果 树 学 报 2026,43(3):535-546
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20250382

红阳猕猴桃果糖激酶基因家族成员鉴定及其在果实软化过程中的表达特性分析

王筱涵,陈珊治,葛潇雨,向妙莲,陈 明,陈金印,曾教科*

(江西农业大学农学院·果蔬贮藏与保鲜江西省重点实验室,南昌 330045)

摘 要:【目的】鉴定猕猴桃果糖激酶(fructokinase,FRK)基因家族成员,探究*FRK*基因差异表达模式及其与猕猴桃后熟软化的关系。**【方法】**利用生物信息学方法鉴定并分析猕猴桃*FRK*基因家族成员,通过转录组数据和相关性分析筛选参与软化的*FRK*成员,采用实时荧光定量PCR技术验证*FRK*基因在果糖、葡萄糖和不同激素处理条件下的表达模式。**【结果】**在红阳猕猴桃基因组中共鉴定出6个*FRK*基因家族成员,进化树分析可将其聚为2个亚族;多序列比对、基因和蛋白质结构分析显示,同一亚族具有较高的保守性;启动子顺式作用元件分析发现,响应乙烯、脱落酸、渗透胁迫和氧化应激反应的元件分布最多;基因表达和相关性分析表明,*AcFRK2*和*AcFRK4*正向调控猕猴桃软化;己糖处理试验表明,*AcFRK2*和*AcFRK4*可有效利用葡萄糖和果糖。激素处理试验表明,*AcFRK2*和*AcFRK4*表达受乙烯诱导而上调,但*AcFRK4*表达还受到AsA和NAA的抑制,表明*AcFRK2*和*AcFRK4*通过响应不同的激素信号参与果实软化进程。**【结论】**共鉴定了6个*FRK*基因家族成员,筛选出2个响应糖代谢、植物激素和猕猴桃后熟软化的关键基因*AcFRK2*和*AcFRK4*,为进一步探究*FRK*基因参与猕猴桃后熟软化的生物学功能提供了理论依据。

关键词:猕猴桃;果糖激酶;软化;基因表达

中图分类号:S663.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2026)03-0535-12

Identification of the fructokinase gene family members in Hongyang kiwifruit and its expression analysis during postharvest softening

WANG Xiaohan, CHEN Shanzhi, GE Xiaoyu, XIANG Miaolian, CHEN Ming, CHEN Jinyin, ZENG Jiaoke*

(College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University/Jiangxi Provincial Key Laboratory for Postharvest Storage and Preservation of Fruits and Vegetables, Nanchang 330045, Jiangxi, China)

Abstract:【Objective】Kiwifruit (*Actinidia* spp.) production in China maintains the world's leading position in both cultivation area and yield. However, postharvest softening of fruit notably reduces its quality. The initiation of fruit postharvest softening of kiwifruit primarily involves the hydrolysis of starch. The hydrolysis of starch into glucose and fructose necessitates phosphorylation for entry into the glycolytic pathway. Plant fructokinases (FRK) belong to the phosphofructokinase B family and possess characteristic substrate recognition regions of the FRK family. The FRK is a specific enzyme is involved in fructose phosphorylation, regulating fructose flux in plant cells and subsequently modulating respiratory metabolic pathways. Furthermore, the plant FRK may function similarly to hexokinases in sugar sensing, serving as a signaling molecule to regulate plant growth, development, starch accumulation, and environmental stress responses. However, little is known about the role of FRK in fruit postharvest softening and senescence. This study sought to identify the kiwifruit *FRK* gene family, investigate the differential expression patterns, and explore its association with kiwifruit softening.【Methods】Using

收稿日期:2025-07-04 **接受日期:**2025-07-18

基金项目:国家自然科学基金项目(32360779);江西省"双千计划"项目(jxsq2020101076);江西农业大学科研启动基金项目(9232309106)

作者简介:王筱涵,女,在读硕士研究生,研究方向为果实贮藏保鲜与品质调控。E-mail:xhan568@163.com

***通信作者** Author for correspondence. E-mail:jkzeng211@163.com

Arabidopsis thaliana, *Lycopersicon esculentum,* and *Manihot esculenta FRK* nucleotide sequences as references, kiwifruit *FRK* family members were identified from the kiwifruit genome database Hong Yang v3, the HMMER online tool was used to verify the presence of the pfkB conserved domain in kiwifruit *FRK* family members, then the NCBI-CDD website was utilized to further validate the characteristic substrate recognition domain of *AcFRK* genes. We used the TBtools software to analyze the chromosomal localization of *AcFRK* genes; the subcellular location of the kiwifruit FRK proteins was predicated using WoLF PSORT online website; the protein molecular weight and isoelectric points were analyzed using EXPASY online website. A phylogenetic relationships of FRK proteins across kiwifruit, *Arabidopsis*, tomato, and cassava were established using MEGA (version 5.05) software; multiple sequence alignments were performed using Clustal X (version 1.81) and Gendoc 32; the conserved motifs of kiwifruit FRK proteins were analyzed using the MEME online website; the exon-intron gene structures were analyzed by TBtools; the FRK protein secondary structure was analyzed using SOPMA; the FRK protein tertiary model was constructed using SWISS-MODEL website; the promoter cis-acting elements of *AcFRKs* were predicted using PlantCARE online website; and the expression heatmap of AcFRKs during postharvest softening were generated using TBtools by normalizing FPKM values from transcriptomic data. The expression profiles of the *AcFRK2* and *AcFRK4* were verified with the real-time quantitative PCR technique after glucose, fructose and various hormones treatment.【Results】In the kiwifruit genome, a total of 6 *FRK* sequences were identified, randomly distributed on 5 chromosomes. The lengths of these 6 FRK proteins varied from 168 aa to 457 aa, with isoelectric points ranging from 4.88 to 6.03 and molecular weights spanning from 18.47 kDa to 50.01 kDa. Furthermore, the phylogenetic tree analysis revealed that kiwifruit FRK family could be divided into two groups: AcFRK1/AcFRK3/AcFRK4 (Group I), AcFRK2/AcFRK5 (Group II a), and AcFRK6 (Group II b), each group comprising three FRK members. The multiple sequence alignments showed that AcFRK proteins possessed pfkB, substrate recognition, and ATP binding domains, members within the same group sharing highly similar conserved domains. The gene structure analysis showed that the *AcFRK* genes comprised 1 to 3 UTRs, 2 to 4 exons of GroupI, and 6 to 9 exons of Group II. Additionally, the amino acid sequence analysis unveiled 12 conserved motifs and demonstrated a high level of conservation among proteins within the same group, these findings were consistent with the multiple sequence alignments analysis. The protein structure analysis revealed a significant resemblance in the main structure among members of the same group, suggesting a strong conservation of functions within AcFRK proteins. The analysis of promoter cis-acting elements found a wide distribution of elements responsive to ethylene, abscisic acid, osmotic stress, and oxidative stress responses, suggesting that the *AcFRK* genes would be likely induced by the hormones ethylene or ABA, thereby participating in kiwifruit ripening and softening. The gene expression heatmap demonstrated an upward trend in the expression levels of the *AcFRK2* and *AcFRK4* as kiwifruit ripening progresses. The correlation analysis revealed a negative association between genes and fruit firmness as well as starch content, while showing a positive correlation with reducing sugar content, indicating that the *AcFRK2* and *AcFRK4* might positively regulate kiwifruit softening. Hexose treatment experiments demonstrated that the *AcFRK2* and *AcFRK4* exhibited upregulation in response to hexose, indicating their potential for efficient utilization of glucose and fructose. The hormone treatment experiments demonstrated that the *AcFRK2* and *AcFRK4* were upregulated by ethylene induction during the late storage period, with the *AcFRK4* expression being further inhibited by AsA and NAA during room temperature storage, indicating that the *AcFRK2* and *AcFRK4* might be involved in the softening process through their response to different hormones.【Conclusion】Six

members of the *FRK* gene family were identified, and two key genes, the *AcFRK2* and *AcFRK4*, were selected, which would be involved in sugar metabolism, plant hormones, and kiwifruit softening. This would provide a theoretical basis for further exploring the biological functions of the *FRK* genes in kiwifruit postharvest softening.

