果 树 学 报 2019,36(11):1463-1472
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20190116

龙眼NF-YB转录因子*DlNF-YB1*、*DlNF-YB10*的克隆和表达分析

彭 媛,张艺勇,Saquib WEHEED,方 庭,曾黎辉*

(福建农林大学园艺学院,福州 350002)

摘 要:【目的】克隆龙眼2个NF-YB转录因子*DlNF-YB1*和*DlNF-YB10* cDNA编码区全长,了解*DlNF-YB1*和*DlNF-YB10*在龙眼中的功能。**【方法】**RT-PCR克隆*DlNF-YB1*和*DlNF-YB10*的*CDS*序列,进行DlNF-YB1和DlNF-YB10蛋白序列理化性质以及转录起始位点前1 500 bp的启动子序列分析;qRT-PCR分析*DlNF-YB1*和*DlNF-YB10*在龙眼不同组织的表达,*DlNF-YB10*在龙眼花芽分化期的表达,*DlNF-YB1*在水分胁迫条件下的表达。**【结果】**以'红核子'cDNA为模板克隆得到*DlNF-YB1*(GenBank登录号:MK372373)和*DlNF-YB10*(GenBank登录号:MK359142)的CDS序列,分别编码175和176个氨基酸;蛋白理化性质分析结果显示DlNF-YB1与DlNF-YB10的理化性质基本相近,三维结构存在一定的区别;*DlNF-YB1*启动子序列中含有与干旱响应相关的MBS顺式作用元件,*DlNF-YB10*启动子序列中含有生长素响应以及ABA响应相关的顺式作用元件;表达分析结果,*DlNF-YB10*在龙眼成年叶芽中表达量较高,且表达量从10月到翌年1月呈现先升后降的趋势,在12月达到峰值;*DlNF-YB1*在根中表达量较高,根系水分胁迫试验表明*DlNF-YB1*在干旱胁迫下表达量显著升高。**【结论】***DlNF-YB10*的功能可能与龙眼花芽分化早期的生理分化有关;*DlNF-YB1*的功能可能与龙眼的抗旱有关。

关键词:龙眼;NF-YB;转录因子;基因表达;花芽分化;水分胁迫

中图分类号:S667.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2019)11-1463-10

Cloning and expression analysis of NF-YB transcription factors *DlNF-YB1* and *DlNF-YB10* in longan

PENG Yuan, ZHANG Yiyong, Saquib WEHEED, FANG Ting, ZENG Lihui*

(College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China)

Abstract:【Objective】Longan (*Dimocarpus longan* L.) is a subtropical fruit species of the Sapindaceae. Longan, a typical drought-tolerant plant, is widely cultivated in tropical and subtropical region and has great economic values. Transcription factor NF-YBs are important regulators during plant growth and development, participating in regulating embryonic development, plant drought resistance, floral meristem growth and flowering time under photoperiod pathway. Two NF-YB transcription factors DlNF-YB1 and DlNF-YB10 in longan were identified and their putative functions were investigated in this study.【Methods】Two NF-YB homolog genes,UN15136 and CL2518 were identified in longan transcriptome data and named *DlNF-YB1* and *DlNF-YB10*. Primers were designed by DNAMAN8.0. Using cDNA of 'Honghezi' longan as the template, CDS sequences of *DlNF-YB1* and *DlNF-YB10* were amplified by RT-PCR. The bioinformatics analysis of two *DlNF-YB* sequences was carried out for further understanding of their putative functions. ORF regions of two *DlNF-YB* genes were founded by ORF Finder program in NCBI. Phylogenetic tree analysis of two DlNF-YBs and the *Arabidopsis thaliana* NF-YB family were obtained by MEGA6.0 software. Multiply amino acid alignment of DlNF-YB genes with other NF-YB genes of 5 species was obtained by DNAMAN8.0. Information about NF-YB protein

收稿日期:2019-06-03 接受日期:2019-07-24

作者简介:彭媛,硕士,主要从事龙眼花芽分化的调控研究。Tel:15705993539,E-mail:601840964@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:13328676575,E-mail:lhzeng@hotmail.com

sequence in different plants was analyzed by PredictProtein online software. The basic physicochemical properties of the proteins were analyzed by ExPASyProtParam. The secondary structure analysis about the content of α-helix, β-sheet, β-turn and random in DlNF-YB proteins were obtained by SOPMA online software. The distribution of curl and the homology modeling of the tertiary structure of DlNF-YB1 and DlNF-YB10 were performed using Swiss-Model online software. In addition, promoter sequences of *DlNF-YB1* and *DlNF-YB10* were analyzed by PLANTCARE online software. Further, expression patterns of DlNF-YB1 and DlNF-YB10 in different organs and different developmental period of longan were analyzed by qRT-PCR. The expression levels of DlNF-YB10 during longan flower bud differentiation and DlNF-YB1 under water stress were also analyzed by qRT-PCR. When water stress experiment was started, seeds of 'Honghezi' longan were sown in trays containing nutrient soil, vermiculite and perlite at the proportion of 2:1:1. Seedlings were cultivated under the growth chambers at a temperature of (25±2) ℃, and the seedling growth was kept with 20.0%-30.0% soil moisture and 50%-55% air humidity. After 6 months, the seedlings were transplanted to 20 cm-diameter plastic pots for root water stress trial. Treatments of three water contents were set. The soil water content of 10% was set as drought treatment; the water level line was kept 5 cm above the bottom (at this time, the soil water content is more than 70%) was set as water immersion treatment; the water content between 20% and 30% was set as the control. In this study, the test was performed in a completely randomized design using Excel 2016, and the LSD test was performed using the Duncan test in SPSS 22.0 ($p < 0.05$).【Results】The CDS sequences of *DlNF-YB1* (GeneBank accession number: MK372373) and *DlNF-YB10* (GeneBank accession number: MK359142) were cloned. Multiply protein sequence analysis of DlNF-YB1 and DlNF-YB10 with NF-YB family of *Arabidopsis thaliana* showed that DlNF-YB1 and DlNF-YB10 had the highest similarity with AtNF-YB1 (80%) and AtNF-YB10 (69%), respectively. *DlNF-YB1*contained 528 bp and *DlNF-YB10* contained 531 bp open reading frames (ORF), encoding 175 amino acids and 176 amino acids, respectively. Both DlNF-YB amino acid sequences included a typical NF-YB/HAP3 domain and five potential functional sites: N-myristoylation site, N-glycosylation site, Casein kinase Ⅱ phosphorylation site, protein kinase C phosphorylation site, and cAMP and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites. Multiple protein sequence alignment revealed a high similarity among *DlNF-YB1, DlNF-YB10, CpNF-YB1, TcNF-YB1, AtNF-YB1, GmNF-YB10* and *AdNF-YB10*. Protein physicochemical properties analysis showed that DlNF-YB1 and DlNF-YB10 had similar physical and chemical properties, and both were unstable and hydrophilic proteins. The secondary structure of *DlNF-YB1* and *DlNF-YB10* included the form of α-helix and random coil mainly. However, the three-dimensional structure of *DlNF-YB1* and *DlNF-YB10* proteins differed greatly. Promoter sequence analysis showed that both of *DlNF-YB1* and *DlNF-YB10* promoters contained ABRE abscisic acid response elements, and specially, *DlNF-YB1* promoter contained the drought response MBS *cis*-acting element, while the *DlNF-YB10* promoter sequence contained the auxin response-related AuxRR-core *cis*-acting element. The expression level of both genes in 'Honghezi' seedling buds were similar with the expression level in the new shoots of 'Sijimi' longan. But the relative expression of *DlNF-YB10* and *DlNF-YB1* varied in different organs and months, *DlNF-YB10* was highly expressed in the vegetative buds of adult longan tree and the expression level of *DlNF-YB10* during physiological differentiation of flower bud gradually increased from October to December, with a peak in December, and began to decline in January of the following year. Differently, *DlNF-YB1* was highly expressed in roots. Relative expression of *DlNF-YB1* varied under different water stresses and it significantly increased under drought stress.【Conclusion】*DlNF-YB1* and *DlNF-YB10* have different functions in longan. The function of *DlNF-YB10* may be related

