DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202401008

香蕉 *HOS15* 基因的鉴定及枯萎病菌 胁迫下的表达分析



王子澍^{1,2}, 王明元^{1,2}, 陈科霖^{1,2}, 贾幸宸^{1,2}, 卫瑾怡^{1,2}, 荣航^{1,2}, 唐易^{1,2}

(1. 华侨大学 园艺科学与工程研究所,福建 厦门 361021;2. 华侨大学 化工学院,福建 厦门 361021)

摘要: 为了研究 HOS15 (HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 15)是否参与香蕉抗性调控过程,利用拟南芥 HOS15 蛋白序列,采用多种生物信息学分析工具,对香蕉 HOS15 (MaHOS15)基因进行鉴定;以高抗品种'南天黄'和易感品种'威廉斯'为试验对象,研究 MaHOS15 在枯萎病菌胁迫下的表达分析及其调控植物病害的潜在机制。结果表明:MaHOS15 蛋白中 LisH 结构域和 WD40 重复蛋白序列高度保守;MaHOS15 蛋白二级结构具有 α 螺旋、 β 折叠、延伸链和无规卷曲结构,且以无规卷曲为主,占比为 46.2%;亚细胞定位发现 MaHOS15 在细胞核内,推测 MaHOS15 可能在细胞核内参与香蕉枯萎病的调控;MaHOS15 可能响应 SA 信号通路、MeJA 信号通路和脱落酸反应;推测 MaHOS15 是在植物抗病过程中负调控植物对病原体防御的关键基因。

关键词: 香蕉; *HOS15*(*MaHOS15*)基因; 拟南芥 HOS15; 枯萎病菌; 生物信息学; 基因表达中图分类号: S 668.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-5013(2024)03-0351-06

Identification of Banana *HOS15* Gene and Expression Analysis Under Stress of Fusarium Wilt

WANG Zishu^{1,2}, WANG Mingyuan^{1,2}, CHEN Kelin^{1,2}, JIA Xingchen^{1,2}, WEI Jinyi^{1,2}, RONG Hang^{1,2}, TANG Yi^{1,2}

Institute of Horticulture Science and Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;
College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to study whether HOS15 (HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 15) is involved in the regulation of banana resistance process, the Arabidopsis HOS15 protein sequence is used to identify banana HOS15 (MaHOS15) gene using various bioinformatics analysis tools, and using the highly resistant variety 'Nantianhuang' and the susceptible variety 'Williams' as experimental objects, the expression analysis of MaHOS15 under the stress of fusarium wilt and its potential mechanism of regulating plant diseases are studied. The results show that the LisH domain and WD40 repeat protein sequence in MaHOS15 protein are highly conserved. The secondary structure of MaHOS15 protein has α -helix, β -fold, extended chain and random coil structure, and the random coil is the main structure accounting for 46.2%. Subcellular localization is in the nucleus, which can be supposed that MaHOS15 may be involved in the regulation

收稿日期: 2024-01-19

通信作者: 王明元(1980-),男,副教授,博士,主要从事园艺植物分子生理的研究。E-mail:w_mingyuan@163.com。

基金项目: 福建省高校产学研联合创新项目(2023N5011)

of banana fusarium wilt in the nucleus. *MaHOS15* may respond to SA signaling pathway, MeJA signaling pathway and abscisic acid reaction. It is speculated that *MaHOS15* is a key gene in the negative regulation of plant defense against pathogens in the process of plant disease resistance.

Keywords: banana; HOS15 (MaHOS15) gene; Arabidopsis HOS15; fusarium wilt; bioinformatics; gene expression

香蕉广泛种植于热带和亚热带地区,是非洲、亚洲和美洲 5 亿多人的重要营养来源和主要食物之一^[1-2]。然而,全世界 64%的香蕉感染了由香蕉枯萎病菌热带 4 号生理小种(Fusarium oxysporum f. sp. cubense tropical race 4, Foc TR4)引起的香蕉枯萎病,极大限制了香蕉的生产^[3-4]。因此,为了提高枯萎病抗性,识别参与调控枯萎病防御反应的关键基因并确定其潜在机制至关重要。