Key words: Kiwifruit; Fructokinase; Softening; Gene expression

猕猴桃（*Actinidia* spp.）原产中国，种植面积和产量稳居世界首位，因其丰富的维生素C含量和香甜的口感，深受消费者喜爱[1-3]。近年来，随着我国猕猴桃产业迅速发展，消费者对高质量猕猴桃的需求量也越来越高[4]。猕猴桃采后软化进程迅速，不耐贮藏。因此，深入探究猕猴桃的软化机制，可为保鲜技术的研发提供理论依据。

果实软化是一种常见的生理现象，涉及物质代谢、细胞壁构成和基因表达的全面变化[5]。在猕猴桃中，果实后熟软化主要表现为淀粉的水解[6]。淀粉水解产生的葡萄糖和果糖，需经过己糖激酶（EC 2.7.1.1）和果糖激酶（EC 2.1.7.4）的磷酸化，生成己糖-6-磷酸，才能为下游的生理代谢途径提供原料[7-8]。研究表明，果糖激酶（fructokinase，FRK）是果糖磷酸化的特异性酶，对果糖的亲和力远高于己糖激酶[9]。此外，植物FRK在糖传感方面的功能可能与己糖激酶类似，其作为信号转导分子，调控植物的生长发育、淀粉积累和环境胁迫响应等过程[10-11]。目前，FRK在果实采后软化和衰老中的功能研究甚少。因此，对猕猴桃*FRK*基因家族和表达水平进行分析，有助于了解猕猴桃后熟软化过程中果糖的代谢机制，为提高猕猴桃果实品质提供理论依据。

植物FRK属于磷酸果糖激酶（phosphofructokinase type B，pfkB）家族，具有pfkB家族特异性区域（pfkB和ATP结合）和果糖激酶家族特征性底物识别区域[10]。目前，已经在多种植物中对*FRK*基因家族成员进行了分析，如番茄至少有4个*FRK*成员[12]、拟南芥有7个*FRK*成员[13]、苹果有9个*FRK*成员[14]、中国白梨有20个*FRK*成员[15]、木薯有7个*FRK*成员[16]、甘蔗有7个*FRK*成员[17]。Nardozza等[18]从猕猴桃EST数据库中鉴定出3个*FRK*成员（*FK4*、*FK6*和*FK8*），并发现其在不同基因型猕猴桃中有差异性表达，参与猕猴桃果实早期发育和淀粉代谢过程。然而，在猕猴桃基因组发布后，关于猕猴桃FRK基因家族成员的研究和报道却相对较少。

植物FRK的生化特性对果糖代谢的调控、不同逆境和激素信号的响应各不相同[9]。因此，笔者以红阳猕猴桃为试验材料，采用生物信息学方法对猕猴桃*FRK*基因家族成员进行鉴定；基于前期转录组测序结果及软化相关数据[19]，分析*AcFRK*基因的表达丰度及其与果实软化的相关性；进一步分析*AcFRK*基因家族成员在果糖、葡萄糖和不同激素处理下的表达模式，以期为*AcFRK*基因在猕猴桃果糖代谢和软化过程中的功能研究提供参考依据。

1　材料和方法

1.1　材料与处理

红阳猕猴桃果实采自江西省宜春市奉新县猕猴桃果园（28.69° N，115.28° E）。采收时果肉可溶性固形物含量为7.0%~8.0%。采收当天运回实验室，挑选大小、形状一致、无机械损伤和病虫害的果实，进行试验处理。处理组1：己糖处理。用打孔器获取直径13 mm、厚5 mm的果肉圆片，将圆片均分为3组，每组约30 g。分别浸入含100 mmol·L^{-1}甘露醇（对照）、100 mmol·L^{-1}果糖和100 mmol·L^{-1}葡萄糖的MES缓冲液（标准缓冲液为50 mmol·L^{-1} MES、5 mmol·L^{-1} $CaCl_2$、5 mmol·L^{-1} $MgCl_2·6H_2O$、1 mmol·L^{-1} EDTA以及10 mmol·L^{-1}抗坏血酸）中，于25℃ 100 r·min^{-1}摇床中温育30 min。在0、4、12和24 h时取样，用于提取总RNA。处理组2：激素处理。将猕猴桃果实随机分成2份，第1份约360个果实，分别进行乙烯处理（ETH，100 μL·L^{-1}乙烯熏蒸12 h）和对照处理（CK，常温密闭12 h）；第2份约720个果实，包括4个处理：0.5 mmol·L^{-1}脱落酸（ABA）、1 mmol·L^{-1}乙酰水杨酸（AsA）、50 mg·L^{-1} α-萘乙酸（NAA）和清水（CS）浸泡5 min，自然晾干后于常温（20±1）℃、相对湿度85%的环境下贮藏10 d。每2 d取样1次，用于提取总RNA。每次取样以10个果实为1个生物学重复，共设置3个生物学重复。

1.2　*AcFRKs*基因家族成员鉴定

根据已有报道[12-13,16]，从拟南芥TAIR网站（www.arabidopsis.org）和NCBI网站（https://www.ncbi.nlm.

nih.gov）中分别下载7个拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）*AtFRK*蛋白序列、4个番茄（*Lycopersicon esculentum*）*LeFRK*蛋白序列和6个木薯（*Manihot esculenta*）蛋白序列作为诱饵，在红阳猕猴桃基因组数据库（https://kiwifruitgenome.org/organism/5）[20]中通过BLAST比对筛选*FRK*同源序列，e阈值设定为$1e^{-5}$。使用HMMER在线软件（https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer）对候选*FRK*基因家族成员进行保守结构域分析，鉴定上述候选成员是否存在完整的PF00294保守结构域（pfkB，磷酸果糖激酶B）；使用NCBI-CDD网站（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml）进一步验证上述候选成员是否具有果糖激酶家族特征性结构域（substrate recognition，底物识别）[10-11]。据此，共鉴定得到6个*AcFRK*基因家族成员，按照其在染色体上的位置依次命名为*AcFRK1*~*AcFRK6*。

1.3 *AcFRKs*基因家族蛋白的理化特性分析

从猕猴桃基因组数据库中下载GFF3注释文件，使用TBtools软件[21]对6个*AcFRK*基因在染色体上的分布进行分析，利用Gene Location Visualize插件对各成员在染色体上的位置进行可视化。使用WoLF PSORT在线网站（https://www.genscript.com/wolf-psort.html）预测6个AcFRK蛋白的亚细胞定位，并通过基因组数据库中的亚细胞组分定位进行确认。理论等电点及平均分子质量使用在线网站（https://web.expasy.org/compute_pi/）进行预测。

1.4 *AcFRKs*基因家族蛋白的系统进化树和氨基酸序列分析

通过TAIR和NCBI网站下载拟南芥、番茄和木薯中已公布的FRK蛋白序列，利用ClustalX（version 1.81）进行多序列比对，比对结果采用Gendoc 32软件进行氨基酸序列分析；并在MEGA（version 5.05）软件中采用邻接法（neighbor-joining，NJ）构建系统进化树。

1.5 *AcFRKs*基因家族成员的保守基序及基因结构

使用MEME在线网站（https://meme-suite.org/meme/tools/meme）分析猕猴桃AcFRK1~AcFRK6蛋白的保守基序（motif），基序数设置为12，其余参数选择默认值。根据猕猴桃基因组注释文件，利用TBtools软件[21]分析*AcFRK1*~*AcFRK6*基因中外显子和非编码区的位置分布，并使用Visualize Gene Structure插件对*AcFRK1*~*AcFRK6*基因的结构特征进行可视化。

