

УДК 581.132:577.124

ИЗОТОПНЫЕ ДАННЫЕ ПОКАЗЫВАЮТ: УГЛЕРОДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ КЛЕТКЕ — КОЛЕБАТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС

А.А. ИВЛЕВ

(Кафедра неорганической и аналитической химии)

Предлагаемая осцилляционная концепция рассматривает фотосинтез как колебательный процесс, состоящий из фазы ассимиляции CO_2 и фазы фотодыхания, во время которых меняется движение потока углеродных субстратов в цикле Кальвина. Смена режимов функционирования цикла происходит благодаря двойственной способности ключевого фермента фотосинтеза — Рубиско работать как карбоксилаза и как оксигеназа в зависимости от периодически меняющегося в клетке отношения концентраций CO_2/O_2 . Концепция обосновывается большим фактическим материалом, в основном связанным с фракционированием изотопов углерода в клетке. Данный материал включает факты, свидетельствующие о существовании в клетке двух изотопноразличающихся потоков углеродных субстратов, подтверждающие связь внутримолекулярной изотопной неоднородности в глюкозе крахмала запасующих органов растений с фотодыхательной фазой работы цикла Кальвина, данные по динамике изотопного состава углерода CO_2 при темновом дыхании, а также факты, не связанные с изотопными эффектами.

Ключевые слова: гипотеза о фотосинтетических осцилляциях.

Анализ литературы по фотосинтезу показывает, что практически все исследователи, занимающиеся изучением углеродного метаболизма, считают, что фотосинтез - стационарный процесс, в котором все реакции на свету протекают непрерывно, одновременно и в стационарном режиме. С этих позиций делаются попытки его описать [29, 43, 44]. В настоящей работе, опираясь на изотопные данные по углероду ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), мы попытаемся аргументировать другое утверждение: фотосинтез - это колебательный процесс, состоящий в чередовании процессов ассимиляции CO_2 и фотодыхания, что соответствует смене направления движения потоков углеродных субстратов в цикле Кальвина с синтеза глюкозо-

6-фосфата (Г6Ф) из CO_2 в фазу ассимиляции на окисление образовавшегося Г6Ф до CO_2 в фазу фотодыхания. Регулятором переключений является ключевой фермент фотосинтеза Рубиско (рибулозобисфосфаткарбоксилаза / оксигеназа), способный функционировать как карбоксилаза и как оксигеназа в зависимости от периодически меняющегося в клетке отношения концентраций CO_2/O_2 [34].

Первым шагом в направлении доказательства колебательной природы фотосинтеза явился открытый нами в 1993 г. изотопный эффект фото дыхания со знаком, противоположным знаку изотопного эффекта фотосинтетической ассимиляции [8]. До этого считалось, что фотосинтез сопровождается

только изотопным эффектом ассимиляции CO_2 , который приводит к обогащению ассимилированного углерода (биомассы) изотопом ^{12}C относительно CO_2 атмосферы. Этот феномен был назван изотопной дискриминацией ^{13}C . Мы обратили внимание на некоторые факты, которые не укладывались в эту гипотезу и считались артефактами. Это накопление ^{13}C в первичных ассимилятах [23], преимущественное поглощение ^{13}C , а не ^{12}C в опытах по газообмену [3]. Обычно упомянутые факты отмечались, когда вместо CO_2 воздуха использовался CO_2 , обогащенный «тяжелым» изотопом ^{13}C . При постепенном увеличении в питающем CO_2 содержания «тяжелого» изотопа отмечалась инверсия знака изотопного эффекта. В биомассе накапливался изотоп ^{13}C [5]. Сопоставив эти и другие факты, связанные с влиянием на изотопную дискриминацию таких внешних факторов, как соленость, влагодоступность, интенсивность освещения, отношение CO_2/O_2 в среде, мы пришли к выводу, что, вероятно, существует другой, неизвестный в то время, изотопный эффект, который, скорее всего, связан с фотодыханием и имеет знак противоположный знаку эффекта ассимиляции. Его не обнаруживали, поскольку он маскировался большим по величине изотопным эффектом ассимиляции CO_2 . Проанализировав гликолатный путь фотодыхания, мы пришли к выводу, что узлом фракционирования изотопов углерода, по-видимому, является реакция ферментативного декарбоксилирования глицина — одна из ключевых реакций фотодыхания [34]. Сделав такое предположение, мы вместе с проф. А.У. Игамбердиевым и его сотрудниками стали исследовать эту реакцию *in vitro* и, действительно, обнаружили в ней фракционирование изотопов углерода, но эффекты были обоих знаков [3, 12]. Доказать, что *in vivo* возникает эффект со знаком, противоположным знаку эффекта ассимиляции удалось после того как совмест-

но с зарубежными исследователями мы изучили фотодыхание у дикого вида ячменя и ячменя-мутанта с редуцированной глициндегидрогеназной функцией [30]. Для этого методами генной инженерии в пластиды растения был внедрен модифицированный ферментный комплекс. Предсказанное обогащение биомассы мутантного растения легким изотопом ^{12}C по сравнению с диким видом подтвердилось (табл. 1) Это означало, что *in vivo* при фотодыхании возникает эффект, сопровождаемый утяжелением биомассы, и местом его возникновения является реакция декарбоксилирования глицина.

Таблица 1
Изотопный состав углерода листа ячменя дикого вида и ГДГ-мутанта [29]
(n — число опытов)

Растение	Возраст, нед.	$\delta^{13}\text{C}\%$
Ячмень, дикий вид	1	$-39,0 \pm 0,7$ (n=4)
	6	$-31,3 \pm 0,6$ (n=2)
Ячмень, ГДГ-мутант	1	$-45,5 \pm 0,6$ (n=5)
	6	$-37,5 \pm 0,3$ (n=4)

Примечание. Принято изотопный состав углерода образцов выражать в единицах δ , представляющих нормированную разность отношений изотопных концентраций $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в образце и стандарте

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{\text{обр}} - \left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{\text{станд}}}{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{\text{станд}}} \cdot 10^3. \text{ В качестве}$$

стандарта используется изотопный состав углерода карбоната кальция из белемнита, в котором отношение $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ равно $1123 \cdot 10^5$.

Здесь и далее величины $\delta^{13}\text{C}\%$ даны в ‰ относительно стандарта РДВ.

Точно такие же опыты были повторены на арабидопсисе и картофеле. Получены аналогичные результаты [31].

Каким же образом представление о двух изотопных эффектах с противоположными знаками, сопровождающих фотосинтез, приводит к выводу о колебательном характере самого процесса? Чтобы ответить на этот вопрос, рассмотрим, каким образом в клетке

происходит периодическое изменение концентраций CO_2/O_2 , переключающее Рубиско с карбоксилазной функции на оксигеназную и обратно.

Вероятный механизм переключений [33] основан на следующем допущении. Скорость ферментативных реакций карбоксилирования РибФ и декарбоксилирования глицина существенно больше скорости диффузии CO_2 в клетку и из нее. В пользу этого говорит низкая энергия активации, экспериментально обнаруженная при изучении проводимости по CO_2 клеток мезофилла (10,2-12,5 кДж/моль при 15~25°C) [21].

