

专论与综述 Reviews

C₄ 光合关键酶基因转化 C₃ 植物

罗遵喜, 张树珍*, 杨本鹏

中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101

Transformation of Genes of C₄ Photosynthetic Key Enzyme into C₃ Plants

LUO Zun-Xi, ZHANG Shu-Zhen*, YANG Ben-Peng

Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

提要: 文章介绍 C₄ 光合关键酶和转运蛋白基因转化 C₃ 植物的研究进展。关键词: C₄ 光合关键酶; C₃ 植物; 转化

绿色植物光合作用是一切生物获得能量、食物以及氧气的根本途径。植物的光合作用分为光反应(light reaction)和暗反应(dark reaction)两个阶段, 光反应的实质是在光下产生同化力 ATP 和 NADPH 去推动暗反应的进行; 而暗反应的实质是用同化力将 CO₂ 转化成稳定的碳水化合物。根据 CO₂ 固定形式的不同, 绿色植物光合作用的暗反应可以分为 C₃、C₄ 和景天科植物代谢(crassulacean acid metabolism, CAM)等 3 种不同途径。C₃ 植物中固定 CO₂ 的酶为核酮糖-1, 5-二磷酸羧化/加氧酶(Rubisco), 初产物为 3-磷酸甘油酸(3-phosphoglycerate, 3-PGA); 而在 C₄ 植物中, 除 C₃ 光合途径外, 还有与高效光合密切相关的 C₄ 光合途径。C₄ 植物中固定 CO₂ 的酶为磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC), 它对底物 CO₂ 有较高的亲和力, 且不受 O₂ 的竞争抑制, 形成的初产物为草酰乙酸(oxaloacetic acid, OAA)。C₄ 植物具有浓缩 CO₂ 机制, 当其处在高温、高光照强度、低 CO₂ 浓度及干旱等条件下仍具有相对较高的光合效率以及水分和氮素利用效率。所以采用生物技术方法将 C₄ 光合关键酶基因导入 C₃ 植物(尤其是重要的农作物), 从而在 C₃ 植物中建立起 C₄ 循环, 提高 C₃ 植物的光合生产能力一直是人们关注的问题。

1 植物光合作用暗反应中的 C₃ 循环与 C₄ 循环

C₃ 植物的维管束鞘细胞较小, 几乎没有叶绿体, 无花环型(kranz type)结构, 位于维管束鞘周围的叶肉细胞排列松散。而 C₄ 植物叶中的维管束鞘细胞较大, 其中含有许多较大的叶绿体颗粒,

叶绿体没有基粒或基粒发育不良。在维管束鞘的外侧紧密包围着一层环状或近环状排列的叶肉细胞, 组成花环型结构, 这是典型 C₄ 植物的结构特征, 其叶肉细胞的叶绿体数目少, 个体小, 有基粒, 维管束鞘细胞与其临近的叶肉细胞之间有大量的胞间连丝相连(匡廷云等 2004)。与 C₃ 植物相比, C₄ 植物叶片在解剖结构上具有许多明显的特征, 这使得 C₄ 植物具有 CO₂ 浓缩机制。C₃ 植物的 C₃ 循环是在单细胞中完成的, 大气中的 CO₂ 直接通过 Rubisco 催化的羧化反应进入 Calvin 循环, 而 C₄ 循环是在叶肉细胞和维管束鞘细胞中协同完成(图 1)。首先, 在叶肉细胞中, CO₂ 以 HCO₃⁻ 的形式为 PEPC 催化固定, 形成 C₄ 二羧酸——草酰乙酸(OAA), OAA 再被还原为苹果酸(Mal), 然后通过胞间连丝转移到维管束鞘细胞中, 再迅速在脱羧酶的催化下重新释放 CO₂, 参与 Calvin 循环, 形成糖类; 其次, 在释放 CO₂ 的同时产生的丙酮酸(pyruvate, Pyr)又转移到叶肉细胞的叶绿体中, 在丙酮酸正磷酸二激酶(PPDK)的催化下生成无机碳的受体磷酸烯醇式丙酮酸(PEP), 使光合反应循环进行。由于 PEPC 对其底物 CO₂ 有较高的亲和力, 所以 C₄ 植物固定 CO₂ 的能力远大于 C₃ 植物(王忠等 2000)。根据植物所形成的 C₄ 二羧酸的种类以及脱羧反应参与的酶类, C₄ 植物分为 3 个亚型: 叶绿体 NADP-苹果酸酶(NADP-ME)催