HOS15(HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 15)是一种转录辅抑制因子。这些转录辅抑制因子与其他转录因子、适配器和辅助蛋白形成多蛋白复合物,可在表观遗传学上抑制靶基因,在植物信号转导和抗性调节中起着重要作用[5-7]。Shen 等[8]发现 HOS15 可以与 SKP1和 Cullin1蛋白连接,并作为 SCF(SKP1-Cullin1-F-box)E3 复合物底物受体,靶向磷酸化 NPR1,从而参与 SA 信号调节,协同抑制防御诱导细胞中转录激活的基因,从而分别防止 NPR1 介导的防御提前激活和过度激活。桃[9]、小麦[10]等植物的相关研究表明,HOS15可以参与 SA 信号调控植物抗病。Lin等[11]已证实 SA 信号通路中 MaTGA8 可能通过与 MaNPR11 或 MaNPR4 互作来增强香蕉对 Foc TR4的抗性。因此,HOS15作为一种多功能蛋白,可能通过介导 SA 信号通路,在抗香蕉枯萎病中起着至关重要的作用,而 HOS15 是否参与香蕉抗性调控过程依然未知。基于此,本文在香蕉基因组数据中BLAST 筛选出香蕉 HOS15(MaHOS15)蛋白序列,以'南天黄'叶片为材料,克隆得到 MaHOS15 基因,并进行生物信息学分析,继而以高抗品种'南天黄'($Musa\ acuminate\ L.\ AAA\ Cavendish,'Nantianhuang')和易感品种'威廉斯'(<math>Musa\ acuminate\ L.\ AAA\ group\ cv.\ Cavendish,'Williams')为试验对象,进一步研究其在枯萎病菌胁迫下的表达分析。$

1 材料与方法

1.1 MaHOS15 的基因克隆和香蕉'威廉斯'和'南天黄'MaHOS15 的表达分析

使用高抗品种'南天黄'和易感品种'威廉斯'的 4 片叶龄的组培苗(广东省高州市石生原生物科技有限公司)。选取长势一致、4 片叶龄的香蕉幼苗,采用蘸根接菌法将'南天黄'和'威廉斯'的香蕉根系浸泡在配制好的 Foc TR4 孢子悬浮液(1×10^6 cfu·mL $^{-1}$)中 2 h,移植到基质(草碳土和蛭石以体积比2:1 混合)中进行盆栽(上口径为 15 cm,下口径为 12 cm)。为研究 Foc TR4 接种后香蕉幼苗根系的变化,在接种后的第 0,2,4,6 天各选取 3 株幼苗,剪取根系,混合后迅速置于液氮中保存。

使用 DP441 型多糖多酚植物核糖核酸(RNA)提取试剂盒(北京市天根生化科技(北京)有限公司)提取'南天黄'叶片总 RNA,将获得的 2 μ g RNA 使用 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)合成互补脱氧核糖核酸(cDNA)。采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,根据 MaHOS15 cDNA 序列进行引物设计。

试验的相关引物,如表1所示。

表 1 试验的相关引物

Tab. 1 Related primers of experiment

引物名称	引物序列	目的
HOS15 EcoRI F	CGGAATTCCGATGACGCATTCGACGATCACC	逆转录-聚合酶链 反应(RT-PCR)
HOS15 Hind∭ R	CCCAAGCTTGGGTTACATCCTGAAGTCCATAACACAAATGCTG	
HOS15 qRT F	TTAGCCCAAACGGCGAGTA	逆转录-实时定量 聚合酶链反应 (RT-qPCR)
HOS15 qRT R	AAATGCCACCACGACCCT	
MaActin F	CGAGGCTCAATCAAAGA	
MaActin R	ACCAGCAAGGTCCAAAC	

RT-PCR 扩增程序在以下条件下进行:94°C 5 min,94°C 30 s,50°C 45 s,72°C 102 s,30 个循环。

采用胶回收试剂盒(江苏省南京市诺唯赞生物科技有限公司),获得纯化产物;采用 pMD-18-T Vector Cloning Kit 试剂盒(日本 TaKaRa 公司),将 MaHOS15 纯化产物与 pMD-18-T 载体连接,并转化大肠杆菌感受态,取阳性菌落送北京擎科生物科技股份有限公司测序。然后,以香蕉 actin 作为内参基因(表1),分析接种 Foc TR4 的'威廉斯'和'南天黄'幼苗 MaHOS15 基因的差异表达,RT-qPCR 扩增程序在以下条件下进行:95 °C 5 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,40 个循环,每个反应重复 3 次。

