北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

山楂*CpPG*基因家族鉴定及表达模式分析

樊晨阳 杜改改 李泰山 李佳佳 梁宏伟 刁松锋

Identification and expression analysis of hawthorn *CpPG* gene family

Fan Chenyang, Du Gaigai, Li Taishan, Li Jiajia, Liang Hongwei, Diao Songfeng

引用本文:
樊晨阳, 杜改改, 李泰山, 李佳佳, 梁宏伟, 刁松锋. 山楂*CpPG*基因家族鉴定及表达模式分析[J]. 北京林业大学学报, 2026, 48(7):110–126. doi: 10.12171/j.1000–1522.20260075
Fan Chenyang, Du Gaigai, Li Taishan, Li Jiajia, Liang Hongwei, Diao Songfeng. Identification and expression analysis of hawthorn *CpPG* gene family[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(7):110–126. doi: 10.12171/j.1000–1522.20260075

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20260075

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

枣果胶甲酯酶基因家族鉴定及基于RNA–Seq表达分析
Identification and expression analysis based on RNA–Seq of the pectin methylesterase gene family in *Ziziphus jujuba*
北京林业大学学报, 2021, 43(4): 8–16. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200338

板栗*Hsp*90基因家族的鉴定及在胚珠发育过程中的表达分析
Identification and expression analysis during ovule development of *Hsp*90 gene family in *Castanea mollissima*
北京林业大学学报, 2022, 44(11): 10–19. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210272

枸杞 *SnRK*基因家族鉴定及表达分析
Identification and expression analysis of *SnRK* gene family in *Lycium barbarum*
北京林业大学学报, 2025, 47(11): 96–108. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250274

水曲柳*FmPLT*基因家族的鉴定及表达分析
Identification and expression analysis of *FmPLT* gene family of *Fraxinus mandschurica*
北京林业大学学报, 2022, 44(2): 11–21. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210105

水曲柳*FmPIF*基因家族克隆及表达模式分析
Cloning and expression pattern analysis of *FmPIF* gene family in *Fraxinus mandshurica*
北京林业大学学报, 2022, 44(1): 58–68. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200379

油松*SAUR*基因家族鉴定及其干旱胁迫表达模式分析
Identification of *SAUR* gene family in *Pinus tabuliformis* and analysis on its expression patterns under drought stress
北京林业大学学报, 2024, 46(8): 57–67. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20230333

DOI:10.12171/j.1000−1522.20260075

山楂 *CpPG* 基因家族鉴定及表达模式分析

樊晨阳[1,2] 杜改改[2,3] 李泰山[2] 李佳佳[2] 梁宏伟[1] 刁松锋[2]
（1. 三峡大学生物与制药学院，湖北 宜昌 443002；2. 中国林业科学研究院经济林研究所，林源药材国家林业和草原局重点实验室，河南 郑州 450003；3. 中国林业科学研究院林业研究所，北京 100091）

摘要:【目的】不同山楂品种间质地差异显著，但其调控果实质地变化的分子基础尚不清晰。本研究旨在以质地差异显著的山楂品种为材料，全基因组鉴定果实软化的关键因子多聚半乳糖醛酸酶（PG）基因家族成员，探究其在山楂果实软化和品种间质地分化过程中的表达特异性，寻找与山楂果实硬度相关的的候选 *PG* 基因，以期为解析山楂果实质地的调控机制奠定前期理论基础，也为后期通过分子设计育种改良山楂果实品质提供候选基因资源。**【方法】**基于山楂基因组数据鉴定 *PG* 基因家族成员，分析其理化性质、亚细胞定位、系统发育、基因结构、保守基序、启动子顺式作用元件及转录因子结合位点，解析染色体分布、基因复制类型、选择压力及跨物种共线性；测定‘金如意’和‘豫北红’果实发育期的硬度和果胶含量；通过 qRT-PCR 分析 *CpPG* 表达模式，并进行基因表达量与表型的相关性分析。**【结果】**（1）在山楂基因组中共鉴定到 68 个 *CpPG* 成员，理化性质差异较大；且约 44% 定位于细胞核中。（2）系统发育分析将其划分为 6 个亚族，各亚族成员间基因结构较为保守，所有 *CpPG* 均包含 Glyco_hydro_28 催化结构域和 5 个保守 Motif。（3）启动子顺式作用元件分析显示，*CpPG* 启动子区域富含激素响应与低温响应相关元件。（4）基因复制分析表明，全基因组复制与分散复制是 *CpPG* 家族扩张的主要方式，纯化选择是其进化保守的主要驱动力。（5）两个果实硬度差异的品种‘金如意’和‘豫北红’在果实软化过程中果实硬度均逐渐降低，总果胶含量均呈先升后降趋势，而水溶性果胶含量随成熟度持续上升。（6）qRT-PCR 结果表明，*CpPG4* 在果实发育后期特异性高表达的 G1 组，且在‘金如意’中的表达量极显著高于‘豫北红’。（7）仅 *CpPG4* 表达量与果实硬度呈极显著负相关，与水溶性果胶含量呈极显著正相关，推测该基因在调控山楂果实软化和品种间质地分化过程中发挥作用。**【结论】**山楂基因组中鉴定出 68 个 *CpPG* 基因，启动子普遍富含低温及激素响应元件，家族扩张主要依赖分散复制和全基因组复制，纯化选择维持进化保守性。*CpPG4* 通过促进果胶溶解驱动果实软化，其品种间差异表达是果实质地分化的关键分子基础。本研究为解析山楂果实质地形成的分子机制提供了理论依据，也为通过分子育种改良果实硬度提供了关键基因资源。

关键词：山楂；多聚半乳糖醛酸酶（PG）；基因家族；果实质地；软化机制；表达模式；分子育种
中图分类号：S661.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2026)07−0110−17
引文格式：樊晨阳，杜改改，李泰山，等. 山楂 *CpPG* 基因家族鉴定及表达模式分析［J］. 北京林业大学学报，2026，48(7)：110−126. Fan Chenyang, Du Gaigai, Li Taishan, et al. Identification and expression analysis of hawthorn *CpPG* gene family［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(7): 110−126.

Identification and expression analysis of hawthorn *CpPG* gene family

Fan Chenyang[1,2] Du Gaigai[2,3] Li Taishan[2] Li Jiajia[2] Liang Hongwei[1] Diao Songfeng[2]
(1. College of biological and Pharmaceutical sciences of China Three Gorges University, Yichang 443002, hubei, China;
2. Research Institute of Non-timber Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Forest-Derived Medicinal Resources, National Forestry and Grassland Administration, Zhengzhou 450003, Henan, China;
3. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

收稿日期: 2026−02−10 **修回日期:** 2026−04−23
基金项目: 中国林科院中央公益性基本科研业务费专项（CAFYBB2024MA005），科技部科技基础资源调查专项（2024FY100502-9）。
第一作者: 樊晨阳。主要研究方向：山楂遗传育种。Email：chengyang1229@outlook.com 地址：443002 湖北省宜昌市西陵区大学路三峡大学生物与制药学院。
责任作者: 刁松锋，研究员。主要研究方向：药用植物育种栽培研究。Email：dsf@caf.ac.cn 地址：450003 河南省郑州市金水区中国林业科学研究院经济林研究所。梁宏伟，副教授。主要研究方向：植物组织培养、遗传改良研究。Email：lianghwcn@ctgu.edu.cn 地址：443002 湖北省宜昌市西陵区大学路三峡大学生物与制药学院。
本刊网址: https://j.bjfu.edu.cn；https://journal.bjfu.edu.cn

Abstract:［**Objective**］Significant differences in fruit texture exist among different hawthorn varieties, yet the molecular basis underlying this variation remains unclear. This study aims to identify members of the polygalacturonase (PG) gene family, a key factor in fruit softening, through a genome-wide analysis using hawthorn varieties with contrasting fruit texture, to investigate their expression specificity during fruit softening and varietal texture differentiation, and to screen for candidate *PG* genes related to hawthorn fruit firmness. The findings will provide a theoretical foundation for deciphering the regulatory mechanisms of hawthorn fruit texture and offer candidate gene resources for future molecular design breeding to improve hawthorn fruit quality.［**Method**］Based on hawthorn genomic data, *PG* gene family members were identified, and their physicochemical properties, subcellular localization, phylogeny, gene structure, conserved Motifs, cis-acting elements in promoters, and transcription factor binding sites were analyzed. The chromosomal distribution, gene duplication types, selective pressure, and interspecies collinearity were also resolved. The fruit firmness and pectin content of ‘Jinruyi’ and ‘Yubeihong’ during fruit development were measured. *CpPG* expression patterns were analyzed by qRT-PCR, and correlation analysis between gene expression levels and phenotypic data was performed.［**Result**］(1) In the hawthorn genome, a total of 68 *CpPG* genes were identified. Their physicochemical properties varied considerably, and approximately 44% of the *CpPG* proteins were predicted to be localized in the nucleus. (2) Phylogenetic analysis divided them into six subfamilies. The gene structure of members within each subfamily was relatively conserved, and all *CpPG* contained the Glyco_hydro_28 catalytic domain and five conserved Motifs. (3)Analysis of cis-acting elements in the promoters revealed that the promoter regions of *CpPG* are enriched in hormone-responsive and low-temperature-responsive elements. (4) Gene duplication analysis indicated that whole-genome duplication and dispersed duplication are the main modes of *CpPG* family expansion, and purifying selection is the major driving force for its evolutionary conservation. (5) In the two varieties with contrasting fruit firmness, ‘Jinruyi’ and ‘Yubeihong’, fruit firmness gradually decreased during fruit softening. Total pectin content showed a trend of first increasing and then decreasing, while water-soluble pectin content continuously increased with ripening. (6) qRT-PCR results showed that *CpPG*4 was specifically highly expressed in the G1 group during the late stages of fruit development, and its expression level in ‘Jinruyi’ was extremely significantly higher than that in ‘Yubeihong’. (7) Only the expression level of *CpPG*4 was extremely significantly negatively correlated with fruit firmness and extremely significantly positively correlated with water-soluble pectin content, indicating that this gene functions in the regulation of fruit softening and texture divergence among hawthorn varieties.［**Conclusion**］A total of 68 *CpPG* genes were identified in the hawthorn genome. Their promoters are generally enriched in low-temperature-and hormone-responsive elements. The family expansion mainly relies on dispersed duplication and whole-genome duplication, and purifying selection maintains its evolutionary conservation. *CpPG*4 drives fruit softening by promoting pectin solubilization, and its differential expression between varieties is a key molecular basis for fruit texture differentiation. This study provides a theoretical basis for deciphering the molecular mechanism of fruit texture formation in hawthorn and offers key gene resources for improving fruit firmness through molecular breeding.

