作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2026, 52(3): 764–779 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2026.53047

玉米 ZmPFK 基因家族全基因组鉴定及响应胁迫表达分析

孟 成 王 哲*

作物抗逆与高效生产全国重点实验室 / 农业农村部西北旱区玉米生物学与遗传育种重点实验室 / 西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100

摘 要: 磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)是糖酵解途径中的关键调控酶, 作为该代谢过程的限速酶, 它主导着细胞内葡萄糖代谢的速率。与此同时, 己糖激酶不仅能够作为糖受体启动下游糖信号传导, 还可整合多种外界信号, 进而激活其他信号转导途径, 参与调节植物对外界环境变化的响应机制。系统分析玉米 PFK 家族成员在基因组上的分布、结构、进化以及表达特性, 对于深入研究该家族的生物学功能具有重要意义。本研究基于玉米 B73 (RefGen_v4)基因组信息以及转录组数据等, 通过生物信息学手段对玉米 B73 自交系磷酸果糖激酶(PFK)家族成员进行全基因组鉴定并对其理化性质、系统发育关系、基因结构、启动子顺式作用元件以及表达特性进行了分析。结果表明, 玉米 B73 自交系共有 20 个 PFK 家族成员, 它们主要分为 ATP 依赖性的磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)和焦磷酸盐依赖性的磷酸果糖激酶(phosphotransferase, PFP), 且不均匀的分布于各个染色体上。共线性分析表明, 玉米 *PFK* 基因与单子叶植物水稻(*Oryza sativa*)具有多对同源基因, 而与双子叶植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)不存在直系同源基因。启动子顺式作用元件预测表明, *PFK* 基因具有一些与生长发育和逆境响应的结合元件。转录组数据以及 qRT-PCR 表明, 各成员在组织表达与胁迫处理下存在不同的表达水平, 并且发现了多个响应非生物胁迫(盐胁迫、干旱胁迫、热胁迫和冷胁迫)与生物胁迫(玉蜀黍平脐蠕孢菌、玉蜀黍凸脐蠕孢菌和禾谷镰孢胁迫)的 *ZmPFK* 基因, 表明该家族成员在响应逆境胁迫中具有重要作用。将重组质粒 *ZmPFK10*-pET32a 转入大肠杆菌 BL21 中, 诱导表达后的重组菌株 *ZmPFK10*-pET32a 在 700 mmol L^{-1} NaCl 和 45℃高温条件下的生长情况优于对照菌株。蛋白互作网络预测与富集分析发现, 与 ZmPFK 蛋白存在互作的 3 个核心蛋白均参与糖酵解活动。上述结果为 PFK 家族成员的生物学功能研究提供了理论基础。

关键词: 玉米; PFK; 基因家族; 糖酵解; 表达分析

Genome-wide identification and expression analysis of the ZmPFK gene family under biotic and abiotic stresses in maize

Meng Cheng and Wang Zhe*

State Key Laboratory of Crop Stress Resistance and High-Efficiency Production / Key Laboratory of Maize Biology and Genetic Breeding in Arid Area of Northwest Region, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: Phosphofructokinase (PFK) is a key regulatory enzyme in the glycolytic pathway, functioning as the rate-limiting enzyme that controls the pace of intracellular glucose metabolism. In parallel, hexokinase not only serves as a sugar sensor initiating downstream sugar signaling, but also integrates various external cues, thereby activating other signaling pathways and contributing to the regulation of plant responses to environmental stimuli. A systematic investigation of the gene structure, evolutionary relationships, and expression patterns of PFK family members in maize is crucial for advancing our understanding of their biological functions. In this study, a genome-wide identification of PFK family members was conducted in the maize inbred line B73

本研究由国家自然科学基金项目(32101699)和中央高校科研业务费项目(Z1090221024)资助。
This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (32101699) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Z1090221024).

* 通信作者(Corresponding author): 王哲, E-mail: wangzhe8636@nwafu.edu.cn
第一作者联系方式: E-mail: mengc@nwafu.edu.cn

Received (收稿日期): 2025-07-09; Accepted (接受日期): 2025-11-18; Published online (网络出版日期): 2025-12-03.
URL: https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20251203.1049.004

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

using bioinformatics approaches. The physicochemical properties, phylogenetic relationships, gene structures, *cis*-acting regulatory elements, and expression profiles were comprehensively analyzed. Twenty *PFK* genes were identified in B73, categorized into ATP-dependent phosphofructokinases (PFKs) and pyrophosphate-dependent phosphotransferases (PFPs), and were found to be unevenly distributed across different chromosomes. Collinearity analysis revealed multiple homologous genes between maize and rice (*Oryza sativa*), but none with *Arabidopsis thaliana*. Promoter analysis indicated the presence of *cis*-regulatory elements associated with growth, development, and stress responses. Transcriptome data and qRT-PCR analysis demonstrated differential expression of *ZmPFK* genes across tissues and under various stress treatments. Several *ZmPFK* genes responded to abiotic stresses (salt, drought, heat, and cold) as well as biotic stresses caused by *Cochliobolus heterostrophus*, *Exserohilum turcicum*, and *Fusarium graminearum*, suggesting a potential role for the PFK family in stress adaptation. Moreover, the recombinant plasmid *ZmPFK10*-pET32a was introduced into *Escherichia coli* BL21, and the resulting strain exhibited enhanced growth under 700 mmol L^{-1} NaCl and 45℃, compared to the control. Protein interaction network prediction and enrichment analysis further revealed that three core proteins interacting with ZmPFK are involved in glycolysis. These findings provide a theoretical foundation for future functional characterization of PFK family members in maize.
Keywords: maize; PFK; gene family; glycolysis; expression analysis

玉米(*Zea mays* L.)是世界上种植面积最大的作物之一, 在保障粮食安全和推动多产业发展方面发挥着重要作用。然而, 各种生物与非生物胁迫严重制约着玉米的生长, 从而降低其产量[1-3]。磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)是糖酵解途径中的关键酶, 是调控细胞内葡萄糖代谢速率的关键节点, 作为糖酵解途径的限速酶, 己糖激酶可以作为糖受体进而引发下游糖信号传导, 也可以整合不同外界信号触发其他下游信号途径, 从而调节植物对外界的反应[4-5]。因此, 糖酵解代谢中的相关激酶在胁迫响应中扮演着关键作用, 是连接能量代谢与逆境适应的枢纽, 挖掘相关激酶并探究其作用具有重要的意义。

糖类物质作为光合作用的主要产物, 除了作为碳源和能源外, 也是高等植物正常生长的关键信号分子, 广泛参与植物代谢和信号传导[6-7]。有研究发现, 不同类型的糖分子被不同受体感知后, 引发不同的信号途径, 形成复杂的信号转导网络[8-11], 例如, 依赖己糖激酶的信号转导途径(hexokinase-dependent signaling pathway) [12-14]、依赖糖酵解的信号转导途径(glycolysis-dependent signaling pathway) [15-16]等。糖代谢过程中的中间产物可以作为信号转导以及响应胁迫信号的重要因子[17], 由于信号转导中最常见的机制之一是蛋白质磷酸化和去磷酸化, 因此蛋白激酶在细胞信号转导以及能量代谢中具有更加突出的作用。而且相对其他糖信号转导途径而言, 依赖糖酵解的信号转导途径具有更加多样的传导通路[18-21]。在植物中, PFK 主要分为 2 种类型: 一种是 ATP 依赖性的磷酸果糖激酶(PFK), 它催化果糖-6-磷酸到果糖-1,6-二磷酸的过程是不可逆的; 另一种是焦磷酸盐依赖性的磷酸果糖激酶(PFP), 它催化果糖-1,6-二磷酸到果糖-6-磷酸的过程是可逆的[22-23]。这 2 种类型都受到几种代谢物的变构调节(ATP、柠檬酸等), 只有 PPi-PFK 被 2,6-二磷酸果糖强烈激活[24]。因此, PFK 调节被认为是控制糖酵解碳通量的关键因子[25-26]。随着测序技术的发展, 目前已在拟南芥[27]、水稻[23]、棉花[28]、木薯[29]、柑橘[30]、玉米[31]等高等植物中鉴定到编码磷酸果糖激酶的基因。作为糖代谢过程中的关键激酶, 磷酸果糖激酶广泛参与植物生长发育以及胁迫反应等过程。拟南芥 *PFK* 基因能够维持葡萄糖稳态[32], PFK5 的氧化还原调节与 FBPase 共同控制叶绿体中光/暗代谢转换[26], *PFP* 基因在响应盐胁迫和渗透胁迫过程中发挥着重要作用[33]。水稻 PFK 基因家族成员在其生长发育及胁迫应答中同样扮演重要角色。例如, *PFP1-1* 和 *PFP1-2* 影响水稻灌浆期籽粒中的淀粉积累与可溶性糖合成, 而 *PFP1-3* 也控制稻米籽粒营养成分的组成[34-35]。*PFKB1* 可影响叶绿体的发育与形成, 并对光合作用至关重要[36]。此外, *PFP* 还参与植物抗病过程, 例如, 水稻 *PFP2* 和 *PFP5* 能够提高植株对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的抗性[37]。而在水稻中, 在褪黑素突变体材料中或者 *OsPFKB1* 和 *OsPFPA1* 在 DNA 去甲基化后, *PFK* 的表达量显著降低, 可能导致植物能量代谢的紊乱进而影响植物的生长发育[38]。而在近期也有研究发现, 小麦中一些糖酵解途径基因与耐冷胁迫直接相关, *PFK* 等糖酵解基因的上调表达可能为植株提供能量以增强冷胁迫的耐受性[39]。本研究借助玉米 B73 自交系基因组信息从全基因组水平挖掘玉米 PFK 基因家族成员, 并系统分析该家族成员的进化关系、基因结构、顺式作用元件、表达模式以及构建蛋白互作网络等方面。本研究结果为进

一步研究玉米中 *PFK* 基因的生物学功能提供了理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2025 年在西北农林科技大学作物抗逆与高效生产全国重点实验室进行, 以玉米自交系 B73 为供试材料。

1.2 玉米 PFK 基因家族鉴定

玉米基因组、蛋白序列与注释文件从 Maize GDB (https://chinese.maizegdb.org)数据库获得, 拟南芥、水稻的 PFK 家族蛋白序列从 Ensembl Plants (https://plants.ensembl.org/index.html)数据库中获得。将拟南芥 PFK 蛋白作为参考序列, 并通过其蛋白序列中所含结构域注释信息, 在 Pfam (http://pfam-legacy.xfam.org/) 下载所含结构域 (PF00365) 的 HMMER 文件, 通过 TBtools 进行家族成员检索[40], 通过 BLASTP 与 HMMER 检索的方法对玉米蛋白数据库进行筛选, 将序列比对与结构域比对结果取交集后, 再使用 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/)数据库对筛选出的 PFK 蛋白结构域进行查询, 保留含有完整 PFK 结构域的 PFK 蛋白。玉米 PFK 家族蛋白长度和染色体位置等信息来自玉米在线数据库 Maize GDB (https://chinese.maizegdb.org)。使用 ExPASy (http://www.expasy.org)分析鉴定的 PFK 蛋白分子量(molecular weight, MW)和等电点(isoelectric point, pI)。利用在线网站 WoLF PSORT (https://www.genscript.com/wolf-psort.html)预测亚细胞定位, 并通过使用热图的形式进行展示。

