

高表达转 C_4 型 *PEPC* 基因水稻在低氮下 诱导碳氮酶稳定光合作用

唐玉婷^{1,2}, 李霞², 陆巍¹, 魏晓东²

(1. 南京农业大学 生命科学学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院 粮食作物研究所, 江苏省优质水稻工程技术研究中心, 国家水稻改良中心南京分中心, 江苏 南京 210014)

摘要:为揭示高表达转玉米 C_4 -*PEPC* 基因水稻在低氮条件下的光合表现, 采用高表达转玉米 C_4 -*PEPC* 基因水稻(PC)与原种 Kitaake(WT)为试验材料, 通过盆栽试验, 分别测定不同的氮素条件下(中氮 300 kg/hm², 低氮 65 kg/hm²), 开花后不同天数的 SPAD 值, 光合参数以及碳氮关键酶活性。并在开花后 50 d 收获植株, 记录产量因子。结果表明: 低氮处理下的 PC 相对于 WT 来说, 在开花后 14, 28 d, 其净光合速率分别提高了 13.10% ($P < 0.05$) 和 29.29% ($P < 0.05$)。同时, Rubisco 羧化酶在开花后 14, 28 d 时活性分别提高了 67.86% 和 52.63% ($P < 0.05$); 硝酸还原酶在 14, 28 d 时的活性分别提高 79.49% ($P < 0.05$) 和 17.96%; 谷氨酰胺合成酶仅在开花后 28 d 时活性提高 28.48% ($P < 0.05$)。但是通过对产量进行分析, 在低氮条件下, 并未发现 PC 的产量与 WT 有明显差异。可见, PC 通过诱导碳氮的关键酶活性的提高维持低氮条件下高净光合速率。

关键词:高表达转 C_4 型 *PEPC* 基因水稻; 低氮; 光合特性

中图分类号: S143.1; S511.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2015)04-0095-06

doi: 10.7668/hbxb.2015.04.017

Transgenic Rice with High Expression of C_4 -*PEPC* Genes Induced Higher Carbon and Nitrogen Key Enzyme to Maintain Photosynthesis under Low Nitrogen Conditions

TANG Yu-ting^{1,2}, LI Xia², LU Wei¹, WEI Xiao-dong²

(1. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Jiangsu High Quality Rice R&D Center, Nanjing Branch of China National Center Rice Improvement, Nanjing 210014, China)

Abstract: The objective of this study was to reveal transgenic rice with high expression of maize C_4 -*PEPC* photosynthetic performance under low nitrogen conditions, two rice genotypes including C_4 -*PEPC* transgenic rice (PC) and untransgenic Kitaake rice (WT) in the pot experiments were chosen to measure their photosynthesis characteristics, SPAD values, PEPC, Rubisco, NR and GS activities of flag leaves at different flowering stage under different nitrogen applications (normal nitrogen 300 kg/ha, low nitrogen 65 kg/ha) and their yield component were investigated after harvest. The results showed that the net photosynthetic rate of PC compared with WT were increased by 13.10% ($P < 0.05$) and 29.29% ($P < 0.05$), respectively in the 14, 28 d after flowering under low nitrogen treatment. At the same time, under low concentrations of nitrogen, relative to untransformed wild type rice, activity of Rubisco carboxylase of PC were increased by 67.86% and 52.63% ($P < 0.05$) in the 14, 28 d after flowering respectively, while activity of nitrate reductase of PC were increased 79.49% ($P < 0.05$) and 17.96%. Meanwhile, activity of glutamine synthetase of PC was increased 28.48% ($P < 0.05$) only in the 28 days after flowering comparing with WT. But we did not find significant differences in the yield of PC and WT under low nitrogen conditions.

收稿日期: 2015-05-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 31371554); 江苏省自主创新基金项目 (CX[14]5004); 江苏省自然科学基金项目 (BK20130708)

作者简介: 唐玉婷 (1991-) 女, 安徽阜阳人, 在读硕士, 主要从事水稻光合生理研究。

通讯作者: 李霞 (1970-) 女, 广西桂平人, 研究员, 博士, 主要从事水稻光合生理研究。

陆巍 (1971-) 男, 江苏无锡人, 副教授, 博士, 主要从事植物光合作用研究。

tions. Therefore, PC maintain high net photosynthetic rate by inducing the activity of carbon and nitrogen key enzyme improvement under low nitrogen conditions.

