

УДК 581.1

## ВОЗМОЖНАЯ АКТИВАЦИЯ C<sub>3</sub>-ПУТИ ФОТОСИНТЕЗА У C<sub>4</sub>-ГАЛОФИТА *Kochia prostrata* ПОД ВЛИЯНИЕМ ПОВЫШЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ CO<sub>2</sub>

© 2021 г. З. Ф. Рахманкулова<sup>а</sup>, \*, Е. В. Шуйская<sup>а</sup>, \*\*, М. Ю. Прокофьева<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: zulfirar@mail.ru

\*\*e-mail: evshuya@gmail.com

Поступила в редакцию 05.02.2021 г.

После доработки 05.03.2021 г.

Принята к публикации 06.03.2021 г.

Исследовали влияние повышенной концентрации CO<sub>2</sub> (800 ppm) на интенсивность роста, эффективность фотосистемы I (ФС I) и фотосистемы II (ФС II), содержание рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (Рубиско) и фосфоенолпируваткарбоксилазы (ФЕПк), пролина, ионов натрия и калия в побегах C<sub>4</sub>-галофита *Kochia prostrata* (L.) Schrad. В условиях повышенной концентрации CO<sub>2</sub> наблюдалось снижение накопления сухой биомассы (в 1.2 раза), увеличение содержания пролина (в 1.2 раза) и ионов калия (в 1.3 раза), а также уменьшение времени выхода на плато кинетической кривой P700 (ФС I) (в 1.7 раза). Содержание ионов натрия и воды в побегах, а также эффективность ФС II ( $F_v/F_m$ ) не изменялись. С помощью иммуноблоттинга показано, что в условиях повышенной концентрации CO<sub>2</sub> соотношение содержания белков Рубиско/ФЕПк возрастало с 1.3 до 3.4. Уменьшение времени выхода на плато кинетической кривой ФС I косвенно свидетельствует о снижении активности циклического транспорта электронов, необходимого для эффективного функционирования C<sub>4</sub>-углерод-концентрирующего механизма. Высказывается предположение, что высокая концентрация CO<sub>2</sub> активирует у C<sub>4</sub>-галофита *K. prostrata* C<sub>3</sub>-путь фотосинтеза.

**Ключевые слова:** *Kochia prostrata*, высокая концентрация CO<sub>2</sub>, Рубиско, фосфоенолпируваткарбоксилаза, C<sub>3</sub>-фотосинтез, C<sub>4</sub>-фотосинтез, фотосистема I, фотосистема II

**DOI:** 10.31857/S0015330321060166

### ВВЕДЕНИЕ

Цикл Кальвина-Бенсона, наиболее распространенный биохимический путь на Земле, является основой углеродной фиксации у подавляющего большинства фотосинтезирующих организмов. Он эволюционировал при очень высоких концентрациях CO<sub>2</sub> и очень низких концентрациях O<sub>2</sub>. За последние 30 миллионов лет во время олигоцена произошел резкий рост атмосферной концентрации O<sub>2</sub> и снижение CO<sub>2</sub> (с ~1000 до < 300 ppm) [1–3]. Низкий уровень атмосферного CO<sub>2</sub> привел к развитию углерод-концентрирующих механизмов (УКМ), примером которых в наземных растениях является C<sub>4</sub>-путь фотосинтеза, возникший независимо более чем в 65 линиях покрытосеменных растений [1, 3]. Большинство C<sub>4</sub>-растений произрастают в аридной зоне, где они проявляют более высокие фотосинтетические и ростовые показатели, благодаря высоким значениям эффективности ис-

пользования воды, углерода и азота [4]. Можно сказать, что C<sub>4</sub>-путь фотосинтеза является адаптацией C<sub>3</sub>-пути к низкой концентрации CO<sub>2</sub>, который за счет снижения оксигеназной функции рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (Рубиско) ограничивает фотодыхание, способствуя повышению эффективности процесса фотосинтеза, и минимизирует потери воды в жаркой и сухой среде [5]. C<sub>4</sub>-УКМ, по сути, является биохимическим CO<sub>2</sub> насосом, в котором диоксид углерода фиксируется при участии фосфоенолпируваткарбоксилазы (ФЕПк) в клетках мезофилла (КМ) в C<sub>4</sub>-кислотах, которые диффундируют в клетки обкладки (КО) проводящего пучка, где содержатся Рубиско и другие компоненты цикла Кальвина-Бенсона. В КО C<sub>4</sub>-кислоты декарбоксилируются, генерируя высокую внутриклеточную концентрацию CO<sub>2</sub> [1, 3].

В C<sub>4</sub>-растениях функционально активны как C<sub>3</sub>-, так и C<sub>4</sub>-пути фотосинтеза. Это приводит к повышению энергетической стоимости ассимиляции CO<sub>2</sub>, по сравнению с C<sub>3</sub>-растениями. Как

**Сокращения:** УКМ — углерод-концентрирующий механизм; ФЕПк — фосфоенолпируваткарбоксилаза.

следствие, две дополнительные молекулы АТФ требуются для каждой молекулы CO<sub>2</sub>, фиксированной в результате функционирования C<sub>4</sub>-пути фотосинтеза. Предполагается, что дополнительные молекулы АТФ синтезируются с помощью циклического транспорта электронов фотосистемы I (ФС I), что способствует генерации градиента рН на тилакоидной мембране без образования НАДФ·Н [6]. Сравнительный анализ в пределах рода *Flaveria*, который включает как C<sub>3</sub>-, так и промежуточные C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> и C<sub>4</sub>-виды, показал, что C<sub>4</sub>-растения демонстрируют более высокую экспрессию генов белков, участвующих в циклическом транспорте электронов ФС I, а также изменения в тилакоидной структуре, способствующие высокой активности циклического потока электронов [6].