1.3 玉米 PFK 基因家族序列比对和系统进化分析

使用 MEGA X 软件对拟南芥、水稻和玉米 PFK 家族蛋白序列进行多重序列比对, 使用邻接法构建系统进化树, Bootstrap 设置为 1000, 使用 iTOL (https://itol.embl.de/)对进化树进行可视化。

1.4 玉米 *PFK* 基因结构和保守基序分析

从 MaizeGDB 中获取玉米 *PFK* 基因 CDS 序列和玉米基因组文件(B73 RefGen_v4), 使用 MEME (https://meme-suite.org/meme/)对玉米 PFK 蛋白中保守基序进行分析, 最大基序数量设置为 12。为了更深一步了解保守基序的相关信息, 使用 InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/)数据库对这些蛋白中的保守基序进行注释, 并使用 TBtools 对 *ZmPFKs* 基因结构进行可视化。

1.5 玉米 PFK 基因家族染色体位置和基因复制

基因长度和位置数据从 MaizeGDB (https://chinese.maizegdb.org)玉米数据库(B73 RefGen_v4)中获得。使用 MCScanX 识别 *ZmPFKs* 基因的串联和片段复制, 染色体位置和基因复制的结果通过 TBtools 展示。使用 Tbtools 计算了重复基因对的非同义(K_a)和同义(K_s)替代率, 分化率计算公式为: $T = (K_s/2\lambda)\times10^{-6}$, 其中 $\lambda = 6.5 \times 10^{-9}$。

1.6 玉米 PFK 基因家族顺式作用元件分析

从 Ensembl Plants (https://plants.ensembl.org/index.html)数据库提取了 *ZmPFKs* 基因转录起始位点前 2000 bp 的基因组序列。使用在线工具 PlantCARE (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)进行顺式作用元件分析, 并使用 TBtools 进行可视化作图。

1.7 玉米 PFK 基因家族组织特异性分析

不同组织的标准化转录组数据均来源于玉米数据库网站 Maize GDB (https://chinese.maizegdb.org), 主要分析了 *ZmPFKs* 基因在胚、胚乳、种子、穗、叶、根、芽尖和花丝 8 个不同组织中的表达模式, 用 TBtools 软件制图, 结果以热图的形式展示出来。

1.8 玉米 PFK 基因家族胁迫表达分析

从植物公共 RNA-seq 数据库(https://plantrnadb.com/)下载部分编号的处理数据, 如干旱胁迫(PRJNA290180)、盐胁迫(PRJNA368967)、低温胁迫(PRJNA344653)和高温胁迫(PRJNA520822)的 RNA 测序数据, 研究 *ZmPFKs* 在非生物胁迫下的表达情况。使用已发表的玉蜀黍平脐蠕孢菌(PRJNA491716)、玉蜀黍凸脐蠕孢菌(PRJNA392457)和禾谷镰孢(PRJNA308408)侵染玉米叶片的 RNA-seq 数据, 从而研究 *ZmPFKs* 在生物胁迫下的表达情况, 并使用 TBtools 进行可视化作图。

根据转录组数据, 验证 *ZmPFK5*、*ZmPFK6*、*ZmPFK10*、*ZmPFK12*、*ZmPFK19* 基因在盐胁迫、干旱胁迫、热胁迫以及小斑病菌侵染后的表达量变化(表 1)。以玉米自交系 B73 为供试材料, 首先水培玉米 B73, 待其长至三叶一心期时, 分别加入 20%的 PEG、150 mmol L^{-1} NaCl 和 45℃热处理进行模拟干旱胁迫、盐胁迫和高温胁迫, 24 h 后采集叶片。小斑病接种试验采用从陕西杨凌小斑病叶上分离的 O 小种进行小斑病苗期接种试验, 用 PDA 培养基培养病原菌 10~14 d, 用加入 0.02% Tween 20 和 0.05%琼脂的灭菌水配置孢子悬浮液(浓度为 5×10^4 个 mL^{-1}),

孢子液均匀喷洒在第 4 片展开叶, 24 h 后取样。每个处理进行 3 次生物学重复。

使用 Omega E.Z.N.A. plant RNA kit 试剂盒提取来自玉米 B73 中的总 RNA 后反转录。实时荧光定量 PCR 使用天根的 FastKing One Step RT-qPCR Kit (SYBR)试剂盒, 并在 QuantStudio7 Flex 仪器中进行定量。选择 *ZmEF-1α* 作为内参基因, 相对基因定量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算[41], 并使用 Origin 2024 进行可视化制图。

1.9 *ZmPFK10* 在大肠杆菌 BL21 中功能验证

以玉米 B73 材料 cDNA 为模板, 基因克隆后回收片段(表 2), 用 *Bam*H I 酶切 pET32a 载体, 同源重组后转入大肠杆菌感受态细胞, 单菌落检测后测序, 提取 *ZmPFK10*-pET32a 质粒转化大肠杆菌感受态 BL21。使用 IPTG 分别诱导表达含有重组质粒 *ZmPFK10*-pET32a 和空载质粒 pET32a 的 BL21, 将诱导后的菌液按梯度稀释为 10^0、10^{-1}、10^{-2} 的浓度。稀释后的菌液各取微量滴在含有 700 mmol L^{-1} NaCl 的 LB 固体培养基上 37℃培养, 进行盐胁迫试验; 另一组置 45℃培养箱中进行高温胁迫试验, 以空载为对照组, 培养 16 h 后观察生长情况并照相。

表 1　*ZmPFK* 基因 qRT-PCR 引物信息
Table 1　qRT-PCR primer information for *ZmPFK* genes

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'–3')
ZmPFK5	ZmPFK5-F	CCGAACCCCCTCCAAGACAA
	ZmPFK5-R	GCTGGTCTTGTGAACAACGATCT
ZmPFK6	ZmPFK6-F	GGGGAGGGTGGACTATTTGA
	ZmPFK6-R	GCTTGGAATAGCACGGATCA
ZmPFK10	ZmPFK10-F	CAAGATCGGCGTTGTGCTCTC
	ZmPFK10-R	AGCTGGGCCTCCCTTAAATCC
ZmPFK12	ZmPFK12-F	CCAGCCTATTCAACTGTCAAG
	ZmPFK12-R	CCACACACCAGTTCCCTGATAA
ZmPFK19	ZmPFK19-F	TGGTTGAGACCGAAATGGAC
	ZmPFK19-R	CCCAGGGTTTCGGTAGATGT
ZmEF-1α	ZmEF-1α-F	TGGGCCTACTGGTCTTACTACTGA
	ZmEF-1α-R	ACATACCCACGCTTCAGATCCT

表 2　*ZmPFK10* 基因引物信息
Table 2　Primer information for *ZmPFK10*

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'–3')
ZmPFK10	ZmPFK10-F	gccatggctgatatcggatccATGGCGGCGGCGGCGGTG
	ZmPFK10-R	acggagctcgaattcggatccTAGCGCAGCACCGAGTTCC

1.10　玉米 PFK 家族蛋白网络与 KEGG 富集分析

蛋白互作网络是通过蛋白与蛋白之间的相互作用而组成, 是一种新的预测与研究蛋白质互作的分析手段。为了探究 ZmPFK 家族蛋白与其他蛋白的相互作用, 将选定的 20 个 ZmPFK 蛋白序列基于 STRING (https://cn.string-db.org/)数据库进行分析。最低要求交互百分数选择最高置信度 0.9, 显示的最大交互数量不超过 5 个。将所有结果通过 cytoscape (https://cytoscape.org/) 软件进行可视化。使用 STRING 数据库提供的 KEGG 数据库, 设置选择相似度大于 0.9, 最大 FDR 值小于等于 0.05, 对选择的候选核心蛋白进行富集分析。

2　结果与分析

2.1　玉米 PFK 基因家族的鉴定

为了鉴定玉米 PFK 基因家族成员, 将拟南芥 PFK 蛋白作为参考序列, 并通过其蛋白序列中所含结构域注释信息, 下载其结构域(PF00365)的 Pfam 文件, 通过 BLASTP 与 HMMER 检索的方法对玉米蛋白数据库进行筛选, 并使用 SMART 数据库分析候选蛋白的结构域, 筛选得到 20 个含有 PFK 结构域的 *ZmPFKs* 基因。根据 *ZmPFKs* 在染色体上的位置,

将这些基因命名为 *ZmPFK1~ZmPFK20*, 并进一步分析了 *ZmPFKs* 基因的染色体位置、编码蛋白的长度、分子量(MW)、等电点(pI)等(表 3)。结果显示, *ZmPFKs* 编码的蛋白质长度为 147~764 aa, 分子量为 15,528.91~83,089.25 D, pI 为 5.69~9.10, 因此 ZmPFK 家族蛋白既有酸性蛋白也有碱性蛋白。此外, 多序列比对结果显示, 不同家族蛋白中 PFK 结构域的长度存在着较大差异, 大多为 270~360 个氨基酸, 只有 ZmPFK14 的 PFK 结构域长度为 80 个氨基酸。亚细胞定位预测 ZmPFKs 蛋白主要定位于细胞质、叶绿体和细胞骨架中(图 1)。

2.2 玉米 PFK 基因家族成员进化分析

为了研究不同物种 *PFK* 基因之间的系统进化关系。利用 20 个玉米 PFK、11 个拟南芥 PFK 和 13 个水稻 PFK 蛋白序列构建系统发育进化树(图 2-A), 并进行蛋白序列相似度比对(图 2-B)。结果显示, 玉米 PFK 家族成员可分为 ATP 依赖性磷酸果糖激酶(PFK)与焦磷酸依赖性果糖-6-磷酸转移酶(PFP) 2 种类型, 其数量分别是 13 个和 7 个, 其中类群 I、IV、V 为 ATP 依赖性磷酸果糖激酶(PFK), 类群 II、III 为焦磷酸依赖性果糖-6-磷酸转移酶(PFP)。根据蛋白相似度比对结果, 各成员间也是呈现较为明显的 5 个类群, 5 个类群之间 PFK 家族成员数量存在差异, 其中类群 I 有 3 个 PFK 家族成员(*ZmPFK1*、*ZmPFK3*、*ZmPFK4*), 类群 II 包含 2 个 PFK 家族成员(*ZmPFK10*、*ZmPFK17*), 同类群 IV 家族成员(*ZmPFK14*、*ZmPFK20*), 均是成员数量最少的类群, 而类群 III 和 V 数量分别有 5 个和 8 个 PFK 家族成员。通过对进化树结果分析发现, 拟南芥 *PFK* 基因与水稻 *PFK* 基因数量分别为 11 个和 13 个, 分别占成员总数的