Key words: High expression of maize C_4 -PEPC transgenic rice; Low nitrogen; Photosynthesis

光合作用的提高对于水稻增产有着积极的影响, Ku 等^[1]将包含启动子、终止子以及全部外显子和内含子的完整玉米 C_4 途径中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (Phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC) 基因, 采用农杆菌介导的方式, 导入粳稻品种 Kitaake 中, 成功获得高水平表达 C_4 -PEPC 基因的水稻株系^[1]。研究发现, 高表达转玉米 C_4 -PEPC 基因水稻 (PC) 具有高光效特性和初级 CO_2 浓缩机制的生理特点^[2-3]。在正常的条件下, PC 相对于原种 Kitaake (WT) 来说, 表现出较高的净光合速率, 大田产量和千粒质量也表现出一个明显的产量优势^[4]。有研究表明, PC 在 0.7 mmol/L (1/4N) 条件下根长和剑叶面积都要大于 WT, 有着明显的形态学上的优势; 同时, PC 在该条件下光系统 II (Photosystem II, PS II) 的相关指标都要显著高于 WT, 具有相对稳定的 PS II 结构, 表现耐低氮的优势^[5], 但其整体的光合特性表现如何, 在低氮下对植株产量有什么影响, 目前并没有研究。最近已有研究表明, PEPC 基因的高表达可以改变氮代谢相关酶^[6]。而且目前已提出铵逆境的信号分子, 可参与调节逆境相关基因的表达^[7]。PC 是否在低氮条件下, 通过调节碳氮关键酶, 缓解氮素缺乏导致的生长指标的下降, 从而稳定水稻产量, 这是一个值得研究的科学问题, 这将对“ C_4 稻”的创制提供重要的线索。

1 材料和方法

1.1 材料种植和氮素处理

本试验使用的材料是高表达转玉米 C_4 -PEPC 基因水稻 (PC)、未转基因的原种 Kitaake (WT)。2014 年 5 月 6 日, 将水稻种子 0.1% 的 $HgCl_2$ 浸泡 15 min, 后使用 75% 的酒精浸泡 3 min, 使用蒸馏水冲洗数次, 消毒后浸种, 并于 5 月 11 日播种于江苏省农业科学院试验田中。在 6 月 6 日, 移栽到只施加了基肥 (复合肥, 含 15% 氮, 15% 磷, 15% 钾) 的盆中, 每盆 5 穴, 每穴 1 株。盆栽试验按照总的施氮量为 300 kg/hm² (中氮, MN), 65 kg/hm² (低氮, LN), 各处理的 PC 和 WT 分别种植 8 盆。在其中低氮处理是一次性以基肥施加, 中氮处理中氮素分别是施基肥时 (15% N), 移栽后 1 周 (20% N), 分蘖肥 (20% N), 穗肥 (45% N) 等时期分别施加, 除基肥外, 其他时期所施加的氮肥均为尿素。常规水肥和

病虫管理, 于开花后统一挂牌, 用于相关的生理指标的测定, 在开花后 50 d 收获, 进行相关产量因子的分析。

1.2 试验测定

1.2.1 SPAD 值的测定 在开花后 7, 14, 28 d 利用叶绿素仪测定剑叶的 SPAD 值, 每个重复测定 5 片叶, 每片叶测定 5 个不同部位。

1.2.2 光合参数的测定 分别在开花后 7, 14, 28 d 使用 LI-6400 便携式光合测定仪 (LI-COR, 美国) 使用红蓝光源, 开放系统测定光合参数。选取叶片为剑叶, 在室外环境, 晴天 9:00 - 11:00 时, 使用光合仪内置光源 (1 000 $\mu\text{mol} (\text{m}^2 \cdot \text{s})$ PPED), 测定供试材料的净光合速率 (Net photosynthetic rate, P_n)、气孔导度 (Stomatal conductance, G_s) 和胞间 CO_2 浓度 (Intercellular CO_2 concentration, C_i), 每个处理测定 3~5 片叶, 每个叶片做 3~5 次测定^[8-9]。

