

ИНДУКЦИЯ САМ-ФОТОСИНТЕЗА У *Hylotelephium triphyllum* (Haw.) Holub (*Crassulaceae*) В УСЛОВИЯХ ЕВРОПЕЙСКОГО СЕВЕРО-ВОСТОКА РОССИИ

© 2021 г. Т. К. Головка^а, И. Г. Захожий^{а, *}, Г. Н. Табаленкова^а

^аИнститут биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

*e-mail: zakhzhij@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 24.03.2020 г.

После доработки 24.04.2020 г.

Принята к публикации 25.04.2020 г.

Исследовали сезонные и суточные изменения титруемой кислотности клеточного сока, содержание органических кислот и активность ФЕП-карбоксилазы в листьях очитника трехлистного (очитка пурпурного) *Hylotelephium triphyllum* (Haw.) Holub. В период генеративного развития растений кислотность клеточного сока возрастала в утренние часы с увеличением содержания малата, активность ФЕП-карбоксилазы повышалась в вечерние часы на фоне снижения его концентрации, что свидетельствует о переходе с C₃-фотосинтеза на САМ-тип. Интенсивность β-карбоксилирования фосфоенолпирувата была наиболее выражена в фазу массового цветения на фоне повышения температуры и снижения влагообеспеченности растений. Установлено, что САМ-фотосинтез не вносит существенного вклада в углеродный баланс и продуктивность растений, о чем свидетельствуют величины изотопной дискриминации ¹³C органического вещества листьев ($\delta^{13}C$ около -27‰) и других органов, близкие к изотопной сигнатуре C₃-видов. Функционирование САМ в период цветения – плодоношения способствует сохранению фотосинтетического аппарата и реализации репродуктивного потенциала растений *H. triphyllum*, обитающих на легко теряющих влагу песчано-супесчаных почвах в условиях гумидного климата таежной зоны европейского Северо-Востока.

Ключевые слова: *Hylotelephium triphyllum*, C₃-САМ переход, кислотность клеточного сока, малат, ФЕП-карбоксилаза, изотопное фракционирование углерода, онтогенез, условия среды

DOI: 10.31857/S0015330320060044

ВВЕДЕНИЕ

Метаболизм по типу толстянковых (*Crassulaceae* Acid Metabolism, САМ), или САМ-фотосинтез, осуществляют примерно 6% всех видов сосудистых растений [1]. Существует мнение, что появлению в эволюции растений с САМ-типом фотосинтеза способствовали аридизация климата и снижение содержания CO₂ в атмосфере [2, 3]. Особенностью САМ является то, что первичная фиксация углекислоты (в форме HCO₃⁻) происходит при участии ФЕП-карбоксилазы в цитоплазме клеток хлоренхимы ночью, когда устьица открыты. Акцептором CO₂ служит фосфоенолпируват (ФЕП), образующийся в процессе гликолитического распада запасных углеводов. Образовавшийся при фиксации CO₂ малат переносится в вакуоли. Днем при закрытых устьицах идет обратный транспорт малата в цитоплазму, где происходит

его декарбоксилирование. Реассимиляция CO₂ осуществляется в цикле Кальвина-Бенсона с участием РуБФ-карбоксилазы/оксигеназы (C₃-путь). Следовательно, в одной клетке функционируют две карбоксилазы. Хотя цена восстановления моля CO₂ при участии САМ выше, чем по C₃-пути, снижение транспирационных потерь на единицу ассимилированного углерода обеспечивает преимущество САМ-растений над C₃-растениями в сухих местообитаниях.

САМ-фотосинтез отличается высокой физиологической и метаболической пластичностью [4]. Экспрессия САМ зависит от генотипа, онтогенетических (фаза развития) и внешних факторов (влагообеспеченность, температурный режим, заселение, освещенность, фотопериод). Продолжительность малатного цикла, динамика пула углеводов и вклад ночной фиксации CO₂ в нетто-накопление углерода (прирост биомассы) могут существенно варьировать. Другими словами, диапазон САМ-растений довольно широкий: от видов, близких к C₃-растениям, до видов, облигатных САМ. Про-

Сокращения: ОСВ – относительное содержание воды; ТК – титруемая кислотность; $\delta^{13}C$ – отклонение соотношения изотопов углерода (¹³C/¹²C) образца от стандарта

межуточную позицию занимают факультативные САМ-виды, которые запускают САМ или выходят из него в зависимости от условий среды и/или стадии развития.

Hylotelephium triphyllum является одним из немногочисленных представителей сем. *Crassulaceae* (толстянковые) на Севере [5, стр. 22–28]. Виды данного семейства широко распространены по всему земному шару, однако большая их часть сосредоточена в аридных районах. Суккулентные черты и САМ-тип фотосинтеза отражают адаптацию этих растений к сухому и теплому климату.

Миграция толстянковых в северном направлении способствовала приобретению свойств гемикриптофитов и криптофитов (погружение почек возобновления в почву, сокращение онтогенеза, отмирание надземной части в период холодов и т.п.). Сохранив суккулентные черты, растения успешно осваивали местообитания с нестабильным водоснабжением.

Ранее нами было показано, что фотосинтетический аппарат толстянковых, обитающих в условиях холодного климата, хорошо адаптирован к низким положительным и умеренным температурам, что позволяет растениям обеспечить уровень метаболизма, необходимый для реализации жизненной стратегии на Севере [6].