表 3 玉米 PFK 基因家族基本信息

Table 3 Basic information of the maize PFK gene family

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	染色体位置 Chromosome localization	氨基酸长度 Amino acid length (aa)	分子量 Molecular weight (D)	等电点 Isoelectric point	不稳定指数 Instability index	类群 Group
ZmPFK1	*Zm00001d032172_T004*	Chr.1	527	58,192.72	8.23	37.93	PFK
ZmPFK2	*Zm00001d032386_T003*	Chr.1	618	67,282.41	6.79	43.40	PFP
ZmPFK3	*Zm00001d033002_T001*	Chr.1	525	57,475.48	7.04	30.57	PFK
ZmPFK4	*Zm00001d005756_T002*	Chr.2	567	62,602.72	8.16	36.79	PFK
ZmPFK5	*Zm00001d039499_T002*	Chr.3	528	57,293.35	7.94	33.10	PFK
ZmPFK6	*Zm00001d043563_T002*	Chr.3	764	83,089.25	6.00	42.66	PFK
ZmPFK7	*Zm00001d051629_T003*	Chr.4	624	67,945.26	7.24	40.27	PFP
ZmPFK8	*Zm00001d017830_T001*	Chr.5	618	67,473.40	7.85	38.79	PFP
ZmPFK9	*Zm00001d036206_T004*	Chr.6	552	60,828.26	8.22	36.37	PFK
ZmPFK10	*Zm00001d037278_T001*	Chr.6	564	61,051.75	6.30	32.83	PFP
ZmPFK11	*Zm00001d037910_T001*	Chr.6	526	57,323.34	7.64	35.38	PFK
ZmPFK12	*Zm00001d038775_T001*	Chr.6	575	63,221.28	6.00	40.19	PFK
ZmPFK13	*Zm00001d020006_T001*	Chr.7	544	59,642.11	5.69	47.32	PFP
ZmPFK14	*Zm00001d020866_T001*	Chr.7	147	15,528.91	9.10	21.54	PFK
ZmPFK15	*Zm00001d008816_T002*	Chr.8	531	57,650.68	7.92	34.33	PFK
ZmPFK16	*Zm00001d010375_T001*	Chr.8	538	58,039.24	7.60	33.38	PFK
ZmPFK17	*Zm00001d044754_T001*	Chr.9	580	62,806.72	5.96	31.91	PFP
ZmPFK18	*Zm00001d045326_T004*	Chr.9	542	59,506.65	8.22	35.55	PFK
ZmPFK19	*Zm00001d045919_T001*	Chr.9	476	52,076.02	6.64	40.21	PFP
ZmPFK20	*Zm00001d025659_T001*	Chr.10	477	51,231.13	6.21	34.54	PFK

PFK: ATP 依赖性的磷酸果糖激酶; PFP: 焦磷酸盐依赖性的磷酸果糖激酶。

PFK: ATP-dependent phosphofructokinase; PFP: pyrophosphate-fructose-6-phosphate phosphotransferase.

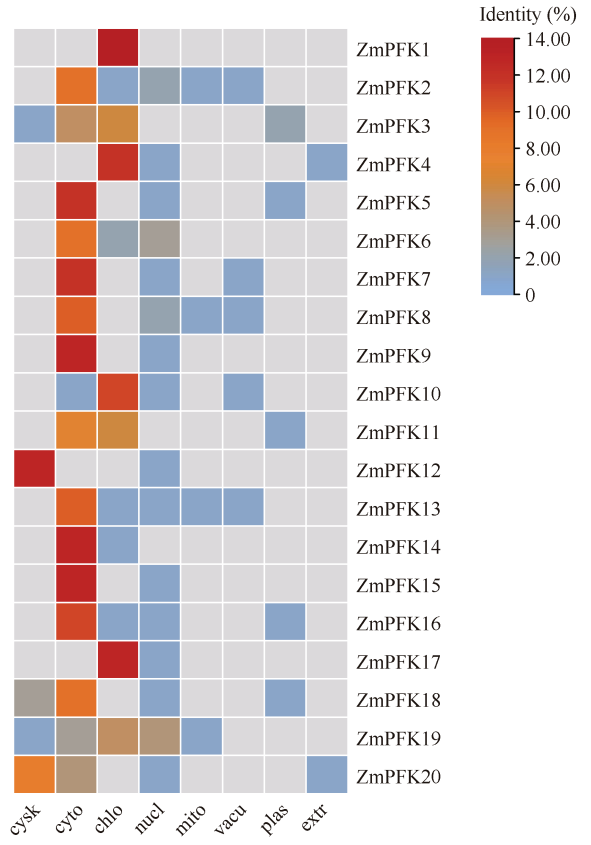


图 1　ZmPFKs 蛋白亚细胞定位

Fig. 1　ZmPFKs protein subcellular localization

PFK 蛋白亚细胞定位结果，数值越高表明定位概率越大。cysk: 细胞骨架; cyto: 细胞质; chlo: 叶绿体; nucl: 细胞核; mito: 线粒体; vacu: 液泡; plas: 细胞膜; extr: 细胞外基质。

Subcellular localization prediction of PFK proteins, the higher values the indicate greater localization. cysk: cytoskeleton; cyto: cytoplasm; chlo: chloroplast; nucl: nucleus; mito: mitochondrion; vacu: vacuole; plas: plasma membrane; extr: extracellular matrix.

25.0%与 29.5%，且各类群之中均包含拟南芥与水稻的 *PFK* 基因，这说明 PFK 蛋白序列与功能在不同的物种间具有保守性。

2.3　玉米 PFK 家族成员基因结构与保守基序分析

根据 *ZmPFK* 的基因序列，对 20 个 *ZmPFKs* 基因结构和保守基序进行研究(图 3)。结果表明，不同亚群的外显子长度与数量存在差异，I、II、IV 类群基因成员具有相同数量的外显子，分别为 13、16、2 个。而 III、V 类群的内含子数量存在差异，因此这种基因结构的多样性可能会影响基因的剪接与表达，导致 *ZmPFK* 基因在不同的代谢过程中发挥多种功能。为了更深入研究玉米 PFK 蛋白的结构特征，使用 MEME 对蛋白中的保守基序进行分析，通过 TBtools 进行结果的可视化，共鉴定出 12 个保守基序，命名为 Motif 1~Motif 12，其中 Motif 1 注释信息为 PFK 结构域，且除 Motif 8 之外，其余基序均与磷酸果糖激酶相关。结果显示，Motif 1 存在于所有 *ZmPFKs* 基因中，是玉米 PFK 家族保守的基序，*ZmPFK14* 中保守序列数量最少，只有 Motif 1、Motif 12。保守基序聚类表明该家族成员大概可以分为 3 种类型，即 V 类群, II 与 III 类群, I 与 IV 类群。除此之外，在各成员中 Motif 1、Motif 2、Motif 3、Motif 4 是最频繁出现的，这部分基序可能是该基因家族在进化过程中最保守的序列。

2.4　玉米 PFK 家族成员染色体位置和基因复制

为了研究 *ZmPFKs* 基因在染色体上的分布，从 Maize GDB 中获取 *ZmPFKs* 基因染色体位置信息(图 4)，20 个 *ZmPFKs* 基因在每个染色体上不均匀分布，其中 2 号、4 号、5 号和 10 号染色体各只有 1 个基因, 1 号和 9 号染色体均有 3 个基因，而 6 号染色体有 4 个家族成员，其余染色体都只有 2 个基因。

基因复制在促进基因家族多样性方面非常重要。为了研究 ZmPFK 家族成员在玉米基因序列间的演化以及与不同物种间基因的演化结果，对 20 个 *ZmPFK* 基因进行了共线性分析，共有 5 对 *ZmPFKs* 基因 (*ZmPFK5*/*ZmPFK15* 、*ZmPFK7*/*ZmPFK8* 、*ZmPFK7*/*ZmPFK19*、*ZmPFK8*/*ZmPFK19*、*ZmPFK9*/*ZmPFK18*)进行了基因复制，它们均被鉴定为片段复制，表明片段复制在 *ZmPFKs* 基因的进化过程中更为重要。为了确定 *ZmPFKs* 基因之间的进化关系，对每对重复基因的 K_a 和 K_s 值以及 K_a/K_s 值进行计算。结果显示，所有基因对之间的 K_a/K_s 值均小于 1，且重复基因对的分化时间在 17.97~74.41 Mya 之间，这表明所有的重复基因所发生的负向纯化选择在家族的进化中具有重要作用。不同物种间的共线性分析表明，玉米与单子叶植物水稻具有更高的同源性(图 5)。

2.5　玉米 PFK 家族成员顺式作用元件分析

通过 PlantCARE 数据库对 20 个 *ZmPFK* 基因的翻译起始密码子上游 2000 bp 的顺式作用元件进行分析(图 6)，一共筛选到了 20 个与胁迫响应、植物激素响应和植物生长发育相关的顺式作用元件，其中 13 个激素相关元件(ABRE、MYB、MYC、P-box、CARE、TCA、TATC-box、AuxRR-core、CGTCA-motif、TGACG-motif、TGA-element、TCA-element、GARE-motif)、6 个应激反应元件(STRE、LTR、MBS、TC-rich repeats、MBSI、W-box)和 1 个植物生长发

