

香蕉 trihelix 转录因子 MaGTL1a 的分离及特性

梁淑敏, 罗冬兰, 程玉瑾, 俞乐安, 杨亚杰, 陈建业, 陆旺金, 邝健飞*

(华南农业大学园艺学院·南方园艺产品保鲜教育部工程研究中心·广东省果蔬保鲜重点实验室, 广州 510642)

摘 要:【目的】研究香蕉 MaGTL1a 转录因子的特性及其基因表达规律, 探讨 MaGTL1a 转录因子在香蕉果实成熟过程中的作用。【方法】以香蕉果肉 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 获得 *MaGTL1a* 序列; 利用烟草瞬时表达法和酵母系统分析 MaGTL1a 亚细胞定位和转录调控活性; 通过实时荧光定量 PCR 分析 *MaGTL1a* 在香蕉果实成熟过程中的表达; 运用烟草 BY2 悬浮细胞瞬时表达法研究 *MaGTL1a* 启动子活性。【结果】*MaGTL1a* cDNA 序列含有 1 个 2 283 bp 的开放阅读框, 编码 761 个氨基酸, 属于 trihelix 转录因子的 GT-2 亚家族; 亚细胞定位和转录活性分析显示, MaGTL1a 定位于细胞核, 并在酵母和植物体内具有转录激活活性; 实时荧光定量 PCR 和启动子活性试验表明, *MaGTL1a* 转录水平和启动子活性均受乙烯诱导, 并且 *MaGTL1a* 转录水平随着香蕉果实的成熟进程而明显增强。【结论】MaGTL1a 是一个受乙烯诱导和核定位的转录激活子, 可能参与了香蕉果实成熟的调控。

关键词: 香蕉果实; 成熟; 转录因子; Trihelix; 表达

中图分类号: S668.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)08-0935-11

Identification and characterization of a trihelix transcription factor MaGTL1a from banana

LIANG Shumin, LUO Donglan, CHENG Yujin, YU Lean, YANG Yajie, CHEN Jianye, LU Wangjin, KUANG Jianfei*

(College of Horticultural Science, South China Agricultural University·Engineering Research Center of Southern Horticultural Products Preservation, Ministry of Education·Guangdong Provincial Key Laboratory of Postharvest Science of Fruits and Vegetables, Guangzhou 510642, Guangdong, China)

Abstract:【Objective】The trihelix transcription factors, also known as GT factors, are plant-specific transcription factors with conserved trihelix DNA-binding domains that bind specifically to the GT elements in promoters of light regulated genes. The trihelix transcription factors can be further divided into five clades, namely GT-1, GT-2, SH4, GTγ and SIP1, on the basis of their sequence structure. To date, the trihelix transcription factors have been identified and characterized in various plant species, such as pea, *Arabidopsis*, rice, maize, tomato, and chrysanthemum. A large number of studies indicated that trihelix transcription factors played an essential role in the regulation light-responsive genes, and different developmental processes of growth and development of flowers, embryos, seeds, stomata and trichomes, as well as the adaptation to environmental stimuli like salt and pathogen stresses. However, little information was available on the involvement of the trihelix transcription factors in the ripening of fleshy fruits, especially in economical fruit crops such as banana. Therefore, the aims of this study were to isolate a trihelix tran-

收稿日期: 2016-09-23 接受日期: 2017-04-06

基金项目: 广州市珠江科技新星专项(201506010080); 国家香蕉现代农业产业技术体系(CARS-32-09); 华南农业大学校级创新训练项目(201510564122)

作者简介: 梁淑敏, 女, 研究方向为园艺产品采后科学。Tel: 020-85285523, E-mail: 786933227@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 020-85285523, E-mail: jfkuang@scau.edu.cn

scription factor from banana fruit (*MaGTL1a*), and investigate its subcellular localization and transcriptional activation activity. Moreover, the gene expression during banana fruit ripening and the promoter activity of *MaGTL1a* were also analyzed, in an effort to elucidate the possible roles of *MaGTL1a* in the ripening of banana fruit. 【Methods】 Total RNA was extracted from banana pulp using the hot borate method and the first strand cDNA was synthesized. RT-PCR was performed to isolate the full-length cDNA of *MaGTL1a*. Bioinformatics analysis was conducted to analyze the sequence characteristics of *MaGTL1a*. Phylogenetic tree was constructed using the MEGA 6.0 software to investigate the evolutionary relationship between *MaGTL1a* and other trihelix transcription factors from other plant species. *Agrobacterium*-mediated transient expression in Ben's tobacco leaves was used to assess the subcellular localization and transactivation activity of *MaGTL1a*. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was carried out to monitor the expression pattern of *MaGTL1a* during fruit ripening of banana. Promoter of *MaGTL1a* was isolated using banana genome DNA as template, and its promoter activity was tested using transient expression in tobacco BY2 protoplasts via the PEG method. 【Results】 A trihelix gene (GSMUA_Achr4G24780_001) was isolated from banana fruit using the RT-PCR technology. A BLAST search of GenBank revealed that the protein encoded by this gene shared 59%, 58%, 53%, 47% and 44% identity with *Elaeis guineensis* EgGTL1-like isoform (XP_010933772.1), *Phoenix dactylifera* PdGTL1-like isoform (XP_008791630.1), *Nelumbo nucifera* NnGTL1-like isoform (XP_010250883.1), *Populus tremula* PtGTL1 (AER42647.1) and *Ricinus communis* RcGTL1-like isoform (XP_002518968.1), respectively, at amino acid level and thus the gene was designated as *MaGTL1a*. The cDNA of *MaGTL1a* had an open reading frame (ORF) of 2 283 bp in length which encoded a peptide of 761 amino acid residues with calculated molecular weight (MW) of 82.70 ku and predicted isoelectric point (pI) of 6.07. Moreover, comparison of the protein sequence with other trihelix transcription factors from other plant species showed that *MaGTL1a* consisted of two trihelix DNA-binding domains at its N-terminal and C-terminal regions respectively, and a typical feature of GT-2 clade of trihelix members, which implied that *MaGTL1a* might belong to GT-2 clade. Phylogenetic analyses exhibited that the plant trihelix transcription factors could be grouped into five clades, namely GT-1, GT-2, SH4, SIP1 and GT γ , where *MaGTL1a* of banana together with those of *Oryza sativa* OsGT-2, *Populus tomentosa* PtaGTL1 and *Arabidopsis thaliana* AtGTL1 fell into GT-2 clade. Subcellular localization indicated that the green fluorescence signal of *MaGTL1a*-GFP fusion protein was exclusively observed in the nucleus of the tobacco epidermal cell, as other reported trihelix transcription factors, indicating that *MaGTL1a* might function in nuclear compartments. Furthermore, transcriptional activation activity assays demonstrated that *MaGTL1a* possessed transcriptional activation ability in yeast and in plant, implicating its role as a transcriptional activator. Importantly, RT-qPCR analyses revealed that the accumulation of *MaGTL1a* transcript was obviously induced by ethylene, with increasing trends along with the progression of banana fruit ripening, which was in accordance with its expression pattern in our DGE data. In addition, the activity of *MaGTL1a* promoter was activated by exogenous ethylene application when transiently expressed in tobacco BY2 protoplasts, further supporting the roles of *MaGTL1a* involved in fruit ripening. 【Conclusion】 *MaGTL1a* was an ethylene-inducible and nucleus-localized transcriptional activator likely involved in the modulation of banana fruit ripening, which expanded our understanding on trihelix transcription factors in regulating fruit ripening and the transcriptional controlling networks of ripening of banana fruits. Further experiments such as identification of *MaGTL1a*'s target genes are needed to fully explore the biological functions of *MaGTL1a* in relation to fruit ripening of banana.

