

# 龙眼 *HDAC* 家族成员的全基因组鉴定及表达分析

李晓斐, 张舒婷, 陈晓慧, 申 序, 蒋梦琦, 刘蒲东, 陈裕坤, 林玉玲, 赖钟雄\*

(福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福州 350002)

**摘要:**【目的】研究龙眼 *HDAC* 家族的进化特性及其在体胚发生过程及不同激素处理下的表达模式。【方法】对龙眼 *HDAC* (*DIHDAC*) 家族成员进行全基因组鉴定及生物信息学分析, 结合转录组数据分析 *DIHDAC* 家族在龙眼非胚性及胚性培养物及不同组织器官中的表达情况, 采用 qRT-PCR 检测龙眼体胚发生过程及不同激素处理下 *DIHDAC* 家族的表达模式。【结果】*DIHDAC* 家族可分为 RPD3/HDA1、HD2 和 SIR2 亚家族, 均为亲水性蛋白质, 亚细胞定位显示主要分布于细胞核中。RPD3/HDA1 亚家族含有 HDAC 结构域, HD2 亚家族含有 C2H2 型锌指和 Nucleoplasmin 结构域, SIR2 亚家族含有 SIR2 结构域。RPD3/HDA1 和 SIR2 亚家族蛋白结构以  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲为主, HD2 亚家族以无规则卷曲为主。*DIHDAC* 启动子序列中包含众多光响应、激素应答、胁迫响应及与植物生长相关作用元件; 转录组数据显示 *DIHDAC* 家族大部分成员在 ICpEC 和 GE 阶段高表达; 且在龙眼果实, 种子及根中高表达。qPCR 分析显示, *DIHDA6*、*DISRT1-1*、*DIHDT1* 和 *DIHDT3* 在 GE 阶段上调表达; 在脱落酸 (ABA)、茉莉酸甲酯 (MeJA)、赤霉素 ( $GA_3$ ) 和水杨酸 (SA) 处理下 *DIHDA8*、*DIHDA9*、*ISRT1-1*、*DISRT2*、*DIHDT1* 和 *DIHDT3* 均被不同程度地诱导表达。【结论】*DIHDAC* 在进化过程中保守性与特异性并存, 可能参与龙眼果实、种子及根的生长发育过程, 并通过响应 ABA、SA 和  $GA_3$  的表达来调控龙眼体胚发生。

**关键词:** 龙眼; 去乙酰化酶基因; 生物信息学分析; 全基因组鉴定; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S667.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2020)06-0793-15

## Genome-wide identification and expression analysis of *HDAC* gene family in *Dimocarpus longan* Lour.

LI Xiaofei, ZHANG Shuting, CHEN Xiaohui, SHEN Xu, JIANG Mengqi, LIU Pudong, CHEN Yukun, LIN Yuling, LAI Zhongxiong\*

(Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China)

**Abstract:**【Objective】The histone deacetylase (*HDAC*) family, an important part of epigenetic regulation, plays an important role in Histone deacetylation modification. *HDAC* affects the acetylation level of related genes in the process of hormones synthesis, signal transduction through the conserved lysine modified kinase on the tail of histone N terminal, as to regulate the growth and development of plants and the response to adversity. *Dimocarpus longan* Lour. is a famous subtropical evergreen fruit tree with high economic and medicinal value. Its flesh is rich in nutrients. The development of the embryo seriously affects the fruit setting rate and fruit quality of the longan. Therefore, we investigated the evolution characteristics of the longan *HDAC* gene family and its expression patterns in the somatic embryogenesis under different hormone treatments, in order to provide a reference for enhancing resistance to the stresses and promoting growth, and to built the genetic basis for molecular breeding.【Methods】Firstly, the candidate *HDAC* genes were screened from the longan genome database by BLAST

收稿日期: 2019-12-08 接受日期: 2020-03-14

基金项目: 国家自然科学基金 (31572088, 31672127); 福建省高原学科建设经费 (102/71201801101); 福建农林大学科技创新专项基金 (CXZX2017189, CXZX2017314, CXZX2018076, KF2015108)

作者简介: 李晓斐, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为果树生物技术。Tel: 13365919969, E-mail: 1130290779@qq.com

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13906933317, E-mail: Laizx01@163.com

analysis in NCBI. HMMER was used to screen the sequence with the complete conserved domain as a member of the longan *HDAC* genes family. Secondly, ExpASy was used to analyze the physicochemical properties of HDAC, subcellular localization was performed by Wolf Psort; phylogenetic analysis was performed by MEGA 5.05; secondary structure was performed by SOPMA; *cis*-acting elements was analyzed by Plantcare, conserved motifs was analyzed by MEME, conserved domains was analyzed by Pfam and SMART, gene structure was analyzed by the gff file. The interaction between members analyzed by STRING. Thirdly, Based on the longan transcriptome datasets, we analyzed the expression levels (FPKM values) of the *DIHDAC* family in non-embryonic cultures and embryogenic cultures of longan, as well as in nine organs of longan. Finally, the longan embryogenic callus with good growth status was obtained and treated in  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  gibberellin ( $\text{GA}_3$ ), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MeJA) respectively. Roche LightCycler 480 real-time fluorescence quantitative PCR were used to analyze the expression pattern of *DIHDAC* family in non-embryonic, embryogenic cultures and with different hormone treatments.【Results】The HDAC family, could be divided into three subfamilies: RPD3/HDA1, HD2 and SIR2. Among them, the HD2 subfamily was a plant-specific histone deacetylase family that has unique evolution. All HDACs were hydrophilic proteins, and most of their isoelectric points (pI) were lower than 7.0 except for SIR2 subfamily. The subcellular localization was mainly distributed in the nucleus, in a few case it was distributed in other parts such as cytoplasm, mitochondria and endoplasmic reticulum. The number of amino acids, molecular and exons-introns were changeable in different subfamilies. The number of exons in *DISRT1-2* was the highest (15), the number of exons in *DIHDA8* was the least (5); the number of introns in *DISRT1-2* was the most (14), and the number of introns in *DIHDA8* was the least (4). Members of the RPD3/HDA1 subfamily contained a conserved HDAC domain, HD2 subfamily members contained both a C2H2-type zinc finger domain and a Nucleoplasmin domain, SIR2 subfamily members all contained a SIR2 domain. Nine members of the RPD3/HDA1 subfamily contained motif 2 and motif 5; Except for *DISRT1-1*, the HD2 and SIR2 subfamilies members contained motif 13. The protein structures of RPD3/HDA1 and SIR2 subfamily were mainly  $\alpha$ -helix and random coil, while the HD2 subfamily was mainly composed of random coils. The *cis*-acting elements of the *DIHDAC* promoter often contained light response, hormone response, anaerobic induction, stress response, and plant growth related elements. Protein interactions showed that *DIHDAC* protein could interact with other family members and other proteins. Proteins predicted to interact with *DIHDAC* might be functionally related to *DIHDAC*. Transcriptome data analysis revealed that most members of the *DIHDAC* family showed high expression both in the ICpEC and GE stage, and were highly expressed in the fruits, seeds and roots of longan. The results of qPCR analysis showed that the expression of *DIHDAC* was consistent with the FPKM value, among which *DIHDA6*, *DISRT1-1*, *DIHDT1* and *DIHDT3* were up-regulated in GE stage. In addition, *DIHDA8*, *DIHDA9*, *DISRT1-1*, *DISRT2*, *DIHDT1* and *DIHDT3* were induced by abscisic acid (ABA), methyl jasmonate (MeJA) and gibberellic acid ( $\text{GA}_3$ ) and salicylic acid (SA) treatments. The expression levels of *DIHDAC* gene showed an anti-“L” pattern in the SA treatment. Except for the decrease of *DISRT1-1* expression, other *DIHDAC* genes showed obvious up-regulation in the MeJA treatment. Under the ABA treatment, the expressions of *DIHDA8*, *DIHDA9-1*, *DIHDT3* and *DISRT2* reached the highest peak and then decreased gradually after the treatment for 12 h. Under  $\text{GA}_3$  treatment, the expression patterns of *DIHDA8*, *DIHDT1* and *DISRT1-1* were basically consistent. With the extension of treatment time, the expression trend of *DIHDA8*, *DIHDT1* and *DISRT1-1* decreased first and then increased, and the expression level was the lowest at 8 h of treatment. These suggested that *DIHDAC* would regulate

the somatic embryo development of longan by regulating hormone levels.【Conclusion】This study demonstrated that HDAC family coexisted in the evolutionary process of conservation and specificity in longan, which might be involved in the growth and development of fruits, seeds and roots, and it might regulates somatic embryogenesis of longan by responding to the expression of ABA, SA and GA in longan.

