

# 香蕉 A、B 基因组胆碱单加氧酶基因克隆及渗透胁迫下表达特性分析

朱博为<sup>1</sup>, 于佳玄<sup>1</sup>, 李新国<sup>1,2\*</sup>, 刘菊华<sup>2,3\*</sup>

1. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228; 2. 热带作物生物育种全国重点实验室, 海南三亚 572025; 3. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101

**摘要:**胆碱单加氧酶 (CMO) 是高等植物体内甜菜碱合成过程中的关键酶, 在植物抵御逆境生理过程中具有重要作用。在香蕉 A、B 参考基因组数据库中分别鉴定到 1 个 CMO 基因, 对 *MaCMO* 与 *MbCMO* 基因组序列进行生物学信息分析, 发现 *MbCMO* 可能由 1 个香蕉 O-岩藻糖基转移酶家族蛋白编码基因与 *MbCMO* 基因串联形成。克隆湛江 AA (ZJ; AA 基因型)、巴西蕉 (BX; AAA 基因型)、广东大蕉 (GD; AAB 基因型) 和金粉 (JF; ABB 基因型) 的 CMO 基因编码序列并测序比对, 在 ZJ 和 BX 中鉴定到基因 CMO-A, GD 和 JF 中鉴定到基因 CMO-A、CMO-B1 和 CMO-B2, JF 中鉴定到基因 CMO-H。鉴定到的 4 种香蕉 CMO 基因中, 有 23 个共同的高频密码子, 密码子 CUU 和 CCG 分别是偏性最强和最弱的密码子。CMO-A 蛋白与 CMO-H 蛋白的氨基酸数量最少, 均为 425 个; CMO-B1 蛋白的氨基酸数量最多, 为 470 个, 且二级结构最为复杂; CMO-B2 蛋白分子量最大, 为 52.02 kDa; CMO-A 分子量最小, 为 47.48 kDa; 4 种 CMO 均属于酸性蛋白, 均不具有跨膜结构且均为亲水性蛋白; 亚细胞定位预测显示 4 种 CMO 均定位在叶绿体中。在进化方面, 植物 CMO 在进化时单、双子叶植物有明显的分支, 香蕉 CMO-A、CMO-H、CMO-B1、CMO-B2 蛋白与其他单子叶植物 CMO 蛋白亲缘关系更近。RT-qPCR 结果显示: 4 种香蕉根中 CMO 在渗透胁迫前期上调表达, A 基因组纯合型 ZJ 与 BX 的 CMO 表达量高于 A、B 基因组杂合型 GD 与 JF 的 CMO 表达量; 4 种香蕉叶中 CMO 在渗透胁迫前期下调表达, 其中 A 基因组纯合型 ZJ 与 BX 的 CMO 表达量在渗透胁迫后期出现上调表达, A、B 基因组杂合型 GD 与 JF 的 CMO 表达量高峰出现在 10 d, 而后 15 d 时表达量再次下调, 并显著低于 ZJ 与 BX 的 CMO 表达量。本研究揭示了香蕉 A、B 基因组间 CMO 基因的差异和不同基因型香蕉中 CMO 基因在渗透胁迫下的表达模式, 为进一步研究香蕉 A、B 基因组 CMO 基因生物学功能, 特别是来源于不同基因组的 CMO 基因与香蕉抗渗透胁迫能力间的关系奠定基础, 为利用基因工程提高香蕉抗逆性提供参考依据。

**关键词:**香蕉; A、B 基因组; 胆碱单加氧酶合成基因; 表达特性; 抗逆性

中图分类号: S668.1 文献标志码: A

## Cloning and Expression Characteristics of Choline Monooxygenase Gene in Banana A and B Genomes under Osmotic Stress

ZHU Bowei<sup>1</sup>, YU Jiaxuan<sup>1</sup>, LI Xinguo<sup>1,2\*</sup>, LIU Juhua<sup>2,3\*</sup>

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding, Sanya, Hainan 572025, China; 3. Institute of Tropical Crops Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

**Abstract:** Choline monooxygenase (CMO) is a key enzyme in the synthesis of betaine in higher plants and plays an important role in the physiological process of plant resistance to stress. A CMO gene was identified in banana A and B

收稿日期 2023-11-01; 修回日期 2023-12-01

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 320RC485); 国家自然科学基金项目 (No. 32160679); 海南省研究生创新科研课题 (No. Qhys2022-99)。

作者简介 朱博为 (1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 果树栽培生理。\*通信作者 (Corresponding author): 李新国 (LI Xinguo), E-mail: lixinguo13@163.com; 刘菊华 (LIU Juhua), E-mail: liujuhua@itbb.org.cn。

reference genomes in banana gene database, and the biological information analysis of *MaCMO* and *MbCMO* genome sequences showed that *MbCMO* might be formed by a gene encoding a banana O-fucosyltransferase family protein and *MbCMO* gene in tandem. The *CMO* gene coding sequences of Zhanjiang AA (ZJ; AA genotype), Baxijiao (BX; AAA genotype), Guangdong Dajiao (GD; AAB genotype) and Jinfen (JF; ABB genotype) were cloned and compared, it was found that ZJ and BX only contained *CMO-A*, GD and JF both contained *CMO-A*, *CMO-B1* and *CMO-B2*, and JF also contained *CMO-H*. Codon usage characteristics showed that there were 23 common high frequency codons among the four banana *CMO* gene, and the codons CUU and CCG were the most biased and the weakest codons, respectively. The physicochemical properties of *CMO-A* protein and *CMO-H* protein showed that the minimum number of amino acids was 425, the maximum number of amino acids was 470, and the secondary structure of *CMO-B1* protein was the most complex. The molecular weight of *CMO-B2* protein was 52.02 kDa, and the molecular weight of *CMO-A* protein was 47.48 kDa. All the four *CMO* proteins were acidic proteins, which did not have a transmembrane structure and were hydrophilic proteins. Subcellular localization prediction showed that all four *CMO* were localized in chloroplasts. In terms of evolution, plant *CMO* had obvious branches in monocotyledonous plants during evolution, and the *CMO-A*, *CMO-H*, *CMO-B1* and *CMO-B2* proteins of banana were more closely related to other monocotyledonous plant *CMO* proteins. The results of RT-qPCR showed that *CMO* expression was up-regulated in the four kinds of banana roots in the early stage of osmotic stress, and the expression levels of ZJ and BX *CMO* in homozygous A genome were higher than those of GD and JF *CMO* in heterozygous A and B genomes. *CMO* expression in the four kinds of banana leaves was down-regulated at the early stage of osmotic stress. The expression levels of homozygous ZJ and BX *CMO* in A genome were up-regulated at the late stage of osmotic stress, while the expression levels of heterozygous GD and JF *CMO* in A and B genomes peaked at 10 days and then down-regulated again at 15 days later. It was significantly lower than that of ZJ and BX *CMO*. This study revealed the differences of *CMO* genes between the A and B genomes of bananas and the expression patterns of *CMO* genes in different genotypes of bananas under osmotic stress, which would lay a foundation for further research on the biological functions of *CMO* genes in the A and B genomes of bananas, especially the relationship between *CMO* genes derived from different genomes and the ability of banana to resist osmotic stress. It would provide a reference for improving the stress resistance of banana by genetic engineering.

**Keywords:** banana; A, B genome; *CMO* gene; characteristic of expression; stress resistance

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.08.003

渗透胁迫作为影响作物生长的主要环境因素之一，是世界农业生产的主要自然灾害，在自然条件下，多种非生物胁迫都会引起植物与环境间渗透势失衡而造成渗透胁迫<sup>[1]</sup>。研究表明，当植物受到渗透胁迫时首先表现出组织中相对含水量显著下降，气孔导度降低导致细胞水分缺失，影响植物蒸腾作用<sup>[2]</sup>，显著提高叶绿素酶活性，叶绿素生物合成途径受到破坏<sup>[3]</sup>，从而抑制植物光合作用<sup>[4]</sup>；渗透胁迫会导致植物活性氧失衡，并抑制生物膜活性<sup>[5]</sup>。植物始终处于在动态的环境中不断调整新陈代谢和发育的进程之中，为了抵御环境压力，植物进化出了相互关联的调节途径，使它们能够及时地做出反应和适应环境<sup>[6]</sup>。渗透调节是指植物通过调节细胞内溶质的含量来保持细胞渗透压的过程，是植物响应渗透胁迫的重要调节机制<sup>[7]</sup>。渗透调节物质包括由外界进入细胞的无机离子（ $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 等）和植物细胞内合成的有机溶质（甜菜碱、脯氨酸和可溶性糖类等）两大类<sup>[8]</sup>。甘氨酸甜菜碱（glycine betaine, GB）是一种广泛存在于高等植物细胞中

的季铵碱类化合物<sup>[9]</sup>，在植物体内合成路径简单，不易发生代谢，容易被植物吸收，是目前研究最多最有效的渗透调节物质之一<sup>[10]</sup>。通过外源喷施 GB<sup>[11-12]</sup>和基因工程<sup>[13-14]</sup>等手段，可以提高非生物胁迫条件下植物内源 GB 的含量，植物内源 GB 的积累更有利于植物稳定生物大分子的结构与功能<sup>[15]</sup>、增强活性氧清除能力<sup>[16]</sup>、减缓渗透胁迫对光系统 II（PSII）反应中心酶活的降低<sup>[17]</sup>等。总之，植物可以通过积累 GB 提高其非生物胁迫抗性<sup>[18-19]</sup>。

