

王 净,周兴雅,张金飞,等. 高代转玉米 C_4 -*pepc* 基因水稻株系形态和产量特性及其聚类分析[J]. 江苏农业科学,2021,49(17):91-95,106.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.17.015

高代转玉米 C_4 -*pepc* 基因水稻株系 形态和产量特性及其聚类分析

王 净^{1,2}, 周兴雅², 张金飞², 曹 悦^{2,4}, 吴博晗^{2,5}, 李 霞^{1,2,3,4,5}

(1. 南京林业大学生物与环境学院, 江苏南京 210037; 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; 3. 江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心, 江苏扬州 225009; 4. 南京农业大学生命科学学院, 江苏南京 210095; 5. 江苏大学环境与安全工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要:为获得高光效的转 C_4 型 PEPC(磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 *phosphoenolpyruvate carboxylase*, PEPC, EC. 1.1.31) 基因水稻(简称 PC)高代的稳定株系,选取 2019—2020 年种植的同一株系的 PC 材料,分析 PC 材料的形态、光合参数、酶活性以及产量构成因子等的变化特点,并将各参数进行聚类分析。结果表明,PC 高代材料的 PEPC 酶活性、净光合速率以及产量构成因子等指标的确存在年度间和株系间的变化,其中变异系数表现为产量构成因子 < 净光合速率 < PEPC 酶活性。聚类分析结果表明,指标间存在基本一致的关系,并可分为 3 类,即 I 类型:高 PEPC 酶活性,高光合参数和中等产量水平类型; II 类型:低 PEPC 酶活性,低光合参数和高产类型; III 类型:中等 PEPC 酶活性,中等光合和低产量类型。其中 PEPC 酶活性和净光合速率存在极显著相关关系($P < 0.01$)。可见,经过形态、高光效特性和产量构成因子等的同步筛选,可在 PC 中筛选出高 PEPC 酶活性、高净光合速率且具有较高单株产量的稳定株系。

关键词:水稻;PEPC 酶;净光合速率;产量因子;聚类分析

中图分类号: S511.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)17-0091-05

水稻(*Oryza sativa* L.)是全球一半以上人口的主食,其超高产量品种和栽培技术的发展都建立在株型改良的基础上^[1]。利用数量性状(quantitative trait locus, QTL)分析发现,株高主要受顶部 1 节间和顶部 4 节间长度的影响^[2]。在保证抗倒性和保持收获指数不变的前提下,株高的增加可提高生物量和最终产量^[3]。水稻高光效机制是水稻超高产育种的重要理论基础,其中单个 C_4 型磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC, EC. 1.1.31)转基因水稻(简称 PC)具高光效特性,受到作物科学工作者的广泛关注^[4]。

高表达转 C_4 型 PEPC 水稻在高光强和高温条件下,外源导入的 C_4 -*pepc* 表达和 PEPC 酶活性均

显著增加,而且功能叶片的光合效率也显著提高^[5],单株产量比未转基因的野生型原种 Kitaake(简称 WT)也显著提高^[6],并将水稻开花后 5~10 d 剑叶的 PEPC 酶活性作为水稻高光效育种筛选的可靠生理指标^[4]。分子机制研究发现,PEPC 酶活性增强和 C_4 -*pepc* 表达上调与 NO 和 Ca^{2+} 参与蛋白激酶和转录因子的介导密切相关^[7]。在干旱胁迫下,PC 水稻中 C_4 -*pepc* 的调节与其糖信号-蔗糖非发酵蛋白激酶(sucrose nonfermenting-1-related protein kinase, SnRKs)家族的调节有关,如亚家族 1-SnRK1 相关基因 *OsK1a*、*OsK24*、*OsK35* 的表达和 SnRK2 均高于 WT^[8]。而外源葡萄糖施入试验表明,SnRK3s 家族基因可与钙调 B 类磷酸酶(calcieneurin-B-like, CBL)作用诱导 NO 参与 PC 叶片气孔调节,从而有利于 PC 耐旱^[9]。因此,PC 作为水稻干旱耐性机制研究材料而被关注。但随着这 10 余年的研究以及多代繁殖,观察到高代转 C_4 -*pepc* 水稻株系的酶活性表达不稳定,且呈下降趋势,导致相应的转基因材料耐旱优势也受限。因此,如何使外源导入的有益基因在水稻内稳定表达,是有益基因能否为水稻育种工作者利用的前

