

香蕉 MaERF15 与 *MaACO8* 靶向结合调控果实采后成熟的分子机制

黄冰云^{1,2}, 郑云柯^{2,3}, 张建斌^{2,3}, 李新国^{1*}, 刘菊华^{2,3*}

1. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228; 2. 热带作物生物育种全国重点实验室/中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572024; 3. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101

摘要: 香蕉是典型的呼吸跃变型果实。MaERF15 是定位于细胞核且具有调控香蕉果实采后成熟作用的转录因子, *MaACO8* 是在香蕉果实采后成熟过程中高水平表达的 1 个乙烯生物合成关键酶-ACC 氧化酶基因, 但 MaERF15 和 *MaACO8* 的分子互作机制尚未明确。探究乙烯响应因子 MaERF15 对下游乙烯合成关键基因的转录调控机制, 为香蕉果实采后保鲜技术的创新提供理论依据。本研究从香蕉 DNA 中分离出 *MaACO8* 启动子序列, 通过生物信息学分析、GUS 染色等方法研究 *MaACO8* 的启动子活性; 采用酵母单杂交技术、EMSA、双荧光素报告系统和活体成像系统研究 MaERF15 与 *MaACO8* 启动子互作机制。结果表明: *MaACO8* 的启动子序列有 11 个, 与 AP2/ERF 转录因子的结合元件 GCC-box 具有较强的启动活性; MaERF15 能与 *MaACO8* 启动子的 GCC-box 特异性结合, 激活 *MaACO8* 的表达, 促进乙烯的生物合成进而调控果实成熟。本研究结果进一步完善了香蕉果实采后乙烯生物合成调控果实成熟的理论, 为香蕉耐贮运育种和成熟调控新技术的研发分别提供基因资源和理论依据。

关键词: 香蕉; MaERF15; *MaACO8*; 转录调控

中图分类号: S668.1 文献标志码: A

Molecular Mechanism of Banana MaERF15 Regulating Postharvest Fruit Ripening by Directly Binding *MaACO8* Promoter

HUANG Bingyun^{1,2}, ZHENG Yunke^{2,3}, ZHANG Jianbin^{2,3}, LI Xinguo^{1*}, LIU Juhua^{2,3*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. National Key Laboratory for Tropical Crops Breeding / Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572024, China; 3. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: Banana is a typical respiration fruit. MaERF15 is a transcription factor located in the nucleus and has the effect of regulating postharvest ripening of banana fruits. *MaACO8* is a key ethylene biosynthesis-ACC oxidase gene expressed at high levels during postharvest ripening of banana fruits. But the molecular interaction mechanism between the two has not been clarified. To explore the transcriptional regulation mechanism of ethylene response factor MaERF15 on the key genes of downstream ethylene synthesis was to provide a theoretical basis for the innovation of postharvest preservation technology of banana fruits. In this study, the promoter sequence of *MaACO8* was isolated from banana DNA, and the promoter activity of *MaACO8* was studied by bioinformatics analysis and GUS staining. Yeast monohybridization, EMSA, dual fluorescein reporter system and in vivo imaging system were used to study the interaction mechanism between MaERF15 and *MaACO8* promoter. The results showed that there were 11 GCC-boxes in the promoter sequence of *MaACO8* that bind to AP2/ERF transcription factors, which had strong priming activity. MaERF15 could specifically bind to the GCC-box of the *MaACO8* promoter, activate the expression of *MaACO8*, pro-

收稿日期 2024-12-03; 接受日期 2024-12-28

基金项目 国家自然科学基金面上项目 (No. 32172269); 国家香蕉产业技术体系建设专项 (No. CARS-31)。

作者简介 黄冰云 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 香蕉遗传改良。*通信作者 (Corresponding author): 李新国 (LI Xinguo), E-mail: lixinguo13@163.com; 刘菊华 (LIU Juhua), E-mail: juhua69@126.com。

mote the biosynthesis of ethylene, and regulate fruit ripening. The results further improved the theory of postharvest ethylene biosynthesis regulating fruit ripening of banana fruits, and would provide genetic resources and theoretical basis for the research and development of new technologies for storage and transportation tolerance breeding and maturity regulation of bananas, respectively.

Keywords: banana; MaERF15; *MaACO8*; transcription regulation

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.05.002

香蕉是全球产量最高的水果作物,也是全球水果贸易市场中重要的热带水果之一^[1]。香蕉果实是典型的呼吸跃变型果实,含有丰富的营养物质(如纤维、淀粉、多糖、维生素),对人体健康具有重要作用^[2-3]。香蕉作为全球贸易型的水果,在鲜果运输中保鲜技术显得尤为重要。随着生物技术的发展,研究果实品质形成与果实成熟机制有助于果实质量的提高和鲜果储存寿命的延长,促进果实保鲜技术的发展,减少全球鲜果产品的浪费^[4-5]。

乙烯响应因子(ethylene response factor, ERF)是 AP2/ERF (apetala2/ethylene response factor)大家族中的 1 个亚族,最早从烟草中分离发现,含有 1 个 AP2 结构域,处于乙烯信号转导通路中的下游,调控着植物的生长、发育、成熟与衰老^[6]。AP2/ERF 家族广泛参与植物生长和发育,包括组织分化和生殖器官的发育,还参与植物的生物和非生物胁迫反应^[7-10]。ERF 作为乙烯信号通路的最终应答基因,在果实成熟中发挥着重要作用,在多种植物水果中发现其表达调控的研究,ERF 通过结合下游 ACO、ACS、PG、EXP、PSY 等基因的启动子,直接调控果实成熟^[11-14]。ERF 与果实品质形成相关基因启动子靶向结合,参与调控番茄 (*Solanum lycopersicum* L.)、花椒 (*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.)、荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 等果实中胡萝卜素、花青素、酚类化合物等抗氧化物质的合成,影响果实品质的形成^[15-17]。ERF 调控果实果皮软化和乙烯生物合成关键基因,参与果实成熟的调控。番茄中,SlERF4、RIN 和 SlASR1 共同调控 β -D-N-乙酰己糖酶 (β -Hex) 的表达,参与调控果实成熟^[18]。柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 的 DkERF8、DkERF16 和 DkERF19 通过激活 *DkXTH9* 启动子参与脱涩期间的果实软化^[19];在猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.) 的研究中发现,AdERF9 通过抑制 *AdXET5* 启动子的活性,影响猕猴桃果实的成熟^[20]。木瓜 [*Pseudocarya sinensis* (Dum.Cours.)