Key words: *Crataegus pinnatifida*; polygalacturonase (PG); gene family; fruit texture; softening mechanism; expression pattern; molecular breeding

山楂（*Crataegus pinnatifida*）是我国重要的药食同源经济树种，其果实富含黄酮、多酚等生物活性成分，具有消食化积、调节血脂等多种功能，广泛应用于中药制剂与健康食品领域[1]。随着市场需求的持续增长，对山楂鲜食品质及加工适用性的要求也不断提高。果实质地是决定其鲜食风味与加工品质的核心性状，直接影响其在鲜食和罐头等深加工产品中的适用性。研究[2]表明，不同质地类型的山楂果实在软化机制上存在显著差异。因此，从分子层面解析山楂果实质地形成与软化的调控机制，对提升果实品质和拓展加工利用途径具有重要的科学价值。

果实成熟软化是一个由多基因网络协同调控

的复杂生物学过程，中间伴随着色泽转变、质地软化及风味物质合成等一系列生理代谢变化[3]。研究[4−5]表明，山楂果实的软化与多聚半乳糖醛酸酶（polygalacturonase，PG）、果胶甲酯酶（pectin methylesterase，PME）等多种细胞壁降解酶的活性动态密切相关。其中，PG 是降解细胞壁果胶、调控果实软化的核心酶，其通过特异性水解果胶多糖的 α-1,4-糖苷键，破坏细胞壁结构，从而在软化过程中削弱细胞间粘连，导致机械强度下降[6−7]。除参与果实软化外，PG 介导的细胞壁重塑还广泛参与器官脱落、花粉管生长及豆荚开裂等多种生理过程[8]。

PG 基因家族的功能与质地性状之间的关联已在多种果树的不同种质资源中得到广泛验证。例如，Gu 等[9]以桃（*Amygdalus persica*）为模式树种，通过对粘核/离核、硬肉/软肉等不同质地的种质进行比较基因组学分析，发现一个编码内切多聚半乳糖醛酸酶的基因簇存在拷贝数变异；该变异直接影响了 *PG* 在果实成熟期的表达量，进而调控中胶层和细胞壁的降解速率，最终导致果肉软化速率以及核肉分离难易度的显著分化，形成了不同种质间的表型差异。类似地，在苹果（*Malus domestica*）中，对不同品种的研究表明，*MdPG*1 基因的表达水平与果实软化速率密切相关，其功能复杂性也被深入揭示：Gunaseelan 等[10]发现该基因的组成型过表达不仅加速软化，还会影响果皮结构与采后失水。超表达与沉默等遗传操作手段为探究 *PG* 功能提供了最直接的证据。在草莓（*Fragaria* × *ananassa*）中，Zhao 等[11]发现沉默关键 *PG* 基因，能够显著提高果实硬度；Li 等[12]将红树莓（*Rubus idaeus*）*RiPG*2 基因在番茄中过表达，加速了番茄的软化进程，这种跨物种的功能验证也证实了 *PG* 功能的保守性。

尽管 PG 在果实软化中的核心功能已在多种蔷薇科（Rosaceae）果树中得到证实，但山楂果实质地的形成具有独特性，依赖于“果肉软化”和“种核硬化”的双重调控。其果肉的软化机制与其他果树一致，依赖于 PG、果胶甲酯酶（PME）等细胞壁水解酶的协同表达，逐步降解果胶与纤维素骨架。与其他果树相比，山楂的核心差异在于将“种核硬度”提升为与“果肉软化”同等重要的品质性状，而苹果、桃等果树的质地改良则几乎完全聚焦于果肉本身，缺乏对种子硬度的定向选择与调控。相较于上述果树，山楂果实质地形成的分子机制，特别是 *PG* 基因家族的系统研究明显滞后。目前，虽有个别研究关注山楂果实软化期间的 PG 酶活性变化，但在全基因组层面上的家族鉴定、成员表达模式分析及其与不同山楂种质质地性状的关联研究尚未见报道。因此，在全基因组水平上系统鉴定并功能解析山楂 *PG* 基因家族，特别是挖掘直接调控果实软化的关键 *PG* 成员，对于揭示山楂果实质地形成的遗传基础、推动耐储运且口感优良的新品种选育，具有重要的理论意义与应用价值。

本研究基于已获得的高质量基因组数据[13]，对山楂 *PG* 基因家族进行了全基因组鉴定，系统分析了其成员的蛋白质理化性质、系统进化关系、保守基序、基因结构、基因复制事件、启动子顺式作用元件，以揭示该家族成员间的进化与分化特征。在此基础上，依据课题组前期的种质资源调查结果，测定了质地较软的山楂品种‘金如意’（*Crataegus pinnatifida* var. *major* ‘Jinruyi’）和质地较硬的‘豫北红’（*Crataegus pinnatifida* var. *major* ‘Yubeihong’）在果实发育阶段的硬度与果胶含量变化，并结合 *PG* 基因的表达水平分析，对 *PG* 基因表达模式及果实发育过程中硬度、果胶含量动态变化的进行综合分析，以期挖掘调控山楂果实成熟软化的关键 *PG* 基因，为深入解析山楂果实成熟软化的分子机制提供理论依据与参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

实验用‘金如意’和‘豫北红’山楂无性系取自中国林业科学研究院孟州实验基地。两个品种均选取树龄一致（10 年生）、树势中庸、处于盛果期、生长健康、无病虫害的植株作为采样对象。于盛花期后 30 d（S1）、60 d（S2）、90 d（S3）、120 d（S4）和 150 d（S5）5 个关键发育时期进行采样。每个品种选取 3 株长势一致的植株，每株在树冠外围中上部随机采集 35 个大小均匀、无机械损伤的果实。果实采后立即带回实验室，15 个果实用于测定硬度，20 个果实用于测定总果胶含量和水溶性果胶含量，剩余果实去核后经液氮速冻，置于−80 ℃ 冰箱保存备用。此外，为进行后续基因表达分析，分别采集盛花期的幼嫩叶片、休眠期的饱满芽以及果实成熟期的种仁。其中，种仁取自上述盛花期后 150 d（S5）采集的成熟果实，剥离果核后获得。所有样品采集后立即置于液氮中速冻，转移至−80 ℃ 超低温冰箱保存备用。

1.2 研究方法

1.2.1 山楂 *CpPG* 基因家族成员鉴定

为系统鉴定山楂基因组中的 *PG* 基因家族成员，从蔷薇科基因组数据库（GDR，https://www.rosaceae.org/）下载了山楂（*Crataegus pinnatifida* var. *major* Genome v1.0）参考基因组序列和注释文件。利用 BLAST + 软件在山楂基因组中筛选出与拟南芥

（*Arabidopsis thaliana*）PG 蛋白序列相似的蛋白序列，将这些作为山楂半乳糖醛酸酶（CpPG）家族的候选序列。再通过 Pfam_scan 软件下载 PG 蛋白的保守结构域（PF00295），将其与候选序列进行对比，以确定最终的山楂 *CpPG* 基因家族成员，并根据在染色体上的位置进行命名。

1.2.2　蛋白质特性分析

为明确鉴定出的山楂 *CpPG* 基因家族成员的基本理化特征，使用在线分析软件 EXPASY（https://www.expasy.org/）对 CpPG 蛋白的理化特性（如氨基酸数量、分子量、疏水性等）进行分析。通过 WOLF PSORT（https://wolfpsort.hgc.jp/）软件进行亚细胞定位的预测。

1.2.3　系统发育树构建

为探究山楂 *CpPG* 家族成员的进化关系及其与近缘物种 PG 蛋白的分类归属，使用 MUSCLE（v5.1.0）软件对山楂、苹果、拟南芥和枇杷（*Eriobotrya japonica*）的 PG 蛋白序列进行多序列比对。为提高比对质量，采用 Trimal 软件（参数“-automated1”）对初始比对结果进行自动化修剪，以剔除低信息或错误比对的区域。基于修剪后的比对结果，利用 IQ-TREE（v2.4.0）软件构建最大似然系统发育树，并通过 UFboot2 超快自展法（1 000 次重复）评估节点置信度。最后，使用 R（v4.5.1）对系统发育树进行注释和可视化。

1.2.4　基因结构和 Motif 分析

为从基因结构层面验证系统发育树的划分是否合理，并揭示不同亚族 *CpPG* 的结构保守性，将所有已经鉴定的山楂 *CpPG* 家族成员的蛋白质序列提交至 MEME（v5.5.6）软件中进行保守基序的预测与分析。并根据山楂基因组的注释信息，获取每个 *CpPG* 基因的 CDS、UTR、内含子和外显子信息；通过 TBtools-II 将基因结构和基序组成可视化。

1.2.5　启动子顺式作用元件与转录因子结合位点分析

为探究 *CpPG* 转录调控的潜在机制，从基因组数据库中提取各 *CpPG* 基因转录起始位点上游 2 000 bp 的序列作为启动子区。利用植物顺式作用元件数据库（PlantCARE）对这些启动子序列进行扫描，预测并统计其中包含的各类顺式作用元件。同时，基于植物转录因子数据库（PlantTFDB），使用结合位点预测工具（FIMO）分析可能与该启动子区结合的转录因子及其具体结合位点。

1.2.6　染色体定位、基因复制和 Ka/Ks 分析

为明确 *CpPG* 在山楂基因组中的分布位置及其家族扩张的分子机制，根据山楂参考基因组的注释信息，获取山楂 *CpPG* 基因家族成员在染色体上的具体位置信息，并通过 TBtools-II 软件绘制染色体定位图。基于全基因组共线性分析，利用 MCScanX 软件包中的 duplicate_gene_classifier 程序，将 *CpPG* 家族成员区分为串联重复和片段重复等复制类型。为评估这些重复基因对所承受的进化选择压力，进一步选取由共线性确定的片段重复同源基因对。使用 ParaAT（v2.0）对这些基因对的编码序列进行比对，并通过其内置的 KaKs_Calculator 程序，采用 NG（Nei-Gojobori）模型计算每对基因的非同义替换率（Ka）与同义替换率（Ks）。计算 Ka/Ks 以推断选择模式，Ka/Ks < 1、≈ 1 或 > 1 分别指示纯化选择、中性进化或正选择。

1.2.7　物种间共线性分析

为阐明山楂 *CpPG* 家族基因在蔷薇科物种间的进化保守性，选取了苹果与枇杷这 2 个与山楂亲缘关系较近的物种进行跨物种共线性分析。首先，使用 OrthoFinder（v2.5.5）对上述 3 个物种的全基因组蛋白序列进行系统性的同源基因群聚类分析，以鉴定山楂 *CpPG* 基因在苹果和枇杷基因组中的同源基因。随后利用 JCVI（https://github.com/tanghaibao/jcvi）工具包中的可视化与比对功能，对包含这些直系同源基因对的基因组区域进行精细比对，进而绘制并分析山楂与苹果、山楂与枇杷之间的全基因组共线性图谱，以揭示 *PG* 基因家族在物种分化过程中的共线性关系。

1.2.8　果实硬度的测定

为获取用于后续与基因表达量进行关联分析的表型数据，在每个品种每个发育期各选取 15 个果皮完好、发育状态一致的果实，每个果实在赤道处正反面各测定 1 次。测定方法采用去皮穿刺法，在 TA.XT Plus 质构分析仪（Stable Micro Systems，UK）上进行。测试参数为 2 mm 直径圆柱形平头探头、30 kg 载荷传感器、测试速度 10 mm/s、触发力 25 g、穿刺深度 4 mm。力−位移曲线由 Texture Exponent 7.0 软件自动采集。