1.6 *AcFRKs*基因家族成员蛋白的二级结构与三级结构预测

利用SOPMA网站（https：//npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl page=npsa_sopma.ht-ml）进行氨基酸的二级结构预测。利用SWISS-MODEL网站（http://swissmodel.expasy.org/）构建蛋白质三级模型。

1.7 *AcFRKs*基因家族成员启动子的顺式作用元件分析

在猕猴桃基因组数据库中下载*AcFRK1*~*AcFRK6*基因上游2000 bp的启动子序列，在PlantCARE在线网站（https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）上分析启动子区顺式作用元件，重点关注植物生长发育、激素响应和胁迫响应元件，并对结果进行统计和可视化。

1.8 转录组测序及相关性分析

将常温贮藏第0天、第4天和第8天的猕猴桃果肉样品送至上海派森诺生物科技有限公司进行转录组测序，每个取样点设置3次重复。从转录组数据中获取上述6个*AcFRK*基因的FPKM值，经$\log_2$（FPKM+1）归一化处理后，使用Tbtools软件绘制基因表达热图。进一步分析*AcFRK*基因的FPKM值与果实软化的相关性，基于前期果实软化相关数据，即硬度、淀粉和还原糖含量[19]，使用在线网站的相关性聚类标记热图工具（v 2.9.1，https://www.omicstudio.cn/tool/59）绘制相关性热图，皮尔逊相关系数值设定为0.5。

1.9 *AcFRKs*基因家族成员的表达分析

使用RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒（货号：DP441，北京天根生化科技有限公司）提取猕猴桃果肉总RNA，通过琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性，利用BioDrop超微量核酸蛋白分析仪（英国柏楷有限公司）检测总RNA纯度和浓度，使用反转录试剂盒（货号：11141ES60，上海翌圣生物科技有限公司）将RNA反转录成cDNA。基因表达通过实时荧光定量PCR（RT-qPCR）试验进行分析。利用Primer 3在线软件（https://primer3.ut.ee/）设计引物，详见表1，以*AcActin*（Actinidia06663）作为内参基因，根据溶解曲线验证引物的特异性。RT-qPCR反应体系、反应程序和基因表达计算参照笔者课题组之前的方法[19]。试验设置3个生物学重复，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算基因的相对表达水平，将0 d的基因表达量设为1，

表1　实时荧光定量PCR引物序列

Table 1　Primer sequences used for real-time quantitative PCR

基因名称 Gene name	上游引物序列（5′−3′） Forward primer (5′−3′)	下游引物序列（5′−3′） Reverse primer (5′−3′)
AcFRK1	GAAGCTCCTCCTGGTCACTC	CGTATCCACTGCTTTGACGTG
AcFRK2	GACAGGGGCCAGAAAGACTC	GGTCCCCAACTTTACGTCCA
AcFRK3	TGCATTCCATGTCAAAACGGT	GATGGCCCCACATGCATTTG
AcFRK4	GCCCGGGAGCACATTATGAG	TCTGCAACCTTTCTCACCAAG
AcFRK5	GGTGATGCCTTTGTTGGTGG	CGTAGGAAGGGCAGGAATGG
AcFRK6	GCTGCTGATGTCTCATTGGT	CCATCGACTTGAGCAGAGCA
AcActin	TGGAATGGAAGCTGCAGGA	CACCACTGAGCACAATGTTGC

作为参照。

1.10　数据统计与分析

试验数据均以平均值±标准误表示。采用SPSS软件（26.0版本）进行单因素方差检验，使用Duncan新复极差法进行差异显著性分析，并以字母标记法标示，使用Origin软件（8.0版本）处理数据和作图。

2　结果与分析

2.1　*AcFRKs*基因家族成员鉴定及分析

笔者从已公布的红阳猕猴桃基因组数据库（Hong Yang v3）中[20]鉴定出6个*FRK*基因家族成员，根据其在染色体上的位置依次命名为*AcFRK1*~*AcFRK6*。*AcFRKs*基因分布在5条不同的染色体（Lachesis group，LG）上，LG0、LG3、LG17和LG25染色体上各分布1个*AcFRK*基因，LG21染色体上有2个*AcFRKs*基因（图1）。亚细胞定位预测结果表明，AcFRK2和AcFRK6定位于叶绿体，其余4个均定位于细胞质（表2），表明FRK蛋白在叶绿体和细胞质中发挥不同的功能。进一步分析发现，6个AcFRKs蛋白中长度最短为168 aa（AcFRK1），最长为457 aa

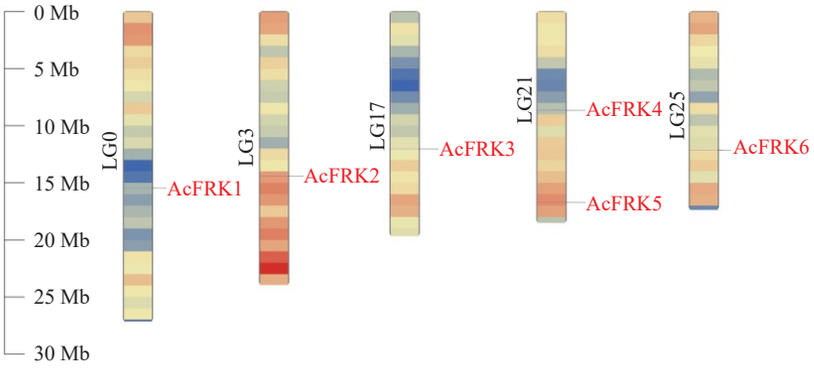


图1　*AcFRKs*基因家族染色体定位分析

Fig. 1　Chromosomal localization analysis of kiwifruit *FRK* gene family

（AcFRK2），平均长度为304 aa；各AcFRKs蛋白质等电点最小为4.88（AcFRK4），最大为6.03（AcFRK5），平均等电点为5.47；AcFRKs蛋白质的分子质量最小为18.47 kDa（AcFRK1），最大为50.01 kDa（AcFRK2），平均分子质量为33.02 kDa。

2.2　*AcFRKs*基因家族成员蛋白系统进化树分析

为了阐明AcFRKs蛋白的功能和进化关系，选取猕猴桃（6个）、拟南芥（7个）、番茄（4个）和木薯（6个）的FRK蛋白序列构建了系统进化树。结果如图2所示，FRK可分为2个亚族（Group Ⅰ和Group Ⅱ）。其中，第Ⅰ亚族有3个AcFRK成员，并与MeFRK3、MeFRK4和LeFRK2聚为一类；第Ⅱa亚族有2个AcFRK成员，并与MeFRK2、AtFRK1和LeFRK1聚为一类；第Ⅱb亚族有1个AcFRK成员，并与定位于质体的MeFRK1、AtFRK3和LeFRK3聚为一类。表明AcFRKs蛋白具有功能多样性，可能在质体和细胞质中发挥功能。