收稿 2007-10-16 修定 2008-03-05

资助 国家自然科学基金(30560081)。

* 通讯作者(E-mail: zhangsz.2007@yahoo.com.cn; Tel: 0898-66892735)。

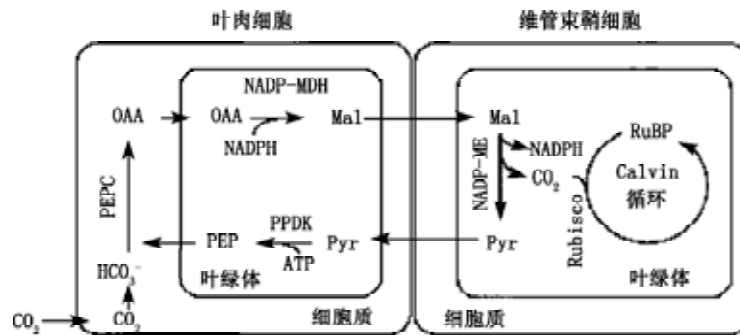


图1 C₄光合碳同化途径简图(Matsuoka 等 1998)

RuBP: 核酮糖-1,5-二磷酸(ribulose-1,5-bisphosphate); OAA: 草酰乙酸(oxaloacetate); Mal: 苹果酸(malate); Pyr: 丙酮酸(pyruvate); NADP-MDH: NADP-苹果酸脱氢酶(NADP-malate dehydrogenase); NADP-ME: NADP-苹果酸酶(NADP-malic enzyme); PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate); PEPC: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase); PPDK: 丙酮酸正磷酸二激酶(pyruvate orthophosphate dikinase)。

化脱羧反应的NADP-ME型,如玉米、甘蔗、高粱等;线粒体NAD-ME催化的NAD-ME型,如马齿苋;以及胞质磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase)催化的PCK型,如鼠尾草(Wyrich 等 1998)。

2 C₄光合关键酶和转运蛋白基因转化C₃植物及其产生的生理效应

随着C₃和C₄光合途径的深入研究和重组DNA技术的不断发展,人们试图通过转基因的方法来提高C₄光合作用酶在C₃植物中的活性,希望能在C₃植物中建立起一个类似于C₄循环的光合途径(图

2),并最终提高C₃植物的光合效率。迄今C₃植物叶中表达C₄循环酶基因的研究已取得一定的进展。

2.1 PEPC转化C₃植物 相对于C₃植物的Rubisco而言,C₄植物的PEPC对空气中的CO₂具有较高的亲和力,且不受O₂的竞争抑制。早期的C₃植物的遗传转化研究中,重点都集中在C₄光合关键酶PEPC上。C₄型PEPC基因(*Ppc*)最早是从玉米和黄花菊属植物 *Flaveria trinervia* 中克隆(Izui 等 1986; Poetsch 等 1991)。玉米C₄型PEPC的完整基因约为6.8 kb,由10个外显子和9个内含子组

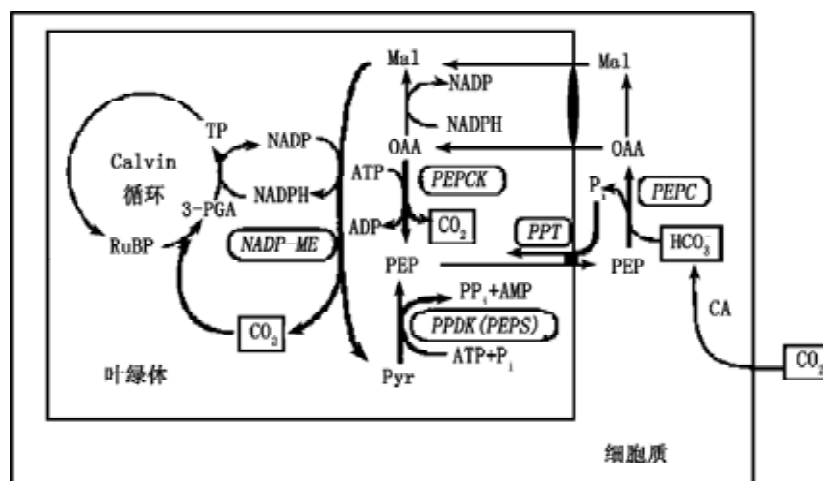


图2 在烟草中建立单细胞C₄光合途径简图(Hausler 等 2002)

RuBP: 核酮糖-1,5-二磷酸(ribulose-1,5-bisphosphate); OAA: 草酰乙酸(oxaloacetate); Mal: 苹果酸(malate); Pyr: 丙酮酸(pyruvate); NADP-MDH: NADP-苹果酸脱氢酶(NADP-malate dehydrogenase); NADP-ME: NADP-苹果酸酶(NADP-malic enzyme); PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate); PEPC: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase); CA: 碳酸酐酶(carbonic anhydrase); PPDK: 丙酮酸正磷酸二激酶(pyruvate orthophosphate dikinase); PEPS: 磷酸烯醇式丙酮酸合成酶(phosphoenolpyruvate synthetase)。

