

单子叶植物不同 *Ppc* 基因构建对烟草转化幼苗生长的影响

张桂芳^{1,2}, 丁在松¹, 赵明^{1*}

(1. 中国农业科学院作物科学研究所, 农业部作物生理生态重点实验室, 北京 100081;

2. 北京师范大学生命科学学院, 北京师范大学学报(自然科学版)编辑部, 北京 100875)

摘要: 为比较单子叶植物 2 种不同形式 (cDNA 和 DNA) 的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC) 基因 (*Ppc*) 在双子叶植物中的表达效果, 本研究将单子叶植物稗草 (*Echinochloa crusgalli*) *Ppc* 基因的 cDNA 和玉米 (*Zea mays*) *Ppc* 基因的 DNA 全长通过农杆菌介导对双子叶植物烟草 (*Nicotiana tabacum*) 进行了遗传转化。GUS 组织化学染色、PCR、RT-PCR 检测结果表明, 2 种形式的 *Ppc* 基因均转入烟草中; 观察分化幼苗生长发育过程发现: 转 *Ppc* 基因 cDNA 的烟草分化苗生长发育正常, 而转 *Ppc* 基因 DNA 的分化幼苗在培养过程中叶片白化现象严重, 未完成正常生长发育过程, 可能是由于完整基因 DNA 在异源细胞中转录起始位点不正确或拼接错误而导致基因表达异常。由此推测在遗传距离较远的物种间转移 DNA 基因序列全长可能会降低正常表达率。净光合速率 (P_n) 的测定结果表明, 大部分转稗草 *Ppc* 基因烟草的 P_n 高于对照, 结果初步证明单子叶植物稗草的根型 PEPC 酶对烟草的光合作用具有一定的调节作用。

关键词: 稗草; 玉米; 烟草; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; 净光合速率; 遗传距离

中图分类号: S435.72

文章编号: 1007-5119(2014)06-0011-06

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2014.06.003

Different Monocotyledonous of *Ppc* Genes on the Growth of Transformed Tobacco Seedlings

ZHANG Guifang^{1,2}, Ding Zaisong¹, ZHAO Ming^{1*}

(1. Institute of Crop Science, CAAS, Key Laboratory of Crop Physiology and Ecology, MOA, Beijing 100081, China;

2. College of Life Science, Editorial Department of Journal of Beijing Normal University (Natural Science), Beijing 100875, China)

Abstract: To compare two different forms (cDNA in monocotyledonous plants *Echinochloa*, DNA in monocotyledon *Zea mays*) of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) gene (*Ppc*) on transformed dicotyledonous plant growth, the *Ppc* genes were *Agrobacterium*-transfected into dicotyledon tobacco. Transformed leaf discs and differentiated seedling leaves were verified with GUS histochemistry, PCR, and RT-PCR. It was found that tobaccos transformed with barnyardgrass cDNA grew better than the complete maize DNA *Ppc* gene. The latter tobacco plants showed lower regeneration efficiency, leaves turned yellow and appeared wilted, possibly due to abnormal chloroplasts, or the complete maize *Ppc* gene was not expressed correctly in tobacco due to incorrect transcription initiation or incorrect splicing. Therefore to transfer DNA gene between genetically-distant species lower normal expression rate. Net photosynthetic rate (P_n) of transgenic tobacco plants transformed with barnyardgrass cDNA was higher than in untransformed tobacco, indicating that over-expressing *Echinochloa* root-*Ppc* gene improved tobacco photosynthesis.

