

# 香蕉果实 *MaGBSSI* 基因家族的克隆及表达分析

苗红霞<sup>1</sup>, 金志强<sup>1,2</sup>, 孙佩光<sup>2</sup>, 刘菊华<sup>1</sup>, 贾彩红<sup>1</sup>, 徐碧玉<sup>1</sup>

(1. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海南 海口 571101;

2. 中国热带农业科学院 海口实验站, 海南省香蕉遗传育种改良重点实验室, 海南 海口 570102)

**摘要:**以“巴西”蕉(*Musa acuminata* L. AAA group cv. Brazilian)为试材, 利用同源克隆法获得 4 个颗粒结合淀粉合成酶 I(Granule-Bound Starch Synthase I, GBSSI)基因家族成员的 cDNA 全长, 运用 MEGA 5.05 软件进行聚类分析, 并通过 quantitative real-time PCR(qPCR)技术检测 *MaGBSSI* 基因家族成员在香蕉果实不同发育时期及成熟阶段和不同组织中的表达情况。结果表明:香蕉 4 个 *MaGBSSI* 基因家族成员 *MaGBSSI*-1、*MaGBSSI*-2、*MaGBSSI*-3、*MaGBSSI*-4 的 cDNA 全长分别为 1 851、1 851、675、1 845 bp, 登录号分别为 KF512020、KF512021、KF512022、KF512023。聚类分析发现, 香蕉 *MaGBSSI* 基因家族与其它植物 GBSSI 基因同源性达 65%。qPCR 分析发现, *MaGBSSI*-1、*MaGBSSI*-2、*MaGBSSI*-4 在香蕉根、球茎、叶片和苞片等营养器官中明显上调表达, 而 *MaGBSSI*-3 在花、果皮、果肉等生殖器官中表达量比较高, 在根、球茎及叶片中几乎不表达。香蕉果实发育过程中, *MaGBSSI*-1、*MaGBSSI*-2、*MaGBSSI*-4 在 0~30 d 明显上调表达, 而 *MaGBSSI*-3 在香蕉果实发育 30~60 d 表达量比较高, 在 0~30 d 几乎不表达, 且随着果实的成熟, *MaGBSSI*-3 表达量逐渐下降。研究结果为阐明香蕉果实的直链淀粉生物合成及降解机制并对其进行表达调控奠定了基础。

**关键词:**香蕉; 果实; *MaGBSSI* 基因; 克隆; 表达分析

**中图分类号:**S 668.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)20-0115-06

香蕉(*Musa* spp.)的主要经济价值体现在果实,且在果实发育过程中具有以淀粉积累为主的特点<sup>[1-2]</sup>。刚采收时香蕉果实中总淀粉含量占 70%~80%,直链淀粉含量占 20%~30%,其中直链淀粉含量直接影响香蕉果实的抗性淀粉含量及糯性、质地等品质<sup>[3]</sup>。而颗粒结合淀粉合成酶(Granule-Bound Starch Synthase, GBSS)是决定直链淀粉合成的关键酶,它在植物细胞中与淀粉颗粒紧密结合,使合成的直链淀粉保持未分支状态,是与发育中的淀粉结合的唯一有活力的蛋白<sup>[4]</sup>。单子叶植物 GBSS 有 2 种同工酶,分别是 GBSSI 和 GBSSII,GBSSI 由 *waxy* 基因编码,在小麦中位于第 7 染色体上<sup>[5]</sup>,水稻中该基因位于第 6 染色体上<sup>[6]</sup>,玉米中位于第 9 染色体

上<sup>[7]</sup>,主要控制种子、胚乳等贮藏器官直链淀粉合成,而 GBSSII 主要控制根、茎、叶等营养器官直链淀粉合成,双子叶植物只有 GBSSII 单个家族,且功能与单子叶植物 GBSSII 相似<sup>[5]</sup>。

GBSS 基因是一个基因家族编码的单拷贝或低拷贝基因,其 cDNA 全长为 0.6~2.4 kb,包含 6~13 个外显子,编码 200~800 个氨基酸,蛋白大小为 30.0~70.0 kDa。目前,在水稻(*OxGBSSI*、*OxGBSSII*)<sup>[6]</sup>、小麦(*TaGBSSI*、*TaGBSSII*)<sup>[5]</sup>、玉米(*ZmGBSSI*、*ZmGBSSII*)<sup>[7]</sup>、马铃薯(*StGBSS*)<sup>[8]</sup>、大麦(*GBSSI*)<sup>[9]</sup>、苋菜(*GBSSI*)<sup>[10]</sup>、拟南芥(*AtGBSS*)<sup>[11]</sup>以及苹果(*MalGBSSII*-1、*MalGBSSII*-2、*MalGBSSII*-3)、桃(*PpGBSSII*-1、*PpGBSSII*-2)、柑橘(*CsGBSSII*-1、*CsGBSSII*-2)<sup>[11]</sup>等多种植物中克隆到编码 GBSS 的基因,且 GBSSI 主要在花、果实、胚乳等生殖器官中表达,而 GBSSII 主要在根、茎、叶等营养器官中表达<sup>[11]</sup>,但目前有关香蕉果实 GBSSI 基因的研究报道很少。

