

香蕉 *MaTIFY1* 转录因子特性及其在成熟过程中基因表达分析

罗冬兰, 巴良杰, 陈建业, 陆旺金, 单伟, 邝健飞*

(华南农业大学园艺学院, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 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: 从香蕉果实中分离获得 1 个 TIFY 亚族的转录因子基因, 命名为 *MaTIFY1*。该基因含有一个 681 bp 的 ORF, 编码一条长度为 227 aa, 分子量为 24.97 kD, 等电点为 7.85 的氨基酸多肽链。*MaTIFY1* 定位于细胞核, 并且具有转录激活活性。荧光定量 PCR 分析表明, *MaTIFY1* 随着香蕉果实成熟进程表达明显增强, 并且外源丙烯处理可诱导其表达。此外, *MaTIFY1* 启动子活性受乙烯利诱导激活, 进一步表明 *MaTIFY1* 可能参与香蕉果实成熟的调控。原核表达并纯化了 *MaTIFY1* 重组蛋白。

关键词: 香蕉; TIFY; 转录因子; 果实成熟; 基因表达

中图分类号: S 668.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 01-0043-10

Characterization and Expression Analysis of Banana *MaTIFY1* Transcription Factor During Fruit Ripening

LUO Donglan, BA Liangjie, CHEN Jianye, LU Wangjin, SHAN Wei, and KUANG Jianfei*

(State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Engineering Research Center of Southern Horticultural Products Preservation, Ministry of Education, Guangdong Provincial Key Laboratory of Postharvest Science of Fruits and Vegetables, College of Horticultural Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: TIFY transcription factors (TFs) play an essential role in plant growth and development as well as environmental adaptation. However, the involvement of TIFY TFs in fruit ripening remains largely unknown. In this work, a gene encoding TIFY subgroup member, which was designated as *MaTIFY1*, was isolated from banana fruit. *MaTIFY1* contains an Open Reading Frame (ORF) of 681 bp, encoding a peptide of 227 aa, with molecular weight of 24.97 kD and pI of 7.85. Subcellular localization and transactivation activity assays indicated that *MaTIFY1* was targeted to nucleus and owned transcriptional activation activity. qRT-PCR analysis revealed that expression of *MaTIFY1* was gradually increased along with the progression of fruit ripening, and was induced by propylene. Moreover, the promoter activity of *MaTIFY1* was also activated by ethylene treatment, further supporting the role of *MaTIFY1* in fruit ripening. In addition, the recombinant *MaTIFY1* protein was available, which provided the basis for further investigation of *MaTIFY1*'s functions.

收稿日期: 2016-08-17; 修回日期: 2016-12-21

基金项目: 广州市珠江科技新星专项 (201506010080); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-32-09)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jfkuang@scau.edu.cn)

Keywords: banana; TIFY; transcription factor; fruit ripening; gene expression

香蕉 (*Musa acuminata*) 产业已逐渐成为我国热带农业的支柱产业 (谢建华和庞杰, 1994; 胡位荣等, 2003; 贾彩红等, 2012)。但香蕉属于典型的呼吸跃变型果实, 在常温下贮藏 10 d 左右即出现乙烯释放高峰和呼吸高峰, 进而果实成熟衰老加快, 导致货架期很短, 给香蕉的采后保鲜和物流带来较大的困难 (Bapat et al., 2009; Shan et al., 2012; Xiao et al., 2013)。

目前报道的与果实成熟衰老相关的转录因子有 MADS-box、NAC 和 ERF (Ethylene response factor) 等 (Lin et al., 2009; Gapper et al., 2013; Seymour et al., 2013)。TIFY 是植物所特有的一类转录因子, 因其序列含有一个 TIF[F/Y]XG 结构域而得名 (Bai et al., 2011)。根据 TIFY 家族保守结构域特征可将 TIFY 家族分为 TIFY、PPD、JAZ 和 ZML 等 4 大类 (Zhang et al., 2012)。已有的报道表明, TIFY 转录因子参与植物生长发育和逆境胁迫响应等众多进程 (Ye et al., 2009; Zhu et al., 2013)。拟南芥 ZIM(AT4G24470)是最早被鉴定的 TIFY 家族成员, 与花序发育和开花有关 (Nishii et al., 2000)。White (2006) 报道了拟南芥 *AtTIFY4a* (PPD1) 和 *AtTIFY4b* (PPD2) 参与叶片的发育过程。JAZ 蛋白属于 TIFY 家族, 是茉莉酸信号途径的一个关键元件, 负责调控响应茉莉酸信号 (Chini et al., 2007)。此外, 过量表达大豆 *GsTIFY10* 可以提高植株对重碳酸盐的抗性 (Zhu et al., 2011)。但是有关 TIFY 转录因子与果实成熟关系的研究不多。

本研究中利用香蕉成熟衰老差异基因表达谱筛选获得了 1 个与成熟衰老相关的 TIFY 转录因子编码基因 (GSMUA_Achr3G10270_001), 命名为 *MaTIFY1*, 并分析了其亚细胞定位、转录激活和基因表达特性; 进一步采用双荧光素酶瞬时表达技术分析其启动子活性, 以期探讨 TIFY 转录因子调控香蕉果实成熟衰老的可能机制, 为进一步揭示香蕉果实成熟衰老的转录调控网络提供信息。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料与处理

