

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.00112

## PEPC 过表达可以减轻干旱胁迫对水稻光合的抑制作用

周宝元 丁在松 赵明\*

中国农业科学院作物科学研究所 / 农业部作物生理生态与栽培重点开放实验室, 北京 100081

**摘要:** 为了明确磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)过量表达能否提高水稻的光合速率, 测定了 42 个表达不同 PEPC 水平的转玉米 PEPC 基因水稻株系及对照(受体亲本中花 8 号)开花期和灌浆期的光合速率。结果表明, 在水田条件下, 转基因株系光合速率与未转基因对照相比没有明显差异; 而在旱地条件下, 转基因水稻的光合速率显著高于对照(27%和 24%)。随机选取 2 个 PEPC 相对活性分别为 10 倍和 25 倍的转基因株系进行网室精确控水盆栽实验得到相似的结果。说明单纯导入 PEPC 并不能提高水稻的光合速率, 而干旱胁迫下转基因水稻的光合优势可能是由于 PEPC 参与水稻的抗旱反应而减轻了干旱胁迫对光合作用的抑制作用。

**关键词:** 干旱; 转基因水稻; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC); 光合速率

## Alleviation of Drought Stress Inhibition on Photosynthesis by Overexpression of PEPC Gene in Rice

ZHOU Bao-Yuan, DING Zai-Song, and ZHAO Ming\*

Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Cultivation, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China

**Abstract:** Introducing enzymes involved in photosynthesis of  $C_4$  plants into rice is supposed to enhance the photosynthesis and crop productivity. However, only a few researches showed that the photosynthesis and crop productivity has been improved by introducing phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) gene into rice. In the present research, the photosynthesis in 42 lines of PEPC gene overexpressed rice was investigated. The average photosynthetic rate ( $P_n$ ) of the transgenic rice lines was almost the same as that of the wild type (control) in paddy field, but it was much higher in upland field than in paddy field. Only a few transgenic lines showed higher  $P_n$  in paddy field and most of them showed higher  $P_n$  in upland field. Similar results were found in the water controlled experiment. Two transgenic rice lines with different relative activities of PEPC (10 and 25 folds) were selected to study their photosynthesis under different water potentials (0, -20, and -40 kPa). In both lines,  $P_n$  was similar with that in the wild type under normal condition (0 kPa) but much higher under drought conditions (-20 and -40 kPa). In both experiments, the transgenic lines had higher  $P_n$  under drought conditions, with a much slower decreasing rate than the wild type. These results suggested that the overexpressed PEPC could not improve the photosynthetic rate of transgenic rice plants. But the photosynthetic rate of transgenic rices declined slowly under drought condition. Therefore, it is supposed that PEPC might be involved in drought resistance to decrease the inhibition of drought stress on photosynthesis in rice.

**Keywords:** Drought; Transgenic rice; Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC); Photosynthetic rate

$C_4$  植物具有较高的光合、水分和氮素利用效率以及较高的生物产量, 特别是在低  $CO_2$  浓度、高温、强光、干旱等逆境条件下, 表现突出。因此, 科学家希望将这一特征引入  $C_3$  作物来提高其光合效率及产量潜力。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)是  $C_4$  途径的

首要关键酶, PEPC 的转基因一直是研究热点<sup>[1-9]</sup>。通过转基因手段实现玉米 PEPC 基因导入水稻, 以提高光合速率及产量的研究已有多例报道<sup>[7-10]</sup>。但是, 转 PEPC 基因是否能增加光合、以及是否能增加产量仍存在较大的争论<sup>[1-3, 8-15]</sup>。近期, PEPC 逆境分子生物

本文由国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2009CB118605)和国家“十一五”科技支撑计划“粮食丰产科技工程”项目(2006BAD02A13)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 赵明, E-mail: zhaoming@caas.net.cn, Tel: 010-82108752

第一作者联系方式: E-mail: zhoubaoyuan3460@sina.com, Tel: 010-82108594

Received(收稿日期): 2010-05-15; Accepted(接受日期): 2010-11-08.

学研究成为新的热点, 研究表明<sup>[13-16]</sup>, 在光氧化和高温条件下转 PEPC 基因植株具有相对较高的光合速率。另外, 干旱、盐和冷害等逆境能够诱导 PEPC 基因的表达, 参与植物对环境的抗逆反应<sup>[17-20]</sup>。