为了深入研究 GBSSI 在香蕉果实直链淀粉生物合成过程中的作用,该研究以“巴西”蕉果实为试材,利用同源克隆法对香蕉果实 *MaGBSSI* 基因家族成员的 cDNA 全长进行克隆,并对其在不同组织、不同发育时期及成

**第一作者简介:**苗红霞(1982-),女,博士,助理研究员,研究方向为香蕉分子生物学。E-mail:hxmrain@163.com.

**责任作者:**徐碧玉(1962-),女,博士,研究员,博士生导师,研究方向为香蕉遗传育种。E-mail:biyuxu@126.com.

**基金项目:**“十二五”农村领域国家科技计划资助项目(2011AA10020605);现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-32);海南省自然科学基金资助项目(314116);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(ITBB140205)。

**收稿日期:**2014-06-24

熟阶段的表达特性进行 qPCR 分析,为研究 MaGBSSI 在香蕉果实直链淀粉生物合成中的表达调控机制奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试“巴西”蕉(*Musa acuminata* L. AAA group cv. Brazilian)果实采自中国热带农业科学院热带生物技术研究所澄迈香蕉试验基地;定植土壤为红壤土(pH 4.5~5.0),生长旺盛期每日每株灌水量为 30~40 kg,肥料管理采取勤施少量的策略,每株施钾肥和复合肥各 0.1~0.2 kg,施后淋水,以利于根系吸收,每株蕉梳数为 7~8 疏。分别于果实发育 0、10、20、30、40、50、60 d(采收)取样。每个时段取 4~6 支果指中部果肉 20~50 g,液氮速冻后-70℃保存备用。

选择果实饱满度为七成的果实采收,当天运回实验室,选大小均匀、无病虫害及机械损伤的单果指,去掉顶部干花,用 0.1%次氯酸钠表面消毒 10 min,晾干过夜后将 30 支果指置于 22℃条件下自然成熟,并于采收后 0、5、10、15、20、25、30 d 取样。重复 3 次,每个重复取 4 支果指中部果肉 20~50 g,液氮速冻后-70℃保存备用。

表 1 扩增 MaGBSSI-3 基因家族成员的引物序列和 PCR 反应程序

Table 1 Primer sequences and PCR amplification procedures of MaGBSSI-3 gene family members

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequences (5'~3')	PCR 反应程序 PCR amplification procedures
MaGBSSI-1-F	CCCATGGGATGGCTGCTGTGATG	94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 120 s, 35 cycles; 72℃ 10 min
MaGBSSI-1-R	GACTAGTCTCATGGAGCGGCCAC	
MaGBSSI-2-F	CCCATGGGATGGCTGCTGTAACAA	94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 120 s, 35 cycles; 72℃ 10 min
MaGBSSI-2-R	GACTAGTCTCAGGGAGTGGCCACAT	
MaGBSSI-3-F	CCCATGGGATGGACACAAATGAGTG	94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35 cycles; 72℃ 10 min
MaGBSSI-3-R	GACTAGTCTTACTTCTTAGTGGTCCCT	
MaGBSSI-4-F	CCCATGGGATGGGACTGTGACGGT	94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 120 s, 35 cycles; 72℃ 10 min
MaGBSSI-4-R	GACTAGTCTCAGGGGTGGCCATGT	
MaGBSSI-1-qPCR-F	CCTTCAGTGTGGAGTGTGCTGTTG	95℃ 1 min; 95℃ 10 s, 56℃ 15 s, 72℃ 35 s, 40 cycles
MaGBSSI-1-qPCR-R	ATTGCTCCCACTTCTTGCCAGGTG	
MaGBSSI-2-qPCR-F	TGTCATAGAAGGCATCACAGGT	95℃ 1 min; 95℃ 10 s, 55℃ 15 s, 72℃ 35 s, 40 cycles
MaGBSSI-2-qPCR-R	CCACTTCTTAGCAGGTCCCTTCCA	
MaGBSSI-3-qPCR-F	CACCACTGGGACTCGTTGA	95℃ 1 min; 95℃ 10 s, 55℃ 15 s, 72℃ 35 s, 40 cycles
MaGBSSI-3-qPCR-R	GATCTTGGTCCATGCAGTTCT	
MaGBSSI-4-qPCR-F	GTTGACAAGGAGGACATAGAAAAAG	95℃ 1 min; 95℃ 10 s, 56℃ 15 s, 72℃ 35 s, 40 cycles
MaGBSSI-4-qPCR-R	TGGGCGAAGGCGGAGTACGGTAG	
MaActin-F	CAGTGGTCTGTAACCTGGTAT	95℃ 1 min; 95℃ 10 s, 55℃ 15 s, 72℃ 35 s, 40 cycles
MaActin-R	ATCCTCCAATCCAGACACTGT	

