

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.00285

干旱胁迫下 PEPC 过表达增强水稻的耐强光能力

丁在松 周宝元 孙雪芳 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: 以过表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)的水稻为材料, 研究了不同程度干旱胁迫下开花期剑叶光合作用的光响应过程、叶绿素荧光参数、色素含量和活性氧代谢。结果表明, 在干旱特别是重度干旱胁迫下, 野生型水稻在强光下净光合速率迅速下降, 而转 *Zmppc* 基因水稻没有明显的下降现象; 而且表示光化学活性的叶绿素荧光参数 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 和 q_p 下降程度低, 说明 PEPC 增强了干旱胁迫下水稻抵御强光胁迫的能力。这可能是因为干旱胁迫下转 *Zmppc* 基因水稻玉米黄质含量高, 光系统对过剩光能的耗散能力强, 能够保护光系统免受过剩光能的伤害, 从而减小 O_2^- 产生速率; 同时干旱胁迫下转 PEPC 基因水稻抗氧化酶 SOD、POD 和 CAT 活性高, 能有效清除活性氧, 减轻膜质过氧化。

关键词: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; 干旱; 光抑制; 叶绿素荧光参数; 活性氧代谢

High Light Tolerance is Enhanced by Overexpressed PEPC in Rice under Drought Stress

DING Zai-Song, ZHOU Bao-Yuan, SUN Xue-Fang, 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: Overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) gene in transgenic rice to improve photosynthesis and stress resistance have brought extensive interest in the world. Our previous report proved that the overexpressed PEPC alleviate drought stress inhibition on photosynthesis. In the present research, photosynthetic light curve, chlorophyll *a* fluorescence parameters, pigment content and reactive oxygen metabolism were studied under drought stress at flowering stage in two lines of PEPC transgenic rice plants. The results showed that under drought especially severe drought stress, net photosynthetic rate decreased dramatically under high photosynthetic active radiation (PAR) in wild type untransformed rice, while maintained unchanged in PEPC transgenic lines under high PAR even more than $1\ 200\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; and the photochemistry activities (F_v/F_m , Φ_{PSII} , and q_p) decreased less under drought stress in both the PEPC transgenic lines. These indicated PEPC enhanced the photoinhibition tolerance of rice under drought stress. The higher zeaxanthin content under drought stress made the PEPC transgenic rice leaves disperse more light energy as heat, thus decreased the O_2^- producing rate in PSII. At the same time, the SOD, POD, and CAT activities were higher in PEPC transgenic rice plants under drought stress. These enzymes could effectively diminished the reactive oxygen species and reduced the membrane lipid peroxidation.

Keywords: PEPC transgenic rice; Drought; Photoinhibition; Chlorophyll fluorescence parameter; Reactive oxygen metabolism

干旱胁迫直接影响作物的光合能力导致作物减产。干旱胁迫引起气孔关闭, 光合作用过程中相关酶活性降低、叶绿体的类囊体膨胀、基质片层排列紊乱、细胞的超显微结构明显变化^[1-2]等。气孔关闭影响 CO_2 的固定还原和光合同化能力, 引起碳同化速率降低, 造成光合机构吸收的光能过剩, 产生光

抑制甚至光破坏^[3-4], 最终导致光合速率下降。同时, 干旱胁迫影响膜系统和抗氧化系统^[5-6], 造成质膜透性增加, 根系物质合成受阻, 生长停滞。然而, 光合机构对水分亏缺具有一定的耐受性, 通过增加光呼吸和热耗散等多种途径耗散过剩的激发能, 以有效地缓解光合作用的光抑制所产生的不良影响, 从而

本研究由国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2009CB118605)和国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAD16B14)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: dingzs@caas.net.cn, Tel: 010-82108594

Received(收稿日期): 2011-04-12; Accepted(接受日期): 2011-09-29; Published online(网络出版日期): 2011-12-01.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20111201.0920.001.html>

形成多种光保护机制^[7-9]。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)不仅仅参与植物的光合碳固定以及三羧酸循环的碳回补功能^[10],大量研究还发现,各种生物逆境和非生物逆境下,PEPC的活性增强,这可能来源于基因转录水平增加,蛋白合成增加或仅仅是来源于蛋白磷酸化水平的增加^[11]。例如,NaCl、LiCl和干旱胁迫提高小麦根中PEPC的转录和酶活性^[12];在拟南芥中,4个不同的*Atppc*基因对盐和干旱胁迫的响应不一,其中*Atppc1*和*Atppc3*在盐胁迫下转录上调,对于干旱胁迫没有响应,细菌型的PEPC*Atppc4*对两种胁迫都表现出转录水平增加,而管家型的PEPC*Atppc2*的转录对两种胁迫都没有反应^[13-14]。过表达PEPC的玉米^[15]、拟南芥^[16]、水稻^[17-19]也表现出抗旱、抗盐或耐光抑制能力增强。我们通过对大量转*Zmppc*株系的研究证明转*Zmppc*水稻抗旱性提高,干旱条件下转基因水稻具有明显的光合优势,PEPC减轻了干旱对光合的抑制作用^[20-22]。然而,PEPC调控水稻的抗旱性和光合作用的机制还不清楚。