Тогда в некоторый момент времени (т. 1 на рис. 1), соответствующий карбоксилазной фазе функционирования РБФК/О, когда концентрация CO_2 в клетке равна концентрации CO_2 в среде, углекислый газ поступает в клетку благодаря градиенту концентрации в среде и у мест карбоксилирования, создаваемому фиксацией углекислого газа на ферменте. Так как скорость

карбоксилирования РибФ на ферменте выше скорости диффузии, концентрация CO_2 , а точнее отношение концентраций CO_2/O_2 (концентрацию O_2 в клетке мы принимаем постоянной) падает вплоть до некоторого критического уровня (т. 2 на рис. 1), соответствующего переключению Рубиско на оксигеназную функцию. На участке 1-2 диффузия CO_2 увеличивает его концентрацию в клетке, а карбоксилирование уменьшает, т.е. их влияние противоположно (показано стрелками на рис.1). Чтобы избежать потерь на бесполезную рециркуляцию субстрата, переключения в клетке должны происходить триггерно (резко).

После переключения на оксигеназную функцию Рубиско концентрация CO_2 в клетке начинает возрастать, только на этот раз скорость диффузии CO_2 оказывается меньше скорости глицидекарбоксилазной реакции. Благодаря этому концентрация CO_2 в клетке возрастает, достигает уровня содержания в среде (т. 3 на рис. 1), а затем

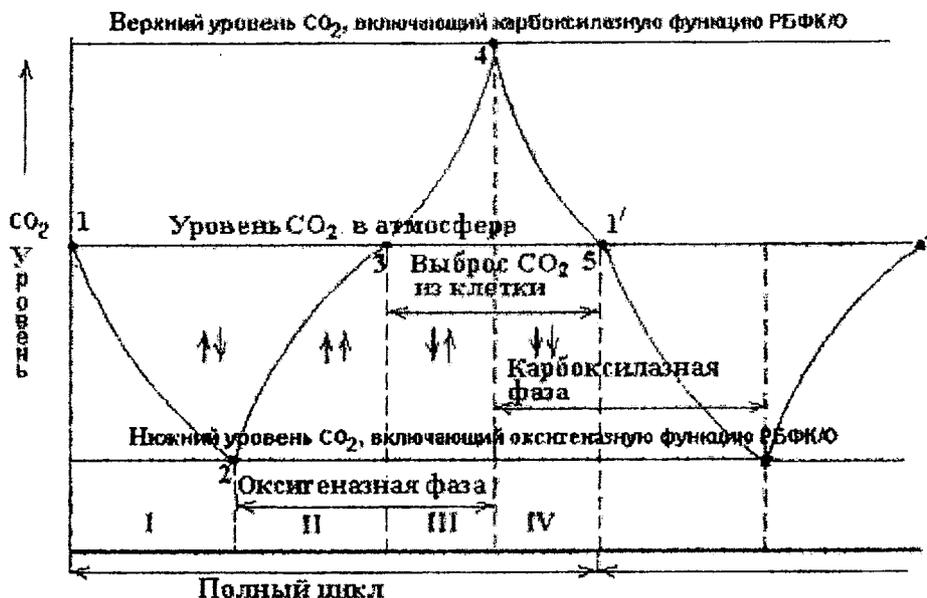


Рис. 1. Схема предполагаемого механизма переключения РБФК/О с карбоксилазной функции на оксигеназную и обратно

превосходит его. На этом временном участке, соответствующем отрезку 2-3 кривой изменения концентраций, глициндекарбоксилазная реакция и диффузия действуют в одном направлении, увеличивая концентрацию CO_2 в клетке. На временном отрезке 3-4 концентрация CO_2 возрастает до тех пор, пока не достигнет верхнего критического значения, соответствующего переключению фермента на карбоксилазную функцию (т. 4 на рис. 1). При этом влияние диффузии и реакции декарбоксилирования глицина на концентрацию CO_2 в клетке будет противоположным. Диффузия будет приводить к выбросу углекислого газа в среду, т.е. к понижению его концентрации внутри клетки, а реакция - наоборот. После переключения фермента на карбоксилазную функцию (отрезок 4-1') влияние диффузии и реакции карбоксилирования вновь становится однонаправленным в сторону снижения концентрации CO_2 в клетке. Это будет продолжаться вплоть до момента, пока концентрация в клетке не сравняется с концентрацией CO_2 в среде (т. Г на рис. 1). Далее все процессы повторяются. Из механизма следует, что собственно фотодыхание, под которым понимается удаление CO_2 из клетки в среду, захватывает только часть оксигеназной фазы (кривая 3-4) и часть карбоксилазной фазы (кривая 4-1'), когда концентрация CO_2 в клетке выше, чем в среде. В рассмотренном механизме точки пороговых значений отношений CO_2/O_2 2 и 4, при которых происходит срабатывание фермента со сменой функции, играют особую роль. По существу, они определяют продолжительность фаз ассимиляции и фотодыхания и вклад последних в метаболизм фотосинтеза. Пороговые значения CO_2/O_2 зависят от ряда факторов, в т.ч. внешних, и связаны с адаптационной способностью организма.

В карбоксилазную фазу работы Рубиско цикл Кальвина работает на карбоксилирование, как показано на ри-

сунке 2. Так как при этом происходит фракционирование изотопов углерода при карбоксилировании РибФ, то образующийся в эту фазу Г6Ф оказывается обогащенным ^{12}C относительно CO_2 среды на величину изотопной дискриминации. Более того, благодаря рандомизации атомов в транскетолазных и трансальдолазных реакциях, атомы углерода в Г6Ф и в других ассимилятах, образующихся в эту фазу, оказываются приблизительно одного и того же изотопного состава. Часть Г6Ф, образующегося в карбоксилазную фазу, запасается в резервных углеводных фондах в виде полисахаридов, которые используются клеткой в темновой период для синтеза определенных метаболитов. Изотопный состав последних и распределение изотопов углерода будет определяться соответствующими характеристиками Г6Ф.

После переключения Рубиско на оксигеназную функцию оставшийся в фонде Г6Ф в виде лабильных углеводов устремляется в гликолатную цепь фотодыхания, где происходит синтез продуктов фотодыхания (оксалатов, гликолевой кислоты, ряда аминокислот серина, глицина, пролина) (рис. 3). Часть Г6Ф запасается в виде сахаразы, из которой в темновой период происходит синтез органических кислот. Поскольку в гликолатной цепи фотодыхания происходит фракционирование изотопов углерода в глициндекарбоксилазной реакции, в фонде Г6Ф, питающем фото дыхательную петлю, накапливается «тяжелый» изотоп ^{13}C . Причем, чем интенсивнее фотодыхание (чем большее число оборотов совершает углеродный поток в фотодыхательной петле), тем сильнее аккумулируется в фонде Г6Ф изотоп ^{13}C . В силу кинетической природы изотопного эффекта декарбоксилирования глицина (изотопный эффект проявляется лишь по местам деструкции углеродных связей) изотопное распределение Г6Ф в оксигеназную фазу становится неоднородным, порождая «тяжелый»

