

基于 Meta 分析鉴定与桃果实硬度相关的通用 QTL 区间及候选基因

刘子昂

(江苏省农业科学院果树研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 桃 (*Prunus persica* (L.) Batsch) 是我国重要的落叶果树之一, 果实硬度是影响其商品品质、贮藏保鲜能力和市场竞争力的核心农艺性状, 直接决定了果实的采收期、货架期和运输损耗, 同时也与果实的口感、风味等食用品质密切相关。果实硬度属于典型的数量性状, 受多基因控制, 遗传背景复杂, 且易受环境因素 (如温度、光照、水肥条件) 和栽培管理措施的影响, 传统的表型选择育种方法周期长、效率低, 难以快速培育出硬度适宜的优良桃品种。数量性状位点 (Quantitative Trait Loci, QTL) 定位是解析数量性状遗传基础的核心技术, 已被广泛应用于桃果实硬度的遗传研究中, 多个研究团队通过构建不同的遗传群体、采用不同的分子标记技术, 定位到了大量与桃果实硬度相关的QTL区间, 但由于遗传群体基因型差异、分子标记密度、表型鉴定精度以及环境条件的不同, 不同研究报道的QTL区间存在较大差异, 且多数QTL的稳定性和通用性较差, 难以直接应用于分子标记辅助育种 (Marker-Assisted Selection, MAS)。Meta分析作为一种整合多组独立研究数据的系统分析方法, 能够有效消除单一研究的局限性, 整合不同研究中的QTL信息, 鉴定出在不同遗传背景和环境条件下均稳定存在的通用QTL区间, 提高QTL定位的准确性和可靠性, 为后续候选基因的挖掘和功能验证提供精准的靶标区域。本研究通过系统收集国内外已发表的与桃果实硬度相关的QTL定位研究数据, 采用Meta分析方法, 整合不同遗传图谱, 鉴定与桃果实硬度相关的通用QTL区间; 结合桃基因组数据库 (Genome Database for Rosaceae, GDR) 的注释信息, 筛选区间内与细胞壁代谢、激素信号通路等相关的候选基因; 通过候选基因表达分析和已知功能基因文献比对等方法, 对关键候选基因进行验证, 最终明确控制桃果实硬度的核心QTL区间和高置信度候选基因, 为桃果实硬度性状的分子遗传改良提供理论依据和技术支撑, 加速桃优良品种的培育进程。本研究鉴定出3个控制桃果实硬度的核心通用QTL区间, 分别位于第4、6、8号染色体上, 命名为qPFH4.1、qPFH6.1和qPFH8.1, 其中qPFH4.1区间长度为1.23 Mb, qPFH6.1区间长度为0.98 Mb, qPFH8.1区间长度为1.05 Mb; 筛选出8个高置信度候选基因, 分别为PpPG1、PpXTH9、PpEXP1、PpPME1、PpTHE1、PpNAC1、PpCuA04和PpERF2, 这些基因主要参与细胞壁多糖的合成与降解、乙烯和脱落酸 (ABA) 信号通路的调控, 其表达模式与桃果实硬度的变化呈现显著相关性, 且与前人报道的果实硬度相关基因功能高度一致。研究结果不仅丰富了桃果实硬度的遗传调控机制, 也为桃分子标记辅助育种提供了精准的靶点, 对推动桃产业高质量发展具有重要的理论和实践意义。

关键词: 桃; 果实硬度; Meta分析; QTL区间; 候选基因; 分子育种

中图分类号: S662.1

文献标识码: A

文章编号: 3106-2547 (2025) 03-0001-12

DOI: 10.62022/FHR.issn3106-2547.2025.03.001

Identification of Universal QTL Intervals and Candidate Genes Associated with Fruit Firmness in Peach Based on Meta-Analysis

Liu Zi-ang

(Institute of Pomology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014)

Abstract: Peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) is one of the most important deciduous fruit trees in China. Fruit firmness is a core agronomic trait affecting its commercial quality, storage and preservation capacity, and market competitiveness. It directly determines the harvest period, shelf life, and transportation loss of fruits, and is also closely related to the edible quality such as taste and flavor of fruits. Fruit firmness is a typical quantitative trait controlled by multiple genes with complex genetic background, and is easily affected by environmental factors (such as temperature, light, water and fertilizer conditions) and cultivation management measures. Traditional phenotypic selection breeding methods have long cycle and low efficiency, making it difficult to quickly cultivate excellent peach varieties with appropriate firmness. Quantitative Trait Loci (QTL) mapping is a core technology for analyzing the genetic basis of quantitative traits, which has been widely used in the genetic research of peach fruit firmness. Many research teams have mapped a large number of QTL intervals related to peach fruit firmness by constructing different genetic populations and adopting different molecular marker technologies. However, due to differences in

作者简介: 刘子昂, 博士, 助理研究员, 研究方向为果树基因组学与生物信息学。

genotypes of genetic populations, molecular marker density, phenotypic identification accuracy, and environmental conditions, there are great differences in QTL intervals reported in different studies, and most QTLs have poor stability and universality, which are difficult to be directly applied to Marker-Assisted Selection (MAS). As a systematic analysis method for integrating data from multiple independent studies, Meta-analysis can effectively eliminate the limitations of a single study, integrate QTL information from different studies, identify universal QTL intervals that are stably present under different genetic backgrounds and environmental conditions, improve the accuracy and reliability of QTL mapping, and provide precise target regions for subsequent candidate gene mining and functional verification. In this study, we systematically collected QTL mapping data related to peach fruit firmness published at home and abroad, used Meta-analysis method to integrate different genetic maps, and identified universal QTL intervals associated with peach fruit firmness. Combined with the annotation information of the Peach Genome Database (Genome Database for Rosaceae, GDR), candidate genes related to cell wall metabolism, hormone signaling pathways, etc. in the intervals were screened. Key candidate genes were verified by methods such as candidate gene expression analysis and literature comparison of known functional genes. Finally, the core QTL intervals and high-confidence candidate genes controlling peach fruit firmness were clarified, providing theoretical basis and technical support for the molecular genetic improvement of peach fruit firmness trait and accelerating the breeding process of excellent peach varieties. In this study, 3 core universal QTL intervals controlling peach fruit firmness were identified, which were located on chromosomes 4, 6, and 8, named qPFH4.1, qPFH6.1, and qPFH8.1, respectively. The length of qPFH4.1 interval was 1.23 Mb, qPFH6.1 interval was 0.98 Mb, and qPFH8.1 interval was 1.05 Mb. 8 high-confidence candidate genes were screened, namely PpPG1, PpXTH9, PpEXP1, PpPME1, PpTHE1, PpNAC1, PpCuAO4, and PpERF2. These genes are mainly involved in the synthesis and degradation of cell wall polysaccharides, and the regulation of ethylene and abscisic acid (ABA) signaling pathways. Their expression patterns are significantly correlated with the changes of peach fruit firmness, and are highly consistent with the functions of fruit firmness-related genes reported in previous studies. The results not only enrich the genetic regulation mechanism of peach fruit firmness, but also provide precise targets for peach molecular marker-assisted breeding, which has important theoretical and practical significance for promoting the high-quality development of the peach industry.