Keywords: baryardgrass; maize; tobacco; phosphoenolpyruvate carboxylase; net photosynthetic rate; genetic distance

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC) 为催化磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 与 HCO_3^- 反应生成草酰乙酸 (OAA) 呈不可逆反应的酶, 在 C_4 植物光合作用的 CO_2 固定反应中发挥着关键性作用。由于 C_4 植物在高温、干旱、强光和低浓度 CO_2 条件下能够保持很高的净光合速率, 由此启示学者们探索利用 C_4 途径关键酶来

优化 C_3 植物的光合作用, 以提高 C_3 植物的净光合效率。大部分 C_4 植物属于单子叶植物的禾本科或莎草科^[1], 而 C_3 植物烟草 (*Nicotiana tabacum*) 属于双子叶植物茄科。由于烟草干物质的 90% 以上来自于叶片的光合作用, 而烟草叶片又是整个植物体干物质来源最重要的器官, 因此, 培育高光效烟草显得尤为重要。目前, 多数的研究集中于将单子叶禾

作者简介: 张桂芳, 博士, 主要从事分子遗传学研究。E-mail: zhangguifang@bnu.edu.cn。* 通信作者, E-mail: zhaomingcau@vip.tom.com

收稿日期: 2014-10-13

本科栽培植物如玉米 (*Zea mays*)^[2-3]、高粱 (*Sorghum*)^[4]、甘蔗 (*Saccharum officinarum*)^[5] 等的 C₄ 型 PEPC 酶基因转入单子叶禾本科 C₃ 植物如水稻中 (*Oryza sativa*), 以改善水稻的光合效率。玉米、甘蔗等植物 C₄ 光合关键酶基因对烟草的转化也有报道^[6-9], 但野生 C₄ 植物稗草 (*Echinochloa crusgalli*) 的光合关键酶基因对烟草的转化未见有报道。由于存在种系起源的遗传距离, 相对影响了单子叶植物 C₄ 光合酶基因对双子叶植物的转化效果^[6,10]。本研究将稗草根型 *Ppc* 基因的 cDNA^[11] 和玉米 *Ppc* 基因的完整 DNA 序列分别转入了烟草中, 用以比较研究 C₄ 单子叶植物 *Ppc* 基因 cDNA、完整 DNA 序列分别导入 C₃ 双子叶植物后的生理表现; 期望获得高水平表达 C₄ 植物 PEPC 酶的转基因烟草株系, 改善烟草的光合碳同化途径, 提高烟草叶片的产量与质量。

1 材料与方法

1.1 实验材料

烤烟品种 G140 由中国遗传与发育生物学研究所赠送, 北京师范大学生命科学学院培养保存。限制性内切酶、连接酶、聚合酶均购自 Takara 公司。抗生素类购自 Sigma。其他试剂均为分析纯。含稗草根型 *Ppc* 基因 cDNA 的表达载体 *pUbi-Eppc* 由中国农业科学院作物研究所实验室构建^[11] 并保存, 含玉米 *Ppc* 基因的 DNA 全长的表达载体 *pCB-ZM Ppc* 由 Matsuoka 赠送。根癌农杆菌 LBA4404、大肠杆菌 DH5 α 及含有助质粒 *pRK2013* 的大肠杆菌 HB101, 均由中国农业科学院作物研究所实验室培养并保存。

1.2 根癌农杆菌 LBA4404 转化

采用三亲杂交法将含目的基因的植物表达载体分别转入根癌农杆菌 LBA4404 中。

1.3 烟草转化

1.3.1 叶片消毒及预培养 选择健康展开的烟草幼叶分别用 70%乙醇和 0.5%次氯酸钠溶液消毒, 然后制成叶盘, 置入附加 6-BA 1mg/L、NAA 0.1 mg/L

的 MS 平板上预培养 2 d。

1.3.2 转化及共培养 将叶盘边缘充分浸湿于 LBA4404 菌液中感染数分钟, 转入覆盖有一层无菌滤纸的附加了 6-BA 1mg/L、吲哚乙酸 (IAA) 0.1mg/L 的 MS 共培养基中于 25 °C 暗培养 2~3 d。

1.3.3 光照继代培养 当共培养基上出现肉眼可见微小菌落时, 将叶盘转入 MS 继代培养基 (附加 6-BA 1mg/L、IAA 0.1 mg/L、头孢霉素 (Cef) 500 mg/L) 28 °C, 光下培养 3 d。