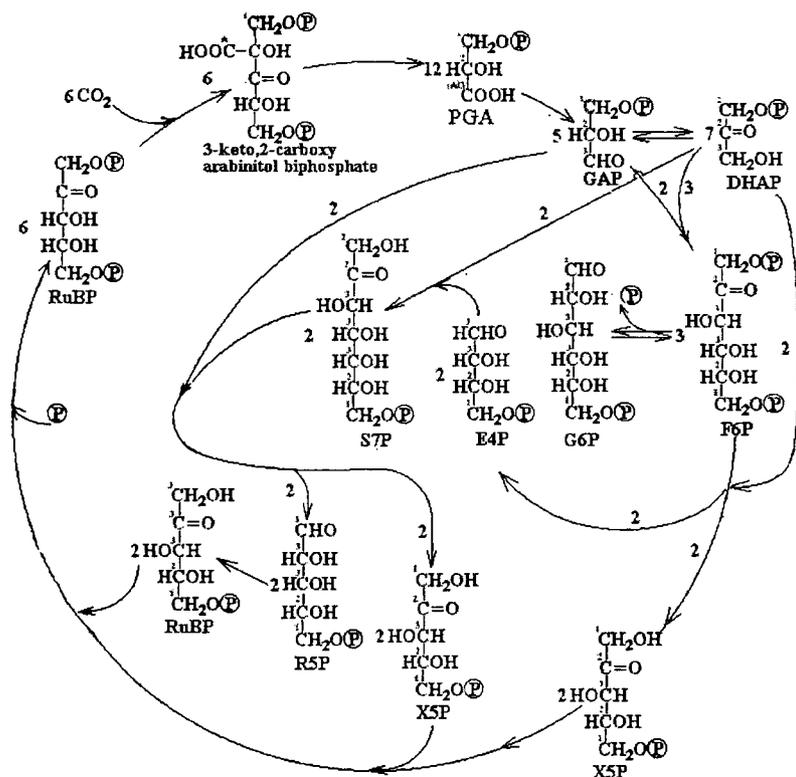


Рис. 2. Схема работы цикла Кальвина в карбоксилазную фазу функционирования Рубиско

изотопный состав и неравномерное изотопное распределение в тех метаболитах, синтез которых связан с фондом Г6Ф в эту фазу. Такова последовательность метаболических событий, вытекающая из представлений о колебательном характере фотосинтеза и возникающем при этом сопряжении изотопных эффектов.

Факты и теоретические основания, говорящие в пользу гипотезы об осцилляциях

Как же аргументировать описанную последовательность событий?

1. Прежде всего, она предполагает существование «легкого» и «тяжелого» потоков метаболитов, источником углерода для которых является Г6Ф, накапливаемый в карбоксилазную и окси-

геназную фазы соответственно. Действительно, как видно из таблиц 2-4, к «легкому» потоку относятся метаболиты, синтез которых связан с гликолитической цепью (большинство аминокислот, липидов), к «тяжелому» потоку — метаболиты фотодыхания (лабильные сахара, оксалаты, пролин) и органические кислоты. Это имеет место независимо от типа фотосинтезирующего организма.

На рисунке 4 представлены некоторые растительные глюкозилонаты. Это сложные молекулы, в синтезе которых принимают участие оба потока. В амигдалине и глюкозинолбине углеводные фрагменты значительно «тяжелее» агликоновых частей [42]. В холиновом эфире синаповой кислоты холиновый спирт синтезируется с участи-

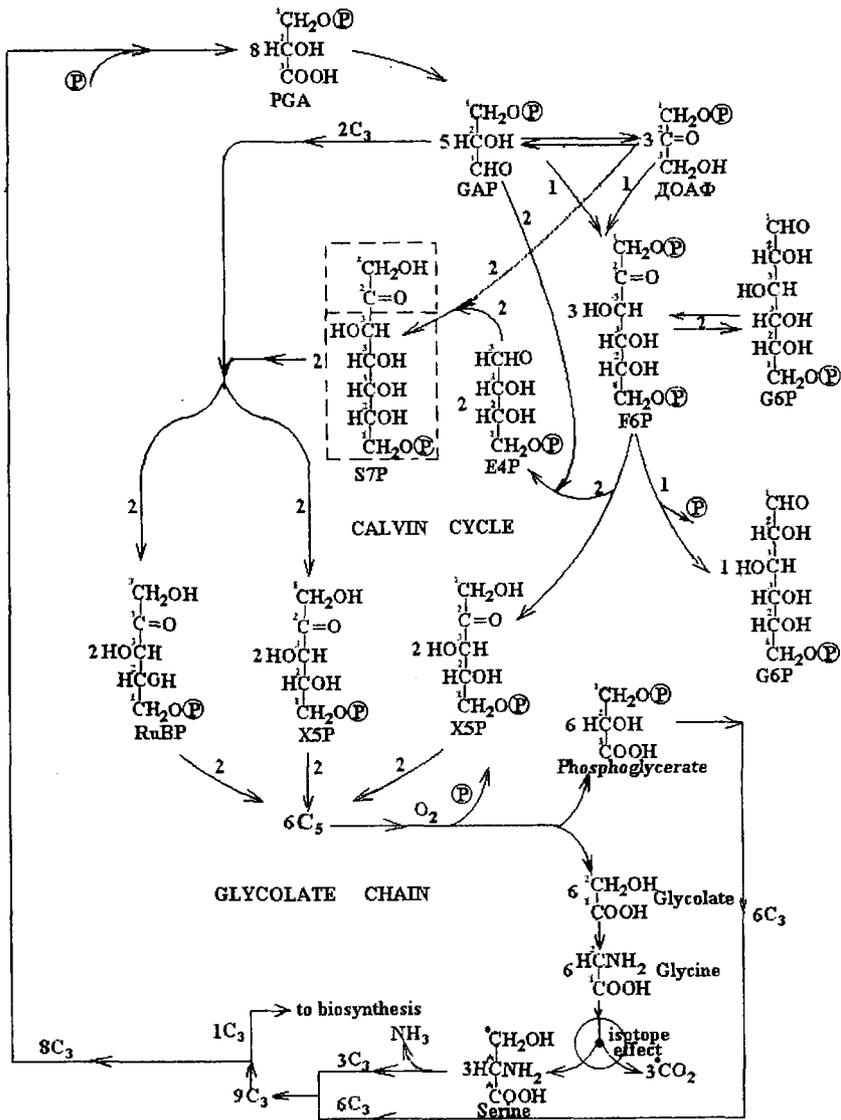


Рис. 3. Схема работы цикла Кальвина в оксигеназную фазу функционирования Рубиско

ем серина [6], углеродный скелет которого также значительно «тяжелее» остальной части молекулы. Обогащенность изотопом ^{13}C во всех случаях объясняется синтезом из углеводов, накапливаемых в оксигеназную фазу.

2. Другим аргументом в пользу осцилляционной концепции стало обнаружение специфической изотопной

неоднородности в углеродном скелете Г6Ф, синтезированного в оксигеназную фазу. Она, как было сказано выше, обусловлена кинетической природой изотопного эффекта, сопровождающего декарбоксилирование глицина. Чтобы представить, каким должно быть распределение изотопов углерода в Г6Ф, следует иметь в виду, что в гли-

Таблица 2
Распределение ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ в PDB единицах)
в биомассе и биохимических фракциях
морской водоросли *Chorella*
***stigmatophora*, выращенной в условиях**
различной солености.
 $\delta^{13}\text{C}$ питающей CO_2 -21‰ [11,17].

