

赵桦, 张舒婷, 刘蒲东, 倪珊珊, 付帅, 叶炜, 陈裕坤, 林玉玲, 徐涵, 赖钟雄. 石斛PRMT基因家族的鉴定及其在不同光周期下的表达[J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28 (2): 413-422

Zhao H, Zhang ST, Liu PD, Ni SS, Fu S, Ye W, Chen YK, Lin YL, Xu H, Lai ZX. Genome-wide identification of PRMT gene family and expression analysis under different photoperiods in *Dendrobium* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2022, 28 (2): 413-422

石斛PRMT基因家族的鉴定及其在不同光周期下的表达

赵桦¹ 张舒婷¹ 刘蒲东¹ 倪珊珊¹ 付帅¹ 叶炜² 陈裕坤¹ 林玉玲¹ 徐涵¹
赖钟雄¹✉

¹福建农林大学园艺植物生物工程研究所 福州 350002

²三明市农业科学研究院 三明 365000

摘 要 蛋白质精氨酸甲基转移酶 (protein arginine methyltransferases, PRMTs) 是真核生物基因组中重要的表观遗传调控因子之一, 在植物信号转导、蛋白亚细胞定位和转录调控中发挥着重要作用。基于铁皮石斛基因组数据库, 采用生物信息学方法对石斛PRMT基因家族进行成员鉴定, 并对其基因结构、蛋白质保守基序 (motif)、蛋白质理化特性和启动子顺式作用元件等进行分析。通过qRT-PCR检测DoPRMT在不同组织部位中的表达模式及对不同光周期条件的响应。在铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 基因组上共筛选鉴定到6个PRMT成员, 基因结构分析发现, 该家族各成员内含子外显子数量有所差异, 其中相差数量最多的达到25个。系统进化树可将石斛PRMT家族划分为3种类型 (I、II、III) 甲基转移酶, 石斛中存在I型PRMT有5个, 1个II型PRMT, III型甲基转移酶在其中不存在同源序列。保守结构域分析结果显示, 该家族成员含有特定的PRMT和PrmA保守结构域, 多数成员仅含有PrmA结构域。保守基序分析发现, 该家族包含motif数量较多, 各成员包含共有的motif1和motif4。启动子作用元件分析发现, 该家族成员包含众多光响应元件及激素应答、厌氧诱导、逆境响应等相关响应元件。qRT-PCR数据表明, 该家族各成员在金钗石斛 (*Dendrobium nobile*) 叶片中表达较高, 茎中的表达较低, 少数成员在根中表达较高。此外, DoPRMT在不同光周期下呈现差异性表达模式, 各成员在24 h (光照)/0 h (黑暗) 下相对表达量较高, 在12 h/12 h、8 h/16 h、4 h/20 h等光周期条件下表达相对较低。本研究表明石斛PRMT家族成员表达具有组织特异性, 并且可能在石斛响应光周期的过程中发挥重要作用。 (图7 表4 参58)

关键词 铁皮石斛; 金钗石斛; DoPRMT; 表达模式; 光周期

Genome-wide identification of PRMT gene family and expression analysis under different photoperiods in *Dendrobium*

ZHAO Hua¹, ZHANG Shuting¹, LIU Pudong¹, NI Shanshan¹, FU Shuai¹, YE Wei², CHEN Yukun¹, LIN Yuling¹, XU Han¹ & LAI Zhongxiong¹✉

¹Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

²Sanming Institute of Agricultural Sciences, Sanming 365000, China

Abstract Protein arginine methyltransferases (PRMTs) are one of the important epigenetic regulators in eukaryotic genomes. PRMTs are important in plant signal transduction, protein subcellular localization, and transcriptional regulation. Based on the *Dendrobium officinale* genome database, bioinformatics methods were used to identify the members of the *Dendrobium* PRMT gene family. Their gene structure, motif, physicochemical properties of proteins, and promoter *cis*-acting elements were analyzed. The expression pattern of DoPRMT in different tissues and response to different photoperiod conditions were detected using qRT-PCR. Six PRMTs were screened and identified in the *D. officinale* genome. Gene structure analysis revealed different numbers of intron exons of each member of the family. Among these, the number of exons differed by as much as 25. Phylogenetic tree analysis found that the *Dendrobium* PRMT family can divide into three types (I, II, and III). These included five type I PRMTs and one type II PRMT. There were no type III sequences. DoPRMT family members contained specific PRMT and PrmA conserved domains. Most members contained only PrmA domains. Conservative motif analysis revealed that all DoPRMT family

