

桃果实 *PpPFK* 基因的电子克隆及低温胁迫下的转录水平分析

余芳¹, 王可¹, 邵兴锋¹, 龚一富², 王鸿飞¹, 许凤¹

(1. 宁波大学食品科学与工程系, 浙江宁波 315211) (2. 宁波大学生物与海洋科学系, 浙江宁波 315211)

摘要: 为了克隆桃果实中 *PpPFK* (*Prunus persica* phosphofructokinase, 磷酸果糖激酶) 基因, 并对其序列和不同低温胁迫下的转录水平进行分析。本研究采用了电子克隆和 RT-PCR (reverse transcription PCR) 相结合的方法分离桃果实 *PpPFK* 基因的 cDNA 全长序列, 采用 RT-qPCR (reverse transcription real-time quantitative PCR) 技术分析桃果实在 0 °C、5 °C 冷藏过程中目的基因转录水平的变化。试验成功获得了全长 1405 bp 的 *PpPFK* 基因序列, 该序列具有完整的开放阅读框 (ORF, open reading frame), 编码 232 个氨基酸。对 ORF 进行 PCR 的验证结果和电子克隆的结果一致。序列分析显示该基因的氨基酸序列同大豆和葡萄具有很高的相似度。RT-qPCR 分析显示, 5 °C 贮藏下的桃果实 *PpPFK* 基因转录水平在前 14 d 高于 0 °C 果实, 这可能导致 5 °C 贮藏的桃果实发生更明显的冷害症状。本研究结果表明, 桃果实 *PpPFK* 转录水平在不同低温贮藏过程中存在差异, 这可能在桃果实低温胁迫响应过程中发挥重要作用。

关键词: 桃; 磷酸果糖激酶; 电子克隆; 转录水平; 调控

文章编号: 1673-9078(2013)9-2125-2130

In Silico Cloning and Transcript Level Analysis of *PpPFK* in Peach Fruit Stored at Different Low Temperatures

YU Fang¹, WANG Ke¹, SHAO Xing-feng¹, GONG Yi-fu², WANG Hong-fei¹, XU Feng¹

(1. Department of Food Science and Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

(2. Department of Biology and Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In order to clone *PpPFK* (*Prunus persica* phosphofructokinase) gene and analyze its transcript levels of peach fruit stored at different low temperatures, *PpPFK* gene complete cDNA length was isolated with in silico cloning method and RT-PCR (reverse transcription PCR), and its transcript levels of peach fruit stored at 0 °C and 5 °C were examined through reverse transcription real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The *PpPFK* gene with 1405 bp was gained, which codes 232 amino acids with an ORF (open reading frame). The ORF check test was conducted and the result suggested that the sequence of *PpPFK* gene through PCR was the same as that in silico cloning. The amino acid sequence of *PpPFK* gene in peach fruit was very similar to that of *Glycine max* and *Vitis vinifera*. The RT-qPCR analysis of *PpPFK* gene indicated that its transcript levels of peach fruit stored at 5 °C were higher than that at 0 °C during first 14 days, resulting in an obvious chilling injury of peach fruit stored at 5 °C. These results revealed that *PpPFK* was cold response gene, and differential responses existed in peach fruit stored at low temperatures, indicating its important role in low temperature stress response.

Key words: peach; phosphofructokinase; silico cloning; transcript levels; regulation

水蜜桃 (*Prunus persica*) 果肉质软、果皮薄, 保护性差, 极易受机械损伤, 再加上收获期多在高温、多雨季节, 果实后熟速度很快, 易产生腐败变质, 所以通常采用低温冷藏的方法来延长贮藏期。但是桃是

冷敏性果实, 在低于 8 °C 的环境下贮藏 2 周及 2 周以上就会出现冷害症状^[1]。冷害是限制桃果实长期贮藏的主要问题, 会导致果实丧失商品价值。

膜被认为是冷害发展的最基本位点, 受抗氧化酶类和 ATP 的保护^[2]。糖可通过一系列代谢途径为生物体提供大量的 ATP 和还原力, 糖酵解就是其中第一个反应。而作为糖酵解途径最关键的调控酶-磷酸果糖激酶 (phosphofructolase, PFK) 的作用受到了研究者的广泛关注。它不可逆地催化果糖-6-磷酸和 ATP 生成果糖 1, 6-二磷酸和 ADP, 在糖酵解中的调控作用最

