

转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻的光合特性

张边江^{1,2}, 华春², 周峰², 周泉澄², 陈全战², 王荣富¹, 焦德茂³

(¹安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; ²南京晓庄学院生命科学系, 南京 211171; ³江苏农业科学院生物技术所, 南京 210014)

摘要:【目的】系统研究 ATP 处理后转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻的光合特性, 证明 ATP 是增强转 C_4 基因水稻光合能力的关键因子。【方法】以原种和转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻为材料, 进行了 PCR 检测, C_4 光合酶活性的测定。通过 ATP 处理后, 分析了光、温—光合曲线和活性氧代谢有关指标, 统计分析了相关的产量构成因素。【结果】原种中虽有全套的 C_4 光合酶, 但活性很低。PCR 检测出玉米的 *PEPC* 和 *PPDK* 基因转入普通水稻后, 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻高表达了 C_4 光合酶活性。在高光和高温条件下, 同未施 ATP 的相比, ATP 处理后转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻光合速率分别提高 17% 和 12%。在光氧化条件下, 耐光氧化能力进一步增强, 产量提高 15%。【结论】ATP 处理后, 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻增强了光合生产力, 表明 ATP 是设计类似 C_4 水稻的关键因子。

关键词: 转基因水稻; 光合特性; C_4 光合途径; ATP

Photosynthetic Characteristics of Transgenic Rice with *PEPC+PPDK* Gene

ZHANG Bian-jiang^{1,2}, HUA Chun², ZHOU Feng², ZHOU Quan-cheng², CHEN Quan-zhan²,
WANG Rong-fu¹, JIAO De-mao³

(¹College of Life Science, Anhui Agriculture University, Hefei 230036; ²Life Department of Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171; ³Institute of Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

Abstract: 【Objective】The aim of this paper is to study photosynthetic characteristics of *PEPC+PPDK* transgenic rice for demonstrating that ATP is the key factor enhancing the photosynthetic capacity in transgenic rice with C_4 genes. 【Method】With the untransformed rice and *PEPC+PPDK* transgenic rice as the materials, PCR test and the activity of C_4 photosynthetic enzymes were conducted. After the ATP treatment, the light, temperature-photosynthetic curves, the parameters related to the metabolism of active oxygen and the component factors of yield were analyzed. 【Result】The untransformed rices possess all the C_4 photosynthetic enzymes but their activities are very low. The PCR test indicated that *PEPC* and *PPDK* gene from maize were transformed into common rice. The activities of the C_4 enzymes in *PEPC+PPDK* transgenic rice were highly expressed. Under the conditions of high photon flux density and high temperature, the photosynthetic rate of *PEPC+PPDK* transgenic rice after the ATP treatment increased by 17% and 12%, respectively, compared with the control without ATP treatment. The resistance of *PEPC+PPDK* transgenic rice against photooxidation was further enhanced under the photooxidative conditions. The yield of *PEPC+PPDK* transgenic rice were also increased by 15%. 【Conclusion】The photosynthetic productivity of *PEPC+PPDK* transgenic rice after the ATP treatment was enhanced, demonstrating that ATP is the key factor for designing the C_4 -like rice.

Key words: Transgenic rice; Photosynthetic characteristics; C_4 photosynthetic pathway; ATP

0 引言

【研究意义】中国水稻育种经历株型育种和杂种

优势利用阶段, 主要是增加光合面积, 提高光吸收能力, 在此基础上进一步增产。将 C_4 光合酶基因导入 C_3 水稻可能是一条提高光合生产力的有效途径。【前

收稿日期: 2007-11-16; 接受日期: 2008-02-15

基金项目: 国家转基因专项 (16100004) 和安徽省自然科学基金项目 (01041106)

作者简介: 张边江 (1979-), 男, 江苏东海人, 讲师, 博士研究生, 研究方向为作物生理学。通讯作者王荣富 (1954-), 男, 安徽肥东人, 教授, 博士, 研究方向为作物生理学。Tel: 0551-5786935; E-mail: rfwang@ahau.edu.cn。通讯作者焦德茂 (1937-), 男, 研究员, 研究方向为作物生理学。E-mail: jiaodm_123@yahoo.com.cn

