

FOTOSENTETİK KARBON FİKSASYONUNDA ROL ALAN ENZİMLERİN ANTİSENSE İNHİBİSYONU

Antisense Inhibition of Photosynthetic Carbon Fixation Enzymes

Hülya ÖLÇER*

ÖZET

Bir yapraktaki fotosentetik aktivite Calvin döngüsü içindeki çeşitli enzimlerin aktivitesi tarafından regüle edilebilir. Calvin döngüsü içindeki spesifik enzimlerin antisense inhibisyonu, bu döngünün metabolik regülasyonunun anlaşılması için önemli ip uçları vermektedir. Sedoheptulose-1,7-bifosfataz antisense bitkileri üzerinde yapılan analizler, bu enzimin aktivitesindeki %35' lik bir düşüşün bile fotosentetik karbon asimilasyonunun azalması için yeterli olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlara karşıt olarak, indirgenmiş ribulose-1,5 bifosfataz/oksijenaz, fruktoz-1,6-bifosfataz, fosforibulokinaz ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz aktivitelere sahip transgenik bitkilerde ise, fotosentetik karbon asimilasyonunda herhangi bir etki görülmesi için bu enzimlerin aktivitelere %65 ve %90 arasında bir azalmaya gereksinim olduğu bulunmuştur. Ayrıca tüm antisense bitkilerde Calvin döngüsü enzimlerinin inhibisyonu nişasta miktarını düşürürken sukroz miktarında önemli değişimler kaydedilmemiştir. Fakat fotosentezde görülen bu değişimin bitkinin büyüme ortamına veya kısa ya da uzun süreli deney ortamına bağlı olarak değiştiği saptanmıştır.

ABSTRACT

The photosynthetic capacity of a leaf might be regulated by the activity of various enzymes of the Calvin cycle. The antisense inhibition of specific enzymes in Calvin cycle have provided important tools to understand metabolic regulation of the cycle. The analysis carried out on the sedoheptulose-1,7-bisphosphatase antisense plants indicated that even 35% reduction in the ezymes activity was enough to reduce photosynthetic carbon assimilation. In contrast to these results, transgenic plants with reduced levels of ribulose-1,5- biphosphatase/oxygenase, fruktoze-1,6-bisphosphatase, phosphoribulokinase and glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase, reductions of between 65% and 90% in the activities of these enzymes were required before any effect on photosynthetic carbon assimilation was observed. Also antisense inhibition of all Calvin cycle enzymes resulted in reduced starch level while sucrose level was maintained. However, it was shown that changes in photosynthesis was depend on the environmental conditions and short or long term experimental sudies.

Anahtar kelimeler: Antisense, Calvin döngüsü, transgenik bitkiler

Key Words: Antisense, Calvin cycle, transgenic plants

* Yrd.Doç.Dr. Hülya ÖLÇER, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya.

Normal koşullarda karbon asimilasyonu ile tekrar RuBP sentezi için yeterince trioz-fosfat üretilir ve buda CO₂ fiksasyonunun devamlılığını sağlar. Fakat sentezlenen trioz-fosfatlar aynı zamanda nişasta ve sukroz sentezi içinde kullanılır. Neticede trioz-fosfat bütün bu metabolik yolların ortak substratı olduğu için Calvin döngüsünün devamlılığı, RuBP rejenerasyonu ile nişasta ve sukroz sentezine bağlıdır. Calvin döngüsünde bu dengeli karbon dağılımının sağlanması döngüdeki reaksiyonları katalizleyen enzimler tarafından kontrol edilmektedir. Bu çalışmada SBPase ve diğer Calvin döngüsü enzimlerinin antisense inhibisyonu sonucu fotosentez ve karbonhidrat metabolizmasında meydana gelen değişimler belirtilmiş ve genel bir değerlendirme yapılmaya çalışılmıştır.

