

基于转录组与 sRNA 测序的栝楼 *ERF* 基因家族鉴定及功能研究

宋佳辉, 张文玉, 胡秀芹, 于秀月, 张效振, 辛 杰*

临沂大学医学院, 山东 临沂 276000

摘要: 目的 基于转录组测序数据鉴定栝楼 *Trichosanthes kirilowii* *ERF* 基因家族 (*TkERFs*) 成员, 解析其在栝楼生长发育中的生物学功能, 为深入研究栝楼性别分化机制提供理论依据。方法 采用生物信息学方法系统鉴定栝楼 *ERF* 基因家族成员, 并筛选性别分化关键候选基因 *TkERF2* 进行功能解析。利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术分析其组织表达模式; 构建 *TkERF2* 过表达载体, 通过亚细胞定位及拟南芥遗传转化实验, 结合表型观察、相关基因表达量检测及乙烯含量测定, 探究其生物学功能; 整合转录组与 small RNA 组学数据, 筛选靶向调控 *TkERFs* 的 miRNAs, 完善其调控网络。结果 基于转录组数据, 经开放阅读框 (open reading frame, ORF) 及保守结构域分析, 共鉴定出 54 个 *TkERF* 基因 (*TkERF1*~*TkERF54*)。其编码蛋白序列长度为 101~389 个氨基酸, 相对分子质量为 11 580~43 310, 理论等电点 (pI) 为 4.66~10.60。亚细胞定位预测显示 74% 的 *TkERFs* 定位于细胞核, 26% 分布于叶绿体及细胞质。蛋白质保守基序分析鉴定出 10 种 motif。系统发育树将该家族划分为 8 个亚族。筛选鉴定出 *TkERF2*、*TkERF20* 和 *TkERF45* 受特异性 miRNA 靶向调控。转基因拟南芥实验表明, *TkERF2* 显著调控乙烯合成途径, 且生长素合成基因 (*AtYUC2*、*AtYUC6*)、生长素响应因子 (*AtARF8*) 及生长素转运基因 (*AtPIN2*) 的表达量均显著高于野生型 ($P<0.05$), 证实 *TkERF2* 通过正向调控生长素合成与转运参与发育进程。结论 完成栝楼 *ERF* 基因家族的系统鉴定与功能初探, 为解析栝楼性别决定机制及遗传改良提供了理论基础。

关键词: 栝楼; *ERF* 基因; 性别分化; 乙烯; 生长素

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)02-0627-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.02.022

Identification and functional study of *ERF* gene family in *Trichosanthes kirilowii* based on transcriptome and sRNA sequencing

SONG Jiahui, ZHANG Wenyu, HU Xiuqin, YU Xiuyue, ZHANG Xiaozhen, XIN Jie

School of Medicine, Linyi University, Linyi 276000, China

Abstract: Objective To identify the members of the *ERF* gene family (*TkERFs*) of *Trichosanthes kirilowii* based on transcriptome sequencing data, and to analyze their biological functions in the growth and development of *T. kirilowii*, so as to provide a theoretical basis for further studying the mechanism of sex differentiation in *T. kirilowii*. **Methods** Bioinformatics methods were used to systematically identify the *ERF* gene family members of *T. kirilowii*, and the key candidate gene for sex differentiation, *TkERF2*, was screened for functional elucidation. The tissue expression patterns of the tissues were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The *TkERF2* overexpression vector was constructed and its biological function was explored through subcellular localization and genetic transformation experiments of *Arabidopsis thaliana*, combined with phenotypic observation, related gene expression detection and ethylene content determination. Transcriptome and small RNA omics data were integrated to screen miRNAs that target the regulation of *TkERFs* and improve their regulatory networks. **Results** Based on transcriptome data, a total of 54 *TkERF* genes (*TkERF1*—*TkERF54*) were identified by open reading frame (ORF) and conserved domain analysis. It encodes a protein sequence length of 101—389 amino acids, a molecular weight of 11 580—43 310, and a theoretical isoelectric point (pI) of 4.66—10.60. Subcellular localization prediction showed that 74% of *TkERFs* were localized in the nucleus and 26% were distributed in chloroplasts and cytoplasm. Protein conservation motif analysis identified 10 motifs. The phylogenetic tree divides the family into

收稿日期: 2025-10-02

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目 (ZR2024MH046); 山东省大学生创新创业项目 (202510452030)

作者简介: 宋佳辉 (2004—), 女, 中药学专业。E-mail: 2776612418@qq.com

*通信作者: 辛 杰 (1987—), 女, 副教授, 硕士生导师, 从事药用植物生理发育研究。E-mail: xinjiezhongyao@126.com

eight subfamilies. *TkERF2*, *TkERF20* and *TkERF45* were identified by specific miRNA targeting. Transgenic *A. thaliana* experiments showed that *TkERF2* significantly regulated ethylene synthesis pathway, and the expressions of auxin synthesis genes (*AtYUC2*, *AtYUC6*), auxin response factor (*AtARF8*) and auxin transport gene (*AtPIN2*) were significantly higher than those of wild type ($P < 0.05$), confirming that *TkERF2* was involved in developmental process by positively regulating auxin synthesis and transport.

Conclusion This study has completed the systematic identification and preliminary exploration of the *ERF* gene family, which provides a theoretical basis for analyzing the mechanism of sex determination and genetic improvement of *T. kirilowii*.

Key words: *Trichosanthes kirilowii* Maxim.; *ERF* gene; gender differentiation; ethylene; auxin

栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 为葫芦科栝楼属多年生宿根攀援草本植物, 其果实 (瓜蒌)、种子 (瓜蒌子)、果皮 (瓜蒌皮)、根 (天花粉) 均属常用中药^[1]。瓜蒌富含萜类、黄酮类、甾体类、油脂类成分, 具有抗癌、抗肿瘤、抗炎、降血糖、抗氧化等广泛的药理活性^[2-3]。除药用功效外, 瓜蒌子还是良好的休闲食品, 在市场上广泛流通^[4]。因此, 栝楼因其较高的综合利用价值, 在全国范围内得到重视。众多地区将栝楼的种植作为农业结构调整的选择之一, 既促进了农民增收又带动地方绿色经济发展。

栝楼为雌雄异株、异花授粉植物, 性别不同药用价值不同^[5]。苗期栝楼雌、雄植株在形态学上没有显著差异, 直到开花阶段花器官结构上的差异才变得明显。栝楼的繁殖方式主要有根茎繁殖和种子繁殖 2 种。根茎繁殖可以控制植株性别, 但其繁殖系数较低, 需要耗费大量天花粉药材作为原材料。相比之下, 种子繁殖具有更高的繁殖效率和更低的成本, 但无法在苗期鉴别性别^[6]。因此, 在实际生产过程中, 根茎繁殖占主导。而长期的根茎繁殖导致种质退化严重, 根结线虫、肾形肾状线虫、炭疽病、蔓枯病、细菌性角斑病等病虫害频发^[7-8], 导致药材产量下降。因此, 为了提高栝楼种植效益和实现大面积种植, 采用种子繁殖是一种经济实用的方法。但面临的问题是种子繁殖时雌雄株比例严重失调且无法控制。栝楼性别差异是如何形成的? 栝楼性别分化机制是什么? 这些均不得而知。因此, 性别分化机制的不明确已限制了栝楼资源的深入拓展利用。

乙烯在高等植物的生长发育过程中发挥关键调控作用^[9], 并作为植物性别激素调控花器官的性别分化^[10]。长期以来, 乙烯在农业生产中一直被用于诱导雌花形成。目前, 在葫芦科植物中已鉴定的性别决定相关基因, 除 *WIP1* 属于转录因子外^[11], 其余基因或参与乙烯生物合成 (如 *CsACS1G*、*CsACS1I*、*CsACS2*、*CmACS1I*、*CmACS-7*^[12,15]), 或

涉及乙烯感知 (ethylene receptors, ETRs) 及乙烯反应 (ethylene response, ERFs) ^[16]。研究表明, *ERFs* 是乙烯信号转导途径中的末端响应因子, 具有重要的调控功能。*ERF* 基因家族是植物中最大的转录因子 (transcription factor, TF) 家族之一, 其成员包含 1 个保守的 DNA 结合域, 即 AP2 结构域。该家族隶属于 AP2/ERF (APETALA2/ethylene responsive element binding factors) 基因超家族, 且是其成员数量最为庞大的亚家族^[17]。在同为葫芦科植物的黄瓜和甜瓜中, 已鉴定出多个参与性别分化过程的 *ERFs*^[18, 20]。因此, *ERFs* 在栝楼的性别分化过程中可能发挥关键作用。