1.2.3 酶活性的测定 硝酸还原酶 (Nitrate reductase, EC 1.7.1.3, NR) 使用 NR 试剂盒, 利用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行测定。通过亚硝酸盐与显色剂反应生成红色化合物, 在 540 nm 处使用紫外可见分光光度计 (UV-1200 型, 上海美谱达仪器有限公司) 测定。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下每 g 蛋白每 min 还原 1.0 μmol 硝酸盐为亚硝酸盐为 1 个酶活力单位。

谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthetase, EC 6.3.1.2, GS) 活性测定, 利用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒, 并在 540 nm 处使用紫外可见分光光度计 (UV-1200 型, 上海美谱达仪器有限公司) 测定吸光值。一个 GS 活性单位定义为于 25 $^{\circ}\text{C}$ 催化 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 的 γ -谷氨酰异羟肟酸的产生所需要的酶量。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (Phosphoenolpyruvate carboxylase, EC 4.1.1.31, PEPC) 酶活的测定, 反应体系中加入 50 mmol/L Hepes-氢氧化钾 (KOH) (pH 值 8.0)、10 mmol/L 碳酸氢钠 ($NaHCO_3$)、5 mmol/L 氯化镁 ($MgCl_2$)、0.2 mmol/L 还原型辅酶 I 二钠 ($NADH-Na_2$)、50 μL 粗酶液、1.5 U 苹果酸脱氢酶, 用蒸馏水定容至 1 mL, 混匀后加入 5 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸 (Phosphoenolpyruvic acid, PEP), 在紫外可见分光光度计 (UV-1200 型, 上海美谱达仪器有限公司) 上记录 90 s 内 340 nm 光密度的下降值 (每 15 s 记

录1次)。PEPC酶的活性($\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{prot}\cdot\text{h})$)= $\Delta\text{OD}_{340}/(6.3\cdot\text{prot}\cdot(\text{反应体系量}/\text{粗酶液体积})\cdot\text{反应时间})$ 。

核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(Ribulose biphosphate carboxylase, EC 4. 1. 1. 39, Rubisco)活性测定参照Lilley和Walker^[10]及Eckardt和Portis^[11]的方法。Rubisco羧化酶活力测定的反应体系包括:100 mmol/L的Hepes-KOH(pH值8.0)、100 mmol/L NaHCO₃、10 mmol/L MgCl₂、2.5 mmol/L三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)、20 mmol/L二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)、0.15 mmol/L NADH、0.1 mol/L磷酸肌醇,再加酶1 U/mL的磷酸甘油醛激酶、甘油醛3-磷酸脱氢酶和磷酸肌醇激酶,然后加入Rubisco羧化酶粗酶提取液100 μL ,将100 μL RuBP加于比色杯内,并马上计时,340 nm处,每隔30 s测1次吸光度,共测3 min。以蒸馏水为空白,在紫外可见分光光度计(UV-1200型,上海美谱达仪器有限公司)340 nm处反应体系的吸光度作为零点值。Rubisco羧化酶的活性以Rubisco活性增加来表示。

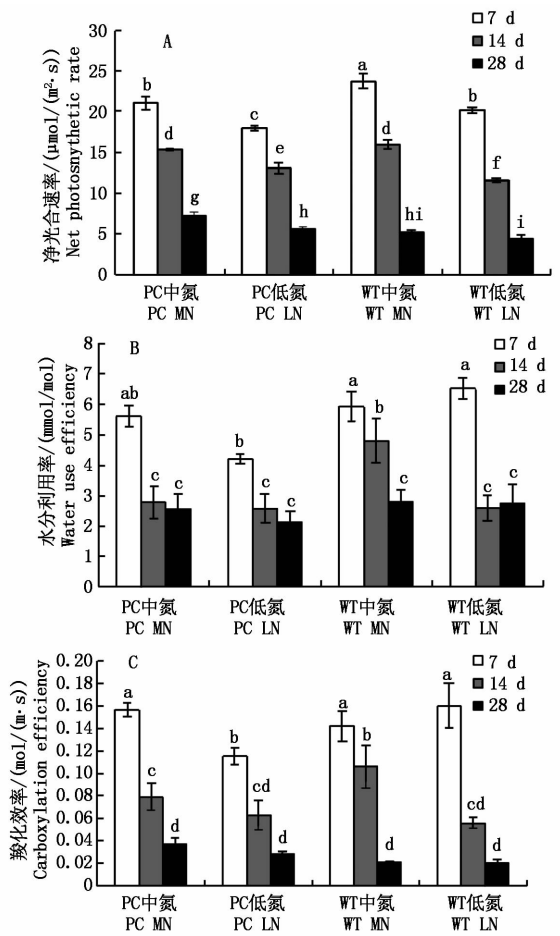
1.2.4 产量构成因子分析 在植株开花后50 d,收获植株,收获取样时各个处理取穗数平均值相等或者相近的10穴,自然风干后进行室内考种,籽粒含水量 $\leq 14.5\%$ 。测定每株分蘖数、每株穗数、穗长、每穴总粒数、穗粒数、每穴实粒数、每穗实粒数、结实率、产量以及千粒质量。