收稿日期:2020-12-17

基金项目:国家自然科学基金(编号:31571585);江苏省重点研发计划(编号:BE2019377);国家重点研发计划(编号:2016YFD0300501-03)。

作者简介:王 净(1994—),女,河南周口人,硕士研究生,主要从事水稻作物生理研究。E-mail:1790438668@qq.com。

通信作者:李 霞,博士,研究员,主要从事水稻逆境生理研究。E-mail:jsplpx@jaas.ac.cn。

提。前期的研究已观察到不同的测定条件和不同的生育期是影响高代转 $C_4 - pepc$ 水稻株系酶活性发挥的重要因子^[4-5],但是高代 PC 株系在相同条件下仍然存在酶活性的差异,这在一定程度上影响了该材料耐性生理机制的深入研究和材料在育种中的应用。因此,本研究选取不同年份同一株系的高代 PC 材料,研究年度间高代 PC 材料形态、光合参数、酶活性以及产量构成因子的变化特点,并将各参数进行聚类分析,以确定稳定的筛选指标,用于高代高光效水稻材料的利用。期望该研究可为筛选高效稳定的高光效水稻材料提供参考,也可为今后解析其高光效差异的内在机制提供新视角。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究选取的 PC 高代材料最初由美国华盛顿州立大学古森本教授赠送,该材料是通过农杆菌介导获得高表达转玉米 $C_4 - pepc$ 全基因的第 3 代水稻株系,获得的水稻种子每年都在江苏省农业科学院转基因作物基地种植。在本研究中,选取 2018—2019 年种植的高代材料 31 个株系,每个株系都是上一年收集的单穗种子于次年种植获得的植株。水稻种子分别于 2019 年、2020 年的 5 月 1 日播种,在水泥池种植,每穴播 1 苗,每个单穗种植的材料作为 1 个株系,并编号、挂牌,常规水肥和病虫害管理,于 7 月底在植株开花后 7~14 d,测定剑叶的光合参数,同步取样,液氮保存,用于测定叶片的酶活性,成熟后单株收获。

1.2 光合参数测定

参照王超等的方法^[5],使用美国 LI-COR 公司生产的 LI-6400 便携式光合测定仪,开放式系统红蓝光源测定。晴天的 08:30—11:30,室外温度 25~30 ℃,相对湿度 70%~80%,测定水稻株系剑叶的净光合速率(net photosynthetic rate, P_n),室外进行,每个处理 5~6 次重复。

1.3 形态指标的测定

在开花后 50 d 收获植株,每个株系在收获时选取 5 株测定其形态指标,包括株高、有效分蘖数和穗长等。

1.4 叶片磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)活性的测定

参照 Giglioli 等的方法^[10]测定 PEPC 的活性。简单来说将 0.1 g 水稻剑叶置于提前冷冻的研钵中

研磨,加入 1 mL 粗酶提取缓冲液,在 4 ℃ 下 13 000 g 离心 10 min,收集上清液(即粗酶液)。在酶活性测定的反应体系(1 mL)中依次加入 725 μ L 混合液,25 μ L 5 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruate, PEP),150 μ L 粗酶液摇匀后,用紫外分光光度计(UV-1200 型,上海美谱达仪器有限公司),记录 340 nm 处吸光度的变化,计算酶活性。

1.5 产量构成因子测定

在开花后 40 d,每个株系选 3 株长势一致的供试材料单株收获,自然晾晒至籽粒含水量小于 14% 时,在室内进行考种,并测定其产量构成因子。

1.6 数据处理

使用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计以及聚类分析,采用 Microsoft excel 2016 软件对数据进行描述和作图。