to the physiological differentiation of flower bud, while *DlNF-YB1* may play an important role in the drought resistance of longan.

Key words: Longan; NF-YB; Transcription factor; Gene expression; Flower bud differentiation; Abiotic stress

核因子Y，亚基B（NF-YBs），也被称为血红素活化蛋白3（HAP3）或CCAAT结合因子A（CBF-A），是一组在酵母[1]、植物[2]、人类[3]以及其他真核生物中发现的转录因子。它与NF-YA（CBF-B/HAP2）、NF-YC（CBF-C/HAP5）形成异源三聚体，作为重要的调节因子参与许多植物的生长发育以及应激诱导反应[4]。在酵母和动物中，由该基因编码的蛋白质是三聚体复合物的一个亚基，形成高度保守的转录因子，其特异性结合多种基因的启动子区域中的CCAAT结构域；在植物中，NF-YB是a编码的多基因家族。近年来，陆续报道在拟南芥、陆地棉、水稻等植物中分别鉴别出含13、41、13个NF-YB转录因子的基因家族[5-7]。

植物NF-YB蛋白由N端的A结构域、中心B结构域和C端的C结构域三部分组成，B区的氨基酸残基在NF-Y复合体结合DNA时发挥着重要的作用，也是和其他亚基相互作用的重要识别区域[8]。NF-YB转录因子在植物生长发育过程中作为重要的调节因子参与各种植物的生长与发育过程。在调控胚胎表观遗传修饰方面，拟南芥*At-LEC1*和*L1L*（*At-NF-YB9* and *NF-YB6*）促进FLC基因建立活跃的染色质状态并在胚胎中重新激活其表达，从而扭转从配子遗传的沉默状态[9]；参与植物形态建成过程中，*At-NF-YB2*转录因子的过表达促进植物更快的细胞分裂和伸长以及促进植物主根的伸长[10]；且据报道，水稻中*Os-NF-YB7/L1L*转录因子过表达造成植物的矮化表型以及密集的圆锥花序双花现象，在营养生长和花分生组织发育过程中发挥着重要作用[11]。*AtNF-YB2*和*AtNF-YB3*对于长期正常诱导开花都是必需的，并且通过调节*FLOWERING LOCUS T*（FT）的表达从而调控植物开花时间[12]；*Os-NF-YB11*（也称为DTH8/Ghd8 /LHD1）在参与光周期开花的信号网络中同样有着重要作用，在长日照条件下其通过下调与开花相关*FLOWERING LOCUS T*的同源基因*Ehd1*和*Hd3a*基因的表达，抑制光周期开花的信号的转导[13]；同时，在拟南芥中过表达野生大麦（*Hordeumvulgare*）*HvNF-YB1*转录因子极大地促进早期开花[14]。NF-YB转录因子同时具有调节植物抗胁迫能力，分别在转基因拟南芥和玉米（*Zea mays*）植物过表达*At-NF-YB1*和*Zm-NF-YB2*基因，极大提高了植株在干旱条件下的存活率[15]；此外，菊花（*Chrysanthemum morifolium*）*CmNF-YB8*转录因子在参与调控童期向生殖期转变过程中，通过下调miR156的表达，使之靶基因SPL表达上调表达，促进菊花从童期向生殖期转变[16]。

龙眼（*Dimocarpus longan* L.）是无患子科龙眼属的亚热带果树，有着很高的经济价值，在热带、亚热带地区广泛种植，特别是在中国、亚洲南部和澳大利亚等地。目前，NF-YB转录因子在木本植物中的研究较少，它在木本植物中的生物学功能、作用机制及其调控网络并不清楚。为探索NF-YB转录因子在龙眼中的功能，笔者在转录组中筛选得到两个NF-YB基因Unigene15136和CL2518，对它们进行生物信息学分析、克隆以及基因表达分析，初步研究其在龙眼中的功能。

1　材料和方法

1.1　材料

‘红核子’龙眼：需要经过低温春化才能诱导花芽分化的普通品种，一年只有一次花期，取其幼芽、幼苗根、幼苗叶片、成年树叶芽材料用于龙眼*NF-YB*转录因子定量分析；成年树叶芽于2017年10月至2018年1月的每月第20天下午进行采样，采后立即放入液氮罐中带回，保存在−80 ℃冰箱中备用。

‘四季蜜’龙眼：不需要经过低温诱导，且具有一年多次开花特性，取其回缩芽材料作为参照，进行龙眼*NF-YB*转录因子定量表达分析。

根系水分胁迫试验的材料为‘红核子’龙眼实生幼苗，种子播种（$V_{腐殖质原土}$∶$V_{蛭石}$∶$V_{珍珠岩}$=2∶1∶1），在同一个环境下培养（土壤水分条件为20.0%~30.0%；室内温度为25 ℃；空气湿度为50%~55%）；6个月后移苗至直径20 cm的塑料盆，选生长势一致的幼苗进行水分胁迫实验。

1.2 方法

1.2.1 RNA的提取与基因克隆 采用北京艾德莱生物公司提供的EASYspin plus多糖多酚/复杂植物RNA快速提取试剂盒提取RNA；用TaKaRa公司提供的PrimeScript™RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒逆转录RNA为单链cDNA，用于RT-PCR与基因克隆。