2. CALVIN DÖNGÜSÜ ENZİMLERİNİN ANTİSENSE İNHİBİSYONU

Son yıllarda antisense teknolojisinin transgenik bitkilerin meydana getirilmesinde başarılı olarak kullanılmasıyla fotosentez mekanizması hakkında önemli sonuçlar elde edilmiştir. Antisense teknolojisi, spesifik bir proteinin hedeflenmesini sağlayarak söz konusu proteinin değişik seviyelerine sahip bitkilerin üretimini mümkün kılar. Antisense tekniğinin amacı normal gen transkriptini tamamlayıcı olan bir mRNA' yı (antisense) kodlayan genin bitki genomuna eklenmesiyle normal genin ekspresyonunun değiştirilmesidir. Bunun iki tamamlayıcı kol arasında hidrojen bağlarının oluşmasıyla sonuçlandığı düşünülmekte ve mRNA' nın proteine translasyonu önlenmektedir (van der Krol ve ark. 1988; Watson ve ark. 1992). Sonuç olarak aktif olarak üretilen bir enzimin miktarı normal seviyesinin altına düşürülebilir. Bugün Calvin döngüsündeki anahtar enzimlerin, Rubisco (Rodermal ve ark. 1988; Hudson ve ark. 1992), FBPase (Kobmann ve ark., 1994), SBPase (Harrison ve ark. 1998; Ölçer ve ark., 2001), PRKase (Paul ve ark., 1995), GAPDH (Price ve ark., 1995) ve aldolaz (Haake ve ark., 1998) antisense inhibisyonu sağlanmış ve gerek CO₂ asimilasyonunda gerekse bitki gelişimi üzerindeki düzenleyici özellikleri araştırılmıştır.

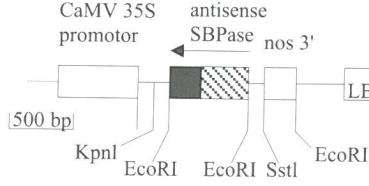
2.1 Sedoheptuloz-1,7-bifosfataz (EC 3.1.3.37)

Sedoheptuloz-1,7-bifosfataz enzimi sadece Calvin döngüsüne özgü olup, sedoheptuloz-1,7-bifosfat'ın sedoheptuloz-7 fosfat'a defosforilasyon reaksiyonunu tek yönlü katalize eder (Raines ve ark. 1991, 1999). Enzimin aktivitesi ışık, pH, Mg⁺², ürün ve substrat konsantrasyonu, ortofosfat (Pi) ve gliserat gibi çeşitli faktörler tarafından kontrol edilir (Schimkat ve ark. 1990, Raines ve ark. 1999, Raines ve ark. 2000). SBPase enzimini kodlayan gen buğday (Raines ve ark. 1992) ve *Arabidopsis thaliana*' dan (Willingham ve ark. 1994) izole edilmiş olup, bu genin ekspresyonunun ışık, bitki gelişim evresi ve heksoz şekerler tarafından kontrol edildiği ortaya konmuştur (Jones ve ark. 1996). Ayrıca SBPase' in Calvin döngüsüne doğru karbon akımında anahtar bir rolü olduğu ileri sürülmüştür (Peterson ve Ryde-Peterson 1989).

Belirli bir proteinin antisense inhibisyonun sağlanmasındaki ilk adım bu proteini kodlayan cDNA' nın izolasyonu ve karakterizasyonudur. SBPase enzimini kodlayan cDNA' nın izolasyonu bir gen konstraktının hazırlanmasına ve bu da proteinin görev aldığı Calvin döngüsü içindeki öneminin araştırılmasına imkan sağlamıştır (Şekil 2).