С помощью методов профилирования метаболитов и многофакторного анализа главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) было показано, что у C<sub>4</sub>-видов, по сравнению с C<sub>3</sub>-видами, более низкий уровень рибулозо-1,5-бисфосфата, а Рубиско характеризуется более низким сродством к CO<sub>2</sub> и более быстрым каталитическим оборотом, позволяющим данному ферменту эффективно функционировать при его более низких концентрациях [3].

Исследование регуляции экспрессии генов Рубиско (*rbcL* и *RbcS*) и ФЕПк (*ppcA*) показало, что для C<sub>4</sub>-видов с Кранц-анатомией характерна экспрессия генов *rbcL* и *RbcS* только в КО [7], тогда как гены класса *ppcA* интенсивно экспрессируются только в КМ [8]. Однако на начальных этапах развития листьев у C<sub>4</sub>-видов обычно экспрессируются гены Рубиско как в КО, так и в КМ (или в их предшественниках). В клетках зрелых C<sub>4</sub>-растений гены Рубиско модифицируются и проявляют КО-специфичность и высокую чувствительность к экзогенным и эндогенным сигналам, в том числе к изменению климата [7].

Вопрос о влиянии высокой концентрации CO<sub>2</sub> на C<sub>4</sub>-растения до сих пор открыт. С одной стороны, считается, что повышение парциального давления CO<sub>2</sub> в атмосфере может увеличить интенсивность фотосинтеза и прирост биомассы как у C<sub>3</sub>-, так и у C<sub>4</sub>-видов, причем у C<sub>4</sub>-видов в меньшей степени. Так, удвоение текущей атмосферной концентрации CO<sub>2</sub> стимулировало рост C<sub>3</sub>-растений на 40–45%, а у C<sub>4</sub>-растений только на 10–20% [9]. Это может быть связано с тем, что у C<sub>4</sub>-видов фотосинтетическая ассимиляция углерода насыщена или почти насыщена CO<sub>2</sub>, благодаря наличию УКМ, а также с тем, что ФЕПк использует HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, а не CO<sub>2</sub> в качестве субстрата, и поэтому фермент не чувствителен к изменениям соотношения CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>. Все это делает C<sub>4</sub>-растения мало-

чувствительными к повышенному содержанию CO<sub>2</sub> [4]. С другой стороны, показано, что C<sub>4</sub>-растения отрицательно реагируют на высокий уровень CO<sub>2</sub> [10]. На C<sub>4</sub>-растениях (сорго) установлено, что выращивание их в условиях повышенной концентрации CO<sub>2</sub> (700 ppm) приводит к снижению эффективности карбоксилирования, скорости насыщения фотосинтеза, уменьшению содержания ФЕПк в листьях (на 49%, в пересчете на площадь), а также к 2-кратному уменьшению толщины клеточных стенок, при этом содержание Рубиско оставалось без изменений [11]. Противоречивая информация о реакции C<sub>4</sub>-растений на повышенный уровень CO<sub>2</sub> свидетельствует о недостаточной изученности данного вопроса и может быть связана с различиями в экспериментальных технологиях, видом и возрастом растений, используемых в экспериментах [12].

Повышение атмосферной концентрации CO<sub>2</sub> сопровождается увеличением температуры, засухой, засолением и другими факторами. Галофиты – виды растений, которые обладают адаптационными механизмами, позволяющими им успешно произрастать в подобных неблагоприятных условиях. Эти качества делают их перспективными для активного использования в качестве кормовых и технических культур в условиях изменяющегося климата. Поэтому исследование влияния высокой концентрации CO<sub>2</sub> на фотосинтетический метаболизм C<sub>4</sub>-галофитов представляет большой научный и практический интерес. Целью данной работы явилось сравнительное изучение влияния естественной (400 ppm) и повышенной (800 ppm) концентраций CO<sub>2</sub> на интенсивность роста, реакции световой фазы фотосинтеза, содержание ключевых фотосинтетических ферментов, пролина, ионов натрия и калия в побегах C<sub>4</sub>-галофита *Kochia prostrata*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Растительный материал и условия выращивания.

Для проведения лабораторных экспериментов семена кохии распростертой (*Kochia prostrata* (L.) Schrad., сем. Chenopodiaceae) проращивали в дистиллированной воде. Проростки в возрасте 3–4 дней пересаживали на перлит, пропитанный 50% питательным раствором Хогланда. Растения выращивали в двух отдельных камерах с разным уровнем концентрации CO<sub>2</sub> (атмосферной (400 ppm) и повышенной (800 ppm)) под люминесцентными лампами при плотности потоков квантов ФАР 200 мкмоль/(м<sup>2</sup> с), 16-часовом фотопериоде и температуре 25°C. У 45-дневных растений измеряли длину побега, сырую и сухую биомассу, содержание воды, пролина, ионов натрия и калия, фотосинтетических ферментов Рубиско и ФЕПк, эффективность фотосистем I и II.

**Определение содержания воды, пролина и ионов натрия и калия.** Для определения сухой биомассы растительные пробы высушивали двое суток при 80°C. Содержание воды (W) рассчитывали по формуле и выражали в г H<sub>2</sub>O/г сухой массы:

$$W = (FW - DW)/DW, \quad (1)$$

где FW – сырая биомасса, DW – сухая биомасса.

Содержания ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> в фотосинтезирующих органах определяли в водной вытяжке пробы (100 мг) на атомно-абсорбционном спектрометре Hitachi 207 (“Hitachi”, Япония).

Содержание свободного пролина определяли с помощью кислого нингидринового реактива по методу Bates [13], результаты рассчитывали на 1 г сухой массы.