Цель работы – изучение индукции и роли САМ у растений *Hylotelephium triphyllum*, произрастающих в природно-климатических условиях среднетаежной зоны европейского Северо-Востока России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Очитник трехлистный (*Hylotelephium triphyllum* (Naw.) Holub) – многолетнее поликарпическое травянистое растение до 50 см в высоту. Побеги монокарпические, моноциклические, чаще одиночные или по два-три, плотно облиственные, неразветвленные. Листорасположение очередное, супротивное, листья уплощенные продолговато-яйцевидной формы с толстой кутикулой. Соцветие многоцветковое, цветки малиновые, пурпуровые, многочисленные. Подземная часть состоит из клубневидно-утолщенных корней и небольшого корневища. Размножается генеративным (семенами) и вегетативным способом (частями стеблей и корневища). В генеративный период особи *H. triphyllum* вступают в возрасте 4–5 лет и старше. Продолжительность генеративного периода составляет 5–6 лет. Сформированные семена полноценные с высокой всхожестью. Корневище укороченное, расположено на небольшой глубине, от него отходят хорошо развитые клубневидно утолщенные придаточные корни веретеновидной формы. Данный вид обычен в лесной зоне, встречается на опушках, полянах,

среди кустарников по лугам. На территории Республики Коми обычными местонахождениями являются пойменные кустарники, склоны, освещенные смешанные леса, вырубki, бечевники. Встречается на террасах в пойме, надпойме и прирусловой части поймы. Произрастает на глинистой, песчаной и супесчаной почве, известняках, сланцевых обнажениях и скалах.

Полевые исследования проведены в подзоне средней тайги Республики Коми. Климат района умеренно континентальный, характеризуется сравнительно длинной холодной снежной зимой и умеренно теплым коротким летом. Средняя температура самого теплого месяца июля около +16°C, а самого холодного месяца января –16°C. Средняя суточная температура воздуха выше 10°C наблюдается 90 дней в году. Среднегодовое количество осадков составляет 700 мм, испарение с поверхности суши – 450 мм. Исследования проводили в течение вегетационного периода 2016 – 2019 гг. В работе использовали растения, обитающие на дерново-слоистой песчано-супесчаной хорошо дренируемой почве в заливаемой части пойменной террасы левого берега р. Вымь (62°16'19.4" N 50°39'29.1" E). Участок находится в окрестностях Ляльского лесобиологического стационара Института биологии Коми НЦ УрО РАН.

Сведения о температуре воздуха и количестве осадков были получены из открытых архивов сайта “Расписание Погоды” (<https://rp5.ru>) и Автоматизированной Информационной Системы Обработки Режимной Информации – АИСОРИ (<http://aisori.meteo.ru/ClimateR>). Использовали данные для метеостанции г. Сыктывкара (синоптический индекс 23805), удаленной от местообитания исследуемых растений на 68 км. Расчет суммы активных температур выше 15°C и суммы осадков осуществляли для 20-дневного периода, предшествующего дате отбора растительных образцов. Микроклиматические условия – освещенность, температуру воздуха и почвы в местообитании растений регистрировали с помощью портативной метеостанции LI-1400 (“LI-COR”, США) с набором метеорологических датчиков.

Погодные условия вегетационного периода 2016 г. характеризовались повышенной по отношению к среднемуголетнему показателю температурой воздуха и близкому к норме количеству осадков с мая по июль (табл. 1). Вегетационные периоды 2017 и 2019 гг. были сравнительно прохладными с обильными осадками. Близкая к климатической норме погода наблюдалась в 2018 г.

Зрелые листья отбирали с верхней трети побегов 20–30 типичных растений в разное время суток в период вегетативного роста (май – июнь), бутонизации – цветения (июнь – июль) и плодоношения (август). Часть свежесобранных листьев использовали для определения содержания сухо-

Таблица 1. Погодные условия вегетационного периода в годы проведения исследований (по данным для метеостанции г. Сыктывкара, синоптический индекс 23805)

Годы	Среднемесячная температура (°С) / Сумма осадков (мм)			
	май	июнь	июль	август
2016	11.5/35	14.6/51	19.9/70	18.1/171
2017	5/54	12.4/98	18.3/79	16/83
2018	8.1/77	13.5/76	19.4/87	14.5/52
2019	10.9/84	13.6/90	15.3/134	11.3/111
Среднемноголетние показатели	8.5/41	14.3/59	17.5/73	14.2/59

го вещества и показателей водного обмена. Для насыщения водой листья размещали на фильтровальной бумаге в чашках Петри, заливали дистиллированной водой и выдерживали в закрытых чашках в течение 12 ч. Длительность экспозиции определяли в предварительном опыте. Относительное содержание воды (ОСВ) в листьях рассчитывали по формуле:

$$\text{ОСВ} = [(m_{\text{сыр}} - m_{\text{сух}}) / (m_{\text{нас}} - m_{\text{сух}})] \times 100\%,$$

где $m_{\text{сыр}}$ и $m_{\text{сух}}$ – масса свежесобранного и масса высушенного при 105°C образцов листьев, $m_{\text{нас}}$ – масса образца листьев после 12-часового насыщения водой.

Дневной водный дефицит (ВД) находили по формуле:

$$\text{ВД} = [(m_{\text{нас}} - m_{\text{сыр}}) / (m_{\text{нас}} - m_{\text{сух}})] \times 100\%.$$

Для определения титруемой кислотности зафиксированные в жидком азоте образцы листьев (1.5 г) гомогенизировали в 10 мл дистиллированной воды, полученный экстракт центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g и отбирали надосадочную жидкость. Общую кислотность супернатанта определяли методом потенциометрического титрования раствором гидроксида натрия (NaOH), используя рН-метр Hanna HI 8519 (“Hanna Instruments”, США). Суммарное содержание органических кислот в листьях выражали в экв. [H⁺]/г сырой массы.

Для анализа углеводов и органических кислот зафиксированный в жидком азоте растительный материал подвергали лиофильной сушке. Определение содержания водорастворимых низкомолекулярных углеводов выполняли спектрофотометрическим методом по колориметрированию избытка щелочного раствора гексацианоферрата (III) калия (K₃[Fe(CN)₆]) после реакции с редуцирующими сахарами [7]. Здесь и далее при выполнении спектрофотометрических измерений применяли двулучевой спектрофотометр Shimadzu UV-1700 (“Shimadzu”, Япония).

Для определения содержания и состава свободных органических кислот и моносахаридов навеску (100 мг) образца лиофильно высушенных

листьев дважды экстрагировали свежими порциями (по 10 мл) дистиллированной воды при температуре 40°C. Полученный экстракт высушивали под вакуумом и подвергали силированию смесью, состоящей из N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида (BSTFA) и триметилхлорсилана (TMCS) в пиридине в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (<https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4800/4747.pdf>). Идентификацию триметилсилильных производных органических кислот и моносахаридов осуществляли на основании сопоставления масс-спектров и индексов удерживания стандартов и компонентов анализируемых растворов после проведения ГЖХ анализа на хромато-масс-спектрометре TRACE DSQ (“Thermo Fisher Scientific”, США). Количественное определение целевых компонентов проводили с помощью метода ГЖХ с пламенно-ионизационным детектированием на приборе Кристалл 200М (“Хроматэк”, Россия). В качестве внутреннего стандарта использовали гексадекан (C₁₆H₃₄).