Параметр	Концентрация NaCl в среде, mM		
	0	425	595
Сухая биомасса, %	-61,6	-59,0	-64,5
Липиды, %	-66,0	-65,0	-63,8
Белки, %	-42,1	-40,9	-47,3
Лабильные сахара, %	-30,0	—	-30,5
Пролин, %	-29,0	—	-31,5

колатный цикл поступает Г6Ф, накопленный в карбоксилазную фазу и имеющий практически равномерное распределение изотопов углерода в скелете.

На первом витке гликолатного цикла до начала декарбоксилирования у глицина сохраняется равномерное распределение изотопов, унаследованное от исходного Г6Ф. Однако после превращения в митохондрии двух молекул глицина в серин и отщепления CO_2 в образующемся серине распределение изотопов углерода становится неравномерным. Поскольку далее серин ис-

Таблица 3
Изотопный состав углерода биохимических фракций,
выделенных из листьев *Clusia minor*, выросших при различных внешних условиях [27].
Пробы отобраны на рассвете и на закате

Фракция	Мокрый сезон		Сухой сезон	
	«экспониров» лист	«затененный» лист	«экспониров» лист	«затененный» лист
	рассвет	рассвет	закат	закат
Общий углерод	-25,7	-30,3	-24,6	-29,1
Липиды и пигменты	-28,7	-32,2	-27,7	-30,8
Аминокислоты	-31,7	-32,6	-31,3	-32,7
Растворимые сахара	-21,2	-29,2	-17,9	-21,9
Органические кислоты	-22,3	-27,7	-21,1	-24,5

Таблица 4
Изотопный состав углерода листа и оксалата некоторых C_3
оксалатнакапливающих растений [37,38]

Вид растения	Тип ассимиляции	Лист	Оксалаты	Ссылка
<i>Spinaceae oleracea</i>	C_3	-27,5	-11,9	37
<i>Spinaceae oleracea</i>	C_3	-25,7	-19,9	38
<i>Pelagronium</i>	C_3	-31,0	-12,4	37
<i>Mereurialis perennis</i>	C_3	-27,9	-13,7	37
<i>Echinomastus intertextus</i>	CAM	-13,4	-7,3	38
<i>Echinomastus horizontholomus</i>	CAM	-13,0	-7,8	38
<i>Escobaria ruberouloza</i>	CAM	-12,3	-8,3	38
<i>Opuntia euglemannii</i>	CAM	-13,3	-8,5	38
<i>Opuntia imbricata</i>	CAM	-14,1	-8,7	38

пользуется при синтезе Г6Ф, последний также приобретает изотопную неоднородность. Для того чтобы оценить изотопную неоднородность серина, рассмотрим фракционирование изотопов, которое происходит в глицин-

дегидрогеназном комплексе (рис. 5). При декарбоксилировании глицина в силу кинетического изотопного эффекта деструкции C - C связи в углеродных атомах недеструктурированного глицина накапливается изотоп ^{13}C (на рис. 5 ато-

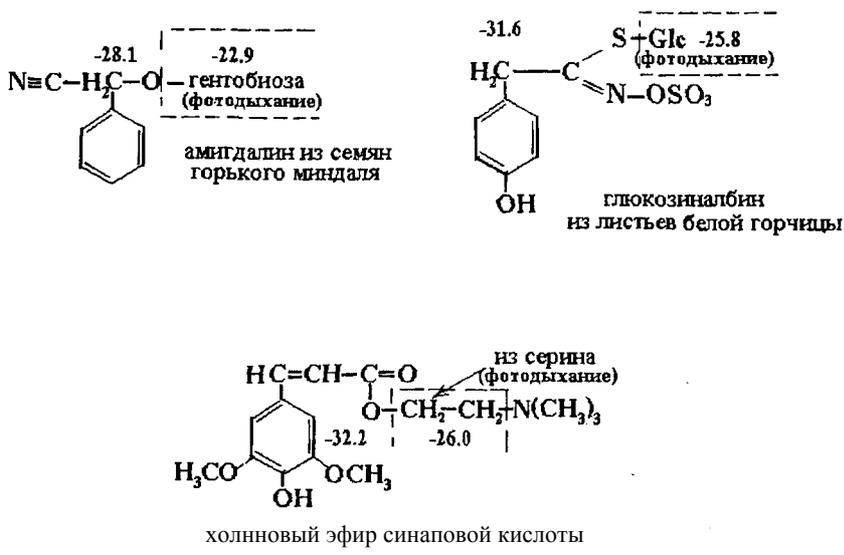


Рис. 4. Изотопное распределение углерода в некоторых растительных глюкозилонатах. Цифры рядом с молекулами обозначают величины $\delta^{13}\text{C}$ изученных частей. Данные из работы [20]

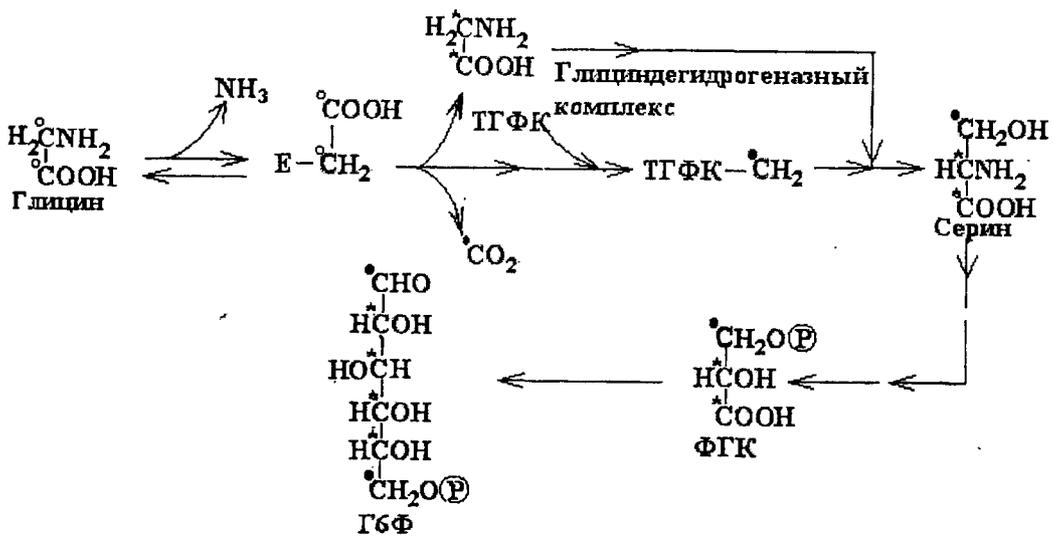


Рис. 5. Схема реакций, происходящих в глицидегидрогеназном комплексе, поясняющая возникновение изотопной неоднородности в Г6Ф в оксигеназную фазу работы Рубиско. Пояснения в тексте

мы обозначены звездочкой), а в образующемся CO_2 и в метиленовой группе, которая связывается с переносчиком одноуглеродных фрагментов тетрагидрофолиевой кислотой (ТГФК)

накапливается ^{12}C (на рис. 5 помечены залитыми кружочками). ТГФК переносит метиленовый атом и присоединяет его к молекуле недеструктурированного глицина, который превращается в се-

рин [36]. Таким образом, у серина карбоксильный и смежный с ним атом углерода оказываются обогащенными «тяжелым» изотопом, а концевой метоксильный атом — «легким».

