果 树 学 报 2026,43(10):2677-2693
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.202600501

梨PPO基因家族全基因组鉴定及其参与果实褐变的转录表达分析

丁 勇[1],张向展[1,2],王亚楠[1],王 龙[1,2],王苏珂[1],苏艳丽[1],薛华柏[1,2*]

([1]中国农业科学院郑州果树研究所•国家园艺种质资源库•果蔬园艺作物种质创新与利用全国重点实验室,郑州 450009;[2]楚雄云果产业技术研究院,云南楚雄 675000)

摘 要:【目的】系统阐明梨PPO基因家族的分子特征与生物学功能,为深入解析梨*PPO*基因的调控机制,开展梨抗褐变种质创新与分子育种提供重要的理论依据。**【方法】**基于4个梨种质的高质量基因组数据,采用生物信息学方法,系统鉴定PPO基因家族成员,解析其编码蛋白的理化性质、基因结构、保守基序、启动子顺式元件及跨物种共线性进化特征;结合梨果实鲜切处理转录组数据,明确*PPO*基因在酪氨酸代谢与苯丙烷代谢通路中的调控作用;并采用RT-qPCR技术,分析核心基因*PpyPPO10*在果实不同发育期的表达动态及不同组织的特异性表达模式。**【结果】**4个梨属不同种质的*PPO*基因均定位于5号和10号染色体,染色体分布特征高度保守;所有PPO编码蛋白均含有典型的PPO保守结构域,为亲水性不稳定蛋白。梨*PPO*基因启动子区域富集大量光响应、激素应答及逆境胁迫相关顺式作用元件;*PpyPPO10*在果实不同发育时期存在显著的表达差异,具有明显的组织特异性表达特征。**【结论】**在梨属4个代表性种质基因组中鉴定出8~10个高度保守的*PPO*家族基因,这类基因的关键成员可协同酪氨酸代谢与苯丙烷代谢通路调控果实多酚物质积累,在梨果实发育过程中呈现差异化表达模式,是调控梨果实褐变的关键基因家族。

关键词:梨;PPO基因家族;果肉褐变;表达分析

中图分类号:S661.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2026)10-2677-17

Genome-wide identification of the PPO gene family in pear and transcriptional analysis of its members involved in fruit flesh browning

Ding Yong[1], Zhang Xiangzhan[1, 2], Wang Yanan[1], Wang Long[1, 2], Wang Suke[1], Su Yanli[1], Xue Huabai[1, 2*]

([1]Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Horticultural Germplasm Resources Center/National Key Laboratory for Germplasm Innovation & Utilization of Horticultural Crops, Zhengzhou 450009, Henan, China; [2]Chuxiong Yunguo Agriculture Technology Research Institute, Chuxiong 675000, Yunnan, China)

Abstract:【Objective】Pear (*Pyrus* L.) is an economically important fruit crop worldwide, with significant nutritional and health-promoting properties due to its abundant phenolic compounds. However, postharvest fruit browning, particularly in fresh-cut products, severely impairs commercial quality and shelf life, representing a major constraint for the pear industry. Enzymatic browning, which is primarily mediated by polyphenol oxidase (PPO), occurs when cellular compartmentalization is disrupted upon tissue damage, allowing PPO to oxidize endogenous phenolic substrates to highly reactive quinones that subsequently polymerize into dark pigments. Despite the pivotal role of PPO in fruit browning, the PPO gene family in pear has not been systematically characterized across multiple representative germplasms, and the evolutionary dynamics, structural diversity, and functional differentiation of its mem-

收稿日期:2026-07-13 **接受日期:**2026-08-07

基金项目:中国农业科学院郑州果树研究所科研业务费专项(ZGS202607);国家现代农业产业技术体系(CARS-28);国家自然科学基金(32202439、U24A20415);国家重点研发计划(2023YFD1600803);河南省重点研发专项(241111113500);中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP);河南省科技攻关项目(252102110315、252102111153);河南省国际科技合作项目(242102521063);新疆维吾尔自治区重大科技专项(2024A02006-1)

作者简介:丁勇,男,在读硕士研究生,研究方向为果树遗传育种。E-mail:18438897121@163.com

***通信作者** Author for correspondence. E-mail:xuehuabai@caas.cn

bers remain poorly understood. This study aims to characterize the PPO gene family in four representative pear varieties, including Yunhong No.1 (sand pear), Dangshansu (white pear), Max Red Bartlett (European pear) and Shanxiduli (wild pear), to analyze their physicochemical properties, and to explore the expression patterns of *PPO* members during fruit development and in different tissues.【Methods】High-quality genome assemblies of the four pear species were obtained from the GDR database and the Pear Genome Database. *PPO* candidate genes were initially screened using HMMER 3.0 with the PPO characteristic domain (PF00264) from the Pfam database, followed by BLAST homology searches (E-value $< 10^{-5}$). All candidate sequences were further validated using NCBI-CDD and Pfam tools to confirm the presence of conserved PPO domains. Physicochemical properties, including polypeptide length, molecular weight, theoretical isoelectric point (pI), instability index, and grand average of hydropathicity (GRAVY), were predicted using ExPASy. Subcellular localization was determined *via* Plant-mPLoc, and three-dimensional protein structures were modeled using Swiss-Model. Chromosomal localization and interspecific synteny analysis were performed using TBtools, while phylogenetic trees were constructed using MEGA 11 with the maximum-likelihood (ML) method and 1000 bootstrap replicates. Gene structures were visualized using GSDS 2.0, and conserved motifs were identified using MEME. Promoter regions (2 kb upstream of the start codon) were analyzed via PlantCARE to identify cis-acting regulatory elements. Transcriptome data from fresh-cut pear fruits of the browning-resistant cultivar Hongxiangsu (HXS) and the susceptible cultivar Mantianhong (MTH) were generated by RNA-seq and analyzed to map the expression of genes involved in phenylpropanoid and tyrosine metabolic pathways. Additionally, RT-qPCR was performed to validate the expression dynamics of the core gene *PpyPPO10* at different fruit developmental stages (70−120 days after full bloom) and in various tissues including pedicel, receptacle, anther, sepal, petiole, leaf, peel, and flesh. All RT-qPCR experiments included three biological replicates and three technical replicates, with *PpyTubulin* as the internal reference gene, and relative expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.【Results】A total of 8−10 conserved *PPO* genes were identified, predominantly clustered at the terminal regions of Chr05 and Chr10. The encoded proteins were hydrophilic, with 586−941 amino acids, varying molecular weights, isoelectric points (5.39−8.40), and instability indices (37.85−52.21); most were predicted to localize to the cytoplasm, chloroplasts, or nucleus, except one extracellular member. Phylogenetic analysis divided all pear PPOs into nine subgroups, with the majority falling into Group Ⅰ. Pear *PPO* genes shared high homology with those of apple and peach, but diverged greatly from non-Rosaceae crops. Strong syntenic blocks were detected between pear Chr05/Chr10 and apple Md5/Md10, whereas collinear fragments with peach and strawberry were scattered due to differing chromosome numbers. Ten conserved motifs and canonical PPO catalytic domains were identified, and gene promoters harbored abundant cis-elements responsive to light, phytohormones, and abiotic stresses. Combined with transcriptome data from the sand pear Yunhong No.1, it was confirmed that pear PPOs modulate the biosynthesis of caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, and other phenolics through the tyrosine and phenylpropane pathways. The core gene *PpyPPO10* showed the closest evolutionary relationship with apple *MdPPO*, and also clustered closely with PPO homologs from other woody plants, including peach, poplar, and tea. RT-qPCR results revealed that *PpyPPO10* expression was significantly higher in the browning-resistant cultivar Hongxiangsu than in the sensitive Mantianhong, with maximal transcript abundance in flesh and moderate levels in peel.【Conclusion】This study systematically characterizes the PPO gene family in four representative pear species, revealing that 8−10 conserved members, which share high evolutionary conservation with Rosaceae homologs, are organized as tandem arrays on Chr05 and

Chr10, and encode hydrophilic proteins with typical PPO domains. The core gene *PpyPPO10*, identified as a key candidate regulating flesh browning, integrates signals from light, phytohormones, and abiotic stresses through its promoter, and coordinately modulates phenolic biosynthesis via the tyrosine and phenylpropanoid pathways. Its enhanced expression in browning-resistant cultivars and flesh-specific accumulation pattern underscore its pivotal role in browning regulation. These findings provide essential candidate genes and theoretical support for molecular breeding aimed at developing browning-resistant pear varieties, and lay a foundation for further functional validation of *PPO* genes in fruit quality regulation.

Key words: Pear; PPO gene family; Flesh browning; Expression analysis

梨是蔷薇科（Rosaceae）梨属（*Pyrus* L.）植物，是全球重要的果树树种，也是我国三大水果之一[1]。梨果实富含维生素、氨基酸及酚类等抗氧化活性物质，兼具营养与食疗保健价值[2]。然而，鲜切梨在采后贮运过程中极易发生品质劣变，其中氧化褐变问题尤为突出[3]，严重制约了梨产业的高质量发展[4]。

酶促褐变是鲜切果实加工贮藏过程中的主要褐变类型[5]。该过程发生于有氧条件下，果实细胞结构受损后，胞内氧化酶与酚类底物接触并将其氧化为醌类中间体，醌类进一步与氨基酸、蛋白质等聚合，最终形成黑褐色色素聚合物[6]。大量研究表明，多酚氧化酶（PPO）是介导酶促褐变的关键酶，其基因表达水平与酶活性直接决定果实褐变速率与严重程度[7]。酚类化合物作为酶促褐变的反应底物，是影响褐变进程的重要物质基础[8]。植物酚类物质主要经由苯丙烷和酪氨酸代谢途径合成[9]。其中，绿原酸、阿魏酸、咖啡酸、儿茶素等酚类物质具有较强的抗氧化活性[10-13]，可在褐变初期通过清除自由基延缓褐变进程。然而，随着氧化产物积累，其抗氧化作用逐渐丧失[14]。因此，酚类底物的代谢稳态是调控鲜切果实酶促褐变的核心因素。

目前，已在苹果（*Malus domestica*）[15]、马铃薯（*Solanum tuberosum*）[16]、茶树（*Camellia sinensis*）[17]、香蕉（*Musa acuminata*）[18]、丝瓜（*Luffa aegyptiaca*）[19]、茄子（*Solanum melongena*）[20]等多个物种中完成了PPO基因家族全基因组鉴定与功能解析。大量试验证实，*PPO*基因的转录受机械损伤、低温胁迫及植物激素等多种因子协同调控[21-22]。功能研究表明，*PPO*基因是调控植物褐变与胁迫响应的核心靶标。苹果转录因子*MdbZIP44*可通过结合并激活*MdPPO2*启动子，正向调控果实褐变进程[23]；沉默马铃薯块茎多个*StuPPO*基因可显著降低PPO酶活性，有效抑制块茎酶促褐变发生[24]；茶树*CsPPO3*可响应遮光、干旱胁迫，通过调控儿茶素氧化过程参与茶叶品质形成[25]；香蕉*MaPPO1*可响应脱落酸信号，介导果实采后褐变[18]；丝瓜*LcPPO2*可特异性催化咖啡酸氧化，是果肉褐变的关键功能基因[26]。此外，通过CRISPR/Cas9编辑茄子*SmelPPO4/5/6*，可显著降低果实PPO活性，有效缓解果肉褐变[27]。综上所述，PPO基因家族是调控园艺作物果实褐变性状、介导逆境响应的核心基因家族，具备重要的育种应用价值。

