

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2020.60812

鲁维维, 刘星. 香格里拉水韭磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 *PEPC* 的克隆及其表达载体构建[J]. 植物科学学报, 2020, 38(6): 812~819
*Lu WW, Liu X. Cloning of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene (*PEPC*) from *Isoetes shangrilaensis* X. Liu and construction of its expression vector [J]. Plant Science Journal, 2020, 38(6): 812~819*

香格里拉水韭磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因(*PEPC*)的克隆及其表达载体构建

鲁维维¹, 刘星^{1,2*}

(1. 武汉大学生命科学学院植物系统学与进化生物学实验室, 武汉 430072; 2. 西藏大学理学院, 拉萨 850000)

摘要: 以中国特有植物香格里拉水韭(*Isoetes shangrilaensis* X. Liu)为材料, 通过转录组测序数据分析筛选出磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因(*IsPEPC*), 根据该基因序列, 从香格里拉水韭 cDNA 中克隆获得磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCase)的编码基因 *IsPEPC*, 并将此基因插入 pCAMBIA-2300-N-eGFP 及 pMD 质粒载体上, 再采用农杆菌介导的花序浸染法将 2 个重组载体分开转入野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)中。结果显示: *IsPEPC* 基因蛋白编码序列长度为 2928 bp, 编码 975 个氨基酸; 同源性检索分析结果表明, 该蛋白与其近源物种江南卷柏(*Selaginella moellendorffii* Hieron.)的 *PEPC* 基因蛋白序列同源性为 79.8%。对转基因的 T₁ 代拟南芥通过抗性筛选并在 gDNA 水平上阳性鉴定, 初步鉴定得到 pC2300-N-eGFP-*IsPEPC* 转基因株系 26 个和 pMD-*IsPEPC* 转基因株系 32 个。

关键词: 香格里拉水韭; CAM 代谢; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因; 拟南芥; 载体构建; 遗传转化

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2020)06-0812-08

Cloning of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene (*PEPC*) from *Isoetes shangrilaensis* X. Liu and construction of its expression vector

Lu Wei-Wei¹, Liu Xing^{1,2*}

(1. Laboratory of Plant Systematics and Evolutionary Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. School of Science, Tibet University, Lhasa 850000, China)

Abstract: Using Chinese *Isoetes shangrilaensis* X. Liu, the phosphoenolpyruvate carboxylase gene (*IsPEPC*) sequence information was screened by transcriptome sequencing analysis, and the *IsPEPC* gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase) was cloned from cDNA based on the gene sequence. The *IsPEPC* gene was inserted into the pCAMBIA-2300-N-eGFP and pMD plasmid vectors, after which the recombinant vectors were transferred into wild-type *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. by agrobacterium-mediated inflorescence infiltration. Results showed that the protein-coding sequence of the *IsPEPC* gene was 2928 bp in length and encoded 975 amino acids. Homologous searching showed that the protein was related to the PEPC protein sequence of the source species *Selaginella moellendorffii* Hieron., with 79.8% sequence homology. Transgenic T₁ *A. thaliana* was screened for resistance and positively identified at the gDNA level. We initially identified 26 pC2300-N-eGFP-*IsPEPC*

收稿日期: 2020-03-02, 退修日期: 2020-03-28。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860046); 2019 年中央财政支持地方高校改革发展专项资金项目(藏财教指[2019]01)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31860046) and Central Government Supports the Special Fund Project for the Reform and Development of Local Universities (Tibetan Finance Education[2019]01).

作者简介: 鲁维维(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物系统与进化生物学(E-mail: wwlw@whu.edu.cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: xingliu@whu.edu.cn)。

transgenic lines and 32 pMD-*IsPEPC* transgenic lines.

Key words: *Isoetes shangri-laensis*; Crassulacean acid metabolism; Phosphoenolpyruvate carboxylase gene; *Arabidopsis thaliana*; Vector construction; Genetic transformation

光合作用是植物将光能转换为化学能并合成有机物的生物化学过程, 是作物生长发育和产量形成的基础^[1]。依据植物吸收固定CO₂形成的原初产物不同, 可将光合作用分为3条途径: C3、C4和CAM(crasulacean acid metabolism)光合途径, 相应的植物则称为C3、C4和CAM植物^[2]。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCase)由*PEPC*基因(phosphoenolpyruvate carboxylase gene)编码, *PEPC*基因家族由多个成员组成, 包括几个植物型*PEPC*^[3, 4]和至少一个同源性较低的细菌型*PEPC*^[5-7]。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCase)在不同类型植物中行使不同功能, 在C3植物中参与三羧酸循环回补反应及协调碳氮代谢^[8, 9], 在C4和CAM植物中参与光合作用碳同化过程, 其对CO₂的亲和力高于C3植物中1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(RuBPCase)^[10], 这使得CAM植物在干旱和养分贫瘠环境条件下具有很强的适应能力^[11]。