1.2.9　总果胶与水溶性果胶的测量

为明确果实软化过程中细胞壁成分的动态变化，采用咔唑比色法测定果实中的水溶性果胶及原果胶含量。步骤如下：称取一定质量（以鲜质量计）的果实样品，经热乙醇脱糖等前处理后，用蒸馏水沸水浴浸提水溶性果胶；而原果胶的测定则需将提取水溶性果胶后的残渣，用稀硫酸溶液加热水解，使其转化为可溶性成分。每种果胶的含量通过测定其水解产物半乳糖醛酸的含量来表示。分别取 2 种提取液，在浓硫酸条件下水解后与咔唑试剂进行显色反应，于 530 nm 波长下测定吸光度。使用半乳糖醛酸标准

品绘制标准曲线，根据吸光度值计算样品中果胶对应的半乳糖醛酸含量，分别计算其占比来表征水溶性果胶与原果胶的含量。总果胶含量为两者之和。每个样品设置 3 次重复，结果以平均值 ± 标准偏差表示。

1.2.10 山楂 *CpPG* 基因的表达模式分析

为筛选参与山楂果实软化的关键基因，参考本课题组前期转录组结果（未发表），选取特异表达的部分 *CpPG* 基因进行实时荧光定量 PCR（qPCR）分析。利用 Premier3.0 设计 qRT-PCR 特异性引物（表 1），内参基因为山楂的 *Actin* 基因[14]，由生工生物工程（上海）股份有限公司合成引物。使用 FastPure Universal Plant Total RNA Isolation Kit（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）提取果肉 RNA，使

表 1 所使用的引物

Tab. 1 Primer used in this study

基因名称	上游引物序列（5′—3′）	下游引物序列（5′—3′）
Actin	TGGTGAAGGCTGGATTTG	CTGTGAGCAGAACTGGGTG
*CpPG*2	CCTCCAACACGGAAGCGT	ACTCCCCGTCAGCCATCT
*CpPG*4	AGCTCCGGCCAAAACGAT	GCTTTTCTGTGGCACCGC
*CpPG*6	GCCTCAGGCTGTGACCTT	CCGGTGCAGTTACGGTGA
*CpPG*7	CTTGGGAGAAGGCGGCTC	TCCGGAGTCCACTGGAGG
*CpPG*9	GGTGGAGACTTTGCCGCT	CGAAAGCGGCGATCCAGA
*CpPG*18	TTTGCTGACAAGGGCGGT	CGTGAGGTGGCTGGTGAG
*CpPG*19	TTTCCAGGGGCCTTGCAG	CCGGGCACATTCGCAAAC
*CpPG*20	ATGGTGCAAAGCCTGGCT	GTCCCGCTCGGAACAACA
*CpPG*21	GCTGAGGCCGGAGTGTTT	GCACGCATCAGTCCAAGC
*CpPG*24	TTTGGCGCTGTCGGTGAT	TCCCCGGTGGCACATAGA
*CpPG*25	CCAAAAGTGGTGGGCCCT	GCAGGGCTGTCACATGGT
*CpPG*27	TGGGTTTCCGGAACAGGC	ACCCTGCGCCGTTACAAA
*CpPG*28	CCGGCATTGGAGGCAGAA	GAGTTGGAGACGGTGCCC
*CpPG*30	GCTGCTGGCCGTGAGTAA	GTGCGGCCTTGGCTCTAA
*CpPG*31	ATGGGTGTCACTTGCGGG	TGCGTTGCGGACTGTGAT
*CpPG*32	GCGCAAGGCTTCGGGTAT	CAGAGCTCCGTGTGCACA
*CpPG*33	ATGAGCGTCTCGTCCCCT	TACCGCAAGCAAGGGTGG
*CpPG*38	GCTTGTGGCCCTGGTCAT	AAACCACTACCGCCCTGC
*CpPG*41	AGTTCGACGCCTGCACAA	TGGCGGAAATGACAGCGT
*CpPG*42	GGACAGCCGGCATTGGAT	CATTTGGTGCGGTCGTGC
*CpPG*43	TCCTACGGACGGCCATCA	CGCCTTGAGCTCCACACA
*CpPG*44	ATGCCGTGTTCTCTGGGC	AGGCATCGGCGTTTCCAA
*CpPG*45	AAGCCCCAACACAGACGG	GTGCCGGGACCGATTGAT
*CpPG*46	CCTCCTCCTCGGAACCGA	TGAGGTCGCGAGAGGTGA
*CpPG*48	TTGATGGGCAAGGCTCCG	GTGCCAAGCAGGGGAGTT
*CpPG*49	GCGGCCGTTGGTCATCTA	AAGCTTCCGGTGAGCCAC
*CpPG*51	AAAGAGCAGCGGGGGTTC	CACCTTGCAAGCTGCTGC
*CpPG*58	CACCTCCTTGCTCTCCGC	GCCATCTTAAACGCCGCG
*CpPG*59	GGTGGACGTGCTTCTGCT	CCATCTCCAACAGCGCCA
*CpPG*60	GGGCGTGAAGAACTCCCC	GCTGACGTCCGAGCACTT
*CpPG*61	GCAGCTGAGTTGGAGGGG	TCCCGGCAACATCAGTGC
*CpPG*62	GGGATTCCTGGCGATCCG	ATGGCTGAGGAACCACGC
*CpPG*63	TGGCTGCTCGGTTGGAAG	CACCGCCAGTCCAATCGT
*CpPG*64	GCGACCATCACACTGGCT	GCTCGGGCAACAAATCGC
*CpPG*65	GGTTCTGAAGGCGGGCTT	TGATGATCCCGGCCATGC
*CpPG*66	AGCGGAGGGTGATGGAGA	GGCACCACCAGAACAGCT
*CpPG*67	AAGCCGTGCAAGGATGCC	GGTGATGCTGGAGTTGAC
*CpPG*68	ACGAAGAGCCCGTGGTTG	CTGGAGAACCCGGCCATG

用 PrimeScript™ RT Master Mix（Perfect Real Time）（Takara）进行逆转录，使用 TB Green® Premix Ex Taq™（Tli RNaseH Plus）（Takara）和 LightCycler® 480 Instrument II 仪器进行 qRT-PCR 验证。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。为分析 *CpPG* 在果实发育过程中的表达模式，基于 qRT-PCR 获得的相对表达量数据，使用 R 语言（pheatmap 包）进行层次聚类分析，将基因划分为不同的表达趋势组。

1.2.11　关键 *CpPG* 基因的筛选与验证

为找到与果实软化表型最相关的基因，将各基因在‘金如意’和‘豫北红’不同发育时期的相对表达量与对应样品的果实硬度、水溶性果胶含量进行 Pearson 相关性分析。以相关系数 $|r| > 0.7$ 且 $P < 0.05$ 作为显著相关的阈值，筛选与果实软化表型高度相关的候选基因。

为验证候选基因 *CpPG*4 的功能特异性，进一步检测其在不同组织中的表达水平。以采集到的‘金如意’和‘豫北红’两个品种的叶片、芽、种仁为材料。采用上述相同的 RNA 提取、逆转录及 qRT-PCR 方法（引物同表 1），以 *Actin* 为内参，计算 *CpPG*4 在各组织中的相对表达量。

1.3　数据统计

所有实验均设置 3 次生物学重复，结果以平均值 ± 标准差表示。使用 SPSS 软件进行数据处理与分析。两组数据间的比较采用独立样本 *t* 检验；多组数据间的比较采用单因素方差分析，并采用 HSD 法进行事后多重比较，以 $P < 0.05$ 作为差异水平具有统计学意义的阈值。

2　结果与分析

2.1　山楂 *PG* 基因家族成员鉴定、理化性质分析与亚细胞定位分析

以拟南芥 PG 蛋白为查询序列，利用 BLAST + 在山楂基因组中鉴定出 68 个 *PG* 基因。根据染色体位置分布，68 个 *CpPG* 基因依次命名为 *CpPG*1 ~ *CpPG*68，理化性质如表 2 所示。氨基酸数量为 157（*CpPG*3）~ 831 aa（*CpPG*27），分子量为 17.06（*CpPG*3）~ 90.51 kDa（*CpPG*27），疏水性为−0.680（*CpPG*33）~ 0.229（*CpPG*29），理论等电点为 4.372（*CpPG*32）~ 10.476（*CpPG*33），不稳定系数为 27.79

表 2　山楂 *PG* 基因家族成员的理化性质

Tab. 2　Physicochemical properties of *PG* gene family of hawthorn

基因名称	氨基酸数量/aa	分子量/kDa	疏水性	等电点	不稳定系数	亚细胞定位
*CpPG*1	578	64.76	−0.403	7.210	48.09	叶绿体
*CpPG*2	483	52.77	−0.142	8.033	43.98	细胞质
*CpPG*3	157	17.06	0.079	5.851	25.55	细胞质
*CpPG*4	460	49.89	−0.166	8.372	35.95	细胞核
*CpPG*5	300	32.46	−0.325	9.706	52.86	叶绿体
*CpPG*6	286	31.53	−0.188	8.571	39.53	叶绿体
*CpPG*7	396	42.93	−0.242	7.672	33.14	细胞核
*CpPG*8	400	44.07	−0.239	8.824	28.83	细胞质
*CpPG*9	491	55.09	−0.189	8.634	43.33	叶绿体
*CpPG*10	398	41.36	0.086	8.720	30.43	细胞核
*CpPG*11	397	42.67	0.023	10.021	32.47	细胞核
*CpPG*12	432	46.16	−0.015	9.268	35.97	细胞外
*CpPG*13	404	43.61	−0.096	6.495	32.40	细胞核
*CpPG*14	735	78.79	−0.243	5.881	68.43	细胞核
*CpPG*15	382	41.11	−0.204	6.026	35.91	细胞核
*CpPG*16	407	43.95	−0.281	4.945	33.90	液泡
*CpPG*17	484	51.01	−0.251	6.593	37.98	细胞核
*CpPG*18	454	49.54	−0.041	5.206	35.77	液泡
*CpPG*19	473	50.92	−0.176	6.984	34.64	液泡
*CpPG*20	328	34.77	−0.027	7.620	30.52	细胞外
*CpPG*21	399	42.29	−0.033	7.320	34.07	细胞核
*CpPG*22	285	30.71	−0.178	7.942	30.44	细胞核
*CpPG*23	427	45.33	−0.056	8.215	31.44	叶绿体

表 2(续)

Tab.2 (continued)