收稿日期: 2013-05-15

基金项目: 国家自然科学基金 (31000825); 浙江省自然科学基金 (Y3090537); 宁波市农业攻关项目 (2010C10021)

作者简介: 余芳 (1990-), 女, 硕士, 从事果蔬采后贮藏与保鲜研究

通讯作者: 邵兴锋 (1980-), 男, 博士, 副教授, 主要从事食品贮藏与保鲜研究

明显。PFK存在于植物的细胞质和质体中,早期研究者们对植物中PFK的研究多集中在活性变化上^[3]。随着科研水平的进步,人们纷纷开始克隆PFK的cDNAs,并结合运用基因、分子手段对它进行研究。目前已经在毛果杨,蒺藜苜蓿,拟南芥等植物中得到研究,但桃果实PFK在此领域的研究还未见报道。

低温贮藏会导致植物体内糖代谢调整,主要代谢调控酶也发生调整,进而影响ATP和还原力含量发生变化。因此,本文将克隆编码桃果实PFKcDNAs,对其生物信息学和低温胁迫下转录水平进行分析,以期为进一步探讨研究桃果实冷害机理提供试验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验样品

玉露桃 (*Prunus persica* L. cv. Yulu) 果实: 采自浙江省宁波市奉化溪口镇果园。

1.1.2 主要试剂

Recombinant DNase I, 宝生物工程(大连)有限公司; PrimeScript™ RT reagent Kit, 宝生物工程(大连)有限公司; SYBR Premix ExTaq™ II, 宝生物工程(大连)有限公司; Taq酶预混液, 上海捷瑞生物工程有限公司; DNA回收试剂盒, 上海生物工程有限公司; 琼脂糖, 上海博耀生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器

J-E 高速冷冻离心机, Beckman, USA; Nanodrop1000分光光度计, Thermo scientific, USA; DYY-5型稳压稳流电泳仪, 北京六一仪器公司; DYCP-34A型电泳槽, 北京六一仪器公司; Alphaimager TM 2200凝胶成像系统, Alpha, USA; 梯度PCR仪, Eppendorf, Germany; Mastercycler ep realplex实时荧光定量PCR仪, Eppendorf, Germany。

1.2 试验方法

1.2.1 样品分组与处理

样品采后立即运回实验室并迅速预冷。挑选无伤害、果型端正、七成成熟的果实,用厚度为0.03 mm的聚乙烯塑料袋包装,每袋6个。试验设置两个贮藏温度: 0 °C和5 °C; 贮藏相对湿度为92~95%, 贮藏时间为28 d。在贮藏起点和每7 d取样,沿果实赤道两侧切取1 cm左右厚的中果皮,立即用液氮冷冻,置于-40 °C冰箱中用于分子试验; 同时观察其冷害发生情况。每个处理重复3次,试验重复2次。

1.2.2 RNA提取与纯化 RNA

RNA样品用 Recombinant DNase I 处理去除痕量的DNA。最终的RNA用RNase free水溶解,1%琼脂糖凝胶检查完整性, RNA的含量通过 Nanodrop1000分光光度计测定^[4]。

1.2.3 cDNA合成

取1 μg的总RNA用 PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录合成cDNA。所有的cDNAs样品在-20 °C保存。样品稀释10倍用于后续的克隆和qPCR试验。

1.2.4 电子克隆

以“phosphofructokinase prunus persica”为关键词在NCBI的EST库中搜索一段相似于PFK的桃序列,再以相似序列为种子序列Blast桃子的EST库,将所有与此序列相似的片段下载,用VectorNTI Advance11.5.1拼接成contig,再用此contig为种子序列重复上述操作直到没有新的序列发现为止,最终获得1405 bp的contig,通过ORF finder寻找该contig的ORF。

