

# 高、低糖杧果品种 *MiFRK* 基因克隆、 表达及生物信息学分析

郑 斌<sup>1</sup>, 王松标<sup>1</sup>, 李新月<sup>2</sup>, 武红霞<sup>1</sup>, 马小卫<sup>1</sup>, 梁清志<sup>1</sup>, 许文天<sup>1</sup>, 李 丽<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>农业农村部热带果树生物学重点实验室·中国热带农业科学院南亚热带作物研究所·国家热带果树种质资源圃海南省热带园艺采后处理与保鲜重点实验室, 广东湛江 524091; <sup>2</sup>云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 665099)

**摘 要:**【目的】了解 *MiFRK* 基因在高糖和低糖杧果品种中的差异。【方法】对在高糖和低糖杧果品种转录组数据中表达差异显著的 *MiFRK1* 和 *MiFRK2* 基因 DNA 序列和 cDNA 序列进行克隆, 再进行一系列生物信息学分析, 并利用 qRT-PCR 检测 2 个 *MiFRK* 基因在品种间及不同果实发育阶段的表达差异。【结果】*MiFRK1* 基因序列在 2 个品种间无差异, *MiFRK2* 差异位点为 69 个, 所编码的氨基酸相似率为 97.87%; *MiFRK1* 和 *MiFRK2* 均含有 PfkB 家族保守结构域, 均为稳定的、不含跨膜结构的疏水性蛋白; *MiFRK1* 在低糖品种不同果实发育期相对表达量均高于高糖品种; *MiFRK2* 在低糖品种幼果期的相对表达量显著高于高糖品种, 且在后熟过程中降低, 而在高糖品种后熟过程中升高。【结论】*MiFRK1* 和 *MiFRK2* 均在 2 个杧果品种果糖含量差异调控中起一定作用。

**关键词:** 杧果; 果糖激酶; 糖代谢; 生物信息学分析

中图分类号: S667.7

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2022)06-0945-12

## Cloning, expression and bioinformatic analysis of *MiFRK* genes in mango varieties with high or low sugar content

ZHENG Bin<sup>1</sup>, WANG Songbiao<sup>1</sup>, LI Xinyue<sup>2</sup>, WU Hongxia<sup>1</sup>, MA Xiaowei<sup>1</sup>, LIANG Qingzhi<sup>1</sup>, XU Wentian<sup>1</sup>, LI Li<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Tropical Fruit Biology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Hainan Province for Postharvest Physiology and Technology of Tropical Horticulture Product, National Field Genebank for Tropical Fruit, Zhanjiang 524091, Guangdong, China; <sup>2</sup>College of Tropical Crop Science, Yunnan Agricultural University, Puer 665099, Yunnan, China)

**Abstract:** 【Objective】 Sweetness is one of the key factors for mango fruit quality. In our previous study, we found that the soluble sugar contents of Tainong No.1 (high-sugar-content variety) and Renong No.1 (low-sugar-content variety) had significant differences at different fruit development stages, in which the difference of fructose content was the largest. Moreover, it is well known that fructokinase (FRK), as a key gene of the sugar metabolism pathways, plays an important role in fructose phosphorylation. We also screened out four *MiFRK* genes from mango genomic data, and there was a significant difference in gene expression levels of the *MiFRK1* and *MiFRK2* between Tainong No.1 and Renong No.1 based on transcriptome data, suggesting that the *MiFRK1* and *MiFRK2* would be one of the key genes for mango sugar metabolism. This study intended to further understand the differences of the *MiFRK1* and *MiFRK2* and their encoded proteins between high-sugar-content mango variety Tainong No.1 and low-sugar-content mango variety Renong No.1. 【Methods】 Two mango varieties Tainong No.1 and Renong No.1 were selected as materials. Firstly, the DNA sequences of the *MiFRK1* and *MiFRK2*

收稿日期: 2021-12-10

接受日期: 2022-02-27

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31901968); 海南省自然科学基金项目(322MS117, 2019CXTD410, 319QN287); 国家重点研发计划项目(2018YFD1000504, 2019YFD1000504, 2019YFD1000500); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项资金(2019KJ108)

作者简介: 郑斌, 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为杧果资源及品质调控。Tel: 13536420285, E-mail: zhengbin@catas.cn

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 18898315963, E-mail: lilialiaa666@163.com

*FRK2* genes in two varieties were cloned respectively and their structural differences between the two varieties were analyzed. The cDNA sequences of the two *MiFRK* genes were further cloned from two varieties, and the physicochemical properties, structural domain, subcellular localization and phylogenetic trees of their encoded proteins were analyzed by bioinformatic software. Finally, the fruits of each variety in four stages were selected as samples, namely, young fruit stage (about 40 days after anthesis), fruit expansion stage, green maturity stage (harvest maturity stage) and full maturity stage (edible maturity stage, one week after harvest). The gene expression patterns of the two genes in fruits of two varieties at different fruit stages were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). 【Results】The results showed that there was no difference in the DNA sequences of the *MiFRK1* between the two varieties, which contained six exons and encode 334 amino acids. In the promoter region of the *MiFRK1*, besides the typical core promoter elements, TATA-box and CAAT-box, it also contained *cis*-acting elements involved in abscisic acid responsiveness, gibberellin responsiveness, salicylic acid responsiveness, and water-deficient, abscisic acid-resistant and antifreeze responsiveness, ABRE, CAT-box, MYC, P-box and TCA-element. However, the *MiFRK2* of the two varieties both contained four exons and encode 329 amino acids. And the DNA sequences of the *MiFRK2* in two varieties had 69 differential sites, resulting in seven differential positions in the encoded amino acid sequence and the similarity of amino acid sequences being 97.87%. The amino acid sequence analysis showed that both the *MiFRK1* and *MiFRK2* had the conservative domain of the phosphofructokinase-B (pfkB) family of carbohydrate kinases and contained three substrate-binding regions, six ATP-binding sites and one conservative domain PLN02323. Both proteins encoded by the *MiFRK1* and *MiFRK2* were stable hydrophobic proteins without transmembrane structure. The subcellular localization analysis revealed that *MiFRK1* protein was localized in the chloroplast and cytoplasm, while the subcellular localization analysis result of *MiFRK2* in the two varieties was different. The *MiFRK2* of Renong No.1 was localized in the chloroplast, the *MiFRK2* of Tainong No.1 was localized in the chloroplast and mitochondria. The three-stage structure analysis showed that both *MiFRK1* and *MiFRK2* proteins existed in the form of a dimer. The phylogenetic tree analysis showed that FRK protein was relatively conservative in evolution, but *MiFRK1* and *MiFRK2* were clustered in two branches, respectively. The results of the qRT-PCR showed that the *MiFRK1* and *MiFRK2* genes had different expression patterns at different fruit stages. During the fruit development of the two varieties, the relative expression of the *MiFRK1* decreased firstly and then increased. The relative expression of the *MiFRK1* in Renong No.1 was larger than that in Tainong No.1, and the change was more significant in Renong No.1. The expression pattern of the *MiFRK2* was significantly different between the two varieties. In young fruit stages, the relative expression level of the *MiFRK2* in the two varieties was high, and the expression level in Renong No.1 was significantly higher than that in Tainong No.1. Then the expression level of the *MiFRK2* in the two varieties decreased in the fruit expansion stage. Subsequently, the relative expression of the *MiFRK2* in the green stage of Renong No.1 increased in the green maturity stage and decreased in the fully mature fruit. However, the expression of the *MiFRK2* in the green and fully mature stages of Tainong No.1 was opposite to that of Renong No.1. The relative expression of the *MiFRK2* continued to decrease in the green maturity stage and increased in the fully mature fruit of Tainong No.1. At last, we calculated the Pearson correlation coefficient between the relative expression of the *MiFRK1* and *MiFRK2* genes and the fructose content. The results showed that the expression of the *MiFRK1* was negatively correlated with the fructose content ( $-0.798$ ) in Renong No.1, while the relative expression of the *MiFRK1* was significantly and positively correlated with the fructose content ( $0.979^*$ ) in Tainong No.1. However, there was no significant

correlation between the relative expression of the *MiFRK2* and the fructose content in the two varieties. **【Conclusion】**The *MiFRK1* might be regulated by abscisic acid, gibberellin, salicylic acid and stress and functions in chloroplast and cytoplasm in the form of a dimer. The *MiFRK2* was different greatly in gene sequence and expression pattern between the two varieties, and the *MiFRK2* might act in the chloroplast and mitochondria in the form of a dimer. In addition, Both the *MiFRK1* and *MiFRK2* contributed to the difference in the fructose content between the two mango varieties.