本试验以转PEPC基因水稻为材料,研究不同程度干旱胁迫下光合作用的光响应过程、叶绿素荧光特征及抗氧化代谢特点,探索PEPC是否减轻干旱对水稻的光抑制作用,并对其生理机制进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选用转基因受体亲本中花8号(CK)及2个转玉米*Zmppc*基因水稻株系(ZM07和ZM24,在表型上没有显著的差异)。

1.2 材料种植与水分控制

试验在中国农业科学院作物科学研究所网室进行,于2009年5月下旬育苗,6月下旬插秧。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。7、8月份网室内晴天中午光照强度为1 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 左右。

采用负压式土壤湿度计测量土壤水分。处理前将土壤水势控制在0 kPa,于水稻五至六叶期断水处理,控制土壤水势在0、-20和-40 kPa三个水平,于水稻开花期取样,测定相关各指标。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 气体交换参数测定 采用LI-6400便携式光合仪测定开花期水稻剑叶的光强-光合速率响应曲线。测定的条件为大气CO₂浓度(360±5) μmol

mol^{-1} ,相对湿度(60±5)%,温度30℃,使用仪器自带的LED光源控制光强。

1.3.2 叶绿素荧光参数测定 参照Genty等^[23]的方法在网室用FMS-2叶绿素荧光仪(Hansatech公司,英国)活体测定剑叶的叶绿素荧光参数 F_0 、 F_m 、 F_s 、 F_m' 和 F_0' ,光化学光强度为800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。并计算光系统II的最大量子产额 $F_v/F_m=(F_m-F_0)/F_m$ 、实际量子产额 $\Phi_{PSII}=(F_m'-F_s)/F_m'$ 、光化学猝灭系数 $q_P=(F_m'-F_s)/(F_m'-F_0)$ 和非光化学荧光猝灭系数 $NPQ=(F_m-F_m')/F_m'$ 。

1.3.3 PEPC活性测定 参照我们曾报道的方法^[21],于晴天中午(12:00)取0.2 g开花期水稻的剑叶,用液氮研磨成粉末,进行酶液提取,反应体系含100 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)、5 mmol L⁻¹ MgCl₂、3 mmol L⁻¹ PEP、0.2 mmol L⁻¹ NADH、10 mmol L⁻¹ NaHCO₃、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的吸光值下降的速率。按Bradford方法^[24]测定蛋白质含量。

1.3.4 活性氧代谢指标的测定 于晴天中午取开花期水稻的剑叶1 g。按Giannopolitis和Ries^[25]的方法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性,以抑制NBT光化还原50%为1个酶活性单位;按Cakmak和Marschner^[26]的方法测定过氧化氢酶(CAT)活性,检测240 nm下OD值的变化;以单位可溶性蛋白含量计算酶活性,按Bradford的方法^[24]测定蛋白质含量。按林植芳等^[27]的方法测定丙二醛(MDA)含量;按王爱国和罗广华^[28]的方法测O₂⁻产生速率。

1.3.5 色素含量测定 参照赵世杰^[29]的方法测定并按照下列公式计算叶绿素的浓度,最终根据稀释倍数换算成单位鲜重的色素含量(Chl)。Chl = 6.63D₆₆₅+18.08 D₆₄₉。

参照Bilger等^[30]和张谦等^[31]的方法,测定玉米黄质的相对含量。取水稻剑叶至液氮中储存,然后在暗处取出叶片迅速剪碎,用80%的丙酮制成匀浆,于200×g下离心5 min,最后以80%的丙酮作参比,测定上清液在505 nm和652 nm处(叶绿素的吸收峰)的光吸收。用叶绿素为参照来比较玉米黄素含量(以A₅₀₅/A₆₅₂表示)的变化。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫下水稻PEPC活性增加

转*Zmppc*基因水稻株系ZM07和ZM24开花期剑叶的PEPC活性分别为对照(CK)的10倍和27倍,随着干旱胁迫程度的增加,PEPC活性逐渐增加(图1)。在中度干旱胁迫下,CK的PEPC活性增加16.3%,

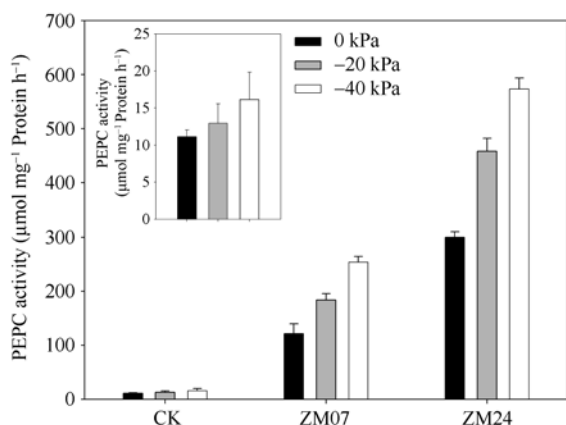


图1 干旱胁迫下水稻开花期剑叶的PEPC活性

Fig. 1 PEPC activities of rice flag leaves under drought stress CK: 受体中花8号; ZM07、ZM24: 不同的转PEPC基因水稻株系; 内嵌的小图是CK在不同水分胁迫下的PEPC活性。数据为5次重复的平均值±标准误, 余图同。

CK: untransformed rice plants ZH8; zm: different PEPC transgenic rice plants. The embedded small graph is the PEPC activities of CK under different soil water potential. The column and bars show the average and standard error of five replicates. The same are given in the followed Figs.

