

# 石斛 *JmjC* 基因家族的鉴定及响应不同光周期的表达分析

赵桦<sup>1</sup>, 张舒婷<sup>1</sup>, 刘蒲东<sup>1</sup>, 付帅<sup>1</sup>, 叶炜<sup>2</sup>, 陈裕坤<sup>1</sup>, 林玉玲<sup>1</sup>,  
徐涵<sup>1</sup>, 赖钟雄<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>福建农林大学园艺学院, 园艺植物生物工程研究所, 福州 350002; <sup>2</sup>三明市农业科学研究院, 福建三明 365000)

**摘要:** 利用生物信息学方法对石斛组蛋白去甲基化关键酶基因 *JmjC* 进行全基因组鉴定, 通过 qRT-PCR 检测 *DoJMJ* 组织表达模式及对不同光周期的响应。结果表明, 在铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 基因组上共鉴定到 17 个 *JmjC*, 保守结构域分析结果显示, 该家族蛋白划分为 5 个亚家族 (JARID1、JHDM3、JHDM2、JMJD6 和 *JmjC*-only), 各亚家族所含保守结构域数量不等; 基因结构分析发现, 各亚家族的外显子和内含子数量有所差异, 同一亚家族具有相似的外显子/内含子结构; 启动子顺式作用元件分析发现 *DoJMJ* 家族成员启动子区域有诸多 Auxin、ABA、GA、MeJA、SA 等激素响应元件及光、干旱、低温、防御和胁迫等环境信号响应元件; qRT-PCR 数据表明, 金钗石斛 (*Dendrobium nobile*) 中该家族 10 个成员在茎和叶片中表达量较高, 少数成员在根中的表达较高, 所有成员在果实中表达均较低, 推测 *DoJMJ* 主要在茎和叶片发育过程发挥作用; 此外, 该家族成员在不同光周期下呈现不同的表达模式, 11 个成员在 12 h (光照)/12 h (黑暗) 下表达量较高, 少数成员在 4 h/20 h、8 h/16 h、24 h/0 h 光周期下高表达。

**关键词:** 铁皮石斛; 金钗石斛; *DoJMJ*; 全基因组鉴定; 光周期

**中图分类号:** S 567

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2020) 08-1505-16

## Genome-wide Identification and Expression Analysis of *JmjC* Gene Family in Response to Different Photoperiods in *Dendrobium*

ZHAO Hua<sup>1</sup>, ZHANG Shuting<sup>1</sup>, LIU Pudong<sup>1</sup>, FU Shuai<sup>1</sup>, YE Wei<sup>2</sup>, CHEN Yukun<sup>1</sup>, LIN Yuling<sup>1</sup>, XU Han<sup>1</sup>, and LAI Zhongxiong<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Institute of Horticultural Plant Bioengineering, Fuzhou 350002, China; <sup>2</sup>Sanming Institute of Agricultural Sciences, Sanming, Fujian 365000, China)

**Abstract:** Bioinformatics methods were used to perform the genome-wide identification of *Dendrobium JmjC* gene. The expression patterns of *DoJMJ* in different tissues and their responses to various photoperiods were detected by qRT-PCR. Seventeen *JmjC* gene family members were identified in the *Dendrobium officinale* genomic database, and they were divided into five subfamilies (JARID1, JHDM3, JHDM2, JMJD6 and *JmjC*-only) based on the conserved domains. The number of conservative

**收稿日期:** 2020-04-08; **修回日期:** 2020-06-01

**基金项目:** 福建省重大科技专项 (2015NZ0002-1); 福建农林大学科技创新基金项目 (KF2015108, CXZX2017189, CXZX2018076); 福建省高原学科建设经费项目 (102/71201801101)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: laizx01@163.com)

domains in each subfamily varies; the gene structures analysis showed that the numbers of exons and introns in different subfamilies were different. There were similar exon/intron structures within the same subfamilies. Promoter *cis*-acting elements analysis revealed that *DoJMJ* family members contained hormone response elements such as Auxin, ABA, GA, MeJA, SA elements, and environmental signaling response elements including light, drought, low temperature, defense and stress elements, qRT-PCR results showed that the expression of ten members were higher in stem and leaf, a few members showed higher expression levels in root, and all members had lower expression in the fruit of the *Dendrobium nobile*, which speculated that *DoJMJ* might play a major role in the developmental processes of stem and leaf. In addition, the family members also exhibited different expression patterns in various photoperiod conditions. Eleven members were highly expressed a 12 h/12 h (light/dark) cycle, and a few members showed higher expression levels in 4 h/20 h, 8 h/16 h and 24 h/0 h (L/D) light cycles.

**Keywords:** *Dendrobium officinale*; *Dendrobium nobile*; *DoJMJ*; genome-wide identification; photoperiod

JmjC 蛋白最早在一种呈“十字形”（日文为 Jumonji）神经板的小鼠突变体中被发现，之后在人类、酵母、植物中被相继报道。作为动植物中一类重要的组蛋白去甲基化酶，在组蛋白修饰中起重要作用（Klose et al., 2006; Tsukada et al., 2006; Chen et al., 2011）。JmjC 蛋白需要  $Fe^{2+}$  和酮戊二酸盐（ $\alpha$ -ketoglutarate,  $\alpha$ -KG）辅因子的参与，作用于赖氨酸甲基化的 3 种形式。进化分析表明，拟南芥、水稻、人类 JmjC 蛋白被分为 8 个亚家族：KDM6/JMJD3、KDM5/JARID1、KDM4/JHDM3、KDM3/JHDM2、KDM2/JHDM1、PHF、JMJD6 和 JmjC domain-only，植物中仅存在 JARID1/KDM5、JHDM3/KDM4、JHDM2/KDM3、JMJD6 和 JmjC domain-only 亚家族（Lu et al., 2008）。在 JmjC 家族中，JmjC domain-only 亚家族成员只含有 JmjC 结构域，其他亚家族除此之外，还含有 JmjN、ARID、FYRN、FYRC、zf-C5HC2、F-Box、zf-Ring 等结构域，不同亚家族的作用方式同样存在特异性。

植物中 JmjC 家族成员数量除大豆外差异较小，拟南芥、水稻（Lu et al., 2008）、草莓（Gu et al., 2016）、玉米（Qian et al., 2019）、葡萄、莲中分别有 21、20、20、19、20、20 个成员，大豆中成员较多，有 48 个（Han et al., 2016）。JmjC 家族成员不仅参与了植物的生长发育，如果实生长及形成（韩玉辉，2016）以及根系建成和生长素合成等（秦巧，2013），也参与植物花粉形态建成、开花等过程（Yang et al., 2010; 李怡斐，2011; Yokoo et al., 2014），并且在植物逆境胁迫响应过程中发挥着较大作用（Song et al., 2018; 孙维悦，2019）。此外，该家族还参与光信号转导途径的调控响应（Lu et al., 2011a; 汤小凤，2018）。近年来的研究发现，*JmjC* 在植物的 DNA 甲基化等表观遗传途径中发挥着重要作用（Li et al., 2015; 杨伟 等，2016）。

在石斛（*Dendrobium*）的研究中发现，光周期调控的开花信号转导与石斛内源激素含量的变化有密切关系（Campos & Kerbauy, 2004）。其对春石斛叶片的多胺含量有显著影响（李程 等，2014），同样也影响着植物代谢产物的合成，对霍山石斛的研究发现，较长时间的光照有利于多糖的积累（谢析颖，2017）。而光周期调控石斛基因表达方面的报道较少。本研究中基于公布的铁皮石斛（*Dendrobium officinale*）基因组数据，对石斛 *JmjC* 家族成员进行鉴定，采用实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）技术探究 *DoJMJ* 在不同组织部位和不同光周期处理下的表达模式，以期为后续石斛 *JmjC* 家族成员的相关生物学功能研究与利用奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与处理

金钗石斛 (*Dendrobium nobile*) 盆栽苗取自福建省三明市农业科学研究所。选取正常生长的盆栽苗, 分别进行组织部位 (气生根、茎、叶、果皮) 取样; 用光照培养箱对金钗石斛 2 年生盆栽苗进行不同光周期 4/20、8/16、12/12、24/0 (h, 光照/黑暗) 处理 1 d, 光照强度为 13 000 lx, 温度保持在 (25 ± 1) °C, 取叶片液氮速冻, - 80 °C 保存, 用于分析石斛 *JmjC* 的组织表达特异性。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 铁皮石斛 *JmjC* 家族基因鉴定

从 Herbal Medicine Omics Database (<http://202.203.187.112/herbalplant>) 数据库下载铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 基因组序列, 并借助拟南芥和水稻的 *JmjC* 家族成员的蛋白序列及其 *JmjC* 域 (Pfam: PF02373, SMART: SM00558) 作为查询序列, 以拟南芥基因组数据库 (TAIR <http://arabidopsis.org/>) 下载的 *JmjC* 蛋白作为探针序列, 利用本地 BLASTP 筛选, 将其比对获得的潜在 DoJMJ 蛋白序列文件保存为候选序列, 使用 HMMER (<http://www.hmmmer.org/>)、Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 及 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 进一步对候选域名进行筛查。选择具有完整 *JmjC* 保守结构域的序列进行后续分析, 并参考成员所在基因组 scaffold 的顺序依次对各成员进行命名。

#### 1.2.2 铁皮石斛 *JmjC* 家族基因编码蛋白理化特性、进化树构建及保守氨基酸残基分析

从拟南芥 (<http://arabidopsis.org/>) 和水稻 (<http://www.ricedata.cn/gene/>) 数据库下载 *JmjC* 蛋白序列, 利用软件 DNAMAN 6.0 对获取的铁皮石斛 *JmjC* 蛋白序列进行多重序列比对分析; 利用在线网站 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 和 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/index.php>) 预测铁皮石斛 *JmjC* 蛋白的理论特性; 采用 MEGA 5.05 软件构建石斛、拟南芥、水稻 *JmjC* 基因家族成员进化树, 建树采用邻接法 (Neighbor-joining Method), Bootstrap 运行次数为 1 000, 其他参数设置为默认值, 使用 iTOL 在线软件 (<https://itol.embl.de/>) 对进化树进行美化。