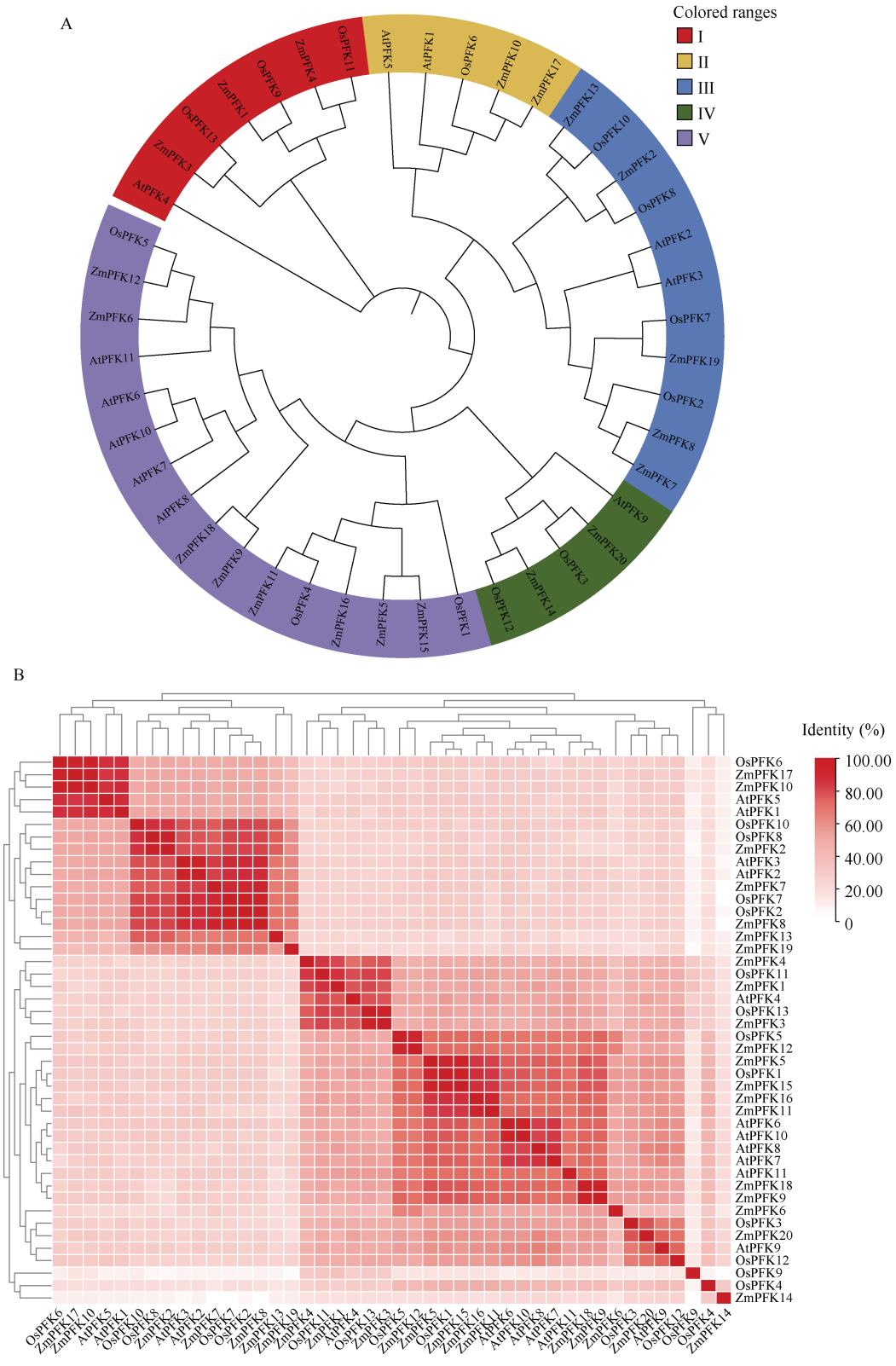


图 2 玉米、拟南芥和水稻中 *PFK* 进化关系

Fig. 2 Phylogenetic tree of *PFK* genes in maize, *Arabidopsis*, and rice

A: PFK 系统发育树, AtPFK (拟南芥), OsPFK (水稻), ZmPFK (玉米)。红、黄、蓝、绿、紫分别表示 I~V 五种类群; B:PFK 蛋白序列比对, 热图中颜色越深表明相似度越高。

A: phylogenetic tree of PFK proteins, AtPFK (*Arabidopsis thaliana*), OsPFK (*Oryza sativa*), and ZmPFK (*Zea mays*). Red, yellow, blue, green, and purple represent groups I–V; B: multiple sequence alignment of PFK protein sequences, darker colors in the heatmap indicate higher sequence similarity.

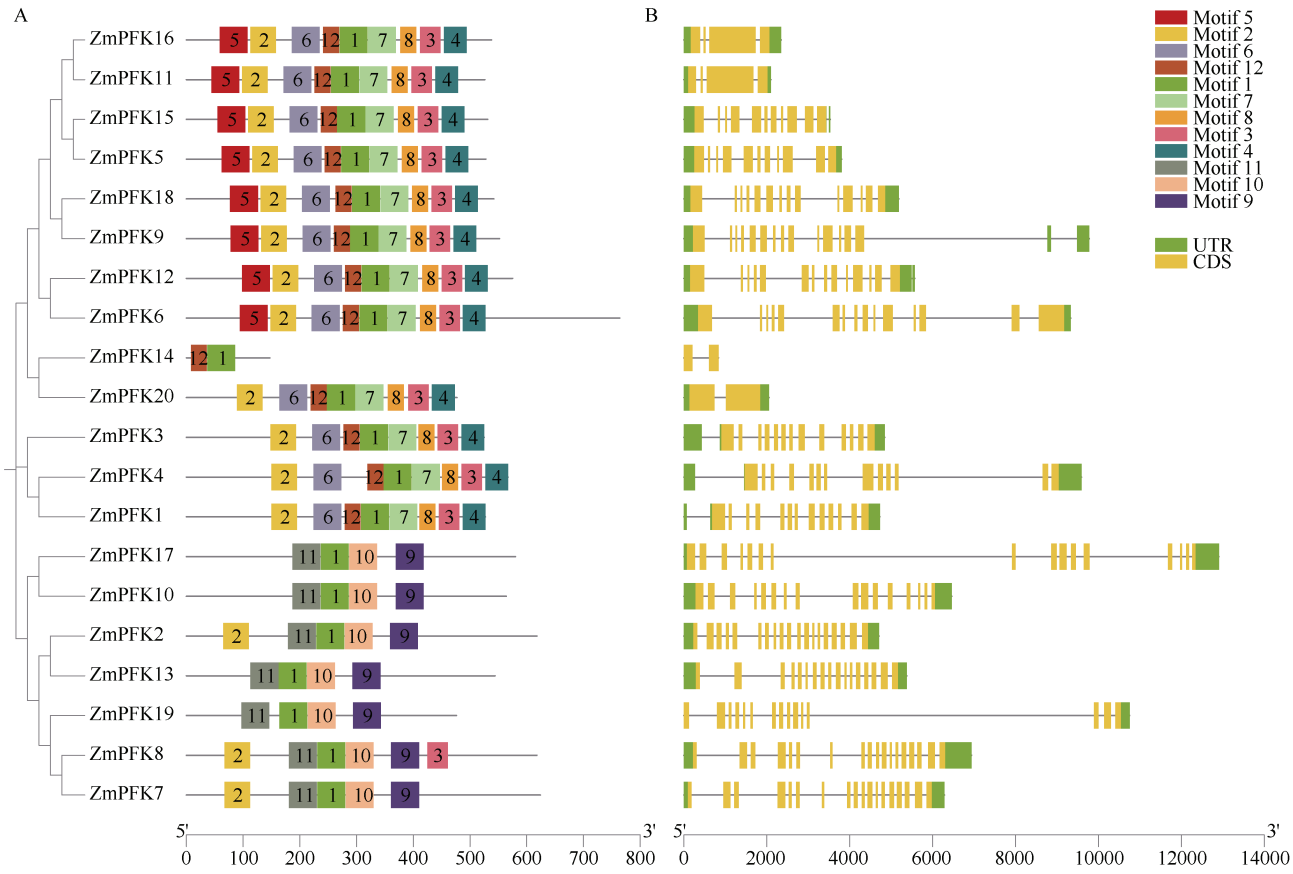


图 3　玉米 PFK 家族保守基序和基因结构分析

Fig. 3　Conserved motifs and gene structure analysis of the maize PFK family

A: 保守基序; B: 基因结构。A: conserved motif; B: gene structure.

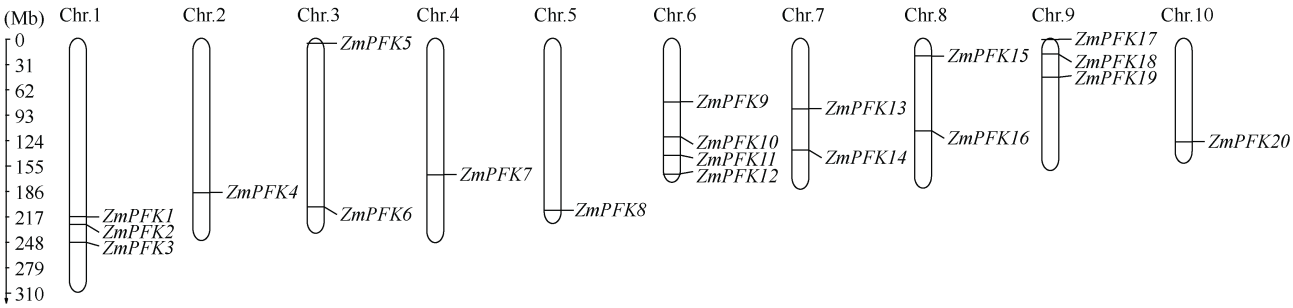
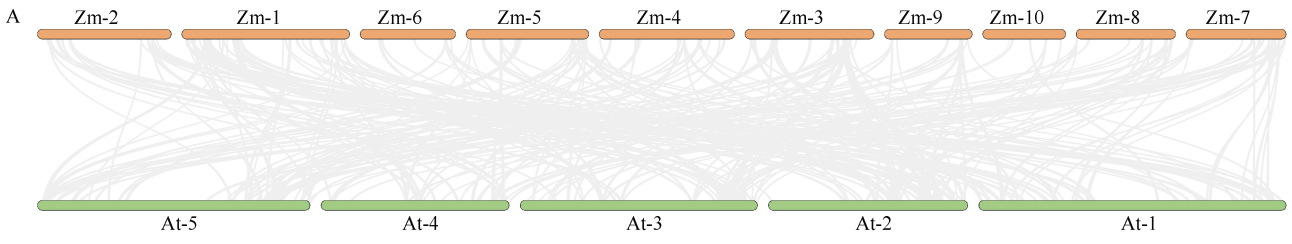


图 4　玉米 *PFK* 基因在染色体上的分布

Fig. 4　Chromosomal distribution of maize *PFK* genes



(图 5)