光合作用对逆境胁迫十分敏感, 特别是干旱胁迫直接影响作物的光合能力导致作物减产。干旱胁迫抑制叶片伸展、引起气孔关闭、降低光合作用过程中相关酶活性、破坏叶绿素结构等, 最终影响 CO<sub>2</sub> 的固定还原和光同化能力, 导致光合速率下降<sup>[21-22]</sup>。研究表明, 干旱胁迫下叶绿体的类囊体膨胀, 基质片层排列紊乱, 细胞的超显微结构发生明显的变化<sup>[23]</sup>。同时, 干旱胁迫影响膜系统和抗氧化系统<sup>[24-25]</sup>, 造成质膜透性增加, 根系物质合成受阻, 生长停滞。另外, 环境胁迫下植物的脯氨酸<sup>[26]</sup>和脱落酸(ABA)<sup>[27]</sup>含量也会增加, 分别起到稳定亚细胞结构和调节气孔开闭<sup>[28]</sup>的作用。

水稻生长过程中不可避免地受到干旱胁迫的影响, 通过提高水稻 PEPC 表达水平, 来同时提高光合性能和抗旱能力可能是一条有效途径。本实验室前期研究发现, 在干旱、高温等逆境条件下, 转 PEPC 基因水稻的光合速率比对照具较强的优势<sup>[12,29]</sup>, 说明 PEPC 在植物抗旱适应过程中可能起一定作用。为此, 本研究以大量表达不同 PEPC 水平的转基因水稻株系为材料, 对比研究水、旱不同栽培条件下转基因水稻的光合特征, 并详细研究干旱条件下 PEPC 基因对水稻光合速率的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

在中国农业科学院廊坊实验基地大田种植本实验室获得的 42 个转玉米 PEPC 基因的水稻株系<sup>[10]</sup>, 以受体亲本中花 8 号为对照。采用水、旱两种栽培方式, 其中水作栽培为全生育期灌水, 旱作栽培为全生育期不灌水, 田间土壤重量含水量在 18% 左右。2009 年 5 月上旬育苗, 6 月上旬插秧, 其他管理措施同常规。

同期, 在中国农业科学院网室进行精确控水盆栽试验。供试材料为两个转玉米 PEPC 基因水稻株系 zm07 和 zm24, 受体亲本中花 8 号(CK)为对照。采用负压式土壤湿度计测量土壤水分, 控制土壤含水量在 0、-20 和 -40 kPa 三个水平。每个材料种植 27 盆(盆钵内径 25 cm, 高 30 cm)。移栽时选取生长均匀一致的秧苗, 每盆 3 穴, 每穴 1 苗, 于插秧 15 d

后控水处理, 其他管理措施同常规。

### 1.2 测定项目与方法

1.2.1 气体交换参数 采用美国 LI-COR 公司的 LI-6400 便携式光合仪测定开花期、灌浆期剑叶的光合气体交换参数。包括净二氧化碳同化速率(A)、气孔导度(G<sub>s</sub>)、胞间 CO<sub>2</sub> 浓度(C<sub>i</sub>)。测定条件为大气 CO<sub>2</sub> 浓度(360±5) μmol mol<sup>-1</sup>, 相对湿度(60±5)%, 温度 25℃, 使用仪器自带的 LED 光源控制光强, 光量子通量密度(PPFD)为 1 500 μmol Photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>。

1.2.2 PEPC 活性 参照 Kung 等<sup>[30]</sup>和 Gonzalez 等<sup>[31]</sup>方法, 并加以改进。取水稻新的完全展开叶, 液氮速冻后贮存在 -80℃ 冰箱备用或立即进行总可溶性蛋白的提取。取叶片 0.2 g, 在研钵中加液氮及石英砂研磨成粉末; 然后加入 1.0 mL 冷提取缓冲液 [50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7.5)、10 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA、10% (W/V) Glycerol、14 mmol L<sup>-1</sup> 巯基乙醇], 及 1% (W/V) PVP, 在冰上继续研磨至匀浆状态。将匀浆转移至 1.5 mL 微量离心管中, 4℃, 13 000×g 离心 15 min, 取上清液, 转移到新的离心管中, 4℃, 15 000×g 再次离心 30 min, 其上清液即为酶粗提物。

采用分光光度计测定 PEPC 酶活。反应体系含 100 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0)、5 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、3 mmol L<sup>-1</sup> PEP、0.2 mmol L<sup>-1</sup> NADH、10 mmol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>、10 U MDH, 反应总体积为 1 mL, 以加入 20 μL 酶粗提物启动反应, 检测 340 nm 的吸光值下降速率。采用考马斯亮蓝法测定可溶性蛋白质含量, 以单位质量可溶性蛋白来标定 PEPC 活性。

1.2.3 苹果酸含量 参照 Crecelius 等<sup>[32]</sup>的方法, 并加以改进。称取剪碎混匀的水稻剑叶叶片 0.2 g 置研钵中, 加少许石英砂, 研磨成匀浆, 移至 1 mL 离心管中, 用 0.4 mL 10% (W/V) 高氯酸提取 10 min, 4℃, 4 400×g, 离心 5 min; 后用 2% 高氯酸洗涤沉淀, 离心。用 1 mmol L<sup>-1</sup> 乙醇胺(含 5 mmol L<sup>-1</sup> KOH)中和上清液, 4℃, 30 min; 然后 4℃, 4 400×g, 离心 10 min, 其上清液即为苹果酸提取液。