成, 其阅读框为 2 910 bp, 编码 970 个氨基酸残基, 蛋白质分子量为 109.4 kDa (Matsuoka 和 Minami 1989; Lepiniec 等 1993)。来自微生物资源的 PEPC 缺少植物酶的调控特征, 例如它不具备磷酸化作用的共价修饰, 因而其对 PEP 的亲合力提高, 对苹果酸抑制的敏感性降低。Gehlen 等(1996)将来源自大肠杆菌(*Escherichia coli*)和谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)的 *Ppc* 基因在 CaMV 35S 启动子控制下导入马铃薯后, 后一种菌的 PEPC 在马铃薯叶中的活性与非转基因植株相比增加 5 倍, 放在黑暗中诱导时, 其 CO₂ 释放量增加, 而在 *Ppc* 抑制表达的植物中则下降, 表明 PEPC 可影响 CO₂ 释放速率。Hausler 等(1999)将来源自棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) PEPC 的基因导入马铃薯, 获得的转基因植株其 CO₂ 补偿点降低, 呼吸和葡萄糖以及淀粉含量随之增加。Hausler 等(2001)进一步的研究表明, 在体外测定马铃薯转化植株的 PEPC 活性是非转基因植株的 20 倍, PEPC 的过量表达诱导胞质 NADP-ME 活性升高 4~6 倍, 因而促进 CO₂ 在叶绿体中从 PEP 羧化产物中释放出来。

Ku 等(1999)报道, 水稻中转入玉米的 C₄ 型 *Ppc* 基因(包括所有外显子、内含子及其自身的启动子和终止序列)后, *Ppc* 基因获得高水平表达, 体外测定表明其活性增加 110 倍, 植株中的 PEPC 蛋白含量占叶片中总可溶蛋白的 12%, 同时 CO₂ 同化过程中的 O₂ 受到抑制, 因而光呼吸也有一定程度的削弱, 但光合速率没有发生明显的变化。焦德茂等(2001)获得的转玉米 *Ppc* 基因水稻植株其 PEPC 活性比原种 'Kitaaki' 高 20 倍, CO₂ 补偿点降低 20%, 光饱和光合速率和羧化效率有提高, 气孔导度增加, 耐光抑制和光氧化能力增强。高光照强度下, 碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)活性增加 1.8 倍。处在高温高强光下的转 *Ppc* 基因水稻一般可增产 10%~30%。在此基础上, 他们又用 ¹⁴C 示踪技术测定的结果表明, 转基因水稻中的 ¹⁴C 较多的分配在 C₄ 光合原初产物天冬氨酸中, 因此他们认为转化植株中存在着一一定的 C₄ 光合代谢途径, 也即是说可以在 C₃ 植物叶内构建初级的 CO₂ 浓缩机制(焦德茂等 2003)。张方等(2003)将从高粱基因组中分离的 C₄ 型 *Ppc* 基因导入水稻后, 水稻植株中 *Ppc* 高水平

表达, CO₂ 补偿点和光呼吸速率下降, 光饱和光合速率和羧化效率提高, 这些都显示出了 C₄ 植物的光合特征。但凌丽俐等(2006)采用放射性碳同位素研究第 8 代转 *Ppc* 基因水稻的结果表明, 此种转基因水稻的种质仍为 C₃ 植物, 且稳定, 不过其 C₄ 光合产物增多, 一些 C₄ 光合特性如光能转换效率提高、耐光氧化能力增强。

Kogami 等(1994)报道, 在组成型表达启动子 CAMV 35S、叶肉细胞特异表达启动子 Cab 或玉米自身启动子的控制下将来源于玉米 C₄ 型 PEPC 的 cDNA 导入烟草后, 转基因烟草植株中 PEPC 活性增加近 2 倍, 苹果酸含量也有增加, 但对 CO₂ 的同化率并没有影响, 与野生型相比, 在温度提高的情况下, 同化 CO₂ 过程中的量子产量未受到影响, 且 CO₂ 补偿点也未发生变化。Matsuoka 等(2001)在 C₄ 型 PEPC 启动子的控制下将 PEPC 的全长 cDNA 导入烟草后, 转基因烟草叶中 PEPC 活性增加 2~5 倍, 苹果酸含量也相应增加, 但预期的光合 CO₂ 同化和 CO₂ 补偿点等重要的生理指标未发生变化。Hausler 等(2002)认为在温度增高时量子产量并不减少, 这可能揭示转基因植株中呼吸释放的 CO₂ 被 PEPC 固定所致。杨荣仲等(2004)将甘蔗 C₄ 型 *Ppc* 导入烟草所获得的转化植株其 PEPC 活性也仅是有较小程度的提高。

2.2 PEPCK 转化 C₃ 植物 在 C₃ 植物中表达 C₄ 型 PEPC 的酶基因只是在 C₃ 植物中建立细胞内 CO₂ 泵的第一步, 在 PEPC 的作用下形成的苹果酸或天冬氨酸经胞间连丝移动从叶肉细胞进入维管束鞘细胞的叶绿体中, 而叶绿体中 CO₂ 释放是取决于脱羧酶的类型, 或是由磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)催化或是由 NADP 苹果酸酶催化, 其中以 PEPCK 催化 OAA 脱羧为最简单的方式。由于 PEPCK 本身是胞质酶, 所以要使其能在叶绿体中表达, 还需要一段叶绿体转运肽的引导。Suzuki 等(2000)将来源于 C₄ 植物类黍尾稗草(*Urochloa panicoides*)的 PEPCK 基因与 *rbcS* 转录序列在玉米 PEPC 或 PPK 启动子的控制下导入水稻后, 转基因水稻叶片中的 PEPCK 活性达到尾稗草叶片的一半, 且植株叶绿素含量增加; 用碳同位素标记转基因水稻显示较高的 ¹⁴CO₂ 流进入 C₄ 复合物(苹果酸、草酰乙酸和天冬氨酸)中, 导致植株胞质 PEP 含量的增加, 因而更高的(PEP)流通过