在高等植物中，GB 生物合成是由酶促反应来完成，首先以胆碱为底物，在胆碱单加氧酶（choline monooxygenase, CMO）催化下氧化为甜菜碱醛，然后甜菜碱醛在甜菜碱醛脱氢酶（betaine aldehyde dehydrogenase, BADH）催化下最终合成 GB，GB 合成后不会再被进一步代谢<sup>[20]</sup>。BROUQUISSE 等<sup>[21]</sup>于 1989 年首次在菠菜（*Spinacia oleracea*）叶绿体中分离出 CMO。CMO 是植物中 GB 合成的限速酶，仅在植物中存在的一种加氧酶<sup>[22]</sup>，CMO 定位于叶绿体基质中，其分子内



部具有 Fe-S 中心,属于单编码基因<sup>[23]</sup>。研究发现,多种植物在胁迫条件下,CMO 基因的上调表达可以显著提高植物的抗逆性<sup>[24-26]</sup>,刘丹等<sup>[13]</sup>将辽宁碱蓬 (*Suaeda liaotungensis*) CMO 基因转化烟草 (*Nicotiana tabacum*),盐胁迫下转基因烟草内源 GB 含量显著提高,烟草耐盐性增强;ZHANG 等<sup>[14]</sup>将甜菜 (*Beta vulgaris*) CMO 基因转化烟草提高了烟草的耐盐抗旱能力;将菠菜 CMO 基因转化水稻 (*Oryza sativa*) 后,发现转基因水稻表现出了对盐胁迫和温度胁迫更强的耐受性<sup>[27]</sup>。将细菌 *codA* 基因转入番茄 (*Solanum lycopersicum*) 中,发现转基因番茄 D1 蛋白的稳定性显著提高,从而缓解 PSII 的光抑制<sup>[17]</sup>。

香蕉 (*Musa* spp.) 属芭蕉科 (Musaceae) 芭蕉属果树,被世界粮农组织定位为仅次于水稻、小麦 (*Triticum aestivum*)、玉米 (*Zea mays*) 的第四大粮食作物<sup>[28]</sup>。全世界香蕉栽培品种大约 300 个, SIMMONDS 等<sup>[29]</sup>认为香蕉由尖叶蕉 (*Musa acuminata*; A 基因组) 和长梗蕉 (*Musa balbisiana*; B 基因组) 2 个原始野生蕉种内或种间杂交后代进化而成,还有少数的 *Musa schizocarpa* (S 基因组) 和 *Musa textilis* (T 基因组)<sup>[30]</sup>。世界香蕉类型有二倍体 (AA、BB)、三倍体 (AAA、AAB、ABB 和 BBB) 和四倍体 (AAAA、AAAB、AABB 和 ABBB) 等品种。到目前为止,基因组公式的预测仍然是基于染色体数目和形态特征的评价。事实上,不仅不同基因型香蕉的形态差异明显,而且还发现了基因结构与功能水平差异。研究发现,在多种非生物胁迫条件下,不同基因型香蕉表现出抗性差异,低温条件下,ABB 与 AAA 基因型品种幼苗相比具有更强的耐寒性<sup>[31-32]</sup>,RAVI 等<sup>[33]</sup>通过对于干旱条件下不同基因型香蕉进行表型分析发现,ABB 基因型香蕉比其它基因型香蕉具有更强的抗旱性。WANG 等<sup>[34]</sup>通过对多种不同基因型香蕉抗旱性分析认为香蕉基因型组成中具 B 基因组越多的品种,其耐旱性越强的趋势。HU 等<sup>[35]</sup>通过表型和生理分析证明,ABB 基因型的粉蕉比 AAA 基因型的巴西蕉更耐渗透胁迫、冷胁迫和盐胁迫,并伴随着多种基因在不同基因组类型间差异表达。WU 等<sup>[36]</sup>通过对香蕉 A、B 基因组中叶绿素降解途径中 *SGR1* 基因表达模式的研究发现,A-*SGR1* 与 B-*SGR1* 等位基因在高温条件下的表达存在差异,并对香蕉果皮颜色的调控功能有差异。RAVI 等<sup>[37]</sup>认为 *Musa balbisiana*

可能是在极端天气条件下被驯化的,因此较 *Musa acuminata* 具有更好的抗旱能力。随着越来越多的证据表明不同基因组类型的等位基因结构与表达模式以及香蕉品种间的非生物胁迫抗性存在部分差异,而基因结构差异是否导致基因功能差异以及基因功能差异与香蕉渗透胁迫抗性是否存在关联仍有待研究。

目前关于香蕉 A、B 基因组抗逆相关等位基因的鉴定研究较少,因此,本研究针对香蕉关键渗透调节物质 GB 合成过程中的限速酶 CMO,通过克隆与测序鉴定来源香蕉 A、B 基因组的 CMO 基因,运用生物信息学分析手段预测其蛋白结构与功能差异,通过 RT-qPCR 分析不同基因型香蕉 CMO 基因在渗透胁迫下的表达模式,以确定其在不同基因型香蕉抗渗透胁迫过程中的作用,为后续进一步揭示香蕉 A、B 基因组 CMO 等位基因与不同基因型香蕉抗逆性相关差异的分子机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以 4 种不同基因型香蕉[湛江 AA (ZJ; AA 基因型)、巴西蕉 (BX; AAA 基因型)、广东大蕉 (GD; AAB 基因型) 和金粉 (JF; ABB 基因型)]的生长健壮、长势一致,五叶一心的组培苗为材料,组培苗均来源于吸芽增殖,由中国热带农业科学院热作两院种苗组培中心提供。在中国热带农业科学院热带生物技术研究组培室处理材料,组培室培养条件为:光照 12 h (8:00—20:00),光照强度 2000 lx, 26 °C,以 200 mmol/L 甘露醇溶液处理模拟渗透胁迫。于 0、5、10、15 d 取全叶和全根系,每个时间点随机取样 3 株苗,取样后迅速放入液氮速冻后转移至 -80 °C 超低温冰箱保存。

### 1.2 方法

1.2.1 香蕉 CMO 基因鉴定及序列分析 从香蕉基因组数据库 (<http://banana-genome-hub.southgreen.fr/>) 中检索 AA 型野生蕉 (*Musa acuminata*, DH-Pahang) 的 *MaCMO* 基因 (序列号: Macma4\_07\_g22330) 和 BB 型野生蕉 (*Musa balbisiana*, Pisang Klutuk Wulung) 的 *MbCMO* 基因 (序列号: Mba07\_g19660) 作为参考序列,并下载 *MaCMO* 基因与 *MbCMO* 基因的 CDS 序列、基因全长序列和蛋白序列。利用 CD-Search Tool (<https://www.cd-search.com/>)

ncbi.nlm.nih.gov/)在线网站对 MaCMO 与 MbCMO 蛋白保守结构域进行预测,并将基因结构与蛋白保守结构域的分析结果导入 TBTOOLS 软件进行分析。利用 Softberry (<http://www.softberry.com>)在线预测网站对 MbCMO 基因进行从头预测,采用 IGV-GSaman (v0.6.79) 软件可视化分析。

1.2.2 不同基因型香蕉 CMO 基因克隆及序列分析 根据 2 个参考序列设计引物(表 1)克隆不同基因型香蕉 CMO 基因的 CDS 序列。PCR 酶使用 2×Phanta Max Master Mix P525 (Vazyme), PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 50 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经回收、纯化,与 pCE2 TA/Blunt-Zero 载体 (Vazyme) 连接,转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,菌液 PCR 筛选阳性克隆,送至北京擎科生物科技有限公司送测。将测序结果导入 MAGE (v11.0.13) 软件进行序列比对,比对结果导入 Jalview (v2.11.27) 软件进行可视化分析,在 MAGE 软件中构建同源树,选用 p 距离模型用于计算遗传距离。利用生信云在线分析网站 ([sangon.com](http://sangon.com)) 分析不同基因型香蕉 CMO 基因的 CDS 序列密码子使用特性,导入 TBTOOLS 软件绘制热图。

1.2.3 CMO 蛋白序列分析及系统进化分析 使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件预测分析 CMO 蛋白编码氨基酸个数、蛋白分子量及等电点等信息。蛋白二级结构预测由 Prabi (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/>)、Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>) 在线软件完成。使用 PSORT (<https://www.genscript.com/psort.html>) 在线软件预测亚细胞定位。蛋白亲疏水性分析由 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 在线软件完成。使用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线软件作蛋白跨膜结构分析。将蛋白序列导入 MEGA 软件中进行多重比对,并构建系统发育树。使用 Jalview 软件进行可视化分析。

1.2.4 RT-qPCR 检测 通过多糖多酚 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取香蕉叶片和全根系 RNA,所有样品均用 1  $\mu$ g 的 RNA 通过 Prime Script RT reagent Kit (TaKaRa 公司, Perfect Real Time) 反转录试剂盒反转录成 cDNA,反转录产物在 -20 °C 下保存备用。以香蕉 Actin 基因为内参,进行特异性表达分析。反应体系 20  $\mu$ L,

反应程序: 95 °C 7 min, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 95 °C 15 s, 共 40 个循环。

### 1.3 数据处理

使用 Excel 软件进行数据计算;采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法分析基因的相对表达量,运用 SPSS 软件分析数据结果;采用 ANOVA 过程作方差分析;采用 Duncan's 新复极差法作多重比较分析;使用 Origin 软件绘制表达模式图。

