



УДК 581.132:577.21

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФОТОСИНТЕЗА И ПОПЫТКИ БИОИНЖЕНЕРИИ ПОВЫШЕНИЯ ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТИ

Н.А. Рябушкина

natrya7@yahoo.com

Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы

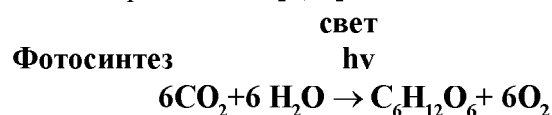
В обзоре кратко описаны отличительные особенности C_3 , C_4 и САМ фотосинтеза, карбоксилирующих ферментов; взаимоотношений фиксации CO_2 , дыхания и фотодыхания на свету; влияние на фотосинтетическую фиксацию температуры, освещенности и водообеспеченности. Приведены примеры трансформации C_3 растений с целью повышения продуктивности на основе интродукции ферментов: рибулезо-бисфосфат карбоксилазы и активазы, фосфоэнолпируват карбоксилазы и других ферментов C_4 пути; ферментов, участвующих в регенерации акцептора углекислоты; ферментов синтеза сахарозы и др., а также перспективы использования для трансформации факторов транскрипции.

Введение

Растения обладают уникальной особенностью создания органической материи с использованием энергии солнечного света, т.е. первичным механизмом фиксации неорганического углерода – фотосинтезом, дающим начало органическим углеродсодержащим химическим соединениям живой природы. Помимо растений, фотосинтез также имеет место в водорослях, диатомеях и определенных формах бактерий. Кроме того, так называемые хемосинтетики для создания органического вещества используют энергию, окисляя неорганические субстраты, например, ионы железа, серы. Но зеленые растения вносят определяющий вклад в поддерживающий биосферу процесс. Биосфера, т.е. значительная часть живого вокруг нас, в той или иной мере создана через посредство фотосинтеза, в процессе которого за счет энергии света из углекислого газа и воды создается органический углерод. При этом в качестве сопутствующего продукта выделяется кислород. Теория фотосинтеза сформировалась как одна из значительных областей естествознания XX века, как центральный аспект всей биологии растительных организмов [1, 2].

В ходе световой стадии фотосинтеза энергия света преобразуется фотохимическим аппаратом, и в результате фотохимических реакций генерируется ассимиляционная сила в форме НАДФН₂ и АТФ. Ассимиляционная сила используется в темновых реакциях фотосинтеза, а образующийся в процессе восстановления CO_2 углевод $[C_6H_{12}O_6]$ одновременно является материалом для строительства любого живого организма и депо химической энергии. Процесс фотосинтеза в растениях происходит в хлоропластах. В мембранах тилакоидов хлоропластов, образующих фотохимический аппарат, фотоны света реагируют с хлорофиллом, в процессе задействованы также дополнительные пигменты каротиноиды и фикобилины, причем хлорофиллы *a* и *b* чувствительны к синей и красной области спектра, а дополнительные пигменты расширяют спектральный диапазон фотосинтеза, передают энергию хлорофиллу и защищают его от окисления.

Сначала энергия света трансформируется в электрическую энергию, когда возбужденные светом электроны передаются от хлорофилла по цепи транспорта электронов в фотосистемах $II \rightarrow I$, при этом электрическая энергия преобразуется в энергию химических связей молекул АТФ и НАДФН₂. Молекулы воды в ходе световых реакций расщепляются (фотолиз) на кислород (O_2), ионы водорода (H^+) и электроны (e^-). Имен-





но разрыв связи Н-О, т.е. фотолиз воды, происходит за счет энергии света. Итак, в освещенном хлоропласте электроны через ряд переносчиков движутся от H_2O к $НАДФ^+$, восстанавливая его. Транспорт электронов приводит к образованию протонного градиента и разделению электрических зарядов, что в итоге стимулирует образование АТФ.

В строме хлоропластов – белковом геле, в который погружены тилакоиды, пластоглобулы и 70S-рибосомы, осуществляются темновые реакции цикла Бенсона – Кальвина (восстановительного пентозо-фосфатного цикла), присоединения водорода из воды к CO_2 , т.е. реакции восстановления с образованием углеводов с затратами энергии химических связей АТФ и $НАДФН_2$. Этот восстановительный цикл присущ всем растениям, независимо от их разделения на C_3 -, C_4 - и САМ типы фотосинтетической ассимиляции углерода. Собственно, цикл делится на три основных стадии: карбоксилирования рибулезо-бис-фосфата (РиБФ) с образованием двух молекул фосфоглицериновой кислоты (ФГК), восстановления ФГК с образованием 3-фосфоглицеринового альдегида и затем реакций регенерации РиБФ. Триозофосфаты являются ключевыми интермедиатами цикла Кальвина.

Во всех реакциях восстановления: присоединения водорода, удаления кислорода, смещения электрона в сторону восстанавливаемой группировки – энергия затрачивается и в случае фотосинтеза – это энергия фотонов света. Таким образом, в результате световых и темновых окислительно-восстановительных реакций фотосинтеза вода окисляется, отдавая водород и выделяя кислород, а двуокись углерода восстанавливается, присоединяя водород, до уровня углевода. Для восстановления одной молекулы CO_2 необходимы три молекулы АТФ и две молекулы $НАДФН_2$.

Углекислый газ, ассимилируемый растениями, попадает в листья из воздуха через устьица. Чем меньше сопротивление (закрытость) устьиц, тем больше углекислоты поступает в клетки мезофилла, при этом тем больше и транспирация, т.е. потери

воды. Вода, поступающая из корней по ксилеме в результате транспирационного тока, поднимает из корней минеральные элементы. Сахароза, синтезируемая из триозофосфатов, поступающих в цитоплазму из хлоропластов, является основной транспортной формой углеводов в растениях. Из клеток мезофилла она переносится во флоэму, и по ней в другие части растения, где непосредственно используется в органах и тканях для осуществления их жизнедеятельности, т.е. роста и развития. Скорость ее синтеза коррелирует со скоростью фотосинтеза. В случаях, когда абиотические стрессы приводят к изменениям в метаболизме углеводов, сахароза и ее метаболиты являются сигнальными элементами в ряде сигнальных путей для модулирования клеточного метаболизма, влияя на экспрессию генов, связанных с рядом метаболических процессов [3, 4]. В отличие от сахарозы полисахарид крахмал в клетках мезофилла синтезируется в хлоропластах и является временным запасом для «отложенного» спроса. Ночью происходит разложение крахмала, из продуктов его гидролиза синтезируется сахароза, которая экспортируется в потребляющие органы [5].

Ферменты карбоксилирования

Рибулезо-бисфосфат карбоксилаза (рубиско). Фермент, осуществляющий фиксацию CO_2 на РиБФ, составляет наибольшую часть белков листа и, очевидно, это самый распространенный фермент в природе. Столь большое количество фермента в листе компенсирует его низкую каталитическую активность. Рубиско – это гетерополимер, состоящий из двух типов субъединиц: восьми больших, кодируемых хлоропластным геномом, и восьми малых, кодируемых ядерным геномом. В растениях регуляция активности рубиско осуществляется различными механизмами, ионы магния необходимы для активности фермента. Индукция фермента происходит в присутствии триозофосфатов, ФГК, ортофосфат ингибирует активность. Согласно современным представлениям, неорганический фосфат не только обес-



печивает активный экспорт из цикла Кальвина и из хлоропластов триозофосфатов, из которых в цитоплазме синтезируется сахароза, но и препятствует обратному проникновению этих триоз в хлоропласт.

Абиотические факторы влияют на состояние рубиско. Количество фермента (как результат соотношения процессов синтеза и распада) и его активность чувствительны даже к краткосрочным флуктуациям условий окружающей среды, что в свою очередь регулируется экспрессией генов. В присутствии насыщающих концентраций CO_2 и соответствующих количеств неорганического фосфата скорость фотосинтеза определяется интенсивностью света и температурой. Фермент рубиско является термостабильным, повышающим каталитическую активность вплоть до температуры 45°C [6]. Но при интенсивности света выше оптимальной и/или на свету в условиях неоптимальных температур, как и в случае других абиотических стрессовых факторов, происходит накопление реактивных форм кислорода (reactive oxygen species, ROS), что, в частности, в хлоропластах приводит к окислительному повреждению мембран тилакоидов и стромальных белков, в том числе к деградации рубиско.

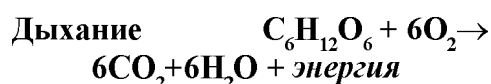
В ряде работ показано, что фермент подерживается в активном состоянии белком, называемым *активазой рубиско*. Предполагается, что активазы рубиско являются одной из ключевых регуляторных точек фотосинтеза. Многие растения имеют две и даже три изоформы активазы [7]. Активазы относятся к классу АТФаз и катализируют АТФ-зависимое удаление с рубиско различных фосфатов сахаров, являющихся ингибиторами [8]. Активность активазы регулируется отношением АТФ/АДФ и восстановительным потенциалом в хлоропласте [9]. Так, анализ 184 инбредных линий сои показал корреляцию уровня экспрессии генов двух изоформ активазы с активностью рубиско, скоростью фотосинтеза и урожаем семян, и исследователи делают вывод о важности генов активазы в регулировании фотосинтеза и урожая семян [10].

Фосфоэнолпируват карбоксилаза (ФЭПК). До определенного времени считалось, что рубиско является единственным ферментом растений, фиксирующим углекислоту, и первичный стабильный продукт фиксации – ФГК. Факт выявления высокой скорости и эффективности фотосинтеза в растениях сахарного тростника послужил открытию C_4 фотосинтеза. Особенность состояла в том, что первичными стабильными продуктами фиксации углекислоты оказались четырехуглеродные кислоты, а не трехуглеродная ФГК (первичный стабильный продукт рубиско), а первичным карбоксилирующим ферментом у этих растений оказалась ФЭПК. Известно, что в условиях повышенных температур и инсоляции так называемые C_4 -растения наиболее продуктивны. Более высокая продуктивность C_4 растений в соответствующих местообитаниях обусловлена в числе особенностей фермента ФЭПК. С одной стороны, ФЭПК в отличие от рубиско не обладает оксигеназной активностью (см. ниже фотодыхание). С другой, субстратом фермента является ион HCO_3^- , а не CO_2 . Фермент карбоангидраза, в зависимости от рН обратимо катализирующий взаимопревращения HCO_3^- и CO_2 в C_3 -растениях, в значительной степени локализован в строме хлоропластов и ответственен за поддержание необходимой концентрации CO_2 «вокруг» рубиско. Карбоангидраза C_4 -растений, катализирующая превращение CO_2 в $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, находится в цитозоле клеток мезофилла, как и ФЭПК. Углекислота, как только поступает в цитозол, превращается в HCO_3^- [11]. Активность ФЭПК максимальна при рН 8,0. При таком значении рН растворимость свободной CO_2 равна 7,4 мкМ, и CO_2 находится в равновесии с 331 мкМ HCO_3^- . Фотосинтез у C_4 растений близок к насыщению при атмосферной концентрации CO_2 , составляющей 0,03%. Для C_3 растений концентрация углекислоты в атмосфере далека от насыщающей. Более того, при высокой интенсивности освещения атмосферного уровня CO_2 может не хватить для насыщения фотосинтеза у C_3 растений даже при отсутствии кислородного ингибирования (фотодыхания).