本研究基于课题组前期发布的 RNA-Seq 及 sRNA-seq 数据, 鉴定 *TkERF* 基因家族成员, 并对其生物信息学分析。基于预测结果, 筛选出与栝楼性别分化相关的关键候选基因, 利用拟南芥模型进行基因功能验证, 以初步阐明其生物学功能。同时, 整合转录组与 miRNA 测序结果, 筛选靶向调控 *TkERFs* 的 miRNAs, 完善 *TkERFs* 的转录调控网络, 为解析栝楼性别决定机制及其综合开发利用提供理论基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

以 2~3 年生栝楼为实验材料, 栝楼种植在临沂大学苗圃, 原植物经辛杰副教授鉴定并确认为葫芦科栝楼属植物栝楼 *T. kirilowii* Maxim.。采集栝楼雌、雄植株的叶、茎、卷须及花芽, 收集在冻存管中, 并做好标记, 放置在 -80 °C 冰箱中长久保存; 本氏烟草 *Nicotiana benthamiana* L. 为本实验室培养。栝楼转录组、sRNA 测序数据由本课题组测序获得, 样品信息及对应原始测序数据存入国家生物信息中心的组学原始数据归档库 (登录号: CRA002313、CRA008425)。

1.2 试剂与仪器

植物 RNA 提取试剂 RNAiso Plu (sTAKARA,

9109)、FSQ-301 型反转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (日本 Toyobo 公司)、琼脂糖 (批号 BS081, 江苏 Biosharp 公司)、DL2000bp Marker (批号 M1060, 北京索莱宝公司)、核酸染料 Super Green (批号 BS355A, 江苏 Biosharp 公司)、荧光定量试剂 Hieff®qPCR SYBR Green Master Mix (No Rox) (批号 11201ES08, 上海翌圣)、2×M5 HiPer plus Taq HiFi PCR mix (with blue dye) (批号 MF002-plus-05, 北京聚合美公司)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (批号 D1200, 北京索莱宝公司)、KpnI (批号 FD0524, 美国赛默飞公司)、XbaI (批号 FD0684, 美国赛默飞公司)、ClonExpress®II One Step Cloning Kit (批号 C112-01, 南京诺唯赞公司)、DH5 α 化学感受态细胞 (批号 C502-02, 南京诺唯赞公司)、LB 液体培养基 (批号 L1010, 北京索莱宝公司)、胰蛋白胨 (批号 LP0042B, 美国赛默飞公司)、酵母浸提物 (批号 LP0021B, 美国赛默飞公司)、氯化钠 (批号 7647-14-5, 上海麦克林公司)、硫酸卡那霉素 (批号 60206ES10, 上海翌圣公司, 母液浓度为 50 mg/mL, 工作浓度为 50 mg/L)、硫酸链霉素 (上海翌圣公司, 批号 60211ES25, 母液浓度为 10 mg/mL, 工作浓度为 50 mg/L)、快速质粒小提试剂盒 (北京天根公司, 批号 DP105)、Ar Qual 感受态细胞 (上海唯地公司, 批号 AC1060S)、吗啉乙磺酸 (MES) (北京索莱宝公司, 批号 M8010)、MgCl₂·6H₂O (上海麦克林公司, 批号 M813913)、乙酰丁香酮 (上海翌圣公司, 批号 60326ES03)、亚历山大染色液 (北京索莱宝公司, 批号 G3050)、蔗糖、Silwet L-77 (上海翌圣公司, 批号 41008ES10)、MS 固体培养基 (青岛海博公司, 批号 HB8469)、潮霉素 (北京索莱宝公司, 批号 H8080)。

A300 型 PCR 基因扩增仪 (杭州朗基公司)、A1 型激光共聚焦显微镜 (日本尼康公司)、ZWY-2102C 型恒温培养振荡器 (上海智诚公司)、Nano-300 型微量分光光度计 (杭州奥盛公司)、TGL-16 型台式冷冻离心机 (湖南湘仪公司)、LightCycler@96 型实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士罗氏公司)。

2 方法

2.1 柃楼 *ERF* 基因家族鉴定及蛋白理化性质分析

基于基因功能注释结果,于转录组数据库中初步筛选 *ERF* 基因。采用开放阅读框 (open reading frame, ORF) Finder 将筛选所得核苷酸序列翻译为氨基酸序列,最小 ORF 长度为 75。运用 NCBI Conserved Domain 工具预测蛋白保守结构域,筛选

出含有 ERF 结构域的氨基酸序列。利用 ExPASy 在线分析平台中的 ProtParam 工具,分析所鉴定柃楼 ERF 蛋白的氨基酸数目、相对分子质量、等电点 (pI)、脂溶性指数及亲疏水性等理化性质。采用 SOPMA 预测 TkERF 蛋白二级结构,并应用 SWISS-MODEL 在线软件的同源建模法预测其三级结构。利用 Plant-mPLOC 预测 TkERF 蛋白亚细胞定位。

2.2 TkERF 蛋白保守基序分析及系统发育树构建

采用 STREME 软件鉴定 TkERF 蛋白保守基序,参数设置为分析 10 个保守区。自 PlantTFDB 数据库首页搜索 ERF 关键词,共获取 122 条拟南芥 ERF 家族成员氨基酸序列。利用 MEGAX 软件,采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树 (bootstrap 值=1 000)。使用在线软件 Evolview 对系统发育树进行修饰。

2.3 TkERF 家族成员表达分析及蛋白互作网络预测

基于转录组数据,挖掘雌、雄柃楼花芽组织中 *TkERFs* 基因的表达丰度 (FPKM 值),并计算平均值,转录组数据处理方法见课题组曾发表论文^[21]。使用 Cuffdiff 软件筛选 DEGs, $|\text{fold change}| \geq 2$ (即 $|\log_2 \text{FC}| > 1$), $P < 0.05$ 作为评判标准。利用 TBtools 软件绘制表达热图。利用 String 蛋白互作数据库对 TkERFs 进行互作网络预测分析,采用同源分析的方法,选择拟南芥为参考物种。利用 Cytoscape 软件对互作结果进行视图优化。

2.4 TkERFs 上游 miRNAs 预测

前期实验室课题组构建了 sRNA 文库,并对测序所获得的原始序列 (raw tags) 进行处理及验证,具体处理方法参考课题组发表论文^[22]对 known 和 novel miRNAs 的靶基因进行预测,结果共发现 11 479 个 known miRNA 的靶基因,3 074 个 novel miRNA 的靶基因。各 miRNA 靶基因数量差异较大,从 1 个到 1 197 个不等,在已知 miRNA 中,miR5658 的靶基因最多,为 1 197 个,miR167b-3p3 靶基因数量最少,为 3 个。基于上述靶向关系,筛选 *TkERFs* 上游 miRNAs。

2.5 qRT-PCR 分析

Trizol 法提取 RNA 并反转录成 cDNA,合成后储存于 -20 °C 冰箱备用。根据转录组数据,利用 Primer Premier 软件设计 qRT-PCR 引物,引物序列见表 1。qRT-PCR 反应体系为 cDNA 1 μ L,上下游引物各 0.4 μ L, Hieff®qPCR SYBR Green Master Mix (No Rox) 10 μ L, 无菌超纯水 8.2 μ L。扩增程序:

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列 (5'-3')	用途
<i>TkERF2</i> -F	ATGAAGCTCCAAAATGACCTC	基因克隆
<i>TkERF2</i> -R	CTAGCTAACCAATAGCTGCTCG	
<i>TkERF2</i> -Q-F	TGCCTCTAAAACTCAACGA	目的基因荧光定量
<i>TkERF2</i> -Q-R	CCAAAGCCGCATCCTCA	
<i>TkTUB</i> -Q-F	TGAGAAAGGAAGCCGAGAA	
<i>TkTUB</i> -Q-R	AGGGAAGACGGAGAAAGTA	
<i>TkERF2</i> -JT-F	TTTGAGAGAGACCTCGACATGAAGCTCCAAAATGACCTC	过表达载体构建接头引物
<i>TkERF2</i> -JT-R	ACTCATTTTTTCTACCCTAGCTAACCAATAGCTGCTCG	