1.2.3 MaGBSSI 基因家族成员的聚类分析 将所得 MaGBSSI 基因家族成员全长 cDNA 序列通过 ExPASy 的 Translate Tool (<http://cn.expasy.org/tools/dna.html>) 推导出对应的氨基酸序列。并通过 Blast X 软件搜索同源氨基酸序列,比对其是否为该基因的完整序列。确认氨基酸序列的正确性之后,采用 MEGA 5.05 软件中的 neighbour-joining methods 进行聚类分析。

1.2.4 MaGBSSI 基因家族成员的表达分析 根据获

### 1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 第一链合成 采用改良 CTAB 法提取总 RNA,具体操作步骤参照文献[12]。以总 RNA 为模板,采用 cDNA 合成试剂盒(PrimeScript™ RT-PCR Kit, TaKaRa)生成 cDNA 第一链,具体操作参考试剂盒说明书进行。

1.2.2 MaGBSSI 基因家族成员的克隆 以合成的 cDNA 为模板,在“巴西”蕉采后 2 d 果实 cDNA 文库<sup>[13]</sup>和香蕉 A 基因组(<http://banana-genome.cirad.fr/>)序列分析的基础上设计引物,引物序列见表 1。采用 PrimeScript™ RT-PCR Kit(TaKaRa)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:0.25 μL ExTaq, 2.5 μL 10× PCR buffer, 0.25 μL dNTP(10 mM), 上、下游引物(10 μM)各 0.5 μL, 19.5 μL ddH<sub>2</sub>O 和 2.0 μL cDNA(100 ng),扩增程序见表 1。PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物回收参照 DNA 凝胶回收试剂盒(Agarose Gel DNA Purification Kit, TaKaRa)说明书上的步骤进行。连接连载体为 pMD19-T(TaKaRa),酶切鉴定后,每个基因选取 3 个克隆进行测序。测序工作委托广州英骏生物技术有限公司完成。

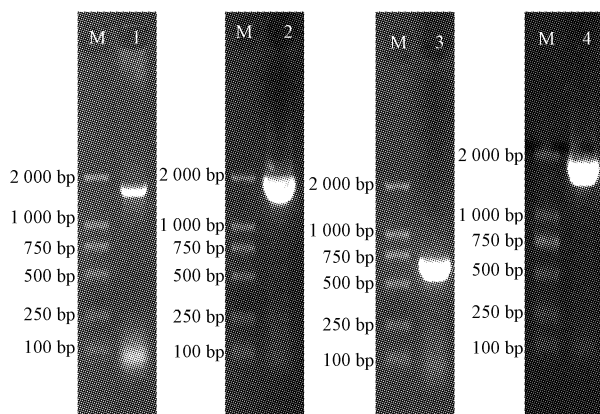
得的基因全长 cDNA 序列,运用 Primer Premier 5.0 软件设计符合 qPCR 要求的目的基因引物及内参基因 Maactin 引物(表 1)。按照 TOYOBO Real-Time PCR Master Mix 试剂盒说明书,20.0 μL 的反应体系为: ddH<sub>2</sub>O 6.4 μL, SYBR® Green Real-time PCR Master Mix 10.0 μL, primer-F(10 μM) 0.8 μL, primer-R(10 μM) 0.8 μL, 模板 2.0 μL(80 ng)。在 iQ5 Real-Time PCR Detection System 上进行 qPCR 反应,扩增程序见表 1,每

个样 3 次重复。qPCR 数据分析: 反应结束后运用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法<sup>[14]</sup> 进行数据处理, 计算出 *MaGBSSI* 基因家族成员在不同组织和不同时间段的相对表达量。该试验均设 3 次重复, 取平均值用于结果分析, 以 ddH<sub>2</sub>O 为阴性对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MaGBSSI* 基因家族成员 cDNA 全长的获得及聚类分析

以“巴西”蕉果肉 cDNA 为模板, 采用同源克隆法获得了 4 个 *MaGBSSI* 基因家族成员的 cDNA 全长(图 1), 经测序后分析确认, *MaGBSSI*-1、*MaGBSSI*-2、*MaGBSSI*-3、*MaGBSSI*-4 的 cDNA 全长分别为: 1 851、1 851、675、1 845 bp, 分别编码 616、616、224、614 个氨基酸; 将 4 个基因家族成员分别登录到 GenBank 数据库, 登录号分别为: KF512020、KF512021、KF512022、KF512023。



注: M; DL 2 000 marker; 1; *MaGBSSI*-1 基因; 2; *MaGBSSI*-2 基因; 3; *MaGBSSI*-3 基因; 4; *MaGBSSI*-4 基因。

Note: M; DL 2 000 marker; 1; *MaGBSSI*-1 gene; 2; *MaGBSSI*-2 gene; 3; *MaGBSSI*-3 gene; 4; *MaGBSSI*-4 gene.