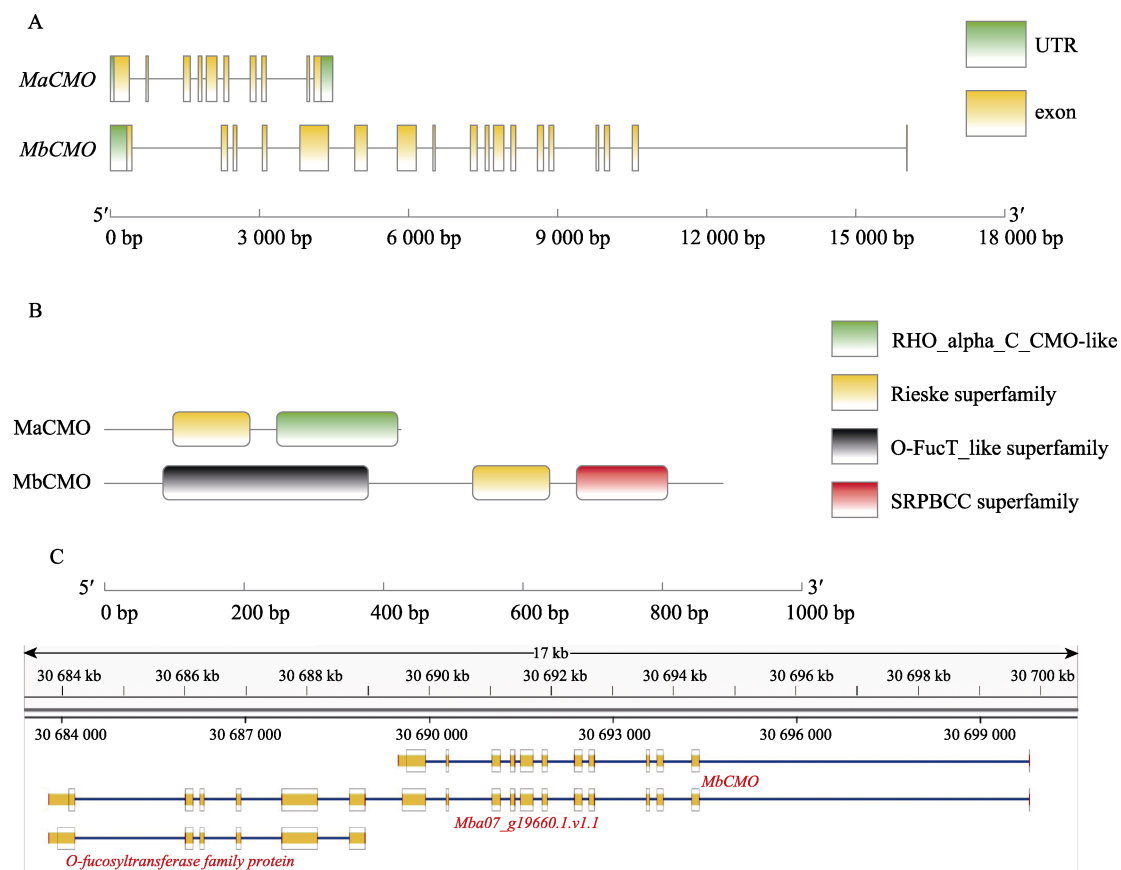
## 2 结果与分析

### 2.1 香蕉 A、B 参考基因组 CMO 基因结构分析及转录本从头预测

在香蕉 A 基因组数据库检索获得 MaCMO 基因,基因序列号 Macma4\_07\_g22330,基因组位于 7 号染色体 (Achr07: 33218743~33223216);在香蕉 B 基因组数据库检索获得 MbCMO 基因,基因序列号 Mba07\_g19660,基因组位置 7 号染色体 (Bchr07: 30683779~30699810)。MaCMO 和 MbCMO 基因的结构分析结果显示(图 1A), MaCMO 基因长度为 4474 bp,具有 10 个外显子,9 个内含子;MbCMO 基因长度为 16 032 bp,具有 18 个外显子,17 个内含子。MaCMO 和 MbCMO 蛋白保守结构域分析结果表明(图 1B), MaCMO 蛋白具有典型的 Rieske 型[2Fe-2S]结构域和加氧酶家族特征;MbCMO 蛋白在具有 Rieske 型[2Fe-2S]结构域和加氧酶家族特征的同时还具有 1 个岩藻糖家族结构域特征。通过 Softberry 在线预测网站对 MbCMO 基因转录本进行从头预测,发现 MbCMO 基因同时包含 1 个香蕉 O-岩藻糖基转移酶家族蛋白编码基因与香蕉 CMO 基因(图 1C)。

### 2.2 不同基因型香蕉中 CMO 基因的克隆与鉴定

以香蕉 A 基因组数据库中 MaCMO 与 Softberry 在线分析网站分析得到的 MbCMO 基因为参考序列,设计 2 对分别克隆香蕉 A、B 基因组 CMO 基因特异性引物(表 1),以 BX、ZJ、JF、GD 的 cDNA 为模板,克隆 BX、ZJ、JF、GD 中 CMO 基因编码序列。经序列比对发现(图 2),使用 MaCMO 基因特异性引物在 BX、ZJ、GD 中各克隆出 1 种 CMO 基因系列(分别命名为 BXCMA-A、ZJCMO-A、GDCMO-A),在 JF 中克隆出 2 种 CMO 基因序列(分别命名为 JFCMO-A、JFCMO-H),5 种 CMO 基因序列与 MaCMO 序列间相似性为 99.31%,共有 37 个 SNPs;使用 MbCMO 基因特异性引物在 GD、JF 中各克隆出 2 种 CMO 基因转



A: *MaCMO* 与 *MbCMO* 基因结构; B: *MaCMO* 与 *MbCMO* 蛋白保守结构域; C: *MbCMO* 基因从头预测。  
A: *MaCMO* and *MbCMO* gene structure; B: Conserved domain of *MaCMO* and *MbCMO*; C: *MbCMO* gene transcript prediction *de novo*.  
图 1 香蕉 A、B 参考基因组 *CMO* 基因结构分析及转录本从头预测

Fig. 1 Banana A and B genome *CMO* gene structure analysis and transcript prediction *de novo*

表 1 本研究所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

| 引物名称<br>Primer name | 引物序列 (5'-3')<br>Primer sequence (5'-3') | 用途<br>function |
|---------------------|-----------------------------------------|----------------|
| Actin-F             | CGTAGCACCAGAAGAACA                      | RT-qPCR        |
| Actin-R             | CATAAAGGGAGAGGACAG                      |                |
| qCMO-F              | TGGAAGGTTTTCTGTGACAAC                   |                |
| qCMO-R              | TTAGTGTCCATCCATGGACCAT                  |                |
| MaCMO-F             | ATGGCCATCGTAGTGCAAAG                    | 基因克隆           |
| MaCMO-R             | TTAGATGTTACCAAGGCACTCATG                |                |
| MbCMO-F             | ATGGCCATCGTAGTGCAAAG                    |                |
| MbCMO-R             | TTATTCGTGGAGAGCGCCTGC                   |                |
| M13-F               | TGTAAAACGACGGCCAGT                      | 菌液 PCR         |
| M13-R               | CAGGAAACAGCTATGACC                      |                |

录本序列 (分别命名为 *GDCMO-B1*、*GDCMO-B2* 与 *JFCMO-B1*、*JFCMO-B2*)，4 种 *CMO* 基因序列与 *MbCMO* 序列间相似性为 98.55%，在 *GDCMO-B1* 与 *JFCMO-B1* 中鉴定到 34 个 SNPs 和 3 个 Indels，分别为 24 bp 与 20 bp 的插入突变与 4 bp 的缺失突变;在 *GDCMO-B2* 与 *JFCMO-B2*

中鉴定到 4 个 SNP 和 2 个 Indels，分别为 24 bp 与 20 bp 的插入突变，导致转录于 1350 bp 提前终止。将在 4 种不同基因型的香蕉品种中鉴定到的 9 种 *CMO* 基因序列导入 MAGE 软件中构建同源树发现 (图 3)，9 种 *CMO* 基因序列与 2 个 *CMO* 参考基因大致分成两簇。其中 *BXCMO-A*、*ZJCMO-A*、*GDCMO-A*、*JFCMO-A*、*GDCMO-B1* 与香蕉 A 基因组的 *MaCMO* 基因归为一簇; *JFCMO-H*、*JFCMO-B1*、*JFCMO-B2*、*GDCMO-B2* 与香蕉 B 基因组的 *MbCMO* 基因归为一簇。因此将与 *MaCMO* 基因亲缘关系最近的 *ZJCMO-A* 定义为 *CMO-A*；将与 *MbCMO* 基因亲缘关系较近的 *JFCMO-B1* 与 *GDCMO-B2* 分别定义为 *CMO-B1* 与 *CMO-B2*；由于 *FJCMO-H* 可能由 A 和 B 基因组重组而形成的，将其定义为 *CMO-H*。

2.3 香蕉 *CMO* 基因密码子偏好性分析

相对同义密码子使用频率 (relative synonymous codon usage, RSCU) 值的大小可以反映密码子的使用频率。一般 RSCU 值大于 1 的密码子被