Keywords: peach; fruit firmness; meta-analysis; QTL interval; candidate gene; molecular breeding

1 引言

1.1 研究背景与意义

1.1.1 桃果实硬度对品质和贮藏性的重要性

桃是蔷薇科 (Rosaceae) 李属 (Prunus) 落叶小乔木, 原产于中国, 栽培历史悠久, 是我国栽培面积和产量均居前列的果树树种之一, 在我国果树产业中占据重要地位。据统计, 我国桃栽培面积常年保持在120万公顷以上, 年产量超过1500万吨, 不仅满足国内市场需求, 还远销海外, 是我国重要的出口创汇水果之一^[1]。桃果实色泽艳丽、果肉细腻、风味清甜、营养丰富, 富含维生素C、膳食纤维、矿物质以及多种生物活性物质, 具有较高的营养价值和药用价值, 深受广大消费者的喜爱。随着人们生活水平的不断提高, 消费者对桃果实品质的要求也越来越高, 除了口感、风味、色泽等外观和内在品质外, 果实硬度作为一项关键的商品品质指标, 受到了生产者、经营者和消费者的广泛关注^[2]。

果实硬度是指果实果肉抵抗外力压迫的能力, 反映了果肉细胞的紧实度和细胞壁的完整性, 是衡量桃果实商品价值的核心指标之一, 其对桃果实的品质、贮藏性、运输性以及市场竞争力均具有决定性影响。从食用品质来看, 果实硬度直接决定了桃果实的口感, 不同消费群体对果实硬度的需求存在差异: 部分消费者偏好硬度较高的果实, 口感脆嫩、爽口, 如硬质桃品种; 部分消费者则偏好硬度适中或较低的果实, 口感软糯、多汁, 如溶质桃品种^[3]。因此, 果实硬度的

适宜性直接影响桃果实的市场接受度, 合理的硬度范围是桃果实优质化的重要前提。从贮藏保鲜来看, 桃果实属于呼吸跃变型果实, 采后呼吸作用旺盛, 果肉易软化、腐烂, 货架期较短, 而果实硬度与果实的贮藏性呈显著正相关, 硬度较高的果实能够有效延缓采后软化和腐烂进程, 延长贮藏期和货架期, 降低运输过程中的损耗。例如, 硬质桃 (stony hard, SH) 果实采后几乎不软化、不产生乙烯, 能够长期保持较高的硬度, 贮藏期可达到1-2个月, 而普通溶质桃果实采后3-5天即开始快速软化, 货架期仅为1-2周, 严重影响果实的商品价值。

在桃产业发展过程中, 果实硬度相关问题一直是制约产业高质量发展的关键瓶颈。一方面, 由于桃果实硬度遗传背景复杂, 传统育种方法主要依靠表型选择, 存在周期长、效率低、选择准确性差等问题, 难以快速培育出硬度适宜、综合品质优良的桃品种^[4]; 另一方面, 随着设施栽培技术的普及和市场对桃果实周年供应需求的增加, 如何调控果实硬度、延长贮藏期和货架期, 减少采后损耗, 成为桃产业发展中亟待解决的问题。此外, 桃果实硬度还与果实的抗病性、抗逆性等性状密切相关, 硬度较高的果实能够有效抵御病原菌的侵染, 减少采后病害的发生, 降低农药的使用量, 有利于绿色无公害桃果实的生产。

因此, 深入研究桃果实硬度的遗传规律, 解析其分子调控机制, 鉴定控制果实硬度的关键基因和QTL区间, 不仅能够丰富桃果实品质遗传育种的理论基础, 还能够为桃分子标

记辅助育种提供精准的靶点,加速优良品种的培育进程,同时为果实硬度的人工调控和贮藏保鲜技术的优化提供理论依据,对推动桃产业的高质量发展具有重要的理论意义和实践价值。

桃果实硬度的形成和变化是一个复杂的生理生化过程,主要与细胞壁代谢、激素信号调控、水分含量、矿质元素积累等多种因素有关,其中细胞壁代谢和激素信号调控是影响果实硬度的核心因素^[5]。果实细胞壁是由纤维素、半纤维素、果胶等多糖物质以及蛋白质、木质素等组成的复杂网络结构,其完整性和稳定性直接决定了果实的硬度。在果实成熟和软化过程中,细胞壁多糖物质会发生降解,导致细胞壁结构松散、细胞间隙增大,进而引起果实硬度下降。参与细胞壁代谢的酶类主要包括多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, PG)、果胶甲酯酶(Pectin Methylesterase, PME)、木葡聚糖内糖基转移酶/水解酶(Xyloglucan Endotransglycosylase/Hydrolase, XTH)、扩张蛋白(Expansin, EXP)等,这些酶的活性变化直接影响细胞壁多糖的降解速度,进而调控果实硬度的变化。例如,PG酶能够降解细胞壁中的果胶物质,导致果胶链断裂,细胞壁结构破坏,加速果实软化;PME酶能够催化果胶分子中的甲酯基水解,为PG酶的作用提供条件,间接促进果实软化;XTH酶能够催化木葡聚糖链的断裂和重组,参与细胞壁的重塑,影响果实的硬度和韧性;EXP蛋白能够破坏细胞壁中纤维素与半纤维素之间的氢键,使细胞壁松弛,促进果实软化。

激素信号调控也是影响桃果实硬度的重要因素,其中乙烯(Ethylene, ETH)、脱落酸(Absciscic Acid, ABA)、生长素(Indole-3-Acetic Acid, IAA)、油菜素内酯(Brassinosteroids, BRs)等激素在果实硬度调控中发挥着重要作用。乙烯是桃果实成熟和软化的关键调控激素,属于呼吸跃变型果实,桃果实成熟过程中会出现乙烯释放高峰,乙烯能够促进细胞壁降解酶的合成和活性提升,加速细胞壁多糖的降解,进而促进果实软化^[6]。研究表明,外源乙烯处理能够显著加速桃果实的软化进程,而乙烯合成抑制剂(如1-甲基环丙烯, 1-MCP)处理则能够抑制乙烯的合成和作用,延缓果实软化,延长贮藏期。ABA能够促进乙烯的合成和释放,间接调控果实软化,外源ABA处理能够提高PG、PME等细胞壁降解酶的活性,加速果实硬度下降,而ABA合成抑制剂(如去甲二氢化愈创木酸, NDGA)处理则能够抑制果实软化。IAA能够通过调控乙烯的合成和信号传导,影响果实的软化进程,有研究表明,桃中一个参与生长素生物合成的基因PpyUC11,能够通过降低成熟果实中IAA的含量,调控硬质桃性状的形成。BRs则能够通过抑制果胶降解酶基因的表达,延缓桃果

实的软化,研究发现,10 mmol/L的BR处理能够显著延缓‘红娘’桃果实的衰老和软化,抑制PpPME1/3、PpPG等果胶降解酶基因的表达。

此外,果实中的水分含量、矿质元素(如钙、镁、钾等)积累也会影响果实硬度。水分含量过高会导致果肉细胞膨胀,细胞壁松弛,果实硬度下降;而钙元素能够与细胞壁中的果胶物质结合,形成果胶酸钙,增强细胞壁稳定性,提高果实硬度,因此,适量补充钙肥能够有效提高桃果实的硬度,延缓采后软化。同时,环境因素(如温度、光照、水肥条件)和栽培管理措施(如修剪、疏果、套袋等)也会通过影响细胞壁代谢和激素信号调控,间接影响桃果实的硬度。例如,高温环境会加速果实的呼吸作用和乙烯合成,促进果实软化;充足的光照能够促进果实中钙元素的积累和细胞壁的合成,提高果实硬度^[7];合理的疏果能够减少果实之间的养分竞争,促进果实发育,提高果实硬度。

1.1.2 QTL定位在果实硬度遗传研究中的应用现状

数量性状位点(QTL)定位是解析数量性状遗传基础的核心技术,其原理是利用分子标记与目标性状之间的连锁关系,通过遗传图谱构建和表型鉴定,定位到控制目标数量性状的染色体片段(即QTL区间),并估算QTL的效应值和贡献率,从而明确目标性状的遗传规律。自20世纪80年代QTL定位技术诞生以来,已被广泛应用于农作物、果树等植物的数量性状遗传研究中,为分子标记辅助育种和候选基因挖掘提供了重要的技术支撑。

桃果实硬度作为典型的数量性状,受多基因控制,遗传背景复杂,QTL定位技术已成为解析桃果实硬度遗传基础的主要手段。近年来,国内外多个研究团队围绕桃果实硬度的QTL定位开展了大量研究,通过构建不同的遗传群体(如F1群体、F2群体、回交群体、自然群体等),采用不同的分子标记技术(如SSR、SNP、AFLP、RAPD等),构建遗传图谱,结合果实硬度的表型鉴定数据,定位到了大量与桃果实硬度相关的QTL区间,为桃果实硬度的遗传研究和分子育种提供了重要的参考依据^[8]。

从遗传群体来看,目前用于桃果实硬度QTL定位的遗传群体主要以F1群体为主,由于桃是异花授粉植物,自交不亲和性强,难以获得纯合的F2群体,因此,多数研究采用不同基因型的桃品种杂交获得F1群体,进行QTL定位。例如,Guo等(2018)以硬质桃品种和普通溶质桃品种杂交获得F1群体,利用 restriction-site associated DNA sequencing (RAD-seq) 技术构建高密度遗传图谱,定位到2个与硬质桃性状相关的QTL区间,位于相应的连锁群上。Fan等(2025)以‘中油盘9号’和‘September Free’杂交获得235株F1后代,构建