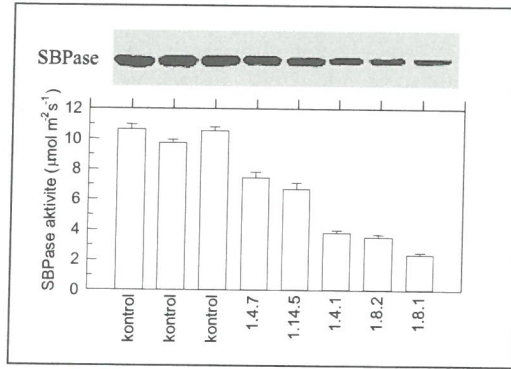
Karıbahar mozaik virüs promotörü (CaMV 35S) ve SBPase cDNA fragmentini taşıyan gen konstraktı bir vektör içine konulduktan sonra *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla yaprak diski transformasyon tekniği kullanılarak tütün bitkisinin genomuna transfer edilmiştir (Harrison ve ark. 1998). Transformant bitkiler kanamisin seleksiyonuna tabi

tutulmuş ve self polinasyon ile T1 dölü elde edilmiştir. T1 transformantları üzerinde fotosentez, SBPase protein ve aktivite ölçümleri ile karbonhidrat analizleri yapılmıştır (Ölçer, 1998).

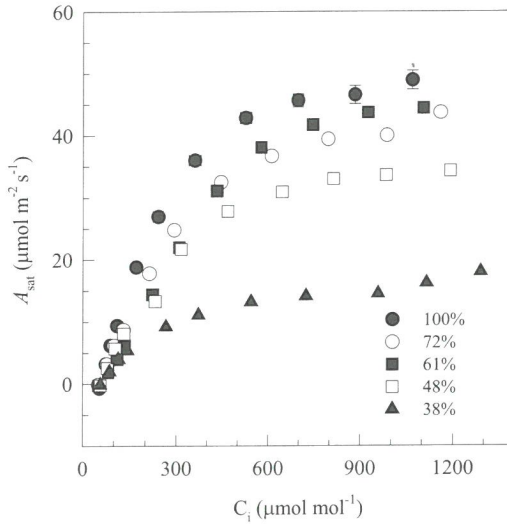


Şekil 2. SBPase cDNA Antisense Gen Konstraktı. SBPase için kodlama veren nükleotit sırası (taralı bölge) ile 3' kodlama vermeyen nükleotit sırasına (siyah bölge) sahip SBPase cDNA fragmenti, CaMV 35S promotörü ve nos sonlandırıcısı arasında ters yönde yerleştirilmiş ve pBin 19 vektörü içinde klonlanmıştır. (Harrison ve ark. 1998).

SBPase enziminin antisense inhibisyonu sonucu yapısında kontrol bitkiye göre % 10-80 oranında SBPase protein ve aktivitesine sahip transformantlar meydana gelmiştir (Şekil 3). Yapısında %20 den daha az SBPase proteinine sahip tütün bitkilerinde bazı fenotipik değişiklikler, yapraklarda klorosis gözlenmiştir. Enzim miktarındaki %30 lük bir düşüş bile yüksek ışık ortamında ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gerek atmosferik CO_2 gerekse doyurulmuş CO_2 konsantrasyonlarında fotosentetik karbon assimilasyonunun azalmasına neden olmuştur (Şekil 4). Ayrıca yaprak nişasta miktarında da önemli bir düşüş kaydedilmiştir (Harrison ve ark., 1998; Ölçer ve ark. 2001).



Şekil 3. Kontrol ve Antisense SBPase Tütün Yapraklarında SBPase Western Blot ve Aktivite Analizleri. Kontrol ve transgenik bitki adları grafik üzerinde belirtilmiş olup aynı bitkilerin western blot analizleri de grafik üzerinde verilmiştir.



Şekil 4. Kontrol ve Antisense SBPase Tütün Yapraklarında Farklı İnterselüler CO₂ Konsantrasyonlarında (C_i) Fotosentetik Karbon Asimilasyonu (A_{sat}). Antisense SBPase bitkilerin kontrol bitkiye (%100) göre sahip olduğu % enzim aktiviteyi grafik üzerinde belirtmiştir.