1.3.4 筛选及分化培养 将叶盘转入 MS 筛选培养基 (附加 6-BA 1mg/L、IAA 0.1mg/L、Cef 500mg/L、Hyg 50 mg/L) 培养 7~10 d, 再转入 MS 再生培养基 (附加 6-BA 1 mg/L、Cef 500 mg/L、Hyg 50 mg/L), 15~20 d 观察到叶盘边缘长出愈伤, 1 个月左右转接至新的再生培养基中, 观察愈伤产生分化苗过程, 待分化出数片幼叶时, 将幼苗转入 MS 生根培养基 (附加 Hyg 50 mg/L) 中。生根后的幼苗在水中炼苗 1 周, 然后移栽至花盆中培养。

1.4 转基因烟草鉴定

1.4.1 GUS (β -葡萄糖苷酸酶基因) 组织化学染色 将带有伤口还未分化的烟草叶盘及已分化出的无菌幼叶切出约 0.5 cm² 大小的小块放入新鲜 GUS 染色液 [0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0), 50 mmol/L K₃Fe (CN)₆, 50 mmol/L K₄Fe (CN)₆, 0.5 mol/L Na₂EDTA, 1% Triton, 20 mmol/L X-Gluc] 中于 37 °C 恒温条件处理 1~2 h 或温育过夜, 然后用 70%的乙醇脱色, 直到组织色素去除干净, 显微镜下观察染色情况。

1.4.2 PCR 及 RT-PCR 检测 提取转基因烟草叶片总 DNA, 对目的 *Ppc* 基因用引物^[11] P_{1C} (5'-ATC CGC AGA ACC CCT CCC ACT CCT CAA G -3') 和 P_{2C} (5'-GGC GTT TCT CCT CCG ACC ACT CAG CAT A-3') 扩增。提取转基因烟草叶片总 RNA, 以 Oligo-T₁₇ 为引物进行反转录, 然后继续以 P_{1C} 和 P_{2C} 为引物, 反转录产物为模板, 进行 *Ppc* 基因扩增。扩增后对目的基因片段回收并测序。

1.5 转基因阳性植株培养

通过组织化学、PCR 和 RT-PCR 检验的阳性幼苗继续进行生根、壮苗培养,最后移栽至大棚花盆。

1.6 叶片光合速率 (P_n) 测定

用 Licor-6400 型光合系统测定光合速率 P_n , 设定光强为 $1200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1})$ 、环境温度为 28°C 。

2 结 果

2.1 转基因烟草的转化、培养及分化生长过程

转化后的叶盘 (图 1a) 经共培养 (暗培养) 和继代培养 (光照培养) 1 周后进行筛选和分化培养, 此过程中叶盘逐渐增厚增大, 颜色变浅并脱分化在边缘处产生愈伤组织。数周后在愈伤组织上可观察到预分化黄绿色颗粒, 将绿色待分化组织转至分化培养基上, 28°C 、光下培养 3~4 周后, 开始分化出绿色小苗 (图 1b, 1c)。待小苗长至 4~5 片叶子时转至生根培养基上 (图 1d), 生根后的幼苗在水中炼苗 1 周 (图 1e), 然后移栽至花盆中培养 (图 1f)。