基因名称	氨基酸数量/aa	分子量/kDa	疏水性	等电点	不稳定系数	亚细胞定位
*CpPG*24	456	49.10	0.020	5.049	43.44	细胞质
*CpPG*25	346	37.45	−0.301	8.267	44.29	细胞核
*CpPG*26	271	29.60	−0.209	7.689	50.53	细胞核
*CpPG*27	831	90.51	−0.023	4.873	26.97	细胞质
*CpPG*28	388	41.79	−0.372	9.772	48.55	叶绿体
*CpPG*29	170	17.65	0.229	8.268	34.56	叶绿体
*CpPG*30	454	49.15	0.050	4.866	46.75	细胞质
*CpPG*31	280	29.99	0.028	5.239	40.23	细胞核
*CpPG*32	324	35.24	−0.122	4.372	29.27	细胞核
*CpPG*33	277	29.84	−0.680	10.476	53.47	细胞核
*CpPG*34	173	18.98	−0.208	4.907	39.72	细胞外
*CpPG*35	399	42.69	−0.116	8.482	31.54	细胞外
*CpPG*36	273	30.20	−0.341	7.819	68.48	细胞核
*CpPG*37	273	30.22	−0.347	7.819	68.48	细胞核
*CpPG*38	462	49.81	−0.046	7.923	43.96	细胞核
*CpPG*39	400	42.12	−0.150	8.345	35.70	细胞核
*CpPG*40	405	44.48	−0.116	9.368	30.95	细胞质
*CpPG*41	269	28.66	−0.064	7.875	37.54	叶绿体
*CpPG*42	371	40.02	−0.300	5.238	34.99	细胞核
*CpPG*43	491	55.06	−0.205	9.174	42.69	细胞质
*CpPG*44	398	41.06	0.095	6.596	29.06	细胞核
*CpPG*45	281	29.64	0.052	9.545	31.38	叶绿体
*CpPG*46	542	59.18	−0.227	6.234	41.41	叶绿体
*CpPG*47	332	34.80	−0.351	9.827	35.39	叶绿体
*CpPG*48	453	49.59	−0.040	6.386	38.26	叶绿体
*CpPG*49	475	51.74	−0.082	6.830	37.07	叶绿体
*CpPG*50	507	55.67	−0.343	8.646	34.07	细胞核
*CpPG*51	490	52.19	−0.229	8.014	39.71	细胞外
*CpPG*52	188	20.01	−0.213	7.218	34.39	叶绿体
*CpPG*53	227	24.15	−0.211	9.465	34.03	细胞外
*CpPG*54	400	42.61	−0.186	6.687	31.63	细胞核
*CpPG*55	400	42.88	−0.171	8.852	24.79	细胞核
*CpPG*56	400	42.61	−0.186	6.687	31.63	细胞核
*CpPG*57	320	34.29	−0.263	6.296	36.50	细胞核
*CpPG*58	510	55.68	−0.385	6.775	60.67	细胞核
*CpPG*59	479	52.25	−0.139	6.087	40.39	叶绿体
*CpPG*60	443	48.13	−0.056	7.790	38.38	叶绿体
*CpPG*61	362	39.75	−0.157	4.607	42.71	细胞质
*CpPG*62	485	53.09	−0.170	4.967	40.47	细胞质
*CpPG*63	480	52.68	−0.100	7.234	36.32	液泡
*CpPG*64	471	51.07	−0.020	5.968	34.30	叶绿体
*CpPG*65	316	35.60	−0.287	6.385	44.07	细胞核
*CpPG*66	390	42.77	−0.082	5.795	36.84	细胞外
*CpPG*67	425	46.21	−0.102	7.998	29.97	细胞核
*CpPG*68	298	31.91	0.019	7.895	28.90	细胞核

（*CpPG*55）～68.48（*CpPG*36）。亚细胞预测结果表明，CpPG 家族蛋白主要定位于细胞核（30）和叶绿体（17），剩下部分定位在细胞质（10）、细胞外（7）和液泡（4）。表明不同 *CpPG* 基因家族成员之间的功能可能存在差异。

2.2　*CpPG* 基因家族进化树分析

图 1 显示，4 个物种的 281 个 PG 蛋白被分为 6 个亚族（A1 ～ A4，B 和 C）。在 A1、A4、B 和 C 亚族中，山楂、枇杷和苹果 3 个物种的基因数量大致相同，且 A1 亚族（21 个、19 个和 19 个）和 A4 亚族中（22 个、18 个和 21 个）的基因数量最多，说明这 2 个亚族可能是 *CpPG* 基因家族的“核心亚族”；其次是 B 亚族（14 个、15 个和 16 个），占 21.23%；而 C 亚族的基因数量最少，均为 1 个，可能代表一类高度特化的 *PG* 基因。A2 亚族中，苹果和枇杷的基因数量大致相同（9 个和 12 个），都多于山楂（5 个）；A3 亚族中，山楂和苹果的基因数量大致相同（5 个和 6 个），都小于枇杷（9 个）。这一差异暗示 A2 和 A3 亚族的 PG 蛋白可能参与了物种特异性的适应性进化过程。

2.3　*CpPG* 基因结构及保守基序分析

山楂 *CpPG* 基因的结构如图 2a 所示，*CpPG*21、*CpPG*22 和 *CpPG*35 的外显子数量最少（1 个），且都属于 A4 亚族；*CpPG*50 的外显子数量最多（11 个），属于 A1 亚族。同一亚族的基因成员之间存在相似的基因结构，这种亚族内结构保守、亚族间结构分化的模式，在基因结构层面为系统进化树的亚族划分提供了依据。例如 B 亚族成员的外显子数量为 5 ～ 6 个，A4 亚族成员的数量主要为 3 ～ 5 个，A1 亚族成员外显子数量主要为 7 ～ 9 个。图 2b 显示：所有 *CpPG* 基因都包含 1 个共同的结构域 Glyco_hydro_28，推测其为 PG 蛋白的催化核心结构域；2 个 *CpPG* 基因（*CpPG*24 和 *CpPG*18）包含结构域 Pectate_lyase_3，1 个 *CpPG* 基因（*CpPG*27）同时包含结构域 PPR 和 PPR_2，1 个 *CpPG* 基因（*CpPG*46）包含结构域 tRNA_anti-codon，这些携带额外结构域的基因可能具有不同于典型 PG 蛋白的多样化功能。

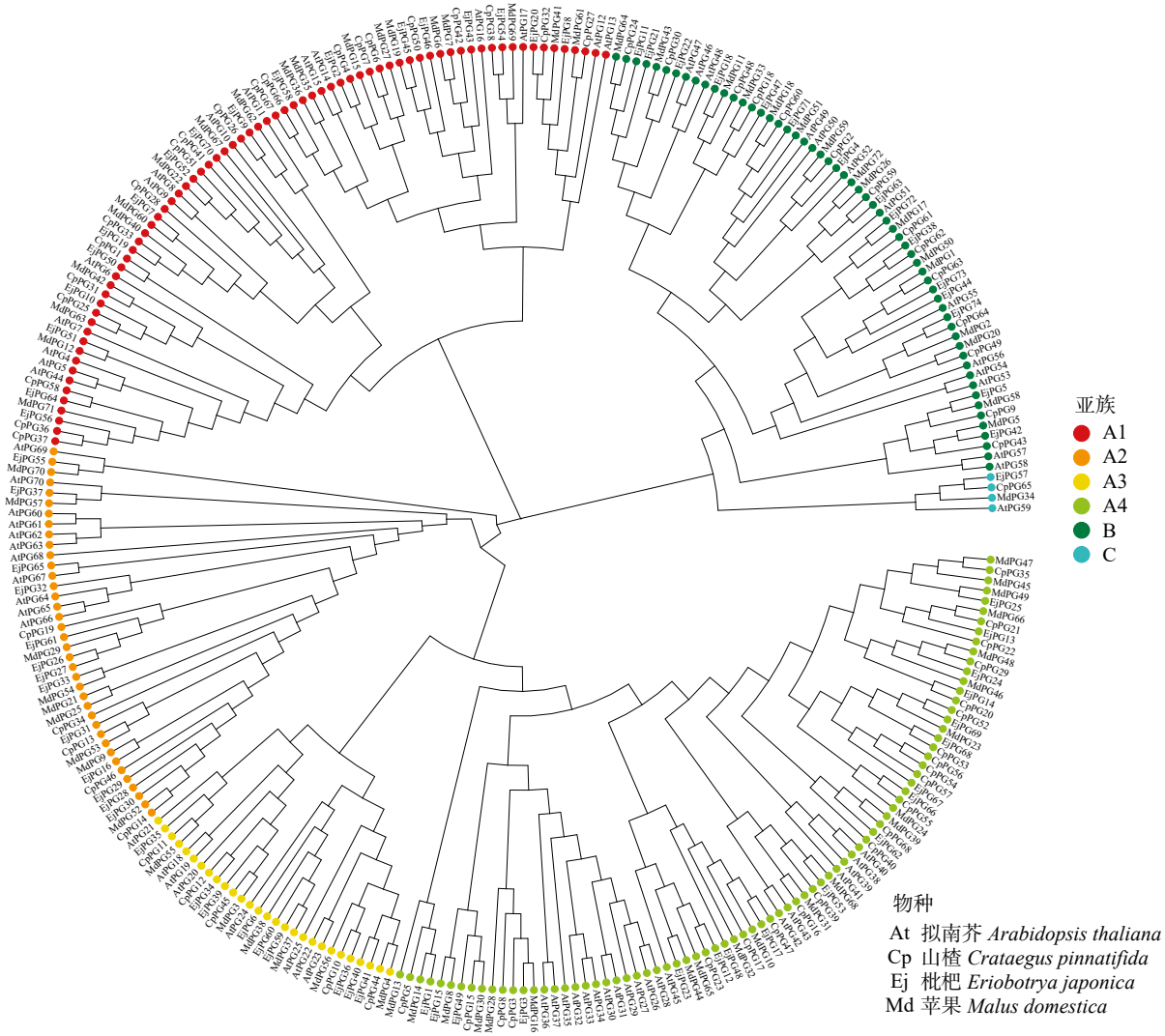


图 1　山楂、苹果和枇杷 PG 基因的系统进化树

Fig. 1　Phylogenetic tree of the PG genes in hawthorn, apple and loquat

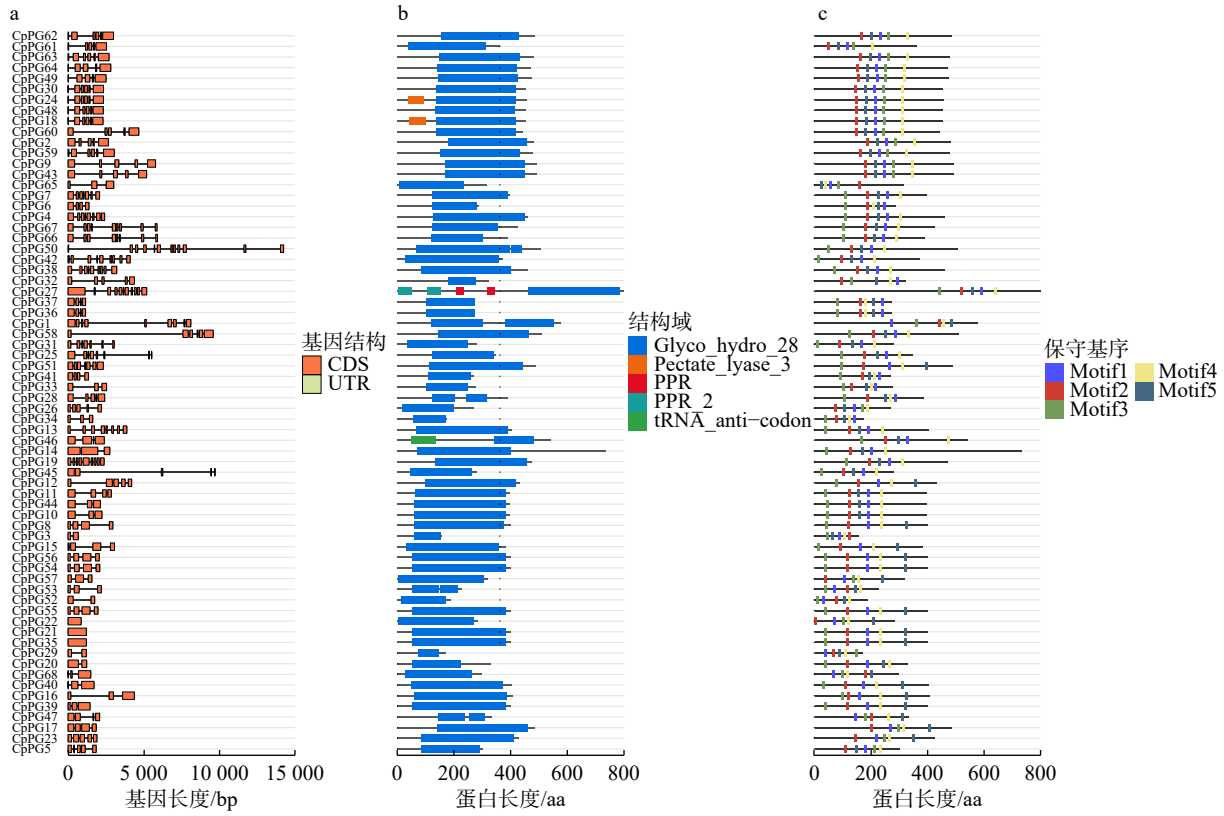


图 2 *CpPG* 的基因结构(a)、结构域(b)和保守基序(c)分析

Fig. 2 Gene structure (a), domain (b) and conserved motifs (c) analysis of *CpPG*