图 1 香蕉 *MaGBSSI* 基因家族成员 cDNA 全长的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR products of full-length cDNA of four *MaGBSSI* gene family members from banana

通过 MEGA 5.05 软件聚类分析发现, 4 个 *MaGBSSI* 基因家族成员氨基酸的同源性在 73%~82% 之间(图 2)。将 4 个 *MaGBSSI* 基因家族成员序列提交至 NCBI 的 Blastx 数据库进行相似性比对, 结果香蕉 *MaGBSSI* 与苹果 (*Malus × domestica*, 登录号 ACB97678)、陆地棉 (*Gossypium hirsutum*, 登录号 ACV72639)、大豆 (*Glycine max*, 登录号 NP001237971) 等植物 *GBSSI* 基因同源性达 65% 以上。

### 2.2 *MaGBSSI* 基因家族成员在香蕉不同组织中的表达特性

以香蕉根、球茎、叶片、苞片、花、果皮、果肉 cDNA 为模板, qPCR 分析结果见图 3。 *MaGBSSI*-1、*MaGBSSI*-2、

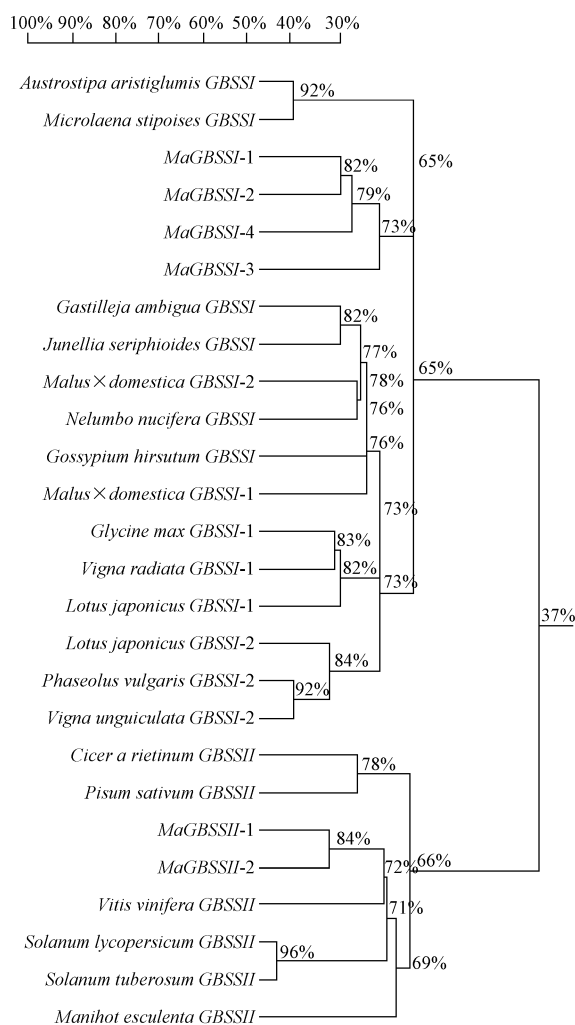


图 2 香蕉 *MaGBSSI* 与其它植物 *GBSSI* 氨基酸序列的进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of *MaGBSSI* and *GBSSI* amino acid sequences from banana and other plant species