2.2 转基因烟草鉴定

转化后挑选数枚带伤口叶盘, 经 GUS 染色液处理后在显微镜下全部能观察到零星蓝色斑点 (图

2) 出现, 炼苗期间切取幼苗叶片进行 GUS 染色和酒精脱色处理, 结果显示所有转基因幼苗叶片均为显示蓝色沉淀的阳性植株。

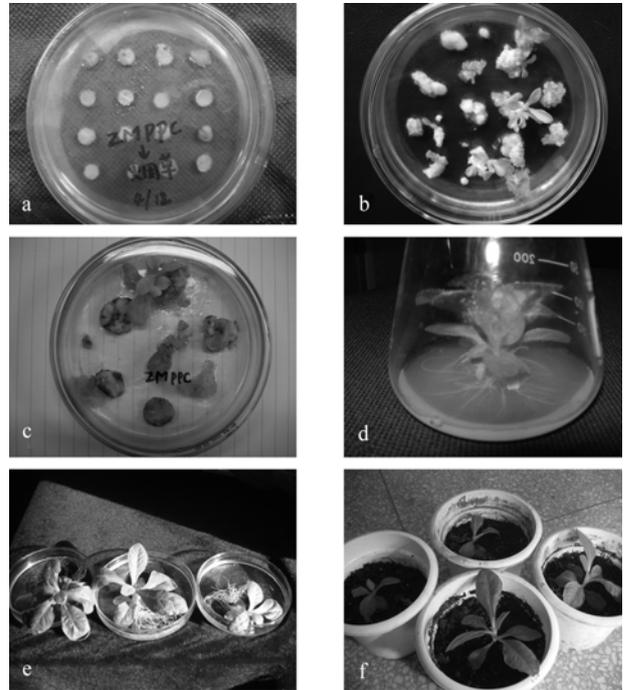


图 1 烟草的转化和培养过程 (a. 叶盘转化; b、c. 转化愈伤组织分化; d. 生根; e. 炼苗; f. 移栽花盆植株)

Fig. 1 Tobacco leaf plate transformation and growth of regenerated plants. (a. leaf plate transformation; b, c. calli selection and regeneration; d. rooting; e. seedling; f. pot planting)

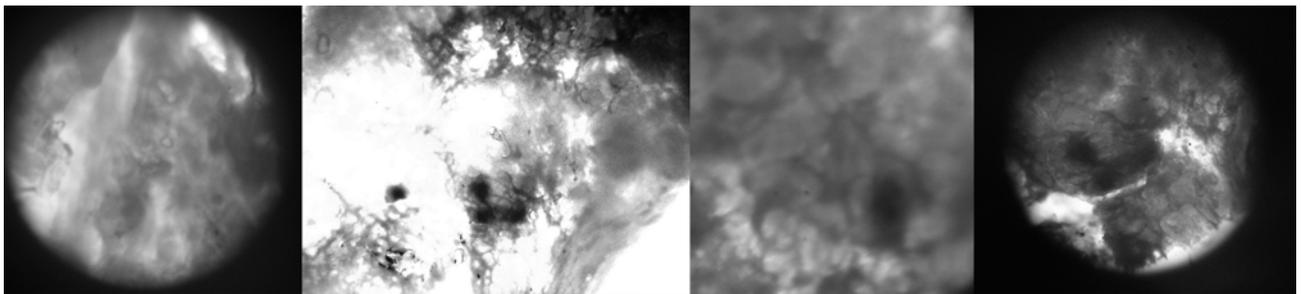


图 2 GUS 染色结果

Fig. 2 The result of GUS staining

2.3 PCR 及 RT-PCR 检测

叶片 DNA 样品 PCR 扩增产物电泳结果见图 3a, 显示转基因烟草均能扩增出稗草根型 0.8 kb 长度的 *Ppc* 基因片段 (1~9 泳道), 相应非转基因植株的扩增信号非常微弱 (对照 1 和 2 泳道); RT-PCR 扩增产物电泳结果见图 3b, 显示转基因烟草样品均扩增出的稗草 0.8 kb 长度的 *Ppc* 基因片段 (1~7 泳道), 相应非转基因植株 (对照) 几乎无扩增信号。

选择扩增信号较强的条带切胶回收并测序, 结果证明 0.8 kb 长度的 DNA 片段与所转的目的 *Ppc* 基因序列完全吻合, 证明所转目的基因在转录水平得到了表达。

2.4 转稗草与转玉米 *Ppc* 基因的烟草分化、生长发育过程对比

观察转稗草 *Ppc*-cDNA 和转玉米 *Ppc*-DNA 烟

草分化、生长发育情况发现,最初从愈伤中分化出的转玉米 *Ppc*-DNA 与转稗草 *Ppc*-cDNA 的烟草幼苗叶片均为鲜绿色,但在继续生根培养过程中多数转玉米 *Ppc*-DNA 苗的叶片逐渐由深绿变浅黄直至整个苗的叶片完全白化而停止生长(图 4a, 4c),部分叶片扭曲成畸形,最后死亡;转稗草 *Ppc*-cDNA 的烟草幼苗除少部分出现白化现象外,大部分苗的叶片始终保持健康绿色(图 4b),完成了整个生长