加一定量(20 μL)提取液于 84.5 mmol L<sup>-1</sup> 双甘氨酸缓冲液中(pH 10), 内含 43.0 mmol L<sup>-1</sup> L-谷氨酸, 0.5 mmol L<sup>-1</sup> β-NAD、3 U L-苹果酸脱氢酶(MDH)和 12 U 谷氨酸草酰乙酸转移酶(GOT), 反应总体积 1 mL, 25℃ 条件下反应 10 min。使苹果酸完全转换成天冬氨酸, 合成的 NADH 量与苹果酸含量存在 1:1 的计量关系, 检测 340 nm 的吸光值下降速率。

## 2 结果与分析

### 2.1 大田水旱不同栽培条件下转 PEPC 基因水稻株系的光合特征

2.1.1 光合速率的比较 在大田水旱不同栽培条件下, 测定了 42 个转 PEPC 基因水稻株系及对照的气体交换特征。对其光合速率平均值的变化进行比较分析发现(图 1), 旱作条件下, 开花期和灌浆期转基因株系和对照的光合速率( $P_n$ )均有所下降, 但对

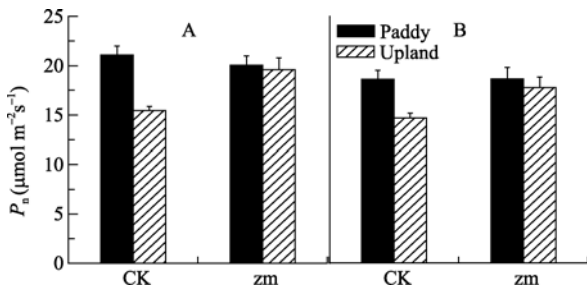


图 1 水旱不同栽培条件下的光合速率( $P_n$ )

Fig. 1 Photosynthetic rate of rice under different water conditions

A: 开花期; B: 灌浆期; CK: 未转基因对照(means  $\pm$  SE,  $n = 9$ ); zm: 转 PEPC 基因水稻株系(means  $\pm$  SE,  $n = 130$ ).  
A: flowering stage; B: filling stage; CK: untransformed rice plants (means  $\pm$  SE,  $n = 9$ ); zm: PEPC transgenic rice plants (means  $\pm$  SE,  $n = 9$ ).

照下降更明显(-37%和-27%), 转基因株系仍维持较高的光合速率, 保持在处理前的 90%以上, 明显高于对照(27%和 24%); 而在正常水分条件下, 转基因株系和对照两个时期的光合速率均没有明显差异。

2.1.2 光合速率的频率分布 对水旱不同条件下转 PEPC 基因水稻株系与对照光合速率的差异进行统计分析发现(图 2), 正常灌水条件下, 开花期和灌浆期的大部分转基因株系与对照的光合速率均没有明显差异, 只有约 5%的转基因株系与对照相差 20% 以上。在干旱胁迫下(土壤重量含水量约 18%), 开花期 95%的转基因株系光合速率高于对照, 73%的转基因株系高于对照 20%以上, 只有 5%的转基因株系光合速率低于对照, 且差异不明显; 灌浆期 98%的转基因株系光合速率均高于对照, 约 65%的转基因株系高于对照 20%以上, 只有 2%的转基因株系光合速率低于对照, 且差异不明显。

2.1.3 光合速率与 PEPC 活性的相关关系 相关分析表明, 在大田水、旱不同栽培条件下光合速率与 PEPC 活性的大小均无显著相关性( $r = 0.2628$  和  $r = -0.0721$ )。