**Key words:** Mango; Fructokinase; Glycometabolism; Bioinformatics analysis

芒果 (*Mangifera indica*. L) 被誉为“热带水果之王”, 其香味诱人, 果肉甜美细腻, 深受消费者喜爱。芒果果实中的糖分积累为淀粉转化型<sup>[1]</sup>, 光合产物蔗糖从源运输到果实后, 由蔗糖转化酶分解为葡萄糖和果糖, 或由蔗糖合成酶分解为尿苷二磷酸葡萄糖和果糖<sup>[2-4]</sup>, 除用于果实生长发育和呼吸消耗外, 多余部分主要转化为淀粉积累于果实中直至采收成熟期, 采收后经过后熟将淀粉转化为可溶性糖。完熟芒果果实中主要可溶性糖为蔗糖、果糖和葡萄糖<sup>[5]</sup>, 其中果糖的甜度值最高<sup>[6]</sup>。在整个糖代谢过程中果糖代谢是基础, 果糖在进入下一步代谢前必须由果糖激酶 (fructokinase, FRK) 或己糖激酶 (hexokinase, HK) 进行磷酸化, 而 FRK 是催化果糖磷酸化的主要酶<sup>[7]</sup>, 在植物细胞中起调节果糖流量的作用。此外, FRK 可作为植物的己糖感受器通过糖信号感受来调控植物生长<sup>[8]</sup>。

目前, 已从拟南芥<sup>[9]</sup>、马铃薯<sup>[10-11]</sup>、番茄<sup>[12-14]</sup>、水稻<sup>[15]</sup>、甘蔗<sup>[16-17]</sup>、温州蜜柑<sup>[18]</sup>、木薯<sup>[19]</sup>和枇杷<sup>[20]</sup>等植物中克隆了 FRK 基因。Kanayama 等<sup>[12]</sup>从番茄中克隆到了 4 个 FRK 基因 *LeFRK1*、*LeFRK2*、*LeFRK3* 和 *LeFRK4*, 发现不同 FRK 基因的表达具有组织特异性。Yao 等<sup>[9]</sup>在木薯中鉴定出的 6 个 FRK 基因 (*MeFRK1*~*MeFRK6*) 在叶、茎、花和果实中表达模式也不同。Jiang 等<sup>[15]</sup>在水稻未成熟的种子中发现 *OsFRK II* 在发育中的水稻籽粒活性较高, *OsFRK I* 在未成熟的水稻籽粒中活性较低。在马铃薯中, *FRK1* 在叶中活性较高, 在块茎中活性较低, 而 *FRK2* 在块茎中活性很高, 在叶中却很难测到<sup>[11]</sup>, 在拟南芥中也同样发现 *FRK2* 在根中具有很强的活性, 但在茎、叶等地上部位很难测到<sup>[9]</sup>。

不同植物果实中 FRK 的表达模式不同, Qin 等<sup>[20]</sup>发现枇杷 *EjFRK* 的表达量在果实发育早期高于成熟时期, 与果糖含量变化趋势相反, 在海巴戟<sup>[21]</sup>、温州蜜柑<sup>[18]</sup>、草莓<sup>[22]</sup>和杨梅<sup>[23]</sup>果实发育过程中也发现

同样现象。但是, 王卫平等<sup>[13]</sup>在番茄果实发育过程中发现, 3 个 FRK 基因的表达量在番茄果实发育过程中呈先上升后下降的趋势。此外, 枸杞 *LbFRK7* 基因的表达量在果实发育过程中也是同样的变化趋势<sup>[24]</sup>。还有研究发现, 在苹果果实发育过程中, *MdFK1* 的相对表达量从花后 16 d 至 122 d 缓慢增加, 在果实成熟期达到最高峰, 但 *MdFK2*、*MdFK3* 和 *MdFK4* 在花后 16 d 相对表达量最高, 在果实成熟期表达量低<sup>[25]</sup>。

笔者团队前期研究发现, 热农 1 号与台农 1 号的可溶性糖含量在果实不同发育阶段有显著差异, 其中果糖差异最大<sup>[5]</sup>, 并基于转录组测序结果, 鉴定出 4 个芒果 FRK 基因, 其中 2 个 FRK 基因在 2 个品种间表达差异较显著。笔者在本研究中继续以热农 1 号和台农 1 号为材料, 对这两个 FRK 基因进行克隆、分析, 以期后续芒果 FRK 基因功能分析和果实甜度遗传控制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

试验材料的采样地为中国热带农业科学院南亚热带作物研究所芒果种质资源圃, 试验材料为低糖的热农 1 号与高糖的台农 1 号, 每个品种选取幼果期 (A: 花后 40 d 左右)、果实膨大期 (B)、青熟期 (C: 采收成熟期) 和完熟期 (D: 食用成熟期, 采收后 1 周) 4 个时期分别取样, 每次取样选取果形端正、无病虫害、大小均匀、成熟度一致的果实。去皮后将果肉切成 2 cm<sup>3</sup> 左右, 用液氮速冻、研磨成粉末后 -80 °C 贮存备用。

### 1.2 试剂

Ezup 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒和植物总 RNA 快速抽提试剂盒 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司); RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific 公司, 美国); TransTaq<sup>®</sup>-T

DNA Polymerase、pEASY®-Blunt 试剂盒(全式金生物科技有限公司); DM 2000 DNA Marker、pMD™19-T Vector Cloning Kit、E.coli DH5 $\alpha$  Competent Cells(宝日医生物技术(北京)有限公司); 通用型 DNA 纯化回收试剂盒(天根生化科技(北京)有限公

司); HiScript® Q RT SuperMix for qPCR、AceQ® qPCR SYBR Green Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司), 其余试剂均为国产分析纯(AR); 采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 相关引物序列见表1。

表1 PCR 所用引物名称及序列

Table 1 Name and sequence of primer used in PCR

引物名称 Primer name	序列 Sequence	引物用途 Function
MiFRK1 F1	CAATCCTTCTTGCTCTGCCTTC	DNA 上游片段克隆
MiFRK1 R1	GCATGGCAAACGGCAATTAAGTGTG	Cloning DNA upstream fragments
MiFRK1 F2	GTCCTGCATCCGTTTTCCATTG	DNA 下游片段克隆
MiFRK1 R2	GCTTGCATCTACAGCACTTCAG	Cloning DNA downstream fragments
MiFRK2 F1	TGTCCCTTCCAATGGCTTCAAAC	DNA 上游片段克隆
MiFRK2 R1	CCAAATGCTCAGGATCTGTGTG	Cloning DNA upstream fragments
MiFRK2 F2	AGACTACCATTGTGGCCCTCTC	DNA 下游片段克隆
MiFRK2 R2	ATCCAAGCCATCTTCTGTGGCA	Cloning DNA downstream fragments
QMifRK1 F1	ATGGATATGAAAGCAGGATCTGGGA	cDNA 全长克隆
QMifRK1 R1	TTATGATGCAGCAACTGGTTCTAAG	Cloning cDNA full-length
QMifRK2 F1	CTGTCCCTTCCAATGGCTTCAAAC	cDNA 全长克隆
QMifRK2 R1	TTAATATGCCCTTTGATTAAGCTG	Cloning cDNA full-length
RtMiFRK1 F1	CAACTCATCTTGCTGCCA	实时荧光定量 PCR
RtMiFRK1 R1	CTTGACCCCATATGCTC	Real-time fluorescence PCR
RtMiFRK2 F1	ATGGCATCCTAACCTGAAG	实时荧光定量 PCR
RtMiFRK2 R1	TGCATAGTAAAGCACCGAC	Real-time fluorescence PCR
Actin F1	AATGGAAGTGAATGGTCAAGGC	内参基因实时荧光定量 PCR
Actin R1	TGCCAGATCTTCCATGTCATCCA	Real-time fluorescent PCR of internal reference gene