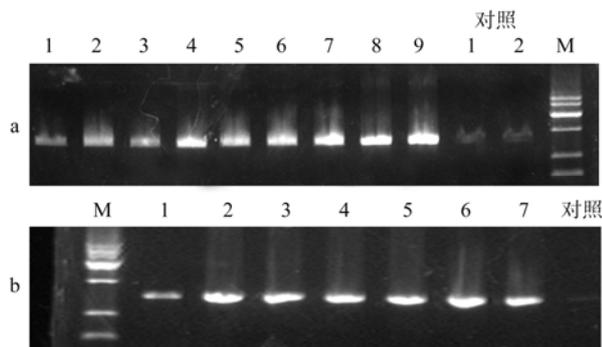


图 3 转基因烟草及对照的 PCR(a)及 RT-PCR (b) 电泳结果 (a. 泳道 1~9 为转基因烟草叶片 DNA 扩增产物; b. 泳道 1~7 为转基因烟草叶片 RT-PCR 扩增产物; M 为 DNA 标准长度由上至下依次为 7500, 5000, 2500, 1000, 500, 250bp)

Fig 3. PCR and RT-PCR detection of *Ppc* gene in transgenic tobacco (a. Lane 1-9: DNA amplification products from transgenic tobacco leaves; b. Lane 1-7: RT-PCR amplification products from transgenic tobacco leaves; M: DNA markers, 7500, 5000, 2500, 1000, 500 bp.)

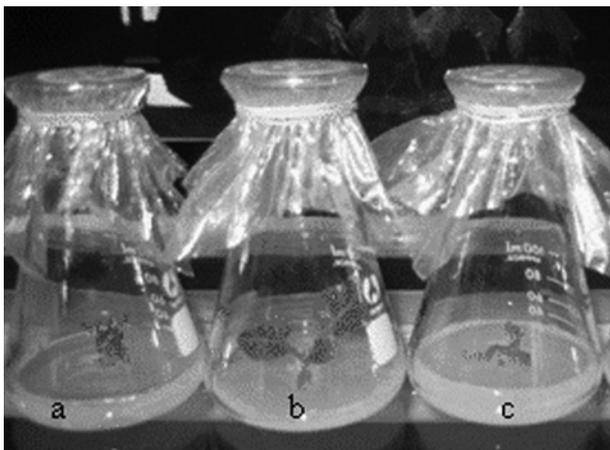


图 4 生根培养的转化苗 (a, c. 转玉米 *Ppc* DNA 幼苗叶片逐渐黄化; 转稗草 *Ppc*(b) c-DNA 幼苗正常生长)

Fig. 4 Transformed seedlings from rooting culture (a, c. Tobacco seedlings transformed with maize *Ppc* DNA gradually turned yellow; b. Green and normally growing seedlings transformed with barnyardgrass *Ppc*)

发育过程。

2.5 转稗草基因烟草净光合速率

由于转玉米 *Ppc* 基因的烟草幼苗最后夭折至盆栽期,没有测得 P_n 数据。测得了 7 株生长良好的转稗草 *Ppc* 基因烟草成株期的 P_n 值,结果见表 1。由表 1 数据可知,7 株转基因烟草中除 G140-*Ecp4* 与 G140-*Ecp7* 这 2 株的 P_n 低于对照外,其他 5 株的 P_n 都高于对照,最高 1 株 G140-*Ecp5* 的 P_n [26.50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{S})$] 高出对照 [22.68 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{S})$] 的 16.84%,另外 2 株 (G140-*Ecp3*, G140-*Ecp6*) 的 P_n 也均高于对照的 10%以上。

此结果初步表明,单子叶植物稗草根型 PEPC 酶对烟草的光合作用具有一定的调节作用。

表 1 转 *Eppc* 基因烟草的 P_n
Table 1 P_n of transgenic tobacco plants

植株编号	$P_n / (\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{S}^{-1})$
G140- <i>Ecp1</i>	23.77
G140- <i>Ecp2</i>	23.95
G140- <i>Ecp3</i>	25.73
G140- <i>Ecp425</i>	22.11
G140- <i>Ecp525</i>	26.50
G140- <i>Ecp6</i>	25.21
G140- <i>Ecp725</i>	21.82
WT	22.68

