

## 植物丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)研究进展

王真梅, 李海霞, 何莹, 曾汉来\*

华中农业大学植物科学技术学院, 农业部长江中游作物生理生态与耕作重点实验室, 武汉430070

**摘要:** 丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)是C<sub>4</sub>植物和景天科酸代谢(CAM)植物光合作用的关键酶, 催化形成固定CO<sub>2</sub>的初始分子受体磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)。本文重点比较了植物的PPDK基因结构及分子进化关系, 综述了PPDK在C<sub>4</sub>植物和C<sub>3</sub>植物中的功能、PPDK的调控机理、PPDK在胁迫条件下的功能以及转PPDK基因等在近年来的研究进展。

**关键词:** 丙酮酸磷酸双激酶; 活性调控; 胁迫; 基因工程

## Advances in Plant Pyruvate, Orthophosphate Dikinase

WANG Zhen-Mei, LI Hai-Xia, HE Ying, ZENG Han-Lai\*

Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System in the Middle Reaches of the Yangtze River, Ministry of Agriculture, College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** Pyruvate, orthophosphate dikinase (PPDK) is a cardinal enzyme of the C<sub>4</sub> and CAM pathway. Its role in C<sub>4</sub> photosynthesis is to catalyze the regeneration of the CO<sub>2</sub> acceptor PEP. This chapter addresses the comparisons among plant PPDK genes and the evolution and phylogenetic distribution of PPDK. The current state-of-knowledge on PPDK functions in C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub> plants and the regulation of PPDK are described. Also reviewed are the role of PPDK in stress and transgenic plants expressing PPDK.

**Key words:** pyruvate, orthophosphate dikinase; activity regulation; stress; genetic engineering

丙酮酸磷酸双激酶(pyruvate, orthophosphate dikinase或pyruvate, phosphate dikinase, PPDK, EC 2.7.9.1)是C<sub>4</sub>途径和景天科酸代谢(crassulacean acid metabolism, CAM)途径的限速酶, 催化ATP、丙酮酸(pyruvate)和Pi经三步反应生成磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP), 此反应具有可逆性, 而PEP则是CO<sub>2</sub>的受体, 因此PPDK对光合功能具有重要调节作用。已有研究表明PPDK基因具有2个不同的转录起始位点, 分别受2个启动子控制。其中, 长转录物翻译为C<sub>4</sub>型PPDK蛋白, 含有一段转运肽, 其表达具有组织特异性及光诱导性, 而短转录物翻译为胞质型PPDK蛋白。有研究指出C<sub>4</sub>光和途径是在低大气CO<sub>2</sub>浓度和较高温气候条件下由C<sub>3</sub>光合途径进化而来的(Christin等2008), 并在C<sub>3</sub>植物水稻、拟南芥等及Flaveria属的C<sub>3</sub>和C<sub>4</sub>植物中发现PPDK基因均具有类似的双元启动子结构和表达模式, 为C<sub>4</sub>植物是由C<sub>3</sub>植物进化而来提供了证据。C<sub>4</sub>型PPDK的活性受到光照调控, 通过PPDK调控蛋白(PDRP)的可逆磷酸化来活化/失活该酶。虽然胞质型PPDK的表达量较低, 但胞质型PPDK的非光合作用可能对pH维持、柠檬酸循环中间产

物的补偿方面有重要作用。在各种非生物胁迫(如干旱、低温、高盐、UV-B)下, PPDK的含量及活性发生改变。此外, 植物在病毒感染的生物胁迫中, PPDK的活性增强。目前对PPDK在C<sub>3</sub>植物中的作用及非光合作用功能研究受到重视, 明确其功能与机理, 以期利用基因工程手段调节植物的碳循环来提高植物的光合效率, 以及增强植物的抗逆性。

### 1 植物PPDK的基因结构及进化关系

目前, 已经从一些高等植物如玉米、水稻、拟南芥、高粱、甘蔗、家稗和Flaveria属等植物中克隆到了PPDK基因, 它们的PPDK基因有很高的同源性。

C<sub>4</sub>植物玉米PPDK基因由19个外显子组成, 跨越12 kb, 其氨基酸序列在1988年首次由玉米cDNA克隆推导而来。玉米PPDK的cDNA编码一段由

收稿 2012-05-24 修定 2012-07-13  
资助 湖北省自然科学基金重点项目和中国博士后科学基金项目(20100480914)。

\* 通讯作者 (E-mail: zenghl@mail.hzau.edu.cn; Tel: 027-8728-3465)。

947个氨基酸组成的102.7 kDa的多肽(Matsuoka等1988)。玉米PPDK基因在核基因组中的定位最初是通过RFLP (restriction fragment length polymorphism, 限制性内切酶片段长度多态性)技术实现的, 定位在第6染色体上(Matsuoka 1990)。对玉米PPDK基因家族的克隆分析表明, 该家族含有两个成员, 其中一个位点PPDK1采用双启动子结构分别编码C<sub>4</sub>型(基因: C4PPDKZM1)和胞质型PPDK(基因: CYPPDKZM1), 通过2个启动子分别从2个不同的转录起始位点转录, 产生2段不同长度的mRNA。长转录物包含436 bp的第一外显子, 编码71个氨基酸(7.3 kDa)组成的叶绿体转运肽, 其余876个氨基酸组成C<sub>4</sub>型成熟PPDK在叶绿体中行使功能, 而短转录物不包括该转运肽, 其产物在细胞质中发挥作用; 另一个位点PPDK2编码胞质型PPDK(基因: CYPPDKZM2)(Matsuoka 1995)。对玉米C<sub>4</sub>型PPDK基因组序列分析表明, 玉米2个PPDK拷贝的编码区以及5'侧翼到TATA box之间的序列有很高的同源性, 该基因的5'端有2段30 bp的重复序列, 该序列可能参与了光调控表达(Glackin和Gruha 1990)。每一个PPDK基因在根、茎、叶中有独立的表达系统。光诱导的C4PPDKZM1基因表达调控受两种不同的表达模式控制, 通过对不同的上游调控序列的活化来实现, 该活化发生在叶片中, 在根和茎中处于失活状态。位于C4PPDKZM1第一内含子中独立的上游原件以及特异的TATA启动子原件是CYPPDKZM1基因表达所必须的。CYPPDKZM2的低表达水平可能是由于缺乏上游正调控原件以及低活性的TATA启动子原件。玉米中光介导C4PPDKZM1表达与叶片的发育无关, 与叶绿体的发育部分相关(Sheen 1991)。