**Key words:** Longan; Deacetylase gene; Bioinformatics analysis; Genome-wide identification; Real-time quantitative PCR

表观遗传调控是在不改变基因的核苷酸序列的情况下,通过改变染色质结构来调控基因表达,并且产生可遗传变异。目前,常见的表观遗传学修饰包括 DNA 的甲基化、组蛋白修饰(甲基化及乙酰化等)、基因印记、非编码的 RNA 调控和染色质重塑等。组蛋白乙酰化作用是组蛋白修饰中鉴定最早、了解最清楚的一种修饰作用,其作用位点在组蛋白 H2A、H2B、H3、H4 均有分布。乙酰化是在组蛋白乙酰转移酶(Histone acetyltransferase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylase, HDAC)共同调控下维持动态平衡。在组蛋白乙酰化酶作用下将乙酰基团移至组蛋白末端赖氨酸残基上,使染色质结构由紧密变松散,启动转录促进基因的表达;组蛋白去乙酰化酶能够水解组蛋白末端赖氨酸残基上的乙酰基团,导致染色质凝聚而抑制基因的转录表达。在植物中 HDAC 家族蛋白可划分为 RPD3/HDA1、SIR2 和 HD2 三个亚家族,其中 RPD3/HDA1 和 SIR2 亚家族与酵母同源,HD2 亚家族是植物特有的家族。

组蛋白去乙酰化酶存在于动物、植物及真菌中,1988 年从豌豆中首次鉴定出植物中的组蛋白去乙酰化酶基因<sup>[1]</sup>。近年来,在植物中 HDAC 基因的研究逐渐增多,在拟南芥<sup>[2]</sup>和水稻<sup>[3]</sup>均鉴定出 18 个 HDACs,番茄<sup>[4]</sup>中鉴定出 15 个 HDACs,甜橙<sup>[5]</sup>中鉴定出 16 个 HDACs。HDAC 在组蛋白乙酰化修饰过程发挥重要作用,HDAC 参与调控植物的生长发育过程及逆境胁迫过程。研究表明 HDAC 生长及生殖发育过程,如参与杨树根的生长发育<sup>[6]</sup>;调控香蕉及番茄的果实成熟过程<sup>[7-8]</sup>;AtHDA19 参与调控花器官的发育<sup>[9]</sup>;HD2 亚家族成员参与拟南芥胚生长及胚胎发育的调控<sup>[10]</sup>;AtHDA19 与 SCL15 互作调控拟南芥种子成熟过程<sup>[11]</sup>;在玉米中,ZmHDA101 调控玉米籽粒大小<sup>[12]</sup>。HDAC 参与植物对在盐、寒冷等非生物胁迫响应<sup>[13-14]</sup>及 ABA<sup>[15]</sup>、SA<sup>[16]</sup>、乙烯(ethyl-

ene)<sup>[17]</sup>、GA<sub>3</sub><sup>[18]</sup>和 MeJA<sup>[19]</sup>等植物激素信号响应,此外,HDAC 参与调控基因沉默<sup>[20]</sup>,调控番茄抗青枯病的分子机制<sup>[21]</sup>和水稻自身免疫系统<sup>[22]</sup>。

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)又名桂圆,是无患子科龙眼属植物,著名的亚热带特色常绿果树。主要分布在东经 105°40'~119°31'及南北纬 28°50'区域内,主要种植于中国、越南、泰国等 20 多个国家。果实营养丰富,有很高的经济、药用价值。龙眼胚胎发育对龙眼坐果率及果实的品质有重要影响,因此对龙眼胚胎发育进行深入研究对龙眼产业的发展具有重大意义。赖钟雄等<sup>[23]</sup>建立了龙眼体胚发生系统并长期继代保持,是研究植物胚胎发育良好的替代材料。目前有关 HDAC 的研究主要集中在拟南芥、水稻、玉米等模式作物上,HDAC 在龙眼中的研究尚未见报道。因此,笔者对 DIHDAC 蛋白家族进行全基因组鉴定,并对家族各成员进行基本理化性质、亚细胞定位、系统进化树、基因结构与保守基序、蛋白保守结构域、启动子顺式作用元件、蛋白质二级、三级结构、蛋白质互作网络及非胚性及胚性培养物(NEC、EC、ICpEC、GE)、不同组织器官的转录组数据(FPKM)进行分析,用 qRT-PCR 检测 DIHDAC 在非胚性及胚性培养物及不同激素处理下的表达模式,以期为研究龙眼 HDAC 基因的功能提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验材料为福建农林大学园艺植物生物研究所提供的‘红核子’龙眼胚性愈伤组织<sup>[24]</sup>。参照赖钟雄等<sup>[23]</sup>建立的培养方法获得非胚性愈伤组织(Nonembryonic callus, NEC)、胚性愈伤组织(Embryogenic callus, EC)、不完全胚性紧实结构(Incomplete embryotic compact structure, ICpEC)及球形胚(Globular embryo, GE)材料。取 0.2 g 继代

培养 20 d 且生长状态良好的龙眼松散型胚性愈伤组织并用  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的赤霉素( $\text{GA}_3$ )、脱落酸(ABA)水杨酸(SA)和茉莉酸甲酯(MeJA)对其进行处理,置于  $25 \text{ }^\circ\text{C}$   $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  的摇床上培养 0、4、8、12、24 h,收样冻存于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中备用。及采用本实验室龙眼基因组及转录组数据库(SRA050205)进行分析。

## 1.2 龙眼 HDAC 家族成员生物信息学分析

根据 Fan 等<sup>[25]</sup>在苹果组蛋白修饰基因家族鉴定中报道的 Pfam 号(HDAs:PF00850、SRTs:PF02146),从龙眼基因组数据库中提取候选的龙眼 RPD3/HDA1 和 SIR2 家族成员。以拟南芥 HD2 家族基因的氨基酸序列为对照,经龙眼数据库同源比对,进行本地 BLAST 比对检索,初步筛选龙眼 HD2 家族成员。然后利用在线软件 HMMER 对所有候选序列进行鉴定,筛选具有完整保守结构域序列作为龙眼 HDAC 基因家族成员。利用在线工具 ExPasy ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))预测 DIHDAC 家族成员的氨基酸个数、等电点、分子量、不稳定系数和亲水性等理化性质。利用 WoLF SORT (<https://www.genscript.com/tools/wolf-psort>) 在线软件,对 DIHDAC 家族蛋白进行亚细胞定位预测;使用 MEGA 5.05 软件采用邻近相邻法(Neighbor-Joining, NJ)对龙眼、拟南芥、水稻、杨树、甜橙 5 个物种构建系统进化树,且对构建的进化树进行自检(bootstrap)分析,设置 1 000 次重复检验,其他参数为默认值,并利用在线工具 iTOL (<https://itol.embl.de/upload.cgi>)对进化树进行美化;通过 MEME 在线(Multiple expectation maximization for motif elicitation)分析龙眼的保守基序(motif);利用龙眼 gff 文件和 genome 文件对 DIHDAC 家族成员进行基因结构预测和分析;使用 Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>) 和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对所有候选成员的结构域进行分析;采用 TBtools 对获得的 motif、内含子、外显子及保守结构域进行绘图。经龙眼基因组数据库提取获得 DIHDAC 家族基因各成员 ATG 上游 2 000 bp 的启动子序列,利用在线网站 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析 DIHDAC 家族成员启动子顺式作用元件;利用 SOMPA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopma.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl))在线软件预测 DIHDAC 家族蛋白的二级

结构。

## 1.3 龙眼 HDAC 成员蛋白互作预测分析

利用在线软件 STRING (<https://string-db.org>)对 14 个蛋白成员之间的互作关系预测(以拟南芥作为模式),用 k 均值聚类算法分析,最低互动评分选择 highest confidence (0.900),预测 DIHDAC 自身及与其他蛋白之间的互作情况。

## 1.4 龙眼 HDAC 在非胚性和胚性培养物及不同组织器官的转录组基因表达分析

利用龙眼转录组数据库提取 DIHDAC 基因在非胚性及胚性培养物中及不同组织器官(种子、根、茎、叶、花、花蕾、果肉、幼果、果皮)特异性表达的 FPKM 值,分析家族各成员的表达趋势,利用 TBtools 绘制热图。

## 1.5 龙眼 HDAC 在非胚性及胚性培养物及不同激素处理下的 qRT-PCR 分析

采用 TransZol Up 试剂盒提取龙眼材料总 RNA,采用 PrimeScript™ IV 1st Strand cDNA Synthesis Mix 试剂盒进行 cDNA 合成。利用 DNAMAN 和 Primer 6.0 对所选序列进行 qRT-PCR 引物设计。分别以 EF-1 $\alpha$  和 UBQ 为龙眼体胚发生过程中及不同激素处理定量的内参基因<sup>[26]</sup>,使用 Light-Cycler480 qRT-PCR 仪器检测,反应体系为  $20 \mu\text{L}$ : SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)  $10 \mu\text{L}$ , cDNA 模板  $2 \mu\text{L}$ , 上下游引物各  $0.8 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $6.4 \mu\text{L}$ 。反应程序为:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 30 s,  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 5 s,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $2 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 10 s, 循环次数 40。DIHDAC 成员的相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算。采用 SPSS 软件进行差异显著性分析 ( $p < 0.05$ ),并用 Graphpad 制图。

## 2 结果与分析

### 2.1 DIHDAC 家族成员鉴定及蛋白基本理化性质分析

在龙眼中共筛选出 14 个具有完整保守结构域的 HDAC 家族成员。参考拟南芥 HDAC 的命名方法进行命名,预测分析 DIHDAC 家族蛋白基本理化性质及亚细胞定位。结果(表 1)表明,DIHDAC 所有成员均为亲水性蛋白质,各亚家族成员序列长度差异较大,氨基酸个数为 282~1 044 aa。其中 RPD3/HDA1 亚家族的 9 个成员,氨基酸个数在 351~1 044 aa,蛋白的等电点在 5.09~5.65,均呈酸