95 °C 预变性 300 s, 95 °C 变性 10 s, 55~60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 共 40 个循环。熔解曲线分析程序: 95 °C、10 s, 65 °C、1 min, 97 °C、1 s。设 3 次重复, 2^{-ΔΔCt} 法分析基因表达模式, 使用 Graphpad Prism 9.5 软件进行数据处理并作图。

2.6 *TkERF2* 亚细胞定位及拟南芥侵染

根据 *TkERF2* 的 CDS 序列设计带有酶切位点的接头引物, 引物序列见表 1。按照 ClonExpress® II One Step Cloning Kit (Vazyme, C112-01) 说明进行重组反应, 重组产物转化大肠杆菌 DH5α, 挑取阳性单克隆测序, 获得过表达载体 *pMDC202-TkERF2-GFP*。利用农杆菌介导的瞬时遗传转化法侵染烟草叶片, *pMDC202-GFP* 作为对照。2~3 d 后, 切感染区域进行制片, 在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光蛋白的情况, 检测 *TkERF2* 蛋白的亚细胞定位。利用蘸花法将 *pMDC202-TkERF2-GFP* 转化拟南芥, 野生型植株作为对照。种子成熟后于添加潮霉素的抗性板上筛选阳性苗, 直至 T3 代植株。

2.7 野生型及转基因拟南芥的形态学特征观察

统计 T3 代植株开花时间, 根据莲座叶数目的多少判断开花时间, 莲座叶越多表明开花时间越晚, 观察记录植株生长状态, 并在第 25 天时观察花器官、果荚及叶片形态并拍照。在 MS 培养基上分别种下大约 100 粒的野生型和 3 个转基因植株的种子, 黑暗条件下培养 5 d 后统计发芽率。选取 5 周龄大的拟南芥新鲜花朵, 仔细剥离花瓣和雌蕊, 仅保留雄蕊用于制片。在雄蕊上滴加 2~3 滴亚历山大染色剂, 小心覆盖上盖玻片, 注意操作要轻柔以避免压碎花粉粒。等待 5~10 min 后, 将制片放在显微镜下进行观察, 将物镜调整至 10 倍放大以查看花粉粒的着色情况。

2.8 乙烯释放速率测定

参考 Wang 等^[23]及 Tran 等^[24]的实验方法, 采用 GC 法测定乙烯释放量。将拟南芥种子播种于容量为 160 mL 的锥形瓶中, 培养基质为 MS 培养基, 每瓶含 MS 培养基 40 mL, 拟南芥种子约 40 粒。播种 10 d 后用保鲜膜封住瓶口, 黑暗条件下密封 24 h, 取 0.5 mL 瓶中气体进样检测乙烯含量。气相色谱测定条件如下: 进样口温度 200 °C, 分流流量 25 mL/min, 分流比 5; 恒流模式, 体积流量 1.5 mL/min; 恒温模式, 柱温箱温度 100 °C, 检测器温度 50 °C; 空气流量 400 mL/min, 尾吹气流量 50 mL/min, 氦气流量 50 mL/min; 运行时间 6 min; 检测器: 氢火焰离子化检测器。而后计算乙烯释放量, 计算公式如下。

$$\text{乙烯释放速率} = (N \cdot V) / (W \cdot H)$$

N 为每 1 mL 气体中的乙烯浓度; V 为密封容器体积; W 为样品质量; H 为密封时间

3 结果与分析

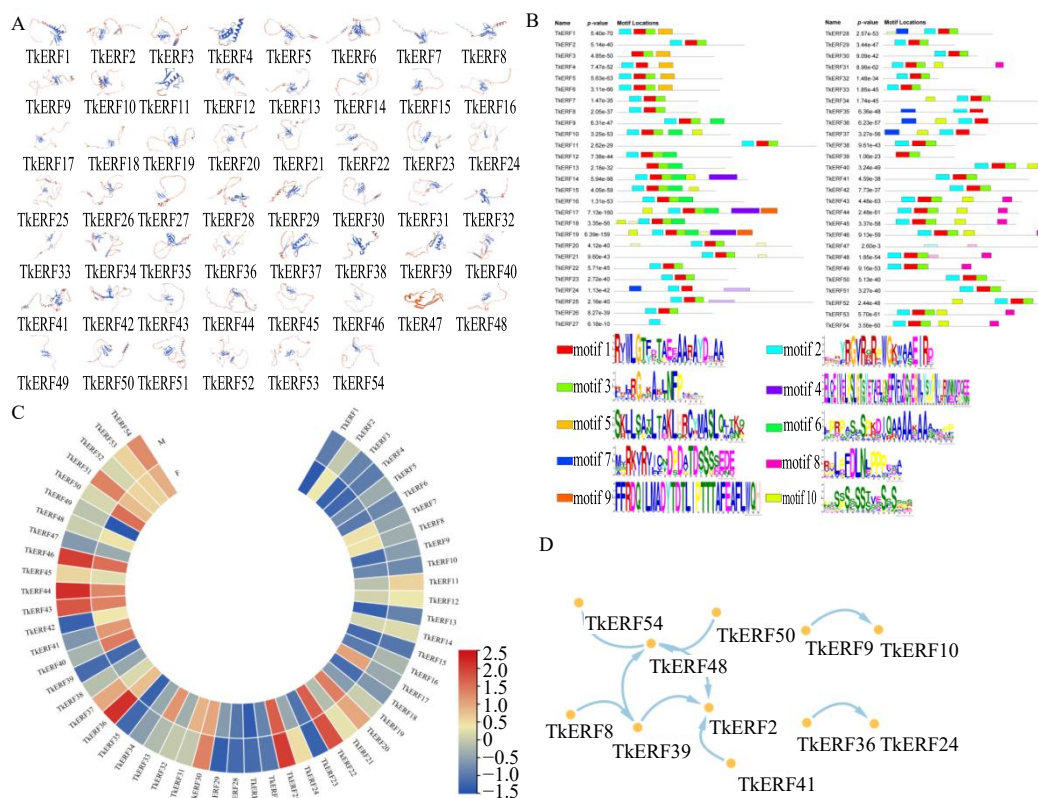
3.1 柝楼 *ERF* 基因家族的鉴定及理化性质分析

基于转录组数据, 通过 ORF 及保守结构域预测分析, 最终鉴定并筛选出 54 个 *TkERF* 基因, 将其命名为 *TkERF1*~*TkERF54*。将 54 个 *TkERF* 基因的核苷酸序列翻译为相应的氨基酸序列, 并对其编码蛋白的理化性质进行分析。结果显示, *TkERF* 蛋白序列长度介于 101 个氨基酸 (*TkERF4*)~389 个氨基酸 (*TkERF25*), 相对质量分数范围为 11 580 (*TkERF4*)~43 310 (*TkERF25*), 理论等电点 (pI) 介于 4.66 (*TkERF36*)~10.60 (*TkERF27*)。亚细胞定位预测结果表明, 包括 *TkERF1*、*TkERF2*、*TkERF3* 在内的 40 个蛋白定位于细胞核; *TkERF8*、*TkERF9*、*TkERF10* 等 13 个蛋白定位于细胞质和细胞核; *TkERF47* 预测定位于叶绿体。蛋白质二级结构预测结果显示 (表 2), *TkERF* 蛋白二级结构由 α 螺旋、延伸链、 β 转角和无规则卷曲组成; 三级结构预测结果 (图 1-A)