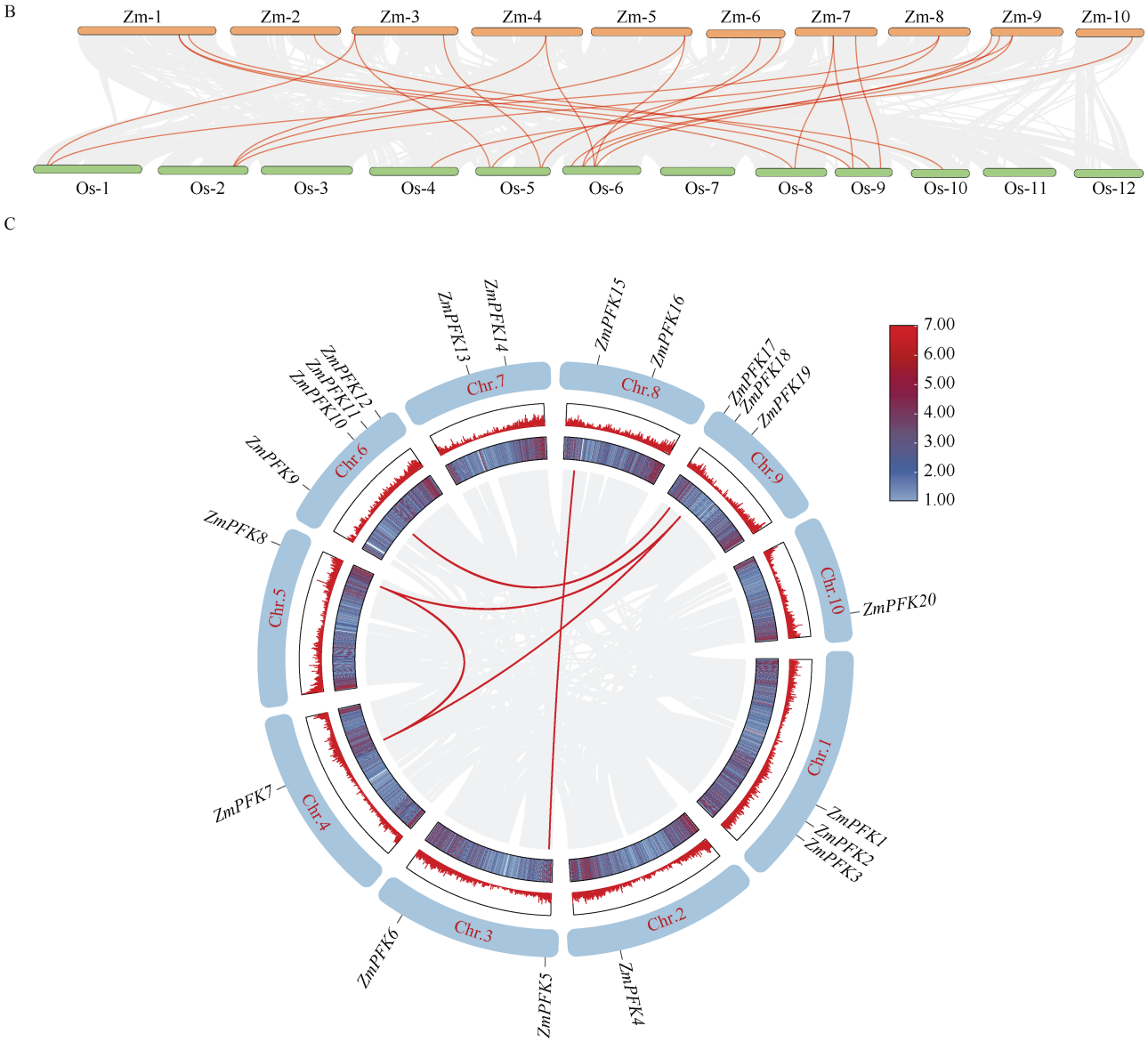


图 5 拟南芥、水稻和玉米的共线性分析与玉米 PFK 家族共线性分析

Fig. 5 Synteny analysis of *PFK* genes in *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), and *Zea mays* (Zm)

A: 玉米与拟南芥基因组间的共线性关系; B: 玉米与水稻基因组间的共线性关系; C: 玉米基因组内共线性关系。灰线代表物种间基因组所有共线性关系, 红线表示 *PFK* 基因在物种间的共线性关系。Zm: 玉米; At: 拟南芥; Os: 水稻。渐变色注图表示染色体上每 10 kb 基因数量。

A: syntenic relationships between maize and *Arabidopsis* genomes; B: syntenic relationships between maize and rice genomes; C: intra-genomic synteny within maize. Gray lines indicate all genomic syntenic relationships, red lines highlight *PFK* gene synteny. Zm: *Zea mays*; At: *Arabidopsis thaliana*; Os: *Oryza sativa*. Gradient bars indicate the number of genes per 10 kb on chromosomes.

育相关元件(WRE3)。几乎每一个家族成员都具有激素相关元件与应激反应元件, 且与脱落酸相关的元件的数量最多, 其中 STRE、MYB 和 MYC 存在于所有 *ZmPFKs* 基因的启动子序列。此外, 发现 TATC-box 只存在于 PFK 成员中, PFP 类群成员相较于 PFK 类群成员的顺式作用元件数量更少。

2.6 玉米 PFK 家族成员组织特异性表达

为了研究 *ZmPFKS* 基因在植物各组织中的表达, 从 MaizeGDB 网站下载了 20 个 *ZmPFKs* 基因在 8 个组织中的标准化数据进行制图(图 7)。结果表明, *ZmPFK9*、*ZmPFK11*、*ZmPFK13*、*ZmPFK14*、*ZmPFK16* 和 *ZmPFK19* 在 8 个组织中表达水平均相对较低, *ZmPFK2*、*ZmPFK7*、*ZmPFK8*、*ZmPFK10*、*ZmPFK17* 在大部分组织中均有较高的表达。PFP 类型的家族成员在各部位的表达量相对较高, 这表明 PFP 蛋白可能在植物生长发育阶段具有更加重要的作用。

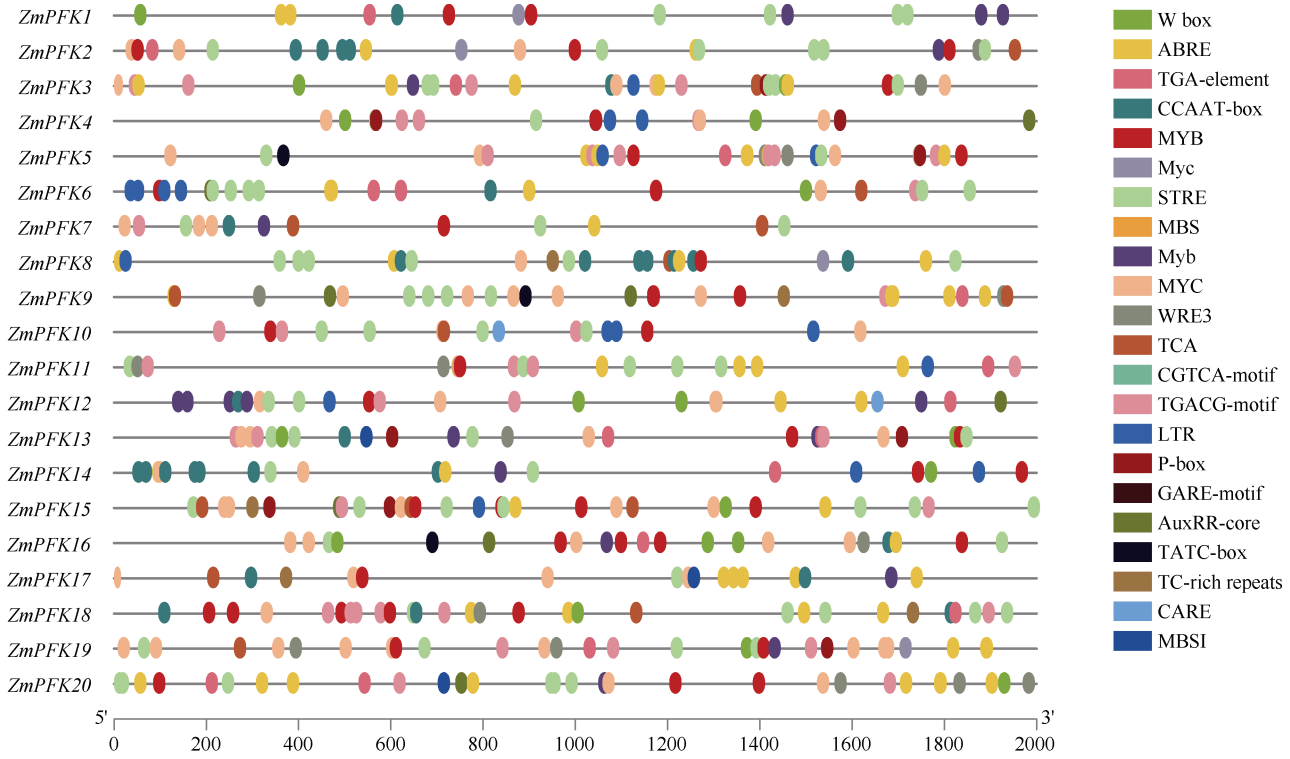


图 6　玉米 *PFK* 基因启动子顺式作用元件预测

Fig. 6　Prediction of *cis*-acting elements in the promoters of maize *PFK* genes

W-box: WRKY 转录因子特异结合位点; ABRE: 脱落酸响应元件; TGA-element: 生长素响应元件; CCAAT-box: 以核心序列 5'-CCAAT-3'命名; MBS、MBSI、MYB: MYB 转录因子结合位点; STRE: 应激响应元件; MYC: MYC 转录因子特异结合位点; WRE3: 伤口响应元件; TCA: 以元件中包含 TCA 序列命名; CGTCA-motif: 以核心序列 5'-CGTCA-3'命名; LTR: 低温响应元件; P-box: 赤霉素响应元件; GARE-motif: 赤霉素响应元件; AuxRR-core: 生长素响应核心元件; TATC-box: 以核心序列 5'-TATC-3'命名; TC-rich repeats: 以富含 TC 重复序列命名; CARE: C 和 G 框相关联的顺式作用元件。

W-box: the binding site for WRKY transcription factors; ABRE: abscisic acid responsive element; TGA-element: auxin-responsive element (AuxRE); CCAAT-box: named for its core consensus sequence 5'-CCAAT-3'; MBS, MBSI, and MYB: recognized by MYB transcription factors; STRE: stress response element; MYC: recognized by MYC transcription factors; WRE3: wound-responsive element 3; TCA: named for its core sequence, which often contains "TCA"; CGTCA-motif: named for its core sequence 5'-CGTCA-3'; LTR: low-temperature responsive element; P-box: gibberellin-responsive element (GARE); GARE-motif: gibberellin-responsive element motif; AuxRR-core: auxin response region core; TATC-box: named for its core sequence 5'-TATC-3'; TC-rich repeats: DNA sequences characterized by thymine-cytosine-rich repeats; CARE: C-box and G-box associated *cis*-acting element.