人研究进展】近 10 年来, 利用基因工程技术将 C_4 光合基因导入 C_3 植物的研究备受关注。玉米 C_4 光合途径的关键酶 *PEPC* (phosphoenolpyruvate carboxylase)、*PPDK* (pyruvate orthophosphate dikinase)、*ME* (NADP-mailc enzyme) 基因分别已成功导入 C_3 作物水稻中, 获得了高表达的转基因植株^[1-7]。已有的研究表明转 *PEPC* 基因水稻在高光下表现出高光合能力^[4,6,7-9]和耐光氧化的特性^[10,11]。向 C_3 植物水稻中外加 C_4 光合原初产物 *OAA* 可提高叶片的光合能力, 进一步证实了转 *PEPC* 基因水稻叶内具有有限的 C_4 微循环的运转^[12]。【本研究切入点】前人的研究表明转 *PPDK* 基因水稻的光合速率并未见提高^[13], 而转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻在施用 ATP 和 ATP 激活剂 NaHSO_3 后, 其光合速率有增加的迹象^[14], 但尚未进行系统的研究。因此本试验, 从基因、酶活性的表达, 光合、光氧化特性和产量的表现等方面进行系统的研究。【拟解决的关键问题】明确转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻在施用 ATP 后, 光合和产量是否增加, 以证实 ATP 是转 C_4 基因水稻提高光合生产力的关键因子。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本试验以日本水稻品种 *Kitaate* 为基因受体, 分别导入玉米的 *PEPC* 和 *PPDK* 基因, 通过杂交的方法获得转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻。在南京进行盆栽试验, 5 月初播种 (抽穗期 7 月中旬, 收获期 8 月上旬), 每个材料播 25 盆, 每盆直播 5 穴, 每穴 1 苗。采用随机区组设计, 3 次重复, 在自然温光条件下按常规管理, 各盆土壤肥力和管理措施保持一致, 按照 Ji 等^[14] 方法分别于拔节期和抽穗期整株各喷施浓度为 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP 3 次, 成熟期收割, 风干后称重, 室内考种, 统计产量构成因素指标。

1.2 转 *PEPC* 和 *PPDK* 基因水稻的 PCR 检测

DNA 提取采用购自上海华顺生物技术公司的试剂盒提取, *PEPC* 基因和 *PPDK* 基因引物分别根据玉米 C_4 型 *PEPC*、*PPDK* 基因组全序列, 通过 Primer5 软件设计, 上海生工生物技术服务有限公司合成。根据外源玉米 *PEPC* 基因序列设计引物专一引物: 5' GATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGC3' 5'TGAGGAGAGAGGTGGATTTGGGTTG3', PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 45 s, 60°C 40 s, 72°C 1 min, 35 循环; 72°C 后延伸 7 min。根据外源玉米 *PPDK*

基因序列设计引物基因专一引物为 PK1: 5'-TAGTTTTCCCTACCTCATCAGCC3' PK2: 5'TTGGACATTTTACTCTTCCTTTA3'。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 45 s, 58°C 40 s, 72°C 1 min, 35 循环; 72°C 后延伸 7 min, 检测结果通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 1.5 h ($5 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$), 溴化乙锭染色后, 在凝胶成像系统上观察。

1.3 C_4 光合酶活性测定

C_4 光合酶 *PEPC*, *PPDK*, *NADP-ME*, *NADP*-苹果酸脱氢酶 (*NADP-MDH*) 活性分别参照 Mukerji 等^[15]、Hatch 等^[16]、陈景治^[17]等和李斌^[18]等的方法在水稻孕穗期测定。

1.4 光合速率测定

在水稻抽穗期, 用 LI-6400 便携式光合仪测定水稻连体剑叶不同光强下光合速率, CO_2 浓度为 $340 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, O_2 为 $8.45 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 温度为 30°C , 绘制光—光合曲线。通过 LI-6400 控制光强在 $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 测定不同温度下净光合速率, 绘制温度—光合曲线。