**Определение содержания белков Рубиско (РБФК/О) и ФЕПк с помощью вестерн-блот анализа.** Тотальный белок экстрагировали из 0.5 г надземной части растения, которую измельчали в жидком азоте и 2 мл экстракционного буфера, содержащего 50 мМ Tris-HCl (pH 8), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.3 мМ ЭДТА, 40 мг поливинилпирролидона и 5 мМ дитиотреитола. Гомогенат центрифугировали при 10000 об./мин в течение 20 мин при 4°C, используя центрифугу марки K-24 (“Janetzki”, Германия). Содержание белка определяли с помощью бицинхониновой кислоты, используя набор реактивов Pierce BCA Protein Assay Kit (“Thermo Scientific”, США). Калибровочную кривую строили на основе известных концентраций бычьего сывороточного альбумина, входящего в данный набор.

Анализ содержания белков Рубиско и ФЕПк, проводили с помощью иммуноферментного анализа по стандартной методике [14] с использованием коммерческих поликлональных антител против белков большой субъединицы (L) РБФК/О и ФЕПк (“Agrisera”, Швеция). Разделение суммарных белков (15 мкг тотального белка в слоте) проводили с помощью 10% денатурирующего гель-электрофореза (SDS-PAGE) по методу Laemmli [15] с использованием маркеров стандартной молекулярной массы (“BioRad”, США). После проведения электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0.45 мкм (“Amersham, GE Healthcare”, Великобритания), используя прибор для мокрого блоттинга (“BioRad”, США), согласно стандартному протоколу. Белки Рубиско и ФЕПк визуализировали при помощи кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с флуоресцентными красителями люминолом и кумариновой кислотой (“Sigma”, США) и пленки Retina XBE (Германия). Интенсивность полос в вестерн-блоттинге оценивали с помощью программы ImageJ 1.37v (США) и выражали относительно среднего уровня ( $n = 3$ ) для растений, вы-

ращенных при 400 ppm CO<sub>2</sub>, которое было взято за 100%. Анализ проводили не менее 3 раз.

**Фотосистема I.** Изменение окислительно-восстановительного потенциала P700 измеряли путем мониторинга оптической плотности листьев при 820 нм с использованием dual-wavelength системы импульсной модуляции ED-P700DW (“Heinz-Walz, Effeltrich”, Германия) в сочетании с РАМ-101 (“Heinz-Walz”, Германия). Кинетика окисления P700 измерялась при освещении дальним красным светом (720 нм, 17.2 Вт/м<sup>2</sup>). Максимальное окисление P700 определяли с использованием ксеноновой газоразрядной лампы (50 мс, 1500 Вт/м<sup>2</sup>; “Heinz-Walz”, Германия) в присутствии дальнего красного света.

**Фотосистема II.** Определение квантового выхода флуоресценции фотосистемы II (ФС II) адаптированного к темноте (20 мин) фрагмента листа осуществляли с помощью РАМ флуориметра (РАМ-101, “Heinz-Walz”, Германия). Измеряли темновой максимальный квантовый выход флуоресценции ФС II ( $F_v/F_m$ ). Измерение проводили с досветкой образца слабым модулированным потоком красного света, которое осуществлялось АЦПУ (PDA-100, “Walz”, Германия), преобразующим первичный сигнал от РАМ-101 на компьютер со специализированным программным интерфейсом. Расчет показателей проводили на основании текущего значения минимальной ( $F_0$ ) и максимальной ( $F_m$ ) флуоресценции адаптированного к темноте листа по формуле:

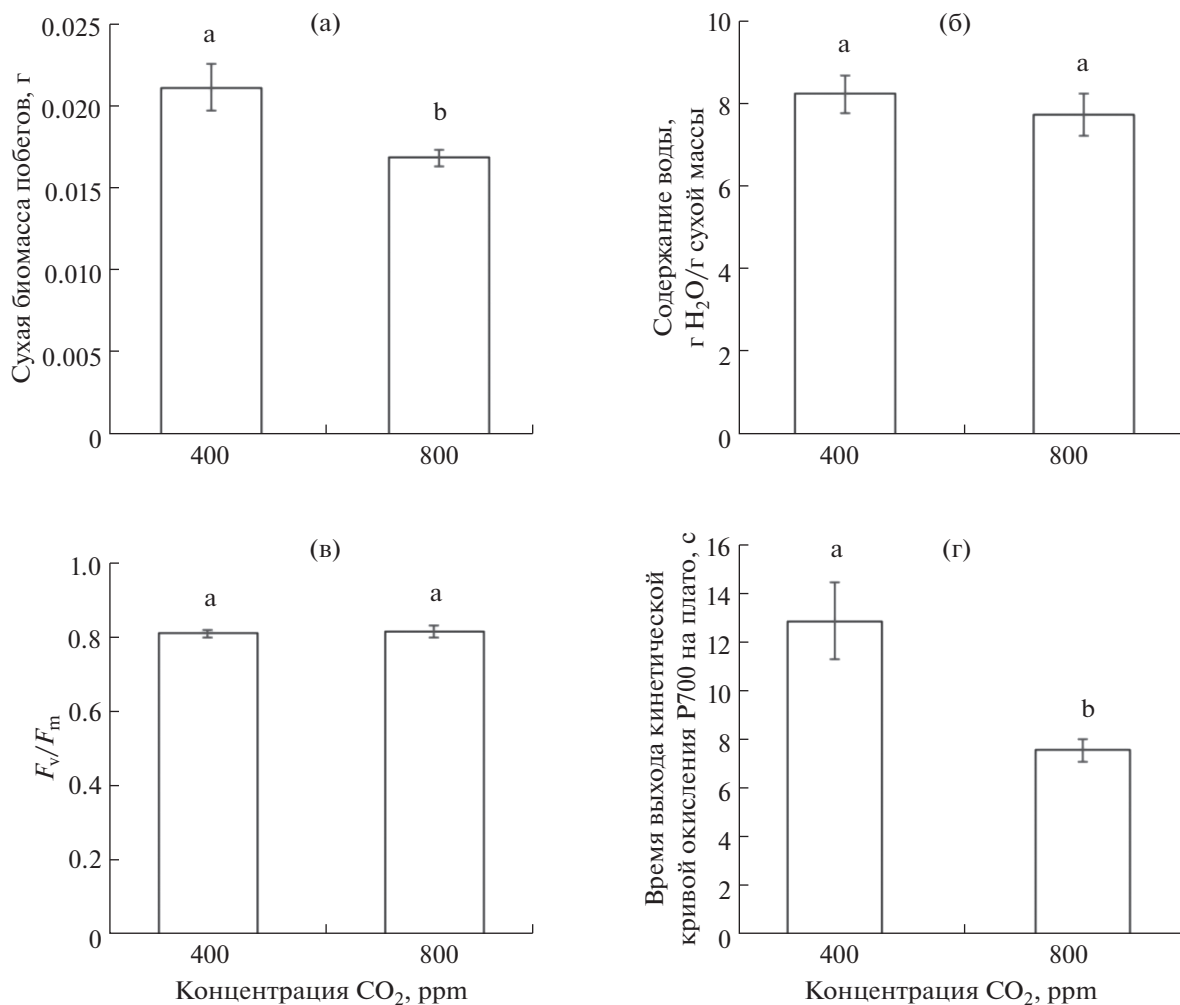
$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m. \quad (2)$$