2.2 Ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz (EC 4.1.1.39)

Calvin döngüsü içinde ilk araştırılan enzim ise Rubisco' dur. CO₂ fiksasyonu Rubisco enzimi tarafından katalizlenmekte olup bu enzim fotosentetik karbon asimilasyonunda önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Rubisco bifonksiyonel bir enzim olduğundan karboksilaz aktivitesi yanında oksijenaz aktivitesi de gösterir. Rubisco C₃ bitkilerinde total yaprak proteininin yaklaşık %50' sini oluşturur dolayısıyla bitkinin karbon ve azot deposu gibidir. Bu sebeple Rubisco' nun fotosentez ve bitki büyümesini sınırladığı etkilerini araştırmak için iki ayrı laboratuarda antisense Rubisco tütün bitkileri oluşturulmuştur (Rodermal ve ark. 1988; Hudson ve ark. 1992). Rubisco enzim proteini iki alt üniteden oluşur, bunlardan büyük ünite (*rbcL*) kloroplast DNA'sı tarafından, küçük ünite ise (*rbcS*) genomik DNA tarafından kodlanır (Tablo 1).

Genomik DNA tarafından kodlanan *rbcS* 'i hedef alan bir antisense *rbcS* geninin CaMV promotörü kullanılarak tütün bitkisine transferi sonucu, tütün bitkisinde Rubisco proteini %90' lara kadar düşürülmüştür. Yapısında kontrol tütün bitkisinin % 60' ı kadar Rubisco proteini taşıyan antisense bitkilerde fotosentezin düşük ışık (300 μmol m⁻² s⁻¹) ve atmosferik CO₂ konsantrasyonunda %6 azaldığı ortaya konmuştur. Rubisco' nun %60' dan daha fazla indirildiği bitkilerde ise fotosentezde de önemli düşüşler ortaya çıkmıştır. Fakat bu noktada Calvin döngüsünde bulunan diğer bir enzimin, FBPase' in aktivitesinde de bir düşüş görülmüş, klorofil miktarında da azalma kaydedilmiştir. Ayrıca çözünebilir şeker ve nişasta miktarında bir düşüş saptanmıştır (Quick ve ark., 1991). Sonuçta Rubisco' nun düşük ışık şiddeti altında Calvin döngüsünün regülasyonunda önemli bir rolü olmadığı ortaya çıkarılmış ve Rubisco proteinin azalması Rubisco enzim aktivasyonunu artmasına sebep olmuştur (Stitt ve Schulze, 1994). Fakat antisense Rubisco bitkilerin farklı ışık, CO₂

ve azot içeren ortamlarda yetiştirilmesi ile bu enzimin fotosentez üzerine olan etkilerinin farklı olduğu saptanmıştır (Stitt ve Schulze, 1994).

Tablo 1: C₃ Calvin Döngüsündeki Bazı Enzimlerin Yapısal Özellikleri (Raines ve ark. 1991).

| Enzim | | Monomer molekül ağırlığı | Holoenzim yapısı | Kodlandığı genom | Sitosol izoenzim |
|-----------------------------------|-----|--------------------------|---|--------------------|------------------|
| Rubisco | Lsu | 52000 | Hetero 16-mer (L ₈ S ₈) | Kloroplast Nükleus | Yok |
| | Ssu | 15000 | | | |
| Gliseraldehit fosfat dehidrogenaz | A | 36000 | Hometetramer (A ₄) ve | Nükleus | Var |
| | B | 41000 | Heterotetramer (A ₂ B ₂) | Nükleus | Var |
| Frukoz-1, 6 bifosfataz | | 39778 | Homotetramer | Nükleus | Var |
| Sedoheptuloz-1,7 bifosfataz | | 35-38000 | Homodimer | Nükleus | Yok |
| Aldolaz | | 38000 | Homotetramer | Nükleus | Var |
| Fosforibulokinaz | | 39200 | Homodimer | Nükleus | Yok |

2.3 Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (EC 5.3.1.16)

GAPDH enzimi 3-fosfogliserat'ın trioz fosfata dönüşümünü çift yönlü katalize edebilen bir enzimdir. GAPDH birbirine benzer iki protein alt ünitesinden oluşan bir enzimdir (GapA ve GapB) (Tablo 1). Tütün bitkisinde kloroplastik GAPDH aktivitesi CaMV 35S promotörünün kontrolü altında GapA alt ünitesinin antisense inhibisyonu ile azaltılmıştır (Price ve ark. 1995). Transgenik tütünlerde GAPDH aktivitesinin düşürülmesi RuBP miktarında paralel bir azalmaya sebep olmuştur. Fakat yüksek ışık ($900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ortamında fotosentetik karbon asimilasyonundaki azalma ancak enzim aktivitesinin kontrol bitkiye göre %60-70 oranında düşürülmesinden sonra görülmüştür.