### 1.3 2 个品种 *MiFRK* 基因 DNA 全长的克隆

根据 Ezup 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒说明书, 分别取 2 个品种的幼果进行总 DNA 提取。用微量分光光度计检测提取 DNA 的浓度和纯度, 并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。选择高质量 DNA 于 -20 °C 保存。

根据前期试验获得的杧果转录组数据库, 筛选转录组中与 NCBI 中 FPK 蛋白同源性较高且在 2 个品种表达差异明显的 2 个 Unigene 片段, 将筛选 Unigene 片段与杧果基因组数据进行比对获得 2 个包含 FPK 编码序列的 DNA 序列, 命名为 *MiFRK1* 和 *MiFRK2*, 设计引物(表 1), 分别以 2 个品种的 DNA 作为模板进行 PCR。在反应体系中加入 1  $\mu$ L 的 DNA 模板、各 1  $\mu$ L 的 MiFRK 的正向引物和反向引物、2.5  $\mu$ L 10 $\times$ TransTaq®-T Buffer、2  $\mu$ L 2.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> dNTPs、0.5  $\mu$ L TransTaq®-T DNA polymerase、加 Nuclease-free Water 至 25  $\mu$ L。PCR 条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 30 s、50~60 °C 30 s、72 °C 90 s, 执行 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物

用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。目的 DNA 片段利用通用型 DNA 纯化回收试剂盒回收。将回收产物按 pMD™19-T Vector Cloning Kit 说明进行 T 载体链接, 转化大肠杆菌感受态细胞过夜培养, 筛选白斑并进行菌液 PCR 鉴定, 将阳性克隆菌液委托上海生物工程有限公司测定 DNA 序列。所得到的结果用 DNAMAN8 进行序列拼接, 以进行后续的结果分析。

### 1.4 2 个品种 *MiFRK* 基因 cDNA 全长的克隆

根据植物总 RNA 快速抽提试剂盒说明书, 分别提取 2 个品种 4 个时期总 RNA, 总 RNA 于 -80 °C 保存, 用微量分光光度计检测提取 RNA 的浓度和纯度, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。等量吸取热农 1 号与台农 1 号 4 个时期的 RNA 混匀作为模板, 根据 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书分别合成热农 1 号与台农 1 号品种 cDNA 第一链, 反转录产物置于 -20 °C 保存, 备用。根据预测的编码区设计 cDNA 全长引物, 以反转录产物为模板进行 PCR, 回收、克隆并测序, 操作同 1.3。

### 1.5 2个品种 *MiFRK* 基因生物信息学分析

通过在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白结构,分析目的基因编码蛋白质的氨基酸组成、蛋白质相对分子质量、理论等电点及稳定性等参数;利用 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 在线预测蛋白质亚细胞定位情况;用 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行蛋白质跨膜结构分析;利用 NCBI 的 CD-Search 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 检索并分析蛋白的保守域;通过 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 和 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 软件分别预测分析蛋白质的二级结构及三级结构;用 NCBI 的蛋白质序列数据库进行 Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp>), 筛选出同源性较高的 FRK 蛋白,利用 MEGA 7 软件构建 Neighbor-Joining 系统进化树, bootstrap 重复次数为 1000 次。

### 1.6 2个品种 *MiFRK* 基因的表达分析

根据得到的热农 1 号和台农 1 号 cDNA 全长序列,分别设计适用于 2 个品种的 *MiFRK1* 和 *MiFRK2* 基因荧光定量 PCR 的特异性引物,将 1.4 获得的 2 个品种不同时期总 RNA 定量至同一浓度,用 HiScript<sup>®</sup> Q RT SuperMix for qPCR 反转录试剂盒合成 cDNA,使用 AceQ<sup>®</sup> qPCR SYBR Green Master Mix 在 Roche Lightcycler<sup>®</sup> 480 上进行 qRT-PCR。反应体

系 20  $\mu\text{L}$ : AceQ<sup>®</sup> qPCR SYBR Green Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ , 正向引物和反向引物各 1  $\mu\text{L}$ 。反应程序:94  $^{\circ}\text{C}$  1 min;94  $^{\circ}\text{C}$  10 s,55  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,40 个循环;做熔解曲线分析,每个样品 3 次重复,反应结束后通过  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因的相对表达量。

### 1.7 2个品种不同果实发育期果糖含量分析

参考袁晖等<sup>[20]</sup>的方法对不同样品进行糖提取,过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜,使用 PE 高效液相色谱仪(美国 PE 公司制造)进行测定,参数为:Serise200 氨基酸柱,柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ ,流动相(乙腈、双蒸水体积比 70:30),流速 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 杧果 *MiFRK* 基因 DNA 全长的克隆及分析

分别以 2 个品种 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,分别获得热农 1 号和台农 1 号的 *MiFRK1* F1R1、*MiFRK1* F2R2、*MiFRK1* F1R1 和 *MiFRK1* F2R2 片段,对测序的结果进行序列拼接得到的热农 1 号和台农 1 号的 *MiFRK1* 和 *MiFRK2* DNA 全长,分别命名为 *R-MiFRK1*、*T-MiFRK1*、*R-MiFRK2* 和 *T-MiFRK2*。长度分别为 3522、3522、3290 和 3299 bp。经 NCBI blastx 分析并结合杧果基因组数据,发现 *R-MiFRK1*、*T-MiFRK1* 均含有 6 个 Exon、140 bp 3'-UTR 以及 886 bp 的 5'-UTR,*R-MiFRK2* 和 *T-MiFRK2* 均含有 4 个 Exon 和 81 bp 的 3'-UTR(图 1)。

经比对发现 *R-MiFRK1* 与 *T-MiFRK1* 序列一致;

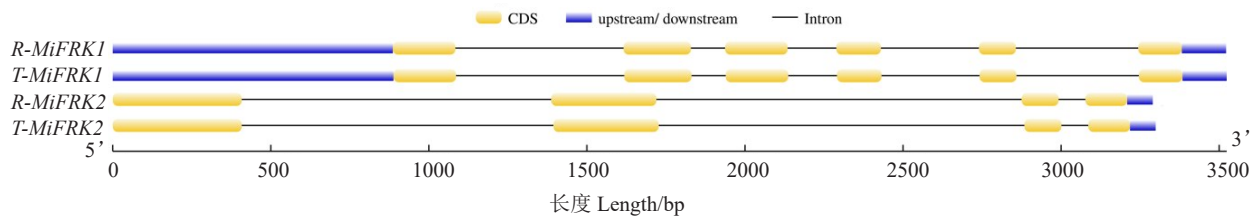


图 1 杧果 *MiFRK* 基因结构预测

Fig. 1 Structural prediction of mango *MiFRK* gene

*R-MiFRK2* 与 *T-MiFRK2* 有 69 个位点存在差异。SNP 差异有 56 个,插入性位点 13 个(图 2)。

利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线分析软件对 *R-MiFRK1* 和 *T-MiFRK1* 启动子区序列进行分析,结果(图 3)发现,*R-MiFRK1* 和 *T-MiFRK1* 启动子区除典型的 TATA-box 和 CAAT-box 核心启动子元件外,均包含 ABRE、CAT-box、MYC、P-box 和 TCA-element

元件。说明杧果 *MiFRK1* 的表达受脱落酸、赤霉素和水杨酸的调控,同时与缺水、抗脱落酸及抗冻响应有关。

### 2.2 杧果 *MiFRK* 基因 cDNA 全长的克隆及分析

根据预测的编码区设计引物,分别以 2 个品种 RNA 反转录的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,分别获得热农 1 号和台农 1 号的 *MiFRK1* 和 *MiFRK2* cDNA 全长,测序结果与由拼接 DNA 预测的一致。