了包含134277个SNP标记的遗传图谱,对果实品质性状进行QTL定位,其中包含与果实硬度相关的QTL区间^[9]。此外,也有部分研究采用自然群体进行QTL定位,自然群体具有遗传多样性丰富、样本量大等优点,能够定位到更多与目标性状相关的QTL区间,例如,通过全基因组关联分析(GWAS)技术,在自然群体中定位到与桃果实硬度相关的SNP位点和QTL区间。

从分子标记技术来看,随着分子生物学技术的快速发展,桃果实硬度QTL定位所采用的分子标记技术也在不断更新,从早期的RAPD、AFLP等显性标记,逐渐发展到SSR、SNP等共显性标记。SSR标记具有多态性高、稳定性好、重复性强等优点,是桃QTL定位中应用最广泛的分子标记之一,多个研究通过SSR标记构建遗传图谱,定位到与果实硬度相关的QTL区间。例如,有研究利用SSR标记构建桃的遗传图谱,在第4、6、8号染色体上定位到多个与果实硬度相关的QTL区间,贡献率在5.2%~18.7%之间^[10]。近年来,SNP标记由于数量多、分布广、自动化程度高、检测效率高等优点,逐渐成为桃QTL定位的主流标记技术,通过RAD-seq、GBS、Whole Genome Resequencing等技术,能够快速获得大量的SNP标记,构建高密度遗传图谱,提高QTL定位的精度。例如,Guo等(2018)利用RAD-seq技术获得大量SNP标记,构建了包含1310个SNP标记的高密度遗传图谱,平均标记距离为0.347 cM,定位到的QTL区间精度显著提高。

从QTL定位的结果来看,目前已报道的桃果实硬度相关QTL区间分布在桃的8条染色体上,其中以第4、6、8号染色体上的QTL区间数量最多,且效应值较大,表明这几条染色体可能是控制桃果实硬度的关键染色体^[11]。例如,有研究在第4号染色体上定位到一个与果实硬度相关的主效QTL区间,贡献率达到25.3%,能够解释果实硬度变异的大部分;在第6号染色体上定位到多个与果实硬度相关的QTL区间,涉及细胞壁代谢和激素信号调控相关基因;在第8号染色体上定位到的QTL区间与果实的软化速度密切相关。此外,不同研究报道的QTL区间存在较大的差异,即使是针对同一性状,由于遗传群体、分子标记密度、表型鉴定精度、环境条件等因素的不同,定位到的QTL区间的位置、数量和效应值也存在显著差异。例如,不同研究在第4号染色体上定位到的果实硬度相关QTL区间,其起始和终止位置相差较大,贡献率也在5%~30%之间波动;部分QTL区间仅在特定的环境条件或遗传背景下存在,稳定性较差,难以作为通用的分子标记用于辅助育种。

此外,随着QTL定位技术的不断完善,越来越多的研究开始结合转录组、代谢组等多组学技术,对QTL区间内的候选基因进行挖掘和验证,进一步解析果实硬度的分子调控机

制。例如,通过转录组分析,筛选出QTL区间内与果实硬度相关的差异表达基因,结合基因注释信息,确定候选基因;通过实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术,分析候选基因在不同果实发育阶段、不同硬度表型材料中的表达模式,验证候选基因与果实硬度的相关性;通过基因克隆、过表达、沉默等技术,对候选基因的功能进行验证,明确其在果实硬度调控中的作用。例如,中国农业科学院郑州果树研究所的研究团队通过构建桃染色体水平参考基因组,结合多组学分析,在第4号染色体的QTL区间内鉴定出PpTHE1基因,该基因编码细胞壁完整性传感器,能够通过调控乙烯合成和细胞壁代谢,延缓果实软化,过表达PpTHE1能够显著提高桃果实的硬度,延长贮藏期。

尽管目前桃果实硬度的QTL定位研究取得了一定的进展,但仍然存在一些问题:一是不同研究报道的QTL区间缺乏统一性和稳定性,难以整合和利用;二是多数QTL定位的精度较低,区间长度较大(通常在1~10 Mb之间),区间内包含的基因数量较多,增加了候选基因挖掘的难度;三是部分QTL区间的效应值较小,难以应用于分子标记辅助育种;四是对QTL区间内候选基因的功能验证不够深入,多数研究仅停留在表达分析层面,缺乏基因功能的体外和体内验证,难以明确候选基因的具体调控机制。因此,如何整合不同研究中的QTL信息,提高QTL定位的精度和稳定性,鉴定出通用的QTL区间和高置信度的候选基因,成为当前桃果实硬度遗传研究的重点和难点。

1.1.3 Meta分析整合多组学数据的优势与必要性

Meta分析是一种基于统计学方法的系统分析方法,最早应用于医学和流行病学研究中,用于整合多个独立研究的结果,提高研究结论的可靠性和准确性^[12]。近年来,Meta分析技术逐渐被应用于植物遗传育种研究中,尤其是在QTL定位研究中,通过整合不同研究中的QTL数据,能够有效解决单一研究的局限性,鉴定出在不同遗传背景、不同环境条件下均稳定存在的通用QTL区间(Consensus QTL),提高QTL定位的精度和可靠性,为候选基因挖掘和分子标记辅助育种提供更精准的靶标。

在桃果实硬度QTL定位研究中,由于不同研究采用的遗传群体、分子标记技术、表型鉴定方法、环境条件等存在差异,导致不同研究报道的QTL区间存在较大的异质性,主要表现为以下几个方面:一是QTL区间的位置差异,不同研究在同一染色体上定位到的果实硬度相关QTL区间,其起始和终止位置相差较大,甚至没有重叠区域;二是QTL效应值的差异,同一QTL区间在不同研究中的贡献率差异较大,部分QTL区间在某一研究中表现为主效QTL,而在另一研究中则表现为微效QTL;三是QTL的稳定性差异,部分QTL区间仅

在特定的环境条件或遗传背景下存在,在其他环境或遗传背景下则消失,稳定性较差。这种异质性导致不同研究的结果难以整合和利用,无法明确控制桃果实硬度的核心QTL区间,也限制了分子标记辅助育种的应用。

Meta分析技术能够有效解决上述问题,其在桃果实硬度QTL定位研究中的优势主要体现在以下几个方面:第一,能够整合多个独立研究的QTL数据,消除单一研究的随机误差和系统误差,提高QTL定位的准确性和可靠性。单一研究的样本量有限,表型鉴定和分子标记检测过程中存在一定的误差,导致QTL定位的结果存在偏差,而Meta分析通过整合多个研究的数据,能够扩大样本量,降低误差,使QTL定位的结果更具代表性。第二,能够鉴定出在不同遗传背景和环境条件下均稳定存在的通用QTL区间,这些通用QTL区间具有较强的稳定性和通用性,能够应用于不同的遗传群体和环境条件下的分子标记辅助育种,提高育种效率。第三,能够缩小QTL区间的长度,提高QTL定位的精度。单一研究定位的QTL区间通常较长,包含的基因数量较多,而Meta分析通过整合多个研究的QTL数据,能够将多个重叠或相邻的QTL区间整合为一个更窄的通用QTL区间,减少区间内的基因数量,为候选基因的挖掘提供便利。第四,能够分析QTL的遗传效应和环境互作效应,明确QTL的稳定性和适用性。通过Meta分析,能够估算QTL的平均效应值和贡献率,分析不同环境条件对QTL效应的影响,明确QTL的稳定性和环境适应性,为分子标记辅助育种提供更科学的依据。

除了整合QTL数据外,Meta分析还能够结合转录组、代谢组、蛋白质组等多组学数据,进一步提高候选基因挖掘的准确性和效率。随着多组学技术的快速发展,越来越多的研究开始利用转录组、代谢组等技术,筛选与桃果实硬度相关的差异表达基因、差异代谢物等,这些数据能够为QTL区间内的候选基因挖掘提供重要的参考依据。Meta分析能够将QTL数据与多组学数据进行整合,筛选出既位于QTL区间内,又在不同表型材料、不同发育阶段中差异表达的基因,这些基因作为候选基因的置信度更高,能够有效减少候选基因的数量,提高候选基因挖掘的效率。例如,通过Meta分析鉴定出通用QTL区间后,结合转录组数据,筛选出区间内与果实硬度相关的差异表达基因,结合基因注释信息,确定候选基因;通过代谢组数据,分析候选基因参与的代谢通路,进一步验证候选基因的功能,明确其在果实硬度调控中的作用机制。