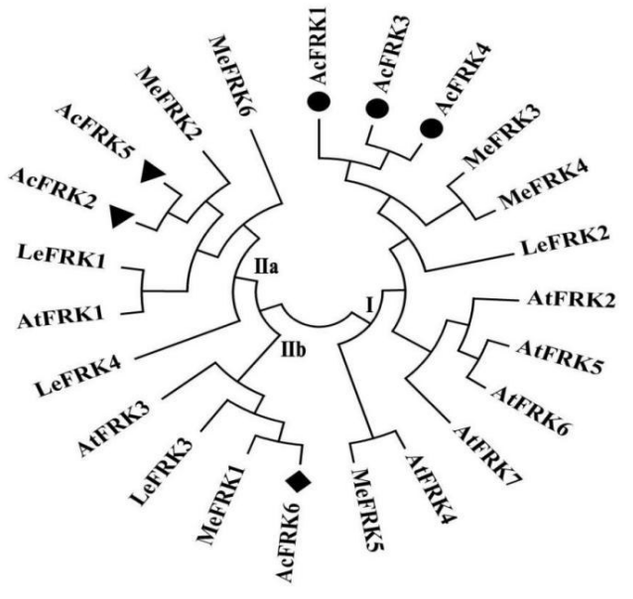
2.3　*AcFRKs*基因家族成员氨基酸序列比对

对猕猴桃*AcFRKs*基因家族成员的氨基酸进行多序列比对分析，发现6个*AcFRKs*均具有pfkB家

表 2 *AcFRKs* 基因及其蛋白理化特性

Table 2 Characteristics of *AcFRK* genes and their deduced proteins

基因名称 Gene name	基因登录号 Genome ID	染色体 Chromosome	亚细胞定位 Subcellular location	蛋白质长度 Protein length/aa	等电点 Isoelectric point	分子质量 molecular mass/kDa
AcFRK1	Actinidia34596	Lachesis_group0	细胞质 Cytoplasm	168	5.49	18.47
AcFRK2	Actinidia13541	Lachesis_group3	叶绿体 Chloroplast	457	5.83	50.01
AcFRK3	Actinidia26508	Lachesis_group17	细胞质 Cytoplasm	310	4.96	33.46
AcFRK4	Actinidia11298	Lachesis_group21	细胞质 Cytoplasm	169	4.88	18.49
AcFRK5	Actinidia31799	Lachesis_group21	细胞质 Cytoplasm	332	6.03	35.79
AcFRK6	Actinidia17224	Lachesis_group25	叶绿体 Chloroplast	389	5.65	41.89



At. 拟南芥；Le. 番茄；Me. 木薯；Ac. 猕猴桃。

At. *Arabidopsis thaliana*; Le. *Lycopersicon esculentum*; Me. *Manihot esculenta*; Ac. *Actinidia* spp.

图 2 猕猴桃与拟南芥、番茄和木薯 FRK 蛋白的进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of the FRK proteins from kiwifruit, *Arabidopsis*, tomato, and cassava

族特异性保守结构域，可以分为2种类型。AcFRK1和AcFRK4包括1个pfkB家族特异性区域、1个底物识别区域和1个ATP结合区域；AcFRK2、AcFRK3、AcFRK5和AcFRK6包括2个pfkB家族特异性区域，1个底物识别区域和1个ATP结合区域（图3）。由此可知，同一亚族中的成员具有高度相似的保守基序，该结果与系统发育树分类结果类似。

2.4 *AcFRKs* 基因家族成员基因结构与保守基序分析

为进一步了解*AcFRKs*基因结构的异同，分析了外显子-内含子基因结构（图4-A）。结果表明，*AcFRKs*基因有0~3个非编码区（UTR）。*AcFRK2*、*AcFRK5*和*AcFRK6*有6~8个外显子，其编码的氨基酸长度较长；*AcFRK1*、*AcFRK3*和*AcFRK4*有3~4个外显子，其编码的氨基酸长度较短。

通过MEME在线网站预测了FRK蛋白序列中的12个保守基序，结果如图4-B所示，AcFRK蛋白均含有motif 1和/或motif 7（底物识别；FRK家族特异性模块）、motif 2（ATP结合模块）和motif 5。除了AcFRK1和AcFRK4外，其他AcFRKs均含有motif 4（pfkB家族特异性模块）。AcFRK1和AcFRK4保守基序种类、数量和排列方式一致；AcFRK2、AcFRK3、AcFRK5和AcFRK6基因的主要保守基序较为一致。这些结果与氨基酸序列分析结果一致，表明同一亚族AcFRKs蛋白的保守性较高。

2.5 *AcFRKs* 基因家族成员蛋白质结构分析

猕猴桃AcFRKs蛋白的二级结构如图5-A所示，6个AcFRKs蛋白序列主要含有α-螺旋、无规则卷曲、延伸链和β-转角。其中，α-螺旋（37.94%）占比最高，无规则卷曲（35.34%）次之，再次是延伸链（20.80%），β-转角（5.92%）占比最低（图5-B）。三维结构建模如图5-C所示，AcFRK1~AcFRK6蛋白质三维空间排列形成的蛋白质分子构象多种多样，其中AcFRK1、AcFRK3和AcFRK4（Group Ⅰ）的蛋白质结构比较相似，AcFRK2、AcFRK5和AcFRK6（Group Ⅱ）的蛋白质主体结构较为相似。

2.6 *AcFRKs* 基因的启动子顺式作用元件分析

利用PlantCARE网站在*AcFRKs*基因启动子区域共鉴定出236个顺式作用元件，按功能可分为4种类型：生长发育、激素响应、胁迫响应和光响应元件，其中光响应元件未在图中显示（图6-A）。*AcFRKs*基因启动子区域存在14~33个顺式作用元件，*AcFRK6*基因最多（图6-B）。*AcFRKs*基因启动子上以激素响应元件（45.04%）最为丰富，其中以乙烯响应元件（ethylene response element，ERE）和脱落酸响应元件（abscisic acid responsivenss，ABRE）为主，推测

点状、灰色和白色长方形分别表示 pfkB 家族特异性区域、底物识别区域和 ATP 结合区域。

Dotted, grey, and white rectangles represent domains of pfkB, substrate recognition, and ATP binding. respectively.

图 3　AcFRKs 与其他 FRKs 氨基酸序列分析

Fig. 3　Amino acid sequence analysis of AcFRKs and other FRKs

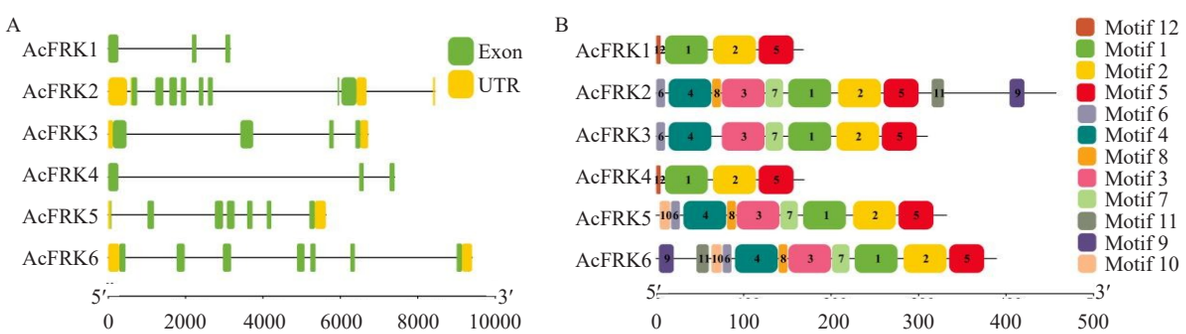
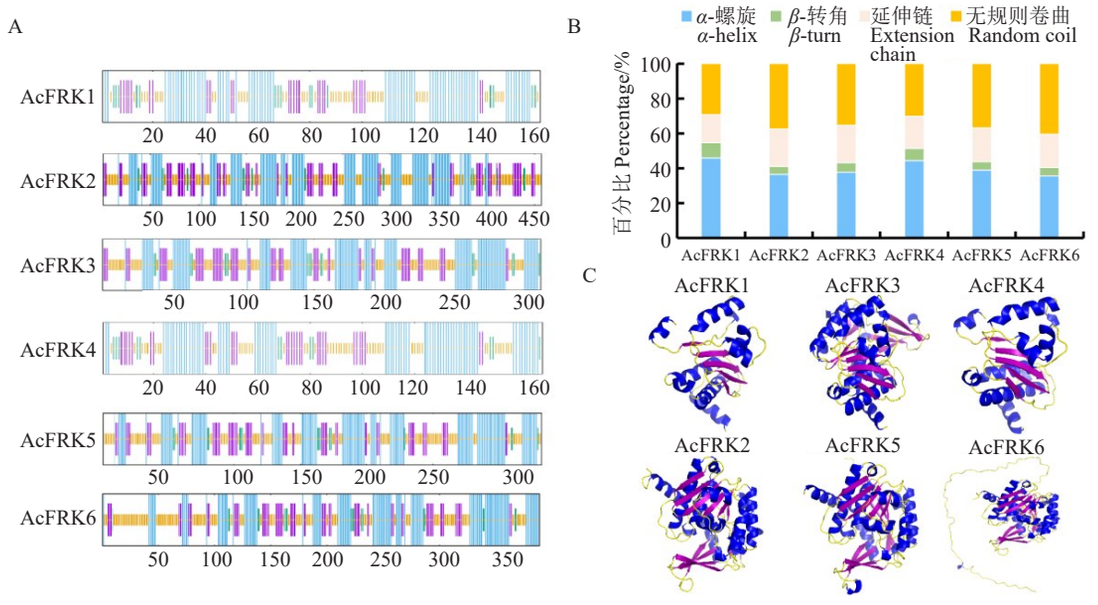