与玉米的PPDK基因结构类似, C<sub>3</sub>植物水稻至少有2个PPDK编码位点(PPDK1和PPDK2), 其中PPDK2定位在水稻第3染色体上, 包含18个外显子, 编码一个由887氨基酸组成、96.6 kDa的胞质型PPDK, 对应基因符号为CPDK2。PPDK1与玉米的C<sub>4</sub>型PPDK基因结构非常相似, 定位在水稻第5染色体上, 全长11 kb, 包含21个外显子, 有20个内含子插入, 比玉米C<sub>4</sub>型PPDK基因多2个内含子, 它们是第1内含子和第4内含子, 分别插入到玉米第1外显子5'非编码区及第3外显子中。PPDK1第1外显子仅包含5'非编码区, 而第2外显子除了含有45 bp的

5'非编码区外, 还包括了225 bp的转运肽编码区。外显子长度范围是57~345 bp, 除第2内含子外, 内含子长度范围是81~1 458 bp。PPDK1除了比玉米基因多2个额外内含子外, 其余内含子插入位点与玉米C<sub>4</sub>型PPDK基因基本一致。与玉米C<sub>4</sub> PPDK的编码方式类似, PPDK1有2个功能独立的启动子, 分别产生一个包含有转运肽的类C<sub>4</sub>型PPDK(947个氨基酸, 102.8 kDa)长转录产物PPDKB, 以及一个不含有转运肽的胞质型PPDK(882个氨基酸, 96.2 kDa)短转录产物CPDK1(Imaizumi等1997)。C<sub>3</sub>植物拟南芥有一个PPDK位点, 由17个外显子和16个内含子组成, 也存在这种双启动子结构, 分别编码胞质型和叶绿体型PPDK(Parsley和Hibberd 2006)。

目前Flaveria属的不同光合类型植物的PPDK基因已经得到了克隆, Flaveria属植物是双子叶植物, 其光合碳同化途径多样, 包括C<sub>3</sub>途径的*F. pringlei*, 介于C<sub>3</sub>和C<sub>4</sub>之间的*F. chloraefolia*、*F. brownii*和*F. linearis*, 以及C<sub>4</sub>途径的*F. trinervia*和*F. bidentis*等。C<sub>3</sub>植物*F. pringlei*与C<sub>4</sub>植物*F. trinervia*的C<sub>4</sub>型PPDK氨基酸序列有96%的同源性。这些差异氨基酸均匀的分布在多肽链中。对上述克隆的基因序列分析表明, 它们的编码区高度同源, 暗示了PPDK在这些种中是单拷贝。通过比较PPDK基因在上述Flaveria属植物中的表达发现其表达丰度与光合作用类型相关, 表达水平的升高在Flaveria属植物由C<sub>3</sub>植物向C<sub>4</sub>植物的进化过程中扮演了重要的角色。PPDK基因在*F. trinervia*中以单拷贝的形式出现, 该基因全长13 kb, 由21个外显子组成, 与水稻类C<sub>4</sub> PPDK基因类似, 通过2个内含子插入, 比玉米C<sub>4</sub>型PPDK基因多了2个外显子。通过双启动子可以实现两种类型PPDK的产生, C<sub>4</sub>型PPDK在叶片中大量积累, 同时也在茎和根中表达, 其转录物长3.4 kb; 胞质型PPDK在根中有表达, 其转录物长3.0 kb, 编码细胞质转运肽部分缺失。3.4 kb的转录物积累是由光调控的。暗诱导可以使这种在叶片和茎中的转录急剧减少, 取而代之的是转运肽缺失、3.0 kb的转录物得到积累, 但是这种积累只存在于茎和根中, 而不存在于叶片中。与玉米PPDK基因调控类似, 都是通过PPDK的同一段5'非编码区的顺式作用原件调控了C<sub>4</sub>型PPDK在叶肉细胞以及其他器官中的表达(Rosche等1994; Rosche和Westhoff 1995; Rosche等1998)。

甘蔗(*Saccharum officinarum*) *PPDK*基因长3 172 bp, 其中编码区长2 841 bp, 可翻译成947个氨基酸(Burnell和Bresolin 2000)。王金明等(2007)从C<sub>4</sub>植物家稗(*Echinochloa crusgalli* var. *frumentacea*)中克隆了全长为3 085 bp的*PPDK*基因cDNA, 其中编码区为2 844 bp, 编码948个氨基酸, 与高粱(*Sorghum bicolor*)、甘蔗(*Saccharum officinarum*)、玉米(*Zea mays*)等C<sub>4</sub>型*PPDK*基因的相似性分别为85.1%、84.0%和82.0%, 与水稻(*Oryza sativa* var. *japonica*)的C<sub>3</sub>型*PPDK*相似性高达82.6%。王森等(2011)从C<sub>4</sub>植物籽粒苋(*Amaranthus hypochondriacus*)中克隆了*PPDK*基因, 全长为3 224 bp, 956个氨基酸由2 868 bp的编码区编码, 在绿色组织中特异表达。

*PPDK*基因特殊的双启动子转录系统不是玉米C<sub>4</sub>型*PPDK*基因特有的, 在水稻、拟南芥(C<sub>3</sub>植物)和*Flaveria*属的C<sub>3</sub>及C<sub>4</sub>植物中都发现了类似的结构。说明这种双启动子系统是C<sub>3</sub>和C<sub>4</sub>植物中*PPDK*的共有特点(Imaizumi等1997; Matsuoka 1995; Parsley和Hibberd 2006)。在水稻中这两种转录物的表达是不同的, 水稻胞质型*PPDK*启动子活性很高, 而C<sub>4</sub>型*PPDK*的启动子活性相对要低。相比之下, 玉米的两种启动子都有较高的活性。除了玉米的C<sub>4</sub>型*PPDK*启动子活性要高于水稻外, 水稻中类C<sub>4</sub>的*PPDK*与玉米的C<sub>4</sub>型*PPDK*不仅在基本的结构方面, 在表达调控方面也有很高的相似性, 表明在C<sub>4</sub>植物进化过程中对C<sub>3</sub>型*PPDK*的遗传改变是相对有限的。两个额外内含子在双子叶*Flaveria*属以及单子叶水稻C<sub>4</sub>型*PPDK*的相同位点中被发现, 证明这2个内含子在单子叶和双子叶植物分化以前的祖先基因中就已经存在了(Imaizumi等1997)。

*PPDK*首先在C<sub>4</sub>植物中发现(Hatch和Slack 1968), 此外在细菌、原生动物、C<sub>3</sub>和CAM植物中均有发现, 但不存在于哺乳动物体内(Evans和Wood 1968; Reeves 1968)。虽然*PPDK*在C<sub>4</sub>植物和细菌中的四级结构不同——在C<sub>4</sub>植物中是同型四聚体, 而在细菌中是同型二聚体(Pocalyko等1990), 但是他们的初级结构都十分类似, 只是细菌和原生动物的*PPDK*不含有转运肽, 这暗示*PPDK*基因在原核生物和真核生物分化以前就已经存在了