Определение активности ФЕП-карбоксилазы в растительном материале проводили по методике, описанной в статье [8] с незначительными модификациями. В работе использовали коммерческие реактивы производства “Sigma-Aldrich” (Германия). Зафиксированные в жидком азоте образцы листьев (500 мг) гомогенизировали в 5 мл 50 ммоль Tris HCl буфера (pH 8.2), содержащем 1 ммоль ЭДТА, 5 ммоль сульфата магния (MgSO₄), 2 ммоль ДТТ, 1% Тритона X-100, 20% глицерина, 50 мг поливинилпирролидона (ПВП) и 20 мкл смеси ингибиторов протеаз (Protease Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts, DMSO solution). Гомогенат центрифугировали 10 мин при 12 000 g и отделяли от осадка. Процедуру выделения проводили при 4°C. Активность ФЕП-карбоксилазы в полученном экстракте определяли спектрофотометрически, оценивая изменение оптической плотности при 340 нм в реакции окисления НАД·Н в присутствии малатдегидрогеназы (МДГ). Для чего к реакционной среде – 50 ммоль Tris HCl буфер (pH 8.2) (2.95 мл), содержащий 10 Ед МДГ, 0.2 ммоль НАД·Н, 5 ммоль сульфата магния (MgSO₄)

Таблица 2. Относительное содержание воды (ОСВ) и дневной водный дефицит (ВД) в листьях *Hylotelephium triphyllum* в период вегетативного роста и начала плодоношения

Дата	ОСВ, %	ВД, %	Доля сухого вещества, %
25–26.05.2016	91.4 ± 5.8	7.6 ± 0.4	7.6 ± 0.7
25–26.07.2016	74.7 ± 4.6	24.3 ± .5	7.4 ± 0.7

Примечание. Долю сухого вещества в листьях выражали в % от сырой массы свежесобранных образцов.

и 5 ммоль гидрокарбоната натрия (NaHCO_3) добавляли аликвоту (50 мкл) экстракта ФЭП-карбоксилазы. Реакцию окисления НАД·Н инициировали путем добавления раствора ФЕП, конечная концентрация которого в реакционной среде составляла 2 ммоль. Скорость окисления НАД·Н измеряли в течение 3 мин после добавления ФЕП. Активность ФЕП- карбоксилазы определяли при 25°C и выражали в расчете на хлорофилл. Содержание хлорофиллов определяли в ацетоновых экстрактах растительного материала спектрофотометрически [9].

Изотопный состав углерода (соотношение изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) в растительных образцах исследовали на базе ЦКП “Геонаука” Института геологии Коми НЦ УрО РАН. Измерения проводились методом проточной масс-спектрометрии на аналитическом комплексе, включающем элементный анализатор Flash EA 1112 (“Thermo Fisher Scientific”, США) сопряженный с масс-спектрометром Delta V Advantage (“Thermo Fisher Scientific”, США). Отклонение изотопной сигнатуры $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ исследуемого образца от сигнатуры стандартного образца рассчитывали по формуле:

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left[\left(\frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{образца}}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{стандарта}}} \right) - 1 \right] \times 1000.$$

Результаты оценки $\delta^{13}\text{C}$ растительных образцов приведены в промилле относительно стандарта PDB (Pee Dee Belemnite).

Все анализы проводили в 3–5-кратной биологической повторности. Для сравнения средних величин применяли дисперсионный анализ ANOVA (критерий Дункана). Расчеты осуществляли при заданном уровне значимости $P \leq 0.05$. На рисунках и в таблицах представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Особенности роста и развития растений Hylotelephium triphyllum. Многолетние наблюдения показали, что отрастание побегов растений начинается в первой–второй декадах мая в зависимости

от продолжительности и силы весеннего половодья. Несмотря на высокую влагообеспеченность, сначала рост побегов замедленный, видимо из-за недостатка тепла и запаса углерода. По мере формирования листовой поверхности активность ростовых процессов возрастала. В период цветения высота растений составляла 35–45 см, сырая масса побега – около 30 г, а на долю листьев приходилось в среднем 30–35% массы побега. Линейный рост побега *H. triphyllum* детерминирован, появление новых метамеров прекращается с переходом растений к генеративному развитию.

Фаза цветения растений приурочена к самому теплomu месяцу вегетационного периода – июлю (табл. 1). При среднемесячной температуре воздуха около 18°C максимальные температуры воздуха над поверхностью почвы могут достигать 28–30°C. При ясном небе в полуденные часы на уровне растений нами были зарегистрированы температуры воздуха в пределах 30–35°C, а почвы на глубине 5 см – 27–30°C. Относительная влажность воздуха составляла 45–50%, а влажность почвы не превышала 20%.

Относительное содержание воды в функционально зрелых листьях в фазу вегетативного роста составляло в среднем 90–92% (табл. 2). В период бутонизации – цветения величина ОСВ снижалась до 80–85%, в отдельных случаях – до 75% (табл. 2). Следует отметить, что отделенные листья хорошо удерживали воду, видимо вследствие накопления осмотически активных соединений, а также низкой устьичной и кутикулярной транспирации. В лабораторных условиях сырая масса листьев практически не менялась в течение суток и более (данные не приводятся).