PEPC, 因此认为存在着 PEP 流从转化水稻植株的叶绿体中运出; 随后饲喂 ^{14}C 标记的 OAA 的结果显示, 在 PEPC 脱羧作用下释放的 CO_2 也进入卡尔文循环, 且标记的 3-PGA 和蔗糖增加 3 倍, 但转基因水稻植株的光合指标如 CO_2 同化率和 CO_2 补偿点并未发生改变。这可能是由于导入的 PEPC 不能与水稻内源 PEPC 协同作用以形成有效的 C_4 循环所致。Hausler 等(2001)在马铃薯 Rubisco 小亚基(rbcS)转录序列控制下将来源于费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)的 PEPC 基因导入烟草叶绿体后, 在转基因烟草植株的叶绿体中可以检测到 PEPC 活性, 但光合效率并未提高。

2.3 NADP-ME 转化 C_3 植物 叶绿体内的 NADP-苹果酸酶是 NADP-ME 型 C_4 光合途径中的另一个关键酶, 位于维管束鞘细胞叶绿体中的 NADP-ME 催化苹果酸或天冬氨酸的脱羧反应。NADP-ME 活性与叶绿素含量及光呼吸活性呈负相关(Ku 等 1991)。Lipka 等(1999)将来源于 C_3 植物黄顶菊(*Flaveria pringlei*)的叶绿体 NADP-ME 的 cDNA 在双 CaMV 35S 启动子的控制下导入马铃薯, 由于来源于黄顶菊的 NADP-ME 的低水平表达以及马铃薯中内源细胞质 NADP-ME 的活性较高, 以致引入的叶绿体酶只能在叶绿体的汁液中形成, 但过量表达 C_3 叶绿体 NADP-ME 的转基因马铃薯植株其光合并没有受到影响。而 Takeuchi 等(2000)将有玉米 C_4 特征的 NADP-ME 基因在 CaMV 35S 启动子控制下导入水稻后, 免疫电镜分析显示, 过量表达玉米 NADP-ME 的水稻植株绝大部分定位于叶绿体中, 以致植株的叶绿体异常, 叶绿体无基粒, 类似于 C_4 植物维管束鞘细胞的叶绿体。据此他们认为叶绿体发育结构的异常是由外源的 NADP-ME 的活性高所致。Tsuchida 等(2001)将编码水稻 C_3 特征和玉米 C_4 特征的 NADP-ME 同功酶全长 cDNA 在 Cab 启动子控制下导入水稻后, 携带水稻 C_3 cDNA 基因的水稻植株 NADP-ME 活性明显低于非转基因植株, 而转玉米 NADP-ME 基因的水稻植株的 NADP-ME 活性为非转基因植株的 30 倍, 这说明表达水稻 C_3 特征的 NADP-ME 受到了共抑制, 而转外源 C_4 特征的 NADP-ME 则能避免这种抑制作用。Chi 等(2004)将来源于高粱的 NADP-ME 基因导入水稻后, 转基因植株中 NADP-ME 酶活性提高 1~7 倍。虽然转 NADP-ME 后获得的转基因植

株酶活性不一样, 但绝大多数转 NADP-ME 基因的植株都受到不良的影响, 如生长迟缓, 叶片白化, 基质状态紊乱, 光抑制增强, 据此可以说转基因植株对光合生产量的提高无实质性的结果(Hausler 等 2001; Tsuchida 等 2001; Chi 等 2004)。

2.4 PPDK 转化 C_3 植物 Sheriff 等(1998)将兼性景天科植物冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum*)的质体 PPDK 基因导入烟草后, 转基因的烟草叶片和种子中 PPDK 含量均得到提高; 当控制 PPDK 基因在质体中表达时, 转基因的烟草每个蒴果的种子数以及蒴果重都高于野生型。当去除转运肽序列促使 PPDK 在细胞质中表达时, 转基因植株产生的种子比野生型的少, 而且 PPDK 高表达的转基因植株几乎不产生种子。Ishimaru 等(1998)将玉米的 PPDK 基因导入马铃薯后, 转基因的植株中 PPDK 酶活性增加 5 倍, Pyr 几乎被耗尽, PEP 含量略有升高, 苹果酸含量也有一定程度的增加, 他们认为这可能是高的 PEP 流通过 PEPC 以致随后的苹果酸合成增加所致。Ku 等(2000)将玉米的 PPDK 基因导入水稻后, 过量表达玉米 PPDK 的转基因水稻植株的光合速率和气孔电导率均高于非转基因植株。而将玉米的 PPDK 基因导入水稻植株后, 转基因水稻植株的 PPDK 活性增加 40 倍, 其纯合植株中的 PPDK 蛋白占叶片总可溶蛋白的 35%, 转基因水稻的叶中 PPDK 蛋白活性与玉米中的一致, 都受光/暗调控, 过量表达 PPDK 的水稻植株的单株谷粒数和千粒重都高于非转基因植株(Fukayama 等 2001; Miyao 和 Fukayama 2005)。Zhang 等(2007)将玉米 PPDK 基因导入籼稻 'IR64' 后, 将获得的转基因植株于温室条件下栽培, 其剑叶的全氮含量高于非转基因植株, 且产量也有提高。