水韭属(*Isoetes*)是水韭科唯一幸存的属, 起源于古老的石松类植物, 占据特殊的进化位置, 是最早出现的维管植物类群之一^[11], 并早在晚古生代(late paleozoic)就因适应于全球气候变化而产生了特殊的水生景天酸代谢(aquatic crassulacean acid metabolism, Aquatic-CAM)途径, 也就是在沉水的低CO₂浓度状态下出现CAM途径, 提升光合效率^[12], 是最古老的具有CAM代谢途径的植物类群, 对探讨植物CAM途径的起源与进化具有重要意义^[13-15]。

最近的转录组学研究表明, 中华水韭(*Isoetes siensis* Palmer)在夜间沉水状态下编码磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的*PEPC*基因高度表达, 在分子水平上验证了水韭属植物存在CAM途径及其相关的表达调控机制^[16]。然而, 有关水韭属植物*PEPC*基因的特征、类型、功能及其进化规律等依然不清楚, 需要进一步研究。

研究发现, 在C3植物中导入*PEPC*基因可以提高C3植物的光合作用效率, 进而可以使其产量增加^[17-20]。但这些*PEPC*基因大多来自C4植物玉米(*Zea mays* L.)等, 且大多为植物型

PEPC^[18, 21-24], 有关CAM植物*PEPC*基因, 特别是水生CAM植物*PEPC*基因的功能及其潜在利用价值还鲜有报道。

本研究从中国特有种香格里拉水韭(*Isoetes shangri-laensis* X. Liu)中克隆得到植物型*IsPEPC*基因, 构建过表达载体转染拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), 获得阳性转基因植株, 以期为进一步探索水韭属植物CAM光合途径的起源与进化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

香格里拉水韭采自云南省迪庆藏族自治州香格里拉市下吉沙县, 在野外采植株新鲜叶片, 洗净后置于液氮中, 于-80℃冰箱中保存。大肠杆菌DH5α、根瘤农杆菌GV3101、克隆载体pBluescript SK、表达载体pCAMBIA-2300-N-eGFP/pMD、野生型拟南芥Columbia生态型(简称WT), 由华中师范大学生命科学学院分子遗传学实验室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 总RNA提取及cDNA合成

采用Trizol法提取香格里拉水韭的RNA, 并反转录为cDNA。

1.2.2 *IsPEPC*基因的克隆及序列分析

根据实验室已有的转录组数据, 获得注释的*IsPEPC*cDNA序列, 利用ORF-finder(http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html)在线工具预测其ORF(open reading frame)序列, 在NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站上比对确定其基因的CDS序列, 并采用软件Primer 5.0软件设计*IsPEPC*全长特异性引物(表1)。

以香格里拉水韭cDNA为模板进行PCR扩增, 50 μL反应体系包括: 10 × buffer 5 μL、DNTP 1 μL、引物PEPC-F和PEPC-R各1 μL、HiFi Pfu DNA Polymerase 1 μL、cDNA模板3.0 μL。

扩增条件为: 95℃预变性5 min, 95℃变性1 min, 56℃复性1 min, 72℃延伸3 min; 共32

表1 引物信息
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	酶切位点 Restriction site
PEPC-F	F:CGGGATCCATAAGGGAAAATTGACGT	Bam HI
PEPC-R	R:CGGGATCCGGGAGGCCAGTTATGTAG	Bam HI
RT-1F	ACACCATCAGAGATCTTCGAGGC	
RT-1R	GTAAGGAGGCCTACGCCCTGATC	
35S1-F	GCTCCTACAAATGCCATCA	

个循环；再72℃延伸10 min。

扩增产物检测、回收后，连接pBluescript SK中间载体，转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞中，对阳性菌落进行扩大培养，然后提取质粒测序，将测序正确的质粒命名为pSK-IsPEPC。

根据克隆测序得到的*IsPEPC*基因序列，利用ExPASy的ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)在线工具对*IsPEPC*基因编码的氨基酸序列特性进行分析。

1.2.3 香格里拉水韭*IsPEPC*基因编码氨基酸序列系统进化分析与分型

搜索NCBI数据库并下载其他物种*PEPC*同源基因序列编码的氨基酸序列，采用ClustalX 2.0软件将这些序列进行多重比对。采用MEGA 6.0软件的JTT替换模型构建进化树，Bootstrap值设为1000，并去除支持率小于50%的分支。根据系统发育分析结果对*IsPEPC*基因进行分型。

1.2.4 植物表达载体的构建及鉴定

利用酶切连接法构建表达载体，pSK-IsPEPC质粒采用Bam HI进行单酶切，片段回收后分别构建于pCAMBIA-2300-N-eGFP和pMD质粒上，命名为pC2300-N-eGFP-IsPEPC和pMD-IsPEPC。取10 μL连接产物转化DH5α感受态细胞，阳性菌落提质粒后进行酶切鉴定，并送公司测序。