2.7　玉米 PFK 家族成员胁迫表达模式分析

根据公共转录组数据初步分析 *ZmPFKs* 在外界胁迫下的表达情况并进行可视化制图(图 8)。在盐胁迫下, *ZmPFK1*、*ZmPFK7*、*ZmPFK8*、*ZmPFK9*、*ZmPFK10* 的表达量上升, *ZmPFK16*、*ZmPFK19* 的表达量下调。在高温、干旱以及低温胁迫下, 大多数 *ZmPFK* 基因变化幅度不明显, *ZmPFK13*、*ZmPFK16*、*ZmPFK20* 在高温胁迫后表达量下降 2~3 倍, 干旱胁迫下 *ZmPFK2*、*ZmPFK13* 表达量上调。

为了研究玉米 ZmPFKs 基因家族在不同病菌侵染过程下的表达量变化, 基于公共转录组数据, 选择玉蜀黍平脐蠕孢菌、玉蜀黍凸脐蠕孢菌和禾谷镰孢侵染的 RNA-seq 数据研究 *ZmPFKs* 在生物胁迫下的表达情况。结果表明, 在 3 种病原菌侵染玉米的叶片或根部之后, 没有检测到 *ZmPFK9*、*ZmPFK11*、*ZmPFK14* 的表达。在玉蜀黍平脐蠕孢菌(玉米小斑病菌)侵染玉米叶片后, *ZmPFK3*、*ZmPFK4*、*ZmPFK6*、*ZmPFK8*、*ZmPFK10*、*ZmPFK12*、*ZmPFK16*、*ZmPFK20* 表达量上升, 而 *ZmPFK5*、*ZmPFK19* 表达量下降; 玉蜀黍凸脐蠕孢菌(玉米大斑病菌)侵染后, *ZmPFK1*、*ZmPFK6*、*ZmPFK19* 表达量先下降后上升, 而 *ZmPFK2*、*ZmPFK7* 的表达量先上升后下降; 禾谷镰孢侵染玉米根部之后, *ZmPFK15*、*ZmPFK16* 表达量上升, *ZmPFK20* 表达量下降。

根据转录组分析结果, 挑选 *ZmPFK5*、*ZmPFK6*、*ZmPFK10*、*ZmPFK12*、*ZmPFK19*, 采用 qRT-PCR 试

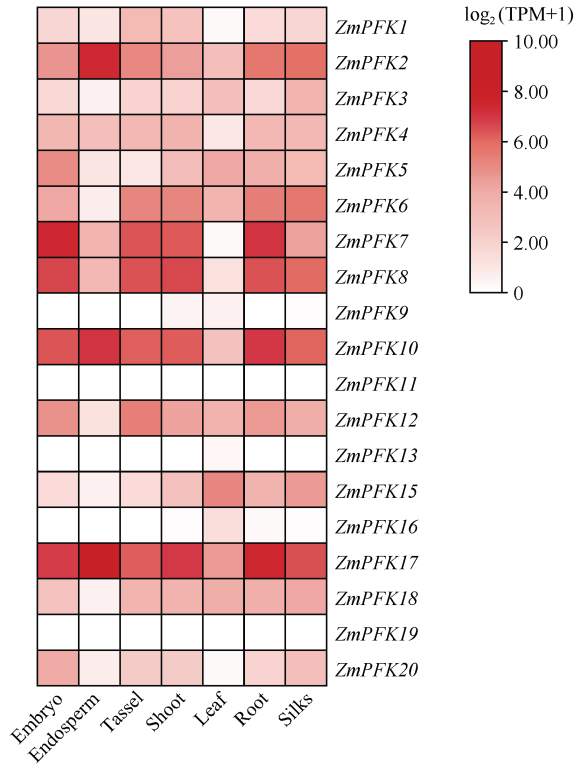


图 7 玉米 *PFK* 基因组织特异性表达

Fig. 7 Tissue-specific expression of *PFK* genes in maize

验验证 *ZmPFK* 在盐胁迫、高温胁迫、干旱胁迫以及小斑病原菌侵染下的表达量变化(图 9)。结果发现，所选基因均响应小斑病菌侵染，*ZmPFK6*、*ZmPFK10*、*ZmPFK12* 表达量上调而 *ZmPFK5*、*ZmPFK19* 表达量下调；而在盐处理后，只有 *ZmPFK6* 基因在处理前后表达无差异；*ZmPFK6*、*ZmPFK10*、*ZmPFK19* 响应干旱处理，且 *ZmPFK6*、*ZmPFK10* 表达量显著上调，而 *ZmPFK19* 表达量降低；只有 *ZmPFK10*、*ZmPFK12* 响应高温胁迫，*ZmPFK10* 表达量上调而 *ZmPFK12* 表达量下调。

2.8 *ZmPFK10* 克隆与功能验证

根据 *ZmPFK10* 的 CDS 序列，设计引物后进行 PCR 扩增(图 10)。结果显示，获得一条 1000~2000 bp 之间的特异性条带。在未处理的 LB 培养基上，转化大肠杆菌 BL21 的对照菌和重组菌的生长差异不明显。而在含有 700 mmol L^{-1} NaCl 的 LB 培养基上和高温胁迫下的培养结果显示，*ZmPFK10* 的菌落生长情况优于空载菌落。结果表明，*ZmPFK10* 的表达能提高大肠杆菌 BL21 的耐盐和耐高温能力(图 11)。

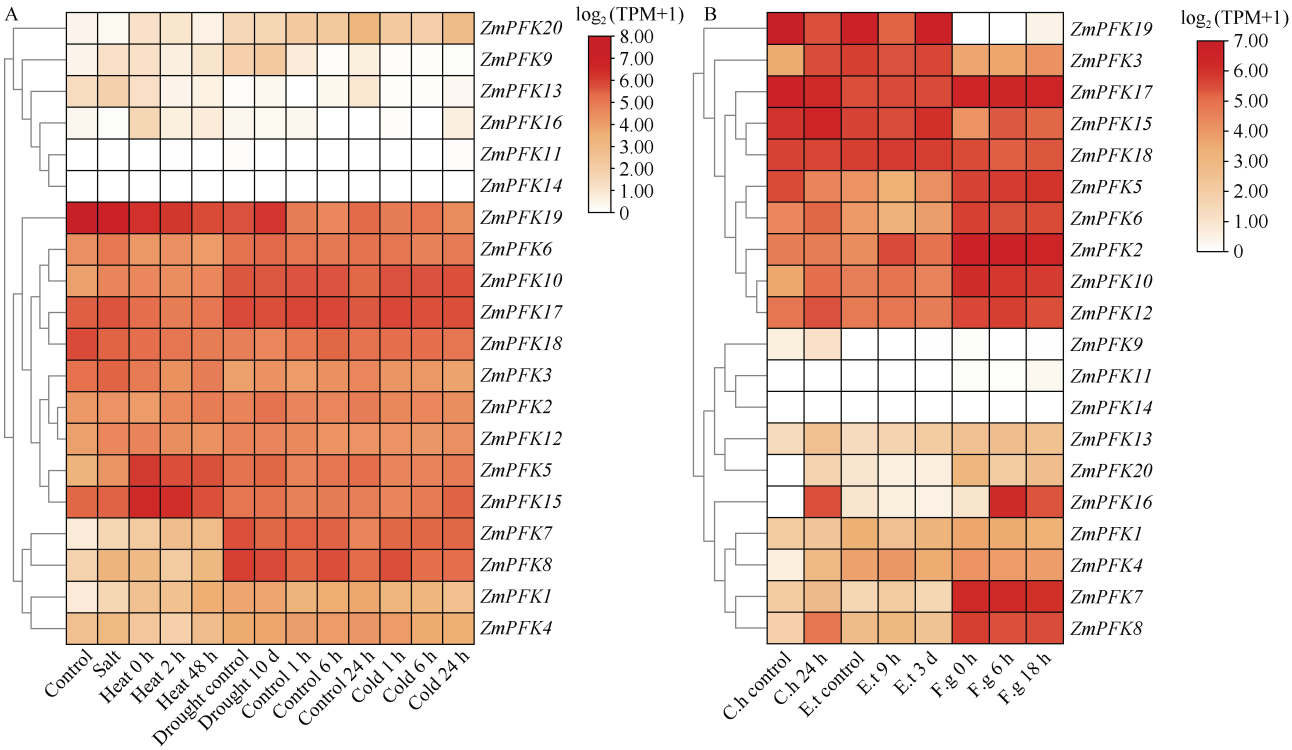


图 8 *ZmPFK* 基因在非生物胁迫与生物胁迫下的表达

Fig. 8 Expression of *ZmPFK* gene under abiotic and biotic stresses

A: 非生物胁迫，Salt 为盐胁迫，Heat 为热胁迫，Drought 为干旱胁迫，Cold 为冷胁迫；B: 生物胁迫，C.h 为玉蜀黍平脐蠕孢菌，E.t 为玉蜀黍凸脐蠕孢菌，F.g 为禾谷镰孢。

A: abiotic stress. Salt indicates salt stress, Heat indicates heat stress, Drought indicates drought stress, Cold indicates cold stress; B: biotic stress. C.h indicates *Cochliobolus heterostrophus*, E.t indicates *Exserohilum turcicum*, F.g indicates *Fusarium graminearum*.

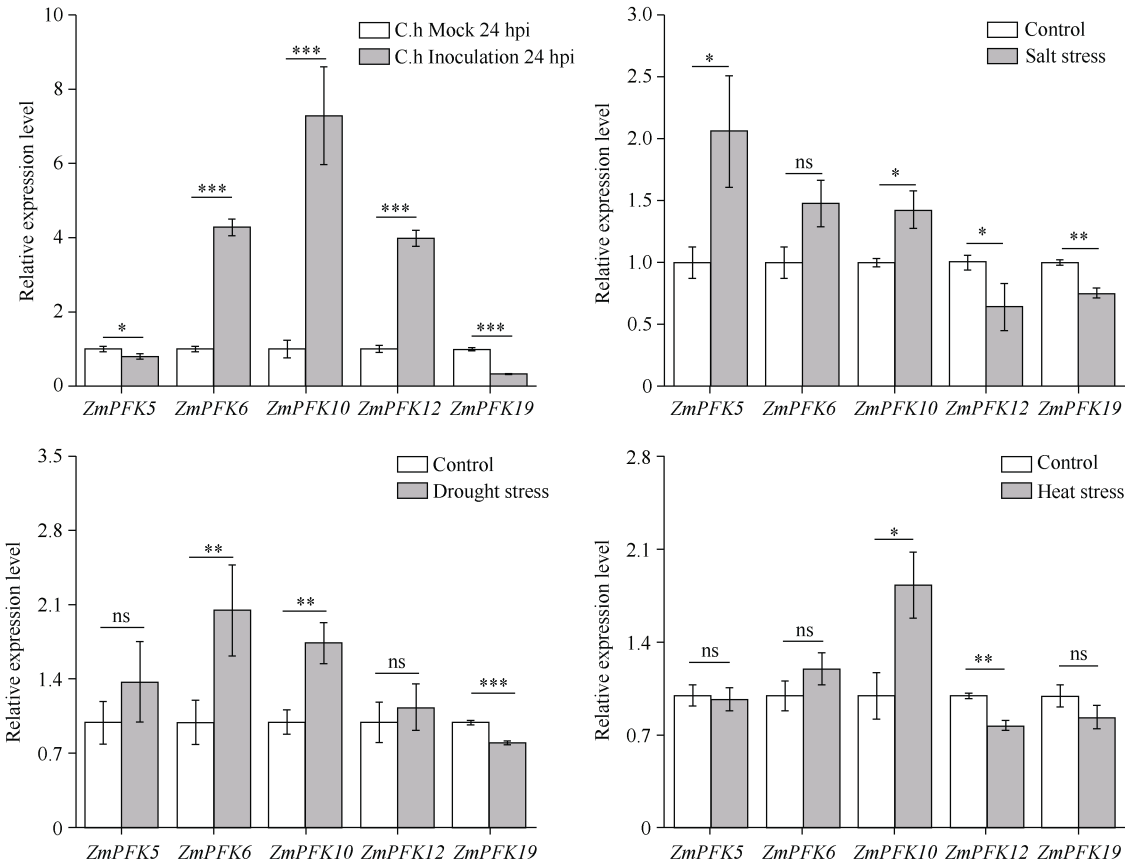


图 9　*ZmPFK* 基因实时荧光定量结果

Fig. 9　Real-time quantitative analysis of *ZmPFK* gene expression

C. h: 玉蜀黍平脐蠕孢菌侵染。*t* 检验进行显著性分析。ns: 差异不显著。

C. h: *C. heterostrophus* infection. Significance was assessed by Student's *t*-test. ns: no significant difference; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

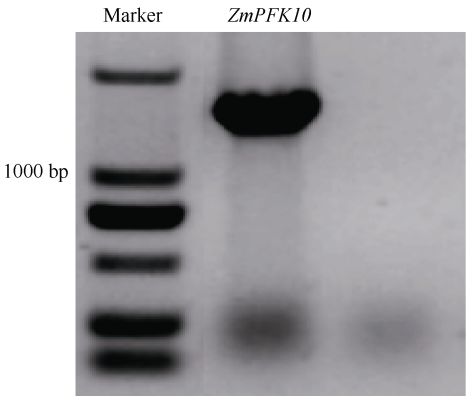


图 10　*ZmPFK10* 的扩增

Fig. 10　Amplification of *ZmPFK10*

第 1 泳道为 2000 bp 的 Marker; 第 2 泳道为加入模板的克隆; 第 3 泳道为未加模板的阴性对照。

Lane 1: 2000 bp DNA ladder; lane 2: clone with template; lane 3: negative control.