Дыхание и фотодыхание

Продукты фотосинтеза используются в процессах окисления органических молекул в катаболических процессах дыхания (полного окисления до CO_2 и H_2O с запасанием восстановительной силы в молекулах АТФ и НАДН₂), а промежуточные продукты окисления – в анаболических реакциях синтезов структурных и функциональных метаболитов растения.



Дыхание включает в себя анаэробную стадию – гликолиз, в результате которой образуется пируват и АТФ. Пируват поступает в цикл Кребса митохондрий, в результате выделяются CO_2 и H_2O , образуются НАДН₂ и АТФ, а также промежуточные продукты – углеродные скелеты, которые могут быть использованы для синтезов. Это – аминокислоты для белков, нуклеотиды для нуклеиновых кислот, предшественники пигментов, и в конечном итоге, разнообразные вторичные метаболиты, способствующие адаптации растений к множеству абиотических и биотических стрессовых факторов среды. Таким образом, нормальное дыхание происходит в цитозоле (гликолиз) и митохондриях (цикл Кребса, и окислительное фосфорилирование в электрон-транспортной системе).

Одна из специфических особенностей любой эукариотической клетки – это компартментализация (пространственное разделение) метаболизма, функций в различных частях, органеллах клетки. Но при этом метаболизм каждого компартмента зависит от других частей клетки, это касается энергии, предшественников метаболитов и все компартменты «полагаются» на ядро и цитоплазматический рибосомальный аппарат для реализации жизнедеятельности клетки как целого. Итак, в условиях оптимальных температур, отсутствия водного дефицита и, соответственно, открытых устьицах в клетках мезофилла C_3 растений углекислота превращается в хлоропластах в триозофос-

фаты, существенная часть которых экспортируется из хлоропластов. Триозофосфаты либо превращаются в сахарозу для экспорта в другие ткани растения и запасания в вакуолях, либо первичные ассимиляты через гликолиз и митохондриальное дыхание превращаются в углеводородные скелеты, необходимые для биосинтезов, для ассимиляции азота, а также образования митохондриальной АТФ. Митохондрии растений находятся в условиях повышенного содержания кислорода и углеводов. Эти условия требуют существенной «пластичности» как электрон-транспортной цепи митохондрий, так и ферментов, связанных с окислением-восстановлением НАДФ. Отсюда очевидны функциональные особенности митохондрий в фотоассимилирующих клетках [12], что подтверждается, в частности, гетерогенностью митохондриального протеома в различных тканях [13]. Другими словами, в фотосинтезирующих клетках в интеграцию клеточной энергии и метаболизм восстановителей вовлечены как хлоропласты, так и митохондрии. Поэтому чрезвычайно важно знать, как осуществляются и контролируются все эти взаимосвязи [14].

В результате темнового дыхания выделяется примерно одна шестая часть углерода, фиксированного в фотосинтезе. На свету у C_3 растений выделяется от четверти до трети фиксируемого углерода. Причиной увеличения выделения CO_2 на свету является ингибирование рубиско кислородом, т.е. проявление **оксигеназной** функции фермента. Молекулы CO_2 и O_2 конкурируют за фермент и его субстрат РибФ. Поскольку CO_2 и O_2 конкурируют за один и тот же центр фермента, скорости этих двух реакций и, соответственно, конечный результат определяется концентрациями этих двух газов. Если первичным стабильным продуктом карбоксилазной активности рубиско являются 2 молекулы ФГК, то оксигеназной – одна молекула ФГК и гликолат (двухуглеродное соединение). Процесс получил название – **фотодыхание**, оно приводит к потере части фиксированного углерода при фотосинтезе и растрате энергии. Фотоды-



хание вовлекает кооперацию хлоропластов, пероксисом и митохондрий. Согласно [15], при атмосферной концентрации CO_2 и температуре около 25°C фотодыхание C_3 растений составляет 20-30% фотосинтеза. То, что эти потери реальны, подтверждают в том числе эксперименты [16]. В хлоропласты арабидопсиса с помощью трансформации были интродуцированы ферменты катаболизма гликолата из *Escherichia coli*, которые превращали гликолат в глицерат. Были получены растения, в которых был снижен поток метаболитов фотодыхания через пероксисомы и митохондрии. Растения росли быстрее, имели большую надземную и корневую биомассу, содержали большее количество растворимых сахаров.

Тем не менее, исследователи считают, что фотодыхание не совсем бесполезно для C_3 растений. В процессе фотодыхания может устраняться часть избыточной энергии, возникающей за счет фотохимических процессов, результатом которых может быть фотоокисление и разрушение фотосинтетического аппарата. Эта защита работает при ограничении доступа CO_2 – во время недостатка воды и, следовательно, закрывания устьиц, и/или при превышении оптимальных для растения температур. У C_4 растений фотодыхание отсутствует или очень невелико, благодаря концентрирующему углекислоту механизму в клетках обкладки и, соответственно, высокому отношению CO_2/O_2 при котором синтез гликолата подавлен. При недостатке воды и/или высоких температурах с увеличением сопротивления устьиц концентрация углекислоты может понизиться и синтез гликолата увеличится, но без видимой утечки CO_2 вследствие рефиксации (но с использованием дополнительной энергии на этот процесс). Строго говоря, в этих условиях отсутствует видимое фотодыхание, поскольку квантовый выход фотосинтеза все же снижается. Выращивание C_3 растений в атмосфере с пониженной концентрацией кислорода или с повышенной концентрацией углекислоты может приводить к существенному возрастанию биомассы этих растений, но увеличения массы

сухого вещества C_4 растений в подобных экспериментах не происходит, более того, пониженные концентрации кислорода могут приводить даже к ингибированию роста C_4 растений. Существует гипотеза, что фермент рубиско возник в ходе эволюции тогда, когда отношение CO_2/O_2 было выше и более благоприятствовало фотосинтезу, уровень фотодыхания был менее значителен. Упомянутое высокое содержание рубиско в тканях листа C_3 растений отчасти помогает сохранять фотосинтетическую активность при падении концентрации CO_2 .

С изменением условий окружающей среды, а именно с уменьшением отношения CO_2/O_2 в ходе эволюции возникла форма ФЭПК, устойчивая к O_2 . Изоформы ФЭПК встречаются у всех растений и во всех органах [2, 17, 18]. Фермент участвует в различных анаэробических реакциях метаболизма, таких как глюконеогенез и неавтотрофная фиксация CO_2 в листьях и нефотосинтезирующих тканях высших растений [19]. Гены ФЭПК принадлежат к мультигенному семейству с различающимися изоформами, из которых только одна вовлечена в C_4 фотосинтез [20]. Анализ филогенетического древа травянистых растений с использованием модели, включающей уровни атмосферной CO_2 , позволил исследователям связать снижение атмосферной углекислоты 32-25 млн. лет назад с переходом от C_3 к C_4 фотосинтезу в целом ряде семейств, произошедшем в это же время [21, 22]. Этот переход осуществлялся на основе набора генов, уже существовавших в C_3 растениях, сделав их соответствующие продукты – ферменты более эффективными в результате изменения их кинетических характеристик и компартментализации. Это явление, по определению исследователей, является наиболее удачным и значимым эволюционным приобретением в истории растений.

Влияние света, температуры и водообеспеченности на фотосинтез растений

Интенсивность фотосинтеза может изменяться в пределах двух порядков величин,



и эти различия определяются изменениями в *интенсивности света, температурных условиях, доступности воды, минеральных элементов*. Раньше было принято считать, что уровень физиологических процессов определяется фактором, находящимся в минимуме, однако ситуация усугубляется при отклонениях параметров от оптимумов сразу нескольких внешних факторов, что, как правило, и имеет место в естественных условиях. Эволюционно растения приспосабливаются к тем или иным местообитаниям, т.е. к определенным пределам внешних факторов среды.

Свет. Наряду с тем, что энергия света используется для создания ассимиляционной силы, свет регулирует активность многих ферментов хлоропластов, т.е. образование углеводов в темноте практически прекращается не только вследствие дефицита ассимиляционной силы, но и неактивности соответствующих ферментов. В C_3 -видах светоактивируемыми являются пять ферментов цикла Кальвина: стадии карбоксилирования – рубиско, восстановительной стадии – 3-фосфоглицеральдегид дегидрогеназа и стадии регенерации – фруктозо-1,6-бисфосфат фосфатаза, седогептулезо-1,7-бисфосфат фосфатаза и рибулезо-5-фосфат киназа. В C_4 -растениях активируются светом ферменты ФЭПК, НАДФ-малат дегидрогеназа (декарбоксилирующая малат) и пируват, ортофосфат дикиназа (способствующая образованию ФЭП, субстрата для ФЭПК), локализованные в мезофилле листа. Способ активации ряда ферментов светом заключается в преобразовании дисульфидных групп (S-S) в группы сульфгидрильные (-SH + -SH). Это преобразование катализируется ферментом ферредоксин-тиоредоксин редуктазой. Подобная модификация структуры ферментов существенно повышает их активность.

Активация светом собственно карбоксилирующих ферментов достаточно сложна и не вовлекает превращений дисульфидных связей в сульфгидрильные. Транспорт электронов и градиент pH через тилакоидную мембрану необходимы для активации

рубиско. Свет обуславливает транспорт протонов из стромы в тилакоиды, тем самым, сдвигая pH стромы от 7,0 до 8,0, это значение pH ближе к оптимуму фермента; увеличением выхода ионов магния из тилакоидов в строму в результате сдвига pH, а Mg^{2+} необходим для функционирования рубиско. Активация светом рубиско определяется также появлением на свету РибФ. Упомянутая выше активация рубиско функционирует на свету, ввиду доступности АТФ фотофосфорилирования. В ряде видов растений был выявлен ингибитор рубиско, который связан с ферментом в темноте, но инактивируется на свету. Наряду с этим, активность рубиско координирована с активностью других ферментов цикла Кальвина.

ФЭПК активируется на свету в клетках мезофилла C_4 -растений и инактивируется в темноте, очевидно для предотвращения фиксации углекислоты в этих условиях. Предполагается фосфорилирование фермента на свету протеин киназами, что и повышает его активность. Активность фермента существенно ингибируется малатом, в меньшей степени оксалоацетатом, т.е. имеет место feedback контроль (контроль продуктом реакции). У C_4 -растений свет является основным лимитирующим фактором при оптимальных температурах. Например, степень активации таких ферментов C_4 -пути, как пируват, ортофосфат дикиназа и НАДФ-малатдегидрогеназа зависит от интенсивности освещения. Относительно яркое освещение требуется и для открывания устьиц у C_4 -растений. У C_3 -растений в обычной атмосфере фотосинтез достигает насыщения при сравнительно слабом освещении, выше точки светового насыщения он начинает лимитироваться из-за кислородного ингибирования, т.е. фотодыхания. Когда концентрация CO_2 является насыщающей, при увеличении интенсивности света C_3 -растения ведут себя подобно C_4 -растениям.