Кислотность клеточного сока и содержание малата. Одним из основных индикаторов функционирования САМ-фотосинтеза служат циклические изменения кислотности клеточного сока листьев растений, связанные с суточной динамикой накопления и утилизации органических кислот. Исследования титруемой кислотности (ТК) клеточного сока листьев *H. triphyllum* в разные годы и периоды вегетации позволили выявить сезонные и суточные изменения величины этого показателя (рис. 1, табл. 3). Из представленных на рис. 1 данных видно, что уровень ТК значительно повышался во второй половине вегетации (июль–август). В этот период были отмечены и более значительные суточные изменения величины ТК. Так, в июле (фаза массового цветения) кислотность клеточного сока в ранние утренние часы достигала 96 мкмоль $[\text{H}^+]/\text{г}$ сырой массы, к полудню она снижалась в 5 раз, а к ночи вновь заметно возрастала до 27 мкмоль $[\text{H}^+]/\text{г}$ сырой массы. В конце мая (фаза вегетативного роста) величина ТК не превышала 6 мкмоль $[\text{H}^+]/\text{г}$ сырой массы и была стабильна в течение суток. Сходные законо-

мерности изменения кислотности клеточного сока в период генеративного развития растений были отмечены и в другие годы (табл. 3). При этом более выраженная динамика величины ТК была зарегистрирована в более теплом 2016 г., чем в 2018 г.

Суточные изменения кислотности клеточного сока в фазу цветения соответствовали динамике содержания малата (табл. 4). Максимальное накопление малата зарегистрировано в ранние утренние часы, в полуденное время его содержание было в 6.5 раз меньше. К ночи концентрация малата вновь повышалась, но не достигала величин, отмеченных в ранние утренние часы. Содержание других карбоновых кислот изменялось в той же манере, что и малата, однако их концентрация была существенно меньше. Следовательно, их вклад в кислотность клеточного сока листьев, по сравнению с малатом, незначительный.

Активность ФЕП-карбоксилазы. ФЕП-карбоксилаза является ключевым ферментом, осуществляющим первичную фиксацию углекислоты у растений с САМ и С4-типом фотосинтеза. Мы исследовали активность фермента в листьях *H. triphyllum* в фазу вегетативного роста (май) и в период цветения (июль) (рис. 2). Листья отрастающих побегов характеризовались низким и стабильным в течение суток уровнем активности ФЕП-карбоксилазы. В фазу цветения активность ФЕП-карбоксилазы была в 4–7 раз выше и изменялась в течение суток. В начале ночи уровень активности ФЕП-карбоксилазы был в 1.5 раза выше, чем в ранние утренние часы. При этом повышение активности фермента

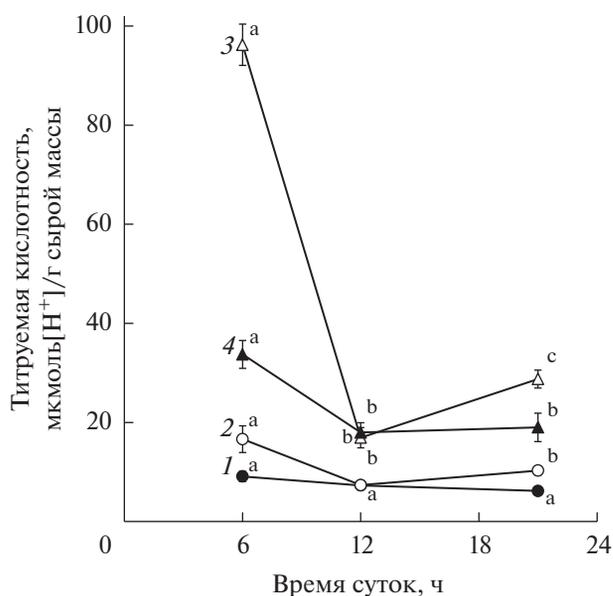


Рис. 1. Суточные изменения титруемой кислотности клеточного сока листьев *Hylotelephium triphyllum* в разные периоды вегетации (данные 2017 г.): 1 — 25–27 мая, 2 — 19–22 июня, 3 — 18–21 июля, 4 — 14–15 августа. Различные латинские буквы обозначают статистически значимые изменения величины показателя в течение суток ($P \leq 0.95$).

наблюдалось уже в полуденное время, на фоне снижения пула органических кислот.

Содержание растворимых сахаров. В период генеративного развития растений содержание растворимых углеводов в листьях *H. triphyllum* суще-

Таблица 3. Суточная динамика титруемой кислотности (мкмоль [H⁺]/г сырой массы) клеточного сока листьев *Hylotelephium triphyllum* в период генеративного развития растений

Время суток, ч	2016 г.		2018 г.	
	2 июля	27 июля	3 июля	30 июля
6:00	84.8 ± 4.2 ^a	156.5 ± 7.6 ^a	43.5 ± 1.3 ^a	77.3 ± 2.6 ^a
12:00	15.3 ± 1.1 ^b	26.8 ± 2.0 ^b	29.1 ± 1.7 ^b	53.1 ± 5.2 ^b
18:00	13.9 ± 1.3 ^b	16.1 ± 0.9 ^c	15.1 ± 1.0 ^c	20.5 ± 1.1 ^c
22:00	31.8 ± 2.6 ^c	30.4 ± 1.9 ^b	27.9 ± 2.4 ^b	21.8 ± 3.2 ^c

Примечание. Различные надстрочные буквы обозначают статистически значимые изменения величины показателя в течение суток.

Таблица 4. Суточная динамика содержания карбоновых кислот (мкмоль/г сырой массы) и титруемой кислотности клеточного сока (мкмоль [H⁺]/г сырой массы) в листьях *Hylotelephium triphyllum*, (данные 18–20 июля 2017 г.)