-886	CAATCTTCTGCTCGCTTCTTAATTC <b>CAAT</b> CTTTCACCTTCAGAGCTTAAATGGCTAAGAATCCCACCTTCAGGTGAGTCTTCTTTTCTTTCTTATACGCTCAAGCTTGTGTTTTTTCATTCATCTTTGTGTA CAAT-box TATA-box	MiFRK1
-750	TTTTCTTGTGTTGATTTTTT <b>CATAAGAGG</b> GAATCAATA <b>CACT</b> TTTTATGCTTTTGAAGTGGTTTACTATTGCAAGATTGTTCTTCTGAAATAGTCTTGT <b>TAAGATT</b> TCATGTTTTTATCTTCTGATTGAGATTCTTCTCGCGTT CAAT-box TCA-element CAAT-box TATA-box	MiFRK1
-600	TCTATGTTGTAATCA <b>ATT</b> ACCTTCTAGATCTCTAGCAGCATCTTCTAGTAGTCTCTTTGTTGTGTAATA <b>ACGTG</b> AGCTTTATCGTGTCCATTAAGTCTTCTTCTTTAGTATCTTATGTCAGTTTCTGTCACAAAT CAAT-box ABRE	MiFRK1
-450	<b>TACT</b> GGGAAACTCAAGGCAGATGCGTTTTATCTAGTGGGGTATCAGAGATTACTGTGATGAAGTCTTCTGATCAGTTTTCTTAATTTATCGAATAGAATCAGGGTAAAAAATCAATTTTTGACATTCTGATT CAAT-box	MiFRK1
-300	CGCTGAATCTTGAGTTATGAAAGTAGATAATTTCT <b>CAAT</b> TGATCTAGGAATGGTGTGATTAGGAATATATGCTTGAATTTTCCCTGAAAATTTTTTATTAGTAGTGGGTTGGAGATTCTATGCTTACTGAGAAAACA CAAT-box	MiFRK1
-150	CCTTAGATCTTAAATGCAGCTGAAAC <b>CTTT</b> GGATTGTGATGCTACAGAGACTACAAGGCAGTTTCTGAA <b>CAAT</b> GTGTGAAT <b>CATT</b> GT <b>GCCACT</b> GAATTTGAT <b>CAAT</b> AATAT <b>CAAT</b> TATGGGAGTTCTTATATCTTCTT P-box CAAT-box MYC CAT-box CAAT-box CAAT-box	MiFRK1

图3 *MiFRK1* 启动子元件分析

Fig. 3 Promoter element analysis of *MiFRK1*

R-MiFRK1	MDMKAGSGNRNSLVVCFGEMLIDFVPTVGGVSLAEAPAFKKAPGGAPANVAVGISRLGGSSAFVGVKVGDDDFGYMLADILKQNNVDTSSVRYDSSARTAL	100
T-MiFRK1	MDMKAGSGNRNSLVVCFGEMLIDFVPTVGGVSLAEAPAFKKAPGGAPANVAVGISRLGGSSAFVGVKVGDDDFGYMLADILKQNNVDTSSVRYDSSARTAL	100
Consensus	mdmkagsgrnrlsvvfcgemplidfvptvggvslaeapafkkapggapanvavgisrlggssafvkvvgdddfgymladilkqnnvdtssvrydssartal	
R-MiFRK1	AFVTLRADGEREFLFFRHPSADMLLHSELDKLLIKQARIFHYGSISLAEPCCKSTHLAAMKIAKESGSILSYDPNLRPLWPSEDAAREGIMSIWQQAD	200
T-MiFRK1	AFVTLRADGEREFLFFRHPSADMLLHSELDKLLIKQARIFHYGSISLAEPCCKSTHLAAMKIAKESGSILSYDPNLRPLWPSEDAAREGIMSIWQQAD	200
Consensus	afvtlradgereflffrhpsadmlhseeldkllkqarifhygsislaepccksthlamkiakesgsilsydpnlrplwpseadaaregimsiwqqad	
R-MiFRK1	IIKISEDEITFLTGGDDHNDNVVLGKLFHPNLKLLVVTGEGSKGRYYTKFRGFVPGVKAISVDTTGAGDAFVSGILSCLASDLSLFKDEKRLREALLF	300
T-MiFRK1	IIKISEDEITFLTGGDDHNDNVVLGKLFHPNLKLLVVTGEGSKGRYYTKFRGFVPGVKAISVDTTGAGDAFVSGILSCLASDLSLFKDEKRLREALLF	300
Consensus	iikiseideitfltgddhndnvvlgklfhpnlkllvvtgegskgryytkfrgfvpgvkaaisvdttgagdafvsgilscldslslfkdekrllrealif	
R-MiFRK1	ANACGALTVERGAIPALPTKEAVLKLEPVAAS	334
T-MiFRK1	ANACGALTVERGAIPALPTKEAVLKLEPVAAS	334
Consensus	anacgaltvtergaipalptkeavlklepvaas	
R-MiFRK2	MASNGAVSGSSLIVSFGEMLIDFVPTVSGVSLAEAPGFLKAPGGAPANVAIAVARLGGKAAAFVVKLGDDDFGHMLAGILKENGVSAGINFDQGARTALA	100
T-MiFRK2	MASNGAVSGSSLIVSFGEMLIDFVPTVSGVSLSEAPGFLKAPGGAPANVAIAVARLGGKAAAFVVKLGDDDFGHMLAGILKENGVSAGINFDQGARTALA	100
Consensus	masngavsgsslivsfgeemplidfvptvsgvslaeapgflkappggapanvaiavarlggkaafvkvlgdddfghmlagilkengvsaginfdqgartala	
R-MiFRK2	FVTLRADGEREFMFYRNPSADMLLRPDELNLELKSATLIFHYGSISLIVEPCRSAPHLKAMEVAKDAGALLSYDPNLRPLWPSPPEARTQILSIWDKAEV	200
T-MiFRK2	FVTLRADGEREFMFYRNPSADMLLRPDELNLELKSATLIFHYGSISLIVEPCRSAPHLKAMEVAKDAGALLSYDPNLRPLWPSPPEARTQILSIWDKAEV	200
Consensus	fvtlradgerefmfyrnpsadmlrrpdelnleliklksatlfhygsislivepcrsahlkamevakdagallsydpnlrplwpsppeartqilsiwdkaev	
R-MiFRK2	IKVSDVELEFLTGSKDIDDESALSLWHPNLKLLVTLGKCGCRYYTKGFKGVEAFHVNTVDTTGAGDAFVSGALLCNIVDDHSLLEDEARLREVLKYANA	300
T-MiFRK2	IKVSDVELEFLTGSKDIDDESALSLWHPNLKLLVTLGKCGCRYYTKGFKGVEAFHVNTVDTTGAGDAFVSGALLCNIVDDHSLLEDEARLREVLKYANA	300
Consensus	ikvsdvelefltgskdiddesalslwhpnlkllvltlgekcgcryytkgfkaveafhvntvdttgagdafvsgallckivddhslledearlvrelyklyana	
R-MiFRK2	CGAITTTKKGAIAPALPK <b>EA</b> DVLSLIGAY	329
T-MiFRK2	CGAITTTKKGAIAPALPK <b>EA</b> DVLSLIGAY	329
Consensus	cgaitttkkgaipalpk <b>ea</b> dvlsligay	

图4 *MiFRK* 编码的氨基酸序列对比

Fig. 4 Amino acid sequence comparison encoded by *MiFRK* genes

等电点、不稳定系数、脂肪族氨基酸指数和平均疏水性指数 (Grand average of hydropathicity, GRAVY) 等。分析发现(表2), R-MiFRK1、T-MiFRK1、R-MiFRK2和T-MiFRK2的分子质量分别为35.79、35.79、35.05和35.11 ku; 等电点分别为5.62、5.62、5.27和5.19; 蛋白不稳定系数分别为30.55、30.55、18.10和17.35, 均为稳定性蛋白; 脂肪族氨基酸指数与蛋白质的热稳定性相关, R-MiFRK1、T-MiFRK1、R-MiFRK2和T-MiFRK2蛋白的脂肪族氨基酸指数分别为94.97、94.97、100.88和100.88, 热稳定性较高; R-MiFRK1、T-MiFRK1、R-MiFRK2和T-MiFRK2蛋白的分别为0.057、0.057、0.122和0.114, 均为疏水性蛋白。利用Cell-PLoc 2.0进行MiFRK蛋白亚细胞定位预测, 发现R-MiFRK1和T-MiFRK1可能定位于叶绿体和细胞质, R-MiFRK2可能定位于叶绿体, T-