#### 1.2.3 铁皮石斛 *JmjC* 基因结构及编码蛋白结构域分析

下载铁皮石斛基因组数据库 GFF3 文件结合筛选出的 *JmjC* 家族成员, 通过 TBtools 绘制基因结构图, 依次对其基因结构呈现的内含子、外显子进行特性分析。通过在线网站 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 对提交的蛋白序列进行保守结构域分析, 借助 Photoshop 对获取的保守结构域进行绘制。利用 MEME 软件 (<http://meme-suite.org/>) 分析石斛蛋白质序列的保守基序 (motif), 保存 TBtools 可视化文件并绘制 motif 结构图。

#### 1.2.4 *DoJMJ* 的启动子顺式作用元件分析

通过下载铁皮石斛全基因组数据提取得到 *DoJMJ* 的起始密码子 ATG 上游 2 000 bp 的序列, 作为 *DoJMJ* 家族的启动子序列, 利用在线软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测并分析不同成员启动子顺式作用元件特性。

#### 1.2.5 *DoJMJ* 的 qRT-PCR 分析

利用 TriPure 试剂盒 (Invitrogen, 北京) 提取金钗石斛不同组织部位及不同光周期处理材料的 RNA, 采用超微量分光光度计 (Thermo Electron Corp, 美国) 检测 RNA 质量和浓度, OD<sub>260/280</sub> 在 1.8 ~ 2.0 之间。参照 Hifair<sup>®</sup> II 1st Strand cDoA Synthesis Kit (gDoA digester plus) (翊圣, 上海) 逆

转录试剂盒进行 cDNA 合成。使用 DNAMAN 6.0 软件对 *DoJMJ* 成员设计 qPCR 引物, 以 *18S rRNA* 为内参基因, 引物序列见表 1。使用 Roche LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪扩增, 每个样本均设置 3 个生物学重复, 目的基因相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算, 利用 SPSS 22.0 中的 Duncan's 法对各基因成员的表达量进行显著性分析。采取 Excel 和 GraphPad 软件分别进行计算分析及图表制作。

表 1 qRT-PCR 引物序列信息  
Table 1 Primers used for qRT-PCR

基因 Gene	上游引物 (5' - 3') Forward primer	下游引物 (5' - 3') Reverse primer	扩增子长度/bp Amplicon length	退火温度/°C Annealing temperature
<i>DoJMJ01</i>	GAAAGGAAGTCTGGTGCTGG	GCATAGGTTGCTCTCTGAAGAA	136	60
<i>DoJMJ02</i>	GGAATACATCGGTCTTGTGTG	TCATCCACCTGAGCATCCT	171	60
<i>DoJMJ03</i>	TGGTTGTGACTTCAGGCAG	ATCAACTCCATTCTCCTCCT	155	60
<i>DoJMJ04</i>	CGCCTTCTCATCTTCTCCTAA	AATGCCGCAACACAGACTT	92	60
<i>DoJMJ05</i>	CGAGACAGAGTTTGC GGAT	CTTGGACAGAGAGCGGTTAAG	145	60
<i>DoJMJ06</i>	GGTGGTGCTTTGTGGGATA	TGAAATACCTTCGTCACTGGAG	119	60
<i>DoJMJ07</i>	GCTTCAAATCCGCATCTC	GATATTGGTTGAGGGGTCGA	174	60
<i>DoJMJ08</i>	GAGGTCCATTGTTGAAAGGC	CCAGTGCCCGAGTATGATT	132	60
<i>DoJMJ09</i>	CAAACGCCTTAGAAGATCCAC	CTCCCTCCACAGAATTCC	120	60
<i>DoJMJ10</i>	GCCTACATCCTCAAGATCGAG	TAGAGTTGGGACTAGGGTTGG	172	60
<i>DoJMJ11</i>	GCATTCTTCTCCGACCTG	CCACAAGCATCACTGAACC	139	60
<i>DoJMJ12</i>	GTTGCGCTATGACCTATGTT	CTACCACAACCACCAATACTTC	187	60
<i>DoJMJ13</i>	CCCCTATTTGTGCTACTGTACCT	TGCCATCTTCTCAAAATCCC	173	60
<i>DoJMJ14</i>	CCAAAGGAAATGGGTGGT	CAAGGCAATGAACAATGTC	158	60
<i>DoJMJ15</i>	CTATTTCCGCTACAAATCCGT	GGTTGAATGATGTGGGATTG	142	60
<i>DoJMJ16</i>	GAAACCAAGTGCTGAATCTACG	GTGCATCCCACCAAACAG	125	60
<i>DoJMJ17</i>	CCTGTTGACTGGCTACCTCA	TTCCACAATGCCCTGACA	128	60
<i>18S rRNA</i>	CCTGAGAAACGGCTACCACAT	CACCAGACTTGCCCTCCA		60

## 2 结果与分析

### 2.1 铁皮石斛 *JmjC* 基因家族的蛋白理化特性分析

基于铁皮石斛基因组数据库, 以拟南芥 21 个成员蛋白序列分别作为探针序列, 利用本地 BLASTP 对基因组数据库进行检索, 保留  $E\text{-value} < 10^{-4}$  之内的数据, 并采用 NCBI-CDD、HMMER、Pfam 和 SMART 数据库检测 *JmjC* 基因所特有的 *JmjC* 结构域, 去除 *JmjC* 保守结构域不完整的序列, 从原始数据中识别并筛选出了 17 个 *DoJMJ* 基因 (表 2)。

表 2 *JmjC* 家族成员亚家族分布  
Table 2 Distribution of subfamilies of *JmjC* family members

亚家族 Subfamily	拟南芥 (125 Mb) <i>Arabidopsis</i>	水稻 (472 Mb) Rice	玉米 (2 300 Mb) Maize	大豆 (1 100 Mb) Soybean	铁皮石斛 (1.11 Gb) <i>Dendrobium officinale</i>
JARID1	6	4	8	9	2
JHDM3	3	5	8	12	4
JHDM2	6	4	3	18	7
JMJD6	3	2	0	3	3
<i>JmjC</i> -only	3	5	0	6	1
总数 Total number	21	20	19	48	17

构建石斛与拟南芥、水稻 *JmjC* 蛋白间的系统发育树, 铁皮石斛中 17 个成员被分为

JARID1/KDM5、JHDM3/KDM4、JHDM2/KDM3、JMJD6 和 JmjC domain-only (JmjC-only) 等 5 个亚家族, 其中 JHDM2 亚家族成员数量最多, 为 7 个, 而 JmjC-only 亚家族仅含有 1 个成员, JARID1、JHDM3、JMJD6 分别含有 2、4、3 个成员 (表 2)。

对 DoJMj 家族成员的基本理化特性分析, 结果如表 3 所示。DoJMj 编码 CDS 序列长度在 1 173 ~ 6 699 bp 之间, 蛋白序列长度在 390 ~ 2 232 个氨基酸之间。蛋白分子量在 44 605.18 ~ 252 878.26 D 之间, 其中 DoJMj03 的分子量最大, 其次为 DoJMj10, 而 DoJMj01 分子量最小, 此趋势与氨基酸数变化一致。DoJMj 不稳定系数在 31.72 ~ 60.43 之间, 理论等电点 (pI) 在 5.20 ~ 9.21 之间, 共 11 个成员为酸性蛋白 (pI < 7.00)。采用 SignalIP 在线网站分析发现, 石斛 DoJMj 家族各成员编码蛋白剪切位点分值/信号肽分值/综合 C、S 剪切位点打分值 (C/S/Y) 均小于 0.5, 均不包含信号肽序列, 属于非分泌蛋白。

表 3 铁皮石斛 JmjC 基本理化性质分析

Table 3 Analysis of basic physical and chemical properties of *Dendrobium officinale* JmjC family

基因 ID Gene ID	基因 Gene	开放阅读 框/bp ORF	氨基酸个数 Number of amino acids	分子量/D Molecular weight	不稳定系数 Instability coefficient	等电点 pI	亲水性 Gravy
Dendrobium_GLEAN_10110573	DoJMj01	1 173	390	44 605.18	59.02	5.20	- 0.547
Dendrobium_GLEAN_10110575	DoJMj02	2 334	777	88 583.89	39.34	9.21	- 0.266
Dendrobium_GLEAN_10108600	DoJMj03	6 699	2 232	252 878.26	56.43	5.71	- 0.629
Dendrobium_GLEAN_10093127	DoJMj04	1 875	624	70 804.91	46.96	6.30	- 0.207
Dendrobium_GLEAN_10066645	DoJMj05	2 685	894	99 689.31	52.81	5.95	- 0.322
Dendrobium_GLEAN_10064584	DoJMj06	1 965	654	73 770.16	53.49	6.43	- 0.707
Dendrobium_GLEAN_10060905	DoJMj07	2 073	690	78 980.87	55.91	8.54	- 0.298
Dendrobium_GLEAN_10060081	DoJMj08	2 754	917	103 499.06	52.11	8.25	- 0.506
Dendrobium_GLEAN_10051126	DoJMj09	2 622	873	100 851.01	60.13	6.66	- 0.773
Dendrobium_GLEAN_10048772	DoJMj10	3 330	1 109	122 393.89	47.82	8.05	- 0.308
Dendrobium_GLEAN_10045262	DoJMj11	3 021	1 006	114 833.89	51.69	5.69	- 0.309
Dendrobium_GLEAN_10042029	DoJMj12	2 472	823	923 81.39	51.46	5.49	- 0.499
Dendrobium_GLEAN_10040465	DoJMj13	2 796	931	106 581.78	60.43	6.01	- 0.413
Dendrobium_GLEAN_10038015	DoJMj14	1 626	541	60 882.48	43.73	8.40	- 0.621
Dendrobium_GLEAN_10034519	DoJMj15	2 178	725	82 581.91	53.66	8.78	- 0.34
Dendrobium_GLEAN_10030696	DoJMj16	1 599	532	60 870.01	31.72	5.37	- 0.255
Dendrobium_GLEAN_10028399	DoJMj17	1 791	596	67 382.65	47.15	6.10	- 0.37