C. K. Schneid.] CpERF9 作为转录抑制因子,与 *CpPME1*、*CpPME2* 和 *CpPG5* 启动子中的 GCC-box 结合,调控木瓜果实的成熟^[21]。桃 [*Prunus persica* (L.) Batsch] PpeERF2 通过抑制 2 个 ABA 生物合成基因 *PpeNCED2*、*PpeNCED3* 以及细胞壁降解基因 *PpePG1* 的表达,调控木瓜果实的成熟^[22]。DkERF8 和 DkERF16 分别增强了细胞修饰基因 *DkXTH11* 和 *DkXTH11* 的启动子活性,促进其转录表达。DkERF18 增强了乙烯合成酶基因 *DkACS2* 启动子活性,促进了乙烯的生物合成和柿子果实的成熟^[23]。苹果 (*Malus domestica* Borkh.) MdERF2 抑制了乙烯合成关键基因 *MdACS1* 的转录表达,而 MdERF3 促进 *MdACS1* 的表达, MdERF2 与 MdERF3 拮抗调节果实的成熟^[24]。PpERF4 通过与 *PpACO1* 和 *PpIAA1* 基因的启动子结合促进其表达。ERF 还与其他蛋白形成复合物,共同调控果实的成熟。PpERF4 与 PpIAA1 结合形成复合物,促进脱落酸生物合成基因 *PpNCED2* 和 *PpNCED3* 以及果实软化基因 *PpPG1* 的表达,加速了桃子果实成熟,缩短了果实货架期^[25]。以上研究报道表明了 ERF 在果实成熟中的重要意义。在香蕉全基因组水平上重新鉴定香蕉 A 基因组中的 AP2/ERF 家族成员,研究其在香蕉果实采后成熟过程中的差异表达特性,发现 AP2/ERFs 家族共有 317 个家族成员,其中 *MaERF15* 在巴西蕉和粉蕉果实成熟过程中处于高表达水平,说明其可能在香蕉果实成熟中具有重要作用,可调控成熟相关基因的表达,从而影响果实采后成熟^[26]。前期从香蕉基因组中分离鉴定出 *MaERF15*,并通过亚细胞定位,转录激活等实验,明确了 *MaERF15* 是定位于细胞核中具有转录激活活性的转录因子,但 *MaERF15* 参与乙烯生物合成调控果实成熟相关的研究还未见报道^[27]。

香蕉是典型的呼吸跃变型果实,伴随着呼吸跃变,内源乙烯生物合成量迅速上升并在短时间内达到高峰,所以内源乙烯的生物合成在果实采后成熟过程中发挥重要作用^[28]。香蕉果实内源乙

烯生物合成过程分 3 个重要步骤：首先是在 S-腺苷蛋氨酸合成酶 (S-adenosyl-l-methionine synthase, SAMS) 的作用下将蛋氨酸合成 S-腺苷蛋氨酸；第二步是在氨基环丙烷羧酸合成酶 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, ACS) 的作用下将 S-腺苷蛋氨酸合成 1-氨基环丙烷羧酸；最后在氨基环丙烷羧酸氧化酶 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase, ACO) 的作用下将 1-氨基环丙烷羧酸氧化生成乙烯^[29]。在此过程中, ACO 基因的表达与乙烯生物合成速率呈正相关, 其基因活性可用于调控高等植物中乙烯的生物合成^[30]。1991 年, 首次成功地从甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 果实组织 cDNA 中提取分离得到 ACO 基因序列并体外验证其活性^[31]。ACO 是乙烯生物合成的关键酶基因, 直接影响着乙烯的生物合成, 在植物生长的各个时期发挥着重要作用, 对植物生长、花朵衰落和果实成熟的研究中具有重要意义^[32]。ACO 作为主要靶基因在基因工程中被 TFs 转录调控研究果实成熟。甜瓜 CmPIF8 抑制 CmACO1 启动子的活性, 从而促进了乙烯的释放, 加速了果实的成熟, 间接增加了采后甜瓜果实中的蔗糖含量^[33]。在南果梨果实的 *PuACO* 家族研究中发现 *PuACO2*、*PuACO3* 和 *PuACO11* 在果实成熟和乙烯生物合成中起重要作用, 可被乙烯诱导并被 1-MCP 处理抑制^[34]。ACO 是一个重要的限速酶, 其高表达直接影响乙烯的生物合成, 形成一个正反馈调节机制, 进一步促进果实的成熟^[35]。分析香蕉基因组发现有 11 个 *MaACO* 基因在果实成熟过程中表现出高表达水平, *MaACO* 可能在果实成熟中具有重要的作用, 但香蕉果实中乙烯响应因子 MaERF15 与关键酶基因 ACO 具体的调控机制还不清楚^[36]。

本研究选取 *MaACO8* 作为靶基因, 研究其启动子的结构特征和启动活性, 发现 *MaACO8* 启动子具有较强的活性, 并受乙烯响应因子 MaERF15 的转录调控。本研究解析了 MaERF15 与 *MaACO8* 启动子互作调控果实成熟的分子机制, 促进 ERF 家族在香蕉果实品质中的研究, 为香蕉果实采后成熟或保鲜新技术的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

巴西蕉果实 (*Musa* spp, Cavendish) 采自中国热带农业科学院热带生物技术研究所文昌种植基

地; 本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 种子由本实验室提供; 大肠杆菌 DH5 α 感受态、农杆菌 GV3101 感受态和 Y1H 酵母感受态均购自上海唯地生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *MaACO8* 启动子的分离扩增与生物信息学分析 (1) *MaACO8* 启动子的分离扩增。根据香蕉 A 基因组数据库 (<http://banana-genome.cirad.fr/>), 从香蕉基因组 DNA 中分离出 *MaACO8* 启动子序列, 设计 *MaACO8* 启动子序列引物, 以巴西蕉 DNA 为模板扩增目的片段, 并连接到 pMD19-T 载体中, 将连接产物转化大肠杆菌感受态, 进行 PCR 鉴定, 挑选阳性菌株送测序, 将测序正确的菌株扩大培养提取质粒, 得到 pMD19-T-*MaACO8* 质粒。

(2) 生物信息学分析。利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线网站对启动子元件进行生物信息学分析, 使用 TBtools 软件制作启动子结构可视化图。

1.2.2 目的基因克隆及载体构建 (1) *MaERF15* 的克隆及相关载体的构建。根据基因的 cDNA 序列设计特异性引物, 以巴西蕉 cDNA 为模板扩增 *MaERF15* 全长, 并连接到 pMD19-T 载体中, 将连接产物转化大肠杆菌感受态, 经 PCR 鉴定后, 挑选阳性菌株送测序, 将测序正确的菌株活化培养并提取质粒, 得到 pMD19-T-*MaERF15* 质粒。分别在特异性引物两端添加无缝克隆接头序列, 以 pMD19-T-*MaERF15* 质粒为模板, 扩增目的片段, 分别连接到 pGreen II 62-SK 和 pGADT7 载体中。扩增、回收、连接、转化鉴定并送测菌液。扩大培养测序正确的 pGADT7-*MaERF15* 和 pGreen II 62-SK-*MaERF15* 菌液并抽提重组质粒。

(2) *MaACO8* 启动子的克隆及相关载体的构建。根据 *MaACO8* 基因启动子序列设计包含 *MaERF15* 结合位点的特异性引物, 以 pMD19-T-*MaACO8* 质粒为模板扩增启动子片段。将 pBI121 的 35S 启动子替换为 *MaACO8* 启动子, 用 *Sda* I 和 *Xba* I 双酶切 pBI121 载体和启动子, 将扩增片段 *MaACO8* 启动子连接到 pBI121 载体中。分别在特异性引物两端加无缝克隆接头序列, 以 pMD19-T-*MaACO8* 为模板扩增目的片段, 分别连接到 pAbAi、pGreen II 0800-LUC 表达载体中。将连接产物转化大肠杆菌感受态, 经 PCR 鉴定