1.2.5 重组质粒转化农杆菌GV3101感受态细胞及鉴定

取1 μL的pC2300-N-eGFP-IsPEPC及pMD-IsPEPC质粒分别加入到100 μL农杆菌GV3101感受态细胞中，对阳性菌落扩大培养。

1.2.6 农杆菌介导的拟南芥转化

1.2.6.1 农杆菌浸染液的制备

挑取阳性单菌落接种于含Kan抗生素(终质量浓度为50 mg/L)的10 mL LB液体培养基中，于

28℃、180 r/min过夜振荡培养，培养至OD₆₀₀值介于0.6~0.8；培养好的菌液于4000 r/min离心15 min，用200 mL(含蔗糖25 g、SilwetL-7760 μL)悬浮液悬浮菌液沉淀。

1.2.6.2 花序浸染法转染拟南芥

在转化的前1 d对拟南芥浇透水，选取生长3周花蕾较多的野生型拟南芥进行转化，将花序全部放入农杆菌浸染液中浸泡45 s，然后用保鲜袋将植株罩住保湿2 d。一周后观察植株生长状况，对生长强壮的植株重复转化一次，提高转化效率，每隔1 d浇水1次，待植株枯黄种子成熟后，收取种子。

1.2.6.3 转*IsPEPC*基因的拟南芥阳性植株的筛选

将收获的T₀代拟南芥种子，70%的乙醇表面灭菌1 min，用无菌水冲洗1~2次，10%次氯酸钠灭菌3 min，然后用无菌水冲洗5次，处理后均匀地平铺在含Kan(50 mg/L)的MS固体培养基(1.0%的琼脂)上。置于4℃冰箱春化2~3 d，光照培养箱中培养约5 d待种子萌发，筛选绿色的抗性苗移栽至温室光照培养架上，培养条件为：23℃，16 h光照/8 h黑暗，生长基质为营养土和蛭石1:1混合。生长至4周，提取植株叶片的gDNA进行PCR检测。

1.2.6.4 转*IsPEPC*基因的拟南芥gDNA阳性植株鉴定

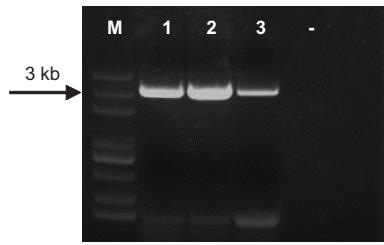
用pCAMBIA-2300-N-eGFP表达载体的35S启动子序列设计上游引物(35S1-F)、目的基因的下游引物(PEPC-R)，对经过Kan抗性平板筛选的绿苗叶片gDNA进行PCR鉴定。15 μL反应体系包括：上、下游引物35S1-F、PEPC5-R(10 μmol/L)各0.3 μL、gDNA模板1.0 μL、2×Taq mix 7.5 μL、ddH₂O 5.9 μL。PCR扩增反应条件为：95℃预变性5 min，95℃变性30 s，58℃复性30 s，72℃延伸45 s；共32个循环；再72℃延伸5 min。

2 结果与分析

2.1 香格里拉水韭*IsPEPC*基因的克隆测序及其编码氨基酸序列分析

研究结果显示，香格里拉水韭cDNA扩增产物约为3 kb，与预期片段一致(图1)。其扩增产物连接到pBluescript SK克隆载体得到重组质粒，

扩增产物片段大小约为 3 kb(图 2), 与目的基因大小一致, 初步确定其为带有目的基因 *IsPEPC* 的重组质粒。



M: DNA marker.