Key words: Banana fruit; Ripening; Transcription factor; Trihelix; Expression

香蕉(*Musa acuminata*)属芭蕉科芭蕉属,是世界上热带、亚热带最主要的水果之一^[1-2]。香蕉在我国广东、海南等地大面积种植,在我国的水果生产中占有重要的位置^[3]。然而,香蕉为典型的呼吸跃变型果实,在常温下1周左右即出现呼吸高峰,导致果实迅速成熟,货架期短;近年来,我国香蕉采后损失严重,香蕉采后损失率约为50%,远远高于中国果蔬采后的平均损耗率25%和发达国家5%的水平^[4]。因此,研究香蕉果实成熟的分子机制,对于有效延长香蕉果实货架期和维持果实采后品质具有十分重要的应用前景。

转录因子调控果实成熟是当前的研究热点。目前发现参与香蕉果实成熟的转录因子包括MADS-box^[5]、EIN3/EIL^[6]、ERF^[7]、NAC^[8]、Dof^[9]和BSD^[10]等。最新研究发现,在香蕉果实中抑制*MaMADS1*或*MaMADS2*的表达可以延缓颜色和质地等的变化,延缓并减少乙烯的生成,从而延迟果实成熟和延长货架期;而外源乙烯处理可以恢复转基因果实的正常成熟症状,为采用转基因方式调控转录因子的表达而延长果实贮藏期提供了参考^[11]。此外,转录因子介导的转录调控机制在果实成熟过程中起着重要的作用,如ERF可转录调控乙烯生物合成而参与果实成熟^[7],Dof可转录抑制果实软化和香气合成基因^[9]等。因此,研究更多的转录因子在果实成熟中的生物学功能及其转录机制对于揭示果实成熟的转录调控网络具有重要的意义。鉴于植物转录因子是一个庞大的基因家族,如拟南芥基因组至少含有1 533个转录因子^[12],香蕉基因组至少含有3 155个转录因子^[13]等,其他调控果实成熟相关的转录因子仍有待进一步研究和挖掘。

trihelix转录因子因其DNA结合域含有3个串联的螺旋结构(螺旋-环-螺旋-环-螺旋)而得名,并且该结合域能特异识别并结合GT元件,因此该家族又被称为GT因子家族^[14]。trihelix转录因子成员GT-1首次从豌豆叶片被鉴定出来,它能特异结合*rbcsS-3A*启动子中的光应答调控GT元件(核心序列:5'-GGTTAA-3')^[15]。随后在拟南芥^[16]、水稻^[17]、番茄^[18]、菊花^[19]等相继鉴定出trihelix的同源基因。大量研究表明,trihelix转录因子参与了植物生长发育过程,包括光应答基因的调控^[15]、花器官形态建成^[20]、种子离层^[21]等,以及应答逆境胁迫,包括冷害^[17]、干旱^[22]和高盐^[23]等非生物胁迫和病原体胁迫^[22]等生物胁迫。但

是,trihelix转录因子是否参与调控果实成熟进程仍不明确。

因此,笔者从课题组早期建立的香蕉成熟差异基因表达数据库中筛选并获得了1个与成熟相关的trihelix转录因子(GSMUA_Achr4G24780_001),命名为*MaGTL1a*,并分析了其亚细胞定位、转录活性等特性;进一步研究了*MaGTL1a*在果实成熟进程中的表达水平和启动子活性,以期探讨trihelix转录因子调控香蕉果实成熟的可能机制。研究结果可为香蕉果实成熟的转录调控机制提供有用信息,同时也丰富了trihelix转录因子的功能研究。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试香蕉为‘巴西’品种(*Musa* spp. AAA group ‘Brazil’),采购于广州市番禺区香蕉种植场。采收七八成饱满度的香蕉(夏季断蕾后70~80 d)立刻运回实验室。采回的香蕉被分成单个蕉指后,挑选饱满度和大小基本一致且没有机械伤和病虫害的果实,经施保功杀菌剂处理后晾干备用。

1.2 果实处理

将上述香蕉分成3组,第1组为自然成熟(对照),将果实放入22℃冷库恒温贮藏使其自然成熟,分别在第0、1、3、5、7、12、15、18和21天取样。第2组为丙烯催熟处理,用1 000 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 的丙烯在密封袋中对果实进行16 h的催熟,之后敞开密封袋,将香蕉果实置于22℃冷库贮藏,分别在第0、1、3、5和7天取样。第3组为1-MCP抑制成熟处理,用0.5 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP密闭处理16 h后,取出果实放入22℃冷库贮藏,分别在第0、1、3、5、7、12、15、18、21、27、30、33和36天取样。取样时选取3个香蕉果实的果肉,3次重复,用液氮速冻后贮存于-80℃备用。

1.3 香蕉果实RNA提取及第1链cDNA合成

采用热硼酸法^[24],从香蕉果肉混合样品中提取总RNA。以香蕉果实总RNA为模板,采用Reverse Transcriptionase M-MLV(RNase H-)试剂盒(TaKaRa公司)反转录合成cDNA第1链,用于后续基因克隆和荧光定量PCR分析。

1.4 *MaGTL1a*基因克隆和生物信息学分析

从本课题组的香蕉果实成熟差异基因表达谱中挑选1个表达上调的trihelix转录因子(GSMUA_Achr4G24780_001),命名为*MaGTL1a*。从

该基因的起始密码子和终止密码子附近设计特异引物(表1)进行PCR扩增、TA克隆及测序,最终获得*MaGTL1a*序列。利用ExPASy在线工具(http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)对*MaGTL1a*基因编码的蛋白质进行氨基酸基本特性分析。运用在线SMART软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白结构域。利用Clustal X1.83和Gendoc以及DNAMAN软件进行不同物种间同源基因的氨基酸