3 讨论

将单子叶 C_4 植物稗草的根型 *Ppc* 基因 cDNA 和玉米 *Ppc* 基因 DNA 完整序列转入遗传距离较远的双子叶 C_3 植物烟草中,结果发现转入 *Ppc* 基因 cDNA 的烟草分化、生长能力较强,多数植株叶片 P_n 高于非转基因对照, P_n 最高比对照提高了 16.84%,但转入 *Ppc* 基因 DNA 完整序列的烟草生长能力反而较差,分化出的几株绿色幼苗在早期生根壮苗过程中叶片不断有黄化现象发生,可能是由于叶组织细胞中的叶绿体在生长发育过程中破坏比较严重,叶片光合作用能力逐渐减弱,自养能力丧失,未能完成营养生长全过程,最后夭折。由于所转玉米 *Ppc* 基因 DNA 包含了玉米 *Ppc* 基因本身的启动子、内含子及终止子,推断可能是由于玉米 *Ppc* 基因的启动子在烟草细胞中未能准确识别转录起始或终止位点,也有可能发生错误的 m-RNA 拼

接^[12]而导致基因表达异常。而向单子叶作物水稻转移完整的玉米 *Ppc* 基因 DNA, 却能得到高效表达 PEPC 酶的转基因水稻^[13], 证明完整基因的内含子在基因表达中的确起着重要作用。但在遗传距离较远的物种间进行基因转移, 可能会降低完整基因 DNA 在异源植物细胞中的正常表达率, 但不能排除正确转化的可能性, 需要加大转化群体数量以选择表达正常的转基因植株。

本研究结果初步证实, 在遗传距离较远的物种间转移基因的 cDNA 序列, 并选择适应范围较宽的外源启动子, 可能会避免转录过程中发生错误识别、拼接等问题。以往的转基因研究中, 很多植物表达载体的构建选择组成性表达的 CaMV 35S 启动子^[9,14-15], 该启动子在双子叶植物中能够高效启动表达。本研究转入烟草的 *Ppc* 基因 cDNA, 是由组成性表达的 Ubiquitin1 基因的启动子 *pUbi* 启动, *pUbi* 启动子的作用是 CaMV 35S 启动子的 10 倍, 我们已经获得了正常表达稗草 *Ppc* 基因的转基因烟草, 且转基因植株的光合效率得到了不同程度的提高, 我们将进一步选育高水平表达 C₄ 植物 PEPC 酶的烟草株系, 以改善烟草的光合碳同化途径, 提高烟草叶片的生产力。

将稗草根型 *Ppc* 基因 cDNA 转入烟草, 不仅对研究烟草在自然生长条件下光合生理特性的改变具有一定的意义, 由于 PEPC 同工酶还参与植物其他代谢的调控过程^[16-17], PEPC 表达受抑制能够改变代谢模式使碳原子的流向从糖类物质的合成转向脂肪酸的合成^[18-19]。根型 PEPC 为非光合类型同工酶, 能够参与植物生长发育过程中许多其他功能, 如根型 PEPC 同工酶活性的增加可增加番茄的氮同化能力^[20], 我们还可进一步研究转基因烟草在各种逆境条件(如高温、高光强、干旱等)下的生长发育状况, 以确定根型 PEPC 同工酶在烟草中表达后执行的具体功能。

4 结 论

单子叶 C₄ 植物稗草根型 *Ppc* 基因的 cDNA 在组成性表达的 Ubiquitin1 基因的启动子调控下, 转

入遗传距离较远的双子叶植物烟草中, 转基因烟草的分化生长能力较强, 得到了 Pn 高于非转基因对照的转稗草根型 *Ppc* 基因的烟草; 转入玉米 *Ppc* 基因 DNA 完整序列的烟草生长能力反而较差, 幼苗在早期容易发生黄化现象, 叶片光合作用能力弱, 可能是转录过程中发生了错误识别、拼接等问题。导致基因表达异常, 证明单子叶完整基因 DNA 在遗传距离较远的双子叶植物细胞中可能会降低正常表达率。