但差异未达到显著水平; 重度干旱胁迫下(-40 kPa), CK的PEPC活性增加45.0%, 与正常条件下的PEPC活性差异达到显著水平($P<0.05$)。2个转基因水稻株系PEPC活性增加更多, 中度胁迫下均超过50% (ZM07 51.3%, ZM24 52.8%), 重度胁迫下均增加约1倍(ZM07 108.8%, ZM24 91.3%)。可见干旱胁迫不仅诱导水稻内源PEPC活性的增加, 也诱导外源导入的玉米PEPC活性的增加, 而且外源PEPC活性增加的比例更高。

2.2 开花期不同水分处理下光合速率对光强的响应

正常水分条件下转Zmppc基因水稻与对照开花期的光合速率在各光强下差异均不明显(图2-A)。中度和重度干旱胁迫下, 转基因株系和对照净光合速率的光响应特征呈现明显的差异(图2-B, C)。在中度干旱胁迫、 $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光强下, 对照的光合速率开始显著低于转基因株系($P<0.05$), 而且随着光强的增加, 差异更加明显; 在重度干旱胁迫下, 光强超过 $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 就开始出现显著差异($P<0.05$)。并且在高光强下(中度和重度干旱胁迫下分别为 $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ 和 $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 净光合速率开始下降, 表现出明显的强光对光合的抑制作用; 而2个转Zmppc基因水稻株系在强光下没有出现很明显的净光合速率下降。可见在干旱条件下, 水稻的光合作用受到了抑制(光抑制), 但转玉米Zmppc

基因水稻株系仍维持较高的光合能力, 表现出较强的耐光抑制能力。

2.3 开花期不同水分处理下叶绿素荧光特征

叶绿素荧光参数可以反映光系统对吸收光能的利用过程, 是研究光抑制的良好指标。随着土壤水势降低, 水稻剑叶的光系统II (PSII)原初光化学效率(F_v/F_m)、PSII实际光量子效率(Φ_{PSII})和光化学猝灭系数(q_p)均逐渐下降(图3-A~C)。在正常水分条件下, 转基因水稻与对照的这3个参数均没有明显的差异, 但是随着干旱胁迫程度增加, 对照降低的速度更快, 在重度干旱胁迫下, CK、ZM07和ZM24的 F_v/F_m 分别下降10.1%、6.8%和5.5%, Φ_{PSII} 分别下降39.2%、21.6%和18.6%, q_p 分别下降25.6%、10.0%和14.0%。说明转Zmppc基因水稻在干旱胁迫下光系统反应中心的开放程度高, 可以维持更高的光化学活性, 其PSII受到的光抑制程度较低, 特别是重度干旱胁迫下, 转基因水稻的 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 和 q_p 与对照的差异均达到极显著水平($P<0.01$)。非光化学猝灭(NPQ)反映PSII的热耗散能力。随着土壤水势降低, 水稻剑叶的NPQ逐渐增加(图3-D), 转PEPC基因水稻增加速度更快。在正常的灌水条件下, 转PEPC基因水稻和对照并没有显著差异; 而在重度干旱胁迫条件下(-40 kPa), 2个转Zmppc基因水稻株系NPQ分别比对照高20%和22%, 差异达到极显著水平($P<0.01$)。说明转Zmppc水稻将过剩光能以热的形式耗散出去的能力更强, 可以减轻过剩光能对光系统的伤害, 从而减小对PSII光抑制。

2.4 开花期不同水分处理下叶绿素和玉米黄质含量变化

随着土壤水势降低, 水稻剑叶的叶绿素含量均逐渐下降(图4-A)。在正常水分条件下, 转基因水稻与对照的叶绿素含量没有明显的差异; 在干旱胁迫下, 对照的叶绿素含量显著降低, 而2个转基因水稻株系的叶绿素略有降低。与之相反, 随着土壤水势降低, 水稻剑叶的玉米黄质相对含量均逐渐升高(图4-B), 而且干旱胁迫下转基因株系的含量明显高于对照($P<0.05$)。说明转Zmppc基因水稻在干旱胁迫下具有较强的光保护功能。

2.5 开花期不同水分处理下活性氧产生速率

随着土壤水势降低, 水稻剑叶的活性氧产生速率逐渐升高(图5)。在正常水分条件下, 转基因水稻与对照的 O_2^- 产生速率没有明显的差异; 在干旱胁迫下, 对照叶绿素的 O_2^- 产生速率快速增加, 远大于2个转基因水稻株系(中度干旱, $P<0.05$; 重度干旱, $P<0.01$)。

