

Perspektywy wykorzystania inżynierii genetycznej do zwiększenia wydajności fotosyntezy

STRESZCZENIE

W drugiej połowie XX wieku miał miejsce znaczący wzrost produkcji rolnej, jednak uważa się, iż uzyskiwany obecnie plon jest maksymalnym, jaki można zebrać z odmian otrzymywanych tradycyjnymi metodami. Ponieważ spodziewany jest dalszy wzrost zapotrzebowania na produkty pochodzenia roślinnego, konieczne jest poszukiwanie innych rozwiązań pozwalających na podniesienie produktywności roślin. Postuluje się wykorzystanie w tym celu metod inżynierii genetycznej. W niniejszym artykule omówione zostały kierunki badań nad zwiększeniem wydajności obu faz fotosyntezy, w szczególności koncepcje dotyczące badań nad usprawnieniem Rubisco, wprowadzeniem do roślin uprawnych mechanizmów zagęszczania CO_2 , ograniczeniem strat wynikających z fotooddychania oraz usprawnieniem etapu regeneracji fazy ciemnej.

WPROWADZENIE

W drugiej połowie XX wieku miał miejsce znaczący wzrost produktywności roślin uprawnych. Wynikał on z wprowadzenia nowych wysokoplennych odmian, stosowania nawozów sztucznych oraz środków ochrony roślin [1]. Szacuje się, że w 1951 roku średni plon zbóż wynosił 1,2 tony/ha, podczas gdy w 1993 roku otrzymywano niemal dwa razy tyle, 2,3 tony/ha [2]. W porównaniu z wiekiem ubiegłym, w XXI stuleciu wzrost produktywności najważniejszych gatunków roślin uprawnych był jednak niewielki. Uważa się, iż uzyskiwany obecnie plon jest maksymalnym, jaki można uzyskać z odmian otrzymywanych tradycyjnymi metodami [1,3]. Poza wykorzystaniem roślin w celach konsumpcyjnych, zwiększa się popyt na inne produkty pochodzenia roślinnego np. biopaliwa. Konieczne jest zatem poszukiwanie innych rozwiązań pozwalających na podniesienie produktywności roślin. Postuluje się wykorzystanie w tym celu metod inżynierii genetycznej [3]. Produktywność roślin zależy od wielu czynników, dlatego badania prowadzone są w wielu kierunkach. Podejmowane są próby wpływania na szybkość wzrostu i fazy rozwojowe roślin, czy zwiększania ich odporności na stresy biotyczne i abiotyczne. Wiele badań dotyczy możliwości zwiększenia wydajności fotosyntezy, czyli procesu odpowiedzialnego za asymilację CO_2 i produkcję biomasy.

Fotosynteza jest procesem bardzo złożonym. Możemy w niej jednak wyróżnić dwa podstawowe etapy: tak zwaną fazę jasną fotosyntezy oraz fazę ciemną. Reakcje fazy jasnej zachodzą w błonach tylakoidów i prowadzą do uzyskania siły redukcyjnej, czyli NADPH oraz ATP, które następnie są wykorzystywane do asymilacji CO_2 , zachodzącej w fazie ciemnej. W ciągu ostatnich dwóch dziesięcioleci proponowano i sprawdzano skuteczność rozwiązań mających na celu zwiększenie wydajności rozmaitych etapów zachodzących podczas obydwu tych etapów.

STRATEGIE USPRAWNIANIA FAZY JASNEJ FOTOSYNTETY

Faza jasna fotosyntezy jest przykładem procesu, który przez miliardy lat ewolucji został wysoce zoptymalizowany, reakcje zachodzące w błonach tylakoidów są szybkie i bardzo wydajne. Specyficzne barwniki fotosyntetyczne czy białka antenowe pojawiały się u określonych grup systematycznych i były udoskonalane w ich obrębie [4]. Rośliny wyższe „odziedziczyły” aparat fotosyntetyczny po zielenicach, podczas gdy odległe spokrewnione organizmy fotosyntetyczne dysponują odmiennymi sposobami na wydajną absorpcję światła, czy ochronę przed jego nadmiarem. Inżynieria genetyczna umożliwia zaimplementowanie pożądanych genów organizmom niespokrewnionym z „dawcą”, tym samym pozwala ominąć ograniczenia wynikające z przeszłości ewolucyjnej [3].

Część badań nad usprawnieniem fazy jasnej fotosyntezy dotyczy zwiększenia wydajności absorpcji światła. Kluczowym elementem aparatu fotosyntetycznego

Beatrycze Nowicka

Jerzy Kruk✉

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

✉ Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; tel.: (12) 664 63 61, e-mail: jerzy.kruk@uj.edu.pl

Artykuł otrzymano 22 stycznia 2018 r.
Artykuł zaakceptowano 15 lutego 2018 r.

Słowa kluczowe: asymilacja węgla, fotooddychanie, inżynieria genetyczna, mechanizmy zagęszczania CO_2 , rośliny C_4 , Rubisco

Wykaz skrótów: Bchl – bakteriochlorofil; CCM – mechanizmy zagęszczania CO_2 ; Chl – chlorofil; Rubisco – karboksylaza/oxygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu; PEP – fosfoenolopirogronian; RuBP – rybulozo-1,5-bisfosforan

Podziękowania: Praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego 2015/19/B/NZ9/00422, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

tycznego, determinującym jego zdolność do pochłaniania energii promieniowania elektromagnetycznego są barwniki fotosyntetyczne. W toku ewolucji organizmy fotosyntetyczne specjalizowały się w wykorzystywaniu światła o takim składzie spektralnym, jaki był dostępny w niszy ekologicznej, w której występowały. Doprowadziło to do sytuacji, w której zakres widma promieniowania elektromagnetycznego wykorzystywanego przez rośliny wyższe do fotosyntezy jest stosunkowo wąski. Ponieważ rośliny uprawne nie muszą konkurować o dostęp do światła, cechą pożądaną z punktu widzenia człowieka byłaby możliwość korzystania z jak najszerzego zakresu widma światła [4].

U organizmów przeprowadzających fotosyntezę oksygeniczną, czyli sinic i eukariontów fotosyntetycznych, występują dwa fotosystemy absorbujące światło o zbliżonej długości fali, co oznacza, że konkurują one ze sobą o fotony [3]. Jedną z bardziej ambitnych koncepcji inżynierii fotosyntezy jest wprowadzenie do roślin genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy bakteriochlorofilu (Bchl) wraz z genami kodującymi centrum reakcji bakterii purpurowych. Pozwoliłoby to na otrzymanie organizmu, który miałby fotosystem zawierający chlorofil (Chl) i absorbujący światło widzialne, a także fotosystem zawierający Bchl i wykorzystujący daleką czerwień oraz bliską podczerwień [3]. Takie rozwiązanie jest jednak wyjątkowo trudne do osiągnięcia, ponieważ wymaga zastąpienia całego fotosystemu i jego systemu anten. Co więcej, szlaki biosyntezy Bchl i Chl współdzielą pierwsze etapy, co oznacza, że konkurowałyby ze sobą o substraty. Hitchcock i współaut. [4] wprowadzili do mutantu bakterii purpurowej *Rhodobacter spheroides*, niezdolnego do syntezy Bchl *a*, geny potrzebne do biosyntezy Chl *a*. Transgeniczna bakteria istotnie produkowała Chl *a*, jednak ponieważ nie wytwarzała Bchl *a* potrzebnego jej do fotosyntezy, nie była zdolna do autotroficznego wzrostu [4].