MiFRK2可能定位于叶绿体和线粒体。利用TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)工具对蛋白进行跨膜区结构预测, R-MiFRK、T-MiFRK1、R-MiFRK2和T-MiFRK2均不具有跨膜区, 表示所编码的蛋白均不是膜蛋白。

2.3.2 杧果MiFRK蛋白结构域、二级结构和三级结构预测 利用NCBI中的CD-Search在线分析杧果MiFRK蛋白保守结构域, 结果(图5)显示2个品种的MiFRK1和MiFRK2结构域相同, R-MiFRK1、T-MiFRK1、R-MiFRK2和T-MiFRK2具有碳水化合物磷酸果糖激酶家族(PfkB family)的保守功能域, 均包含3个底物结合区域、6个ATP结合位点和1个保守结构域PLN02323。推测R-MiFRK1、T-MiFRK1、R-MiFRK2和T-MiFRK2蛋白具有保守结构域的功能, 属于FRK, 对果糖具有高度特异性。

表 2 不同杧果品种 MiFRK 蛋白的理化性质

Table 2 Physicochemical properties of MiFRK proteins in different species of mango

MiFRK 蛋白 MiFRK protein	相对分子质量 Molecular weight/ku	理论等电点 Theoretical pI	不稳定系数 Instability index	脂肪族氨基酸指数 Aliphatic index	平均疏水指数 Grand average of hydropathicity
R-MiFRK1	35.79	5.62	30.55	94.97	0.057
T-MiFRK1	35.79	5.62	30.55	94.97	0.057
R-MiFRK2	35.05	5.27	18.1	100.88	0.122
T-MiFRK2	35.11	5.19	17.35	100.88	0.114



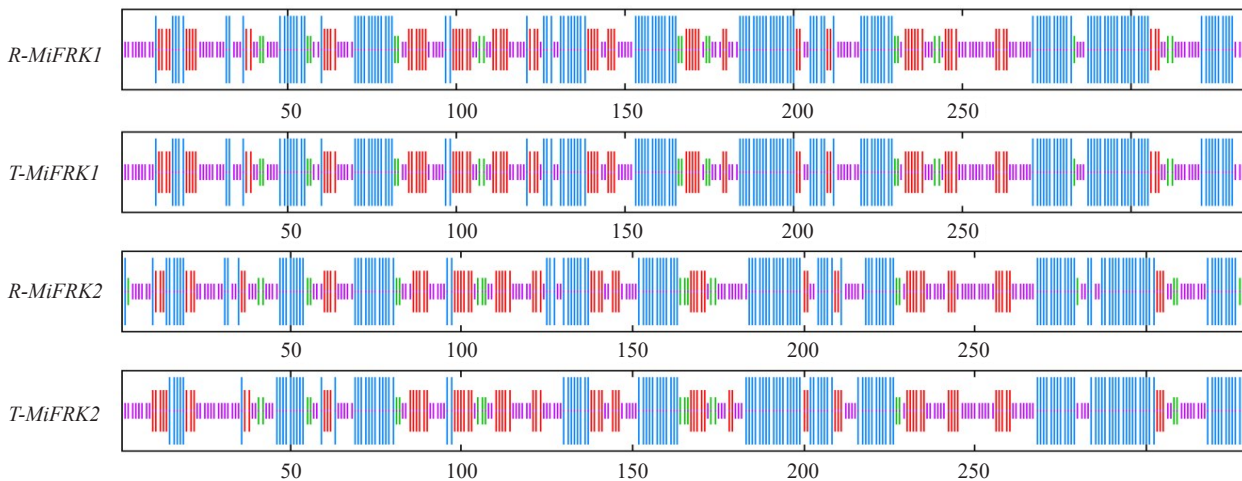
图 5 杧果 MiFRK 蛋白保守结构域

Fig. 5 Conserved Domain of mango MiFRK

蛋白质的二级结构指的是蛋白质中局部存在的规则的结构元件,利用 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html))网站进行氨基酸的二级结构预测。由图 6 可知,这 4 个蛋白序列主要含有  $\alpha$ -螺旋、延伸链和无规卷曲。R-MiFRK1 与 T-MiFRK1 氨基酸序列中  $\alpha$ -螺旋占 38.92%;延伸链占 20.66%; $\beta$ -转角占 6.29%;无规

卷曲占 34.13%。R-MiFRK2 氨基酸序列中  $\alpha$ -螺旋占 38.91%;延伸链占 19.45%; $\beta$ -转角占 6.69%;无规卷曲占 34.95%。T-MiFRK2 氨基酸序列中  $\alpha$ -螺旋占 38.91%;延伸链占 21.58%; $\beta$ -转角占 5.47%;无规卷曲占 34.04%。

根据上述氨基酸序列,分别利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)构建蛋白三级模



蓝色 .  $\alpha$ -螺旋;红色 . 延伸链;绿色 .  $\beta$ -转角;紫色 . 随机卷曲。

Blue.  $\alpha$ -helix; Red. Extended strand; Green.  $\beta$ -turn; Purple. Random coil.

图 6 MiFRK 蛋白质二级结构

Fig. 6 Secondary structure of MiFRK proteins



型(图7)。R-MiFRK1和T-MiFRK1三级结构一致,而R-MiFRK2和T-MiFRK2的三级结构有细微差别,并且R-MiFRK1、T-MiFRK1、R-MiFRK2和T-Mi-

FRK2四个蛋白均是以二聚体的形式存在,这与崔娜等<sup>[27]</sup>提到的一些植物FRK蛋白是以二聚体形式存在、其功能部位由相对分子质量为30~40 ku的亚基

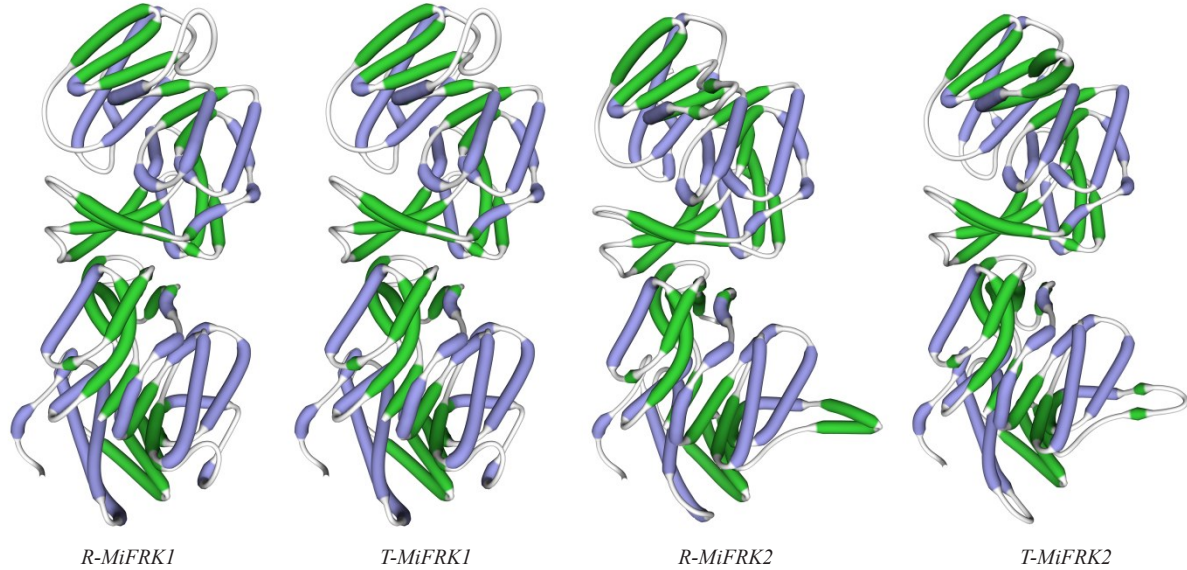


图7 MiFRK 蛋白质三级模型

Fig. 7 Tertiary model of MiFRK proteins

组成的二聚体相吻合。

2.3.3 杧果FRK蛋白系统进化树分析 通过下载NCBI中与MiFRK1及MiFRK2氨基酸序列相似度较高的其他植物FRK蛋白序列,运用MEGA 7构建NJ进化树,结果(图8)显示,2个品种的MiFRK1和MiFRK2分别聚在2个分支,MiFRK1与龙眼DiFRK(AEK21796.1)聚在一起,MiFRK2与美国山核桃Ci-