2 结果与分析

2.1 高代 PC 株系剑叶 PEPC 酶活性的变化及其聚类分析

水稻生育后期剑叶的 PEPC 酶活性为水稻高光效特性的重要筛选指标^[4]。因此,本研究选取了高代 PC 株系共 31 株,连续 2 年选取水稻株系的剑叶测定其 PEPC 酶活性,所有株系 PEPC 酶活性为 $(1\,723.72 \pm 1\,139.14)$ nmol/(min · g),变异系数为 0.66。并使用 WARD 法对 PEPC 酶活性数据进行聚类分析(度量标准为 Euclidean 距离),以阈值 20 作为聚类标准,可将供试材料的类型量化细分为 3 类(表 1)。其中类型 I 为高 PEPC 酶活性类型,PEPC 酶活性为 4 982.70 nmol/(min · g),包括第 2、22 株系,占供试材料的 6.45%;类型 II 为低 PEPC 酶活性类型,PEPC 酶活性为 841.98 nmol/(min · g),包括第 13、14、16、17、19、20、24、26、27、28、31 株系,占供试材料的 35.48%;类型 III 为 PEPC 酶活性位于中间的材料类型,PEPC 酶活性为 1 900.44 nmol/(min · g),包括第 1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、18、21、23、25、29、30 株系,占供试材料的 58.06%。可见,高代 PC 的 PEPC 酶活性的确存在一定的变异。

2.2 高代 PC 株系剑叶净光合速率的变化及其聚类分析

连续 2 年同步测定对应株系抽穗期,开花后 14 d 剑叶的净光合速率(photosynthetic rate, P_n),2 年所有株系的平均值和标准差为 (17.11 ± 4.14) μ mol/(m² · s),变异系数为 0.24,将该参数经

表 1 不同株系间水稻 PEPC 酶活性的聚类分析

类型	数量 (个)	具体材料	百分比 (%)	类型	PEPC 活性 [nmol/(min · g)]
I	2	2,22	6.45	高 PEPC 酶活性	4 982.70
II	11	13、14、16、17、19、20、24、26、27、28、31	35.48	低 PEPC 酶活性	841.98
III	18	1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、18、21、23、25、29、30	58.06	中等 PEPC 酶活性	1 900.44

过 WARD 法聚类分析(度量标准为 Euclidean 距离),以阈值 8 作为聚类标准,也可将供试材料的类型量化细分为 3 类。其中类型 I 为高净光合速率类型,包括第 1、2、3、7、22、23 株系,占供试材料的 19.35%,净光合速率平均值为 $21.53 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$;类型 II 为低净光合速率类型,包括第 15、20、21、29、30 株系,占供试材料的

16.13%,净光合速率的平均值为 $14.65 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$;类型 III 为净光合速率位于中间的材料类型,包括第 4、5、6、8、9、10、11、12、13、14、16、17、18、19、24、25、26、27、28、31 株系,占供试材料的 64.52%,净光合速率为 $16.40 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,和酶活性的表现一样也呈现正态分布(表 2)。

表 2 不同株系间水稻净光合速率的聚类分析

类型	数量 (个)	具体材料	百分比 (%)	类型	净光合速率 [$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]
I	6	1、2、3、7、22、23	19.35	高净光合速率	21.53
II	5	15、20、21、29、30	16.13	低净光合速率	14.65
III	20	4、5、6、8、9、10、11、12、13、14、16、17、18、19、24、25、26、27、28、31	64.52	中等净光合速率	16.40