1.2 MaHOS15 生物信息学分析

以模式植物拟南芥在美国国家生物信息中心(NCBI)上的 HOS15 蛋白序列为查询序列,在香蕉基因组数据库(https://banana-genome-hub.southgreen.fr/)中,通过 Blastp 算法筛选出 MaHOS15 蛋白序列。以'南天黄'叶片为材料,克隆得到 MaHOS15 基因,并进行生物信息学分析。通过 GSDS 网站(http://gsds.cbi.pku.edu.cn/)分析成员基因内含子/外显子的数量分布;通过 PlantCare 数据库(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)预测 MaHOS15 蛋白的顺式作用元件;通过 ExPASy 网站(https://web.expasy.org/protparam/)分析成员基因所编码蛋白质的基本特性;通过 SMART 网站(http://smart.embl-heidelberg.de/)进行蛋白质结构预测;通过 PRABI 网站中的 SOPM(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)分析蛋白质的二级结构;通过 SWISS-MODEL 网站(https://swissmodel.expasy.org/)进行蛋白三维结构同源建模分析;通过 MBC 网站(https://cello.life.nctu.edu.tw/)进行亚细胞定位预测。

1.3 MaHOS15 蛋白系统发育树及多序列分析

以香蕉 HOS15 蛋白序列为参照序列,在 NCBI 上搜索并获得其他植物的 HOS15 蛋白序列,采用 GENEDOC 软件进行多重序列比对,并采用 MEGA 7 软件构建系统发育树。

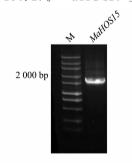
1.4 数据处理

采用 Excel 2010 软件和 SPSS 24.0 软件进行数据分析。对于同一处理随时间变化的差异性,采用最小显著性差异(LSD)法进行多重比较分析,同时,采用 Excel 2010 软件进行图表绘制。

2 实验结果与分析

2.1 MaHOSI5 基因克隆与理化性质分析

以 AtHOS15 序列为参照序列,在香蕉 cDNA 中分离得到 MaHOS15 的全长序列(GenBank 登录号为 XM_009409136.2)。MaHOS15 基因克隆与基因序列,如图 1 所示。图 1 中:M 为分子质量标记。



TIONICOCO LOTI ANALMACICCA MOCICATI TICTO GACCIONA GARDITICO STOCI TICCO TICCO

(a) 基因克隆

(b) 基因序列

图 1 MaHOS15 基因克隆与基因序列

Fig. 1 MaHOS15 gene cloning and gene sequence

测序结果表明,MaHOS15 基因开放阅读框(ORF)为 1 701 bp,共编码 567 个氨基酸。通过理化性质分析可知,MaHOS15 的基因 ID 为 $Ma06_g38390.1$,所在染色体为 chr. 06,氨基酸残基数为 567,等电点为 5.46,分子质量为 63.79 ku,亚细胞定位为细胞核。

2.2 MaHOS15 蛋白结构分析

通过 SMART 在线软件分析 MaHOS15 氨基酸序列,发现其 N 端包含一个 LisH 基序,C 端包含一个 WD40 结构域,有 8 个 WD40 重复序列(图 2(a))。将 MaHOS15 氨基酸序列通过 SOPMA 网站和 SWISS-MODEL 网站进行分析,结果显示,MaHOS15 的二级结构主要由 α 螺旋、延伸链、 β 折叠、无规

卷曲组成,且以无规卷曲为主,占比为 46.2%(图 2(b))。MaHOS15 蛋白三维结构,如图 2(c)所示。

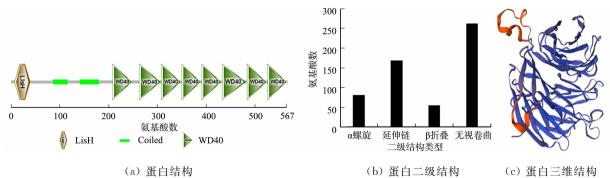


图 2 MaHOS15 蛋白结构和蛋白二级结构与蛋白三维结构

Fig. 2 Protein structure, protein secondary structure and protein 3D structure of MaHOS15