图 1 香格里拉水韭 *IsPEPC* 扩增结果

Fig. 1 PCR products of *IsPEPC* of *Isoetes shangriensis*

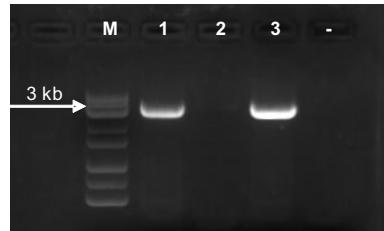


图 2 重组质粒的 PCR 产物电泳图

Fig. 2 PCR products of recombinant plasmids

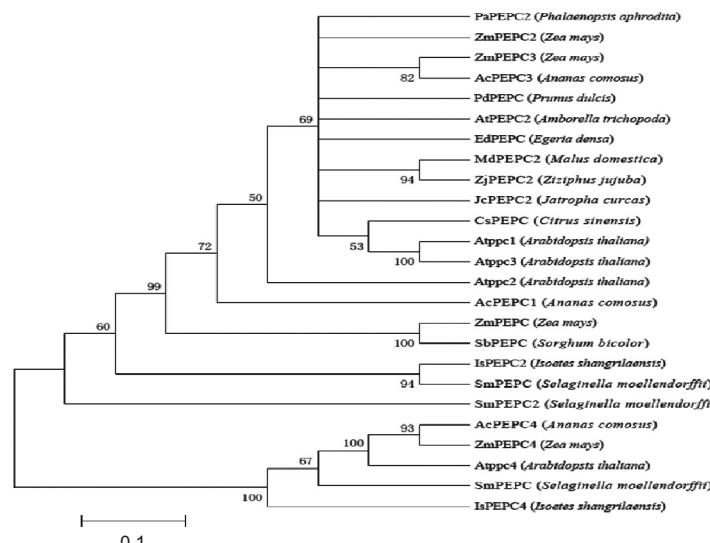
测序结果表明, 本研究克隆得到的香格里拉水韭 *IsPEPC* 基因 CDS 编码区长度为 2928 bp, 共编码 975 个氨基酸, 蛋白分子量为 110.69 kD, 理论等电点(PI)为 5.65, 该蛋白质平均亲水系数为 -0.384, 具有较强的亲水性, 为亲水性蛋白。

同源性分析结果显示, 氨基酸序列同源性由高

到低依次为江南卷柏 (*Selaginella moellendorffii Hieron.*) 79.28%、扁桃 (*prunus pedunculata Pall.*) 77.7%、苹果 (*Malus pumila Mill.*) 77.5%、枣 (*Ziziphus jujuba Mill.*) 77.4%、柑橘 (*Citrus reticulata Blanco.*) 77.2%、麻风树 (*Jatropha curcas L.*) 77.2%、埃格草 (*Egeria densa Planch.*) 77.2%、无油樟 (*Amborella trichopoda Baill.*) 76.8%、菠萝 (*Ananas comosus (L.) Merr.*) 75.6%、拟南芥 75.4%、玉米 (*Zea mays L.*) 75.3%、蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodita Rchb. F.*) 75.2%。

2.2 香格里拉水韭 *IsPEPC* 基因编码氨基酸序列的系统进化与类型分析

本研究通过转录组数据分析, 筛选到 2 个磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 (*PEPC*) 序列信息, 这 2 个基因具有 *PEPC* 家族基因典型结构特征。将香格里拉水韭 *IsPEPC* 基因编码的氨基酸序列与上述物种构建系统进化树, 结果显示, 2 个 *IsPEPC* 被分为 2 类, *IsPEPC* 在氨基酸水平与近缘种江南卷柏 *SmPEPC* 蛋白亲缘关系最近, 其次与玉米和高粱 (*Sorghum bicolor (L.) Moench*) 的 C4 型 *PEPC* 聚在一起, 为植物型 *PEPC* (PTPC) 蛋白, 且玉米及高粱的 C4 型 *PEPC* 基因经过转基因验证可提高 C3 植物的光合效率。而 *IsPEPC4* 在氨基酸水平与 *SmPEPC4*、拟南芥 *Atppc4*、玉米 *ZmPEPC4*、菠萝 *AcPEPC4* 聚为一类, 为细菌型 *PEPC* (BTPC) 蛋白(图 3)。



分枝上的数字为 Bootstrap 值, 去除小于 50% 的数值。

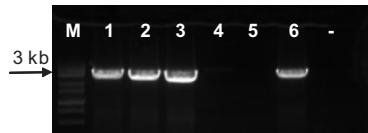
Numbers on branches are bootstrap values, less than 50% of which were removed from the tree.

图 3 *IsPEPC* 同源基因氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *IsPEPC* homologs at amino acid level

2.3 表达载体构建与转 *IsPEPC* 基因拟南芥鉴定

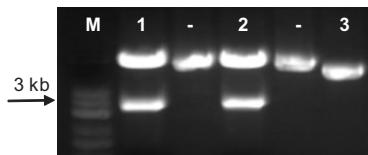
本研究构建香格里拉水韭表达载体，质粒PCR检测及酶切结果显示，片段大小均为3 kb左右(图4, 图5)，说明成功构建含 *PEPC* 基因 CDS 全长的植物表达载体，将其命名为 pC2300-N-eGFP-*IsPEPC* 和 pMD-*IsPEPC*。进一步利用这2种重组质粒转化农杆菌，经过农杆菌介导的花序浸



1–6: PCR products.

图4 表达载体的 PCR 产物电泳图

Fig. 4 PCR products of recombinant expression vectors



1: pC2300-N-eGFP-*IsPEPC*; 2: pMD-*IsPEPC*; 3: Blank vector control; -: Negative control.