## 2.2 DoJMj 活性位点保守氨基酸残基与系统进化分析

JmjC 蛋白借助 Fe<sup>2+</sup>和  $\alpha$ -KG 结合辅因子反应决定去甲基酶活性 (Chen et al., 2006; Huang et al., 2016), 但结合此类辅因子需要 5 个氨基酸残基: 3 个残基 (His 188、Glu/Asp 190、His 276) 与 Fe<sup>2+</sup>辅因子结合, 另外 2 个残基 (Thr/Phe 185、Lys 206) 与  $\alpha$ -KG 结合。为阐明与辅因子相互作用的保守残基是否在 DoJMj 中发生了分化, 对来自石斛、拟南芥和水稻中的 JmjC 蛋白结构域序列进行比对。根据 JmjC 蛋白的特性、保守位点的氨基酸, 将这些蛋白质分成两组 (A 组、B 组) (图 1)。A 组成员分别属于 JARID1 与 JHDM3 亚家族, 这两个亚家族均含有与 Fe<sup>2+</sup>辅因子结合的保守氨基酸 His (H)、Glu (E)、His (H), 以及与  $\alpha$ -KG 结合的 Phe (F) 和 Lys (K), B 组包括了 JMJD6 及 JmjC-only 亚家族, 保留了与 Fe<sup>2+</sup>辅因子结合的残基 His (H)、Asp (D)、His (H) 和与  $\alpha$ -KG 结合的 Thr (T) 和 Lys (K), 两种形式都与组蛋白去甲基化活性可共存 (Lu et al., 2008)。在石斛中这些位点没有发生改变。表明石斛 JmjC 蛋白作用位点高度保守。总之, 相互作用位点的高度保守性对这些位点在 JmjC 基因家族去甲基化酶活性中发挥着重要作用 (Han et al., 2016)。

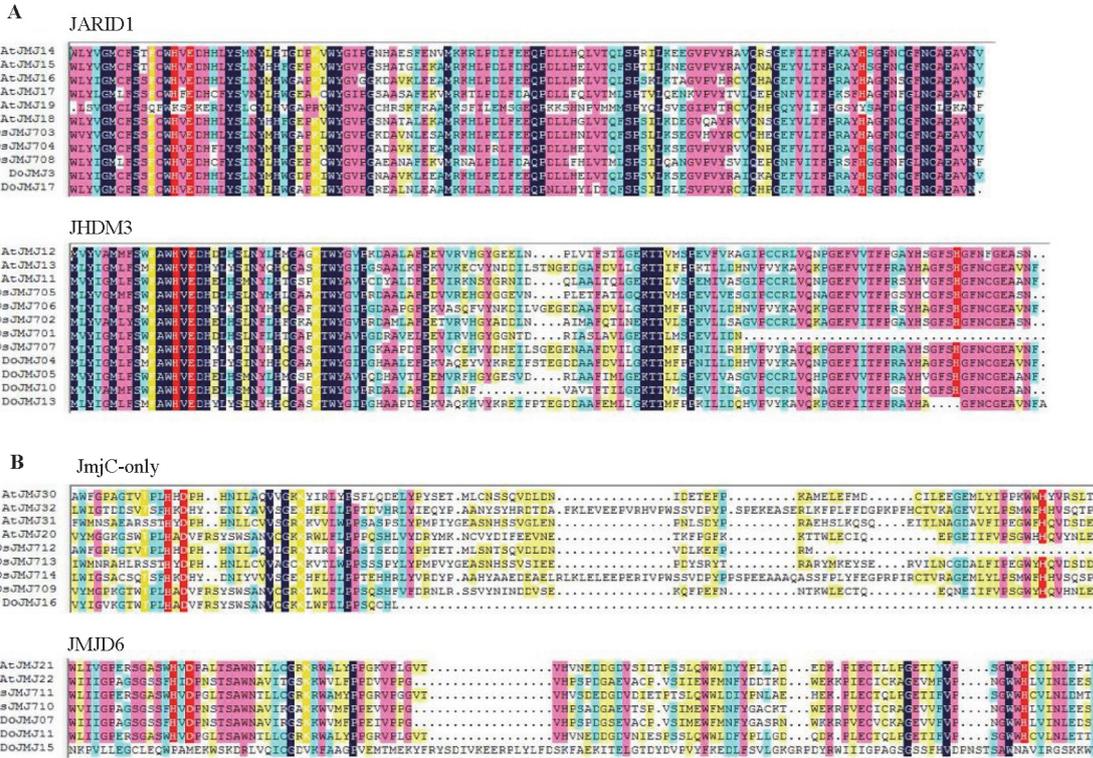


图 1 铁皮石斛 JmjC 域序列比组 (A、B)

与 Fe<sup>2+</sup>结合位点的去甲基化活性相容的保守残基以红色突出显示，而与  $\alpha$ -KG 结合位点的残基以深黄色表示，深蓝色、粉色、天蓝色和浅黄色序列表明氨基酸残基的相似性分别为 100%、75%~99%、50%~75%、33%~50%。

At: 拟南芥; Os: 水稻; Do: 铁皮石斛。

Fig. 1 Two alignment groups (A, B) of JmjC domain sequence of *Dendrobium officinale*

The conservative residues compatible with the demethylation activity of Fe<sup>2+</sup> binding site are highlighted in red, while the residues of  $\alpha$ -KG binding site are highlighted in dark yellow. Dark blue, pink, sky blue and light yellow sequences showed that the similarities of amino acid residues were 100%, 75% - 99%, 50% - 75%, 33% - 50%.

At: *Arabidopsis*; Os: Rice; Do: *Dendrobium officinale*.

为更好地识别植物中 JmjC 之间的系统发育关系，并评估这些蛋白在石斛、水稻和拟南芥中的进化史，从这 3 个物种中筛选出 58 个成员的全长序列，借助 MEGA5.05 软件，采用邻接法对 21 个 *AtJMJ*、20 个 *OsJMJ*、17 个 *DoJMJ* 编码的蛋白序列构建系统发育进化树。结果如图 2 所示，JmjC 蛋白主要分为 JARID1/KDM5、JHDM3/KDM4、JHDM2/KDM3、JMJD6 和 JmjC domain-only (JmjC-only) 5 个主要亚家族。其中 JHDM2/KDM3 亚家族中成员最多，包含 7 个同源 *JmjC* 基因，其中 *DoJM108* 和 *AtJM124* 具有较高的相似性；其次为 JHDM3/KDM4 亚家族，包含 4 个 *JmjC* 基因，*DoJM105* 和 *AtJM111* 亲源关系较近，*DoJM104* 和 *OsJM107* 具有较高相似性；JmjC-only 亚家族仅包含 1 个 *JmjC* 基因，其中 *DoJM116* 与 *OsJM109* 具有较高的相似性。

### 2.3 DoJM1 基因结构及 Motif 分析

有研究表明，基因的内含子数量及位置对其表达有重要的调控作用 (Parra et al., 2011; 王红飞和尚庆茂, 2019)。DoJM1 家族成员均含有内含子，大多成员内含子都在 6 个以上，其中 DoJM103 内含子最多，为 19 个，DoJM115 内含子数量最少，仅有 1 个 (图 3)。其中各亚家族的外显子/内含子变化趋势有所差异，同一亚家族外显子/内含子数量相当。

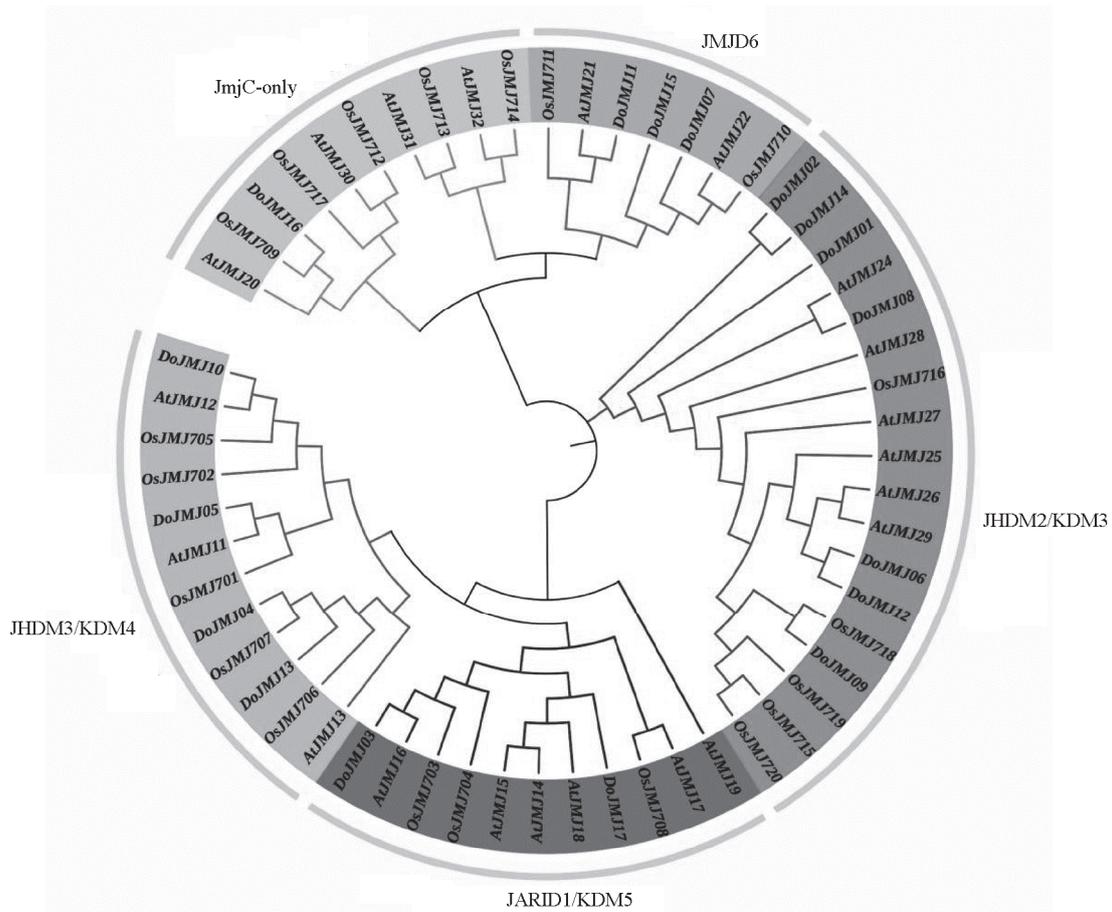


图2 铁皮石斛 (Do)、水稻 (Os) 和拟南芥 (At) JmjC 基因编码蛋白的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of JmjC proteins in *Dendrobium officinale* (Do), rice (Os) and *Arabidopsis thaliana* (At)