相比苹果、茄子等物种，梨PPO基因家族的系统性鉴定及功能机制研究仍相对薄弱，缺乏多种质间对比、进化特征及代谢调控的系统性分析。基于此，本研究以梨属4个代表性种质为研究材料，通过全基因组生物信息学分析，系统鉴定梨PPO基因家族成员，解析其蛋白理化性质、基因结构、保守基序、启动子顺式元件及跨物种共线性分析；并结合转录组数据与实时荧光定量PCR技术，阐明*PPO*基因在酪氨酸、苯丙烷代谢通路中的调控作用，分析核心*PPO*基因在果实不同发育时期、不同组织中的表达模式。本研究旨在筛选调控梨果实褐变的关键*PPO*基因，揭示其对果实褐变的调控作用，为梨抗褐变优质种质创制与分子遗传育种提供关键基因资源和理论依据。

1　材料和方法

1.1　试验材料

基因组鉴定与生物信息学分析所用的4个类型梨属代表性梨种质，分别为砂梨云红1号、白梨砀山酥梨、西洋梨Max Red Bartlett和野生梨山西杜梨；转录组测序与RT-qPCR验证所用的试验材料为抗褐变品种红香酥和易褐变品种满天红。试验材料

取自中国农业科学院郑州果树研究所梨种质资源圃（国家园艺种质资源库郑州梨分库）（东经113°42′，北纬34°48′）。挑选长势均一的红香酥与满天红健康梨树各3株，采集花梗、花托、花药、萼片、叶柄、叶片、果皮、果肉组织；于盛花后70~120 d，每10 d分期采收果肉样品。组织样品经液氮快速冷冻后，置于−80 ℃超低温冰箱保存备用。

1.2 梨*PPO*基因的鉴定及理化性质分析

梨、苹果、桃和草莓基因组序列下载自蔷薇科基因组数据库和梨基因组数据库GDR（https://www.rosaceae.org/和 http://pyrusgdb.sdau.edu.cn/index.html），其余物种基因组数据来源于Plant2T数据库（https://bis.zju.edu.cn/plant2t/home）。基于Pfam数据库中PPO特征结构域（PF00264）的隐马尔可夫模型文件，利用HMMER3.0对基因组序列进行批量筛选，初步筛选*PPO*候选基因；同时对获得的序列进行BLAST同源比对，筛选标准设置E值＜10^{-5}。为确保鉴定结果的可靠性，进一步采用NCBI-CDD（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）和Pfam在线工具对候选序列进行保守结构域双重验证，最终确定梨PPO基因家族成员。

利用ExPASy在线工具（http://web.expasy.org/）分析PPO蛋白的氨基酸长度、分子质量、等电点等理化指标；采用Plant-mPLoc预测平台（http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/）进行蛋白亚细胞定位预测分析；通过Swiss-model同源建模服务器（https://swissmodel.expasy.org）构建PPO蛋白的三维空间结构模型。

1.3 梨*PPO*基因结构与启动子顺式元件分析

基于云红1号基因组数据，提取各*PpyPPO*基因的外显子与内含子结构信息，利用GSDS 2.0在线平台（https://gsds.gao-lab.org/Gsds_help.php）完成基因结构可视化分析。通过TBtools批量提取各*PpyPPO*基因ATG起始密码子上游2 kb序列作为启动子区域，提交至PlantCARE数据库（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）开展顺式作用元件鉴定，最终利用GSDS 2.0实现启动子元件分布的可视化展示。

1.4 PPO蛋白序列比对与系统进化及染色体定位分析

收集梨、苹果、桃、草莓、马铃薯、丝瓜等物种的PPO蛋白序列，利用MEGA11软件中的内置MUSCLE算法开展多序列比对。分别采用邻接法（NJ）与最大似然法（ML）构建系统发育进化树，设置Bootstrap重复次数为1000，最终利用iTOL工具对进化树进行美化与可视化。通过GDR数据库获得基因组注释文件中的位置信息，利用Tbtools软件进行PPO基因家族染色体分布特征的可视化分析。

1.5 RNA提取、cDNA文库构建和RNA测序

选取鲜切处理不同时间点的梨果肉组织，液氮速冻后置于−80 ℃超低温冰箱保存，用于转录组测序分析。使用RNA提取试剂盒（ZOMANBIO，中国北京）提取总RNA。经琼脂糖凝胶电泳初步检测RNA完整性后，利用Agilent 2100生物分析仪（Agilent Technologies，美国）精准评估RNA样品质量与纯度。cDNA文库构建及高通量测序由广州基迪奥生物科技有限公司完成。采用fastp对原始测序读段进行过滤，以获得高质量有效读段，利用HISAT2软件将其比对云红1号梨参考基因组（http://pyrusgdb.sdau.edu.cn/index.html）。

1.6 梨*PPO*基因表达模式分析和PPO活性测定

提取不同果实发育时期及不同梨组织样品的总RNA，使用全式金反转录试剂盒（TransGen Biotech）一步法去除基因组DNA（gDNA）及反转录合成第一链cDNA。实时荧光定量PCR（RT-qPCR）在罗氏（Roche）LightCycler 480荧光定量PCR仪（巴塞尔，瑞士）上进行，反应体系参考北京全式金生物技术有限公司的TransStart Top Green qPCR SuperMix试剂盒说明书设置。样品设置3次生物学重复与技术重复，以梨*PpyTubulin*为内参基因，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量[28]。所用基因特异性引物序列见表1。采用苏州科铭多酚氧化酶检测试剂盒测定果肉PPO

表1 荧光定量PCR引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

基因 Gene name	正向引物序列 Forward primer sequences	反向引物序列 Reverse primer sequences
PpyTubulin	TGGGCTTTGCTCCTCTTAC	CCTTCGTGCTCATCTTACC
PpyPPO10	GGGACGGGCCTAACCCT	GTCCCTACCAGCGGAGTAAA

活性，依据邻苯二酚氧化反应体系，于525 nm波长下测定吸光值并计算酶活力。

1.7　统计分析

利用Microsoft Excel软件进行数据统计和图表绘制。所有数据均以3次独立生物学重复（每个重复含3次技术重复）的平均值±标准差（SD）表示。以*（$P<0.05$）表示差异具有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　梨PPO基因家族鉴定及蛋白理化特征分析

基于最新公布的砂梨云红1号、白梨砀山酥梨、西洋梨Max Red Bartlett端粒到端粒（T2T）基因组及野生梨山西杜梨高质量染色体水平基因组，结合HMM模型检索、多序列比对与保守结构域多重验证，在上述4个梨种质中鉴定出不同数量的PPO家族成员。其中，云红1号与山西杜梨各包含10个*PPO*基因，砀山酥梨包含9个，西洋梨Max Red Bartlett仅鉴定到8个，其蛋白理化性质见表2。所有品种中，梨PPO家族基因编码的氨基酸数目为586~941个，蛋白分子质量为64 828.78~105 268.1 Da，理论等电点为5.39~8.40，不稳定系数为37.85~52.31；蛋白的平均亲水性均为负数，表明其为亲水性蛋白。亚细胞定位预测显示，多数*PPO*基因定位于细胞质、叶绿体和细胞核中，仅有1个基因（*PbeP-*

表2　梨PPO家族成员基本信息和理化性质

Table 2　Basic information and physicochemical properties of pear PPO family members

基因名称 Gene name	基因ID Gene ID	氨基酸数目 Number of amino acids/aa	分子质量 Relative molecular mass/Da	等电点 pI	不稳定系数 Coefficient of instability	亚细胞定位 Subcellular localization	亲水性系数 Gravy
PpyPPO1	Pspp.Chr05.02673	600	67 226.73	6.26	45.26	细胞质 Cytoplasm	−0.542
PpyPPO2	Pspp.Chr05.02677	600	67 254.83	6.38	44.72	细胞质 Cytoplasm	−0.542
PpyPPO3	Pspp.Chr05.02678	587	65 059.52	6.41	40.87	细胞质 Cytoplasm	−0.462
PpyPPO4	Pspp.Chr05.02682	586	64 880.76	5.39	41.91	细胞质 Cytoplasm	−0.467
PpyPPO5	Pspp.Chr10.02461	611	68 622.67	7.88	48.10	细胞质 Cytoplasm	−0.549
PpyPPO6	Pspp.Chr10.02475	795	89 976.15	6.24	47.94	细胞质 Cytoplasm	−0.459
PpyPPO7	Pspp.Chr10.02476	730	81 445.03	5.80	38.04	细胞质 Cytoplasm	−0.467
PpyPPO8	Pspp.Chr10.02479	605	67 242.90	5.81	49.04	叶绿体 Chloroplast	−0.478
PpyPPO9	Pspp.Chr10.02481	593	65 744.84	8.22	47.85	叶绿体 Chloroplast	−0.436
PpyPPO10	Pspp.Chr10.02483	593	65 746.82	8.40	47.23	叶绿体 Chloroplast	−0.438
PbrPPO1	Ppye1_05G534000	600	67 226.73	6.26	45.26	细胞核 Nucleus	−0.542
PbrPPO2	Ppye1_05G534800	600	67 254.83	6.38	44.72	细胞核 Nucleus	−0.542
PbrPPO3	Ppye1_05G535200	621	68 927.78	5.96	40.50	细胞核 Nucleus	−0.422
PbrPPO4	Ppye1_10G512800	611	68 622.67	7.88	48.10	细胞质 Cytoplasm	−0.549
PbrPPO5	Ppye1_10G513400	595	66 850.45	6.96	47.64	细胞核 Nucleus	−0.557
PbrPPO6	Ppye1_10G517200	604	67 601.06	5.97	38.86	细胞核 Nucleus	−0.531
PbrPPO7	Ppye1_10G517600	605	67 239.89	5.73	49.03	叶绿体 Chloroplast	−0.475
PbrPPO8	Ppye1_10G517800	593	65 744.84	8.22	47.85	叶绿体 Chloroplast	−0.436
PbrPPO9	Ppye1_10G518000	593	65 744.80	8.40	47.08	叶绿体 Chloroplast	−0.438
PcPPO1	Pcom1_05G535800	600	67 281.90	6.52	44.72	细胞核 Nucleus	−0.547
PcPPO2	Pcom1_05G536800	587	65 138.63	6.41	40.61	细胞核 Nucleus	−0.467
PcPPO3	Pcom1_05G537400	586	64 828.78	5.44	42.06	细胞质 Cytoplasm	−0.458
PcPPO4	Pcom1_10G491200	611	68 449.42	6.83	48.31	细胞质 Cytoplasm	−0.544
PcPPO5	Pcom1_10G494600	610	69 173.38	6.99	52.31	细胞质 Cytoplasm	−0.509
PcPPO6	Pcom1_10G495600	603	67 530.97	5.97	38.96	细胞质 Cytoplasm	−0.544
PcPPO7	Pcom1_10G496400	605	67 229.90	5.76	50.30	叶绿体 Chloroplast	−0.473
PcPPO8	Pcom1_10G496600	593	65 790.87	8.22	48.80	叶绿体 Chloroplast	−0.431
PbePPO1	Chr5.g05994.m1	587	65 164.53	6.18	40.70	细胞质 Cytoplasm	−0.477
PbePPO2	Chr5.g06005.m1	600	67 298.86	6.38	44.17	细胞质 Cytoplasm	−0.548
PbePPO3	Chr10.g14114.m1	593	65 743.81	8.22	47.75	叶绿体 Chloroplast	−0.445