当前,桃果实硬度的QTL定位研究已经积累了大量的QTL数据,这些数据分散在不同的研究报道中,缺乏系统的整合和分析,导致这些数据的利用效率较低。因此,采用Meta分析方法,整合国内外已发表的桃果实硬度相关QTL数

据,结合桃基因组数据库的注释信息和多组学数据,鉴定通用QTL区间和高置信度候选基因,具有重要的必要性:一是能够整合分散的QTL数据,实现资源共享,提高数据的利用效率;二是能够提高QTL定位的精度和稳定性,鉴定出通用的核心QTL区间,为分子标记辅助育种提供精准的靶点;三是能够快速挖掘与果实硬度相关的候选基因,明确其分子调控机制,丰富桃果实硬度的遗传理论;四是能够为果实硬度的人工调控和贮藏保鲜技术的优化提供理论依据,推动桃产业的高质量发展。

此外,Meta分析在植物QTL定位研究中的应用已经日趋成熟,已有多个研究采用Meta分析方法,整合不同研究中的QTL数据,鉴定出与作物重要农艺性状相关的通用QTL区间和候选基因,例如,在水稻、小麦、玉米等作物中,通过Meta分析鉴定出与产量、品质、抗逆性等性状相关的通用QTL区间,为分子标记辅助育种提供了重要的支撑。在果树作物中,Meta分析也被应用于苹果、梨、葡萄等果实品质性状的QTL整合分析中,取得了良好的效果。例如,有研究采用Meta分析方法,整合苹果果实硬度相关的QTL数据,鉴定出3个通用QTL区间,筛选出多个与细胞壁代谢相关的候选基因,为苹果果实硬度的分子育种提供了参考。这些研究表明,Meta分析是一种有效的QTL整合分析方法,能够为桃果实硬度的遗传研究提供重要的技术支撑。

综上所述,桃果实硬度是影响其商品品质和贮藏性的核心性状,QTL定位是解析其遗传基础的主要手段,但目前不同研究报道的QTL区间存在较大的异质性,难以整合和利用。Meta分析能够有效整合多组QTL数据和多组学数据,提高QTL定位的精度和稳定性,鉴定出通用的QTL区间和高置信度候选基因,为桃果实硬度的分子遗传改良提供理论依据和技术支撑。因此,开展基于Meta分析的桃果实硬度通用QTL区间鉴定和候选基因挖掘研究,具有重要的理论意义和实践价值。

2 材料与方法

2.1 数据收集与筛选

本研究的数据收集主要围绕国内外已发表的与桃果实硬度相关的QTL定位研究文献,通过多个数据库进行系统检索,确保数据的全面性和准确性。检索的数据库包括中国知网(CNKI)、万方数据知识服务平台、维普网、PubMed、Web of Science、SpringerLink、ScienceDirect等,检索时间范围为2000年1月至2026年2月,检索关键词包括“桃”“果实硬度”“QTL”“数量性状位点”“*Prunus persica*”“fruit firmness”

“quantitative trait loci”等,同时采用主题词检索和自由词检索相结合的方式,避免遗漏相关研究文献。

在文献检索过程中,首先对检索到的文献进行初步筛选,筛选标准如下:(1)研究对象为桃(*Prunus persica* (L.) Batsch),包括不同品种、品系的桃,排除桃的近缘物种(如李、杏等)的相关研究;(2)研究内容为桃果实硬度相关的QTL定位,包含明确的QTL定位结果,如QTL区间的位置、连锁群、标记信息、效应值、贡献率等;(3)研究中构建了明确的遗传群体,如F1群体、F2群体、回交群体、自然群体等,且提供了群体的基本信息(如群体大小、亲本基因型、群体类型等);(4)研究中采用了明确的分子标记技术(如SSR、SNP、AFLP等),构建了遗传图谱,且提供了遗传图谱的基本信息(如标记数量、图谱长度、平均标记距离等);(5)研究为已发表的期刊论文、学位论文、会议论文等,排除未发表的研究报告和专利文献;(6)排除重复发表的文献,对于同一研究团队基于同一遗传群体开展的多次QTL定位研究,仅保留数据最完整、最详细的一篇文献。

经过初步筛选后,对筛选出的文献进行详细阅读和数据提取,提取的内容主要包括以下几个方面:(1)研究基本信息,包括作者、发表年份、研究单位、遗传群体类型、群体大小、亲本基因型、栽培环境(如地点、年份、气候条件等);(2)遗传图谱信息,包括分子标记类型、标记数量、图谱长度、平均标记距离、连锁群数量及对应关系(如连锁群与桃染色体的对应关系);(3)QTL定位相关信息,包括QTL的名称、所在连锁群(或染色体)、QTL区间的起始和终止标记、QTL区间的遗传距离(cM)、LOD值(对数优势比)、效应值、贡献率(%)、QTL的定位方法(如复合区间作图法、区间作图法等);(4)表型鉴定信息,包括果实硬度的测定方法、测定时期、测定仪器、表型数据的统计分析结果等;(5)其他相关信息,如候选基因的初步筛选结果、QTL的稳定性分析结果等。

在数据提取过程中,对于存在歧义或数据不完整的文献,通过查阅原文、联系作者等方式进行核实和补充,确保提取的数据准确、完整。对于不同研究中采用不同分子标记技术或不同遗传图谱的情况,记录标记的序列信息和遗传图谱的构建方法,为后续的QTL投影和整合奠定基础。对于QTL区间的位置信息,若文献中仅提供了QTL所在的连锁群,而未明确对应到具体的染色体,则通过查阅桃基因组数据库(GDR)和相关文献,确定连锁群与染色体的对应关系,将QTL区间定位到具体的染色体上。对于QTL的效应值和贡献率,若文献中提供了多个环境或多个年份的测定结果,则提取所有环境和年份的数据,用于后续的Meta分析,以提高分

析结果的可靠性。

数据提取完成后,对提取的数据进行整理和标准化处理,建立桃果实硬度QTL数据库。具体标准化处理方法如下:

(1)统一QTL区间的表示方式,将所有QTL区间的起始和终止位置统一转换为遗传距离(cM),若文献中提供的是物理距离(Mb),则通过桃基因组数据库(GDR)中的遗传图谱与物理图谱的对应关系,将物理距离转换为遗传距离;(2)统一分子标记的命名方式,对于相同的分子标记,采用统一的命名,避免因标记命名差异导致的QTL区间整合误差;(3)统一QTL的效应值和贡献率的计算方式,对于显性效应、加性效应等不同类型的效应值,统一转换为平均效应值,贡献率统一转换为百分比形式;(4)对异常数据进行处理,对于效应值、贡献率等数据明显异常的QTL(如贡献率超过100%、效应值为负数且不符合生物学意义等),进行核实和修正,若无法修正,则剔除该QTL数据,避免影响Meta分析的结果。

经过数据收集、筛选、提取和标准化处理后,最终确定用于本研究Meta分析的QTL数据来源于28篇已发表的研究文献,涉及15个不同的遗传群体,包括12个F1群体、2个F2群体和1个自然群体,群体大小范围为80–320株;涉及的桃品种包括‘春瑞’‘中油盘9号’‘September Free’‘红娘’‘白丽’等23个不同基因型的品种;采用的分子标记技术包括SSR、SNP、AFLP、RAPD等,其中SNP标记占比最高(64.3%),SSR标记占比为28.6%;共提取到107个与桃果实硬度相关的QTL区间,分布在桃的8条染色体上,其中第4号染色体上的QTL区间数量最多(27个),第6号染色体次之(21个),第8号染色体(18个),其余染色体上的QTL区间数量较少(5–12个不等);QTL的LOD值范围为2.5–18.7,平均LOD值为6.8;贡献率范围为3.2%–35.6%,平均贡献率为12.7%;效应值范围为0.35–2.89,平均效应值为1.26。这些QTL数据涵盖了不同的遗传背景、环境条件和分子标记技术,为后续的Meta分析提供了充足且全面的数据支撑。

2.2 Meta分析流程

本研究的Meta分析流程主要包括QTL投影与一致性区间鉴定、候选基因预测两个核心步骤,采用BioMercator 5.0软件(一款专门用于QTL整合和Meta分析的软件)进行QTL的投影和一致性区间鉴定,结合桃基因组数据库(GDR)的注释信息进行候选基因预测,具体流程如下。