图5 表达载体酶切检测

Fig. 5 Digestion test of expression vectors

染法，将香格里拉水韭 *IsPEPC* 基因成功转入拟南芥，并通过前后4批转化，共获得 pC2300-N-eGFP-*IsPEPC* 表达载体的转基因株系 26 个以及 pMD-*IsPEPC* 表达载体的转基因株系 32 个(图6, 图7)。观察结果发现，成功转入 pC2300-N-eGFP-*IsPEPC* 表达载体的拟南芥幼苗根部具有明显的荧光，且亚细胞定位于细胞膜上(图8)。

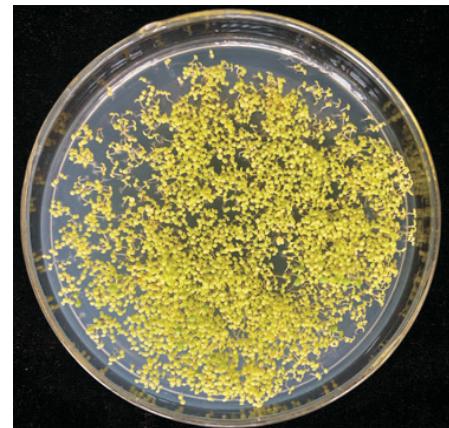
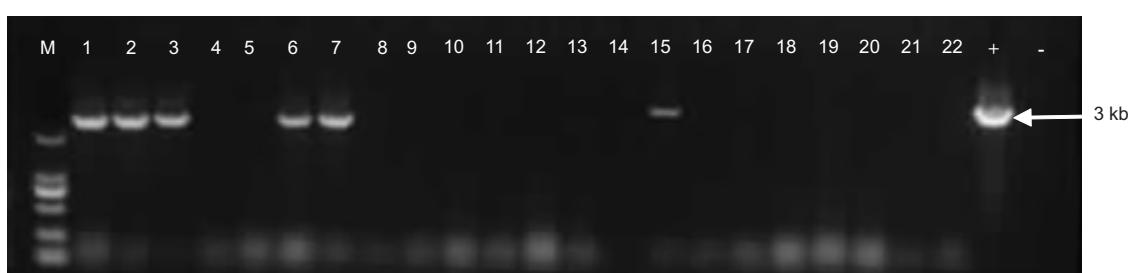


图6 T_1 代拟南芥种子抗性筛选

Fig. 6 Resistance screening of T_1 generation of *Arabidopsis thaliana* seedlings



1~21: PCR 产物；22: WT 对照；+: 阳性对照；-: 阴性对照。

1~21: PCR products; 22: Wild-type control; +: Positive control; -: Negative control.

图7 转 *IsPEPC* 基因阳性苗拟南芥的 PCR 检测图

Fig. 7 PCR products of transgenic *IsPEPC*-positive *Arabidopsis thaliana*

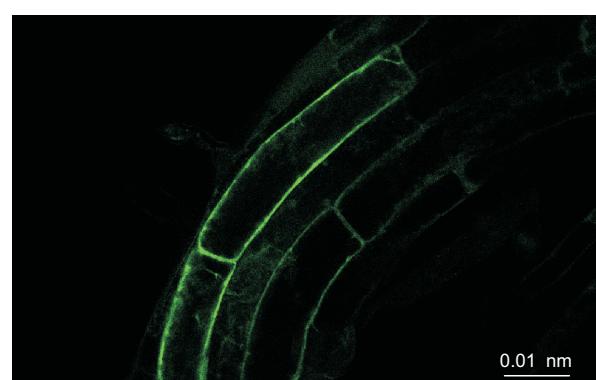


图8 *IsPEPC*-GFP 阳性植株

Fig. 8 *IsPEPC*-GFP positive plants

3 讨论

水韭属是最早产生 CAM 代谢途径的植物类群, 作为适应水生环境的水生 CAM 代谢途径, 其 CO₂浓缩机制与陆生 CAM 代谢途径不同^[25]。其 *PEPC* 基因的起源与进化及其功能研究, 不仅对探讨水韭属植物的物种形成与适应性进化机制具有重要意义, 也对揭示整个植物界 CAM 途径的起源与进化具有参考价值。

目前, 有关植物 *PEPC* 基因的研究主要集中于陆生类群, 如玉米、凤梨科、兰科植物等 C4 和 CAM 植物^[26-28]。研究发现, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶不仅在吸收 CO₂过程中发挥重要作用, 还参与各种非光合作用过程, 包括果实成熟、气孔开放、碳氮相互作用、种子形成和萌发以及调节植物对逆境胁迫的耐受性^[29]。并且 *PEPC* 基因广泛存在于植物的组织中, 其表达具有组织特异性, 例如拟南芥 *Atppc4* 在花、根和果实表达^[30]; 花生 (*Arachis hypogaea* L.) 中 *AhPEPC2* 在叶片表达量高, 其他组织表达量低^[31]; 菠萝 *AcPEPC1* 在叶片中的表达量较高, 在根和花中的表达量较低。因此, 推测在叶片中表达量较高的 *PEPC* 基因可能是参与 CAM 代谢中 CO₂吸收的关键基因^[32], 但有关 *PEPC* 基因的具体功能还有待进一步的研究。