表2（续） Table 2 (Continued)

基因名称 Gene name	基因ID Gene ID	氨基酸数目 Number of amino acids/aa	分子质量 Relative molecular mass/Da	等电点 pI	不稳定系数 Coefficient of instability	亚细胞定位 Subcellular localization	亲水性系数 Gravy
PbePPO4	Chr10.g14116.m1	605	67 308.06	5.85	49.83	叶绿体 Chloroplast	−0.456
PbePPO5	Chr10.g14121.m1	600	67 197.54	5.88	38.25	细胞质 Cytoplasm	−0.557
PbePPO6	Chr10.g14123.m1	683	77 307.84	8.15	50.29	细胞质 Cytoplasm	−0.473
PbePPO7	Chr10.g14144.m1	824	91 369.63	6.54	37.85	叶绿体 Chloroplast	−0.349
PbePPO8	Chr10.g14145.m1	789	87 542.73	7.21	45.87	叶绿体 Chloroplast	−0.478
PbePPO9	Chr10.g14146.m1	631	70 725.22	6.19	47.62	细胞质 Cytoplasm	−0.453
PbePPO10	Chr10.g14148.m1	941	105 268.13	6.35	44.48	细胞外 Extracellular	−0.466

PO10）定位在细胞外。

2.2 多物种PPO蛋白家族系统发育分析

为明确梨*PPO*基因的系统进化特征，本研究基于砂梨、白梨、西洋梨、杜梨4个梨属物种，以及苹果、桃、草莓、香蕉、甘薯、马铃薯、茄子、杨树等8个外类群物种的PPO蛋白序列，采用最大似然法（ML）构建了系统发育树（图1）。结果表明，所有物种*PPO*基因可划分为9个进化支（GroupⅠ~Ⅸ），同一进化支内的同源基因亲缘关系更为密切。梨属PbrPPO、PpyPPO、PcPPO、PbePPO蛋白主要聚集于GroupⅠ，少量成员零散分布于其他分支。进化分析显示，梨与苹果、桃等蔷薇科果树*PPO*基因同源性较高，亲缘关系较近，而香蕉、甘薯、马铃薯等非蔷薇科作物PPO序列分化程度较大，与梨的亲缘关系相对较远。

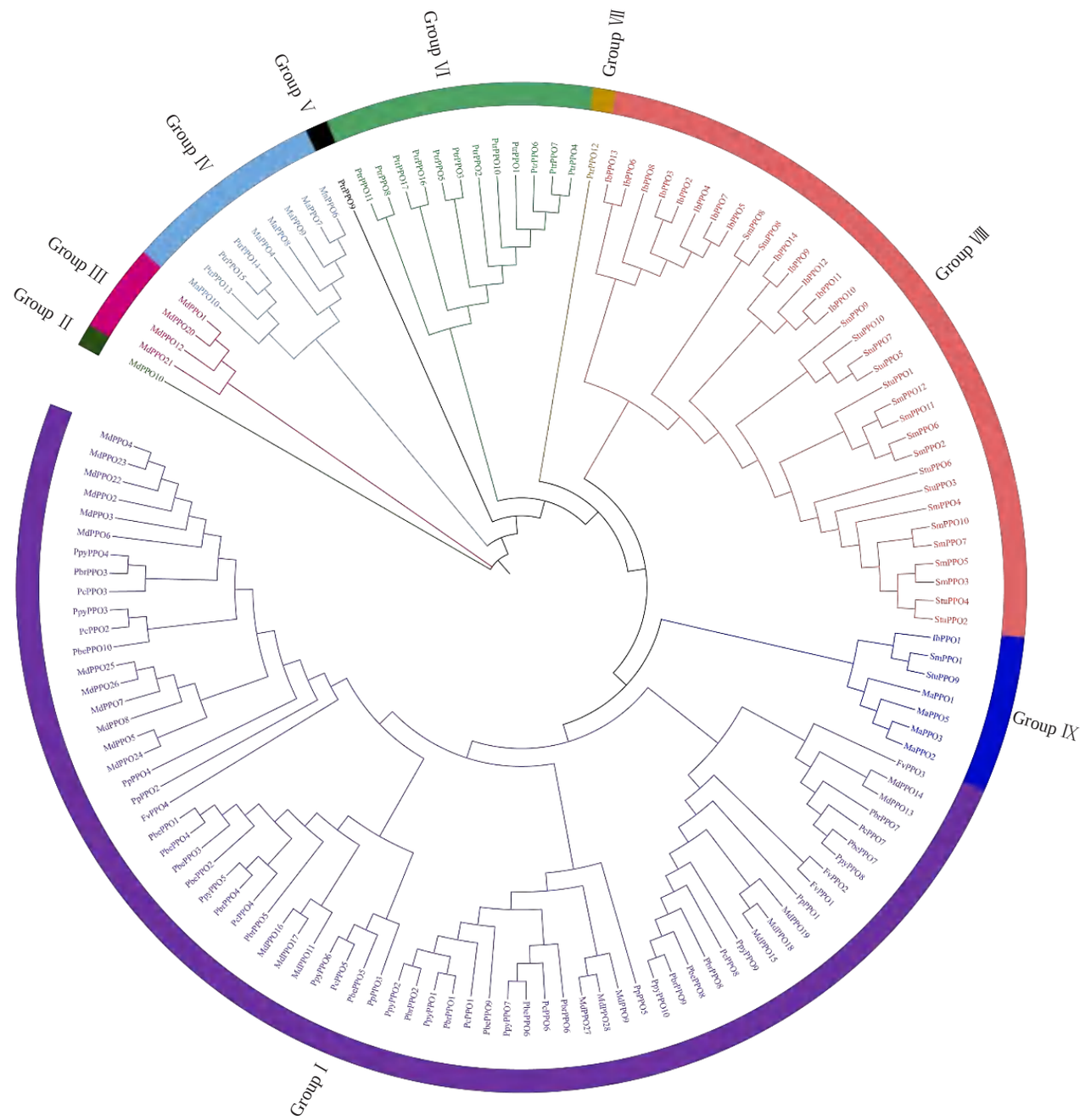
2.3 梨PPO基因家族的系统进化、结构与调控特征分析

为系统揭示梨PPO基因家族的演化规律与分子特征，本研究从跨物种共线性、染色体定位、基因结构、蛋白基序、启动子调控元件及蛋白三级结构等多个层面开展综合分析。跨物种共线性分析表明（图2），梨基因组中Ppy5与Ppy10染色体间存在大量共线性连线，表明PPO基因家族在梨进化过程中发生显著的基因组片段复制，是梨PPO基因家族扩张的核心来源。蔷薇科果树（包括苹果、桃、草莓）与梨核心染色体间分布密集同源连线，其中苹果Md5、Md10与梨Ppy5、Ppy10共线性关联最强；桃和草莓与蔷薇科物种间虽因染色体数目差异导致共线性区块较为分散，但仍可识别出显著保守片段，暗示蔷薇科内部经历了染色体融合和裂变事件，同时也说明该基因家族在蔷薇科共同祖先中已稳定存在，科内物种分化后基因组区段仍高度保守。

在单子叶植物香蕉、旋花科甘薯、茄科马铃薯与茄子，以及木本模式植物杨树的部分染色体上均能检测到与梨Ppy5、Ppy10的同源共线性区段，提示PPO基因家族起源于陆生植物共同祖先。相比跨科远缘物种，蔷薇科近缘果树间共线性连线更为密集，表明随着物种分化，基因组重排与片段丢失事件逐步削弱同源区段的保守程度。共线性图谱证实，梨PPO基因家族依赖物种特异性片段复制实现基因拷贝数扩张，且在分化差异显著的陆生植物中均保留保守同源基因组区段，进化位置高度保守。

对砀山酥梨、云红1号、Max Red Bartlett、山西杜梨4个代表性梨种质的PPO家族基因开展染色体定位分析（图3），结果显示，4个梨品种的*PPO*基因均特异性集中分布于Chr05与Chr10染色体末端，Chr05上的*PPO*基因集中分布于30~35 Mb区间，Chr10上的*PPO*基因主要聚集在28~32 Mb区间，且呈现高度保守的簇状串联排布模式，证实梨PPO基因家族在两条核心染色体的末端形成特异性基因簇。不同种质间存在明显拷贝数分化：云红1号Chr05染色体上PPO拷贝数扩增至4个；而山西杜梨Chr05仅保留2个PPO拷贝。Chr10上*PPO*基因簇的拷贝数整体高于Chr05，砀山酥梨、云红1号、Max Red Bartlett、山西杜梨分别包含6、6、5、8个串联*PPO*基因，不同种质间拷贝数量差异显著。云红1号和山西杜梨富集的*PPO*基因数量最多，砀山酥梨、Max Red Bartlett的基因拷贝数依次降低。综上所述，梨*PPO*基因的染色体分布在不同种质中高度保守，串联成簇的分布特征表明该家族主要通过串联复制方式完成基因扩张，而品种间拷贝数差异则反映了*PPO*基因在梨属种质进化过程中的序列分化与扩张差异。

为明晰梨PPO基因家族成员的基因结构特征



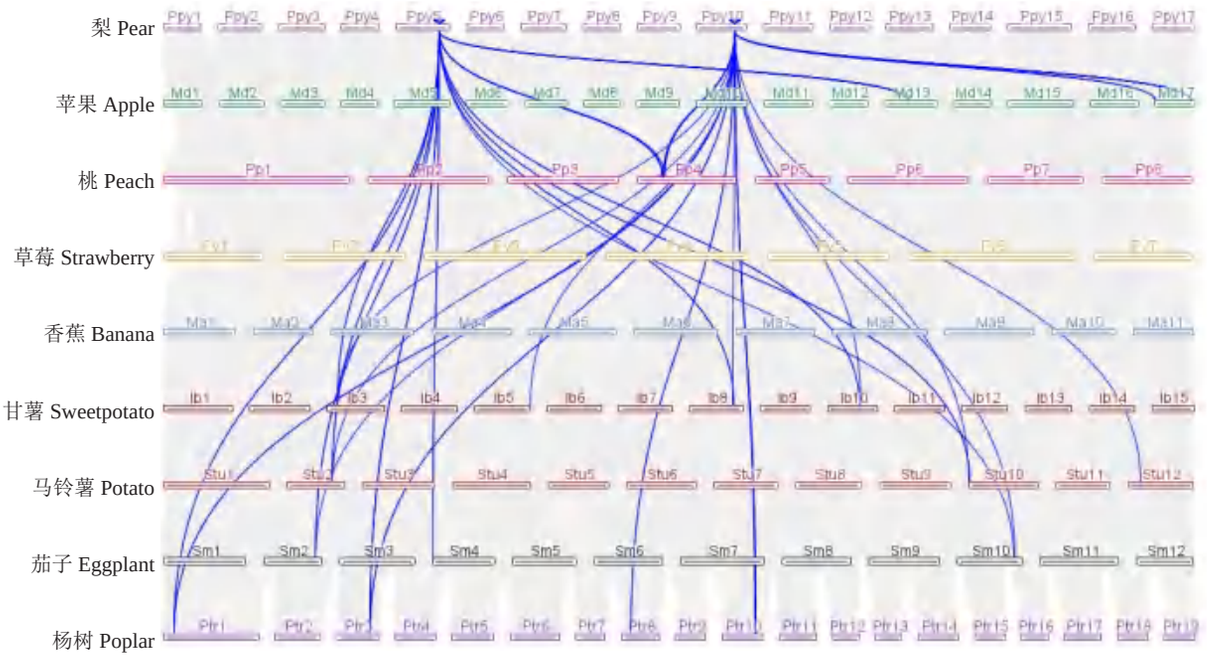
Ppy. 砂梨；Pbr. 白梨；Pc. 西洋梨；Pbe. 杜梨；Md. 苹果；Pp. 桃；Fv. 草莓；Ma. 香蕉；Ib. 甘薯；Stu. 马铃薯；Sm. 茄子；Ptr. 杨树。