2.3 高代 PC 株系产量构成因子的变化及其聚类分析

连续 2 年在同期同步记录了不同株系产量构成因子的变化,其中 2 年的平均值分别为株高为 $(75.38 \pm 3.64) \text{ cm}$,变异系数为 0.05;总分蘖数为 (9.85 ± 1.84) 个,变异系数为 0.19;有效分蘖数为 (7.64 ± 1.56) 个,变异系数为 0.20;千粒质量为 $(21.88 \pm 0.58) \text{ g}$,变异系数为 0.03;穗长为 $(10.49 \pm 0.65) \text{ cm}$,变异系数为 0.06;穗粒数为 (28.32 ± 4.05) 个,变异系数为 0.14;结实率为 $(72.21 \pm 6.85)\%$,变异系数为 0.09;单株产量为 $(3.56 \pm 1.19) \text{ g}$,变异系数为 0.33。可见,供试材料各形态

指标变异小于其单株产量,单株产量的变化主要与有效穗数和每穗粒数的变化密切相关。进一步将这些数据经过 WARD 法聚类分析(度量标准为 Euclidean 距离),以阈值 12 作为聚类标准,也可将供试材料的类型量化细分为 3 类。其中类型 I 为高产类型,包括第 4、5、7、13、16、17、21、22、30 株系,占供试材料的 29.03%;类型 II 为低产类型,包括第 2、6、12、20、23、25、26、27、28、31 株系,占供试材料的 32.26%;类型 III 为产量位于中间的材料类型,包括第 1、3、8、9、10、11、14、15、18、19、24、29 株系,占供试材料的 38.71%(表 3)。

表 3 不同株系间水稻产量构成因子的变化及其聚类分析

类型	数量 (个)	具体材料	百分比 (%)	类型	单株产量 (g)
I	9	4、5、7、13、16、17、21、22、30	29.03	高产	4.60
II	10	2、6、12、20、23、25、26、27、28、31	32.26	低产	2.52
III	12	1、3、8、9、10、11、14、15、18、19、24、29	38.71	中间产量	3.63

2.4 PEPC 酶活性、净光合速率和产量指标的聚类分析

进一步将本研究中 PC 高代材料测定的 3 类指标数据也经过 WARD 法聚类分析(度量标准为 Euclidean 距离),以阈值 15 作为聚类标准,可将供试材料的类型量化细分为 3 类(表 4)。其中类型 I

为高 PEPC 酶活性,高净光合速率和中产的材料类型,包括第 1、2、3、7、22、23 株系,占供试材料的 19.35%;类型 II 为低 PEPC 酶活性,低净光合速率和高产的材料类型,包括第 13、14、16、17、19、20、24、26、27、28、31 株系,占供试材料的 35.48%;类型 III 为中等光合能力的材料类型,包括第 4、5、6、8、9、

10、11、12、15、18、21、25、29、30 株系,占供试材料的 45.16%。从图 1 可以看出,类型 I 实际上还可以细分为 2 个小的亚型, I -1 包括 1、3、7、23 共 4 个株系,占供试材料的 12.90%,这类型的 PEPC 活性[平均值 2 747.19 nmol/(min·g)]和净光合速率[平均值为 21.49 μmol/(m²·s)]仍高于其他 2 个大类型(Ⅱ和Ⅲ),而且单株产量最高(平均值为 4.18 g/株);而 I -2,只包括 2 个株系(2 和 22),占

比 6.45%,这类型的 PEPC 酶活性最高[平均值 4 982.70 nmol/(min·g)],净光合速率与 I -2 的类似,也较高[平均值为 21.60 μmol/(m²·s)],但是产量则最低(平均值为 2.87 g/株)。进一步从各类参数的相关性分析可知,PC 株系的 P_n 与 PEPC 酶活性的相关系数为 0.808,呈极显著相关(P<0.01),PEPC 酶活性的发挥与光合能力密切相关,但是与单株产量相关性不显著。