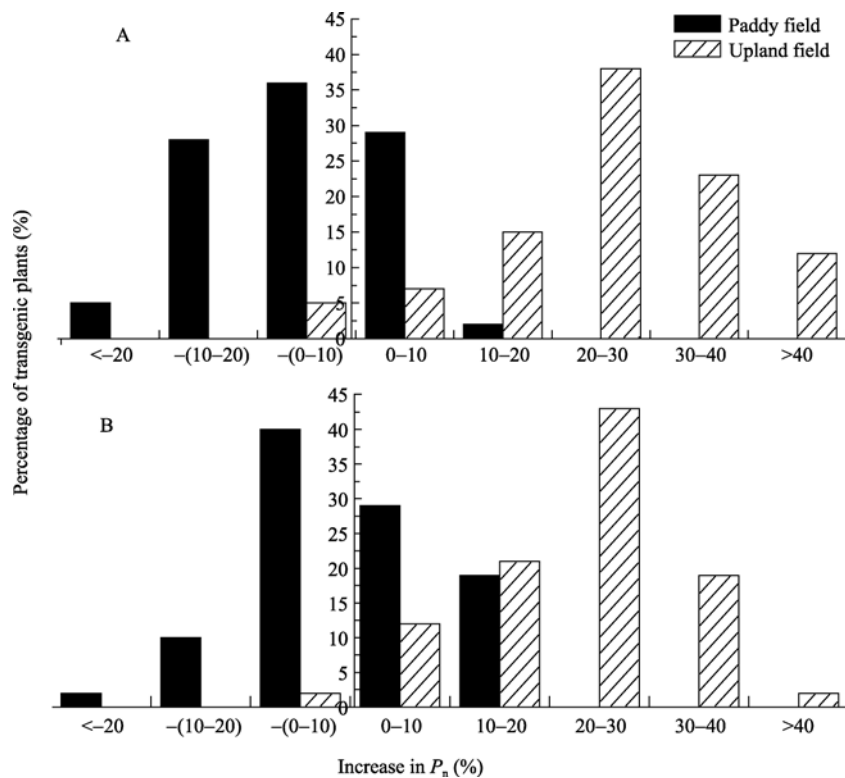


图 2 水旱不同栽培条件下转基因株系光合速率的频率分布

Fig. 2 Frequency distribution of photosynthetic rate in transgenic rice plants under different water contains

A: 开花期; B: 灌浆期。横坐标为转基因株系光合速率高于对照的百分数; 纵坐标为转基因株系累计百分数。

A: flowering stage; B: filling stage; X axis: increase in  $P_n$  of transgenic plants compared with control; Y axis: percentage of transgenic plants (%).

由图 3 可见, PEPC 相对活性分别为 5、10、15、20、25 和 30 倍的转基因株系及对照(PEPC 相对活性为 1)在正常灌水条件下均具较高光合速率, PEPC 活性较高的转基因株系没有明显的光合优势; 而在旱作栽培条件下, 随着 PEPC 活性增加转基因株系表现出明显的光合优势, 但当 PEPC 活性过高时(30 倍), 转基因株系的光合优势不再增加, 光合速率维持在较稳定的水平。说明干旱条件下 PEPC 活性在调节植株光合速率上可能是有一定范围的, 活性过高或过低对光合速率的影响都不大。

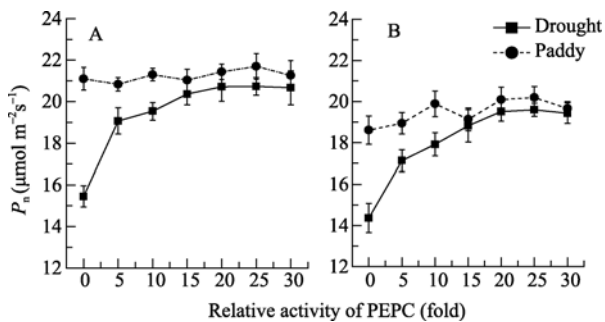


图 3 水旱栽培条件下净光合速率与 PEPC 相对活性的相关关系  
Fig. 3 Correlation between photosynthetic rate and the relative activity of PEPC under different water conditions  
A: 开花期; B: 灌浆期。0: 未转基因对照; 5~30: 5~30 倍的 PEPC 相对活性。  
A: flowering stage; B: filling stage; 0: untransformed rice plants; 5~30: relative activity of PEPC at 5~30 fold.

## 2.2 网室精确控水盆栽下转 PEPC 基因水稻株系的光合特征

### 2.2.1 叶片 PEPC 活性

为了进一步证明转 PEPC 基因水稻株系在干旱胁迫下具有较高的光合能力, 进行了网室精确控水盆栽试验。图 4 表明, 随着土壤干旱胁迫程度的增加, 转基因水稻和未转基因对照的 PEPC 活性均不同程度增加, 但是转基因株系 PEPC 活性明显高于对照, 说明转入的外源 PEPC 基因在水稻体内得到了正确的表达, 且干旱胁迫诱导了 PEPC 表达量的增加。

### 2.2.2 气体交换特征

网室精确控水实验也证明了转 PEPC 基因水稻株系在干旱胁迫下具有较高的光合能力。图 5 表明, 随着土壤干旱程度的增加, 转基因水稻和对照的光合速率均下降, 对照下降得更明显; 在土壤水势为 -40 kPa 时, 开花期对照的光合速率下降到处理前的 65%左右, 而两个转基因株系仍维持较高的光合速率, 保持在处理前的 90%左右; 灌浆期对照的光合速率下降到处理前的 40%左右,