根据龙眼转录组数据库中Unigene15136和CL2518基因序列设计引物[17]，扩增cDNA编码区全长序列（表1）。

表1 *DlNF-YB1*和*DlNF-YB10*基因克隆以及qPCR引物序列

Table 1 Primers of *DlNF-YB1* and *DlNF-YB10* genes used in cloning and qPCR

引物名称 Primer name	序列（5′→3′） Sequence	引物用途 Primer purpose
DlNF-YB1-up	ATGGCGGAAGCACCGA	基因全长克隆
DlNF-YB1-down	TTATTGATTCCCTTGCATGG	Full length clone
DlNF-YB10-up	ATCACACCCACTCCACTTCAG	
DlNF-YB10-down	GATGTCACTCTGTGCCTTGCATA	
DlNF-YB1-qup	GAGTGAGAGAGCAGGACAGGTAT	定量PCR
DlNF-YB1- qdown	CTGGTGATGAAGCTGATGAAC	Quantitative PCR
DlNF-YB10- qup	GCGAGCAGGATAGGTACCTTC	
DlNF-YB10-q down	GAGTTCATCAGCTTCATCACC	
Fe-sod- up	AAGAGGAGAAAGAGCAAGAGTCAGA	定量内参基因PCR
Fe-sod- down	CCGATACAACAAACCCTGAAATG	Quantitative reference gene
Actin-up	TTCCGCTGCCCAGAAGTCCTCTT	PCR
Actin-down	CATTGAACATAGTTGAACCACCACTGAG	

基因克隆PCR反应体系（25 μL：模板1 μL，上、下游引物各0.5 μL，10× Ex Taq buffer 2.5 μL，dNTP mix 2 μL，Ex Taq polymerase 0.5 μL，RNA-free H_2O 18.5 μL；

反应程序为：95 ℃预变性2 min；95 ℃变性30 s，56.5 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，35个循环；72 ℃延伸10 min。

1.2.2 *DlNF-YB1*与*DlNF-YB10*基因序列的生物信息学分析 对获得的两个NF-YB基因序列进行相关的生物信息学分析，利用ORF Finder分析NF-YB序列的ORF区，利用MEGA6.0软件，采用Neighbor-Joining法分析龙眼NF-YB基因与拟南芥NF-YB家族系统发育树，对UN15136、CL2518基因命名；用DNAMAN8.0进行龙眼NF-YB基因与其他物种NF-YB基因进行序列比对；用PredictProtein（predictprotein.org）在线软件分析不同植物的NF-YB基因编码的蛋白序列；利用ExPASyProtParam（web.expasy.org）分析蛋白质的基本理化性质；SOPMA（npsa-prabi.ibcp.fr）在线软件分析龙眼NF-YB蛋白二级结构的α螺旋、β折叠、β转角和无规卷曲的分布情况；利用Swiss-Model（swissmodel.expasy.org）在线软件对DlNF-YB1与DlNF-YB10蛋白三级结构进行同源建模。

1.2.3 根系水分胁迫试验 进行水分实验之前做不同含水量的水分预处理实验（图1），设置土壤含水量的水分梯度分别为10%，20%，30%以及浸水处理到水位线5 cm；连续处理15 d，每天定点于北京时间8:00，18:00用温湿度仪（顺科达）测定土壤含水量，并进行土壤水分补给。其中，土壤的含水量保持在10%时，龙眼叶片出现枯黄现象，龙眼生长受到胁迫，将此处理设置为干旱处理；浸水处理到水位线5 cm（此时土壤含水量为70%以上），龙眼幼苗同样出现枯黄现象，设置此处理为浸水处理；含水量为20%~30%的情况下，相比浸水处理和干旱处理，叶片生长状况良好，因此把这个范围内的含水量处理作为对照处理。每个处理5株重复，连续处理15 d，并于处理后7 d、15 d分别取样。

图1 ‘红核子’龙眼实生苗不同水分含量处理

Fig. 1 Different moisture content treatments to ‘Honghezi’ longan seedlings

1.2.4 *DlNF-YB1*与*DlNF-YB10*基因的定量表达分

析　使用Bio-Rad荧光定量PCR仪（CFX 96 real-time PCR detection system，美国）和TaKaRa公司的SYBR Premix Ex Taq（TB RNase Plus）试剂盒进行q-PCR基因定量表达分析。选择合适的内参基因Fe-SOD作为水胁迫实验下的定量内参基因[18]，选择Actin作为不同时期以及不同部位下的定量PCR的内参基因[19]，用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法[20]计算基因的定量相对表达。*DlNF-YB1*与*DlNF-YB10*基因的qPCR特异性引物见表1，引物序列由擎科生物工程有限公司合成。

Q-PCR反应体系25 μL：dd H_2O 8.5 μL，上、下游引物各1 μL，1 ng·μL^{-1}模板2 μL，SYBR Premix酶12.5 μL。反应程序：95 ℃预变性30 s；40个循环的95 ℃ 5 s、60℃ 30 s；溶解曲线：95℃ 10 s，65 ℃ 5 s，95 ℃ 0.5 s。

1.2.5　*数据统计与分析*　试验采用完全随机设计，采用Excel 2016作图，用SPSS 22.0中的Duncan检验法进行显著性LSD检验（$p < 0.05$）。

2　结果与分析

2.1　*DlNF-YB1*与*DlNF-YB10*基因的克隆与序列分析

利用引物进行编码区全长扩增，琼脂糖凝胶电泳检测得到2条大约500 bp的产物（图2），测序显示克隆的片段为2个龙眼NF-YB基因编码区全长序列。这两个基因的编码长度分别为528 bp和531 bp，分别编码175和176个氨基酸。

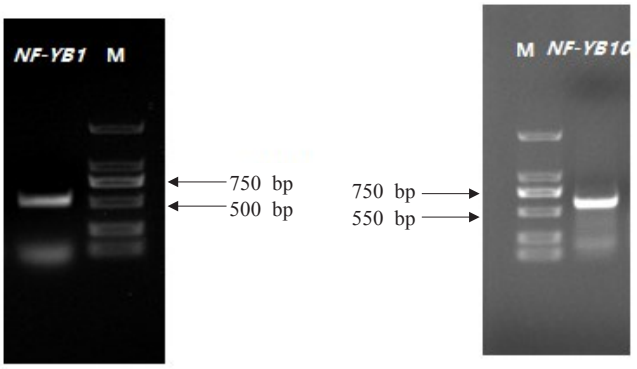


图2　*DlNF-YB1*与*DlNF-YB10*基因PCR扩增的电泳分析

Fig. 2　The electrophoresis of PCR amplification of *DlNF-YB1* and *DlNF-YB10*

聚类分析结果表明，Unigene15136与NF-YB1有较高的相似性，CL2518与NF-YB10有较高的相似性（图3），因此，将UN15136命名为*DlNF-YB1*（GenBank登录号：MK372373），CL2518命名为*DlNF-YB10*（GenBank登录号：MK359142）。