(Matsuoka 1995)。

对部分植物、细菌及原生动物*PPDK*的氨基酸序列进行系统进化树分析(图1), 结果表明: 单子叶(如水稻、玉米)和双子叶植物(如*Flaveria*属、冰叶日中花和拟南芥)的*PPDK*同源性不同, 玉米C<sub>4</sub>型*PPDK*与同是禾本科C<sub>3</sub>型*PPDK*的同源性较双子叶C<sub>4</sub>型*PPDK*高。植物中的*PPDK*根据光合作用类型的不同, 同源性有差异, 光合作用类型相近的物种(如*Flaveria*属的*F. bidentis*和*F. trinervia*) *PPDK*的同源性较强。说明C<sub>3</sub>植物在向C<sub>4</sub>植物进化的过程中, 保留了大部分C<sub>3</sub>*PPDK*基因序列。对拟南芥和玉米*PPDK*基因的5'和3'非转录区的分析证明了这些C<sub>3</sub>基因中的顺式作用元件促进了C<sub>4</sub>光合作用的进化, 此外, C<sub>3</sub>反式作用元件在C<sub>4</sub>功能叶片的进化中也起到了重要的作用(Kajala等2012)。

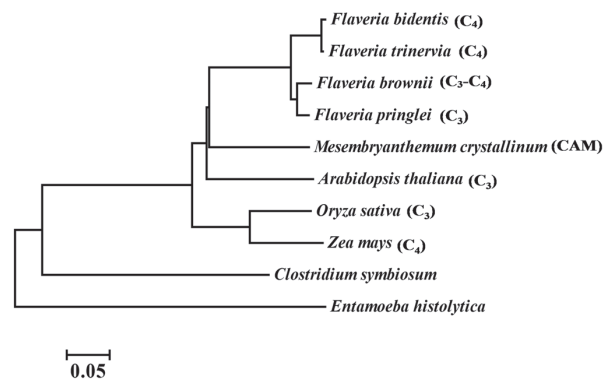


图1 植物、细菌和原生动物*PPDK*系统进化树

Fig.1 The phylogenetic distribution of *PPDK* from plants, bacteria and protozoa

参考Matsuoka (1995)文献略有改动。 *Flaveria*属植物: *Flaveria bidentis* (C<sub>4</sub>) (Q39735), *Flaveria trinervia* (C<sub>4</sub>) (CAA40420), *Flaveria brownii* (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>) (CAA55784), *Flaveria pringlei* (C<sub>3</sub>) (CAA53223); 其他植物: *Mesembryanthemum crystallinum* 冰叶日中花(CAM) (CAA57872), *Arabidopsis thaliana* 拟南芥(C<sub>3</sub>) (O23404), *Zea mays* 玉米(C<sub>4</sub>) (AAA33495), *Oryza sativa* 水稻(C<sub>3</sub>) (BAA22419); 细菌: *Clostridium symbiosum* (P22983); 原生动物: *Entamoeba histolytica* (P37213)。

## 2 植物*PPDK*的功能

PEP酶家族通常是通过3个结构域实现可逆的催化反应, *PPDK*是PEP酶家族成员, 通过一个高度保守的His残基介导磷酸基团的转移(McGuire等1996; Tjaden等2006)。 *PPDK*中催化残基His位于磷酸转运结构域内, 对玉米*PPDK*晶体结构的研究

证实了该结构域通过一段15~30个氨基酸残基组成的内源结构域连接肽(或称旋转结构域)实现在N端和C端底物结合域之间的往复自由旋转,使磷酸基团得以转运(McGuire等1996; Nakanishi等2005; Lin等2006; Lim等2007)。植物和细菌的PPDK都含有一段高度保守的活化序列GMTSHAAVVAR/G, 原生动物的PPDK也含有一段类似序列GKT-SHAAVVAR, 其中T为调控位点, H为催化位点(Goss等1980; Roeske等1988)。在植物体内, PPDK是C<sub>4</sub>途径和景天科酸代谢途径的限速酶(Mallona等2001; Wang等2008)。在C<sub>4</sub>光合途径中, PPDK的功能是催化ATP及丙酮酸生成PEP, PEP作为初始CO<sub>2</sub>受体进一步生成苹果酸。PPDK催化的反应为: 丙酮酸+ATP+Pi $\rightleftharpoons$ PEP+AMP+PPi。此反应分三步进行:

(1) E-His-P<sup>γ</sup>P<sup>β</sup>P<sup>α</sup>-Ade+Pi $\rightleftharpoons$ E-His-P<sup>β</sup>P<sup>γ</sup>•P<sup>α</sup>-Ade•Pi

(2) E-His-P<sup>β</sup>P<sup>γ</sup>•P<sup>α</sup>-Ade•Pi $\rightleftharpoons$ E-His-P<sup>β</sup>+P<sup>α</sup>-Ade+P<sup>γ</sup>Pi

(3) E-His-P<sup>β</sup>+丙酮酸 $\rightleftharpoons$ E-His+PEP<sup>β</sup>

首先是ATP与该酶的N端结构域结合, 利用ATP (P<sup>γ</sup>P<sup>β</sup>P<sup>α</sup>-Ade)的β和γ磷酸基团转移对中心催化残基His (E-His)进行焦磷酸化, 然后将γ磷酸基团转移到一个自由磷酸基团上形成焦磷酸(PPi)、AMP (P<sup>α</sup>-Ade)以及E-His-P<sup>β</sup>, 最后通过磷酸转运结构域在C端丙酮酸结合域的活化位点将P<sup>β</sup>转移到丙酮酸上, 形成PEP, 以上各步反应具有可逆性(Parsley和Hibberd 2006; Chastain等2011)。

在C<sub>4</sub>植物叶绿体基质中, PPDK大量存在, 而在C<sub>3</sub>植物中, 由于PPDK的表达量很低, PPDK的功能还知之甚少(Edwards等1985; Chastain等2006; Burnell和Chastain 2006)。PPDK主要存在于C<sub>3</sub>植物未成熟种子(小麦、水稻、拟南芥、豌豆、绿豆、李子、蓖麻等)、根、胚芽鞘和叶片(烟草、菠菜、向日葵、小麦、水稻等)中(Aoyagi和Bassham 1984; Parsley和Hibberd 2006)。种子中的PPDK调控氨基酸代谢和淀粉合成, 而主叶脉中的PPDK为通过莽草酸途径合成木质素提供PEP。Kang等(2005)认为PPDK存在代谢补偿效应, 定位在水稻胚乳细胞质的PPDK可能与籽粒发育早期的代谢相关, 如自由氨基酸合成、脂肪酸从头合