后, 挑选阳性菌株送测序, 将测序正确的菌株活化培养提取质粒, 得到 pBI121-*MaACO8*、pAbAi-*MaACO8* 和 pGreen II 0800-*LUC-MaACO8* 重组质粒。

1.2.3 *MaACO8* 启动子的活性检测 (1) 转化农杆菌。将构建好的 pBI121-*MaACO8* 重组质粒转化农杆菌 GV1301, 具体转化步骤如下: 从 -80 °C 冰箱内取出 GV1301 农杆菌感受态细胞, 迅速插入冰盒内, 使其溶解。加入 pBI121-*MaACO8* 质粒轻轻混匀, 依次于冰盒上静置 5 min、液氮 5 min (或干冰乙醇浴 -80 °C 和 -80 °C 冰冻)、37 °C 水浴 5 min、冰浴 5 min。添加 700 μ L 不含抗生素的 YEB 液体培养基, 混合均匀, 于 28 °C 震荡培养 2~3 h。6000 r/min 离心 1 min, 收集菌体, 留取 100 μ L 左右上清轻轻吹打重悬菌体并涂布于含相应抗生素的 YEB 平板上, 倒置于 28 °C 培养箱培养 2~3 d。挑菌进行 PCR 鉴定, 将阳性菌株放入 50 mL 的离心管中扩大培养备用。

(2) 农杆菌介导法侵染香蕉果实切片。将农杆菌菌液在 30 °C 的恒温摇床中震荡培养至 $OD_{600}=0.8$, 8000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 并用加入 200 μ mol/L 乙酰丁香酮 (AS) 的 MS 液体培养基重悬至 $OD_{600}=0.6\sim0.8$, 室温暗处静置孵育 2~3 h。将香蕉果实切成形状和厚度大致相同的薄片, 于 1.5% 亚硫酸氢钠溶液中浸泡 10 min。把香蕉薄片放入孵育好的菌液中, 进行真空辅助侵染。将侵染后的香蕉薄片均匀放置于 1/2MS 固体培养基上 28 °C 暗培养 3 d, 每组重复 3 次。

(3) GUS 染色实验。选取侵染后大小相近的香蕉果实薄片置于 50 mL 小烧杯中放于 GUS 染液中进行染色处理过夜, 每组重复 3 次, 具体操作步骤按照试剂盒说明书, 把染色处理后的果片用 75% 乙醇进行脱色, 直到脱色液透明, 将果片体置于体视显微镜下观察拍照。切去 35S 启动子的空载体为阴性对照, 正常 pBI121 载体为阳性对照。

(4) GUS 酶活性检测。将侵染后的香蕉薄片样品放入研钵中, 加入液氮研磨, 然后取 200 mg 样品放入 1.5 mL 离心管中, 加入 1800 μ L PBS, 涡旋 30 s 后, 在冰上静置 10 min, 接着 12 000 r/min 离心 10 min, 离心后收集的上清液为 GUS 酶活的测定样品。具体检测方法参考植物 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) ELISA 试剂盒 (mlbio 酶联生物, 中国) 说明书。

1.2.4 酵母单杂交 (YIH) (1) AbA 的背景筛选。①转化 Y1H Gold 酵母感受态: 将构建好的 pAbAi-*MaACO8* 和 pAbAi-*p53i* 质粒用 *Bst*BI 单酶切, 65 °C 酶切 1 h, 电泳凝胶检测正确后, 纯化回收目的片段, 转化 Y1HGold 酵母感受态细胞 (转化步骤参照 Y1H 酵母感受态转化说明书)。观察菌落生长情况, 并挑选出长势较好的菌落, PCR 鉴定 pAbAi-*MaACO8* 整合到 Y1HGold 基因组中的情况。将检测正确的阳性菌株保存 (-80 °C 甘油保存), 此酵母菌株为 Y1HGold (pAbAi-*MaACO8*) 阳性菌株。②AbA 背景表达水平筛选: 挑取固体培养基中 Y1Hgold (pAbAi-*MaACO8*) 阳性单克隆, 用 100 μ L 0.9% NaCl 溶液吸打混匀, 测定其吸光度, 根据比例稀释菌液至 $OD_{600}=0.002$ 。吸取 100 μ L 混合液均匀涂布于含有不同浓度 AbA 抗生素的 SD/-Ura 固体培养基上, 设置 AbA 浓度每 50 ng 为 1 个梯度, 设置范围为 0~1000 ng/mL。30 °C 倒置培养 48~72 h。观察不同 AbA 浓度下 SD/-Ura 板上单菌落的生长情况, 若到某一个浓度酵母菌无法生长, 则在该浓度范围内进行细致筛选, 最终筛选 AbA 表达水平为酵母无法生长的最低浓度。

(2) 酵母转化。①Y1H Gold (pAbAi-*MaACO8*) 酵母感受态制备: 在 SD/-Ura 板上挑取 3~5 个 Y1Hgold (pAbAi-*MaACO8*) 阳性菌于 3 mL YPDA 培养基中, 在 30 °C 摇床中 200 r/min 活化培养 8~12 h; 选取活性强的菌液, 吸取 5 μ L 加入到 50 mL 的 YPDA 培养基中在 250 mL 的锥形瓶继续培养孵育, 16~20 h 至 $OD_{600}=0.15\sim0.3$; 将菌液收集于 50 mL 离心管中, 7000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 50 mL 的 YPDA 重悬, 于 250 mL 的锥形瓶培养 3~5 h, 使得 $OD_{600}=0.4\sim0.5$; 收集菌体 7000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 30 mL ddH₂O 重悬, 7000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 将沉淀重悬于 1.5 mL 的 1.1 $\times$ TE/LiAC; 细胞悬液转移至 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 50 s, 弃上清液, 向管中沉淀加入 600 μ L 1.1 $\times$ TE/LiAC, 酵母 Bait-*MaACO8* 感受态制备完成 (保存于冰上, 2 h 内转化)。②Y1HGold (pBait) 酵母感受态与 Prey 表达载体互作验证: 取上述 50 μ L Y1Hgold (pAbAi-*MaACO8*) 酵母感受态细胞放入 2 个 1.5 mL 离心管中, 向管中分别加入 100 ng Prey 表达载体 pGADT7-*MaERF15* 和 pGADT7, 具体转化步骤参照 1.2.4 (1) 中的转化方法, 吸取 100 μ L

转化菌液涂布于 SD/-Leu 板上, 培养 3~5 d。待菌落长出后, 挑取单菌落溶于 1 mL 0.9% NaCl 溶液, 将 OD₆₀₀ 调至 0.2, 点涂于 SD/-Leu 和 SD/-Leu+AbA 固体培养基上, 观察每组酵母菌的生长情况, 从而确定互作情况。

1.2.5 凝胶阻滞实验 (EMSA) 将 *MaERF15* 基因的编码序列克隆到 pGEX-4T-1 载体 (Amersham Biosciences, USA) 上, 获得带 GST (glutathione S-transferases) 标签的重组蛋白, 将重组蛋白转化 *Escherichia coli* 菌株 BM Rosetta (DE3), 得到的蛋白用 Glutathione-Superflow Resin (Clontech) 进行纯化。*MaACO8* 启动子与 *MaERF15* 的结合顺式作用元件的探针序列 (5-ATGGCCGACATGC-3) 由上海生工合成, 其 5' 端用生物素标记。EMSA 具体操作步骤参照 XIAO 等^[37]的方法。