表 4 不同株系间水稻 PEPC 酶活性、净光合速率和产量指标的聚类分析

类型	数量 (个)	具体材料	百分比 (%)	类型	PEPC 活性 [nmol/(min·g)]	净光合速率 [μmol/(m ² ·s)]	单株产量 (g)
I	6	1、2、3、7、22、23	19.35	高 PEPC 酶活性, 高光合和中产	3 492.36	21.53	3.74
Ⅱ	11	13、14、16、17、19、20、24、 26、27、28、31	35.48	低 PEPC 酶活性, 低光合和高产	841.98	15.00	3.82
Ⅲ	14	4、5、6、8、9、10、11、12、15、 18、21、25、29、30	45.16	中 PEPC 酶活性, 中等光合和低产	1 658.52	16.88	3.27

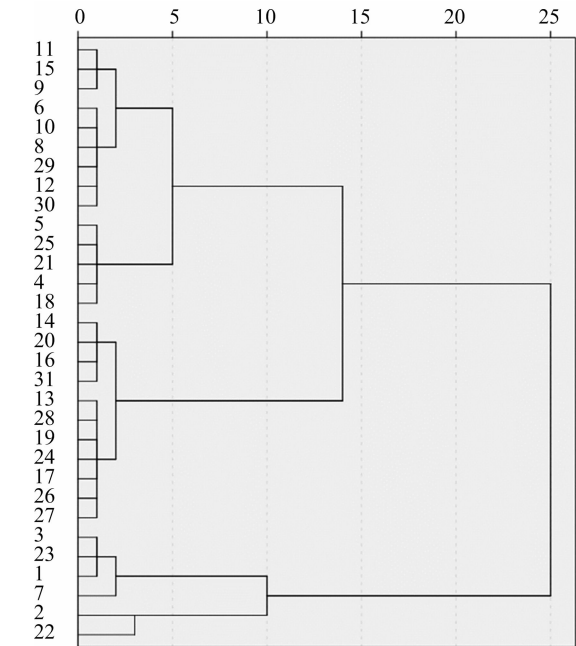


图1 PC 高代材料 3 类指标的聚类分析

3 讨论与结论

C₄ 植物与 C₃ 植物的一个重要区别是 C₄ 植物的 CO₂ 补偿点很低,所以 C₄ 植物在 CO₂ 含量低的情况下存活率更高,而且 C₄ 植物在高光强、高温和干旱等条件下,比 C₃ 植物具有较高的 CO₂ 固定效率、水分利用率和籽粒产量^[11],其中 C₄ 植物光合作用的关键酶 PEPC 起关键作用。科学家已经通过基

因工程,将该基因引入 C₃ 植物如水稻中,该基因不仅在水稻中获得高表达,而且表现高光效,并最终表现出籽粒产量提高^[12-13]。与原种 Kitaake 相比,高表达转玉米 *pepc* 基因水稻(PC)不仅表现出较强的光合能力和较高的籽粒产量,而且还在强光、高温、干旱和低氮下均具有较高的净光合速率和籽粒产量,并与高 PEPC 酶活性的诱导密切相关^[8,14-18],可以作为研究植物耐逆机制的有益资源。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶在 C₄ 植物中起浓缩 CO₂ 以提高光合效率的作用。王强等研究表明,两优培九超高产的重要原因,与其较高的光能和 CO₂ 利用效率、较强的抗光抑制能力以及较高的 C₄ 途径酶 PEPC 的表达水平相关^[19]。研究表明,PEPC 酶在不同生育期、不同部位以及不同光强条件下的表达特征曲线与光合速率具有密切关系,特别在产量形成的关键时期,外源 *PEPC* 基因高水平表达与净光合速率的高值出现期表现一致,而且相对稳定,此时测定的剑叶 PEPC 活性可作为水稻高光合速率的可靠分子育种指标,这为水稻高光效特性鉴定和筛选提供了依据,并能为作物高光效机制的研究提供有用的材料^[4]。本研究利用相关的筛选指标,检测了年度间高代的 31 株系 PC 水稻的高光效特性和产量表现。结果表明,PC 的高代材料在 PEPC 酶活性的发挥、净光合速率以及产量构成因子等指标上的确存在年度间和株系间的变化,其中