Ponieważ w warunkach naturalnych organizmy fotosyntetyczne konkurują ze sobą, korzystną strategią jest maksymalizacja absorpcji światła i zacienianie sąsiadów. W wyniku tego w słoneczny dzień, górne liście roślin wyższych absorbują więcej światła, niż są w stanie wykorzystać do fotosyntezy. Nadmiar pochłoniętej energii musi być rozpraszany w celu uniknięcia szkodliwych reakcji ubocznych. W tym samym czasie do liści dolnych dociera światło o natężeniu niewystarczającym do wysycenia zachodzącej tam fotosyntezy. Stąd pomysł, by zmodyfikować zawartość barwników w liściach tak, aby górne zawierały ich mniej niż dolne [3]. Brano też pod uwagę modyfikacje powierzchni i orientacji liści [5]. Na określenie optymalizacji wykorzystania światła w obrębie rośliny używa się w anglojęzycznej literaturze terminu „*smart canopy concept*” [3].

Sytuacja zbliżona do wyżej opisanej dla roślin lądowych, zachodzi także w przypadku hodowli glonów. Glony znajdujące się w powierzchniowej warstwie wody pochłaniają światło w nadmiarze, natomiast w głębszych warstwach występuje jego niedobór. Przeprowadzono szereg eksperymentów na sinicach i glonach jednokomórkowych ze zmniejszoną zawartością kompleksów antenowych lub zmniejszonymi rozmiarami anten [6-8]. U mutantu *Synechocystis* PCC 6803 nie syntetyzującego fikocyjaniny, zaobserwowano wyższą produkcję biomasy w porównaniu z

typem dzikim, gdy hodowano sinice w silnym świetle [7]. Analogiczne wyniki uzyskano dla jednokomórkowej zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii*, u której częściowo wyciszono ekspresję genów z rodziny LHC [8] lub hamowano syntezę LHC na etapie translacji [6].

Postulowano także, że dla zwiększenia produktywności roślin korzystne byłoby skrócenie czasu relaksacji procesów fotoprotekcyjnych odpowiedzialnych za rozpraszanie nadmiaru zaabsorbowanej energii [2].

STRATEGIE USPRAWNIANIA FAZY CIEMNEJ FOTOSYNTAZY

Jednym z najważniejszych czynników determinujących produktywność roślin jest wydajność asymilacji CO₂. Z uwagi na pochodzenie plastydów od sinic, wszystkie fotosyntetyczne eukarionty wiążą CO₂ w cyklu Calvina [9]. Kluczowy enzym tego cyklu, karboksylaza/oxygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu (Rubisco) jest jednak daleka od doskonałości.

Rubisco nie dyskryminuje CO₂ i O₂, co oznacza, że oprócz pożądanej reakcji karboksylacji rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBP), katalizuje także uboczną reakcję utleniania tego substratu, co prowadzi do uwalniania węgla, zamiast do jego wiązania [10]. Cykl Calvina wyewoluował w środowisku niskiej zawartości tlenu w atmosferze lub w warunkach beztlenowych. Nie było zatem presji selekcyjnej na wykształcenie większej selektywności enzymu wiążącego CO₂ [11]. Potem jednak stężenie tlenu w atmosferze gwałtownie wzrosło. Obecnie, gdy wynosi ono 21%, podczas gdy stężenie CO₂ to 0,04%, u roślin C₃, do których należy zdecydowana większość gatunków roślin uprawnych, jedna na 3-4 cząsteczki RuBP jest utleniana przez Rubisco, zamiast ulegać karboksylacji [10]. W wyniku utleniania RuBP powstaje jedna cząsteczka aldehydu 3-fosfoglicerynowego oraz jedna cząsteczka 2-fosfoglikolanu. Fosfoglikolan jest inhibitorem enzymów uczestniczących w metabolizmie węgla i dlatego nie może gromadzić się w komórkach. Procesem pozwalającym przekształcić fosfoglikolan w związki, które mogą zostać ponownie włączone do metabolizmu podstawowego jest fotooddychanie. Jego przeprowadzanie wymaga dodatkowego nakładu energii, prowadzi też do utraty organicznego węgla i azotu. Przetworzeniu dwóch cząsteczek fosfoglikolanu towarzyszy powstanie jednej cząsteczki CO₂ i jednej cząsteczki NH₃ [12,13]. Szacuje się, że w temperaturze 25°C około 25% asymilowanego węgla jest traczone podczas fotooddychania, co oznacza, że w skali globalnej rocznie do atmosfery powraca około 29 gigaton organicznego węgla [1,10].

Kolejnym ograniczeniem Rubisco jest niska liczba obrotów enzymu. Dla Rubisco z większości organizmów wynosi ona 1-10 s⁻¹, podczas gdy dla pozostałych enzymów metabolizmu podstawowego parametr ten zazwyczaj mieści się w granicach 50-100 s⁻¹. Aby zapewnić odpowiednią wydajność wiązania węgla, rośliny wytwarzają duże ilości Rubisco. Enzym ten może stanowić nawet do 50% białek rozpuszczalnych [14]. Obliczono, że około 25% obecnego w liściach azotu jest przeznaczane na syntezę Rubisco [15]. Innym przystosowaniem służącym usprawnieniu wiązania węgla

i ograniczeniu fotooddychania są różnorodne mechanizmy zagęszczania CO₂ (CCM, ang. Carbon Concentrating Mechanisms) [13].

Można wyróżnić trzy główne kierunki badań zmierzających do zwiększenia wydajności fazy ciemnej fotosyntezy: badania dotyczące usprawnienia Rubisco, inżynierię fotooddychania oraz próby wprowadzenia CCM do najważniejszych gatunków roślin uprawnych.