Время суток, ч	Малат	Цитрат + изоцитрат	Сукцинат	Титруемая кислотность
6:00	35.6 ± 1.8 ^a	5.0 ± 0.2 ^a	1.5 ± 0.2 ^a	96.2 ± 4.2 ^a
12:00	5.4 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.1 ^b	0.5 ± 0.1 ^b	16.9 ± 2.0 ^b
21:00	12.7 ± 0.2 ^c	2.1 ± 0.1 ^b	0.7 ± 0.1 ^b	28.2 ± 1.8 ^c

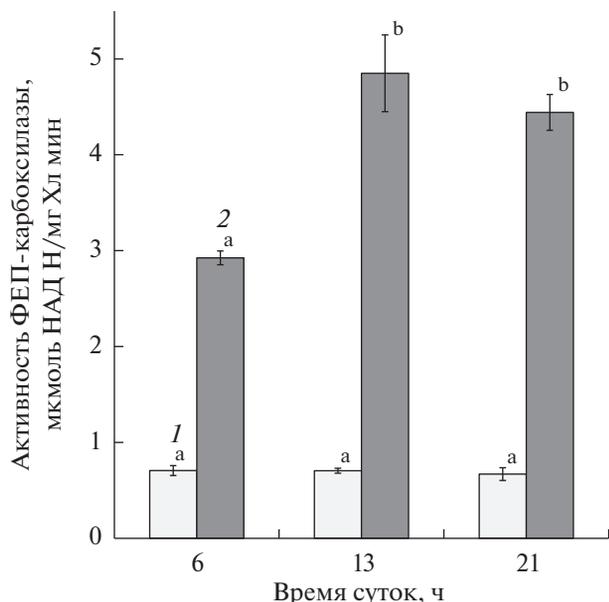


Рис. 2. Суточная динамика активности ФЕП-карбоксилазы в листьях *Hylotelephium triphyllum*: 1 – май 2019 г., 2 – август 2018 г. Различные латинские буквы обозначают статистически значимые изменения величины показателя в течение суток ($P \leq 0.95$).

ственно изменялось в течение суток (рис. 3). Максимум накопления сахаров отмечали во второй половине дня. При этом в начале июля (начало цветения) фонд сахаров в дневные часы был в 1.5 раза больше, чем в начале августа (начало пло-

доношения). В оба срока в фонде углеводов, как правило, доминировали моносахара, их доля составляла в среднем 70%. Дисахариды были представлены в основном сахарозой. В составе моносахаров присутствовали седогептулоза (около 60%), фруктоза (35–40%) и глюкоза (менее 5%) (рис. 4).

Таким образом, нами установлено, что с переходом к генеративному развитию в листьях *H. triphyllum* повышается кислотность клеточного сока, увеличивается содержание малата, возрастает уровень активности ФЕП-карбоксилазы. В фазу цветения наблюдаются выраженные суточные изменения этих показателей. Фаза цветения приходится на наиболее теплый период вегетации (июль).

ОБСУЖДЕНИЕ

Факультативный САМ используют однолетние и многолетние растения, которые в условиях достаточного водоснабжения реализуют C_3 -тип фотосинтеза для поддержания высокой скорости роста. При неблагоприятных воздействиях (дефицит влаги, высокие температуры, засоление) такие виды переходят на САМ. Индукция САМ служит механизмом снижения потери влаги и поддержания фотосинтетической активности. По имеющимся в литературе данным переход на САМ позволяет экономить до 70% воды, теряемой при транспирации за день [10].

Известно, что САМ-тип фотосинтеза связан с суточной ритмикой органических кислот. Зако-

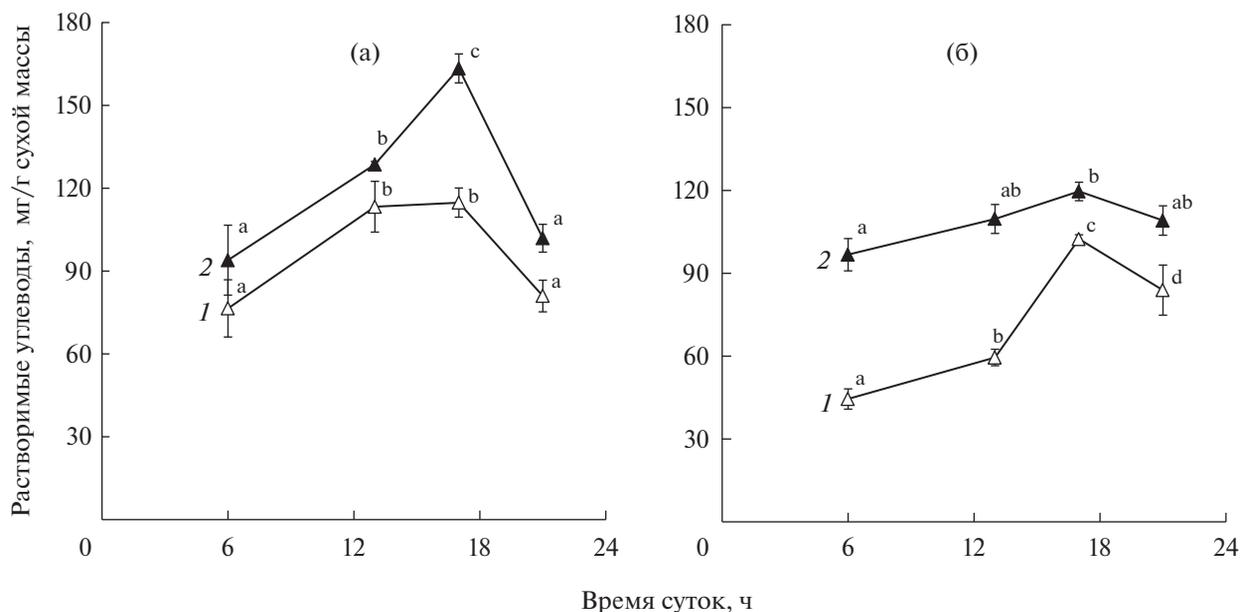


Рис. 3. Содержание растворимых углеводов в фазе начала цветения (а) и начала плодоношения (б) в листьях *Hylotelephium triphyllum* (данные 2 июля и 3 августа 2018 г., соответственно): 1 – моносахариды, 2 – сумма растворимых сахаров. Различные латинские буквы обозначают статистически значимые изменения величины показателя в течение суток ($P \leq 0.95$).