图 4　*AcFRKs* 基因结构（A）与保守基序（B）分析

Fig. 4　Structure (A) and conserved domain (B) of *AcFRKs*

AcFRKs 基因极可能受到乙烯或脱落酸的诱导，进而参与调控猕猴桃后熟软化过程；其次是胁迫响应（42.75%），以渗透胁迫元件（osmotic stress response element，STRE）和氧化应激反应元件（as-1）为主，推测 *AcFRKs* 基因可能通过调节氧化应激反应以应对细胞内渗透压变化和猕猴桃后熟衰老进程。此外，*AcFRKs* 基因还含有大量光响应元件，推测 *AcFRKs* 基因可能在植物的源和库中均发挥着重要作用。



蓝色．α-螺旋；绿色．β-转角；紫色．延伸链；橙色．无规则卷曲和环状结构。

Blue. α-helix; Green. β-turn; Purple. Extension chain; Orange. Random coil and cyclic structure.

图5 AcFRKs蛋白质二级结构（A）、类型占比（B）和三级模型（C）

Fig. 5 Secondary structure (A), states percentage (B), and tertiary model (C) of AcFRK proteins

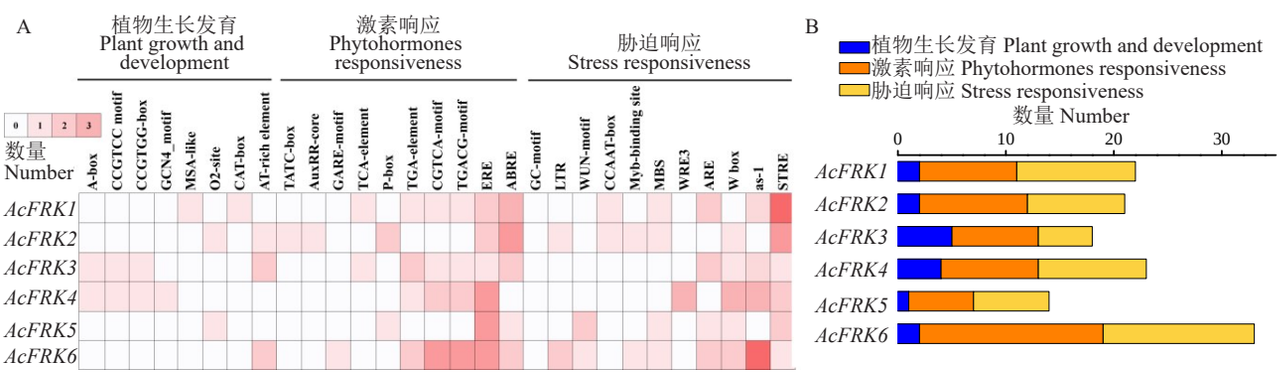


图6 *AcFRKs*基因启动子顺式作用元件特征（A）和数量（B）分析

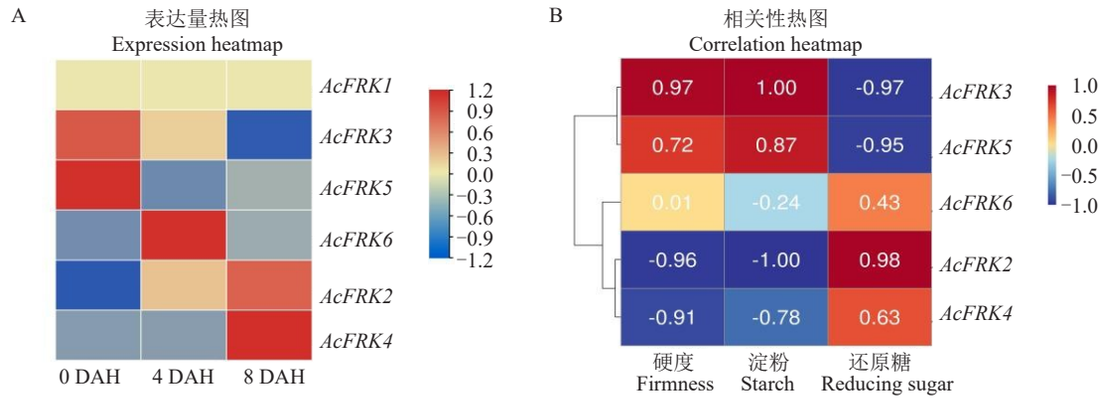
Fig. 6 Characteristic (A) and quantitative (B) analysis of the promoters *cis*-acting element of *AcFRKs*

2.7 *AcFRKs*基因在猕猴桃后熟软化阶段的表达分析

为研究*FRK*基因家族成员在猕猴桃后熟软化过程中的表达模式，对红阳猕猴桃采后贮藏0、4和8 d的果肉样品进行转录组测序，并分析*FRK*基因表达丰度及其与果实软化的相关性，猕猴桃样品处理、硬度、淀粉和还原糖含量见前期报道[19]。表达量分析结果如图7-A所示，*AcFRK1*在猕猴桃后熟软化过程中几乎不表达；*AcFRK3*和*AcFRK5*随后熟时间的增加其表达量下调；*AcFRK6*表达量呈现先上升后下降的趋势，并在常温贮藏第4天达到峰值；*AcFRK2*和*AcFRK4*表达量随猕猴桃果实软化进程呈上升趋势，并在贮藏第8天达到峰值。进一步分析后熟过程中*FRK*表达量与软化的相关性，发现*AcFRK2*和*AcFRK4*的表达量与果实硬度和淀粉含量呈显著负相关，与还原糖含量呈显著正相关；而*AcFRK3*和*AcFRK5*的表达量则与果实硬度呈显著正相关（图7-B）。这些结果表明，猕猴桃*FRK*基因家族成员在猕猴桃后熟软化过程中存在不同的表达模式，并且*AcFRK2*和*AcFRK4*是促进果实软化的候选基因。

2.8 *AcFRKs*基因响应己糖的表达模式

为进一步探讨*AcFRK2*和*AcFRK4*对己糖的响应机制，分析了这2个基因在不同浓度果糖和葡萄糖温育的猕猴桃果肉中的表达模式。结果如图8所示，在对照组和果糖组中，*AcFRK2*在处理前期不表达，后