2.2　龙眼DlNF-YB1与DlNF-YB10蛋白结构及其启动子分析

蛋白理化性质分析，结果表明（表2），两者的蛋白理化性质基本相近，DlNF-YB1与DlNF-YB10的分子质量分别为19.08 kDa和19.11 kDa；其中，两者的理论等电点小于7.0，为酸性蛋白质；两种的负电荷氨基酸主要是Asp（天冬氨酸）和Glu（谷氨酸），正电荷残基主要是Arg（精氨酸）和Lys（赖氨酸）；不稳定系数均接近50，，为不稳定蛋白，对DlNF-YB1与DlNF-YB10两个基因编码蛋白的疏水性进行分析，两者的氨基酸疏水性平均系数分别是−0.71和−0.81，为亲水性蛋白。

α螺旋、β折叠、β转角和无规卷曲的分布情况，结果表明（表3），DlNF-YB1二级结构主要以α螺旋（结构含量占47.73%）和无规卷曲（结构含量占44.89%）方式存在；DlNF-YB10二级结构同样主要以α螺旋（结构含量占41.71%）和无规卷曲（结构含量占49.14%）方式存在，这种结构含量比与前人研究所报道的一致[21]。

对DlNF-YB1与DlNF-YB10蛋白的三级结构进行同源建模，得到蛋白质的三维模型（图4），两个蛋白的三维空间结构差异较大。

对转录起始位点上游核心启动子区域进行顺式作用元件的预测和分析，有助于了解基因的生物学功能。因此，对龙眼基因组[22]中*DlNF-YB1*和*DlNF-YB10*的两个基因上游的启动子序列（转录起始位点ATG上游的1 500 bp）进行顺式作用元件分析（表4）。*DlNF-YB1*和*DlNF-YB10*启动子序列中均含有ABRE脱落酸响应元件，*DlNF-YB1*启动子序列中含

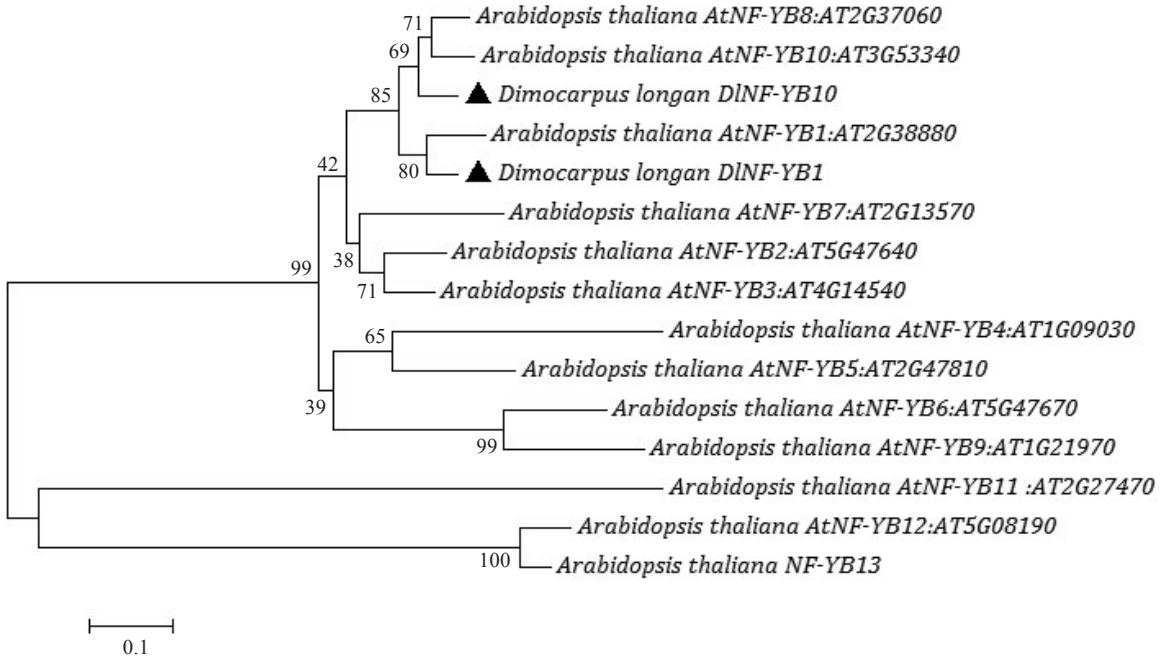


图 3 龙眼 NF-YB 蛋白和拟南芥 NF-YB 家族系统进化树分析自展值（1~1 000）标记各个节点

Fig. 3 Phylogenetic analysis of longan NF-YBs and *A. thaliana* NF-YB proteins Boot-strap values from 1 000 - replicates are indicated at each node

表 2 龙眼 DlNF-YB1 以及 DlNF-YB10 蛋白质一级结构分析

Table 2 First structure analysis of DlNF-YB1 and DlNF-YB10 genes in Longan

蛋白 Protein	分子式 Molecular formula	分子质量/kDa Molecular weight/kDa	等电点(pI) Isoelectric point/pI	负电荷残基 Negative charge residue	正电荷残基 Positive charge residue	不稳定系数 Unstable coefficient	疏水性平均系数 Hydrophobic average coefficient
DlNF-YB1	$C_{820}H_{1310}N_{242}O_{267}S_8$	19.08	6.09	22	20	48.53	-0.71
DlNF-YB10	$C_{815}H_{1299}N_{239}O_{274}S_9$	19.11	5.94	23	21	50.32	-0.81

表 3 龙眼 DlNF-YB1 以及 DlNF-YB10 二级结构预测

Table 3 Secondary structure prediction of DlNF-YB1 and DlNF-YB10genes in Longan

蛋白名称 Name	α螺旋 Alpha helix/%	延伸链 Extended srand/%	β转角 Beta turn/%	无规卷曲 Random coil/%
DlNF-YB1	47.73	4.55	2.84	44.89
DlNF-YB10	41.71	4.57	4.57	49.14