表1 DIHDAC家族基本理化性质分析  
Table 1 Basic physicochemical property of DIHDAC family

基因名称 Gene name	注释到拟南芥成员 Annotated in <i>Arabidopsis thaliana</i>	氨基酸数 Amino acids number	等电点 PI	分子质量 Molecular weight/kD	不稳定系数 Instability coefficient	亲水性 Hydrophilia	亚细胞定位 Subcellular localization
Dlo_031838.1 (DIHDA5)	<i>AtHDA5</i>	1 040	5.63	114.82	45.49	-0.405	细胞核 Nucleus
Dlo_019233.2 (DIHDA6)	<i>AtHDA6</i>	473	5.26	53.29	42.80	-0.478	细胞核 Nucleus
Dlo_032451.1 (DIHDA8)	<i>AtHDA8</i>	479	5.26	52.36	35.97	-0.119	内质网 Endoplasmic reticulum
Dlo_031519.1 (DIHDA9-1)	<i>AtHDA9</i>	429	5.09	48.99	29.78	-0.371	线粒体 Mitochondria
Dlo_031530.1 (DIHDA9-2)	<i>AtHDA9</i>	441	5.5	50.50	32.57	-0.328	细胞质 Cytoplasm
Dlo_011745.2 (DIHDA14)	<i>AtHDA14</i>	351	5.65	37.92	35.37	-0.113	内质网 Endoplasmic reticulum
Dlo_037570.1 (DIHDA19-1)	<i>AtHDA19</i>	498	5.12	56.21	40.11	-0.553	细胞核 Nucleus
Dlo_036520.1 (DIHDA19-2)	<i>AtHDA19</i>	504	5.21	56.88	39.60	-0.532	细胞核 Nucleus
Dlo_038230.1 (DIHDA19-3)	<i>AtHDA19</i>	498	5.16	56.29	39.98	-0.544	细胞核 Nucleus
Dlo_030193.1 (DIHDT1)	<i>AtHDT1</i>	282	5.09	29.92	40.22	-0.991	细胞核 Nucleus
Dlo_031412.1 (DIHDT3)	<i>AtHDT3</i>	299	4.98	32.61	42.20	-1.223	细胞核 Nucleus
Dlo_017089.1 (DISRT1-1)	<i>AtSRT1</i>	497	8.87	55.23	39.54	-0.252	细胞核 Nucleus
Dlo_034158.1 (DISRT1-2)	<i>AtSRT1</i>	531	9.11	59.83	45.06	-0.250	细胞核 Nucleus
Dlo_000650.1 (DISRT2)	<i>AtSRT2</i>	368	7.04	40.46	38.14	-0.225	细胞质 Cytoplasm

性,蛋白分子质量在 37.92~114.82 kD。HD2 亚家族的 2 个成员的理化性质基本一致,氨基酸数目在 290 aa 左右,等电点均在 5.0 左右,呈酸性,都属于不稳定亲水性蛋白。SIR2 亚家族成员的理化性质与其他 2 个亚家族略有不同,等电点在 7.0~9.0,为碱性蛋白质。亚细胞定位预测结果显示有 9 个成员定位于细胞核上,2 个定位于细胞质,2 个定位于内质网,1 个定位在线粒体。

## 2.2 DIHDAC 家族系统进化树的构建及分析

为进一步了解 DIHDAC 的生物学功能和亲缘关系,采用 MEGA 5.05 的临近法(Neighbor-joining)构建龙眼和拟南芥、杨树、甜橙、水稻共计 63 个 HDACs 氨基酸序列的聚类进化树。结果(图 1)显示,可将 DIHDAC 家族分为为 3 个亚家族,即 RPD3/HDA1、HD2 和 SIR2 亚家族,RPD3/HDA1 亚家族有 9 个成员包括 DIHDA5、DIHDA6、DIHDA8、DIHDA9-1、DIHDA9-2、DIHDA14、DIHDA19-1、DI-

HDA19-2、DIHDA19-3;HD2 亚家族有 DIHDT1 和 DIHDT3 两个成员,SIR2 亚家族有 3 个成员包括 DISRT1-1、DISRT1-2、DISRT2。且发现龙眼 HDAC 家族与水稻<sup>[3]</sup>(3 个亚族)、番茄<sup>[4]</sup>(3 个亚族)中的聚类情况相同,说明 DIHDAC 家族成员在各个物种中具有相似的进化过程,可能源于该基因家族功能的保守性。

## 2.3 DIHDAC 家族成员基因结构、保守基序及蛋白保守结构域分析

为了解 DIHDAC 家族基因的外显子-内含子的特征,使用龙眼 gff 文件对 DIHDAC 外显子-内含子分布情况进行分析。结果如图 2 所示,DIHDAC 基因家族成员外显子-内含子结构数量分布差异较大,其中 DISRT1-2 外显子数目(15)最多,DIHDA8 外显子数目(5)最少;DISRT1-2 内含子数目(14)最多,DIHDA8 内含子数目(4)最少。有 4 个成员含有 7 个外显子,6 个内含子(DIHDA19-1、DIHDA19-2、DI-

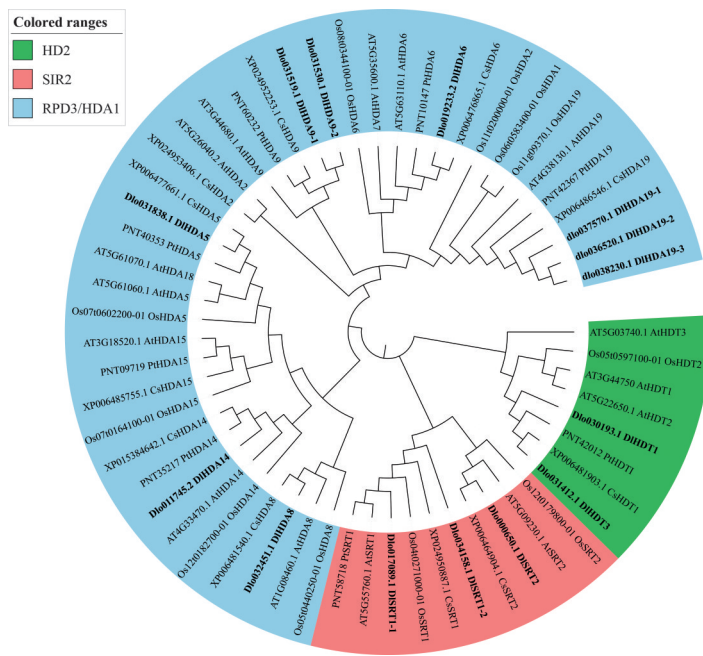


图 1 龙眼、拟南芥、水稻、杨树、甜橙 HDAC 家族成员系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of HDAC family members in longan, *Arabidopsis*, rice, poplar, and orange

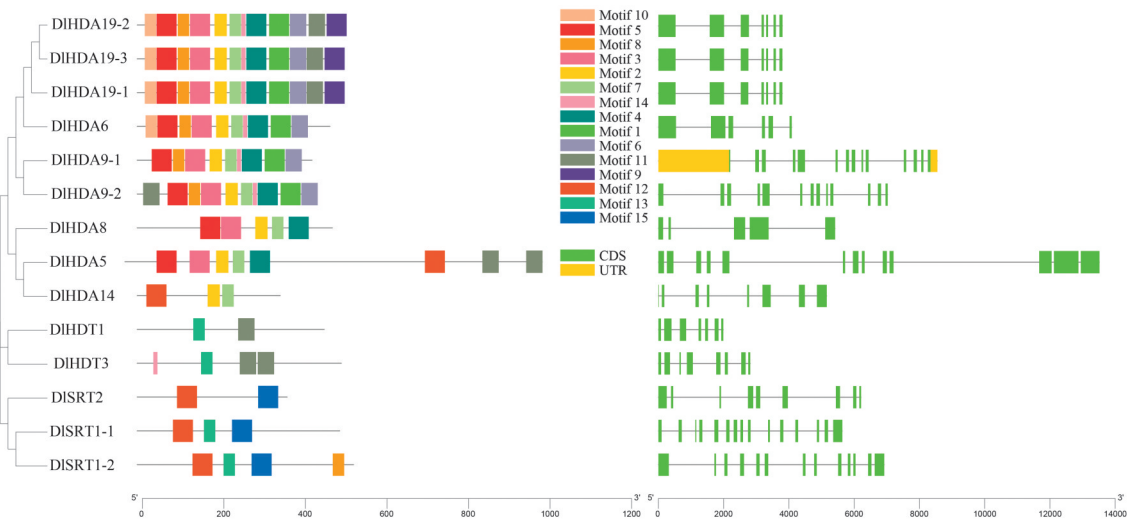


图 2 龙眼 DIHDAC 家族成员基因结构与保守 motif 分布

Fig. 2 Conservative motif and genetic structure distribution of DIHDAC family members

HDA19-3 和 DIHDT3); 有 3 个成员含有 13 个外显子, 12 个内含子(DIHDA9-2、DIHDA5 和 DISRT2); DIHDA14 和 DIHDT1 均含有 8 个外显子, 7 个内含子。

利用 MEME 在线预测 DIHDAC 家族蛋白质保守基序, 分析发现 motif 2 和 motif 7 是 RPD3/HDA1 亚家族成员特有保守基序且存在于该亚家族所有成员中; 此外, 除 DIHDA14 外 RPD3/HDA1 亚家族每个成员均含有 motif 3、motif 4 和 motif 5; 除 DIHDA5、DIHDA8、DIHDA14 外, RPD3/HDA1 亚家族 6 个成员均含有 motif 6。在 HD2 和 SIR2 亚家族中,

除 DISRT1-1 外, 其他成员均含有 motif 13; HD2 亚家族各成员均含有 motif 11; SIR2 亚家族成员均含有 motif 12 和 motif 15, 且 motif 15 为该亚家族所特有保守基序。总体而言, HD2 和 SIR2 亚家族成员相对保守, 推测这两个家族成员功能具有保守性, 但由于家族成员间发挥不同的功能所致。

为了解 DIHDAC 家族成员蛋白保守结构域特点, 对 14 条 DIHDACs 的蛋白结构域进行预测分析, 结果显示(图 3)DIHDAC 家族在结构上比较保守, 其中 RPD3/HDA1 亚家族的 9 个成员均含有保