FRK2(XP\_042985185.1)、胡桃JrFRK2(XP\_018839987.1)和小果咖啡CaFRK2(XP\_027119568.1)等较为相近,聚在一起。而且还发现亲缘关系相近物种的FRK蛋白一般聚在一个分支,表明FRK基因在进化中较保守,这也与陈毅鸿等<sup>[17]</sup>研究的FRK基因家族演化是很保守的结论相一致。而杧果*MiFRK1*与*MiFRK2*基因可能在果糖代

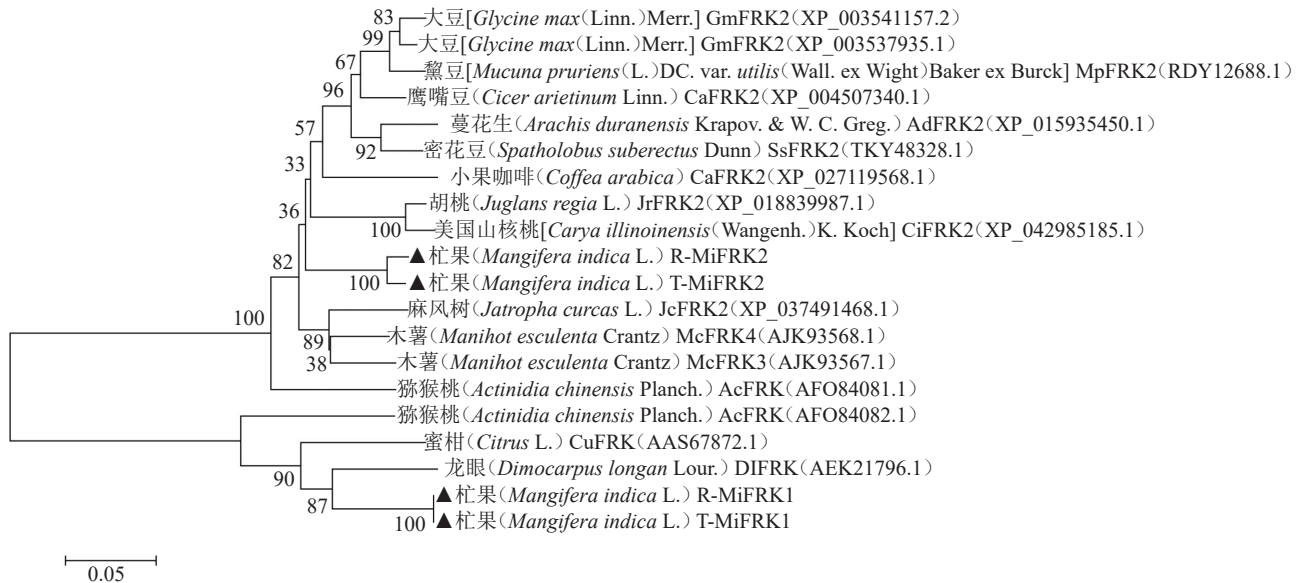


图8 杧果与其他植物FRK蛋白系统进化树分析

Fig. 8 Phylogenetic tree of FRK proteins in mango and other plants

谢过程中具有不同功能。

#### 2.4 杧果FRK基因不同果实发育时期表达模式

利用qRT-PCR检测MiFRK基因在杧果高糖和低糖2个品种不同果期中表达情况,结果见图9。*MiFRK1*和*MiFRK2*基因在不同果实发育时期具有不同的表达模式。*MiFRK1*在果实从幼果到完熟过程中的相对表达量呈先降低后升高趋势,且*MiFRK1*在热农1号各时期的相对表达量均大于台农1号,并在热农1号中变化较显著。*MiFRK2*在热农1号和台农1号中均是在幼果中相对表达量高,且在热农1号中的相对表达量明显大于台农1号;接下来在果实膨大期降低,随后,*MiFRK2*在热农1号青熟期的相对表达量上升,在完熟果中下降,而*MiFRK2*在台农1号青熟期和完熟期的相对表达量与热农1号相反,青熟期的相对表达量继续下降,在完熟果中表达量上升且高于热农1号。

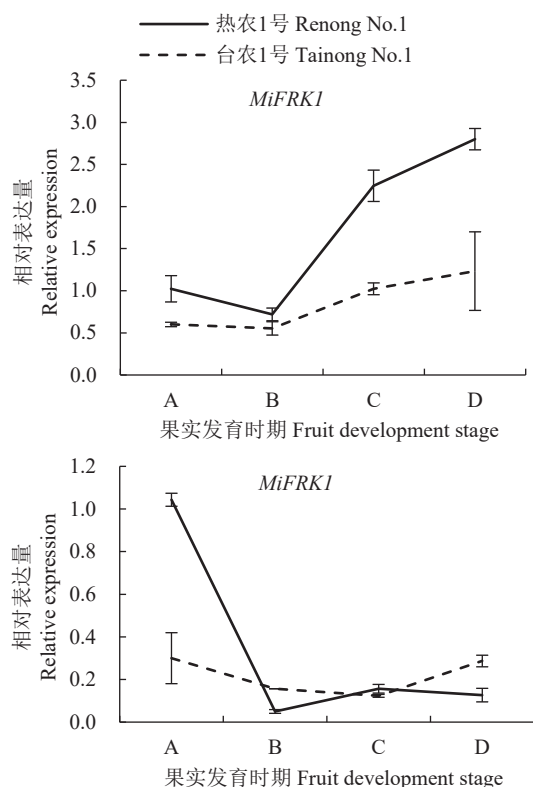


图9 不同果实发育时期 *MiFRKs* 基因的表达模式  
Fig. 9 Expression pattern of *MiFRKs* of mango at different fruit development stages

#### 2.5 不同果实发育时期果糖含量变化

基于高效液相色谱法对2个品种不同时期的果糖含量进行分析(图10)。从幼果期到果实膨大期,2个品种的果糖含量呈升高趋势,且台农1号中的果糖低于热农1号,随后,台农1号中的果糖含量继续

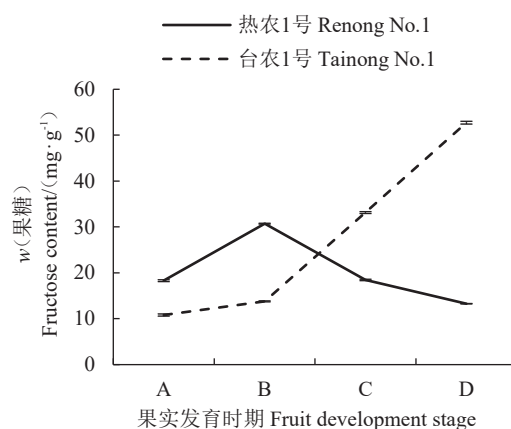


图10 不同果实发育时期果糖含量

Fig. 10 Fructose content of mango during fruit ripening

升高,而热农1号中的果糖含量呈下降趋势。相关性分析发现,热农1号中*MiFRK1*的相对表达量与果糖含量呈负相关(-0.798),而台农1号中*MiFRK1*的相对表达量与果糖含量呈显著正相关(0.979\*)。2个品种中*MiFRK2*的相对表达量与果糖含量未达到显著相关水平,但是从幼果期到青熟期*MiFRK2*的相对表达量与果糖含量变化趋势相反,从青熟期到完熟期的后熟过程中变化趋势一致。