1.5 活性氧代谢指标的测定

在水稻抽穗期, 用 $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的光氧化剂甲基紫精 (MV) 溶液 (用 1% V/V 吐温-80 溶液配制) 涂抹于叶片上表面, 然后将植株置于室内弱光 ($20\sim30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 下 1 h, 使蒸馏水和抑制剂渗入叶片内, 随后在 $1400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 下照光, 测定有关生理参数的变化。超氧化物歧化酶 (SOD) 活性按南京建成生物工程公司生产的试剂盒的方法测定; 丙二醛 (MDA) 的含量和过氧化物酶 (POD) 活性按张志良^[19] 方法测定; O_2^- 产生速率按王爱国等^[20] 的方法测定。

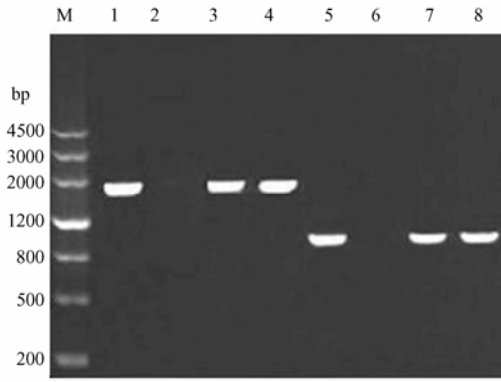
2 结果与分析

2.1 PCR 检测转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻

通过对转育 *PEPC+PPDK* 双基因水稻植株 DNA 做 PCR 扩增, 图 1 中 1~4 泳道为 *PEPC* 基因扩增的产物, 转基因植株和阳性对照吻合产生 1.8 kb 特异性扩增片段, 而水稻 *Kitaate* 则无该片段的产生 (图 1 泳道 2)。5~8 泳道为 *PPDK* 基因基因扩增的产物, 转基因植株和阳性对照扩增出 0.971 的特异性条带, 水稻 *Kitaate* 无该条带, 证实了玉米 C_4 型 *PEPC* 和 *PPDK* 基因已导入转基因水稻中, 并有高表达, 表明用 *PEPC* 和 *PPDK* 基因特征引物能够对转玉米 C_4 型 *PEPC+PPDK* 基因水稻植株进行准确的筛选。

2.2 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻叶片内的光合酶活性

由图 2 可知, 水稻 *Kitaate* 中具有全套的 C_4 光合酶,



1, 5: 玉米; 2, 6: 水稻 Kitaate; 3, 4, 7, 8: 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻; M: Marker; 1~4: *PEPC* 基因扩增的产物 (1.8 kb); 5~8: *PPDK* 基因扩增的产物 (0.971 kb); 1, 5: Maize; 2, 6: Rice kitaate; 3, 4, 7, 8: Transgenic rice with *PEPC+PPDK* gene; M: Marker; 1-4: The 1.8 kb amplified product of *PEPC* gene; 5-8: The 0.971 kb amplified product of *PPDK* gene

图 1 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻的 PCR 检测
Fig. 1 PCR analysis of the transgenic rice with *PEPC+PPDK* gene

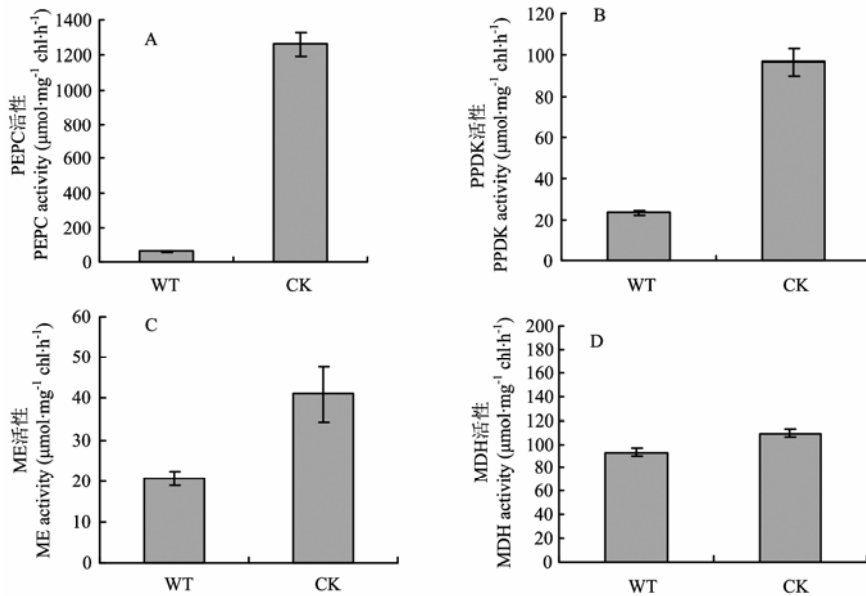
但活性很低。转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻的 *PEPC* 和 *PPDK* 活性分别比水稻 Kitaate 高了 18 倍和 3 倍, ME