При синтезе Г6Ф из серина его скелет формируется таким образом, что «тяжелый» карбоксильный атом серина оказывается в положениях С-3 и С-4 атомов Г6Ф. Атомы в положениях С-2 и С-5 в результате перемешивания оказываются несколько «легче», чем С-3 и С-4, но «тяжелее» общего углерода Г6Ф, а атомы в положении С-1 и С-6 Г6Ф оказываются «легче», чем углерод исходного субстрата. Расчет численного примера [6], представленный в таблице 5, показывает, что

на втором и последующих оборотах цикла эта неравномерность сохраняется и усиливается. Чем больше интенсивность фотодыхания, т.е. чем больше оборотов делает углеродный поток в фотодыхательной петле, тем «тяжелее» становится углерод Г6Ф, и тем сильнее изотопные различия атомов, составляющих его скелет (см. табл. 5).

Анализ имеющегося в литературе материала по изучению изотопного распределения углерода в углеводной фракции растений выявил, что распределение, сходное с вышеописанным, имеет глюкоза, выделенная из крахмала их запасующих органов (табл. 6). Следовательно, есть основания считать, что крахмал запасующих орга-

Таблица 5

Результаты расчёта распределения изотопов углерода Г6Ф, остающегося в фотодыхательном фонде по мере его исчерпания за п оборотов цикла Кальвина

Номер атома	Число оборотов, п								
	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1	-20,3	-20,7	-21,1	-21,4	-21,9	-22,4	-23,0	-23,7	-24,6
2	-19,7	-19,4	-19,1	-18,7	-18,3	-17,8	-17,2	-16,4	-15,2
3	-19,5	-18,8	-18,1	-17,3	-16,4	-15,2	-13,8	-11,9	-8,8
4	-19,5	-18,8	-18,1	-17,3	-16,4	-15,2	-13,8	-11,9	-8,8
5	-19,7	-19,4	-19,1	-18,7	-18,3	-17,8	-17,2	-16,4	-15,2
6	-20,0	-20,7	-21,1	-21,4	-21,9	-22,4	-23,0	-23,0	-24,6

Примечание. Расчёт проводился с учётом величины кинетического изотопного эффекта декарбоксилирования глицина, равной $\alpha = {}^{12}\text{C}/{}^{13}\text{C} = 1,020$. Изотопной состав углеродных атомов Г6Ф, поступающего в цикл после карбоксилазной фазы, принят равным -20‰ [6].

Таблица 6

Распределение изотопов углерода в глюкозе крахмала запасующих органов ряда растений [4,13, 39]

Объект	$\delta^{13}\text{C}$ глюкозы	$\Delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_i - \delta^{13}\text{C}_{\text{глюкозы}}$, i- номер атома					
		ОСН ₍₁₎ - НС ₍₂₎ ОН - ОНС ₍₃₎ Н - НС ₍₄₎ ОН - НС ₍₅₎ ОН - С ₍₆₎ Н ₂ ОН					
		C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
<i>Beta vulgaris</i> , клубень	-25,2	-1,6	-0,4	+2,1	+6,3	-1,7	-5,1
<i>Zea mays</i> , семена	-10,8	-1,7	-0,1	+1,1	+3,6	-0,2	-3,6
<i>Zea mays</i> , семена	-12,5	-3,1		+1,9			-1,9
<i>Triticum aestivum</i> , семена	-23,1	-7,1		+3,5*			-7,1
<i>Solanum tuberosum</i> , клубень	-24,9	-9,1		+4,5*			-9,1
<i>Oryza sativa</i> , семена	-26,1	-6,9		+3,5*			-6,9
<i>Pisum sativum</i> , семена	-24,9	-4,1		+2,1*			-4,1

Примечание. Изотопные сдвиги углеродных атомов $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) приведены относительно общего углерода глюкозы.

Величины $\delta^{13}\text{C}$ атомов С-3 и С-4 рассчитывались по данным [24] из предположения, что изотопный состав углерода остальных атомов равен изотопному составу атомов С-1

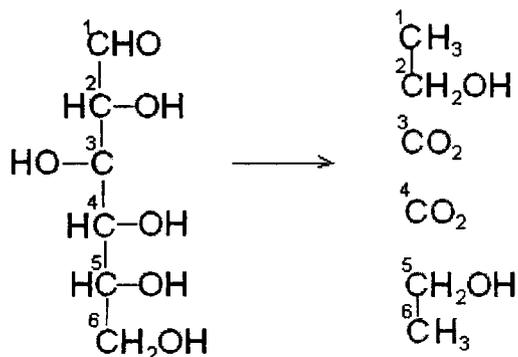


Рис. 6. Схема, иллюстрирующая унаследованность углеродных атомов глюкозы продуктами ее деструкции при ферментации

нов растений синтезируется с участием Г6Ф, образующегося в фазу фотодыхания.

С этим согласуется и изотопное распределение, полученное при анализе продуктов деструкции глюкозы при ее ферментации [28]. Как видно из рисунка 6, образующийся при ферментации CO_2 наследует атомы С-3 и С-4 глюкозы, а этиловый спирт — атомы С-1, С-2, С-5 и С-6 соответственно. Собранный углекислый газ оказался заметно «тяжелее» общего углерода молекулы, а углерод этанола, напротив, «легче». Другими словами, все исследователи получили согласующиеся между собой результаты.

Следовательно, можно сделать вывод, что в глюкозе крахмала запасующих органов растений изотопное распределение соответствует предсказываемому для глюкозы, синтезируемой в оксигеназную фазу, а значит, является аргументом в пользу существования осцилляций.

В пользу этого говорит и то, что запасующие органы растений формируются на поздних этапах онтогенеза, когда растения проявляют многочисленные признаки того, что в это время фотодыхание значительно усиливается. Действительно, на этапах цветения, созревания и плодоношения

происходит накопление в старых листьях окисленных продуктов гликолатного цикла, увеличивается концентрация перекиси водорода, усиливается активность пероксидазы [15, 16]. На усиление фотодыхания указывает и наблюдаемое в эти периоды изотопное утяжеление биомассы растений [35], и ряд других признаков [32, 41].

Возможный вклад в образование глюкозы крахмала запасующих органов глюкозы, синтезированной в карбоксилазной фазе, не может исказить вышеописанное изотопное распределение, поскольку глюкоза, синтезируемая в карбоксилазной фазе, должна иметь приблизительно равномерное изотопное распределение. Сказанное не только свидетельствует в пользу осцилляций, но также позволяет сделать вывод о значительной биосинтетической роли фотодыхания, особенно проявляющегося на стадии формирования запасующих органов.