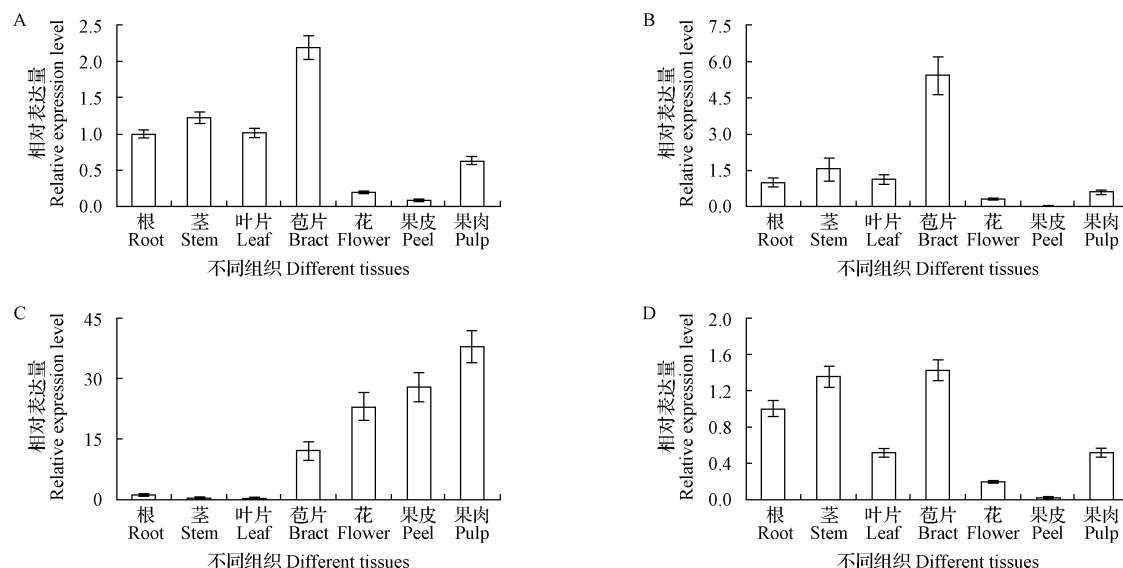
*MaGBSSI*-4 在香蕉根、球茎、叶片及苞片中明显上调表达, 在花、果皮、果肉中几乎不表达, 且在苞片中的表达量约为果皮的 10 倍(图 3-A、B、D); 而 *MaGBSSI*-3 在花、果皮、果肉中表达量比较高, 在根、球茎及叶片中几乎不表达, 且在果肉中的表达量约为根的 40 倍(图 3-C), 这一结果表明, *MaGBSSI*-1、*MaGBSSI*-2、*MaGBSSI*-4 可能主要涉及到香蕉根、球茎、叶片等营养器官直链淀粉的合成, 而 *MaGBSSI*-3 可能与香蕉花、果皮、果肉等生殖器官直链淀粉的合成有关。

### 2.3 *MaGBSSI* 基因家族成员在香蕉果实发育过程中的表达分析

以香蕉果实发育 0、10、20、30、40、50、60 d 的 cDNA 为模板, qPCR 分析结果见图 4。 *MaGBSSI*-1、*MaGBSSI*-2、*MaGBSSI*-4 在香蕉果实发育 0~30 d 明显上调表达, 在 30~60 d 几乎不表达, 且 *MaGBSSI*-1 在果实发育 10 d

的表达量约为 60 d 的 240 倍(图 4-A、B、D),而 *MaGBSSI-3* 在香蕉果实发育 30~60 d 表达量比较高,在 0~30 d 几乎不表达,且在果实发育 60 d 的表达量约为 0 d 的 500 倍(图 4-C),这一结果表明,*MaGBSSI-1*、*MaGB-*

*SSI-2*、*MaGBSSI-4* 可能主要涉及到香蕉果实发育前期(0~30 d)直链淀粉的合成,而 *MaGBSSI-3* 可能与香蕉果实发育后期(30~60 d)直链淀粉的合成有关。



注:A;*MaGBSSI-1* 基因;B;*MaGBSSI-2* 基因;C;*MaGBSSI-3* 基因;D;*MaGBSSI-4* 基因。以下同。

Note: A; *MaGBSSI-1* gene; B; *MaGBSSI-2* gene; C; *MaGBSSI-3* gene; D; *MaGBSSI-4* gene. The same below.

图 3 *MaGBSSI* 基因家族成员在香蕉不同组织中的表达分析

Fig. 3 Expression of *MaGBSSI* gene family members in different tissues of banana