1.2.5 数据处理 使用Excel软件和SPSS 19.0对数据进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同的氮素水平对不同水稻材料光合参数的影响

从图1-A中可以看出,PC和WT随着开花天数的增加,其净光合速率下降。在开花后7 d时,低氮下的WT相对于PC其净光合速率还要更高一些($P < 0.05$)。但是到开花后14 d和开花后28 d时,低氮下PC的净光合作用与WT相比,分别提高了13.10% ($P < 0.05$)和29.29% ($P < 0.05$)。虽然在中氮条件下,PC在开花后28 d时要比WT的净光合要高($P < 0.05$),但是在开花后14 d时PC相对于WT来说是相差不大的。这也说明了在低氮下,PC相对于WT来说,其净光合速率是比较稳定的。但从水分利用效率(图1-B)和羧化效率(图1-C)的结果看,低氮条件下,尤其是生育后期(开花后28 d)PC的净光合速率下降的较慢与水分的利用能力以及羧化效率关系不大。



不同字母表示0.05水平上差异显著。图2~4,表1同。
The different letters are significant different at 0.05 level.
The same as Fig. 2-4, Tab. 1.

图1 不同氮素水平下不同品种开花后不同天数剑叶的光合参数

Fig.1 Light parameters of the flag leaf in different varieties during different days after flowing at different nitrogen levels

2.2 不同的氮素水平对转玉米C₄-PEPC基因水稻SPAD值的影响

叶片的SPAD值表示植物叶片的相对叶绿素水平,从图2中可以看出在低氮条件下,PC相对于WT来说其SPAD无显著性的差异。

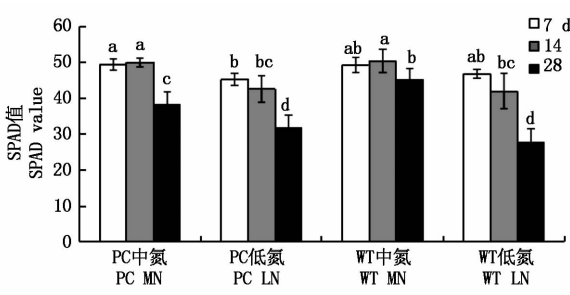


图2 不同氮素水平下不同品种开花后不同天数剑叶SPAD值

Fig.2 SPAD of the flag leaf in different varieties during different days after flowing at different nitrogen levels

2.3 不同的氮素水平对转玉米 C₄-PEPC 基因水稻酶活的影响

从图 3-A 中可以看出,与 WT 相比,无论是在中氮条件还是在低氮条件下,PC 中 PEPC 酶的活性均高于 WT,并有显著性差异($P < 0.05$),尤其是在低氮条件下开花后 14 d 时,有着最大的 PEPC 活性。

值得注意的是,在低氮下,开花后 28 d 时 PC 的 Rubisco 的活性相对于 WT 来说显著提高了 52.63% ($P < 0.05$)(图 3-B),在花后 14 d Rubisco 羧化酶提高了 67.86%,说明 PC 在低氮下可诱导碳相关酶的活性来补充氮素的匮乏。