1.2.5 基因ORF扩增

在拼接的全长cDNA ORF外设计一对上下游引物用来验证ORF。上游引物PFK(F): TGTCCCATCTTTC TGTTTGCT, 下游引物PFK(R): CAGGACCGAG GAATAAATCAG。反应体系为25 μL: Taq酶预混液12.5 μL, cDNA 1 μL, 上下游引物各1 μL, 超纯水9.5 μL。反应参数为94 °C预变性5 min, 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 90 s, 37个循环, 72 °C延伸10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后用DNA回收试剂盒回收目的片段,接着连接到克隆载体pMD19-T,连接物转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞中,涂板鉴定,菌液测序,测序由上海生物工程有限公司完成。

1.2.6 生物信息学分析

蛋白质的亲水/疏水性、跨膜结构域、转运肽、信号肽,亚细胞定位,磷酸化位点分析分别由ProtScale、TMHMM Server V. 2.0、TargetP1.1 Server, SignalP-4.1, PSORT Prediction, NetPhos 2.0 Server在线程序进行预测; 利用Expasy ProtParam、PSIPRED和SOPMA软件分析蛋白质的一级、二级结构。系统进化树使用MEGA 5.0软件包,以邻接法(Neighbor joining)构建,使用1000次的自展值(bootstrap)以评价系统树分支节点置信度。

1.2.7 不同温度贮藏期间桃果实 PpPFK 表达量分析

在PpPFK的3'非翻译区(3' UTR)设计上下游引物,上游引物: TCTTGCATCGACGAACCAGC, 下游引物: AAGCCGTAAGTCATGTCACCTTG, 扩增片段的长度为246 bp。本研究应用Eppendorf/Mastercycler ep realplex实时定量PCR仪,以TEF2 (translation elongation factor 2)为内参基因进行qPCR

扩增。20 μL扩增体系含2 μL cDNA, 上下游引物各0.4 μL, 10 μL SYBR Premix ExTaq™ II 和7.2 μL超纯水。反应条件为: 95 °C 2 min, 94 °C 15 s, 55 °C 20 s, 72 °C 25 s运行40个循环, 反应结束后分析荧光值变化曲线以及融解曲线。试验设计3次重复, 使用Excel软件分析试验数据。

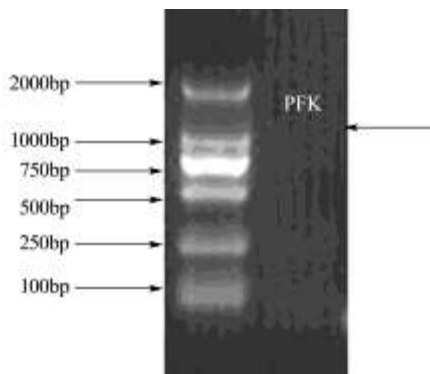


图1 PFK基因的PCR检测

Fig.1 PCR result of PFK gene

1.2.8 不同低温贮藏期间桃果实冷害情况分析
桃果实沿缝合线纵向切分, 观察内部果肉的褐变情况, 参考文献Meng^[5]的方法进行褐变等级划分和计算, 以褐变指数表征冷害发生情况。

1.3 统计分析

采用 SPSS 17.0软件进行统计分析, 实验数据用平均数±标准误差表示, 并进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 结果

利用合成的上下游引物进行PCR验证, 结果如图1所示, PFK在1400 bp左右, 与电子克隆预测序列的长度吻合。

2.2 水蜜桃 PFK 基因的序列组成及理化性质分析

通过克隆获得PFK基因全长1405 bp, 编码232个氨基酸, 终止子为TAA (图2)。用Protparam软件预测水蜜桃PFK编码蛋白的理化性质, 推测该蛋白的分子量为25714.20, 等电点为5.07; 不稳定系数为29.48, 属于稳定蛋白 (以40为界, 40以上为不稳定蛋白, 40以下则为稳定蛋白)。由于GenBank尚没有桃果实PFK类mRNA序列登陆, 我们将该基因命名为PpPFK, 递交到GenBank, 登陆号为KC700019。



图2 PpPFK基因 cDNA 及推测的氨基酸序列

Fig.2 Sequences of PpPFKcDNA and its deduced amino acids

注: 加粗的核苷酸分别为起始密码子和终止密码子(*)。

2.3 PpPFK 的编码蛋白结构分析

2.3.1 PpPFK 编码蛋白的亲/疏水性

用ProtScale软件对PpPFK编码蛋白进行亲水性/疏水性分析, 结果表明: 第12位的异亮氨酸 (Ile) 疏水性最强, 可达-4.50; 第18位的精氨酸 (Arg) 亲水性最强, 可达-4.50。总体上该蛋白的亲水性 (Grand average of hydrophaticity, GRAVY) 为-0.08。