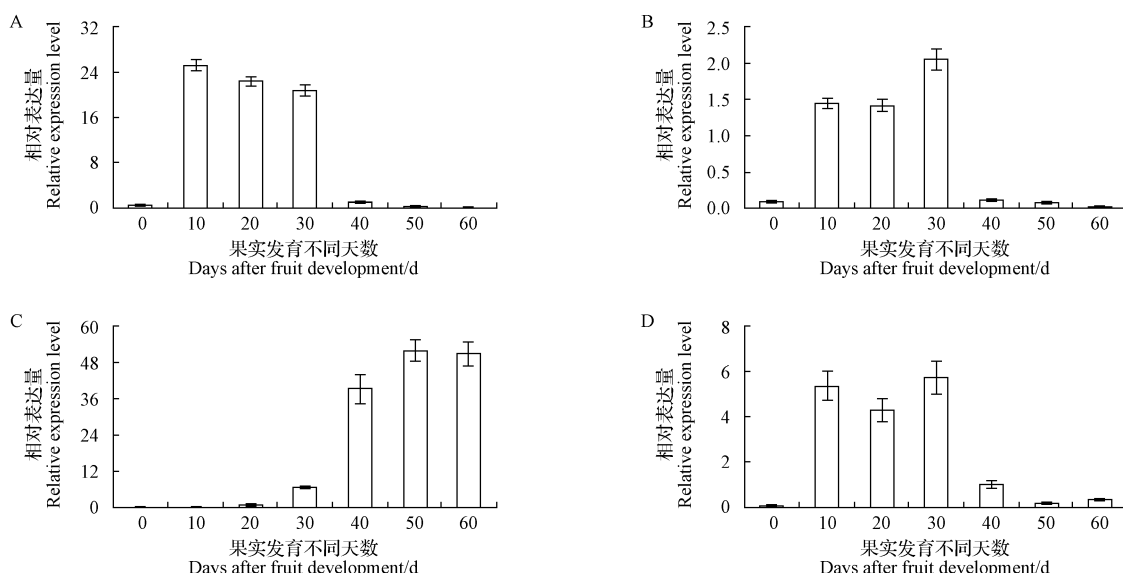


图 4 *MaGBSSI* 基因家族成员在香蕉发育过程中的表达分析

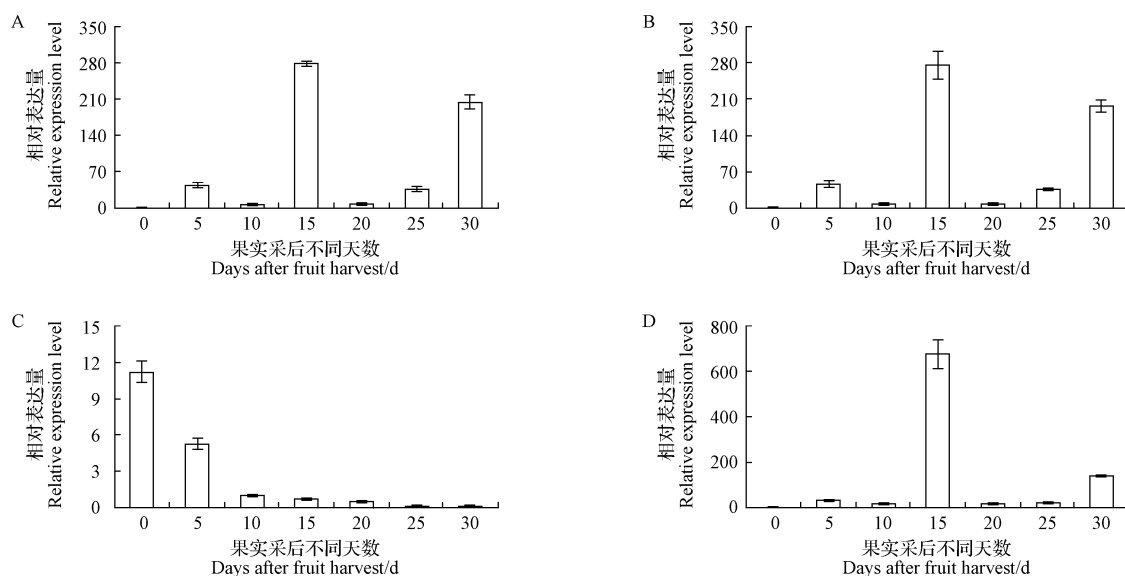
Fig. 4 Expression analysis of *MaGBSSI* gene family members in different development stages of banana

## 2.4 *MaGBSSI* 基因家族成员在香蕉果实成熟过程中的表达分析

以香蕉果实采后 0、5、10、15、20、25、30 d 的 cDNA 为模板,qPCR 分析结果见图 5。*MaGBSSI-1*、*MaGBSSI-2*、*MaGBSSI-4* 在香蕉果实采后 15、30 d 表达量较高,其它

时段表达量相对较低(图 5-A、B、D),而 *MaGBSSI-3* 随着香蕉果实的成熟,表达量逐渐下降,与采收后 0 d 相比较,采收后 30 d *MaGBSSI-3* 的表达量下降了约 110 倍(图 5-C),这一结果表明,*MaGBSSI-3* 表达量下降可能与香蕉果实成熟过程中直链淀粉的降解有关。



图5 *MaGBSSI* 基因家族成员在香蕉果实成熟过程中的表达分析Fig. 5 Expression of *MaGBSSI* gene family members in different days after banana harvest