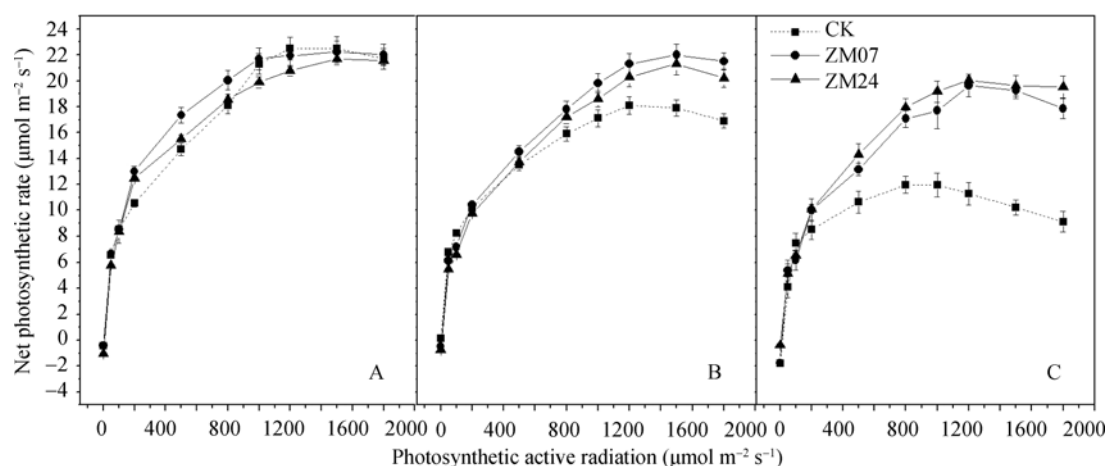


图 2 开花期水稻在不同程度干旱胁迫下的光强-光合响应曲线

Fig. 2 Photosynthesis-light curve of rice flag leaves at flowering stage under different drought stresses

A: 土壤水势为 0 kPa; B: 土壤水势为 -20 kPa; C: 土壤水势为 -40 kPa.

A: water potential is 0 kPa; B: water potential is -20 kPa; C: water potential is -40 kPa.

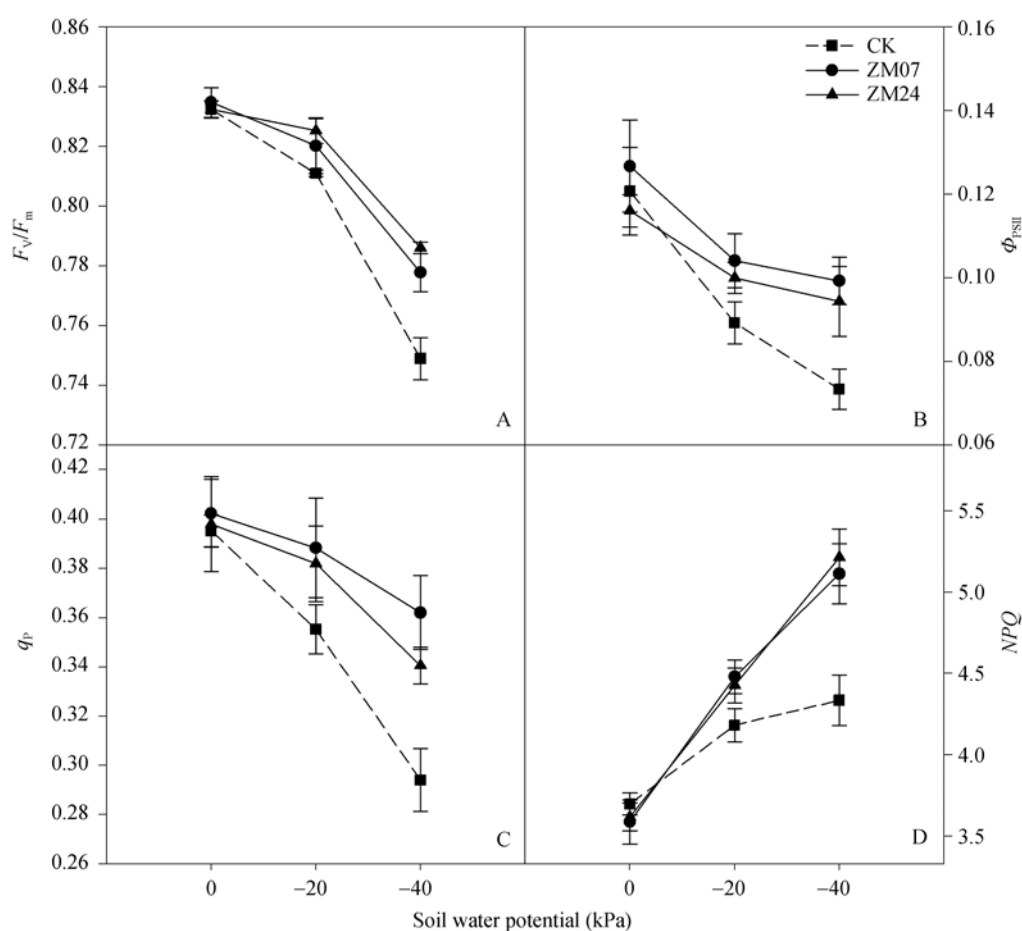


图 3 开花期水稻剑叶在不同程度干旱胁迫下的主要叶绿素荧光参数

Fig. 3 Chlorophyll fluorescence parameters of flag leaves at flowering stage of rice under different drought stresses