而 2 个转基因株系分别保持在处理前的 65%和 70%以上。

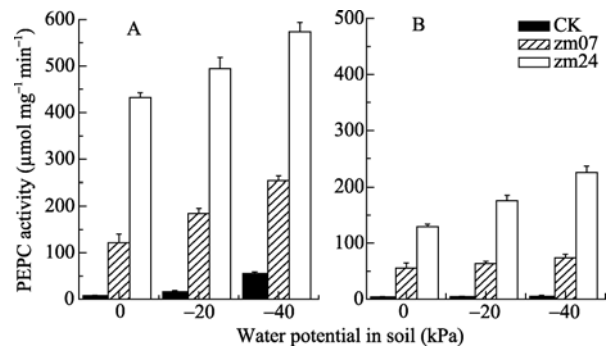


图 4 不同水分处理下叶片的 PEPC 活性  
Fig. 4 Relative activity of PEPC of rice under drought stress  
A: 开花期; B: 灌浆期; CK: 未转基因对照植株; zm07 和 zm24: 转 PEPC 基因水稻株系。  
A: flowering stage; B: filling stage; CK: untransformed rice plants; zm07 and zm24: PEPC transgenic rice plants.

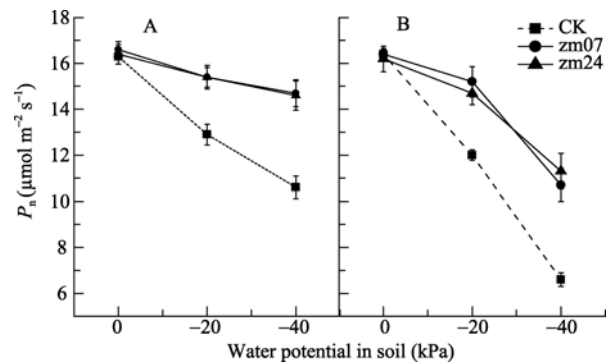


图 5 不同水分处理下的净光合速率(P<sub>n</sub>)  
Fig. 5 Photosynthetic rate of rice under drought stress  
A: 开花期; B: 灌浆期; CK: 未转基因对照植株; zm07 和 zm24: 转 PEPC 基因水稻株系。  
A: flowering stage; B: filling stage; CK: untransformed rice plants; zm07 and zm24: PEPC transgenic rice plants.

干旱胁迫下气孔导度( $G_s$ )的调节对转基因株系维持较高光合速率起了一定的作用。由图 6 可知, 当土壤水势为 -20 kPa 时, 对照的  $G_s$  下降到处理前的 60%, 而转基因株系都维持在处理前的 90%以上, 与光合速率的变化一致, 说明中度干旱胁迫下转基因株系维持较高的光合速率主要依靠  $G_s$  的调节。当土壤水势达到 -40 kPa 时, 对照和转基因株系的  $G_s$  下降幅度都很小(与 -20 kPa 比), 对照下降了 9%, 两个转基因株系分别下降 8%和 6%, 说明在重度干旱胁迫下  $G_s$  不是光合速率的主要限制因素, 而非气孔限制起了更重要的作用。

### 2.2.3 叶片苹果酸含量

苹果酸可作为载体在细胞质与细胞器以及细胞器之间传递碳素和还原力,

并为氨基酸合成提供碳骨架,同时苹果酸还参与气孔开闭的调节<sup>[33]</sup>。

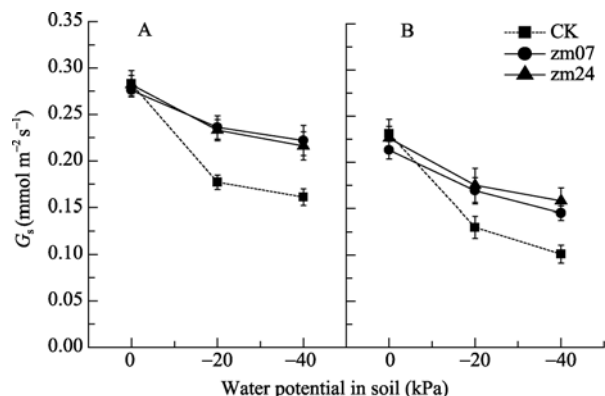


图 6 不同水分处理下的气孔导度( $G_s$ )

**Fig. 6 Stomatal conductance of rice under drought stress**  
A: 开花期; B: 灌浆期; CK: 未转基因对照植株; zm07 和 zm24: 不同的转 PEPC 基因水稻株系。  
A: flowering stage; B: filling stage; CK: untransformed rice plants; zm07 and zm24: PEPC transgenic rice plants.