‘卡文迪什’香蕉 (*Musa acuminata* AAA group ‘Cavendish’) 采购于广州市番禺区香蕉种植园。选取七八成饱满度的香蕉采收, 立刻运回实验室, 分成单个蕉指后, 挑选大小和饱满度基本一致且没有病虫害和机械伤的果实, 经 0.05% “施保功” (有效成分为 46% 咪鲜胺锰络合物) 浸泡 3 min 后晾干备用。

香蕉分成 3 组: 第 1 组放入 22 °C 恒温冷库自然成熟; 第 2 组为丙烯催熟 (丙烯可与内源乙烯区分) 处理 (Burg & Burg, 1967), 用 1 000 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丙烯在密封袋中对果实催熟 16 h, 之后敞开封袋, 置于 22 °C 冷库贮藏; 第 3 组为 1-MCP 抑制成熟处理, 用 0.5 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1-MCP 密闭处理 16 h 后取出放入 22 °C 冷库贮藏。分别定期取样, 每次取 3 个香蕉果实的果肉作为 1 个样品, 重复 3 次。样品立刻用液氮速冻后储存于 -80 °C 待用。

1.2 基因分离和序列分析

采用热硼酸法提取香蕉果肉的总 RNA (Wan & Wilkins, 1994)。

根据本课题组获得的香蕉果实成熟衰老差异基因表达谱, 从中挑选一个表达上调的 TIFY 转录因子基因, 命名为 *MaTIFY1*。以香蕉果实 cDNA 为模板, 设计引物进行 RT-PCR 扩增, 获得与预期片段长度 (681 bp) 一致的目的条带。经 PCR 产物回收、连接、转化 DH5 α 后, 将鉴定为阳性的克

隆送广州英潍捷基生物技术有限公司测序, 最终获得其全长序列。所用引物 (表 1) 全部由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

利用 ExPASy 在线工具 (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) 对 *MaTIFY1* 编码的蛋白质进行氨基酸基本特性分析。在 NCBI 的 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行 *MaTIFY1* 的同源性检索和相似性比对。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序列比对, 并结合 MEGA5.0 软件构建系统进化树。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物用途 Primer usage	引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	内切酶 Restriction enzyme
全长扩增 Full length amplification	MaTIFY1-full	F: ATGGGGAAGAGATGGGAGA R: CTATCTGAAACTCCCGGAGC	
实时荧光定量 PCR Real-time quantitative PCR	MaACT1-RT	F: GAGGCACCAAGTCCGTAGATAGC R: CCGCCAGATGAAGGTACAACAT	
	MaTIFY1-RT	F: GGCTCGCAGTTCTCAGTCA R: GCACCTTTCGCGCTAG	
转录活性分析 Transcriptional activity analysis	MaTIFY1-pBD	F: TCGCCGACCGGTAGGCCT ATGGGGAAGAGATGGGAGA R: AACCAGAGTTAAAGGCCTTCTGAAACTCCCGGAGC	<i>Stu</i> I
亚细胞定位 Subcellular localization	MaTIFY1-GFP	F: CAAATTCGCGACCGGT ATGGGGAAGAGATGGGAGA R: TGCTAGTCATACCGTTCTGAAACTCCCGGAGC	<i>Age</i> I
启动子 Promoter amplification	MaTIFY1-pro	F: ATTGAAAGAGATTATTCTGGTG R: CTTCTCCCATCTCTCCCCAT	
原核表达 Prokaryotic expression	GST-MaTIFY1	F: GGTTCGCGTGGATCC ATGGGGAAGAGATGGGAGA R: AGTCACGATCGCGCCGC CTATCTGAAACTCCCGGAGC	<i>Bam</i> H I <i>Not</i> I

1.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析

根据获得的 *MaTIFY1* 基因的全长序列设计荧光定量 PCR 引物 (表 1), 选取 *MaACT1* 为内参基因 (Chen et al., 2011)。提取各样品的总 RNA, 合成 cDNA 第一链。按 SYBR Premix ExTaq II 配制 PCR 体系, 采用荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 检测。运行程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 40 个循环。测定其 Ct 值, 用 $F = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各样品的 *MaTIFY1* 的相对表达量。

1.4 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 博士惠赠)。根据 *MaTIFY1* 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后经 *Nru* I 单切酶切出与目的基因两端相同的黏性末端, 用 T_4 DNA 连接酶连接到 pEAQ-GFP 载体得到 pEAQ-MaTIFY1-GFP 融合表达载体, 转入 DH5 α , PCR、酶切筛选阳性克隆并进行测序验证。

参考 Sainsbury 等 (2009) 的方法, CaCl₂ 法制备农杆菌 GV3101 感受态细胞, 把 1 μ L pEAQ-GFP 空载 (正对照) 与 pEAQ-MaTIFY1-GFP 等 2 种质粒各加入 30 μ L 农杆菌感受态菌液中, 电穿孔仪电转法进行转化; 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) YEB 液体培养基中, 于摇床中 28 °C 200 r · min⁻¹ 摇 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 nm, 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 0.5 ~ 0.6 nm, 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。