2.6 开花期不同水分处理下抗氧化酶活性

随着土壤水势降低, 水稻剑叶的抗氧化酶 SOD、POD 和 CAT 活性逐渐升高(图 6)。在正常水

分条件下, 转基因水稻与对照的 3 种抗氧化酶活性没有明显的差异; 在干旱胁迫下, 2 个转基因株系的抗氧化酶活性增加的速率明显高于对照。其中 SOD

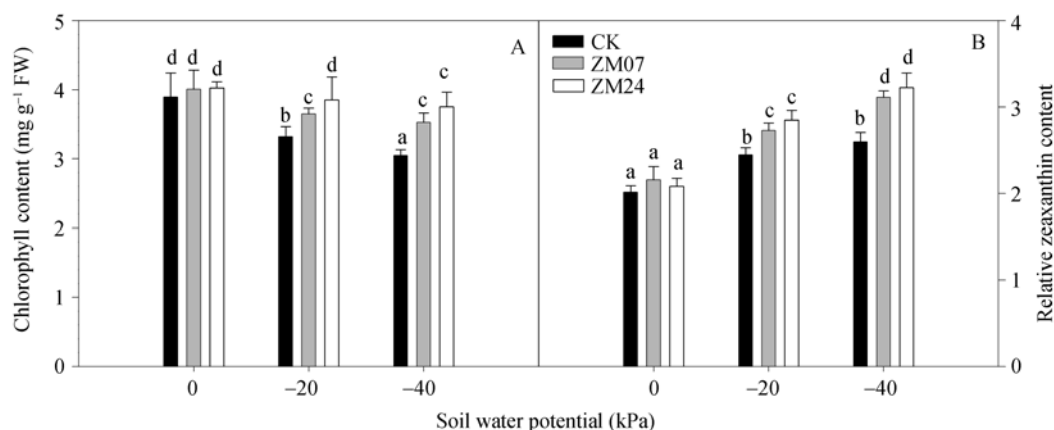


图 4 开花期水稻剑叶在不同程度干旱胁迫下的色素含量

Fig. 4 Chlorophyll (A) and relative zeaxanthin content (B) of rice flag leaves at flowering stage under different drought stresses
数据为 3 次重复的平均值与标准误, 不同的字母表示在 0.05 水平上差异显著。

Bars superscripted with different letters are significantly different at $P < 0.05$ as determined by LSD method. The columns and bars show the average and standard error of three replicates.

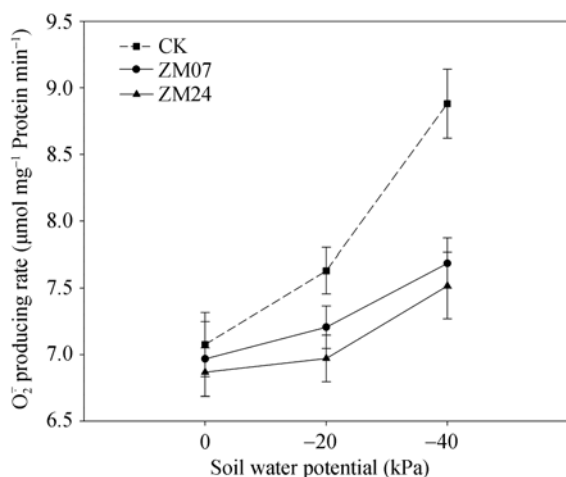


图 5 开花期水稻剑叶在不同程度干旱胁迫下的 O₂⁻ 产生速率

Fig. 5 Super oxygen radical producing rate of rice flag leaves at flowering stage under different drought stresses

和 POD 的活性在中度和重度干旱胁迫下, 转基因株系均明显高于对照 ($P < 0.05$)。

2.7 开花期不同水分处理下 MDA 含量

MDA 含量可以反映植物细胞膜脂质过氧化程度。随着土壤水势降低, 水稻剑叶的 MDA 含量迅速升高(图 7)。在正常水分条件下, 转基因水稻与对照的 MDA 含量没有明显的差异; 在干旱胁迫下, 对照的 MDA 迅速增加, 远大于 2 个转基因株系 ($P < 0.01$)。

3 讨论

干旱导致植物叶片气孔关闭, 叶肉中可利用 CO₂ 下降, 碳同化速率降低, 叶片吸收的光能过剩, 造成光合器官的光化学效率和光合速率降低, 即发生光抑制甚至光破坏^[4-5]。在本研究中, 干旱条件下,

转 *Zmppc* 基因水稻和对照都发生了不同程度的光抑制现象, 但是, PEPC 活性大幅度增加的转基因水稻光抑制程度较低。特别是在重度干旱胁迫下, 2 个转 *Zmppc* 基因水稻剑叶的光化学活性 (F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 和 q_P) 都极显著地高于对照。而且干旱胁迫下转基因水稻的净光合速率在强光下没有下降, 而对照在 800~1 000 μmol m⁻² s⁻¹ 净光合速率达到最大, 随着光强进一步增加, 净光合速率迅速下降。这些都表明 PEPC 过表达增加了干旱条件下耐光抑制能力。焦德茂等^[18-19]用人工光氧化剂甲基紫精(MV)涂抹连体叶片及低 CO₂ 和 O₂ 处理离体叶片的方法, 研究转 *Zmppc* 基因水稻对光抑制/光氧化逆境的响应时也发现, 在光抑制/光氧化条件下, 转 *Zmppc* 基因水稻 F_v/F_m 下降较少, 受光抑制较轻, 光能转化效率较高, 热耗散较高, 表现出较强的抵御强光胁迫的能力。