2.5 CA 转化 C_3 植物 C_4 光合的起始步骤是在 CA 催化下将 CO_2 快速转换成 HCO_3^- , 为 PEPC 固定碳提供前体(HCO_3^-) (Hatch 和 Burnell 1990)。Badger 和 Price (1994)认为, 在缺少细胞质 CA 的条件下, C_4 植物的光合作用估计将会降低到原来的万分之一。 C_4 植物中的绝大多数 CA 均定位在叶肉细胞的细胞质中, 并在那里催化空气中的 CO_2 进入叶中形成 C_4 光合途径的前体 HCO_3^- , 而在维管束鞘细胞中几乎没有 CA 的分布(Ludwig 等 1998)。Caemmerer 等(2004)将编码细胞质 CA 的 cDNA 反

义基因导入 C_4 双子叶植物(*Flaveria bidentis*)后, 转基因植株的 CO_2 同化率降低, 以致植株生长需要更多的 CO_2 。用光谱技术测定 T_1 代植株叶中 CA 活性和 CO_2 同化速率之间数量关系的结果表明, 当 CA 活性不及野生型的 20% 时 CO_2 同化速率急剧下降, 在正常条件下生长不正常。至于 C_4 植物的 CA 转化 C_3 植物后会产生何种生理效应, 迄今尚未见报道。

2.6 PPT 转化 C_3 植物 C_4 光合途径的有效运转不仅需要一系列 C_4 光合酶的催化反应, 还伴随着多种跨膜运输过程, 这一过程包括叶肉细胞中丙酮酸通过丙酮酸/ H^+ 同向转运蛋白(symporter)进入叶绿体; 叶绿体内生成的 PEP 通过 PEP/磷酸转运蛋白(phosphoenolpyruvate/phosphate translocator, PPT)进入细胞质等(匡廷云等 2004)。PPT 是惟一的一种 C_4 代谢所必需的转运蛋白, 目前已从多种非 C_4 组织中克隆出此种转运蛋白, 经分析, 其在 C_3 植物的叶绿体内膜和非绿色质体中的活性很低, 这可能是限制四碳二羧酸循环的一种因素(Fischer 等 1997; Suzuki 等 2000)。由于 PPT 的低活性, 所以形成的 PEP 便在叶绿体中大量积累, 以致整个代谢循环受阻, 为此, 应将 C_3 植物叶绿体中由 PEPC 或 PPDK 催化形成的 PEP 高效地转运出去, 这样才能提高 CO_2 的同化能力。Hausler 等(2002)根据 Flugge 实验室的资料表明, 花椰菜的 PPT 基因在 CaMV35S 启动子调控下转入烟草后, 转基因的植株中 PEP 转运速率比野生型的高出 10 倍。

3 C_4 光合关键酶基因在 C_3 植物中的组合表达

在 C_3 植物中过量表达单个 C_4 循环酶基因是 C_3 植物高光效遗传改造的一种尝试。由于 C_4 循环是在多种酶和转运蛋白的协同作用下完成的, 并且 C_3 植物中存在内源的 C_4 循环酶及转运蛋白, 只是它们的活性较低, 且表达的部位不同, 因而增加个别基因的表达并不能在 C_3 植物中建立起完整的 C_4 循环, 还有可能会扰乱 C_3 植物的正常代谢。由于所有的 C_4 酶在 C_3 植物中均有不同的功能, 所以采用分析转双(基因)和多(基因)的植株也许可以找出在 C_3 作物建立单细胞 C_4 循环的有效方法。目前, 人们已经开始尝试将两个或更多的 C_4 循环关键酶基因转入同一种 C_3 植物中。Lipka 等(1999)将来源于黄顶菊(*Flaveria pringlei*)的 PEPC 基因和 NADP-ME 基因逐步转入马铃薯后, 获得马铃薯