和 MDH 活性略有提高, 这表明转基因水稻高表达了相应的 C_4 光合酶活性。

2.3 ATP 处理后转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻叶片光合速率对光、温的响应

从叶片的光-光合曲线图 3-A 看出, 在低光强下, 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻的光合速率与水稻 Kitaate 没有明显差异, ATP 处理后差异也不显著。但进一步增加光强, 水稻 Kitaate 的饱和光合速率在 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 饱和光强在 $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 喷施 ATP 后饱和光强未变, 净光合速率略有提高; 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻饱和光合速率为 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 饱和光强为 $1200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 喷施 ATP 后转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻饱和光合速率高到 $35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 同未施 ATP 的比较, 提高了 17%。

从图 3-B 中可以看出, 在低温下转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻的光合速率比水稻 Kitaate 的高, 但差异不明显, 水稻 Kitaate 的最适合的光合温度在 $30\sim 35^\circ\text{C}$ 之间, 但转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻在 35°C 时光合速率最高。 35°C 时转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻光合速率比水稻 Kitaate 高 30%。而当 ATP 处理后, 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻的光合速率在 35°C 时同未施



WT 示原种水稻 Kitaate, CK 示转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻, 图内数据为平均值 \pm SE (n=5)。下同
WT stands for the untransformed rice Kitaate, CK stands for the *PEPC+PPDK* transgenic rice. And all the values in the figure are mean \pm SE (n=5). The same as below

图 2 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻叶片的 C_4 光合酶活性
Fig. 2 Activities of the C_4 photosynthetic enzymes in the leaves of transgenic rices

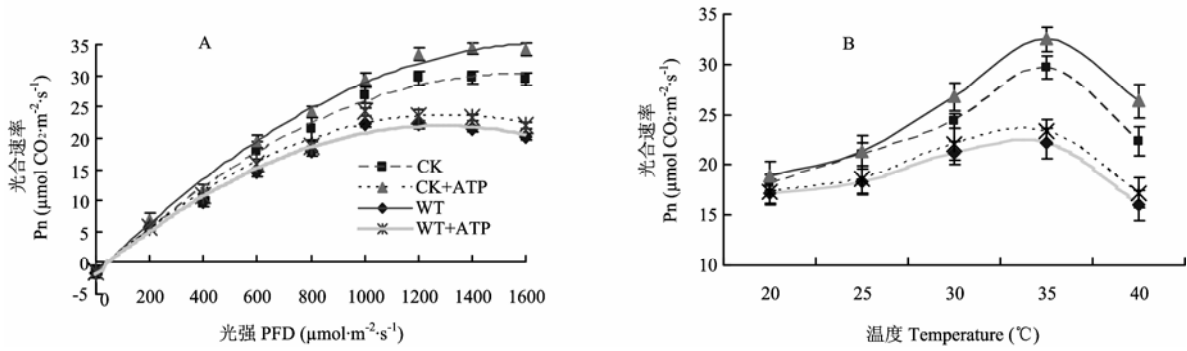


图 3 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻叶片光合速率对光、温的响应曲线

Fig. 3 Light and temperature photosynthesis curves in the flag leaves of transgenic rice with *PEPC+PPDK* gene (CK)

ATP 的比较, 增加了 12%。说明在高温、高光强下 ATP 处理后进一步增强了转 *C₄* 基因水稻的光合能力。

2.4 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻的光氧化特性

从图 4-A, B 看出, 光氧化处理后, 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻的超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 活性与图 3-A 光合速率变化一致, 而 O_2^- 产生速率和膜脂过氧化产物 MDA 含量 (图 4-C, D) 与