Температура. C_3 -растения хорошо растут в интервале температур 15-25°C, а C_4 -растения при 25-35°C. Скорость фотосинтеза у C_3 -растений при температурах выше оптимума лимитируется из-за ограничен-



ной растворимости CO_2 и увеличения отношения растворимостей O_2/CO_2 . Температурный оптимум фотосинтеза повышается на несколько градусов при увеличении концентрации CO_2 . Темновое дыхание с увеличением температуры также растет, снижая реальную скорость фотосинтеза на свету. При температурах ниже 20°C снижение активности рубиско в C_4 -растениях лимитирует фотосинтез [23]. При низких температурах интенсивность фотосинтеза C_4 -пути может становиться даже ниже, чем у C_3 -растений. Например, пируват ортофосфат-дикиназа, катализирующая в C_4 -растениях превращение ПВК в ФЭП (субстрат для ФЭПК), при низкой температуре диссоциирует, превращаясь из тетрамера в димер или даже мономер. Два вида растений *Abutilon theophrasti* (C_3) и *Amaranthus retroflexus* (C_4) в течение 20 дней выращивали при двух температурных режимах ($30/24^\circ\text{C}$ и $22/16^\circ\text{C}$ день/ночь) и двух концентрациях CO_2 (пониженной $180\text{--}200$ мкмоль/моль в сравнении с современной 380 мкмоль/моль) [24]. При пониженной концентрации углекислоты C_4 вид имел лучшие показатели роста, однако это преимущество уменьшалось при понижении температуры, причем рост C_3 вида был практически одинаков при двух экспериментальных температурных режимах. Эти результаты говорят в пользу преимуществ C_4 фотосинтеза при снижении концентрации углекислоты, но эти преимущества нивелируются при понижении температуры.

В 11 сортах озимой пшеницы определялся уровень экспрессии генов активазы после длительного воздействия высоких температур. Кроме того, оценивался ответ на краткосрочное воздействие высокой температуры на четыре генотипа пшеницы, пять генотипов кукурузы и генотип арабидопсиса [25]. Иммуноблоттинг выявил три полосы у пшеницы, две у кукурузы и арабидопсиса, с молекулярными весами между 40 и 46 килодальтон (кД). Стресс высокой температуры влиял на экспрессию активазы в нескольких генотипах пшеницы и кукурузы. В кукурузе стресс индуцировал появление новой формы (полоса 45-46 кД). Причем эта

форма не выявлялась в генотипе кукурузы с повышенной чувствительностью к стрессу. Значимая линейная корреляция была выявлена у пшеницы между экспрессией 45-46 кД. формой и продуктивностью растений при стрессе высокой температуры. Таким образом, эндогенный уровень определенных форм активазы может иметь значение для продуктивности в условиях температур выше оптимальных.

Водообеспеченность

Дефицит водообеспеченности – один из наиболее распространенных и значимых стрессовых факторов, а эффективность использования воды при ее дефиците влияет на эффективность фотосинтеза и в конечном итоге на продуктивность. Так, высокая скорость фотосинтеза присуща даже пустынным однолетним и травянистым растениям при условии доступности воды. Снижение продуктивности растений в условиях водного стресса обусловлено снижением устьичной и мезофильной проводимости, что вызывает быстрые изменения в клеточном метаболизме [26].

В условиях водного стресса, когда концентрация CO_2 в листе уменьшается из-за увеличения сопротивления устьиц, как реакция на повышение потерь воды (транспирации), скорость фотосинтеза C_4 -растений может быть все же в 2-3 раза выше, чем у C_3 -растений. Следовательно, растения C_4 типа осуществляют высокую скорость фиксации CO_2 при относительно слабо открытых устьицах за счет механизма концентрации углекислоты, увеличивая тем самым эффективность использования воды, т.е. они наиболее продуктивны в условиях высокой инсоляции и повышенных температур, увеличивающих сопротивление устьиц. C_4 -растения вносят существенный вклад в глобальный пул органического углерода и по сравнению с C_3 -растениями более перспективны для обеспечения продовольственной безопасности в жарких и засушливых регионах. Однако, отдельные биохимические реакции C_4 -фотосинтеза (например, снижение активности отдельных фотосинтетических ферментов, концентрации АТФ,



снижение ассимиляции азота) могут быть не менее, если даже не более чувствительны к водному стрессу, чем биохимические стадии C_3 -фотосинтеза [27, 28].

Преимущество C_4 фотосинтеза заключается в том, что при водном дефиците и частично закрытых устьицах (для снижения транспирации и, соответственно, при снижении концентрации поступающей углекислоты) фиксация углекислоты осуществляется ферментом фосфоэнолпируват карбоксилазой (ФЭПК), обладающей гораздо более высоким сродством к углекислоте, чем рубиско. Специфическая особенность C_4 -фотосинтеза, т.е. механизм концентрирования CO_2 в клетках мезофилла обусловлен рядом биохимических и структурных модификаций, *обеспечивающих в конечном итоге более эффективное функционирование C_3 -пути*. Структурные модификации касаются, прежде всего, анатомии листа, в котором в большинстве случаев имеет место два типа фотосинтезирующих клеток (Кранц анатомия). Клетки мезофилла, где сосредоточены реакции фиксации на ФЭПК и образование четырехуглеродных продуктов, и клетки обкладки, окруженные клетками мезофилла, куда транспортируются четырехуглеродные соединения, и где они декарбоксилируются, предоставляя углекислоту для восстановительного пентозофосфатного пути. Т.е. в клетках мезофилла и обкладки функционируют C_4 - и C_3 -циклы, соответственно. В цитоплазме клеток мезофилла происходит превращение атмосферного углекислого газа в бикарбонат под действием карбоангидразы. Бикарбонат реагирует с фосфоэнолпируватом с образованием оксалоацетата. Оксалоацетат превращается в малат (или аспарат), который из клеток обкладки поступает в клетки мезофилла и декарбоксилируется, выделяя CO_2 для рубиско в C_3 -цикле.

Существует еще один приспособительный механизм фотосинтеза при очень скудной водообеспеченности в аридных местообитаниях – так называемый метаболизм суккулентов, толстянковых (САМ). Очевидно, что в таких условиях открывание устьиц на свету для доступа углекисло-

ты крайне нежелательно. Поэтому устьица открываются в ночное время, и первичная фиксация углерода осуществляется в этих растениях ферментом ФЭПК с образованием малата ночью и временной компартиментацией продукта в вакуоли. На свету малат транспортируется из вакуоли в цитоплазму, декарбоксилируется и выделяемый CO_2 рефиксируется рубиско при закрытых устьицах. Если в C_4 -растениях образование и декарбоксилирование малата (аспартата) разобщено пространственно в клетках мезофилла и обкладки, соответственно, то в САМ растениях разобщение этих реакций временное, соответственно ночью и днем в одних и тех же клетках. Почему ФЭПК в этих растениях не фиксирует углекислоту на свету? Было установлено, что на свету этот фермент переходит в неактивную форму, гораздо менее чувствительную к углекислоте, и, кроме того, малат, выделяющийся из вакуоли, сильно ингибирует ФЭПК. Скорость, продуктивность фотосинтеза в растениях этого типа самая низкая по сравнению с C_4 - и C_3 -фотосинтезом. Следует, однако, отметить, что в отличие от облигатных САМ, факультативные (индуцибельные C_3 -САМ) растения имеют следующую особенность: метаболизм по типу САМ наблюдается в условиях водного дефицита и резких перепадов температур в дневное и ночное время, при более «нормальных» условиях растения переключаются на C_3 -фотосинтез. Этот тип фотосинтетического метаболизма рассматривается как адаптивное приспособление, позволяющее запасать воду в сухих местообитаниях благодаря закрытым устьицам и отсутствию транспирации в дневное время, т.е. минимизирования соотношения транспирация/фотосинтез. Таким образом, особенности первичной фиксации CO_2 отражают экологическую приспособляемость в эволюции определяющего физиологического процесса в растительных организмах – фотосинтеза.

Что известно о взаимодействии фотосинтеза, дыхания и фотодыхания, взаимоотношениях хлоропластов и митохондрий в условиях водного дефицита, одного из наи-



более лимитирующих продуктивность растений факторов окружающей среды? Так, соответствующие эксперименты указывают на необходимость существенных изменений метаболизма митохондрий в условиях водного дефицита, помогающих справиться с потоком продуктов фотодыхания и возникающими проблемами фиксации CO_2 . Исследователи предлагают следующую схему этих взаимоотношений [26]. В растениях, подвергнутых водному дефициту, первая реакция – закрывание устьиц. Это приводит к снижению доступа, а, следовательно, и ассимиляции углекислоты. Для снижения потерь углерода в C_3 фотосинтезе в результате фотодыхания стимулируется превращение продукта фотодыхания – фосфогликолата в пероксисомах в глицин, две молекулы которого в митохондриях образуют серин. Серин транспортируется в хлоропласты, где превращается в ФГК, и далее осуществляется стадия регенерации РибФ. Аммоний, выделяемый при образовании серина в митохондриях, также «рефиксируется», но уже в хлоропластах с вовлечением системы глутаминсинтетаза – глутамат-оксоглутарат аминотрансфераза (GS-GOGAT). Показано, что водный стресс ингибирует АТФ-синтазу хлоропластов, что оказывает отрицательный эффект на функционирование цикла Кальвина. В этих условиях АТФ/АДФ нуклеотидный переносчик осуществляет импорт митохондриальной АТФ. Было показано усиление транскрипции генов, кодирующих определенные нуклеотидные переносчики, в условиях непродолжительной засухи или длительного осмотического стресса (<http://bar.utoronto.ca/>). Таким образом, поддержание митохондриального синтеза АТФ при водном стрессе существенно для поддержания функционирования хлоропластов в этих условиях. При водном стрессе митохондрии должны участвовать в различных челночных передачах метаболитов, поддерживать баланс клеточной энергии и собственный метаболизм. Следует все же отметить, что процессы дыхания и взаимоотношения их с процессами фотосинтеза и фотодыхания

в условиях водного дефицита на настоящий момент изучены недостаточно.