双转化植株, 其 PEPC 和叶绿体 NADP-ME 活性均得到提高, 与野生型相比, 双转基因的植株分离的叶绿体中 NADP-ME 活性增加 5 倍, 温度升高时, 它们对 CO_2 同化的温度依赖性明显减弱, 且 CO_2 同化过程中的电子需求显著下降。Hausler 等(2001)在马铃薯的 *Ppc* 过量表达植株中再导入内生细胞质 NADP-ME 酶基因后, 双转化植株中的 *Ppc* 表达被削弱, 其光合作用也没有显著变化。但 Ku 等(2001)在同一水稻植株中过量表达 PEPC 和 PPDK 基因后, 其光合能力增加 35%、谷粒产量增加 22%。Matsuoka 等(2001)进一步分析认为, PPDK 在叶绿体中高表达后促进了种荚和小穗等组织的类似于 C_4 光合作用的参数, 因而种子和谷物的产量提高。王德正等(2004)获得的水稻 PEPC 和 PPDK 的双转化植株, 其单株有效穗数和单株产量分别比受体亲本 'Kitaake' 提高 29.1% 和 27.0%。袁定阳等(2007)将 PEPC 和 PPDK 基因在 Cab 启动子的控制下导入水稻恢复系 'R299' 后, 其 T_3 代获得了无筛选标记的转基因纯合系, 它的 PEPC 酶活性比非转基因植株提高 1.5~4.9 倍, 光合速率提高 19%~40%; 初步测定转基因纯系所配杂交组合的产量表明, 转基因组合单株的有效穗数和单株产量分别比非转基因植株提高 15% 和 10%。而将多个基因同时转入一种 C_3 植物中也获得成功, 如 Hausler 等(2002)用含有不同的抗性筛选基因(kanamycin、hygromycin、sulphonylamide 和 BASTA [bar])的表达质粒逐步转入马铃薯后, 共获得 4 个 C_4 基因(来源于 *Corynebacterium glutamicum* 的 PEPC 或内源 PEPC、NADP-ME、PPDK 和 PPT)表达的马铃薯植株。在烟草中, 过量表达 C_4 循环单一基因的转基因植株经过常规杂交, 采用不同的组合获得一系列共表达的多种组合(PEPC, NADP-ME, PPDK, PEPS, PEPC, PPT)的杂合子代(Jun Li 的未发表资料, 引自 Hausler 等 2002)。

4 结束语

从解剖结构来说, C_4 植物的花环型解剖结构并不是控制 CO_2 浓缩机制的先决条件, 因为在水生植物和陆生藜科植物中都曾报道有单细胞 C_4 集中机制, 但它们并无典型的花环型结构(Spencer 等 1996; Magnin 等 1997)。长期以来, 人们都在尝试将 C_4 植物的光合特性导入 C_3 植物来提高它

们的光合效率。传统的方法是杂交育种,但效果不佳(李卫华等 1999; Raines 2006)。近年来,人们试图用基因工程的方法来提高 C_3 植物的光合碳同化, C_4 型光合酶和转运蛋白基因在 C_3 植物中过量表达的研究已取得较大的进展,且在 C_3 植物叶中的特定区域高水平表达 C_4 酶基因的技术已十分成熟。但在转基因 C_3 植物中的许多方法都将目标定位在相应酶可能的最高活性上,因为这些酶在 C_4 植物的叶片中具有高的表达水平。但导入的酶基因的高表达与其体内的高活性之间并没有必然的联系,因而转入单一基因并不能明显地提高 C_3 植物的光合效率。于是人们又进一步将多基因共转化于 C_3 植物中,以期提高其光合效率。

虽然转PPDK的烟草和双转化(PEPC和PPDK)水稻植株的光合速率和产量有提高,但要真正在 C_3 植物中建立起完整的 C_4 循环尚存在许多难题。首先,在现有的基础上如何使多种 C_4 关键酶基因在 C_3 植物的单细胞内协调表达?因为每一条代谢途径都受到严格而精密控制,各种途径又互相交错和相互影响。单纯将某一种酶大量表达而不注意对其他代谢途径的影响以及它们彼此之间的比例关系,很可能造成代谢失调、能量浪费,以致循环不能有效运转(匡廷云等 2004);其次,除 C_4 循环关键酶以外,还有其他酶、代谢产物的转运蛋白的组织特异性表达和诱导表达都是 C_3 植物中建立 C_4 循环所不能忽略的,如磷酸烯醇式丙酮酸合成酶(phosphoenolpyruvate synthetase, PEPS)、PPT、CA。虽然 C_3 型 PPT 和 CA 的转基因研究取得了一些进展,但 C_4 型的 PPT 和 CA 向 C_3 植物的转化迄今尚未见报道。总之,在 C_3 植物中建立有效的 C_4 微循环是一个伟大的设想,也是所有高光效育种工作者面临的一项艰巨任务,其中的许多问题还有待深入研究。