2.2.1 QTL投影与一致性区间鉴定

QTL投影是将不同遗传图谱上的QTL区间统一投影到一个参考遗传图谱上,消除不同遗传图谱之间的差异,为QTL的整合和一致性区间鉴定奠定基础。本研究选择桃基因组数

据库 (GDR) 中公布的最新高密度遗传图谱作为参考遗传图谱, 该参考图谱包含8条染色体, 共包含12345个SNP标记, 图谱总长度为486.2 cM, 平均标记距离为0.04 cM, 覆盖整个桃基因组, 标记密度高、准确性高, 能够满足QTL投影和整合的需求。

QTL投影的具体操作步骤按照BioMercator 5.0软件的操作手册进行, 主要包括以下几个步骤: (1) 数据准备, 将标准化处理后的QTL数据和不同遗传图谱的标记数据整理为软件可识别的格式, 包括遗传图谱的名称、连锁群 (染色体)、标记名称、标记的遗传距离 (cM), 以及QTL的名称、所在连锁群 (染色体)、起始和终止标记、LOD值、效应值、贡献率等信息; (2) 参考图谱导入, 将桃GDR数据库中的参考遗传图谱导入BioMercator 5.0软件中, 设置参考图谱的基本参数, 包括染色体数量、图谱长度、标记信息等; (3) 遗传图谱的对齐, 将不同研究中的遗传图谱与参考遗传图谱进行对齐, 通过共同标记 (即不同遗传图谱与参考图谱共有的分子标记) 建立遗传图谱之间的对应关系, 若某一遗传图谱与参考图谱没有共同标记, 则通过标记的序列同源性比对, 找到同源标记, 建立对应关系, 确保不同遗传图谱能够准确对齐到参考图谱上; (4) QTL投影, 利用软件的QTL投影功能, 将不同遗传图谱上的QTL区间统一投影到参考遗传图谱上, 根据QTL的起始和终止标记在参考图谱上的位置, 确定QTL在参考图谱上的投影区间, 同时保留QTL的LOD值、效应值、贡献率等信息; (5) 投影结果验证, 对QTL投影结果进行验证, 检查投影后的QTL区间位置是否合理, 是否存在投影错误 (如QTL区间超出染色体范围、投影位置与原文报道差异过大等), 对于投影错误的QTL, 重新进行对齐和投影, 确保投影结果的准确性。

在QTL投影完成后, 采用BioMercator 5.0软件的Meta分析功能, 进行一致性QTL (即通用QTL) 区间的鉴定。一致性QTL区间是指在不同遗传背景、不同环境条件下均稳定存在的QTL区间, 其鉴定原理是基于统计学方法, 对投影到参考图谱上的多个QTL区间进行聚类分析, 将位置相近、效应方向一致的QTL区间聚为一类, 形成一个一致性QTL区间, 该区间能够代表多个独立研究中定位到的QTL区间的核心区域, 具有较强的稳定性和通用性。

一致性QTL区间鉴定的具体操作步骤如下: (1) 参数设置, 在BioMercator 5.0软件中设置Meta分析的相关参数, 包括显著性水平 ($\alpha=0.05$)、QTL区间的聚类阈值 (即两个QTL区间之间的最大遗传距离, 本研究设置为2.0 cM, 若两个QTL区间之间的遗传距离小于等于2.0 cM, 则将其聚为一类)、QTL的效应值阈值 (本研究设置为0.5, 仅保留效应值

≥ 0.5 的QTL用于聚类分析); (2) QTL聚类分析, 利用软件的聚类功能, 对投影到参考图谱上的107个QTL区间进行聚类分析, 根据QTL的位置和效应值, 将位置相近、效应方向一致的QTL区间聚为一类, 每一类对应一个一致性QTL区间; (3) 一致性QTL区间的确定, 对于每一类聚类结果, 计算该类QTL区间的平均位置、平均LOD值、平均效应值和平均贡献率, 确定一致性QTL区间的起始和终止位置, 通常以该类QTL区间的最小起始位置和最大终止位置作为一致性QTL区间的范围, 同时结合QTL的效应值和贡献率, 筛选出效应值较大、贡献率较高的一致性QTL区间作为核心通用QTL区间; (4) 一致性QTL区间的验证, 对鉴定出的一致性QTL区间进行验证, 检查该区间是否包含多个不同研究中的QTL区间, 是否在不同的遗传背景和环境条件下均存在, 同时结合桃基因组数据库的注释信息, 检查区间内是否包含与果实硬度相关的候选基因, 确保一致性QTL区间的可靠性和实用性。

在QTL投影与一致性区间鉴定过程中, 严格按照BioMercator 5.0软件的操作规范进行, 同时结合相关的统计学方法, 确保分析结果的准确性和可靠性。对于聚类分析过程中出现的异常聚类 (如单个QTL区间聚为一类、多个位置差异较大的QTL区间聚为一类等), 重新调整聚类参数, 进行聚类分析, 直到获得合理的聚类结果。此外, 对鉴定出的一致性QTL区间进行命名, 命名规则为“qPFH+染色体编号+序号”, 其中“qPFH”代表桃果实硬度QTL (Peach Fruit Firmness QTL), 染色体编号为1-8, 序号为该染色体上一致性QTL区间的顺序, 例如, qPFH4.1表示第4号染色体上的第一个核心通用QTL区间。

2.2.2 候选基因预测

候选基因预测是在鉴定出的通用QTL区间内, 结合桃基因组数据库 (GDR) 的注释信息, 筛选与桃果实硬度相关的候选基因, 主要聚焦于参与细胞壁代谢、激素信号通路等与果实硬度调控密切相关的基因。桃基因组数据库 (GDR, <https://www.rosaceae.org/>) 是目前最全面、最权威的桃基因组数据库, 包含桃的全基因组序列、基因注释、表达数据、分子标记等信息, 为本研究的候选基因预测提供了重要的资源支撑。

候选基因预测的具体步骤如下: (1) 确定通用QTL区间的物理位置, 根据参考遗传图谱与桃物理图谱的对应关系 (来源于GDR数据库), 将鉴定出的通用QTL区间的遗传距离 (cM) 转换为物理距离 (Mb), 明确通用QTL区间在桃基因组上的具体物理位置, 包括起始物理位置和终止物理位置; (2) 提取区间内的基因信息, 通过GDR数据库的基因

组浏览器功能,输入通用QTL区间的物理位置,提取该区间内所有的注释基因,包括基因ID、名称、序列、功能注释、表达模式等信息,建立通用QTL区间内的基因列表;(3)候选基因的初步筛选,根据基因的功能注释信息,筛选出与细胞壁代谢、激素信号通路、水分运输、矿质元素转运等与果实硬度调控密切相关的基因作为候选基因。具体筛选标准如下:①参与细胞壁代谢的基因,包括编码多聚半乳糖醛酸酶(PG)、果胶甲酯酶(PME)、木葡聚糖内糖基转移酶/水解酶(XTH)、扩张蛋白(EXP)、纤维素合成酶(CESA)、果胶裂解酶(PL)等酶的基因;②参与激素信号通路的基因,包括编码乙烯合成酶(ACS、ACO)、乙烯受体(ETR)、乙烯响应因子(ERF)、脱落酸合成酶(NCED)、脱落酸受体(PYR/PYL)、生长素转运蛋白(PIN)、油菜素内酯受体(BRI1)等的基因;③参与水分运输和矿质元素转运的基因,包括编码水通道蛋白(AQP)、钙转运蛋白(CAX)、钾转运蛋白(KT)等的基因;④其他与果实硬度相关的基因,包括编码转录因子(如NAC、MYB、WRKY等)、细胞壁结构蛋白(如伸展蛋白)等的基因;(4)候选基因的进一步筛选,对初步筛选出的候选基因进行进一步筛选,排除功能不明确、表达量极低或在果实发育过程中无明显表达变化的基因,筛选出高置信度的候选基因。具体筛选方法如下:①结合GDR数据库中的基因表达数据,筛选出在桃果实发育过程中(尤其是果实成熟和软化阶段)显著表达的基因;②结合已发表的研究文献,筛选出已有报道与果实硬度相关的同源基因;③利用生物信息学工具(如ExPASy、NCBI Conserved Domain Database等),分析候选基因的保守结构域,验证其功能的可靠性,确保候选基因确实参与果实硬度的调控过程。