В связи с этим можно привести два примера. Интересные особенности взаимоотношений органелл в фотосинтезирующих клетках риса представлены в работе [29]. Структура хлоренхимы риса, травянистого C_3 растения теплого климата отличается от таковой C_3 растений умеренных местобитаний. Если в последних основную часть клетки занимает вакуоль, а хлоропласты, пероксисомы и митохондрии прижаты к периферии, то в рисе 66% объема занимают хлоропласты, а митохондрии и пероксисомы связаны со стромулами хлоропластов (стромулы – микротрубочки, заполненные стромой, облегчающие транспорт молекул как между хлоропластами, так и другими органеллами и цитозолом). Таким образом, столь тесная взаимосвязь органелл повышает проводимость мезофилла, снижает компенсационную точку, позволяя быстро рефиксировать CO_2 фотодыхания. У ряда растений, например, представителей семейства *Chenopodiaceae*, C_4 -фотосинтез осуществляется в клетках хлоренхимы (т.е. без Кранц анатомии). Но при этом ферменты фотосинтеза компартментированы в различных зонах хлоренхимных клеток [30]. Центральная и периферическая области хлоренхимной клетки одного из представителей семейства *Bienertia sinuspersici* содержат различного типа хлоропласты, связанные цитоплазматическими каналами, состоящими из микротрубочек и филаментов актина. Вакуоль в этих клетках также связана каналами как с центральной, так и с периферической областями клетки [31]. Эта система представляет уникальную интеграцию и контроль процессов, происходящих в органеллах и цитоплазме фотосинтезирующей клетки *Bienertia sinuspersici*.

Как упоминалось выше, C_4 -растения более эффективно используют воду, чем C_3 -растения. Эффективность использования воды выражается в величинах транспирации в расчете на единицу образуемого сухого вещества. Соппротивление устьиц для потери воды у C_4 -растений выше, чем у



C_3 -растений. Это обусловлено тем, что C_4 -растения осуществляют высокую скорость фиксации CO_2 при относительно слабо открытых устьицах, тем самым увеличивая эффективность использования воды. Создавая повышенное сопротивление устьиц при водном дефиците C_4 -растения способны поддерживать более высокую скорость фотосинтеза в сравнении с таковой C_3 -растений в отсутствие стрессовых воздействий. Достоверно доказано, что физиологические преимущества, выражающиеся в большей эффективности C_4 фотосинтеза при высокой инсоляции и высоких температурах, являются решающими для экологического доминирования этих растений в жарких, аридных условиях, в тропических и субтропических зонах. Примечательно, что их распространение коррелирует с заметным снижением средних значений годовых осадков [32].

В зависимости от систематического положения и приуроченности к различным местообитаниям и у C_3 -, и C_4 -, и САМ-растений имеется большое количество адаптивных приспособлений метаболизма к различным условиям окружающей среды. В качестве примера можно привести растения семейства маревых (*Chenopodiaceae*), доминирующих в экосистемах Азии и северной Африки и являющихся типичными представителями полупустынной и пустынной флоры. Например, на территории Казахстана, более 60% территории которого составляют пустыни и полупустыни, произрастает каждый шестой вид семейства маревых мировой флоры [33]. У представителей данного семейства встречаются виды с C_3 типом фотосинтеза, C_4 растения с Кранц анатомией (клетки мезофилла и обкладки), C_4 – только с одним типом фотосинтезирующих клеток – хлоренхимой. В исследованиях [34] изучались кинетические характеристики ФЭПК у различных представителей семейства маревых: видов с уникальным C_4 фотосинтезом в индивидуальных клетках хлоренхимы (*Bienertia sinuspersici*, *Suaeda aralocaspica*), C_4 с типичной Кранц анатомией (*Haloxylon persicum*, *Salsola richteri*,

Suaeda eltonica) и C_3 вид (*Suaeda linifolia*). ФЭПК из всех C_4 видов имели типичные кинетические и регуляторные характеристики этого типа фотосинтеза. Хотя ФЭПК из всех трех типов растений были высоко гомологичны, ФЭПК из клеток хлоренхимы являлась изоформой Кранц типа, что, очевидно, необходимо для эффективного функционирования C_4 фотосинтеза. Согласно модели [35], атмосферная углекислота поступает в дистальный участок клеток хлоренхимы и фиксируется ФЭПК цитозола. ФЭП генерируется в хлоропластах дистальной части клеток пируват, ортофосфат-дикиназой (ПФДК). C_4 кислоты диффундируют из дистальной в проксимальную часть через тонкое пространство цитоплазмы в средней части клеток. C_4 кислоты декарбоксилируются в митохондриях, локализованных в проксимальной части клеток, фиксация рубиско происходит в хлоропластах. Хлоропласты в проксимальной и дистальной частях клетки диморфны. Даже C_4 виды с Кранц анатомией различаются между собой по определенным структурным и физиологическим характеристикам [36].

Итак, помимо типичных C_3 и C_4 растений, существуют C_4 -растения только с одним типом фотосинтезирующих клеток – хлоренхимой, промежуточные C_3 - C_4 [37] и C_3 -САМ виды [38]. Вопрос в том, на каких уровнях организации от «геномики» до «физиономики» («physionomics» – всеобъемлющее физиологическое профилирование растительной системы) фотосинтез адаптируется, как происходит реализация эффективности всех подсистем и их интеграция в целостную систему – организм [39]. Так, даже на умеренный водный дефицит растения отвечают быстрыми изменениями в экспрессии генов, при этом компоненты фотосинтеза ингибируются [40]. Эти ответные реакции обусловлены, в том числе, изменениями восстановительного потенциала и аденилатной системы; окисленными формами кислорода, образующимися в результате снижения эффективности электрон-транспортной системы; изменениями метаболизма вследствие изменения



энергетического баланса фотосинтезирующей клетки [41]. Даже если в экспериментах для идентификации механизма(ов) ответа строго контролируются условия и выбор испытуемых видов растений, тем не менее, остается целый ряд неопределенностей [39]. Очевидно, что расшифровка взаимоотношений и регуляции процессов фотосинтеза, дыхания и фотодыхания в стрессовых условиях в разных видах растений даже с одним типом фотосинтеза повысит вероятность успехов биотехнологии в увеличении продукционного потенциала растений, в повышении устойчивости культурных растений к возрастающему водному дефициту и другим стрессовым факторам среды.

Трансформация фотосинтеза

В высших растениях фотосинтез лимитируется уже на первой стадии ассимиляции CO_2 [42]. «Неэффективность» рубиско, и в том числе в предпочтении CO_2 к O_2 , обуславливает «не»эффективность, с которой растения используют свет, воду, азот и побуждают исследователей искать возможности с помощью биотехнологических подходов пытаться создать растения с «лучшими» каталитическими свойствами рубиско, используя существенные вариации в характеристиках фермента из различных источников.

Попытки увеличить эффективность фотосинтеза растений риса с помощью интродукции гена ядерной субъединицы рубиско не дали положительного результата, хотя в полученных трансформированных растениях содержание рубиско превышало 120% и более от такового нетрансформированных растений [43]. Авторы объяснили отсутствие положительного эффекта повышением содержания голофермента. Количество фермента было больше в самых верхних полностью развитых листьях, но в листьях, расположенных ниже, было на уровне нетрансформированных растений [44]. Скорость фотосинтеза в листьях соответствующих уровней не различалась в трансформированных и нетрансформированных растениях, не было также увеличения биомассы растений.

Проанализировав литературные данные по кинетическим характеристикам рубиско из множества хемо- и фотосинтетиков и данные по фракционированию изотопов углерода, исследователи [45] пришли к выводу, что большинство этих рубиско, очевидно, практически оптимально адаптированы именно к тем условиям содержания газов и температуры, в которых обитают соответствующие организмы. Если это так, то генетические манипуляции с интродукцией гена рубиско из различных источников, по мнению авторов, могут лишь незначительно улучшить эффективность фермента и рост растений. Филогенетический анализ значительного количества данных C_3 и C_4 однодольных растений выявил, что ген большой субъединицы рубиско (rbcL) претерпел эволюционную селекцию в независимых по систематическому происхождению C_4 видах [46]. Кинетические показатели указывают на адаптацию к более высокой концентрации CO_2 , имеющей место в клетках C_4 растений. Восемь кодонов этой субъединицы, вовлеченных в положительную селекцию, претерпели параллельные изменения в 23 независимых по происхождению образцов, вовлеченных в это исследование. Идентификация аминокислот, кодируемых этими областями, как считают авторы, ответственных за изменение эффективности рубиско, открывает, по их мнению, новые возможности в генетической инженерии. Интродукция этой субъединицы в C_3 растения может повысить эффективность фотосинтеза в условиях предсказываемого повышения в атмосфере концентрации углекислоты в будущем.

Исследователями обсуждаются возможности генной инженерии по увеличению активности и количества активазы при действии различных стрессовых факторов [10]. В результате сверх-экспрессии гена большой субъединицы активазы растения риса показали более высокую фотосинтетическую активность как в результате активации световых, так и темновых реакций [47]. Было показано, что повышение термостабильности активазы рубиско может повысить фотосинтез и рост растений в условиях



«умеренного» стресса высокими температурами [7]. Для экспрессии термостабильной формы в хлопке, кукурузе и пшенице требуется продолжительное воздействие высоких температур. В эксперименте использовалась «gene shuffling» технология для получения короткой изоформы с повышенной термостабильностью. Подход базируется на сочетании структурной и функциональной геномики, позволяя относительно просто и быстро анализировать специфические последовательности генома и транскриптома, с последующей «перетасовкой» и сшивкой последовательностей гомологичных генов. Полученные обычный короткий и термостабильный «shuffled» варианты генов были интродуцированы в линию арабидопсиса с делецией активазы, что позволило напрямую оценить физиологический эффект активазы с повышенной термостабильностью в условиях высоких температур. Трансгенные линии с вариантами термостабильной активазы проявили более высокую скорость фотосинтеза, лучший рост, более высокую биомассу и урожай семян по сравнению с линией, экспрессирующей дикий тип активазы 1 (короткая форма), но все же это улучшение показателей было незначительным по сравнению с «диким типом». Исследователи считают, что результаты, тем не менее, не исключают потенциал генетического манипулирования активазы для улучшения продуктивности растений при повышенных температурах.

В экспериментах [48] растения дикого типа и трансформанты табака выращивались при температурах 20 и 30°C, затем в экспериментах они подвергались воздействию температур от 15 до 40°C. Кроме содержания активазы, в сравниваемых типах растений не было обнаружено видимых различий в других свойствах фотосинтезирующих листьев, которые могли бы «запутать» интерпретацию температурного ответа. Полученные сравнительные результаты позволили исследователям сделать вывод, что снижение содержания активазы, тем не менее, не привело к увеличению температурной чувствительности рубиско, а селектив-

ное увеличение активазы, вероятно, только незначительно может повысить фотосинтез при высоких температурах.