SOD、POD 的活性相反。上述结果说明, 低浓度 ATP 处理后, 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻比水稻 Kitaate 具有较强的光保护能力。

2.5 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻的产量构成

从下表看出, 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻与未用 ATP 处理的相比, 在 ATP 处理后的每穗实粒数和千粒重, 分别增加了 7.7% 和 9.1%, 因此单株产量相应的增加了 15.2%。

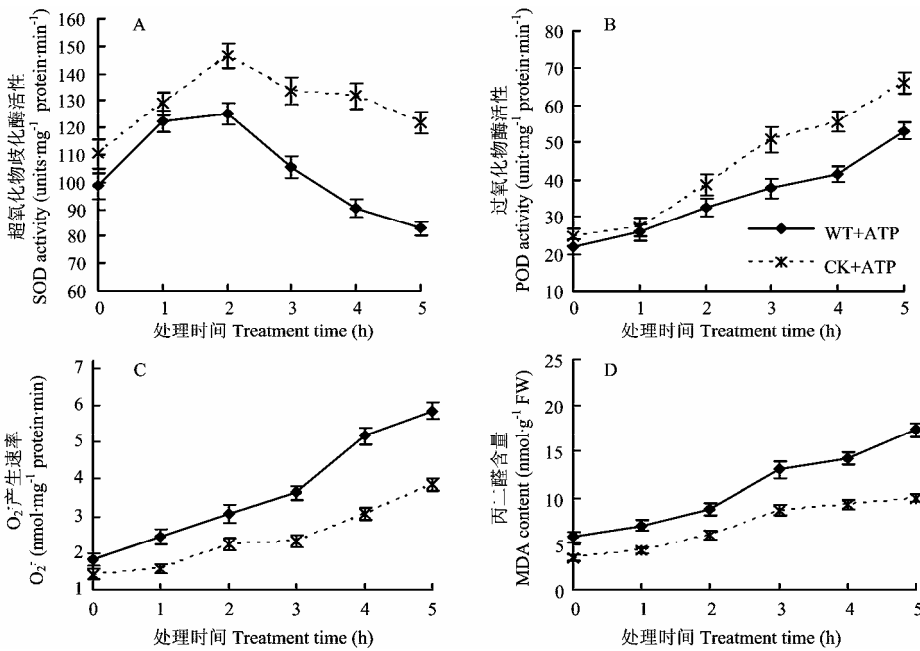


图 4 光氧化剂 (MV) 处理后转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻 (CK) 和水稻 Kitaate (WT) 的光氧化特性

Fig. 4 The changes of O_2^- generation rates, MDA contents and the activities of SOD, POD in leaves of *PEPC+PPDK* transgenic rice and untransformed rice Kitaate after photooxidant treatment

表 转 *PEPC+PPDK* 基因水稻和水稻 Kitaate 产量构成因素的比较Table Comparison of component factors and yield with *PEPC+PPDK* (CK) transgenic rice and untransformed rice kitaate (WT)

品种	每株穗数	每穗实粒数	千粒重	单株产量
Variety	Panicle number per plant	No. of grain per panicle	1000-grain weight (g)	Grain yield per plant (g)
WT	20.0±3.39a	71.67±4.16 c	19.3±1.20c	30.04±1.98c
WT+ATP	19.4±2.51a	72.45±3.15 c	19.57±0.58c	30.49±1.44c
CK	20.2±3.35a	78.33±3.06b	22.13±0.54b	33.32±1.85b
CK +ATP	20.8±3.96a	84.33±4.05a	24.13±1.01a	38.30±3.01a

同列数据后不同字母表示在 0.05 水平上差异显著表内数据为平均值±SE (n=5)

Different letters represent significant difference at 0.05 level. And all the values in the table are mean±SE (n=5)