MODYFIKACJE RUBISCO

Dla wielu szlaków/cykli metabolicznych podstawowym sposobem na zwiększenie ich wydajności u roślin jest nadekspresja genów kodujących enzym lub enzymy przeprowadzające kluczowe etapy danego procesu. Strategia ta nie sprawdziła się jednak jako sposób podniesienia efektywności fazy ciemnej fotosyntezy, bowiem transgeniczny ryż z nadekspresją Rubisco nie wykazywał zwiększonej asymilacji CO₂ [16]. Podjęto także próby uzyskania Rubisco o ulepszonych parametrach katalitycznych tak, aby mniejsza ilość enzymu była wymagana do wydajnego wiązania węgla. Oznaczałoby to niższe nakłady energii i metabolitów do syntezy Rubisco [17].

Rubisco występujące w naturze różnią się specyficznością i szybkością katalizowanej reakcji. Jednak dla tego enzymu zachodzi ujemna korelacja pomiędzy k_{cat} i specyficznością enzymu [15,18]. W celu podniesienia wydajności karboksylacji, rozważa się wprowadzenie mało selektywnego Rubisco o relatywnie wysokiej k_{cat} razem z CCM, zapewniającym korzystny stosunek CO₂/O₂ w bezpośrednim otoczeniu enzymu (zob. następny podrozdział). Badania wykazały także, że Rubisco pochodzące z krasnostów cechują się korzystnymi parametrami, są one około dwukrotnie bardziej selektywne od enzymów z typowych roślin C₃ przy zachowaniu podobnych wartości K_m oraz maksymalnej szybkości asymilacji CO₂. Próbowano ekspresjonować je w roślinach, jednak nie dochodziło tam do poprawnego fałdowania i składania enzymu [15,19]. Pewne nadzieje wiąże się z Rubisco pochodzącymi z okrzemek [20].

Poza badaniami nad naturalnymi formami Rubisco, podejmuje się również próby otrzymania enzymów o ulepszonych własnościach katalitycznych. Opracowano systemy do sztucznej ukierunkowanej ewolucji Rubisco, pozwalające na selekcję enzymu o korzystniejszych właściwościach katalitycznych po przeprowadzeniu losowej mutagenезy. Systemy takie oparto na transgenicznej *E. coli*, bakterii purpurowej *Rhodobacter capsulatus*, sinicy *Synechococcus* PCC 6308 oraz zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii*. Do tej pory nie udało się jednak dzięki tej metodzie uzyskać Rubisco o parametrach katalitycznych korzystniejszych niż te, jakie można spotkać u enzymów występujących w naturze [17,21,22].

Prowadzono także eksperymenty z wykorzystaniem mutagenезy punktowej. Metoda ta okazała się bardzo przydatna w badaniu własności enzymu i jego mechanizmu katalitycznego. Dzięki niej odkryto, które reszty aminokwasowe są ważne dla zapewnienia selektywności, a które wpływają na szybkość reakcji [17]. Również i w tym przypadku nie

udało się jednak uzyskać znaczącej poprawy parametrów enzymu [3].

Kolejny problem związany z modyfikacjami Rubisco wiąże się z trudnościami, na jakie napotyka się podczas prób jego heterologicznej ekspresji w organizmach transgenicznych. Rubisco roślin wyższych należy do tzw. typu I B i jest heksadekamerem składającym się z 8 dużych podjednostek, pełniących funkcję katalityczną i 8 małych, uczestniczących w regulacji [23]. Duże podjednostki są kodowane w genomie chloroplastowym, natomiast małe w jądrowym. Genomy roślin wyższych zwykle zawierają kilka genów małych podjednostek Rubisco. Pozwala to na zróżnicowaną ekspresję tych genów w zależności od warunków środowiska i etapu rozwoju rośliny [24]. Synteza małych i dużych podjednostek musi być ściśle skoordynowana. Aby powstał aktywny enzym, konieczne są odpowiednie modyfikacje potranslacyjne. Małe podjednostki są transportowane do chloroplastów, gdzie musi dojść do poprawnego fałdowania i składania całego kompleksu z udziałem odpowiednich białek opiekuńczych [15]. Wykazano, że nawet pojedyncze substytucje reszt aminokwasowych mogą mieć znaczny wpływ na poprawne fałdowanie Rubisco u danego gatunku [19]. Aktywność Rubisco zależy też od jej oddziaływania z aktywą Rubisco [17]. Przeprowadzono szereg eksperymentów, mających na celu otrzymanie roślin transgenicznych z wprowadzonymi genami kodującymi Rubisco, jednak w wielu przypadkach nawet jeśli dochodziło do transkrypcji wprowadzonych transgenów, nie wykrywano produktu białkowego, albo białko było syntetyzowane, ale nie ulegało poprawnemu fałdowaniu i składaniu, lub też aktywność uzyskanego kompleksu była bardzo niska [17,25]. Ponieważ zazwyczaj Rubisco składające się z małych i dużych podjednostek pochodzących z różnych gatunków wykazują niższą aktywność od enzymów złożonych z podjednostek pochodzących z tego samego gatunku, należałoby transformować rośliny genami dużych i małych podjednostek jednocześnie. Oznacza to konieczność przeprowadzenia udanej transformacji zarówno genomu jądrowego, jak i chloroplastowego [26].

Innym podejściem jest modyfikacja aktywazy Rubisco [24]. Aktywazy Rubisco są enzymami zależnymi od ATP, przeciwdziałającymi hamowaniu Rubisco przez fosforany cukrów. Doświadczenia w warunkach *in vitro* wykazały, że roślinne aktywazy Rubisco są niestabilne w temperaturze powyżej 30°C. Zastąpienie natywnej aktywazy Rubisco formami bardziej termostabilnymi pozwoliło uzyskać transgeniczny *A. thaliana* wykazujący większy przyrost biomasy i plon z nasion w porównaniu z typem dzikim, gdy rośliny hodowano w podwyższonej temperaturze [27].

WPROWADZANIE MECHANIZMÓW ZAGĘSZCZANIA DWUTLENKU WĘGLA

MECHANIZMY ZAGĘSZCZANIA CO₂ POCHODZĄCE Z SINIC I GLONÓW EUKARIOTYCZNYCH

Wiele organizmów fotosyntetycznych, zwłaszcza gatunków występujących w środowisku wodnym, wykształciło CCM działające w obrębie pojedynczych komórek. W ich skład wchodzi białkowe transportery HCO₃⁻, anhidrazy przekształcające odwracalnie CO₂ w HCO₃⁻, a także wyspe-

cjalizowane struktury subkomórkowe, gdzie znajduje się Rubisco, a lokalne stężenie CO_2 jest znacząco podwyższone. Struktury obecne u sinic (oraz niektórych proteobakterii) nazywamy karboksosomami, natomiast u glonów eukariotycznych występują pirenoidy [28,29].