在山楂基因组中一共鉴定出 5 个保守基序，并且每个 *CpPG* 基因中都存在 5 个 Motif(图 2c)。不同亚族之间基序的排列顺序存在差异，例如 B 亚族 N 端为 Motif2，C 端为 Motif4，A1 亚族 N 端为 Motif3，C 端为 Motif4，A4 亚族 N 端为 Motif3，C 端为 Motif5。这种亚族特异的 Motif 排列模式，可能与不同亚族对底物识别或催化效率的差异有关。

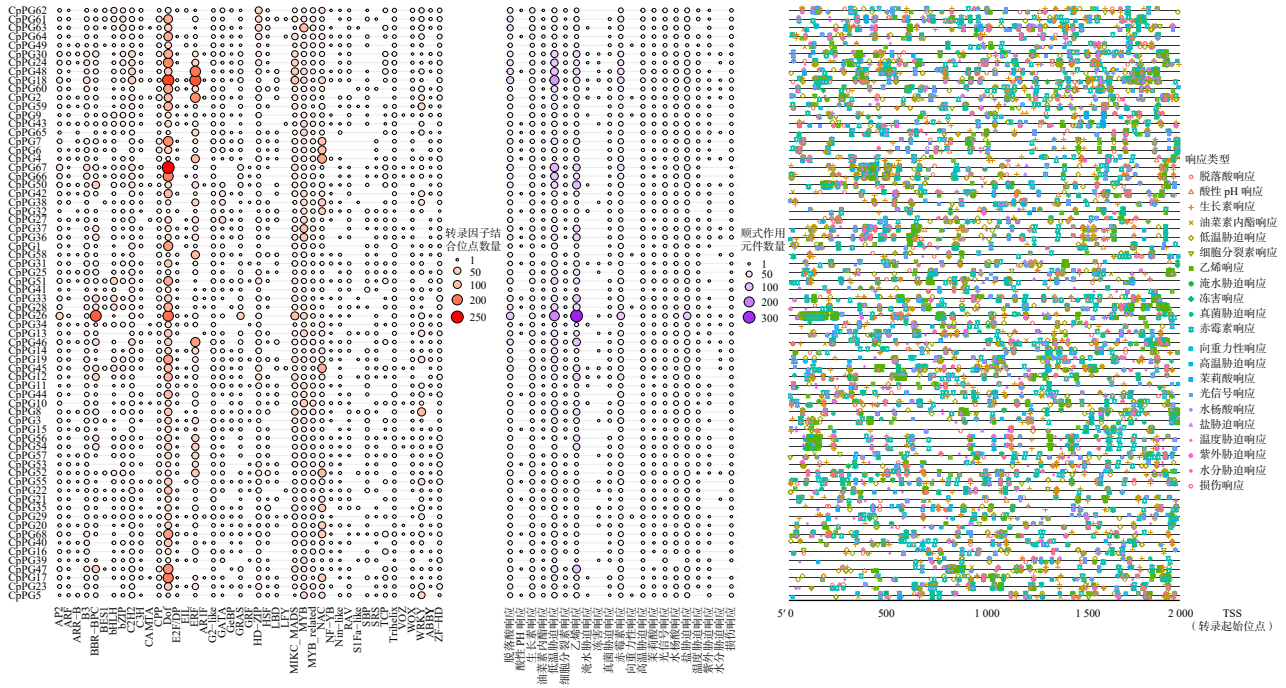
2.4 *CpPG* 基因启动子转录因子结合位点与顺式作用元件分析

本研究选择山楂 *CpPG* 基因上游 2 000 bp 的区域作为启动子进行分析。如图 3a 所示，在山楂 *PG* 基因家族 68 个成员的启动子区域中，共鉴定到来自 18 个转录因子家族的 9 079 个潜在结合位点。其中，Dof、BBR-BPC、B3 和 AP2 家族的结合位点数量最为丰富，分别占总数的 45.54%、16.1%、8.46%、8.23%，合计占比达 78.33%，表明 *CpPG* 基因的表达可能主要受到与发育、激素信号及应激响应相关通路的协同调控。*CpPG* 基因的顺式作用元件的分析结果(图 3b、c)显示，全部 68 个 *CpPG* 均含有非生物胁迫响应相关元件和植物激素响应相关元件，这些元件与山楂的生长发育密切相关。在各类元件中，低温响应元件的数量最为丰富，共检测到 2 966 个；其次是乙烯响应元件(2 591 个)、脱落酸响应元件(1 986 个)和赤霉素响应元件(1 715 个)。值得注意的是，全部 68 个 *CpPG* 的启动子区域均含有低温响应以及乙烯、脱落酸、赤霉素的响应元件，表明低温信号对 *PG* 基因的调控具有普遍重要性，而乙烯、脱落酸和赤霉素可能广泛参与调控该基因家族的转录，进而影响果实的发育与软化进程。不同 *CpPG* 成员间启动子区域中的顺式作用元件的数目存在差异。其中，*CpPG*26 含有的元件数目最多，共 865 个，而 *CpPG*41 含有的数目最少，仅有 65 个，这表明不同山楂 *CpPG* 基因可能受到不同的转录调控，其表达模式与功能分化可能与此密切相关。

2.5 染色体定位、基因复制与 Ka/Ks 分析

染色体定位分析发现：68 个 *CpPG* 基因不均匀地分布在 16 条染色体上，除 10 号染色体外都存在 *PG* 基因成员；其中第 6 和 13 号染色体上的基因数量最多，各含有 9 个；而第 15 号染色体上的基因数量最少，仅含有 1 个(图 4a)。

基因复制是驱动基因家族扩张和功能多样化的关键机制，主要包括串联复制(TD)、分散复制(DSD)、转座复制(TRD)、近端复制(PD)以及全基因组复制(WGD)。本研究利用 DupGen_finder 软件，在山楂 *PG* 基因中发现存在 111 对共线性关系。其中，分散复制产生的基因对数量最多(58 对)，其次为全基因组复制(42 对)，而转座复制在山楂基因组中未被检测到(图 4b)。这表明分散复制和全基因组



a 转录因子结合位点数量　　b 顺式作用元件数量　　c 顺式作用元件分布

图 3　山楂 *PG* 基因转录因子结合位点分析与启动子顺式作用元件分析

Fig. 3　Analysis of transcription factor binding sites and cis-acting elements in hawthorn *PG* gene promoters

复制是导致山楂 PG 基因家族扩张的主要模式。此外，在 111 对同源基因中，只有 4 对的 Ka/Ks 值大于 1，剩下 107 对（约 96.4%）均小于 1（图 4c），说明该基因家族在进化过程中主要受到纯化选择作用。

2.6　物种间共线性分析

通过分析山楂、枇杷与苹果之间的种间共线性关系，发现在 *PG* 基因家族中，山楂与苹果之间存在 65 对同源基因，而与枇杷之间存在 60 对同源基因（图 5）。表明山楂与苹果在 *PG* 基因家族的进化上可能具有更近的亲缘关系。同时，两个组合均能检测到大量同源基因对，说明 *PG* 基因家族在蔷薇科物种间整体较为保守。