水生植物的 CAM 途径普遍存在于水韭属植物中, 极少出现在景天科、仙人掌科、凤梨科的植物中, 而水韭属又早在晚古生代就进化出水生 CAM 代谢途径, 说明 CAM 代谢很可能起源于水生植物^[25]。而水生 CAM 途径源于水环境中低 CO₂可用性^[13], 陆生 CAM 途径源于水分亏缺环境^[33, 34], CO₂限制的水生 CAM 途径和水分限制的陆生 CAM 途径在 *PEPC* 基因的适应性进化上是否存在不同的机制等都需要深入研究。

研究证明, C3 植物如拟南芥、水稻 (*Oryza sativa* L.)、小麦 (*Triticum aestivum* L.) 中超表达 *PEPC* 基因后, 其光合速率显著提高^[35-38]。转入玉米磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的小麦与对照相比, 净光合速率明显提高, 胞间 CO₂浓度降低, 单茎重、单穗重、千粒重和收获指数均较对照显著提高^[39]。因此, 转 *PEPC* 基因最终可以应用到提高作物的产量^[40-42]。

另外, 拟南芥为 C3 植物, 其 *PEPC* 基因的

功能与碳固定无关, 但在低 CO₂ 胁迫条件下, *PEPC* 基因表达会上调, 行使一定的固定 CO₂ 的功能^[43]。

本研究克隆获得中国特有水生植物香格里拉水韭的 *IsPEPC* 基因, 构建了 pC2300-N-eGFP-*IsPEPC* 和 pMD-*IsPEPC* 植物表达载体, 并采用农杆菌浸染法转染野生型拟南芥, 共获得了 T₁ 代 58 株阳性转基因植株, 亚细胞定位结果显示 *IsPEPC* 基因定位于细胞膜上, 为进一步分析水韭 CAM 型 *PEPC* 基因在 C3 植物中的表达研究奠定了基础。下一步将继续筛选 T₃ 代纯合高表达转基因株系, 并鉴定其酶活性、叶绿素含量及光合作用速率, 以解释水韭属植物 *PEPC* 基因的功能特征, 并评价其提高作物光合效率的应用潜力。

致谢: 华中师范大学生命科学学院任峰教授及本课题组研究生姬亚丽、杨玉娇在实验中给予了帮助, 在此表示感谢。

参考文献:

- [1] 李丽, 申双和, 孙钢, 李永秀, 王晓东, 刘瑞娜. 土壤水分对冬小麦气孔导度及光合速率的影响与模拟 [J]. 中国农业气象, 2016, 37(6): 666-673.
- [2] Li L, Shen SH, Sun G, Li YX, Wang XD, Liu RN. Simulation on and impact of soil moisture on stomatal conductance and photosynthesis rate of winter wheat [J]. Chinese Journal of Agrometeorology, 2016, 37(6): 666-673.
- [3] 井忠平. CAM 植物的研究概况 [J]. 自然杂志, 1987, 12(6): 425-429.
- [4] Jing ZP. Research overview of CAM plants [J]. Journal of Nature, 1987, 12(6): 425-429.
- [5] Gennidakis S, Rao S, Greenham K, Uhrig RG, O'leary B, et al. Bacterial- and plant-type phosphoenolpyruvate carboxylase polypeptides interact in the hetero-oligomeric Class-2 PEPC complex of developing castor oil seeds [J]. Plant J, 2007, 52(5): 839-849.
- [6] Roberts K, Granum E, Leegood RC, Raven JA. C3 and C4 pathways of photosynthetic carbon assimilation in marine diatoms are under genetic, not environmental, control [J]. Plant Physiol, 2007, 145(1): 230-235.
- [7] Deng H, Zhang LS, Zhang GQ, Zheng BQ, Liu ZJ, Wang Y. Evolutionary history of *PEPC* genes in green plants: Implications for the evolution of CAM in orchids [J]. Mol Phylogenet Evol, 2016, 94: 559-564.
- [8] Zhao Y, Guo A, Wang Y, Hua J. Evolution of *PEPC* gene family in *Gossypium* reveals functional diversification and