CCM u sinic cechuje duża wydajność, mogą one zagęszczać CO_2 w bezpośrednim otoczeniu Rubisco nawet tysiąckrotnie. Do tej pory u sinic odkryto pięć systemów pozwalających na pobieranie nieorganicznego węgla. Trzy z nich oparte są na transporterach HCO_3^- , dwa kolejne wykorzystują błonowe kompleksy dehydrogenaz NAD(P)H, przekształcające CO_2 do HCO_3^- . Aniony wodorowęglanowe nie mogą swobodnie dyfundować przez błony, dlatego zostają niejako „uwięzione” wewnątrz komórki. Poszczególne gatunki sinic zwykle dysponują kilkoma systemami pobierania nieorganicznego węgla, co pozwala im dostosowywać się do zmiennych warunków środowiska, transportery o wysokim powinowactwie do HCO_3^- ulegają zwiększonej syntezy w warunkach niedoboru CO_2 [29,30]. W cytoplazmie komórek sinic znajdują się karboksosomy, wielościenne, uporządkowane makrostruktury zbudowane z Rubisco, anhidrazy węglanowej oraz białek osłonki (ang. shell proteins). W zależności od typu Rubisco obecnego w karboksosomach (typ I A i I B) wyróżnia się odpowiednio karboksosomy typu α i β [31]. Anhidraza węglanowa przekształca HCO_3^- do CO_2 , natomiast zadaniem białek osłonki jest ograniczanie dyfuzji O_2 do wewnątrz a CO_2 na zewnątrz karboksosomów [28].

Eukariotyczne CCM odkryto u wielu glonów, między innymi zielenic, krasnorostów, bruzdnic i okrzemek. Występują one także u gwałików [11,29]. Mechanizmy te są bardzo zróżnicowane i mają pochodzenie polifiletyczne, jednak zasada ich działania jest zbliżona do tej, na jakiej oparte są systemy sinicowe. Różnorodne transportery HCO_3^- odpowiadają za zagęszczanie anionów węglanowych w stromie chloroplastów. Chloroplastowymi strukturami zawierającymi Rubisco i anhidrazę węglanową są tzw. pirenoidy. Zazwyczaj są one otoczone ziarnami skrobi [29]. Dzięki obecności CCM, okrzemki mogą przeprowadzać wydajną fotosyntezę z udziałem o wiele mniejszych ilości Rubisco w porównaniu z roślinami wyższymi. Enzym ten u okrzemek stanowi tylko 2-6% całkowitego białka, a więc kilkanaście razy mniej niż u roślin lądowych [32].

Przeprowadzono eksperymenty, których celem było wprowadzenie CCM do roślin uprawnych [33]. Skupiono się na systemach sinicowych, ponieważ zostały one lepiej poznane [28]. U roślin wyższych występuje Rubisco typu I B, dlatego też badania koncentrują się nad inżynierią β -karboksosomów [33]. Uzyskano transgeniczny tytoń, w którym natywne Rubisco zostało zastąpione enzymem z sinicy *Synechococcus elongatus* [34,35]. Sinicowe Rubisco posiadają maksymalną szybkość karboksylacji wyższą od enzymów roślinnych, lecz niższe powinowactwo do CO_2 , są też mniej selektywne [15]. Z tego względu tytoń wytwarzający enzym pochodzący z sinicy, musiał być hodowany w podwyższonym stężeniu CO_2 [34,35]. Prowadzono także badania nad uzyskaniem transgenicznego tytoniu produkującego karboksosomy. Przejściowa ekspresja genów kodujących białka karboksosomów z *Synechococcus elongatus*

PCC 7942 z dołączonym peptydem sygnałowym kierującym do chloroplastów doprowadziła do powstawania w tych organellach uporządkowanych struktur formowanych przez produkty wprowadzonych transgenów [36]. Sukces osiągnięto również w doświadczeniach mających na celu wprowadzenie do roślin transporterów HCO_3^- pochodzących z sinic. Uzyskano linie transgeniczne, w których dochodziło do syntezy tych białek, a następnie kierowania ich do osłonek chloroplastów [37-39]. Rozpoczęto także badania nad wprowadzeniem do roślin CCM z zielenic. Do tej pory udało się uzyskać ekspresję wybranych komponentów CCM pochodzących z *Chlamydomonas reinhardtii* w tytoniu i *A. thaliana* [40].

ROŚLINY C_4

Niektóre rośliny wyższe wykształciły inny mechanizm zagęszczania CO_2 , nazywany szlakiem C_4 . Jest on dodatkowym szlakiem wiązania CO_2 , poprzedzającym, ale nie zastępującym cykl Calvin. CO_2 wiązany przez karboksylazę fosfoenolopirogronianu (PEP) jest ponownie uwalniany w sąsiedztwie Rubisco, która przeprowadza właściwą asymilację węgla. U większości gatunków tego typu, adaptacji metabolicznej towarzyszą przystosowania anatomiczne określane mianem anatomii Kranza. Polegają one na zróżnicowaniu tkanki fotosyntetycznej liścia na mezofil oraz komórki pochwy okołowiązkowej [41]. Mięszki mezofilu zawiera dużo przestworów międzykomórkowych, co ułatwia dyfuzję CO_2 . W jego komórkach anhidraza węglanowa przekształca CO_2 w HCO_3^- , stanowiący substrat dla karboksylazy PEP. W wyniku karboksylacji powstaje czterowęglowy jabłczan (stąd nazwa cyklu). W zależności od podtypu cyklu C_4 jabłczan może być eksportowany do komórek pochwy okołowiązkowej lub też najpierw następuje transaminacja i transportowanym metabolitem jest asparaginian, który w miejscu docelowym ponownie przekształcany do jabłczanu. W cytozolu komórek pochwy okołowiązkowej dochodzi do dekarboksylacji jabłczanu, uwalniany CO_2 po dyfuzji do chloroplastów jest wiązany przez Rubisco, a pirogronian powraca do komórek mezofilu. W pochwie okołowiązkowej nie ma dużych przestworów międzykomórkowych, ponadto skład chemiczny ściany komórkowej jest zmodyfikowany tak, by ograniczać dyfuzję CO_2 z powrotem do mezofilu [41]. Oszacowano, że w chloroplastach roślin C_3 stężenie CO_2 wynosi poniżej $10 \mu\text{M}$, podczas gdy stężenie tego gazu w chloroplastach pochwy okołowiązkowej roślin C_4 osiąga $160 \mu\text{M}$ i więcej [20]. Dzięki temu, podobnie jak to ma miejsce u sinic i zielenic dysponujących CCM, rośliny C_4 mogą korzystać z Rubisco o niższej selektywności, a za to wyższej szybkości maksymalnej od enzymów roślin C_3 [15]. Dlatego też, rośliny C_4 mogą wydajnie asymilować CO_2 , wytwarzając mniejsze ilości Rubisco, enzym ten stanowi u nich 10-25% rozpuszczalnych białek liścia, czyli jest go kilkakrotnie mniej niż u roślin C_3 [24].