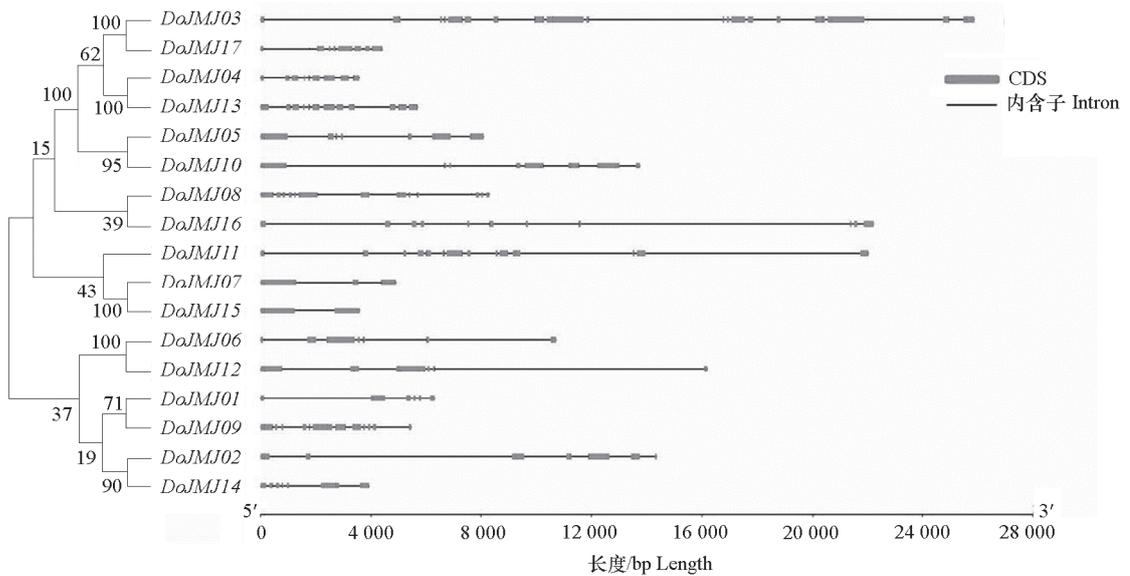


图3 铁皮石斛 JmjC 家族成员基因结构分析

Fig. 3 Gene structure analysis of JmjC family members in *Dendrobium officinale*

使用 MEME 软件对 DoJMj 家族蛋白保守基序的分布情况进行分析,共鉴定到 30 个保守基序(图 4)。17 个 *DoJMj* 中含有保守基序类型和数量不同,其中 *DoJMjC16* 含有最少的保守基序,仅 2 个(Motif 1、Motif 27),而含有保守基序最多的成员为 *DoJMj03*,有 19 个。其中,某些基序只在特定类别的 *DoJMj* 中存在,如 JMJD6 亚家族中含有 Motif 17、Motif 19 和 Motif 30, JHDM 3 亚家族中包含特异性的 Motif 18;此外, JHDM2 亚家族含有 Motif 2、Motif 5、Motif 9、Motif 13 等特异性保守基序。*DoJMj* 蛋白基序出现在 N 端与 C 端位置的数量较为均衡,说明各成员基序之间离散程度差异小,暗示 *DoJMj* 家族成员功能可能较为保守。Motif 1 在成员中分布较为广泛,推测 *JmjC* 可能在调控植物生长发育过程中发挥重要作用。

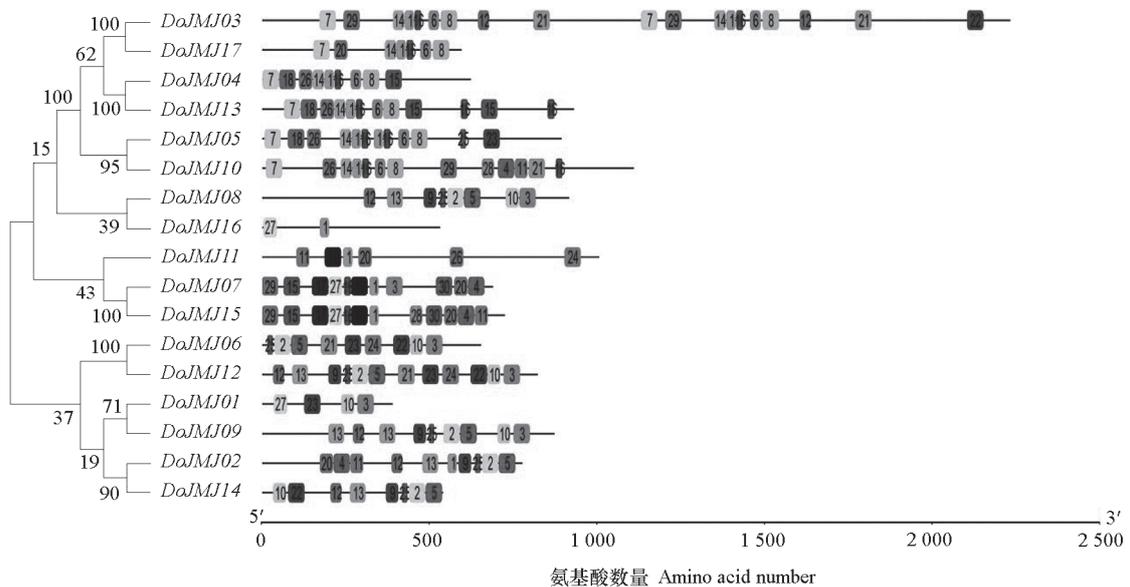


图 4 铁皮石斛 JmjC 家族成员蛋白保守基序 (motif 1 ~ motif 30) 预测

Fig. 4 Protein conserved motif 1 - motif 30 prediction of JmjC family members in *Dendrobium officinale*

## 2.4 DoJMj 保守结构域分析

保守结构域作为蛋白质中能够折叠成特定三维结构的一段区域,由结构亚单位模体 (Motif) 组成,而组成基序的氨基酸区域行使特异的功能,并蕴含各自的遗传信息(陈莹等,2009)。如图 5 所示,DoJMj 各亚家族均含有一个 JmjC 保守结构域,不同亚家族也包含有特异的结构域。JmjN 是第二大结构域,出现在 JARID1/KDM5、JHDM3/KDM4 两个亚家族中,此结构域与 JmjC 不相邻,属于 jumonji 家族 (Balciunas & Ronne, 2000)。此外,在 JARID1 及 JHDM3 亚家族中存在一种锌指结构 zf-C5HC2, JARID1 亚家族内同样还含有 FYRN、FYRC 结构域。JHDM2 亚家族中 *DoJMj08* 成员 N 端存在一个环型锌指结构域 (zf-Ring) 及 WRC 结构域,而 JmjC-only 亚家族内仅包含有 JmjC 域,不存在其他结构域。JMJD6 亚家族除含有 JmjC 结构域外,含有特殊的 F-Box 结构域,此外 *DoJMj02* 中含有的 RT-nLTR 结构域,这种结构域是反转座子的重要结构域,参与 DNA 序列的转座过程(侯策等,2017)。DoJMj 家族的 JmjC 结构域在 *DoJMj03*、*DoJMj05*、*DoJMj06*、*DoJMj09*、*DoJMj12* 共 5 个成员上不同位置再次出现,此情况在拟南芥和水稻中未发现过,猜测或许是由于基

因组测序及物种特异性表达之间存在差异而引起的现象, 但具体特性还需进一步探索。

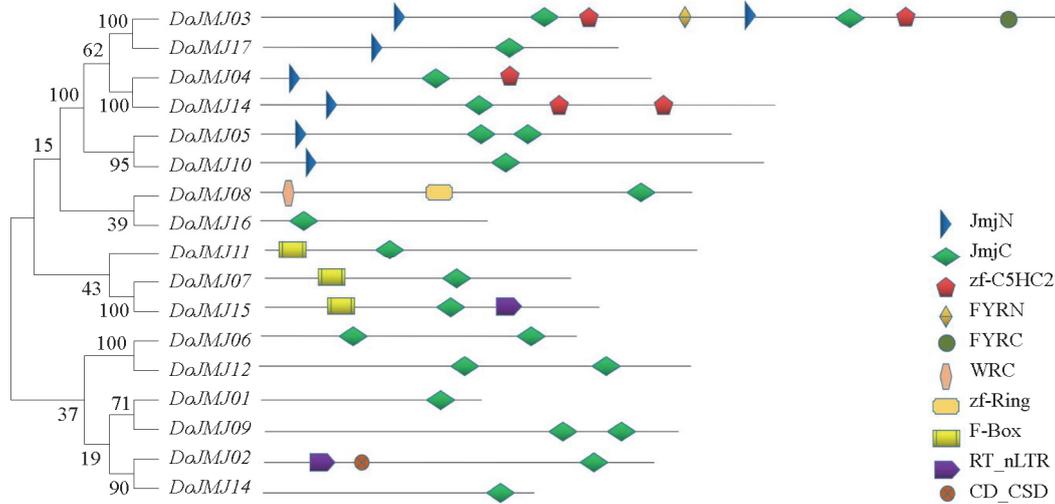


图 5 铁皮石斛 JmjC 家族成员保守结构域分析

Fig. 5 Conservative domain analysis of JmjC family members in *Dendrobium officinale*