参考文献

- 焦德茂, 李霞, 黄雪清, 迟伟, 匡廷云, 古森本(2001). 转PEPC基因水稻的光合 CO_2 同化和叶绿素荧光特性. 科学通报, 46 (5): 414~418
- 焦德茂, 匡廷云, 李霞, 戈巧英, 黄雪清, 郝乃斌, 白克智(2003). 转PEPC基因水稻具有初级 CO_2 浓缩机制的生理特点. 中国科学, 33 (1): 33~39
- 匡廷云, 卢从明, 李良璧(2004). 作物光能利用效率与调控. 济南: 山东科学技术出版社, 271~284
- 李卫华, 郝乃斌, 戈巧英, 张其德(1999). C_3 植物中 C_4 途径的研究进展. 植物学通报, 16 (2): 97~106
- 凌丽俐, 林宏辉, 焦德茂(2006). 转PEPC基因水稻种质的稳定光合生理特性. 作物学报, 32 (4): 527~531
- 王德正, 迟伟, 王守海, 焦德茂, 吴爽, 李霞, 李成全, 张云华, 罗彦长(2004). 转 C_4 光合基因水稻特征特性及其在两系杂交稻育种中的应用. 作物学报, 30 (3): 248~252
- 王忠, 王三根, 李合生(2000). 植物生理学. 北京: 中国农业出版社, 162
- 杨荣仲, 谭裕模, 张木清, 陈如凯, 李杨瑞(2004). 甘蔗磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因转化烟草研究初报. 热带作物学报, 25 (2): 61~65
- 袁定阳, 段美娟, 谭炎宁, 易自力, 袁隆平, 辛世文(2007). 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. 杂交水稻, 22 (2): 57~63
- 张方, 迟伟, 金成哲, 王强, 张其德, 吴乃虎(2003). 高粱 C_4 型磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的分子克隆及其转基因水稻的培育. 科学通报, 48 (14): 1542~1546
- Badger MR, Price GD (1994). The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 45: 369~392
- Caemmerer S, Quinn V, Hancock NC, Price GD, Furbank RT, Ludwig M (2004). Carbonic anhydrase and C_4 photosynthesis: a transgenic analysis. Plant Cell Environ, 27 (6): 697~703
- Chi W, Zhou JS, Zhang F, Wu NH (2004). Photosynthetic features of transgenic rice expressing sorghum C_4 type NADP-ME. Acta Bot Sin, 46 (7): 873~882
- Fischer K, Kammerer B, Gutensohn M, Arbinger B, Weber A, Hausler RE, Flugge UI (1997). A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter. Plant Cell, 9: 453~462
- Fukayama H, Tsuchida H, Agarie S, Nomura M, Onodera H, Ono K, Lee BH, Hirose S, Toki S, Ku MSB et al (2001). Significant accumulation of C_4 -specific pyruvate, orthophosphate dikinase in a C_3 plant, rice. Plant Physiol, 127: 1136~1146
- Gehlen J, Pastruga R, Smets H, Merkelbach S, Kleins M, Porsch P, Fladung M, Becker I, Rademacher T, Hausler E, Hirsch HJ (1996). Effects of altered phosphoenolpyruvate carboxylase activities on transgenic C_3 plant *Solanum tuberosum*. Plant Mol Biol, 32 (5): 831~848
- Hatch MD, Burnell JN (1990). Carbonic anhydrase activity in leaves and its role in the first step of C_4 photosynthesis. Plant Physiol, 93: 825~828
- Hausler RE, Hirsch HJ, Kreuzaler F, Peterhansel C (2002). Overexpression of C_4 cycle enzymes in transgenic C_3 plant: a biotechnological approach to improve C_3 -photosynthesis. J Exp Bot, 53 (369): 591~607
- Hausler RE, Kleines M, Uhrig H, Hirsch HJ, Smets H (1999). Overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum* lower the CO_2 compensation point (T) and enhance dark and light respiration in transgenic potato. J Exp Bot, 50: 1231~1242
- Hausler RE, Rademacher T, Li J, Lipka V, Fischer KL, Schubert S, Kreuzaler F, Hirsch HJ (2001). Single and double overexpression of C_4 -cycle genes had differential effects on