2.4 Fruktoz-1,6-bifosfataz (EC 3.1.3.11)

Calvin döngüsü içinde antisense inhibisyonu yapılan diğer bir enzimde plastidik FBPase'dir. Bu enzim Calvin döngüsünün rejenerasyon safhasında rol alıp fruktoz, 1-6 bifosfatın fruktoz-6 fosfata dönüşüm reaksiyonunu tek yönlü olarak katalize eder. FBPase enziminin antisense inhibisyonu ile yapısında kontrol patates bitkisine oranla %12-36 arasında aktiviteye sahip transformantlar meydana gelmiştir (Kobmann ve ark. 1994). Yapısında kontrol bitkiye göre %36 aktivite gösteren transformantlarda büyüme ve tuber oluşumunda bir farklılık gözlenmemiş, ayrıca düşük veya yüksek ışık ($100-1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ile yüksek CO₂ ortamında ölçülen fotosentezde de sadece önemsiz bir düşüş saptanmıştır. FBPase aktivitesindeki düşüş fructose-1,6-bifosfat ve DHAP'nin azalmasına sebep olmuş, fakat diğer Calvin döngüsü enzimlerinde paleotropik bir etki yani değişim görülmemiştir. FBPase enziminin %90 oranında düşürüldüğü transgenik bitkilerde ise karbonhidrat miktarında azalma kaydedilmiştir.

2.5 Fosforibulokinaz (EC 5.3.1.16)

PRKase Calvin döngüsünün rejenerasyon safhasında ATP' ye bağımlı ribuloz-5 fosfattan ribuloz-1,5 bifosfat sentezini tek yönlü olarak katalize eden bir enzimdir. PRKase proteinin kodlanmasından sorumlu cDNA izole edilerek *rbsS* promotörü aracılığıyla tütün bitkisine transferi sonucu antisense PRKase tütün bitkileri elde edilmiştir (Paul ve ark. 1995). Düşük ışık ortamında ($330 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) büyütülen antisense bitkilerde PRKase seviyesinin %85' e kadar indirildiği bitkilerde fotosentezde bir değişim görülmemiştir. Fakat PRKase seviyesindeki düşüş RuBP, PGA ve ADP miktarında azalmaya, ribuloz-5 fosfat, ATP ve fruktose-6 fosfat seviyesinde bir artışa sebep olmuştur. Ayrıca PRKase enziminin %85-95 oranında düşürüldüğü transgenik bitkilerde nişasta miktarında azalma görülürken sukroz miktarında bir değişim kaydedilmiştir.

2.6 Aldolaz (EC 4.1.2.13)

Aldolaz Calvin dönüşünün rejenerasyon safhasında fruktoz-1,6-bifosfat ve sedoheptuloz-1,7-bifosfatın sentez reaksiyonlarını çift yönlü katalize eden bir enzimdir. Aldolaz enziminin yüksek bitkilerde iki büyük formu bulunmaktadır. Sınıf I tetramerik protein yapısına (160 kD) sahip olup plastid içinde bulunur (Tablo 1), sınıf II ise dimerik protein yapısında (80 kD) dir ve stoplazmada bulunur (Foyer ve Quick, 1998). Rejenerasyon safhasında çift yönlü reaksiyon katalizleyen bu enzimin aktivitesi metabolitler tarafından kontrol edilir. Antisense patates bitkilerinde enzim aktivitesinin %60' dan fazla düşürüldüğü bitkilerde fotosentezde azalma kaydedilmiş, kontrol bitkiye göre yapısında %90' nın altında aktiviteye sahip bitkilere ise büyüme engellenmiştir. Fakat karbonhidrat analizleri yapıldığında aldolaz aktivitesindeki %70 lik azalma nişasta miktarında da %74 lük bir düşüşe sebep olmuştur. Sukroz konsantrasyonunda ise değişim kaydedilmemiştir (Sonnewald ve ark. 1994; Haake ve ark., 1998, 1999).