## 2.5 DoJMJ 启动子顺式作用元件分析

*DoJMJ* 家族启动子区包含大量 CAAT-box 响应元件, 其中 JHDM2 亚家族中含有 250 个 CAAT-box, 而 JmjC-only 亚家族仅含有 55 个 CAAT-box, 推测不同亚家族之间的调控存在较大差异。进一步分析 *DoJMJ* 不同亚家族顺式作用元件类型 (图 6), 发现 JHDM2 亚家族的顺式作用元件最为

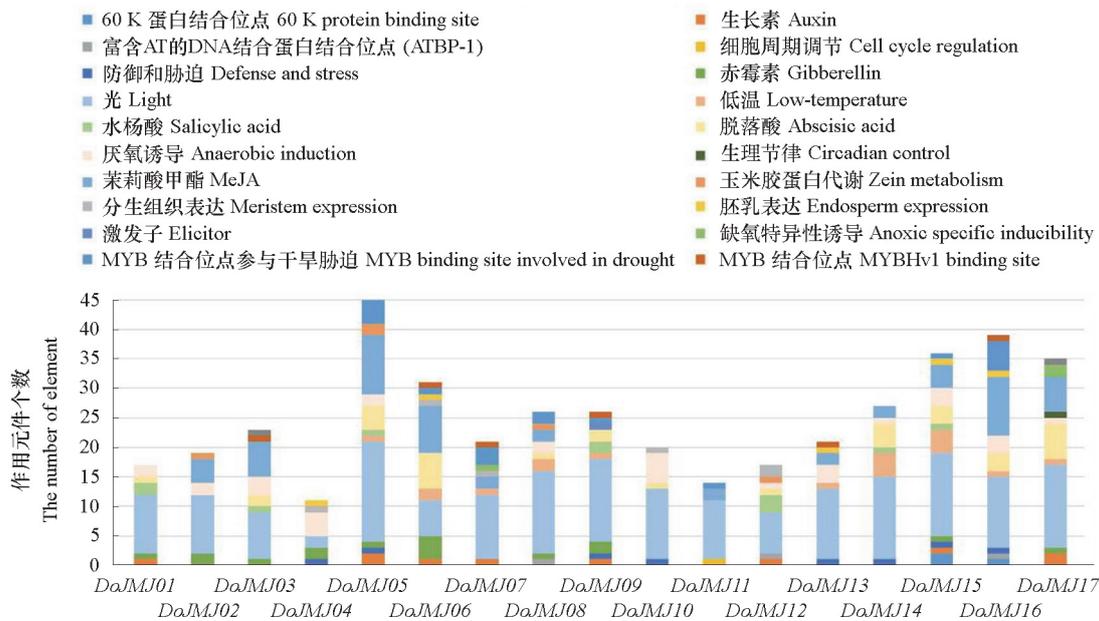


图 6 铁皮石斛 JmjC 家族成员启动子顺式作用元件分布

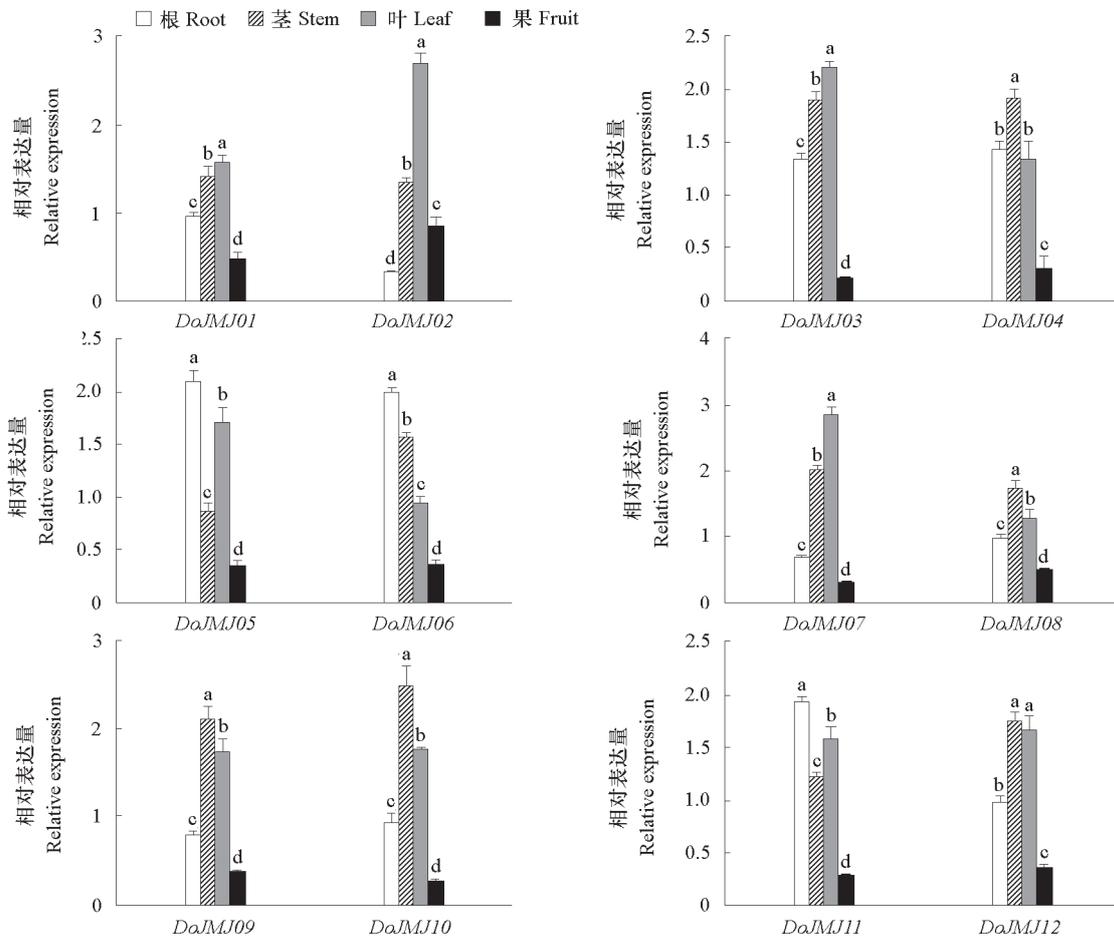
Fig. 6 Putative *cis*-acting element distribution in the promoter of JmjC family members in *Dendrobium officinale*

丰富, 包括与环境信号有关的光、低温、胁迫、MYB 结合位点参与干旱响应的顺式作用元件, 与激素响应有关的 GA、Auxin 等顺式作用元件。表明该类群基因可能在植物生长发育及非生物胁迫的抵御等方面有重要作用。其余亚家族成员启动子顺式作用元件类型相对较少, 与生长相关的作用元件数量与逆境响应作用元件相近。

*DoJMJ* 家族存在多种逆境胁迫应答元件, 其中以 MYB 结合位点参与干旱诱导的响应元件及厌氧胁迫相关的顺式作用元件较多, 同时, 低温响应元件、防御和胁迫应答响应元件也属于逆境胁迫应答相关元件, 此类特征表明该家族成员可能在低温、干旱等胁迫环境中发挥着重要作用。此外还存在众多激素应答元件, 65%的 *DoJMJ* 家族成员含有茉莉酸甲酯 (MeJA)、脱落酸 (ABA) 应答响应元件, 59%的成员含有水杨酸 (SA) 和赤霉素 (GA) 顺式作用元件, 47%的成员含有生长素 (Auxin) 响应元件 (图 6)。表明 *DoJMJ* 可能对植物生长发育具有重要调控作用。进一步分析发现该家族启动子仍存在较多特异性作用元件, 如激发子 AT-rich、胚乳表达特异性元件 GCN4\_motif、细胞周期调节元件 MSA-like、MYB 结合位点元件 CCAAT-box、分生组织表达响应元件 CAT-box、SEF 因子结合位点作用元件、生理节律调控作用元件 circadian、玉米胶蛋白代谢调节作用元件 O<sub>2</sub>-site 等。

## 2.6 *DoJMJ* 在不同组织部位的表达分析

利用 qRT-PCR 分析 *DoJMJ* 在金钗石斛根、茎、叶片、果皮的相对表达量, 除 *DoJMJ16* 在所有组织部位几乎没有表达外, 其余 16 个基因在各组织部位均有表达 (图 7)。