表 2 TkERF 蛋白质理化性质

Table 2 Physicochemical properties of TkERF proteins

基因名	氨基酸数目/个	相对分子质量	理论等电点	亚细胞定位预测	α -螺旋/%	延伸链/%	β -转角/%	无规则卷曲/%
TkERF1	140	15 640	9.79	细胞核	47.86	2.86	5.00	44.29
TkERF2	228	24 950	7.86	细胞核	31.14	14.47	6.58	47.81
TkERF3	174	19 140	7.09	细胞核	56.32	8.05	1.15	34.48
TkERF4	101	11 580	10.43	细胞核	51.49	6.93	1.98	39.60
TkERF5	189	21 500	6.54	细胞核	40.21	3.70	3.70	52.38
TkERF6	184	20 820	7.75	细胞核	39.13	1.63	3.26	55.98
TkERF7	145	16 590	9.64	细胞核	30.34	10.34	4.14	55.17
TkERF8	144	16 480	8.92	细胞质、细胞核	32.64	9.72	4.86	52.78
TkERF9	293	33 260	6.99	细胞质、细胞核	20.48	16.72	6.48	56.31
TkERF10	202	22 180	5.13	细胞质、细胞核	28.71	10.89	5.45	54.95
TkERF11	357	39 280	10.43	细胞质、细胞核	18.49	12.89	2.24	66.39
TkERF12	205	22 780	5.00	细胞质、细胞核	18.05	10.73	6.34	64.88
TkERF13	194	20 590	7.05	细胞质、细胞核	27.32	10.31	3.61	58.76
TkERF14	233	25 590	5.02	细胞核	24.03	12.02	3.43	60.52
TkERF15	177	19 480	9.42	细胞核	31.07	16.95	8.47	43.50
TkERF16	227	24 920	5.50	细胞核	25.99	8.81	1.76	63.44
TkERF17	287	31 880	5.74	细胞质、细胞核	26.48	16.03	2.79	54.70
TkERF18	205	22 710	6.20	细胞质、细胞核	20.98	9.76	5.37	63.90
TkERF19	270	30 310	8.83	细胞质、细胞核	22.22	15.93	3.33	58.52
TkERF20	347	38 070	5.00	细胞核	31.99	8.93	1.73	57.35
TkERF21	370	41 130	9.49	细胞质、细胞核	32.97	9.73	3.78	53.51
TkERF22	238	26 700	9.00	细胞核	33.19	6.72	4.20	55.88
TkERF23	221	24 410	7.74	细胞核	33.03	8.14	4.07	54.75
TkERF24	349	40 240	4.85	细胞质、细胞核	30.95	9.74	1.15	58.17
TkERF25	389	43 310	5.02	细胞核	29.82	6.43	3.08	60.67
TkERF26	192	21 050	10.45	细胞核	23.96	11.98	3.12	60.94
TkERF27	102	11 820	10.60	细胞核	20.59	22.55	7.84	49.02
TkERF28	214	23 880	6.61	细胞核	27.10	13.08	5.61	54.21
TkERF29	139	15 640	6.22	细胞核	28.78	11.51	7.91	51.80
TkERF30	185	21 140	9.22	细胞核	26.49	12.97	5.95	54.59
TkERF31	235	26 070	9.04	细胞核	19.57	16.60	5.53	58.30
TkERF32	108	12 680	10.09	细胞核	47.22	10.19	7.41	35.19
TkERF33	180	19 370	7.96	细胞核	24.44	11.11	7.78	56.67
TkERF34	301	33 010	5.11	细胞核	29.24	7.97	3.32	59.47
TkERF35	157	18 240	10.00	细胞核	19.75	12.10	1.91	66.24
TkERF36	318	35 440	4.66	细胞质、细胞核	27.67	9.75	1.89	60.69
TkERF37	161	18 200	10.09	细胞质、细胞核	30.43	9.94	4.35	55.28
TkERF38	112	13 080	5.60	细胞核	41.07	8.93	8.04	41.96
TkERF39	111	12 380	10.44	细胞核	28.83	17.12	14.41	39.64
TkERF40	290	31 050	5.30	细胞核	22.07	11.03	3.10	63.79
TkERF41	230	25 110	4.97	细胞核	37.39	11.30	3.91	47.40
TkERF42	251	28 300	5.31	细胞核	37.85	10.76	3.59	47.81
TkERF43	218	24 090	6.73	细胞核	23.39	11.93	2.75	61.93
TkERF44	214	23 610	8.38	细胞核	20.09	12.62	5.14	62.15
TkERF45	209	22 970	9.20	细胞核	22.49	12.92	4.31	60.29
TkERF46	258	27 800	9.49	细胞核	15.89	16.28	3.49	64.34
TkERF47	264	28 970	10.41	叶绿体	23.11	12.88	6.44	57.58
TkERF48	170	18 140	9.60	细胞核	22.35	14.12	8.24	55.29
TkERF49	138	15 160	9.56	细胞核	22.46	7.25	2.90	67.39
TkERF50	193	21 690	6.45	细胞核	29.53	9.33	5.70	55.44
TkERF51	271	29 770	9.36	细胞核	22.14	9.59	3.32	64.94
TkERF52	342	38 140	5.54	细胞核	24.27	15.50	4.09	56.14
TkERF53	223	24 390	9.78	细胞核	17.94	20.63	8.07	53.36
TkERF54	196	21 270	8.78	细胞核	22.45	14.80	3.57	59.18



A-三级结构分析; B-蛋白保守基序分析; C-转录本丰度分析; D-蛋白互作关系分析。

A- Tertiary structural analysis; B- Protein conserved motif analysis; C- Transcript abundance analysis; D- Analysis of protein-protein interactions.

图 1 TkerFs 成员特征分析

Fig. 1 Characteristics analysis of TkerFs members

与二级结构(表 2)相符,表明其三级结构主要由 α 螺旋、无规则卷曲和延伸链进一步折叠组装形成。

3.2 TkerF 蛋白保守基序分析

利用 MEME 对 TkerFs 蛋白保守基序进行分析,结果在 54 个 TkerFs 中共发现了 10 种 motif,长度为 15~50 aa(图 1-B)。其中, motif 1, motif 2 和 motif 3 为出现频率较高的保守基序。除 TkerF27 及 TkerF47 外,其余 52 条序列均含有 motif 1;除 TkerF3、TkerF13 及 TkerF39 之外,其余 51 条序列均含有 motif 2。除 TkerF4、TkerF24、TkerF27、TkerF35、TkerF36、TkerF37、TkerF47 外共有 47 条序列含有 motif 3。motif 1 和 motif 2 可能构成了 AP2 保守结构域。

3.3 TkerF 家族成员转录本丰度分析

为了解 *TkerF* 基因的表达模式,使用 RNA-seq 数据分析了各基因在雌、雄花芽中的表达量。结果表明, *TkerF1*、*TkerF3*、*TkerF4* 等 15 个基因在雄花芽中高表达,而 *TkerF2*、*TkerF6*、*TkerF7* 等 39 个基因均在雌花芽中高表达(图 1-C)。

3.4 TkerF 蛋白互作分析

基于 String 在线网站,构建了 TkerF 蛋白互作网络,去除没有相互关系作用的成员,共有 11 个 TkerF 间有蛋白质互作的关系。结果如图 1-D 所示,11 个 TkerF 间的相互作用分为 3 块互作网络。其中, TkerF2、TkerF39 及 TkerF48 为互作网络中的 3 个主要中心节点,相互作用关系最强。这 3 个主要中心节点与 TkerF8、TkerF41、TkerF50 和 TkerF54 之间也存在着相互作用关系。TkerF24 和 TkerF36, TkerF9 和 TkerF10 为 2 块具有独立互作的蛋白网络。利用 Cytoscape 软件中的 Cytohubba 插件,筛选核心蛋白,排名前 3 的蛋白依次为 TkerF2、TkerF39 及 TkerF48。

3.5 TkerF 发育进化树构建

为了研究桔梗和拟南芥之间 ERF 蛋白的进化关系,使用 54 个 TkerFs 和 122 个 AtERFs 的氨基酸序列进行蛋白质多序列比对分析,并采用邻接法构建系统发育树,有助于揭示 TkerFs 基因功能。

在拟南芥中, AtERFs 被分为 12 个亚组, A1~A6 和 B1~B6, 以 AtERF 的分类作为参考, 将 54 个 TkerFs 归为 8 个亚组 (图 2)。

3.6 TkerFs 对应 miRNA 预测分析

通过联合转录组及 sRNA 测序数据, 预测 TkerFs 对应的 miRNA, 结果如表 3 所示, 只有

TkerF2、TkerF20 和 TkerF45 预测到了相应的 miRNA。其中, TkmiR167c-3p_2 可能靶向调控 TkerF2, 属于 MIR167 家族; TkmiR156a_2 可能靶向调控 TkerF20, 属于 MIR156 家族; TkmiR5658 可能靶向调控 TkerF45, 属于 MIR5658 家族。

