6)	0	–	–	–	–	–
<i>Usnea hirta</i> , 2005, N, (18)	–	–	–	–	100	0
<i>Usnea hirta</i> , 2005, C, (16)	–	–	–	–	100	100
<i>Usnea filipendula</i> , 2005, N, (24)	–	–	–	–	67	0
<i>Usnea filipendula</i> , 2005, C, (25)	–	–	–	–	61	66

О б о з н а ч е н и я. C – хранение в криобанке; N – температура хранения от +20 до +25°C; d/n – хранение при температуре от +20 до +25°C с чередованием режима день/ночь; * – трансплантация в условиях мегаполиса; в скобках указано число трансплантированных образцов.

условиях пониженной температуры являются видоспецифический коэффициент и индекс витальности, что обеспечивает необходимость закладки полностью здоровых образцов для хранения в криобанке. Чем больше индекс витальности и видоспецифический коэффициент, тем дольше возможный срок хранения лишайников.

Результаты и обсуждение

Трансплантация считалась успешной, если витальность образцов сохранялась неизменной по истечении года. В таблице приведены результаты трансплантации лишайников в Тарусском р-не Калужской обл. после хранения в обычных условиях и условиях криобанка, а кроме того, результаты трансплантации образцов эпифитных лишайников в урбанизированном районе (Москва). В таблице значения приживаемости (%) округлены до целых значений.

Из таблицы видно, что хранение при пониженной температуре способствует сохранению витальности собранных лишайников разных видов и экологических групп. Так, по расчетам сборов 2001 г., процент приживаемости лишайников (среднее по всем изученным видам) в криптобиозе и при комнатной температуре составил соответственно 99,7 и 22,6% для 2 лет хранения, 97,2 и 5,6% для 4 лет хранения, 98,8 и 0% для 7 лет хранения. Трансплантация свежесобранного материала (в год сбора образцов), как правило, проходила успешно – средняя по всем изученным видам приживаемость составила 96,8% по расчетам сборов 2001 г. Некоторое исключение составил эпифитный вид *Usnea filipendula*, образцы которого частично некротизировались при трансплантации даже после хранения в криобанке. Возможно, это было связано с тем, что климатические условия Калужской обл. не в полной мере соответствовали экологическим требованиям образцов из Норского заповедника (Амурская обл.). Некоторые лишайники показали устойчивость хранения и при комнатной температуре. Так, при температуре от +20 до +25°C сохранили витальность часть образцов *Hypogymnia physodes* (после 2 лет хранения приживаемость составила 40%) и *Phaeophyscia orbicularis* (после 2 и 4 лет хранения приживаемость составила 61 и 28% соответственно). Наши предыдущие эксперименты по трансплантации лишайников после нескольких лет хранения в обычных условиях (*Parmelia submontana* из Крыма, различные эпифитные виды из Приокско-террасного заповедника) закончились гибелью лишайников, что, возможно, и было связано с условиями хранения.

Антропогенное воздействие на лишенобиоту может приводить к полному исчезновению локальных

популяций лишайников. Мероприятия по реинтродукции позволяют в таких случаях восстановить или сохранить лишенобиоту. Восстановление ряда видов в Москве в подходящих биотопах вполне возможно. Однако реинтродукция на урбанизированных и антропогенно-нарушенных территориях имеет свои особенности. Распространение лишенобиоты зависит от нескольких факторов, каждый из которых в отдельности является лимитирующим. Один из основных – общий фоновый уровень загрязнения воздуха, что очень важно для многих видов, наиболее чувствительных к поллютантам. Другим немаловажным фактором является биотопический, включающий субстратный и микроклиматический. Еще один важный фактор – отсутствие в подходящих биотопах аскоспор, соредий или изидий. Это означает, что даже после улучшения экологической ситуации, при уровне загрязнения, не препятствующем развитию лишайников, и благоприятных биотопических условиях, виды все равно могут отсутствовать. Именно в таких случаях возможна их успешная реинтродукция. При реинтродукции лишенобиоты в условиях многофакторности лимитирующих агентов важнейшее значение приобретает жизнеспособность трансплантируемого материала. В основе криолихенологии лежат физиологическая способность лишайников впадать в анабиотическое состояние при высыхании и общий физико-химический закон уменьшения скорости химических реакций при понижении температуры. В данном случае криолихенология – раздел лишенологии, предметом изучения которого являются метаболические процессы в лишайниках при минусовой температуре, методы криоконсервации, хранения и использования криоматериала из криобанка лишайников. Нередко лимитирующим фактором являются пожары, во время которых практически полностью уничтожается эпигейная лишенобиота. Примером может служить ситуация с *Cetraria islandica* в Норском заповеднике. Эпигейные и эпилитные виды лишайников в этом заповеднике приурочены в основном к сопкам, отстоящим друг от друга на расстоянии от нескольких до десятков километров и образующим своеобразную «островную систему». Для восстановления *Cetraria islandica* в 2010 г. в охранной зоне Норского заповедника (Мальцевская сопка) были заложены три реинтродукционные площадки с использованием материала из криобанка лишенобиоты грибов (Пчелкина и др., 2013), а также одна площадка на песчаной косе на территории заповедника.

Время сохранения жизнеспособности лишайников при хранении в криобанке зависит от видовой при-