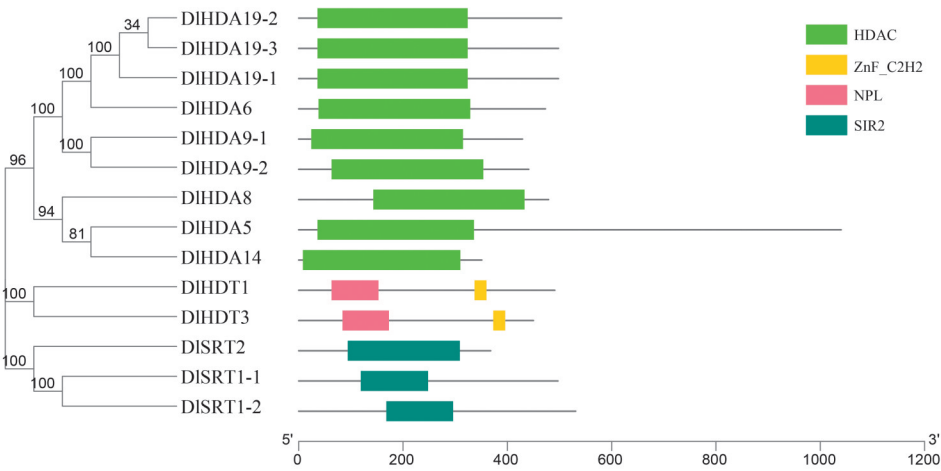


图3 龙眼 DIHDAC 家族蛋白保守结构域分析

Fig. 3 Conserved domain distribution of proteins of DIHDAC family

守的组蛋白去乙酰化酶结构域,该结构域为组蛋白去乙酰化酶发挥功能所必须的结构域,且该家族去乙酰化酶活性可以被专用抑制剂曲古抑菌素(TSA)抑制。HD2 亚家族序列与肽脯氨酰顺反异构酶同源,在龙眼中鉴定出 2 个 HD2 亚家族成员,均含有 C2H2 型锌指结构域和 Nucleoplasmin 结构域。SIR2 亚家族 3 个成员均含有 SIR2 结构域,该家族在蛋白序列和结构上与其他家族成员

不具有同源性,其去乙酰化酶活性也不能被曲古抑菌素(TSA)抑制,具有该结构域的组蛋白去乙酰化酶需要依赖于 NAD<sup>+</sup>完成其组蛋白去乙酰化的催化。

### 2.4 DIHDAC 家族基因启动子顺式作用元件分析

利用在线网站 PlantCARE 对 DIHDAC 家族成员 ATG 上游 2 000 bp 的启动子序列顺式作用元件进行分析,结果显示(图 4)DIHDAC 家族启动子序列包含大量的胁迫响应元件、光响应元件、激素响

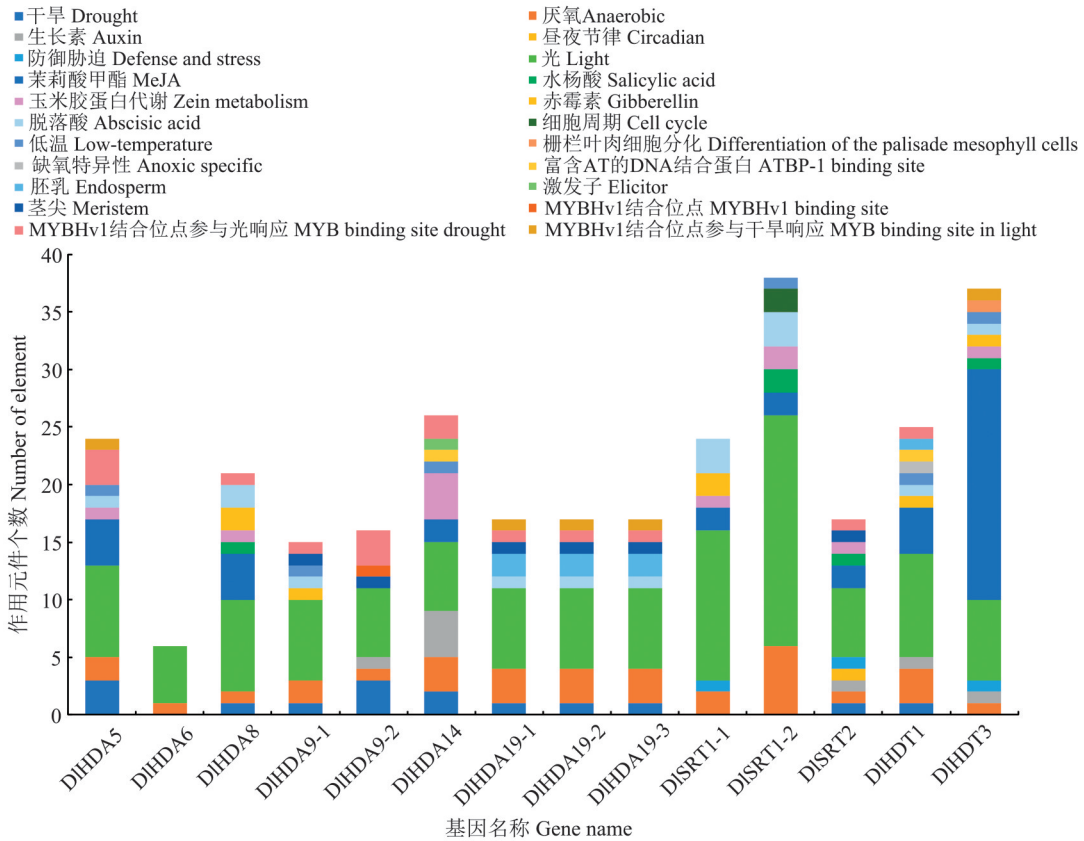


图4 DIHDAC 家族启动子顺式作用元件分布

Fig. 4 Promoter cis-acting element distribution of DIHDAC family

应元件、厌氧诱导响应元件、胚乳发育响应元件、玉米胶蛋白代谢调控相关元件、植物胚乳生长发育相关元件、茎尖生长发育相关元件、栅栏叶肉细胞分化元件、昼夜节律相关元件及细胞周期相关元件等。*DIHDAC* 家族成员均含有光反应元件,且光反应元件数目最多为 116 个,表明 *DIHDAC* 家族在光响应过程中作用重要。*DIHDAC* 启动子序列含 5 种激素响应元件分别为水杨酸响应元件(5)、茉莉酸甲酯响应元件(20)、脱落酸响应元件(18)、赤霉素响应元件(7)和生长素响应元件(8),其中 HD2 亚家族的 2 个成员 *DIHDT1* 和 *DIHDT3* 均含有脱落酸、赤霉素和生长素顺式作用元件。以上结果表明 *DIHDAC* 家族的表达可能受多种激素共同调控,茉莉酸甲酯和脱落酸在诱导 *DIHDAC* 基因表达过程中可能扮演重要角色。

此外,对 *DIHDAC* 家族成员启动子序列逆境响

应元件进行分析,*DIHDAC* 家族启动子序列中含 5 种逆境响应元件分别为低温胁迫响应元件、干旱胁迫响应元件、厌氧诱导响应元件、缺氧特异性响应元件和防御和胁迫相关的应答元件,其数目分别为 6、15、32、1、3 个,推测 *DIHDAC* 可能参与多种逆境胁迫。同时,发现 *DIHDAC* 家族所有成员都含有厌氧诱导响应元件,其中 *DISRT1-2* 启动子序列所含的厌氧诱导响应元件数量最多为 7 个。除上述作用元件外,*DIHDAC* 家族成员还含有许多与植物生长相关的作用元件玉米胶蛋白代谢调控相关元件等。

## 2.5 龙眼 HDAC 家族蛋白的二级结构预测

蛋白质二级结构指蛋白质的多肽链中有规则重复的构象,限于主链原子的局部空间排列,不包括与肽链其他区段的相互关系及侧链构象,蛋白质二级结构影响蛋白质的稳定性。对 *DIHDAC* 家族蛋白的二级结构进行预测,结果(表 2)显示,RPD3/

表 2 *DIHDAC* 家族成员蛋白质二级结构组成

Table 2 Composition of family protein secondary structure of *DIHDAC*

%

蛋白质名称 Protein name	$\alpha$ -螺旋 $\alpha$ -helix	伸展链 Extension chain	无规则卷曲 Random curl	$\beta$ -转角 $\beta$ -turn	蛋白质名称 Protein name	$\alpha$ -螺旋 $\alpha$ -helix	伸展链 Extension chain	无规则卷曲 Random curl	$\beta$ -转角 $\beta$ -turn
DIHDA5	37.88	18.37	35.67	8.08	DIHDA19-2	35.12	13.89	45.04	5.95
DIHDA6	32.14	15.01	46.09	6.77	DIHDA19-3	38.76	13.45	42.37	5.42
DIHDA8	37.58	19.21	37.58	5.64	DIHDT1	20.57	16.67	53.9	8.87
DIHDA9-1	36.36	15.62	40.33	7.69	DIHDT3	7.36	14.38	72.58	5.69
DIHDA9-2	40.14	15.65	38.32	5.90	DISRT1-1	31.39	18.31	43.66	6.64
DIHDA14	41.31	15.95	37.89	4.84	DISRT1-2	24.29	23.92	43.69	8.10
DIHDA19-1	36.95	14.26	43.17	5.62	DISRT2	39.4	14.13	39.67	6.79