变异系数产量构成因子 < 净光合速率 < PEPC 酶活性, 聚类分析结果表明, 三者基本存在一致的关系, 该材料经过高光效特性的筛选, 还是可以在高代中选择出高 PEPC 酶活性、高净光合速率和较高单株产量的高代稳定株系。需要注意的是, 从本研究看, 转基因株系叶片的 PEPC 酶活性与其净光合速率仍然存在极显著相关关系 ($P < 0.01$), 但 PEPC 酶活性并不是越高越好。本研究发现 PEPC 酶活性和净光合速率最高的 2 个株系, 其单株产量最低, 提示 PEPC 酶活性的发挥是个耗能的过程, 具有较高 PEPC 酶活性的植株反而不利于其最终产量, 可能需要一个协调和平衡。

磷酸烯醇丙酮酸羧化酶包括植物型 PEPC (plant-type phosphoenolpyruvate carboxylase, PTPC) 和细菌型 PEPC (bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase, BTPC) 等多基因家族。BTPC 和 PTPC 相互作用, 形成 2 类异性寡聚多肽复合物^[20], 在蓖麻 (*Ricinus communis*) 种子发育中发挥重要作用。因此, 它的功能很多样, 而且 PEPC 酶和基因的调节也很复杂。前期研究表明, 与 WT 相比, PC 材料在高光强^[14]、高温^[15]、干旱^[7]以及低氮条件^[17]下均表现出较好的耐性, 而且这些优异的特性与 PEPC 酶活性的发挥以及 $C_4 - pepc$ 基因的调节密切相关。信号分子 H_2O_2 ^[6]、 NO ^[21]、 Ca^{2+} ^[7]、磷脂酸^[22]、ATP^[23]以及糖分子^[24-25]均参与其基因的表达。本研究还观察到 PC 水稻在响应干旱逆境时 $C_4 - pepc$ 有去甲基化现象发生, 有利于 $C_4 - pepc$ 的高表达, 也伴随着 PEPC 的磷酸化以及相关基因的表达, 显示了表观遗传机制可能也参与该材料干旱的响应机制^[8]。因此, 深入研究 PC 不同株系 PEPC 酶活性的调节机制, 是获得稳定高光效材料的重要理论基础, 将有助于揭示其基因表达差异的内在原因。

参考文献:

- [1] Tian Z X, Wang J W, Li J Y, et al. Designing future crops: challenges and strategies for sustainable agriculture[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2021, 105(5): 1165–1178.
- [2] 姜树坤, 黄成, 徐正进, 等. 粳稻株高 QTL 与赤霉素和油菜素内酯合成及信号转导基因相关分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(14): 2829–2838.
- [3] Zhu X G, Long S P, Ort D R. Improving photosynthetic efficiency for greater yield[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61(1): 235–261.
- [4] 李霞, 王超, 陈晏, 等. PEPC 酶活性作为水稻高光效育种筛选指标的研究[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(5): 559–564.
- [5] 王超, 李霞, 蔡庆生. 不同测定环境条件下转 *PEPC* 基因水稻及杂交后代光合特性的比较[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(3): 232–236.
- [6] 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.
- [7] Qian B Y, Li X, Liu X L, et al. Improved oxidative tolerance in suspension-cultured cells of $C_4 - pepc$ transgenic rice by H_2O_2 and Ca^{2+} under PEG-6000[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2015, 57(6): 534–549.
- [8] Liu X L, Li X, Zhang C, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase regulation in $C_4 - pepc$ expressing transgenic rice during early responses to drought stress[J]. Physiologia Plantarum, 2017, 159(2): 178–200.
- [9] 张金飞, 李霞, 何亚飞, 等. 外源葡萄糖增强高表达转玉米 C_4 型 *pepc* 水稻耐旱性的生理机制[J]. 作物学报, 2018, 44(1): 82–94.
- [10] Giglioli - Guivarch N, Pierre J N, Brown S, et al. The Light-Dependent transduction pathway controlling the regulatory phosphorylation of C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase in protoplasts from *Digitaria sanguinalis*[J]. The Plant Cell, 1996, 8(4): 573–586.
- [11] Zhu X G, Long S P, Ort D R. Improving photosynthetic efficiency for greater yield[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61(1): 235–261.
- [12] Ku M S, 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.
- [13] Taniguchi Y, Ohkawa H, Masumoto C, et al. Overproduction of C_4 photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C_4 -like photosynthetic pathway into rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(7): 1799–1809.
- [14] Jiao D M, Ji B H, Li X. Characteristics of chlorophyll fluorescence and membrane-lipid peroxidation during senescence of flag leaf in different cultivars of rice[J]. Photosynthetica, 2003, 41(1): 33–41.
- [15] 李霞, 焦德茂, 戴传超. 转 *PEPC* 基因水稻对光氧化逆境的响应[J]. 作物学报, 2005, 31(4): 408–413.
- [16] 唐玉婷, 李霞, 陆巍, 等. 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[J]. 华北农学报, 2015, 30(4): 95–100.
- [17] Tang Y T, Li X, Lu W, et al. Enhanced photorespiration in transgenic rice over-expressing maize C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene contributes to alleviating low Nitrogen stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 130: 577–588.
- [18] 严婷, 李佳馨, 李霞, 等. 转 C_4 型 *PEPC* 基因水稻非生物胁迫耐受性研究进展[J]. 淮阴工学院学报, 2019, 28(5): 62–68.
- [19] 王强, 卢从明, 张其德, 等. 超高产杂交稻两优培九的光合作用、光抑制和 C_4 途径酶特性[J]. 中国科学(C辑), 2002, 32(6): 481–487.