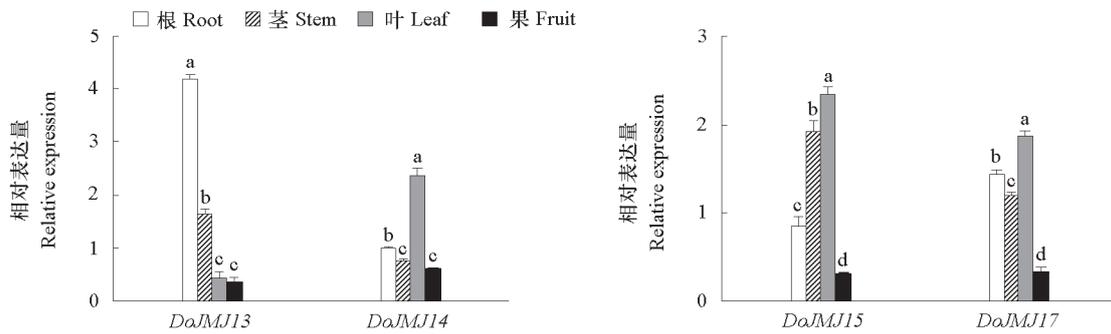


图 7 *JmjC* 家族成员在金钗石斛不同组织部位特异表达分析

不同小写字母表示组织间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

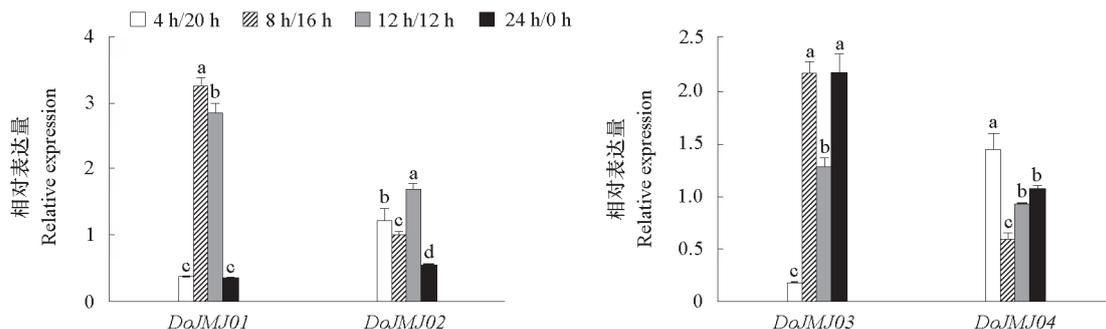
Fig. 7 Specific expression analysis of *JmjC* family members in different organs of *Dendrobium nobile*

Different lowercase letters indicate significant differences between tissues at the level of 0.05.

其中 *DoJMJ02*、*DoJMJ07*、*DoJMJ14*、*DoJMJ15* 等在叶中的表达量较高, 而 *DoJMJ04*、*DoJMJ08*、*DoJMJ10*、*DoJMJ12* 等在茎中的表达量较高, *DoJMJ05*、*DoJMJ06*、*DoJMJ11*、*DoJMJ13* 基因在根中的较高, 所有成员在果实中的表达均较低。表明 *DoJMJ* 不同成员在不同组织部位中表达水平差异较大, 且呈现组织特异性, 推测 *DoJMJ* 可能与茎、叶、根等部位的生长和发育过程相关。研究发现, 同一亚家族成员在不同组织部位并不存在相似的表达趋势, 如 JHDM3 亚家族中成员 *DoJMJ10* 和 *DoJMJ13*, 二者分别在茎和根部位表达较高。表明石斛 *DoJMJ* 不同亚家族成员可能参与不同的生理过程, 抑或在不同时期发挥不同的作用。

## 2.7 *DoJMJ* 基因对不同光周期的响应分析

石斛生长发育和代谢产物的积累很大程度上受到光照 (Li et al., 2017)、温度 (Hao et al., 2012) 和栽培条件的影响。利用 qRT-PCR 分析上述 17 个基因在 4/20、8/16、12/12、24/0 (h, 昼/夜) 光照周期处理下的表达变化情况, 不同光照节律处理下该家族成员表达模式有所差异 (图 8)。有 8 个成员在昼夜周期 12 h/12 h (L/D) 条件下表达量较高, 如 *DoJMJ09*、*DoJMJ12*、*DoJMJ15* 等。在 8 h/16 h、24 h/0 h 光周期下 *DoJMJ01*、*DoJMJ10* 等 5 个成员表达较高。表明该家族成员在不同光照周期中响应不同调控机制。少数基因在不同周期下表达量相近, 如 *DoJMJ10* 在 8 h/16 h、12 h/12 h 周期下表达趋势较为一致; *DoJMJ03* 在 8 h/16 h、24 h/0 h 下表达水平相似; 而 *DoJMJ17* 在 12 h/12 h、24 h/0 h 下表达趋势大致相同; 仅少数基因在短期光照和长期黑暗的昼夜条件下表达量稍高, 如 *DoJMJ04*、*DoJMJ14*。



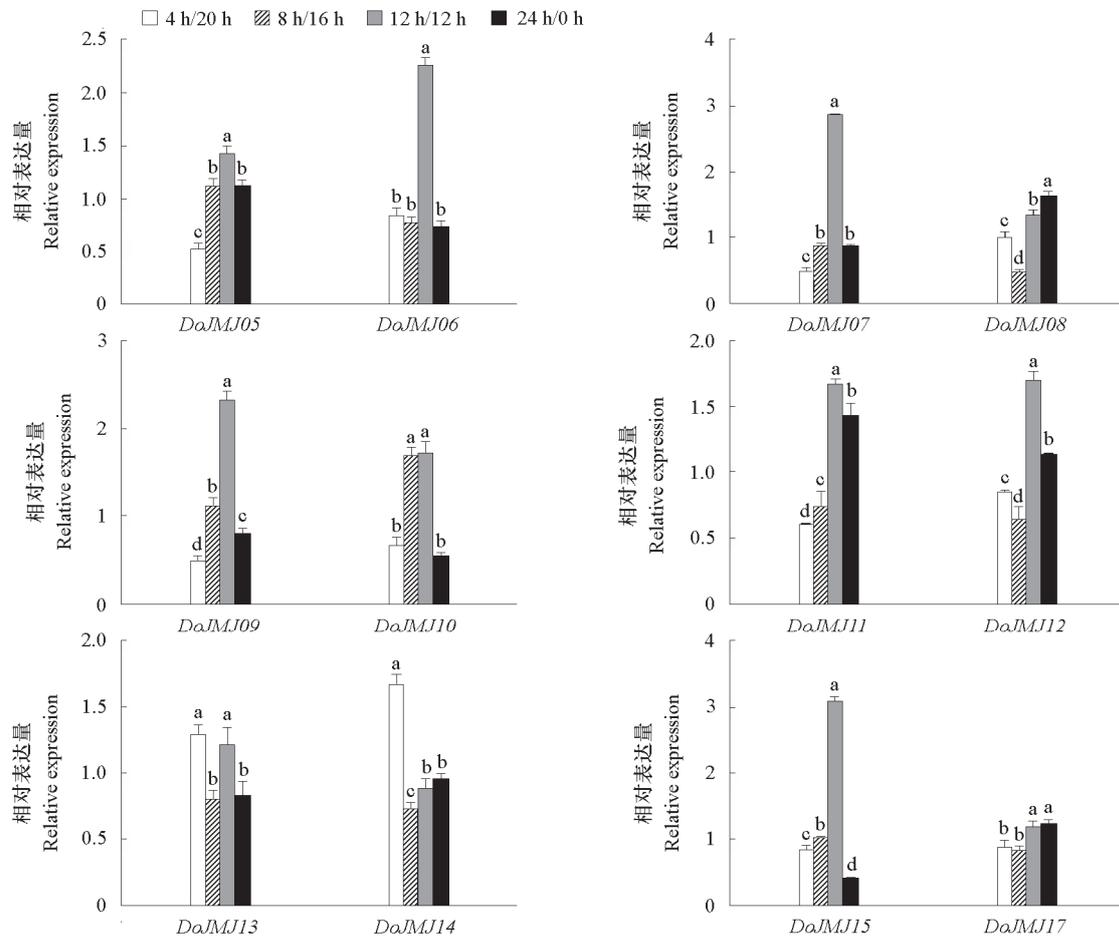


图8 *JmjC* 家族成员在不同光周期下的特异表达分析

不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 8 Specific expression analysis of *JmjC* family members in various photoperiod

Different lowercase letters indicate significant differences in treatment at the level of 0.05.

### 3 讨论

#### 3.1 DoJMj 潜在功能的生物信息分析预测

本研究中基于铁皮石斛基因组数据,对 DoJMj 家族进行了鉴定,发现铁皮石斛中存在有 17 个 *DoJMj*,与人 (30)、拟南芥 (21) (Lu et al., 2008; Zhao et al., 2015)、水稻 (20) (Lu et al., 2008; Zong et al., 2013)、玉米 (19) (Qian et al., 2019)、杨树 (24) (郭源远和尹京苑, 2010)、草莓 (20) (Gu et al., 2016) 相比成员数量基本相当,但明显少于大豆 (48 个) (Han et al., 2016),表明不同的物种 *JmjC* 家族成员数量存在差异。生物信息分析发现,所有成员均含有内含子,少数成员数量差异较大,其中相差最多为 18 个。内含子作为真核生物基因组的重要组成部分,参与基因表达、细胞骨架构建等过程 (Cremer et al., 2006),其大小、数量与位置都与基因的表达调控有极其重要的关系 (Hong et al., 2006),石斛 *JmjC* 家族中各成员内含子数量较多、分布较广泛,与大豆、玉米中的一致 (Han et al., 2016; Qian et al., 2019)。保守结构域分析得出, *DoJMj* 均含有保守的 *JmjC*