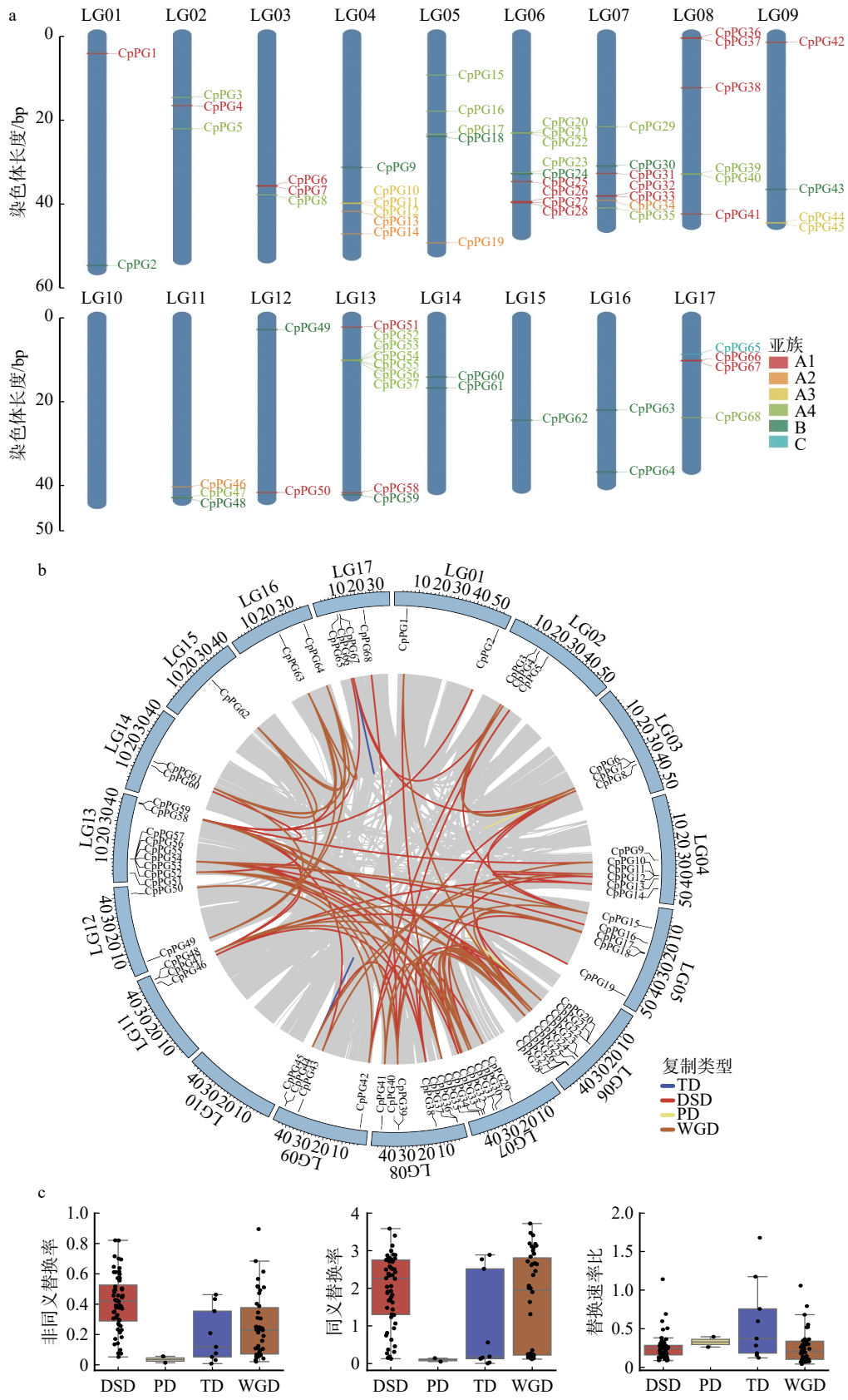
2.7　不同发育时期果实硬度、总果胶和水溶性果胶含量的变化

果实硬度在发育早期（S1、S2 和 S3）的硬度缓慢降低，在 S4 和 S5 时期则快速降低，其中‘豫北红’从 S1 期的 43.94 N/cm^2 下降至 S5 期的 30.46 N/cm^2，‘金如意’从 41.25 N/cm^2 下降至 26.54 N/cm^2，且‘金如意’在各阶段硬度均显著低于‘豫北红’（图 6）。上述结果表明，‘金如意’果实硬度更低、软化更迅速，而‘豫北红’相对更硬、软化较缓，二者为解析果实软化的分子调控机制提供了理想的对比材料。总果胶含量在两品种中均呈现先升高后降低的趋势，均在 S4 时期达到最高（‘豫北红’3.90%，‘金如意’3.80%），至 S5 期则开始回落。水溶性果胶含量则随成熟度持续上升，‘金如意’从 0.13% 增至 1.05%，‘豫北红’从 S1 的 0.12% 增至 S5 的 0.95%，表明果实成熟过程中原果胶不断转化为水溶性果胶。

2.8　*CpPG* 表达模式分析

基于 qRT-PCR 的 *PG* 基因家族表达谱分析表明，该家族成员在山楂品种‘金如意’与‘豫北红’的果实发育过程中，呈现出丰富的动态变化与显著的品种间差异（图 7）。例如，*CpPG*4 的表达量随着发育阶段逐渐升高，并且其在‘金如意’中的表达量显著高于‘豫北红’，暗示其在果实成熟软化过程中可能扮演关键角色。与之相反，*CpPG*58 在‘金如意’中不表达，在‘豫北红’中却在 S5 时期高表达。*CpPG*25 在‘豫北红’中的表达量均显著高于‘金如意’，显示了稳定的品种特异性表达模式。此外，如 *CpPG*18 和 *CpPG*2 等基因，在不同阶段均有表达。这些差异表达基因可能是两个品种果实质地形成与变化的潜在分子基础。

为从整体角度进一步揭示 *CpPG* 的功能分化趋势，对 qPR-PCR 结果进行了聚类分析，其表达模式可以分为 5 组（图 8）：*CpPG*4 归属的 G1 组表现为在发育早期表达量极低，随着果实发育在后期高表达，可能与果实成熟软化密切相关。G2 组属于在发育早期高表达，在 S5 时期表达量达到最低，可能参与幼果期细胞壁构建或早期发育调控。G3 组表现在果实前中期高表达，发育后期低表达，可能参与果实膨大期的细胞壁代谢，而在成熟软化阶段被抑制。G4 组基因在‘金如意’和‘豫北红’中存在相反的表达模式，在‘金如意’中属于前期高表达，后期低表达，在‘豫北红’中则前期低表达，后期高表达，这可能是导致两个品种果实质地差异的重要候选基因。G5 组属于在



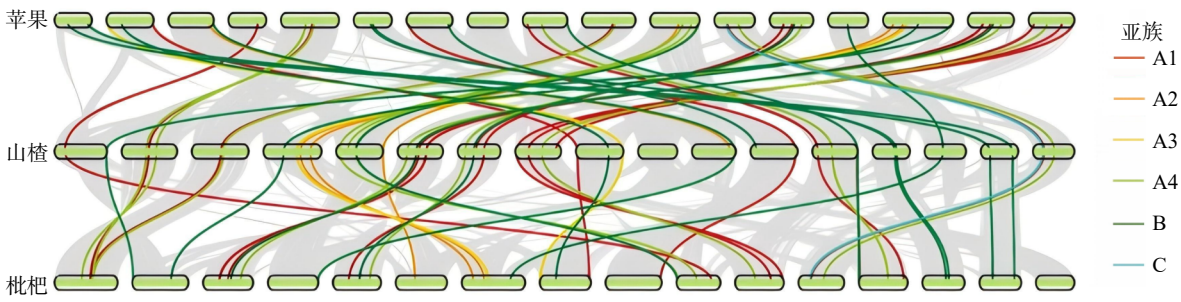
TD 表示串联复制；DSD 表示分散复制；PD 表示近端复制；WGD 表示全基因组复制。

图 4 山楂 *PG* 基因家族染色体定位(a)、基因复制(b)与 Ka/Ks 分析(c)

Fig. 4 Chromosomes location (a), gene duplication (b), and Ka/Ks analysis (c) of the hawthorn *PG* gene family

‘金如意’特异性表达，可能赋予‘金如意’独特的质地特性。

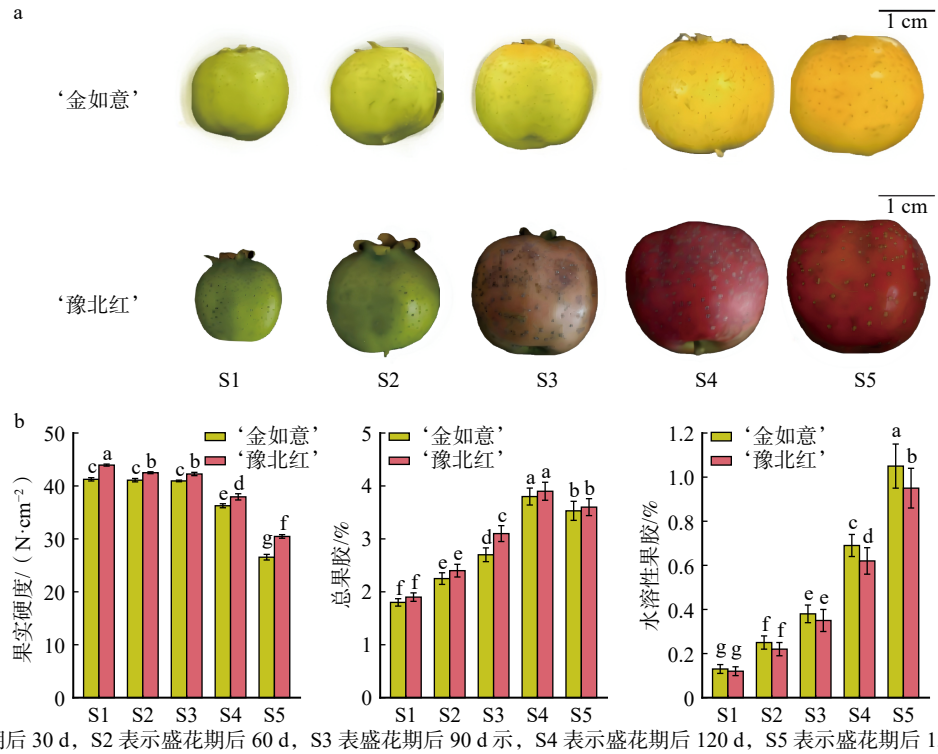
综合表达谱和聚类分析结果发现，*CpPG4* 是 G1 组中品种间表达差异最显著的基因，且其表达模式与果实软化进程高度吻合，推测其为调控果实软化的首要候选基因。



嫩黄绿色圆形矩形表示不同物种的染色体。灰色线条表示全基因组共线区，不同颜色的线条连接属于目标基因家族同一亚族的共线基因对。

图 5　山楂、枇杷与苹果的 *PG* 基因种间共线性分析

Fig. 5　Cross-species synteny analysis of *PG* genes in hawthorn, apple and loquat



S1 表示盛花期后 30 d，S2 表示盛花期后 60 d，S3 表盛花期后 90 d 示，S4 表示盛花期后 120 d，S5 表示盛花期后 150 d，不同字母表示在 $p < 0.05$ 水平上存在显著性差异。下同。

图 6　‘金如意’和‘豫北红’不同发育阶段的果实图片（a）与果实硬度、总果胶和水溶性果胶含量（b）

Fig. 6　Fruit picture (a) and fruit firmness, pectin and water soluble total pectin content (b) at different developmental stages of ‘Jinruyi’ and ‘Yubeihong’

2.9　关键 *CpPG* 基因的筛选与组织特异性验证

为从表达层面筛选调控果实软化的关键 *CpPG* 基因，将所有 *CpPG* 的表达量与果实硬度和水溶性果胶含量进行了相关性分析（图 9），发现在所有基因中，只有 *CpPG4* 的表达量与果实硬度呈极显著负相关（$r = -0.88$，$P < 0.001$），而与水溶性果胶含量呈极显著正相关（$r = 0.97$，$P < 0.001$）。相比之下，*CpPG58* 的表达量与果实硬度亦呈显著负相关（$r = -0.69$，$P < 0.05$），但与水溶性果胶含量的相关性未达显著水平（$r = 0.48$，$P > 0.05$），说明 *CpPG4* 基因可能通过促进果胶溶解，在果实软化过程中发挥关键作用。此外，果实硬度与水溶性果胶含量之间也存在显著负相关（$r = -0.91$，$P < 0.001$），进一步支持了果胶代谢与果实软化过程的紧密联系。

基于上述结果，*CpPG4* 被初步确定为与果实软化表型高度相关的关键候选基因。为了进一步验证 *CpPG4* 的功能特异性，通过 qRT-PCR 检测了该基因在不同组织中的表达水平。结果（图 10）显示：该基因在叶片中不表达；在种仁中，‘金如意’的表达量显著高于‘豫北红’；而在芽中，‘金如意’的表达量则显著低于‘豫北红’。这表明 *CpPG4* 的表达具有明显的组织特异性和品种特异性。