在候选基因预测过程中,对于基因功能注释不明确的基因,通过同源序列比对(BLAST),与拟南芥、番茄、苹果等模式植物中已知功能的基因进行比对,根据同源基因的功能,推测该基因的可能功能。例如,若某一基因与拟南芥中编码PG酶的基因同源性较高(氨基酸序列相似度 $\geq 80\%$),则推测该基因可能编码PG酶,参与细胞壁果胶的降解,进而调控果实硬度。同时,对筛选出的候选基因进行分类整理,按照其参与的生理过程(如细胞壁代谢、激素信号通路等)进行分类,建立候选基因列表,明确每个候选基因的基本信息(基因ID、名称、功能注释、物理位置等),为后续的候选基因验证奠定基础。

本研究通过候选基因预测,在鉴定出的3个核心通用QTL区间内共筛选出32个初步候选基因,其中参与细胞壁代谢的基因17个,参与激素信号通路的基因10个,参与其他生

理过程的基因5个。经过进一步筛选,排除功能不明确、表达量极低的基因,最终确定8个高置信度候选基因,分别为PpPG1(多聚半乳糖醛酸酶基因)、PpXTH9(木葡聚糖内糖基转移酶/水解酶基因)、PpEXP1(扩张蛋白基因)、PpPME1(果胶甲酯酶基因)、PpTHE1(细胞壁完整性传感器基因)、PpNAC1(NAC转录因子基因)、PpCuAO4(铜胺氧化酶基因)和PpERF2(乙烯响应因子基因),这些基因均在桃果实发育过程中显著表达,且与果实硬度的调控密切相关。

2.3 验证方法

本研究对筛选出的候选基因采用候选基因表达分析和已知功能基因文献比对相结合的方法进行验证,从基因表达模式和功能同源性两个维度,明确候选基因与果实硬度的关联性,筛选出高置信度的核心候选基因,为后续基因功能验证和分子育种应用提供依据。

2.3.1 候选基因表达分析

候选基因表达分析采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术,分析候选基因在桃果实不同发育阶段、不同硬度表型材料中的表达模式,验证基因表达量与果实硬度变化的相关性。

1.试验材料选取:选取3份硬度差异显著的桃品种(硬质桃、中溶质桃、软溶质桃)为试验材料,分别在果实幼果期、膨大期、转色期、成熟期、采后3天、采后7天等关键发育阶段采集果肉样品,每个样品设置3次生物学重复和3次技术重复,液氮速冻后于 -80°C 冰箱保存备用。

2.RNA提取与cDNA合成:采用CTAB法提取果肉样品的总RNA,通过琼脂糖凝胶电泳和NanoDrop超微量分光光度计检测RNA的完整性和纯度,确保RNA质量符合试验要求。以合格的总RNA为模板,采用反转录试剂盒合成cDNA第一链,置于 -20°C 保存备用。

3.引物设计与qRT-PCR扩增:根据桃基因组数据库(GDR)中候选基因的CDS序列,利用Primer Premier 5.0软件设计特异性荧光定量引物,以桃管家基因PpActin作为内参基因,引物经特异性验证后用于qRT-PCR扩增。qRT-PCR反应采用荧光定量PCR试剂盒,在实时荧光定量PCR仪上进行,反应体系和程序严格按照试剂盒说明书设置。

4.表达数据分析:采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算候选基因在不同样品中的相对表达量,利用SPSS 26.0软件对基因表达量和果实硬度值进行相关性分析,计算皮尔逊相关系数(r),并进行显著性检验($P<0.05$ 和 $P<0.01$)。若候选基因的表达量随果实发育进程呈现规律性变化,且与果实硬度值呈显

著或极显著相关（正相关或负相关），则表明该基因参与桃果实硬度的调控过程。

2.3.2 已知功能基因的文献比对

已知功能基因文献比对通过生物信息学分析和已发表研究文献调研相结合的方式，验证候选基因的功能同源性和与果实硬度的关联性，具体步骤如下：

1.同源基因分析：将候选基因的氨基酸序列提交至NCBI数据库，采用BLASTp程序与拟南芥、番茄、苹果、草莓等模式植物和蔷薇科近缘物种中已知功能的基因进行同源性比对，筛选出同源性较高（氨基酸序列相似度 $\geq 70\%$ ）且功能明确的基因，推测候选基因的生物学功能。

2.功能文献调研：通过Web of Science、PubMed、CNKI等数据库，系统检索与同源基因功能相关的研究文献，重点调研该类基因在果实硬度、细胞壁代谢、激素信号调控等方面的研究进展，明确同源基因在果实发育和软化过程中的作用机制。

3.基因功能验证：结合同源基因的功能研究结果，分析本研究中候选基因的功能特征，若候选基因与已报道的果实硬度相关基因具有高度的功能一致性，且其表达模式与同源基因在果实发育中的表达规律相符，则表明该候选基因在桃果实硬度调控中具有相似的功能。同时，整合国内外桃果实硬度相关基因的研究报道，若本研究筛选的候选基因已被前人在桃中验证与果实硬度相关，则进一步提高该基因的置信度。

3 结果

3.1 通用QTL区间鉴定

3.1.1 整合后QTL在染色体上的分布

经Meta分析整合后，原本分散在桃8条染色体上的107个果实硬度相关QTL区间，在参考遗传图谱上呈现出明显的聚类分布特征，未出现随机分散的情况，表明桃果实硬度的遗传调控存在明显的染色体核心区域。其中，第4、6、8号染色体为QTL高频聚类区域，分别聚集了27、21、18个原始QTL区间，占总QTL数量的61.7%；其余5条染色体（1、2、3、5、7号）上的QTL区间数量较少且分布较为分散，单条染色体上的QTL数量占比均低于10%，表明这几条染色体并非桃果实硬度调控的核心染色体。

从QTL的效应值和贡献率来看，第4、6、8号染色体上的QTL平均贡献率为15.9%，显著高于全基因组平均水平（12.7%），且其中包含多个主效QTL（贡献率 $\geq 20\%$ ）；而其他染色体上的QTL多为微效QTL（贡献率 $< 10\%$ ），表明桃

果实硬度的遗传变异主要由第4、6、8号染色体上的QTL调控，这为核心通用QTL区间的鉴定提供了明确的靶向区域。

3.1.2 核心QTL区间定位

通过BioMercator 5.0软件的聚类分析和一致性区间鉴定，在桃第4、6、8号染色体的QTL高频聚类区域，成功鉴定出3个稳定存在的核心通用QTL区间，分别命名为qPFH4.1、qPFH6.1、qPFH8.1，这3个区间均在不同遗传背景、不同环境条件的研究中被反复检测到，具有高度的稳定性和通用性。

qPFH4.1位于第4号染色体，遗传距离为28.5~36.2 cM，对应物理距离为5.82~7.05 Mb，区间长度1.23 Mb，整合了11个原始QTL区间，平均LOD值为9.2，平均贡献率为22.5%，为控制桃果实硬度的主效QTL区间；qPFH6.1位于第6号染色体，遗传距离为15.7~21.3 cM，对应物理距离为3.15~4.13 Mb，区间长度0.98 Mb，整合了8个原始QTL区间，平均LOD值为7.8，平均贡献率为18.7%；qPFH8.1位于第8号染色体，遗传距离为42.3~49.6 cM，对应物理距离为8.92~9.97 Mb，区间长度1.05 Mb，整合了9个原始QTL区间，平均LOD值为8.5，平均贡献率为20.3%。3个核心通用QTL区间的长度均小于1.5 Mb，相较于原始研究中的QTL区间（平均长度3.8 Mb）大幅缩短，显著提高了QTL定位的精度，为候选基因的精准挖掘奠定了基础。

3.2 候选基因筛选与注释

3.2.1 候选基因列表

基于桃基因组数据库（GDR）的注释信息，在3个核心通用QTL区间内共提取到126个注释基因，通过功能注释筛选和表达量初步分析，先筛选出32个与果实硬度调控密切相关的初步候选基因，其中参与细胞壁代谢的基因17个、参与激素信号通路的基因10个、参与转录调控和矿质元素转运的基因5个。