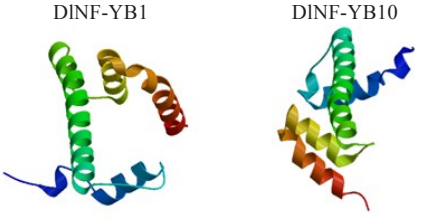


图 4 DlNF-YB1 以及 DlNF-YB10 蛋白的三级结构预测

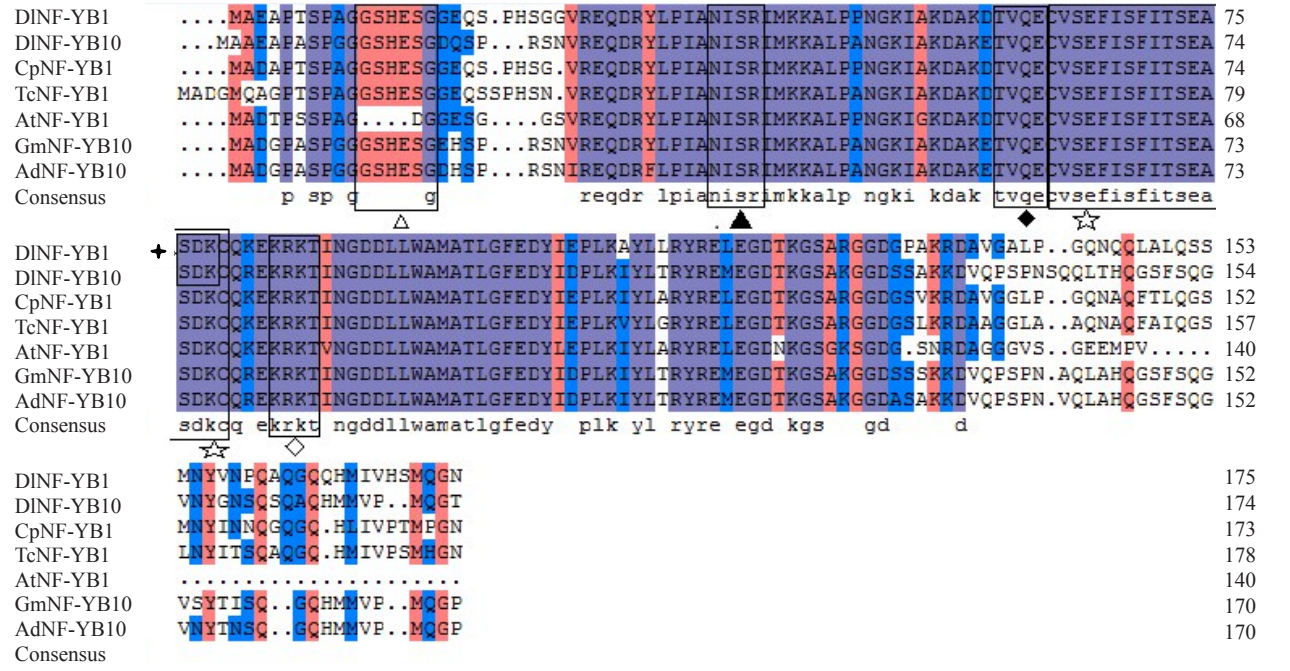
Fig. 4 Tertiary structure prediction of DlNF-YB1 and DlNF-YB10 protein

表 4 *DlNF-YB1* 与 *DlNF-YB10* 启动子序列顺式作用元件分析

Table 4 The cis-acting elements of *DlNF-YB1 and DlNF-YB10*

序列 Squence	顺式作用元件名称 *Cis*-acting element	位点功能 Site function	DlNF-YB1	DlNF-YB10
ACGTG	ABRE	脱落酸响应 Abscisic acid responsiveness	1	2
CGTCA	CGTCA-motif	茉莉酸响应 MeJA-responsiveness	4	4
GGTCCAT	AuxRR-core	生长素响应 Auxin responsiveness	0	1
CAACTG	MBS	干旱响应 Drought-inducibility	2	0
ATTCTCTAAC	TC-rich repeats	防御和压力响应 Defense and stress responsiveness	0	2

有 MBS 干旱响应元件，而 *DlNF-YB10* 启动子序列中含有 AuxRR-core 生长素响应元件。DlNF-YB1 和 DlNF-YB10 蛋白与其他物种的蛋白结构域分析（图 5），均含有相同的作用位点，且表现出高度保守性。



CpNF-YB1. 番木瓜 XP_021910503.1；TcNF-YB1. 可可 XP_017985159.1；AtNF-YB1. 拟南芥 At2g38880；GmNF-YB10. 大豆 XP_003554361；AdNF-YB10. 蔓花生 XP_015969981。△ 表示 N-豆蔻酰化位点；◇ 表示 NF-YB/HAP3 subunitsignature；▲ 表示 N-糖基化位点；◆ 表示酪蛋白激酶 II 磷酸化位点；✚ 表示蛋白激酶 C 磷酸化位点；☆ 表示 cAMP-和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点。

CpNF-YB1. *Carica papaya* XP_021910503.1; TcNF-YB1. *Theobroma cacao* XP_017985159.1; AtNF-YB1. *Arabidopsis thaliana* At2g38880; GmNF-YB10. *Glycine max* XP_003554361; AdNF-YB10. *Arachis duranensis* XP_015969981. △ show N-myristoylation site; ◇ show NF-YB/HAP3 subunitsignature; ▲ show N-glycosylation site; ◆ show Casein kinase II phosphorylation site; ✚ show Protein kinase C phosphorylation site; ☆ show NF-YB/HAP3 subunit signature.

图 5　6 种植物的 NF-YB 氨基酸序列比对

Fig. 5　Multiple alignment of NF-YB amino acid sequences from six plants

2.3　*DlNF-YB1* 以及 *DlNF-YB10* 的表达分析

通过在‘红核子’龙眼不同组织中的 qRT-PCR 实验结果表明，*DlNF-YB1* 在幼苗根中表达水平显著性高于其他组织的表达水平；在芽中，‘四季蜜’回缩新梢的芽中 *DlNF-YB1* 的表达水平与幼苗叶芽的表达水平相近（图 6-A）。进一步分析 *DlNF-YB1* 在水分胁迫下根中的表达，在连续 7 d 和 15 d 的干旱处理下，*DlNF-YB1* 基因的表达量均显著高于正常水分处理下以及浸水处理下的表达水平（图 6-C、6-D）。