Cykl C_4 wymaga dodatkowego nakładu energii, ale za to umożliwia wydajniejsze wiązanie CO_2 oraz ograniczenie utraty wody. Dzięki temu zwiększa dostosowanie roślin C_4 , zwłaszcza w warunkach sprzyjających fotooddychaniu, takich jak silne światło, wysoka temperatura oraz ograniczona dostępność wody. Szlak C_4 wyewoluował niezależnie u co najmniej 62 grup systematycznych [42].

Do roślin C_4 należą takie gatunki jak kukurydza i trzcina cukrowa, jednakże większość roślin uprawnych to rośliny C_3 . Dlatego postulowano, aby za pomocą inżynierii genetycznej wprowadzić cykl C_4 do najważniejszych gatunków zbóż C_3 . Jest to jednak bardzo trudne zadanie. Liczba potrzebnych enzymów i transporterów jest stosunkowo niewielka, jednak do tego aby cykl C_4 mógł zachodzić prawidłowo, konieczne jest zapewnienie wymaganej anatomii liści i odpowiedniego składu białkowego chloroplastów [43]. Mimo tego, w ciągu ostatnich 20 lat podejmowano próby wprowadzenia cyklu C_4 do roślin C_3 [13]. Wiele eksperymentów dotyczyło ekspresji genów kodujących enzymy tego cyklu w ryżu [44,45]. Obecnie prowadzi się intensywne badania, mające na celu identyfikację genów odpowiedzialnych za wykształcanie anatomii Kranza i funkcjonalne zróżnicowanie komórek mezofilu oraz pochwy okołowiązkowej [43,46,47]. Ponieważ do wykształcenia cyklu C_4 doszło niezależnie wielokrotnie, a podstawowe enzymy cyklu są obecne w roślinach C_3 , gdzie pełnią inne funkcje, przypuszcza się, że uzyskanie tego przystosowania metabolicznego jest procesem mniej skomplikowanym, niż można by sądzić na podstawie porównań anatomii i fizjologii roślin C_3 i C_4 [43].

Znane są także gatunki roślin C_4 , u których dochodzi do funkcjonalnego zróżnicowania się chloroplastów w obrębie jednej komórki [48]. Są to jednak albo rośliny wodne, albo sukulentki, co oznacza, że ich fizjologia i anatomia różni się znacznie od tej występującej u najważniejszych gatunków roślin uprawnych [49].

INŻYNIERIA FOTOODDYCHANIA

Fotooddychanie prowadzi do strat organicznego węgla i azotu. Z tego względu sądzono, że ograniczenie tego procesu powinno wpłynąć korzystnie na produktywność roślin. W praktyce jednak okazuje się, iż fotooddychanie jest ściśle zintegrowane z najważniejszymi szlakami metabolicznymi roślin. Zaobserwowano bezpośrednią zależność pomiędzy intensywnością fotooddychania a odpornością na rozmaite stresy abiotyczne. Uważa się też, że może ono być rodzajem „zaworu bezpieczeństwa” pozwalającego zużywać NADPH w sytuacji, gdy powstaje on w nadmiarze. Nadtlenek wodoru, który jest wytwarzany w czasie fotooddychania może pełnić funkcję ochronną podczas ataku patogenu. Postulowano również, że fotooddychanie może także uczestniczyć w syntezie seryny [1].

Mutanty enzymów uczestniczących w fotooddychaniu wykazują upośledzony wzrost w normalnej atmosferze [50]. Wyciszenie genów kodujących te enzymy również prowadziło do obniżenia produktywności roślin transgenicznych [1].

Zastosowano zatem inną strategię - selekcjonowano rośliny, które tolerowały podwyższone stężenie tlenu. Większość takich roślin cechowała się podwyższonym poziomem katalazy. Nie znaleziono natomiast żadnej, u której tolerancja na wysokie stężenia tlenu wynikałaby z ograniczonego fotooddychania [51]. Obserwowano pozytywną korelację pomiędzy produktywnością a natężeniem fotooddychania,

wynikającą z tego, że rośliny o wysokiej produktywności cechuje wyższa intensywność fotosyntezy [52]. Co ciekawe, nadekspresja genów kodujących wybrane enzymy uczestniczące w fototoddychaniu u *Arabidopsis thaliana* i ryżu prowadziła do zwiększenia wydajności fotosyntezy i szybkości wzrostu [1]. Postulowano, że intermediały fotooddychania uczestniczą w regulacji fotosyntezy [53].

Skoro obniżenie intensywności fotooddychania nie prowadziło do podwyższenia produktywności roślin, zaproponowano inne rozwiązania. Polegały one na wprowadzeniu alternatywnych, mniej wymagających energetycznie szlaków metabolizmu fosfoglikolanu.

Grupa Maiera [54], wprowadziła do chloroplastów *A. thaliana* szlak katabolizmu 2-fosfoglikolanu, prowadzący do przekształcenia go do dwóch cząsteczek CO_2 . Wprawdzie w jego wyniku obydwie atomy węgla wchodzące w skład fosfoglikolanu zostają całkowicie utlenione (a nie jeden, jak to ma miejsce w natywnym cyklu), ale nie dochodzi do zużycia ATP oraz strat NH_3 . Ponadto, w transgenicznych roślinach uzyskanych przez Maiera i wsp. CO_2 pochodzący z rozkładu fosfoglikolanu jest uwalniany w chloroplastach, dzięki czemu może być ponownie asymilowany. Kebeish i współpracownicy [55] wprowadzili do *A. thaliana* szlak katabolizmu 2-fosfoglikolanu występujący u *E. coli*. Glikolan jest w nim przekształcany do glicerynianu, co pozwala ominąć reakcje zachodzące w mitochondriach i peroksysomach. Dzięki temu, zużywane jest mniej ATP i siły redukcyjnej. Transgeniczne rośliny, uzyskane przez obie wyżej wymienione grupy, wykazywały zwiększoną produkcję biomasy, jednak tylko w warunkach dnia krótkiego i przy optymalnym zaopatrzeniu w wodę i azot [54,55]. Przeprowadzono także eksperyment, mający na celu ekspresję genów kodujących karboligazę glioksalanu i izomerazę hydroksypirogronianu z *E. coli* w tytoniu. Miało to umożliwić pominięcie mitochondrialnego etapu fotooddychania, gdzie dochodzi do utraty CO_2 i NH_3 . Niestety, uzyskane rośliny transgeniczne nie produkowały izomerazy hydroksypirogronianu [56]. Rozwiązanie zaproponowane przez grupę Kebeisha zostało wykorzystane przez innych badaczy. Otrzymano transgeniczny lnicznik siewny (roślina oleista), który cechował się podwyższoną produkcją nasion [57]. Transgeniczny ziemniak z ekspresją jednego z enzymów wykorzystanych przez Kebeisha i współautorów, dehydrogenazy glikolanu, pozwalał na uzyskanie podwyższonego plonu z bulw [58].