Проанализировав протеом листьев дикого вида риса *Oryza meridionalis*, описанного в Австралии, где температуры регулярно превышают 35°C, в сравнении с *O. sativa ssp. japonica* cv. Amago (оба вида имеют AA геномы), исследователи выявили, что после 24 часов экспозиции при высокой температуре многие ферменты цикла Кальвина в австралийском виде были в избытке, тогда как количество иРНК соответствующих генов заметно снижалось [49]. Анализ протеома исследователи использовали, поскольку при абиотических стрессах многие ключевые белки могут регулироваться трансляционно и посттрансляционно. В результате проведенных экспериментов в растениях существенно увеличивалось количество белка и экспрессия гена большой субъединицы активазы. Однако при 27°C нетто фотосинтез культурного риса был заметно выше, а при 45°C показатели были одинаковы для сравниваемых видов.

Растения риса подвергали действию повышенных температур 40/30°C (день/ночь) в течение 4 дней, после чего растения восстанавливались в течение 3 дней при температурном режиме 30/22°C. Стресс высоких температур индуцировал экспрессию большой субъединицы активазы рубиско, как на уровне иРНК, так и белка [50]. Трансгенные растения с интродуцированным геном большой субъединицей активазы проявляли более высокую термостабильность на уровне скорости фотосинтеза и активности рубиско. Растения росли быстрее при высоких температурах по сравнению с диким типом или трансгенными растениями с повышенным содержанием малой субъединицы активазы. При нормальных температурах наилучшие показатели были у трансгенных растений с малой субъединицей. Полученные результаты говорят о возможной значимости большой субъединицы активазы в растениях риса при повышенных температурах, тогда как малая субъединица играет главную роль в поддержании активности



рубиско в нормальных условиях. Все же не следует переоценивать «возможности» активазы рубиско при повышенных температурах в трансформированных растениях, поскольку ряд исследований по влиянию этого вида стресса указывают также и на снижение транспорта электронов, пула РиБФ и отношения РиБФ к ФГК [51].

Очевидно, что успех трансформирования растений с целью повышения эффективности фотосинтеза и увеличения продуктивности зависит в значительной мере от понимания процессов, контролирующих поток фиксированного углерода. Являясь ключевыми интермедиатами цикла Кальвина, триозофосфаты используются также для синтеза крахмала в хлоропластах и после переноса в цитоплазму для синтеза сахарозы. При этом жизненно важно поддерживать баланс между регенерацией акцептора углекислоты РиБФ и использованием триозофосфатов на синтез сахарозы и крахмала. И эта регуляция осуществляется на уровне каталитической активности определенных ферментов цикла. Так, активность ферментов, участвующих в стадии регенерации РиБФ, а именно фруктозо-1,6-бисфосфатазы и седогептулезо-1,7-бисфосфатазы, регулируется восстановительным потенциалом через систему ферредоксин/тиоредоксин, что модулирует активность ферментов в ответ на условия свет/темнота [52]. Интродукция фруктозо-1,6-бисфосфатазы и/или седогептулезо-1,7-бисфосфатазы, уровень которых в хлоропластах несравнимо ниже, чем других ферментов цикла, позволила исследователям повысить фиксацию углерода [53]. Тамоi с соавт. получили трансгенные растения табака, экспрессирующие эти ферменты. В условиях гидропоники и в почве растения, в которых активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы была в 2,3 раза, а седогептулезо-1,7-бисфосфатазы в 1,6 и 4,3 раза выше, чем в нетрансформированных растениях, имели больший вес и высоту, а также более высокую скорость роста. Количество сухого вещества в трансформантах было в 1,3-, 1,5- и 1,5 раз больше, соответственно. Содержание РиБФ было

в них в 1,4-1,8 раза выше. Полученные результаты показали, что седогептулезо-1,7-бисфосфатаза является наиболее важным фактором для регенерации РиБФ, а фруктозо-1,6-бисфосфатаза участвует как в регенерации РиБФ, так и в синтезе крахмала. Авторы считают, что эти ферменты цикла Кальвина могут иметь стратегическое значение в распределении углерода в конечные продукты фотосинтеза.

В ходе фотосинтеза часть триозофосфатов покидает хлоропласт и превращается в сахарозу при участии фруктозо-1,6-бисфосфатазы (fbp) цитоплазмы (фермент катализирует отщепление фосфата от фруктозо-1,6-бисфосфата, образованного из триозофосфатов: фосфоглицеринового альдегида и дигидроацетонфосфата). Анализ экспрессии показал, что продукт гена *oscfbp1* играет существенную роль в этих превращениях в листьях в дневное время [54]. В листьях мутантов по этому гену существенно снижался уровень сахарозы, глюкозы, фруктозы и крахмала. При этом значительно возрастал уровень продуктов гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. Таким образом, в растениях риса подавление синтеза сахарозы в цитоплазме не приводило к компенсаторному переключению на увеличение синтеза крахмала в хлоропластах. В конечном итоге растения погибали вследствие низкой скорости фотосинтеза и снижения содержания хлорофилла. Анализ трансформантов, полученных в ряде исследований, подтвердил наличие двух изоформ фермента и их внутриклеточную компартиментализацию, обеспечивающую регуляторные механизмы и влияние на фотосинтез, и метаболизм в целом [55]. Характерно, что изменения в содержании фермента приводят к несколько различным последствиям в ряде использованных в экспериментах видов, авторы считают, что речь может идти о видовой специфичности данного фермента, его влияния на содержание и распределение углеводов.

Сахарозофосфат синтетаза (СФС) осуществляет в цитоплазме предпоследнюю реакцию синтеза сахарозы: образование



сахарозофосфата из УДФ-глюкозы и фруктозо-6-фосфата (УДФГ + фруктозо-6-фосфат = УДФ + сахарозофосфат). Этот фермент является ключевым, контролирующим поток фиксированного в фотосинтезе углерода в сахарозу. СФС регулируется посттрансляционным фосфорилированием, фосфорилирование осуществляется по определенным положениям молекул серина в молекуле белка и регулируется условиями свет/темнота. Глюкозо-6-фосфат и неорганический фосфат являются эффекторами фермента. В растениях существует несколько различных изоформ фермента, отражающих, вероятно, различные эволюционные ветви. Соответствующие эксперименты по выявлению профилей транскрипции предполагают, что изоферменты, отличающиеся как по профилям транскрипции, так и регуляции, в согласии с авторской филогенетической классификацией представляют специфические функциональные категории [56].

Для выяснения функционирования потенциально нерегулируемой СФС растения табака, томатов и риса трансформировали с использованием гена СФС из цианобактерии *Synechocystis sp.*, (PCC 6803), в котором отсутствует серин, вовлекаемый в фосфорилирование, а также – аллостерическое регулирование глюкозо-6-фосфатом и ортофосфатом [57]. Хотя фермент экспрессировался со скоростью, достаточной для 2-8-кратного увеличения активности, увеличения не наблюдалось. При этом в растениях томатов, экспрессирующих СФС из кукурузы, имело место 2-3-кратное увеличение активности фермента, увеличение распределения фотоассимилятов в сахарозу и повышение скорости фотосинтеза до 58%. Поскольку очищенный фермент трансформантов имел такую же каталитическую активность, что и из растений «дикого типа», исследователи предположили, что какой-то белок связывает фермент в трансформантах, ингибируя его.

Трансформация растений табака с повышенной конститутивной экспрессией СФС из кукурузы оказала существенное влияние на соотношение углеводов с последствиями

для роста растений [58]. В листьях, экспрессирующих трансген, отношение сахарозы к крахмалу было значительно выше. Активность фермента в молодых и стареющих листьях была десятикратна, во взрослых экспортирующих листьях в 2-3 раза выше, чем в диком типе. В стареющих листьях при этом фотосинтез повышался, ускорялось развитие растений, а также увеличивалось количество цветков, но увеличения надземной биомассы не происходило.

Трансформанты арабидопсиса с антисенс репрессией ФБФ (катализирующей отщепление фосфата от фруктозо-1,6-бисфосфата, образованного из триозофосфатов) и СФС использовали для изучения влияния синтеза сахарозы на холодовую акклиматизацию растений, поскольку известна положительная роль сахарозы при холодовом закаливании растений [59]. По сравнению с «диким типом» более высокая скорость фотосинтеза в трансформантах СФС (>30% при температуре 23°C) имела место и при перенесении их в условия пониженной температуры 5°C. Увеличение фотосинтетической фиксации и экспорта сахарозы из листьев трансформантов при 23°C сопровождалось повышенной экспрессией СФС и переносчика триозофосфатов из хлоропластов (AtTPТ) и в меньшей степени переносчика сахарозы во флоэму (AtSUC1). Подобный ответ наблюдался у растений «дикого типа» при 5°C и ослаблялся у растений-трансформантов с пониженным синтезом сахарозы, обусловленным антисенс репрессией ФБФ. Подобный ответ, по мнению исследователей, предполагает, что ключевой элемент при акклиматизации к пониженным температурам – это контроль обмена метаболитами между хлоропластами и цитоплазмой.

Влияние изменения метаболизма сахарозы на рост растений было подтверждено в экспериментах по трансформации растений табака с интродукцией УДФглюкозопирофосфорилазы (фермента, катализирующего реакцию УДФ + глюкозо-1-фосфат = пирозофосфат + УДФГ); СФС (УДФГ + фруктозо-6-фосфат = УДФ + сахарозофосфат) и



сахарозо-синтазы (УДФглюкоза + фруктоза = УДФ + сахароза). Последний фермент может обратимо разлагать сахарозу [60]. Трансгены с одним геном подвергались перекрестному скрещиванию с получением двойных и тройных трансгенов. Целью данного исследования было выяснения возможности изменения синтеза целлюлозы манипулированием метаболизма сахарозы. По отдельности экспрессированные ферменты не оказывали изменений на метаболизм, тогда как их одновременная сверхэкспрессия приводила к увеличению роста, в некоторых случаях более чем на 50%. Пирамидирование генов приводило также к пролонгированию образования репродуктивных почек и изменению морфологии цветков.

В трансформированных растениях хлопчатника, максимально экспрессирующих СФС из шпината, было показано повышенное отношение сахароза/крахмал и преимущественное включение C^{14} в сахарозу по сравнению с крахмалом [61]. В экспериментах при действии стрессовых факторов: низких ночных температурах и ограниченной освещенности – эти трансформанты имели наибольшую активность фермента, большее количество микроволокон хлопка и более быстрое созревание, коррелирующие с большей толщиной вторичных целлюлозных стенок.

Трансформированные растения табака, экспрессирующие СФС из арабидопсиса, имели повышенный пул сахарозы в потребляющих органах (sink), в то время как в фотосинтезирующих (source) он был такой же, как и в «диком типе» [62]. Все трансформанты имели утолщенные стебли и были более высокими вследствие удлинения междоузлий, а также повышенную биомассу, что подтверждает, по мнению исследователей, роль доступности сахарозы для контролирования роста растений.

При действии таких стрессовых факторов, как засуха/умеренный водный дефицит уровень активности СФС может снижаться. Экспрессия фермента(ов) может приводить к повышению уровня сахарозы и др. сахаров и проявлению устойчивости к абиоти-

ческим стрессам, однако при этом может иметь место подавленный рост вследствие конститутивной экспрессии соответствующих генов. В связи с этим необходимы усилия по созданию трансгенных растений, в которых экспрессия трансгенов осуществлялась бы только при действии стрессовых факторов.

