

转 C₄ 基因水稻的生理表现

傅元婷, 张边江, 陈全战^{*}
(南京晓庄学院, 江苏 南京 211171)

摘要: 以 C₃ 水稻原种(WT)和 C₄ 玉米为材料, 研究了转 PEPC+PPDK+ME 基因水稻(PKM)的 C₄ 光合酶活性、不同光温条件下光合参数和水分利用效率、活性氧代谢等指标。结果表明, PKM 水稻饱和光合速率介于 WT 和 C₄ 玉米之间, 稍偏向玉米, 而水分利用效率与 WT 接近。由于玉米 C₄ 基因的导入, PKM 水稻高表达了相关的 C₄ 光合酶。在高光和高温条件下, PKM 水稻光合速率比原种提高 55% 以上。另外, 虽然 PKM 水稻光合速率增加, 但蒸腾速率亦升高, 因此 PKM 水稻的水分利用效率略有增加, 偏向原种。在光氧化条件下, PKM 水稻耐光氧化能力进一步增强。

关键词: 转基因水稻; 光合特性; 水分利用效率

中图分类号: S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)05-0018-05

Physiological Performance of Transgenic Rice Expressing C₄ Genes

FU Yuan-ting, ZHANG Bian-jiang, CHEN Quan-zhan^{*}
(Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China)

Abstract: In this study, the activities of C₄ photosynthetic enzymes (including PEPC, PPDK, ME and MDH), the gas exchange parameters and water use efficiency (*WUE*) under different light intensities and temperatures, and the metabolic index of active oxygen were determined in transgenic rice carrying PEPC, PPDK and ME genes (PKM), taking the C₃-type untransformed rice (WT) and maize (a C₄ plant) as controls. The result showed that the light-saturated photosynthetic rate of PKM was intermediate between WT and maize, with a slight bias towards maize, while the *WUE* of PKM was similar to WT. The C₄ photosynthetic enzymes were highly expressed in the PKM. Under the conditions of high photon flux density and high temperature, the photosynthetic rate of PKM increased by 55%, as compare to WT. Though *Pn* of PKM increase, its transpiration rate was also increased. Thus the *WUE* of CK was only slightly increased, and was similar to WT. In addition, the resistance of CK to photo-oxidation was enhanced under the photo-oxidative conditions. Based on the above results, CK possesses enhanced photosynthetic productivity, providing a new technical approach and physiological basis for constructing C₄-like rice with enhanced photosynthetic efficiency and high yields.

Key words: Transgenic rice; Photosynthetic parameter; Water use efficiency

与 C₃ 植物相比, C₄ 植物具有 CO₂ 浓缩机制, 能在高光强、高温及低 CO₂ 浓度、干旱等条件下有较高的光合效率和营养、水分利用效率^[1,2]。人们

企图将 C₄ 光合性状导入 C₃ 作物中以提高 C₃ 作物的光合效率^[3]。但由于研究手段等限制, 长期以来未取得明显的进展。近 10a 来, 由于生物技术的进

收稿日期: 2009-10-21

基金项目: 江苏省大学生创新训练项目(2160081); 江苏省教育厅高校自然基金项目(08KJD180012)

作者简介: 傅元婷(1987-), 女, 江苏仪征人, 在校本科生, 研究方向: 农作物生理。

^{*} 通讯作者: 陈全战(1965-), 男, 江苏东海人, 副教授, 博士, 主要从事作物生理研究。

步,玉米 C₄ 光合途径的关键酶 PEPC(phosphoenolpyruvate carboxylase)、PPDK(pyruvate orthophosphate dikinase)、ME(NA DP-mailc enzyme)基因已成功地导入 C₃ 作物水稻中,获得了高表达的转基因植株^[4-12]。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]和耐光氧化的特性^[13, 14]。向 C₃ 植物水稻中外加 C₄ 光合原初产物 OAA 可提高叶片的光合能力,意味着转 PEPC 基因水稻叶内具有有限的 C₄ 微循环的运转^[15]。但前人对转 3 个光合关键酶基因的水稻研究较少,本试验通过杂交获得了转 PEPC+PPDK+ME 3 个基因(PKM)水稻的材料,在上述工作基础上,以原种、PKM 和 C₄ 植物玉米为材料,研究了净光合速率(*P_n*)、蒸腾速率(*Tr*)和水分利用效率(*WUE*)的相互关系及其光氧化特性,以期阐明提高水稻光合和水分利用效率的技术途径及其生理基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