2.3.2 跨膜区域和亚细胞定位分析

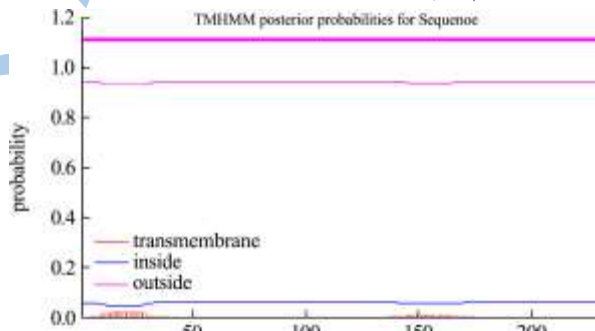


图3 PpPFK跨膜结构

Fig.3 Transmembrane structure of PpPFK in prunus persica

利用TMHMM Server v.2.0软件对PpPFK蛋白进行蛋白质跨膜区段预测, 结果如图3所示, 该蛋白整条肽链都位于细胞膜外, 说明此蛋白不存在跨膜结构域。利用PSORT Prediction对PpPFK蛋白的亚细胞定位分析可知该蛋白位于细胞质上的可能性为0.450, 大于位于线粒体基质空间 (概率为0.10), 微体 (概率为0.30) 和内质网膜 (概率为0.00)。所以, 推测PpPFK蛋白定位于细胞质中。

2.3.3 转运肽、信号肽和磷酸化位点预测

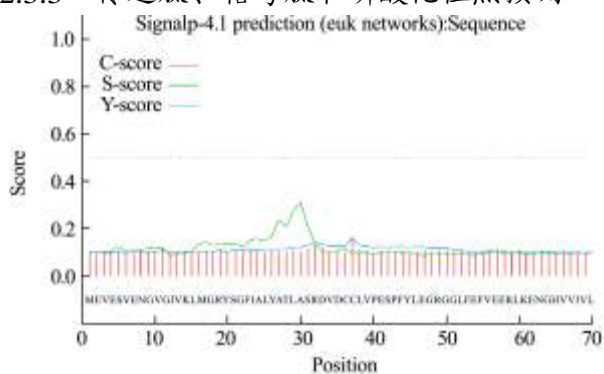


图4 PpPFK 信号肽预测

Fig.4 Signal prediction of PpPFK in prunus persica

用Target P1.1 Server对PpPFK蛋白进行转运肽预测,结果显示叶绿体转运肽可靠性(cTP)为0.02,线粒体转运肽可靠性(mTP)为0.25,分泌通路的转运肽可靠性为0.29,所以推测PpPFK可能存在分泌通路的转运肽。用SignalP-4.1对PpPFK蛋白进行分析,结果见图4,可知该蛋白不具有信号肽,为非分泌蛋白,该蛋白在细胞质中合成后,不进行蛋白转运。用NetPhos 2.0 Server预测PpPFK蛋白的磷酸化位点,结果显示PpPFK蛋白共包含7个磷酸化位点,2个丝氨酸(Ser),1个苏氨酸(Thr),4个酪氨酸(Tyr)。

2.3.4 PpPFK 蛋白的二级结构分析

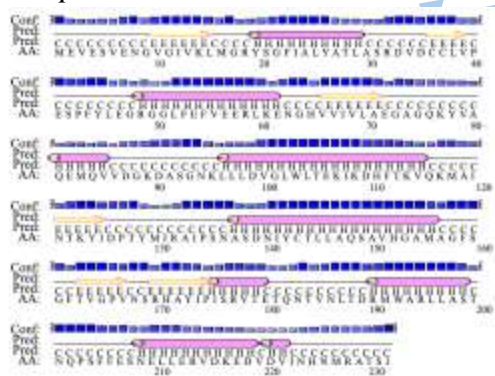


图5 PpPFK 二级结构的预测

Fig.5 Prediction of secondary structure for PpPFK in Prunus Persica

注:直线表示无规则卷曲;箭头表示片层结构;圆柱表示 α -螺旋结构。

用PSIPRED预测PpPFK氨基酸序列的二级结构(图5),PpPFK有9个 α 螺旋,6个片层结构,无规则卷曲则夹杂在 α 螺旋和片层结构之间,缺乏 β 转角。而用SOPMA预测则是 α 螺旋占的比例最高为37.93%,片层结构则占了18.10%,不规则卷曲占了34.91%。 β 转角占了9.05%。