光抑制现象在 C₃ 植物中普遍存在^[32], 高光强下伴以其他逆境(低温、高温、干旱、盐、大气污染等)时光抑制加剧, 使叶绿素降解, 甚至破坏光系统结构^[33]。干旱胁迫下, 转 *Zmppc* 基因水稻的叶绿素降解较慢(图 4-A), 说明光系统受到的伤害程度较轻。植物抗光抑制的一条重要途径就是增加热耗散能力^[34], 我们和焦德茂等^[18-19]的试验都发现转 *Zmppc* 基因水稻 NPQ 显著高于未转基因的对照, 说明 PEPC 通过增加热耗散来减轻干旱条件下的光抑制。光系统的热耗散主要来自于叶黄素循环及其组分玉米黄质在防御光破坏中的重要作用^[35]。叶黄素循环组分由紫黄质(V), 环氧玉米黄质(A)和玉米黄质(Z) 构成。当光照强度超过作物光饱和点出现过剩光能时, V 便

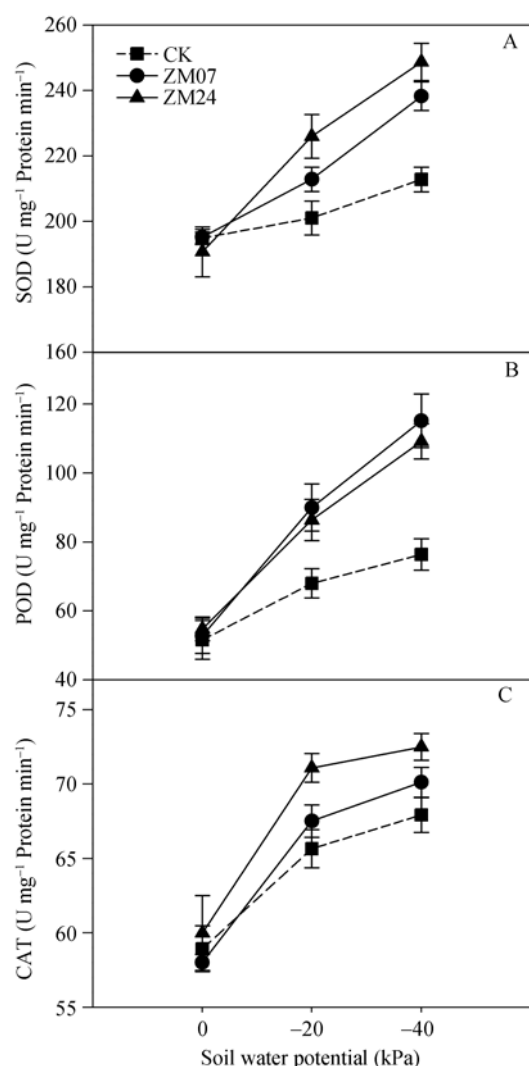


图6 开花期水稻剑叶在不同程度干旱胁迫下的抗氧化酶活性

Fig. 6 Antioxidant enzyme activities of rice flag leaves at flowering stage under different drought stresses

A: 超氧化物歧化酶(SOD)活性; B: 过氧化物酶(POD)活性; C: 过氧化氢酶(CAT)活性。

A: SOD activity, B: POD activity, C: CAT activity.

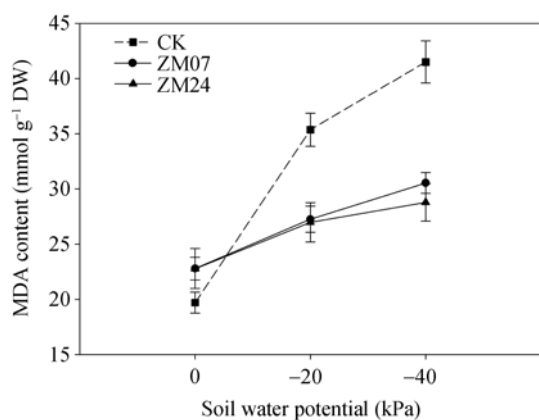


图7 开花期水稻剑叶在不同程度干旱胁迫下的MDA含量

Fig. 7 MDA content of rice flag leaves at flowering stage under different drought stresses

在紫黄质脱环氧化酶(VDE)催化下,经中间体A脱环氧化生成Z,Z随着过剩光能的增加而增加,并直接参与热耗散而将多余的激发能猝灭,起光保护作用^[36]。本研究中,在正常水分条件下,转基因株系与对照的相对玉米黄质含量无明显差异;但是在干旱胁迫下,2个转基因株系相对玉米黄质含量均明显高于对照(图4-B)。说明依赖于叶黄素循环的热耗散可能是转*Zmppc*基因水稻光合机构免遭强光破坏的一条重要途径。PEPC催化形成的草酰乙酸在植物细胞内迅速转化为苹果酸,苹果酸具有调节细胞内pH的作用^[37],可以缓解由于干旱胁迫造成的细胞碱化^[38-39]。而低pH值可以提高VDE的活性,启动紫黄质向玉米黄质的转化^[40]。