与美国华盛顿州立大学 Maurice S B Ku 教授合作,以日本水稻品种 Kitaake 为基因受体,分别导入玉米的 PEPC、PPDK、ME 基因,获得不同的转基因水稻材料,另外通过杂交的方法获得转 PEPC+PPDK+ME 基因(下称 PKM)水稻材料。上述种子在南京进行盆栽试验,5 月初播种,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,各小区土壤肥力和管理措施保持一致。

1.2 C₄ 酶活性测定

C₄ 光合酶 PEPC、PPDK、ME、MDH(脱氢酶)活性分别参照 Gonzalez 等^[16]、Hatch 等^[17]、陈景治等^[18]和李斌等^[19]的方法测定。

1.3 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,CO₂ 为 340 μmol/mol, O₂ 为 21%,温度为 30℃,绘制光合曲线。通过 LI-6400 控制光强在 1000 μmol/(m²·s),测定不同温度下净光合速率,绘制温度-光合曲线。

1.4 活性氧代谢指标的测定

在水稻抽穗期,用 1.5 mmol/L 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(20~30 μmol/(m²·s))下 1h,使蒸馏水和抑制剂渗入叶片内,随后在 1400 μmol/(m²·s)下照光 5h 后测定

有关生理参数。超氧化物歧化酶(SOD)活性按 Giannopolitis 等^[20]方法测定;丙二醛(MDA)含量和过氧化物酶(POD)活性分别按 Heath 等^[21]和 Kochba 等^[22]方法测定;O₂⁻产生速率按王爱国等^[23]的方法测定。

2 结果与分析

2.1 PKM 水稻及原种叶片内的 C₄ 光合酶活性比较

由表 1 可知,原种中具有全套的 C₄ 光合酶,但活性很低。PKM 水稻的 PEPC、PPDK 和 ME 活性分别比 C₃ 水稻原种(WT)高 17.34 倍、2.54 倍和 3.97 倍。表明转 PKM 基因水稻高表达了相应的 C₄ 光合酶。

表 1 PKM 水稻叶片内的光合酶活性
μmol/(mg·h)

光合酶	原种	转基因植株	增加倍数
PEPC	62.10±3.85	1139±65.65	17.34
PPDK	23.52±1.08	83.48±6.80	2.54
ME	20.64±1.76	102.60±6.64	3.97
MDH	93.24±4.91	98.05±3.44	0.05

2.2 PKM 水稻、原种和玉米的光合生理特性比较

从图 1 看出,原种、PKM 水稻和玉米在低光强下光合作用没有明显差异。但进一步增加光强,WT 的饱和光强为 1000 μmol/(m²·s),饱和光合速率为 20 μmol/(m²·s);PKM 水稻饱和光强为 1200 μmol/(m²·s),饱和光合速率为 30 μmol/(m²·s);玉米饱和光强为 1400 μmol/(m²·s),饱和光合速率达到了 40 μmol/(m²·s)。

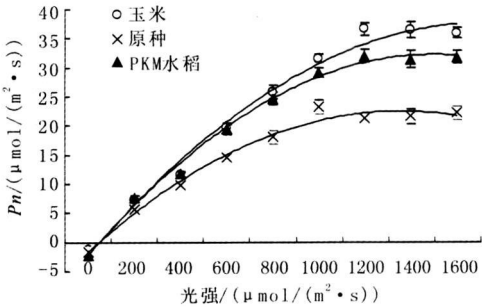


图 1 PKM 水稻、原种与玉米叶片的光合速率对光强的响应

图 2 显示,不同光强下蒸腾速率的变化趋势与光合速率相一致,PKM>WT>玉米,所有材料随着光强的增加蒸腾速率均升高,说明在高光强下水分蒸腾速率亦很高。

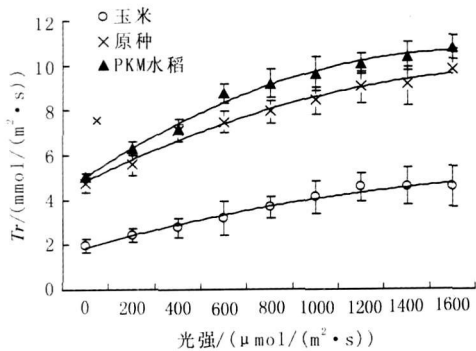


图 2 PKM 水稻、原种与玉米叶片蒸腾速率对光强的响应

图 3 显示, 水分利用效率表现为玉米> PKM> WT, 说明 C₄ 植物的水分利用效率远高于 C₃ 植物, 虽然 PKM 比原种光合速率增加明显, 但由于 $WUE = Pn / Tr$, 经过计算得出 PKM 水分利用效率比 WT 略有增加。