1.5 转录活性分析

在新西兰植物与食品研究所开发的含双荧光素酶的 pGreenII 0800-LUC 载体 (Hellens et al., 2005) 的基础上, 将连续 5 个 GAL4 序列和 TATA 序列插入到萤火虫荧光素酶 (Firefly luciferase, LUC) 前面作为报告基因载体, 而在同一个载体上的由 CaMV35S 驱动的海肾荧光素酶 (Renilla luciferase, REN) 作为内参报告基因 (reporter)。MaTIFY1 和 VP16 的 ORF 序列经 PCR 扩增分别重组到含有 GAL4BD 的 pEAQ 载体 (Sainsbury et al., 2009) 作为效应基因载体 (pBD-MaTIFY1 和 pBD-VP16), 以 pBD-VP16 和空载体 (pBD-Empty) 分别作为正、负对照。载体构建引物见表 1。

用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) 来反映 MaTIFY1 的转录活性 (Ba et al., 2016)。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, 每对组合重复 6 次。

1.6 启动子分离与活性检测

利用 DNeasy Plant Mini Kit 试剂盒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/>), 找到基因 MaTIFY1 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。

参考 Ba 等 (2014) 的启动子活性检测方法, 将克隆的 MaTIFY1 的启动子连接到 Hind III 和 BamH I 双酶切的 pGreenII 0800-LUC 载体上, 然后采用 PEG 介导法转化烟草 BY2 悬浮细胞系原生质体中 (徐群刚 等, 2015)。

采用双荧光素酶报告基因系统, 在烟草 BY2 悬浮细胞中对 MaTIFY1pro-pGreenII 0800-LUC 的启动子活性进行分析。瞬时表达 MaTIFY1pro-pGreenII 0800-LUC 后的 BY2 原生质体包括对照 (乙烯利, 0 mmol·L⁻¹) 和处理 (乙烯利, 0.8 mmol·L⁻¹) 经过 14 h 孵化, 通过测定 LUC 和 REN 的值来获得 MaTIFY1 启动子活性。每对组合重复 6 次。

1.7 原核表达与蛋白纯化

参照 Shan 等 (2014) 的方法, 限制性内切酶 Not I 和 BamH I 双酶切测序正确的 MaTIFY1 质粒, 回收目的片段, 将 MaTIFY1 构建到经过同样酶切并含有 GST 标签的 pGEX-4T-1 表达载体上, 并转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞。采用终浓度为 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导目的蛋白表达, 诱导条件为 25 °C 下 6 h。采用 Glutathione Sepharose 4B (GE) GST 亲和层析柱纯化表达的 GST-MaTIFY1 融合蛋白。纯化后的蛋白用 10% SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 MaTIFY1 克隆与序列比对

MaTIFY1 编码的氨基酸长度为 227 aa, 分子量为 24.97 kD, 等电点为 7.85。氨基酸序列比对表明, MaTIFY1 含有 1 个 TIF[F/Y]XG 保守结构域 (图 1)。利用 MEGA5.0 对 MaTIFY1 和拟南芥的 TIFY 家族构建系统进化树, 发现植物 TIFY 家族可以分为 TIFY、PPD、JAZ 和 ZML 亚族, 与前人的研究结果 (Zhang et al., 2012) 相似; MaTIFY1 与拟南芥的 AT1G74950.1、AT1G19180.1 和

AT1G72450.1 类似, 均含有 1 个 TIF[F/Y]XG 保守结构域, 因而同属于 TIFY 转录因子家族中的 TIFY 亚族成员 (图 2)。

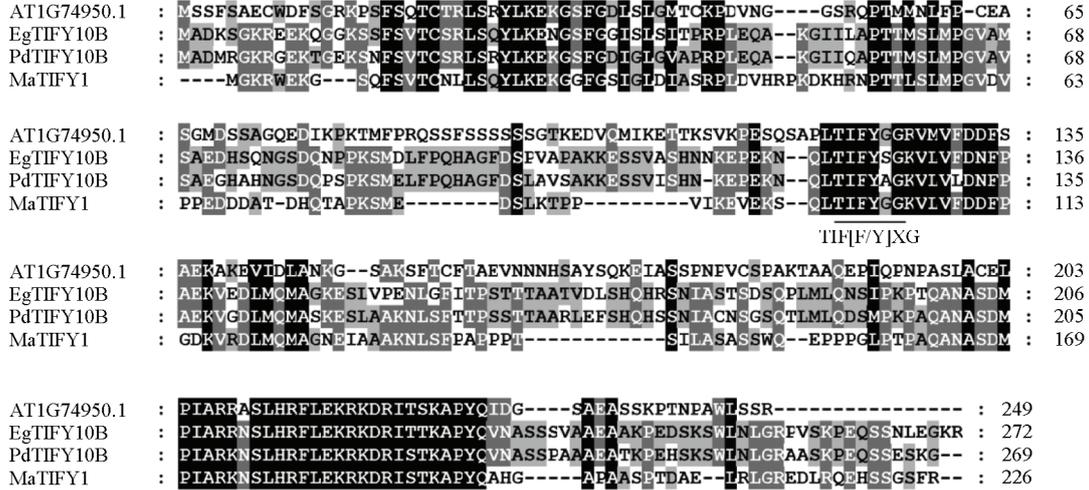


图 1 香蕉 MaTIFY1 与拟南芥 TIFY 蛋白氨基酸比对

Fig. 1 Alignment of the predicted TIFY proteins between banana and *Arabidopsis thaliana*