参考文献

- [1] 张晓可, 王海军, 茹辉军, 等. 黄河干流河岸带 C₄ 植物群落特征及其对水库生态效应的指示[J]. 武汉植物学研究, 2010, 28 (5): 568-576.
- [2] Ku M S B, Agarie S, Nomura M, et al. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants [J]. Nature Biotechnology, 1999, 17: 76-80.
- [3] Fukayama H, Hatch M D, Tamai L, et al. Activity regulation and physiological impacts of maize C₄-specific phosphoenolpyruvate carboxylase over-produced in transgenic rice plants[J]. Photosynthesis Research, 2003, 77: 227-239.
- [4] 张方, 迟伟, 金成哲, 等. 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.
- [5] 丁在松. 谷子和甘蔗 C₄ 型磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的克隆及其转基因水稻光合效率的提高[D]. 北京: 中国科学院植物研究所, 2004.
- [6] Hudspeth R, Grula J W, Dai Z Y, et al. Expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic tobacco [J]. Plant Physiol, 1992, 98: 458-464.
- [7] 杨荣仲, 谭裕模, 张木清, 等. 甘蔗 C₄ 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因转化烟草研究初报[J]. 热带作物学报, 2004 (2): 61-65.
- [8] Häusler R E, Rademacher T, Li J, et al. Single and double overexpression of C₄-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]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52: 1785-1803.
- [9] Kogami H, Shono M, Koike T, et al. Molecular and physiological evaluation of transgenic tobacco plants expression a maize phosphoenolpyruvate carboxylase gene under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter[J]. Transgenic Res, 1994(3): 287-296.
- [10] Keith B, Chua N H. Monocot and dicot pre-mRNAs are processed with different efficiencies in transgenic

- tobacco[J].EMBO J, 1986, 5: 2419-2425.
- [11] 张桂芳, 赵明, 丁在松, 等. 稗草磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPCase) 基因的克隆与分析[J]. 作物学报, 2005, 31 (10): 1365-1369.
- [12] Goodall G J, Filipowicz W. Different effects of intron nucleotide composition and secondary structure on pre-mRNA splicing in monocot and dicot plants [J]. EMBO J, 1991, 10: 2635-2644.
- [13] Ku M S B, Agarie S, Nomura M, et al. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants [J]. Nature Biotech, 1999, 17: 76-80.
- [14] 焦改丽, 孟钊红, 聂安全, 等. 花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子在转基因棉花中的表达[J]. 作物学报, 2004, 30 (11): 1135-1139.
- [15] Chen Dexi, Chen Xuwei, Ma Bingtian, et al. Genetic Transformation of Rice with Pi-d2 Gene Enhances Resistance to Rice Blast Fungus [J]. Magnaporthe oryzae. Rice Science, 2010, 17(1): 19-27.
- [16] Brendan O L, Joonho P, William C P. 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: 15-34.
- [17] Pan Lijuan, Yang Qingli, Chi Xiaoyuan, et al. Functional analysis of the phosphoenolpyruvate carboxylase on the lipid accumulation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Seeds Journal of Integrative Agriculture, 2013, 12(1): 36-44.
- [18] Kubis S E, Pike M J, Everett C J, et al. The import of phosphoenolpyruvate by plastids from developing embryos of oilseed rape, *Brassica napus* (L.), and its potential as a substrate for fatty acid synthesis [J]. J Exp Bot, 2004, 55(402): 1455-1462.
- [19] Wu G T, Lang C X, Hu A H, et al. Raising fat content in transgenic rice by anti-PEP gene transformation. J Plant Physiol Mol Biol, 2006, 32(3): 339-344.
- [20] Igor Setián, Izargi Vega-Mas, Natalia Celestino, et al. Root phosphoenolpyruvate carboxylase and NAD-malic enzymes activity increase the ammonium-assimilating capacity in tomato[J]. Journal of Plant Physiology, 2014 (171): 49-63.