结构域, 含有保守的  $Fe^{2+}$  和  $\alpha$ -KG 结合位点, 是其组蛋白去甲基化酶活性的功能结构域 (Klose et al., 2006)。此外, 还含有典型的 *JmjN*、*zf-C5HC2*、*F-Box*、*zf-Ring*、*WRC* 等保守结构域, 但不同亚家族中数量和分类有所差异, 其中 *JmjN* 结构域与 *JmjC* 结构域之间的相互调节对芽孢酵母中 H3K4 特异性去甲基化酶 KDM5 具有重要作用 (Huang et al., 2010)。JARID1 亚家族中含有 FYRN、FYRC 结构域, 此结构域可能具有染色质结合活性 (Lu et al., 2008), 亦或与其他蛋白质结合互动从而发挥对 *JmjC* 结构域的调控, 研究表明, 植株在开花时间调控过程中的功能特异性与 FYRC 域的作用有关联 (Ning et al., 2015)。JHDM2 亚家族中含有一个环型结构域 (*zf-Ring*), 该结构域对去甲基化活性至关重要 (Yamane et al., 2006)。本研究发现, 石斛中 JHDM2 亚家族成员数量居多, 与拟南芥中鉴定的成员 *AtJMJ24*、*AtJMJ27* 等同属一个亚家族, 推测它们之间功能相近, 对植物的生长发育和干旱胁迫响应起着重要调控作用。*DoJMJ08* 存在一个 WRC 结构域, 研究表明该结构域包含核定位信号区域 (NLS) 和与 DoA 结合的一个锌指结构 (Kim et al., 2012)。JMJD6 亚家族内含有特殊的 F-Box 结构域, 该结构域定义了泛素 E3 连接酶的活性, 泛素化修饰在植物抵抗非生物胁迫中起重要作用。石斛中含有 3 个 JMJD6 亚家族成员, 推测该亚家族成员可能在调控植物抗胁迫能力方面发挥着重要作用。

构建进化树分析得到, 人、拟南芥和水稻 *JmjC* 基因家族在系统进化树上可分别被归为 8、5、5 个亚家族 (Klose et al., 2006; Lu et al., 2008), 特别的是, 在人类与动物中存在的 JHDM1、PHF、JMJD3 三类亚家族在植物上并未发现, 仅发现另 5 个亚家族 [ (JARID1/KDM5、JHDM3/KDM4、JHDM2/KDM3、JMJD6 和 *JmjC domain-only* (*JmjC-only*) ] , 而大豆 *JmjC* 基因家族的系统进化树将其归类为不同于人类的 8 个亚家族 (Han et al., 2016), 可见不同物种在系统发育进化关系上存在一定差异。启动子顺式作用元件与转录因子结合调控基因转录, 在植物基因表达调控中起着关键作用 (郭晋艳 等, 2011)。对 *DoJMJ* 启动子顺式作用元件分析发现, 存在大量光响应元件及部分胁迫应答、激素应答有关元件。基因表达分析中, 启动子区含有大量光响应元件的成员 *DoJMJ08*、*DoJMJ09* 对不同光周期的处理有明显响应表达, 一定程度上说明该家族成员表达模式与启动子预测较为一致 (孙雪丽 等, 2019)。*DoJMJ* 家族启动子区域包含部分低温响应元件, 研究发现, 含 *JmjC* 结构域的组蛋白去甲基化酶基因 *MtJMJC5* 能够在苜蓿响应低温胁迫反应中发挥作用 (沈迎芳, 2016), 因而推测 *JmjC* 基因也参与了石斛的低温胁迫应答过程。

### 3.2 *DoJMJ* 在不同组织部位及不同光周期下的表达模式

基因在不同物种、不同组织部位的表达模式有所差异, 具有物种特异性和组织特异性。研究发现, *JmjC* 基因在大豆叶芽、花、茎尖中表达量较高, 在根、豆荚、种子中表达量较低 (Han et al., 2016), 推测 *GmJMJ* 主要对茎、花的生长发育起到促进作用。在玉米茎尖、长须的表达量高于其他组织, 推测该家族可能参与玉米茎、须的发育 (Qian et al., 2019)。17 个 *DoJMJ* 大多在茎、叶片部位表达量较高, 其中有 5 个成员分别在茎、叶中的表达量较高, 4 个在根系中较高水平表达, 推测 *DoJMJ* 可能对茎、叶片、根的生长发育起到一定调节作用, 但具体调控机制待进一步研究。启动子区顺式作用元件发现, 石斛 *JmjC* 基因家族存在大量分生组织及细胞周期响应元件的成员, 在不同组织部位的表达均出现了显著响应。同一亚家族成员, 如 *DoJMJ01*、*DoJMJ02* 和 *DoJMJ07*、*DoJMJ15*, 在不同组织中表达模式相似, 表明这些基因之间存在功能冗余。研究发现, *OsJMJ714* 能够参与调控水稻根系中生长素的含量, 进而影响根系的发育 (秦巧, 2013)。本研究中, *DoJMJ13* 在根部位的表达量较高, 表明该成员可能参与植物根系的形态建成, 但是否通过调节其他激素水平影响根系生长仍待探究。

启动子区域所含顺式作用元件在一定程度上可以推断家族成员的基因表达特征。在 *DoJMJ* 启动子序列中鉴定到大量光响应元件，而前期对拟南芥的研究发现，JmjC 蛋白参与了不同光周期响应的表达调控 (Lu et al., 2011b)。本研究中利用 qRT-PCR 技术探究了 *DoJMJ* 对光照周期的响应，发现不同光周期条件下该家族成员的表达趋势显著不同，一定程度上表明该家族基因表达趋势与启动子分析一致。*DoJMJ07* 与已报道的拟南芥中对光周期有明显响应的 *AtJMJ30* (Lu et al., 2011b) 同源性最高，该成员在 12 h/12 h 光照周期下表达显著上调，与番茄中同源基因 *JMJ524* 参与生物钟响应的趋势 (Li et al., 2015) 一致。随着光照时间的增加，*DoJMJ* 表达趋势较为一致，大都呈现先“先上升后下降”的趋势。其中大部分成员在 12 h/12 h 光照周期下高表达，少数成员在 4 h/20 h、8 h/16 h、24 h/0 h 光周期下表达量较高。研究发现 *DoJMJ04*、*DoJMJ14* 在 4 h/20 h 光周期下表达量高于其他处理，表明此类基因可能更适宜于短日照环境。综上，不同光周期下各基因的表达量峰值也有差异，可能是由于该家族基因在生物钟信号传递过程中发挥的功能差异所导致。物种进化分析显示，*AtJMJ12*、*AtJMJ11* 与 *DoJMJ10*、*DoJMJ05* 同属分支，而研究发现 *AtJMJ11*、*AtJMJ12* 可在光周期途径中被诱导表达 (Noh et al., 2004)。另外，有文献报道 JmjC 蛋白可通过表观遗传修饰参与光信号转导途径，进一步参与植物次生代谢产物的生物合成 (汤小凤, 2018)。表观遗传调控参与药用植物次生代谢产物的合成，可能是由于不同光照条件下植物的生长信号和物质积累信号存在互作效应的结果。这些结果都为进一步研究石斛 JmjC 基因家族的生物学功能提供了数据参考和理论依据。

本试验中基于铁皮石斛基因组数据库信息进行研究，对石斛 JmjC 基因家族进行了成员筛选及鉴定，并进行了一系列生物信息分析，系统地介绍了该家族成员各类理化特性、基因结构特征、进化发育关系等，探究了 *DoJMJ* 在不同组织部位中的表达模式及其对不同光周期的响应模式，为进一步明晰石斛 JmjC 基因家族成员的生物学功能奠定了一定的理论基础。

## References

- Balciunas D, Ronne H. 2000. Evidence of domain swapping within the jumonji family of transcription factors. *Trends in Biochemical Sciences*, 25 (6): 274 - 276.
- Campos K O, Kerbauy G B. 2004. Thermoperiodic effect on flowering and endogenous hormonal status in *Dendrobium* (Orchidaceae). *Journal of Plant Physiology*, 161 (12): 1385 - 1387.
- Chen X, Hu Y, Zhou D X. 2011. Epigenetic gene regulation by plant Jumonji group of histone demethylase. *Biochim Biophys Acta*, 1809 (8): 421 - 426.
- Chen Ying, Sun Xia, Hu Shanglian, Cao Ying, Lu Xueqin. 2009. Conserved domain analysis of NAC transcription factors associated with secondary growth in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 37 (5): 185 - 194. (in Chinese)
- 陈莹, 孙霞, 胡尚连, 曹颖, 卢学琴. 2009. 拟南芥次生生长相关 NAC 转录因子保守结构域析. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 37 (5): 185 - 194.
- Chen Z, Zang J, Whetstone J, Hong X, Davrazou F, Kutateladze T G, Simpson M, Mao Q, Pan C, Dai S. 2006. Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell*, 125 (4): 691 - 702.
- Cremer T, Cremer M, Dietzel S, Müller S, Solovei I, Fakan S. 2006. Chromosome territories—a functional nuclear landscape. *Current Opinion in Cell Biology*, 18 (3): 307 - 316.
- Gu T, Han Y, Huang R, McAvoy R J, Li Y. 2016. Identification and characterization of histone lysine methylation modifiers in *Fragaria vesca*. *Scientific Reports*, 6: 23581.
- Guo Jinyan, Zheng Xiaoyu, Zou Cuixia, Li Qiuli. 2011. Advances in studies on cis-elements and transcription factors of plant abiotic stress-induced promoters. *Biotechnology Bulletin*, (4): 16 - 20, 30. (in Chinese)
- 郭晋艳, 郑晓瑜, 邹翠霞, 李秋莉. 2011. 植物非生物胁迫诱导启动子顺式元件及转录因子研究进展. *生物技术通报*, (4): 16 - 20, 30.