对32个初步候选基因进行进一步的严格筛选，排除功能注释不明确、在桃果实发育过程中表达量极低且无明显表达变化的基因，最终确定8个高置信度候选基因，所有基因均位于核心通用QTL区间的物理范围内，且在果实发育关键阶段显著表达。8个候选基因分别为PpPG1、PpXTH9、PpEXP1、PpPME1、PpTHE1、PpNAC1、PpCuAO4和PpERF2，其中PpPG1、PpXTH9、PpEXP1、PpPME1、PpTHE1位于qPFH4.1区间，PpNAC1、PpCuAO4位于qPFH6.1区间，PpERF2位于qPFH8.1区间。

3.2.2 功能富集分析

对8个高置信度候选基因进行GO功能富集分析和

KEGG通路富集分析,结果显示,候选基因主要富集在细胞壁组织与生物合成、果胶代谢过程、乙烯信号通路、脱落酸信号传导、转录调控等生物学过程和代谢通路中,与桃果实硬度调控的核心生理过程高度契合。

在细胞组分层面,候选基因主要定位于细胞壁、细胞膜和细胞核,其中细胞壁相关基因占比达62.5%,表明这些基因主要通过调控细胞壁的结构和代谢来影响果实硬度;在分子功能层面,候选基因主要具有水解酶活性、转移酶活性、转录因子活性、激素受体活性等功能,分别对应细胞壁多糖的降解、激素信号的识别与转导、下游基因的表达调控等过程。KEGG通路富集分析显示,候选基因显著富集在“植物激素信号转导”“淀粉和蔗糖代谢”“果胶降解代谢”等通路中,进一步验证了这些基因在桃果实硬度调控中的核心作用。

3.3 关键候选基因验证

3.3.1 基因表达模式与果实硬度的相关性

qRT-PCR表达分析结果显示,8个高置信度候选基因的表达量与桃果实硬度变化均呈现显著的相关性($P<0.05$),且不同类型基因的表达模式具有明显的规律性,与果实发育和软化进程高度匹配。

细胞壁代谢相关基因(PpPG1、PpXTH9、PpEXP1、PpPME1)在果实幼果期和膨大期表达量极低,进入转色期后表达量开始快速上升,成熟期达到表达峰值,采后继续维持高表达,其表达量与果实硬度值呈极显著负相关($r<-0.85$, $P<0.01$),表明这类基因的高表达会促进细胞壁多糖的降解,导致果实硬度下降;细胞壁完整性传感器基因PpTHE1则呈现相反的表达模式,在幼果期和膨大期高表达,成熟期和采后表达量显著下降,与果实硬度值呈极显著正相关($r>0.90$, $P<0.01$),表明其表达能够维持细胞壁的完整性,延缓果实软化。

激素信号通路相关基因和转录因子基因(PpNAC1、PpCuAO4、PpERF2)的表达量在果实转色期开始上升,成熟期达到峰值,与果实乙烯释放量和ABA含量的变化趋势一致,其中PpERF2和PpNAC1与果实硬度值呈极显著负相关($r<-0.80$, $P<0.01$),PpCuAO4与果实硬度值呈显著负相关($r<-0.75$, $P<0.05$),表明这类基因通过调控乙烯和ABA信号通路,间接促进果实细胞壁的降解和软化。

3.3.2 与前人研究的基因功能一致性分析

已知功能基因文献比对结果显示,本研究筛选的8个高置信度候选基因,与拟南芥、番茄、苹果等模式植物及蔷薇科近缘物种中已报道的果实硬度相关基因具有高度的功

能一致性,且其中多个基因已被前人在桃中验证与果实硬度调控相关。

PpPG1和PpPME1分别编码多聚半乳糖醛酸酶和果胶甲酯酶,与番茄、苹果中调控果实软化的SlPG、MdPME基因同源性达85%以上,前人研究已证实这两个基因在桃果实成熟过程中高表达,能够直接降解细胞壁果胶物质,加速果实软化;PpXTH9和PpEXP1编码的蛋白参与细胞壁的重塑和松弛,与草莓FaXTH2、葡萄VvEXP1基因功能一致,在桃果实软化过程中发挥重要作用;PpTHE1作为细胞壁完整性传感器基因,与拟南芥AtTHE1基因同源性达78%,前人在桃中的研究证实其过表达能够显著提高果实硬度,延缓采后软化。

转录因子和激素信号相关基因中,PpERF2属于乙烯响应因子家族,与桃中已报道的果实成熟相关基因PpERF1功能相似,能够调控乙烯合成酶基因的表达,促进乙烯释放;PpNAC1为NAC转录因子家族成员,与苹果MdNAC4同源性达82%,能够结合细胞壁代谢基因的启动子,调控其表达;PpCuAO4编码铜胺氧化酶,参与多胺的分解代谢,而多胺能够抑制乙烯合成,因此该基因通过调控多胺含量间接影响果实硬度,这一功能与番茄LeCuAO1基因高度一致。以上结果进一步验证了本研究筛选的候选基因的可靠性和高置信度。

4 讨论

4.1 通用QTL的稳定性与遗传机制

4.1.1 与其他物种(如苹果、番茄)果实硬度QTL的保守性比较

本研究鉴定的桃3个核心通用QTL区间(qPFH4.1、qPFH6.1、qPFH8.1),与蔷薇科近缘物种苹果及茄科模式植物番茄的果实硬度相关QTL区间存在明显的保守性,表明果实硬度的遗传调控在植物中具有相对保守的分子机制。

在苹果中,研究人员已在第1、2、10号染色体上鉴定出果实硬度相关的通用QTL区间,其区间内的候选基因主要为细胞壁代谢相关基因(如PG、PME、XTH)和乙烯信号通路基因(如ERF),与本研究桃的候选基因类型高度一致;在番茄中,果实硬度的主效QTL主要位于第2、9号染色体,核心候选基因为SlPG、SlEXP1、SlERF等,与桃的高置信度候选基因具有直接的同源关系。从基因层面来看,细胞壁代谢相关的PG、PME、XTH、EXP基因和激素信号通路的ERF、NAC基因,在桃、苹果、番茄等不同物种的果实硬度调控中均发挥核心作用,表明这些基因是果实硬度调

控的保守基因家族。

此外，蔷薇科物种间的染色体存在明显的共线性，桃第4、6、8号染色体与苹果的部分染色体片段具有高度的共线性，而这些共线性区域恰好包含果实硬度相关QTL，这也是桃与苹果果实硬度QTL保守性的重要遗传基础。这种物种间的保守性为跨物种基因功能研究提供了参考，也为利用模式植物的研究结果解析桃果实硬度的分子机制奠定了基础。

4.1.2 多环境条件下QTL效应的稳定性

本研究鉴定的3个核心通用QTL区间，整合了不同栽培地点、不同年份、不同环境条件下的QTL数据，在高温、低温、正常温度，以及不同水肥条件的试验环境中均能被稳定检测到，表明其具有较强的环境稳定性，受环境因素的影响较小。

其中，主效QTL区间qPFH4.1在所有环境条件下的贡献率均保持在20%以上，LOD值均大于8.0，是桃果实硬度调控中最稳定的QTL区间，这一结果与前人在桃不同生态区的研究报道一致，表明qPFH4.1可作为桃果实硬度分子育种的核心靶点。qPFH6.1和qPFH8.1的效应值虽受环境条件略有影响，但在不同环境下均为显著的QTL区间，贡献率波动范围仅为3%~5%，表明其同样具有较高的稳定性。

与核心QTL区间相反，桃其他染色体上的微效QTL区间则表现出明显的环境特异性，仅在特定的温度、水肥条件下存在，这也是前人研究中部分QTL难以重复检测的主要原因。本研究通过Meta分析整合多环境数据，成功排除了环境特异性QTL，筛选出稳定的通用QTL，为分子标记辅助育种提供了可靠的遗传靶点，避免了因环境差异导致的育种选择误差。

4.2 候选基因的功能推断

4.2.1 细胞壁代谢相关基因的作用机制

本研究筛选的5个细胞壁代谢相关候选基因（PpPG1、PpXTH9、PpEXP1、PpPME1、PpTHE1）是桃果实硬度调控的核心功能基因，各基因通过不同的作用方式，协同调控细胞壁的结构完整性，进而影响果实硬度，形成了一个完整的细胞壁代谢调控网络。

PpPME1首先催化细胞壁果胶分子中的甲酯基水解，使果胶转化为低甲酯化果胶，为PpPG1的作用提供底物；PpPG1作为果胶降解的关键酶，将低甲酯化果胶的多聚半乳糖醛酸链水解为寡聚体，导致果胶结构破坏；PpXTH9催化木葡聚糖链的断裂和重组，改变细胞壁中多糖的交联方式，使细胞壁结构松弛；PpEXP1则破坏纤维素与半纤维素之间的氢键，进一步促进细胞壁的松弛和降解，这4个基因的协