表 1 本文所用引物序列
Table 1 The primer sequences used in this study

引物用途 Primer usage	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	内切酶 Restriction enzyme
全长扩增 Full length amplification	MaGTL1a-full	F: ATGCAACAGCAGAAAGCA R: CTATTGAACTATGGCCAAGAA	
实时荧光定量PCR Real time quantitative PCR	MaACT1-RT MaGTL1a-RT	F: GAGGCACCACTCCGTAGATAGC R: CCGCCAGATGAAGGTACAACAT F: ATCCACCTCCCAATCAACAGA R: GAAACCTCGCCGCCCTC	
转录活性分析 Transcriptional activity analysis	MaGTL1a-pBD	F: TCGCCGACCGGTAGGCCT ATGCAACAGCAGAAAGCA R: AACCAGAGTTAAAGGCCTTTGAACTATGGCCAAGAA	<i>Stu I</i>
亚细胞定位 Sub-cellular localization	MaGTL1a-GFP	F: CAAATTGCGGACCGGT ATGCAACAGCAGAAAGCA R: TGCTAGTCATACCGGTTTGAAGTATGGCCAAGAA	<i>Age I</i>
启动子克隆 Promoter amplification	MaGTL1a-pro	F: CATCCTAAAACCTTAACGACTGTG R: GACCCTGCTTTCTGCTGTTGCAT	
启动子活性 Promoter amplification activity analysis	MaGTL1a-pro-0800	F: TATAGGGCGAATTGGGTACCCATCCTAAAACCTTAACGACTGTG R: TTGGCGTCTTCCATGGGACCCGTGCTTTCTGCTGTTGCAT	<i>Kpn I</i> <i>Nco I</i>
酵母转录激活 The yeast transcriptional activity analysis	pGBKT7- MaGTL1a	F: CATGGAGGCCGAATTCATGCAACAGCAGAAAGCA R: GCCGCTGCAGTGCAGCGCTATTGAACTATGGCCAAGAA	<i>EcoR I</i> <i>Sal I</i>

序列比对,并结合MEGA6.0软件构建系统进化树。

1.5 亚细胞定位

所用载体为带绿色荧光蛋白(GFP)的pEAQ[英国George P. Lomonosoff博士(Department of Biological Chemistry, John Innes Centre, Norwich Research Park)惠赠]。根据*MaGTL1a*基因的ORF和pEAQ-GFP载体图谱设计定位引物(表1)。获得正确的阳性克隆,经测序验证后,采用电穿孔仪电转法转化到农杆菌GV3101,参考Sainsbury等^[25]的方法进行。挑取农杆菌单菌落分别置于含卡那霉素(50 mg·L⁻¹)和庆大霉素(40 mg·L⁻¹)的YEB液体培养基中,于摇床中28℃200 r·min⁻¹孵育24~36 h,PCR鉴定阳性克隆。将阳性克隆农杆菌单菌液培养至OD₆₀₀=0.8~1.0,10 000 r·min⁻¹离心1 min,收集菌体,用侵染缓冲液(10 mmol·L⁻¹ MES-KOH,10 mmol·L⁻¹ MgCl₂,0.1 mmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮)重悬菌体至OD₆₀₀为0.5~0.6,室温静置2~3 h后将重悬菌液注射到本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)叶片背面,培养室培养2 d后,取约1 cm²的叶片材料在荧光显微镜下观察GFP信号并拍照记录。

1.6 转录活性分析

*MaGTL1a*转录活性分析分别采用酵母和植物

系统进行。酵母系统:采用Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System试剂盒(Clontech公司),选取合适的酶切位点,将*MaGTL1a*基因全长克隆至pGBKT7载体上,并保证构建后的重组质粒读码正确。在LiAc介导下将质粒转入酵母Y2HGold菌株中,30℃下培养3 d之后,如果酵母在SD/-Trp平板上面有生长,则挑取单克隆涂布在SD/-Trp-His-Ade/Kan平板上。再经30℃培养3 d之后如果有生长,则向酵母菌落上面滴加X-α-gal溶液并观察酵母颜色的变化。如果10 min后酵母变蓝,则说明转入的重组BD质粒激活了酵母内下游报告基因的表达,加入BD载体中的目的蛋白具有转录激活能力。

植物系统:将*MaGTL1a*基因全长克隆至含有GAL4BD的pEAQ载体^[25]作为本试验的效应基因载体(pBD-MaGTL1a),以pBD-VP16和空载体(pBD-Empty)分别作为本试验的正、负对照。报告基因载体为本实验室改造的含双荧光素酶的pGreenII 0800-LUC载体^[9]。按照前面所述的农杆菌侵染法,将含效应基因(effector)和报告基因(reporter)的农杆菌共侵染本氏烟草叶背面,培养2~3 d后,采用双荧光素酶检测试剂盒(Promega)测定烟草叶片的2个报告基因LUC和REN表达后发生的荧光量比值

(LUC/REN)(反映 MaGTL1a 的转录活性),具体参考 Ba 等^[10]的方法完成。测定仪器为 Thermo 的荧光分光光度计,参考试剂盒说明书(Promega)进行,每对组合6次重复。

1.7 Real-time 定量PCR(qRT-PCR)分析

根据 MaGTL1a 基因全长序列,设计荧光引物, MaActin1 作为内参基因^[26]。qRT-PCR 使用的荧光染料为 TaKaRa SYBR Green I, 仪器为 Bio-Rad CFX9600。20 μ L qRT-PCR 反应液中含有 40 ng 的 cDNA 和 5 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 基因特异引物。qRT-PCR 溶液配制具体操作过程见 SYBR Green I 试剂盒(TaKaRa)说明书,并用相对定量软件对 PCR 结果的溶解曲线和标准曲线进行分析、定量。荧光定量反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,55 $^{\circ}$ C 退火 10 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,40 个循环。溶解曲线分析从 60 $^{\circ}$ C 至 95 $^{\circ}$ C,第 1 步维持 45 s,以后每升高 1 $^{\circ}$ C 维持 5 s。荧光定量引物见表 1。

1.8 启动子分离和元件分析

利用 DNeasy Plant Mini Kit 试剂盒(Qiagen)提取香蕉幼叶基因组 DNA。根据香蕉基因组数据库序列(<http://banana-genome-hub.southgreen.fr/>),找到 MaGTL1a 的启动子序列并设计引物(表 1),以 DNA 为模板进行 PCR 扩增,目的片段经测序后获得确定的启动子序列。通过 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)在线软件进行启动子区域中的元件分析。