收稿日期 Received: 2020-10-31 接受日期 Accepted: 2020-12-26

福建省重大科技专项 (2015NZ0002-1)、福建省高原学科建设经费 (102/71201801101) 和福建农林大学科技创新基金项目 (CXZX2017189、CXZX2018076、KF2015108) 资助 Supported by the Major Science and Technology Project of Fujian Province (2015NZ0002-1), the Plateau Discipline Construction of Fujian Province (102/71201 801101), and the Special Fund for Science and Technology Innovation of Fujian Agriculture and Forestry University (CXZX2017189, CXZX2018076, KF2015108)

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: Laizx01@163.com)

members contained motif1 and motif4. Promoter *cis*-acting element analysis revealed that *DoPRMT* family members contained light response, hormone response, anaerobic induction, and stress response elements. qRT-PCR results showed that the expression levels of *DoPRMT* were higher in leaves, lower in stems, with a few members expressed at higher levels in roots. At the same time, *DoPRMTs* displayed different expression patterns in various photoperiods. The relative expression level of each member was higher under the 24 h (light) / 0 h (dark) photoperiod treatment, and relatively low under the 12 h/12 h, 8 h/16 h, and 4 h/20 h photoperiod treatments. The collective findings show that the expression of *Dendrobium PRMT* family members is tissue-specific and may play an important role in the photoperiodic response of *Dendrobium*.

Keywords *Dendrobium officinale*; *Dendrobium nobile*; *DoPRMT*; expression pattern; photoperiod

真核细胞中的蛋白质经历不同的翻译后共价修饰,如磷酸化、乙酰化、甲基化和素酰化等,对蛋白质结构和功能有深远的影响。蛋白质甲基化一般指精氨酸或赖氨酸在蛋白质序列中的甲基化,作为翻译后修饰的一种形式,在甲基转移酶的催化下,S-腺苷甲硫氨酸的甲基转移到组蛋白^[1]。某些组蛋白残基通过甲基化抑制或激活基因表达,从而成为表观遗传,在环境因素和遗传表达交互作用间发挥重要作用。蛋白质精氨酸甲基化发生在精氨酸残基上,由精氨酸转移酶催化S-腺苷甲硫氨酸的甲基化基团转移到精氨酸的胍基上。PRMT (protein arginine methyltransferases) 作为一种蛋白质精氨酸甲基转移酶,分为3种(I、II、III)类型,I型催化形成单甲基和不对称双甲基精氨酸,II型催化形成单甲基和对称双甲基精氨酸,而III型只能催化胍基基团的单甲基化。该家族各成员在底物特异性、氨基酸序列(尤其是N端延伸)、酶活性类型和亚细胞定位等方面存在较大差异^[2]。一个有趣的发现是,在高等植物拟南芥、水稻等PRMTs中存在多个同源基因,猜测可能是由于基因复制所导致^[3]。其中PRMT1、PRMT2、PRMT3、PRMT4、PRMT6、PRMT10属于I型蛋白^[4],其中PRMT2是通过与PRMT1的蛋白同源性分析而被鉴定的^[5],仅在动物中存在。PRMT5是被发现的第一个II型蛋白^[6],在动植物中均有,其次是PRMT9,但PRMT9在植物中不存在同源基因,为动物中特有。PRMT7是人类基因组中唯一的III型蛋白^[7],在拟南芥、水稻中存在同源蛋白,PRMT8具有与PRMT1极高的同源性,同PRMT9一样仅存在于动物中。PRMT11是人类PRMT1b的拟南芥同源蛋白,但因其既不具有PRMT特征基元,也没有显示出可复制的PRMT活性,因而并不被认为是真正的PRMTs^[8]。综上,植物中存在着I型甲基转移酶PRMT1、PRMT3、PRMT4、PRMT6和PRMT10,II型甲基转移酶PRMT5以及III型甲基转移酶PRMT7。

对人类PRMT家族的生物信息学分析发现,人类中该家族成员有9个,该家族各成员在参与调控人类疾病等方面研究较为广泛^[2]。在真菌中,灵芝的PRMT家族成员有3个,可能参与了灵芝的生长发育过程^[9]。植物中PRMT家族成员数量差异较小,拟南芥^[10]、水稻^[11]、玉米^[12]和金银花^[13]等植物中分别有9、8、8和4个成员。PRMT蛋白不仅参与对植物开花时间的调控^[14-15]、响应植物昼夜节律的调节变化^[16],亦可以参与调控植物生长发育和盐胁迫适应反应^[17]。Hernando等对拟南芥研究得出,PRMT5和PRMT4可通过调节相关基因的表达,间接参与RNA剪接、光信号、开花、激素信号和非生物/生物胁迫信号途径的调控过程^[10]。AtPRMT5成员可以通过抑制开花抑制因子FLC的表达参与对春化和成花转变过程的调控^[18-19]。AtPRMT5作为拟南芥中发现的最重要的II型精氨酸甲基转移酶,一旦缺失将导致植株生长发育等多方面产生缺陷现象,如