HDA1 亚家族的 9 个成员, $\alpha$ -螺旋所占比例都在 30%以上,无规则卷曲所占比例都在 35%~45%,伸展链和  $\beta$ -转角所占比例相对较低。SIR2 亚家族所含二级元件数量与 RPD3/HDA1 亚家族类似,二级元件占的比例由高到低依次为无规则卷曲、 $\alpha$ -螺旋、伸展链和  $\beta$ -转角。HD2 亚家族的二级结构明显不同于 RPD3/HDA1 亚家族和 SIR2 亚家族,HD2 亚家族中的 *DIHDT1* 和 *DIHDT3* 含  $\alpha$ -螺旋数少于其他成员,而无规则卷曲所占比例相对较高,其中 *DIHDT3* 含无规则卷曲在整个家族占比例最高,为 72.58%,含  $\alpha$ -螺旋所占比例最低,为 7.36%。HD2 亚家族具有独特的蛋白二级结构,预测是由于 HD2 亚家族是植物特有的一类组蛋白去乙酰化酶所致。

## 2.6 龙眼 HDAC 家族蛋白互作网络预测分析

蛋白质之间的互相作用包含了直接物理相互

作用和间接的功能相关性。以拟南芥 AtHDAC 蛋白数据库为参考,利用在线蛋白互作数据库 String 对 14 个 *DIHDAC* 蛋白成员之间的相作关系预测。*DIHDAC* 蛋白互作聚类预测结果如图 5 所示,*DIHDAC* 蛋白可以与多种蛋白发生互作,尤其在图中红色和绿色区域的蛋白质间互作关系较强。发现家族 *DIHDAC* 蛋白既可以与自身家族成员发生互作,还可以与其他蛋白发生互作。*DIHDAC* 家族蛋白主要与 HTA11、HTA2、HTB9、HTR4、HTB2 及 E2F1、E2F3、DPA、DPA 蛋白之间发生互作。预测与 *DIHDAC* 蛋白互作关系较强的蛋白可能与 *DIHDAC* 具有功能相关性。

## 2.7 *DIHDAC* 家族基因在龙眼非胚性、胚性培养物及不同组织器官中转录组数据分析

2.7.1 *DIHDAC* 家族基因在龙眼非胚性及胚性培养物中转录组数据分析 为进一步分析 *DIHDAC* 家



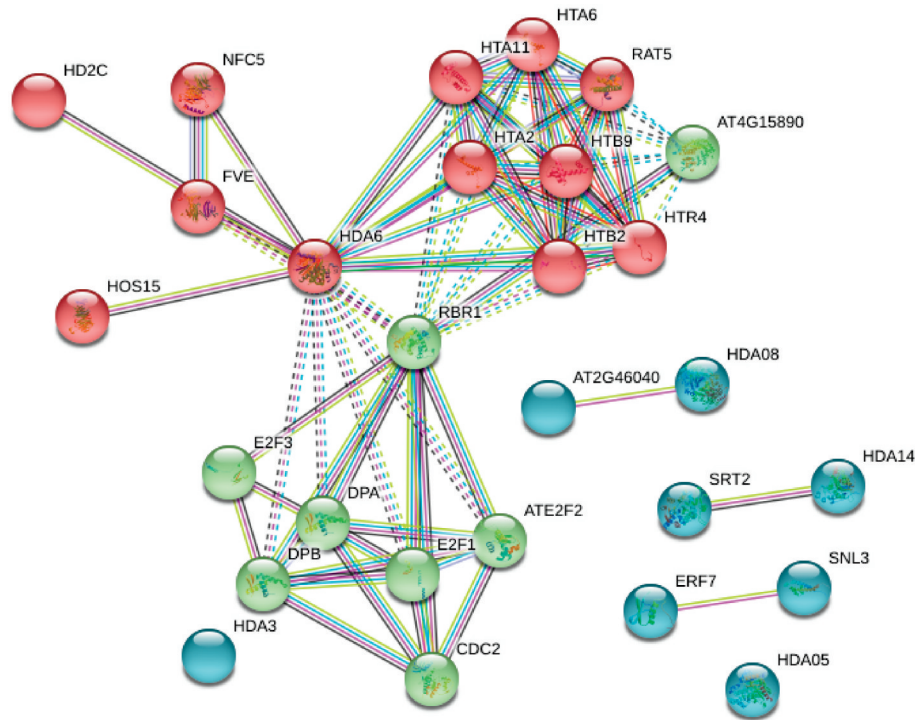
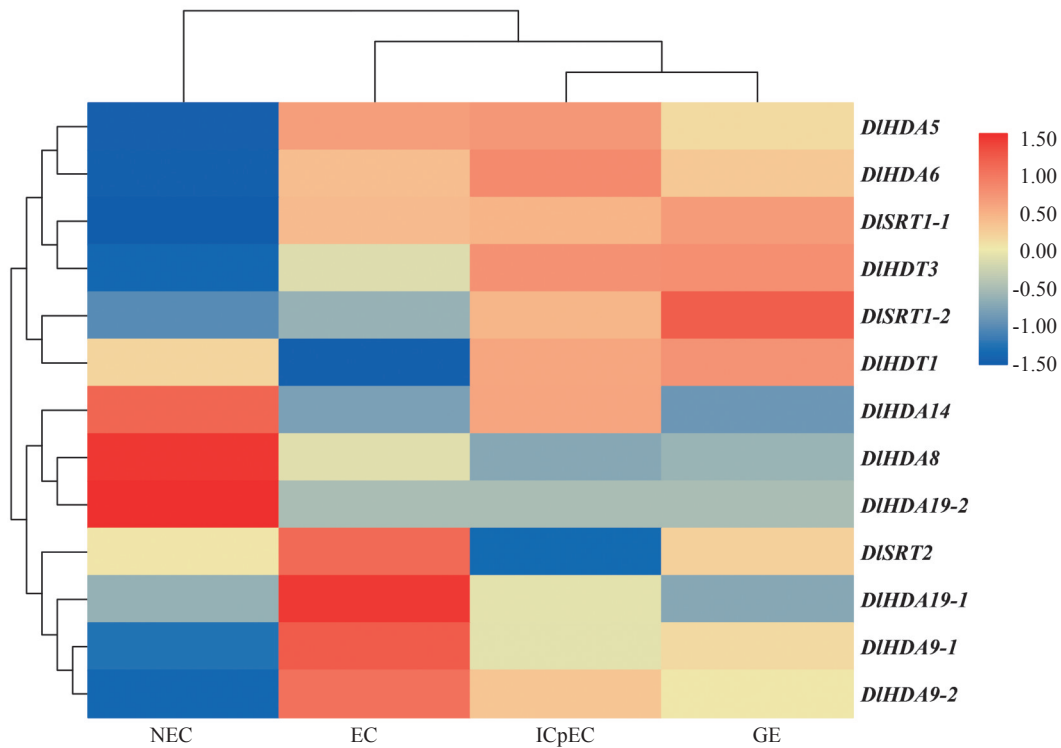


图5 DIHDAC 家族蛋白质互作预测分析

Fig. 5 Protein interaction prediction analysis of DIHDAC

族成员在非胚性及胚性培养物中 (NEC, EC, ICpEC, GE) 的表达情况。本研究对这 4 个阶段 *DI-*

*HDAC* 基因的 FPKM 值进行分析, 并制作聚类分析热图 (图 6)。除 *HDAC19-3* 在 4 个阶段均不表达



NEC. 非胚性愈伤组织; EC. 胚性愈伤组织; ICpEC. 不完全胚性紧实结构; GE. 球形胚。下同。

NEC. Nonembryogenic callus; EC. Embryogenic callus; ICpEC. Incomplete embryotic compacted structure; GE. Spherical embryo. The same below.

图6 DIHDAC 家族在体胚发生阶段的特异表达分析

Fig. 6 Specific expression analysis of the DIHDAC family in the somatic embryogenesis stage

外,其余 13 个 *DIHDAC* 成员均检测到表达。结果显示,表达模式总体分为五大类:第一类在 NEC 阶段上调表达,其他阶段表达下调(*DIHDA8*、*DIHDA19-2*),且 *DIHDA19-2* 仅在 NEC 阶段表达,其他阶段均不表达,表明 *DIHDA19-2* 基因可能对龙眼 NEC 阶段的调控作用较为重要;第二类在 EC 阶段上调表达(*DIHDA19-1*、*DIHDA9-1*、*DIHDA9-2*、*DISRT2*)其他阶段都下调表达;第三类在 NEC 和 ICpEC 阶段上调表达,EC 和 GE 下调(*DIHDA14*);第四类在 EC、ICpEC 和 GE 阶段上调表达,NEC 下调表达(*DIHDA5*、*DIHDA6*、*DISRT1-1*、*DIHDT3*);第五类 ICpEC

和 GE 阶段上调表达,NEC 和 EC 下调表达(*DISRT1-2*、*DIHDT1*)。总之,*DIHDAC* 家族成员在在非胚性及胚性培养物中表现出不同的表达模式,大部分成员在 ICpEC 和 GE 阶段表达量较高,说明 *DIHDAC* 家族基因主要参与这两个阶段培养物生长。

**2.7.2 *DIHDAC* 家族基因在龙眼不同组织器官中转录组数据分析** 本研究结合 *DIHDAC* 基因转录组数据(FPKM 值)分析该家族成员在龙眼不同组织器官中的表达情况,并制作聚类分析热图(图 7)。分析结果与 *DIHDAC* 基因在非胚性、胚性培养物中表达情况一致,除 *DIHDAC19-3* 外其余的 13 个 *DIH-*