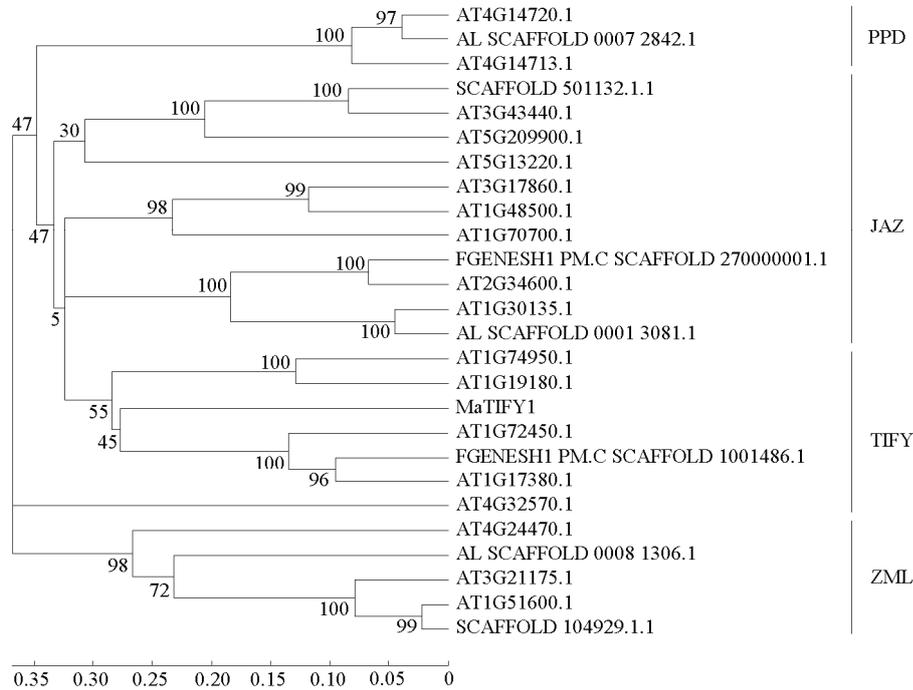


图 2 香蕉 MaTIFY1 与拟南芥 TIFY 蛋白家族的进化关系

数值表示分支长度。

Fig. 2 The phylogenetic tree of banana MaTIFY1 protein and *Arabidopsis thaliana* TIFY proteins

The values represent branch length.

2.2 MaTIFY1 的亚细胞定位

利用烟草叶背面瞬时表达体系，分析了 MaTIFY1 蛋白的亚细胞定位。如图 3 所示，与整个细胞都发光的阳性对照 pEAQ-GFP 相比，pEAQ-MaTIFY1-GFP 的融合蛋白只在烟草叶片表皮细胞的细胞核中观察到绿色荧光信号，表明 MaTIFY1 定位于细胞核，是核定位蛋白，这与转录因子是核定位的特征相一致。

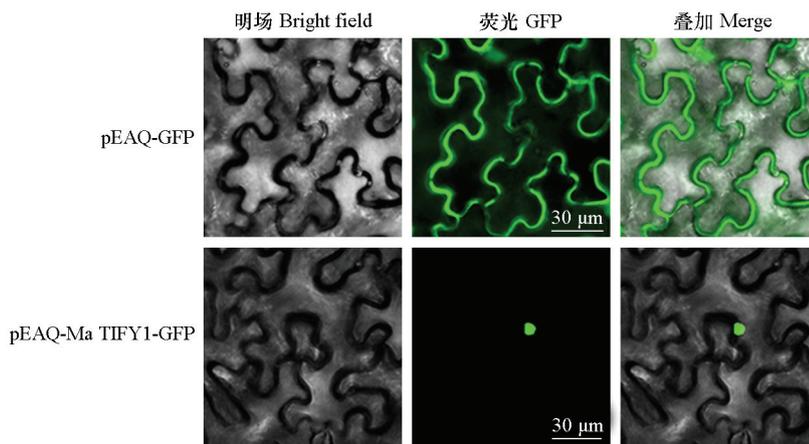


图 3 香蕉 MaTIFY1 蛋白在烟草叶片表皮细胞中的亚细胞定位
 Fig. 3 Subcellular localization of MaTIFY1 in tobacco leaf epidermal cells

2.3 MaTIFY1 具有转录激活活性

利用双荧光素酶报告基因分析系统（图 4），通过在烟草叶背面瞬时表达来研究 MaTIFY1 的转录活性。结果显示，与含 pBD-MaTIFY1 的 effector 载体共转后，LUC/REN 的值明显高于负对照（pBD-Empty），约为负对照的 5.11 倍（图 5），这说明 MaTIFY1 具有转录激活活性，是一个转录激活子。