成以及脂类代谢等。拟南芥子叶中的PPDK将由氨基酸转化而来的丙酮酸转换成PEP, PEP参与糖异生等生理生化反应; 而在叶片中的PPDK为花器官的发生提供N活化的碳骨架(Parsley和Hibberd 2006)。拟南芥叶片细胞质型PPDK对叶片自然衰老的氨基酸转运过程有重要作用, 该酶可以显著地加速叶片中N代谢, 从而增加种子的重量和N含量。其机理可能包括: 由蛋白降解过程中产生的氨基酸转化为丙酮酸; 由PPDK和PEPC催化形成PEP和草酰乙酸; 以及通过柠檬酸循环产生谷氨酸和谷氨酰胺的前体α酮戊二酸(Taylor等2010)。

在缺乏丙酮酸激酶的原生动物*Entamoeba histolytica*和*Bacteroides symbiosus*中, PPDK的功能是催化PEP生成ATP (Reeves 1968; Pocalyko等1990)。

### 3 植物PPDK活性的调控

在C<sub>4</sub>光合途径中, PPDK的活性是由光照调控的, 即在黑暗条件下, 叶片中的PPDK活性下降, 经光诱导后活性快速恢复(Edwards等1985), 并且PPDK只受红、蓝光谱活化(Yamamoto等1974)。光合磷酸化的解耦连剂DCMU可以抑制PPDK的光活化(Nakamoto和Edwards 1986)。这些证据表明PPDK的活性可能是由于诸如pH、氧化还原态、二价阳离子浓度、Pi等叶肉细胞叶绿体基质的生理变化而改变的(Chastain 2011)。此外, 通过对经暗适应失活的PPDK在适温孵育后恢复活性等的研究发现PPDK的活性是通过PPDK调控蛋白(pyruvate orthophosphate dikinase regulatory protein, PDRP)进行调控的(Hatch和Slack 1968; Edwards等1985)。PDRP为低丰度蛋白, 其含量不到玉米叶片可溶性总蛋白含量的0.04%, 与PPDK同时存在于叶肉细胞叶绿体基质中(Chastain 2011)。PDRP首先从玉米的叶肉细胞和维管束鞘细胞的叶绿体中分离得到(Majeran等2005), 然后从玉米的cDNA文库中克隆了该基因——*RPI* (Burnell和Chastain 2006)。同时C<sub>4</sub>型PDRP也从拟南芥中得到了克隆。在拟南芥等十字花科植物中, PDRP由*AtRPI*和*AtRP2*两个基因编码, *AtRPI*编码定位于叶绿体的PDRP, 具有和C<sub>4</sub>型PDRP类似的双重蛋白激酶/磷酸酶功能; *AtRP2*编码定位于细胞质的PDRP, 只有蛋白激酶功能, 没有磷酸酶功能(Chastain等2008)。玉米PDRP具有Ser/Thr激酶和磷酸酶活性,

通过对PPDK调控位点Thr-456 (玉米PPDK)的氨基酸残基进行可逆磷酸化来调控PPDK失活(磷酸化)和PPDK活化(去磷酸化)。在无光照或者光照减弱的条件下, PDRP对PPDK的调控位点Thr进行磷酸化使PPDK失活, 经过暗适应后, 失活的PPDK催化位点His残基去磷酸化, 只有这种失活状态的PPDK才能再次被PDRP催化, 使Thr残基去磷酸化, PPDK活性恢复(图2) (Burnell和Hatch 1983, 1985; Ashton等1984; Budde等1985; Chastain等2006)。

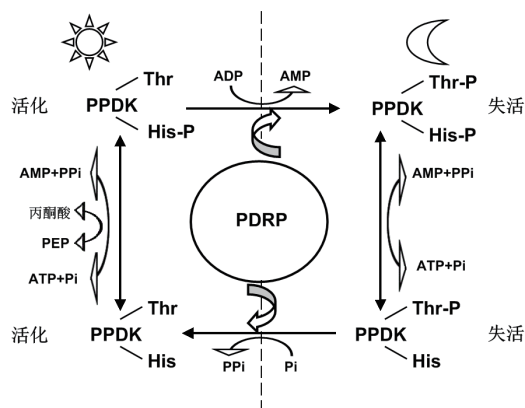


图2 光/暗介导的PPDK可逆磷酸化

Fig.2 Light/dark mediated reversible phosphorylation of PPDK

参照Edwards等(1985)文献略有改动。Thr为PPDK的调控位点, His为PPDK的催化位点。PDRP对PPDK的调控是通过对PPDK调控位点Thr进行可逆磷酸化来实现PPDK失活(磷酸化)和PPDK活化(去磷酸化)。

PDRP对PPDK的调控可以用ADP抑制模型解释(图3): PDRP有两个催化位点, 一个是蛋白激酶催化位点, 一个是蛋白磷酸酶催化位点, ADP与PDRP蛋白激酶活化位点结合会抑制其磷酸酶活性, 此时PDRP行使蛋白激酶功能, 将ADP上的Pi转移到PPDK上, 使PPDK磷酸化; 反之, ADP与PDRP蛋白激酶活化位点的解离使磷酸酶活性恢复, 此时PDRP行使磷酸酶功能, 催化PPDK去磷酸化。ADP在作为PDRP底物的同时还是PDRP催化反应的底物, 于是产生了竞争性抑制。PDRP的催化方向取决于细胞质中ADP的含量。在光强减弱的条件下, 光和磷酸化作用减弱, 胞质中ADP的含量升高, 促使PDRP催化PPDK磷酸化; 而在光照条件下, 活跃的光合磷酸化消耗了基质中的ADP, 促使PDRP催化PPDK去磷酸化。PDRP在C<sub>3</sub>植物菠菜

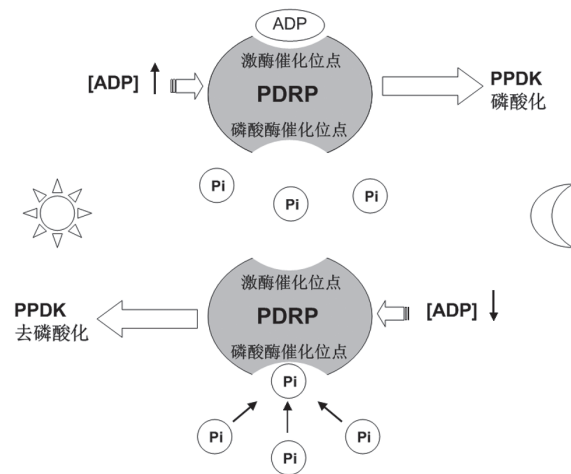


图3 PDRP对PPDK调控的ADP抑制模型

Fig.3 Model for ADP-as-attenuator of PDRP regulating PPDK activity

参照Chastain (2011)文献略有改动。

(*Spinacia oleracea*)、蚕豆(*Vicia faba*)、水稻(*Oryza sativa*)以及拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)叶绿体中对胞质型PPDK有类似的光调节机制(Fukayama等2001; Chastain等2002; Chastain和Chollet 2003)。