1.9 启动子活性检测

参考 Ba 等^[10]启动子活性检测方法,将克隆的 MaGTL1a 的启动子连接到 Hind III 和 BamH I 双酶切的 pGreenII 0800-LUC 载体上(所用引物见表 1),然后采用 PEG 介导法转化烟草 BY2 悬浮细胞系原生质体中,参考徐群刚等^[27]的方法进行。采用双荧光素酶报告基因系统,在烟草 BY2 悬浮细胞中对 MaGTL1a_{pro}-pGreenII 0800-LUC 的启动子活性进行分析。瞬时表达 MaGTL1a_{pro}-pGreenII 0800-LUC 后的 BY2 原生质体包括对照组(0 mmol $\cdot$ L⁻¹ 乙烯利)和处理组(乙烯处理,0.8 mmol $\cdot$ L⁻¹ 乙烯利),经过 14 h 孵化,通过测定 LUC/REN 的值来获得 MaGTL1a 启动子活性。每对组合 6 次重复。

2 结果与分析

2.1 香蕉 MaGTL1a 基因克隆与序列分析

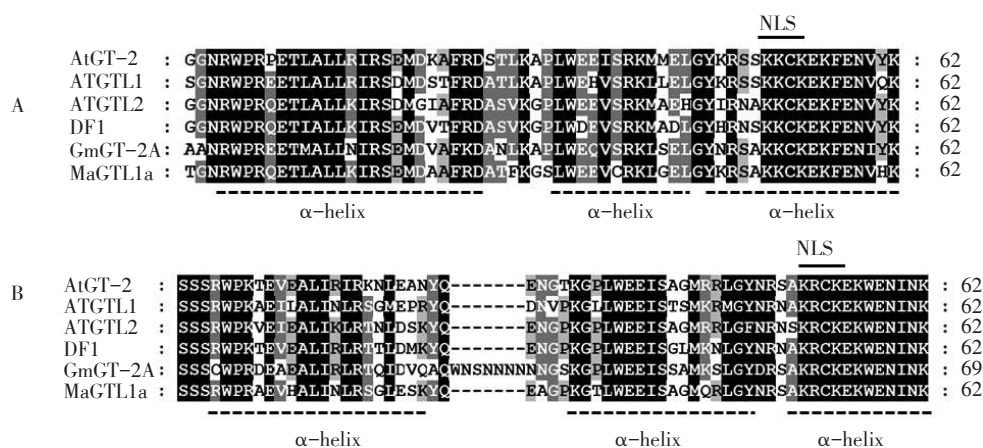
根据课题组构建的香蕉果实成熟差异基因表达谱,从中挑选了 1 个在成熟衰老过程中表达较明显上调的 trihelix 转录因子。以香蕉果肉 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,获得 1 条长度为 2 283 bp 的目的条带,经测序获得其全长序列。将该序列放在 NCBI 中进行 Blast 同源性分析,结果显示该序列与棕榈 GTL1 同源基因(XP_010919359.1)的同源性最高,为 60%,因此命名为 MaGTL1a。MaGTL1a 编码一条 761 个氨基酸、分子质量为 82.70 ku、等电点为 6.07 的多肽链。运用在线 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白结构域,结果表明, MaGTL1a 在 N 端和 C 端各含有 1 个 trihelix SANT 保守结构域,分别由第 95 的苏氨酸(T)起到 157 的赖氨酸(K)和第 481 位的丝氨酸(S)起到 543 位的赖氨酸(K)组成(图 1)。进一步对 MaGTL1a 的 2 个 SANT 保守结构域分析,发现它们均符合 trihelix 转录因子的 DNA 保守结合功能域特征,即含有 3 个 α -螺旋(图 2)。利用 MEGA 6.0 对 MaGTL1a 和其他物种 trihelix 同源基因构建系统进化树,发现植物 trihelix 可以分为 GT-1、GT-2、SH4、SIP1 和 GT γ 5 个亚家族,与前人的研究相一致^[14];其中, MaGTL1a 与水稻的 OsGT-2、毛果杨的 PtaGTL1、拟南芥的 AtGTL1 的亲缘关系较近,并归类于 trihelix 转录因子家族中的 GT-2 亚族成员(图 3)。

2.2 MaGTL1a 的亚细胞定位

为明确 MaGTL1a 的亚细胞定位情况,构建了 MaGTL1a 的 C 端融合 GFP 表达载体 35S::MaGTL1a-GFP,采用农杆菌侵染法使其在烟草叶片背面瞬时表达(图 4)。在 35S::GFP 载体转化的烟草叶片细胞中,GFP 荧光信号分布在整个细胞中,而转化了 35S::MaGTL1a-GFP 载体的烟草细胞中只在细胞核处检测到绿色荧光信号,表明 MaGTL1a 主要定位于细胞核,是核定位蛋白,这一结果与其氨基酸序列含有核定位信号(NLS)相符(图 2)。

2.3 MaGTL1a 具有转录激活活性

为了检测 MaGTL1a 是否具有转录激活活性,笔者采用 GAL4 系统在 Y2H Gold 酵母中分析 MaGTL1a 的转录激活活性。含 pGBKT7-MaGTL1a、阳性对照 pGBKT7-53 + pGADT7-T 以及空载体 pGBKT7 的 Y2H Gold 酵母菌株均能在 SD/-Trp 培养基上生长,说明外源质粒顺利转入酵母。将转入外源质粒的酵母菌株接种在营养缺陷型培养基 SD/-Trp-Ade-His

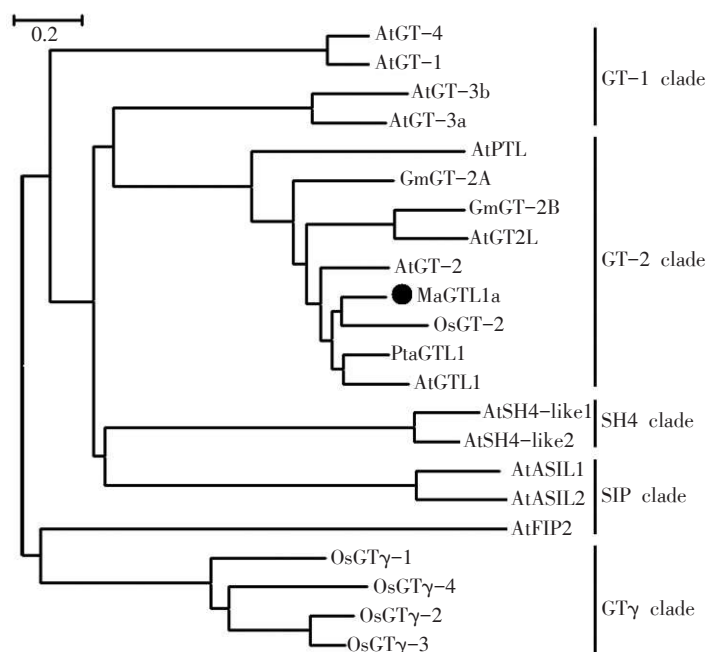


A. N 端 trihelix DNA 结合域氨基酸序列比对; B. C 端 trihelix DNA 结合域氨基酸序列比对。虚线和实线分别表示 α -螺旋和核定位信号。AtGT-2、AtGTL1、AtGTL2、DF1、GmGT-2A、MaGTL1a 的登录号分别为 At1g76890、At1g33240、At5g28300、BAB41080.1、EF221753、GSMUA_Achr4G24780_001。