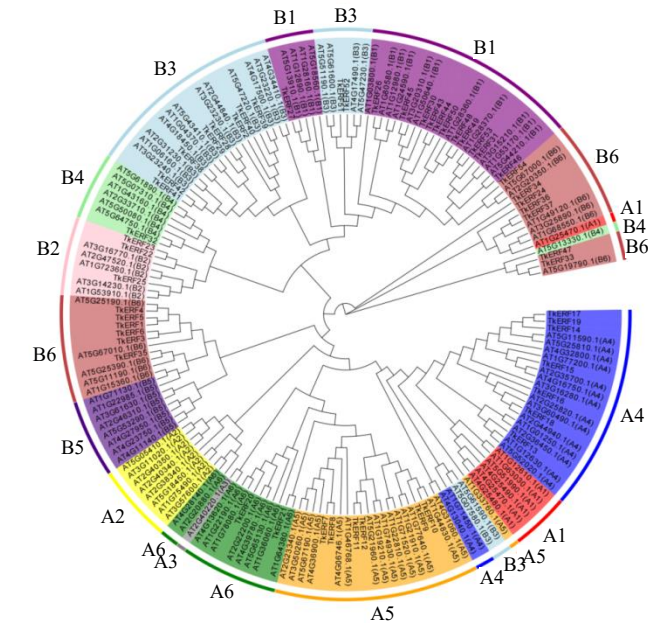


图 2 TkerF 氨基酸序列对比及 NJ 进化树
Fig. 2 Amino acid sequence comparison and NJ evolutionary tree of TkerF

表 3 桔楼 ERF 基因家族 miRNA 预测
Table 3 Prediction of miRNAs from ERF gene family in T. kirilowii

基因名称	miRNA名称	成熟体	发卡结构
TkerF2	TkmiR167c-3p_2	AGGTCATCTTGAGGTTGTTGAGAGGTTGAAGCTGCCAGCATGATCTGATTTAATTGCTAATCTCCTTCAAT	TTTGTAGAGATTTTGATTAAGCAATAATTATTTGGATGAATAAATAAGGCAAATGGATTTTGGATCTTGATGTTGTTTTAAGGGTTTGTGTTTGAAAATCAGGTCATCTTGAGCTTCAATCACTCATTACCAACAAATTCATTTAACAATGGCTGCCATTTTTGAGGTCTTTTATTTCTCTCTCTCAGAGAAACAACAATTTCTTCATTTCAGACAAACAGAAAGCAATAGCAGCCCAGCAAT
TkerF20	TkmiR156a_2	TGACAGAAGAGAGAGAGAC	TGACAGAAGAGAGAGAGACGTCCTCGGCGATGGTATGTATGCAATTCTACCTGTCAATTGTTTTCTGCAATTTCCCCAATTTTAGGGCAAAATTGATTCCATTTCCGTTATAATCGATTGAATAACAAACGGCCGTGATTCTGAGTTCACTTCAAACAGAAACCTAGATTAAAAATAATCAATACTAATAATAAGTTAATTACAAGTTAACTTCGTTTTTAATAAGTCTATTAAGTTCTAGATCTCTTCGGCCACTTTTGATATGCATTTGAGTTTTTGTGTTTTGAAAA
TkerF45	TkmiR5658	ATGATGATGATGATTATAAAGGTCCCAGCTTGTCGGGGACCCATTTGCCGTCGGTATAGTCACATGGATGAAA	GAGTTTCATTAATCGCATTTACTTCTTCTGTGGAAGGAAATAAATTTGCAATTGTTTGTAGTAAATGAAGAACACGCACACTGACAAACTCAAAAAAATCCATCTTACCAACAAAAAACCTGAAATAAAAGACTAATAAGAAGCAATCTTGTGTTGTTGTTGTTCTGTACCTTCATGAACAGATGAAGGTGAAAAATGAGGAGGCGACAAAAAGAAGAAGATGATGATGATGATGATGAAA

3.7 *TkERF2* 组织表达模式及亚细胞定位

基于上述发现,为初步解析桔楼性别分化关键候选基因 *TkERF2* 的功能及调控基础,本研究对该基因的组织表达模式及其亚细胞定位进行了分析。采用 qRT-PCR 技术检测 *TkERF2* 在桔楼花芽、茎、卷须及叶片中的表达水平。结果显示(图 3-A), *TkERF2* 在桔楼不同组织中呈现特异性表达模式。在茎组织中, *TkERF2* 于雄株中的表达量显著高于雌株;而在 2、4、6、8、10 mm 花芽、叶片及卷须

中,雌株的表达量均高于雄株。

为进一步确定 *TkERF2* 蛋白的亚细胞定位,将构建好的植物融合表达载体 *pMDC202-TkERF2-GFP* 及对照空载体 *pMDC202-GFP* 分别转化农杆菌菌株,并进行瞬时表达分析。结果显示,作为对照的 *pMDC202-GFP* 载体在细胞核和细胞质中均有定位,而 *pMDC202-TkERF2-GFP* 融合载体所产生的荧光信号,与叶绿体自身的自发荧光信号重合(图 3-B),说明 *TkERF2* 蛋白在细胞内的主要定位区域为叶绿体。

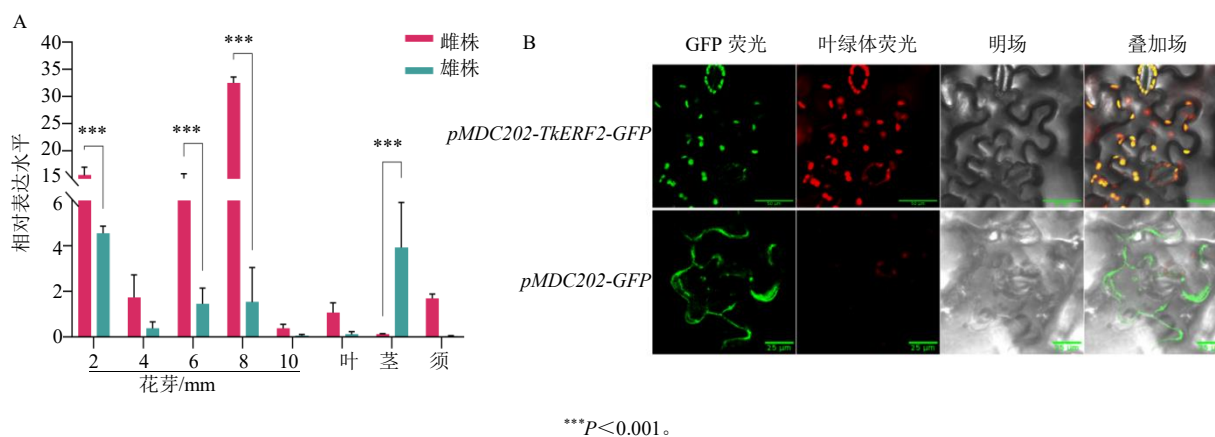


图 3 桔楼不同组织中 *TkERF2* 基因的表达模式分析 (A) 及亚细胞定位 (B)

Fig. 3 Analysis of *TkERF2* gene expression patterns in different organs of *T. kirilowii* (A) and subcellular localization (B)