Трансформации C_3 растений с использованием ферментов, участвующих в C_4 пути

Исследователями предпринимаются попытки трансформации C_3 растений с помощью гена ФЭПК из C_4 растений. Так в растения риса был интродуцирован ген ФЭПК кукурузы [63]. Обычно в листьях C_4 растений уровень ФЭПК приблизительно в 50 раз выше, чем в C_3 растениях. Хотя уровень фермента в трансформантах риса достигал 12% от общего растворимого белка листа, и в полученных растениях наблюдалось снижение ингибирования фотосинтеза кислородом, однако скорость фотосинтеза была сравнима с таковой растений «дикого типа».

Очевидно, что одной из проблем функционирования в C_3 растениях ФЭПК из C_4 растений является достаточность (!?) субстратов для фермента, а именно: фосфоэнолпирувата (ФЭП) и $HC_3O_3^-$. В C_4 растениях ФЭП образуется из пирувата под действием пируват, ортофосфат-дикиназы (ПФДК), локализованной в хлоропластах и катализирующей обратимую реакцию: $Пируват + P_i + АТФ \rightarrow ФЭП + АМФ + P_Pi$.

ПФДК обнаружена в различных органах C_3 растений, однако функции ее однозначно не определены ввиду незначительных количеств [64]. Тем не менее, в последние годы интерес к данному ферменту в C_3 растениях возрастает. В клетках C_3 растения арабидопсиса выявлены две формы ПФДК: цитоплазматическая и хлоропластная [65], причем хлоропластная и цитозольная формы фермента обнаружены в семядолях, в листьях же только хлоропластная. Транскрипт цитозольной формы резко возрастает в ответ на продолжительную темноту и старение в темноте. Авторы предположили,



что семядольный фермент играет важную роль в глюконеогенезе, а в стареющих листьях способствует ремобилизации азота в репродуктивные органы. Показано, что кислородное голодание и водный дефицит стимулируют активность цитоплазматической формы фермента в корешках проростков риса - C_3 вида, устойчивого к аноксии [66].

Нефотосинтетическую функцию фермента подтверждает также его обилие в развивающихся зерновках риса [67]. По мнению исследователей, это предполагает участие фермента в реакции ФЭП→ПВК (обратной направлению в листьях C_4 растений) в биосинтетических процессах на ранних стадиях развития семени в C_3 растениях. Содержание белка в семенах определяет его питательную ценность. Эксперименты с меченым пируватом на C_3 растениях, а также локализации цитозольной формы в проводящей системе, а хлоропластной в клетках мезофилла позволили исследователям обозначить роль фермента в ремобилизации азота, т.е. в образовании и транспорте глутамата из мезофилла во флоэму [68]. Повышенная экспрессия фермента в ходе старения листьев, по мнению авторов, является желаемым агрономическим признаком для оптимизации реутилизации азота из листьев в репродуктивные органы.

Исследователями была предпринята попытка трансформации риса с использованием ферментов, участвующих в C_4 пути. Четыре фермента, ФЭПК и ПФДК из кукурузы, НАДФ-малатдегидрогеназа из сорго и маликэнзим из риса (ферменты, декарбоксилирующие малат в C_4 пути, высвобождающие CO_2 для рубиско) были интродуцированы в клетки мезофилла риса независимо или в различных комбинациях [69]. Повышенная экспрессия ни одного из интродуцированных ферментов не влияла на скорость фиксации углекислоты, кроме ФЭПК, которая незначительно снижала фиксацию. Исследователи объяснили этот эффект вероятным повышением ассимиляции азота, и этот процесс конкурирует с циклом Кальвина за АТФ и восстановитель. Уровень фиксации восстанавливался до показателя нетранс-

генных растений только при комбинации всех четырех ферментов. Этот эффект был более заметен при повышении концентрации углекислоты в эксперименте, при этом не изменилась компенсационная точка (концентрация CO_2 , при которой количество поглощаемой при фотосинтезе углекислоты равно выделяемой при дыхании; у C_4 растений она близка к нулю). Это говорит о том, что трансформация с участием четырех ферментов не повлекла за собой концентрации CO_2 . Необходимость интродукции сразу ряда трансгенов – в числе серьезных ограничений успешной трансформации. Так, даже один фермент рубиско является гетеромером, состоящим из двух типов субъединиц, кодируемых как ядерным, так и хлоропластным геномами.

В случае трансформации C_3 -растений с помощью ФЭПК C_4 -растений необходимо «обеспечение» фермента не только достаточным количеством его субстрата ФЭП. Очевидно, что соответствующая локализация и активность карбоангидразы, фермента, обратимо катализирующего взаимопревращения CO_2 и HCO_3^- ; в клетках мезофилла C_3 растений также должна обеспечивать трансгенную ФЭПК из C_4 -растения, локализованную в цитоплазме (?), соответствующим достаточным количеством HCO_3^- . Эта проблема для C_3 растений также остается под вопросом. В листьях картофеля было показано, что 87% активности карбоангидразы локализовано в хлоропластах и только 13% в цитозоле [70]. Цитозольный изофермент с массой 255.000 состоял из 8-ми идентичных субъединиц, хлоропластный с массой 222.000 был октамером из двух типов субъединиц с массой 22000 и 27500, соответственно. Хлоропластная изоформа находилась в строме, цитозольная, вероятно, распределена в нем рандомизированно.

Хотя стратегия повышения эффективности фотосинтеза C_3 растений как за счет ключевых ферментов этого пути фотосинтеза, в том числе рубиско, так и включения компонентов C_4 пути не отвергается, уже осуществленные попытки трансформации



говорят о серьезности проблемы. Это очевидно на основе сложности регуляции фотосинтеза на уровне клетки при координации фотохимических и биохимических систем, регуляции взаимодействия различных ее органелл, т.е. компартментов, а также изменений интенсивности и даже направленности ряда процессов, а соответственно и регуляции в ходе развития при переходе от вегетативной к репродуктивной фазе. Важными для успешной трансформации, очевидно, являются значения кинетических характеристик (максимальной скорости V_m , константы Михаэлиса K_m), характеристик активации и катализа интродуцированных и нативных ферментов фотосинтетических путей, влияния на их активность света, pH, уровня восстановителя и др., необходимости стадии активирования (например, фосфорилирования) фермента.

Роль факторов транскрипции (ФТ) в возможной трансформации метаболических путей растений

На основе многолетних экспериментальных исследований влияния абиотических стрессовых факторов признано, что стрессы оказывают практически одновременное воздействие на различные стадии и этапы фотосинтеза. Это показано на уровне изменения проводимости устьичных клеток и мезофилла для CO_2 , эффективности фотосистемы II, в целом окислительно-восстановительного (редокс) потенциала стромы, образования реактивных форм кислорода (ROS), содержания РибФ, которое зависит от наличия АТФ и НАДФН, соотношения карбоксилазной и оксигеназной активности рубиско (уровня фотодыхания) и др. Физиологические и биохимические изменения, вызываемые стрессовым фактором, сопряжены с изменениями в уровнях экспрессии целого ряда генов, и устойчивость к тому или иному виду стресса является полигенным признаком. Так, действие засухи и восстановление после ее действия обусловило различные профили транскриптов двух устойчивых мексиканских сортов кукурузы и одного неустойчивого [71]. У

устойчивых генотипов изменения в профилях транскрипции были более значимы, чем у неустойчивого генотипа, что говорит о способности устойчивых генотипов быстрее модулировать метаболизм как при действии фактора, так и при восстановлении после его действия. Более того, различия наблюдались и между устойчивыми генотипами, очевидно, указывая на различные механизмы их адаптации к засухе. Эти примеры говорят как об определенном сходстве ответных реакций при различных видах стрессов на уровне экспрессии генов, так и о возможных особенностях на уровне даже отдельного вида.

Если абиотические стрессы затрагивают экспрессию многих генов, очевидно, что эти процессы должны быть скоординированы. Воздействие внешнего стрессового фактора вызывает каскад сигналов, который в результате посредством факторов транскрипции (ФТ) координирует: повышает и/или подавляет экспрессию соответствующих генов. Поддержание восстановительного гомеостаза является центральным звеном приспособления метаболизма и развития растений в меняющихся условиях среды. Так, листья арабидопсиса подвергали действию двух ингибиторов фотосистемы II: свет высокой интенсивности и дихлорфенилдиметил мочевины (DCMU) [72]. Около 6% генов при регулировании восстановительного потенциала (редокс) при действии двух ингибиторов были идентифицированы как гены, ответственные за редокс потенциал. Функциональная характеристика этих генов показала их участие во многих метаболических путях, включая регулируемые несколькими семействами ФТ, особенно семейством AP2. С другой стороны, сравнение экспрессии генов у близкородственных видов: C_3 (*Cleome spinosa*) and C_4 (*Cleome gynandra*) выявило различия в 603 транскриптах, в том числе 17 ФТ [73].

При всей недостаточности понимания особенностей регуляции через факторы транскрипции ответных реакций растений, в последнее годы ФТ рассматриваются как более «жизнеспособная» альтернатива «еди-



ничным» ферментам в качестве подхода для манипулирования метаболическими путями растений [74], поскольку ФТ регулируют многие, если не все стадии определенных метаболических путей. По мнению исследователей, реализация этого подхода позволит преодолеть «узкие места», выявить специфичность в различных типах клеток, органах и видах растений, а также особенности организации регуляторных систем генов. В обзоре [75] дано достаточно подробное описание основных последствий действия стрессовых факторов на фотосинтез и сопряженных с ним процессов, описание ФТ, задействованных в ответных реакциях на абиотические стрессы, в том числе ФТ, специфических для фотосинтеза: вовлеченных в регуляцию работы устьиц, а также в их образование и количество в развивающихся листьях; ФТ, вовлеченных в неустыичное регулирование процессов фотосинтеза. Так, образование реактивных форм кислорода (оксидативный стресс) является характерной ответной реакцией растений на все виды абиотического стресса. В последние годы было показано, что эти реактивные формы кислорода играют существенную роль в сигнальных путях различных физиологических ответов растения, в том числе открывании/закрывании устьиц через посредство представителей определенных семейств ФТ [76]. В таблице, представленной в обзоре [75], приведены положительные результаты по улучшению фотосинтетических показателей при трансформации ряда растений с использованием 20-ти факторов транскрипции, представителей нескольких семейств (AP2/EREBP, bZIP, NAC, NF-X1, NF-Y (NAP), C₂H₂ zinc finger, MYB). Однако, по мнению авторов, результаты должны быть подтверждены в полевых условиях, поскольку в экспериментах оценивалось ограниченное количество фотосинтетических параметров. К сожалению, исследований по детализации механизмов устойчивости даже у представителей близкородственных видов и выявлению ТФ, вовлекаемых в регуляцию генов, участвующих в процессах фотосинтеза, еще недостаточно.