- Guo Yuanyuan, Yin Jingyuan. 2010. Genomic analysis of *Arabidopsis*, rice and poplar JMJC families. *Bioinformatics*, 8 (2): 118 - 123. (in Chinese)  
郭源远, 尹京苑. 2010. 拟南芥、水稻和杨树 JMJC 家族全基因组分析. *生物信息学*, 8 (2): 118 - 123.
- Han Y, Li X, Cheng L, Liu Y, Wang H, Ke D, Yuan H, Zhang L, Wang L. 2016. Genome-wide analysis of soybean JmjC domain-containing proteins suggests evolutionary conservation following whole-genome duplication. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1800.
- Han Yuhui. 2016. Identification and analysis of histone methylation modified enzyme gene in strawberry[M. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)  
韩玉辉. 2016. 森林草莓中组蛋白甲基化修饰酶基因的鉴定与分析[硕士论文]. 南京: 南京农业大学.
- Hao L, Zhang X, Zhang W, Yi Y. 2012. Effect of temperature on growth and metabolism of *Dendrobium nobile*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 43 (2): 372 - 374.
- Hong X, Scofield D G, Lynch M. 2006. Intron size, abundance, and distribution within untranslated regions of genes. *Molecular Biology and Evolution*, 23 (12): 2392 - 2404.
- Hou Ce, Su Xiaoping, Wang Qitian, Cui Kuiqing, Shi Deshun, Liu Qingyou. 2017. Sequence polymorphism analysis of PIS region in Guanzhong milk goat. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary*, (12): 171 - 179. (in Chinese)  
侯 策, 粟小平, 王起恬, 崔奎青, 石德顺, 刘庆友. 2017. 关中奶山羊 PIS 区域序列多态性分析. *中国畜牧兽医*, (12): 171 - 179.
- Huang F, Chandrasekharan M B, Chen Y C, Bhaskara S, Hiebert S W, Sun Z W. 2010. The JmjN domain of Jhd2 is important for its protein stability, and the Plant Homeodomain (PHD) finger mediates its chromatin association independent of H3K4 methylation. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (32): 245 - 248.
- Huang Y, Chen D, Liu C, Shen W, Ruan Y. 2016. Evolution and conservation of JmjC domain proteins in the green lineage. *Molecular Genetics and Genomics*, 291 (1): 33 - 49.
- Kim J S, Mizoi J, Kidokoro S, Maruyama K, Nakajima J, Nakashi-ma K, Mitsuda N, Takiguchi Y, Ohme-Takagi M, Kondou Y, Youshizumi T, Matsui M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki A. 2012. *Arabidopsis* growthregulating factor7 functions as a transcriptional repressor of abscisic acid-and osmotic stress-responsive genes, including DREB2A. *The Plant Cell*, 8 (24): 3393 - 3405.
- Klose R J, Kallin E M, Zhang Y. 2006. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nature Reviews Genetics*, 7 (9): 715 - 727.
- Li Cheng, Pei Zhongxiao, Gan Linye, Jia Nan, Wang Caiyun, Hu Huirong. 2014. Effect of photoperiod on flowering and polyamine content of *Dendrobium officinale*. *Acta Botanica Sinica*, 50 (8): 1167 - 1170. (in Chinese)  
李 程, 裴忠孝, 甘林叶, 贾 楠, 王彩云, 胡惠蓉. 2014. 光周期对春石斛开花及多胺含量的影响. *植物生理学报*, 50 (8): 1167 - 1170.
- Li J, Yu C, Wu H, Luo Z, Ouyang B, Cui L, Zhang J, Ye Z. 2015. Knockdown of a JmjC domain-containing gene JMJ524 confers altered gibberellin responses by transcriptional regulation of GRAS protein lacking the DELLA domain genes in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 66 (5): 1413 - 1426.
- Li J, Zhao Z, Liu H, Luo C, Wang H. 2017. Influence of light intensity and water content of medium on total dendrobine of *Dendrobium nobile* Lindl. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10 (11): 1095 - 1100.
- Li Yifei. 2011. Expression analysis and functional verification of *BcJMJ30* and *BcMF22* genes related to pollen development and pollen fertilization in Chinese cabbage[Ph. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)  
李怡斐. 2011. 白菜花粉发育与粉受精相关基因 *BcJMJ30* 和 *BcMF22* 的表达分析与功能验证[博士论文]. 杭州: 浙江大学.
- Lu F, Cui X, Zhang S, Jenuwein T, Cao X. 2011a. *Arabidopsis* REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. *Nature Genetics*, 43 (7): 715 - 719.
- Lu F, Li G, Cui X, Liu C, Wang X J, Cao X. 2008. Comparative analysis of JmjC domain - containing proteins reveals the potential histone demethylases in *Arabidopsis* and rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (7): 886 - 896.
- Lu S X, Knowles S M, Webb C J, R Brandon C, Chuah C, Siu J P, Tobin E M. 2011b. The Jumonji C domain-containing protein JMJ30 regulates period length in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Physiology*, 155 (2): 906.
- Ning Y, Ma Z, Huang H, Mo H, Zhao T, Li L, Cai T, Chen S, Ma L, He X. 2015. Two novel NAC transcription factors regulate gene expression and flowering time by associating with the histone demethylase JMJ14. *Nucleic Acids Research*, 43 (3): 1469 - 1484.
- Noh B, Lee S, Kim H, Yi G, Shin E, Lee M, Jung K, Doyle M R, Amasino R M, Noh Y. 2004. Divergent roles of a pair of homologous Jumonji/Zinc-Finger-class transcription factor proteins in the regulation of *Arabidopsis* flowering time. *The Plant Cell*, 16 (10): 2601 - 2613.

- Parra G, BraDoam K, Rose A B, Ian K. 2011. Comparative and functional analysis of intron-mediated enhancement signals reveals conserved features among plants. *Nucleic Acids Research*, 39 (13): 5328 - 5337.
- Qian Y, Chen C, Jiang L, Zhang J, Ren Q. 2019. Genome-wide identification, classification and expression analysis of the JmjC domain-containing histone demethylase gene family in maize. *BMC Genomics*, 20 (1): 256.
- Qin Qiao. 2013. Study on the function of OsJMJ714 in regulating rice root development and auxin content[M. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. (in Chinese)
- 秦巧. 2013. OsJMJ714 调控水稻根系发育与生长素含量的功能研究[硕士论文]. 北京: 中国农业科学院.
- Shen Yingfang. 2016. Variable splicing characteristics and preliminary functional analysis of transcriptome and *MtJMJ5* genes of *Tribulus sativa* under low temperature stress[Ph. D. Dissertation]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences. (in Chinese)
- 沈迎芳. 2016. 低温胁迫下蒺藜苜蓿转录组及 *MtJMJ5* 基因的可变剪接特性和初步功能分析[博士论文]. 北京: 中国科学院大学.
- Song T, Zhang Q, Wang H, Han J, Xu Z, Yan S, Zhu Z. 2018. *OsJMJ703*, a rice histone demethylase gene, plays key roles in plant development and responds to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132: 183 - 188.
- Sun Weiyue. 2019. Cloning and functional verification of the CD stress related gene *SLMJ* in tomato[M. D. Dissertation]. Harbin: Harbin Normal University. (in Chinese)
- 孙维悦. 2019. 番茄响应胁迫相关基因 *SLMJ* 的克隆及功能验证[硕士论文]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学.
- Sun Xueli, Liu Fan, Tian Na, Xiang Leilei, Hao Xiangyang, Wang Yun, Peng Liyun, Wang Tianchi, Cheng Chunzhen, Lai Zhongxiong. 2019. Genomic identification and expression analysis of Aux/IAA gene family in banana. *Acta of Horticulturae Sinica*, 46 (10): 1919 - 1935. (in Chinese)
- 孙雪丽, 刘范, 田娜, 项蕾蕾, 郝向阳, 王云, 彭丽云, 王天池, 程春振, 赖钟雄. 2019. 香蕉 Aux/IAA 基因家族的全基因组鉴定及表达分析. *园艺学报*, 46 (10): 1919 - 1935.
- Tang Xiaofeng. 2018. Molecular mechanism of anthocyanin biosynthesis regulated by poplar histone demethylase PtrJMJ25[M. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 汤小凤. 2018. 杨树组蛋白脱甲基化酶 PtrJMJ25 调控花青素生物合成的分子机制[硕士论文]. 重庆: 西南大学.
- Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren M E, Borchers C H, Tempst P, Zhang Y. 2006. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, 439 (7078): 811 - 816.
- Wang Hongfei, Shang Qingmao. 2019. Identification and expression analysis of cucumber SAUR gene family. *Acta of Horticulturae Sinica*, 46 (6): 1093 - 1111. (in Chinese)
- 王红飞, 尚庆茂. 2019. 黄瓜 SAUR 基因家族的鉴定与表达分析. *园艺学报*, 46 (6): 1093 - 1111.
- Xie Xinying. 2017. Cloning of biological clock related genes of dendrobium huoshan and analysis of sugar content in culture[M. D. Dissertation]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. (in Chinese)
- 谢析颖. 2017. 霍山石斛生物钟相关基因克隆及其与培养物糖含量分析[硕士论文]. 福州: 福建农林大学.
- Yamane K, Toumazou C, Tsukada Y. 2006. JHD2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell*, 125 (3): 483 - 495.
- Yang W, Jiang D, Jiang J, He Y. 2010. A plant-specific histone H3 lysine 4 demethylase represses the floral transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 62 (4): 663 - 673.
- Yang Wei, Pan Yu, Su Chenggang, Zhang Xingguo, Li Jinhua. 2016. DoA methylation analysis of tomato *JMJ524* gene regulating *SIGLD1*. *Biotechnology Bulletin*, 32 (12): 79 - 85. (in Chinese)
- 杨伟, 潘宇, 苏承刚, 张兴国, 李金华. 2016. 番茄 *JMJ524* 基因调控 *SIGLD1* 的 DoA 甲基化分析. *生物技术通报*, 32 (12): 79 - 85.
- Yokoo T, Saito H, Yoshitake Y, Xu Q, Asami T, Tsukiyama T, Teraishi M, Okumoto Y, Tanisaka T. 2014. Se14, encoding a JmjC domain-containing protein, plays key roles in long-day suppression of rice flowering through the demethylation of H3K4me3 of RFT1. *PLoS ONE*, 9 (4): e96064.
- Zhao W, Shafiq S, Berr A, Shen W. 2015. Genome-wide gene expression profiling to investigate molecular phenotypes of *Arabidopsis* mutants deprived in distinct histone methyltransferases and demethylases. *Genomics Data*, 4: 143 - 145.
- Zong W, Zhong X, You J, Xiong L. 2013. Genome-wide profiling of histone H3K4-tri-methylation and gene expression in rice under drought stress. *Plant Molecular Biology*, 81 (1 - 2): 175 - 188.