3. TARTIŞMA

Fotosentetik karbon fiksasyonu ve mekanizmasının anlaşılmasında transgenik bitkiler önemli bir kaynak olmuştur. Bu biyosentetik yolda rol enzimlerin aktivitelerinin moleküler bir yol izlenerek değiştirilmesi, enzimlerin gerek CO_2 asimilasyonunda gerekse bitki gelişimi üzerindeki düzenleyici özellikleri hakkında geniş bilgiler vermektedir (Stitt, 1995; Stitt ve Sonnewald, 1995). Antisense inhibisyonu yapılan Calvin döngüsü enzimlerinden şimdiye kadar yapılan çalışmalardan ortaya çıkan sonuçlar şöyle değerlendirilebilir;

i) Calvin döngüsünün kontrolü bazı enzimler arasında paylaşılmakta ve kontrolün enzimler arasındaki dağılımı da bitkinin büyüme ortamına veya kısa ya da süreli deney ortamına bağlı olarak değişmektedir. Örneğin Rubisco enzimi üzerinde yapılan çalışmalar da yüksek ışık ve nem ile düşük CO_2 konsantrasyonlarında Rubisco' nun Calvin döngüsü üzerinde yüksek bir regülasyon kapasitesine sahip olduğu, aynı zamanda Rubisco' nun bu düzenleyici rolünün bitkinin yetiştiği ortamdaki azot miktarı ile değiştiği de saptanmıştır.

ii) İkinci nokta ise döngünün kontrolü her zaman tek yönlü reaksiyonları katalizleyen enzimler tarafından olmayabilir, örneğin antisense FBPase patates bitkilerinde bu enzimin fotosentez üzerine olan etkisi ancak enzim aktivitesinin yaklaşık %65 oranında düşürülmesinden sonra ortaya çıkmıştır. Buna karşın çift yönlü reaksiyonları katalizleyen enzimlerin de, örneğin aldolaz aktivitesinin %50' den fazla düşürülmesi halinde döngüde

kontrol potansiyelinin olduğu gösterilmiştir. Doğısıyla Rubisco, SBPase ve aldolaz enzimlerinin Calvin döngüsün regülasyonunda önemli role sahip oldukları ortaya çıkmaktadır.

iii) Diğer bir nokta ise rejenerasyon safhasındaki reaksiyonların engellenmesi (FBPase, SBPase, aldolaz enzimlerinin antisense inhibisyonu) sonucu bugüne kadar alınan sonuçlara göre sukroz metabolizmasında bir değişim olmadığı halde öncelikle nişasta metabolizmasının engellendiği ortaya konmuştur. Döngüde RuBP rejenerasyonunun azalması neticede fosfogliseraldehit (3PGA) gibi fosforile edilmiş metabolitlerin azalmasına ve serbest fosfatın (Pi) artışına neden olabilir. PGA/Pi oranındaki azalmanın ise nişasta sentezinde rol alan enzimlerin aktivitelerini etkilediği bilinmektedir.