**Статистический анализ.** Во всех экспериментах было не менее трех биологических повторностей. Для корреляционного и факторного (ANOVA) анализа использовали программу SigmaPlot 12.0. На графиках приведены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные ошибки. Различия считались достоверными при  $P < 0.05$  (тест Тьюки). Для многофакторного анализа методом главных компонент (РСА) было использовано программное обеспечение R (версия 3.6.1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

У растений *Kochia prostrata*, выращенных при высокой концентрации CO<sub>2</sub> (800 ppm), по сравнению с растениями, находившимися при естественной концентрации CO<sub>2</sub> (400 ppm), наблюдалось небольшое снижение сухой биомассы (в 1.2 раза) (рис. 1а). При этом содержание воды в надземной части растений не изменялось (рис. 1б).

Исследование эффективности функционирования фотосистем у растений *K. prostrata* в условиях высокой концентрации CO<sub>2</sub> показало, что максимальный квантовый выход ФС II ( $F_v/F_m$ ) не



**Рис. 1.** Сухая биомасса (а), содержание воды (б), максимальный квантовый выход ФС II (в) и время выхода на плато кинетической кривой окисления P700 (ФС I) при освещении дальним красным светом (г) растений C<sub>4</sub>-галофита (*Kochia prostrata*), выращенных при разных концентрациях CO<sub>2</sub> (400 и 800 ppm). Разными латинскими буквами отмечены достоверные различия на уровне  $P < 0.05$  (тест Тьюки).

изменялся (рис. 1в). При этом наблюдалось снижение времени выхода на плато кинетической кривой ФС I (в 1.7 раза) (рис. 1г), т.е. уменьшалась интенсивность циклического транспорта электронов, характерная для C<sub>4</sub>-видов.

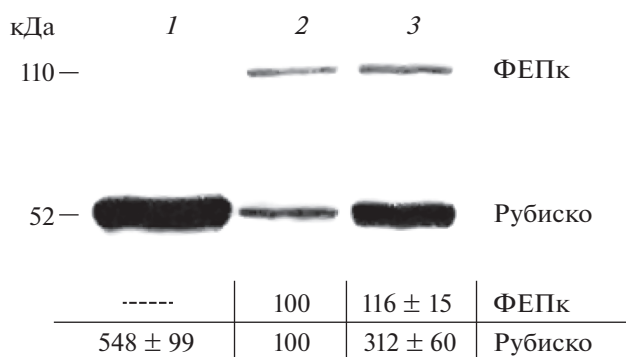
С помощью вестерн-блоттинга и специфических антител к ключевым ферментам C<sub>3</sub>- и C<sub>4</sub>-пути фотосинтеза, а именно к большой субъединице Рубиско и ФЕПк, было показано, что в условиях высокой концентрации CO<sub>2</sub> у растений *K. prostrata* содержание обоих ферментов возрастало (рис. 2). Было установлено, что содержание Рубиско у растений, выращенных при 800 ppm CO<sub>2</sub>, увеличивалось на 312% (в 3 раза), относительно его содержания при 400 ppm CO<sub>2</sub>. Содержание ФЕПк возрастало в меньшей степени и при 800 ppm CO<sub>2</sub> составило 116%, относительно растений, выра-

щенных при 400 ppm CO<sub>2</sub> (рис. 2). При этом отношение Рубиско/ФЕПк при 400 ppm CO<sub>2</sub> составило 1.3, а при 800 ppm CO<sub>2</sub> оно увеличивалось почти в 3 раза и составило 3.4 (рис. 3а).