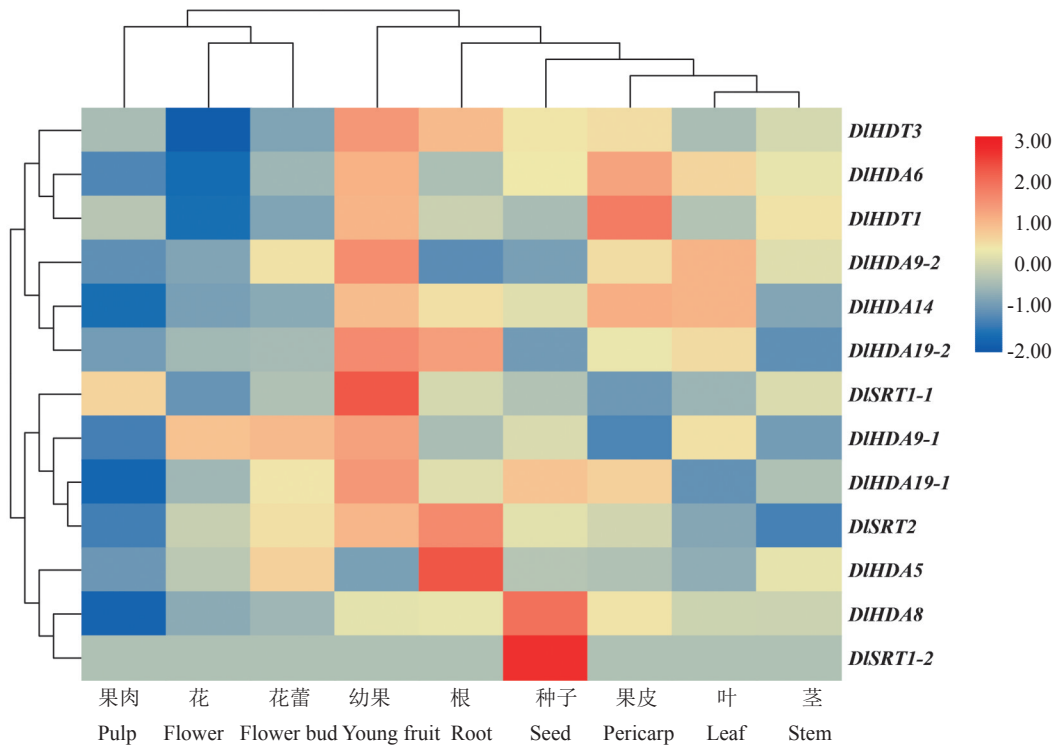


图7 *DIHDAC*家族在不同组织器官的特异表达分析

Fig. 7 Specific expression analysis of *DIHDAC* family in different tissues and organs

*DAC* 成员均检测到表达。表达模式总体分为 4 大类:第一类在幼果期显著上调表达的有 6 个成员(*DIHDA9-1*、*DIHDA9-2*、*DIHDA19-1*、*DIHDA19-2*、*DISRT1-1* 和 *DIHDT3*),其中 *DIHDA9-1* 在花和花蕾中部分上调表达,*DIHDA19-1* 在种子果皮中部分上调表达;第二类在种子中显著上调表达的成员有 2 个(*DIHDA8*、*DISRT1-2*),其中 *DISRT1-2* 只有在种子中有表达,在其他组织部位均未表达;第三类在果皮中显著上调表达的有 *DIHDA6*、*DIHDT1* 和 *DIHDA14*(*DIHDT1* 在果皮中 FPKM 值高达 2065.3),其中 *DIHDA14* 在叶片和幼果中部分上调表达;第

四类在根中显著上调表达的有 *DIHDA5*、*DIHDA19-2*、*DISRT2* 和 *DIHDT3*,其他部位下调。总体而言,*DIHDAC* 家族基因在龙眼果实、种子及根部表达量高,推测该家族基因主要参与果实及根的生长发育过程。*DIHDAC* 家族成员在龙眼不同组织器官表现出不同的表达模式,说明 *DIHDAC* 家族基因可能存在功能冗余和分化。

**2.8 *DIHDAC* 家族成员在龙眼非胚性、胚性培养物 and 不同激素处理下的 qRT-PCR 分析**

**2.8.1 *DIHDAC* 部分成员在龙眼非胚性及胚性培养物中的 qRT-PCR 分析** 为进一步了解 *DIHDAC* 家

族在龙眼体胚发生中的调控作用,通过分析龙眼在非胚性及胚性培养物中的转录组数据。筛选出在龙眼体胚发生早期表达差异显著的 8 个 *DIHDAC*s 基因 (*DIHDA6*、*DIHDA8*、*DIHDA9-1*、*DIHDA19-1*、

*DIHDT1*、*DIHDT3*、*DISRT1-1* 和 *DISRT2*)。利用 qRT-PCR 检测其表达趋势,结果(图 8)显示,*DIHDAC* 的表达趋势与 FPKM 值趋势基本一致。大部分基因在 GE 阶段表达量显著上升,进一步验证 *DI-*

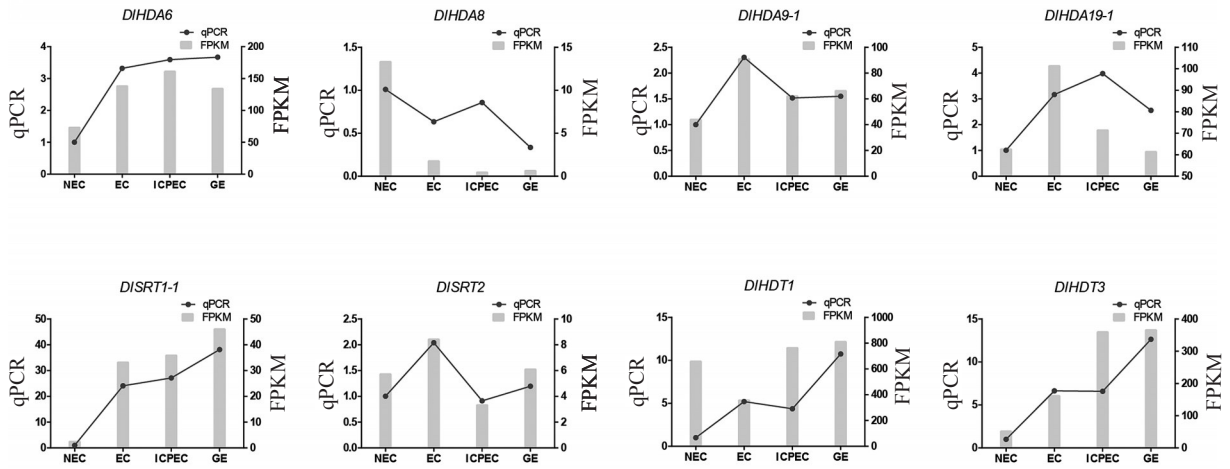


图8 *DIHDAC*家族在不同体胚发生阶段的相对表达量

Fig. 8 Relative expression of *DIHDAC* family at different somatic embryogenesis stages

*HDAC* 基因在龙眼体胚发生过程中 GE 阶段尤为重要作用。

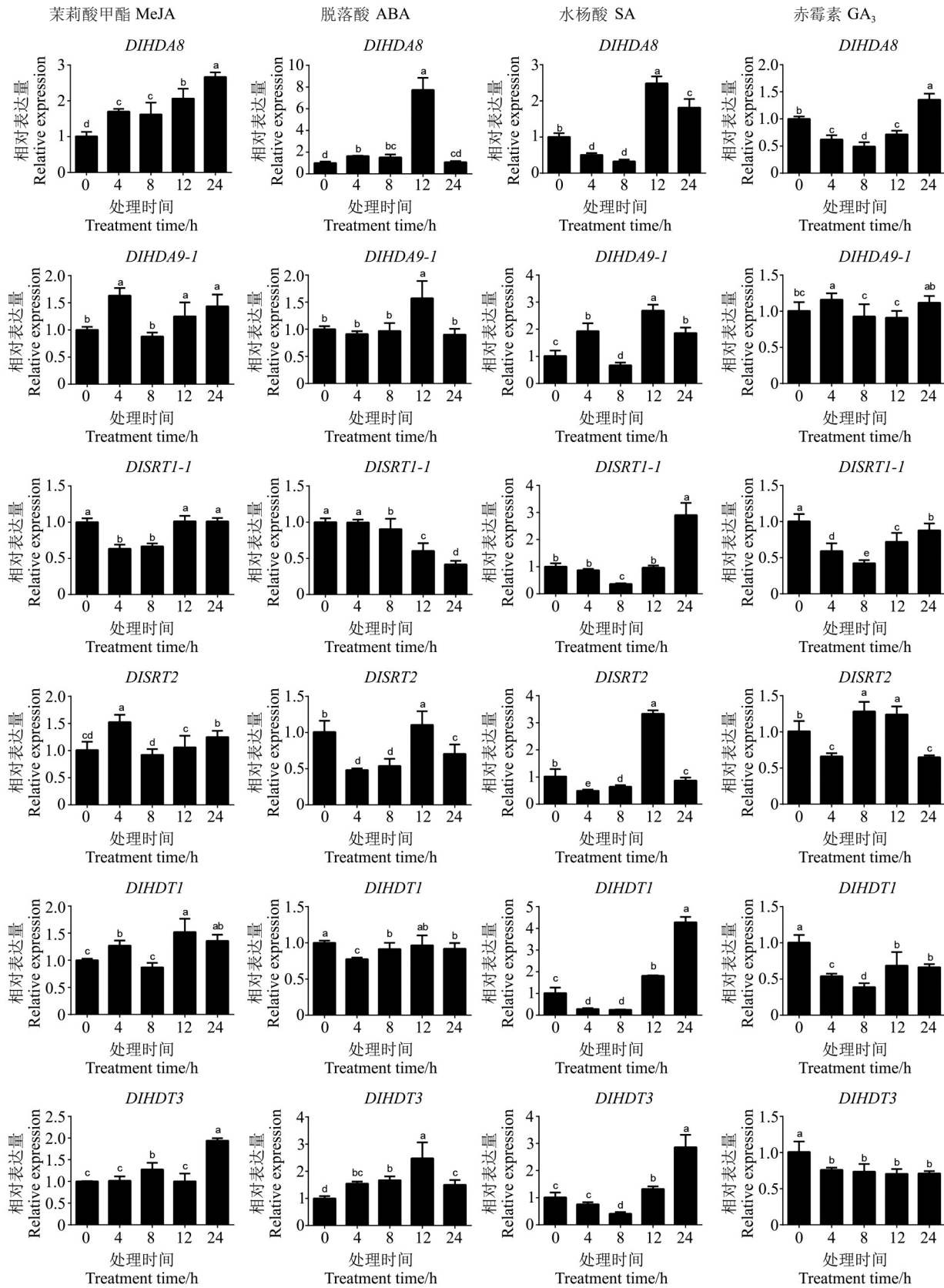
2.8.2 *DIHDAC* 部分成员在不同激素处理下的 qRT-PCR 分析 结合 *DIHDAC* 家族各成员启动子顺式作用元件分析,使用 qRT-PCR 检测龙眼胚性愈伤组织(EC)在 4 种外源激素(ABA、MeJA、SA、GA<sub>3</sub>)处理 0、4、8、12、24 h 后 *DIHDA8*、*DIHDA9-1*、*DIHDT1*、*DIHDT3*、*DISRT1-1* 和 *DISRT2* 的表达水平(图 9)。在不同外源激素处理下,大部分 *DIHDAC* 都存在明显响应,但变化趋势不尽相同。在 MeJA 处理下,除 *DISRT1-1* 表达量下降,其他成员呈现明显上调趋势。在 ABA 处理下,*DIHDA8*、*DIHDA9-1*、*DIHDT3* 和 *DISRT2* 的相对表达量均在处理 12 h 时达到最高峰随后逐渐下降;*DIHDT1* 在处理 4 h 时表达量最低;*DISRT1-1* 随着处理时间延长表达量逐渐降低。在 SA 处理下,*DIHDAC* 基因的表达呈反“L”型模式,在 SA 处理 4 h 或 8 h 时,*DIHDA9-1*、*DISRT2*、*DIHDA8*、*DIHDT1*、*DIHDT3* 和 *DISRT1-1* 表达明显受到抑制,而在 SA 处理 12 h 或 24 h 时表达量又显著上升。在 GA<sub>3</sub> 处理下 *DIHDA8*、*DIHDT1* 和 *DISRT1-1* 的表达模式基本一致,均随着处理时间延长,表达趋势先降低再上升,在处理 8 h 时表达量最低。