### 3 讨论与结论

直链淀粉是香蕉果实的主要成分之一,它的含量直接影响香蕉的产量和品质。*GBSS* 是决定直链淀粉合成的关键酶基因,包括 *GBSSI* 和 *GBSSII* 两大家族,*GBSSI* 是决定生殖器官直链淀粉合成的关键酶基因,在水稻<sup>[16]</sup>、玉米<sup>[16]</sup>、马铃薯<sup>[17]</sup>、马齿苋<sup>[18]</sup>、苹果、桃及柑橘<sup>[12]</sup>等植物中均有报道。然而,目前有关香蕉果实直链淀粉的研究主要集中在直链淀粉颗粒结构和水解酶<sup>[19]</sup>、酚含量和抗氧化能力<sup>[20]</sup>,以及物理和化学加工性能<sup>[3]</sup>等方面,对于调控香蕉果实直链淀粉合成的关键酶基因 *GBSSI* 的研究报道尚少。该试验所克隆的 4 个香蕉 *MaGBSSI* 基因家族成员与其它植物报道的 *GBSSI* 基因同源性为 65%,不同组织特异性表达分析发现,4 个香蕉 *MaGBSSI* 基因家族成员中只有 *MaGBSSI-3* 在花、果皮、果肉等生殖器官中表达,而其它 3 个成员均在根、球茎、叶片等营养器官中表达,推测 *MaGBSSI-3* 可能是调控香蕉果实直链淀粉合成的主要成员。

在香蕉果实发育过程中,直链淀粉含量呈逐渐上升趋势,占果肉干重比例由 3.87% 上升到 23.33%<sup>[21]</sup>,*GBSS* 活性由 0 U/min 上升到 3.15 U/min<sup>[22]</sup>。该试验发现,*MaGBSSI-3* 随着香蕉果实的发育,表达量逐渐上升,与直链淀粉含量、*GBSS* 活性等变化相一致。而其它 3 个成员在香蕉果实发育前期(0~30 d)明显上调表达,而果实发育后期(30~60 d)几乎不表达,这一结果推测,*MaGBSSI-1*、*MaGBSSI-2*、*MaGBSSI-4* 可能主要涉及到香蕉果实发育前期直链淀粉的合成,而 *MaGBSSI-3* 可能与香蕉果实发育后期直链淀粉的合成密切相关。

在香蕉果实自然后熟过程中,直链淀粉含量由 21.60% 迅速下降到 1.38% 以下<sup>[21]</sup>,*GBSS* 活性由 3.170 U/min 下降到 0.012 U/min<sup>[22]</sup>。*MaGBSSI-1*、*MaGBSSI-2*、*MaGBSSI-4* 在香蕉果实采后 15、30 d 表达量较高,其它时段表达量相对较低,而 *MaGBSSI-3* 随着香蕉果实的成熟,直链淀粉含量的下降,表达量逐渐下调,因此推测在香蕉果实成熟过程中,*MaGBSSI-3* 表达量的下降可能与直链淀粉降解有关,但仍需对 *MaGBSSI-3* 基因在香蕉果实直链淀粉合成及降解中的功能进一步鉴定。

(该文作者还有张建斌,单位同第一作者。)

### 参考文献

- [1] D'Hont A, Denoeud F, Aury J, et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants [J]. *Nature*, 2012, 488: 213-217.
- [2] Aparicio-Saguilan A, Osorio-Diaz P, Agama-Acevedo E, et al. Tortilla added with unripe banana and cassava flours: chemical composition and starch digestibility [J]. *CyTA-J Food*, 2013, 11(1): 90-95.
- [3] Utrilla-Coello R G, Rodriguez-Huezo M E, Carrillo-Navas H, et al. In vitro digestibility, physicochemical, thermal and rheological properties of banana starches [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 101: 154-162.
- [4] Krishnan H B, Chen M. Identification of an abundant 56 kDa protein implicated in food allergy as granule-bound starch synthase [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(22): 5404-5409.
- [5] Vrinten P L, Nakamura T. Wheat granule-bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues [J]. *Plant Physiol*, 2000, 122(1): 255-264.
- [6] Dian W, Jiang H, Chen Q, et al. Cloning and characterization of the granule-bound starch synthase II gene in rice: gene expression is regulated by the nitrogen level, sugar and circadian rhythm [J]. *Planta*, 2003, 218: 261-268.
- [7] Hylton C M, Denyer K, Keeling P L, et al. The effect of *uazy* muta-

tions on the granule-bound starch synthases of barley and maize endosperms [J]. *Planta*, 1996, 198: 230-237.

[8] Dry I, Smith A, Edwards A, et al. Characterization of cDNAs encoding two isoforms of granule-bound starch synthase which show differential expression in developing storage organs of pea and potato [J]. *Plant J*, 1992, 2(2): 193-202.

[9] Li Z, Li D, Du X, et al. The barley *amo1* locus is tightly linked to the starch synthase IIIa gene and negatively regulates expression of granule-bound starch synthetic genes [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(14): 5217-5231.

[10] Park Y J, Nemoto K, Nishikawa T, et al. Genetic diversity and expression analysis of granule bound starch synthase I gene in the new world grain amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) [J]. *J Cereal Sci*, 2011, 53(3): 298-305.

[11] Cheng J, Khan M A, Qiu W M, et al. Diversification of genes encoding granule-bound starch synthase in monocots and dicots is marked by multiple genome-wide duplication events [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30088.