Znane są jeszcze dwa inne szlaki metabolizowania fosfoglikolanu [1]. Próby wprowadzenia enzymów jednego z tych szlaków, występującego naturalnie u sinic, nie doprowadziły jednak do uzyskania roślin *A. thaliana* o podwyższonej produktywności [10].

Badano także *A. thaliana* i tytoń z nadekspresją genu kodującego syntetazę glutaminy. Spodziewano się, że pozwoli to na wydajniejsze wiązanie NH_3 uwalnianego podczas fotooddychania. Uzyskane rośliny transgeniczne rosły szybciej od kontrolnych w warunkach sprzyjających fotooddychaniu [1].

U zielonych bakterii nitkowatych, glioksalan jest pierwotnym produktem asymilacji HCO_3^- , odbywającej się za

pomocą tzw. dicyklu 3-hydroksypropionowego [9]. Shih i współaut. [2014] wprowadzili do sinicy *Synechococcus elongatus* geny kodujące enzymy cyklu 3-hydroksypropionowego, pozwalające przekształcać glikolan do pirogronianu. Wykazano, że wprowadzony fragment szlaku był aktywny w transgenicznym sinicach, jednak nie rosły one szybciej w porównaniu z kontrolą [59].

POZOSTAŁE KONCEPCJE

Zaproponowano także inne sposoby podniesienia wydajności fotosyntezy wykorzystując zdobycze inżynierii genetycznej. Eksperymenty z wykorzystaniem roślin z obniżoną ekspresją genów kodujących enzymy cyklu Calvina wykazały, że na szybkość przepływu metabolitów przez ten cykl wpływają również enzymy uczestniczące w fazie regeneracji. Spośród tych enzymów najistotniejszą rolę pełni fosfataza sedoheptulozo-1,7-bisfosforanu. Nawet niewielkie zmniejszenie ilości tego białka powadziło do obniżenia wydajności fotosyntezy i spowolnienia wzrostu [60]. Transgeniczny tytoń z nadekspresją genu kodującego fosfatazę sedoheptulozo-1,7-bisfosforanu pochodzącego z *A. thaliana* lub z sinic asymilował CO₂ wydajniej niż typ dziki [61,62].

Postulowano także całkowite zastąpienie cyklu Calvina innym szlakiem pozwalającym na asymilację węgla. Obecnie znanych jest sześć szlaków wiązania CO₂, z czego trzy są wrażliwe na tlen [9]. Spośród pozostałych największe zainteresowanie wzbudza wspomniany wyżej dicykl 3-hydroksypropionianowy. Uzyskano transgeniczną *E. coli* z ekspresją genów kodujących wybrane enzymy tego cyklu [63].

PROBLEMY I PERSPEKTYWY

Próby zwiększenia wydajności fotosyntezy z wykorzystaniem inżynierii genetycznej napotykać liczne przeszkody. Fotosynteza, jako jeden z najważniejszych procesów metabolicznych, jest ściśle powiązana z innymi podstawowymi szlakami. Zmiana pojedynczego etapu/elementu prowadzi do zaburzenia interakcji z resztą metabolizmu. Z tego względu konieczne są dalsze badania podstawowe, pozwalające lepiej zrozumieć powiązania pomiędzy poszczególnymi szlakami metabolicznymi, zarówno na poziomie wymiany intermediatów, jak i wzajemnej regulacji aktywności enzymów przez produkty różnych szlaków oraz udział tych ostatnich w regulacji ekspresji genów [3].

Ograniczenia wynikają także z dostępnych metod. Inżynieria fotosyntezy na większą skalę wymaga skutecznej transformacji genomu chloroplastowego i jądrowego jednocześnie. Konieczne jest również wprowadzanie dużych fragmentów DNA, kodujących całe zestawy białek. Dla wielu gatunków roślin trudno jest uzyskać stabilną transformację, czy wydajną ekspresję wprowadzonego transgenu. Również i w tym przypadku konieczne są intensywne badania podstawowe dotyczące promotorów, terminatorów transkrypcji oraz sekwencji sygnałowych. Choć należy zaznaczyć, że metodologia związana z inżynierią genetyczną cały czas się rozwija i np. dla *Nicotiana glauca* opracowano skuteczne techniki transformacji genomu plastydowego i jądrowego [3].

Ostatnie lata przyniosły też bardzo obiecujące metody pozwalające na wprowadzanie precyzyjnych zmian sekwencji DNA, przede wszystkim tzw. system CRISPR/Cas9, wykorzystujący zmodyfikowaną bakteryjną nukleazę współpracującą z białkiem wiążącym RNA. Częsteczką RNA służy za wzór pozwalający na odnajdywanie, a następnie cięcie komplementarnych fragmentów DNA [64]. Kolejnym ważnym osiągnięciem jest konstrukcja sztucznych minichromosomów, za pomocą których można wprowadzać do roślin większą liczbę genów [65]. Można zatem mieć nadzieję, że w przyszłości modyfikacja fotosyntezy pozwalająca na podniesienie jej wydajności u roślin uprawnych będzie możliwa w znacznie większym stopniu niż obecnie.