### 3 讨论

#### 3.1 龙眼 HD2 家族进化的独特性分析

组蛋白乙酰化修饰是由 HAT 和 HDAC 共同调控完成,通过组蛋白乙酰化作用和去乙酰化作用分别激活和抑制基因的转录表达。*HDAC* 通过影响植物激素的合成、信号转导等过程中相关基因的组蛋白乙酰化水平,调控相关基因的表达量,从而调节植物的生长发育、逆境响应等过程。*HDAC* 基因在拟南芥、玉米、水稻生长发育过程中具有重要作用,在无患子科植物龙眼体胚中 *HDAC* 基因功能尚未见报道。在本研究中,对龙眼 *HDAC* 家族成员进行全基因组鉴定,并从进化、基因表达等方面进行分析。在龙眼中共鉴定出 14 个 *DIHDAC* 成员,将其分为三个亚家族 RPD3/HDA1、HD2 和 SIR2 亚家族。

1997 年从玉米中鉴定出组蛋白去乙酰化酶 HD2 亚家族,是植物特有的组蛋白去乙酰化酶家族。本研究通过对 HD2 亚家族成员蛋白质二级结构、亚细胞定位预测、保守结构域分析,发现 HD2 亚家族与 RPD3/HDA1 和 SIR2 亚家族之间差异较大。HD2 亚家族蛋白结构以无规则卷曲为主,而 RPD3/HDA1 和 SIR2 亚家族以  $\alpha$ -螺旋和无规则卷



不同小写字母表示激素处理间在 0.05 水平差异显著。

Different small letters indicate significant difference at 0.05 level between hormone treatments.

图9 DIHDAC家族在不同激素处理下的相对表达量

Fig. 9 Relative expression of DIHDAC family under different hormone treatments

曲为主;亚细胞定位预测显示,HD2 亚家族成员 DIHDT1 和 DIHDT3 均定位于细胞核,而 RPD3/HDA1 和 SIR2 家族成员在细胞核等其他细胞器均分布。HD2 家族成员均含有锌指结构域和 Nucleoplasm 结构域,而锌指蛋白是真核生物基因组中较为丰富的一类转录因子,这种蛋白质与  $Zn^{2+}$  结合形成稳定的“手指”结构,在基因表达调控细胞分化和胚胎发育等过程中发挥重要作用<sup>[27]</sup>。HD2 家族蛋白进化的独特性,推测其生理功能可能不同于 DIHDAC 家族其他成员。

### 3.2 DIHDAC 可能参与龙眼果实、种子及根的生长发育

已有报道 DIHDAC 参与植物生长发育及生殖发育过程,如参与植物花器官发育<sup>[9]</sup>、根生长发育及果实发育成熟过程<sup>[7]</sup>。辣椒中, *CaHDA1* 在果皮和胎座破熟过程中表达且随着发育进程其表达量逐渐升高,推测 *CaHDA1* 基因参与辣椒果实发育<sup>[28]</sup>。番茄中 *SIHDA1* 和 *SIHDA4* 可以与 MADS-box 蛋白、AG1 和 TM29 发生互作,表明 *SIHDACs* 基因可通过调控果实成熟基因的表达来影响果实的成熟<sup>[29]</sup>。在玉米中, *ZmHDA101* 过表达和反义表达后,转基因玉米生长迟缓和开花延迟,说明 *ZmHDACs* 参与玉米开花等生长发育过程<sup>[30]</sup>。在拟南芥中, *hda9* 突变体幼苗与野生型相比,种子发芽速率加快,说明 *AtHDA9* 参与拟南芥种子萌发<sup>[31]</sup>; *AtHDA6* 能够抑制根发育基因 *EIN3* 的表达,用 HDAC 抑制剂处理后拟南芥幼苗产生大量根毛,说明 *AtHDA6* 参与拟南芥根的发育<sup>[32]</sup>。本研究中蛋白互作预测显示 DIHDA6 与其他蛋白之间互作强度较大,说明 *DIHDA6* 可能与其他蛋白相互作用进而调控龙眼生长发育进程。森林草莓中, *FvSRT1* 在花粉中表达水平较高, *FvSRT2* 在花药和心皮中的表达水平较高,说明该基因可能在调控森林草莓花粉、花药和心皮发育中有特定的作用<sup>[33]</sup>。结合不同组织器官中 DIHDAC 基因的转录组数据分析,发现 DIHDAC 在幼果、果皮、种子和根中的 FPKM 值较高,推测 DIHDAC 基因参与龙眼果实、种子及根的生长发育。同时,发现 *DISRT1-2* 在所有组织器官仅在种子检测到表达,推测 *DISRT1-2* 基因在龙眼种子发育过程发挥重要作用,进而为进一步研究龙眼生长发育中 DIHDAC 家族成员功能奠定了基础。

### 3.3 龙眼 HDAC 基因家族可能通过响应 ABA、SA 和 GA<sub>3</sub> 的表达从而调控龙眼体胚发生

植物激素是植物细胞接受特定环境信号诱导产生的、低浓度时可调节植物生理反应的活性物质。探究不同激素处理下龙眼胚性愈伤组织(EC)中 DIHDAC 的表达情况,发现 DIHDAC 在 4 种外源激素处理下均表达受到不同程度地诱导,说明 DIHDAC 可能参与多种激素响应。在拟南芥中 *HDA19* 功能的缺失会导致 SA 含量升高,并提高与 SA 积累相关基因的表达量<sup>[6]</sup>; *AtHDT1* 下调赤霉素降解基因 *GJ2ax2* 的表达,进而影响赤霉素的代谢途径<sup>[18]</sup>。激素响应对体细胞胚发育有重要的影响,通过调控激素水平进而调控植物体细胞胚发育。尤其 ABA 在植物体细胞胚胎发生过程发挥重要作用,ABA 可以促进人参<sup>[34]</sup>、甘蔗<sup>[35]</sup>、挪威云杉<sup>[36]</sup>、枸杞<sup>[37]</sup>体细胞胚胎发育成长与成熟。本研究对 ABA 处理条件下龙眼 HDAC 基因的表达分析发现, DIHDAC 基因的表达受 ABA 不同程度的调节, *DIHDA8*、*DIHDA9-1*、*DIHDT3* 在 ABA 处理下显著上调表达。因此预测 DIHDAC 基因家族可能通过调控 ABA 的表达而调控龙眼体胚发生过程。

### 参考文献 References:

- [1] SENDRA R, RODRIGO I, SALVADOR M L, FRANCO L. Characterization of pea histone deacetylases[J]. *Plant Molecular Biology*, 1988, 11(6): 857-866.
- [2] PANDEY R, MÜLLER A, NAPOLI CA, SELINGER D A, PI-KAARD C S, RICHARDS E J, BENDER J, MOUNT D W, JORGENSEN R A. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(23):5036-5055.
- [3] 黄利民. 水稻组蛋白去乙酰化酶基因的分离和功能鉴定[D]. 武汉:华中农业大学,2008.  
HUANG Limin. Isolation and functional characterization of rice histone deacetylase gene[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008.
- [4] CIGLIANO R A, SANSEVERINO W, CREMONA G, ERCOLANO M R, CONICELLA C, CONSIGLIO F M. Genome-wide analysis of histone modifiers in tomato: gaining an insight into their developmental roles[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 57.
- [5] XU J, XU H, LIU Y, WANG X, XU Q, DENG X. Genome-wide identification of sweet orange (*Citrus sinensis*) histone modification gene families and their expression analysis during the fruit development and fruit-blue mold infection process[J]. *Frontiers*