3. Другое свидетельство существования фотодыхательной глюкозы, а значит и двух фаз колебательного режима у цикла Кальвина, дает сопоставление внутримолекулярных изотопных распределений глюкозы крахмала запасующих органов у C_3 и C_4 -растений. Хобби и Вернер [28], изучив такие распределения и усреднив их, установили, что у глюкозы крахмала из C_3 -растений изотопная неоднородность выражена гораздо резче. Результаты их исследования представлены в таблице 7, из которой видно, что в C_4 -растениях глюкоза крахмала имеет принципиально такое же распределение, как и глюкоза крахмала у C_3 -растений, только внутримолекулярная изотопная неоднородность у нее гораздо менее выражена. Эта особенность согласуется с тем известным фактом, что C_3 -растения отличаются от C_4 -растений гораздо более интенсивным фотодыханием. Выше отмечалось, что чем интенсивней фотодыхание, тем сильнее выражено изотопное утяжеление глюкозы и тем больше прояв-

Таблица 7
Сопоставление усредненных изотопных распределений в глюкозе крахмала из запасающих органов у C₃ и C₄-растений [28]

Номер атома	$\Delta(C_3)$	$\Delta(C_4)$	$\Delta(C_3 - C_4)$
C-1	-1,3	+0,9	-2,2
C-2	-0,9	-0,1	-0,8
C-3	+1,9	-0,7	+2,6
C-4	+6,3	+5,2	+1,1
C-5	-1,1	-0,1	-1,0
C-6	-4,9	-4,8	-0,1

Примечание. Деструкция глюкозы проводилась путем ферментации. Цифры в столбцах представляют разность изотопного состава общего углерода глюкозы и изотопного состава углерода в *i*-м положении в C₃ и C₄-растениях ($\Delta_i = \delta^{13}C_i - C_{total}$). В последнем столбце приведены разности между изотопным составом углерода в каждом положении у C₃ и C₄-растений

ляется ее изотопная неоднородность, что подтверждается данными таблицы 7.

4. Информация, полученная при изучении темнового дыхания у C₃-растений, также свидетельствует в пользу фотосинтетических осцилляций. Группа ученых из нескольких стран, используя новейший настраиваемый диодный лазерный спектрометр, позволяющий одновременно определять интенсивность темнового дыхания и изотопный состав выдыхаемого CO₂, исследовала темновое дыхание *Ricinus communis* L. в опытах по газообмену в контролируемых условиях [26]. Результаты приведены в таблице 8.

Было обнаружено (см. табл. 8), что в первые 15 мин после выключения света наблюдается интенсивное дыхание

Таблица 8
Временная динамика величины $\delta^{13}C$ CO₂, выдыхаемого листьями *Ricinus communis* L. в темноте в газобменной камере, совмещенной с настраиваемым диодным лазерным спектрометром [26]*

Время после выключения света	$\Delta = \delta^{13}C_{CO_2} - \delta^{13}C_{субстрат}$	Предполагаемый субстрат для темнового дыхания
10–15 мин от начала темнового периода	До +11‰	Сахара из флоэмного сока
30–60 мин от начала темнового периода	От +3 до +7‰	Сахара из флоэмного сока
2–5 ч после начала темнового периода	До +4,5‰	Сахара из флоэмного сока
24 ч после начала темнового периода	-1,1‰	Сахара из флоэмного сока + вклад продуктов деструкции липидов
48 ч после начала темнового периода	-1,6‰	Сахара из флоэмного сока + вклад продуктов деструкции липидов

* Условия эксперимента: обильное увлажнение; не менее чем за 20 мин до выключения света экспонирование светом высокой интенсивности.

и CO₂ по изотопному составу углерода значительно тяжелее предполагаемого субстрата — сахаров из флоэмного сока растений. Более того, оказалось, что если перед выключением осветить растение светом высокой интенсивности, изотопное утяжеление еще более усиливается. В последующий час интенсивность дыхания и изотопное утяжеление снижаются. При пролон-

гации темнового периода более чем на 24 ч и после 48 ч изотопный состав углерода CO₂ становится обогащенным изотопом ¹²C относительно исходного субстрата. Авторы не смогли объяснить эту динамику и источник столь «тяжелых» субстратов.

Объяснение дает осцилляционная гипотеза. Как было сказано, после переключения Рубиско на оксигеназную

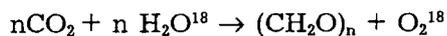
функцию лабильные сахара не только питают фотодыхательную цепь, но одновременно поступают во флоэму. Поэтому сахара флоэмного сока не только обогащены изотопом ^{13}C , но их гексозные звенья имеют неравномерное распределение изотопов углерода, в котором атомы С-3 и С-4 утяжелены сильнее других. Освещение светом высокой интенсивности перед его выключением должно приводить к усилению фотодыхания, поскольку интенсивность освещения является одним из факторов, стимулирующих фотодыхание [2]. Это, в свою очередь, еще больше усиливает обогащение сахаров флоэмного сока изотопом ^{13}C , а в гексозах сахаров увеличивается внутримолекулярная изотопная неоднородность.

При выключении света сначала начинают разрушаться накопленные лабильные сахара, превращаясь в органические кислоты. На это указывают данные Борланд и др. [27], обнаруживших четкую связь между сахарами, накопленными в световой период, и синтезом органических кислот — в темновой. Одновременно прослеживается тесная корреляция и по изотопному составу сахаров и органических кислот. Авторы [26] также высказали предположение, что интенсивное дыхание, которое начинается сразу после выключения света, связано с синтезом органических кислот. Если это так, то становится понятным причина очень тяжелого изотопного состава CO_2 , обусловленного этим синтезом. При деструкции сахаров атомы С-3 и С-4 гексоз отщепляются и фиксируются в виде CO_2 темнового дыхания, а двухуглеродные фрагменты используются на синтез углеродного скелета ди- и трикарбоновых кислот. Изотопный состав CO_2 , выдыхаемого в первые 15 мин после выключения света по величине обогащенности изотопом ^{13}C , как раз соответствует обогащению атомов С-3 и С-4 Г6Ф (см. табл. 5).

Облегчение изотопного состава CO_2 при пролонгировании темнового пери-

ода (см. табл. 7) связано уже не фотосинтезом, а с колебаниями в гликолитической цепи, период колебаний которых составляет приблизительно 24 ч [24]. При этом в отсутствие поступления глюкозы из цикла Кальвина (цикл в темноте не работает), основную роль начинает играть ресинтез глюкозы за счет продуктов распада липидов и белков [36]. Поскольку последние в целом обогащены изотопом ^{12}C , это и является причиной обогащения легким изотопом CO_2 при пролонгировании темноты.

5. Еще один аргумент в пользу фотосинтетических осцилляций дает рассмотрение связи изотопного состава кислорода, образующегося при фотосинтезе, с ассимиляцией CO_2 . Еще в 1941 г. Виноградов и Тейс [1], используя меченую воду H_2O^{18} , выяснили, что кислород, выделяемый при фотосинтезе, происходит из воды.