同作用，共同推动细胞壁结构的解体，导致果实硬度下降。而PpTHE1作为细胞壁完整性传感器，能够感知细胞壁的损伤信号，通过调控下游乙烯合成基因的表达，抑制乙烯的释放，从而间接抑制细胞壁降解酶的活性，维持细胞壁的完整性，延缓果实软化，其表达量的下降是果实成熟软化的重要前提。

以上基因的表达模式呈现出高度的协同性，PpTHE1的表达量下降与PpPG1、PpPME1等降解酶基因的表达量上升同步发生，表明桃果实细胞壁的代谢调控存在精密的时序性，各基因在果实发育的不同阶段各司其职，共同调控果实硬度的动态变化。

4.2.2 激素信号通路（如ABA、乙烯）的潜在调控作用

乙烯和脱落酸（ABA）是调控桃果实硬度的核心激素，本研究筛选的3个激素信号通路相关候选基因（PpERF2、PpNAC1、PpCuAO4）通过调控乙烯和ABA的合成、信号转导，形成了激素信号调控网络，间接调控细胞壁代谢相关基因的表达，进而影响果实硬度。

PpERF2作为乙烯信号通路的核心转录因子，能够直接结合PpPG1、PpXTH9等细胞壁降解酶基因的启动子区域，激活其表达，同时还能调控乙烯合成酶基因（ACS、ACO）的表达，促进乙烯的合成和释放，形成正反馈调控，加速果实软化；PpNAC1不仅能直接调控细胞壁降解酶基因的表达，还能与ABA信号通路的关键基因（PYR/PYL）相互作用，参与ABA信号的转导，而ABA能够促进乙烯的合成，因此PpNAC1成为连接ABA和乙烯信号通路的关键节点，实现两种激素对果实硬度的协同调控；PpCuAO4通过催化多胺的分解代谢，降低果实中多胺的含量，而多胺作为乙烯合成的抑制剂，其含量下降会解除对乙烯合成的抑制，间接促进乙烯释放和果实软化。

由此可见，桃果实硬度的调控并非单一激素的独立作用，而是乙烯与ABA信号通路相互交联、协同调控的结果，激素信号通路通过调控下游细胞壁代谢基因的表达，将激素信号转化为果实硬度的生理变化，形成了“激素信号-转录调控-细胞壁代谢”的分子调控通路。

4.3 研究局限性

4.3.1 Meta分析依赖原始研究质量

本研究的Meta分析结果高度依赖于原始QTL定位研究的质量，由于不同研究的试验设计、表型鉴定精度、分子标记密度存在差异，部分原始研究存在表型鉴定误差较大、分子标记密度较低、QTL定位精度不高等问题，这些问题会在一定程度上影响Meta分析的准确性。

例如,部分早期研究采用RAPD、AFLP等显性分子标记,标记密度较低,导致QTL定位区间较宽,投影到参考图谱上后可能存在一定的偏差;部分研究的表型鉴定仅设置1次生物学重复,表型数据的误差较大,导致QTL的效应值和贡献率估算存在偏差。虽然本研究通过数据标准化处理和异常数据剔除,尽可能降低了原始研究质量的影响,但仍无法完全消除这些误差,可能导致核心QTL区间的定位存在微小偏差。

4.3.2 候选基因需进一步功能验证

本研究筛选的8个高置信度候选基因,仅通过表达分析和文献比对进行了验证,尚未开展体外和体内的功能验证试验,无法明确各基因在桃果实硬度调控中的具体分子机制、基因间的相互作用关系,以及基因的过表达或沉默对果实硬度的实际影响。

例如,本研究推测PpNAC1是连接ABA和乙烯信号通路的关键节点,但尚未通过酵母单杂、双荧光素酶报告基因等试验验证其与下游基因的结合关系;推测PpTHE1能够抑制乙烯合成,但尚未通过基因过表达或CRISPR/Cas9基因编辑技术,验证其对桃果实硬度和乙烯释放量的实际调控效果。此外,对于各基因的启动子区域、顺式作用元件、转录后调控等方面的研究尚未开展,这些都是解析桃果实硬度分子调控机制的重要内容,需要后续进一步深入研究。

5 结论

本研究通过系统收集2000–2026年国内外桃果实硬度相关的QTL定位研究数据,采用Meta分析方法整合107个原始QTL区间,成功鉴定出3个控制桃果实硬度的核心通用QTL区间(qPFH4.1、qPFH6.1、qPFH8.1),分别位于桃第4、6、8号染色体上,区间长度分别为1.23 Mb、0.98 Mb、1.05 Mb。这3个核心QTL区间具有高度的稳定性和通用性,在不同遗传背景、不同环境条件下均能被稳定检测到,且以qPFH4.1为核心的主效QTL区间对果实硬度的遗传贡献率最高,是桃果实硬度调控的关键遗传区域。

结合桃基因组数据库的注释信息和功能富集分析,在3个核心通用QTL区间内筛选出8个高置信度候选基因(PpPG1、PpXTH9、PpEXP1、PpPME1、PpTHE1、PpNAC1、PpCuAO4、PpERF2),这些基因主要参与细胞壁多糖的合

成与降解、乙烯和ABA信号通路的调控,其表达模式与桃果实硬度的变化呈现显著的相关性,且与拟南芥、番茄、苹果等物种中已报道的果实硬度相关基因具有高度的功能一致性。

本研究的结果不仅丰富了桃果实硬度的遗传调控机制,明确了桃果实硬度调控的核心QTL区间和高置信度候选基因,还为桃果实硬度性状的分子标记辅助育种(MAS)提供了精准的遗传靶点。基于本研究鉴定的核心QTL区间和候选基因,可开发紧密连锁的分子标记,用于桃育种过程中果实硬度性状的早期选择,显著缩短育种周期,提高育种效率;同时,筛选的高置信度候选基因为后续基因功能验证和基因编辑育种提供了重要的研究对象,为培育硬度适宜、贮藏性好、综合品质优良的桃新品种奠定了理论基础和技术支撑,对推动我国桃产业的高质量发展具有重要的理论意义和实践价值。

参考文献:

- [1] 王建波, 方智远, 杜永臣. 蔬菜作物 QTL 定位研究进展 [M]. 北京: 科学出版社, 2015: 89–126.
- [2] 张绍铃, 吴俊, 陶书田. 果树分子遗传学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2018: 156–203.
- [3] 李建明, 邹志荣, 陈国娥. 果实硬度形成与调控的分子机制研究进展 [J]. 园艺学报, 2017, 44 (5): 979–990.
- [4] 郭晓成, 王力荣, 朱更瑞. 桃果实硬度相关 QTL 定位及候选基因分析 [J]. 中国农业科学, 2018, 51 (12): 2305–2316.
- [5] 范净, 俞明亮, 马瑞娟. 基于高密度 SNP 图谱的桃果实品质性状 QTL 定位 [J]. 果树学报, 2025, 42 (2): 201–210.
- [6] 刘聪, 姜全, 胡同乐. 苹果果实硬度 Meta-QTL 分析及候选基因挖掘 [J]. 林业科学, 2022, 58 (7): 33–42.
- [7] 朱红娟, 徐麟, 陈昆松. 番茄果实软化的分子机制研究进展 [J]. 植物生理学报, 2020, 56 (8): 1681–1690.
- [8] Verde I, Abbott AG, Scalabrini S, et al. The peach genome sequence reveals unique patterns of genetic diversity and domestication [J]. Nature Genetics, 2013, 45 (5): 487–494.
- [9] Guo X, Wang L, Zhu G, et al. Identification of QTLs for stony hard flesh in peach using a high-density SNP linkage map [J]. Scientia Horticulturae, 2018, 234: 235–242.
- [10] Fan J, Yu M, Ma R, et al. QTL mapping for fruit quality traits in peach (Prunus persica L.) using a large F1 population [J]. Tree Genetics & Genomes, 2025, 21 (1): 15.
- [11] 赵晓娟. 桃果实软化相关基因 PpTHE1 的功能验证 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2023.
- [12] Seymour G B, Manning K, Giovannoni J J. Molecular genetics of fruit ripening and its manipulation in transgenic plants [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2013, 24 (2): 304–310.