虽然这种ADP抑制模型能够很好的解释PDRP催化可逆反应之间的平衡, 但是还存在一些问题亟待解决。首先在进化过程中ADP作为磷酸基团的供体是严格被避免的, 为何在C<sub>4</sub>植物中保留了ADP介导的磷酸化失活(Edwards等1985)。其次需要更精确的C<sub>4</sub>叶肉细胞质中腺苷酸浓度的证据。此外PDRP蛋白的双向调控与PPDK失活后磷酸基团仍然存在于PPDK的His催化残基上有关, 但暗适应可以使磷酸化的PPDK迅速去磷酸化, 这种快速去磷酸化是如何发生的还未知。由于PDRP从C<sub>4</sub>叶片分离出来后的不稳定性, 其转录后调控机制的研究还不明朗。目前还没有间接证据表明PDRP有转录后调控(如可逆磷酸化)或者是由内源因子(如胞质pH)调控的(Chastain 2011)。

在CAM植物中, PPDK基因的表达同样受光照调节, 在光活化的仙人掌(*Opuntia ficus var. indica*)的扁平叶状茎中, PPDK的表达具有12 h的光周期性, 即PPDK的相对表达量随着昼夜变化呈12 h的正弦曲线型波动(Mallona等2011)。

#### 4 植物PPDK在胁迫下的功能

C<sub>4</sub>型PPDK在低温、UV-B、高盐等胁迫条件

下的作用已有初步研究(Doubnerova和Ryslava 2011)。玉米PPDK在温度低于12 °C时失活,可能是由于四聚体的解聚造成的,PPDK的失活可能是低温下玉米光合速率降低的原因(Ohta等2004)。高大芨子草(*Miscanthus×giganteus*)是一种C<sub>4</sub>型生物能源作物,在寒冷气候下光合作用仍维持较高水平,这使其生长周期延长,保证了较高的生物产量。对高大芨子草和C<sub>4</sub>植物玉米进行低温(14 °C)和适温(25 °C)处理,经过比较发现,和玉米维持C<sub>4</sub>高光效的酶不同,高大芨子草C<sub>4</sub>光合途径中的限速酶PPDK对维持高大芨子草在低温下的光合效率起主要作用。在低温下,PPDK转录水平和PPDK酶浓度的提高增加了PPDK的活性稳定性(Wang等2008)。Casati等(2005)首次发现在UV-B胁迫下,玉米PPDK的Thr-526残基发生了磷酸化。PPDK在阳光UV-B辐射及补充UV-B辐射的条件下表达量上升,但是在温室中补充UV-B,其表达量下调。这种复杂的蛋白响应机制暗示了光质和光量在光合作用酶活性的调控中发挥重要作用。用250 mmol·L<sup>-1</sup>的NaCl对两种不同基因型玉米在苗期进行盐胁迫,发现NaCl增加了杂交品种‘Hybrid351’中PPDK的含量,降低了‘Giza2’中PPDK含量。对PPDK活性分析发现,在处理的前2 d, NaCl显著地抑制了PPDK活性,但是在杂交品种中这种抑制作用消失(Nemat Alla和Hassan 2011)。而Omoto等(2012)同样对苗期玉米进行了盐渍处理,叶肉细胞中PPDK的活性却显著增强。

目前,胞质型PPDK与胁迫的关系也有报道,主要集中在低氧、缺水、高温及生物胁迫。脱落酸、聚乙二醇以及淹水显著地增加了水稻根中PPDK的表达。在ABA诱导下,水稻根中产生胞质型PPDK。苗期水稻在干旱、低温、高盐以及甘露醇等缺水胁迫下同样在根中诱导PPDK产生。在低氧胁迫如淹水培养的水稻幼苗根和胚芽鞘、无氧环境培养的黄化水稻幼苗中,都可以诱导PPDK合成。而在水稻光合组织中则不会产生胞质型PPDK。低氧胁迫在增加了PPDK活性的同时,乙醇脱氢酶I、磷酸羧化酶和苹果酸脱氢酶的活性也得到了增强,说明胞质型PPDK参与了水稻缺水和低氧胁迫下的代谢应答(Moons等1998)。缺氧条件诱导了水稻胚芽鞘中PPDK的大量合成,其功能

可能是与丙酮酸激酶协同作用催化ATP产生PPi,能量以PPi的形式穿过液泡膜进行转运,PPi是蔗糖合酶催化蔗糖水解必需的,PPi还加速了糖酵解过程,这些生理反应是水稻胚芽鞘对缺氧的适应(Huang等2005)。高温胁迫下水稻籽粒中胞质型PPDK的转录水平下调(Yamakawa等2007)。Li等(2011)对不同高温下水稻籽粒蛋白质组分析同样表明:高温下PPDK的表达受到抑制;此外,PPDK同源异构体表达量与垩白度呈负相关,但高温下PPDK的减少是如何引起垩白的机制尚不清楚。C<sub>3</sub>植物烟草(*Nicotiana tabacum* L.)在分别感染Potato virus Y (PVY)和Potato virus A (PVA)病毒后叶片PPDK的活性增强,其中感染PVY后PPDK活性增强2~3倍(Ryslava等2003)。烟草在感染Potato virus Y (PVA<sup>NTN</sup>)病毒后叶片PPDK的活性也增强。这可能是由于在非生物胁迫条件下,通过补偿代谢改变了基本代谢通路,保证了植物的生命活动,PPDK作为补偿代谢的关键酶在这一过程中起到了重要的作用(Doubnerova等2007)。