Ppy. *yrus pyrifolia*; Pbr. *Pyrus bretschneideri*; Pc. *Pyrus communis*; Pbe. *Pyrus betulifolia*; Md. *Malus domestica*; Pp. *Prunus persica*; Fv. *Fragaria vesca*; Ma. *Musa acuminata*; Ib. *Ipomoea batatas*; Stu. *Solanum tuberosum*; Sm. *Solanum melongena*; Ptr. *Populus trichocarpa*.

图 1　梨与其他物种 PPO 基因家族进化分析

Fig. 1　Phylogenetic analysis of the PPO gene family in pear and other species

与进化关系，对砂梨云红 1 号 *PpyPPO* 家族 10 个成员的蛋白序列构建系统进化树（图 4）。结果显示，10 个 *PpyPPO* 基因可划分为 3 个进化分支。其中，*PpyPPO*1/2/3/4/7 聚为第一支，*PpyPPO*8/9/10 聚为第二支，*PpyPPO*5 和 *PpyPPO6* 分别形成独立的系统发育分支；亲缘关系相近的基因节点自展值多数达到 100，进化聚类可信度较高。基因结构分析表明，不同分支 *PpyPPO* 基因的外显子数量、内含子长度及基因全长存在显著分化。*PpyPPO3/4/5/8/9/10* 均为无内含子的单 CDS 结构，编码区长度相近，CDS 序列长度分布在 1500~2000 bp 范围内；*PpyPPO1/2* 仅含 1 个内含子，*PpyPPO6* 包含 3 个较短的内含子，而

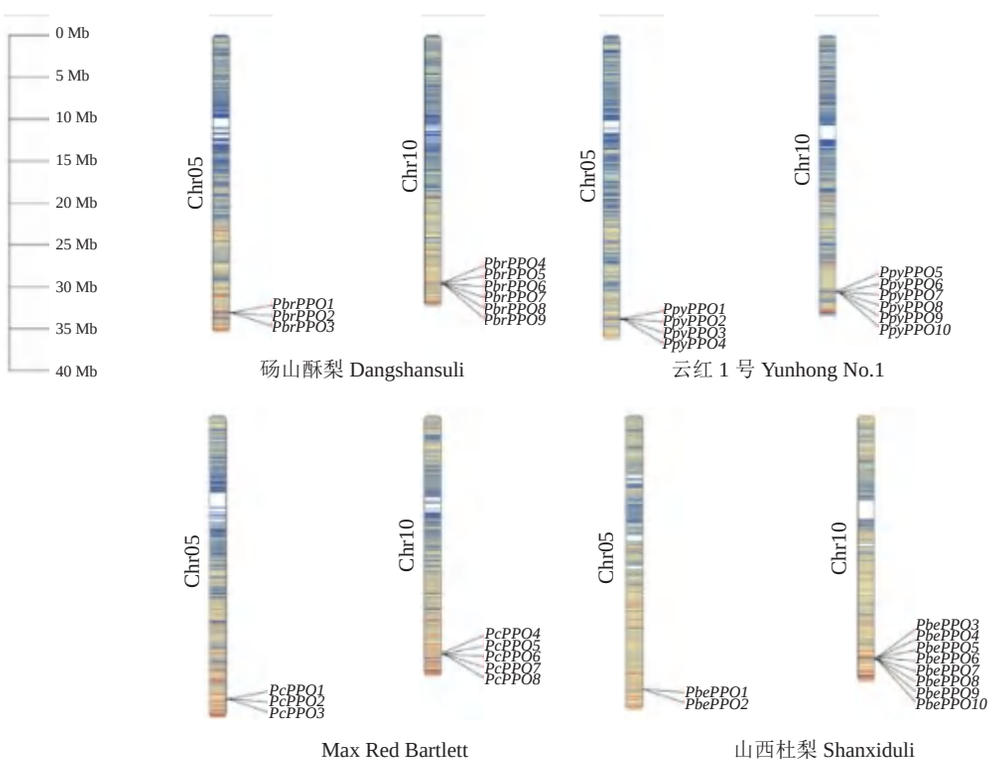


不同颜色水平条带代表各物种染色体，蓝线连线指示共线性同源基因对。

Horizontal bars in different colors represent chromosomes from each species, and blue lines indicate collinear homologous gene pairs.

图 2　不同物种 *PPO* 基因的共线性分析

Fig. 2　Inter-species collinearity analysis of *PPO* genes across diverse plant species

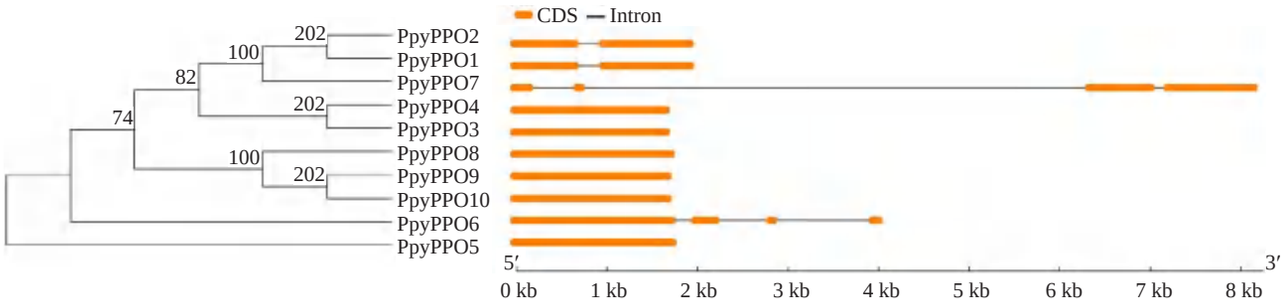


左侧标尺代表染色体物理长度（Mb），红色标注为串联排布的 *PPO* 基因，框中颜色代表染色体的基因密度。

The left scale bar indicates chromosome physical length (Mb), and red labels represent tandemly arranged PPO genes, the colors in the boxes represent the gene density of chromosomes in pear.

图 3　4 个梨品种 *PPO* 基因在染色体上的物理定位

Fig. 3　Physical mapping of *PPO* genes in four pear varieties



橙色线段表示编码区（CDS），灰色线段表示内含子（Intron），底部标尺代表基因序列长度（kb）。

Orange lines represent coding sequences (CDS), gray lines represent introns, and the scale bar at the bottom indicates gene sequence length (kb).

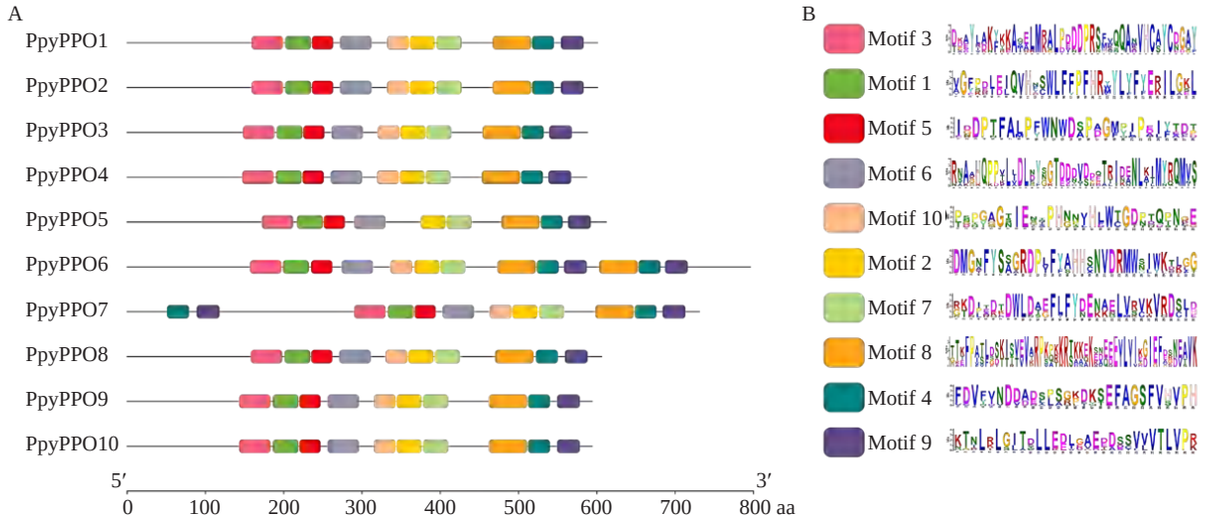
图 4　PpyPPO 基因家族系统进化分析（A）与基因结构（B）

Fig. 4　Phylogenetic analysis (A) and gene structure (B) of the PpyPPO gene family

PpyPPO7 含有 3 个内含子，其长度均显著大于该家族其他成员，基因总长度超过 8 kb，为所有成员中跨度最大的基因。整体可知，进化聚类关系相近的成员在基因长度与内含子排布上趋于一致，亲缘进化关系与基因结构特征高度吻合，内含子数量与片段长度的差异是梨 PPO 基因家族进化分化的重要特征。

通过 MEME 进行保守基序分析，共鉴定到 10 种高度保守的特征基序（Motif1-Motif10），基序的分布特征如图 5-A 所示，各基序对应的氨基酸序列特征如图 5-B 所示。多数 PpyPPO 蛋白共享一套高度保守的 Motif 排布模式，均依次包含 Motif3、Motif1、Motif5、Motif6、Motif10、Motif2、Motif7、Motif8、Motif4、Motif9，仅 PpyPPO5 缺失 Motif10。PpyPPO6 在 C 端重复出现 Motif8、Motif4、Motif9，PpyPPO7 在蛋白 N 端特异性出现 Motif4 与 Motif9 基序（图 5-A）。全部 *PpyPPO* 保守基序分布于 200~700 aa 区间，所有家族成员的保守基序主区段位置高度保守，表明白梨 PPO 基因家族蛋白结构域保守性较强，核心功能基序在进化过程中未发生大幅丢失；少数成员存在 Motif 缺失、重复或 N 端额外基序插入现象，暗示不同 *PpyPPO* 拷贝在进化中产生了结构分化，可能对应功能特异性差异。

为解析 *PpyPPO* 基因的转录调控模式，提取 10



A. 10 个 PpyPPO 蛋白的保守基序分布；B. Motif 1~Motif 10 的氨基酸保守序列。不同彩色色块代表不同保守基序，底部标尺为氨基酸序列长度。

A. Distribution of conserved motifs in ten PpyPPO proteins; B. The conserved amino acid sequences of Motif 1 to Motif 10. Each colored block denotes a unique motif, and the scale bar at the bottom indicates the amino acid length.