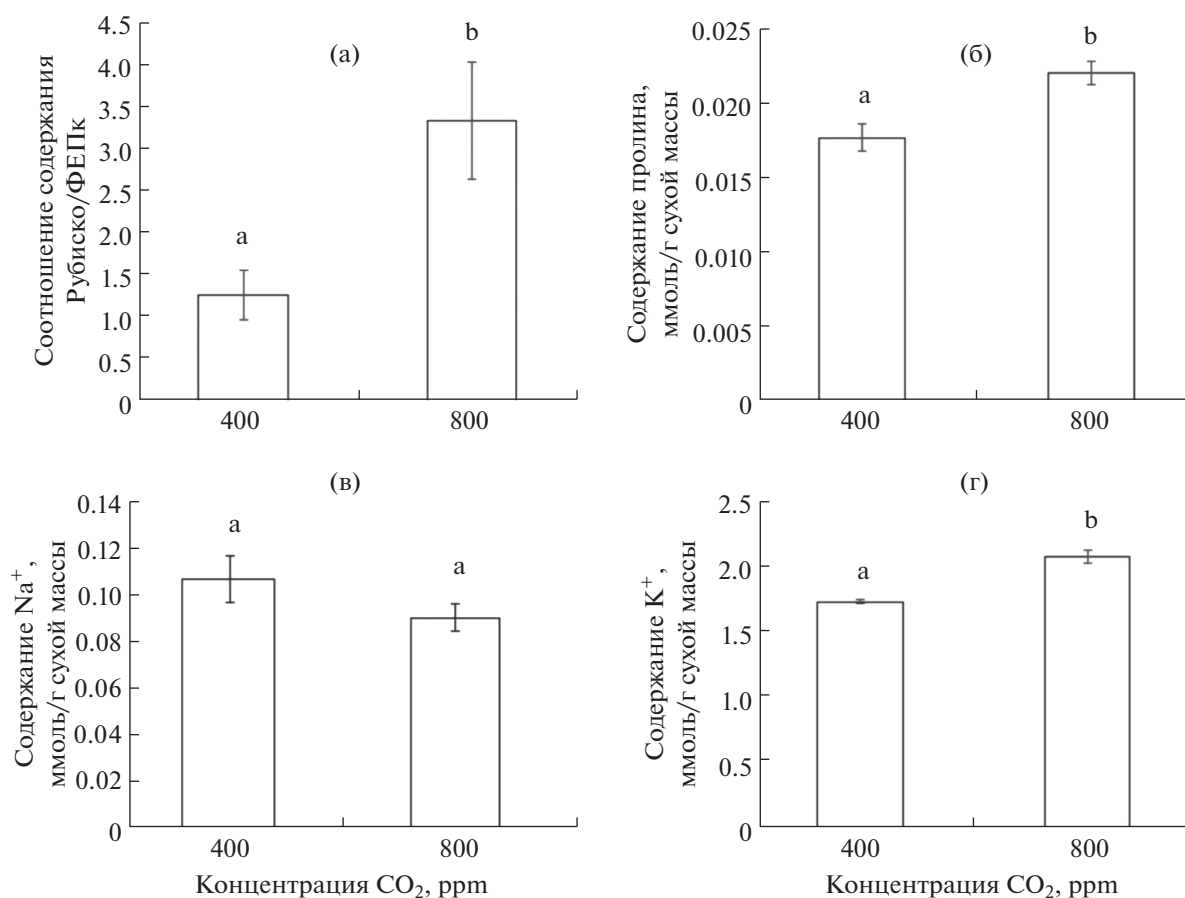
Определение содержания пролина показало, что выращивание растений в условиях высокой концентрации CO<sub>2</sub> приводило к небольшому, но достоверному его увеличению (в 1.2 раза) (рис. 3б).

Содержание Na<sup>+</sup> в тканях растений *K. prostrata* не изменялось в зависимости от концентрации CO<sub>2</sub> в камере (рис. 3в). В условиях высокой концентрации CO<sub>2</sub> наблюдалось накопление K<sup>+</sup> (в 1.3 раза по сравнению с вариантом 400 ppm CO<sub>2</sub>) (рис. 3г).

С целью выявления параметров, участвующих в процессе акклимации к высокой концентрации CO<sub>2</sub>, был проведен анализ главных компонент (PCA) на растениях *K. prostrata*, произрастающих



**Рис. 2.** Результаты вестерн-блоттинга белков Рубиско (большая субъединица) и ФЕПк в листьях растений *Kochia prostrata*, выращенных при разных концентрациях  $\text{CO}_2$  (400 и 800 ppm). В качестве контроля взят  $\text{C}_3$ -вид (*Salicornia europaea* L.). 1 – *S. europaea*; 2 – *K. prostrata* при 400 ppm  $\text{CO}_2$ ; 3 – *K. prostrata* при 800 ppm  $\text{CO}_2$ . Относительное содержание Рубиско и ФЕПк дано на основе оценки интенсивности полос в вестерн-блоттинге с помощью программы ImageJ 1.37v (США) и выражено относительно среднего уровня для растений, выращенных при 400 ppm  $\text{CO}_2$ , которое было взято за 100%. Приведены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные ошибки ( $n = 3$ ).



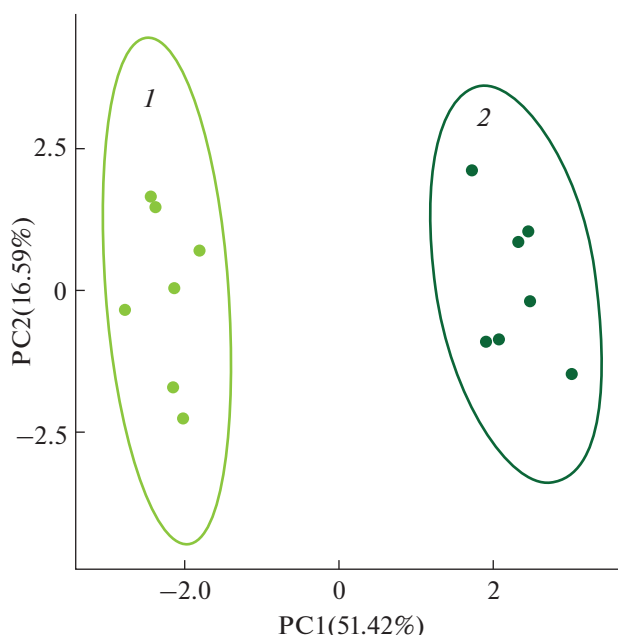
**Рис. 3.** Соотношение Рубиско/ФЕПк (а), содержание пролина (б), ионов натрия (в) и калия (г) у растений  $\text{C}_4$ -галофита (*Kochia prostrata*), выращенных при разных концентрациях  $\text{CO}_2$  (400 и 800 ppm). Разными латинскими буквами отмечены достоверные различия на уровне  $P < 0.05$  (тест Тьюки).