叶色变深、卷叶、生长迟滞、生物周期节律紊乱及对金属离子吸收异常等^[20-22]。同时精氨酸甲基化酶(PRMT5)和Tudor域蛋白(TSNs)均可调节AGO2介导的RNAi,从而促进植物免疫^[23]。水稻的研究发现,PRMTs对于稻瘟病菌的侵染致病可能起重要调控作用^[24]。

石斛(*Dendrobium*)属兰科(Orchidaceae)药用石斛属(*Dendrobium* Sw.)植物,常见的石斛种类有铁皮石斛、金钗石斛、流苏石斛、鼓槌石斛等,于中国药典收录。其繁殖方式、内部结构,甚至所含代谢成分、碱基序列具有较高相似性,次生代谢物质种类及含量丰富,以生物碱类、多糖类、总黄酮为主成分,在癌症治疗^[25]、改善记忆、抗衰老^[26]、降血脂^[27]等方面临床应用价值较高。研究发现,石斛体内源激素含量的变化与光周期调控的信号表达有紧密联系^[28]。多胺含量的积累同短日照环境呈正比,猜测短日照条件更利于春石斛代谢物的积累^[29]。光周期同样参与着霍山石斛代谢产物的合成^[30]。金钗石斛因其株形与古时女子发髻上所用发钗形状所似而取名“金钗”,相较铁皮石斛不同的是茎中生物碱含量、叶中总黄酮含量较高,有助于阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的治疗^[31]。研究发现,表观遗传修饰可通过激活生物碱合成相关基因的表达,进而调控金钗石斛内生物碱的合成,从而提高石斛药用价值。而光周期调控石斛基因表达等的研究较少,本研究基于铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)基因组数据库,对石斛PRMT基因家族成员进行筛选及鉴定,并对其基因结构、蛋白质保守基序(motif)、蛋白质二维及三维结构和启动子顺式作用元件等进行分析,借助实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术探究DoPRMT在金钗石斛中不同组织部位和不同光周期处理下的表达模式,为进一步探索石斛PRMT基因家族的功能及其在光信号响应中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料处理

金钗石斛(*Dendrobium nobile*)盆栽苗取自福建省三明市农业科学研究所,选取生长良好的盆栽苗,对不同组织部位(根、茎、叶)进行取样(图1),于-80℃保存备用。光周期处理:以金钗石斛2年生盆栽苗为处理材料,前期进行黑暗培养,待光周期惯性表达降低至可忽略水平后,借助光照培养箱进行光周期4/20、8/16、12/12、16/8、24/0(h,光照/黑暗)处理1d,光照强度为13 000 lx,温度保持在25±1℃,取叶片速冻后于-80℃保存,用于分析石斛PRMT(*DoPRMT*)基因家族的表达特性。

1.2 方法

1.2.1 DoPRMT基因家族成员鉴定 从铁皮石斛



图1 金钗石斛不同组织部位。R: 根; St: 茎; L: 叶。
Fig. 1 Different organs of *Dendrobium nobile*. R: Root; St: Stem; L: Leaf.

(*Dendrobium officinale*) 基因组数据库 Herbal Medicine Omics Database (<http://202.203.187.112/herbalplant>) 下载铁皮石斛基因组序列, 并基于拟南芥 (TAIR <http://arabidopsis.org/>) 及水稻数据库 (<http://www.ricedata.cn/gene/>) 的PRMT家族成员的蛋白序列及其保守结构域PRMT、PrmA (PF05185、PF06325) 作为查询序列, 以拟南芥数据库下载PRMT蛋白序列作为探针, 采用本地BLASTP进行比对筛选, 将获得的潜在PRMT蛋白序列保存为候选序列, 并使用HMMER (<http://www.hmmerr.org/>)、Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 及Batch CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进一步对候选序列进行鉴定。剔除保守结构域长度< 90的序列, 保留具有完整PRMT、PrmA结构域的序列作为PRMT家族成员进行后续分析, 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 DoPRMT家族理化特性、进化树构建分析 以铁皮石斛基因组数据库中筛选出的PRMT蛋白序列为目标序列, 利用在线网站ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测铁皮石斛PRMT蛋白的氨基酸数量、分子量、不稳定系数、等电点和亲水性等; 利用Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 在线网站对其进行亚细胞定位预测分析; 采用MEGA 5.05软件构建石斛、拟南芥、水稻PRMT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 DoPRMT蛋白质二级结构与三级结构预测 基于数据库中筛选出的PRMT家族成员, 采用在线软件SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 分析该家族成员蛋白质二级结构, 并采用软件SWISS-MODE (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进一步对DoPRMT蛋白质三级结构进行预测分析。