Biyoteknolojik yollar izlenerek karbon asimilasyonunun düzenlenmesi, bitki büyüme ve karbonhidrat miktarının değiştirilmesinde ya da bitkinin uygun olmayan iklim ve ortam koşullarında dahi optimal olarak fotosentezi gerçekleştirmesi açısından önemli imkanlar sunmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar atmosferik CO₂ konsantrasyonunun gittikçe arttığını göstermektedir. Gelecekte doğal ve tarımsal bitkilerin karşılaşacağı bu durum doğal olarak insanları da etkileyecektir. Karasal ekosistemlerde bitkilerin gittikçe artan CO₂ konsantrasyonuna verdiği cevapta fotosentez, solunum ve respirasyon gibi üç temel mekanizma önemli bir rol alacaktır (Drake ve ark., 1997). Bir C₃ yaprağında Rubisco enzimi yaprak azotunun %25' ini yapısında bulundurur. Bugünkü atmosferik CO₂ konsantrasyonunda ve yüksek ışıktaki yapılan fotosentezi desteklemek için yüksek miktarda Rubisco enziminin gerekli olduğu görülmektedir. Teorik olarak yapılan hesaplamalar, şimdiki atmosferik CO₂ konsantrasyonunun iki katına çıkarıldığı koşullarda Rubisco' nun fotosentezi etkilemeden %35 oranında azaltılabileceğini önermiştir. Bu teorik çalışmalar bugün antisense *rbcS* tütün bitkilerinden elde edilen deneysel sonuçlarla desteklenmiştir. Yapısında kontrol bitkiye göre %20 daha az Rubisco enzimine sahip transgenik bitkiler, bugünkü atmosferik CO₂ konsantrasyonunda yetiştirildiğinde büyümenin kontrol bitkilere göre daha yavaş olduğu bulunmuştur. Buna karşın, hem transgenik hem de kontrol bitkiler yüksek CO₂ konsantrasyonunda yetiştirildiğinde ise her iki bitkininde büyüme ve karbon fiksasyonunun aynı olduğu ve yüksek CO₂ konsantrasyonlarında Rubisco enzimine daha az ihtiyaç olduğu ortaya konmuştur. Dolayısıyla bitkiler gelecekte atmosferik CO₂ konsantrasyonundaki artışa bu enzim miktarındaki ayarlama ile daha iyi uyum sağlayabileceklerdir.

KAYNAKLAR

Drake, B.G., Meler-Gonzalez, M.A. and Long, S.P. (1997). More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂ ? Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 609-39.

Foyer, C.H. and Quick, W.P. (1998). A molecular approach to primary metabolism in higher plants. Taylor&Francis Ltd. London.

Haake, V., Zrenner, R., Sonnewald, U. and Stitt, M. (1998). A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch and inhibits growth of potato plants. Plant Journal 14: 145-147.

Haake, V., Geiger, P., Walch-Li P., Engels, C., Zrenner, R. and Stitt, M. (1999). Changes in aldolase activity in wild-type potato plants are important for acclimation to growth irradiance and carbon dioxide concentration, because plastid aldolase exerts control over the ambient rate of photosynthesis across a range of growth conditions. *Plant Journal* 17 (5): 479-489.

Harrison, E.P., Willingham, N.M., Lloyd, C.J. and Raines, A.C. (1998). Reduced sedoheptulose-1,7-bisphosphatase levels in transgenic tobacco lead to decreased photosynthetic capacity and altered carbohydrate accumulation. *Planta* 204: 27-36.

Hudson, G.S, Evans J.R., Caemmerer, S., von Arvidson Y.B.C., and Andrews, T.J. (1992). Reduction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content by antisense RNA reduces photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology* 98: 294-302.

Jones, P.G., Lloyd J.C. and Raines, C.A. (1996). Glucose feeding of intact wheat plants represses the expression of a number of Calvin cycle genes. *Plant, Cell and Environment* 19: 231-236.

Koßmann, J. Sonnewald, U. and Willmitzer, L. (1994). Reduction of the chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants impairs photosynthesis and plant growth. *Plant Journal* 6: 637-650.

Macdonald, F.D. and Buchanan B.B. (1992). The reductive pentose phosphate pathway and its regulation, In *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, Longman Scientific & Technical, UK., pp 239-252.

Paul, M.J., Knight, J.S., Habash, D., Parry, M.A.J. Lawlor, D.W., Barnes, S.A., Loynes, A. and Gray, J.C. (1995). Reduction in phosphoribulokinase activity by antisense RNA in transgenic tobacco: effect on CO₂ assimilation and growth in low irradiance. *Plant Journal* 7: 535-542.