номерные суточные изменения кислотности клеточного сока и содержания малата в листьях *H. triphyllum* наблюдались нами в период генеративного развития (рис. 1; табл. 3, 4). Переход к генеративному развитию отмечен в конце июня, а фаза массового цветения приходилась на середину июля – месяца с наиболее теплой погодой. В период отрастания побегов (май) кислотность клеточного сока была низкой и постоянной в течение суток. Мы проанализировали зависимость величины, характеризующей разность между максимальными и минимальными за сутки значениями показателя титруемой кислотности клеточного сока (Δ ТК), от погодных условий июня–июля. Выявлено, что величины Δ ТК, полученные в разные годы и сроки вегетации, зависели достоверно от суммы активных температур ($>15^\circ\text{C}$) за период (20 суток), предшествующий дате изучения суточной динамики ТК (рис. 5). Чем больше тепла получала растения, тем сильнее была выражена суточная динамика титруемой кислотности и больше величина Δ ТК. В то же время количество выпавших осадков не оказало значимого влияния на величину Δ ТК (данные не приводятся), вероятно, из-за низкой способности дерново-слоистой песчано-супесчаной почвы удерживать влагу. Несмотря на осадки, в июле нами было отмечено снижение содержания влаги в корнеобитаемом слое почвы до 10–15% полной влагоемкости. В результате уменьшилась оводненность и увеличился водный дефицит листьев (табл. 2).

Регуляция САМ-фотосинтеза в течение суток связана с суточным ритмом активности ФЕП-карбоксилазы. Считается, что активная (нечувствительная к накоплению малата) форма фермента присутствует у САМ-растений ночью [11]. Однако у некоторых САМ-видов ФЕП-карбоксилаза может оставаться активной в течение нескольких часов после начала фотопериода. Например, у C_3 -САМ-вида *Clusia minor* она была активной (фосфорилированной) еще в течение 3 ч после включения света [12].

У исследованных нами растений *H. triphyllum* активность ФЕП-карбоксилазы в ранние утренние часы была почти вдвое ниже, чем в начале ночи. Причем повышение уровня активности фермента начиналось уже в первой половине дня. Известно, что фотопериод, интенсивность и спектральный состав светового потока могут оказывать существенное влияние на индукцию САМ посредством увеличения синтеза ФЕП-карбоксилазы и модуляции активности фермента [13, 14]. Анализируя суточные изменения активности фермента в листьях *H. triphyllum*, следует учитывать особенности светового режима, связанные с географическим положением района проведения исследований и, в первую очередь, продолжительность фотопериода. Так, в середине июля восход солнца наблюда-

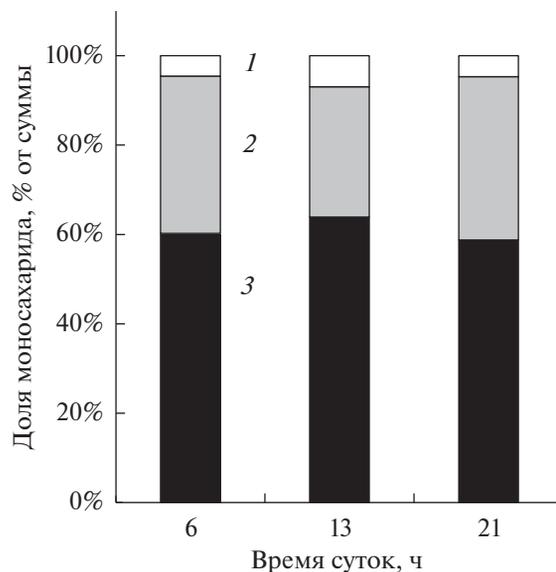


Рис. 4. Относительная доля моносахаридов в листьях *Hylotelephium triphyllum* в фазу массового цветения (18–20 июля 2017 г.): 1 – глюкоза, 2 – фруктоза, 3 – седогеаптулоза.

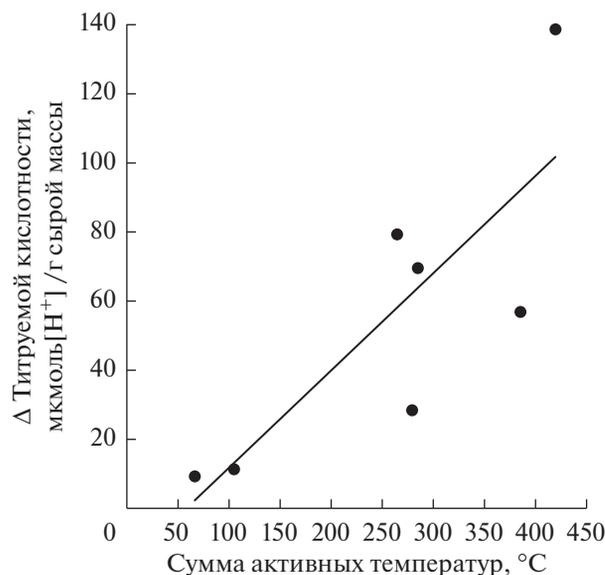


Рис. 5. Зависимость разности между максимальной и минимальными величинами титруемой кислотности клеточного сока (Δ ТК) листьев *Hylotelephium triphyllum* от суммы активных температур выше 15°C за 20-суточный период, предшествующий дате определений суточной динамики титруемой кислотности (обобщенные данные за июнь–июль 2016–2019 гг.). Результаты корреляционного анализа: коэффициент корреляции Пирсона $r = 0.811$, уровень значимости $P = 0.027$.

ется в 2 ч 23 мин, заход в 21 ч 04 мин, а сумерки длятся более 2 ч.

Ранее было показано, что в листьях *H. triphyllum* отсутствует специализированная водозапаса-

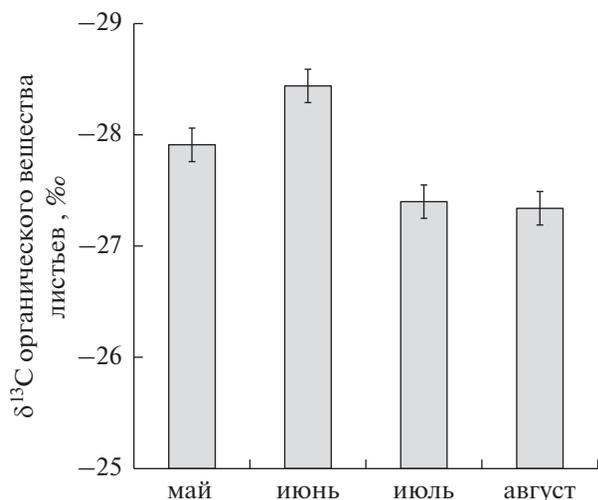


Рис. 6. Сезонные изменения величины $\delta^{13}\text{C}$ органического вещества листьев *Hylothelephium triphyllum* (данные 2017 г.)