3.8 *TkERF2* 转基因拟南芥表型分析

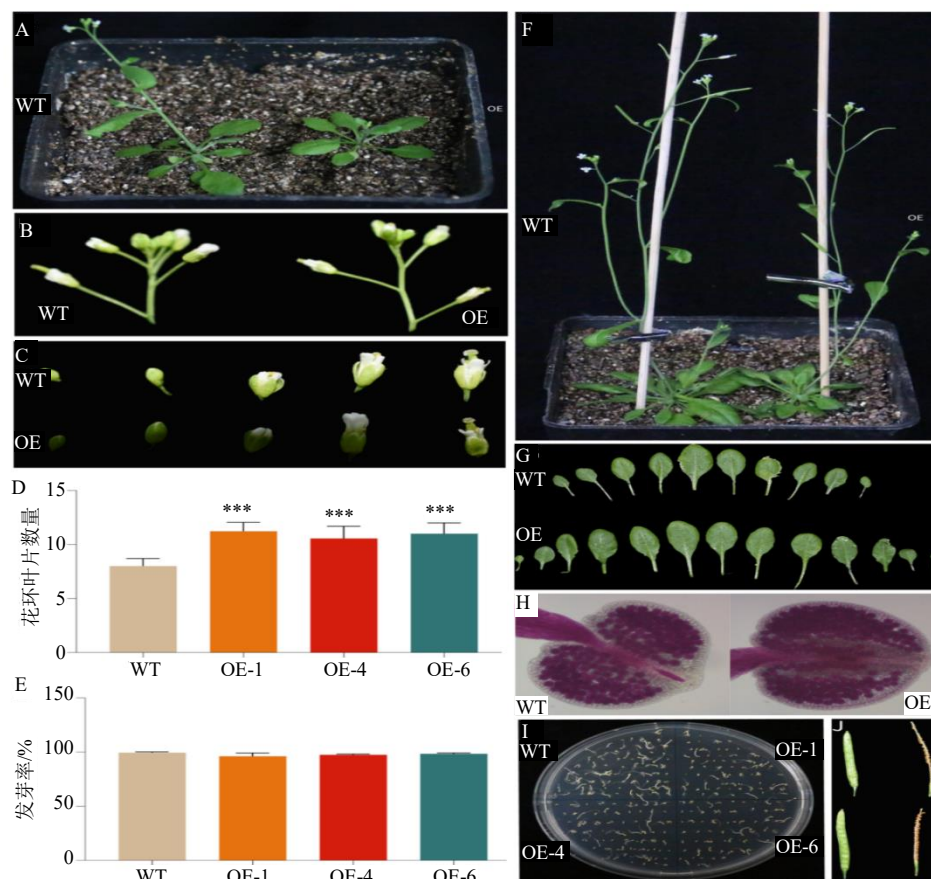
通过对 3 批次拟南芥抽薹至 1 cm 高度的时序及莲座叶数目进行统计,分析了野生型与转基因植株的开花时间。结果显示,转基因拟南芥植株的株高显著低于野生型(图 4-A);当野生型植株已形成侧薹时,转基因植株仍未见侧枝形成(图 4-F)。此外,转基因植株的莲座叶数目显著多于野生型(图 4-D),且开花时间显著延迟,呈现典型晚花表型。观察表明,转基因与野生型拟南芥在花器官、果荚及叶片形态上均无明显差异,表明 *TkERF2* 基因转化并未导致组织结构发生显著形态变异(图 4-B、C、G、J)。对 T3 代种子的发芽率统计表明,转基因植株的发芽起始时间略晚于野生型(图 4-I),但两者的最终发芽率无显著差异(图 4-E)。采用亚历山大染色法检测野生型及 3 株转基因植株的花粉活力,所有花粉均被染成深红色,表明野生型与转基因拟南芥的花粉活力均较强,且两者间无显著差异,即 *TkERF2* 基因未影响拟南芥的育性(图 4-H)。

3.9 *TkERF2* 转基因拟南芥相关基因表达量分析及乙烯含量测定

植物性别决定与花器官发育密切相关,花发育

相关基因的表达模式可作为性别决定状态及开花时间变化的表征指标。为深入探究 *TkERF2* 基因对拟南芥花发育的潜在影响,本研究采用 qRT-PCR 技术检测了 7 个与拟南芥花发育密切相关的关键基因表达水平,包括花分生组织特征基因 *AtLFY*、开花抑制基因 *AtFLC*、花发育调控基因 *AtMYB80*、成花途径整合因子基因 *AtFT*、花器官建成基因 *AtSEP3*、开花时间基因 *AtCO* 及 *AtSPL9*。结果显示,相较于野生型拟南芥, *AtFLC* 和 *AtSPL9* 基因在 3 株转基因拟南芥中的表达量均显著升高; *AtCO* 基因表达量虽略有上升,但未达到统计学显著水平;而 *AtFT*、*AtLFY*、*AtMYB80* 及 *AtSEP3* 基因的表达量均显著降低(图 5-A)。

乙烯作为参与植物性别决定的关键激素,可控开花进程。鉴于 *TkERF2* 为乙烯响应因子,本研究推测其过表达可能促进了拟南芥内源乙烯的生物合成,进而导致早花表型。为验证此假说,对乙烯合成基因 *AtACS2*、*AtACS7* 及 *AtACS11* 的表达量进行了检测。结果表明,在转基因拟南芥中,这 3 个基因的表达量均显著高于野生型对照(图 5-D)。进一步采用气相色谱法(GC)测定乙烯释放速率发



A-生长 10 d 的拟南芥; B-拟南芥花序形态 (WT 为野生型植株, OE 为转基因植株); C-拟南芥花蕾形态; D-莲座叶数目统计图 (与 WT 比较: *** $P < 0.001$); E-发芽率; F-生长 24 d 的拟南芥; G-拟南芥莲座叶形态; H-亚历山大染色后的花粉形态; I-拟南芥发芽情况图; J-拟南芥荚果形态。
A-*A. thaliana* grown for 10 days; B-*A. thaliana* inflorescence morphology (WT is a wild-type plant, OE is a transgenic plant); C-*A. thaliana* bud morphology; D-Statistical chart of the number of rosette leaves (*** $P < 0.0001$); E-germination rate; F-24-day-old *A. thaliana*; G-*A. thaliana* rosette leaf morphology; H-Pollen morphology after Alexandria staining; I-*A. thaliana* germination map; J-*A. thaliana* pod morphology.

图 4 *TkERF2* 转基因拟南芥的表型分析

Fig. 4 Phenotypic analysis of *TkERF2* transgenic *A. thaliana*

现, 转基因植株的乙烯释放速率较野生型植株显著提高约 1.3 倍 (图 5-B)。

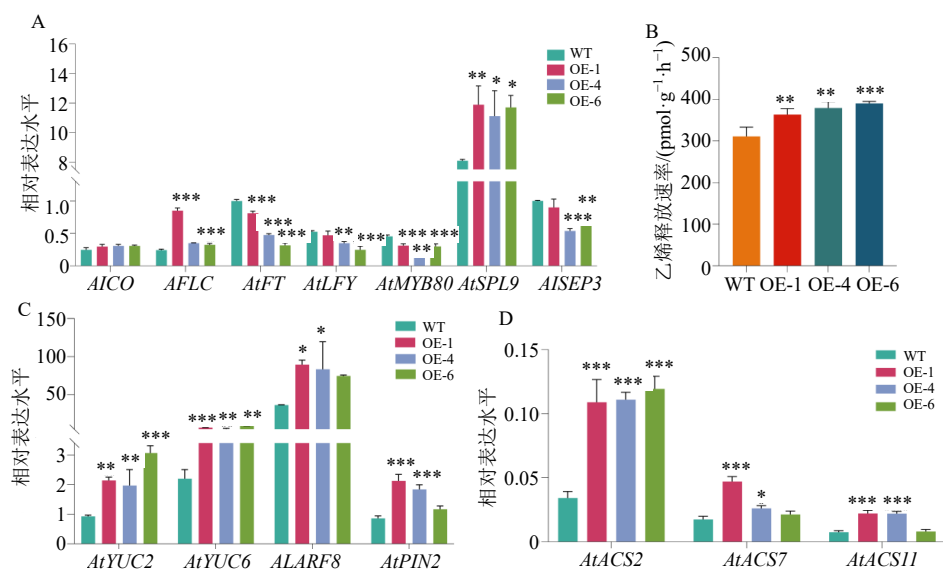
研究表明, 生长素在植物性别分化过程中发挥重要调控作用。例如, 在番木瓜中, 生长素积累对雄花形成至关重要, 过量积累可诱导雌蕊向雄蕊转化。因此, 本研究通过 qRT-PCR 分析了生长素相关基因的表达量。如图 5-C 所示, 在转基因拟南芥中, 生长素合成基因 *AtYUC2*、*AtYUC6*, 生长素响应因子 *AtARF8* 及生长素运输基因 *AtPIN2* 的表达量均显著高于野生型。

4 讨论

本研究基于柧楼转录组数据, 鉴定出 54 个 *TkERFs* 基因, 并对其理化性质、蛋白结构、系统进化关系、表达模式、蛋白互作网络及潜在功能进行了综合分析。与已报道物种 (如拟南芥 122 个^[26]、

黄瓜 103 个^[27]、葫芦 92 个^[28]) 相比, 柧楼 *ERF* 家族成员数量存在显著差异。此差异一方面源于柧楼基因组数据的缺乏, 仅依赖转录组数据可能导致基因筛选不全面, 此现象在蒙古冰草 *Agropyron mongolicum*^[29] 及半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit.^[30] 研究中亦有类似报道; 另一方面, 可能与高等植物基因复制及演化历程相关。基因组多倍化 (whole genome duplication/polyploidization, WGD)、串联复制 (tandem duplication)、染色体片段复制 (segmental duplication)、反转录转座 (retrotransposition) 及转座子介导复制 (transposon-mediated duplication) 等事件可导致结构和功能相似的基因^[31] 扩增, 进而促使黄瓜、葫芦等物种中 *ERF* 家族成员数量显著增加。

TkERFs 蛋白理化性质分析显示, 该家族成员



A-花发育相关基因表达量; B-乙烯释放速率; C-生长素相关基因表达量; D-乙烯相关基因表达量; 与 WT 比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。
A-expression of genes related to flower development; B-ethylene release rate; C-auxin-related gene expression; D-ethylene-related gene expression. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs WT group.