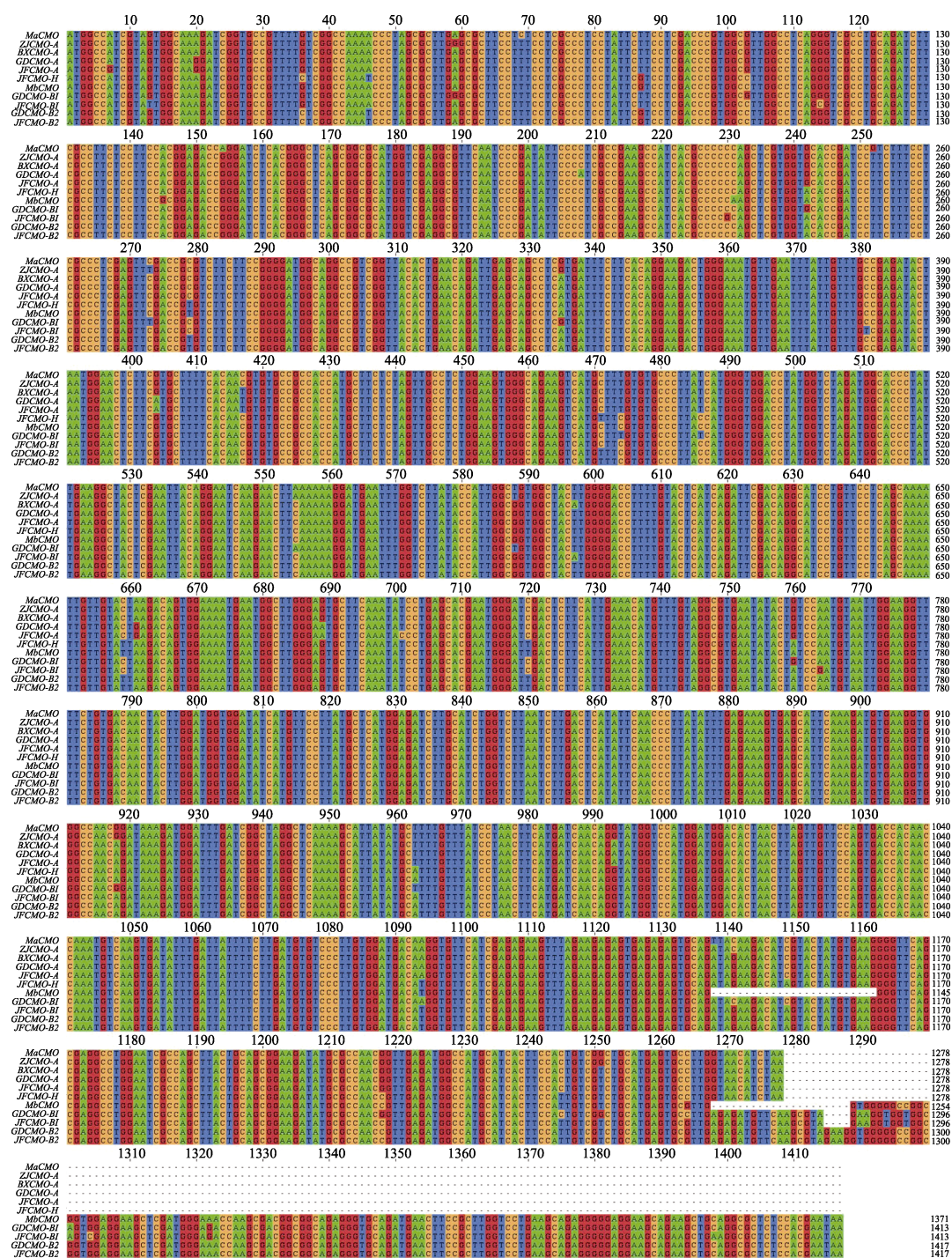


图 2 不同基因型香蕉 CMO 基因序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of CMO gene of different banana genotypes

认为是高频密码子, RSCU 值小于 1 的则为低频密码子。通过比较发现(图 4), 在 4 种香蕉 CMO 基因中, 有 23 个共同的高频密码子, 密码子 CUU 是 4 种香蕉 CMO 基因中偏性最强的密码子, RSCU 值均超过 2, 密码子 CCG 则是偏性最弱的密码子, 在 CMO-B1 中的 RSCU 值为 0.18, 其余 3 种中。CMO-A 中均为 0。其中, 密码子 GGU、

CUA、UCG 在 CMO-A 中属于高频密码子, RSCU 值分别为 1.12、1.02、1.05; 密码子 GGU、CUA、UCG、UCC、AAA 在 CMO-H 中属于高频密码子, RSCU 值分别为 1.12、1.02、1.20、1.02、1.00; 密码子 GGU、UCG、CGC、AAA、CGA、AGC 在 CMO-B1 中属于高频密码子, RSCU 值分别为 1.20、1.05、1.03、1.00、1.03、1.05; 密码子 CUA、

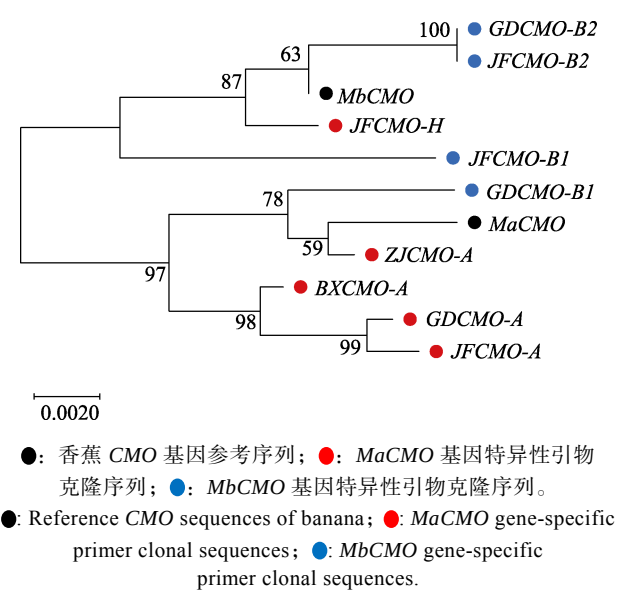


图 3 不同基因型香蕉 CMO 基因同源性分析  
Fig. 3 Homology analysis of CMO gene in different genotypes of bananas.

UCC、AAA、GGG、CUC、AGC 在 CMO-B2 中属于高频密码子,RSCU 值分别为 1.02、1.09、1.00、1.07、1.02、1.22。

2.4 香蕉 CMO 蛋白理化性质分析

利用 ProtParam 工具对蛋白序列进行的蛋白质相关理化性质分析表明（表 2），CMO-A 蛋白与 CMO-H 蛋白均由 425 个氨基酸编码形成，CMO-B1 编码氨基酸数量最多，为 470 个，

CMO-B2 由 450 个氨基酸编码形成；CMO-B2 蛋白分子量最大，为 52.02 kDa，并且等电点最低，为 5.44，CMO-A 蛋白分子量最小，为 47.48 kDa，CMO-B1 蛋白等电点最高为 6.88,说明 4 种 CMO 蛋白均属于酸性蛋白。Prabi 分析发现 CMO-B1 蛋白二级结构较为复杂,CMO-A 蛋白二级结构较为简单。TMHMMY 预测分析 4 种 CMO 蛋白都不具有跨膜结构且亲疏水性指数均小于 0，为亲水性蛋白质；亚细胞定位预测显示将 4 种 CMO 蛋白均定位在叶绿体中。

2.5 香蕉 CMO 蛋白系统进化分析及多重序列比对

为进一步研究 4 种香蕉 CMO 蛋白的系统进化关系，在 NCBI 数据库中检索并选取拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、番茄、玉米、水稻、菠菜、苋菜（*Amaranthus tricolor*）、大豆（*Glycine max*）、大麦（*Hordeum vulgare*）、豇豆（*Vigna unguiculata*）、甜瓜（*Cucumis melo*）、橙子（*Citrus sinensis*）、番石榴（*Psidium guajava*）、油棕（*Elaeis guineensis*）、海枣（*Phoenix dactylifera*）、葡萄（*Vitis riparia*）、黄瓜（*Cucumis sativus*）等 16 个物种 CMO 蛋白与 CMO-A、CMO-H、CMO-B1、CMO-B2 蛋白进行系统进化分析。由图 5 可知，CMO-A、CMO-H、CMO-B1、CMO-B2 与 EgCMO、PdCMO、ZmCMO、HvCMO、OsCMO 5 种单子