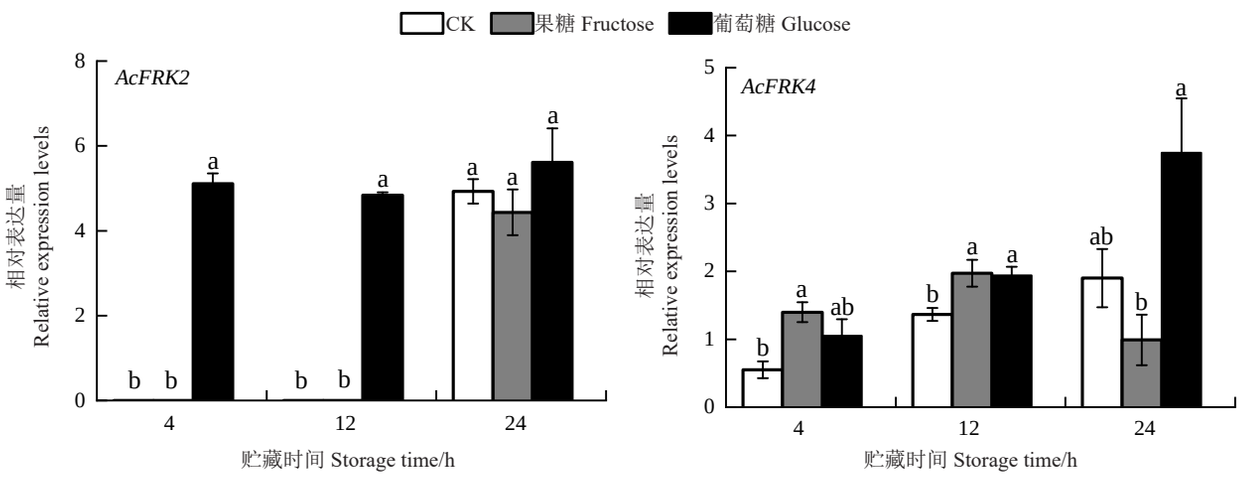


皮尔逊相关系数＞0.5 表示显著正相关，皮尔逊相关系数＜−0.5 表示显著负相关。

Pearson’s correlation coefficient＞0.5 indicate positively correlation, pearson’s correlation coefficient＜−0.5 indicate negative correlation.

图 7　*AcFRKs* 家族成员表达量热图（A）和相关性热图（B）

Fig. 7　Heatmap of *AcFRK* gene family expression (A) and correlations (B)



不同小写字母表示同一时期处理间差异显著（P＜0.05）。下同。

Different small letters indicate significant difference among treatments at the same growth stage at P＜0.05. The same below.

图 8　果糖和葡萄糖温育对猕猴桃 *AcFRK2* 和 *AcFRK4* 基因表达的影响

Fig. 8　Gene expression levels of kiwifruit *AcFRK2* and *AcFRK4* under fructose and glucose incubation

期（24 h）显著上调，但两组之间无显著差异；与对照和果糖相比，葡萄糖处理可显著上调贮藏 4 h 和 12 h 的 *AcFRK2* 表达量（P＜0.05）。*AcFRK4* 表达量随着贮藏时间的延长不断升高，果糖、葡萄糖处理均可显著上调其在贮藏 4 h 和 12 h 的表达量，其中，果糖处理表达量分别是对照组的 2.54 倍和 1.44 倍；葡萄糖处理则分别是对照组的 1.91 倍和 1.42 倍，但在贮藏后期无显著差异。这些结果表明，*AcFRK2* 和 *AcFRK4* 基因的表达受到果糖和葡萄糖的调控，也进一步验证了 *AcFRK2* 和 *AcFRK4* 参与淀粉和糖代谢过程。

2.9　*AcFRKs* 基因响应外源激素的表达模式

笔者分析了不同激素即乙烯（ETH）、乙酰水杨酸（AsA）、脱落酸（ABA）和 α-萘乙酸（NAA）处理下猕猴桃 *AcFRK2* 和 *AcFRK4* 的表达模式。结果如图 9 所示，在 ETH 处理下，与对照相比，*AcFRK2* 在贮藏前期无表达，在贮藏后期被 ETH 显著诱导上调表达；*AcFRK4* 的表达在贮藏过程中呈波动变化，但在贮藏后期（10 d），ETH 显著诱导 *AcFRK4* 表达，其表达量是对照组的 3.61 倍。在 ABA 处理下，*AcFRK2* 和 *AcFRK4* 的表达无规律性变化，但 *AcFRK4* 在贮藏第 6 天显著上调表达。AsA 处理下，*AcFRK2* 的表达变化无规律性，在贮藏第 2 天显著上调，但在贮藏第 6 天被显著抑制。而 *AcFRK4* 的表达在整个贮藏期被 AsA 诱导下调；*AcFRK4* 在 AsA 诱导 8 d 后减幅最大，减少量为 61.08%。NAA 处理下，*AcFRK2* 基本不表达。与对照相比，NAA 处理降低 *AcFRK4* 的表

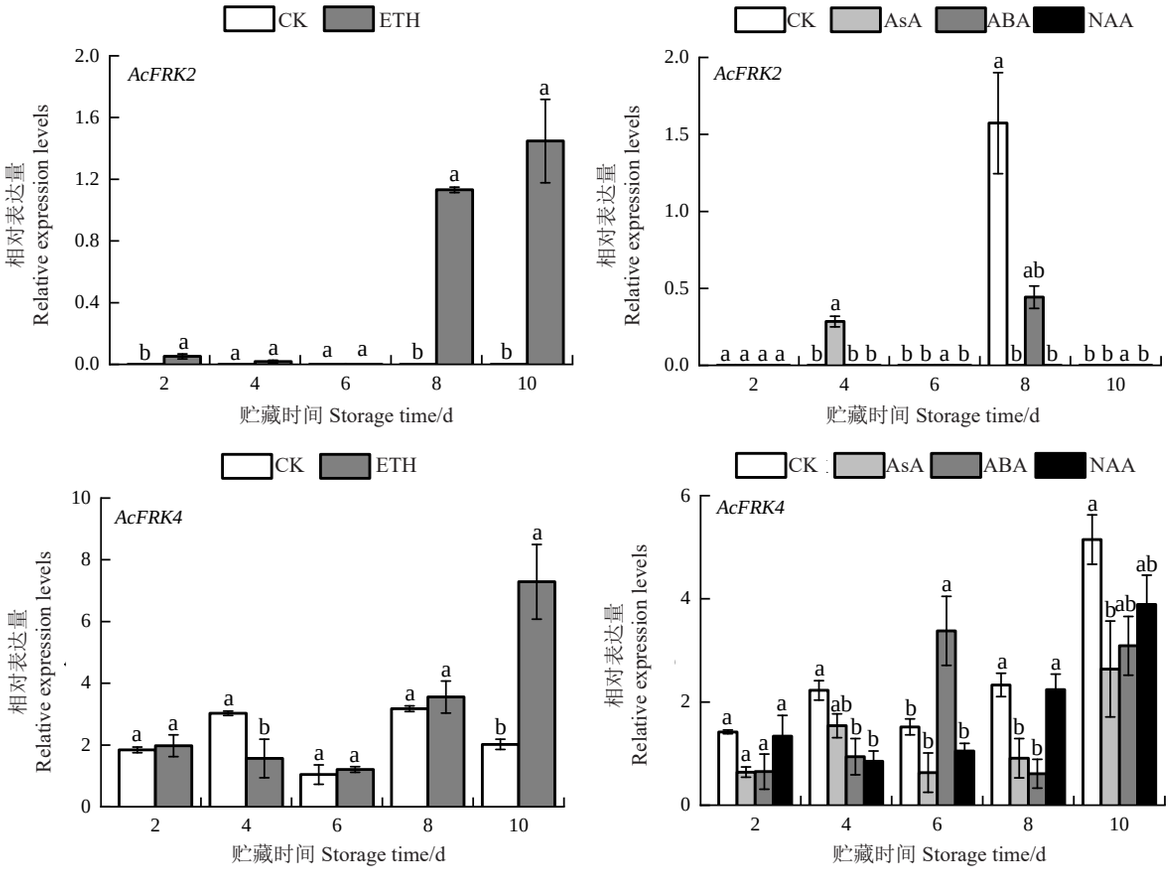


图 9 激素处理对猕猴桃 *FRK2* 和 *FRK4* 基因表达的影响

Fig. 9 Gene expression levels of kiwifruit *FRK2* and *FRK4* after application of hormones