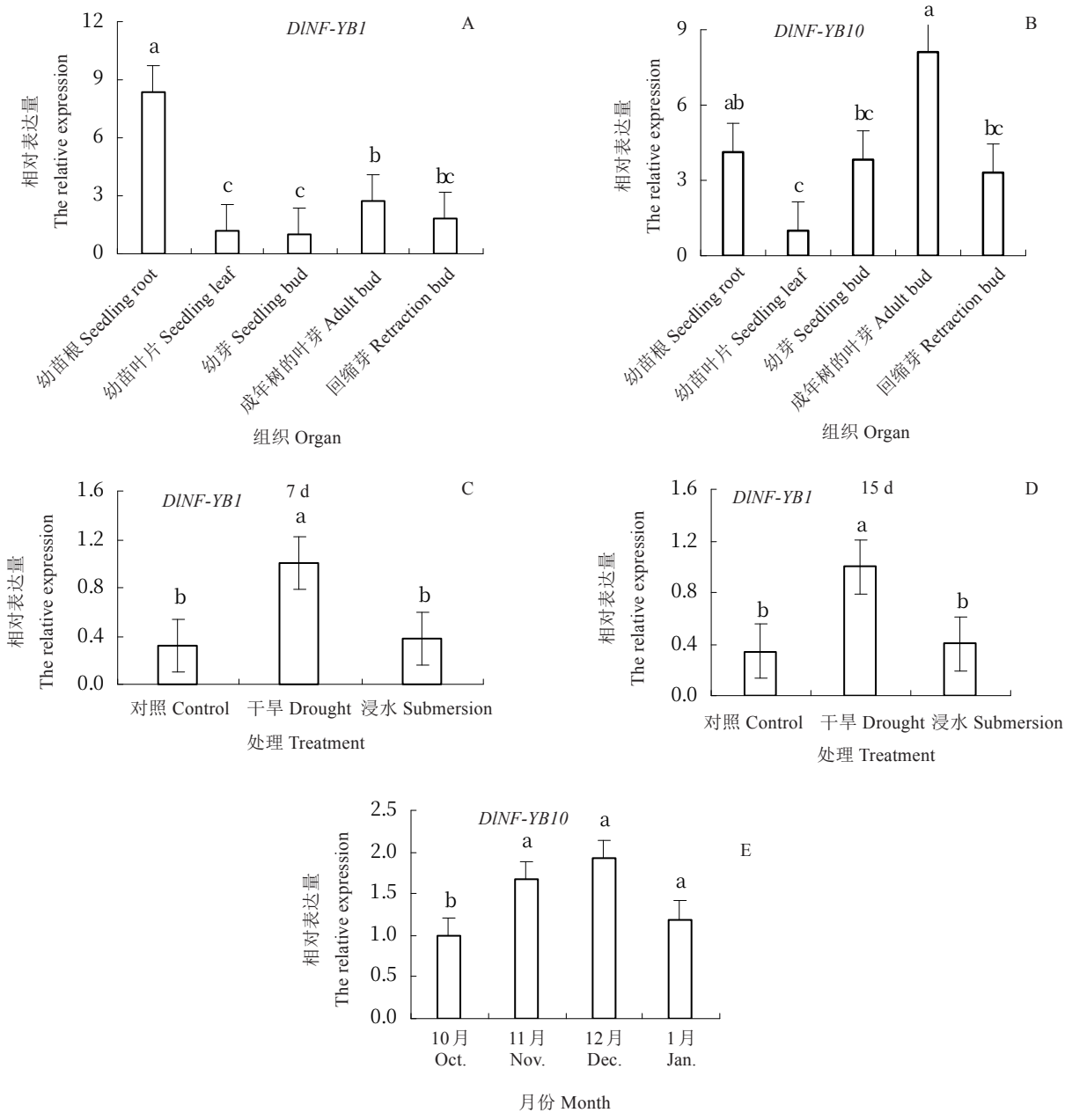
与 *DlNF-YB1* 的表达不同，*DlNF-YB10* 在成年树的叶芽中表达量最高，表达量显著高于其他组织（图 6-B），相比在四季蜜回缩新梢中的表达水平，幼苗叶芽的表达水平与其一致；进一步分析 *DlNF-YB10* 在‘红核子’花芽分化早期的表达，从 10 月份到翌年 1 月份，*DlNF-YB10* 的表达量呈现先上升后下降的变化趋势，在 12 月份表达水平达到峰值（图 6-E）。

3　讨　论

3.1　龙眼 *DlNF-YB1* 与 *DlNF-YB10* 序列和蛋白结构特点

序列分析表明，龙眼 *DlNF-YB1* 与 *DlNF-YB10* 属于 NF-YB 家族基因，DlNF-YB1 与 DlNF-YB10 氨基酸序列中均含有典型的 NF-YB/HAP3 结构域，以及各类豆蔻酰化、糖基化以及磷酸化作用位点，这些作用位点在参与细胞信号转导，控制细胞生长和分化过程中起重要作用。

DlNF-YB1、DlNF-YB10 蛋白序列与不同植物（拟南芥、番木瓜、可可、大豆以及蔓花生）的 NF-YB 蛋白序列相似度均超过 70%，表明 NF-YB 家族基因在进化上高度保守。蛋白质二级结构预测显示 DlNF-YB1 与 DlNF-YB10 蛋白主要由 α 螺旋和无规卷曲组成，有相关研究表明这种蛋白结构可根据多种



A 和 B 分别表示 *DlNF-YB1* 和 *DlNF-YB10* 在不同器官以及不同时间的表达量；C 和 D 分别表示 *DlNF-YB1* 在连续 7 d 水分胁迫处理以及连续 15 d 水分胁迫处理下的表达量；E 表示 *DlNF-YB10* 基因在花芽生理分化期中不同月份间的表达量（显著性分析 $p < 0.05$）。

A and B respectively indicate the expression levels of *DlNF-YB1* and *DlNF-YB10* in different organs and at different times，C and D show the expression levels of *DlNF-YB1* in 7 d water stress treatment and 15 d water stress treatment; E indicate the expression of *DlNF-YB10* gene in the different months during the physiological differentiation of flower buds（significance analysis $p < 0.05$）.