1.2.6 双荧光素酶报告系统试验 (1) 转化农杆菌 GV3101。参照上述 1.2.2 转化农杆菌 GV3101 的方法, 将构建好的 pGreen II 0800-LUC-*MaACO8* 和 pGreen II -62-SK-*MaERF15* 质粒分别转化农杆菌感受态 GV3101 (pSoup)。pGreen II 0800-LUC 和 pGreen II 62-SK 空载体转化为对照。

(2) 烟草转化和瞬时表达。将实验组 (GV3101/pGreen II -LUC-*MaACO8* 和 GV3101/pGreen II -62-SK-*MaERF15*) 与对照组 (GV3101/pGreen II 0800-LUC-*MaACO8* 和 GV3101/pGreen II -62-SK) 分别置于 YEP 液体培养基 (25 μg/mL Rif、50 μg/mL Kan 和 20 μg/mL Tet) 中, 30 °C, 220 r/min 活化扩大培养至 OD₆₀₀=0.8, 5000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。将菌体用侵染液重悬至 OD₆₀₀=0.6, 室温静置 2 h。将 GV3101/pGreen II -LUC-*MaACO8* 分别与 GV3101/pGreen II -62-SK 和 GV3101/pGreen II -62-SK-*MaERF15* 以 1:3 的

体积比混匀。用去掉针头的 1 mL 注射器将混合好的菌液从烟草叶背面进行注射。为保证实验背景的一致性, 需要将对照载体和实验目标载体的菌液注射在同一叶片的不同部位上。室温条件下培养 2 d, 每天向叶片喷水 1~2 次, 保持湿润。

(3) 双荧光素酶报告基因活性检测。取注射后的实验组和对照组烟草叶片分别放入研钵中研磨, 参照 FU 等^[21]的方法测定萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性值, 最后统计分析实验组和对照组的萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶活性值 (LUC/REN)。

(4) 活体植物发光成像观察。将 1.2.6 (1) 中的菌液 1:3 混匀组成 4 种组合, 在同一片叶片中分为 4 个区域分别注射 4 种组合的菌液分为对照组和实验组。48 h 后用活体植物发光成像系统进行拍照观察, 观察前需要于暗处在烟草叶片上喷洒反应底物 D-虫荧光素钾盐溶液反应 5 min。

1.3 数据处理

使用 Excel、GraphPadPrism 9.5、TBtools、IBM SPSS Statistics 25 软件对数据进行统计和分析。

2 结果与分析

2.1 *MaACO8* 启动子的克隆和生物信息学分析

根据香蕉 A 基因组数据库 (<http://banana-genome.cirad.fr/>) BLAST, 从香蕉基因组 DNA 中分离出 2000 bp 的 *MaACO8* 启动子序列, 采用 PlantCARE 软件对 *MaACO8* 启动子进行生物信息学分析。结果表明, *MaACO8* 启动子包含 11 处与 ERF 结合的 GCC-box 核心启动子元件、36 个 CAAT-box、14 个负责启动、促进和增强转录的 TATA-box 等 (图 1)。

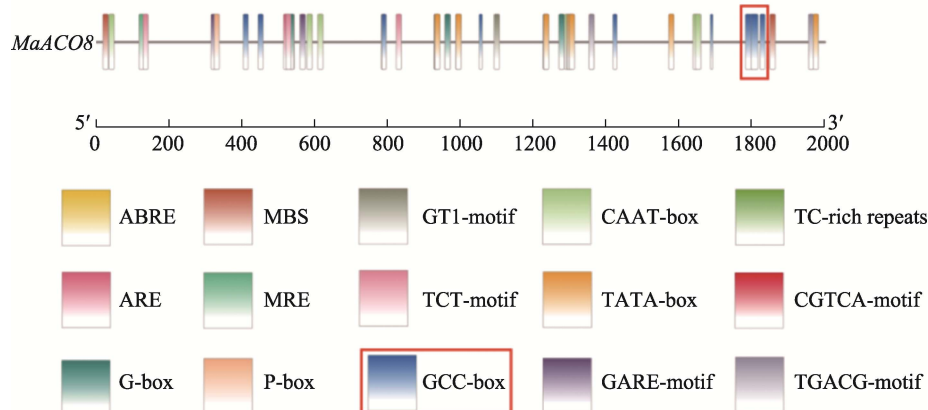


图 1 *MaACO8* 启动子结构可视化分析

Fig. 1 Visual analysis of *MaACO8* promoter structure

2.2 MaACO8 启动子活性检测

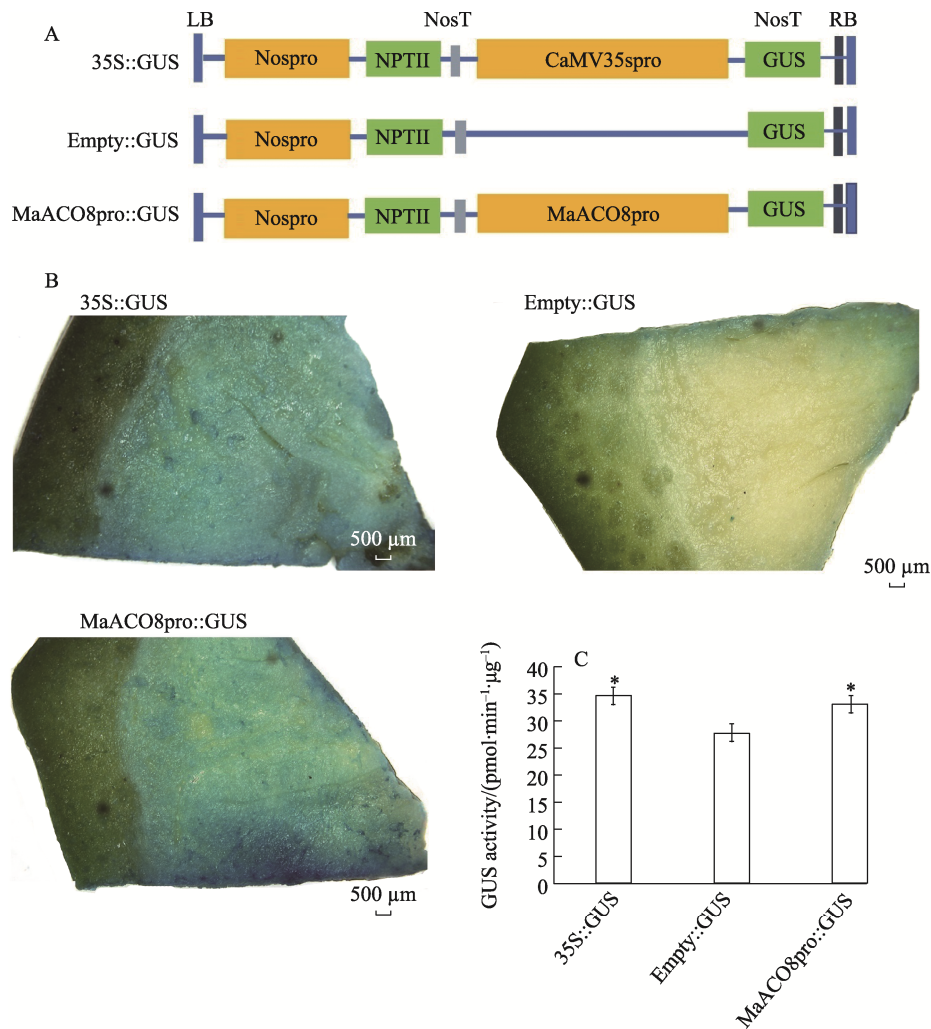
将 *MaACO8* 启动子取代 pBI121 载体的 35S 启动子（图 2A），利用农杆菌介导法转化侵染香蕉果实切片。pBI121 作为阳性对照，去除 35S 启动子的 pBI121 作为阴性对照进行 GUS 染色。染色结果显示，使用 *MaACO8* 启动子侵染的香蕉薄片颜色比阴性对照蓝，但比阳性对照稍浅（图 2B）。其 GUS 活性（图 2C）与染色结果一致，表明 *MaACO8* 启动子具有较强的启动活性。