图 5　PpyPPO 基因家族保守基序分析

Fig. 5　Conserved motifs analysis of PpyPPO gene family

个*PpyPPO*基因上游2000 bp启动子序列进行顺式作用元件预测，共鉴定到26类功能各异的顺式调控元件（图6）。所有*PpyPPO*启动子区均大量富集光响应与逆境胁迫、激素应答相关的调控元件，但各类元件的数量、分布位置存在显著差异。其中，光响应元件（G-box、Box4等）为家族共有核心元件，在全部*PpyPPO*基因中广泛分布，表明光照是调控梨*PPO*基因转录的关键环境因子。此外，脱落酸响应元件（ABRE）、茉莉酸甲酯响应元件（MeJA）以及水杨酸响应元件（TCA）在多数成员中均有分布，提示*PPO*基因可能参与激素介导的褐变调控网络。在胁迫响应方面，部分基因（如*PpyPPO1*、*PpyPPO4*、*PpyPPO10*等）的启动子区还含有干旱诱导的MYB结合位点（MBS）、厌氧诱导元件（ARE）以及防御与应激响应元件（TC-rich repeats），表明*PPO*基因的表达可能受干旱、缺氧等多种逆境胁迫的诱导。不同*PpyPPO*启动子在顺式元件的类型、拷贝数与分布位置上存在明显分化，其中*PpyPPO10*启动子同时富集G-box、ARE、MeJA及MBS等元件，兼具光、激素、逆境多重调控位点，预示其可受MYB转录因子与多类信号通路共同调控。

利用同源建模手段对10个PpyPPO基因家族成

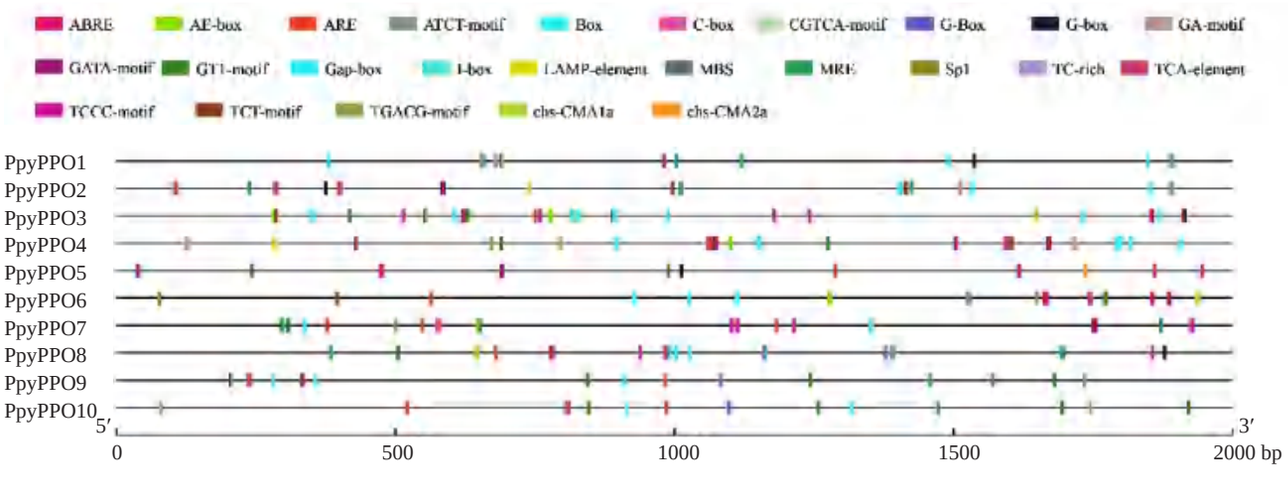


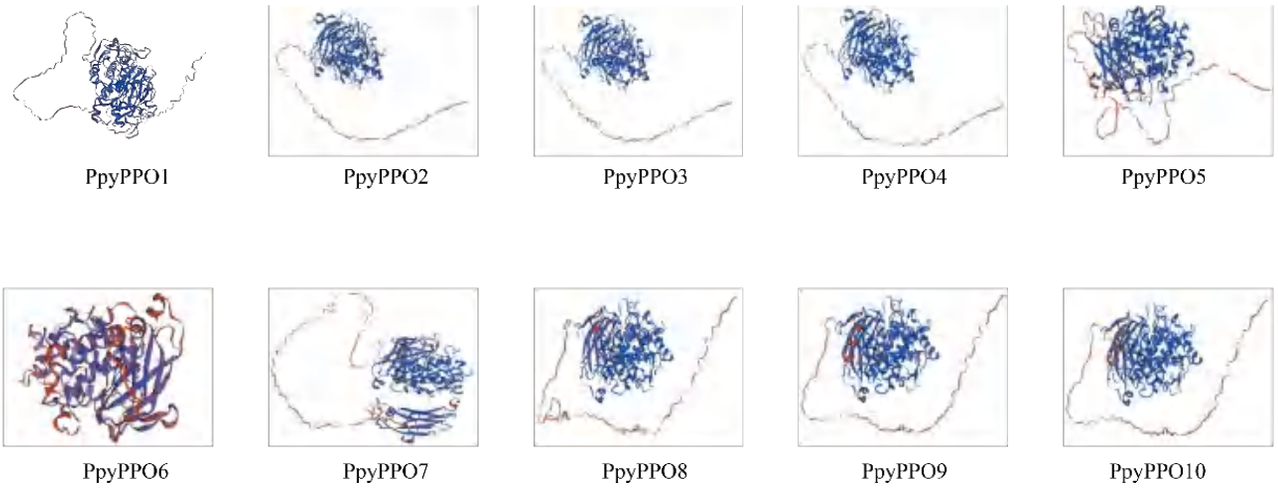
图6 *PpyPPO*基因启动子顺式作用元件分析

Fig. 6 Analysis of cis-acting elements in the promoter regions of *PpyPPO* genes

员的蛋白三级结构进行预测分析（图7）。结果显示，PpyPPO蛋白均存在高度折叠的保守核心结构域，同时序列两端分布着大量无规则卷曲的柔性无序区段。PpyPPO成员均具备典型多酚氧化酶保守的球状催化结构域，但各成员整体空间构象、柔性区段分布存在差异，PpyPPO1~PpyPPO5、PpyPPO8~PpyPPO10拥有单一紧凑的催化核心区，柔性无序区主要集中在蛋白N端与C端；PpyPPO7呈现双域结构特征，除主催化球状结构域外，蛋白末端额外形成独立小型折叠亚结构，为该家族独有构象特征；而PpyPPO6整体折叠模式与其他家族成员差异最大，无明显游离长柔性尾区，蛋白整体由大量α-螺旋与β-折叠紧密缠绕形成紧凑球状构象，无显著外露无序区段，空间结构高度致密。PpyPPO基因家族成员保守催化结构域的空间折叠形态相似，暗示其具备多酚氧化酶典型的催化骨架基础；而柔性无序区长度、分布位置以及整体空间构象的分化，预示家族不同成员在蛋白亚细胞定位、底物结合特性及酶活调控模式上可能存在功能分化。

2.4 *PPO*在酪氨酸代谢支路与苯丙烷通路中的调控功能解析

为解析不同梨品种褐变敏感性差异的分子机制，本研究以砂梨代表性种质抗褐变品种红香酥（HXS）与易褐变品种满天红（MTH）鲜切果实为材料，在多个时间点对酪氨酸代谢及苯丙烷代谢通路中78个关键酶编码基因进行了转录表达谱分析（图8）。结果显示，在经典苯丙烷通路中，PAL、4CL、C4H、HCT、C3H、COMT等关键酶编码基因整体高表达，且呈现同步差异化表达，共同推动绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、儿茶素、表儿茶素等多酚物质积累。*PpyPPO*家族基因整体呈上调表达趋势，其编码蛋白可催化酪氨酸生成L-DOPA，并进一步合成咖啡



深蓝色区域代表 PPO 保守催化结构域，橙色线条为蛋白柔性无规律卷曲区段。

The dark blue spheres represent the conserved catalytic domains of PPOs, and the orange lines indicate flexible random coil regions.

图 7　梨 PpyPPO 家族蛋白三级结构预测模型

Fig. 7　Predicted tertiary structural models of PpyPPO proteins in pear

酸，直接参与酪氨酸支路酚类合成。值得注意的是，*PpyPPO*8/9/10 在红香酥中的表达水平显著高于满天红，其中 *PpyPPO10* 的上调表达幅度最为显著，提示其在品种间褐变差异中可能发挥更关键的作用。上述结果表明，*PpyPPO* 作为酪氨酸支路核心基因，与苯丙烷途径功能基因协同响应，共同决定梨果实多酚组分的合成水平，为深入解析 PPO 介导果实酶促褐变的代谢调控网络提供了转录水平依据。