2.3 MaHOS15 多序列比对

MaHOS15 的结构与其他物种的 HOS15 相似。其中,MaHOS15 的氨基酸序列与拟南芥 HOS15 的同源性为 64.66%,在 N 端都具有典型的 LisH 结构域,C 端都具有 WD40 重复蛋白。HOS15 多序列分析,如图 3 所示。

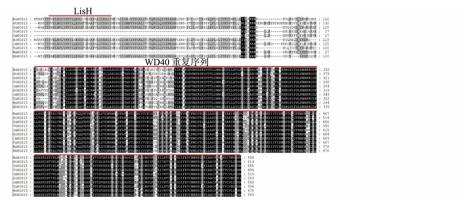


图 3 HOS15 多序列分析

Fig. 3 Multilocus sequence analysis of HOS15

2.4 MaHOS15 蛋白的系统发育学分析

将拟南芥 AtHOS15 (NM_126132.4)、姜黄 ZoHOS15 (XM_042588498.1)、光稃稻 OgHOS15 (XM_052305560.1)、玉米 ZmHOS15 (XM_020545660.2)、凤梨 AcHOS15 (m_020240239.1)、石榴 PgHOS15 (XM_031540885.1)、小麦 TaHOS15 (XM_04446769_0.1)、柑橘 CcHOS15 (XM_006425942.2)、橡胶树 HbHOS15 (XM_021795802.1)和香蕉 MaHOS15 蛋白序列构建进化树。

HOS15蛋白系统发育树分析,如图 4 所示。图 4中:数值为自展值。由图 4可知:MaHOS15与同为单子叶植物的姜黄 ZoHOS15 关系更为密切。

2.5 MaHOS15 顺式作用元件分析

对顺式元件的预测发现,确定的相关顺式元件生长和发育为 TCCC 基序、GATA 基序。 MBS 是参与干旱胁迫的顺式元件。启动子区存在激素相关顺式元件,如 CGTCA 基序和 ABRE,表明 *MaHOS15* 可能响应 SA 信号通路、MeJA 信号通路和脱落酸反应。

2.6 MaHOS15 的差异表达分析

为了研究 MaHOS15 是否参与尖孢镰刀菌的胁

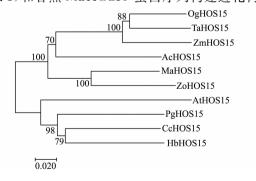


图 4 HOS15 蛋白系统发育树分析 Fig. 4 Analysis of phylogenetic trees of HOS15 proteins

迫,在 Foc TR4 侵染高抗品种'南天黄'和易感品种'威廉斯'的第 0,2,4,6 天,采集香蕉根系,并分析 MaHOS15 的差异表达。接种 Foc TR4 后'南天黄'和'威廉斯'根系 MaHOS15 的相对表达量,如图 5

所示。图 5 中:a~d表示差异具有统计学意义。

由图 5 可知:在接种 Foc TR4 后第 2 天, MaHOS15在'威廉斯'中表达显著上调,而在'南天黄' 中表达显著下调,这表明 MaHOS15 可能在香蕉抵抗 Foc TR4 中发挥作用。

3 讨论

Wang 等[12] 发现小麦经 SA 处理后的 TaNPRs 上调,加强了对小麦锈病的抗性。近期,学者们发现了一种新的多功能蛋白 HOS15,HOS15 是编码 WD40 重复蛋白的 85 个 WD蛋白之一,而 WD40 重复蛋白在调控植物生长发育、ABA 信号和干旱胁迫响应等多种生物途径中发挥关键作用[13-14]。研究表明,HOS15 也广泛参与植物生长调控[6],以及对非生物胁迫和生物胁迫的