Однако долгое время оставалась загадкой обогащенность выделяющегося O_2 «тяжелым» кислородом по сравнению с кислородом воды. В последующих опытах [2, 19, 20] было показано, что утяжеление $^{18}\text{O}_2$ возникает вследствие светоиндуцированного поглощения кислорода при ассимиляции. Оно, как выяснили авторы, является следствием фотодыхания и релеевского истощения изотопа ^{16}O (преимущественного поглощения $^{16}\text{O}_2$ при дыхании на свету), сопровождающих этот процесс. В подтверждение своего вывода авторы приводят экспериментально изученную связь обогащенности выдыхаемого на свету кислорода изотопом ^{18}O с интенсивностью дыхания на свету, с содержанием в среде ассимилируемого углерода CO_2 (или бикарбонат иона) и с интенсивностью освещения, т.е. с факторами, влияющими на интенсивность фотодыхания [20]. Наблюдаемая у разных фотосинтезирующих организмов связь обогащенности кислорода ^{18}O с факторами, влияю-

щими на интенсивность фотодыхания (интенсивность света, концентрация питающей CO_2) [19], обусловлена разной интенсивностью фотодыхания (разной степенью истощения образовавшейся порции кислорода), определяемой вышеупомянутыми факторами. Но истощение кислорода возможно лишь в том случае, если кислород при фотосинтезе образуется в виде отдельных порций. При этом порция кислорода образуется, если в процесс фотосинтеза CO_2 вовлекается в виде отдельных порций. Еще в 1989 г., анализируя изотопные эффекты углерода при фотосинтетической ассимиляции CO_2 , мы высказали гипотезу [9], что CO_2 поступает в клетку не сплошным потоком, а дискретно. Сейчас природа дискретности стала понятной: она связана с периодическими переключениями Рубиско с карбоксилазной функции на оксигеназную и обратно и с чередованием процессов ассимиляции и фотодыхания. Это и находит свое подтверждение в изотопных эффектах по кислороду.

6. Осцилляционная гипотеза подтверждается не только изотопными данными. Явление постиллюминационного всплеска CO_2 (post illumination burst, PIB) [25], возникающего сразу после выключения света, свидетельствует, что ассимиляция CO_2 и процесс фотодыхания разнесены во времени [13], а это согласуется с колебаниями. О том же свидетельствует появление двух пиков на кривой замедленной люминесценции хлорофилла. Первый пик соответствует влиянию на фотосистему II цикла Кальвина, работающего в режиме карбоксилирования, второй его влиянию, когда он работает в режиме оксигенирования [43]. Пики разнесены во времени на 1.6 с.

В работе [40] обнаружены периодические колебания концентрации CO_2 в межклеточном пространстве листа при концентрациях CO_2 , близких к точке компенсации, т.е. тогда, когда фотодыхание проявляется сильнее всего.

Авторы склонны считать эти колебания проявлением переключений Рубиско, о которых шла речь.

Заключение

Таким образом, рассмотренный фактический материал подводит серьезную основу под осцилляционную концепцию фотосинтеза. Последняя позволяет совершенно по-новому рассматривать фундаментальные вопросы организации и регуляции фотосинтеза и открывает новые возможности в интерпретации фактического материала. Несомненно, что при ее использовании появятся и новые возможности в решении прикладных вопросов — повышения продуктивности с.-х. культур, выведения сортов, устойчивых к неблагоприятным внешним факторам.

Библиографический список

1. *Виноградов А.П., Тейс Р.В.* Изотопный состав кислорода разного происхождения // Доклады АН СССР, 1960. Т. 33. № 9. — 2. *Виноградов А.П., Кутпюрин В.М., Улубекова М.В., Задорожный П.К.* Изотопный состав кислорода фотосинтеза и дыхание // Доклады АН СССР, 1960. Т.134. № 6. — 3. *Вознесенский В.Л., Глаголева Т.А., Зубкова Е.А., Мамушина Н.С., Филипова Л.А., Чулановская М.В.* Метаболизм ^{14}C при длительном выращивании хлореллы в присутствии $^{14}\text{CO}_2$ // Физиология растений, 1982. Т. 29. С. 564-571. — 4. *Галимов Э.М., Кодина Л.А., Генералова В.Н., Богачева М.В.* The 8th International Congress on Organic Geochemistry. Moscow, // Thesis dokl., 1977. Vol.2. — 5. *Иванов М.В., Зякун А.М., Гоготлова Е.И., Дондарь В.А.* Разделение изотопов углерода фотосинтезирующими бактериями, растущими на бикарбонате, обогащенном изотопом ^{13}C // Доклады АН СССР, 1978. Т. 242. С. 1417-420. — 6. *Ивлев А.А.* Изотопный эффект в глициндегидрогеназной реакции — причина внутримолекулярной изотопной неоднородности углерода глюкозы крахмала, синтезируемого при фотодыхании // Биофизика, 2005. Т.50. №6. С.1079—1086. — 7. *Ивлев А.А.* Вклад фотодыхания в изменения изотопноуглеродных характерис-

тик растений при воздействии стрессовых факторов // Физиология растений, 2004. Т. 49. № 2. С. 303-313. — 8. *Ивлев АЛ.* О потоках «лёгкого» и «тяжёлого» углерода при сопряжении фотосинтеза и фотодыхания // Физиология растений, 1993. Т.40. С.872-880. — 9. *Ивлев АЛ.* О дискретности процесса ассимиляции CO₂ на свету C₃-растениями // Биофизика, 1989. Т.34. Вып.5. С.887-891. — 10. *Ивлев А.А.* О природе изотопных эффектов углерода в живой клетке // Биофизика, 1985. Т. 30. Вып. 3. С. 506-515. — 11. *Ивлев А.А., Калинкина Л.Г.* Экспериментальные свидетельства существования изотопного эффекта фотодыхания // Физиология растений, 2001. Т. 48. С. 467—480. — 12. *Ивлев А.А., Игамбердиев А.У. Трелкелд Ч., Быкова Н.В.* Изотопные эффекты углерода в глициндекарбоксилазной реакции *in vitro* на митохондриях из гороха и шпината // Физиология растений, 1999. Т. 46. №5. С. 748-756. — 13. *Ивлев А.А., Лапин А.В., Бризанова Л.Я.* Распределение изотопов углерода (¹²C/¹³C) в глюкозе крахмала кукурузы // Физиология растений, 1987. Т.34. Вып. 3. С. 493-498. — 15. *Игамбердиев А.У.* Пероксисомальное окисление в растениях // Физиология растений, 1991. Т. 38. С. 774-786. — 16. *Игамбердиев А.У.* Роль микротелец в организации метаболических путей растений // Успехи современной биологии, 1990. Т.109.С. 65-76. — 17. *Калинкина Л.Г., Удельнова Т.М.* Влияние фотодыхания на фракционирование стабильных изотопов углерода у морской хлореллы // Физиология растений, 1990.Т.37.С. 96—104. — 18. *Кукушкин А.К., Солдатова Е.А.* Влияние фотодыхания на индукцию замедленной миллисекундной люминесценции хлорофилла фотосистемы II высушенных растений: теоретическое исследование // Биофизика, 1996. Т. 41. С. 440—444. — 19. *Кутюрин В.М.* Водное происхождение кислорода фотосинтеза и изменчивость изотопного состава кислорода, выделяемого растениями / Очерки современной геохимии и аналитической химии. М.: Наука, 1972. С.508-513. — 20. *Кутюрин В.М., Назаров Н.М., Семенюк К.Г.* О кислородном обмене между водой хлоропластов и комплексом, выделяющим кислород фотосинтеза // Докл. АН СССР, 1966. Т.171.