2.5　*PpyPPO10* 系统进化分析

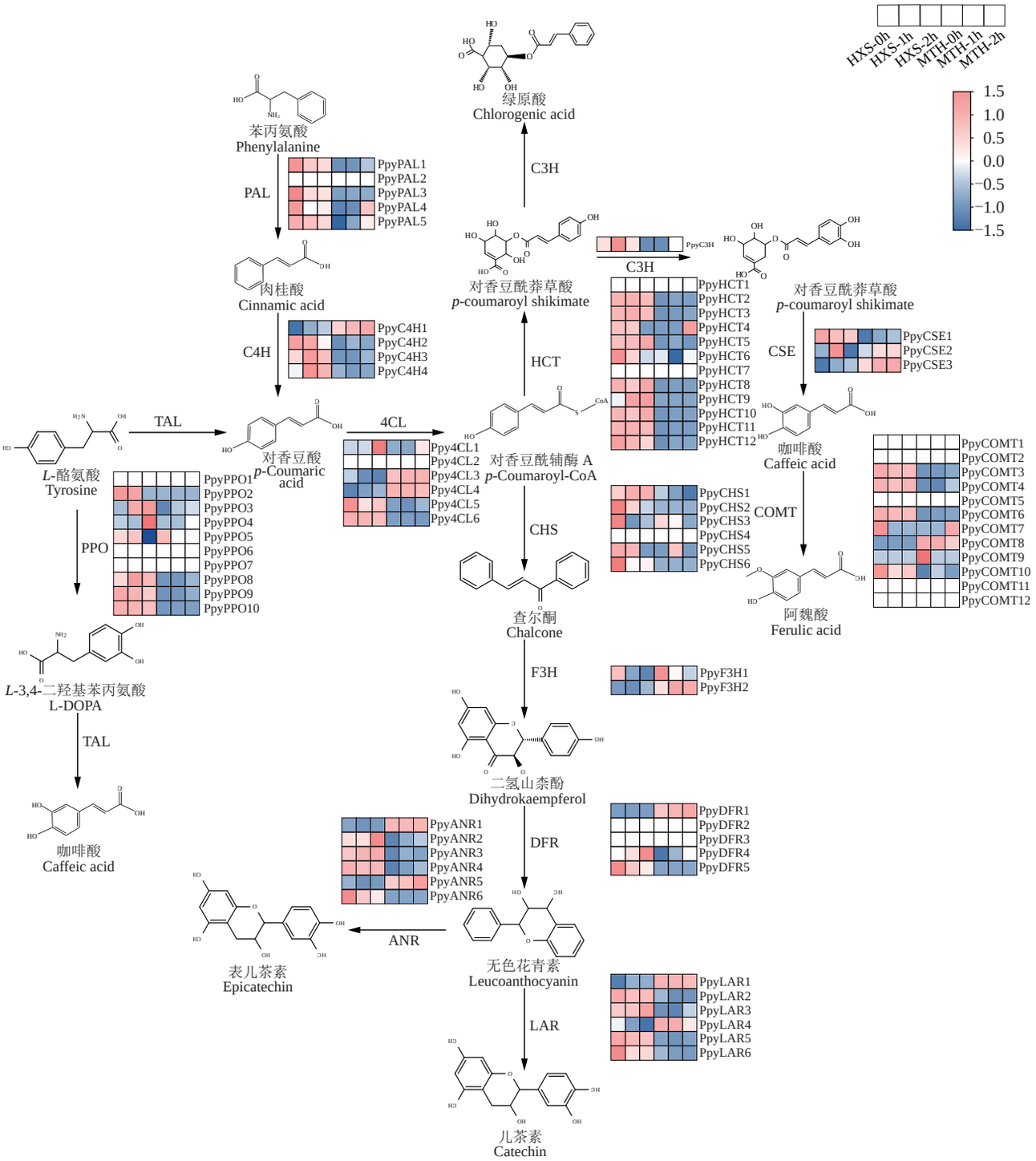
鉴于 *PpyPPO10* 在果实褐变转录组中的特异性表达特征，为揭示其跨物种的进化保守性，选取苹果、桃、草莓、马铃薯、柑橘、香蕉等 16 个物种的 PPO 蛋白序列，构建了系统进化树（图 9）。结果表明，梨 PpyPPO10 与桃 PpPPO 聚于同一分支，亲缘关系最近，与其同属蔷薇科的分类一致，暗示二者功能保守。此外，PpyPPO10 与苹果 MdPPO 和草莓 FvPPO 亦具有较近的进化关系。相比之下，梨 PpyPPO10 与水稻 OsPPO、香蕉 MaPPO 等单子叶植物的 PPO 蛋白亲缘关系较远，位于不同的进化支系。该结果进一步支持了 PPO 基因家族在进化过程中遵循物种分化规律，同时暗示梨与桃、苹果等蔷薇科果树的 PPO 蛋白可能具有相似的功能特性，尤其在果实褐变调控中可能发挥保守作用。

2.6　红香酥与满天红 PPO 活性差异及 *PpyPPO10* 在果实发育过程及不同组织中的表达分析

PPO 活性测定结果显示，易褐变品种满天红果肉 PPO 活性显著高于抗褐变品种红香酥（图 10-A）。为明确 *PpyPPO10* 的时空表达特征，揭示其在梨果实褐变中的调控功能，利用 RT-qPCR 技术，系统检测了该基因在易褐变品种满天红与抗褐变品种红香酥果实不同发育阶段，以及在不同组织中的表达模式。果实发育时序表达结果显示，在花后 70~120 d 的果实发育周期内，红香酥 *PpyPPO10* 相对表达量均显著高于满天红（$P<0.05$），并在花后 90 d 达到峰值（图 10-B）。组织特异性表达结果表明，*PpyPPO10* 在果肉中的表达量远高于果柄、花托、花药、萼片、叶柄、叶片、果皮等组织，呈现显著的果肉优势表达特征（图 10-C）。综上所述，*PpyPPO10* 具有明显的时空表达特异性，推测其是参与调控梨果肉酶促褐变的关键候选基因。

3　讨　论

多酚氧化酶（PPO）基因家族在植物中广泛存在，目前已在苹果、桃、葡萄、草莓、核桃、香蕉等多个果树中完成全基因组鉴定。本研究基于生物信息学方法，在 4 个梨种质中鉴定出 8~10 个 PPO 家族基因：云红 1 号和山西杜梨各 10 个，砀山酥梨为 9 个，Max Red Bartlett 为 8 个。山西杜梨为野生种质，云红 1 号为云南地方品种，二者鲜切后均易发生褐变；而砀山酥梨和 Max Red Bartlett 分别属于东方梨和西洋梨系统的栽培品种，褐变程度较轻或不易褐变。鉴于上述材料间 *PPO* 基因数量的差异及其与

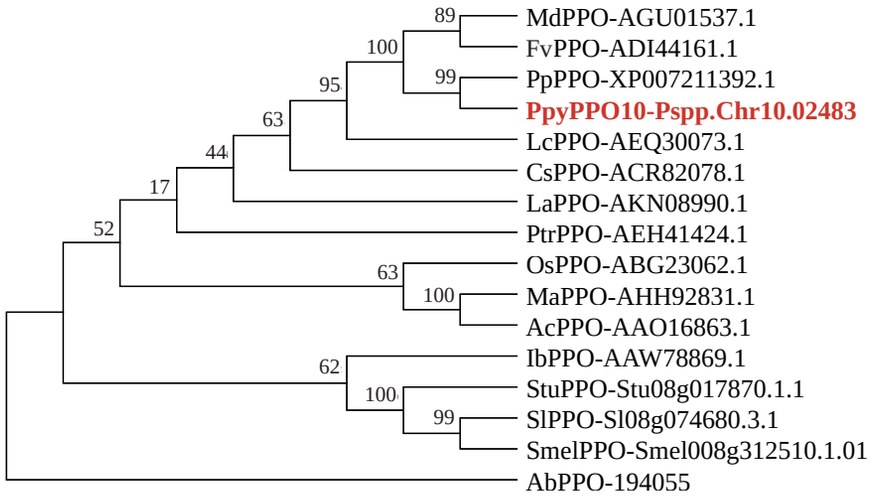


PAL. 苯丙氨酸解氨酶；C4H. 肉桂酸-4-羟化酶；4CL. 4-香豆酰辅酶 A 连接酶；CHS. 查尔酮合成酶；F3H. 黄烷酮 3-羟化酶；LAR. 无色花青素还原酶；ANR. 花青素还原酶；PPO. 多酚氧化酶；TAL. 酪氨酸解氨酶；C3H. 对香豆酸 3-羟化酶；HCT. 羟基肉桂酰转移酶；CSE. 咖啡酰莽草酸酯酶；COMT. 咖啡酸 *O*-甲基转移酶；DFR. 二氢黄酮醇 4-还原酶。

PAL. Phenylalanine ammonia-lyase; C4H. Cinnamate 4-hydroxylase; 4CL. 4-coumaroyl: CoA ligase; CHS. Chalcone synthase; F3H. Flavanone 3-hydroxylase; LAR. Leucoanthocyanidin reductase; ANR. Anthocyanidin reductase; PPO. Polyphenol oxidase; TAL. Tyrosine ammonia-lyase; C3H. P-coumarate 3-hydroxylase; HCT. Shikimate *O*-hydroxycinnamoyl transferase; CSE. Caffeoyl shikimate esterase; COMT. Caffeic acid O-methyltransferase; DFR. Dihydroflavonol 4-reductase.

图 8 梨果肉苯丙烷与酪氨酸代谢通路关键酶基因相对表达量热图

Fig. 8 Heat map of relative expression levels of key enzyme genes in phenylpropanoid and tyrosine metabolic pathways in pear flesh



Md. 苹果；Fv. 森林草莓；Pp. 桃；Ppy. 砂梨；Lc. 荔枝；Cs. 黄瓜；La. 薰衣草；Ib. 甘薯；Ab. 颠茄；Stu. 马铃薯；Sl. 番茄；Smel. 茄子；Os. 水稻；Ma. 香蕉；Ac. 猕猴桃；Ptr. 毛果杨。

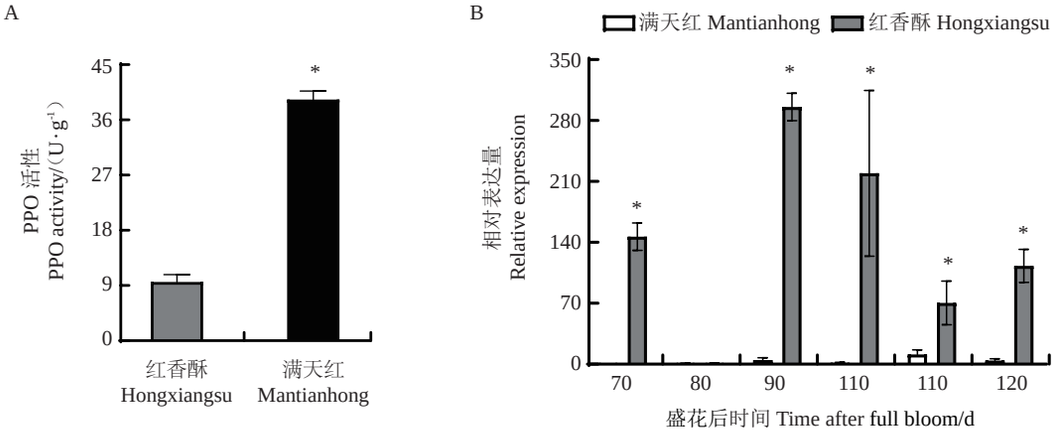
Md. *Malus domestica*; Fv. *Fragaria vesca*; Pp. *Prunus persica*; Ppy. *Pyrus pyrifolia*; Lc. *Litchi chinensis*; Cs. *Cucumis sativus*; La. *Lavandula angustifolia*; Ib. *Ipomoea batatas*; Ab. *Atropa belladonna*; Stu. *Solanum tuberosum*; Sl. *Solanum lycopersicum*; Smel. *Solanum melongena*; Os. *Oryza sativa*; Ma. *Musa acuminata*; Ac. *Actinidia chinensis*; Ptr. *Populus trichocarpa*.

图 9　PpyPPO10 的跨物种系统进化分析

Fig. 9　Phylogenetic analysis of PpyPPO10 and its paralogous homologs

褐变表型的关联，*PPO* 基因串联重复复制事件与果实褐变程度的关系值得深入探讨，这也为梨乃至蔷薇科物种果实褐变机制的研究提供了新方向。

梨 PPO 家族蛋白理化性质分析表明，家族成员均为亲水性蛋白，且多数为不稳定蛋白，该理化特征与多数园艺植物 PPO 蛋白的基础属性高度一致[18,22,29]。而多数 PPO 蛋白稳定性较差，表明该家族蛋白在细胞内易受温度、pH、离子浓度等环境变化



A. 满天红与红香酥果肉 PPO 活性；B. 满天红、红香酥果实不同发育阶段 *PpyPPO10* 相对表达量；C. *PpyPPO10* 在梨不同组织中的表达分析。*代表差异显著（$P<0.05$）。

A. PPO activity in flesh of Mantianhong and Hongxiangsu; B. Relative expression levels of *PpyPPO10* in fruits of Mantianhong(MTH) and Hongxiangsu (HXS) at different developmental stages; C. Tissue-specific expression of *PpyPPO10* in various pear tissues. * indicates significant differences ($P<0.05$).