已有研究表明,光抑制的伤害多与活性氧的产生有关^[41]。过剩的光能可在PSI或PSII上将电子传给O₂使之成为O₂⁻。过多的活性氧导致膜脂过氧化,引起MDA的积累,破坏光合机构^[42-45]。干旱胁迫下,与对照相比转*Zmppc*基因水稻具有较高的光化学活性和较强的热耗散能力,这样过剩光能导致的O₂⁻产生速率较低(图5)。SOD等抗氧化酶能有效地清除活性氧,减小活性氧对细胞的伤害。转PEPC基因水稻在干旱胁迫下能够诱导更强的SOD、POD和CAT活性(图6)。活性氧产生少与清除能力强共同减轻转*Zmppc*基因水稻膜质的活性氧伤害,干旱胁迫下MDA的含量极显著低于对照(图7)。焦德茂等^[17-18]的研究也发现在光抑制/光氧化条件下,转*Zmppc*基因水稻株系的内源活性氧清除酶系SOD、POD的诱导活性高(图6),从而有效清除水稻叶片内的活性氧减少活性氧积累,降低膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量。然而,还需进一步研究以明确PEPC过表达对抗氧化酶活性在干旱胁迫下诱导活性高的调控机制。

本研究中,正常和不同程度的干旱胁迫下转*Zmppc*基因水稻株系ZM24开花期剑叶的PEPC活性都远大于ZM07;而在干旱胁迫下2个株系的光合气体交换参数、叶绿素荧光参数、抗氧化酶活性、MDA含量及O₂⁻产生速率却没有很大的差异。已有的研究表明,无论水稻的PEPC活性提高多少倍,其催化后形成的苹果酸只增加1.5~3.0倍^[46-47]。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^[32];且苹果酸对PEPC有反馈调节作用,苹果酸过多会抑制PEPC活

性^[30-36]。在我们前期的报道中^[22], ZM24 和 ZM07 的苹果酸含量差异也远小于其 PEPC 活性的差异, ZM24 的苹果酸积累量稍大于 ZM07。本研究中的光合、叶绿素荧光、抗氧化酶活性、MDA 含量及 O_2^- 产生速率等指标在干旱胁迫下, ZM24 也具有一定的优势。说明苹果酸的积累量对于干旱胁迫下转基因水稻的耐强光具有一定的作用, 然而苹果酸如何调节水稻抗强光胁迫的能力, 还需深入研究。

4 结论

PEPC 过量表达的水稻在干旱胁迫下光合作用受到的光抑制程度明显低于对照。这主要是因为 PEPC 活性增加后, 提高了玉米黄质含量, 增加了光系统的热耗散能力, 从而降低了过剩光能产生活性氧的速率, 减轻了强光对光系统的伤害; 同时 PEPC 活性增加还提高了抗氧化酶 SOD、POD 和 CAT 干旱诱导活性, 可以有效地清除活性氧, 保护膜系统免受伤害。