- 吸收、运转和子粒品质的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(3): 514–521.
- [8] 田 昌, 周 旋, 杨俊彦, 等. 化肥氮磷优化减施对水稻产量和田面水氮磷流失的影响[J]. 土壤, 2020, 52(2): 311–319.
- [9] Liu J, Ouyang X Q, Shen J L, et al. Nitrogen and phosphorus runoff losses were influenced by chemical fertilization but not by pesticide application in a double rice – cropping system in the subtropical hilly region of China[J]. The Science of the Total Environment, 2020, 715: 136852.
- [10] 朱利群, 王春杰, 杨曼君, 等. 施肥对长江中下游稻田温室气体排放的影响——基于 Meta 分析[J]. 资源科学, 2017, 39(1): 105–115.
- [11] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 农业出版社, 2000: 1–495.
- [12] Daniel T C, Sharpley A N, Lemunyon J L. Agricultural phosphorus and eutrophication: a symposium overview [J]. Journal of Environmental Quality, 1998, 27(2): 251–257.
- [13] 蒋伟勤, 马中涛, 胡 群, 等. 缓控释氮肥对水稻生长发育及氮素利用的影响[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(3): 777–784.
- [14] 黄元财, 王伯伦, 王 术, 等. 施氮量对水稻产量和品质的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(5): 688–692.
- [15] 郭鑫年, 孙 娇, 梁锦秀, 等. 施磷对宁夏引黄灌区水稻产量、氮磷吸收利用及氮素残留的影响[J]. 水土保持研究, 2019, 26(2): 49–54, 61.
- [16] 董作珍, 吴良欢, 柴 婕, 等. 不同氮磷钾处理对中亚优 1 号水稻产量、品质、养分吸收利用及经济效益的影响[J]. 中国水稻科学, 2015, 29(4): 399–407.
- [17] 杨 建, 樊慧梅, 刘笑笑, 等. 施氮对水稻产量氮素吸收及其品质的影响[J]. 农业与技术, 2015, 35(17): 16–19.
- [18] 杨苞梅, 林 电, 吴多能, 等. 海南省蕉园燥红土养分状况及其限制因子研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(10): 168–172.
- [19] 郭海瑞, 赵立纯, 窦超银. 稻田人工湿地氮磷去除机制及其研究进展[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(6): 23–26.
- [20] 陈梦楠, 高志强, 孙 敏, 等. 休闲期耕作配施磷肥对旱地小麦氮素吸收与转运的影响[J]. 麦类作物学报, 2015, 35(11): 1569–1575.
- [21] 唐海明, 肖小平, 李 超, 等. 长期施肥对双季稻区水稻植株养分积累与转运的影响[J]. 生态环境学报, 2018, 27(3): 469–477.
- [22] 江立庚, 甘秀芹, 韦善清, 等. 水稻物质生产与氮、磷、钾、硅素积累特点及其相互关系[J]. 应用生态学报, 2004, 15(2): 226–230.
- [23] 马 鹏, 张宇杰, 林 邯, 等. 油—稻轮作下前茬氮肥投入与稻季氮肥运筹对稻田土壤养分、碳库及作物产量的影响[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(4): 896–904.
- [24] 冯 涛, 杨京平, 施宏鑫, 等. 高肥力稻田不同施氮水平下的氮肥效应和几种氮肥利用率的研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2006, 32(1): 60–64.
- [25] 张洪程, 王秀芹, 戴其根, 等. 施氮量对杂交稻两优培九产量、品质及吸氮特性的影响[J]. 中国农业科学, 2003, 36(7): 800–806.
- [26] 王伟健, 鲁剑巍, 何予卿, 等. 氮、磷、钾肥对水稻产量、品质及养分吸收利用的影响[J]. 中国水稻科学, 2011, 25(6): 645–653.
- [27] 易 均, 谢桂先, 刘 强, 等. 磷肥减施对双季稻生长和产量及磷肥利用率的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2016, 42(2): 197–201.
- [28] Stitt M. Nitrate regulation of metabolism and growth[J]. Current Opinion in Plant Biology, 1999, 2(3): 178–186.
- [29] 樊剑波, 张亚丽, 王东升, 等. 水稻氮素高效吸收利用机理研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2008, 31(2): 129–134.
- [30] Zhang D, Wang H Y, Pan J T, et al. Nitrogen application rates need to be reduced for half of the rice paddy fields in China [J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2018, 265: 8–14.
- [31] 刘红江, 郑建初, 郭 智, 等. 太湖地区氮肥减量对水稻氮素吸收利用的影响[J]. 生态学杂志, 2016, 35(11): 2960–2965.
- [32] 康洪灿, 李国生, 钊兴宽, 等. 水稻化肥减量增效施用技术试验初探[J]. 中国稻米, 2017, 23(4): 176–179.

(上接第 95 页)

- [20] O'Leary B, Park J, Plaxton W C. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post – translational controls of non – photosynthetic PEPCs [J]. The Biochemical Journal, 2011, 436(1): 15–34.
- [21] Chen P B, Li X, Huo K, et al. Promotion of photosynthesis in transgenic rice over – expressing of maize C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase gene by nitric oxide donors [J]. Journal of Plant Physiology, 2014, 171(6): 458–466.
- [22] Li X, Wang C, Ren C G. Effects of butanol neomycin and Calcium on the photosynthetic characteristics of *pepc* transgenic rice [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 76(10): 17466–17476.
- [23] Huo K, Li X, He Y F, et al. Exogenous ATP enhance signal response of suspension cells of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) expressing maize C₄ – *pepc* encoded phosphoenolpyruvate carboxylase under PEG treatment [J]. Plant Growth Regulation, 2017, 82(1): 55–67.
- [24] Zhang C, Li X, He Y, et al. Physiological investigation of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase introduced rice line shows that sucrose metabolism is involved in the improved drought tolerance [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 115: 328–342.
- [25] He Y F, Xie Y F, Li X, et al. Drought tolerance of transgenic rice overexpressing maize C₄ – *pepc* gene related to increased anthocyanin synthesis regulated by sucrose and calcium [J]. Biologia Plantarum, 2020, 64: 136–149.