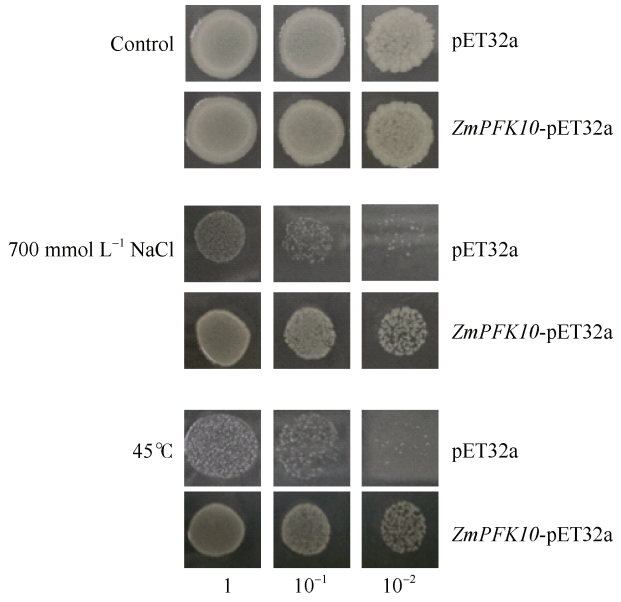


图 11　*ZmPFK10* 在大肠杆菌 BL21 中的功能验证

Fig. 11　Functional verification of *ZmPFK10* in *E. coli* BL21

2.9　玉米 PFK 家族蛋白网络互作分析

为了鉴定 ZmPFK 的互作蛋白, 使用 STRING 数据库预测了 12 种与 ZmPFK 蛋白存在相互作用的蛋白(图 12-A)。使用 STRING 数据库检索之后发现, 这

12 种蛋白可以分为磷酸转移酶、1,6-二磷酸果糖醛缩酶、2,6-二磷酸果糖磷酸酶、磷酸己糖异构酶、醛缩酶五种类型。磷酸己糖异构酶 A0A1D6I644 (*ZmPHI3*)、C0PAU7_MAIZE (*ZmPHI2*)、ZmPHI1 是 ZmPFK 蛋白网络的 3 个核心，与除 ZmPFK7、ZmPFK13、ZmPFK14 和 ZmPFK19 以外其他家族蛋白均具有相互作用关系。蛋白网络分析表明，ZmPFK 蛋白最为可能和磷酸己糖异构酶联系密切并具有相互作用。KEGG 富集分析表明，多个 ZmPFK 家族成员与 ZmPHI1 (图 12-B)、ZmPHI3 (图 12-C)蛋白可能互作，共同驱动磷酸戊糖途径、糖酵解/糖异生途径和半乳糖途径。

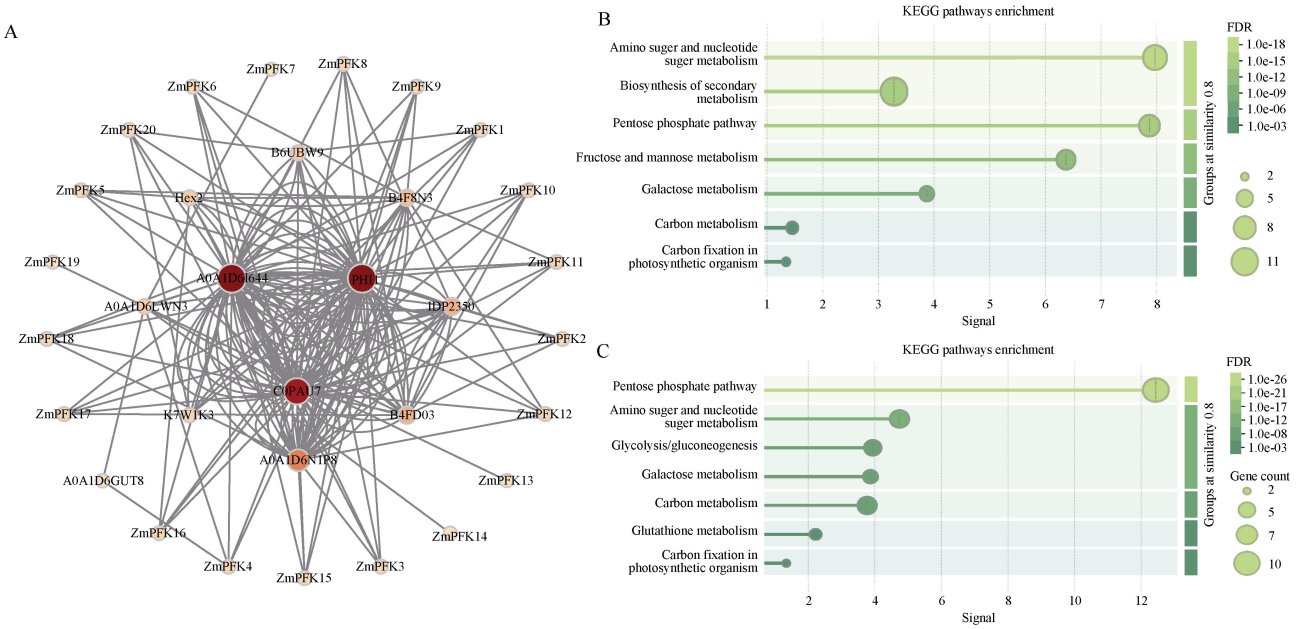


图 12 ZmPFK 蛋白互作网络和核心互作蛋白的 KEGG 富集分析

Fig. 12 Protein-protein interaction network of ZmPFK and KEGG enrichment analysis of core interacting proteins

3 讨论

糖酵解是生物体产生能量的共同代谢反应，糖酵解途径中相关产物和反应酶能够参与信号转导、能量代谢等过程[14,27]。其中，己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶分别催化糖酵解途径中 3 个不可逆反应。己糖激酶在植物中的生理功能已经被鉴定[4-5]，但关于磷酸果糖激酶参与胁迫响应的研究较少，作为第二步限速反应的关键酶，其激酶活性能够磷酸化 6-磷酸果糖，暗示其可能影响与其他糖类代谢激酶协同作用，参与植物胁迫响应。

本研究在全基因组水平共鉴定出 20 个家族成员(13 个 ATP 依赖型 PFK 和 7 个焦磷酸依赖型 PFP)。这一家族规模显著大于拟南芥(11 个)和水稻(13 个)，暗示玉米作为 C_4 作物可能对糖酵解通路调控的复杂性需求更高。进化结果显示，拟南芥、水稻与玉米中的 *PFK* 基因分布于所有类群中，表明 PFK 蛋白在单子叶与双子叶植物间具有保守性。蛋白序列比对表明，PFK 比 PFP 具有更多的类群，这表明 PFK 类型在进化过程中可能具有更加复杂的功能。而且，玉米与水稻的同源基因对数量显著多于与拟南芥的同源基因对，这一结果与单子叶植物(玉米、水稻)和双子叶植物(拟南芥)的进化分歧一致[42]。基因结构分析表明，PFK 和 PFP 类型基因的外显子数量差异显著，且内含子长度存在高度变异性，这种结构差异可能通过可变剪接机制产生功能多样的转录本，从而增强基因家族的功能可塑性[43-44]。基因复制是驱动基因家族扩张和功能分化的重要机制[45-46]。研究发现，玉米 PFK 基因家族的扩张主要通过片段复制实现，5 对重复基因的 K_a/K_s 值均小于 1，表明这些基因在进化过程中受到强烈的纯化选择压力，功能分化有限，这与前人在棉花和木薯中的发现一致[28-29]。共线性分析表明，玉米与水稻中存在多对直系同源基因(如 *ZmPFK1*/*OsPFK3*)，但未发现与拟南芥的直系同源关系，表明单子叶与双子叶植物在糖代谢基因进化上可能存在显著分歧，这种分化可能与玉米作为 C_4 作物对高光效和逆境适应的独特需求相关。

启动子顺式作用元件分析表明, *ZmPFK* 基因包含多种激素调节和逆境响应的元件。所有家族成员均含有脱落酸(ABRE)、干旱(MBS)和低温(LTR)响应元件, 表明PFK类型基因可能更直接地参与ABA介导的胁迫信号通路, 印证了糖信号与ABA途径协同调控逆境响应的经典模型[47]。组织特异性表达分析显示, PFK 类型基因(如 *ZmPFK5* 和 *ZmPFK18*)在光合组织(叶和穗)中高表达, 而 PFP 类型基因(如 *ZmPFK7* 和 *ZmPFK10*)在代谢活跃的根和胚乳中占主导, 与水稻中 PPi-PFK 在低氧组织中活跃的报道一致[23]。由此推断, 叶片中 PFK 的高表达可能通过增强糖酵解速率支持光合产物的快速转化, 而根中 PFP 的活跃可能通过焦磷酸代谢适应低氧或盐碱环境[23]。

测序技术的进步为探究植物基因功能提供理论支撑, 通过整合和发掘这些信息数据可以更好地了解基因在不同条件下的表达情况。前人研究发现, 不同植物中的 *PFK* 基因能够响应不同的生物胁迫与非生物胁迫[39,48]。通过对 *ZmPFK* 基因在不同胁迫条件下的表达情况分析, 发现 *ZmPFK* 对生物胁迫的响应更加全面, 存在更多差异表达的基因, 这表明 *PFK* 基因可能催化糖酵解过程产生更多的中间代谢产物, 影响大分子多糖(纤维素等)的产生进而增强植物细胞对外界胁迫的防御。结合转录组数据与定量试验验证发现, 在盐、高温、干旱以及小斑病菌侵染后 *ZmPFK10* 均呈现明显的上调趋势, 此外, 通过原核表达试验验证了 *ZmPFK10* 在盐胁迫和高温胁迫下的功能, 表明 *ZmPFK10* 可能是响应胁迫的关键基因。综上所述, PFK 型(ATP 依赖型)基因可能通过增强糖酵解代谢来提供能量从而支持渗透调节和抗氧化防御; 而 PFP 作为焦磷酸依赖型酶, 其活性受果糖-2,6-二磷酸(F-2,6-BP)的调控, PFP 型基因可能通过调节焦磷酸代谢平衡缓解 ATP 匮乏, 反映其对能量波动环境更强的适应性。