- the pattern of endogenous enzymes, attenuation of photorespiration and on contents of UV protectants in transgenic potato and tobacco plants. *J Exp Bot*, 52 (362): 1785~1803
- Ishimaru K, Okawa Y, Ishige T, Tobisa DJ, Ohsugi R (1998). Elevated pyruvate, orthophosphate dikinase activity alters carboxylate metabolism in transgenic potatoes with a C₄ maize PPDK gene. *Physiol Plant*, 103 (3): 340~346
- Izui K, Ishijima S, Yamaguchi Y, Katagiri F, Murata T, Shigesada K, Sugiyama T, Katsuki H (1986). Cloning and sequence analysis of cDNA encoding active phosphoenolpyruvate carboxylase of the C₄-pathway of maize. *Nucleic Acid Res*, 14 (4): 1615~1628
- Kogami H, Shono M, Koike T, Yangisawa S, Izui K, Sentoku N, Tanifuji S, Uchimiyama H, Toki S (1994). 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*, 3: 287~296
- Ku MSB, Agarie S, Nomura M, Fukayama H, Tsuchida H, Ono K, Hirose S, Miyao M (1999). High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nat Biotechnol*, 17: 76~80
- Ku MSB, Cho DH, Li X, Jiao DM, Pinto M, Miyao M, Matsuoka M (2001). Introduction of genes encoding C₄ photosynthesis enzymes into rice plants: physiological consequences. In: Goode JA, Chadwick DC (eds). *Rice Biotechnology: Improving Yield, Stress Tolerance and Grain Quality*. Ny: John Wiley and Sons, 100~116
- Ku MSB, Cho DH, Rande U, Hsu TP, Li X, Jiao DM, Ehleringer J, Miyao M, Matsuoka M (2000). Photosynthetic performance of transgenic rice plants overexpressing maize C₄ photosynthesis enzymes. In: Sheehy JE, Mitchell PL, Hardy B (eds). *Redesigning Rice Photosynthesis to Increase Yield*. Philippines: International Rice Research Institute, 193~206
- Lepiniec L, Keryer E, Philippe H, Gadal P, Cretin C (1993). Sorghum phosphoenolpyruvate carboxylase gene family: structure, function and molecular evolution. *Plant Mol Biol*, 21 (3): 487~502
- Lipka V, Hausler RE, Rademacher T, Li J, Hirsch HJ, Kreuzaler (1999). *Solanum tuberosum* double transgenic expressing phosphoenolpyruvate carboxylase and NADP-malic enzyme display reduced electron requirement for CO₂ fixation. *Plant Sci*, 144: 93~105
- Ludwig M, Caemmerer SV, Price GD, Badger MR, Furbank RT (1998). Expression of tobacco carbonic anhydrase in the C₄ dicot *Flaveria bidentis* leads to increased leakiness of the bundle sheath and a defective CO₂-concentrating mechanism. *Plant Physiol*, 117 (3): 1071~1081
- Magnin NC, Cooley BA, Reiskind JB, Bowes G (1997). Regulation and localization of key enzymes during the induction of Karaz-less, C₄-type photosynthesis in *Hydrilla verticillata*. *Plant Physiol*, 115 (4): 1681~1689
- Matsuoka M, Minami E (1989). Complete structure of gene for phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *Eur J Biochem*, 181: 593~598
- Matsuoka M, Nomura M, Agarie S, Miyao M, Ku M (1998). Evolution of C₄ photosynthetic genes and overexpression of maize C₄ genes in rice. *J Plant Res*, 111 (2): 333~337
- Matsuoka M, Turbank R, Fukayama H, Miyao M (2001). Molecular engineering of C₄ photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52: 297~314
- Miyao-Tokutomi M, Fukayama H (2005). Overproduction of C₄ enzymes in transgenic rice: an approach for improved photosynthesis and crop yield. In: Toriyama K, Heong KL, Hardy B (eds). *Rice Is Life: Scientific Perspectives for the 21st Century*. Tsukuba: Proceedings of the World Rice Research Conference, 87~90
- Poetsch W, Hermans J, Westhoff P (1991). Multiple cDNAs of phosphoenolpyruvate carboxylase in the C₄ dicot *Flaveria trinervia*. *FEBS Lett*, 292: 133~136
- Raines CA (2006). Transgenic approaches to manipulate the environmental responses of the C₃ carbon fixation cycle. *Plant Cell Environ*, 29 (3): 331~339
- Sheriff A, Meyer H, Riedel E, Schmitt JM, Lapke C (1998). The influence of plant pyruvate, orthophosphate dikinase on a C₄ plant with respect to the intracellular location of the enzyme. *Plant Sci*, 136 (1): 43~57
- Spencer WE, Wetzel RG, Teeri J (1996). Photosynthetic phenotype plasticity and the role of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Hydrilla verticillata*. *Plant Sci*, 118 (1): 1~9
- Suzuki S, Murai N, Burnell JN, Arai M (2000). Changes in photosynthetic carbon flow in transgenic rice plants that express C₄-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Urochloa panicoides*. *Plant Physiol*, 124 (1): 163~172
- Takeuchi Y, Akagi H, Kamasawa N, Osumi M, Honda H (2000). Aberrant chloroplasts in transgenic rice plants expressing a high level of maize NADP-dependent malic enzyme. *Planta*, 211 (2): 265~274
- Tsuchida H, Tamai T, Fukayama H, Agarie S, Nomura M, Onodera H, Ono K, Nishizawa Y, Lee BH, Hirose S et al (2001). High level expression of C₄-specific NADP-malic enzyme in leaves and impairment of photoautotrophic growth in a C₃ plant, rice. *Plant Cell Physiol*, 42 (2): 138~145
- Wyrich R, Dressen U, Brockmann S, Streubel M, Chang C, Qiang D, Paterson AH, Westhoff P (1998). The molecular basis of C₄ photosynthesis in sorghum: isolation, characterization and RFLP mapping of mesophyll- and bundle-sheath-specific cDNA obtained by differential screening. *Plant Mol Biol*, 37 (2): 319~335
- Zhang JF, Datta SK, Wang GY, Xie HA (2007). Intergration of C₄-specific PPDK gene of maize to C₃ rice and its characteristics in relation to photosynthesis. *Front Agric China*, 1 (3): 243~249