达量；在NAA处理4 d后减幅最大，减少量为62.02%。因此，推测*AcFRK2*和*AcFRK4*可能通过响应ETH、NAA和AsA来参与猕猴桃后熟软化过程。

3 讨 论

*FRK*基因家族成员可介导植物细胞中果糖的流量，进而调节呼吸代谢途径[11]。研究表明，*FRK*基因在调控植物生长发育和胁迫响应过程中也发挥了重要作用[9-10]。笔者在猕猴桃基因组数据库中鉴定出6个*AcFRK*基因，不均匀地分布在5条染色体上，与Vizzotto等[22]的报道一致。系统进化树显示，AcFRKs蛋白分为2个亚族，且与拟南芥、番茄和木薯的聚类关系较近。其中，Ⅰ亚族定位于细胞质；Ⅱ亚族定位于细胞质或叶绿体，表明不同成员在特定部位中发挥作用，与前人[12-13,16]的研究结果较一致。基因结构分析发现，同一*FRK*亚族具有相似的结构和功能，其基因保守性较强。蛋白结构分析表明，AcFRKs蛋白二级结构主要由*α*-螺旋、无规则卷曲和延伸链组成，*β*-转角占比较少；三维结构模型显示同一类型FRK蛋白质结构更为相似，这也进一步表明了同一类型FRK可能具有相似的功能。对*AcFRKs*启动子序列分析表明，其区域富含多种激素响应元件，尤以乙烯和脱落酸响应元件最为丰富，推测*AcFRKs*基因的表达可能受ETH或ABA等诱导，进而参与猕猴桃糖代谢、果实成熟及逆境胁迫等过程。在苹果、木薯、甘蔗等其他植物的*FRK*基因启动子区域也发现了相同的顺式作用元件，受激素诱导而差异表达，并参与生物和非生物胁迫响应过程[14,17,23]。

FRK与植物库组织中的糖代谢密切相关，糖可作为碳源和信号分子调节下游基因的表达和代谢过程[9,24]。在枇杷果实中，EjFRK蛋白定位于细胞质，其转录水平可被100 mmol·L^{-1}外源果糖和葡萄糖诱导上调，且无高浓度抑制效应[25]。在苹果中，*MdFRK2*基因启动子活性和表达水平可被外源葡萄糖和果糖诱导上调，但在其启动子区并未发现已报道的糖响应元件[26]。与此类似，在本试验中*AcFRK2*主要被100 mmol·L^{-1}葡萄糖诱导上调，而*AcFRK4*可同时响应葡萄糖和果糖。但在其启动子区域均未检测

到糖响应元件，表明*AcFRK2*和*AcFRK4*存在未知的糖响应元件。*AcFRK2*和*AcFRK4*基因对葡萄糖和果糖的响应，可能在调控糖代谢并促进淀粉和蔗糖的高效利用中发挥作用[25,27]。

在猕猴桃采后贮藏过程中，淀粉降解为己糖（葡萄糖和果糖）。果糖主要被FRK磷酸化生成果糖-6-磷酸，进而启动糖酵解、呼吸代谢和其他次生代谢过程，加速果肉软化并缩短贮藏期[28-29]。因此，FRK在猕猴桃淀粉降解和软化过程中发挥重要作用。目前，关于植物FRK与淀粉代谢的研究，主要集中在淀粉积累和植物生长发育等方面[8,11]，而对淀粉降解的研究相对较少。本研究结果表明，在猕猴桃后熟软化时期，*AcFRKs*基因呈现差异表达。进一步分析*AcFRKs*与软化的相关性，发现*AcFRK2*和*AcFRK4*基因表达水平与淀粉降解、果实软化呈正相关，推测这2个基因可能在猕猴桃采后果肉软化过程中起促进作用，但其具体功能还有待深入研究。

猕猴桃采后的成熟软化与激素信号存在紧密联系，尤其是ETH和ABA信号[30]。相关研究表明，外源激素可诱导*FRK*差异表达，而*FRK*可调节果糖信号转导，并参与植物糖代谢和生长发育过程[17,31-32]。笔者通过分析*AcFRK2*和*AcFRK4*对ETH、ABA、NAA和AsA处理的响应，发现*AcFRK2*和*AcFRK4*在ETH处理后期均显著上调表达，这与猕猴桃采后乙烯释放及软化的变化趋势相一致[30]。在ABA处理下*AcFRK2*和*AcFRK4*的表达无规律性变化，表明*AcFRK2*和*AcFRK4*主要被ETH诱导而非ABA来促进猕猴桃的后熟软化过程。*AcFRK4*在AsA处理第8天和NAA处理第4天显著下调表达，而1.0 mmol·L^{-1} AsA和50 mg·L^{-1} NAA处理可延缓猕猴桃的后熟软化过程[33-34]，进一步表明*AcFRK4*表达与果实软化呈正相关。

4　结　论

笔者在猕猴桃基因组中共鉴定出6个*FRK*基因家族成员，分布于5条染色体上；亚细胞定位预测其主要定位于细胞质或叶绿体；系统进化分析将其分为2个亚族，同一亚族成员在基因和蛋白结构上相对保守；在*FRK*基因启动子序列上发现大量响应乙烯、脱落酸、渗透胁迫和氧化应激反应的元件。在猕猴桃后熟软化过程中，*AcFRK2*和*AcFRK4*表达水平上升；*AcFRK2*和*AcFRK4*可利用果糖和葡萄糖，并通过响应ETH、AsA和NAA等方式在猕猴桃后熟过程中调控糖代谢和软化。本研究结果为后续开展*FRK*功能验证、上游和下游调控机制等研究奠定了理论基础。

参考文献 References：

[1] PINTO T. Kiwifruit，a botany，chemical and sensory approach a review[J]. Advances in Plants & Agriculture Research，2018，8(6)：383-390.

[2] 齐秀娟，郭丹丹，王然，钟云鹏，方金豹 . 我国猕猴桃产业发展现状及对策建议[J]. 果树学报，2020，37(5)：754-763.
QI Xiujuan，GUO Dandan，WANG Ran，ZHONG Yunpeng，FANG Jinbao. Development status and suggestions on Chinese kiwifruit industry[J]. Journal of Fruit Science，2020，37(5)：754-763.

[3] 郭琳琳，庞荣丽，王瑞萍，乔成奎，田发军，王彩霞，李君，庞涛，成昕，谢汉忠 . 猕猴桃营养品质综合评价[J]. 果树学报，2022，39(10)：1864-1872.
GUO Linlin，PANG Rongli，WANG Ruiping，QIAO Chengkui，TIAN Fajun，WANG Caixia，LI Jun，PANG Tao，CHENG Xin，XIE Hanzhong. Comprehensive trait evaluation for kiwifruit nutritional quality[J]. Journal of Fruit Science，2022，39(10)：1864-1872.

[4] 方金豹，钟彩虹 . 新中国果树科学研究 70 年：猕猴桃[J]. 果树学报，2019，36(10)：1352-1359.
FANG Jinbao，ZHONG Caihong. Fruit scientific research in New China in the past 70 years：Kiwifruit[J]. Journal of Fruit Science，2019，36(10)：1352-1359.