### 3 讨 论

为深入分析关键*MiFRK*基因在高糖和低糖杧果品种中的差异,笔者对筛选的2个*MiFRK*基因*MiFRK1*和*MiFRK2*在高糖和低糖2个品种中的基因结构、蛋白性质及结构和表达模式差异进行了分析。研究发现,2个品种*MiFRK1*基因序列一致,所编码的氨基酸一致。对启动子区序列进行分析发现,启动子区除典型的TATA-box和CAAT-box核心启动子元件外,均包含ABRE、CAT-box、MYC、P-box和TCA-element元件,说明杧果*MiFRK1*的表达受脱落酸、赤霉素和水杨酸的调控,同时与缺水、抗脱落酸及抗冻响应有关。在其他果树中也有报道脱落酸<sup>[28]</sup>、赤霉素<sup>[29]</sup>、水杨酸<sup>[30]</sup>和干旱<sup>[31]</sup>均与果实的糖分积累有关。*MiFRK2*基因序列在2个品种间有多个差异位点,致使R-*MiFRK2*与T-*MiFRK2*所编码的氨基酸相似度仅为97.87%,推测*MiFRK2*在2个杧果品种糖代谢调控中的作用有差异。

生物信息学分析发现R-*MiFRK1*、T-*MiFRK1*、R-*MiFRK2*和T-*MiFRK2*的蛋白分子质量在35.05~35.79 ku之间,等电点为5.19~5.62,与番茄<sup>[13]</sup>、马铃薯<sup>[10]</sup>和枸杞<sup>[24]</sup>等基本一致,并处在Pego等<sup>[8]</sup>描述的植

物FRK单体分子质量范围34~37 ku内。进一步分析发现这4个MiFRK均为热稳定性较高的稳定性蛋白,而且是不含跨膜结构的疏水性蛋白,这与枸杞LbFRK7<sup>[24]</sup>以及草莓FaFRK3<sup>[22]</sup>等FRK蛋白一致。

利用 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)进行MiFRK蛋白亚细胞定位预测,发现R-MiFRK1和T-MiFRK1定位于叶绿体和细胞质,R-MiFRK2定位于叶绿体,T-MiFRK2定位于叶绿体和线粒体。而有学者已经证明番茄SlFRK3(Solyc02g091490)定位于叶绿体<sup>[14]</sup>,但在拟南芥中,Gilkerson等<sup>[32]</sup>鉴定并命名了7个FRK基因(*At5g51830*、*At2g31390*、*At1g66430*、*At4g10260*、*At1g06020*、*At1g06030*和*At3g59480*),其中*At1g66430*(*AtFRK3*)定位于质体,其余6个为细胞质FRK。说明同一植物不同FRK可能作用于不同位置。杧果MiFRK1可能在叶绿体和细胞质均发挥作用,而R-MiFRK2主要作用于叶绿体,T-MiFRK2可能同时作用于叶绿体和线粒体。

FRK在果糖代谢中起着关键作用,表达模式分析发现,*MiFRK1*在2个品种幼果期相对表达量低,而在青熟果和完熟果中具有较高的相对表达量,这与苹果*MdFK1*<sup>[25]</sup>的表达模式一致,且在热农1号中的相对表达量高于台农1号,相关性分析发现,热农1号中*MiFRK1*的相对表达量与果糖含量呈负相关(-0.798),而台农1号中*MiFRK1*的相对表达量与果糖呈显著正相关(0.979\*),说明*MiFRK1*在2个品种果糖差异中起到了重要作用。*MiFRK2*的表达模式恰恰相反,在热农1号幼果期相对表达量高于成熟果,这与枇杷*EjFRK*<sup>[20]</sup>、海巴戟*McFRK2*<sup>[21]</sup>、柑橘*CuFRK1*和*Cufrk2*<sup>[18]</sup>、红颜草莓*FaFRK3*基因<sup>[22]</sup>、杨梅*MrFRK2*<sup>[23]</sup>、苹果*MdFK2*、*MdFK3*和*MdFK4*<sup>[25]</sup>的表达模式一样,而且从青熟到完熟呈下降趋势。但是笔者发现*MiFRK2*在台农1号不同果期相对表达量变化较小,从幼果期到青熟期呈下降趋势,后熟过程中表达量升高。而且从幼果期到青熟期,2个品种中*MiFRK2*的相对表达量与果糖含量的相对表达量和果糖含量变化趋势相反,说明在这个果实发育阶段,*MiFRK2*可能在杧果果糖降解中发挥一定作用,且其表达水平受到果糖含量的抑制<sup>[33,9]</sup>。

## 4 结 论

杧果果糖激酶*MiFRK1*可能受脱落酸、赤霉素、

水杨酸及逆境调控以二聚体的形式在叶绿体和细胞质发挥作用,*MiFRK2*在2个品种中的基因序列及表达模式差异大,可能以二聚体的形式在叶绿体和线粒体发挥作用。*MiFRK1*和*MiFRK2*均在2个杧果品种果糖含量差异调控中起到一定作用。

## 参考文献 References:

- [1] FUCHS Y, PESIS E, ZAUBERMAN G. Changes in amylase activity, starch and sugars contents in mango fruit pulp[J]. *Scientia Horticulturae*, 1980, 13(2): 155-160.
- [2] OFFER C E, PATRICK J W. Cellular pathway and hormonal control of short distance transfer in sink regions[J]. *Plant Biology*, 1986, 1: 295-306.
- [3] 齐红岩, 李天来, 刘海涛, 张洁. 番茄不同部位中糖含量和相关酶活性的研究[J]. *园艺学报*, 2005, 32(2): 239-243. QI Hongyan, LI Tianlai, LIU Haitao, ZHANG Jie. Studies on carbohydrate content and sucrose-metabolizing enzymes activities in different parts of tomato[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32(2): 239-243.
- [4] 崔娜, 李天来, 赵聚勇. 外源生长素 PCPA 对番茄果实蔗糖代谢的影响[J]. *北方园艺*, 2008(5): 8-12. CUI Na, LI Tianlai, ZHAO Juyong. Effects on sucrose metabolism of tomato fruit by PCPA treatment[J]. *Northern Horticulture*, 2008(5): 8-12.
- [5] LI L, WU H X, MA X W, XU W T, LIANG Q Z, ZHAN R L, WANG S B. Transcriptional mechanism of differential sugar accumulation in pulp of two contrasting mango (*Mangifera indica* L.) cultivars[J]. *Genomics*, 2020, 112(6): 4505-4515.
- [6] 姚改芳, 张绍铃, 曹玉芬, 刘军, 吴俊, 袁江, 张虎平, 肖长城. 不同栽培种梨果实中可溶性糖组分及含量特征[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(20): 4229-4237. YAO Gaifang, ZHANG Shaoling, CAO Yufen, LIU Jun, WU Jun, YUAN Jiang, ZHANG Huping, XIAO Changcheng. Characteristics of components and contents of soluble sugars in pear fruits from different species[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(20): 4229-4237.
- [7] GRANOT D. Role of tomato hexose kinases[J]. *Functional Plant Biology*, 2007, 34(6): 564-570.
- [8] PEGO J V, SMEEKENS S. Plant fructokinases: A sweet family get-together[J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(12): 531-536.
- [9] GONZALI S, PISTELLI L, DE BELLIS L, ALPI A. Characterization of two *Arabidopsis thaliana* fructokinase[J]. *Plant Science*, 2001, 160(6): 1107-1114.
- [10] SMITH S B, TAYLOR M A, BURCH L R, DAVIES H V. Primary structure and characterization of a cDNA clone of fructokinase from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Record)[J]. *Plant Physiology*, 1993, 102(3): 1043-1043.
- [11] TAYLOR M A, ROSS H A, GARDNER A, DAVIES H V. Characterisation of a cDNA encoding fructokinase from potato (*Solanum tuberosum* L.)[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1995, 145(3): 253-256.
- [12] KANAYAMA Y, DAI N, GRANOT D, PETREIKOV M, SCHAFFER A, BENNETT A B. Divergent fructokinase genes are differentially expressed in tomato[J]. *Plant Physiology*, 1997, 113(4): 1379-1384.