A. N-terminal trihelix DNA-binding domains; B. C-terminal trihelix DNA-binding domains. α -helix and nuclear localization sequence(NLS) are indicated by dotted and solid lines, respectively. Accession numbers of AtGT-2, AtGTL1, AtGTL2, DF1, GmGT-2A, MaGTL1a are At1g76890, At1g33240, At5g28300, BAB41080.1, EF221753, GSMUA_Achr4G24780_001, respectively.

图2 MaGTL1a 与其他物种 trihelix 的 3 螺旋 DNA 结合域比较

Fig. 2 Amino acids alignment of DNA-binding domains from MaGTL1a and trihelix proteins from other species



数值表示分支长度, MaGTL1a 蛋白用“●”标出。登录号如下。拟南芥: AtGT-3a. At5g01380; AtGT-3b. At2g38250; AtGT-1. At1g13450; AtGT-4. At3g25990; AtGT-2. At1g76890; AtGTL1. At1g33240; AtGT2L. At5g28300; AtPTL. At5g03680; AtSH4-like1. At2g35640; AtSH4-like2. At1g31310; AtASIL1. At1g54060; AtASIL2. At3g14180; AtFIP2. At4G17060. 水稻: OsGT-2. CAA48328; OsGTγ-1. CAA48328; OsGTγ-2. Os11g06410; OsGTγ-3. Os12g06640; OsGTγ-4. Os01g21590. 大豆: GmGT-2A. EF221753; GmGT-2B. EF221754. 白杨: PtaGTL1. JN113092. 香蕉: MaGTL1a. GSMUA_Achr4G24780_001。

The value represents branch length, and MaGTL1a is indicated by solid circle. Accession numbers as follows. *Arabidopsis thaliana*: AtGT-3a. At5g01380; AtGT-3b. At2g38250; AtGT-1. At1g13450; AtGT-4. At3g25990; AtGT-2. At1g76890; AtGTL1. At1g33240; AtGT2L. At5g28300; AtPTL. At5g03680; AtSH4-like1. At2g35640; AtSH4-like2. At1g31310; AtASIL1. At1g54060; AtASIL2. At3g14180; AtFIP2. At4G17060. *Oryza sativa*: OsGT-2. CAA48328; OsGTγ-1. CAA48328; OsGTγ-2. Os11g06410; OsGTγ-3. Os12g06640; OsGTγ-4. Os01g21590. *Glycine max*: GmGT-2A. EF221753; GmGT-2B. EF221754. *Populus tomentosa*: PtaGTL1. JN113092. *Musa acuminata*: MaGTL1a. GSMUA_Achr4G24780_001.

图3 MaGTL1a 与其他物种 trihelix 蛋白的进化关系

Fig. 3 Phylogenetic tree of MaGTL1a and trihelix proteins from other species

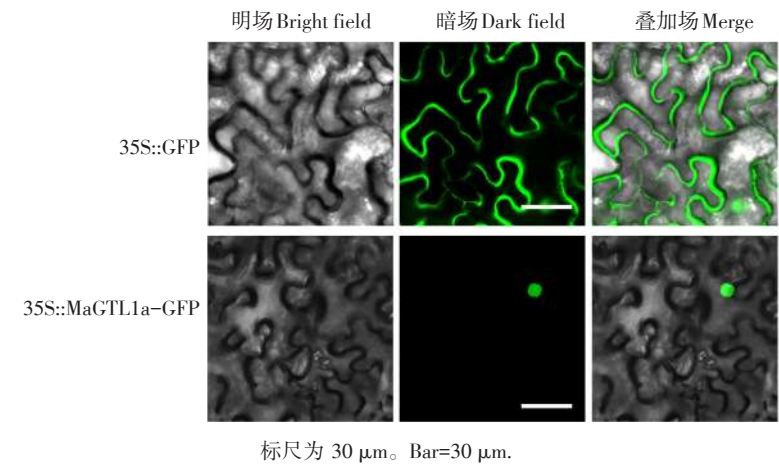


图 4 香蕉 *MaGTL1a* 蛋白在烟草叶片表皮细胞中的亚细胞定位
Fig. 4 Subcellular localization of *MaGTL1a* in tobacco leaf epidermal cells

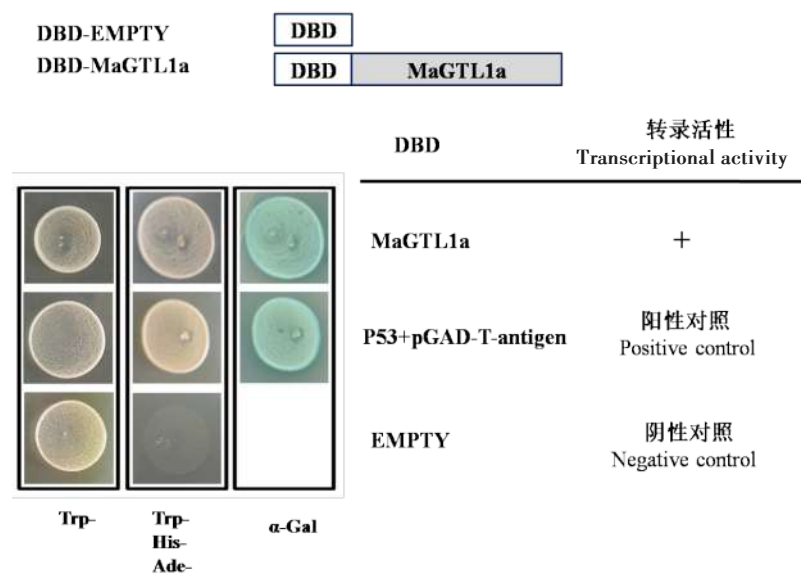


图 5 *MaGTL1a* 在酵母内的转录活性分析
Fig. 5 Transcriptional activity of *MaGTL1a* in yeast cells