[5] PENG Z Z，LIU G S，LI H L，WANG Y X，GAO H Y，JEMRIĆ T，FU D Q. Molecular and genetic events determining the softening of fleshy fruits：A comprehensive review[J]. International Journal of Molecular Sciences，2022，23(20)：12482.

[6] BURDON J，LALLU N. Kiwifruit (*Actinidia* spp.)[M]//YAHIA E M. Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. Woodhead Publishing Inc.，2011：326-360.

[7] CLAEYSSEN É，RIVOAL J. Isozymes of plant hexokinase：Occurrence，properties and functions[J]. Phytochemistry，2007，68(6)：709-731.

[8] GRANOT D，DAVID-SCHWARTZ R，KELLY G. Hexose kinases and their role in sugar- sensing and plant development[J]. Frontiers in Plant Science，2013，4：44.

[9] STEIN O，GRANOT D. Plant fructokinases：Evolutionary，developmental，and metabolic aspects in sink tissues[J]. Frontiers in Plant Science，2018，9：339.

[10] PEGO J V，SMEEKENS S C M. Plant fructokinases：A sweet family get-together[J]. Trends in Plant Science，2000，5(12)：531-536.

[11] 叶香媛，周文彬 . 植物果糖激酶研究进展[J]. 科学通报，2021，66(22)：2820-2831.
YE Xiangyuan，ZHOU Wenbin. Research advances in plant fruc-

tokinases[J]. Chinese Science Bulletin，2021，66(22)：2820-2831.

[12] DAMARI-WEISSLER H，KANDEL-KFIR M，GIDONI D，METT A，BELAUSOV E，GRANOT D. Evidence for intracellular spatial separation of hexokinases and fructokinases in tomato plants[J]. Planta，2006，224(6)：1495-1502.

[13] RIGGS J W，CAVALES P C，CHAPIRO S M，CALLIS J. Identification and biochemical characterization of the fructokinase gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. BMC Plant Biology，2017，17(1)：83.

[14] SU J，ZHU L C，AO P X，SHAO J H，MA C H. Genome-wide identification，molecular evolution，and functional characterization of fructokinase gene family in apple reveal its role in improving salinity tolerance[J]. Journal of Integrative Agriculture，2024，23(11)：3723-3736.

[15] CAO Y P，LI S M，HAN Y H，MENG D D，JIAO C Y，ABDULLAH M，LI D H，JIN Q，LIN Y，CAI Y P. A new insight into the evolution and functional divergence of FRK genes in *Pyrus bretschneideri*[J]. Royal Society Open Science，2018，5(7)：171463.

[16] 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.

[17] CHEN Y H，ZHANG Q，HU W C，ZHANG X T，WANG L M，HUA X T，YU Q Y，MING R，ZHANG J S. Evolution and expression of the fructokinase gene family in *Saccharum*[J]. BMC Genomics，2017，18(1)：197.

[18] NARDOZZA S，BOLDINGH H L，OSORIO S，HÖHNE M，WOHLERS M，GLEAVE A P，MACRAE E A，RICHARDSON A C，ATKINSON R G，SULPICE R，FERNIE A R，CLEARWATER M J. Metabolic analysis of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) berries from extreme genotypes reveals hallmarks for fruit starch metabolism[J]. Journal of Experimental Botany，2013，64(16)：5049-5063.

[19] ZENG J K，WANG X H，DONG W J，XIANG M L，GAN Z Y，CHEN C Y，CHEN M，CHEN J Y. Transcriptome analysis reveals a regulatory role of hexokinase in kiwifruit postharvest softening[J]. LWT-Food Science and Technology，2025，223：117717.

[20] YUE J Y，LIU J C，TANG W，WU Y Q，TANG X F，LI W，YANG Y，WANG L H，HUANG S X，FANG C B，ZHAO K，FEI Z J，LIU Y S，ZHENG Y. Kiwifruit Genome Database (KGD)：A comprehensive resource for kiwifruit genomics[J]. Horticulture Research，2020，7：117.

[21] CHEN C J，CHEN H，ZHANG Y，THOMAS H R，FRANK M H，HE Y H，XIA R. TBtools：An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant，2020，13(8)：1194-1202.

[22] VIZZOTTO G，FALCHI R. Genetics of sugar and starch metabolism[M]//TESTOLIN R，HUANG H W，FERGUSON A R. The Kiwifruit genome. Cham：Springer International Publishing，2016：189-204.

[23] 吴金山，陆小静，王思琦，黄家权，张逸杰，贾迎雪，陈银华 . 木薯 *FRK1* 类似基因的分离及表达分析[J]. 热带作物学报，2023，44(8)：1525-1533.
WU Jinshan，LU Xiaojing，WANG Siqi，HUANG Jiaquan，ZHANG Yijie，JIA Yingxue，CHEN Yinhua. Isolation and expression analysis of *FRK1*-like genes from cassava[J]. Chinese Journal of Tropical Crops，2023，44(8)：1525-1533.

[24] ROSA M，PRADO C，PODAZZA G，INTERDONATO R，GONZÁLEZ J A，HILAL M，PRADO F E. Soluble sugars：Metabolism，sensing and abiotic stress：A complex network in the life of plants[J]. Plant Signaling & Behavior，2009，4(5)：388-393.

[25] 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.

[26] YANG J J，ZHAN R L，JIN Y R，SONG J Y，LI D X，AN G Y，LI M J. Functional analysis of the promoter of the *MdFRK2* gene encoding a high-affinity fructokinase in apple (*Malus* × *domestica*)[J]. Scientia Horticulturae，2020，265：109088.

[27] KANAYAMA Y，GRANOT D，DAI N，PETREIKOV M，SCHAFFER A，POWELL A，BENNETT A. Tomato fructokinases exhibit differential expression and substrate regulation[J]. Plant Physiology，1998，117(1)：85-90.

[28] 冉欣雨，黄文俊，钟彩虹 . 猕猴桃果实淀粉代谢研究进展[J]. 果树学报，2024，41(2)：325-337.
RAN Xinyu，HUANG Wenjun，ZHONG Caihong. Advance in starch metabolism research of kiwifruit[J]. Journal of Fruit Science，2024，41(2)：325-337.

[29] YU J W，TSENG Y，PHAM K，LIU M，BECKLES D M. Starch and sugars as determinants of postharvest shelf life and quality：Some new and surprising roles[J]. Current Opinion in Biotechnology，2022，78：102844.

[30] LIN M F，GAO Z，WANG X L，MAO J P，PAN L Y，GONG X C，YAO D L，ZHONG H Q，HUO H Q. Identification of two postharvest ripening regulatory models in kiwifruit：Based on plant hormones，physiology，and transcriptome analysis[J]. BMC Plant Biology，2024，24(1)：1121.

[31] CHO Y H，YOO S D. Signaling role of fructose mediated by FINS1/FBP in *Arabidopsis thaliana*[J]. PLoS Genetics，2011，7(1)：e1001263.

[32] DU M，ZHU Y C，NAN H，ZHOU Y J，PAN X J. Regulation of sugar metabolism in fruits[J]. Scientia Horticulturae，2024，326：112712.

[33] 陈昆松，李方，张上隆，ROSS G S. ABA 和 IAA 对猕猴桃果实成熟进程的调控[J]. 园艺学报，1999，26(2)：81-86.
CHEN Kunsong，LI Fang，ZHANG Shanglong，ROSS G S. Role of abscisic acid and indole-3-acetic acid in kiwifruit ripening[J]. Acta Horticulturae Sinica，1999，26(2)：81-86.

[34] YIN X R，ZHANG Y，ZHANG B，YANG S L，SHI Y N，FERGUSON I B，CHEN K S. Effects of acetylsalicylic acid on kiwifruit ethylene biosynthesis and signaling components[J]. Postharvest Biology and Technology，2013，83：27-33.