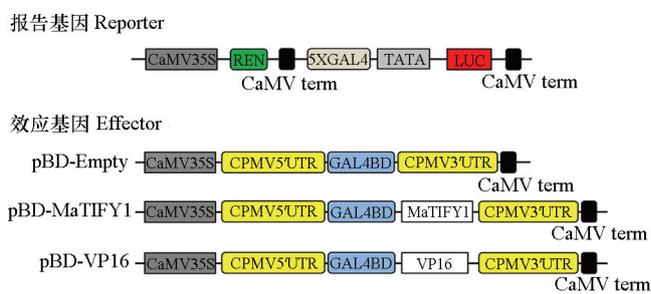


图 4 瞬时表达分析载体
 Fig. 4 Constructs used in the transient expression assays

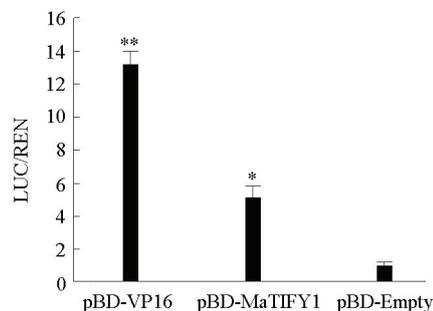


图 5 香蕉 MaTIFY1 转录活性分析
 Fig. 5 Transcriptional ability of MaTIFY1

2.4 香蕉果实成熟衰老过程中 *MaTIFY1* 的表达分析

Han 等 (2016) 研究发现: 在 22 °C 条件下, 自然成熟香蕉果实在 15 d 时开始产生乙烯, 此时成熟启动, 18 d 时出现乙烯高峰; 丙烯处理在 1 d 时开始释放乙烯, 3 d 时出现乙烯释放高峰; 1-MCP 处理在 30 d 时开始释放乙烯, 33 d 时出现乙烯高峰。

利用 qRT-PCR 技术分析了 *MaTIFY1* 在 3 种不同成熟进程 (包括自然成熟、丙烯催熟和 1-MCP 处理延缓成熟) 果实中的表达特征, 结果 (图 6) 显示, *MaTIFY1* 随着果实成熟进程而增强表达, 并且外源丙烯上调了其表达。在自然成熟 18 d、丙烯催熟 3 d 和 1-MCP 处理延缓成熟 33 d 时, *MaTIFY1* 的表达量分别为 0 d 时的 28 倍、11 倍和 14 倍, 表明 *MaTIFY1* 与香蕉果实成熟有一定关系。

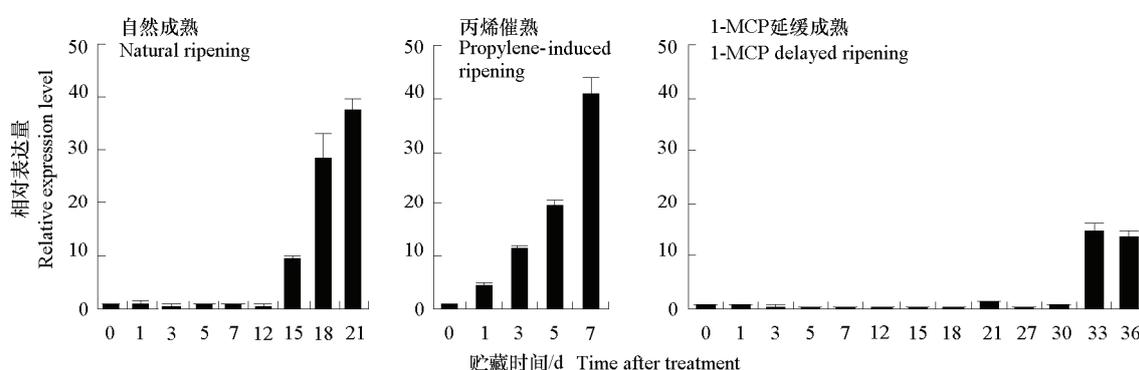


图 6 *MaTIFY1* 在 3 种不同成熟进程的香蕉果实中的表达
Fig. 6 Expression level of *MaTIFY1* in banana fruit with 3 different ripening behaviors

2.5 *MaTIFY1* 的启动子活性分析

为了进一步研究 *MaTIFY1* 调控香蕉果实成熟的转录机制, 分离了它的启动子。表 2 显示 *MaTIFY1* 的启动子含有丰富的顺式作用元件, 包括热胁迫应答的元件 (核心序列为 AAAAAATTTC)、响应脱落酸的 ABRE 元件 (核心序列为 ACGTG)、响应赤霉素的 P-box 元件 (核心序列为 CCTTTG)、响应茉莉酸的 CGTCA-motif (核心序列为 CGTCA)、MYB 的结合元件、WRKY 的结合元件 W-box 等。值得注意的是, *MaTIFY1* 启动子含有 1 个乙烯反应元件 ERE (核心序列为 ATTCACAA), 表明 *MaTIFY1* 启动子有可能响应乙烯信号。

表 2 香蕉 *MaTIFY1* 的启动子元件分析
Table 2 Main regulatory motifs found within the *MaTIFY1* promoter