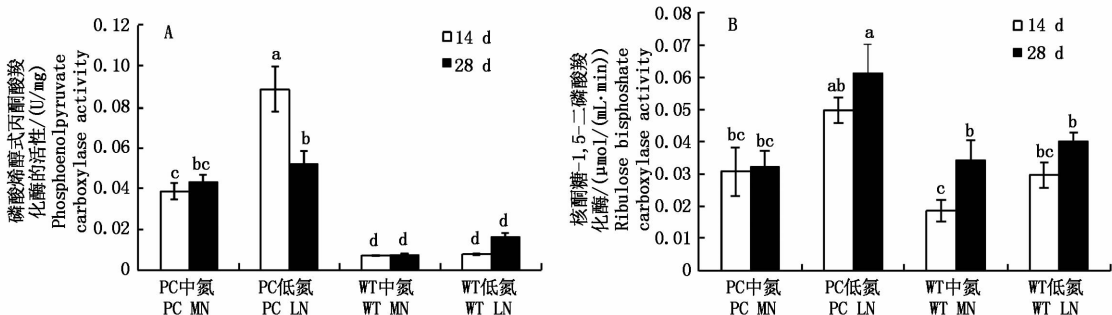


图 3 不同氮素水平下不同品种开花后不同天数剑叶的 PEPC 酶和 Rubisco 羧化酶的活性

Fig.3 Activity of phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose bisphosphate carboxylase of the flag leaf in different varieties during different days after flowering at different nitrogen levels

氮代谢相关酶 NR 的活性(图 4-A)在中氮条件下 PC 与 WT 无显著性差异,但是在低氮条件下开花后 14 d,与 WT 相比,PC 的 NR 活性提高了 79.49% ($P < 0.05$)。在开花后 28 d 时提高了 17.96%,但并无显著性差异。谷氨酰胺合成酶的活性(图 4-B)则在开花后 14 d 时,PC 和 WT 无差异。但是在开

花后 28 d,低氮条件下的 PC 中 GS 活性显著的要高于 WT(28.48%, $P < 0.05$),暗示 PC 可能通过分期诱导氮代谢酶,即前期诱导硝酸还原酶增加氮素的吸收,生育后期诱导谷氨酰胺合成酶增加氮素的同化,来应对氮素的匮乏。

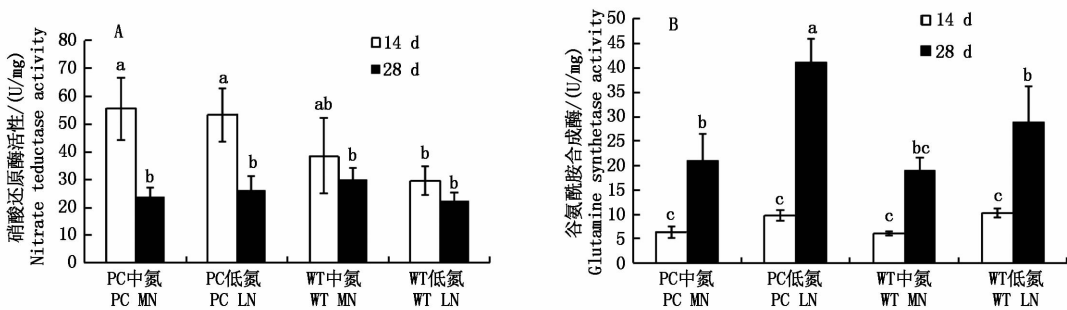


图 4 不同氮素水平下不同品种开花后不同天数剑叶的硝酸还原酶和谷氨酰胺合成酶的活性

Fig.4 Activity of nitrate reductase and glutamine synthetase of the flag leaf in different varieties during different days after flowing at different nitrogen levels

表 1 不同水稻材料在不同氮素下产量及其构成因子的变化

Tab.1 Yields and composition of different varieties at different nitrogen levels

项目 Item	高表达转玉米 C ₄ -PEPC 基因水稻 PC		原种 Kitaake WT	
	中氮 MN	低氮 LN	中氮 MN	低氮 LN
株高/cm Plant height	67.88 ± 4.49a	68.35 ± 5.55a	67.52 ± 4.80a	68.79 ± 5.27a
每株分蘖数 Tillers per plant	11.41 ± 2.81a	6.30 ± 1.60c	8.63 ± 2.26b	5.41 ± 1.37d
每株穗数 Panicles per plant	9.79 ± 2.83a	5.00 ± 1.70c	7.27 ± 1.74b	4.50 ± 1.05c
穗长/cm Panicle length	10.81 ± 0.87a	10.74 ± 1.06a	10.59 ± 1.41a	11.97 ± 1.57a
每穴总粒数 Total grains per hole	289.81 ± 82.47a	149.20 ± 205.58b	205.58 ± 65.86b	163.60 ± 44.57b
穗粒数 Grains per panicle	54.20 ± 10.78a	48.27 ± 6.39a	47.97 ± 9.89a	61.40 ± 13.50a
每穴实粒数 Filled grains per hole	218.87 ± 62.63a	128.40 ± 42.70b	174.00 ± 58.65b	150.60 ± 38.84b
每穗实粒数 Filled grains per panicle	22.78 ± 4.67b	25.87 ± 2.99b	22.94 ± 3.77b	35.47 ± 9.70a
结实率/% Kernels rate	0.76 ± 0.10b	0.87 ± 0.06a	0.84 ± 0.11a	0.89 ± 0.08a
单株产量/g Yield per plant	5.88 ± 0.83a	4.19 ± 0.94b	4.32 ± 0.97b	4.17 ± 0.98b
千粒质量/g 1000-kernel weight	26.67 ± 0.39a	26.71 ± 1.16a	26.24 ± 0.63a	26.74 ± 1.161a