图 6 *DlNF-YB1* 和 *DlNF-YB10* 的定量表达

Fig. 6 The expression of *DlNF-YB1* and *DlNF-YB10*

生物和非生物胁迫发生改变进而增强植物体对多种逆境胁迫的抵御能力[23]。虽然两者的蛋白理化性质较为接近，但两个蛋白的三维空间结构存在较大差异，可能在功能上存在着一定的差异。

3.2 龙眼 *DlNF-YB1* 与 *DlNF-YB10* 基因功能分析

在非生物逆境胁迫中，旱害和涝害是对植物生长影响最普遍的两种现象。龙眼是典型的亚热带植物，是一种耐旱性较强的植物，但目前对龙眼的耐旱机制鲜有研究。在严重干旱条件下 *AtNF-YB1* 表达水平提高 12 倍，这种适应性机制受到双子叶植物和单子叶植物中的一组结构保守的 CCAAT DNA 元件介导转录调节[15]，序列分析显示龙眼 *DlNF-YB1* 中含

有CCAAT binding结构域；且聚类分析结果表明，龙眼DlNF-YB1氨基酸序列表现出与其他物种的NF-YB氨基酸序列高度相似，与参与干旱和胁迫响应有关的AtNF-YB1氨基酸序列相似度高达73%[15]，但与同样参与干旱和胁迫响应的紫花苜蓿（*Alfalfa*）*MsNF-YB4*以及ABA依赖和ABA不依赖两条非生物胁迫响应途径相关的普通小麦（*Triticum aestivum*）*TaNF-YB6*的核酸序列相似度均较低[24-25]，只有33%的相似率，据此初步推测，龙眼在参与干旱能力调控方面与拟南芥的*AtNF-YB1*适应干旱的机制可能存在一定的相似度。*DlNF-YB1*的启动子序列分析显示，其中含有与干旱诱导相关的顺式作用元件MBS元件，这进一步表明*DlNF-YB1*可能参与干旱应答反应；q-PCR分析结果显示*DlNF-YB1*在根中的表达水平显著高于其他组织部位；进一步通过水分胁迫实验证实*DlNF-YB1*基因在干旱胁迫下的根部中高度表达。综合以上分析，可以推断*DlNF-YB1*可能作为一种重要的转录因子参与龙眼的耐旱调控，关于*DlNF-YB1*通过调控哪些基因、如何调控这些基因来影响根的耐旱机制问题，目前还不太清楚，将是我们进一步研究的一个方向。

在植物中，关于*NF-YB10*转录因子的研究甚少。菊花（*Chrysanthemum morifolium*）报道与*NF-YB10*高度相似的*NF-YB8*因子*CmNF-YB8*基因通过下调miR156基因的表达，作用于靶基因SPL，从而促进菊花从童期向生殖期转变[16]。在福建省，龙眼花芽分化的生理分化期在11月份至12月初，形态分化期在1月份至3月份[26]。*DlNF-YB10*的表达量从10月到12月逐渐上升，12月达到最高值，暗示着*DlNF-YB10*的功能可能与龙眼花芽的生理分化有关；同时，*DlNF-YB10*的启动子序列分析结果表明，其含有与生长素响应相关的AuxRR-core作用元件，以及和ABA响应相关的ABRE作用元件，说明*DlNF-YB10*的表达可能受到生长素以及脱落酸的影响，且相关研究表明，‘水涨’龙眼花芽分化生理分化期，IAA和ABA等激素的升高可以促进叶芽向花芽的生理转化[27]，*DlNF-YB10*启动子上的顺式作用原件与*DlNF-YB10*可能参与龙眼的花芽分化初期调控的功能吻合。‘四季蜜’龙眼成年树重度回缩后，抽生的新梢一成熟便会开花，但是*DlNF-YB10*的表达量在‘四季蜜’回缩新梢或实生幼苗芽中的表达量都较低，说明‘四季蜜’易成花的特性与*DlNF-YB10*无关，但*DlNF-YB10*在成年树的叶芽上的表达较高，其功能是否与龙眼树幼年向成年转变有关有待进一步研究。

4　结　论

综上所述，本研究中从‘红核子’龙眼中分离得到两个*DlNF-YB*基因，基因结构预测、启动子分析以及水分胁迫处理等结果表明*DlNF-YB1*可能作为一种重要的转录因子参与龙眼的耐旱调控；花芽分化过程中q-PCR分析表明*DlNF-YB10*的生物学功能可能与龙眼花芽分化早期的生理分化有关。

参考文献 References：

[1] OLESEN J T，FIKES J D，GUARENTE L. The schizosaccharomyces pombe homolog of saccharomyces cerevisiae HAP2 reveals selective and stringent conservation of the small essential core protein domain[J]. Molecular and Cellular Biology，1991，11(2):611-619.

[2] EDWARDS D，MURRAY J A，SMITH A G. Multiple genes encoding the conserved CCAAT-box transcription factor complex are expressed in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol，1998，117(3): 1015-1022.

[3] BECKER D M ，FIKES J D，GUARENTE L. A cDNA encoding a human CCAAT-binding protein cloned by functional complementation in yeast[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences，1991，88(5): 1968-1972.

[4] PETRONI K，KUMIMOTO R W，GNESUTTA N，CALVENZANI V，FORNARI M，TONELLI C，HOLT B F，MANTOVANI R. The promiscuous life of plant NUCLEAR FACTOR Y transcription factors[J]. The Plant Cell，2013，24(12): 4777-4792.

[5] SIEFERS N，DANG K K，KUMIMOTO R W，BYNUM W E，TAYROSE G，HOLT B F. Tissue-specific expression patterns of *Arabidopsis* NF-Y transcription factors suggest potential for extensive combinatorial complexity[J]. Plant Physiology，2009，149(2): 625-641.

[6] 刘静，徐珍珍，袁娜，郭月，张保龙，杜建厂 . 陆地棉NF-YB基因家族的全基因组分析[J]. 华北农学报，2016，31(5): 21-27.
LIU Jing，XU Zhenzhen，YUAN Na，GUO Yue，ZHANG Baolong，DU Jianchang. Genome-wide analysis of the NF-YB gene family of *upland cotton*[J]. Acta Agriculturae Boreali Sinica，2016，31(5): 21-27.

[7] 周天顺，余东，孙志忠，孙学武，谭炎宁，盛夏冰，段美娟，袁定阳 . 水稻转录因子NF-YB家族的生物信息学分析[J]. 分子植物育种，2018，16(18): 11-23.
ZHOU Tianshun，YU Dong，SUN Zhizhong，SUN Xuewu，TAN Yanning，SHENG Xiabing，DUAN Meijuan，YUAN Dingyang. Bioinformatics analysis of *Rice* transcription factor NF-YB family[J]. Molecular Plant Breeding，2018，16(18): 11-23.

[8] KWONG R W，BUI A Q，LEE H，KWONG L W，FISCHER R L，GOLDBERG R B，HARADA J J. LEAFY COTYLEDON1-

LIKE defines a class of regulators essential for embryo development[J]. Plant Cell，2003，15(1): 5-18.

[9] TAO Z，SHEN L，GU X，WANG Y，YU H，HE Y. Embryonic epigenetic reprogramming by a pioneer transcription factor in plants[J]. Nature，2017，551(7678): 124-128.

[10] BALLIF J，ENDO S，KOTANI M，MACADAM J，WU Y. Overexpression of HAP3b enhances primary root elongation in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology & Biochemistry，2011，49(6): 579-583.