References

- [1] Barlow E W K. The Growth and Functioning of Leaves. London: Cambridge University Press, 1988. pp 314–345
- [2] 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
- [3] Massacci A, Nabiv S M, Pietrosanti L, Nematov S K, Chemikova T N, Thor K, Leipner J. Response of photosynthesis apparatus of cotton to the onset of drought stress under field conditions by gas exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiol Biochem*, 2008, 46: 189–195
- [4] Zhao L-Y(赵丽英), Deng X-P(邓西平), Shan L(山仑). Effects of osmotic stress on chlorophyll fluorescence parameters of wheat seedling. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 2005, 16(7): 1261–1264 (in Chinese with English abstract)
- [5] 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)
- [6] Dhindsa R S. Protein synthesis during rehydration of rapidly dried *Tortula ruralis*: evidence for oxidation injury. *Plant Physiol*, 1987, 85: 1094–1098
- [7] Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment *in vivo* photosynthesis. In: Schulze E D, Caldwell M M, eds. *Ecophysiology of Photosynthesis*. Berlin: Springer Verlag, 1994
- [8] Santos M G, Ribeiro R V, Machado E C, Pimentel C. Photosynthetic parameters and leaf water potential of five common bean genotypes under water deficit. *Biol Plant*, 2009, 53: 229–236
- [9] Schreiber U, Gademann R, Ralph P J, Larkum A W D. Assessment of photosynthetic performance of prochloron in *Lissoclinum patella* in hospite by chlorophyll fluorescence measurements. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38: 945–951
- [10] Latzko E, Kelly G J. The many-faced function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C_3 plants. *Physiol Veg*, 1983, 21: 805–815
- [11] Doubnerova V, Ryslava H. What can enzymes of C_4 photosynthesis do for C_3 plants under stress? *Plant Sci*, 2011, 180: 575–583
- [12] 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
- [13] Sanchez R, Cejudo F J. Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 2003, 132: 949–957
- [14] 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
- [15] Jeanneau M, Gerentes D, Foucillasse X, Zivy M, Vidal J, Toppan A, Perez P. Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the *Zm-Asr1* gene and increase of water use efficiency by over-expressing C_4 -PEPC. *Biochimie*, 2002, 84: 1127–1135
- [16] Leboutteiller B, Gousset A, Pierre J N, Bleton J, Tchaplal A, Maucourt M, Moing A, Rolin D, Vidal J. Physiological impacts of modulating phosphoenolpyruvate carboxylase levels in leaves and seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 2007, 172: 265–272
- [17] 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
- [18] 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 photooxidation of transgenic rice expressing C_4 photosynthesis enzymes. *Photosynth Res*, 2002, 72: 85–93
- [19] Jiao D M, Li X, Ji B H. Photoprotective effects of high level expression of C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice during photoinhibition. *Photosynthetica*, 2005, 43: 501–508
- [20] 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)
- [21] 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)
- [22] Zhou B-Y(周宝元), Ding Z-S(丁在松), Zhao M(赵明). Alleviation of drought stress inhibition on photosynthesis by over expression of *pepc* gene in rice. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2011, 37(1): 112–118 (in Chinese with English abstract)
- [23] Genty B, Briantais J M, Baker N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 990: 87–92
- [24] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254
- [25] Giannopolitis S, Ries S K. Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol*, 1977, 59: 309–314
- [26] Cakmak I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol*, 1992, 98: 1222–1227
- [27] Lin Z-F(林植芳), Li S-S(李双顺), Lin G-Z(林桂珠), Sun G-C(孙谷畴), Guo J-Y(郭俊彦). Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in relation to senescence of rice leaves. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1984, 26(6): 605–615 (in Chinese)
- [28] Wang A-G(王爱国), Luo G-H(罗广华). Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 1990, (6): 55–57 (in Chinese with English abstract)
- [29] Zhao S-J(赵世杰). Experimental Guide for Plant Physiology (植物生理学实验指导). Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 2000 (in Chinese)
- [30] Bilger W, Björkman O, Thayer S S. Light-induced spectral absorbance changes in relation to photosynthesis and the epoxidation state of xanthophyll cycle components in cotton leaves. *Plant Physiol*, 1989, 91: 542–551
- [31] Zhang Q(张谦), Jiao D-M(焦德茂), Zhang Y-H(张云华), Huang X-Q(黄雪清). Study of the protective effects in *PEPC* transgenic rice. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2004, 37(12): 1812–1818
- [32] Shen Y K. Some factors limiting photosynthesis in nature. In: Baltscheffsky M ed. Current Research in Photosynthesis. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1990, Vol. IV, 843–850
- [33] Sharkey T O, Loreto F, Vasey T L. Effects of stress on photosynthesis. In: Baltscheffsky M ed. Current Research in Photosynthesis. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1990, Vol. I. pp 549–556
- [34] Wang Q(王强), Wen X-G(温晓刚), Zhang Q-D(张其德). Progress in studies on photoinhibition. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2003, 20(5): 539–548 (in Chinese with English abstract)
- [35] Demmig B, Winter K, Czyger F. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. *Plant Physiol*, 1987, 84: 218–224
- [36] Muller P, Li X P, Niyogi K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol*, 2001, 125: 1558–1566
- [37] Matinoia E, Rentsch D. Malate compartmentation responses to a complex metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1994, 45: 447–467
- [38] Gollan T, Schurr U, Schulze E D. Stomatal responses to soil drying in relation to changes in xylem sap composition of *Helianthus annuus*: I. The concentration of cations, anions, amino acids in and pH of the xylem sap. *Plant Cell Environ*, 1992, 15: 551–560
- [39] Bacon M A, Wilkinson S, Davies W J. pH-regulated leaf cell expansion in drought plants is abscisic acid dependent. *Plant Physiol*, 1998, 118: 1507–1515
- [40] Hager A, Holocher K. Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light dependent) pH decrease. *Planta*, 1994, 192: 581–589
- [41] Salin M L. Toxin oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol Plant*, 1988, 72: 68–689
- [42] Foyes C H, Lefandais M, Kunert K J. Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant*, 1994, 92: 696–717
- [43] Niyogi K K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 1999, 50: 333–359
- [44] Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*, 1989, 58: 79–110
- [45] Cleland R F, Gracsec S C. Voltammetric detection of superoxide production by photosystem. *FEB Lett*, 1999, 457: 348–352
- [46] Fukayama H, Hatch M D, Tamai T, Tsuchida H, Sudoh S, Furukawa R T, Miyao M. Activity regulation and physiological impacts of maize C₄-specific phosphoenolpyruvate carboxylase overproduced in transgenic rice plants. *Photosynth Res*, 2003, 77: 227–239
- [47] Agarie S, Miura A, Sumikura R, Tsukamoto S, Nose A, Arima S, Matsuoka M, Miyao-Tokutomi M. Overexpression of C₄ PEPC caused O₂-insensitive photosynthesis in transgenic rice plant. *Plant Sci*, 2002, 162: 257–265