3 讨论

20 世纪 60 年代, 世界上进行了第一次绿色革命, 作物半矮秆化, 扩大了叶片光合面积, 使作物能够吸收更多的光能, 产量提高 20%。中国杂交水稻育种, 在株型育种的基础上, 主要扩大了“库”, 即增大了穗型, 进一步增产 20%。但分析现有品种的增产潜力, 在叶面积指数达到 9 以上时, 扩大叶面积指数, 会引起群体内光能分布的恶化, 因此在适宜的光合面积上提高单叶的光合速率, 是进一步增加水稻生产能力的一条有效途径^[21]。提高植物的光合效率, 可能有多种途径, 其中将 C₄ 光合基因导入 C₃ 水稻以提高 C₃ 作物的 C₄ 光合特性, 长期以来是人们一直关注的问题, 国内外做了一系列的工作, 在水稻^[1]、小麦^[22]等作物上都取得了成功。2006 年国际水稻研究所邀请各国有关科学家讨论, 论证在 10~15 年构建出 C₄ 水稻, 以实现新的一次绿色革命^[23]。

近 10 年来, Ku 等^[1]、焦德茂等^[24,25]研究表明转 *PEPC* 基因水稻具有光合羧化效率提高, 光抑制减轻等特性, 因为 *PEPC* 基因导入水稻后, 增强了 C₃ 水稻中的 C₄ 微循环^[12], 但是在转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻上没有进一步增强^[26]的效果, 尔后 Ji 等^[14]看到喷施 NaHSO₃ 和 ATP 有增加光合速率的迹象。本文研究的结果进一步表明, 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻在喷施外源 ATP 后, 在高温、高光下提高了光合速率, 减轻了光氧化的伤害, 结实率、千粒重和单株产量与对照相比都有明显提高, 增产效果明显, 证明了这一技术的可靠性。在喷施 ATP 及其激活剂后, 转 C₄ 基因水稻提高光合生产力的机理可能是: 转 C₄ 基因水稻中 *PPDK* 酶激活 Pyr 生成 PEP 是耗能反应, 需要 ATP 的参与。已知 C₄ 途径每同化 1 分子 CO₂ 到三碳糖的水平, 需要比 C₃ 途径多消耗 2 个 ATP^[27], 因此在 C₃ 植物中激活 C₄ 微循环需要更多的 ATP。这可能是转

PEPC+PPDK 基因水稻由于喷施 ATP 后保证了 C₄ 微循环能量的供应, 可以固定更多的 CO₂, 从而增加光合速率, 当然这种假设尚需要进一步的实验证明。看来, ATP 可能是转 C₄ 基因水稻增强光合能力和构建类似 C₄ 水稻的关键因子。

C₄ 途径有 3 个重要的酶, 如果将 3 个关键酶 *PEPC*、*PPDK*、*ME* 的基因共同聚合在水稻中, 在外源 ATP 的供应下, 它的光合作用怎样, 是值得今后进一步研究的问题。

4 结论

PCR 检测出玉米的 *PEPC* 和 *PPDK* 基因转入原种后, 转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻高表达了 C₄ 光合酶活性, 在高光和高温条件下, 喷施外源 ATP 后, 其光合能力增强, 光氧化伤害减轻, 产量明显提高, 表明 ATP 是提高转 *PEPC+PPDK* 双基因水稻光合生产力的关键因子, 为今后设计类似 C₄ 水稻提供了技术途径。

References

- [1] Ku M S B, 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. *Natural Biotechnology*, 1999, 17: 76-80.
- [2] Fukayama H, Tsuchida H, Agarie S, Nomura M, Onodera H, Ono K, Lee B Y, Hirose S, Toki S, Ku M S B, Makino A, Matsuoka M, Miyao M. Significant accumulation of C₄-specific pyruvate, orthophosphate dikinase in a C₃ plant rice. *Plant Physiology*, 2001, 127: 1136-1146.
- [3] Tsuchida H, Tamai T, Fukayama H, Agarie S, Nomura M, Onodera H, Ono K, Nishizawa Y, Lee B H, Hirose S, Toki S, Ku M S B, Matsuoka M, Miyao M. High level expression of C₄-specific NADP-malic enzyme in leaves and impairment of photoautotrophic growth in a C₃ plant, rice. *Plant Cell Physiology*, 2001, 42: 138-145.