2.3 MaERF15 与 MaACO8 启动子的互作机制

2.3.1 pAbAi-MaACO8 载体转化酵母 为了验证 MaERF15 是否与 *MaACO8* 启动子存在互作关系，分别将 MaERF15 和 *MaACO8* 启动子构建到 pGADT7 和 pAbAi 载体中，得到 pGADT7-Ma

ERF15 和 pAbAi-MaACO8 重组载体进行酵母单杂交实验（图 3A）。将构建好的 Bait 载体 pAbAi-MaACO8 和 pAbAi-p53i 质粒用 *Bst*b I 单酶切反应后回收。将酶切产物转化到酵母 Y1HGold 感受态中，取 100 μL 转化产物涂布于 SD/-Ura 培养基上，30 °C 倒置培养 48~96 h，挑取单菌落进行 PCR 鉴定，检测 pBait-AbAi 是否整合到酵母菌株中（pAbAi-p53i 为阳性对照）。结果表明 pAbAi-MaACO8 载体成功整合到酵母基因组中，诱饵载体转化成功。

2.3.2 AbA 背景筛选 金担子素 A (aureobasidin A, AbA) 是环酯肽类抗生素中的一种，其浓度为 0.1~0.5 μg/mL 时能抑制酵母菌株生长。以 pAbAi-p53i 为对照检验金担子素的背景表达，其酵母菌



A: pBI-121 载体构建示意图。B: 香蕉果实切片 GUS 染色；C: GUS 活性检测，*表示差异显著（ $P<0.05$ ）。
A: Schematic diagram of vector construction; B: Assay of GUS histochemical staining in banana fruit slices;
C: GUS activity analysis, * indicates significant difference ($P<0.05$).

图 2 MaACO8 启动子活性检测
Fig. 2 Analysis of MaACO8 promoter activity

株的生长浓度范围是 0~200 ng/mL。结果表明,抑制 pAbAi-*MaACO8* 酵母菌株生长的最低 AbA 浓度为 50 ng/mL。

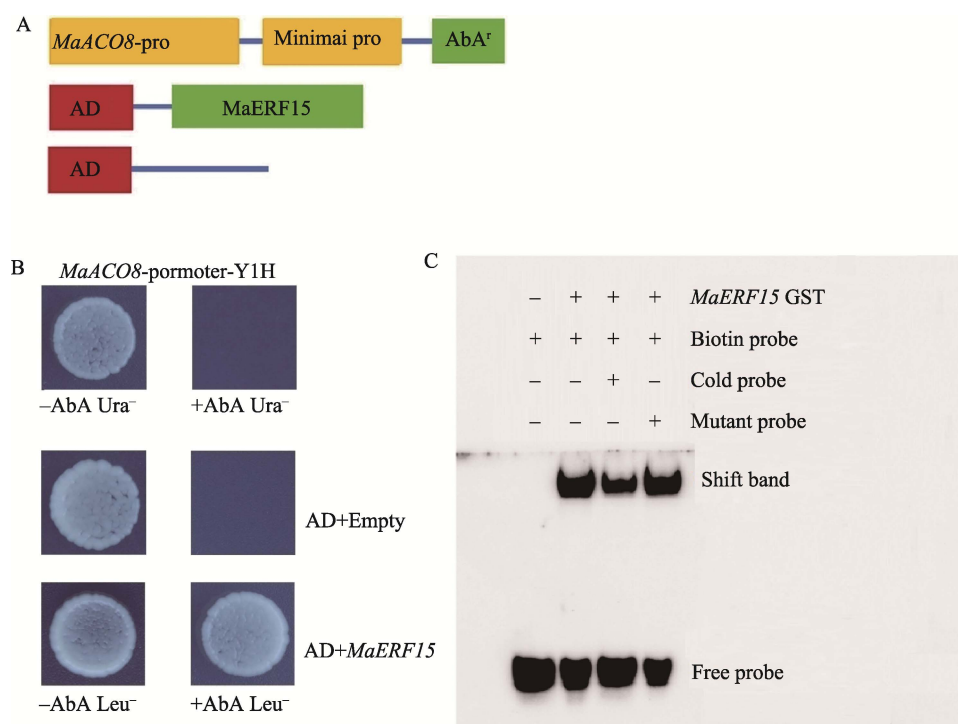
2.3.3 酵母单杂交 将转入 pAbAi-*MaACO8* 诱饵载体的酵母菌制作成 Y1HGold (pBait) 酵母感受态后与 *MaERF15* 构建的 Prey 表达载体共转化后观察酵母细胞的生长情况。如图 3B 所示,酵母细胞在不含有抗生素 AbA 的 SD/-Leu 培养基上生长良好。培养基内加入抗生素 50 ng/mL 的 AbA 后,实验组 (AD-*MaERF15*+*MaACO8*-promoter) 的酵母细胞可以正常生长;而阴性对照组 (AD-Empty+*MaACO8*-promoter) 共转化的酵母细胞则不能生长,表明 *MaERF15* 与 *MaACO8* 启动子互作。

2.3.4 凝胶阻滞实验 (EMSA) 生物信息学分析结果表明 *MaACO8* 的启动子有 *MaERF15* 的结合元件 GCC-box, 因此采用 EMSA 技术来验证 *MaERF15* 是否能与 *MaACO8* 的启动子直接结合。如图 3C 所示, *MaERF15* 转录因子能与 *MaACO8* 的启动子上的 GCC-box 直接结合, 随着竞争性的冷探针的加入显著降低了 *MaERF15* 与 *MaACO8*

启动子的结合能力, 加入非标记的突变探针并未影响 *MaERF15* 与 *MaACO8* 的结合能力, 非标记的突变探针则不能与 *MaERF15* 结合。以上结果表明 *MaERF15* 转录因子能特异性地与 *MaACO8* 的启动子上的 GCC-box 直接结合。