PIŚMIENNICTWO

1. Betti M, Bauwe H, Busch FA, Fernie AR, Keech O, Levey M, Ort DR, Parry MA, Sage R, Timm S, Walker B (2016) Manipulating photorespiration to increase plant productivity: recent advances and perspectives for crop improvement. *J Exp Bot* 67: 2977-2988
2. Long SP, Zhu XG., Naidu SL, Ort DR (2006) Can improvement in photosynthesis increase crop yields? *Plant Cell Environ* 29: 315-330
3. Ort DR, Merchant SS, Alric J, Barkan A, Blankenship RE, Bock R, Croce R, Hanson MR, Hibberd JM, Long SP, Moore TA (2015) Redesigning photosynthesis to sustainably meet global food and bioenergy demand. *Proc Natl Acad Sci* 112: 8529-8536
4. Hitchcock A, Jackson PJ, Chidgey JW, Dickman MJ, Hunter CN, Canniffe DP (2016) Biosynthesis of chlorophyll *a* in a purple bacterial phototroph and assembly into a plant chlorophyll-protein complex. *ACS Synth Biol* 5: 948-954
5. Drewry DT, Kumar P, Long SP (2014) Simultaneous improvement in productivity, water use, and albedo through crop structural modification. *Global Change Biol* 20: 1955-1967
6. Beckmann J, Lehr F, Finazzi G, Hankamer B, Posten C, Wobbe L, Kruse O (2009) Improvement of light to biomass conversion by de-regulation of light-harvesting protein translation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol* 142: 70-77
7. Kirst H, Formighieri C, Melis A (2014) Maximizing photosynthetic efficiency and culture productivity in cyanobacteria upon minimizing the phycobilisome light-harvesting antenna size. *Biochim Biophys Acta: Bioenerg* 1837: 1653-1664
8. Mussgnug JH, Thomas-Hall S, Rupprecht J, Foo A, Klassen V, McDowall A, Schenk PM, Kruse O, Hankamer B (2007) Engineering photosynthetic light capture: impacts on improved solar energy to biomass conversion. *Plant Biotechnol J* 5: 802-814
9. Hügler M, Sievert SM (2011) Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. *Mar Sci* 3: 261-289
10. Hagemann M, Bauwe H (2016) Photorespiration and the potential to improve photosynthesis. *Curr Op Chem Biol* 35: 109-116
11. Hagemann M, Kern R, Maurino VG, Hanson DT, Weber AP, Sage RF, Bauwe H (2016) Evolution of photorespiration from cyanobacteria to land plants, considering protein phylogenies and acquisition of carbon concentrating mechanisms. *J Exp Bot* 67: 2963-2976
12. Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci* 15: 330-336
13. Peterhansel C, Krause K, Braun HP, Espie GS, Fernie AR, Hanson DT, Keech O, Maurino VG, Mielewicz M, Sage RF (2013) Engineering photorespiration: current state and future possibilities. *Plant Biol* 15: 754-758
14. Erb TJ, Zarzycki J (2016) Biochemical and synthetic biology approaches to improve photosynthetic CO₂-fixation. *Curr Op Chem Biol* 34: 72-79
15. Whitney SM, Houtz RL, Alonso H (2011) Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO₂-sequestering enzyme, Rubisco. *Plant Physiol* 155: 27-35

16. Suzuki Y, Miyamoto T, Yoshizawa R, Mae T, Makino A (2009) Rubisco content and photosynthesis of leaves at different positions in transgenic rice with an overexpression of RBCS. *Plant Cell Environ* 32: 417-427
17. Parry MA, Andralojc PJ, Mitchell RA, Madgwick PJ, Keys AJ (2003) Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. *J Exp Bot* 54: 1321-1333
18. Tcherkez GG, Farquhar GD, Andrews TJ (2006) Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose biphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 7246-7251
19. Parry MA, Andralojc PJ, Scales JC, Salvucci ME, Carmo-Silva AE, Alonso H, Whitney SM (2013) Rubisco activity and regulation as targets for crop improvement. *J of Exp Bot* 64: 717-730
20. Young JN, Heureux AM, Sharwood RE, Rickaby RE, Morel FM, Whitney SM (2016) Large variation in the Rubisco kinetics of diatoms reveals diversity among their carbon-concentrating mechanisms. *J Exp Bot* 67: 3445-3456
21. Mueller-Cajar O, Whitney SM (2008) Directing the evolution of Rubisco and Rubisco activase: first impressions of a new tool for photosynthesis research. *Photosynth Res* 98: 667-675
22. Parikh MR, Greene DN, Woods KK, Matsumura I (2006) Directed evolution of RuBisCO hypermorphs through genetic selection in engineered *E. coli*. *Prot Eng Des Sel* 19: 113-119
23. Tabita FR, Satagopan S, Hanson TE, Kreeb NE, Scott SS (2008) Distinct form I, II, III, and IV Rubisco proteins from the three kingdoms of life provide clues about Rubisco evolution and structure/function relationships. *J Exp Bot* 59: 1515-1524
24. Carmo-Silva E, Scales JC, Madgwick PJ, Parry MA (2015) Optimizing Rubisco and its regulation for greater resource use efficiency. *Plant Cell Environ* 38: 1817-1832
25. Sharwood RE, von Caemmerer S, Maliga P, Whitney SM (2008) The catalytic properties of hybrid Rubisco comprising tobacco small and sunflower large subunits mirror the kinetically equivalent source Rubiscos and can support tobacco growth. *Plant Physiol* 146: 83-96
26. Wang YL, Zhou JH, Wang YF, Bao JS, Chen HB (2001) Properties of hybrid enzymes between *Synechococcus* large subunits and higher plant small subunits of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 396: 35-42
27. Kurek I, Chang TK, Bertain SM, Madrigal A, Liu L, Lassner MW, Zhu G (2007) Enhanced thermostability of *Arabidopsis* Rubisco activase improves photosynthesis and growth rates under moderate heat stress. *Plant Cell* 19: 3230-3241
28. Badger MR, Price GD (2003) CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J Exp Bot* 54: 609-622
29. Singh SK, Sundaram S, Sinha S, Rahman MA, Kapur S (2016) Recent advances in CO₂ uptake and fixation mechanism of cyanobacteria and microalgae. *Crit Rev Environ Sci Technol* 46: 1297-1323
30. Price GD, Badger MR, Woodger FJ, Long BM (2008) Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, C_i transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *J Exp Bot* 59: 1441-1461
31. Rae BD, Long BM, Whitehead LF, Förster B, Badger MR, Price GD (2013) Cyanobacterial carboxysomes: microcompartments that facilitate CO₂ fixation. *J Mol Microbiol Biotechnol* 23: 300-307
32. Losh JL, Young JN, Morel FM (2013) Rubisco is a small fraction of total protein in marine phytoplankton. *New Phytol* 198: 52-58
33. Hanson MR, Lin MT, Carmo-Silva AE, Parry MA (2016) Towards engineering carboxysomes into C₃ plants. *Plant J* 87: 38-50
34. Lin MT, Occhialini A, Andralojc PJ, Parry MA, Hanson MR (2014) A faster Rubisco with potential to increase photosynthesis in crops. *Nature* 513: 547-550
35. Occhialini A, Lin MT, Andralojc PJ, Hanson MR, Parry MA (2016) Transgenic tobacco plants with improved cyanobacterial Rubisco expression but no extra assembly factors grow at near wild type rates if provided with elevated CO₂. *Plant J* 85: 148-160
36. Lin MT, Occhialini A, Andralojc PJ, Devonshire J, Hines KM, Parry MA, Hanson MR (2014) β -Carboxysomal proteins assemble into highly organized structures in *Nicotiana* chloroplasts. *Plant J* 79: 1-12
37. Pengelly JLL, Förster B, von Caemmerer S, Badger MR, Price GD, Whitney SM, (2014) Transplastomic integration of a cyanobacterial bicarbonate transporter into tobacco chloroplasts. *J Exp Bot* 65: 3071-3080
38. Rolland V, Badger MR, Price GD (2016) Redirecting the cyanobacterial bicarbonate transporters BicA and SbtA to the chloroplast envelope: soluble and membrane cargos need different chloroplast targeting signals in plants. *Front Plant Science* 7: 185
39. Uehara S, Adachi F, Ito-Inaba Y, Inaba T (2016) Specific and efficient targeting of cyanobacterial bicarbonate transporters to the inner envelope membrane of chloroplasts in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 7: 16
40. Atkinson N, Feike D, Mackinder L, Meyer MT, Griffiths H, Jonikas MC, Smith AM, McCormick AJ (2015) Introducing an algal carbon-concentrating mechanism into higher plants: location and incorporation of key components. *Plant Biotechnol J* 14: 1302-1315
41. Gowik U, Westhoff P (2011) The path from C₃ to C₄ photosynthesis. *Plant Physiol* 155: 56-63
42. Sage RF, Christin PA, Edwards EJ (2011) The C₄ plant lineages of planet Earth. *J Exp Bot* 62: 3155-3169
43. Covshoff S, Hibberd JM (2012) Integrating C₄ photosynthesis into C₃ crops to increase yield potential. *Curr Op Biotechnol* 23: 209-214
44. Miyao M, Masumoto C, Miyazawa SI, Fukayama H (2011) Lessons from engineering a single-cell C₄ photosynthetic pathway into rice. *J Exp Bot* 62: 3021-3029
45. Raines CA (2006) Transgenic approaches to manipulate the environmental responses of the C₃ carbon fixation cycle. *Plant Cell Environ* 29: 331-339
46. von Caemmerer S, Quick WP, Furbank RT (2012) The development of C₄ rice: current progress and future challenges. *Sci* 336: 1671-1672
47. Kajala K, Covshoff S, Karki S, Woodfield H, Tolley BJ, Dionora MJA, Mogul RT, Mabilangan AE, Danila FR, Hibberd JM, Quick WP (2011) Strategies for engineering a two-celled C₄ photosynthetic pathway into rice. *J Exp Bot* 62: 3001-3010
48. Sharpe RM, Offermann S (2014) One decade after the discovery of single-cell C₄ species in terrestrial plants: what did we learn about the minimal requirements of C₄ photosynthesis? *Photosynth Res* 119: 169-180
49. Häusler RE, Hirsch HJ, Kreuzaler F, Peterhänsel C (2002) Overexpression of C₄-cycle enzymes in transgenic C₃ plants: a biotechnological approach to improve C₃-photosynthesis. *J Exp Bot* 53: 591-607
50. Timm S, Bauwe H (2013) The variety of photorespiratory phenotypes - employing the current status for future research directions on photorespiration. *Plant Biol* 15: 737-747
51. Zelitch I (1989) Selection and characterization of tobacco plants with novel O₂-resistant photosynthesis. *Plant Physiol* 90: 1457-1464
52. Aliyev JA (2012) Photosynthesis, photorespiration and productivity of wheat and soybean genotypes. *Physiol Plant* 145: 369-383
53. Timm S, Florian A, Wittmiß M, Jahnke K, Hagemann M, Fernie AR, Bauwe H (2013) Serine acts as a metabolic signal for the transcriptional control of photorespiration-related genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 162: 379-389
54. Maier A, Fahnenstich H, von Caemmerer S, Engqvist MK, Weber AP, Flügge UI, Maurino VG (2012) Transgenic introduction of a glycolate oxidative cycle into *A. thaliana* chloroplasts leads to growth improvement. *Front Plant Sci* 3: 38
55. Kebeish R, Niessen M, Thiruveedhi K, Bari R, Hirsch HJ, Rosenkranz R, Stähler N, Schönfeld B, Kreuzaler F, Peterhänsel C (2007) Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnol* 25: 593-599
56. de Carvalho J, Madgwick PJ, Powers SJ, Keys AJ, Lea PJ, Parry MA (2011) An engineered pathway for glyoxylate metabolism in tobacco plants aimed to avoid the release of ammonia in photorespiration. *BMC Biotechnol* 11: 1
57. Dalal J, Lopez H, Vasani NB, Hu Z, Swift JE, Yalamanchili R, Dvora M, Lin X, Xie D, Qu R, Sederoff HW (2015) A photorespiratory bypass