## 5 PPDK基因工程研究进展

C<sub>4</sub>植物光合产量比C<sub>3</sub>植物一般高1.5~2倍,因此,研究者希望借助于基因工程手段将C<sub>4</sub>循环引入到C<sub>3</sub>植物中,从而增加C<sub>3</sub>植物的产量(Jiao等2002)。C<sub>3</sub>植物与C<sub>4</sub>植物的区分不是绝对的,在同一物种中可能同时存在C<sub>3</sub>和C<sub>4</sub>两种光合途径(魏松涛等2008)。如一种两栖植物黑藻(*Hydrilla verticillata*)在冬季进行C<sub>3</sub>代谢,而在夏季水生条件下则进行C<sub>4</sub>代谢(Magnin等1997)。在Flaveria属中既有C<sub>3</sub>植物,也有C<sub>4</sub>植物,还有介于C<sub>3</sub>和C<sub>4</sub>之间的种类(Rosche等1998)。C<sub>4</sub>藜科(Chenopodiaceae)植物*Bienertia cycloptera*和*Borszczowia aralocaspica*可以在一个细胞内完成C<sub>4</sub>光合作用,说明即使没有C<sub>4</sub>植物叶肉细胞特有的花环状结构,植物也能进行C<sub>4</sub>光合循环,这为通过基因工程提高C<sub>3</sub>光合效率提供了理论依据(Edwards等2004)。PPDK作为C<sub>4</sub>光合途径CO<sub>2</sub>同化作用的关键酶,是通过基因工程手段提高光合效率的目标基因之一。目前已经有研究者对C<sub>3</sub>植物烟草、水稻和拟南芥等的转PPDK基因进行了尝试。

在导入完整的玉米PPDK基因后获得的高表达PPDK水稻植株中,与野生型相比,PPDK占叶片

总可溶性蛋白的比例以及叶片总N含量均比野生型要高, PPDK的活性大大增加, 与野生型相比甚至提高了40倍(Fukayama等2001)。此外, 袁莉民等(2006)将C<sub>4</sub>光合循环关键酶基因转入水稻中, 获得了转PPDK基因的水稻植株以及同时转PEPC(磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的编码基因)和PPDK基因的水稻植株。转基因的水稻叶片光合器官结构得到改善: 转入PPDK单基因的水稻叶片气孔密度高、面积大; 转入双基因的叶片气孔密度高, 但是面积小。转基因水稻叶片叶肉细胞的叶绿体基粒更加密集、类囊体结构更完整、有序。叶鞘维管束结构发达, 这些结构和形态上的优势与秧苗的高干物质积累量一致, 说明通过转基因手段实现水稻高光效是可能的。张建福等(2006a, b)对籼稻‘明恢63’和‘IR64’进行了转玉米PPDK基因研究, 通过对光合性状和产量性状的分析表明, 转基因植株在温室条件下促进了N的吸收和同化, 在一定程度上提高了植株的收获指数。在拟南芥衰老阶段超量表达PPDK可以加速叶片中的氮活化, 从而加速植株生长以及种子的重量及氮含量, 从而延缓衰老(Taylor等2010)。但是转PPDK基因植株的高光效是否与高产及高品质相关还有待研究。

同时, 超量表达PPDK是否能增强植物对逆境的耐受性仍然存在疑问。为了增强玉米PPDK的耐冷性, Ohta等(2004)从*F. brownii*中分离到了耐冷的PPDK cDNA, 与*F. bidentis*的启动子融合, 导入到玉米中。在转基因玉米叶片中产生了耐冷的同源四聚体PPDK以及耐冷性较差的异源四聚体PPDK。同时导入的玉米PPDK反义基因可以使外源与内源PPDK的比例升高。但是该转基因玉米的光合作用是否增强还有待验证。此外, PPDK在C<sub>3</sub>植物中的非光合功能还没有明确, 这种转基因方法是否适用于其他植物还有待研究。

## 6 小结

从PPDK发现至今, PPDK的分子特性和调控机理研究已经取得了重要进展。由于光合作用是作物产量形成的基础, C<sub>4</sub>植物的高光合效率成为研究者关注的热点, 他们希望将C<sub>4</sub>光合途径导入C<sub>3</sub>植物中, 提高C<sub>3</sub>作物如水稻的光合效率, 从而达到增加作物产量的目的。PPDK作为C<sub>4</sub>光合途径的关键酶, 目前已经有了基因工程的尝试, 但是这种转

C<sub>4</sub> PPDK基因的C<sub>3</sub>植物的光合效率以及产量是否能真正提高还有待研究。此外, PPDK还存在非光合作用, 逆境胁迫下PPDK的表现为其非光合功能的阐明提供了线索。今后的研究方向除了继续通过基因工程的手段将C<sub>4</sub>途径的关键基因(如phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; NADP-malic enzyme, NADP-ME, NADP-苹果酸酶等)导入到C<sub>3</sub>作物以提高作物光合效率外, 还将继续探明PPDK的非光合功能。

## 参考文献

- 王金明, 丁在松, 张桂芳, 赵明(2007). 家稗丙酮酸磷酸双激酶(PPDK)基因的克隆及序列分析. 作物学报, 33: 927~930
- 王淼, 王旭静, 唐巧玲, 王志兴(2011). 籽粒苋中PPDK基因的克隆及表达特性分析. 生物技术进展, 1: 50~55
- 魏松涛, 迟伟, 张立新(2008). 高等植物碳循环基因工程研究进展. 植物学通报, 25: 516~525
- 袁莉民, 仇明, 王朋, 王志琴, 杨建昌(2006). C<sub>4</sub>转基因水稻秧苗叶片气孔与叶鞘维管束结构特征. 中国农业科学, 39: 902~909
- 张建福, Datta KS, 王国英, 谢华安(2006a). 玉米高光效基因PPDK在籼稻IR64中的整合及其与光合作用相关的特性分析. 分子植物育种, 4: 797~804
- 张建福, 谢华安, 王国英(2006b). 玉米PEPC基因和PPDK基因在籼稻明恢63中的整合及其与光合作用相关的特性分析. 分子植物育种, 4: 655~662
- Aoyagi K, Bassham JA (1984). Pyruvate orthophosphate dikinase of C<sub>3</sub> seeds and leaves as compared to the enzyme from maize. Plant Physiol, 75: 387~392
- Ashton AR, Burnell JN, Hatch MD (1984). Regulation of C<sub>4</sub> photosynthesis: inactivation of pyruvate, Pi dikinase by ADP-dependent phosphorylation and activation by phosphorolysis. Arch Biochem Biophys, 230: 492~503
- Budde RJA, Holbrook GP, Chollet R (1985). Studies on the dark/light regulation of maize leaf pyruvate, orthophosphate dikinase by reversible phosphorylation. Arch Biochem Biophys, 242: 283~290
- Burnell JN, Bresolin N (2000). Nucleotide sequence of a cDNA encoding sugar cane chloroplastic pyruvate orthophosphate dikinase (accession no. AF194026). (PGR00-014). Plant Physiol, 122: 293
- Burnell JN, Chastain CJ (2006). Cloning and expression of maize-leaf pyruvate, Pi dikinase regulatory protein gene. Biochem Biophys Res Commun, 345: 675~680
- Burnell JN, Hatch MD (1983). Dark-light regulation of pyruvate, Pi dikinase in C<sub>4</sub> plants: evidence that the same protein catalyses activation and inactivation. Biochem Biophys Res Commun, 111: 288~293
- Burnell JN, Hatch MD (1985). Regulation of C<sub>4</sub> photosynthesis: purification and properties of the protein catalyzing ADP-mediated inactivation and Pi-mediated activation of pyruvate, Pi dikinase. Arch Biochem Biophys, 237: 490~503
- Casati P, Zhang X, Burlingame AL, Walbot V (2005). Analysis of leaf proteome after UV-B irradiation in maize lines differing in sensi-