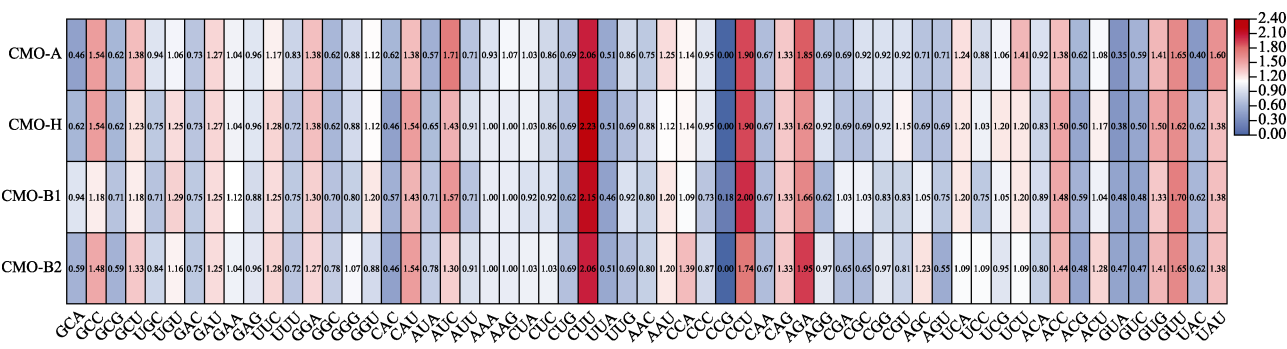
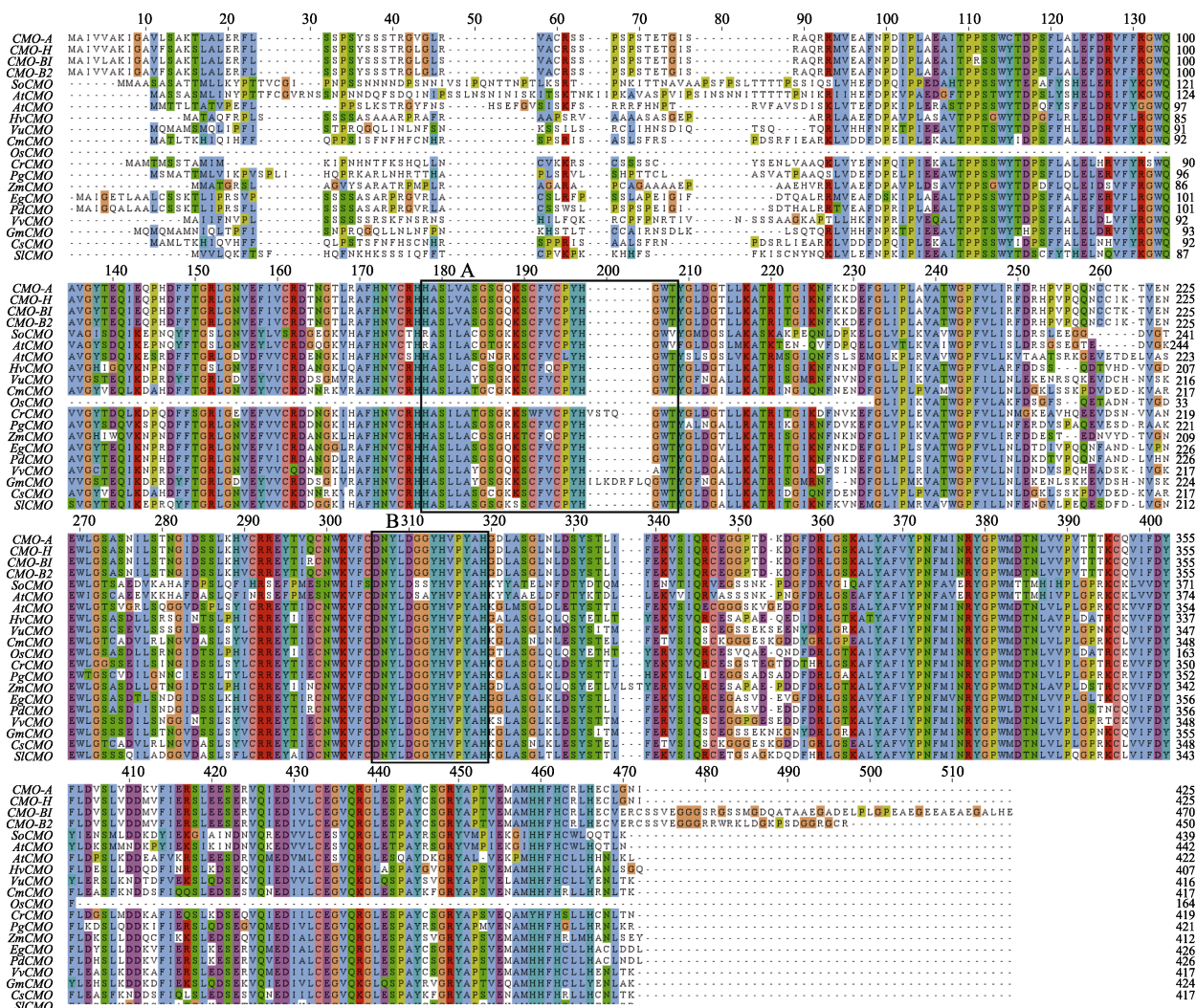


图 4 4 种香蕉 CMO 基因密码子偏好性分析  
Fig. 4 Codon preference analysis of four banana CMO gene

表 2 4 种香蕉 CMO 蛋白理化性质分析  
Tab. 2 Physicochemical properties of four banana CMO protein

| 蛋白名称<br>Protein name | 氨基酸数量<br>Amino acids number | 分子量<br>Molecular weight/kDa | 等电点<br>pI | α-螺旋<br>α-helix/% | 延伸链<br>Extended strand/% | β-转角<br>β-turn/% | 无规则卷曲<br>Random coil/% | 跨膜结构<br>Transmembrane structure | 亲疏水性指数<br>Hydrophilicity index | 亚细胞定位<br>Subcellular localization |
|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|-------------------|--------------------------|------------------|------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| CMO-A                | 425                         | 47.48                       | 6.36      | 35.06             | 15.53                    | 4.71             | 44.71                  | 无                               | -0.157                         | 叶绿体                               |
| CMO-H                | 425                         | 47.61                       | 6.23      | 35.53             | 16.00                    | 5.41             | 43.06                  | 无                               | -0.142                         | 叶绿体                               |
| CMO-B1               | 470                         | 50.35                       | 6.88      | 35.32             | 15.11                    | 5.11             | 44.47                  | 无                               | -0.208                         | 叶绿体                               |
| CMO-B2               | 450                         | 52.02                       | 5.44      | 32.67             | 13.78                    | 4.89             | 48.67                  | 无                               | -0.211                         | 叶绿体                               |





A: Rieske 型[2Fe-2S]结构域; B: 铁结合位点。

A: Rieske type [2Fe-2S] conserved domain; B: Iron binding region.

图 5 CMO 蛋白系统进化分析

Fig. 5 Phylogenetic relationships analysis of the CMO protein

叶植物共同处于 1 个分支, 表明它们亲缘关系最近。CMO-A、CMO-H、CMO-B1、CMO-B2 与 SoCMO 和 AtCMO (拟南芥胆碱单加氧酶蛋白) 亲缘关系最远。结果表明, 植物 CMO 在进化时单、双子叶植物有明显的分支, 说明物种内的分化时间比物种间的分化时间更晚。蛋白多重序列比对结果显示 (图 6)。香蕉 CMO 蛋白序列中都具有典型的 Rieske 型[2Fe-2S]结构域和铁结合位点, 进一步说明香蕉 CMO 蛋白具有铁离子结合和氧化还原酶活性, 并且植物 CMO 蛋白在进化时 C 端较 N 端更为保守。

## 2.6 渗透胁迫条件下 4 种基因型香蕉 CMO 表达模式分析

为探究 4 种基因型香蕉 CMO 在渗透胁迫条件下表达特性, 通过 RT-qPCR 对 200 mmol/L 甘露

醇处理后的 4 种不同基因型香蕉根与叶中 CMO 表达模式进行分析。以 0 d JF 处理组 CMO 表达量作为对照 (设相对表达量为 1), 计算出其他处理组的相对表达量, 结果如图 7 所示, 渗透胁迫条件下, 在渗透胁迫大部分阶段 A 基因组纯合型 (ZJ 与 BX) 香蕉根叶中的 CMO 表达量显著高于 A、B 基因组杂合型 (GD 与 JF) 香蕉根叶中的 CMO 表达量。在根中, A 基因组纯合型 (ZJ 与 BX) CMO 表达量在 0、5、10 d 显著高于 A、B 基因组的杂合型 (GD 与 JF) CMO 基因表达量 ( $P < 0.05$ ), 只有在 15 d 时 ZJCMO 表达量与 GDCMO 表达量无显著差异。ZJ、BX、GD 的 CMO 基因在 5 d 时表达量出现高峰, 分别为 CK 的 7.39、5.69、3.58 倍, JF 的 CMO 基因表达量在 10 d 出现高峰, 仅为 CK 的 1.55 倍。在叶中, A、B 基