- increases plant growth and seed yield in biofuel crop *Camelina sativa*. *Biotechnol Biofuels* 8: 1
58. Nölke G, Houdelet M, Kreuzaler F, Peterhänsel C, Schillberg S (2014) The expression of a recombinant glycolate dehydrogenase polyprotein in potato (*Solanum tuberosum*) plastids strongly enhances photosynthesis and tuber yield. *Plant Biotechnol J* 12: 734-742
59. Shih PM, Zarzycki J, Niyogi KK, Kerfeld CA (2014) Introduction of a synthetic CO₂-fixing photorespiratory bypass into a cyanobacterium. *J Biol Chem* 289: 9493-9500
60. Raines CA (2011) Increasing photosynthetic carbon assimilation in C₃ plants to improve crop yield: current and future strategies. *Plant Physiol* 155: 36-42
61. Lefebvre S, Lawson T, Fryer M, Zakhleniuk OV, Lloyd JC, Raines CA (2005) Increased sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development. *Plant Physiol* 138: 451-460
62. Miyagawa Y, Tamoi M, Shigeoka S (2001) Overexpression of a cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth. *Nature Biotechnol* 19: 965-969
63. d Mattozzi M, Ziesack M, Voges MJ, Silver PA, Way JC (2013) Expression of the sub-pathways of the *Chloroflexus aurantiacus* 3-hydroxypropionate carbon fixation bicycle in *E. coli*: Toward horizontal transfer of autotrophic growth. *Metabol Eng* 16: 130-139
64. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819-823
65. Carlson SR, Rudgers GW, Zieler H, Mach JM, Luo S, Grunden E, Krol C, Copenhaver G.P, Preuss D (2007) Meiotic transmission of an in vitro-assembled autonomous maize minichromosome. *PLoS Genet* 3: e179

Genetic engineering as a method for the improvement of photosynthesis

Beatrycze Nowicka, Jerzy Kruk✉

Department of Plant Physiology and Biochemistry, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, 7 Gronostajowa St., 30-387 Kraków, Poland

✉e-mail: jerzy.kruk@uj.edu.pl

Key words: C₄ plants, CO₂ assimilation, photorespiration, genetic engineering, carbon concentrating mechanisms, Rubisco

ABSTRACT

The significant increase in crop productivity occurred in the second half of the 20th century. However, it is thought that nowadays yield of main crop species reached its maximum. As we expect that the demand for plant products is going to increase during next century, it is necessary to develop new methods for yield improvement, other than traditional breeding. The redesign of photosynthesis using genetic engineering is one of the approaches postulated. The present article covers the main directions of research aimed to increase photosynthetic efficiency. The research covered by this review are: improvement of light capture, improvement of Rubisco and the regeneration phase of Calvin cycle, introducing carbon concentrating mechanisms to main crop species and reducing loss caused by photorespiration.