在 25℃ PKM 水稻的光合速率比 WT 的高, 但差异不明显, WT 最适合的温度在 30 ~ 35℃, 但 PKM 水稻在 35℃时光合速率最高。玉米的光合作用均比水稻高且在 35 ~ 40℃净光合速率还进一步增加, 说明转 C₄ 基因水稻光合能力介于 C₃ 植物和 C₄ 植物之间, 偏向玉米。

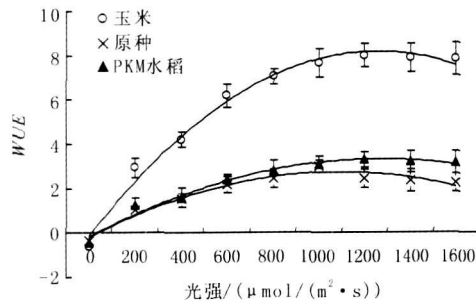


图 3 PKM 水稻、原种与玉米叶片的水分利用效率对光强的响应

图 4 和图 5 为不同温度下 PKM 水稻、原种和玉米的蒸腾效率和水利用效率的变化情况。

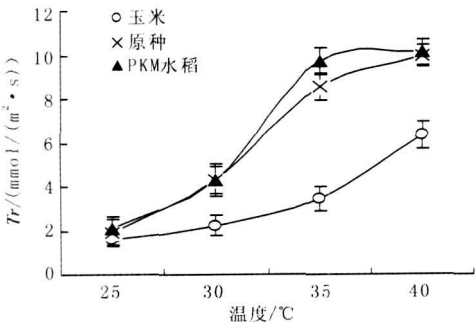


图 4 PKM 水稻、原种与玉米叶片的蒸腾速率对温度的响应

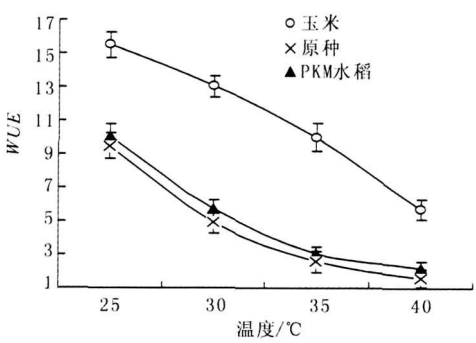


图 5 PKM 水稻、原种与玉米叶片的水分利用效率对温度的响应

2.3 PKM 水稻的光氧化特性

从图 6-A、B 看出, 光氧化处理后, PKM 水稻的 SOD、POD 活性比原种高, 而 O₂⁻ 产生速率和 MDA 含量(图 6-C、D)与 SOD、POD 活性表现相反。上述结果说明, PKM 水稻具有较强的光保护能力。

3 讨论

在高光高温下, C₄ 植物具有 C₄ 光合途径和 Kranz 结构, 因此具有 CO₂ 浓缩机制, 表现高的光合能力^[1]。从研究结果看出, C₄ 植物(玉米)在光强 1400 μmol/(m²·s)和 40℃下, 光合速率为 40 μmol/(m²·s), 比 C₃ 植物水稻高 1 倍。而玉米的 Tr 较低, 因此, 水分利用效率比 C₃ 植物高 2.5 倍, 适于在干旱条件下栽培。

本研究表明, 将 C₄ 植物 PEPC、PPDK 和 ME 基因导入水稻, 有利于 CO₂ 和水分的进入。光强在 1200 μmol/(m²·s)、35℃时, PKM 水稻仍维持较高的光合能力和耐光抑制的特性。其原因可能是在高光高温下, 与 CO₂ 浓缩有关的酶 PEPC 和 CA 蛋白的表达量增加有关, C₄ 微循环可能起着重要作用^[14]。但这一机制还有待同位素饲喂加以证明。PKM 水稻的 WUE 比 WT 略有增加, 但与玉米相比相差显著(P<0.01), 这一特性有利于旱稻的栽培, 至于养分利用效率有待研究。

转 C₄ 基因水稻是否有增加光合能力的效应还存在一些争议^[24, 25], 本试验的材料是在南京夏季的自然条件下种植, 最高温度常在 35℃, 光强常超过 1400 μmol/(m²·s)。Jiao 等^[26]在这种条件下发现, 转 PEPC 基因水稻表现出光合速率和耐光氧化能力提高和产量增加的特性; Bandyopadhyay 等^[9]在印度的研究结果也支持这一观点。因此认为, 转 C₄ 基因的水稻材料需要在高光高温的自然条件下进行培育和定向筛选鉴定, 这是一个重要的技术条件。