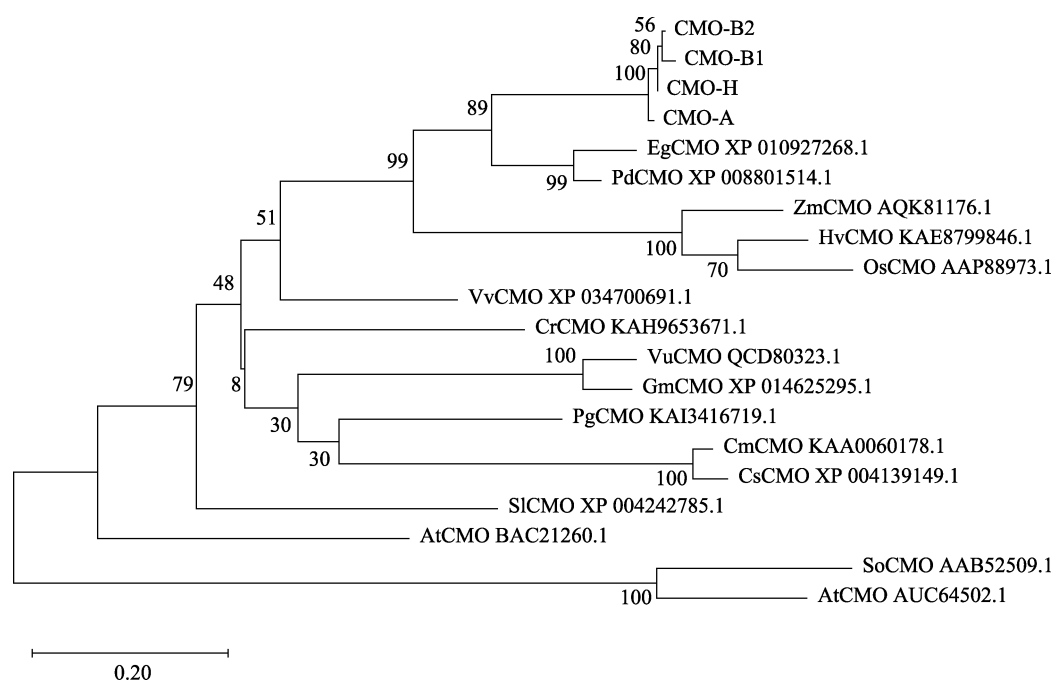


图 6 CMO 蛋白氨基酸序列比对

Fig. 6 CMO protein amino acid sequence alignment

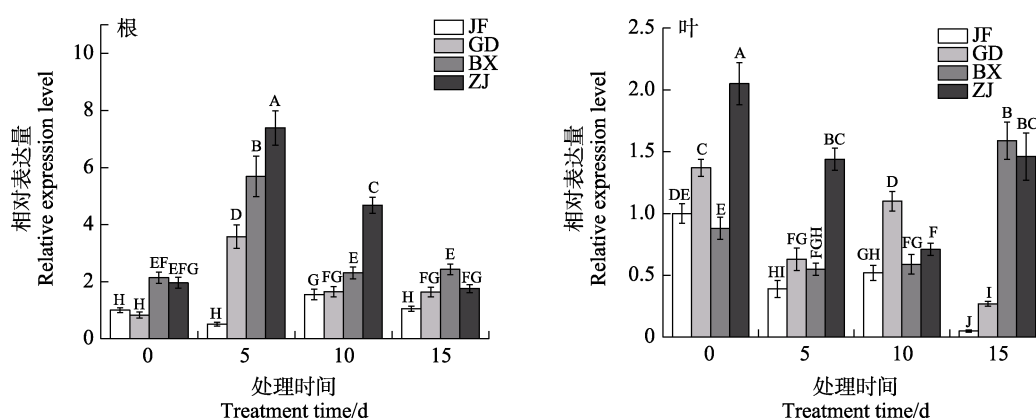
不同大写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。Different uppercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 7 渗透胁迫下 4 种基因型香蕉 CMO 基因表达模式

Fig. 7 CMO gene expression patterns of four genotypes of bananas under osmotic stress.

因组的杂合型 (GD 与 JF) CMO 在 10 d 时表达量出现高峰, 其中 GD 的 CMO 表达量显著高于 ZJ 与 BX, A 基因组的纯合型 (ZJ 与 BX) 的 CMO 表达量在 15 d 时表达量再次上升且显著高于 GD 与 JF ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

目前, CMO 基因已经在多种高等植物中被鉴定, 并发现其在植物 GB 合成以及响应植物胁迫反应时起到重要作用<sup>[38-39]</sup>。CMO 基因为单拷贝基因<sup>[23]</sup>, 结合香蕉 A、B 基因数据库数据, 分别发现 1 个 MaCMO 与 MbCMO 基因, MaCMO 和

MbCMO 基因结构分析结果显示: MaCMO 基因长度为 4432 bp, 具有 10 个外显子; MbCMO 基因长度为 16 032 bp, 具有 18 个外显子; MbCMO 基因长度是 MaCMO 基因长度的近 4 倍, 多了 8 个外显子。MaCMO 和 MbCMO 蛋白保守结构域分析结果显示: MaCMO 蛋白和 MbCMO 蛋白具有典型的 Rieske 型[2Fe-2S]结构域和加氧酶家族特征, 而 MbCMO 蛋白还具有 1 个岩藻糖家族结构域特征, 这与人报道的大麦<sup>[40]</sup>与水稻<sup>[41]</sup>等植物 CMO 蛋白具有的结构域并不完全一致。MbCMO 基因转录本进行从头预测发现, MbCMO 基因可能由 1 个香蕉 O-岩藻糖基转移酶家族蛋白编码基

因与 *MbCMO* 基因串联形成, 推测可能是由于基因组测序结果在拼接的过程中由于 2 个基因在基因组中位置较为接近而拼接成 1 个基因, 这种 1 个基因由多个基因串联形成的现象普遍存在于已有的植物基因组测序结果中<sup>[42-43]</sup>。

大量研究表明, 相同基因在同一物种不同基因型的品种间可能存在多种转录本。WU 等<sup>[36]</sup>在 AAB\ABB 基因型香蕉中同时鉴定到分别来源于 A、B 基因组的 *SGR1* 等位基因; YU 等<sup>[44]</sup>在 4 个不同的小麦品种中鉴定来源不同的 *TaBADH-A* 与 *TaBADH-B* 基因。根据形态学特征, ZJ、BX、GD 和 JF 的基因型分别被预测为 AA、AAA、AAB 和 ABB<sup>[30, 45]</sup>。本研究选择香蕉关键渗透调节物质 GB 合成过程中限速酶合成基因 *CMO* 作为重点研究基因, 探讨不同基因型香蕉 *CMO* 基因之间的差异, 通过克隆后的测序和序列的多重比对, 在 4 种基因型香蕉中发现了 9 条 *CMO* 基因序列, 其中 *MaCMO* 基因特异性引物在 BX、ZJ、GD 中各克隆出 1 种 *CMO* 基因, 在 JF 中克隆出 2 种 *CMO* 基因; *MbCMO* 基因特异性引物在 GD、JF 中各克隆出 2 种 *CMO* 基因并且在 *GDCMO-B2* 与 *JFCMO-B2* 中出现 Indels 使得转录提前终止, 蛋白一级结构发生变异。通过构建同源树分析不同来源的 *CMO* 基因的亲缘关系, 结果表明 9 条 *CMO* 基因与 2 个 *CMO* 参考基因大致分成两簇, 包括与香蕉 A 基因组 *MaCMO* 基因亲缘关系较近的归为一簇以及与香蕉 B 基因组 *MbCMO* 基因亲缘关系较近的为另一簇。其中, *JFCMO-H* 具有 *MaCMO* 基因和 *MbCMO* 基因共同特征, 推测其可能由 A 和 B 基因组在进化过程中重组而形成的, 这种现象符合 JERIDI 等<sup>[46]</sup>的观点。

本研究在 *CMO-A*、*CMO-H*、*CMO-B1*、*CMO-B2* 中分别有 26、28、29、29 个最优密码子, 其中分别包括 18、19、19、18 个以 A 或 U 结尾的密码子, 表明 4 种香蕉 *CMO* 基因对以 A 或 U 结尾的密码子偏好性最强, 这与前人对香蕉基因组密码子使用偏好性分析的结果并不一致<sup>[47]</sup>。蛋白理化性质分析结果显示 *CMO-A*、*CMO-H*、*CMO-B1* 与 *CMO-B2* 均属于酸性蛋白, 均不具有跨膜结构且都为亲水性蛋白。与前人对西瓜 (*Citrullus lanatus*) *CMO*<sup>[48]</sup>与沙棘 (*Hippophae rhamnoides*) *CMO*<sup>[49]</sup>蛋白预测结果一致。HANSON 等<sup>[9]</sup>认为 GB 的合成是在植物叶绿体基质中完成的, 且有研究表明具有 Rieske 型[2Fe-2S]

结构域的 *CMO* 蛋白定位在叶绿体基质中<sup>[50]</sup>, 与本研究亚细胞定位预测的一致。

本研究中, *CMO-A*、*CMO-H*、*CMO-B1*、*CMO-B2* 与 *EgCMO*、*PdCMO*、*ZmCMO*、*HvCMO*、*OsCMO* 5 种单子叶植物共同处于 1 个分支, 表明它们亲缘关系最近, 剩余的所有双子叶植物处于 1 个大支, 表明 *CMO* 在系统进化时, 单、双子叶植物之间有明显的分支。这与已经报道过的 *CMO* 在同一物种中亲缘关系较近的结果一致<sup>[40-41]</sup>, 并且前人通过比较香蕉基因组和单、双子叶植物基因组进化过程发现, 香蕉基因组与单子叶植物基因组更具有同源性<sup>[51]</sup>。*CMO* 是一种仅存在于植物中的加氧酶, 并且许多植物并不具有 *CMO*, 如拟南芥<sup>[52]</sup>、烟草<sup>[53]</sup>和水稻<sup>[41]</sup>等。有研究者认为部分植物缺乏功能性 *CMO* 或无 *CMO* 导致其不能自然积累 GB<sup>[53]</sup>。因此, *CMO* 物种内的分化时间较晚于不同物种之间的分化时间可能与一些植物不具备积累甜菜碱的能力有关。