3　讨　　论

多聚半乳糖醛酸酶（PG）作为降解细胞壁果胶的关键酶，对果实的质地差异具有重要的影响。目前



*、**、*** 分别表示 $P < 0.05$、$P < 0.01$、$P < 0.001$ 水平上两品种间基因表达量差异显著。

图 7 *CpPG* 基因表达的 qRT-PCR 分析

Fig. 7 Expression analysis of *CpPG* by qRT-PCR

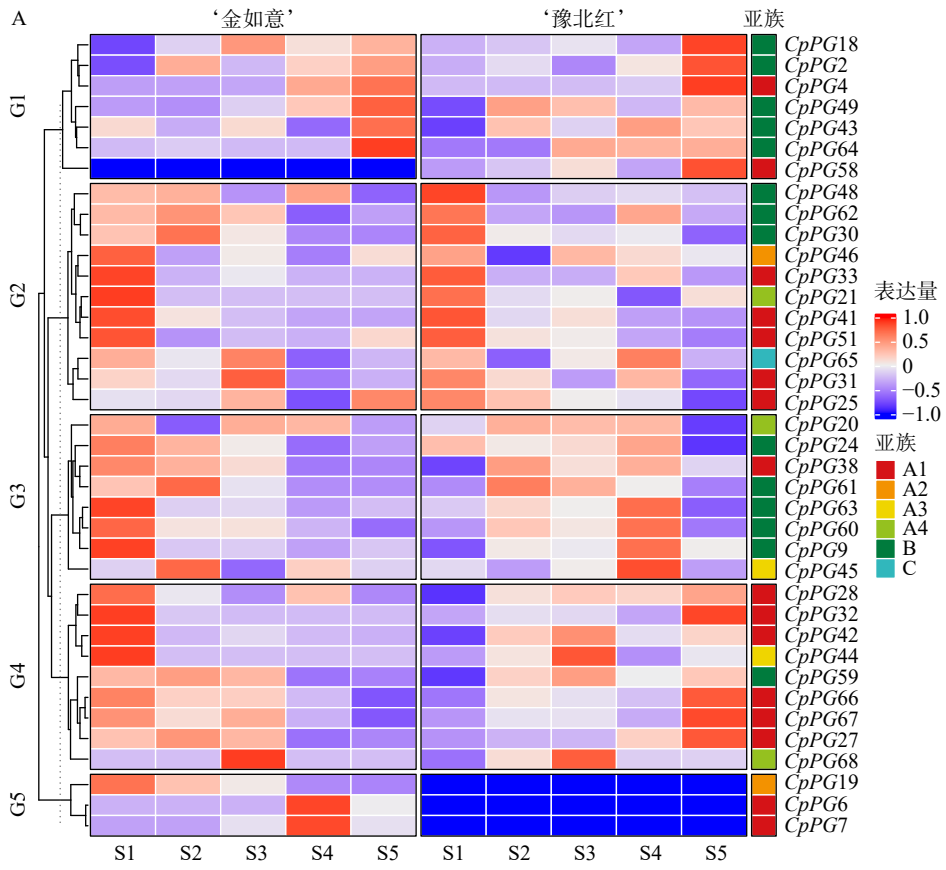


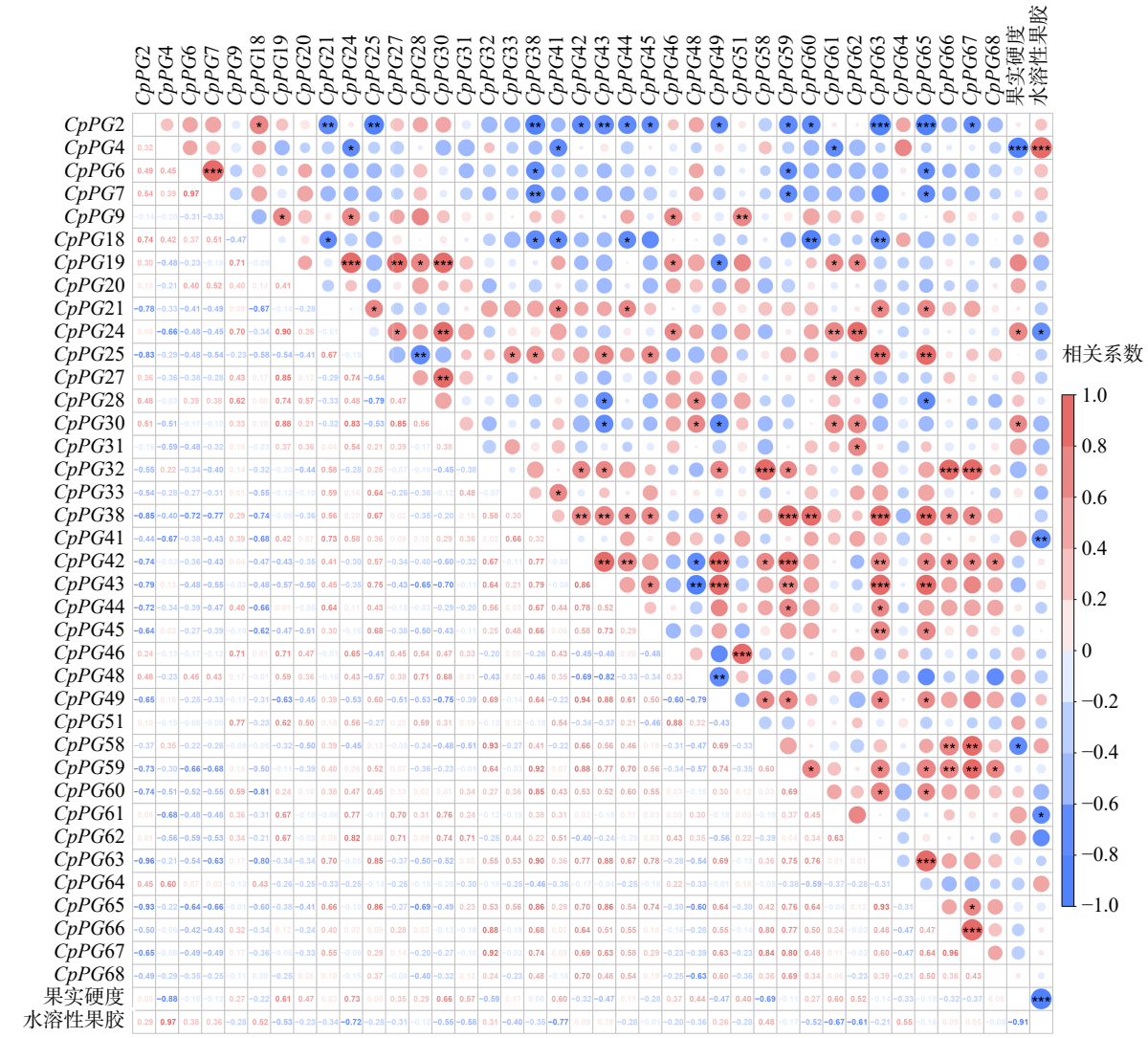
图 8　*CpPG* 在不同发育阶段不同品种的表达热图

Fig. 8　Expression heatmap of *CpPG* in different varieties at different developmental stages

在多种蔷薇科果树中已经进行了 *PG* 功能的验证，然而山楂中 *PG* 基因家族的系统鉴定及其与果实质地分化的关联研究尚属空白。本研究基于山楂高质量基因组数据，首次完成了 *PG* 基因家族的全基因组鉴定，并结合品种间质地差异的表型与表达分析，锁定了关键候选基因 *CpPG4*，为进一步解析山楂果实成熟软化的分子机制提供理论依据。

目前，包括梨（*Pyrus bretschneideri*）[15]、桃[16]、掌叶覆盆子（*Rubus chingii*）[17]、柚（*Citrus maxima*）[18]在内的多种果树的 *PG* 基因家族均已完成全基因组鉴定，其成员均被系统地划分为 6 个亚族。这一规律在山楂中同样得到了验证，本研究共鉴定出 68 个 *CpPG* 基因，依据系统进化关系也可明确分为 6 个亚族（图 1）。如图 2 所示，同一亚族内的基因结构和保守基序相似，不同亚族之间则存在差异，这种模式在梨、桃、苹果等植物中亦有报道，提示其可能与功能特化相关[19]。这些来自不同物种的研究结果共同表明，PG 基因家族在高等植物中遵循着相似的亚族分化模式。在苹果中发现低温和乙烯共同作用调控 *MdPG1*[20]，而山楂 *CpPG* 基因启动子中富含低温响应元件和乙烯响应元件，说明山楂中很可能也存在着类似的调控机制。物种内共线性分析表明分散复制和全基因组复制是推动该家族扩张的主要机制，这与 Wu 等[21]在蔷薇科中的结论一致。全基因组复制事件常伴随基因组结构重排，而基因的进化轨迹则受到其结构复杂性、保守功能域以及进化速率等多重因素的共同影响[22]。进一步的选择压力分析显示，绝大多数 *CpPG* 基因的 Ka/Ks 值远小于 1（图 4c），表明它们在进化过程中主要受到纯化选择的作用。这一结果提示，*CpPG* 基因在进化中保持了相对稳定的功能约束，近年来其蛋白功能可能未发生显著分化[23]。

果实的软化本质上是细胞壁结构解体的过程，其中果胶物质的降解尤为关键。在猕猴桃（*Actinidia chinensis*）等呼吸跃变型果实中，随着果实成熟，PG 酶活性显著升高，驱动原果胶向水溶性果胶转化，最终导致果实硬度下降[24−26]。本研究同样观察到，随着山楂果实的发育，两个品种的硬度持续降低，尤其在成熟期（S4 ~ S5）硬度急剧下降，伴随水溶性果胶含量显著上升。这一表型特征与上述物种的软化规律一致，表明山楂果实软化同样遵循细胞壁果胶降解的基本生化路径。值得注意的是，‘金如意’在各发育阶段的果实硬度均显著低于‘豫北红’（图 6），表明其软化速率更快、果实质地更软，而‘豫北红’则相对较硬、耐贮性更好。这两个品种为解析果实软化的分子调控机制提供了理想的对比材料。然而，本研



*、** 和 *** 分别表示在 $P < 0.05$、$P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 上相关性显著。

图 9 *CpPG* 与果实软化相关的指标的相关性分析

Fig. 9 Correlation analysis between *CpPG* and the indices related to fruit softening

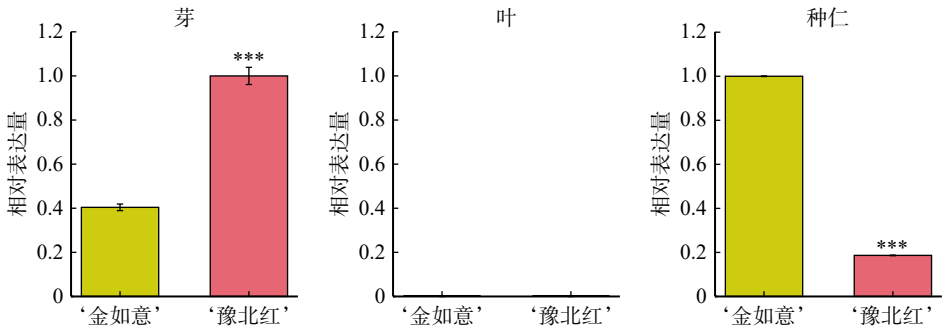


图 10 *CpPG4* 在不同组织中的表达量

Fig. 10 Expression levels of *CpPG4* in different tissues

究的核心发现并非验证这一共性规律，而是揭示了 *PG* 基因家族中 *CpPG4* 在调控山楂品种间质地分化中的特异性功能角色。qRT-PCR 结果显示，*CpPG4* 在果实发育前期（S1 ~ S3）表达水平极低，而在软化启动期（S4）及成熟期（S5）表达量骤然上升，这一表达模式的变化与果实硬度的快速下降及水溶性果胶含量的急剧上升在时间上高度吻合，为 *CpPG4* 参与软化过程提供了关键的时间证据。更为重要的是，该基因在质地较软的‘金如意’品种中的表达量显著高于质地较硬的‘豫北红’品种，且这种品种间表达差异自软化启动期（S4）开始显现，与果实硬度分化的时间窗口完全重叠，提示 *CpPG4* 的表达水平可能直