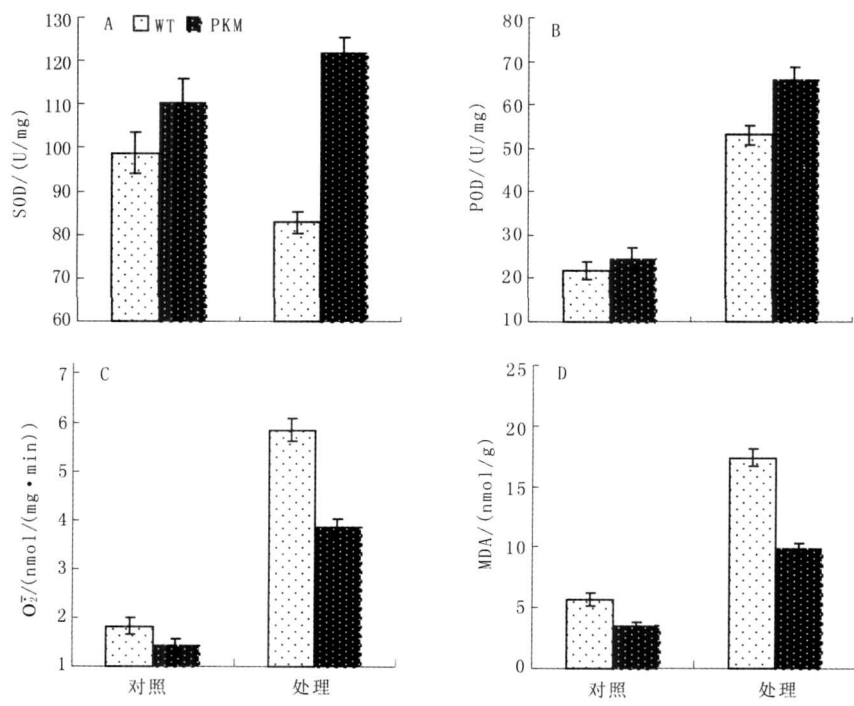


图 6 光氧化处理后 PKM 和原种的 SOD、POD 酶活性以及 O_2^- 产生速率、MDA 含量

近来,国际水稻研究所邀请各国有关科学家进行了主题为构建 C₄ 水稻的讨论,试图实现新的一次绿色革命^[27]。今后拟进一步对其光合作用增加的机制进行探讨,为构建 C₄ 水稻提供理论依据。

参考文献:

[1] Black C C, Campbell W H, Chen T M, *et al.* Pathways of carbon metabolism related to net carbon dioxide assimilation by monocotyledons[J]. The Quarterly Review of Biology, 1973, 48(2): 299-313.

[2] Ku M S B, Kano-Murakami Y, Matsuoka M. Evolution and expression of C₄ photosynthesis genes[J]. Plant Physiol, 1996, 111: 949-957.

[3] Brown R H, Bassett C L, Cameron R G, *et al.* Photosynthesis of F₁ hybrids between C₄ and C₃-C₄ species of Flaveria[J]. Plant Physiol, 1986, 82: 211-217.

[4] Ku M S B, Sakae A, Mika N, *et al.* High level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants[J]. Natural Biotechnology, 1999, 17, 76-80.

[5] Zhang F, Chi W, Jin C Z, *et al.* Molecular cloning of phosphoenolpyruvate carboxylase gene from sorghum involved in C₄ photosynthesis and breeding transgenic rice[J]. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(14): 1542-1546.

[6] 张桂芳, 赵明, 丁在松, 等. 稗草磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCase)基因的克隆与分析[J]. 作物学报, 2005,

31(10): 1365-1369.

[7] 丁在松, 赵明, 荆玉祥, 等. 玉米 *pepc* 基因过表达对转基因水稻光合速率的影响[J]. 作物学报, 2007, 33(5): 717-722.

[8] 袁定阳, 段美娟, 谭炎宁, 等. 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[J]. 杂交水稻, 2007, 22(2): 57-63.

[9] Bandyopadhyay A, Datta K, Zhang J, *et al.* Enhanced photosynthesis rate in genetically engineered indica rice-expressing *pepc* gene cloned from maize[J]. Plant Science, 2007, 172: 1204-1209.

[10] Fukayama H, Agarie S, Nomura M, *et al.* High level expression of maize C₄-specific pyruvate, Pi dikinase and its light activation in transgenic rice plants[J]. Plant Cell Physiology, 1999, 40: 116.