图 5 *TkERF2* 转基因拟南芥的相关基因表达和乙烯含量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Gene expression and ethylene content of *TkERF2* transgenic *A. thaliana* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

多为碱性蛋白, 其氨基酸长度、相对分子质量及理论等电点存在显著变异, 暗示其功能多样性。亚细胞定位预测表明, 74%*TkERFs* 定位于细胞核, 少数分布于叶绿体及细胞质, 提示其主要在细胞核内发挥转录调控功能, 且不同成员可能在柃楼生长发育过程中行使功能各异。但采用烟草瞬时转化的亚细胞定位结果与预测结果存在差异, 推测其原因可能是 *TkERF2* 蛋白受到磷酸化、乙酰化或泛素化等翻译后修饰, 从而改变了其亚细胞定位。例如, Qiao 等^[25]的研究表明, 经乙烯前体 1-氨基环丙烷羧酸 (ACC) 处理的拟南芥幼苗, 其 EIN2 蛋白可从内质网转移至细胞核。

保守基序分析揭示 *TkERFs* 包含多达 10 种 motif, 其中 motif 1 和 motif 2 在所有成员中均以串联形式存在, 推测二者共同构成 AP2 特征结构域。系统进化分析将柃楼 *TkERFs* 划分为 8 个亚组, 其中 B6 亚组成员最多 (13 个), B4 亚组仅含 1 个成员。与拟南芥相比, 柃楼缺失 A1、A2、A3 及 B5 亚组, 此现象既可能与基因筛选局限性有关, 亦可能反映进化过程中特定亚家族的丢失, 该规律与棉花^[32]研究结果一致。该进化分析有助于基于功能已知的 *AtERFs* 预测未知 *TkERFs* 的功能, 为靶向选择基因进行功能解析提供依据。例如, *TkERF32* 可能与拟南芥 *AtERF114*

(AT5G61890.1) 功能相似, 后者通过介导木质素和水杨酸积累正向调控植物防御反应^[33]。

基于柃楼 RNA-Seq 数据的表达模式分析为 *TkERFs* 功能预测及个体差异解析提供了依据。结果显示, *TkERFs* 在雌、雄花芽中呈现差异性表达, 72% 的成员在雌花芽中高表达, 表明其在雌雄植株中功能分化, 且表达量差异暗示 *TkERFs* 可能参与柃楼性别分化调控。进一步采用 qRT-PCR 技术分析 *TkERF2* 在不同组织中的表达水平, 可初步推断该基因可能与雌性特异性性状相关, 或是在性别分化过程中偏向调控雌性发育。比如它可能参与雌花发育、雌性生殖器官形成, 或是调控与雌株相关的生理代谢, 但还需通过确认组织表型差异、开展基因过表达或敲降实验及分析下游靶基因等实验进一步验证。

miRNA 靶点预测表明, 转录后调控可能是 *TkERFs* 参与柃楼生长发育的重要途径。值得注意的是, 本研究预测的 TkmiR167c-3p_2 及 TkmiR156a_2 所属家族成员均被报道参与花器官发育调控, 暗示其在柃楼性别分化中可能发挥类似作用。Zheng 等^[34]研究表明, 拟南芥 miR167 通过限制花药生长并促进开裂调控生殖发育, 其功能缺失导致花药开裂延迟及花粉活力下降。Wu 等^[35]研究发现, 拟南

芥 miR167 对胚珠和花药发育具有调控作用, 其功能丧失引发胚珠发育停滞及花药不开裂。miR156 作为另一保守 miRNA, 在拟南芥和玉米中首次被发现可调控营养生长阶段转变^[36-37], 其介导的 miR156-SPL 模块在植物生长、发育及胁迫响应(尤其是开花调控)中作用广泛。拟南芥中, miR156 靶向调控 SPL2、SPL3、SPL4、SPL5、SPL6、SPL9、SPL10、SPL11、SPL13、SPL13-like 及 SPL15^[38]等 11 个 SPL 转录因子。此外, TkmiR5658 仅在茄子 *Solanum melongena* L.、鸡毛菜 *Brassica rapa* L. 等少数物种中被鉴定^[39-40], 提示其在柘楼中可能发挥独特且关键的调控功能。

在拟南芥中超表达 *TkERF2* 并未引起花、种子及叶片形态的显著改变, 且发芽率与野生型无显著差异, 但发芽时间略有延迟。转基因植株莲座叶数目显著多于野生型, 呈现晚花表型, 此结果与前人研究一致^[41]。qRT-PCR 分析显示, 开花抑制因子 *AtFLC* 表达显著上调, 而成花关键基因 *AtFT*、*AtLFY*、*AtMYB80*、*AtSEP3* 表达显著下调, 进一步证实晚花表型。然而, 部分基因的表达模式存在矛盾: 如促进开花的 *AtSPL9* 表达升高与晚花表型不符^[38]。需指出, 成花基因功能并非绝对, 开花时间受光周期(昼长)、温度及胁迫等多因素调控^[42]。例如, 拟南芥 *AtCO* 基因在短日照下促进开花, 长日照下则延迟开花^[43]; *FHY3* 和 *FAR1* 基因在充足光照下通过与 *SPL3*、*SPL4*、*SPL5* 互作, 抑制其与 *FUL*、*LFY*、*API*、*MIR172C* 的结合, 从而延迟开花, 而在弱光环境下其表达下降则促进开花^[44]。

为探究晚花机制, 本研究聚焦于性别分化相关激素乙烯。转基因拟南芥中乙烯合成基因(*AtACS2*、*AtACS7*、*AtACS11*)表达量及乙烯释放速率均显著高于野生型。黄瓜研究中, *CsACS2* (“单性花基因”)可促进心皮发育并抑制雄蕊发育^[12], *CsACS11* 则抑制心皮发育^[13], *CsERF31* 作为连接 *CsACS11* 与 *CsACS2* 的桥梁, 受乙烯信号激活后通过正反馈环路促进雌花分化^[19]。尽管本研究仅观察到开花延迟, 但初步证实 *TkERF2* 可直接或间接调控乙烯通路, 其是否具有类似 *CsERF31* 的功能有待深入探究。此外, 生长素相关基因(合成、运输及响应因子)在转基因植株中表达上调, 表明生长素水平及分布发生改变, 提示 *TkERF2* 可能同时参与乙烯及生长素信号调控, 具体机制需进一步验证。