2.4 不同的氮素水平对不同水稻材料产量的影响

分析了不同氮素水平下的转玉米 C_4 -*PEPC* 基因水稻及其野生型植株的产量因子,包括每株分蘖数、每株穗数、穗长、每穴总粒数、穗粒数、每穴实粒数、每穗实粒数、结实率、单株产量以及千粒质量(表 1)。其中 PC 在正常条件下其单株产量相对于 WT 来说是提高的,但是在低氮条件下 PC 与 WT 并没有显著差异,看来,PC 在低氮下可能调节到应对逆境的模式而不是高产的模式,可见要达到作物高产和耐逆的双重目标还是相当困难的。

3 讨论

氮素是植物生长和产量形成的重要营养元素^[12-13]。在本试验中无论是 PC 还是 WT 都会由于氮素的缺少,其 SPAD 和单株产量都有所下降。在有关光合参数的分析中,在低氮下 PC 在开花 14 d 以后相对于 WT 来说维持了较高的净光合速率。并且在碳氮代谢关键酶活性测定时也发现,低氮条件下 PC 中 *PEPC*、*Rubisco*、*NR* 和 *GS* 都在开花后 14 d 或者是 28 d 相对于 WT 提高。这可能也是使得 PC 净光合速率维持的原因。

由于 C_4 -*PEPC* 基因导入,使得 PC 相对于 WT 来说有着较高的 *PEPC* 酶活性,诱导了体内一个原初和有限的 C_4 光合微循环,大幅度提高了光合作用的运行^[14]。本研究中,在低氮下开花后 28 d 的 PC 其 *Rubisco* 的活性也显著提高了。这与之前在高光强下研究中,转 *PEPC* 基因水稻中 *Rubisco* 羧化酶活性变化不明显有差异^[15],并与之前在干旱胁迫下的番茄中 *Rubisco* 的活性是下降的研究结果相反^[16],这说明 C_4 -*PEPC* 基因的导入,在不同的环境条件下,碳代谢酶的表现不同,暗示高表达转 *PEPC* 基因水稻有多条应对环境逆境的方式。

在 N 代谢的过程中,硝酸根离子和铵根离子进入到植物体内后会经过一系列酶的作用将其转化为氨基酸的组成结构。在开花后 14 d 时,低氮下 PC 中 *NR* 活性显著高于 WT,使得 PC 可能在氮素吸收方面相对于 WT 来说更有优势。除此之外,植物体内的 *NR* 是 NO 合成的途径之一,NO 作为植物中重要的氮信号,影响植物的新陈代谢,贯穿了植物生长发育的每一个阶段。NO 可打破休眠,刺激萌发和根的伸长。NO 能刺激多种植物种子的萌发。如 NO 能够抑制莴苣 (*Lactuca sativa*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和大麦 (*Hordeum vulgare*) 等植物种子休眠,促进其萌发^[17]。NO 的积累还可影响根的向地性^[18]。前期研究表明:外施 NO 的供体硝普钠

也可以提高 PC 的净光合速率^[8]。是否在低氮条件下,硝酸还原酶诱导了 PC 的 NO 增加,增强其光合能力,以应对低氮的环境,是今后值得深入研究的内容。

有报道指出细胞溶质的谷氨酰胺合成酶对于从衰老的叶片转移至灌浆谷粒中氨基酸的再活化有作用^[19-21]。在有关 SPAD 的数据中也显示了当开花后 28 d,无论是 WT 还是 PC 其 SPAD 值均下降,说明水稻在生育后期,叶绿素降解,叶片开始衰老。所以,PC 水稻 *GS* 活性在开花后 28 d 时的提高,可能有助于 PC 水稻将衰老叶片中的 N 转移到籽粒当中去,使其籽粒中 N 的含量提高,补充氮匮乏对植物的不良影响。可见,PC 对氮代谢酶的分期诱导增加,有利于其抵御低氮的环境。