- tivity. *Mol Cell Proteomics*, 4: 1673~1685
- Chastain CJ (2011). Structure, function, and post-translational regulation of C<sub>4</sub> pyruvate orthophosphate dikinase. In: Raghavendra AS, Sage RF (eds). *Advances in Photosynthesis and Respiration, C<sub>4</sub> Photosynthesis and Related CO<sub>2</sub> Concentrating Mechanisms*. The Netherlands: Springer Press, 301~315
- Chastain CJ, Chollet R (2003). Regulation of pyruvate, orthophosphate dikinase by ADP-/Pi-dependent reversible phosphorylation in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Plant Physiol Biochem*, 41: 523~532
- Chastain CJ, Failing CJ, Manandhar L, Zimmerman MA, Lakner MM, Nguyen THT (2011). Functional evolution of C<sub>4</sub> pyruvate, orthophosphate dikinase. *J Exp Bot*, 62: 3083~3091
- Chastain CJ, Fries JP, Vogel JA, Randklev CL, Vossen AP, Dittmer SK, Watkins EE, Fiedler LJ, Wacker SA, Meinhover KC et al (2002). Pyruvate, orthophosphate dikinase in leaves and chloroplasts of C<sub>3</sub> plants undergoes light-/dark-induced reversible phosphorylation. *Plant Physiol*, 128: 1368~1378
- Chastain CJ, Heck JW, Colquhoun TA, Voge DG, Gu XY (2006). Posttranslational regulation of pyruvate, orthophosphate dikinase in developing rice (*Oryza sativa*) seeds. *Planta*, 224: 924~934
- Chastain CJ, Xu W, Parsley K, Sarath G, Hibberd JM, Chollet R (2008). The pyruvate, orthophosphate dikinase regulatory proteins of *Arabidopsis* possess a novel, unprecedented Ser/Thr protein kinase primary structure. *Plant J*, 53: 854~863
- Christin PA, Besnard G, Samaritani E, Duvall MR, Hodkinson TR, Savolainen V, Salamin N (2008). Oligocene CO<sub>2</sub> decline promoted C<sub>4</sub> photosynthesis in grasses. *Curr Biol*, 18: 37~43
- Doubnerova V, Janoskova M, Synkova H, Subr Z, Cerovska (2007). Effect of *Potato virus Y* on the activities of antioxidant and anaplerotic enzymes in *Nicotiana tabacum* L. transgenic plants transformed with the gene for P3 protein. *Gene Appl Plant Physiol*, 33: 123~140
- Doubnerova V, Ryslava H (2011). What can enzymes of C<sub>4</sub> photosynthesis do for C<sub>3</sub> plants under stress? *Plant Sci*, 180: 575~583
- Edwards GE, Franceschi VR, Voznesenskaya EV (2004). Single-cell C<sub>4</sub> photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 173~196
- Edwards GE, Nakamoto H, Burnell JN, Hatch MD (1985). Pyruvate, Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C<sub>4</sub> photosynthesis: Properties and mechanism of light/dark regulation. *Annu Rev Plant Physiol*, 36: 255~286
- Evans HJ, Wood HG (1968). The mechanism of the pyruvate, phosphate dikinase reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 61: 1448~1453
- Fukayama H, Tsuchida H, Agarie S, Nomura M, Onodera H, Ono K, Lee BH, Hirose S, Toki S, Ku MS et al (2001). Significant accumulation of C<sub>4</sub>-specific pyruvate, orthophosphate dikinase in a C<sub>3</sub> plant, rice. *Plant Physiol*, 127: 1136~1146
- Glackin CA, Grula JW (1990). Organ-specific transcripts of different size and abundance derive from the same pyruvate, orthophosphate dikinase gene in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 3004~3008
- Goss NH, Evans CT, Wood HG (1980). Pyruvate phosphate dikinase: sequence of the histidyl peptide, the pyrophosphoryl and phosphoryl carrier. *Biochemistry*, 19: 5805~5809
- Hatch MD, Slack CR (1968). A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C<sub>4</sub> dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem J*, 106: 141~146
- Huang S, Greenway H, Colmer TD, Millar AH (2005). Protein synthesis by rice coleoptiles during prolonged anoxia: implications for glycolysis, growth and energy utilization. *Ann Bot*, 96: 703~715
- Imaizumi N, Ku MS, Ishihara K, Samejima M, Kaneko S, Matsuoka M (1997). Characterization of the gene for pyruvate, orthophosphate dikinase from rice, a C<sub>3</sub> plant, and a comparison of structure and expression between C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> genes for this protein. *Plant Mol Biol*, 34: 701~716
- Jiao D, Huang X, Li X, Chi W, Kuang T, Zhang Q, Ku MS, Cho D (2002). Photosynthetic characteristics and tolerance to photo-oxidation of transgenic rice expressing C<sub>4</sub> photosynthesis enzymes. *Photosynth Res*, 72: 85~93
- Kajala K, Brown NJ, Williams BP, Borrill P, Taylor LE, Hibberd JM (2012). Multiple *Arabidopsis* genes primed for recruitment into C<sub>4</sub> photosynthesis. *Plant J*, 69: 47~56
- Kang HG, Park S, Matsuoka M, An G (2005). White-core endosperm *floury endosperm-4* in rice is generated by knockout mutations in the C<sub>4</sub>-type pyruvate orthophosphate dikinase gene (*OsPPDKB*). *Plant J*, 42: 901~911
- Li H, Chen Z, Hu M, Wang Z, Hua H, Yin C, Zeng H (2011). Different effects of night versus day high temperature on rice quality and accumulation profiling of rice grain proteins during grain filling. *Plant Cell Rep*, 30: 1641~1659
- Lim K, Read RJ, Chen CC, Tempczyk A, Wei M, Ye D, Wu C, Dunaway-Mariano D, Herzberg O (2007). Swiveling domain mechanism in pyruvate phosphate dikinase. *Biochemistry*, 46: 14845~14853
- Lin Y, Lusin JD, Ye D, Dunaway-Mariano D, Ames JB (2006). Examination of the structure, stability, and catalytic potential in the engineered phosphoryl carrier domain of pyruvate phosphate dikinase. *Biochemistry*, 45: 1702~1711
- Magnin NC, Cooley BA, Reiskind JB, Bowes G (1997). Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranz-less, C<sub>4</sub>-type photosynthesis in *Hydrilla verticillata*. *Plant Physiol*, 115: 1681~1689
- Majeran W, Cai Y, Sun Q, van Wijk KJ (2005). Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics. *Plant Cell*, 17: 3111~3140
- Mallona I, Egea-Cortines M, Weiss J (2011). Conserved and divergent rhythms of crassulacean acid metabolism-related and core clock gene expression in the cactus *Opuntia ficus-indica*. *Plant Physiol*, 156: 1978~1989
- Matsuoka M (1990). Structure, genetic mapping, and expression of the gene for pyruvate, orthophosphate dikinase from maize. *J Biol Chem*, 265: 16772~16777
- Matsuoka M (1995). The gene for pyruvate orthophosphate dikinase in C<sub>4</sub> plants: structure, regulation and evolution. *Plant Cell Physiol*, 36: 937~943
- Matsuoka M, Ozeki Y, Yamamoto N, Hirano H, Kano-Murakami Y, Tanaka Y (1988). Primary structure of maize pyruvate, orthophosphate dikinase as deduced from cDNA sequence. *J Biol*