- [4] 张方, 迟伟, 金成哲, 王强, 张其德, 吴乃虎. 高粱 C₄ 型磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的分子克隆及其转基因水稻的培育. 科学通报, 2003, 48(14): 1542-1546.
Zhang F, Chi W, Jin C Z, Wang Q, Zhang Q D, Wu N H. Molecular cloning of phosphoenolpyruvate carboxylase gene from sorghum involved in C₄ photosynthesis and breeding transgenic rice. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(14): 1542-1546. (in Chinese)
- [5] 张桂芳, 赵明, 丁在松, 张丽, 肖俊涛. 稗草磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCase) 基因的克隆与分析. 作物学报, 2005, 31(10): 1365-1369.
Zhang G F, Zhao M, Ding Z S, Zhang L, Xiao J T. Cloning and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase gene from *Echinochloa crusgalli*. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31(10): 1365-1369. (in Chinese)
- [6] 丁在松, 赵明, 荆玉祥, 李良璧, 匡廷云. 玉米 *ppc* 基因过表达对转基因水稻光合速率的影响. 作物学报, 2007, 33(5): 717-722.
Ding Z S, Zhao M, Jing Y X, Li L B, Kuang T Y. Effect of overexpression of maize *ppc* gene on photosynthesis in transgenic rice plants. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(5): 717-722. (in Chinese)
- [7] 袁定阳, 段美娟, 谭炎宁, 易自力, 袁隆平, 辛世文. 共转化法获得无筛选标记的转 *PEPC*、*PPDK* 基因水稻恢复系纯合体. 杂交水稻, 2007, 22(2): 57-63.
Yuan D Y, Duan M J, Tan Y N, Yi Z L, Yuan L P, Xin S W. Generating marker-free transgenic homozygous rice restorer lines with *PEPC* and *PPDK* genes by *Agrobacterium*-mediated transformation using super binary vector. *Hybrid Rice*, 2007, 22(2): 57-63. (in Chinese)
- [8] 焦德茂, 李霞, 黄雪清, 迟伟, 匡廷云, 古森. 转 *PEPC* 基因水稻的光合 CO₂ 同化和叶绿素荧光特性. 科学通报, 2001, 46(5): 414-418.
Jiao D M, Li X, Huang X Q, Chi W, Kuang T Y, Ku M S B. The characteristics of CO₂ assimilation of photosynthesis and chlorophyll fluorescence in transgenic *PEPC* rice. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46(5): 414-418. (in Chinese)
- [9] Chi W, Jiao D M, Li X, Kuang T Y, Ku M S B. Photosynthetic characteristics of transgenic rice plants overexpressing maize phosphoenolpyruvate carboxylase. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43: 657-660.
- [10] 黄雪清, 焦德茂. 转 C₄ 光合酶基因水稻株系的抗光氧化特性. 植物生理学报, 2001, 27(5): 393-400.
Huang X Q, Jiao D M. The characteristics of resistance to photooxidation of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants with maize genes coding for C₄ photosynthesis enzyme. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 2001, 27(5): 393-400. (in Chinese)
- [11] Jiao D M, Li X, Ji B H. Photoprotective effects of high level expression of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice during photoinhibition. *Photosynthetica*, 2005, 43: 501-508.
- [12] Ji B H, Zhu S Q, Jiao D M. A limited photosynthetic C₄-microcycle and its physiological function in transgenic rice plant expressing the maize *PEPC* gene. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(5): 542-551.
- [13] Jiao D M, Hang X Q, Li X, Chi W, Kuang T Y, Zhang Q D, Ku M S B, Cho D. Photosynthetic characteristics and tolerance to photooxidation of transgenic rice expressing C₄ photosynthesis enzymes. *Photosynthesis Research*, 2002, 72: 85-93.
- [14] Ji B H, Tan H H, Zhou R, Jiao D M, Shen Y G. Promotive effect of low concentrations of NaHSO₃ on photophosphorylation and photosynthesis in phosphoenolpyruvate carboxylase transgenic rice leaves. *Acta Botanica Sinica*, 2005, 47(2): 178-186.
- [15] Mukerji S K. Corn leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activation by magnesium-ions. *Plant Science Letter*, 1974, 2 (4): 243-248.
- [16] Hatch M D, Slack C R. Pyruvate, Pi dikinase from leaves. *Methods in Enzymology*, New York: Academic Press, Inc, 1975, 42: 212-219.
- [17] 陈景治, 陈冬兰, 吴敏贤, 施教耐. 高粱和小麦叶片苹果酸酶某些特性比较. 植物生理学报, 1981, 7(4): 345-350.
Chen J Z, Chen D L, Wu M X, Shi J N. Comparison of some characteristics of NADP-malic enzyme from sorghum and wheat leaves. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1981, 7(4): 345-350. (in Chinese)
- [18] 李斌, 陈冬兰, 施教耐. 高粱 NADP 苹果酸脱氢酶的纯化及其分子特性. 植物生理学报, 1987, 13(2): 113-121.
Li B, Chen D L, Shi J N. Purification and molecular properties of NADP dependent malate dehydrogenase from sorghum leaves. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1987, 13(2): 113-121. (in Chinese)
- [19] 张志良. 植物生理学实验指导(第二版). 北京: 高等教育出版社, 1990: 154-155.
Zhang Z L. *The Guide of Plant Physiological Experiment*(2nd ed). Beijing: Higher Education Press, 1990: 154-155. (in Chinese)
- [20] 王爱国, 罗广华. 植物超氧物自由基与羟胺反应的定量关系. 植物生理学通讯, 1990, (6): 55-57.
Wang A G, Luo G H. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. *Plant Physiology Communication*, 1990, (6): 55-57. (in Chinese)
- [21] 杨建昌, 杜永, 吴长付, 刘立军, 王志琴, 朱庆森. 超高产粳型水稻生长发育特性的研究. 中国农业科学, 2006, 39(7): 1336-1345.
Yang J C, Du Y, Wu C F, Liu L J, Wang Z Q, Zhu Q S. Growth and development characteristics of super-high-yielding mid-season