由图 7 可知,随着土壤干旱程度的增加,转基因水稻和对照的苹果酸含量均增加,且前者明显高于后者。但是在重度干旱胁迫下(-40 kPa),转基因株系和对照的苹果酸含量增加均不明显,且在 PEPC 活性不同的两个转基因株系间没有明显差异。

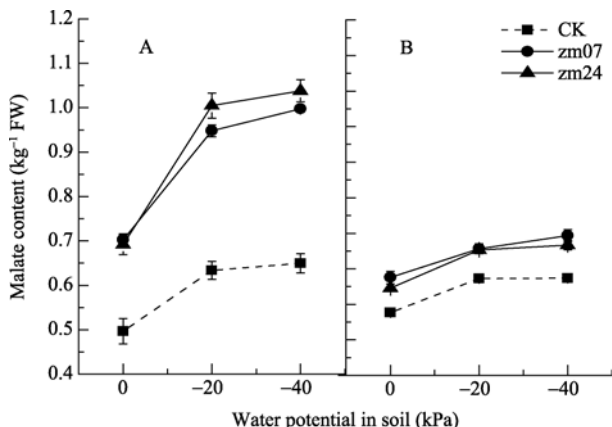


图 7 不同水分处理下的苹果酸含量

**Fig. 7 Malate content in leaves of rice under drought stress**  
A: 开花期; B: 灌浆期; CK: 未转基因对照植株; zm07 和 zm24: 转 PEPC 基因水稻株系。  
A: flowering stage; B: filling stage; CK: untransformed rice plants; zm07 and zm24: PEPC transgenic rice plants.

### 3 讨论

将  $C_4$  循环酶基因导入  $C_3$  作物被认为是提高作物光合效率和改善产量潜力的重要途径。然而目前国内关于 PEPC 能否提高转基因水稻的光合效率

却存在分歧。Agarie 等<sup>[8]</sup>和 Fukayama 等<sup>[9]</sup>均发现 PEPC 活性提高 50 倍的转基因水稻株系的光合速率略低于对照。Jiao 等<sup>[14]</sup>测定 PEPC 活性增加 20 倍的转基因水稻的光响应曲线,发现饱和光强下光合速率增加,强光下光合速率增加的比例更大,达 55%。Ku 等<sup>[6,12]</sup>认为转基因水稻的光合速率或者增强或者没有变化,而且光合速率的增加主要依赖于气孔导度的增加。本研究表明,在大田旱作栽培条件下(土壤重量含水量为 18%),转基因株系和对照的光合速率均有所下降,但后者下降更加明显(-37%和 -27%),转基因株系仍维持较高的光合速率。在网室进行全生育期精确控水试验,也表明转 PEPC 基因水稻株系在干旱胁迫下仍能维持较高的光合速率,这与前人的研究结果一致<sup>[10,34-35]</sup>。说明转 PEPC 基因水稻在干旱胁迫下的光合优势并不在于提高了光合速率,而是 PEPC 通过参与水稻的抗旱反应减轻了干旱胁迫对光合作用的抑制作用。

相关分析表明,光合速率与 PEPC 活性的大小之间无显著相关性( $r = 0.2628$  和  $r = -0.0721$ ),PEPC 似乎只有在一定的表达水平内才可提高转基因水稻的光合速率,PEPC 活性过高或过低,对光合速率的影响不大。这是因为细胞内苹果酸的积累有一定限度,当苹果酸含量过高时,植物体自身会调节苹果酸的代谢和转运来维持细胞内代谢平衡,如细胞质中苹果酸氧化产生 NADH 为硝酸还原反应提供还原力<sup>[32]</sup>,且苹果酸对 PEPC 有反馈调节作用,苹果酸过多会抑制 PEPC 活性<sup>[30,36]</sup>。

本研究表明,在正常水分条件下转基因株系与对照光合速率差异不明显。这可能是由于在正常水分条件下,虽然转基因株系的 PEPC 过量表达,但  $C_4$  循环其他酶表达并未因此而增加,细胞内没有建立  $C_4$  循环,  $CO_2$  的同化方式仍以  $C_3$  途径为主,因此与对照相比光合优势不明显。

方立峰等<sup>[29]</sup>研究发现干旱胁迫下水稻体内脯氨酸含量增加,提高了水稻渗透调节能力,转基因株系明显高于未转基因的对照,因此转基因株系在干旱胁迫下维持较高的光合速率。李霞等<sup>[35]</sup>和焦德茂等<sup>[37]</sup>研究表明中午高温、强光逆境胁迫下,转 PEPC 基因水稻体内形成初级  $CO_2$  浓缩机制,维持了较高光合速率。本研究也发现,随着土壤干旱程度的增加,水稻叶片的苹果酸含量增加,且转基因株系明显高于对照。我们推测可能是过表达的 PEPC 固定  $CO_2$  形成的苹果酸为氨基酸合成提供碳骨架,促进