越来越多的研究表明, 不同基因型物种间可能存在不同响应非生物胁迫的模式<sup>[54]</sup>, 在 4 个不同的小麦品种在干旱和盐胁迫条件下, *BADH-A1b* 型的表达水平以及甜菜碱积累量显著高于 *BADH-A1a* 型<sup>[44]</sup>, *CsCMO* 在抗寒性强的茶树品种中的表达量显著高于抗寒性弱的茶树品种<sup>[38]</sup>, 本研究 4 种基因型香蕉 *CMO* 基因表达量在渗透胁迫条件下都表现出不同程度的上调趋势, 表明香蕉 *CMO* 可以响应渗透胁迫, 这与前人关于 *CMO* 可以响应多种非生物胁迫的结论一致<sup>[24-26]</sup>。通过比较 4 种基因型香蕉渗透胁迫条件下 *CMO* 表达量可以发现, A 基因型纯合品种 (ZJ、BX) 的 *CMO* 表达量显著高于 A 基因型与 B 基因型杂合品种 (GD、JF) *CMO* 表达量, 推测可能是来源于香蕉 A 基因组的 *CMO* 基因较来源于 B 基因组的 *CMO* 基因具有更强的渗透胁迫响应能力从而导致其在不同基因型香蕉间差异表达。有观点认为, 不同基因型香蕉间可能存在不同的信号转导及响应模式, HU 等<sup>[35]</sup>通过转录组测序分析渗透胁迫、冷胁迫和盐胁迫下 ABB 基因型的粉蕉与 AAA 基因型的巴西蕉基因表达情况, 发现粉蕉与巴西蕉间存在基因差异表达现象, 并认为粉蕉较巴西蕉具有更独立的 ABA 信号网络; YANG 等<sup>[55]</sup>研究发现 ABB 基因型的 Dajiao 中细胞 MPK2 磷酸化信号通路较 AAA 基因型的 Cavendish 更为保守, 导致 Dajiao 耐寒性强于 Cavendish。不同基因型



香蕉也可能存在不同的转录激活模式, 来源不同基因组的 *CMO* 基因的转录对可能受到不同转录因子的诱导, 从而引起等位基因特异性表达, 最终导致不同基因型香蕉 *CMO* 表达量出现差异。前人通过转录组测序分析干旱胁迫条件下, 耐旱香蕉品种 Saba (ABB 基因型) 与敏感品种 Grand Naine (AAA 基因型) 基因表达情况, 结果表明有 46 种转录因子家族部分基因出现差异表达, 占到差异表达基因总数的 15.9%<sup>[56]</sup>。等位基因特异性表达是指在含有多于一组同源基因组的物种中存在的一种等位基因之间转录失衡的表达模式<sup>[57]</sup>, 在植物中, 这种基因表达模式可以由不同转录因子的调控而引起<sup>[58-59]</sup>。因此, 不同基因型香蕉 *CMO* 表达量的差异可能与转录调控水平差异导致的等位基因特异性表达密切相关。而本研究在 ZJ、BX、GD 和 JF 中来源不同的 *CMO* 基因是否存在等位基因特异性表达现象仍有待进一步验证, 并且不同的 *CMO* 基因表达差异是否导致不同基因型香蕉非渗透胁迫抗性出现差异及其影响香蕉渗透胁迫抗性的机制也有待解析。

本研究在 4 种不同基因型香蕉中鉴定分别来源于香蕉 A、B 基因组 *CMO* 基因, 并对其序列特征和蛋白结构与功能进行了解析, 探究了不同基因型香蕉 *CMO* 基因在渗透胁迫下的表达模式, 以确定其在不同基因型香蕉抗渗透胁迫过程中的作用, 为后续进一步揭示香蕉 A、B 基因组 *CMO* 等位基因与不同基因型香蕉抗逆性相关差异的分子机理奠定基础。

## 参考文献

- [1] RUDULIER D, STROM A R, DANDEKAR A M, SMITH, L T, VALENTINE R C. Molecular biology of osmoregulation[J]. Science, 1984, 224(4653): 1064-1068.
- [2] LIU Q, LIU R, ZHOU Y, WANG W, WU G, YANG N. Phospholipase D $\delta$  and H<sub>2</sub>S increase the production of NADPH oxidase-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to respond to osmotic stress-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiology, 2022, 270: 153617.
- [3] ALASVANDYARI F, MAHDAVI B. Effect of glycine betaine and salinity on photosynthetic pigments and ion concentration of safflower[J]. Desert, 2018, 23(2): 265-271.
- [4] PAN T, LIU M M, KRESLAVSKI V D, ZHARMUKHAMEDOV S K, NIE C R, YU M, KUZNETSOV V V, ALLAKHVERDIEV S I, SHABALA S. Non-stomatal limitation of photosynthesis by soil salinity[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2021, 51(12): 1735231.
- [5] HUANG H, ULLAH F, ZHOU D X, YI M, ZHAO Y. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses[J]. Front Plant Science, 2019, 10: 800.
- [6] ZHANG H, ZHU J, GONG Z, ZHU J K. Abiotic stress responses in plants[J]. Nature reviews Genetics, 2022(2): 23.
- [7] OZTURK M, UNAL B T, P GARCÍA-CAPARRÓS, KHURSHEED A, HASANUZZAMAN M. Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants[J]. Physiologia Plantarum, 2020(12): 1321-1335.
- [8] HENDRIX D L, PIERCE W S. Osmoregulation and membrane-mediated responses to altered water potential in plant cells[J]. Cryobiology, 1983, 20(4): 466-486.
- [9] HANSON A D, MAY A M, GRUMET R, BODE J, RHODES J D. Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985, 82(11): 3678-3682.
- [10] 张天鹏, 杨兴洪. 甜菜碱提高植物抗逆性及促进生长发育研究进展[J]. 植物生理学报, 2017, 53(11): 1955-1962.
- [10] ZHANG T P, YANG X H. Research progress of betaine in improving plant stress resistance and promoting growth and development[J]. Plant Physiology Journal, 2017, 53(11): 1955-1962. (in Chinese)
- [11] TISARUM R, THEERAWITAYA C, SAMPHUMPHUNG T, TAKABE T, CHA-UM S. Exogenous foliar application of glycine betaine to alleviate water deficit tolerance in two Indica rice genotypes under greenhouse conditions[J]. Agronomy, 2019, 9(3): 138.
- [12] YANG X, LU C. Effects of exogenous glycinebetaine on growth, CO<sub>2</sub> assimilation, and photosystem II photochemistry of maize plants[J]. Physiologia Plantarum, 2010, 127(4): 593-602.
- [13] 刘丹, 李爱华, 刘岱松, 周波, 吴自友, 黄凯. 甜菜碱在提高烟草抗逆性中的作用[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(7): 11-13, 19.
- [13] LIU D, LI A H, LIU D S, ZHOU B, WU Z Y, HUANG K. Role of betaine in improving stress resistance in tobacco[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(7): 11-13, 19. (in Chinese)
- [14] ZHANG J, TAN W, YANG X H, ZHANG H X. Plastid-expressed choline monooxygenase gene improves salt and drought tolerance through accumulation of glycine betaine in tobacco[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(6): 1113.
- [15] CHEN W P, CHEN T. Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L[J]. Plant Cell & Environment, 2000, 23(6): 609-618.

- [16] AHMED N, ZHANG Y, LI K, ZHOU Y, ZHANG M, LI Z. Exogenous application of glycine betaine improved water use efficiency in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) via modulating photosynthetic efficiency and antioxidative capacity under conventional and limited irrigation conditions[J]. The Crop Journal, 2019, 7(5): 65-80.
- [17] LI D, WANG M, ZHANG T, CHEN X, LI C, LIU Y, BRESTIC M, CHEN THH, YANG X. Glycinebetaine mitigated the photoinhibition of photosystem II at high temperature in transgenic tomato plants[J]. Photosynthesis Research, 2021, 147: 301-315.
- [18] 梁峥, 骆爱玲. 甜菜碱和甜菜碱合成酶[J]. 植物生理学报, 1995, 31(1): 1-8.  
LIANG Z, LUO A L. Betaine and betaine synthetase[J]. Plant Physiology Journal, 1995, 31(1): 1-8. (in Chinese)
- [19] ANNUNZIATA M G, CIARMIELLO L F, WOODROW P, DELL'AVERSANA E, CARILLO P. Spatial and temporal profile of glycine betaine accumulation in plants under abiotic stresses[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1-13.
- [20] ALI S, ABBAS Z, SELEIMAN M F, RIZWAN M, YAVAS İ, ALHAMMAD B A, SHAMI A, HASANUZZAMAN M, KALDERIS D. Glycine betaine accumulation, significance and interests for heavy metal tolerance in plants[J]. Plants, 2020, 9(7): 896.
- [21] BROUQUISSE R, WEIGEL P, RHODES D, YOCUM C F, HANSON A D. Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma[J]. Plant Physiology, 1989, 90(1): 322-329.
- [22] HIBINO T, WADITEE R, ARAKI E, ISHIKAWA H, AOKI K, TANAKA Y, TAKABE T. Functional characterization of choline monooxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(44): 41352-41360.
- [23] RATHINASABAPATHI B, MCCUE K F, GAGE D A, HANSON A D. Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance[J]. Planta, 1994, 193(2): 155-162.
- [24] ZAHOOR A, SHAZIA A, AHMAD W E, ASHAR A M, TANVEER A, SABIR T R M, RASHID A, AAMIR I M. Growth, physiology, and biochemical activities of plant responses with foliar potassium application under drought stress - a review[J]. Journal of Plant Nutrition, 2018, 41(13): 1734-1743.
- [25] KHAN M S, XIANG Y, KIKUCHI A, ASAHINA M, WATANABE K N. Genetic engineering of glycine betaine biosynthesis to enhance abiotic stress tolerance in plants[J]. Plant Tissue Culture Letters, 2009, 26: 125-134.
- [26] RUSSELL B L, HANSON R A D. Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth[J]. Plant Physiology, 1998, 116(2): 859.
- [27] SHIRASAWA K, TAKABE T, TAKABE T, KISHITANI S. Accumulation of glycinebetaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress[J]. Annals of Botany, 2006, 98(3): 565-571.
- [28] 谢江辉. 新中国果树科学研究 70 年: 香蕉[J]. 果树学报, 2019, 36(10): 179-190.  
XIE J H. Fruit scientific research in New China in the past 70 years: banana[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(10): 179-190. (in Chinese)
- [29] SIMMONDS N W, SHEPHERD K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas[J]. Botanical Journal of The Linnean Society, 1955, 55: 302-312.
- [30] 金志强. 香蕉基因组学研究 20 年: 成就与挑战[J]. 热带作物学报, 2020, 41(10): 2003-2012.  
JIN Z Q. Twenty years of genomics research in banana (*Musa* L.): achievements and challenges[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(10): 2003-2012. (in Chinese)
- [31] 王泽槐, 梁立峰. 香蕉冷害过程叶片抗坏血酸含量及过氧化氢酶活性的变化[J]. 华南农业大学学报, 1994, 15(3): 71-76.  
WANG Z H, LIANG L F. Changes of ascorbic acid content and catalase activity in leaves during banana cold damage[J]. Journal of South China Agricultural University, 1994, 15(3): 71-76. (in Chinese)
- [32] LIU J, MENG J, CHEN H, LI X, SU Z, CHEN C, NING T, HE Z, DAI L, XU C. Different responses of banana classical AGP genes and cell wall AGP components to low-temperature between chilling sensitive and tolerant cultivars[J]. Plant Cell Reports, 2022, 41(8): 1693-1706.
- [33] RAVI I, UMA S, VAGANAN M M, MUSTAFFA M M. Phenotyping bananas for drought resistance[J]. Front Physiology, 2013, 4: 9.
- [34] WANG R, XU Y, LIX G, SHEN Y, WANG L X, XIE Z S. Comparison of drought tolerance of banana genotypes[J]. Genetics and Molecular Research, 2020, 19(2): 18544.
- [35] HU W, DING Z, TIE W, YAN Y, LIU Y, WU C, LIU J, WANG J, PENG M, XU B, JIN Z. Comparative physiological and transcriptomic analyses provide integrated insight into osmotic, cold, and salt stress tolerance mechanisms in banana[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 43007.
- [36] WU Q, MA Z Z, QIN Y L, LI Y M, HUANG B Z, ZHANG X L, DU L N, SONG J, ZHANG Z Q, PANG X Q. Imbalanced expression of *stay-green 1* alleles in banana