图 10　红香酥与满天红 PPO 活性差异及 *PpyPPO10* 基因的时空表达模式

Fig. 10　Differences in PPO activity between Hongxiangsu and Mantianhong and temporal and spatial expression profiles of *PpyPPO10*

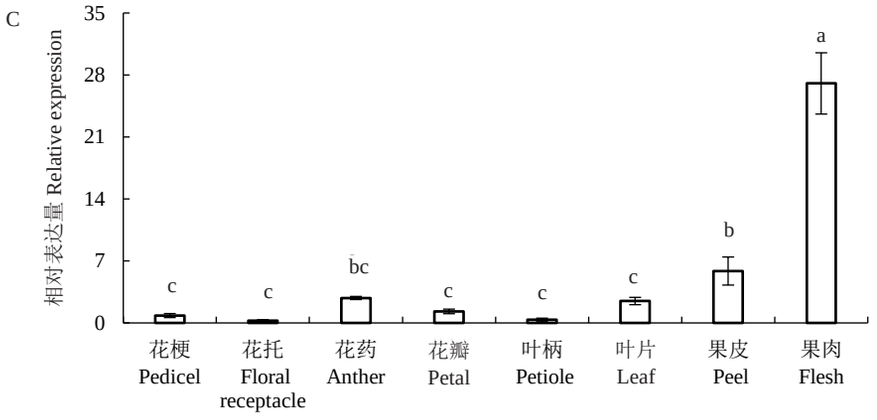


图 10 （续） Fig. 10 (Continued)

的影响，蛋白构象易发生改变，进而直接调控PPO活性变化，这也是梨果实采后贮藏、加工过程中酶活性易于波动、褐变程度差异显著的重要基础。同时，蛋白不稳定性也暗示梨PPO蛋白功能表达具有较强的环境敏感性，可快速响应植株生理状态与外界胁迫信号，参与植物应激代谢调控，这与启动子分析中发现的多数顺式作用元件的分析结果一致。

亚细胞定位预测结果显示，该家族蛋白主要分布于细胞质与叶绿体，少数成员定位于细胞核，仅1个成员定位于细胞外，提示PPO基因家族主要在细胞质和叶绿体中发挥生物学功能。叶绿体作为植物多酚物质合成的关键细胞器，富集大量酚类合成的前体物质，酚类物质合成后储存于液泡内。定位于叶绿体的PPO蛋白可直接就近催化多酚氧化反应，是梨果实组织褐变、叶片抗氧化代谢的核心功能载体，这与PPO为叶绿体定位功能蛋白的已有研究结论一致[19]。细胞质作为细胞代谢的主要场所，定位于细胞质的PPO蛋白可参与胞内基础多酚代谢、活性氧清除及逆境响应过程，在维持细胞内代谢稳态、抵御生物与非生物胁迫中发挥重要作用[30-31]。

跨物种共线性分析比较表明，梨*PPO*基因与苹果、桃等蔷薇科双子叶植物间存在显著的共线性关系，而与非蔷薇科双子叶植物及单子叶植物的共线性程度较低。该结果从基因组水平印证蔷薇科物种具有共同的祖先*PPO*基因拷贝，在物种分化过程中保留了同源基因区段；单子叶与蔷薇科双子叶植物分化时间久远，长期独立演化导致*PPO*基因所在基因组区段发生大量染色体重排、片段丢失与重复事件，同源共线性关系大幅弱化，这与植物传统分类及分子进化亲缘关系的结论相符。基因结构与MEME保守基序分析进一步证实梨PPO基因家族高度保守的进化特征。基因结构分析显示，多数*PpyPPO*基因不含内含子，基因结构整体较为简单，是多酚氧化酶基因家族典型的结构特征，无内含子结构可减少转录剪切过程，能够在胁迫、损伤等条件下诱导基因高效表达，快速响应果实损伤褐变过程。通过MEME基序分析发现，家族成员均含有核心保守基序，基序组成整体上高度保守；不同进化分支的PPO蛋白在特征性基序排布上存在差异，且基序特征与系统发育分类结果高度一致，能够保证多酚催化氧化等核心酶的功能稳定；但不同进化分支蛋白的基序排布模式存在特异性差异，且基序特征与系统发育聚类结果完全匹配，表明PPO基因家族在物种分化后随进化分支发生局部序列变异，基序排布分化是不同亚家族功能差异化的重要分子基础。

启动子顺式元件分析表明，*PpyPPO*基因启动子普遍富集光响应、激素应答、逆境胁迫及生长发育相关顺式作用元件，该特征与已报道其他植物*PPO*的表达调控规律相符[32-34]，表明*PPO*基因在木本果树中受到多重环境与内源激素信号的协同调控。其中，*PpyPPO10*启动子同时富集G-box、ARE、MeJA及MBS等关键功能元件，G-box为MYB转录因子经典结合位点，MBS、MeJA、ARE分别介导干旱、茉莉酸、厌氧胁迫应答，预示该基因可整合光信号、激素通路与多种逆境信号，在果实机械损伤、低温胁迫、成熟衰老过程中被大量诱导表达，极有可能是调控梨果实多酚氧化、果皮及果肉褐变的核心功能基因，是后续开展基因功能验证与品质改良的关键基因。

酚类物质是梨果实关键的次生代谢产物，具有双重生理作用，既可作为酶促褐变的直接底物，诱发果实品质劣变，又可参与植株抗氧化防御反应，增强抗逆能力[35]。植物体内酚类物质代谢稳态主要依赖苯丙烷主途径与酪氨酸支路协同调控[36]。本研究代谢通路基因表达分析结果表明，苯丙烷途径为梨果实酚类物质合成的核心通路，其关键结构基因PAL、4CL、C4H、HCT、C3H、COMT均呈现高表达特征，主导酚类合成通量；而酪氨酸支路作为重要的辅助合成通路，可在PPO催化下生成L-DOPA，并进一步转化为咖啡酸等前体物质，为绿原酸、阿魏酸等特征酚酸供给前体底物。

多酚氧化酶（PPO）是介导果实酶促褐变的关键氧化酶，普遍认为基因高表达会加剧果实褐变[37]，但基因水平与褐变表型之间并不存在绝对的正相关关系。已有研究表明，抗褐变菠萝品种中PPO活性偏高，依靠完整的抗坏血酸氧化还原系统与完整的细胞膜抑制褐变发生[38]。板栗抗褐变品种中*CmPPO*表达量显著高于褐变品种，表明*PPO*基因表达水平与果实褐变程度并非简单正相关[30]。此外，茄子果肉PPO活性与褐变程度也无显著关联，进一步表明褐变的复杂调控[39]。本研究发现，抗褐变品种红香酥中*PpyPPO10*表达量显著高于易褐变品种满天红，而满天红PPO活性则显著高于红香酥。结合代谢通路与生理特征分析，该现象可能源于*PPO*的双重生物学功能。一方面，PPO可通过酪氨酸代谢支路参与绿原酸、阿魏酸等抗氧化多酚的合成，红香酥中高表达的PPO优先驱动多酚合成通路，提高果实抗氧化能力；另一方面，PPO可氧化酚类底物生成褐色醌类物质，进而推动果实酶促褐变发生。这表明梨果实褐变是多通路协同调控的复杂性状，不能仅依靠*PPO*表达量作为评判褐变能力的唯一标准，其功能偏向、细胞微环境及整个次生代谢通路共同决定褐变表型。后续需结合体外酶活性测定、基因功能验证等试验，解析不同*PpyPPO*成员的功能分工，深入阐明梨果实褐变的分子调控机制。

基因表达模式分析为*PpyPPO10*核心功能提供了有力佐证。通路表达热图显示，*PpyPPO10*在褐变进程中存在百倍以上的显著差异表达，且在果实褐变的不同阶段及果实发育的不同阶段均维持稳定的差异表达特征，与苯丙烷通路关键酶基因的表达模式高度契合。时空转录组分析进一步表明，*PpyPPO10*在梨果实中特异性高丰度表达，果皮组织次之，明确了该基因的组织特异性与时序表达特征。

综上所述，*PpyPPO10*通过协同调控苯丙烷途径与酪氨酸支路，参与梨果实酚类物质合成与氧化过程，是介导梨果实酶促褐变的核心*PPO*基因。本研究明确了*PpyPPO10*在酚类代谢平衡与果实褐变调控中的关键地位，为后续梨果实褐变分子机制解析、开展抗褐变分子育种及采后保鲜技术研发提供了重要的目标基因与理论支撑。

4　结　论

本研究从云红1号、山西杜梨、砀山酥梨及Max Red Bartlett 4个梨品种中分别鉴定出8~10个*PPO*家族成员，并系统分析了其蛋白理化特性、亚细胞定位、共线性关系、染色体分布、基因结构、启动子顺式作用元件及系统进化关系。梨PPO蛋白主要定位于细胞质与叶绿体；梨*PPO*基因与苹果、桃等蔷薇科同源基因共线性显著；梨PPO基因家族成员集中分布于第5、10号染色体，并以串联重复形式排列；多数*PpyPPO*基因无内含子，基因结构较为简单；启动子区富含光响应、激素应答、逆境及发育相关调控元件，其中*PpyPPO10*启动子富集G-box、ARE、MeJA、MBS等多种元件，可能受MYB转录因子及多条通路协同调控，是参与梨果实褐变的关键候选基因。梨*PpyPPO*与苹果*MdPPO*聚类同一分支，亲缘关系最近，在果实褐变调控中功能保守。*PpyPPO10*协同苯丙烷与酪氨酸通路调控多酚合成，在抗褐变品种果肉中特异性高表达，进而参与褐变调控。本研究为梨果实褐变分子机制的解析、抗褐变梨新品种的培育提供了候选基因与理论依据。

参考文献 References:

[1] Du M N，Wang Y N，Zhang X Z，Wang S K，Su Y L，Wang L，Xue H B. Integrated metabolomic and transcriptomic analyses elucidate anthocyanin-mediated flesh coloration mechanisms in red- fleshed pear[J]. Frontiers in Plant Science，2025，16：1670229.

[2] 仵菲，蒲云峰，雷晓钰，何志浩，沈立荣，白红进 . 库尔勒香梨果实发育过程中酚类物质及抗氧化活性研究[J]. 果树学报，2022，39(4)：574-583.
Wu Fei，Pu Yunfeng，Lei Xiaoyu，He Zhihao，Shen Lirong，Bai Hongjin. Phenolic compounds and antioxidant activity of Kuerlexiangli pear fruit during the growth period[J]. Journal of Fruit Science，2022，39(4)：574-583.