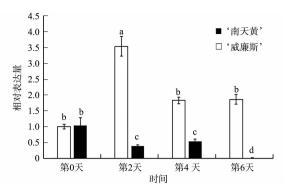


图 5 接种 Foc TR4 后'南天黄'和 '威廉斯'根系 Ma HOS15 的 相对表达量

Fig. 5 Relative expression level of MaHOS15 in roots of 'Nantianhuang' and 'Williams' after inoculation with Foc TR4

反应。Ahn 等^[15]发现 HOS15 通过多种途径调节拟南芥开花时间; Suzuki 等^[16]发现 HOS15 与 HDA9 和 POWERDRESS (PWR)—起调节叶细胞的扩增和增殖; Park 等^[17]发现 HOS15 作为正向调控因子,与 PWR 相互作用,促进与 COR 基因染色质结合和 HD2C 降解,进而促进植物的耐冷性^[18-19]; Li 等^[9]发现在桃子果实中两个核定位蛋白 PpWRKY22 与 PpHOS1 在体内发生物理相互作用,负调控对 R. stolonifer的抗性; Liu 等^[10]发现 TaHOS15 与拟南芥组蛋白去乙酰化酶 AtHDA6 的小麦同源体 TaHDA6 相互作用,形成转录抑制因子复合体,调控小麦防御相关基因。

利用拟南芥 HOS15 蛋白序列,首次对香蕉 HOS15 基因进行鉴定,分析其调控植物病害的潜在机制。由蛋白结构预测和多序列对比可知,MaHOS15 蛋白中 LisH 结构域和 WD40 重复蛋白序列高度保守。在拟南芥中,该结构可与 SKP1-like 蛋白(ASK)和 Cullin1 蛋白结合形成 SCF 复合体(ASK-Cullin1-HOS15),通过降解磷酸化 AtNPR1 负调控拟南芥对 Pst DC3000 的抗性 [8] 。MaHOS15 蛋白的二级结构预测表明,其具有 α 螺旋、 β 折叠、延伸链和无规卷曲结构,且以无规卷曲为主,占比 46.2%。亚细胞定位发现 MaHOS15 在细胞核内,推测 MaHOS15 可能在细胞核内参与香蕉枯萎病的调控。

由香蕉 HOS15 在高抗品种'南天黄'和易感品种'威廉斯'上的生物胁迫差异表达分析可知,接种 Foc TR4 后,MaHOS15 在抗、感病香蕉品种的表达程度不同,结果表明,'南天黄'中 MaHOS15 的表达量显著低于'威廉斯'。这一现象与桃子[^{9]}与小麦[^{20]}的研究结果一致,推测 MaHOS15 是在植物抗病过程中负调控植物对病原体防御的关键基因。课题组将进一步深入探究 MaHOS15 在抗香蕉枯萎病过程中的调控机制,为香蕉抗病研究提供理论依据。

参考文献:

- [1] PERRIER X, DE LANGHE E, DONOHUE M, et al. Multidisciplinary perspectives on banana (Musa spp.) domestication [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(28):11311-11318, DOI: 10.1073/pnas. 1102001108.
- [2] WANG Zhuo, MIAO Hongxia, LIU Juhua, et al. Musa balbisiana genome reveals subgenome evolution and functional divergence [J]. Nature Plants, 2019, 5(8):810-821. DOI:10. 1038/s41477-019-0452-6.
- [3] LIN Yinghong, CHANG Jingyi, LIU Entzu, et al. Development of a molecular marker for specific detection of Fusarium oxysporum f. sp. cubense race 4[J]. European Journal of Plant Pathology, 2009, 123(3): 353-365. DOI: 10. 1007/s10658-008-9372-4.
- [4] PLOETZ R C. Fusarium wilt of banana[J]. Phytopathology, 2015, 105(12): 1512-1521. DOI: 10. 1094/PHYTO-04-15-0101-RVW.
- [5] PARK J, LIM C J, KHAN I U, et al. Identification and molecular characterization of HOS15-interacting proteins in Arabidopsis thaliana [J]. Journal of Plant Biology, 2018, 61(5):336-345. DOI:10.1007/s12374-018-0313-2.
- [6] HUANG Lijun, WANG Yukun, LIN Zeng, et al. The role of corepressor HOS15-mediated epigenetic regulation of