[12] 罗明, 肖月华, 侯磊, 等. 棉花 LM 结构域基因 (GhLM1) 的克隆与表达分析 [J]. *遗传学报*, 2003, 30(2): 175-182.

[13] Xu B Y, Su W, Liu J H, et al. Differentially expressed cDNAs at the early stage of banana ripening identified by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray [J]. *Planta*, 2007, 226: 529-539.

[14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

[15] Biselli C, Cavalluzzo D, Perrini R, et al. Improvement of marker-based predictability of apparent amylose content in *japonica* rice through GBSSI

allele mining [J]. *Rice*, 2014, 7: 1-18.

[16] Juárez-García E, Agama-Acevedo E, Gómez-Montiel N O, et al. Proteomic analysis of the enzymes involved in the starch biosynthesis of maize with different endosperm type and characterization of the starch [J]. *J Sci Food Agr*, 2013, 93(11): 2660-2668.

[17] Kimura T, Saito A. Heterogeneity of poly (A) sites in the granule-bound starch synthase I gene in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2010, 74(3): 667-669.

[18] Park Y J, Nemoto K, Nishikawa T, et al. Molecular cloning and characterization of granule bound starch synthase I cDNA from a grain amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) [J]. *Breeding Sci*, 2009, 59(4): 351-360.

[19] Soares C A, Peroni-Okita F H G, Cardoso M B, et al. Plantain and banana starches; granule structural characteristics explain the differences in their starch degradation patterns [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(12): 6672-6681.

[20] Sarawong C, Schoenlechner R, Sekiguchi K, et al. Effect of extrusion cooking on the physicochemical properties, resistant starch, phenolic content and antioxidant capacities of green banana flour [J]. *Food Chem*, 2014, 143: 33-39.

[21] 苗红霞, 金志强, 刘伟鑫, 等. 香蕉果实抗性淀粉变化及其与其他类型淀粉相关性分析 [J]. *中国农业科学*, 2013, 46(24): 180-187.

[22] Miao H X, Sun P G, Liu W X, et al. Identification of genes encoding granule-bound starch synthase involved in amylose metabolism in banana fruit [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88077.

## Cloning and Expression Analysis of *MaGBSSI* Gene Family Members of Banana Fruit

MIAO Hong-xia<sup>1</sup>, JIN Zhi-qiang<sup>1,2</sup>, SUN Pei-guang<sup>2</sup>, LIU Ju-hua<sup>1</sup>, JIA Cai-hong<sup>1</sup>, XU Bi-yu<sup>1</sup>, ZHANG Jian-bin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101; 2. Key Laboratory of Genetic Improvement of Bananas, Hainan province, Haikou Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 570102)

**Abstract:** Taking *Musa acuminata* L. AAA group cv. Brazilian as material, PCR amplification method of homologous gene was used to clone the cDNA full length of Granule-Bound Starch Synthase I (GBSSI) gene family in banana. Then, the cluster analysis of the gene family was performed by MEGA 5.05 software and its expression patterns in different tissues and different developmentals and harvest periods were tested by quantitative real-time PCR (qPCR). The results showed that the cDNA full length of four *MaGBSSI* gene family members, i. e. *MaGBSSI*-1, *MaGBSSI*-2, *MaGBSSI*-3 and *MaGBSSI*-4 were 1 851 bp, 1 851 bp, 675 bp and 1 845 bp, respectively. The accession number of *MaGBSSI*-1, *MaGBSSI*-2, *MaGBSSI*-3 and *MaGBSSI*-4 were KF512020, KF512021, KF512022 and KF512023, respectively. Cluster analysis showed that the *MaGBSSI* gene family from banana shared 65% amino acid sequence identifies with *GBSSI* gene from other plant. Tissue-specific expression of the *MaGBSSI* gene family members were detected using qPCR. *MaGBSSI*-1, *MaGBSSI*-2, and *MaGBSSI*-4 were up-regulated in vegetative tissue such as root, stem, leaf, and bract. In contrast, *MaGBSSI*-3 was highly expressed in reproductive tissues such as flower, peel, and pulp, but was weakly expressed in root, stem, and leaf. Expression levels of *MaGBSSI*-1, *MaGBSSI*-2, *MaGBSSI*-4, *MaGBSSII*-1, and *MaGBSSII*-2 at earlier stages of banana development (from 0 d to 30 d) were higher than the later stages (from 30 d to 60 d). In contrast, *MaGBSSI*-3 was weakly expressed at the early stages but was highly up-regulated at 50 d of development, while the expression level of *MaGBSSI*-3 was gradually decreased with the ripening of banana fruit. The results had laid the foundation to illustrate the amylose biosynthesis and degradation mechanism and regulate the expression of *MaGBSSI* gene family members of banana fruit.

**Keywords:** banana; fruit; *MaGBSSI* gene; clone; expression analysis