в условиях естественной (400 ppm) и высокой (800 ppm) концентрациях  $\text{CO}_2$ . На рис. 4 видно, что четко выделяются 2 группы, разделенные первым основным компонентом (PC1), что составляет 51.42% от общей вариации. Основными элементами PC1 были содержание  $\text{K}^+$ , Рубиско и пролина, т.к. эти переменные имели наиболее высокие значения коэффициентов факторной нагрузки (табл. 1). Второй главный компонент (PC2) не дал четкого разделения на группы.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Высокие концентрации  $\text{CO}_2$  стимулируют фотосинтез за счет увеличения доступности субстрата ( $\text{CO}_2$ ) для Рубиско и одновременного подавления фотодыхания [16]. Стимуляция фотосинтеза и роста у растений, выращиваемых в условиях повышенных концентраций  $\text{CO}_2$ , хорошо изучена [17, 18]. Однако подобная стимуляция часто является непостоянной, и в процессе акклимации растений к повышенной концентрации  $\text{CO}_2$  происходит снижение фотосинтетической активности и

уменьшение стимуляции роста растений [19, 20]. Это может быть связано с накоплением сахаров, приводящим к понижению концентрации Рубиско и снижению интенсивности фотосинтеза [21]. В наших экспериментах при выращивании растений *K. prostrata* в условиях повышенной концентрации CO<sub>2</sub> наблюдали небольшое снижение сухой биомассы растений (рис. 1а), которое сопровождалось увеличением содержания пролина и ионов калия (рис. 3б, г). Данный вид, являясь эу-галофитом, обладает специфическими адаптационными механизмами солеустойчивости, в которых большую роль играет накопление ионов натрия и калия в тканях. Наличие таких механизмов и их эффективное функционирование показано на галофите *Salicornia ramosissima* в условиях повышенной концентрации CO<sub>2</sub> (700 ppm) и засоления (510 mM NaCl) [22]. Совместное влияние данных факторов привело к улучшению водного баланса растений за счет сокращения устьичной проводимости и увеличения осмотического потенциала. Несмотря на эти положительные эффекты, существенных изменений в приросте биомассы не наблюдалось. Авторы этот факт объясняют более высокими энергетическими затратами на механизмы защиты от солевого стресса, в том числе связанные с повышением концентрации антиоксидантных пигментов и активности антиоксидантных ферментов [22]. В наших экспериментах, чтобы избежать солевого стресса, мы выращивали растения *K. prostrata* при незначительном содержании ионов натрия в питательном растворе (0.13 mM) и достоверных изменений в содержании Na<sup>+</sup> в побегах растений при разных концентрациях CO<sub>2</sub> не



**Рис. 4.** Анализ главных компонент (PCA) исследованных параметров (биомасса, эффективность фотосистем, содержание воды, пролина, ионов натрия, калия, Рубиско и ФЕПк), участвующих в процессе акклимации растений *Kochia prostrata* к высокой концентрации CO<sub>2</sub>. 1 – Растения, выращенные при 400 ppm CO<sub>2</sub>; 2 – растения, выращенные при 800 ppm CO<sub>2</sub>.

наблюдалось (рис. 3в). В то же время, как следует из полученных результатов, высокая концентрация CO<sub>2</sub> стимулировала увеличение содержания ионов калия и пролина (рис. 3б, г). Как известно, калий является жизненно важным макроэлементом,

**Таблица 1.** Факторные нагрузки физиологических параметров на главные компоненты (PC1 и PC2) многофакторного анализа (PCA) растений *Kochia prostrata* при действии разных концентраций CO<sub>2</sub> (400 и 800 ppm)

Параметры	PC1	PC2
Сырая биомасса	-0.1381	0.5407
Сухая биомасса	-0.2891	0.3676
Длина побега	0.0143	0.6599
Фотосистема I	-0.3362	-0.1192
Фотосистема II	0.1132	-0.0860
Содержание воды	-0.2247	0.0557
Содержание пролина	<b>0.3954</b>	-0.0953
Содержание K <sup>+</sup>	<b>0.4123</b>	0.0697
Содержание Na <sup>+</sup>	-0.3193	-0.0855
Содержание Рубиско	<b>0.4041</b>	0.0750
Содержание ФЕПк	0.3591	0.2920

Примечание. Наиболее значимые параметры выделены полужирным шрифтом.

который выполняет функции, связанные с активацией ферментов, поддержанием осмоса и тургора, размножением клеток, регуляцией электрического мембранного потенциала и гомеостазом pH [23]. Аминокислота пролин играет важную роль в обмене веществ и развитии растений, участвует в поддержании клеточного гомеостаза, включая редокс-баланс и энергетический статус. При действии стрессовых факторов пролин может функционировать как превосходный осмолит, антиоксидант и сигнальная молекула [24]. Повышенное накопление ионов калия и пролина обеспечивали стабильное состояние водного баланса растений *K. prostrata*, что подтверждается постоянным содержанием воды в побегах, а также отсутствием снижения максимального квантового выхода ФС II (рис. 1б, в). Однако, в связи с тем, что процессы накопления ионов калия и биосинтеза пролина являются энергозатратными [23, 24], их стимуляция может служить одной из причин снижения сухой биомассы растений.