[11] ITO Y，THIRUMURUGAN T，SERIZAWA A，HIEATSU K，OHMETAKAGI M，KURATAN. Aberrant vegetative and reproductive development by overexpression and lethality by silencing of OsHAP3E in *rice*[J]. Plant Science，2011，181(2): 105-110.

[12] KUMIMOTO R W，ADAM L，HYMUS G J，REPETTI P P，REUBER T L，MARION C M，HEMPEL F D，RATCLIFFE O J. The Nuclear Factor Y subunits NF-YB2 and NF-YB3 play additive roles in the promotion of flowering by inductive long-day photoperiods in *Arabidopsis*[J]. Planta，2008，228(5): 709-723.

[13] WEI X，XU J，GUO H，JIANG L，CHEN S，YU C，ZHOU Z，HU P，ZHAI H，WAN J.DTH8 suppresses flowering in *rice*,influencing plant height and yield potential simultaneously[J]. Plant Physiology，2010，153(4): 1747-1758.

[14] LIANG M，HOLE D，WU J，BLAKE T，WU Y. Expression and functional analysis of NUCLEAR FACTOR-Y，subunit B genes in barley[J]. Planta，2012，235(4): 779-791.

[15] NELSON D E，RRPETTI P P，ADAMS T R，CREELMAN R A，WU J，WARNER D C，ANSTROM D C，BENSEN R J，CASTIGLIONI P P，DONNARUMMO M G，HINCHEY B S，KUMIMOTO R W，MASZLE D R，CANALES R D，KROLIKOWSKI K A，DOTSON S B，GUTTERSON N，RATCLIFFE O J，HEARD J E. Plant Nuclear Factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences，2007，104(42): 16450.

[16] WEI Q，MA C，XU Y，WANG T，CHEN Y，LU J，ZHANG L，JIANG C，HONG B，GAO J. Control of chrysanthemum flowering through integration with an aging pathway[J]. Nature Communications，2017，8(1): 829.

[17] JIA T，WEI D，MENG S，ALLAN A C，ZENG L. Identification of regulatory genes implicated in continuous flowering of Longan (*Dimocarpus longan* L.[J]. PLoS One，2014，9 (12): e114568.

[18] WU J，ZHANG H，LIU L，LI W，WEI Y，SHI S. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in preharvest and postharvest *Longan* fruits under different experimental conditions[J]. Frontiers in Plant Science，2016，7(439): 780.

[19] 付志远，贾天琦，彭媛，SAQUIB Weheed，曾黎辉 . 龙眼 ELF4 同源基因的克隆与功能研究[J]. 园艺学报，2018，45(5): 875-886.
FU Zhiyuan，JIA Tianqi，PENG Yuan，SAQUIB Weheed，ZENG Lihui. Cloning and function analysis of ELF4 homolog genes in *Dimocarpus longan*[J]. Acta Horticulturae Sinica，2018，45(5): 875-886.

[20] 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.

[21] 林善枝，张志翔，侯路，王涛，侯琦，孙润泽 . 黄连木 LEC1 转录因子基因的克隆及表达分析[C]//. 中国高科技产业化研究会 . 中国科协年会--非粮生物质能源与高技术产业化研讨会 . 福建，2010.
LIN Shanzhi，ZHANG Zhixiang，HOU Lu，WANG Tao，HOU Qi，SUN Runze.Cloning and expression analysis of LEC1 transcription factor gene from *Pistacia chinensis*[C]//. China High-Tech Industrialization Research Association.China Association for Science and Technology Annual Meeting --Seminar on Non-grain Biomass Energy and High Technology Industrialization. Fu Jian，2010.

[22] LIN Y L，MIN J M，LAI R L，WU Z Y，CHEN Y K，YU L L，CHENG C Z，JIN Y C，TIAN Q L，LIU Q F，LIU W H，ZHANG C G，LIN L X，HU Y，ZHANG D M，THU M，ZHANG Z Z，LIU S C，ZHONG C S，FANG X D，WANG J，YANG H M，VARSHNEY R K，YIN Y，LAI Z. Genome-wide sequencing of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) provides insights into molecular basis of its polyphenol-rich characteristics [J]. GigaScience，2017，6(5): 1-14.

[23] 杨步越，韦正乙，王云鹏，仲晓芳，邢少辰 . 紫花苜蓿转录因子 NF-YB4 的克隆及其耐盐作用的评价[J]. 分子植物育种，2017，15(6): 2147-2156.
YANG Buyue, WEI Zhengyi, WANG Yunpeng, ZHONG Xiaofang, XING Shaochen. Cloning and salt-tolerance assessment of transcription factor MsNF- YB4 in *Alfalfa*[J/OL]. Molecular Plant Breeding，2017，15(6): 2147-2156.

[24] 万千，张秀荣，赵兰飞，刘风珍，王宏伟，孔令让 . 小麦 *TaNF-YB6* 基因亚细胞定位和非生物胁迫表达分析[J]. 分子植物育种，2016，14(11)，2904-2911.
WAN Qian，ZHANG Xiurong，ZHAO Lanfei，LIU Fengzhen，WANG Hongwei，KONG Lingrang. Subcellular localization of *TaNF-YB6* in *Wheat* and it's expression analysis under abiotic stress[J]. Molecular Plant Breeding，2016，14(11): 2904-2911.

[25] 郭玉琼，王仲，朱晨，赵姗姗，张舒婷，常笑君，李小桢，傅海峰，林玉玲，赖钟雄 . 茶树 *CSD1* 基因及其启动子克隆与低温胁迫下的表达[J]. 应用与环境生物学报，2018，24(5)：1122-1131.
GUO Yuqiong，WANG Zhong，ZHU Chen，ZHAO Shanshan，ZHANG Shuting，CHANG Xiaojun，LI Xiaozhen，FU Haifeng，LIN Yuling，LAI Zhongxiong. Cloning and expression analysis of copper/zinc-superoxide dismutase 1 gene and its promotor under low temperature stress in *Camellia sinensis*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology，2018，24(5): 1122-1131.

[26] 苏明华，刘志成，庄伊美 . 水涨龙眼结果母枝内源激素含量变化对花芽分化的影响[J]. 热带作物学报，1997(2): 66-71.
SU Minghua，LIU Zhicheng，ZHUANG Yimei. Effect of changes in endogenous hormone content of shuizhang longan female branches on flower bud differentiation[J]. Chinese Journal of Tropical Crops，1997(2): 66-71.

[27] 王长春，柯冠武 . 龙眼花芽形态分化的研究[J]. 福建省农科院学报，1992，7(1): 55-58.
WANG Changchun，KE Guanwu. Studies on morhologie differentiation of lower buds in *longan*[J]. Journal of Fujian Academy of Agricultural Sciences，1992，7(1): 55-58.