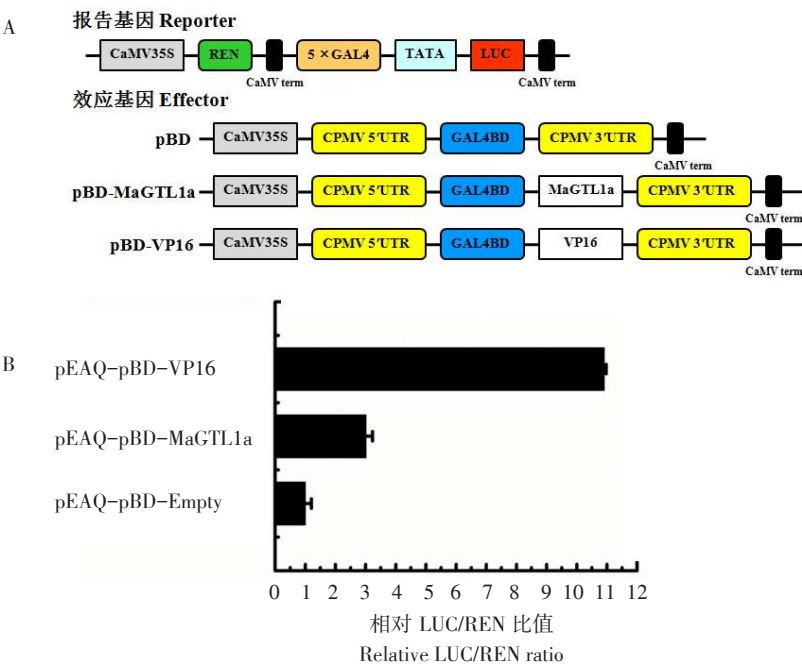
(内源乙烯释放)而显著提高,在自然成熟的 21 d、丙烯催熟的 3 d 和 1-MCP 延缓成熟的 33 d 达到最大值,分别为 0 d 时的 100、49 和 75 倍(图 7)。以上结果表明, *MaGTL1a* 受(内源)乙烯上调诱导,并可能在香蕉果实成熟过程中起到调节成熟的作用。

2.5 *MaGTL1a* 启动子活性分析

为了深入了解 *MaGTL1a* 调控香蕉果实成熟的作用机制,进一步分离其启动子。从表 2 可以看出, *MaGTL1a* 启动子含有丰富的顺式作用元件,包括低温应答的元件(核心序列为 CCGAAA)、响应生长素的 TGA 元件(核心序列为 AACGAC)、响应赤霉素的 GARE 元件和 P-box 元件(核心序列分别为 AAACA-GA 和 CCTTTTG)、响应茉莉酸的 CGTCA-motif(核

心序列为 CGTCA)、WRKY 的结合元件 W-box、MYB 的结合元件等。并且 *MaGTL1a* 启动子含有 1 个乙烯反应元件 ERE (核心序列为 ATTTCAAA),推测 *MaGTL1a* 启动子可能响应乙烯诱导。

利用 DLR 系统(图 8-A),通过在烟草 BY2 原生质体瞬时表达 *MaGTL1a pro*-pGreenII 0800-LUC 来研究 *MaGTL1a* 启动子活性(图 8-B)。结果显示,瞬时表达 *MaGTL1a pro*-pGreenII 0800-LUC 后的 BY2 原生质体经乙烯利处理后的报告基因表达量显著高于未处理的对照,约为对照的 3.1 倍,表明 *MaGTL1a* 启动子可能受乙烯激活,与 *MaGTL1a* 在香蕉果实成熟过程受乙烯诱导一致,进一步说明 *MaGTL1a* 可能参与香蕉果实成熟调控。



A. 瞬时表达分析载体;B. 相对 LUC 荧光酶活性与 REN 荧光酶活性比值代表的 MaGTL1a 转录活性。
A. Constructs used in the transient expression assay; B. Transcriptional activity of MaGTL1a as revealed by relative LUC/REN ratio.

图 6 MaGTL1a 在植物体内转录活性分析
Fig. 6 Transcriptional ability of MaGTL1a in planta

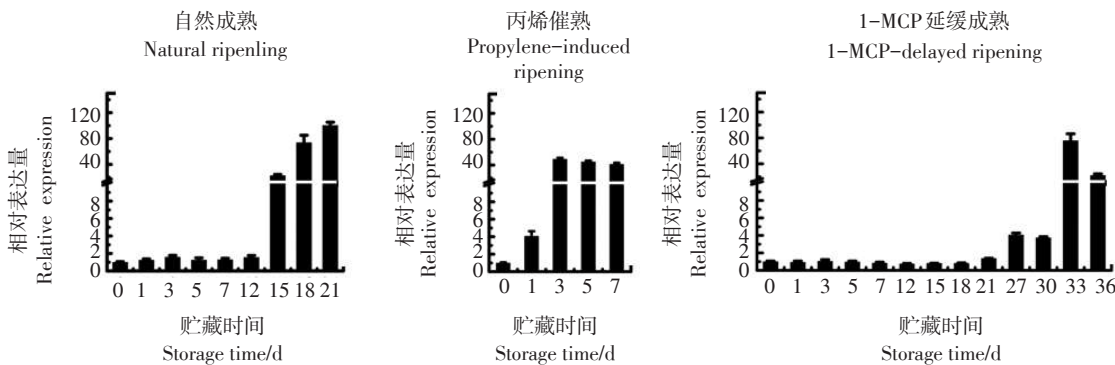
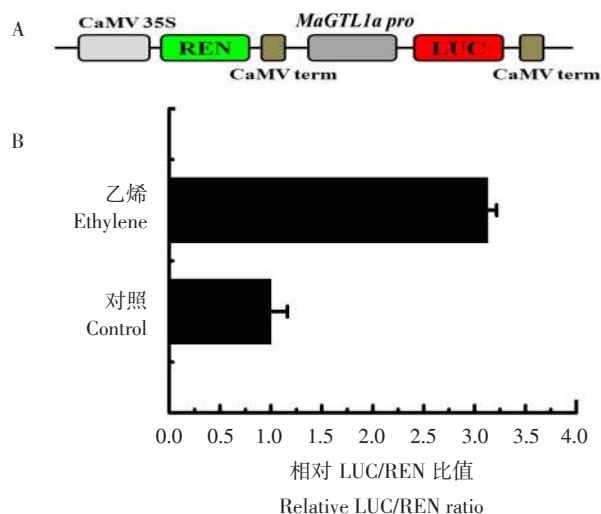