所以针对于未知蛋白的预测最好是以多种方法相结合,这样就可以增加可信度。

2.4 进化树比对分析

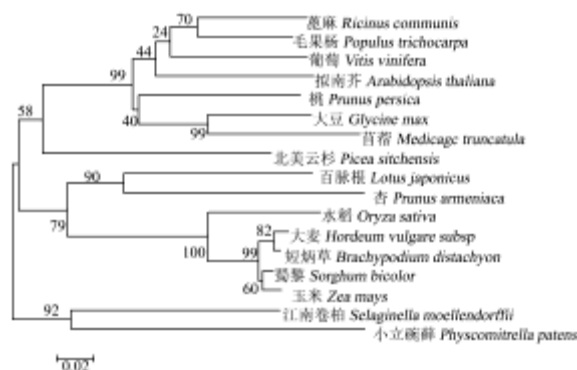


图6 桃与其他物种的 PFK 氨基酸序列的系统发生树

Fig.6 Phylogenetic tree of Prunus persica PFK and those of other PFKs

根据PpPFK编码蛋白的氨基酸序列和GenBank上已发表的相关PFK氨基酸序列进行比对,PpPFK与大豆(GI: 356535482)、毛果杨(GI: 224112817)、葡萄(GI: 359490072)、蓖麻(GI: 255539891)、拟南芥(GI: 297793715)、日本水稻种系(GI: 115462519)、杏(GI: 2688822)、北美云杉(GI: 148908163)、玉米(GI: 413947612)、蒺藜苜蓿(GI: 358346077)、蜀黍(GI: 242056105)、大麦(GI: 326495520)、短柄草(GI: 357126065)、江南卷柏(GI: 302786840)、百脉根(GI: 388521087)、小立碗藓(GI: 168027183)的同源性分别达到80%、85%、81%、78%、79%、70%、68%、75%、73%、78%、69%、69%、68%、71%、69%、68%。它们之间的PFK氨基酸序列进化分析结果如图6,结果显示,水蜜桃与大豆和苜蓿的亲缘关系最近,与小立碗藓亲缘关系最远。

2.5 不同低温胁迫下桃果实中 PFK 的转录水

平分析

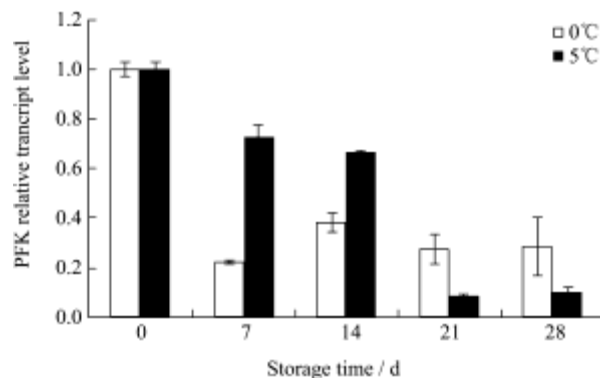


图7 0 °C和5 °C贮藏28 d桃果实PpPFK的相对转录水平

Fig.7 Relative transcript analysis of PpPFK in peach fruit stored at 0 °C and 5 °C for 28 days

如图7所示,低温冷藏后,桃果实的*PpPFK*基因明显下调,其中0℃果实下降幅度远远大于5℃。0℃贮藏的桃果实*PpPFK*转录水平在7~14 d内有小幅上升,随后的贮藏过程中保持相对稳定。5℃果实*PpPFK*转录水平在7~14 d略有下降,随后发生大幅度的下降。总的来说,5℃果实在贮藏前14 d *PpPFK*的相对转录水平高于0℃处理,而在第14 d至28 d则相反。