Таким образом, накопленный опыт по трансформации растений показывает, что интродукция отдельных ферментов фотосинтеза зачастую приводит к существенным изменениям содержания ряда продуктов фотосинтеза и их внутриклеточной компартиментализации, и, кроме того, эти изменения могут быть видоспецифичны. Тем не менее, в большинстве экспериментов все эти манипуляции не оказывают положительного влияния на конечный результат – продуктивность растений. Очевидно, что необходимы более глубокие исследования по влиянию стрессовых факторов среды, вовлекающие различные аспекты физиологии фотосинтеза, дыхания и последующего распределения ассимилятов в растениях. Это должно быть сопряжено с одновременной оценкой функционального генома и выявления роли соответствующих факторов транскрипции. Современные достижения в области структурной и функциональной геномики, использование систем трансформации с неконститутивной (transient) экспрессией генов в сочетании с другими технологиями являются платформой для развития подходов по выявлению специфики регуляции процессов при стрессовых воздействиях во взаимосвязи ответных реакций на уровне метаболизма, протеома и генома. Вероятно, наряду с использованием факторов транскрипции, одним из перспективных направлений в области молекулярной биоинженерии может стать технология «gene shuffling» – «перетасовки» последовательностей гомологичных генов при условии подобия исходных «родительских» последовательностей, доменов. Со времени, когда было высказано положение, что новые белки в эволюции возникают вследствие re-shuffling геномных последовательностей, расшифровка последовательностей генов подтверждает, что рекомбинация последовательностей, кодирующих полипептидные домены, играет огромную роль в эволюции белков [77]. «Перетасовка» последовательностей генов – новый метод для направленной эволюции *in vitro* в целях создания новых ферментов с измененными и/или улучшенными свойствами [78]. При



этом созданный белок будет иметь сегменты, домены из различных использованных родительских последовательностей. Так, процесс перетасовки экзонов определенных

ферментов фотосинтетической фиксации из различных организмов может создать в результате мозаичные или химерные белки с улучшенными желаемым характеристиками.

Литература

1. Plant Physiology. Fourth Edition. Eds. F.B. Salisbury, C.W. Ross. Thomson Information/Publishing Group. – 1992. – 682 pp.
2. Эдвардс Дж., Уокер Д. Фотосинтез C3 и C4 растений: механизмы и регуляция. – Москва: Мир, 1986. – 579 с.
3. Gupta A.K., Kaur N. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants // *J Biosci.* – 2005. – V. 30(5). – P. 761–776.
4. Hanson J., Smeeckens S. Sugar perception and signaling-an update // *Curr Opin Plant Biol.* – 2009. – V. 12(5). – P. 562–567.
5. Geiger D.R., Servaites J.C. Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C-3 plants // *Annu Rev Plant Physiol.* – 1994. – V. 45. – P. 235–256.
6. Crafts-Brandner, S.J., and Salvucci, M.E. Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂ // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – V. 97. – P.13430–13435.
7. Kurek I., Chang T.K., Bertain S. M., Madrigal A., Liu L., Lassner M.W., and Zhu G. Enhanced Thermostability of *Arabidopsis* Rubisco Activase Improves Photosynthesis and Growth Rates under Moderate Heat Stress // *Plant Cell.* – 2007. – V. 19(10). – P. 3230–3241.
8. Portis A. Rubisco activase: Rubisco's catalytic chaperone // *Photosynth Res.* – 2003. – V.75. – P. 11–27.
9. Yamori W. and von Caemmerer S. Effect of Rubisco Activase Deficiency on the Temperature Response of CO₂ Assimilation Rate and Rubisco Activation State: Insights from Transgenic Tobacco with Reduced Amounts of Rubisco Activase1[W][OA] // *Plant Physiology.* – 2009. – V. 151. – P. 2073–2082.
10. Yin Z., Meng F., Song H., Wang X., Xu X., Yu D. Expression quantitative trait loci analysis of two genes encoding rubisco activase in soybean // *Plant Physiol.* – 2010. – V. 152(3). – P. 1625–1637.
11. Von Caemmerer S., Quinn V., Hancock N.C., Price G.D., Furbank R.T. and Ludwig M. Carbonic anhydrase and C 4 photosynthesis: a transgenic analysis // *Plant, Cell and Environment.* – 2004. – V. 27. – P. 697–703.
12. Noctor G., De Paepe R., Foyer C.H. // *Trends Plant Sci.* – 2007. – V. 12(3). – P. 125–34.
13. Lee C.P., Eubel H., O'Toole N., Millar A.H. // *Mol Cell Proteomics.* – 2008. – V. 7(7). – P.1297–1316.
14. Lunn J.E. Compartmentation in plant metabolism // *Journal of Experimental Botany.* – 2007. – V. 58. – P. 35–47.
15. Sage R.F. The evolution of C4 photosynthesis // *New Phytologist.* – 2004. – V.161. – P.341–370
16. Kebeish R., Niessen M., Thiruveedhi K., Bari R., Hirsch H.J., Rosenkranz R., Stähler N., Schönfeld V., Kreuzaler F., Peterhänsel C. Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana* // *Nat Biotechnol.* – 2007. – V.25(5). – P. 593–599.
17. Рябушкина Н.А., Папина Е.А., Богданова Е.Д., Полимбетова Ф.А. Фосфоэнолпируваткарбоксилаза в фотосинтезирующих органах сортов пшеницы // *Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская.* – 1998. – №3. – С. 88–93.
18. Рябушкина Н.А., Папина Е.А. Фосфоэнолпируваткарбоксилазная активность первичных корней пшеницы и полученной из них каллусной культуры // *Физиология растений.* – 1988. – Т. 35. – Вып. 5. – С. 921–927.
19. Chollet R., Vidal J., O'Leary M.H. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* – 1996. – V.47. – P.273–298.
20. Christin P.A., Salamin N., Savolainen V., Duvall M.R., Besnard G. C4 Photosynthesis evolved in grasses via parallel adaptive genetic changes. // *Curr Biol.* – 2007. – V. 17. – P. 1241–1247.



21. Sage R.F., Coleman J.R. Effects of low atmospheric CO₂ on plants: more than a thing of the past // *Trends Plant Sci.* – 2001. – V. 6(1). – P. 18-24.
22. Christin P.A., Besnard G., Samaritani E., Duvall M.R., Hodkinson T.R., Savolainen V., Salamin N. Oligocene CO₂ decline promoted C₄ photosynthesis in grasses // *Curr Biol.* – 2008. – V.18(1). – P. 37-44.
23. Sage R.F., Kubien D.S. The temperature response of C₃ and C₄ photosynthesis // *Plant Cell Environ.* – 2007. – 30(9). – P. 1086-1106.
24. Ward J.K., Myers D.A., Thomas R.B. Physiological and growth responses of C₃ and C₄ plants to reduced temperature when grown at low CO₂ of the last ice age // *J Integr Plant Biol.* – 2008. – V. 50(11). – P. 1388-1395.
25. Ristic Z, Momcilovic I, Bukovnik U, Prasad PV, Fu J, Deridder BP, Elthon TE, Mladenov N. Rubisco activase and wheat productivity under heat-stress conditions. *J Exp Bot.* 2009;60(14):4003-14.
26. Atkin O.K. and Machere D. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance // *Annals of Botany.* – 2009. – V. 103. – P. 581–597.
27. Ghannoum O. C₄ photosynthesis and water stress // *Annals of Botany.* – 2009. – V. 103. – P.635–644.
28. Carmo-Silva A.E., Keys A.J., P. Andralojc J., Powers S.J., Arrabac M.C., and Parry J. M.A. Rubisco activities, properties, and regulation in three different C₄ grasses under drought // *Journal of Experimental Botany.* – 2010. – V. 61. – P. 2355–2366.
29. Sage T.L., Sage R.F. The functional anatomy of rice leaves: implications for refixation of photorespiratory CO₂ and efforts to engineer C₄ photosynthesis into rice. // *Plant Cell Physiol.* – 2009. – V. 50(4). – P. 756-772.
30. Chuong S.D., Franceschi V.R., Edwards G.E. The cytoskeleton maintains organelle partitioning required for single-cell C₄ photosynthesis in Chenopodiaceae species // *Plant Cell.* – 2006. – V. 18(9). – P. 2207-2223.
31. Park J., Knoblauch M., Okita T.W., Edwards G.E. Structural changes in the vacuole and cytoskeleton are key to development of the two cytoplasmic domains supporting single-cell C₄ photosynthesis in *Bienertia sinuspersici* // *Planta.* – 2009. – V. 229(2). – P. 369-382.
32. Edwards E.J., Smith S.A. Phylogenetic analyses reveal the shady history of C₄ grasses // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2010. – V. 107(6):2532-2537.
33. Gemedjieva N., Teixeira da Silva J.A., Ryabushkina N. Representation of Endemics in Floristic Subprovinces of Kazakhstan // *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology.* – 2010 *Global Science Books, in press.*
34. Lara M.V., Chuong S.D.X., Akhani H., Andreo C.S., and Edwards G.E. Species Having C₄ Single-Cell-Type Photosynthesis in the Chenopodiaceae Family Evolved a Photosynthetic Phosphoenolpyruvate Carboxylase Like That of Kranz-Type C₄ Species // *Plant Physiology.* – 2006. – V. 142. – P. 673–684.
35. Voznesenskaya E.V., Edwards G.E., Kiirats O., Artyusheva. E.G., Franceschi V.R. Development of biochemical specialization and organelle partitioning in the single celled C₄ system in leaves of *Borszczowia aralocaspica* (Chenopodiaceae) // *Am J Bot.* – 2003. – V. 90. – P.1669–1680.
36. Voznesenskaya E.V., Chuong S.D., Koteyeva N.K., Franceschi V.R., Freitag H., Edwards G.E. Structural, biochemical, and physiological characterization of C₄ photosynthesis in species having two vastly different types of kranz anatomy in genus *Suaeda* (Chenopodiaceae) // *Plant Biol (Stuttg).* – 2007. – V. 9(6). – P. 745-757.
37. Voznesenskaya EV, Koteyeva NK, Edwards GE, Ocampo G. Revealing diversity in structural and biochemical forms of C₄ photosynthesis and a C₃-C₄ intermediate in genus *Portulaca* L. (Portulacaceae) *J Exp Bot.* 2010, Jun 30.
38. Vogan P.J., Frohlich M.W., Sage R.F. The functional significance of C₃-C₄ intermediate traits in *Heliotropium* L. (Boraginaceae): gas exchange perspectives // *Plant Cell Environ.* – 2007. – V.30(10). – P. 1337-1345.
39. Lawlor D.W. Musings about the effects of environment on photosynthesis // *Annals of Botany.* – 2009. – V. 103. – P. 543–549.
40. Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell // *Annals of Botany.* – 2009. – V. 103. – P. 551–560.