2.4 *MaERF15* 对 *MaACO8* 的转录调控作用

分别将 *MaERF15* 和 *MaACO8* 构建到 pGreen II 62-SK 和 pGreen II 0800-LUC 载体中, 得到 pGreen II -62-SK-*MaERF15* 和 pGreen II 0800-LUC-*MaACO8* 重组载体 (图 4A)。转化农杆菌侵染烟草叶片, 用双荧光素酶报告基因检测试剂盒对荧光素酶活性进行检测, 验证 *MaERF15* 与 *MaACO8* 的启动子的互作能力。将报告载体与效应载体共侵染烟草叶片, 将 *MaACO8* 启动子加空效应载体作为对照组, 其 LUC/REN 比值作为 1。结果显示, *MaERF15* 与 *MaACO8* 启动子共侵染烟草叶片 LUC 活性显著高于对照组 (图 4B)。同样地, 在活体植物发光成像系统下荧光强弱也直观显示出 *MaERF15* 与 *MaACO8* 启动子的荧光素酶活性明显高于对照组 (图 4C), 这充分说明 *MaERF15* 对 *MaACO8* 的转录具有激活作用。

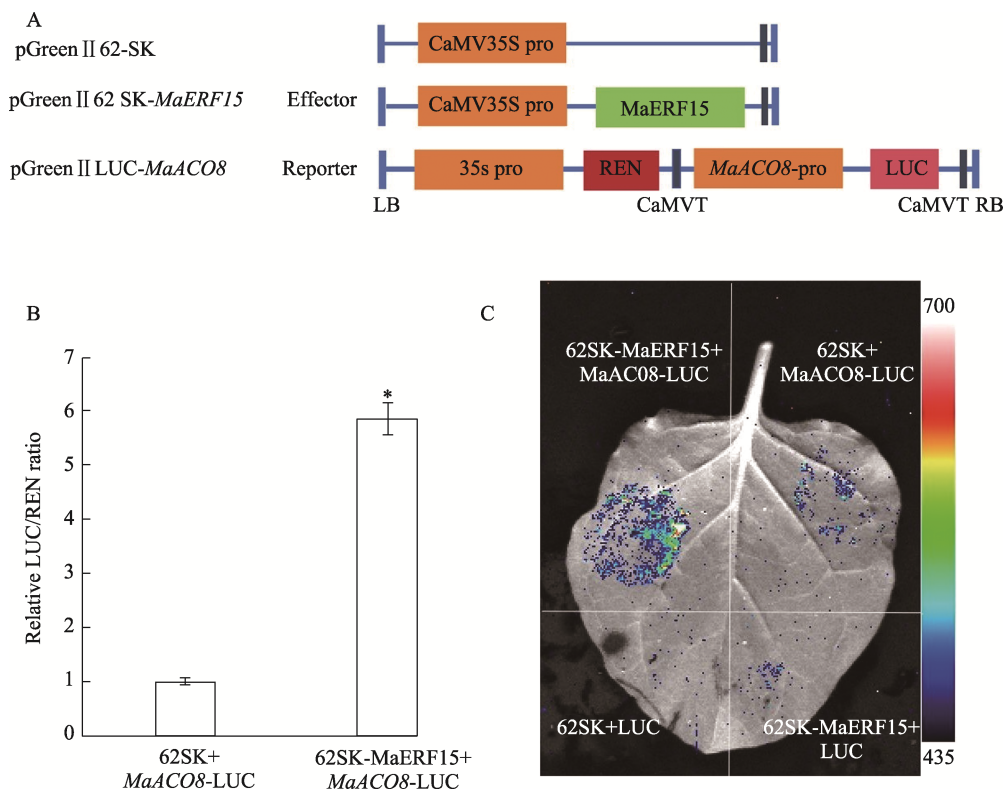


A: 酵母单杂交载体示意图; B: 酵母单杂交验证; C: EMSA 验证, Shifted band 表示 *MaERF15* 与 *MaACO8* 启动子的结合带, “-”表示无, “+”表示有。

A: Schematic diagram of vector construction for Y1H; B: Y1H assay; C: EMSA assay, The shifted bands indicate the binding of *MaERF15* to the *MaACO8* promoter, “-” indicates absence, “+” shows presence.

图 3 *MaERF15* 与 *MaACO8* 启动子的相互作用

Fig. 3 Interaction of *MaERF15* with *MaACO8* promoter



A: 双荧光素报告系统载体构建示意图; B: 双荧光素报告系统检测, *表示差异显著 ($P<0.05$); C: 活体成像检测。
A: Schematic diagram of vector construction for LUC/REN; B: Relative LUC/REN ratio, * indicates significant difference ($P<0.05$); C: Live imaging.

图 4 MaERF15 对 MaACO8 的转录调控作用

Fig. 4 Analysis of transcription regulation of MaERF15 on MaACO8

3 讨论

香蕉采后成熟决定了水果的保质期, 乙烯生物合成是决定香蕉成熟的核心因素^[38]。ACO (1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶) 是植物乙烯合成途径中的关键酶, 对植物的开花、果实成熟和种子发育等生物学过程有重要影响, 参与调控植物的成熟和衰老过程^[39]。2003 年, RASORI 等^[40]构建 β -葡萄糖醛酸酶 (GUS) 报告基因与桃 ACO 基因启动子之间的嵌合融合体, 转化番茄植株, 并在桃果实中进行瞬时活性鉴定, 分析 ACO 启动子的功能。本研究通过将 MaACO8 启动子构建到具有 β -葡萄糖醛酸酶 (GUS) 报告基因的 pBI121 载体中, 使用农杆菌介导法转化到香蕉果片中, 通过染色观察 GUS 基因的瞬时表达情况和定量分析 GUS 酶活性, 从而确定启动子活性的强弱, 研究结果表明 MaACO8 启动子具有较强的启动子活性。

ERF 是 AP2/ERF 超家族的一个亚家族, 广泛参与调控果实品质的形成, 是植物生长过程中重要的转录因子^[41]。ERFs 作为激活子或抑制子调控果实品质形成相关基因的表达, 参与果实成熟的调

控。ERFs 可以直接或间接调控乙烯生物合成中的关键酶基因 ACS 和 ACO, 直接影响果实中乙烯的生物合成, 进而影响成熟过程^[42]。MdERF4 直接与 MdACS1 启动子结合并抑制其表达, 并与 MdERF3 启动子结合, 抑制 MdERF3 对 MdACS1 启动子的激活作用, 间接抑制了乙烯的合成, 延长了果实的贮藏期^[43]。WANG 等^[36]从香蕉 A 基因组中鉴定到 11 个与果实成熟密切相关的 ACO 基因, 其中 MaACO8 在巴西蕉和粉蕉果实采后成熟过程中高水平表达, 这与 MaERF15 在采后果实中的表达具有相似的趋势, 二者互作在调控香蕉果实采后乙烯生物合成和果实成熟过程中具有重要作用。本研究中的 MaERF15 是乙烯响应因子, 生物信息学分析结果表明 MaACO8 启动子区域有多个 ERF 转录因子结合域, 酵母单杂交实验证明二者存在互作关系, EMSA 证明 MaERF15 与 MaACO8 基因启动子的 GCC-box 直接结合, 并通过双荧光素酶报告系统和活体荧光成像系统证实了 MaERF15 对 MaACO8 的转录调控作用, 进而调控乙烯的生物合成, 影响香蕉的成熟过程。这与香蕉 B 基因