图 7 MaGTL1a 在 3 种不同成熟进程的香蕉果实中的表达
Fig. 7 Expression level of MaGTL1a in banana fruit with three different ripening characteristics

表 2 香蕉 MaGTL1a 启动子元件分析

元件名称	Cis-acting element name	序列 Sequence	位置 Location	作用 Function
W-box		TGAC	27(+); 657(+)	WRKY 识别位点 WRKY binding site
MYBS		AACCA	902(+);	MYB 识别位点 MYB binding site
CGTCA-motif		CGTCA	1 013(+)	茉莉酸响应 Jasmonic acid-responsive
ERE		ATTTCAAA	412(-)	乙烯响应元件 Ethylene-response element
GARE-motif		AAACAGA	1 089(+)	赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element
LTR		CCGAAA	1 234(+)	低温应答 Low temperature-responsive
MYBS		CAACTG	943(-); 1 007(+)	MYB 识别位点 MYB binding site
TGA-element		AACGAC	14(+);288(+)	生长素响应 Auxin-responsive
P-box		CTTTTG	423(+)	赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element

注: +表示在正义链上; -表示在负义链上。
Note: + indicated at the positive-sense strand; - indicated at the negative -sense strand.



A. 瞬时表达分析载体; B. 相对 LUC/REN 比值代表的 *MaGTL1a* 启动子活性。

A. Constructs used in the transient expression assay; B. Promoter activity of *MaGTL1a* as revealed by relative LUC/REN ratio.

图 8 香蕉 *MaGTL1a* 启动子活性分析

Fig. 8 Promoter activity of *MaGTL1a* in response to ethylene

3 讨 论

Trihelix 是植物最早发现的转录因子之一,因其保守结构域含有 3 个串联的 α -螺旋而得名。目前报道 trihelix 转录因子在植物光形态建成、不同器官如花、气孔、表皮毛、胚胎和种子等发育过程,以及在冷胁迫、干旱胁迫、盐胁迫和病害等非生物和生物胁迫反应中起着重要调控作用^[14]。但目前有关果实成熟衰老相关 trihelix 转录因子的分离及其调控机制的研究较少。笔者从香蕉果实成熟表达谱中筛选了一个 trihelix 转录因子,并命名为 *MaGTL1a*。生物信息学分析表明, *MaGTL1a* 属于 GT-2 亚族,并具有该亚族典型的结构特征,即包含 2 个 trihelix 保守结构域。与其他报道的 trihelix 转录因子^[29]类似, *MaGTL1a* 也主要定位于细胞核内,表明 *MaGTL1a* 可能在细胞核内参与调控下游基因的转录。与本研究结果不同的是,拟南芥 GT-4 则定位在细胞质和细胞核区域^[30],这可能与 GT-4 行使其他功能有关。此外, *MaGTL1a* 在酵母和植物细胞内具有转录激活活性,暗示 *MaGTL1a* 可能作为转录激活子激活果实成熟相关的下游基因的表达。有趣的是,拟南芥 At-GT2L 在酵母体内也具有转录激活能力,并且该激活能力位于 N 端(1~383 aa)^[31],而 GT-4 的转录激活能力位于 C 端(114~373 aa)^[30]。

本研究发现, *MaGTL1a* 在香蕉 3 种不同成熟进程中,表达均随着香蕉果实成熟进程而增强,推测 *MaGTL1a* 受(内源)乙烯诱导上调表达。另外, *MaGTL1a* 启动子含有乙烯反应元件,并且受乙烯诱导激活,与它的转录水平一致,进一步证实了 trihelix 转录因子不仅参与植物器官生长发育,而且还参与果实的成熟衰老调控,拓展了 trihelix 转录因子的生物学功能研究领域。转录因子参与果实成熟主要是通过转录调控一系列下游靶基因的表达,后续试验如挖掘 *MaGTL1a* 的下游靶基因等将会对揭示 trihelix 转录因子调控果实成熟机制非常有意义。值得注意的是,拟南芥 trihelix 转录抑制子 ASR3 被 MPK4 磷酸化修饰后,增强了其 DNA 结合能力从而促进 ASR3 对下游靶基因的抑制^[32]。因此,香蕉 *MaGTL1a* 是否存在翻译后修饰,及其对下游基因调控能力的影响等,需要进一步研究。

4 结 论

香蕉 trihelix 转录因子 *MaGTL1a* 是一个核定位的转录激活子,在香蕉果实成熟过程中受果实成熟和乙烯释放诱导而显著上调表达,推测 *MaGTL1a* 可能参与香蕉果实成熟的调控,为采用分子生物学手段调控香蕉果实成熟提供参考依据。

参考文献 References :

- [1] 王卓,徐碧玉,贾彩虹,李健平,刘菊华,张建斌,苗红霞,金志强. 香蕉 MYB 基因克隆和表达分析[J]. 果树学报, 2015, 32(6): 1085-1092.
WANG Zhuo, XU Biyu, JIA Caihong, LI Jianping, LIU Juhua, ZHANG Jianbin, MIAO Hongxia, JIN Zhiqiang. Molecular cloning and expression of MYB1 gene from banana (*Musa acuminata* L. AAA group, 'Cavendish') under the various stresses[J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(6): 1085-1092.
- [2] 王静毅,武耀廷,刘菊华,贾彩虹,苗红霞,张建斌,王卓,金志强,徐碧玉. 香蕉不同器官中 microRNA 差异表达分析[J]. 果树学报, 2016, 33(7): 777-782.
WANG Jingyi, WU Yaoting, LIU Juhua, JIA Caihong, MIAO Hongxia, ZHANG Jianbin, WANG Zhuo, JIN Zhiqiang, XU Biyu. Differential expression analysis of microRNA in banana different organs [J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(7): 777-782.
- [3] 艾建安,熊瑞权,董丽萍,万忠,黄秉智. 2015 年广东香蕉产业发展形势与对策建议 [J]. 广东农业科学, 2016, 43(4): 11-15.
AI Jian'an, XIONG Ruiquan, DONG Liping, WAN Zhong, HUANG Bingzhi. Development situation and countermeasures of Guangdong banana industry in 2015[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2016, 43(4): 11-15.
- [4] 李玉萍,方佳. 中国香蕉产业现状与发展对策研究[J]. 中国农业通报, 2008, 24(8): 443-447.
LI Yuping, FANG Jia. A survey on status and countermeasures of banana industry in China[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(8): 443-447.
- [5] ELITZUR T, VREBALOV J, GIOVANNONI J J, GOLDSCHMIDT