研究表明, PFK 通过磷酸化和激活 AMP 依赖的蛋白激酶(AMPK)来增加糖酵解通量, 并且糖酵解通量的速率调整是通过调节有关酶的活性来实现的, 因此糖酵解代谢速率直接影响植物应对逆境胁迫的能力[18,25]。通过蛋白互作网络分析表明, ZmPFK 与磷酸己糖异构酶(ZmPHI1/3)、醛缩酶等糖代谢酶具有互作关系, 通过 KEGG 分析发现其富集于糖酵解和磷酸戊糖途径, 这揭示了糖酵解-磷酸戊糖途径耦合模型: 胁迫下 *PFK* 基因上调可加速 ATP 生成, 又能通过磷酸戊糖途径提供 NADPH 以维持氧化还原稳态, 协同增强抗逆性, 这与前人在拟南芥中发现的 PFK 与磷酸己糖异构酶的互作一致[26], 上述内容进一步证实了 *PFK* 基因在糖酵解过程中的核心作用。

4　结论

玉米 B73 自交系基因组中共鉴定出 20 个 ZmPFK 家族成员, 分为 2 种类型。*ZmPFK* 启动子中富含多种生物与非生物胁迫的顺式作用元件, 转录组数据以及定量试验发现了多个受不同胁迫诱导的 ZmPFK 成员, 且利用大肠杆菌系统验证了 *ZmPFK10* 能够增强菌株 BL21 的耐盐性与耐高温能力。蛋白互作网络分析发现, ZmPFK 蛋白与磷酸己糖异构酶(ZmPHI1/3)、醛缩酶等糖代谢酶可能具有互作关系, 且互作蛋白富集于糖酵解和磷酸戊糖途径。

References

[1] Zhu J K. Abiotic stress signaling and responses in plants. Cell, 2016, 167: 313–324.

[2] van Zelm E, Zhang Y X, Testerink C. Salt tolerance mechanisms of plants. Annu Rev Plant Biol, 2020, 71: 403–433.

[3] Sturm A. Invertases, primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. Plant Physiol, 1999, 121: 1–8.

[4] Dong Y H, Silbermann M, Speiser A, et al. Sulfur availability regulates plant growth *via* glucose-TOR signaling. Nat Commun, 2017, 8: 1174.

[5] 陈宏艳, 李小二, 李忠光. 糖信号及其在植物响应逆境胁迫中的作用. 生物技术通报, 2022, 38(7): 80–89.
Chen H Y, Li X E, Li Z G. Sugar signaling and its role in plant response to environmental stress. Biotechnol Bull, 2022, 38(7): 80–89 (in Chinese with English abstract).

[6] Bolouri-Moghaddam M R, Le Roy K, Xiang L, et al. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. FEBS J, 2010, 277: 2022–2037.

[7] Roberts M R, Paul N D. Seduced by the dark side: integrating molecular and ecological perspectives on the influence of light on plant defence against pests and pathogens. New Phytol, 2006, 170: 677–699.

[8] Liu W, Gendron J M. Same concept different outcomes: sugars determine circadian clock protein fate in animals and plants. Mol Plant, 2020, 13: 360–362.

[9] Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, et al. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 2006, 140: 637–646.

[10] Kim M S, Cho S M, Kang E Y, et al. Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization. Mol Plant Microbe Interact, 2008, 21: 1643–1653.

[11] Denoux C, Galletti R, Mammarella N, et al. Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. Mol Plant, 2008, 1: 423–445.
[12] Li J, Yao X, Zhang J L, et al. Genome-wide identification and expression analysis of hexokinase gene family under abiotic stress in tomato. Plants, 2025, 14: 441.
[13] Supriya L, Dake D, Woch N, et al. Sugar sensors in plants: orchestrators of growth, stress tolerance, and hormonal crosstalk. J Plant Physiol, 2025, 307: 154471.
[14] Jang J C, Sheen J. Sugar sensing in higher plants. Trends Plant Sci, 1997, 2: 208–214.
[15] Lu C G, Lin C C, Lee K W, et al. The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice. Plant Cell, 2007, 19: 2484–2499.
[16] Xiong Y, McCormack M, Li L, et al. Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. Nature, 2013, 496: 181–186.
[17] Li Z G, Luo L J, Zhu L P. Involvement of trehalose in hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced the acquisition of heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. Bot Stud, 2014, 55: 20.
[18] Kierans S J, Taylor C T. Glycolysis: a multifaceted metabolic pathway and signaling hub. J Biol Chem, 2024, 300: 107906.
[19] Baena-González E, Hanson J. Shaping plant development through the SnRK1-TOR metabolic regulators. Curr Opin Plant Biol, 2017, 35: 152–157.
[20] Eom S H, Kim E, Hyun T K. HXK, SnRK1, and TOR signaling in plants: unraveling mechanisms of stress response and secondary metabolism. Sci Prog, 2024, 107: 368504241301533.
[21] Hoxhaj G, Manning B D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. Nat Rev Cancer, 2020, 20: 74–88.
[22] Winkler C, Delvos B, Martin W, et al. Purification, micro sequencing and cloning of spinach ATP-dependent phosphofructokinase link sequence and function for the plant enzyme. FEBS J, 2007, 274: 429–438.
[23] Mustroph A, Stock J, Hess N, et al. Characterization of the phosphofructokinase gene family in rice and its expression under oxygen deficiency stress. Front Plant Sci, 2013, 4: 125.
[24] Dancer J, Hatzfeld W D, Stitt M. Cytosolic cycles regulate the turnover of sucrose in heterotrophic cell-suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. Planta, 1990, 182: 223–231.
[25] O'Leary B, Plaxton W C. Multifaceted functions of post-translational enzyme modifications in the control of plant glycolysis. Curr Opin Plant Biol, 2020, 55: 28–37.
[26] Yoshida K, Hisabori T. Biochemical basis for redox regulation of chloroplast-localized phosphofructokinase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol, 2021, 62: 401–410.
[27] Mustroph A, Sonnewald U, Biemelt S. Characterisation of the ATP-dependent phosphofructokinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett, 2007, 581: 2401–2410.
[28] Mehari T G, Xu Y C, Umer M J, et al. Genome-wide identification and expression analysis elucidates the potential role of PFK gene family in drought stress tolerance and sugar metabolism in cotton. Front Genet, 2022, 13: 922024.
[29] Wang H Y, Zhao P J, Shen X, et al. Genome-wide survey of the phosphofructokinase family in cassava and functional characterization in response to oxygen-deficient stress. BMC Plant Biol, 2021, 21: 376.
[30] Ochiki S N, Chen T X, Meng Z X, et al. Characterization of ATP-dependent phosphofructokinase genes during ripening and their modulation by phytohormones during postharvest storage of *Citrus* fruits (*Citrus reticulata* Blanco.). Plant Physiol Biochem, 2024, 217: 109235.
[31] Fu W C, Fan D L, Liu S K, et al. Correction: genome-wide identification of the phosphofructokinase gene family in maize (*Zea Mays* L.) and their expression levels under abiotic stress and phytohormones. BMC Plant Biol, 2025, 25: 1206.
[32] Perby L K, Richter S, Weber K, et al. Cytosolic phosphofructokinases are important for sugar homeostasis in leaves of *Arabidopsis thaliana*. Ann Bot, 2022, 129: 37–52.
[33] Lim H, Cho M H, Bhoo S H, et al. Pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase is involved in the tolerance of *Arabidopsis* seedlings to salt and osmotic stresses. Vitro Cell Dev Biol Plant, 2014, 50: 84–91.
[34] Chen C, He B S, Liu X X, et al. Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase (PFP1) regulates starch biosynthesis and seed development via heterotetramer formation in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Biotechnol J, 2020, 18: 83–95.
[35] Duan E C, Wang Y H, Liu L L, et al. Pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase (PFP) regulates carbon metabolism during grain filling in rice. Plant Cell Rep, 2016, 35: 1321–1331.
[36] Zhu X B, Ze M, Yin J J, et al. A phosphofructokinase B-type carbohydrate kinase family protein, PFKB1, is essential for chloroplast development at early seedling stage in rice. Plant Sci, 2020, 290: 110295.
[37] Mutuku J M, Nose A. High activities and mRNA expression of pyrophosphate-fructose-6-phosphate-phosphotransferase and 6-phosphofructokinase are induced as a response to *Rhizoctonia solani* infection in rice leaf sheaths. Physiol Mol Plant Pathol, 2012, 77: 41–51.
[38] Lu Y, Gharib A, Chen R J, et al. Rice melatonin deficiency causes premature leaf senescence *via* DNA methylation regulation. Crop J, 2024, 12: 721–731.
[39] Zhang N, Wang S S, Zhao S M, et al. Global crotonylatome and GWAS revealed a TaSRT1-TaPGK model regulating wheat cold tolerance through mediating pyruvate. Sci Adv, 2023, 9: eadg1012.
[40] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. Mol Plant, 2020, 13: 1194–1202.
[41] Wagner G P, Kin K, Lynch V J. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. Theory Biosci, 2012, 131: 281–285.
[42] 彭华, 何秀静, 高健, 等. 玉米 SBP 转录因子全基因组鉴定与功能分析. 作物学报, 2016, 42: 201–211.
Peng H, He X J, Gao J, et al. Genome-wide identification and function analysis of SBP gene family in maize. Acta Agron Sin, 2016, 42: 201–211 (in Chinese with English abstract).
[43] Yang P C, Wang D P, Kang L. Alternative splicing level related to intron size and organism complexity. BMC Genomics, 2021, 22: 853.

[44] McGuire A M, Pearson M D, Neafsey D E, et al. Cross-Kingdom patterns of alternative splicing and splice recognition. Genome Biol, 2008, 9: R50.

[45] Huo H L, Li J, Tian L M, et al. Multi-omics analysis reveals the role of UGT72 family genes in arbutin biosynthesis in *Pyrus* and evolution driven by whole genome duplication. Int J Biol Macromol, 2025, 291: 139005.

[46] Panchy N, Lehti-Shiu M, Shiu S H. Evolution of gene duplication in plants. Plant Physiol, 2016, 171: 2294–2316.

[47] Baena-González E, Rolland F, Thevelein J M, et al. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. Nature, 2007, 448: 938–942.

[48] He X R, Long F Y, Li Y J, et al. Comparative transcriptome analysis revealing the potential mechanism of low-temperature stress in *Machilus microcarpa*. Front Plant Sci, 2022, 13: 900870.