家族中 MbERF71、MbERF113 可分别靶向 *MbACO2* 启动子的 GCC-box, 激活 *MbACO2* 的表达结果一致^[44]。MaERF11 转录因子募集组蛋白脱乙酰酶 MaHDA1 并与 *MaACO1* 启动子相互作用以抑制其表达, 而 MaERF9 则激活 *MaACO1* 启动子活性^[45]。这表明乙烯合成关键酶基因 *ACO* 受到多个 ERF 家族成员的复杂调控。ERF 参与果实成熟调控的网络错综复杂, 本研究解释了 ERF 通过转录调控乙烯生物合成关键基因 *ACO* 参与果实成熟的调控机制。

4 结论

本研究揭示了香蕉中乙烯响应因子 MaERF15 与乙烯生物合成关键基因 *MaACO8* 相互作用参与果实成熟的调控机制。MaERF15 与 *MaACO8* 启动子中的 GCC-box 靶向结合, 激活 *MaACO8* 的表达, 从而促进果实中乙烯的生物合成, 加快果实成熟的进程。本研究促进了 ERF 转录因子调控下游乙烯生物合成关键基因的研究, 进一步解析 ERF 在采后果实成熟中的调控网络, 为种质资源改良和果实保鲜技术的创新提供理论基础。

参考文献

- [1] PANIGRAHI N, THOMPSON A J, ZUBELZU S, KNOX J W. Identifying opportunities to improve management of water stress in banana production[J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 276: 109735.
- [2] QAMAR S, SHAIKH A. Therapeutic potentials and compositional changes of valuable compounds from banana: a review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 79: 1-9.
- [3] KUMAR P S, SARAVANAN A, SHEEBA N, UMA S. Structural, functional characterization and physicochemical properties of green banana flour from dessert and plantain bananas (*Musa* spp.)[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 116: 108524.
- [4] AL-DAIRI M, PATHARE P B, AL-YAHYAI R, JAYASURIYA H, AL-ATTABI Z. Postharvest quality, technologies, and strategies to reduce losses along the supply chain of banana: a review[J]. *Trends in Food Science & Technology* 2023, 134: 177-191.
- [5] 朱孝扬, 李雪萍, 单伟, 邝健飞, 陈建业, 陈维信, 陆旺金. 香蕉贮运保鲜技术研究进展[J]. *热带作物学报*, 2020, 41(10): 2013-2021.
- [6] CHEN W X, LU W J. Research progress on banana storage, transportation and preservation technology[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2020, 41(10): 2013-2021. (in Chinese)
- [7] FENG K, HOU X L, XING G M, LIU J X, DUAN A Q, XU Z S, LI M Y, ZHUANG J, XIONG A S. Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(6): 750-776.
- [8] XIE Z, NOLAN T M, JIANG H, YIN Y. AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in *Arabidopsis*[J]. *Front Plant Science*, 2019, 10: 228.
- [9] LI J J, GUO X, ZHANG M H, WANG X, ZHAO Y, YIN Z G, ZHANG Z Y, WANG Y M, XIONG H Y, ZHANG H L, TODOROVSKA E, LI Z C. OsERF71 confers drought tolerance via modulating ABA signaling and proline biosynthesis[J]. *Plant Science*, 2018, 270: 131-139.
- [10] ZHANG Z J, HUANG R F. Enhanced tolerance to freezing in tobacco and tomato overexpressing transcription factor TERF2/LeERF2 is modulated by ethylene biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2010, 73(3): 241-249.
- [11] LI B B, WANG X H, WANG X F, XI Z M. An AP2/ERF transcription factor VvERF63 positively regulates cold tolerance in *Arabidopsis* and grape leaves[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2023, 205: 105124.
- [12] HAN Y C, KUANG J F, CHEN J Y, LIU X C, XIAO Y Y, FU C C, WANG J N, WU K Q, LU W J. Banana transcription factor MaERF11 recruits histone deacetylase MaHDA1 and represses the expression of MaACO1 and expansins during fruit ripening[J]. *Plant Physiology*, 2016, 171(2): 1070-1084.
- [13] LEE J M, JOUNG J G, MCQUINN R, CHUNG M Y, FEI Z, TIEMAN D, KLEE H, GIOVANNONI J. Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor SIERF6 plays an important role in ripening and carotenoid accumulation[J]. *Plant J*, 2012, 70(2): 191-204.
- [14] LIU M, DIRETTO G, PIRRELLO J, ROUSTAN JP, LI Z, GIULIANO G, REGAD F, BOUZAYEN M. The chimeric repressor version of an Ethylene Response Factor (ERF) family member, SI-ERF. B3, shows contrasting effects on tomato fruit ripening[J]. *New Phytologist*, 2014, 203(1): 206-218.
- [15] LIU M, GOMES B L, MILA I, PURGATTO E, PERES L E, FRASSE P, MAZA E, ZOUINE M, ROUSTAN J P, BOUZAYEN M, PIRRELLO J. Comprehensive profiling of ethylene response factor expression identifies ripening-associated ERF genes and their link to key regulators of fruit