- E E, FRIEDMAN H. The regulation of MADS-box gene expression during ripening of banana and their regulatory interaction with ethylene [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61 (5): 1523-1535.
- [6] MBEGUIE A, MBEGUIE D, HUBERT O, FILS LYCAON B, CHILLET M, BAURENS F C. EIN3-like gene expression during fruit ripening of Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Grande Naine) [J]. *Physiologia Plantarum*, 2008, 133(2):435-448.
- [7] 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.
- [8] SHAN W, KUANG J F, CHEN L, XIE H, PENG H H, XIAO Y Y, LI X P, CHEN W X, HE Q G, CHEN J Y, LU W J. Molecular characterization of banana NAC transcription factors and their interactions with ethylene signalling component EIL during fruit ripening [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63 (14): 5171-5187.
- [9] FENG B H, HAN Y C, XIAO Y Y, KUANG J F, FAN Z Q, CHEN J Y, LU W J. The banana fruit Dof transcription factor MaDof23 acts as a repressor and interacts with MaERF9 in regulating ripening-related genes [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67 (8):2263-2275.
- [10] BA L J, SHAN W, XIAO Y Y, CHEN J Y, LU W J, KUANG J F. A ripening-induced transcription factor MaBSD1 interacts with promoters of *MaEXPI2* from banana fruit [J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(11):1913-1920.
- [11] ELITZUR T, YAKIR E, QUANSAH L, ZHANGJUN F, VREBALOV J, KHAYAT E, GIOVANNONI J J, FRIEDMAN H. Banana MaMADS transcription factors are necessary for fruit ripening and molecular tools to promote shelf-life and food security [J]. *Plant Physiology*, 2016, 171(1):380-391.
- [12] RIECHMANN J L, HEARD J, MARTIN G, REUBER L, JIANG C Z, KEDDIE J, ADAM L, PINEDA O, RATCLIFFE O J, SAMAHAR R, CREELMAN R, PILGRIM M, BROUN P, ZHANG J Z, GHANDEHARI D, SHERMAN B K, YU G L. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes [J]. *Science*, 2000, 290(5499):2105-2110.
- [13] D' HONT A, DENOEUDE F, AURY J M, BAURENS F C, CARREEL F, GARSMEURO, ..., WINCKER P. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants [J]. *Nature*, 2012, 488(7410):213-217.
- [14] KAPLAN-LEVY R N, BREWER P B, QUON T, SMYTH D R. The trihelix family of transcription factors - light, stress and development [J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(3):163-171.
- [15] GREEN P J, KAY S A, CHUA N H. Sequence-specific interactions of a pea nuclear factor with light-responsive elements upstream of the *rbcS-3A* gene [J]. *The EMBO Journal*, 1987, 6(9):2543-2549.
- [16] HIRATSUKA K, WU X, FUKUZAWA H, CHUA N H. Molecular dissection of GT-1 from *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 1994, 6 (12):1805-1813.
- [17] FANG Y J, XIE K B, HOU X, HU H H, XIONG L Z. Systematic analysis of GT factor family of rice reveals a novel subfamily involved in stress responses [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2010, 283(2):157-169.
- [18] YU C Y, CAI X F, YE Z B, LI H X. Genome-wide identification and expression profiling analysis of trihelix gene family in tomato [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 468(4):653-659.
- [19] SONG A P, WU D, FAN Q Q, TIAN C, CHEN S M, GUAN Z Y, XIN J J, ZHAO K K, CHEN F D. Transcriptome-wide identification and expression profiling analysis of chrysanthemum trihelix transcription factors [J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2016, 102(2):10-16.
- [20] LAMPUGNANI E R, KILINC A, SMYTH D R. PETAL LOSS is a boundary gene that inhibits growth between developing sepals in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 2012, 71 (5): 724-735.
- [21] LIN Z W, GRIFFITH M E, LI X R, ZHU Z F, TAN L B, FU Y C, ZHANG W X, WANG X K, XIE D X, SUN C Q. Origin of seed shattering in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Planta*, 2007, 226(1):11-20.
- [22] XIE Z M, ZOU H F, LEI G, WEI W, ZHOU Q Y, NIU C F, LIAO Y, TIAN A G, MA B, ZHANG W K, ZHANG J S, CHEN S Y. Soybean trihelix transcription factors GmGT-2A and GmGT-2B improve plant tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* [J]. *PloS One*, 2009, 4(9):e6898.
- [23] PARK H C, KIM M L, KANG Y H, JEON J M, YOO J H, KIM M C, PARK C Y, JEONG J C, MOON B C, LEE J H, YOON H W, LEE S H, CHUNG W S, LIM C O, LEE S Y, HONG J C, CHO M J. Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135 (4): 2150-2161.
- [24] WAN C Y, WILKINS T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Analytical Biochemistry*, 1994, 223(1):7-12.
- [25] SAINSBURY F, THUENEMANN E C, LOMONOSSOFF G P. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2009, 7(7):682-693.
- [26] CHEN L, ZHONG H Y, KUANG J F, LI J G, LU W J, CHEN J Y. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions [J]. *Planta*, 2011, 234(2):377-390.
- [27] 徐群刚, 邓健飞, 单伟, 陆旺金, 陈建业. 香蕉果实冷胁迫相关 MaWRKY11 转录因子的特性、互作蛋白筛选与鉴定 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2015, 23(5):543-552.
- XU Qungang, KUANG Jianfei, SHAN Wei, LU Wangjin, CHEN Jianye. Characterization and interacting-protein identification of MaWRKY11 transcription factor related to cold stress from banana fruits [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2015, 23(5):543-552.
- [28] 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.
- [29] QIN Y, MA X, YU G, WANG Q, WANG L, KONG L, KIM W, WANG H W. Evolutionary history of trihelix family and their functional diversification [J]. *DNA Research*, 2014, 21 (5): 499-510.
- [30] WANG X H, LI Q T, CHEN H W, ZHANG W K, MA B, CHEN S Y, ZHANG J S. Trihelix transcription factor GT-4 mediates salt tolerance via interaction with TEM2 in *Arabidopsis* [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1):339.
- [31] XI J, QIU Y J, DU L Q, POOVAIAH B W. Plant-specific trihelix transcription factor AtGT2L interacts with calcium/calmodulin and responds to cold and salt stresses [J]. *Plant Science*, 2012, 185(4):274-280.
- [32] LI B, JIANG S, YU X, CHENG C, CHEN S, CHENG Y, YUAN J S, JIANG D, HE P, SHAN L. Phosphorylation of trihelix transcriptional repressor ASR3 by MAP KINASE4 negatively regulates *Arabidopsis* immunity [J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(3):839-856.