- japonica* rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(7): 1336-1345. (in Chinese)
- [22] 陈绪清, 张晓东, 梁荣奇, 张立全, 杨凤萍, 曹鸣庆. 玉米 C₄ 型 *pepc* 基因的分子克隆及其在小麦的转基因研究. 科学通报, 2004, 49(20): 2137-2143.
- Chen X Q, Zhang X D, Liang R Q, Zhang L Q, Yang F P, Cao M Q. Expression of the intact C₄ type *pepc* gene cloned from maize in transgenic winter wheat. *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49(20): 2137-2143. (in Chinese)
- [23] Dennis N. Agricultural research: consortium aims to supercharge rice photosynthesis. *Science*, 2006, 28(313): 423. (in news of the week)
- [24] 焦德茂, 李 霞, 黄雪清, 迟 伟, 匡廷云, 古森本. 转 PEPC 基因水稻的光合 CO₂ 同化和叶绿素荧光特性. 科学通报, 2001, 46: 414-418.
- Jiao D M, Li X, Huang X Q, Chi W, Kuang T Y, Gu S B. The characteristics of CO₂ assimilation of photosynthesis and chlorophyll fluorescence in transgenic PEPC rice. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46: 414-418. (in Chinese)
- [25] 焦德茂, 匡廷云, 李 霞, 戈巧英, 黄雪清, 郝乃斌, 白克智. 转 PEPC 基因水稻具有初级 CO₂ 浓缩机制的生特点. 中国科学, 2003, 33: 33-39.
- Jiao D M, Kuang T Y, Li X, Ge Q Y, Huang X Q, Hao N W, Bai K Z. Physiological characteristics of the primitive CO₂ concentrating mechanism in PEPC transgenic rice. *Science in China*, 2003, 33: 33-39. (in Chinese)
- [26] Huang X Q, Jiao D M, Chi W, Ku M S B. Characteristics of CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence of transgenic rice with C₄ genes. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(4): 405-412.
- [27] 崔继林. 光合作用与生产力. 南京: 江苏科学技术出版社, 2000: 347.
- Cui J L. *Photosynthesis and Productivity*. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Press, 2000: 347. (in Chinese)

(责任编辑 吴晓丽, 郭银巧)