元件名称 Element	序列 Core sequence	位置 Site	作用 Function
ERE	ATTCACAA	365(+)	乙烯响应 Ethylene response
W-box	TGAC	313(+)	WRKY 识别位点 WRKY binding site
ABRE	ACGTG	574(+); 715(+)	脱落酸响应 Abscisic acid response
CGTCA-motif	CGTCA	466(+)	茉莉酸响应 Jasmonic acid response
MYBRS	AACCA	795(+); 824(+); 897(+)	MYB 识别位点 MYB binding site
HSE	AAAAAATTTC	325(-)	热胁迫应答 Heat stress response
P-box	CCTTTG	833(-)	赤霉素响应 Gibberellin response

利用荧光素酶报告基因分析系统 (图 7), 通过在烟草 BY2 瞬时表达 *MaTIFY1pro*-pGreen II 0800-LUC 来研究 *MaTIFY1* 启动子活性。结果 (图 8) 表明, 乙烯利处理的 LUC/REN 是对照的 2.94 倍, 表明 *MaTIFY1* 的启动子可能受乙烯诱导。结合 *MaTIFY1* 在香蕉果实成熟过程中的表达, 进一步说明 *MaTIFY1* 受乙烯诱导, 并可能参与香蕉果实成熟进程。

2.6 MaTIFY1 的蛋白原核表达

构建重组质粒 *GST-MaTIFY1*, 在大肠杆菌中体外诱导 *MaTIFY1* 蛋白。考马斯亮蓝染色结果显示, 未经 IPTG 诱导的大肠杆菌的蛋白提取物中没有目的蛋白产生, 而经 IPTG 诱导的大肠杆菌的蛋白提取物中包含 1 条大约 50 kD (图 9) 的蛋白条带, 这是重组蛋白 *GST-MaTIFY1*, 与推测的 *MaTIFY1* 蛋白的大小一致 (由约 26 kD 的 GST 标签蛋白和约 24 kD 的 *MaTIFY1* 蛋白组成)。此后通过 GST 纯化试剂盒将 *GST-MaTIFY1* 蛋白纯化, 并检测纯化蛋白, 发现纯化蛋白与纯化之前的蛋白大小一致 (图 9)。以上结果表明, 通过原核表达可以在体外诱导 *MaTIFY1* 重组蛋白, 为后续试验如制备 *MaTIFY1* 抗体等奠定基础。

3 讨论

TIFY 是植物所特有的转录因子, 尽管已从多数植物中鉴定出 TIFY 转录因子, 对其研究多集中于拟南芥、葡萄、水稻和玉米等模式植物 (Vanholme et al., 2007; Bai et al., 2011; Zhang et al., 2012), 而有关果实成熟衰老相关 TIFY 转录因子的分离及其作用机制的报道较少。在本研究中, 从香蕉果实中克隆了一个 TIFY 转录因子, 命名为 *MaTIFY1*。序列分析表明, *MaTIFY1* 具有 TIFY 转录因子 TIFY 亚族的典型特点, 即含有 1 个 TIF[F/Y]XG 结构域。系统进化树也显示, *MaTIFY1* 与拟南芥 TIFY 亚族的 AT1G74950.1、AT1G19180.1 和 AT1G72450.1 等组成一个分支, 进一步证实 *MaTIFY1* 属于 TIFY 亚族成员。

TIFY 转录因子主要参与植物生长发育、各种代谢过程, 也参与生物或非生物胁迫的响应 (Bai et al., 2011; Hakata et al., 2012)。qRT-PCR 分析表明, *MaTIFY1* 受外源乙烯诱导, 并且在 3 种不同成熟进程的香蕉果实中, 均是随着乙烯释放和果实成熟进程, 其表达增强, 推测 *MaTIFY1* 可能参与调控香蕉果实成熟。此外, 启动子活性分析表明, *MaTIFY1* 启动子受乙烯诱导, 与它的 mRNA 表

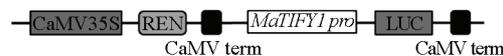


图 7 瞬时表达分析载体

Fig. 7 Constructs used in the transient expression assay

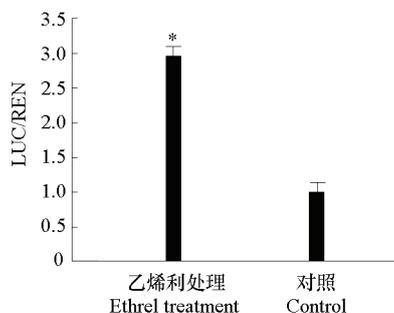


图 8 香蕉 *MaTIFY1* 启动子活性分析

Fig. 8 Promoter activity of *MaTIFY1* in response to ethrel

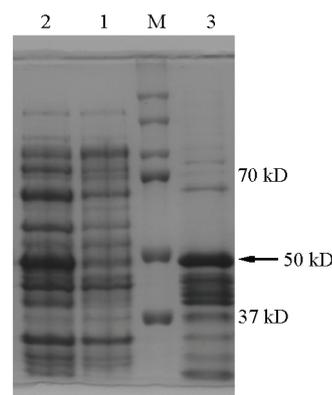


图 9 香蕉 *MaTIFY1* 原核表达和蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

M: 蛋白质 marker; 1: 未诱导; 2: 诱导 6 h; 3: 纯化后。
箭头所指为 *GST-MaTIFY1* 蛋白条带。

Fig. 9 SDS-PAGE analysis of prokaryotic expressed- and purified-*GST-MaTIFY1* protein

M: Protein marker; 1: Un-induced; 2: Induced for 6 h; 3: Purified.
The arrow indicated the *GST-MaTIFY1* protein band.