- GhPEPC genes responding to abiotic stresses [J]. *Gene*, 2019, 698: 61–71.
- [7] Masumoto C, Miyazawa SI, Ohkawa H, Fukuda T, Taniguchi Y, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2010, 107(11): 5226–5231.
- [8] Fan ZQ, Li JY, Lu MZ, Li X, Yin HF. Overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Jatropha curcas* increases fatty acid accumulation in *Nicotiana tabacum* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2013, 35(7): 2269–2279.
- [9] O'leary B, Park J, Plaxton WC. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs [J]. *Biochem J*, 2011, 436(1): 15–34.
- [10] 张娟. 转PEPC基因水稻苗期优势C4光合途径初探[D]. 南京: 南京师范大学, 2014.
- [11] 邓华. 兰科植物景天酸代谢(CAM)途径研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
- [12] Pigg KB. Isoetalean lycopsid evolution: from the devonian to the present [J]. *Am Fern J*, 2001, 91(3): 99–114.
- [13] Pedersen O, Rich SM, Pulido C, Cawthray GR, Colmer TD. Crassulacean acid metabolism enhances underwater photosynthesis and diminishes photorespiration in the aquatic plant *Isoetes australis* [J]. *New Phytol*, 2011, 190(2): 332–339.
- [14] Keeley JE. *Isoetes howellii*: a submerged aquatic CAM plant [J]. *Am J Bot*, 1981, 68(3): 420–424.
- [15] Green WA. The function of the aerenchyma in arborescent lycopsids: evidence of an unfamiliar metabolic strategy [J]. *Proc Biol Sci*, 2010, 277(1692): 2257–2267.
- [16] Yang T, Liu X. Comparing photosynthetic characteristics of *Isoetes sinensis* Palmer under submerged and terrestrial conditions [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17783.
- [17] 张艳, 满为群, 南相日, 李柱刚. 高粱C4型PEPC基因转入大豆可改善大豆光合特性[J]. 分子植物育种, 2015, 13(2): 294–300.
- Zhang Y, Man WQ, Nan XR, Li ZG. Sorghum C4-specific PEPC gene transformed into soybean can improve the photosynthetic characteristics of soybean [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(2): 294–300.
- [18] 杜西河, 许为钢, 胡琳, 张磊, 李艳, 等. 转ZmPEPC与ZmPPDK基因拟南芥对干旱胁迫的反应[J]. 分子植物育种, 2013, 11(4): 477–484.
- Du XH, Xu WG, Hu L, Zhang L, Li Y, et al. Response of maize C4-type PEPC and PPDK transgenic *Arabidopsis* plants to drought-stress [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2013, 11(4): 477–484.
- [19] 雷明月, 许为钢, 李小博, 张庆琛, 王会伟, 等. 玉米C4光合酶基因导入对拟南芥光合特性及抗旱性的影响[J]. 麦类作物学报, 2017, 37(1): 108–115.
- Lei MY, Xu WG, Li XB, Zhang QS, Wang HW, et al. Effect of maize C4-specific photosynthesis gene on photosynthesis and drought resistance of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Triticeae*, 2017, 37(1): 108–115.
- [20] 钟秀娟. 转玉米C4型PEPC基因大豆的分子特征及光合特性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [21] 吴梅, 张边江, 陈全战, 王荣富. C4高效光合基因在C3植物中的应用研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(3): 68–71.
- Wu M, Zhang BJ, Chen QZ, Wang RF. Research progress on introducing efficient photosynthetic C4 genes into C3 plant [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(3): 68–71.
- [22] 王玉民. 玉米C4途径关键酶基因(PPDK、NADP-ME)的克隆及PPDK、PEPC在拟南芥中的表达分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012.
- [23] 张方, 迟伟, 金成哲, 王强, 张其德, 吴乃虎. 高粱C4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[J]. 科学通报, 2003, 48(14): 1542–1546.
- Zhang F, Chi W, Jin CZ, Wang Q, Zhang QD, Wu NH. Molecular cloning of sorghum C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene and cultivation of transgenic rice [J]. *Scientific bulletin*, 2003, 48(14): 1542–1546.
- [24] 曹路遥. 玉米磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因在拟南芥和烟草中的表达分析[D]. 郑州: 河南科技学院, 2018.
- [25] Keeley JE. Aquatic CAM photosynthesis: a brief history of its discovery [J]. *Aquat Bot*, 2014, 118: 38–44.
- [26] Qin N, Xu W, Hu L, Li Y, Wang H, et al. Drought tolerance and proteomics studies of transgenic wheat containing the maize C4 phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) gene [J]. *Protoplasma*, 2016, 253(6): 1503–1512.
- [27] Deng H, Liang SZ, Guo QZ, Zheng BQ, Liu ZJ, Wang Y. Evolutionary history of PEPC genes in green plants: implications for the evolution of CAM in orchids [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2016, 94: 559–564.
- [28] Brautigam A, Schluter U, Eisenhut M, Gowik U. On the evolutionary origin of CAM photosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2017, 174(2): 473–477.
- [29] 王丽媛, 张玉, 徐明怡, 冷海楠, 伍一宁. 植物磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的研究进展[J]. 国土与自然资源研究, 2017, 5: 86–89.
- Wang LY, Zhang Y, Xu MY, Leng HN, Wu YN. The research progress of plant phosphoenolpyruvate carboxylase [J]. *Territory and Natural Resources Study*, 2017, 5: 86–89.
- [30] Sánchez R, Cejudo FJ. Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenol-