- [13] 王卫平, 崔娜, 于志海, 白丽萍, 李天来. 番茄果实糖激酶基因的克隆及其表达分析[J]. 华北农学报, 2011, 26(3): 11-15.  
WANG Weiping, CUI Na, YU Zhihai, BAI Liping, LI Tianlai. Cloning and expression analysis of fructokinase gene (FRK) from tomato fruit[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2011, 26(3): 11-15.
- [14] GERMAN M A, ASHER I, PETREIKOV M, DAI N, SCHAFER A A, GRANOT D. Cloning, expression and characterization of *LeFRK3*, the fourth tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) gene encoding fructokinase[J]. Plant Science, 2004, 166(2): 285-291.
- [15] JIANG H W, DIAN W M, LIU F Y, WU P. Isolation and characterization of two fructokinase cDNA clones from rice[J]. Phytochemistry, 2003, 62(1): 47-52.
- [16] HOEPFNER S W, BOTH A F C. Expression of fructokinase isoforms in the sugarcane culm[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2003, 41(8): 741-747.
- [17] 陈毅鸿, 张积森. 植物果糖激酶基因家族演化及其功能[J]. 分子植物育种, 2016, 14(2): 359-369.  
CHEN Yihong, ZHANG Jisen. A review for gene evolution and functional study in plant fructokinase[J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(2): 359-369.
- [18] QIN Q P, ZHANG S L, CHEN J W, XIE M, JIN Y F, CHEN K S, SYED A. Isolation and expression analysis of fructokinase genes from citrus[J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(12): 1408-1415.
- [19] YAO Y, GENG M T, WU X H, SUN C, WANG Y L, CHEN X, SHANG L, LU X H, LI Z, LI R M, FU S P, DUAN R J, LIU J, HU X W, GUO J C. Identification, expression, and functional analysis of the fructokinase gene family in *Cassava*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(11): 2398.
- [20] QIN Q P, CUI Y Y, ZHANG L L, LIN F F, LAI Q X. Isolation and induced expression of a fructokinase gene from loquat[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2014, 61(3): 289-297.
- [21] 王青芬, 宫树森, 白艳, 刘念, 王培源, 吴田. 海巴戟果实发育过程中果糖、果糖激酶及其基因的变化[J]. 热带亚热带植物学报, 2022, 30(1): 63-69.  
WANG Qingfen, GONG Shusen, BAI Yan, LIU nian, WANG Peiyuan, WU Tian. Changes in fructose, fructokinase and its gene in *Morinda citrifolia* during fruit development[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2022, 30(1): 63-69.
- [22] 吕文远, 张丽勃, 高清华, 段可. ‘红颜’草莓中果糖激酶基因 *FaFRK3* 的克隆与表达分析[J]. 上海农业学报, 2020, 36(6): 1-5.  
LÜ Wenyuan, ZHANG Liqiong, GAO Qinghua, DUAN Ke. Cloning and expression analysis of fructokinase gene *FaFRK3* from ‘Benihoppe’ strawberry[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2020, 36(6): 1-5.
- [23] 陈馨, 施丽愉, 邵佳蓉, 陈伟, 郑永华, 杨震峰. 杨梅果糖激酶基因 *MrFRK2* 的克隆及在成熟期果实中的表达分析[J]. 园艺学报, 2016, 43(8): 1585-1592.  
CHEN Xin, SHI Liyu, SHAO Jiarong, CHEN Wei, ZHENG Yonghua, YANG Zhenfeng. Molecular cloning and expression analysis of *MrFRK2* in Chinese bayberry during fruit ripening[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(8): 1585-1592.
- [24] 赵建华, 尹跃, 李浩霞, 王亚军, 李彦龙, 安巍. 枸杞果糖激酶基因 *LbFRK7* 的克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2018, 38(5): 816-822.  
ZHAO Jianhua, YIN Yue, LI Haoxia, WANG Yajun, LI Yanlong, AN Wei. Cloning and expression analysis of fructokinase gene (*LbFRK7*) from wolfberry (*Lycium barbarum* Linn.)[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2018, 38(5): 816-822.
- [25] 刘凤丽. 苹果 *MdFKs* 基因的表达分析与原核表达[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.  
LIU Fengli. The expression analysis of apple (*Malus domestica*) *MdFKs* genes and prokaryotic expression[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2015.
- [26] 袁晖, 韦云, 李馨玥, 李俊才, 王爱德. ‘南果梨’及其芽变‘南红梨’果实中糖分积累与相关基因表达差异分析[J]. 果树学报, 2017, 34(5): 534-540.  
YUAN Hui, WEI Yun, LI Xinyue, LI Juncai, WANG Aide. Differences in sugar accumulation and the related gene expression in fruit development between ‘Nanguo’ and its mutant ‘Nanhong’ pears[J]. Journal of Fruit Science, 2017, 34(5): 534-540.
- [27] 崔娜, 王卫平, 林凤, 白丽萍, 张玉龙. 植物果糖激酶的研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(14): 41-47.  
CUI Na, WANG Weiping, LIN Feng, BAI Liping, ZHANG Yulong. Update on fructokinase in higher plants[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(14): 41-47.
- [28] 王贵元, 夏仁学, 曾祥国, 吴强盛. 外源脱落酸和赤霉素对红肉脐橙果肉糖含量的影响[J]. 农业科学与技术(英文版), 2014, 15(1): 47-51.  
WANG Guiyuan, XIA Renxue, ZENG Xiangguo, WU Qiangsheng. Dynamic changes of sugar concentrations in pulp of ‘Cara cara’ navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) after application by exogenous ABA and GA<sub>3</sub>[J]. Agricultural Science and Technology, 2014, 15(1): 47-51.
- [29] 李节法, 杨琪, 虞秀明, 王磊, 王世平, 许文平, 张才喜. 赤霉素对梨糖代谢及其关键酶基因表达的影响[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2015, 33(3): 21-28.  
LI Jiefu, YANG Qi, YU Xiuming, WANG Lei, WANG Shiping, XU Wenping, ZHANG Caixi. Influence of gibberellins on sugar metabolism and related gene expression in fruit of pear (*Pyrus pyrifolia*) [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science), 2015, 33(3): 21-28.
- [30] 刘晓峰, 李昌亨, 穆卫, 温鹏飞. 水杨酸对赤霞珠葡萄果实内在品质的影响[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2014, 34(3): 258-261.  
LIU Xiaofeng, LI Changheng, MU Wei, WEN Pengfei. Influence of salicylic acid on the internal qualities of grape berry cv. Cabernet Sauvignon[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2014, 34(3): 258-261.
- [31] 龚成宇, 王毅, 宋海岩, 杨科, 陶海青, 刘俊宏, 龚荣高. 干旱胁迫对黄果柑果实品质及糖酸代谢酶活性的影响[J]. 西南农业学报, 2021, 34(2): 272-278.  
GONG Chengyu, WANG Yi, SONG Haiyan, YANG Ke, TAO Haiqing, LIU Junhong, GONG Ronggao. Effects of drought stress on fruit quality and enzyme activity of glycolic acid metabolism in Huangguogan fruit[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2021, 34(2): 272-278.
- [32] GILKERSON J, PEREZ-RUIZ J M, CHORY J, CALLIS J. The plastid-localized pfkB-type carbohydrate kinases FRUCTOKINASE-LIKE 1 and 2 are essential for growth and development of *Arabidopsis thaliana*[J]. BMC Plant Biology, 2012, 12(1): 102.
- [33] SCHAFFER A A, PETREIKOV M. Sucrose-to-starch metabolism in tomato fruit undergoing transient starch accumulation[J]. Plant physiology, 1997, 113(3): 739-746.