- AAB/ABB cultivars prevents high-temperature-induced green ripening as in AAA Cavendish fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2019, 158: 110980.
- [37] RAVI I, VAGANAN M M. Abiotic stress tolerance in banana[J]. *Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops*, 2016: 207-222.
- [38] 曹红利, 岳川, 郝心愿, 王新超, 杨亚军. 茶树胆碱单加氧酶 *CsCMO* 的克隆及甜菜碱合成关键基因的表达分析[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(15): 3087-3096.
- CAO H L, YUE C, HAO X Y, WANG X C, YANG Y J. Cloning of *Choline Monooxygenase (CMO)* gene and expression analysis of the key glycine betaine biosynthesis-related genes in tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(15): 3087-3096. (in Chinese)
- [39] XU Z, SUN M, JIANG X, SUN H, DANG X, CONG H, QIAO F. Glycinebetaine biosynthesis in response to osmotic stress depends on jasmonate signaling in watermelon suspension cells[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1469.
- [40] MITSUYA S, KUWAHARA J, OZAKI K, SAEKI E, FUJIWARA T, TAKABE T. Isolation and characterization of a novel peroxisomal choline monooxygenase in barley[J]. *Planta*, 2011, 234(6): 1215-1226.
- [41] LUO D, NIU X, YU J, YAN J, GOU X, LU B R, LIU Y. Rice choline monooxygenase (*OsCMO*) protein functions in enhancing glycine betaine biosynthesis in transgenic tobacco but does not accumulate in rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(9): 1625-1635.
- [42] CHEN C, LI J, FENG J, LIU B, FENG L, YU X, LI G, ZHAI J, MEYERS BC, XIA R. sRNAanno-a database repository of uniformly annotated small RNAs in plants[J]. *Horticulture Research*, 2021(1): 45.
- [43] JIANG S, LV F, GAO L, GU J, YANG R, LI S, LI Y, LI S, WANG P. Novel R2R3-MYB transcription factor LiMYB75 enhances leaf callus regeneration efficiency in *Lagerstroemia indica*[J]. *Forests*, 2023, 14(3): 517.
- [44] YU M, YU Y, GUO S, ZHANG M, LI N, ZHANG S, ZHOU H, WEI F, SONG T, CHENG J, FAN Q, SHI C, FENG W, WANG Y, XIANG J, ZHANG X. Identification of *TaBADH-A1* allele for improving drought resistance and salt tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Front Plant Science*, 2022, 13: 942359.
- [45] BROWN A, TUMUHIMBISE R, AMAH D, UWIMANA B, NYINE M, MDUMA H, TALENGERA D, KARAMURA D, KURIBA J, SWENNEN R. Bananas and Plantains (*Musa* spp.)[J]. *Genetic Improvement of Tropical Crops*, 2017: 219-240.
- [46] JERIDI M, BAKRY F, ESCOUTE J, FONDI E, CARREEL F, FERCHICHI A, D'HONT A, RODIER-GOUD M. Homologous chromosome pairing between the A and B genomes of *Musa* spp. revealed by genomic in situ hybridization[J]. *Annals of Botany*, 2011, 108(5): 975-981.
- [47] 曲俊杰, 黄羽, 卢江, 魏征, 尹玲. 香蕉基因组密码子使用偏好性分析[J]. *南方农业学报*, 2017, 48(1): 14-19.
- QU J J, HUANG Y, LU J, WEI Z, YIN L. Uodon usage bias of banana genome[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2017, 48(1): 14-19. (in Chinese)
- [48] 孙梦利, 徐子健, 龙娅丽, 乔飞, 党选民. 西瓜 *CMO* 基因序列分析及受乙烯诱导后表达特性分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(1): 350-357.
- SUN M L, XU Z J, LONG Y L, QIAO F, DANG X M. Analysis of *CMO* gene sequence and expression characteristic induced by ethylene in watermelon (*Citrullus lanatus*)[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(1): 350-357. (in Chinese)
- [49] 刘青青, 马玉花, 董佳伟, 冶贵生, 张丹, 杨开宇. 干旱胁迫下沙棘 *CMO* 基因的时空表达模式与蛋白结构预测[J]. *西北林学院学报*, 2024, 39(2): 21-27.
- LIU Q Q, MA Y H, DONG J W, YE G S, ZHANG D, YANG K Y. Temporal and spatial expression patterns and protein structure prediction of seabuckthorn *CMO* gene under drought stress[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2024, 39(2): 21-27. (in Chinese)
- [50] GUBERNATOR B, KRÓLICEWSKI J, KALLAS T, SZCZEPANIAKA A. Iron-sulfur cluster reconstitution of spinach chloroplast Rieske protein requires a partially prefolded apoprotein[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2006, 1764(4): 735-742.
- [51] DENOEUDE F, CARREEL F, AURY J M, BAURENS F C, AL E, D'HONT A. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants[J]. *Nature*, 2012, 488: 213-219.
- [52] ALIA H H, MUSTARDY L, DESHNIUM P, IDA M, MURATA N. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress[J]. *Plant Journal*, 1997, 12(1): 133-142.
- [53] NUCCIO M L, RUSSELL B L, NOLTE K D, RATHIN-ASABAPATHI B, GAGE D A, HANSON A D. The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase[J]. *Plant Journal*, 1998, 16(4): 487-496.
- [54] NELSON S C, PLOETZ R C, KEPLER A K. *Musa* species (banana and plantain)[J]. *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*, 2006, 15(2): 251-259.
- [55] YANG Q S, GAO J, HE W D, HE W D, DING L J, WU J H, LI C Y, PENG X X, ZHANG S, YI G J. Comparative

- transcriptomics analysis reveals difference of key gene expression between banana and plantain in response to cold stress[J]. *Bmc Genomics*, 2015, 16: 1-18.
- [56] MUTHUSAMY M, UMA S, BACKIYARANI S, SARASWATHI M S, CHANDRASEKAR A. Transcriptomic changes of drought-tolerant and sensitive banana cultivars exposed to drought stress[J]. *Front Plant Sciences*, 2016, 7: 1609.
- [57] HOGUIN A, RASTOGI A, BOWLER C, TIRICHINE L. Genome-wide analysis of allele-specific expression of genes in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 2954.
- [58] VON KORFF M, RADOVIC S, CHOUMANE W, STAMATI K, UDUPA S M, GRANDO S, CECCARELLI S, MACKAY I, POWELL W, BAUM M, MORGANTE M. Asymmetric allele-specific expression in relation to developmental variation and drought stress in barley hybrids[J]. *Plant Journal*, 2009, 59(1): 14-26.
- [59] ZHANG Q, YE Z, WANG Y, ZHANG X, KONG W. Haplotype-resolution transcriptome analysis reveals important responsive gene modules and allele-specific expression contributions under continuous salt and drought in *Camellia sinensis*[J]. *Genes*, 2023, 14(7): 1417.