41. Pfannschmidt T., Bräutigam K., Wagner R., Dietzel L., Schröter Y., Steiner S., and Nykytenko A. Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energystate: approaches towards better understanding. *Annals of Botany*. – 2009. – V. 103. – P.599–607.
42. Hartman F.C., Harpel M.R. Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase // *Annu Rev Biochem*. – 1994. – V. 63. – P. 197–234.
43. Suzuki Y., Ohkubo M., Hatakeyama H., Ohashi K., Yoshizawa R., Kojima S., Hayakawa T., Yamaya T., Mae T., Makino A. Increased Rubisco content in transgenic rice transformed with the ‘sense’ rbcS gene // *Plant Cell Physiol*. – 2007. – V. 48(4). – P. 626–637.
44. Suzuki Y., Miyamoto T., Yoshizawa R., Mae T., Makino A. Rubisco content and photosynthesis of leaves at different positions in transgenic rice with an overexpression of RBCS // *Plant Cell Environ*. – 2009. – P. 32(4). – P. 417–427.
45. Guillaume T. G.B., Farquhar G.D., and Andrews T.J. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose bisphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized // *PNAS*. – 2006. – V. 103. – P. 7246–7251.
46. Christin P.A., Salamin N., Muasya A.M., Roalson E.H., Russier F., Besnard G. Evolutionary switch and genetic convergence on rbcL following the evolution of C4 photosynthesis // *Mol Biol Evol*. – 2008. – V. 25(11). – P. 2361–2368.
47. Wu H., Li L., Jing Y., Kuang T. Over- and anti-sense expressions of the large isoform of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase gene in *Oryza sativa* affect the photosynthetic capacity // *Photosynthetica*. – 2007. – 45. – P. 194–201.
48. Yamori W., von Caemmerer S. Effect of Rubisco activase deficiency on the temperature response of CO₂ assimilation rate and Rubisco activation state: insights from transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco activase // *Plant Physiol*. – 2009. – V. 151(4). – P. 2073–2082.
49. Scafaro A.P., Haynes P.A., and Atwell B.J. Physiological and molecular changes in *Oryza meridionalis* Ng., a heat-tolerant species of wild rice // *Journal of Experimental Botany*. – 2010. – V.61. – P. 191–202.
50. Wang D., Li X.F., Zhou Z.J., Feng X.P., Yang W.J., Jiang D.A. Two Rubisco activase isoforms may play different roles in photosynthetic heat acclimation in the rice plant // *Physiol Plant*. – 2010. – V. 139. – P. 55–56.
51. Parry M.A.J., Keys A.J., Madgwick P.J., Carmo-Silva A.E. and Andralojc P.J. Rubisco regulation: a role for inhibitors // *Journal of Experimental Botany*. – 2008. – V. 59. – P. 1569–1580.
52. Tamoi M., Nagaoka M., Yabuta Y., Shigeoka S. Carbon metabolism in the Calvin cycle // *Plant Biotechnology*. – 2005. – V. 22. – P. 355–360.
53. Tamoi M., Nagaoka M., Miyagawa Y., Shigeoka S. Contribution of fructose-1,6-bisphosphatase and sedoheptulose-1,7-bisphosphatase to the photosynthetic rate and carbon flow in the Calvin cycle in transgenic plants // *Plant Cell Physiol*. – 2006. – V. 47. – P. 380–390.
54. Lee S.K., Jeon J.S., Börnke F., Voll L., Cho J.I., Goh C.H., Jeong S.W., Park Y.I., Kim S.J., Choi S.B., Miyao A., Hirochika H., An G., Cho M.H., Bhoo S.H., Sonnewald U., Hahn T.R. Loss of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase limits photosynthetic sucrose synthesis and causes severe growth retardations in rice (*Oryza sativa*) // *Plant Cell Environ*. – 2008. – V. 31. – P. 1851–1863.
55. Serrato A.J., de Dios Barajas-López J., Chueca A., Sahrawy M. Changing sugar partitioning in FBPase-manipulated plants // *J. Exp Bot*. – 2009. – P. 2923–2931.
56. Lutfiyya L.L., Xu N., D’Ordine R.L., Morrell J.A., Miller P.W., Duff S.M. Phylogenetic and expression analysis of sucrose phosphate synthase isozymes in plants // *J Plant Physiol*. – 2007. – V.164. – P. 923–933.
57. Lunn J.E., Gillespie V.J. and Furbank R.T. Expression of a cyanobacterial sucrose-phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in transgenic Plants // *Journal of Experimental Botany*. – 2003. – V. 54. – P. 223–237.
58. Baxter Ch.J., Foyer Ch.H., Turner J., Rolfe S.A. and Quick W.P. Elevated sucrose-phosphate synthase activity in transgenic tobacco sustains photosynthesis in older leaves and alters development *Journal of Experimental Botany*. – 2003. – V. 54. – P. 1813–1820.



59. Lundmark M., Cavaco A.M., Trevanion S., Hurry V. Carbon partitioning and export in transgenic *Arabidopsis thaliana* with altered capacity for sucrose synthesis grown at low temperature: a role for metabolite transporters // *Plant Cell Environ.* – 2006. – 29. – P. 1703-1714.
60. Coleman H.D., Beamish L., Reid A., Park J.Y., Mansfield S.D. Altered sucrose metabolism impacts plant biomass production and flower development // *Transgenic Res.* – 2010. – V. 19. – P.269-283.
61. Haigler C.H., Singh B., Zhang D., Hwang S., Wu C., Cai W.X., Hozain M., Kang W., Kiedaisch B., Strauss R.E., Hequet E.F., Wyatt B.G., Jividen G.M., Holaday A.S. Transgenic cotton over-producing spinach sucrose phosphate synthase showed enhanced leaf sucrose synthesis and improved fiber quality under controlled environmental conditions // *Plant Mol Biol.* – 2007. – V.63. – P. 815-832.
62. Park J.Y., Canam T., Kang K.Y., Ellis D.D., Mansfield S.D. Over-expression of an arabidopsis family A sucrose phosphate synthase (SPS) gene alters plant growth and fibre development // *Transgenic Res.* – 2008. – V. 17. – P. 181-192.
63. Ku M.S., Agarie S., Nomura M., Fukayama H., Tsuchida H., Ono K., Hirose S., Toki S., Miyao M., Matsuoka M. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants // *Nat. Biotechnol.* – 1999. – V. 17. – P. 76-80.
64. Chastain C.J., Xu W., Parsley K., Sarath G., Hibberd J.M., Chollet R. The pyruvate, orthophosphate dikinase regulatory proteins of *Arabidopsis* possess a novel, unprecedented Ser/Thr protein kinase primary structure // *Plant J.* – 2008. – V. 53. – P. 854-863.
65. Parsley K., Hibberd J.M. The *Arabidopsis* PPK gene is transcribed from two promoters to produce differentially expressed transcripts responsible for cytosolic and plastidic proteins // *Plant Mol Biol.* – 2006. – V. 62. – P. 339-349.
66. Moons A., Valcke R., Van Montagu M. Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C3 plant // *Plant J.* – 1998. – V. 15. – P. 89-98.
67. Chastain C.J., Heck J.W., Colquhoun T.A., Voge D.G., Gu X.Y. Posttranslational regulation of pyruvate, orthophosphate dikinase in developing rice (*Oryza sativa*) seeds // *Planta.* – 2006. – V.224(4). – P. 924-934.
68. Taylor L., Nunes-Nesi A., Parsley K., Leiss A., Leach G., Coates S., Winkler A., Fernie A.R., Hibberd J.M. Cytosolic pyruvate, orthophosphate dikinase functions in nitrogen remobilization during leaf senescence and limits individual seed growth and nitrogen content // *Plant J.* – 2010. – V. 62. – P. 641-652.
69. Taniguchi Y., Ohkawa H., Masumoto C., Fukuda T., Tamai T., Lee K., Sudoh S., Tsuchida H., Sasaki H., Fukayama H., Miyao M. Overproduction of C4 photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C4-like photosynthetic pathway into rice // *J Exp Bot.* – 2008. – V. 59. – P. 1799-1809.
70. Rumeau D., Cuiñé S, Fina L., Gault N., Nicole M., Peltier G. Subcellular distribution of carbonic anhydrase in *Solanum tuberosum* L. leaves: characterization of two compartment-specific isoforms // *Planta.* – 1996. – V. 99. – P. 79-88.
71. Hayano-Kanashiro C., Calderón-Vázquez C., Ibarra-Laclette E., Herrera-Estrella L., Simpson J. Analysis of gene expression and physiological responses in three Mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation // *PLoS One.* – 2009. – V. 4(10):e7531.
72. Khandelwal A., Elvitigala T., Ghosh B., Quatrano R.S. *Arabidopsis* transcriptome reveals control circuits regulating redox homeostasis and the role of an AP2 transcription factor // *Plant Physiol.* – 2008. – V. 148. – P. 2050-2058.
73. Bräutigam A., Kajala K., Wullenweber J., Sommer M., Gagneul D., Weber K.L., Carr K.M., Gowik U., Maß J., Lercher M.J., Westhoff P., Hibberd J.M., Weber A.P. An mRNA blueprint for C4 photosynthesis derived from comparative transcriptomics of closely related C3 and C4 species // *Plant Physiol.* – 2010, Jun 11.
74. Grotewold E. Transcription factors for predictive plant metabolic engineering: are we there yet? // *Curr Opin Biotechnol.* – 2008. – V. 19. – P. 138-144.
75. Saibo N.J.M., Lourenco T. and Oliveira M.M. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses // *Annals of Botany.* – 2009. – V.103. – P. 609–623.



76. Pitzschke A., Djamei A., Bitton F., Hirt H. A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signalling. // *Plant*. – 2009. – V. 2. – P. 120-137.
77. Schmidt E.E. and. Davies Ch.J. The origins of polypeptide domains // *Bioessays*. – 2007. – V.29. – P. 262–270.
78. Rosic N.N. Versatile capacity of shuffled cytochrome P450s for dye production // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2009. – V. 82. – P. 203-210.

Түйін

Шолуда сумен және жарықпен қамтамасыз етілу, тыныс алу, фототыныс алу, CO₂ фиксациясының арақатынасы, фотосинтездің C₃, C₄ және САМ жолдарының ерекшеліктері қысқаша сипатталған. Сонымен қатар өсімдіктердің өнімділігін арттыру мақсатында рибулезобисфосфат карбоксилаза, активаза, фосфоэнолпируват карбоксилаза және т.б. фермент гендері, сахароза синтезі және транскрипция факторлары арқылы C₃ өсімдіктерін трансформациялайтын тәжірибелер қарастырылған.

Summary

This review shortly considers some features of C₃, C₄ and CAM photosynthesis to respond to the environment. Experiments for C₃ plants transformation by introduction of genes of Rubisco, activase Rubisco, phosphoenolpyruvate carboxylase and other enzymes of C₄ photosynthesis, sucrose synthesis and transcription factors with aim to increase plant productivity are discussed.