В проведенных нами экспериментах у растений *K. prostrata*, выращенных в условиях повышенной концентрации CO<sub>2</sub>, наблюдалось снижение времени выхода на плато кинетической кривой ФС I (в 1.7 раза) (рис. 1г), что свидетельствует об уменьшении интенсивности циклического транспорта электронов, в ходе которого осуществляется синтез дополнительного АТФ, необходимого для эффективного функционирования С<sub>4</sub>-УКМ [6]. Чувствительность фотосинтетической ЭТЦ к повышению концентрации CO<sub>2</sub> была показана и другими авторами при исследовании ключевых генов и молекулярно-биологических процессов, реагирующих на изменение концентрации CO<sub>2</sub> [25, 26]. Таким образом, снижение сухого веса растений *K. prostrata* при высокой концентрации CO<sub>2</sub> может быть связано также с уменьшением интенсивности циклического транспорта электронов ФС I и, возможно, с менее эффективным функционированием С<sub>4</sub>-пути фотосинтеза.

С помощью вестерн-блоттинга и специфических антител к ключевым ферментам С<sub>3</sub>- и С<sub>4</sub>-путей фотосинтеза (к большой субъединице Рубиско и ФЕПк) было показано, что в условиях высокой концентрации CO<sub>2</sub> у растений *K. prostrata* значительно увеличивалось содержание фотосинтетических ферментов: Рубиско в 3 раза, ФЕПк на 16% (рис. 2). Это привело к возрастанию отношения содержания Рубиско/ФЕПк почти в 3 раза (рис. 3а), что может свидетельствовать об активации менее эффективного С<sub>3</sub>-пути фотосинтеза у С<sub>4</sub>-галофита *K. prostrata* под влиянием повышенной концентрации CO<sub>2</sub>, и также может вносить вклад в снижение сухого веса растений. Увеличение содержания Рубиско может быть связано с воздействием высокой концентрации CO<sub>2</sub> на механизмы регуляции экспрессии генов Рубиско в

клетках мезофилла. Известно, что на ранних стадиях развития листьев амаранта мРНК Рубиско присутствует как в клетках-предшественниках КО, так и в КМ, хотя белки Рубиско накапливаются только в КО [7]. В зрелых листьях проявляется специфичность к КО на уровнях мРНК и накопления белка. Активация механизмов КО-специфичности генов *rbcL* и *RbcS* в развивающихся листьях С<sub>4</sub>-растений происходит в ответ на эндогенные и экзогенные сигналы. В частности, показано, что гены Рубиско очень чувствительны к факторам изменения климата [27] и поэтому высокая концентрация CO<sub>2</sub> может выступить в роли такого экзогенного фактора. Установлено, что повышенный уровень CO<sub>2</sub> по-разному влияет на экспрессию фотосинтетических генов, связанных с синтезом Рубиско [26] и ФЕПк [28]. Например, экспрессия генов, кодирующих субъединицы Рубиско может как активироваться [26], так и ингибироваться [29]. Клеточно-специфическое накопление белков в КМ или КО, характерное для С<sub>4</sub>-пути фотосинтеза, опосредуется событиями на различных уровнях регуляции экспрессии генов [27]. В тоже время, при исследовании регуляторных механизмов экспрессии клеточно-специфических генов выявлено сходство в системах их контроля, а именно *цис*-элементы, *транс*-факторы и другие регуляторы одинаковы у растений с С<sub>3</sub> и С<sub>4</sub>-путями фотосинтеза [30].

Проведенный РСА анализ показал, что значимыми переменными в реакции растений *K. prostrata* на высокий уровень CO<sub>2</sub> являются содержание ионов калия, Рубиско и пролина (рис. 4, табл. 1). Вероятно, высокая концентрация CO<sub>2</sub> стимулирует биосинтез главного фотосинтетического фермента С<sub>3</sub>-пути у С<sub>4</sub>-вида, а пролин и ионы калия обеспечивают стабилизацию водного обмена, необходимого для активного биосинтеза и эффективного функционирования Рубиско. Итак, у С<sub>4</sub>-вида *K. prostrata* в условиях повышенной концентрации CO<sub>2</sub> наблюдается небольшое снижение сухой биомассы, значительное увеличение соотношения Рубиско/ФЕПк, снижение активности циклического транспорта электронов ФС I, необходимого для синтеза дополнительного АТФ и эффективного функционирования С<sub>4</sub>-УКМ, а также увеличение содержания пролина и жизненно важных ионов калия.

Полученные результаты позволяют предположить, что повышенный уровень концентрации CO<sub>2</sub> (особенно в условиях отсутствия засоления) активизирует С<sub>3</sub>-путь фотосинтеза в КМ и в КО проводящих пучков листьев С<sub>4</sub>-галофита *K. prostrata*.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-

либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sage R.F., Sage T.L., Kocacinar F. Photorespiration and the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis // Annu. Rev. Plant Biol. 2012. V. 63. P. 19.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105511>
2. Raven J.A., Beardall J., Sánchez-Baracaldo P. The possible evolution and future of CO<sub>2</sub>-concentrating mechanisms // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. P. 3701.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erx110>
3. Arrivault S., Moraes T.A., Obata T., Medeiros D.B., Fernie A.R., Boulouis A., Ludwig M., Lunn J.E., Borghi G.L., Schlereth A., Guenther M., Stitt M. Metabolite profiles reveal inter-specific variation in operation of the Calvin-Benson cycle in both C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub> plants // J. Exp. Bot. 2019. V. 70. P. 1843.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz051>
4. Lara M.V., Andreo C.S. C<sub>4</sub> plants adaptation to high levels of CO<sub>2</sub> and to drought environments // Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations / Eds. Shanker A., Venkateswarlu B. InTech: Croatia, 2011. V. 18. P. 415.  
<https://doi.org/10.5772/24936>
5. Edwards G.E., Walker D.A. C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>: Mechanism, and Cellular and Environmental Regulation, of Photosynthesis / Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1983, 542 p.
6. Nakamura N., Iwano M., Havaux M., Yokota A., Munekage Y.N. Promotion of cyclic electron transport around photosystem I during the evolution of NADP malic enzyme-type C photosynthesis in the genus *Flaveria* // New Phytol. 2013. V. 199. P. 832.  
<https://doi.org/10.1111/nph.12296>
7. Berry J.O., Mure C.M., Yerramsetty P. Regulation of Rubisco gene expression in C<sub>4</sub> plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2016. V. 31. P. 23.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.03.004>
8. Westhoff P., Gowik U. Evolution of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase. Genes and proteins: a case study with the genus *Flaveria* // Ann. Bot. 2004. V. 93. P. 13.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mch003>
9. Ghannoum O., von Caemmerer S., Ziska L.H., Conroy J.P. The growth response of C<sub>4</sub> plants to rising atmospheric CO<sub>2</sub> partial pressure: a reassessment // Plant Cell Environ. 2000. V. 23. P. 931.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00609.x>
10. Reddy A.R., Rasineni G.K., Raghavendra A.S. The impact of global elevated CO<sub>2</sub> concentration on photosynthesis and plant productivity // Curr. Sci. 2010. V. 99. P. 46.
11. Watling J.R., Press M.C., Quick W.P. Elevated CO<sub>2</sub> induces biochemical and ultrastructural changes in leaves of the C<sub>4</sub> cereal sorghum // Plant Physiol. 2000. V. 123. P. 1143.  
<https://doi.org/10.1104/pp.123.3.1143>
12. Sage R.F. How terrestrial organisms sense, signal and respond to carbon dioxide // Integ. and Comp. Biol. 2002. V. 42. P. 469.  
<https://doi.org/10.1093/icb/42.3.469>
13. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. 1973. V. 39. P. 205.  
<https://doi.org/10.1007/BF00018060>
14. Пожудаева Е.С. Вестерн-блот-гибридизация // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2011. С. 228.
15. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680.  
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
16. Drake B.G., Gonzalez-Meler M.A., Long S.P. More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO<sub>2</sub>? // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1997. V. 48. P. 609.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.609>
17. Ainsworth E.A., Rogers A. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO<sub>2</sub>]: mechanisms and environmental interactions // Plant Cell Environ. 2007. V. 30. P. 258.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01641.x>
18. Dusenke M.E., Duarte A.G., Way D.A. Plant carbon metabolism and climate change: elevated CO<sub>2</sub> and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration // New Phytol. 2019. V. 221. P. 32.  
<https://doi.org/10.1111/nph.15283>
19. Leuzinger S., Luo Y., Beier C., Dieleman W., Vicca S., Körner C. Do global change experiments overestimate impacts on terrestrial ecosystems? // Trends Ecol. Evol. 2011. V. 26. P. 236.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.02.011>
20. Warren J.M., Jensen A.M., Medlyn B.E., Norby R.J., Tissue D.T. Carbon dioxide stimulation of photosynthesis in *Liquidambar styraciflua* is not sustained during a 12-year field experiment // AoB Plants. 2015. V. 7: plu074.  
<https://doi.org/10.1093/aobpla/plu074>
21. Moore B.D., Cheng S.-H., Sims D., Seemann J.R. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> // Plant Cell Environ. 1999. V. 22. P. 567.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1999.00432.x>
22. Pérez-Romero J.A., Idaszkin Y.L., Barcia-Piedras J.M., Duarte B., Redondo-Gómez S. Caçador I., Mateos-Naranjo E. Disentangling the effect of atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment on the halophyte *Salicornia ramosissima* J. Woods physiological performance under optimal and suboptimal saline conditions // Plant Physiol. Biochem. 2018. V. 127. P. 617.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.041>
23. Ragel P., Raddatz N., Leidi E.O., Quintero F.J., Pardo J.M. Regulation of K<sup>+</sup> nutrition in plants // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 281.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00281>
24. Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M.N., Wani A.S., Pichtel J., Ahmad A. Role of proline under changing environ-



- ments: a review // *Plant Signal Behav.* 2012. V. 7. P. 1456.  
<https://doi.org/10.4161/psb.21949>
25. *Zheng S., Chen Z., Nie H., Sun S., Zhou D., Wang T., Zhai X., Liu T., Xing G., Li M.* Identification of differentially expressed photosynthesis- and sugar synthesis-related genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants grown under different CO<sub>2</sub> concentrations // *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2020. V. 34. P. 84.  
<https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1715833>
26. *Zhao X., Li W.F., Wang Y., Ma Z.H., Yang S.J., Zhou Q., Mao J., Chen B.H.* Elevated CO<sub>2</sub> concentration promotes photosynthesis of grape (*Vitis vinifera* L. cv. 'Pinot noir') plantlet in vitro by regulating RbcS and Rca revealed by proteomic and transcriptomic profiles // *BMC Plant Biol.* 2019. V. 19. P. 42.  
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-1644-y>
27. *Hibberd J.M., Covshoff S.* The regulation of gene expression required for C<sub>4</sub> photosynthesis // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010. V. 61. P. 181.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112238>
28. *Silva R.G.D., Alves R.D.C., Zingaretti S.M.* Increased [CO<sub>2</sub>] causes changes in physiological and genetic responses in C<sub>4</sub> crops: a brief review // *Plants.* 2020. V. 9. P. 1567.  
<https://doi.org/10.3390/plants9111567>
29. *Huang Y., Fang R., Li Y., Liu X., Wang G., Yin K., Jin J., Herbert S.J.* Warming and elevated CO<sub>2</sub> alter the transcriptomic response of maize (*Zea mays* L.) at the silking stage // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 17948.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-54325-5>
30. *Reeves G., Grangé-Guermente M.J., Hibberd J.M.* Regulatory gateways for cell-specific gene expression in C<sub>4</sub> leaves with Kranz anatomy // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. P. 107.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw438>