2.6 不同低温胁迫下桃果实冷害情况分析

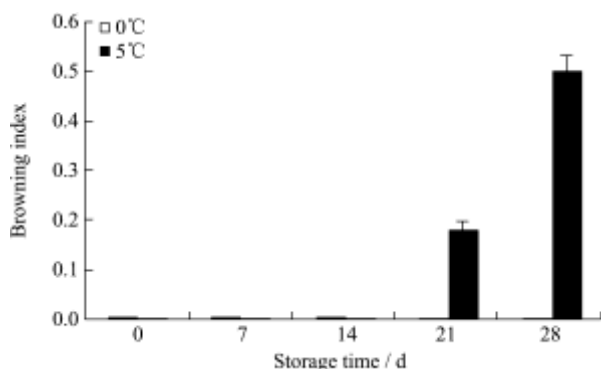


图8 0℃和5℃贮藏28 d桃果实 *PpPFK* 的褐变指数变化

Fig.8 The internal browning in peach fruit stored at 0℃ and 5℃ for 28 days

玉露桃的冷害症状表现为明显的果肉褐变,不同贮藏温度对果肉褐变的发生有不同的影响。如图8所示,0℃果实贮藏期间几乎未出现明显的冷害症状,冷害系数为0;但是5℃处理果实的冷害症状在第21 d出现,在28 d时显现出非常明显的果肉褐变。

3 讨论

本试验是基于电子克隆技术的基础上获得*PFK* cDNA,利用这一技术可减少开支、节约劳动力,并且具有速度快、针对性强等优点。目前电子克隆技术已广泛应用于小麦、水稻、桃等基因的克隆上。本研究利用电子克隆技术成功获得了桃果实的*PpPFK*基因,并对其进行了生物信息学分析,这可以增强我们对基因结构的认识,阐明生物信息之间的关系。

*PpPFK*基因氨基酸序列通过与其他物种的*PFK*基因氨基酸序列比对,发现和大豆、葡萄的相似度很高,但未发现和蔷薇科物种的较高相似度,说明*PpPFK*基因可能是*PFK*基因家族的一个分支^[6]。*PpPFK*具有7个磷酸化位点,分泌通路的转运肽,复杂的二级结构等特点,这些可能和它的酶学特性相关,*PpPFK*基因的具体功能还有待进一步研究。

桃果实的冷害特征包括果肉褐变,果肉发棉,不能正常熟化,容易腐烂等^[7]。玉露桃主要表现为果肉褐变,在贮藏期中5℃桃果实的褐变程度大于0℃果

实,这与前人研究结果一致^[8-9]。说明玉露桃果实贮藏在0℃下更有利于减少冷害的发生。

糖是植物体重要的能源来源和碳源,能增强植物的抗逆性。在采后果实中,糖代谢主要包括山梨醇代谢、蔗糖代谢和己糖代谢。其中涉及能量的主要是己糖分解代谢,包括糖酵解,戊糖磷酸途径和三羧酸循环等。作为己糖分解代谢的第一把钥匙—糖酵解,它的关键调控酶*PFK*无疑在糖分解代谢过程中起着重要的作用。*PFK*催化过程会消耗ATP,而ATP的减少对采后桃果实是不利的。ATP缺乏可引起油脂过氧化,在低温胁迫下引起膜损伤^[10]。杨爱萍等^[2]发现用γ-氨基丁酸处理可维持“白凤桃”较高的ATP含量,保护细胞膜免受冷伤,增强桃果实的冷抵抗力。宋丽丽等^[11]发现用外源ATP处理荔枝可有效的降低细胞膜的渗透性,减少果皮褐变,抑制病害发展。