[11] Tsuchida H, Tamai T, Fukayama H, *et al.* High level expression of C₄-specific NADP-malic enzyme in leaves and impairment of photoautotrophic growth in a C₃ plant, rice[J]. Plant Cell Physiology, 2001, 42: 138-145.

[12] Chi W, Zhou J S, Zhang F, *et al.* Photosynthetic features of transgenic rice expressing sorghum C₄ type NADP-ME[J]. Acta Bot Sin, 2004, 46: 873-882.

[13] 黄雪清, 焦德茂. 转 C₄ 光合酶基因水稻株系的抗光氧化特性[J]. 植物生理学报, 2001, 27(5): 393-400.

[14] Jiao D M, Li X, Ji B H. Photoprotective effects of high level expression of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice during photoinhibition[J]. Pho-

tosynthetica, 2005, 43: 501-508.

- [15] 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[J] . Acta Botanica Sinica, 2004, 46(5): 542-551.
- [16] Gonzalez D H, Iglesias A A, Andeo C S. On the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity from maize leaves by L-malate; effect of pH[J] . Plant Physiol, 1984, 116: 425-429.
- [17] Hatch M D, Slack C R. Pyruvate Pi dikinase from leaves[J] . Meth Enzymol, 1975, 42: 212-219.
- [18] 陈景治, 陈冬兰, 吴敏贤. 高粱和小麦叶片苹果酸酶某些特性比较[J] . 植物生理学报, 1981, 7(4): 345-350.
- [19] 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[J] . 植物生理学报, 1994, 13(2): 113-121.
- [20] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase: I . Occurrence in higher plants[J] . Plant Physiol, 1977, 59: 309-314.
- [21] Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I . kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J] . Arch Biochem Biophys, 1968, 125: 189-198.
- [22] Kochba J, Lave E S, Spiegel R P. Difference in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic shamouti orange ovular callus lines[J] . Plant Cell Physiol, 1977, 18: 463-467.
- [23] 王爱国, 罗广华. 植物超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系[J] . 植物生理学通讯, 1990(6): 55-57.
- [24] Fukayama H, Imanari E, Tsuchida H, *et al.* In vivo activity of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plant[J] . Plant Cell Physiology, 2000, 41: 112-117.
- [25] Taniguchi Y, Ohkawa H, Masumoto G, *et al.* Overproduction of C₄ photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C₄-like photosynthetic pathway into rice[J] . Journal of Experimental Botany, 2008, 59: 1799-1809.
- [26] Jiao D M, Hang X Q, Li X, *et al.* Photosynthetic characteristics and tolerance to photooxidation of transgenic rice expressing C₄ photosynthesis enzymes[J] . Photosynthesis Research, 2002, 72: 85-93.
- [27] Dennis N. Agricultural research: Consortium aims to supercharge rice photosynthesis[J] . Science, 2006, 28(313): 423.

(上接第 17 页)

- [2] 勾玲, 黄建军, 张宾, 等. 群体密度对玉米茎秆抗倒力和农艺性状的影响[J] . 作物学报, 2007, 33(10): 1688-1695.
- [3] 谢振江, 李明顺, 李新海, 等. 密度压力下玉米杂交种农艺性状与产量相关性研究[J] . 玉米科学, 2007, 15(4): 100-104.
- [4] 常程, 张书萍, 刘晶, 等. 密度对不同株型玉米产量和农艺性状的影响[J] . 辽宁农业科学, 2008(2): 27-29.
- [5] Hashemi, A M, Herbert S J, D H. Yield response of corn to crowding stress[J] . Agronomy Journal, 2005, 97(3): 839-846.
- [6] 张永科, 王立祥, 杨金慧, 等. 中国玉米产量潜力增进技术研究进展[J] . 中国农学通报, 2007, 23(07): 267-269.
- [7] 王晓鸣, 戴法超, 廖琴, 等. 玉米病虫害田间手册——病虫害鉴别与抗性鉴定[M] . 北京: 中国农业科技出版社, 2002: 26-29.
- [8] 孙建军, 铁双贵, 刘建双, 等. 郑白糯 918 不同种植密度效应研究[J] . 河南农业科学, 2008(7): 21-24.
- [9] 石继文, 尹华, 蒋明华, 等. 杂交玉米贵单 8 号密度试验[J] . 现代农业科技, 2009(2): 144-145.
- [10] 李明. 玉米不同种植密度试验研究[J] . 现代农业科技, 2008(22): 169-170.