重要的渗透调节物质脯氨酸的合成, 提高水稻在干旱胁迫下的渗透调节能力, 从而降低了干旱对光合作用的抑制; 也可能是逆境胁迫条件下, 水稻内源的与 CO<sub>2</sub> 浓缩有关的酶如碳酸酐酶(CA)、丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)、NAD(P)-苹果酸酶(ME)、NAD(P)-苹果酸脱氢酶(MDH)等诱导表达增强, 在细胞内建立了一套 C<sub>4</sub> 微循环, 从而增强了水稻的光合速率<sup>[37]</sup>。

研究表明, 转 PEPC 基因水稻在干旱胁迫下表现明显的光合优势, 但其机制深入研究和阐明。

#### 4 结论

在正常水分条件下, 导入 PEPC 基因对水稻的光合速率没有明显的改变; 而在干旱条件下, 转 PEPC 基因水稻相对于未转基因的对照表现出非常明显的光合优势, 其光合速率因干旱下降的幅度较小。推测 PEPC 可能提高了水稻的抗旱能力, 从而减轻了干旱胁迫对水稻光合作用的抑制效果。

#### References

- [1] Häusler R E, Hirsch H J, Kreuzaler F, Peterhänsel C. Over-expression of C<sub>4</sub>-cycle enzymes in transgenic C<sub>3</sub> plants: a biotechnological approach to improve C<sub>3</sub>-photosynthesis. *J Exp Bot*, 2002, 53: 591–607
- [2] Leegood R C. C<sub>4</sub> photosynthesis: principles of CO<sub>2</sub> concentration and prospects for its introduction into C<sub>3</sub> plants. *J Exp Bot*, 2002, 53: 581–591
- [3] Matsuoka M, Furbank R T, Fukayama H, Miyao M. Molecular engineering of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 297–314
- [4] Mann C C. Crop scientists seek a new revolution. *Science*, 1999, 283: 310–314
- [5] Mann C C. Genetic engineers aim to soup up crop photosynthesis. *Science*, 1999, 283: 314–316
- [6] Ku M S B, Agarie S, Nomurn 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 Biotech*, 1999, 17: 76–80
- [7] Sheehy J E, Mitchell P L, Hardy B, eds. Redesign rice Photosynthesis to Increase Yield. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2000. pp 167–204
- [8] Agarie S, Miura A, Sumikura R, Tsukamoto S, Nose A, Arima S, Matsuoka M, Miyao-Tokutomi M. Over expression of C<sub>4</sub> PEPC caused O<sub>2</sub>-insensitive photosynthesis in transgenic rice plant. *Plant Sci*, 2002, 162: 257–265
- [9] Fukayama H, Hatch M D, Tamai T, Tsuchida H, Sudoh S, Furbank R T, Miyao M. Activity regulation and physiological impacts of maize C<sub>4</sub>-specific phosphoenolpyruvate carboxylase overproduced in transgenic rice plants. *Photosynth Res*, 2003, 77: 227–239
- [10] Ding Z-S(丁在松), Zhao M(赵明), Jing Y-X(荆玉祥), Li L-B(李良璧), Kuang T-Y(匡廷云). Effect of over expression of maize *ppc* gene on photosynthesis in transgenic rice plants. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(5): 717–722 (in Chinese with English abstract)
- [11] Miyao M. Molecular evolution and genetic engineering of C<sub>4</sub> photosynthetic enzymes. *J Exp Bot*, 2003, 54: 179–189
- [12] Ku M S B, Cho D, Ranade U, Hsu T P, Li X, Jiao D M, Ehleringer J, Miyao M, Matsuoka M. Photosynthetic performance of transgenic rice plants over expressing maize C<sub>4</sub> photosynthesis enzymes. In: Sheehy J E, Mitchell P L, Hardy B, eds. Redesigning of Rice Photosynthesis to Increase Yield. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2000. pp 193–204
- [13] Jiao D M, Huang X Q, Li X, Chi W, Kuang T Y, Zhang Q D, Ku M S B, Cho D H. Photosynthetic characteristics and tolerance to photo-oxidation of transgenic rice expressing C<sub>4</sub> photosynthesis enzymes. *Photosynth Res*, 2002, 72: 85–93
- [14] Jiao D M, Li X, Ji B H. Photoprotective effects of high level expression of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice during photo inhibition. *Photosynthetica*, 2005, 43: 501–508
- [15] Jiao D-M(焦德茂), Li X(李霞), Huang X-Q(黄雪清), Chi W(迟伟), Kuang T-Y(匡廷云), Ku M S B(古森本). Characteristics of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation and chlorophyll fluorescence in transgenic rice plants with PEPC gene. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2001, 46(5): 414–418 (in Chinese)
- [16] Bandyopadhyay A, Datta K, Zhang J, Yang W, Raychaudhuri S, Datta S K. Enhanced photosynthesis rate in genetically engineered *indica* rice expressing *pepc* gene cloned from maize. *Plant Sci*, 2007, 172: 1204–1209
- [17] Gonzalez M C, Sanchez R, Cejudo F J. Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. *Planta*, 2003, 216: 985–992
- [18] Sanchez R, Flores A, Cejudo F J. Arabidopsis phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. *Planta*, 2006, 223: 901–909
- [19] Echevarría C, García-Maurino S, Alvarez R, Soler A, Vidal J. Salt stress increases the Ca<sup>2+</sup>-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in sorghum leaves. *Planta*, 2001, 214: 283–287
- [20] García-Maurino S, Monreal J A, Alvarez R, Vidal J, Echevarría C. Characterization of salt stress-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in leaves of sorghum *vulgare*: independence of osmotic stress, involvement of ionotoxicity and significance of dark phosphorylation. *Planta*, 2003, 216: 648–655