[3] Men C L，Wu C C，Zhang J，Wang Y Q，Chen M，Liu C H，Zheng L. *α*-Lipoic acid treatment regulates enzymatic browning and nutritional quality of fresh-cut pear fruit by affecting phenolic and carbohydrate metabolism[J]. Food Chemistry，2024，458：140223.

[4] Su Y L，Gao X M，Zhang X Z，Yang J，Wang L，Wang S K，Wang L，Xue H B. Fine mapping and candidate gene analysis of flesh browning in pear (*Pyrus* L.)[J]. Scientia Horticulturae，2022，302：111140.

[5] Chen D X，Zhang Y，Zhao J S，Liu L，Zhao L. Research progress on physical preservation technology of fresh-cut fruits and vegetables[J]. Horticulturae，2024，10(10)：1098.

[6] 王斌，林薇，袁晓 . 鲜切果蔬褐变机理及防控技术研究进展[J]. 食品科学，2025，46(7)：367-384.
Wang Bin，Lin Wei，Yuan Xiao. Research progress in mechanism and preventive technologies for the browning of fresh-cut fruits and vegetables[J]. Food Science，2025，46(7)：367-384.

[7] Tilley A，McHenry M P，McHenry J A，Solah V，Bayliss K. Enzymatic browning：The role of substrates in polyphenol oxidase mediated browning[J]. Current Research in Food Science，2023，7：100623.

[8] Sultan M Z，Farouk K A，Elbagoury M M，Yahia E M. Trends in biochemical，anatomical mechanisms and molecular aspects in enzymatic browning of apples：A review[J]. European Food Research and Technology，2025，251(10)：3305-3326.

[9] Ninkuu V，Aluko O O，Yan J P，Zeng H M，Liu G D，Zhao J，Li H H，Chen S B，Dakora F D. Phenylpropanoids metabolism：Recent insight into stress tolerance and plant development cues[J]. Frontiers in Plant Science，2025，16：1571825.

[10] Basit A，Shahzad R，Mueed A，Muhammad A，Wang R，Liu Y，Gong X，Shahrokh K，Arshad M，Tao S T. A critical review on pear fruit's polyphenols and its chlorogenic acid：Composition，bioavailability，and pharmacological potential[J]. Food Bioscience，2025，68：106407.

[11] Zheng M L，Liu Y T，Zhang G F，Yang Z K，Xu W W，Chen Q H. The antioxidant properties，metabolism，application and mechanism of ferulic acid in medicine，food，cosmetics，livestock and poultry[J]. Antioxidants，2024，13(7)：853.

[12] Muheyuddeen G，Verma S，Yadav P，Khan M Y，Ahmad T，Khushtar M. Caffeic acid：A comprehensive review of its traditional use and modern pharmacological applications by 2025[J]. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas，2026，55(2)：336-382.

[13] Ahammed G J，Wu Y X，Wang Y M，Guo T M，Shamsy R，Li X. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG)：A unique secondary metabolite with diverse roles in plant-environment interaction[J]. Environmental and Experimental Botany，2023，209：105299.

[14] Zhou X，Iqbal A，Li J X，Liu C，Murtaza A，Xu X Y，Pan S Y，Hu W F. Changes in browning degree and reducibility of polyphenols during autoxidation and enzymatic oxidation[J]. Antioxidants，2021，10(11)：1809.

[15] Di Guardo M，Tadiello A，Farneti B，Lorenz G，Masuero D，Vrhovsek U，Costa G，Velasco R，Costa F. A multidisciplinary approach providing new insight into fruit flesh browning physiology in apple (*Malus* × *domestica* Borkh.)[J]. PLoS One，2013，8(10)：e78004.

[16] Chi M，Tang D，Xue C，Huang J P，Liu B，Cao M Q. Genome-wide analysis of polyphenol oxidase gene family in *Solanum tuberosum* and functional identification of StuPPO9 in regulating tolerance to *Phytophthora infestans*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology，2024，132：102310.

[17] 曾泽媛，罗勇，郑楚楚，李娟，李勤，林海燕，王坤波 . 茶树 PPO 基因家族的鉴定与分析[J]. 茶叶科学，2018，38(4)：385-395.
Zeng Zeyuan，Luo Yong，Zheng Chuchu，Li Juan，Li Qin，Lin Haiyan，Wang Kunbo. The identification and analysis of polyphenol oxidase gene family in tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. Journal of Tea Science，2018，38(4)：385-395.

[18] Qin F，Hu C H，Dou T X，Sheng O，Yang Q S，Deng G M，He W D，Gao H J，Li C Y，Dong T，Yi G J，Bi F C. Genome-wide analysis of the polyphenol oxidase gene family reveals that MaPPO1 and MaPPO6 are the main contributors to fruit browning in *Musa acuminata*[J]. Frontiers in Plant Science，2023，14：1125375.

[19] 柴亚倩，高璐瑶，董文其，石玉洁，张鹏，周胜军，朱育强，王欣，孙玉燕 . 普通丝瓜果实褐变鉴定评价及 *PPO* 基因家族分析[J]. 植物遗传资源学报，2026，27(2)：424-437.
Chai Yaqian，Gao Luyao，Dong Wenqi，Shi Yujie，Zhang Peng，Zhou Shengjun，Zhu Yuqiang，Wang Xin，Sun Yuyan. Identification and evaluation of fruit browning and analysis of the *PPO* gene family in luff a cylindrica[J]. Journal of Plant Genetic Resources，2026，27(2)：424-437.

[20] Xiao K，Liu X H，Zhang A D，Zha D S，Zhu W M，Tan F，Huang Q R，Zhou Y R，Zhang M，Li J Y，Wu X X. Genome-wide identification of polyphenol oxidase (PPO) family members in eggplant (*Solanum melongena* L.) and their expression in response to low temperature[J]. Horticulture，Environment，and Biotechnology，2022，63(5)：747-758.

[21] Shetty S M，Chandrashekar A，Venkatesh Y P. Promoter analyses and transcriptional profiling of eggplant polyphenol oxidase 1 gene (*SmePPO1*) reveal differential response to exogenous methyl jasmonate and salicylic acid[J]. Journal of Plant Physiology，2012，169(7)：718-730.

[22] He F，Shi Y J，Zhao Q，Zhao K J，Cui X L，Chen L H，Yang H B，Zhang F，Mi J X，Huang J L，Wan X Q. Genome-wide investigation and expression profiling of polyphenol oxidase (PPO) family genes uncover likely functions in organ development and stress responses in *Populus trichocarpa*[J]. BMC Genomics，2021，22(1)：731.

[23] Zhao J W，Zou Q，Bao T T，Kong M，Gu T T，Jiang L P，Wang T，Xu T Y，Wang N，Zhang Z Y，Chen X S. Transcription factor MdbZIP44 targets the promoter of *MdPPO2* to regulate brown-

ing in *Malus domestica* Borkh.[J]. Plant Physiology and Biochemistry，2024，214：108934.

[24] Chi M，Bhagwat B，Lane W D，Tang G L，Su Y Q，Sun R C，Oomah B D，Wiersma P A，Xiang Y. Reduced polyphenol oxidase gene expression and enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) with artificial microRNAs[J]. BMC Plant Biology，2014，14(1)：62.

[25] Yu Z M，Liao Y Y，Zeng L T，Dong F，Watanabe N，Yang Z Y. Transformation of catechins into theaflavins by upregulation of *CsPPO3* in preharvest tea (*Camellia sinensis*) leaves exposed to shading treatment[J]. Food Research International，2020，129：108842.

[26] Chai Y Q，Zhang P，Gao L Y，Shi Y J，Dong W Q，Zhou S J，Wang X，Zhu Y Q，Diao M，Sun Y Y. Transcriptome and metabolome profiling reveal the mechanism underlying fruit browning in sponge gourd (*Luffa cylindrica*)[J]. Postharvest Biology and Technology，2026，231：113926.

[27] Maioli A，Gianoglio S，Moglia A，Acquadro A，Valentino D，Milani A M，Prohens J，Orzaez D，Granell A，Lanteri S，Comino C. Simultaneous CRISPR/Cas9 editing of three *PPO* genes reduces fruit flesh browning in *Solanum melongena* L.[J]. Frontiers in Plant Science，2020，11：607161.

[28] Livak K J，Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods，2001，25(4)：402-408.

[29] Zhao Y Q，Liu Z A，Zhao L Y，Xi Y Y，Wu Z G，Zheng Y H，Jin P. Transcription factor PpMYB73 inhibits *PpPPO1* transcription and flesh browning in hydrogen sulfide-mitigated chilling injury of peach fruit[J]. Postharvest Biology and Technology，2026，232：114004.

[30] 程丽莉，程运河，曹庆昌，胡广隆，兰彦平 . 板栗 *PPO* 基因家族鉴定及生物信息学分析[J]. 果树学报，2020，37(9)：1305-1313.
Cheng Lili，Cheng Yunhe，Cao Qingchang，Hu Guanglong，Lan Yanping. Identification and bioinformatics analysis of *PPO* gene family in Chinese chestnut (*Castanea mollissima*)[J]. Journal of Fruit Science，2020，37(9)：1305-1313.

[31] Zhao Z L，Wang F，Deng M J，Fan G Q. Identification and analysis of *PPO* gene family members in *Paulownia fortunei*[J]. Plants，2024，13(15)：2033.

[32] Jin J T，Qi L Y，Shen S R，Yang S R，Yuan H，Wang A D. Violet LED light-activated MdHY5 positively regulates phenolic accumulation to inhibit fresh-cut apple fruit browning[J]. Horticulture Research，2025，12(1)：uhae276.

[33] Akhtar W，Aziz E，Koiwa H，Mahmood T. Characterization of rice polyphenol oxidase promoter in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. Turkish Journal of Botany，2017，41：223-233.

[34] Chen Y N，Mao J X，Zhang L L，Zhu C J，Qin Q P，Li N Y. Genome-wide identification and expression pattern analysis of polyphenol oxidase gene family in *Agaricus bisporus*[J]. Agronomy，2023，13(10)：2534.

[35] Xu L L，Wang X P. A comprehensive review of phenolic compounds in horticultural plants[J]. International Journal of Molecular Sciences，2025，26(12)：5767.

[36] El-Azaz J，Maeda H A. The multilayered regulation of aromatic amino acid biosynthesis in plants[J]. Trends in Biochemical Sciences，2025，50(12)：1051-1071.

[37] Fan J，Du W，Chen Q L，Zhang J G，Yang X P，Hussain S B，Hu H J. Comparative transcriptomic analyses provide insights into the enzymatic browning mechanism of fresh-cut sand pear fruit[J]. Horticulturae，2021，7(11)：502.

[38] Sangsoy K，Sanongkiet S，Srisamlee S，Beckles D M，Luengwilai K. Role of enzymatic browning and calcium transporters in internal browning of pineapple fruit[J]. Postharvest Biology and Technology，2024，218：113174.

[39] Gramazio P，Vilanova S，Plazas M，Andújar I，Hurtado M，Herraiz F J，Prohens J. Is it possible to combine high content in phenolics with low browning in fruits and vegetables?：A case in eggplant[J]. Bulletin UASVM Horticulture，2013，70(1)：115-123.