高产和广适是水稻育种的永恒主题。本试验研究中虽然 PC 在低氮下,净光合速率以及碳氮代谢的相关酶活性显著增加,但是在相关产量的分析中并没有产量的显著提高,可见高产和耐逆是不同的复杂机制。对各个参数与产量进行相关性分析发现:PC 的分蘖数提高了,分蘖直接决定着水稻穗数的多少进而影响水稻单位面积的产量^[22]。所以玉米 C_4 -*PEPC* 基因的导入,提高了光合效率及其生物量,但由于氮匮乏对氮素的再动员,利用了一部分库的氮素应对不同环境,因此产量没有表现提高。

目前的研究多致力于鉴定提高作物氮的有效利用率 (Effective utilization of nitrogen, NUE) 的基因,这些基因存在于与 N 吸收、同化、氨基酸的生物合成、C/N 储存和代谢、信号传导过程中以及与 N 代谢、运输、再活化和衰老调节中^[23]。因此,本研究的结果表明,通过转碳相关基因的表达,也可显著影响水稻的氮代谢相关酶,这将为氮高效利用提供了新思路。在低氮条件下,PC 中 *NR* 提高可能对于硝酸根运输蛋白的活性有着一定的影响,从而影响对于氮的吸收。有试验表明,NO 能诱导胞质中 Ca^{2+} 的增加^[24]。Garcia-Mata 等^[25]发现植物在胁迫下诱导了 NO 的增加,进而引起胞内 Ca^{2+} 含量的上升,在调节信号转导途径中发挥重要的作用。其中,在氮的吸收方面,植物氮代谢的转运体 *NRT1.1* (Nitrate transporter 1.1) 与 Ca^{2+} 信号有关。*NRT1.1* 的磷酸化和去磷酸化分别作为高亲和、低亲和的运输蛋白^[26]。低浓度的 NO_3^- 能够通过类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白 (Calcineurin B-like protein, CBL) 相互作用的 Calcineurin B-like-interacting Protein Kinase23 (CIPK23) 蛋白激酶触发 *NRT1.1* T101 的磷酸化^[27]。这个磷酸化对蛋白的结构与功能有着重要的影响^[28-29],磷酸化的 *NRT1.1* 处于高亲和的状

态。与之相反, CIPK8 主要是其转化为低亲和的状态, 这些氮代谢转运体也受逆境而改变。CIPK 是一类丝氨酸蛋白激酶, 与 CBL 互作能够响应 Ca^{2+} 信号。同时, NRT1.1 不仅是 NO_3^- 的运输载体能够感应 NO_3^- 信号, 也是植物激素生长素的运输载体, 能够使得植物在低 NO_3^- 条件下加快生长素的运输来促进侧根的生长^[30-31]。是否转 C_4 -PEPC 基因水稻也通过影响氮代谢的转运体, 从而增加低氮的耐性, 这将是今后一个值得研究的重要科学问题。

参考文献:

- [1] Ku M B, Agarie S, Nomura M, *et al.* High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(1): 76 - 80.
- [2] 焦德茂, 李霞, 黄雪清, 等. 转 PEPC 基因水稻的光合 CO_2 同化和叶绿素荧光特性[J]. *科学通报*, 2001, 46(5): 414 - 418.
- [3] 焦德茂, 匡廷云, 李霞, 等. 转 PEPC 基因水稻具有初级 CO_2 浓缩机制的生理特点[J]. *中国科学(C 辑)*, 2003, 33(1): 33 - 39.
- [4] Ren C G, Li X, Liu X L, *et al.* Hydrogen peroxide regulated photosynthesis in C_4 -pepc transgenic rice[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 74: 218 - 229.
- [5] 魏晓东, 李霞, 郭士伟, 等. 氮素水平对转 C_4 光合基因水稻花期剑叶 PS II 荧光特性的影响[J]. *华北农学报*, 2013, 28(1): 193 - 200.
- [6] Li X, Wang C. Physiological and metabolic changes of transgenic rice plant with increased activity of phosphoenolpyruvate carboxylase during flowering stage[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35(5): 1503 - 1512.
- [7] Li B, Li G, Kronzucker H J, *et al.* Ammonium stress in Arabidopsis: signaling, genetic loci, and physiological targets[J]. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(2): 107 - 114.
- [8] Chen P, Li X, Huo K, *et al.* Promotion of photosynthesis in transgenic rice over-expressing of maize C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene by nitric oxide donors[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171(6): 458 - 466.
- [9] Li X, Cao K, Wang C, *et al.* Variation of photosynthetic tolerance of rice cultivars (*Oryza sativa* L.) to chilling temperature in the light[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9(9): 1325 - 1337.
- [10] Lilley R M, Walker D A. An improved spectrophotometric assay for ribulosebiphosphate carboxylase[J]. *Biochimica et Biophysica acta*, 1974, 358(1): 226 - 229.
- [11] Eckardt N A, Portis Jr A R. Heat denaturation profiles of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) and Rubisco activase and the inability of Rubisco activase to restore activity of heat-denatured rubisco[J]. *Plant Physiology*, 1997, 113(1): 243 - 248.
- [12] Hu Y, Schmidhalter U. Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2005, 168(4): 541 - 549.
- [13] Kraiser T, Gras D E, Gutiérrez A G, *et al.* A holistic view of nitrogen acquisition in plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(4): 1455 - 1466.
- [14] 季本华, 朱素琴, 焦德茂. 转玉米 C_4 光合酶基因水稻株系中的光合 C_4 微循环[J]. *作物学报*, 2004, 30(6): 536 - 543.
- [15] Jiao D M, Huang X, Li X, *et al.* Photosynthetic characteristics and tolerance to photo-oxidation of transgenic rice expressing C_4 photosynthesis enzymes[J]. *Photosynthesis Research*, 2002, 72(1): 85 - 93.
- [16] Parry M A J, Andralojc P J, Khan S, *et al.* Rubisco activity: effects of drought stress[J]. *Annals of Botany*, 2002, 89(7): 833 - 839.
- [17] Bethke P C, Libourel I G L, Jones R L. Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(3): 517 - 526.
- [18] Hu X, Neill S J, Tang Z, *et al.* Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots[J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(2): 663 - 670.
- [19] Martin A, Lee J, Kichey T, *et al.* Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(11): 3252 - 3274.
- [20] Obara M, Sato T, Sasaki S, *et al.* Identification and characterization of a QTL on chromosome 2 for cytosolic glutamine synthetase content and panicle number in rice[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 110(1): 1 - 11.
- [21] Tabuchi M, Abiko T, Yamaya T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(9): 2319 - 2327.
- [22] 李学勇, 钱前, 李家洋. 水稻分蘖的分子机理研究[J]. *中国科学院院刊*, 2003, 18(4): 274 - 276.
- [23] Mcallister C H, Beatty P H, Good A G. Engineering nitrogen use efficient crop plants: the current status[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2012, 10(9): 1011 - 1025.
- [24] 王鹏程, 杜艳艳, 宋纯鹏. 植物细胞一氧化氮信号转导研究进展[J]. *植物学报*, 2009, 44(5): 517 - 525.
- [25] Garcia-Mata C, Gay R, Sokolovski S, *et al.* Nitric oxide regulates K^+ and Cl^- channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(19): 11116 - 11121.
- [26] Bouguyon E, Gojon A, Nacry P. Nitrate sensing and signaling in plants[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2012, 23(6): 648 - 654.
- [27] Ho C H, Lin S H, Hu H C, *et al.* CHL1 functions as a nitrate sensor in plants[J]. *Cell*, 2009, 138(6): 1184 - 1194.
- [28] Parker J L, Newstead S. Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1. 1[J]. *Nature*, 2014, 507(7490): 68 - 72.
- [29] Sun J, Bankston J R, Payandeh J, *et al.* Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1. 1[J]. *Nature*, 2014, 507(7490): 73 - 77.
- [30] Krouk G, Crawford N M, Coruzzi G M, *et al.* Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13(3): 266 - 273.
- [31] Remans T, Nacry P, Pervent M, *et al.* The Arabidopsis NRT1. 1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(50): 19206 - 19211.