- ripening in tomato[J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(3): 1732-1744.
- [15] ZHANG S Y, LIU S, REN Y S, ZHANG J, HAN N, WANG C, WANG D M, LI H H. The ERF transcription factor ZbERF3 promotes ethylene-induced anthocyanin biosynthesis in *Zanthoxylum bungeanum*[J]. *Plant Science*, 2024, 349: 112264.
- [16] ZHUO M G, WANG T Y, HUANG X M, HU G B, ZHOU B Y, WANG H C, ABBAS F. ERF transcription factors govern anthocyanin biosynthesis in litchi pericarp by modulating the expression of anthocyanin biosynthesis genes[J]. *Scientia Horticulturae*, 2024, 337: 113464.
- [17] CAI D L, XU H, LIU Z L, CHEN N H, ZHU L, LIN Z X, WU C J, SHAN W, CHEN J Y, LU W J, CHEN L, KUANG J F. Banana MaERF124 negatively modulates carotenoid accumulation during fruit ripening through repression of carotenogenesis genes[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2023, 195: 112151.
- [18] IRFAN M, KUMAR P, KUMAR V, DATTA A. Fruit ripening specific expression of β -D-N-acetylhexosaminidase (β -Hex) gene in tomato is transcriptionally regulated by ethylene response factor SIERF. E4[J]. *Plant Science*, 2022, 323: 111380.
- [19] WANG M M, ZHU Q G, DENG C L, LUO Z R, SUN N J, GRIERSON D, YIN X R, CHEN K S. Hypoxia-responsive ERFs involved in postdestringency softening of persimmon fruit[J]. *Plant Biotechnol Journal*, 2017, 15(11): 1409-1419.
- [20] YIN X R, ALLAN A C, CHEN K S, FERGUSON I B. Kiwifruit EIL and ERF genes involved in regulating fruit ripening[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(3): 1280-1292.
- [21] FU C C, HAN Y C, QI X Y, SHAN W, CHEN J Y, LU W J, KUANG J F. Papaya CpERF9 acts as a transcriptional repressor of cell-wall-modifying genes *CpPME1/2* and *CpPG5* involved in fruit ripening[J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(11): 2341-2352.
- [22] WANG X B, ZENG W F, DING Y F, WANG Y, NIU L, YAO J L, PAN L, LU Z H, CUI G C, LI G H, WANG Z Q. Peach ethylene response factor PpeERF2 represses the expression of ABA biosynthesis and cell wall degradation genes during fruit ripening[J]. *Plant Sciences*, 2019, 283: 116-126.
- [23] HE Y H, XUE J, LI H, HAN S K, JIAO J Q, RAO J P. Ethylene response factors regulate ethylene biosynthesis and cell wall modification in persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit during ripening[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2020, 168: 111255.
- [24] LI T, JIANG Z Y, ZHANG L C, TAN D M, WEI Y, YUAN H, LI T L, WANG A. Apple (*Malus domestica*) MdERF2 negatively affects ethylene biosynthesis during fruit ripening by suppressing MdACS1 transcription[J]. *The Plant Journal*, 2016, 88(5): 735-748.
- [25] WANG X B, PAN L, WANG Y, MENG J R, DENG L, NIU L, LIU H, DING Y F, YAO J L, NIEUWENHUIZEN N J, AMPOMAH-DWAMENA C, LU Z H, CUI G C, WANG Z, ZENG W. PpIAA1 and PpERF4 form a positive feedback loop to regulate peach fruit ripening by integrating auxin and ethylene signals[J]. *Plant Science*, 2021, 313: 111084.
- [26] 张海波, 郑云柯, 付毛妮, 张建斌, 贾彩红, 李新国, 刘菊华. 香蕉 AP2/ERFs 超家族的重新鉴定及在果实采后成熟过程中的差异表达特性[J]. *果树学报*, 2024, 41(5): 861-874.
- ZHANG H B, ZHENG Y K, FU M N, ZHANG J B, JIA C H, LI X G, LIU J H. Re-identification of the AP2/ERFs superfamily in banana and its differential expression characteristics during postharvest ripening[J]. *Journal of Fruit Science*, 2024, 41(5): 861-874. (in Chinese)
- [27] 张海波. 香蕉 MaAP2/ERFs 家族的全基因组分析及关键 MaERFs 在果实采后成熟过程中的作用[D]. 海口: 海南大学, 2024.
- ZHANG H B. Genome-wide analysis of banana MaAP2/ERFs family and the role of key MaERFs in fruit postharvest ripening[D]. Haikou: Hainan University, 2024. (in Chinese)
- [28] LIU M Y, WANG C R, JI H L, SUN M X, LIU T Y, WANG J H, CAO H, ZHU Q G. Ethylene biosynthesis and signal transduction during ripening and softening in non-climacteric fruits: an overview[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1368692.
- [29] LI S, CHEN K S, GRIERSON D. A critical evaluation of the role of ethylene and MADS transcription factors in the network controlling fleshy fruit ripening[J]. *New Phytologist*, 2019, 221(4): 1724-1741.
- [30] RUDUŚ I, SASIAK M, KĘPCZYŃSKIV J. Regulation of ethylene biosynthesis at the level of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) gene[J]. *Acta Physiol Plant*, 2013, 35: 295-307.
- [31] VERVERIDIS P, JOHN P. Complete recovery *in vitro* of ethylene-forming enzyme activity[J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(3): 725-727.
- [32] PATTYN J, VAUGHAN-HIRSCH J, VAN DE POEL B. The regulation of ethylene biosynthesis: a complex multi-level control circuitry[J]. *New Phytologist*, 2021, 229(2): 770-782.
- [33] GUAN J Y, LIANG X, GAO G, YANG F, QI H Y. The interaction between CmPIF8 and CmACO1 under postharvest red light treatment might affect fruit ripening and su-

- crose accumulation in oriental melon fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2024, 209: 112717.
- [34] YUAN H, YUE P T, BU H D, HAN D G, WANG A. Genome-wide analysis of *ACO* and *ACS* genes in pear (*Pyrus ussuriensis*)[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2019, 56: 193-199.
- [35] HOUBEN M, VAN DE POEL B. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO): the enzyme that makes the plant hormone ethylene[J]. *Front Plant Science*, 2019, 10: 695.
- [36] WANG Z, MIAO H X, LIU J H, XU B Y, YAO X M, XU C Y, ZHAO S C, FANG X D, JIA C H, WANG J Y, ZHANG J B, LI J Y, XU Y, WANG J S, MA W H, WU Z Y, YU L L, YANG Y L, LIU C, GUO Y, SUN S L, BAURENS F C, MARTIN G L, SALMON F, GARSMEUR O, YAHIAOUI N, HERVOUET C, ROUARD M, LABOUREAU N, HABAS R, RICCI S, PENG M, GUO A P, XIE J H, LI Y, DING Z H, YAN Y, TIE W W, D'HONT A, HU W, JIN Z. *Musa balbisiana* genome reveals subgenome evolution and functional divergence[J]. *Nature Plants*, 2019, 5(8): 810-821.
- [37] XIAO Y Y, KUANG J F, QI X N, YE Y J, WU Z X, CHEN J Y, LU W J. A comprehensive investigation of starch degradation process and identification of a transcriptional activator MabHLH6 during banana fruit ripening[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16: 151-164.
- [38] XU B Y, SU W, LIU J H, WANG J B, JIN Z Q. Differentially expressed cDNAs at the early stage of banana ripening identified by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray[J]. *Planta*, 2007, 226(2): 529-539.
- [39] ZHANG Y X, ZHANG Y R, YU Z, WANG H Y, PING B Y, LIU Y X, LIANG J K, MA F W, ZOU Y J, ZHAO T. Insights into ACO genes across Rosaceae: evolution, expression, and regulatory networks in fruit development[J]. *Genes Genomics*, 2024, 46(10): 1209-1223.
- [40] RASORI A, BERTOLASI B, FURINI A, BONGHI C, TONUTTI P, RAMINA A. Functional analysis of peach ACC oxidase promoters in transgenic tomato and in ripening peach fruit[J]. *Plant Science*, 2003, 165(3): 523-530.
- [41] 宋康华, 黎宇婷, 张鲁斌. AP2/ERF 转录因子调控果实品质研究进展[J]. *热带作物学报*, 2019, 40(5): 1032-1040.
- SONG K H, LI Y T, ZHANG L B. Research progress on the regulation of fruit quality by AP2/ERF transcription factors[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2019, 40(5): 1032-1040. (in Chinese)
- [42] HAO P P, WANG G M, CHENG H Y, KE Y Q, QI K J, GU C, ZHANG S L. Transcriptome analysis unravels an ethylene response factor involved in regulating fruit ripening in pear[J]. *Physiologia Plantarum*, 2018, 163(1): 124-135.
- [43] ZANG N N, LI X J, QI L Y, ZHANG Z R, YANG Y M, YIN Z P, WANG A D. H₂O₂-activated transcription factor MdERF4 negatively regulates ethylene biosynthesis during fruit ripening by suppressing MdACS1 transcription[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2023, 204: 112461.
- [44] TANG Y Q, YAN Y, TIE W W, YE X X, ZENG L W, ZENG L M, YANG J H, XU B Y, LI M Y, WANG Y, XIE Z N, JIN Z Q, HU W. Transcriptional regulation of MbACO2-mediated ethylene synthesis during postharvest banana ripening[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2023, 200: 112325.
- [45] XIAO Y Y, CHEN J Y, KUANG J F, SHAN W, XIE H, JIANG Y M, LU W J. Banana ethylene response factors are involved in fruit ripening through their interactions with ethylene biosynthesis genes[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(8): 2499-2510.