- pyruvate carboxylase from *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 949–957.
- [31] Pan L, Zhang J, Chen N, Chen M, Wang M, et al. Molecular characterization and expression profiling of the phosphoenolpyruvate carboxylase genes in peanut (*Arachis hypogaea* L.)[J]. *Russ J Plant Physl*, 2017, 64(4): 576–587.
- [32] 马海洋, 赵秋芳, 陈曙, 石伟琦, 冼韶敏. 菠萝 *PEPC* 基因家族生物信息学分析[J]. 热带作物学报, 2020, 41(1): 97–103.
- Ma HY, Zhao QF, Chen S, Shi WQ, Xian AM. Bioinformatics analysis of *PEPC* gene family in pineapple [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2020, 41(1): 97–103.
- [33] West-Eberhard MJ, Smith JAC, Winter K. Photosynthesis, reorganized[J]. *Science*, 2011, 332(6027): 311–312.
- [34] Winter K, Holtum JAM. Facultative crassulacean acid metabolism (CAM) plants: powerful tools for unravelling the functional elements of CAM photosynthesis[J]. *J Exp Bot*, 2014, 65(13): 3425–3441.
- [35] Matiz A, Mioto PT, Mayorragg AY, Mayorga AY, Freschi L, Mercier H. CAM photosynthesis in bromeliads and agaves: what can we learn from these plants? [M]// Dubinsky Z, ed. *Photosynthesis*. Rijeka: InTech, 2013.
- [36] Garcia TM, Arcia TM, Heyduk K, Kuzmick ER, Mayer JA. Crassulacean acid metabolism biology [J]. *New Phytol*, 2014, 204: 738–740.
- [37] 李霞, 焦德茂, 戴传超, 王守海, 吴爽, 李成荃. 转育 *PEPC* 基因的杂交水稻的光合生理特性[J]. 作物学报, 2001(2): 137–143.
- Li X, Jiao DM, Dai CC, Wang SH, Wu S, Li CM. Photophysiological characteristics for rice hybrids with transgenic *PEPC* parent HPTER-01 [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2001(2): 137–143.
- [38] 李小博, 许为钢, 雷明月, 张庆琛, 王会伟, 等. 转玉米 C4 光合途径 *PEPC*、*ppdk*、*nadp-me* 基因拟南芥光合特性对强光胁迫的反应[J]. 分子植物育种, 2017, 15(3): 911–919.
- Li XB, Xu WG, Lei MY, Zhang QC, Wang HW, et al. The response of photosynthetic characteristics of maize C4-type *PEPC*, *ppdk* and *nadp-me* transgenic *Arabidopsis thaliana* on high light stress[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(3): 911–919.
- [39] 吴琼, 许为钢, 李艳, 齐学礼, 胡琳, 等. 田间条件下转玉米 C4 型 *PEPC* 基因小麦的光合生理特性[J]. 作物学报, 2011, 37(11): 2046–2052.
- Wu Q, Xu WG, Li Y, Qi XL, Hu L, et al. Physiological characteristics of photosynthesis in transgenic wheat with maize C4-*PEPC* gene under field conditions [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2011, 37(11): 2046–2052.
- [40] 张庆琛, 许为钢, 胡琳, 李艳, 张磊, 齐学礼. 玉米 C4 型全长 *PEPC* 基因导入普通小麦的研究[J]. 麦类作物学报, 2010, 30(2): 194–197.
- Zhang QC, Xu WG, Hu L, Li Y, Zhang L, Qi XL. Development of transgenic wheat plants with maize C4-specific *PEPC* gene by particle bombardment[J]. *Journal of Triticaceae*, 2010, 30(2): 194–197.
- [41] 焦德茂, 李霞, 黄雪清, 匡廷云, 戈巧英, 等. 转 *PEPC* 基因水稻具有初级 CO₂浓缩机制的生理特点[J]. 中国科学(C辑: 生命科学), 2003(1): 33–39.
- Jiao DM, Li X, Huang XQ, Kuang TY, Ge QY, et al. Physiological characteristics of *PEPC* transgenic rice with primary CO₂ concentration mechanism [J]. *Chinese Science (C Series: Life Sciences)*, 2003(1): 33–39.
- [42] Zhao YP, Guo AH, Wang YM, Hua JP. Evolution of *PEPC* gene family in *Gossypium* reveals functional diversification and *GhPEPC* genes responding to abiotic stresses [J]. *Gene*, 2019, 698: 61–71.
- [43] Li YY, Xu JJ, Haq NU, Zhang H, Zhu XG. Was low CO₂ a driving force of C4 evolution: *Arabidopsis* responses to long-term low CO₂ stress[J]. *J Exp Bot*, 2014, 65(13): 3657–3667.

(责任编辑: 周媛)