本研究中,桃果实在冷藏后*PFK*相对转录水平都明显降低(图6),说明低温会抑制桃果实的糖酵解,进而影响己糖进入糖酵解和戊糖磷酸途径的比例,此现象在黑麦草、冬油菜叶子中都有被发现^[12-13]。这一改变对果实抵御胁迫能力有一定的积极作用,可能是因为胁迫下的果实其戊糖磷酸途径会增强,而戊糖磷酸途径可产生NADPH,它是许多生物合成所必需的还原力,再者戊糖磷酸途径产生的其它代谢产物可合成木质素、芳香族氨基酸、核苷酸和辅酶等物质,这些物质可参与胁迫回应、维持细胞膜稳定性^[14]。但是,不同低温胁迫下*PFK*基因表达差异较大。在0~14 d贮藏期中,5℃桃果实的转录水平极大的高于0℃果实,这意味着桃果实在5℃低温冷藏的前期(0~14 d)就已经消耗了更多的能量,导致该果实抵抗低温胁迫的能力明显低于0℃果实,因此在21 d就出现了明显的冷害症状,出现生理失调。5℃果实在贮藏的后期表现出较低的*PFK*表达量,可能是果实冷害发生后生理代谢失调的结果。对于0℃桃果实而言,*PFK*的表达量在贮藏前期表现较低,这导致其能量消耗少,抗冷性强、无明显冷害症状,且生理代谢正常,在整个贮藏期间表达量较稳定。

4 结论

本研究获得全长1405 bp的桃果实*PpPFK*基因序列及其相关生物信息学信息,发现该基因的转录水平变化在桃果实低温胁迫响应过程中可能发挥重要作用。冷藏前期较高的*PpPFK*基因转录水平,可能导致更多的能量消耗,从而引发桃果实发生严重的冷害。今后我们还将进一步结合其它相关基因一起来共同阐述复杂的冷害机理。

参考文献

- [1] Lurie S, Crisosto C H. Chilling injury in peach and nectarine [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2005, 37: 195-208
- [2] Yang A P, Cao S F, Yang Z F, et al. γ -Aminobutyric acid treatment reduces chilling injury and activates the defence response of peach fruit [J]. *Food Chemistry*, 2011, 129: 1619-1622
- [3] 查静娟,胡志元,吴敏贤,等.菠菜叶片中两种酶型的磷酸果糖激酶性质比较[J].*植物生理学报*,1995,21(3):242-246
Cha J J, Hu Z Y, Wu M X, et al. Comparison between the properties of two forms of phosphofructokinase from spinach leaves [J]. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1995, 21(3): 242-246
- [4] Diallinas G, Pateraki I, Sanmartin M, et al. Melon ascorbate oxidase: cloning of a multigene family, induction during fruit development and repression by wounding [J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 34(5): 759-770
- [5] Meng X H, Han J, Wang Q, et al. Changes in physiology and quality of peach fruits treated by methyl jasmonate under low temperature stress [J]. *Food Chemistry*, 2009, 114: 1028-1035
- [6] 晏露,姜建国,刘冠楠,等.盐藻番茄红素 β -环化酶全长 cDNA 的克隆及结构分析[J].*现代食品科技*,2010,26(3): 218-221
Yan L, Jiang J G, Liu G N, et al. Cloning and structure analysis of the full length cDNA of lycopene β -Cyclase from *Dunaliella salina* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2010, 26(3): 218-221
- [7] Nilo R, Saffie C, Lilley K. et al. Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE) [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 43-62
- [8] Zhang B, Xi W P, Wei W W, et al. Changes in aroma-related volatiles and gene expression during low temperature storage and subsequent shelf-life of peach fruit [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 60: 7-16
- [9] 金薇薇,徐昌杰,李鲜,等.采后玉露桃果实冷害发生与 *ROP* 基因的表达调控[J].*果树学报*,2009,26(5):608-613
Jin W W, Xu C J, Li X, et al. Occurrence of chilling injury and regulation of *ROP* gene expression in Yulu peach fruit during storage [J]. *Journal of Fruit Science*, 2009, 26(5): 608-613
- [10] Crawford R M, Braendle R. Oxygen deprivation stress in a changing environment [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1996, 47: 145-159
- [11] Song L L, Jiang Y M, Gao H Y, et al. Effects of adenosine triphosphate on browning and quality of harvested litchi fruit [J]. *American Journal of Food Technology*, 2006, 1: 173-178
- [12] Bredmemeijer G M M, Esselink G. Phosphofructokinase in relation to sugar accumulation in cold-hardened *Lolium perenne* L. cultivars [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1994, 143: 112-118
- [13] Maciejewska U, Bogatek R. Glucose catabolism in leaves of cold-treated winter rape plants [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2002, 159: 397-402
- [14] Copeland L, Turner J F. The regulation of glycolysis and pentose-phosphate pathway [J]. *The Biochemistry of Plants*, 1987, 11: 107-125