- [21] Barlow E W K. The Growth and Functioning of Leaves. London: Cambridge University Press, 1988. pp 314–345
- [22] Legg B J, Day W, Lawton D W, Parkinson K J. The effect of drought on barley growth: models and measurements showing relative importance of leaf area and photosynthetic rate. *J Agric Sci*, 1979, 92: 703–716
- [23] Yamance K, Hayakawa K, Kawasaki M. Bundle sheath chloroplasts of rice are more sensitive to drought stress than mesophyll chloroplasts. *J Plant Physiol*, 2003, 160: 1319–1327
- [24] Jiang M-Y(蒋明义), Yang W-Y(杨文英), Xu J(徐江), Chen Q-Y(陈巧云). Osmotic stress-induced oxidative injury of rice seedlings. *Acta Agron Sin* (作物学报), 1994, 20(6): 733–738 (in Chinese with English abstract)
- [25] Dhindsa R S. Protein synthesis during rehydration of rapidly dried *Tortula ruralis*: evidence for oxidation injury. *Plant Physiol*, 1987, 85: 1094–1098
- [26] Kavi Kishore P B, Sangam S, Amrutha R N, Laxmi P S, Naidu K R, Rao K R S S, Rao S, Reddy K J, Theriappan P, Sreenivasulu N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci*, 2005, 88: 424–438
- [27] Liang J-S(梁建生), Zhang J-H(张建华). Production, transport and physiological functions of stress signal abscisic acid in roots. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 1998, 34(5): 329–338 (in Chinese with English abstract)
- [28] Grabov A, Blatt M R. Co-ordination of signaling elements in guard cell ion channel control. *J Exp Bot*, 1998, 49: 351–360
- [29] Fang L-F(方立锋), Ding Z-S(丁在松), Zhao M(赵明). Characteristics of drought tolerance in ppc overexpressed rice seedlings. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2008, 34(7): 1220–1226 (in Chinese with English abstract)
- [30] Kung S D, Chollet R, Marsho T V. Crystallization and assay procedures of tobacco ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase. In: Pietro A S ed. *Method Enzymology*. New York: Academic Press Inc, 1980, 69: 326–335
- [31] Gonzalez D H, Iglesias A A, Andreo C S. On the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity from maize leaves by L-malate: effect of pH. *J Plant Physiol*, 1984, 116: 425–430
- [32] Frauke C, Peter S, Jurgen F. Malate metabolism and reactions of oxidoreduction in cold-hardened winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *J Exp Bot*, 2003, 384: 1075–1083
- [33] Backhausen J E, Kitzmann C, Scheibe R. Competition between electron acceptors in photosynthesis: regulation of the malate valve during CO<sub>2</sub> fixation and nitrite reduction. *Photosynth Res*, 1994, 42: 75–86
- [34] Kogami H, Shono M, Koike T, Yanagisawa S, Izui K, Sentoku N, Tanifuji S, Uchimiya H, Toki S. Molecular and physiological evaluation of transgenic tobacco plants expression a maize phosphoenolpyruvate carboxylase gene under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Transgenic Res*, 1994, 3: 287–296
- [35] Li X(李霞), Jiao D-M(焦德茂), Dai C-C(戴传超). The response to photo oxidation in leaves of PEPC transgenic rice plant (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(4): 408–413 (in Chinese with English abstract)
- [36] Andreo C S, Gonzalez D H, Iglesias A A. Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase: structure and regulation. *FEBS Lett*, 1987, 13: 1–8
- [37] Jiao D-M(焦德茂), Kuang T-Y(匡廷云), Li X(李霞), Ge Q-Y(戈巧英), Huang X-Q(黄雪清), Hao N-B(郝乃斌), Bai K-Z(白克智). A limited photosynthetic CO<sub>2</sub> concentration mechanism in transgenic rice plant over expressed maize PEPC gene. *Sci China* (Ser C) (中国科学-C 辑), 2003, 33(1): 33–39 (in Chinese with English abstract)