ющая ткань [6, стр. 31–32] и они характеризуются высокой водоудерживающей способностью. Этому способствует накопление осмотически активных соединений – растворимых сахаров и органических кислот.

Растворимые сахара играют важную роль во всех процессах жизнедеятельности, поскольку могут действовать как сигнальные молекулы, контролируемые экспрессию генов, которые регулируют метаболизм, развитие и устойчивость растений к стрессу [15]. Поэтому углеводный статус может иметь особое значение для видов с факультативным САМ. Наши данные свидетельствуют о сравнительно высоком содержании в листьях растений *H. triphyllum* растворимых сахаров, преимущественно моносахаридов, отличающихся наибольшей биологической активностью. Среди моносахаридов доминировала седогептулоза. О способности некоторых видов САМ-растений накапливать этот сахар известно давно, однако роль седогептулозы до конца не выяснена [16]. Полагают, что синтез седогептулозы связан с цитозольным окислительным пентозофосфатным путем и она участвует в поддержании углеродного и фосфорного гомеостаза в клетке при повышенной концентрации CO_2 .

Несмотря на многочисленные исследования, все еще остаются плохо понятыми механизмы восприятия и трансдукции сигнала, формирования адекватного биохимического ответа САМ-растений [17, 18]. Не ясно, в какой мере эти механизмы универсальны для всех видов с факультативным САМ. У отдельных видов индукция САМ связана с онтогенетическим развитием. Следовательно, в регуляции экспрессии САМ генов могут участвовать гормоны, циркадные ритмы и другие факторы,

способные синхронизировать онтогенетические события в соответствии с изменениями во внешней среде. Онтогенетически запрограммированную индукцию C_3 -САМ перехода можно рассматривать как способ обеспечения положительного баланса углерода и ресурсов для репродукции при предсказуемом ухудшении водоснабжения [4, 19]. У исследованного нами *H. triphyllum* выраженное функционирование САМ-пути наблюдалось в период генеративного развития и коррелировало с поступлением тепла на фоне снижения влагообеспеченности растений.

Для оценки вклада САМ в продукционный процесс мы определяли соотношение стабильных изотопов углерода ($\text{C}^{12}/\text{C}^{13}$) в биомассе различных органов *H. triphyllum*. Как известно, фракционирование изотопов углерода при фотосинтезе в сильной степени зависит от биохимического механизма связывания углерода и существенно отличается у видов с различными типами фиксации атмосферного CO_2 [20]. У растений с C_3 -типом углеродного метаболизма величина изотопной дискриминации ($\delta^{13}\text{C}$) варьирует в пределах от -21 до -35‰ , а у C_4 -видов от -18 до -9‰ . Промежуточную позицию занимают растения с САМ-типом углеродного метаболизма. Если величина $\delta^{13}\text{C}$ органического вещества листьев составляет -30‰ – -25‰ , можно говорить о минимальном вкладе β -карбоксилирования ФЕП в общий углеродный баланс [21, 22].

Величина $\delta^{13}\text{C}$ органического вещества листьев *H. triphyllum* варьировала в пределах от -27.3 до -28.4‰ (рис. 6). Обогащение пула углерода легким изотопом в первой половине вегетации (май–июнь) обусловлено тем, что растения находятся в благоприятных для роста условиях и фотосинтетическая ассимиляция углерода осуществляется по C_3 -пути. Интенсивному росту способствуют длинный день и достаточное количество влаги в почве после половодья. Во второй половине вегетации (июль–август) отмечено небольшое повышение содержания в листьях тяжелого изотопа, что связано с индукцией САМ. В период плодоношения (середина августа) величина $\delta^{13}\text{C}$ органического вещества генеративных органов составляла -27.9‰ , стеблей -27.5‰ , почек возобновления -27.4‰ и утолщенных придаточных корней -27.3‰ . Тот факт, что величина $\delta^{13}\text{C}$ утолщенных придаточных корней была наименее отрицательна, указывает на возможность аллокации углерода, ассимилированного при САМ-фотосинтезе в запасующие органы. Использованием запасных веществ для формирования надземной биомассы побегов можно объяснить тенденцию к обогащению органического вещества листьев тяжелым изотопом углерода в период весеннего отрастания (май). Вместе с тем нельзя исключить влияние постфотосинтетических процессов фракционирования изотопов углерода, которые также

приводят к изменению сигнатуры изотопного состава органического вещества подземных органов относительно $\delta^{13}\text{C}$ листьев [23].

Вопрос о том, насколько точно величина $\delta^{13}\text{C}$ отражает вклад ночной и дневной фиксации CO_2 у САМ-растений, остается дискуссионным [24]. Поэтому судя только по величине $\delta^{13}\text{C}$ трудно оценить роль ассимиляции CO_2 посредством β -карбоксилирования ФЕП в углеродном балансе C_3 -САМ вида *H. triphyllum*. Обогащение биомассы *H. triphyllum* легким изотопом углерода подтверждает, что в природных условиях таежной зоны растения в большей мере использовали C_3 -тип фотосинтетического метаболизма, чем САМ-путь.

Итак, нами выявлена сезонная и суточная динамика показателей, служащих индикаторами C_3 -САМ перехода. Закономерные изменения кислотности клеточного сока, содержания малата и активности ФЕП-карбоксилазы в листьях свидетельствуют об индукции САМ у растений *H. triphyllum* в период генеративного развития. Установлено, что САМ-фотосинтез не вносит существенного вклада в углеродный баланс и продуктивность растений. Функционирование САМ в период цветения – плодоношения способствует сохранению фотосинтетического аппарата и реализации репродуктивного потенциала растений, обитающих на легко теряющих влагу песчано-супесчаных почвах в условиях гумидного климата таежной зоны европейского Северо-Востока России.

Работа выполнена в рамках темы госбюджетных НИОКТР “Физиология и стресс-устойчивость фотосинтеза растений и пойкилогидрических фотоавтотрофов в условиях Севера” (№ АААА-А17-117033010038-7).