综上所述, 本研究基于柘楼转录组数据鉴定出 54 个 *TkERFs* 基因, 系统解析了其理化性质、蛋白

结构、系统进化及表达模式。结果表明, *TkERFs* 多为碱性蛋白, 功能多样且主要定位于细胞核发挥转录调控作用。系统进化分析显示其分为 8 个亚组, 部分亚组缺失可能与筛选局限或进化丢失相关。表达模式分析揭示其在雌雄花芽中表达差异显著, 暗示其参与性别分化。miRNA 靶点预测提示转录后调控是 *TkERFs* 影响柘楼发育的重要途径。拟南芥超表达实验表明 *TkERF2* 可能通过调控乙烯及生长素信号通路影响开花时间与性别分化, 具体分子机制仍需深入探究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 三部. 2025: 356.
- [2] 王杨, 汤俊瑜, 李怡洁, 等. 云南柘楼属植物的化学成分及生物活性研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2022, 50(22): 1-5.
- [3] 张琪, 彭向前. 柘楼的活性成分及其药理作用的研究进展 [J]. 山东化工, 2021(14): 98-100.
- [4] 彭星星, 李卫文, 董玲, 等. 柘楼食用历史沿革与变迁 [J]. 皖西学院学报, 2023, 39(2): 79-83.
- [5] 周涛, 黄璐琦, 江维克. 柘楼属(葫芦科)植物的系统演化与地理分布 [J]. 植物科学学报, 2015, 33(3): 414-423.
- [6] 辛杰, 王振, 张波, 等. 柘楼不同性别花芽分化形态解剖特征观察 [J]. 植物科学学报, 2018, 36(5): 648-657.
- [7] 方圆, 朱衍, 吴慧平, 等. 安徽省首次发现肾形肾状线虫危害瓜蒌 [J]. 植物保护, 2023, 49(6): 87-94.
- [8] 汪霞, 林一帆, 张立新. 柘楼主要病害及综合防治技术 [J]. 特种经济动植物, 2021, 24(8): 40-41.
- [9] Rao Y R, Ansari M W, Sahoo R K, et al. Salicylic acid modulates ACS, NHX1, sos1 and HKT1;2 expression to regulate ethylene overproduction and Na⁺ ions toxicity that leads to improved physiological status and enhanced salinity stress tolerance in tomato plants cv. Pusa Ruby [J]. *Plant Signal Behav*, 2021, 16(11): 1950888.
- [10] Wang Z Y, Yadav V, Yan X, et al. Systematic genome-wide analysis of the ethylene-responsive ACS gene family: Contributions to sex form differentiation and development in melon and watermelon [J]. *Gene*, 2021, 805: 145910.
- [11] Cebrián G, Iglesias-Moya J, Romero J, et al. The ethylene biosynthesis gene *CpACO1A*: A new player in the regulation of sex determination and female flower development in *Cucurbita pepo* [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 12: 817922.
- [12] Boualem A, Fergany M, Fernandez R, et al. A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to

- andromonoecy in melons [J]. *Science*, 2008, 321(5890): 836-838.
- [13] Boualem A, Troadec C, Camps C, *et al.* A cucurbit androecy gene reveals how unisexual flowers develop and dioecy emerges [J]. *Science*, 2015, 350(6261): 688-691.
- [14] Kamachi S, Sekimoto H, Kondo N, *et al.* Cloning of a cDNA for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase that is expressed during development of female flowers at the apices of *Cucumis sativus* L [J]. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(11): 1197-1206.
- [15] Saito S, Fujii N, Miyazawa Y, *et al.* Correlation between development of female flower buds and expression of the CS-ACS₂ gene in cucumber plants [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58(11): 2897-2907.
- [16] Martínez C, Jamilena M. To be a male or a female flower, a question of ethylene in cucurbits [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2021, 59: 101981.
- [17] Wu Y, Li X, Zhang J N, *et al.* ERF subfamily transcription factors and their function in plant responses to abiotic stresses [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 1042084.
- [18] 牛欢欢. 黄瓜乙烯响应因子ERFs参与性别决定过程的调控研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
- [19] Pan J, Wen H F, Chen G Q, *et al.* A positive feedback loop mediated by CsERF31 initiates female cucumber flower development: Ethylene Response Factor31 mediates a positive feedback loop that initiates female cucumber flower development [J]. *Plant Physiol*, 2021, 186(2): 1088-1100.
- [20] Tao Q Y, Niu H H, Wang Z Y, *et al.* Ethylene responsive factor ERF110 mediates ethylene-regulated transcription of a sex determination-related orthologous gene in two *Cucumis* species [J]. *J Exp Bot*, 2018, 69(12): 2953-2965.
- [21] Hu X Q, Liao Z Y, Zhang B, *et al.* Transcriptome sequencing and screening of genes related to sex determination of *Trichosanthes kirilowii* Maxim [J]. *PLoS One*, 2020, 15(10): e0239230.
- [22] Hu X Q, Song H, Li N, *et al.* Identification and analysis of miRNAs differentially expressed in male and female *Trichosanthes kirilowii* Maxim [J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 81.
- [23] Wang K, Zhai M J, Cui D Z, *et al.* Genome-wide analysis of the amino acid permeases gene family in wheat and *TaAAP1* enhanced salt tolerance by accumulating ethylene [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(18): 13800.
- [24] Tran D, Dauphin A, Meimoun P, *et al.* Methanol induces cytosolic calcium variations, membrane depolarization and ethylene production in *Arabidopsis* and tobacco [J]. *Ann Bot*, 2018, 122(5): 849-860.
- [25] Qiao H, Shen Z X, Huang S C, *et al.* Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas [J]. *Science*, 2012, 338(6105): 390-393.
- [26] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, *et al.* Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Physiol*, 2006, 140(2): 411-432.
- [27] Hu L F, Liu S Q. Genome-wide identification and phylogenetic analysis of the ERF gene family in cucumbers [J]. *Genet Mol Biol*, 2011, 34(4): 624-633.
- [28] Li Q F, Zhang L, Chen P W, *et al.* Genome-wide identification of APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR transcription factors in *Cucurbita moschata* and their involvement in ethylene response [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 847754.
- [29] 吴婧, 范菠菠, 张学峰, 等. 蒙古冰草ERF转录因子生物信息学及其表达分析 [J]. 草地学报, 2022, 30(11): 2910-2921.
- [30] 杨金荣, 崔婉宁, 张瑜, 等. 基于转录组数据的半夏AP2/ERF 基因家族鉴定及逆境响应分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5): 176-184.
- [31] Holland P W H, Marlétaz F, Maeso I, *et al.* New genes from old: Asymmetric divergence of gene duplicates and the evolution of development [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2017, 372(1713): 20150480.
- [32] Zafar M M, Rehman A, Razzaq A, *et al.* Genome-wide characterization and expression analysis of *Erf* gene family in cotton [J]. *BMC Plant Biol*, 2022, 22(1): 134.
- [33] Li Z, Zhang Y, Ren J, *et al.* Ethylene-responsive factor ERF114 mediates fungal pathogen effector PevD1-induced disease resistance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Plant Pathol*, 2022, 23(6): 819-831.
- [34] Zheng L J, Nagpal P, Villarino G, *et al.* miR167 limits anther growth to potentiate anther dehiscence [J]. *Development*, 2019, 146(14): dev174375.
- [35] Wu M F, Tian Q, Reed J W. *Arabidopsis* microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction [J]. *Development*, 2006, 133(21): 4211-4218.
- [36] Shikata M, Yamaguchi H, Sasaki K, *et al.* Overexpression of *Arabidopsis* miR157b induces bushy architecture and delayed phase transition in *Torenia fournieri* [J]. *Planta*, 2012, 236(4): 1027-1035.
- [37] Wu G, Park M Y, Conway S R, *et al.* The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2009, 138(4): 750-759.
- [38] Wang J W, Czech B, Weigel D. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering

- pathway in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Cell*, 2009, 138(4): 738-749.
- [39] Hajieghrari B, Farrokhi N, Goliaei B, *et al.* Computational identification of microRNAs and their transcript target(s) in field mustard (*Brassica rapa* L.) [J]. *Iran J Biotechnol*, 2017, 15(1): 22-32.
- [40] Kapadia C, Datta R, Mahammad S M, *et al.* Genome-wide identification, quantification, and validation of differentially expressed miRNAs in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on their response to *Ralstonia solanacearum* infection [J]. *ACS Omega*, 2023, 8(2): 2648-2657.
- [41] Tominaga-Wada R, Nukumizu Y, Wada T. Flowering is delayed by mutations in homologous genes CAPRICE and TRYPTICHON in the early flowering *Arabidopsis cpl3* mutant [J]. *J Plant Physiol*, 2013, 170(16): 1466-1468.
- [42] Cho L H, Yoon J, An G. The control of flowering time by environmental factors [J]. *Plant J*, 2017, 90(4): 708-719.
- [43] Luccioni L, Krzymuski M, Sánchez-Lamas M, *et al.* Constans delays *Arabidopsis* flowering under short days [J]. *Plant J*, 2019, 97(5): 923-932.
- [44] Xie Y R, Zhou Q, Zhao Y P, *et al.* FHY3 and FAR1 integrate light signals with the miR156-SPL module-mediated aging pathway to regulate *Arabidopsis* flowering [J]. *Mol Plant*, 2020, 13(3): 483-498.

[责任编辑 时圣明]