接介导了品种间软化速率的差异。换言之，‘金如意’中 *CpPG*4 的高表达可能正是其果实更软、软化更快的分子原因，而‘豫北红’中该基因的低表达则与其相对较硬的果实质地相一致。这一表达模式与草莓[11] *FxaC*_21g15770 基因的功能模式相似，提示 *CpPG*4 可能通过品种特异的转录调控机制，介导了山楂果实质地的种质间分化。在苹果中，*MdPG*36 被证实是一个参与果实软化的关键基因[27]。基于系统进化上的紧密关系（图 1），可合理推测 *CpPG*4 与 *MdPG*36 功能相似，都在果实软化中起重要作用。在不同品种的秋子梨（*Pyrus ussuriensis*）中，果实软化伴随着硬度下降与水溶性果胶含量上升，且两者呈显著负相关[28]。与此规律一致，本研究中，*CpPG*4 的表达与果实硬度显著负相关，而与水溶性果胶含量显著正相关（图 9）。多维度证据链显示，*CpPG*4 通过降解果胶来推动山楂果实的成熟软化，是其过程中的关键功能基因。

本研究首次在全基因组水平上系统鉴定了山楂 *PG* 基因家族，揭示了其进化保守性与物种特异性扩张机制，并联合表型与表达分析精准锁定了调控果实软化及品种间质地分化的关键基因 *CpPG*4，为深入解析山楂果实质地形成的分子调控网络提供了理论依据，也为分子标记辅助选择育种及基因编辑改良果实硬度提供了候选基因资源。但本研究也存在一定的局限性：仅通过基因表达量与表型的关联分析就确定了关键基因 *CpPG*4，并未通过转基因等其他技术手段直接验证该基因的生物学功能。未来可针对 *CpPG*4 基因展开详细功能验证，结合遗传转化和组学分析等，解析其调控果胶降解及果实软化的分子机制，为山楂果实质地改良的分子育种提供更精准的理论支撑。

4　结　　论

本研究针对山楂果实质地分化分子机制不清的科学问题，利用全基因组鉴定、系统进化分析、基因结构分析、启动子顺式作用元件分析、共线性分析、qRT-PCR 验证及表达量与表型相关性分析等方法，对山楂 *PG* 基因家族进行系统全面研究，主要得到以下结论。

（1）在山楂基因组中共鉴定到 68 个 *CpPG* 基因，分为 6 个亚族，其中 A1 和 A4 亚族成员最多、结构最保守，为“核心亚族”，同亚族基因结构、保守基序排布保守而亚族间差异显著，所有成员均含有 Glyco_hydro_28 催化结构域和 5 个核心 Motif，但亚族间基序排列顺序存在差异。这种“亚族内保守、亚族间分化”的模式为功能特化提供了结构基础。

（2）山楂 *CpPG* 启动子普遍富含低温及多种激素响应元件，且成员间元件数量差异显著，低温和激素信号的广泛调控及调控异质性共同构成了该家族功能分化的转录基础。基因复制与选择压力分析显示，分散复制和全基因组复制是 *CpPG* 家族扩张的主要方式，纯化选择主导了该家族的进化。

（3）基于表达模式分析和相关性分析的双重筛选，*CpPG*4 被鉴定为关键候选基因。该基因在果实发育后期特异性高表达，通过促进果胶溶解驱动山楂果实软化；并且其在‘金如意’（质地偏软）中的表达量显著高于‘豫北红’（质地偏硬），是两者果实质地分化的关键分子基础。

本研究首次系统揭示了山楂 *CpPG* 基因家族的进化特征与调控网络，明确了 *CpPG*4 在果实软化中的核心功能，为深入解析山楂果实质地形成的分子机制奠定了理论基础。上述结果可为山楂分子标记辅助选择育种及基因编辑改良果实硬度提供重要的候选基因。未来可进一步通过遗传转化验证 *CpPG*4 的生物学功能，并结合多组学分析，解析品种间差异表达的分子调控机制。

参　考　文　献

[1] 刘雪平, 赵莉, 王靖, 等. 山楂加工及综合开发利用研究进展 [J]. 保鲜与加工, 2024, 24(1): 83−89.
Liu X P, Zhao L, Wang J, et al. Research progress on hawthorn processing and comprehensive utilization [J]. Storage and Process, 2024, 24(1): 83−89.

[2] 徐家玉. 羽裂山楂中软肉资源果实的软化机理研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.
Xu J Y. Study on the softening mechanism of soft-flesh resource fruit in *Crataegus pinnatifida* [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017.

[3] Wang W H, Wang Y Y, Chen T, et al. Current insights into posttranscriptional regulation of fleshy fruit ripening [J]. Plant Physiology, 2023, 192(3): 1785−1798.

[4] 王碧君, 杨淮策, 焦洋, 等. 不同软化速率山楂果实软化相关酶活性分析 [J]. 北方园艺, 2023(9): 23−28.
Wang B J, Yang H C, Jiao Y, et al. Analysis of softening-related enzyme activities in hawthorn fruits with different softening rates [J]. Northern Horticulture, 2023(9): 23−28.

[5] 王雪, 宋爽, 李美育, 等. 枣果胶甲酯酶基因家族鉴定及基于 RNA-Seq 表达分析 [J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(4): 8−16.
Wang X, Song S, Li M Y, et al. Identification of pectin methylesterase gene family in jujube and expression analysis based on RNA-Seq [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2021, 43(4): 8−16.

[6] 葛廷, 黄雪, 谢让金. 多聚半乳糖醛酸基因在果树中的研究进展 [J]. 植物生理学报, 2019, 55(8): 1075−1088.
Ge T, Huang X, Xie R J. Research progress of polygalacturonase genes in fruit trees [J]. Plant Physiology Journal, 2019, 55(8):

1075−1088.

[7] Nie H M, Shi Y, Geng X Q, et al. CRISRP/Cas9-mediated targeted mutagenesis of tomato polygalacturonase gene (SlPG) delays fruit softening [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 729128.

[8] Yang Y, Yu Y, Liang Y, et al. A profusion of molecular scissors for pectins: classification, expression, and functions of plant polygalacturonases [J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1208.

[9] Gu C, Wang L, Wang W, et al. Copy number variation of a gene cluster encoding endopolygalacturonase mediates flesh texture and stone adhesion in peach [J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(6): 1993−2005.

[10] Gunaseelan K, Schröder R, Rebstock R, et al. Constitutive expression of apple endo-POLYGALACTURONASE1 in fruit induces early maturation, alters skin structure and accelerates softening [J]. Plant Journal, 2024, 117(5): 1413−1431.

[11] Zhao M, Hu R, Lin Y, et al. Genome-wide analysis of polygalacturonase gene family reveals its role in strawberry softening [J]. Plants, 2024, 13(13): 1838.

[12] Li T, Guo X, Chen Y, et al. Overexpression of the *Rubus idaeus* polygalacturonases gene *RiPG*2 accelerates fruit softening in *Solanum lycopersicum* [J]. Agronomy, 2024, 14(1): 160.

[13] Zhang T, Qiao Q, Du X, et al. Cultivated hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. major) genome sheds light on the evolution of Maleae (apple tribe) [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(8): 1487−1501.

[14] 马聚泽, 吕换男, 王海静, 等. 山楂 *Actin* 基因片段克隆及序列分析 [J]. 河北科技师范学院学报, 2019, 33(1): 1−7.
Ma J Z, Lu H N, Wang H J, et al. Cloning and sequence analysis of *Actin* gene fragment from hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) [J]. Journal of Hebei Normal University of Science & Technology, 2019, 33(1): 1−7.

[15] Zhang S, Ma M, Zhang H, et al. Genome-wide analysis of polygalacturonase gene family from pear genome and identification of the member involved in pear softening [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 587.

[16] Qiao M, Zhang Y, Yan X, et al. Identification and expression analysis of polygalacturonase family members during peach fruit softening [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(11): 1933.

[17] 沈丹维, 朱婷, 李妹新, 等. 掌叶覆盆子多聚半乳糖醛酸酶基因家族鉴定及在果实发育中的作用 [J]. 浙江农林大学学报 (自然科学版), 2025, 42(2): 249−260.
Shen D W, Zhu T, Li M X, et al. Identification of the polygalacturonase gene family and its role in fruit development of *Rubus chingii* Hu [J]. Journal of Zhejiang A&F University (Natural Science Edition), 2025, 42(2): 249−260.

[18] 刘若南, 刘林婷, 周秋蓉, 等. 柚多聚半乳糖醛酸酶基因家族的鉴定和分析 [J]. 热带作物学报, 2022, 43(4): 666−674.
Liu R N, Liu L T, Zhou Q R, et al. Identification and analysis of polygalacturonase gene family in pummelo [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(4): 666−674.

[19] Sun M, Zhang M, Chen X, et al. Rearrangement and domestication as drivers of Rosaceae mitogenome plasticity [J]. BMC Biology, 2022, 20(1): 181.

[20] Tacken E, Ireland H, Gunaseelan K, et al. The role of ethylene and cold temperature in the regulation of the apple *Polygalacturonase*1 gene and fruit softening [J]. Plant Physiology, 2010, 153(1): 294−305.

[21] Wu J, Wang Z, Shi Z, et al. The genome of the pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) [J]. Genome Research, 2013, 23(2): 396−408.

[22] Wang L, Wang L, Zhang Z, et al. Genome-wide identification and comparative analysis of the superoxide dismutase gene family in pear and their functions during fruit ripening [J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 143: 68−77.

[23] Qiao X, Li M, Li L, et al. Genome-wide identification and comparative analysis of the heat shock transcription factor family in Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*) and five other Rosaceae species [J]. BMC Plant Biology, 2015, 15: 12.

[24] 罗静, 郭琳琳, 黄玉南, 等. 猕猴桃 *PG* 基因在果实贮藏过程中的表达及其与硬度的关系 [J]. 园艺学报, 2018, 45(5): 865−874.
Luo J, Guo L L, Huang Y N, et al. Expression of *PG* gene and its relationship with firmness during kiwifruit storage [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45(5): 865−874.

[25] 杨德兴, 戴京晶, 庞向宇, 等. 猕猴桃衰老过程中 *PG*, 果胶质和细胞壁超微结构的变化 [J]. 园艺学报, 1993, 20(4): 341−345.
Yang D X, Dai J J, Pang X Y, et al. Changes in *PG*, pectin substances and cell wall ultrastructure during senescence of kiwifruit [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1993, 20(4): 341−345.

[26] Brummell D A. Cell wall disassembly in ripening fruit [J]. Functional Plant Biology, 2006, 33(2): 103−119.

[27] 陈鸿飞, 邵红霞, 樊胜, 等. 苹果全基因组多聚半乳糖醛酸酶基因家族的鉴定及进化分析 [J]. 园艺学报, 2016, 43(10): 1863−1877.
Chen H F, Shao H X, Fan S, et al. Genome-wide identification and evolutionary analysis of the polygalacturonase gene family in apple (*Malus* × *domestica*) [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(10): 1863−1877.

[28] 霍宏亮, 曹玉芬, 徐家玉, 等. 秋子梨果胶含量与果肉硬度的相关性研究 [J]. 经济林研究, 2018, 36(4): 47−52.
Huo H L, Cao Y F, Xu J Y, et al. Correlation between pectin content and flesh firmness in ussurian pear [J]. Non-wood Forest Research, 2018, 36(4): 47−52.

（责任编辑 赵田芸
责任编委 马履一）