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Silvera K., Neubig K.M., Whitten W.M., Williams N.H., Winter K., Cushman J.C.* Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum // *Funct. Plant Biol.* 2010 V. 37. P. 995. <https://doi.org/10.1071/FP10084>
2. *Raven J.A., Spicer R.A.* The evolution of crassulacean acid metabolism // *Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution* / Eds. Winter K., Smith J.A.C. Berlin: Springer-Verlag, 1996. P. 360.
3. *Keerle J.E., Rundel P.W.* Evolution of CAM and C_4 carbon-concentrating mechanisms // *Int. J. Plant Sci.* 2003 V.164. P. 55. <https://doi.org/10.1086/374192>
4. *Dodd A.N., Borland A.M., Haslam R.P., Griffiths H., Maxwell K.* Crassulacean acid metabolism: plastic, fan-
5. *tastic* // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 569. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.369.569>
5. *Головки Т.К., Далькэ И.В., Бачаров Д.С., Бабак Т.В., Захожий И.Г.* Толстянковые в холодном климате. СПб.: Наука, 2007. 205 с.
6. *Golovko T.K., Dalke I.V., Bacharov D.S.* Mesostructure and activity of photosynthetic apparatus for three crassulacean species grown in cold climate // *Russ. J. Plant Physiol.* 2008. V. 55. P. 603. <https://doi.org/10.1134/S1021443708050038>
7. *Brushwood D.E.* Modification of the potassium ferricyanide reducing sugar test for sugars from extracts of cotton fiber // *J. Cotton Sci.* 2000. V.4. P. 202
8. *Theng V., Agarie S., Nose A.* Regulatory properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in crassulacean acid metabolism plants: diurnal changes in phosphorylation state and regulation of gene expression // *Plant Prod. Sci.* 2007. V. 10 P. 171. <https://doi.org/10.1626/pp.s.10.171>
9. Методика измерений массовой доли пигментов спектрофотометрическим методом (фиксация и экстракция диметилкетонем). Свидетельство об аттестации методики измерений № 88-17641-077-01.00076-2014. 2014. Сыктывкар. 24 с.
10. *Borland A.M.* A model for the partitioning of photosynthetically fixed carbon during the C_3 -CAM transition in *Sedum telephium* // *New Phytol.* 1996. V. 134. P. 433. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb04360.x>
11. *Carter P.J., Fewson C.A., Nimmo G.A., Wilkins M.B.* Roles of circadian rhythms, light and temperature in the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in crassulacean acid metabolism // *Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution* / Eds. Winter K., Smith J.A.C. Berlin: Springer-Verlag, 1996. P. 46.
12. *Borland A.M., Griffiths H.* A comparative study on the regulation of C_3 and C_4 carboxylation processes in the constitutive crassulacean acid metabolism (CAM) plants *Kalanchoe daigremontiana* and the C_3 -CAM intermediate *Clusia minor* // *Planta.* 1997. V. 201. P. 368 <https://doi.org/10.1007/s004250050079>
13. *Cockburn W., Whitelam G. C., Broad A., Smith J.* The participation of phytochrome in the signal transduction pathway of salt stress responses in *Mesembryanthemum crystallinum* L. // *J. Exp. Bot.* 1996. V. 47. P. 647. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.5.647>
14. *Gawronska K., Romanowska E., Miszalski Z., Niewiadomska E.* Limitation of C_3 -CAM shift in the common ice plant under high irradiance // *J. Plant Physiol.* 2013. V. 170. P. 129. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.09.019>
15. *Ceusters N., van den Ende W., Ceusters J.* Exploration of sweet immunity to enhance abiotic stress tolerance in plants: lessons from CAM // *Progress in Botany Vol. 78* / Eds. Cánovas F., Lüttge U., Matyssek R. Cham: Springer, 2016. P. 145. https://doi.org/10.1007/124_2016_1
16. *Ceusters J., Godts C., Peshev D., Vergauwen R., Dyubankova N., Lescrinier E., De Proft M.P., Van den Ende W.* Sedoheptulose accumulation under CO_2 enrichment in leaves of *Kalanchoë pinnata*: a novel mechanism to enhance C and P homeostasis? // *J. Exp. Bot.* 2013.

- Vol. 64. P. 1497.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert010>
17. *Cushman J.C., Taybi T., Bohnert H.J.* Induction of crassulacean acid metabolism – molecular aspects // Photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration, V 9. / Eds. Dordrecht: Springer, 2000. P. 551.
 18. *Winter K., Holtum J.A.M.* Facultative crassulacean acid metabolism (CAM) plants: powerful tools for unraveling the functional elements of CAM photosynthesis // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 3425.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru063>
 19. *Herppich W., Herppich M., Dieter J.W.* The irreversible C₃ to CAM shift in well-watered and salt-stressed plants of *Mesembryanthemum crystallinum* is under strict ontogenetic control // Bot. Acta. 1992. V. 105. P. 34.
<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1992.tb00264.x>
 20. *Farquhar G.D., Ehleringer J.R., Hubick K.T.* Carbon isotope discrimination and photosynthesis // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1989. V. 40. P. 503.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.002443>
 21. *Brugnoli E., Farquhar G.D.* Photosynthetic fractionation of carbon isotopes // Photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration, V. 9. / Eds. Leegood R.C., Sharkey T.D., Caemmerer S. Dordrecht: Springer, 2000. P. 399.
 22. *Griffiths H.* Carbon isotope discrimination and the integration of carbon assimilation pathways in terrestrial CAM plants // Plant Cell Environ. 1992. V. 15. P. 1051.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1992.tb01655.x>
 23. *Badeck F.W., Tcherkez G., Nogués S., Piel C., Ghashghaie J.* Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs – a widespread phenomenon // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005. V. 19. P. 1381.
<https://doi.org/10.1002/rcm.1912>
 24. *Winter K., Holtum J.A.M.* How closely do the δ^{13} values of crassulacean acid metabolism plants reflect the proportion of CO₂ fixed during day and night? // Plant Physiol. 2002. V. 129. P. 1843.
<https://doi.org/10.1104/pp.002915>