- in *Plant Science*, 2015, 6: 607.
- [6] 张冰, 夏德安, 马旭俊. 组蛋白去乙酰化酶在杨树根再生和生长中的功能[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(5): 40-43.  
ZHANG Bing, XIA Dean, MA Xujun. Function of histone deacetylase in regeneration and growth of poplar root[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2017, 45(5): 40-43.
- [7] 郭俊娥. 番茄组蛋白去乙酰化酶家族基因 SIHDA1 和 SIHDT3 的功能研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2017.  
GUO Jun'e. Functional study of histone deacetylase genes SIHDA1 and SIHDT3 in tomato[D]. Chongqing: Chongqing University, 2017.
- [8] 韩延超. 组蛋白去乙酰化酶参与 ERF 转录因子调控的香蕉果实成熟机制研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.  
HAN Yanchao. Histone deacetylases are involved in ERF-mediated transcriptional regulation of banana fruit ripening[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [9] KROGAN N T, KENDRA H, LONG J A. APETALA2 negatively regulates multiple floral organ identity genes in *Arabidopsis* by recruiting the co-repressor TOPLESS and the histone deacetylase HDA19[J]. *Development*, 2012, 139(22): 4180-4190.
- [10] KEQIANG W, LINING T, CHANGHE Z, DANIEL B, BRIAN M. Repression of gene expression by *Arabidopsis* HD2 histone deacetylases[J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2010, 34(2): 241-247.
- [11] GAO M J, LI X, HUANG J, GROPP G M, GJETVAJ B, LINDSAY D L, WEI S, COUTU C, CHEN Z, WAN X C, HANNOUFA A, LYDIATE D J, GRUBER M Y, CHEN Z J, HEGEDUS D D. SCARECROW-LIKE15 interacts with HISTONE DEACETYLASE19 and is essential for repressing the seed maturation programme[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7243.
- [12] 杨华. 玉米组蛋白去乙酰化酶 ZmHDA101 调控籽粒大小的分子机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.  
YANG Hua. The molecular regulatory mechanism of maize histone deacetylase ZmHDA101 for kernel size[D]. Beijing: China Agricultural University, 2016.
- [13] CHEN L T, LUO M, WANG Y Y, WU K. Involvement of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 in ABA and salt stress response[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(12): 3345-3353.
- [14] MA X, LV S, ZHANG C, YANG C. Histone deacetylases and their functions in plants[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(4): 465-478.
- [15] WANG Z, CAO H, SUN Y, LI X, CHEN F, CARLES A, LI Y, DING M, ZHANG C, DENG X, SOPPE W J J, LIU Y X. *Arabidopsis* paired amphipathic helix proteins SNL1 and SNL2 redundantly regulate primary seed dormancy via abscisic acid-ethylene antagonism mediated by histone deacetylation[J]. *Plant Cell*, 2013, 25(1): 149-166.
- [16] CHOI S M, SONG H R, HAN S K, HAN M, KIM C Y, PARK J, LEE Y H, JEON J S, NOH Y S, NOH B. HDA19 is required for the repression of salicylic acid biosynthesis and salicylic acid-mediated defense responses in *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 2012, 71(1): 135-146.
- [17] ZHANG F, WANG L, KO E E, SHAO K, QIAO H. Histone deacetylases SRT1 and SRT2 interact with ENAP1 to mediate ethylene-induced transcriptional repression[J]. *Plant Cell*, 2018, 30(1): 153-166.
- [18] LI H, TORRES-GARCIA J, LATRASSE D, BENHAMED M, SCHILDERINK S, ZHOU W, KULIKOVA O, HIRT H, BISELING T. Plant-specific histone deacetylases HDT½ regulate GIBBERELLIN 2-OXIDASE 2 expression to control *Arabidopsis* root meristem cell number[J]. *Plant Cell*, 2017, 29(9): 2183-2196.
- [19] THINES B, KATSIR L, MELOTTO M, NIU Y, MANDAOKAR A, LIU G, NOMURA K, HE S Y, HOWE G A, BROWSE J. JAZ repressor proteins are targets of the SCF(CO11) complex during jasmonate signalling[J]. *Nature*, 2007, 448(7154): 661-665.
- [20] XU Y, WANG Y, STROUD H, GU X, SUN B, GAN E, NG K, JACOBSEN S E, HE Y, ITO T. A matrix protein silences transposons and repeats through interaction with retinoblastoma-associated proteins[J]. *Current Biology*, 2013, 18(4): 345-350.
- [21] 苏慧慧. 组蛋白去乙酰化酶参与番茄抗青枯病的机制研究[D]. 广州: 暨南大学, 2015.  
SU Huihui. Histone deacetylases play an important role in bacterial wilt resistance tomato[D]. Guangzhou: Jinan University, 2015.
- [22] DING B, BELLIZZI M D R, NING Y, MEYERS B C, WANG G L. HDT701, a histone H4 deacetylase, negatively regulates plant innate immunity by modulating histone H4 acetylation of defense-related genes in rice[J]. *Plant Cell*, 2012, 24(9): 3783-3794.
- [23] 赖钟雄. 龙眼生物技术研究[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2003.  
LAI Zhongxiong. Longan biotechnology research[M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 2003.
- [24] 赖钟雄, 潘良镇, 陈振光. 龙眼胚性细胞系的建立与保持[J]. *福建农业大学学报*, 1997, 26(2): 160-167.  
LAI Zhongxiong, PAN Liangzheng, CHEN Zhenguang. Establishment and maintenance of embryogenic cell lines of longan [J]. *Journal of Fujian Agricultural University*, 1997, 26(2): 160-167.
- [25] FAN S, WANG J, LEI C, GAO C, YANG Y, LI Y, AN N, ZHANG D, HAN M. Identification and characterization of histone modification gene family reveal their critical responses to flower induction in apple[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 173.
- [26] LIN Y, LAI Z. Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree[J]. *Plant Science*, 2010, 178(4): 359-365.

- [27] LAITY J H, LEE B M, WRIGHT P E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11(1): 39-46.
- [28] 李涛, 徐小万, 黎振兴, 王恒明, 李植良, 李颖. 辣椒组蛋白去乙酰化基因家族分离鉴定及表达分析[J]. *辣椒杂志*, 2015, 13(1): 1-7.  
LI Tao, XU Xiaowan, LI Zhenxing, WANG Hengming, LI Zhiliang, LI Ying. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of HDAC gene family in hot pepper[J]. *Chili Magazine*, 2015, 13(1): 1-7.
- [29] ZHAO L, LU J, ZHANG J, WU P Y, YANG S, WU K. Identification and characterization of histone deacetylases in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 5: 760.
- [30] ROSSI V, LOCATELLI S, VAROTTO S, DONN G, PIRONA R, HENDERSON D, HARTINGS H, MOTTO M. Maize histone deacetylase hda101 is involved in plant development, gene transcription, and sequence-specific modulation of histone modification of genes and repeats[J]. *Plant Cell*, 2007, 19(4): 1145-1162.
- [31] VAN ZANTEN M, ZLL C, WANG Z, PHILIPP C, CARLES A, LI Y, KORNET N G, LIU Y, SOPPE W J J. HISTONE DEACETYLASE 9 represses seedling traits in *Arabidopsis thaliana* dry seeds[J]. *Plant Journal*, 2014, 80(3): 475-488.
- [32] ZHU Z, AN F, FENG Y, LI P, XUE L, MU A, JIANG Z, KIM J M, TO T K, LI W, ZHANG X, YU Q, DONG Z, CHEN W Q, SEKI M, ZHOU J M, GUO H. Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*[J]. 2011, 108(30): 12539-12544.
- [33] 林莹, 韩玉辉, 熊思嘉, 李泽斌, 张欣, 顾婷婷. 森林草莓组蛋白去乙酰化酶基因的鉴定和分析[J]. *南京农业大学学报*. 2017, 40(2): 43-51.  
LIN Ying, HAN Yuhui, XIONG Sijia, LI Zebin, ZHANG Xin, GU Tingting. Identification and analysis of histone deacetylases in *Fragaria vesca*[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2017, 40(2): 43-51.
- [34] LANGHANSOVÁ L, KONRÁDOVÁ H, VANĚK T. Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos[J]. *Plant Cell Reports*, 2004, 22(10): 725-730.
- [35] NIEVES N, MARTÍNEZ M E, CASTILLO R, BLANCO M A, GONZÁLEZ-OLMEDO J L. Effect of abscisic acid and jasmonic acid on partial desiccation of encapsulated somatic embryos of sugarcane[J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2001, 65(1): 15-21.
- [36] ARNOLD S V, HAKMAN I. Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1988, 132(2): 164-169.
- [37] 崔凯荣, 裴新梧, 秦琳, 王君健, 王亚馥. ABA 对枸杞体细胞胚发生的调节作用[J]. *分子细胞生物学报*, 1998, 31(2): 195-201.  
CUI Kairong, PEI Xinwu, QIN Lin, WANG Junjian, WANG Yafu. Effect of ABA on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* [J]. *Acta Molecular-Cell Biology*, 1998, 31(2): 195-201.