- Chem, 263: 11080~11083
- McGuire M, Carroll LJ, Yankie L, Thrall SH, Dunaway-Mariano D, Herzberg O, Jayaram B, Haley BH (1996). Determination of the nucleotide binding site within *Clostridium symbiosum* pyruvate phosphate dikinase by photoaffinity labeling, site-directed mutagenesis, and structural analysis. *Biochemistry*, 35: 8544~8552
- Moons A, Valcke R, Van Montagu M (1998). Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C<sub>3</sub> plant. *Plant J*, 15: 89~98
- Nakamoto H, Edwards GE (1986). Light activation of pyruvate, Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase in mesophyll protoplasts of maize: effect of DCMU, antimycin A, CCCP, and phlorizin. *Plant Physiol*, 82: 312~315
- Nakanishi T, Nakatsu T, Matsuoka M, Sakata K, Kato H (2005). Crystal structures of pyruvate phosphate dikinase from maize revealed an alternative conformation in the swiveling-domain motion. *Biochemistry*, 44: 1136~1144
- Nemat Alla MM, Hassan NM (2011). A possible role for C<sub>4</sub> photosynthetic enzymes in tolerance of *Zea mays* to NaCl. *Protoplasma*, DOI 10.1007/s00709-011-0356-4
- Ohta S, Ishida Y, Usami S (2004). Expression of cold-tolerant pyruvate, orthophosphate dikinase cDNA, and heterotetramer formation in transgenic maize plants. *Transgenic Res*, 13: 475~485
- Omoto E, Taniguchi M, Miyake H (2012). Adaptation responses in C<sub>4</sub> photosynthesis of maize under salinity. *J Plant Physiol*, 169: 469~477
- Parsley K, Hibberd JM (2006). The *Arabidopsis* PPDK gene is transcribed from two promoters to produce differentially expressed transcripts responsible for cytosolic and plastidic proteins. *Plant Mol Biol*, 62: 339~349
- Pocalyko DJ, Carroll LJ, Martin BM, Babbitt PC, Dunaway-Mariano D (1990). Analysis of sequence homologies in plant and bacterial pyruvate phosphate dikinase, enzyme I of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and other PEP-utilizing enzymes. Identification of potential catalytic and regulatory motifs. *Biochemistry*, 29: 10757~10765
- Reeves RE (1968). A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase. *J Biol Chem*, 243: 3202~3204
- Roeske CA, Kutny RM, Budde RJ, Chollet R (1988). Sequence of the phosphothreonyl regulatory site peptide from inactive maize leaf pyruvate, orthophosphate dikinase. *J Biol Chem*, 263: 6683~6687
- Rosche E, Chitty J, Westhoff P, Taylor WC (1998). Analysis of promoter activity for the gene encoding pyruvate orthophosphate dikinase in stably transformed C<sub>4</sub> *Flaveria* species. *Plant Physiol*, 117: 821~829
- Rosche E, Streubel M, Westhoff P (1994). Primary structure of the photosynthetic pyruvate orthophosphate dikinase of the C<sub>3</sub> plant *Flaveria pringlei* and expression analysis of pyruvate orthophosphate dikinase sequences in C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> and C<sub>4</sub> *Flaveria* species. *Plant Mol Biol*, 26: 763~769
- Rosche E, Westhoff P (1995). Genomic structure and expression of the pyruvate, orthophosphate dikinase gene of the dicotyledonous C<sub>4</sub> plant *Flaveria trinervia* (Asteraceae). *Plant Mol Biol*, 29: 663~678
- Ryslava H, Muller K, Semoradova S, Synkova H, Cerovska N (2003). Photosynthesis and activity of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Nicotiana tabacum* L. leaves infected by *Potato virus A* and *Potato virus Y*. *Photosynthetica*, 41: 357~363
- Sheen J (1991). Molecular mechanisms underlying the differential expression of maize pyruvate orthophosphate dikinase genes. *Plant Cell*, 3: 225~245
- Taylor L, Nunes-Nesi A, Parsley K, Leiss A, Leach G, Coates S, Winkler A, Fernie AR, Hibberd JM (2010). Cytosolic pyruvate, orthophosphate dikinase functions in nitrogen remobilization during leaf senescence and limits individual seed growth and nitrogen content. *Plant J*, 62: 641~652
- Tjaden B, Plagens A, Dorr C, Siebers B, Hensel R (2006). Phosphoenolpyruvate synthetase and pyruvate, phosphate dikinase of *Thermoproteus tenax*: key pieces in the puzzle of archaeal carbohydrate metabolism. *Mol Microbiol*, 60: 287~298
- Wang D, Portis AR Jr, Moose SP, Long SP (2008). Cool C<sub>4</sub> photosynthesis: pyruvate Pi dikinase expression and activity corresponds to the exceptional cold tolerance of carbon assimilation in *Miscanthus×giganteus*. *Plant Physiol*, 148: 557~567
- Yamakawa H, Hirose T, Kuroda M, Yamaguchi T (2007). Comprehensive expression profiling of rice grain filling-related genes under high temperature using DNA microarray. *Plant Physiol*, 144: 258~277
- Yamamoto E, Sugiyama T, Miyachi S (1974). Action spectrum for light activation of pyruvate, phosphate dikinase in maize leaves. *Plant Cell Physiol*, 15: 987~992