№ 1. — 21. *Лайск А. Х.* Кинетика фотосинтеза и фотодыхания у C-3 растений. М.: Наука, 1977. — 22. *Ленинджер А.* Биохимия М.: Мир. 1974. — 23. *Санадзе Г.А., Блэк Л.Л., Тевзадзе И.Т., Тархнишвили Г.М.* Изменение отношения ¹³CO₂/¹²CO₂ при фотосинтезе растениями C₃ и C₄ // Физиология растений, 1978. Т.25. С. 171-172. — 24. *Сельков Е.Е.* Временная организация энергетического метаболизма и клеточные часы // Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние организма / Под ред. М.Н.Кондрашовой. М.: Наука, 1978. С.15-32. — 25. *Atkin O.K., Gardstrom P., Day D.A.* Photosynthesis, carbohydrate metabolism and respiration in leaves of higher plants // In: Leegood R.C., Dharkey T.D., von Caemmerer S., eds. / Advances in photosynthesis. Photosynthesis: physiology and metabolism. V. 9 Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. P. 153-175. — 26. *Barbour M.M., McDowell N.G., Tcherkez G. Bickford Ch.P., Hanson D.* A new measurement technique reveals rapid post illumination changes in the carbon isotope composition of leaf-respired CO₂ // Plant Cell and Environment, 2007. V.30. P. 469-482. — 27. *Borland A.M., Griffiths H., Broadmeadow M.S., Fordham M.C., Maxwell C.* Carbon Isotope Composition of Biochemical Fractions and the Regulation of Carbon Balance in Leaves of the C₃-Crassulacean Acid Metabolism Intermediate *Clusia minor* L. Growing in Trinidad // Plant Physiol, 1994. V.105: P.493-501. — 28. *Hobbie E.A., Werner R.A.* Intramolecular, compound-specific, and bulk carbon isotope patterns in C₃ and C₄ plants: a review and synthesis // New Phytologist, 2004. V. 161. P. 371-385. — 29. *Farquhar G.D., O'Leary M.H., Berry J.A.* On the relationship between carbon isotope discrimination and intercellular carbon dioxide concentration in leaves // Aust. J. Plant Physiol., 1982. V.9. P.121-137. — 30. *Igamberdiev A.U., Ivlev A.A., Bykova N.V., Threlkeld Ch., Lea P.J., Gardstrom P.* Decarboxylation of glycine contributes to carbon isotope fractionation in photosynthetic organisms // Photosynthesis Research, 2001 V.67. P.177-184. — 31. *Igamberdiev A.U. Milkelsen T.N., Ambus P., Bauwe H., Lea P.J., Gardstroff P.* Photorespiration contri-

- butes to stomatal regulation and carbon isotope fractionation : a study with barley, potato and *Arabidopsis* plants deficient in glycine decarboxylase // Photosynthesis Research, 2004. V.81. P.139-152. — 32. *Ivlev A.A., Igamberdiev A.Y., Bykova N.V.* Fractionation of carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) isotopes in glycine decarboxylase reaction // FEBS Letters, 1996. V.386. P.174-176. — 32. *Ivlev A.A., Igamberdiev A.Y., Bykova N.V.* Fractionation of carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) isotopes in glycine decarboxylase reaction // FEBS Letters, 1996. V.386. P.174-176. — 32. *Ивлев А.А., Пичужкин В.И. Князев Д.А.* Изменения изотопного состава углерода органов пшеницы в онтогенезе и их возможная связь с фотодыханием растений // Физиология растений, 2001. Т.46. №4. С. 517-526. — 33. *Ivlev A.A., Igamberdiev A.Y., Dubinsky A.Yu.* Isotopic composition of carbon metabolites and metabolic oscillations in the course of photosynthesis // Biophysics, 2004. V.49. Suppl. 1. P. 3-16. — 34. *Laing W.A., Orgen W.L., Hageman R.H.* Regulation of soybean net photosynthetic CO_2 fixation by interaction of CO_2 , O_2 and ribulose-1,5-biphosphate carboxylase // Plant Physiology, 1974. V.54. P.678-685. — 35. *Lerman J.C., Deleens E., A.Nato, A. Moysse* Variations in the Carbon isotope Composition of a Plant with Crassulecean Acid Metabolism// Plant Physiology, 1974. V. 53. P. 5811-584. — 36. *Oliver D.J., Neuberger H., Bourguignon J., Douce L.* // Glycine metabolism by plant mitochondria // Physiol. Plant, 1990. V.80. P.487-491. — 37. *Raven J.A., Griffiths H., Glidewell S.M., Preston T.* The mechanism oxalate biosynthesis in higher plants: investigations with the stable isotopes oxygen-18 and carbon-13// Proc.R.Soc. (London). Ser.B., 1982. V. 216. P. 87-101. — 38. *Rivera E.R., Smith B.N.* Crystal morphology and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ composition of solid oxalate in Cacti// Plant Physiol, 1979. V.64. P. 966-970. — 39. *Rofimann F., Butzenlechner M., Schmidt H.-L.* Evidence for nonstatistical carbon isotope distribution in natural glucose // Plant Physiology, 1991.V. 96. P. 609-614. — 40. *Roussel M.R., Ivlev A.A., Igamberdiev A.Y.* Oscillations of the internal CO_2 concentration in tobacco leaves transferred to low CO_2 // J. Plant Physiol, 2007. V. 164. P. 1188-1196. — 41. *Saranga Y., Flash I., Patersson A.H., Yakir D.* Carbon isotope ratio in cotton varies with growth stage and plant organ // Plant Science, 1999. V. 142. P. 47-56. — 42. *Schmidt H.-L., Kexel H., Butzenlechner M., Schwarz S., Gleixner G., Thimet S., Werner R.A. and Gensler M.* 2. Non-statistical isotope distribution in natural compounds: mirror of their biosynthesis and key for their origin assignment// Stable Isotopes in the Biosphere /eds.:Wada E., Yoneyama T., Mittleagawa M., Ando T. and Fry B.D. Kyoto : Kyoto University Press, 1995. P.17-35. — 43. *Tcherkez G., Farquhar G., Badek F., Ghashghaie J.* Theoretical considerations about carbon isotope distribution in glucose of C_3 plants // Funct. Plant Biology, 2004. V. 31. P. 857-877. — 44. *Vogel J.C.* Variability of Carbon Isotope Fractionation during Photosynthesis// Stable isotopes and plant carbon — water relations / Eds Ehleringer J.R., Hall A.E., Farquhar G.D. San Diego — Boston, 1993. P.29-46.

Рецензент — д. б. н. И.Г. Тараканов

SUMMARY

The oscillation concept assuming that photosynthetic oscillations appear to be a result of periodic changes of Calvin cycle regimes from CO_2 assimilation to photorespiration is suggested. The oscillations occur due to switching of the key photosynthetic enzyme Rubisco from carboxylase function to oxygenase with simultaneous change in carbon substrate flux directions in the Calvin cycle. The factual argumentation of the theory is considered. It is based on carbon isotope fractionation data that comprise the existence of two isotopically different carbon fluxes in a cell, the heterogeneous carbon isotope distribution in glucose from starch of storage organs that was proved for glucose formed in photorespiration phase, carbon isotope ratio dynamics of CO_2 expired in the dark, etc. Some non-isotopic data confirm this concept as well.