- flowering[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 13(8):1101912. DOI:10.3389/fpls. 2022. 1101912.
- [7] ZHU Jianhua, JEONG J C, ZHU Yanmei, et al. Involvement of Arabidopsis HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105 (12): 4945-4950. DOI: 10.1073/pnas. 0801029105.
- [8] SHEN Mingzhe, LIM C J, PARK J, et al. HOS15 is a transcriptional corepressor of NPR1-mediated gene activation of plant immunity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117 (48):30805-30815. DOI:10.1073/pnas.2016049117.
- [9] LI Chunhong, WANG Jing, JI Nana, et al. PpHOS1, a RING E3 ubiquitin ligase, interacts with PpWRKY22 in the BABA-induced priming defense of peach fruit against Rhizopus stoloni fer [J]. Postharvest Biology and Technology, 2020, 159(9):111029. DOI: 10.1016/j. postharvbio. 2019. 111029.
- [10] LIU Jiao, ZHI Pengfei, WANG Xiaoyu, et al. Wheat WD40-repeat protein TaHOS15 functions in a histone deacety-lase complex to fine-tune defense responses to Blumeria graminis f. sp. tritici[J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(1):255-268. DOI:10.1093/jxb/ery330.
- [11] LIN Ping, DONG Tao, CHEN Wenliang, et al. Expression analysis of MaTGA8 transcription factor in banana and its defence functional analysis by overexpression in arabidopsis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(17):14. DOI:10.3390/ijms22179344.
- [12] WANG Xiaojing, ZHANG Hongtao, NYAMESORTO B, et al. A new mode of NPR1 action via an NB-ARC-NPR1 fusion protein negatively regulates the defence response in wheat to stem rust pathogen[J]. New Phytologist, 2020, 228(3):959-972. DOI:10.1111/nph.16748.
- [13] ALI A, YUN D J. Arabidopsis HOS15 is a multifunctional protein that negatively regulate ABA-signaling and drought stress[J]. Plant Biotechnology Reports, 2020, 14(2):163-167. DOI:10.1007/s11816-020-00600-1.
- [14] LEE J H, TERZAGHI W, GUSMAROLI G, et al. Characterization of Arabidopsis and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases[J]. Plant Cell, 2008, 20(1): 152-167. DOI: 10. 1105/tpc. 107. 055418.
- [15] AHN G, PARK H J, JEONG S Y, et al. HOS15 represses flowering by promoting GIGANTEA degradation in response to low in [J]. Plant Communications, 2023, 4(4):100570. DOI: 10.1016/j. xplc. 2023. 100570.
- [16] SUZUKI M, SHINOZUKA N, HIRAKATA T, et al. OLIGOCELLULA1/HIGH EXPRESSION OF OSMOTI-CALLY RESPONSIVE GENES15 promotes cell proliferation with HISTONE DEACETYLASE9 and POWER-DRESS during leaf development in Arabidopsis thaliana [J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9(18):580. DOI:10. 3389/fpls. 2018. 00580.
- [17] PARK J, LIM C J, SHEN M Z, et al. Epigenetic switch from repressive to permissive chromatin in response to cold stress[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(23); E5400-E5409. DOI: 10.1073/pnas.1721241115.
- [18] YANG Leiyun, CHEN Xiangsong, WANG Zhixue, et al. HOS15 and HDA9 negatively regulate immunity through histone deacetylation of intracellular immune receptor NLR genes in Arabidopsis[J]. New Phytologist, 2020, 226 (2):507-522, DOI; 10.1111/nph. 16380.
- [19] LIM C J, ALI A, PARK J, et al. HOS15-PWR chromatin remodeling complex positively regulates cold stress in Arabidopsis [J]. Plant Signaling and Behavior, 2021, 16(5):1893978. DOI:10.1080/15592324. 2021. 1893978.
- [20] ZHI Pengfei, KONG Lingyao, LIU Jiao, et al. Histone deacetylase TaHDT701 functions in TaHDA6-TaHOS15 complex to regulate wheat defense responses to Blumeria graminis f. sp. tritici [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(7): 2640. DOI: 10.3390/ijms21072640.

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)