Petterson, G. and Ryde-Petterson, U. (1989). Dependence of the Calvin cycle activity on kinetic parameters for the interaction of non-equilibrium cycle enzymes with their substrates. *European Journal of Biochemistry* 186: 683-687.

Price, G.D., Evans, J.R., von Caemmerer, S., Yu, J-W. and Badger, M.R. (1995). Specific reduction of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity by antisense RNA reduces CO₂ assimilation via a reduction in ribulose biphosphate regeneration in transgenic tobacco plants. *Planta* 195: 369-378.

Quick, W.P., Schurr, U., Fichtner, K., Schulze, E.-D., Rodermal, S.R., Bogorad, L. and Stitt, M. (1991). The impact of decreased Rubisco on photosynthesis, growth, allocation and storage in tobacco plants which have been transformed with antisense *rbcS*. *Plant Journal* 1(1): 51-58.

Raines, C.A., Harrison, E.P., Ölçer, H. and Lloyd, J.C. (2000). Investigating the role of the thiol-regulated enzyme sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in the control of photosynthesis. *Phsiologia Plantarum*, 110: 303-308.

- Raines, C.A., Lloyd, J.C. and Dyer, T.A.** (1991). Molecular biology of the C3 photosynthetic carbon reduction cycle. *Photosynthesis Research* 27: 1-14.
- Raines, C.A., Lloyd, J.C. and Dyer, T.A.** (1999). New insights into the structure and function of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; an important but neglected Calvin cycle enzyme. *Journal of Experimental Botany* 50(330): 1-8.
- Raines, C.A., Lloyd, J.C., Willingham, N.M. Potts, S. and Dyer T.A.** (1992). cDNA and gene sequences of wheat chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase reveal homology with fructose-1,6-bisphosphatases. *European Journal of Biochemistry* 205: 1053-1059.
- Rodermal, S.R., Abbott, M.S. and Bogorad, L.** (1988). Nuclear-organelle interactions: nuclear antisense inhibits ribulose bisphosphate carboxylase enzyme levels in transformed tobacco plants. *Cell* 55: 673-681.
- Schimkat, D., Heineke, D. and Heldt, H.W.** (1990). Regulation of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase by sedoheptulose-7-bisphosphate and glycerate and of fructose-1,6-bisphosphatase by glycerate in spinach chloroplasts. *Planta* 181: 97-103.
- Sitt, M.** (1995). The use of transgenik plants to study the regulation of plant carbohydrate metabolism. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 635-646.
- Stitt, M. and Schulze, D.** (1994). Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth? An exercise in molecular ecophysiology. *Plant, Cell and Environment* 17: 465-487.
- Stitt, M. and Sonnewald, U.** (1995). Regulation of plant metabolism in transgenic plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 341-368.
- Ölçer, H.** (1998). The effect of reduced sedoheptulose-1,7-bisphosphatase levels on photosynthetic capacity during leaf development and phosphate deficiency. PhD thesis, University of Essex.
- Ölçer, H., Lloyd, J.C. and Raines, C.A.** (2001). Photosynthetic capacity is differentially affected by reductions in sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity during leaf development in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology*, 125: 982-989.
- van der Krol, Mol, J.N.M. and Stuitje, A.R.** (1988). Antisense genes in plants: an overview, *Gene* 72: 45-50.
- Watson, J.D., Gilman, M., Witrowski, J. and Zeller, M.** (1992). *Rekombinant DNA*, 2nd ed. Scientific American Books, 626 p.
- Willingham, N.M., Lloyd, J.C. and Raines, C.A.** (1994). Molecular cloning of the *Arabidopsis thaliana* sedoheptulose-1,7-bisphosphatase gene and expression studies in wheat and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 26: 1191-1200.

Woodrow, I.E. and Berry, J.A. (1988). Enzymatic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 533-594.