达水平一致,这可能与其启动子含有乙烯反应元件有关。这些结果说明,TIFY 转录因子不仅与植物生长发育有关,也与果实的成熟衰老有关,拓展了 TIFY 转录因子的生物学功能。

转录因子通常进入细胞核后才能发挥调控其他基因表达的作用。亚细胞定位分析表明, MaTIFY1 定位在细胞核内,与转录因子的核定位特征一致。TIFY 转录因子主要通过结合下游靶基因启动子序列来激活或者抑制靶基因的表达。与拟南芥 TIFY8 具有转录抑制活性(Perez et al., 2014)不同, MaTIFY1 具有转录激活活性,暗示 MaTIFY1 可能通过转录激活香蕉果实成熟相关基因的表达来参与调控果实成熟。由此可见,后续试验如挖掘和鉴定 MaTIFY1 调控果实成熟相关的靶基因将十分有意义。目前通过原核表达方法可以在体外诱导 MaTIFY1 重组蛋白表达,为后续试验如凝胶阻滞迁移实验(EMSA)以及制备抗体等鉴定 MaTIFY1 靶基因奠定了一定基础。另外,果实成熟衰老的调控是一个复杂的过程,涉及多层次、多种转录因子的协同作用(范中奇等, 2015)。最近研究发现,转录抑制子 MaDof23 与转录激活子 MaERF9 相互作用,并且拮抗调控 10 个成熟相关基因从而参与香蕉果实成熟控制(Feng et al., 2016)。因此, MaTIFY1 是否与香蕉果实成熟衰老相关的其他转录因子如 ERFs、MADS-box 和 NACs 等存在互作关系,并协同调控果实成熟衰老过程等,有待于后续进一步研究。

References

- Ba L J, Kuang J F, Chen J Y, Lu W J. 2016. MaJAZ1 attenuates the MaLBD5-mediated transcriptional activation of jasmonate biosynthesis gene *MaAOC2* in regulating cold tolerance of banana fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64: 738 - 745.
- Ba L J, Shan W, Xiao Y Y, Chen J Y, Lu W J, Kuang J F. 2014. A ripening-induced transcription factor MaBSD1 interacts with promoters of *MaEXPI2* from banana fruit. *Plant Cell Reports*, 33: 1913 - 1920.
- Bai Y H, Meng Y J, Huang D L, Qin Y H, Ming C. 2011. Origin and evolutionary analysis of the plant-specific TIFY transcription factor family. *Genomics*, 98: 128 - 136.
- Bapat V A, Trivedi P K, Ghosh A, Sane V A, Ganapathi T R, Nath P. 2009. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advance*, 28 (1): 94 - 107.
- Burg S P, Burg E A. 1967. Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiology*, 42: 144 - 152.
- Chen L, Zhong H Y, Kuang J F, Lu W J, Chen J Y. 2011. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta*, 234 (2): 377 - 390.
- Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico J M, Lorenzo O, Garcia-Casado G, Lopez-Vidriero I, Lozano F M, Ponce M R. 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448: 666 - 671.
- Fan Zhong-qi, Kuang Jian-fei, Lu Wang-jin, Chen Jian-ye. 2015. Advances in research of the mechanism of transcription factors involving in regulating fruit ripening and senescence. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (9): 1649 - 1663. (in Chinese)
- 范中奇, 邝健飞, 陆旺金, 陈建业. 2015. 转录因子调控果实成熟和衰老机制研究进展. *园艺学报*, 42 (9): 1649 - 1663.
- Feng B H, Han Y C, Xiao Y Y, Kuang J F, Fan Z Q, Chen J Y, Lu W J. 2016. The banana fruit DOF transcription factor MaDOF23 acts as a repressor and interacts with MaERF9 in regulating ripening-related genes. *Journal of Experimental Botany*, 67 (8): 2263 - 2275.
- Gapper N E, McQuinn R P, Giovannoni J J. 2013. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Molecular Biology*, 82 (6): 575 - 591.
- Hakata M, Kuroda M, Ohsumi A, Hirose T, Nakamura H, Muramatsu M, Lchikawa H, Yamakawa H. 2012. Overexpression of a rice *TIFY* gene increases grain size through enhanced accumulation of carbohydrates in the stem. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76 (11): 2129 - 2134.
- Han Y C, Kuang J F, Chen J Y, Liu X C, Xiao Y Y, Fu C C, Wang J Y, Wu K Q, Lu W J. 2016. Banana transcription factor MaERF11 recruits histone deacetylase MaHDA1 and represses the expression of *MaACO1* and *Expansins* during fruit ripening. *Plant Physiology*, 171: 1070 - 1084.
- Hellens R, Allan A, Friel E, Bolitho K, Grafton K, Templeton M, Karunairetnam S, Gleave A, Laing W. 2005. Transient expression vectors for

- functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods*, 18 (1): 13.
- Hu Wei-rong, Zhu Xi-ru, Wang Zheng-xun, Zhang Zhao-qi, Ji Zuo-liang. 2003. Banana fruit postharvest physiological research progress and storage. *Journal of Guangzhou University (Natural Science Edition)*, 2 (3): 228 - 234. (in Chinese)
- 胡位荣, 朱西儒, 王正询, 张昭其, 季作梁. 2003. 香蕉果实采后及贮藏生理研究进展. *广州大学学报 (自然科学版)*, 2 (3): 228 - 234.
- Jia Cai-hong, Jin Zhi-qiang, Liu Ju-hua, Zhang Jian-bin, Xu Bi-yu. 2012. Research progress of postharvest physiology of banana fruits. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 33 (1): 189 - 193. (in Chinese)
- 贾彩红, 金志强, 刘菊华, 张建斌, 徐碧玉. 2012. 香蕉采后生理学研究进展. *热带作物学报*, 33 (1): 189 - 193.
- Lin Z, Zhong S, Grierson D. 2009. Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany*, 60 (12): 3311 - 3336.
- Nishii A, Takemura M, Fujita H, Shikata M, Yokota A, Kohchi T. 2000. Characterization of a novel gene encoding a putative single zinc-finger protein, ZIM, expressed during the reproductive phase in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64: 1402 - 1409.
- Perez A C, Durand A N, Vanden Bossche R, De Clercq R, Persiau G, Van Wees S C M, Pieterse C M J, Gevaert K, De Jaeger G, Goossens A. 2014. The non-JAZ TIFY protein TIFY8 from *Arabidopsis thaliana* is a transcriptional repressor. *PLoS ONE*, 9 (1): e84891.
- Sainsbury F, Thuenemann E C, Lomonosoff G P. 2009. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 7 (7): 682 - 693.
- Seymour G B, Østergaard L, Chapman N H. 2013. Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology*, 64: 219 - 241.
- Shan W, Kuang J F, Chen L, Chen J Y, Lu W J. 2012. Molecular characterization of banana NAC transcription factors and their interactions with ethylene signalling component EIL during fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 63 (14): 5171 - 5187.
- Shan W, Kuang J F, Lu W J, Chen J Y. 2014. Banana fruit NAC transcription factor MaNAC1 is a direct target of MaICE1 and involved in cold stress through interacting with MaCBF1. *Plant Cell and Environment*, 37 (9): 2116 - 2127.
- Vanholme B, Grunewald W, Bateman A, Kohchi T, Gheysen G. 2007. The TIFY family previously known as ZIM. *Trends in Plant Science*, 12 (6): 239 - 244.
- Wan C Y, Wilkins T A. 1994. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Analytical Biochemistry*, 223 (1): 7 - 12.
- White D W. 2006. PEAPOD regulates lamina size and curvature in *Arabidopsis*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 13238 - 13243.
- Xiao Y Y, Chen J Y, Kuang J F, Shan W, Xie H, Jiang Y M, Lu W J. 2013. Banana ethylene response factors are involved in fruit ripening through their interactions with ethylene biosynthesis genes. *Journal of Experimental Botany*, 64 (8): 2499 - 2510.
- Xie Jian-hua, Pang Jie. 2010. Research progress of postharvest physiology and preservation technique of banana. *Storage and Process*, 10 (6): 37 - 42. (in Chinese)
- 谢建华, 庞杰. 2010. 香蕉采后生理与保鲜技术研究进展. *保鲜与加工*, 10 (6): 37 - 42.
- Xu Qun-gang, Kuang Jian-fei, Shan Wei, Lu Wang-jin, Chen Jian-ye. 2015. Characterization and interacting-protein identification of MaWRKY11 transcription factor related to cold stress from banana fruits. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 23 (5): 543 - 552. (in Chinese)
- 徐群刚, 邝健飞, 单伟, 陆旺金, 陈建业. 2015. 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. *热带亚热带植物学报*, 23 (5): 543 - 552.
- Ye H Y, Du H, Tang N, Li X H, Xiong L Z. 2009. Identification and expression profiling analysis of TIFY family genes involved in stress and phytohormone responses in rice. *Plant Molecular Biology*, 71 (3): 291 - 305.
- Zhang Y C, Gao M D, Singer S, Fei Z J, Wang H, Wang X P. 2012. Genome-wide identification and analysis of the TIFY gene family in grape. *PLoS ONE*, 9 (7): e44465.
- Zhu D, Bai X, Luo X, Chen Q, Cai H, Ji W, Zhai H, Lv D, Luo X, Zhu Y. 2011. GsTIFY10, a novel positive regulator of plant tolerance to bicarbonate stress and a repressor of jasmonate signaling. *Plant Molecular Biology*, 77: 285 - 297.
- Zhu D, Bai X, Luo X, Chen Q, Cai H, Ji W, Zhu Y M. 2013. Identification of wild soybean (*Glycine soja*) TIFY family genes and their expression profiling analysis under bicarbonate stress. *Plant Cell Reports*, 32 (2): 263 - 272.