1.2.4 DoPRMT基因结构及蛋白结构域分析 使用铁皮石斛基因组数据库GFF3注释文件, 结合筛选出的PRMT家族成员, 通过TBtools软件^[32]绘制基因结构图, 依次对PRMT家族成员内含子、外显子特性进行分析。结合HMMER和NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/>

bwrpsb.cgi) 在线软件, 对提交的蛋白序列进行保守结构域分析, 利用Photoshop组合绘制获取的保守结构域。利用MEME在线软件 (<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。

1.2.5 调控DoPRMT家族成员的miRNAs预测 以miRBase (<http://www.mirbase.org/search.shtml>) 数据库登录的miRNA信息, 选择筛选获得的石斛PRMT核酸序列为目标序列, 利用psRNATarget在线软件 (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/analysis>) 预测可以靶定DoPRMT的miRNA。

1.2.6 DoPRMT家族启动子顺式作用元件分析 利用TBtools提取铁皮石斛基因组数据库中DoPRMT家族成员起始密码子ATG上游2 000 bp的序列作为启动子序列, 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。

1.2.7 DoPRMT的qRT-PCR分析 利用TransZol Up试剂盒 (全式金, 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, OD260/280在1.8-2.0之间。参照Evo M-MLV RT Kit for qPCR (艾科瑞, 湖南) 逆转录试剂盒进行cDNA合成。使用DNAMAN 6.0软件设计DoPRMT成员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仪进行检测, 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对各成员的表达量进行显著性分析, 采取Excel和GraphPad软件分别进行数据分析及图表制作。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛PRMT基因家族的鉴定及蛋白质理化特性

基于铁皮石斛基因组数据库, 以拟南芥、水稻数据库下载的9个、8个PRMT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-value < 10^{-4} 内的数据。使用Batch CD-Search、HMMER和Pfam数据库检测PRMT蛋白所包含的PRMT、PrmA保守结构域, 去除保守结构域长度过短及不完整序列, 从原始数据库中识别并筛选出6个DoPRMT家族成员, 并基于成员所在基因组的scaffold顺序对其命名 (表2)。

对DoPRMT家族成员的基本理化特性进行分析, 结果如表2所示。各成员编码CDS序列长度在489-3 135 bp之间, 蛋白序列长度在162-1 044 aa之间。蛋白分子量在18 168.47 -117 202.36之间, 其中分子量最大的成员为DoPRMT3, 其

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 Amplification length	退火温度 Annealing temperature (θ/℃)
DoPRMT1	TGCGGGGACAGGGATTTTATC	CTCAAACAACAGGAAATAGCCCATC	205	60
DoPRMT2	ATGGGCTATTTCTGTTGTTGAG	ATCATGGCCTGCTTCTTGATG	209	60
DoPRMT3	TACTGTGATTTCTTGATATGCGC	TTTGTAGTGGAATCGGTTGGAGAT	198	60
DoPRMT4	GGAGTCAGACTTGCTTCAGAACG	ACCAACCGATCGGCTACAAA	135	60
DoPRMT5	ACCCCTGCAGTCATTAAAGAAATTG	ATACTACCCCGAAAATGGACATCAA	152	60
DoPRMT6	ATTATTTGGACTTCGCGTGCG	GATTCGGACTGCTGGAAACGA	139	60
18S rRNA	CCTGAGAAACGGCTACCACAT	CACCAGACTTGCCTCCA		60

表2 铁皮石斛PRMT基本理化性质分析

Table 2 Analysis of basic physical and chemical properties of *Dendrobium officinale* PRMT family

基因ID Gene ID	基因名称 Gene name	开放 阅读框/bp ORF	氨基酸个数/aa Number of amino acids	分子量 Molecular weight	不稳定系数 Instability coefficient	等电点 pI	亲水性 Gravy	亚细胞定位 Subcellular location
Dendrobium_GLEAN_10132534	DoPRMT1	489	162	18168.47	31.85	5.58	0.506	细胞膜 细胞质 细胞核 Cell membrane Cytoplasm Nucleus
Dendrobium_GLEAN_10132536	DoPRMT2	915	304	34450.25	29.52	5.92	0.083	叶绿体 细胞质 Cytoplasm
Dendrobium_GLEAN_10116216	DoPRMT3	3135	1044	117202.36	43.60	6.52	-0.196	细胞核 Nucleus
Dendrobium_GLEAN_10110081	DoPRMT4	1023	340	38303.06	46.32	7.65	-0.241	叶绿体 Chloroplast
Dendrobium_GLEAN_10100768	DoPRMT5	1149	383	43401.38	38.98	5.85	-0.179	细胞质 细胞核 Cytoplasm Nucleus
Dendrobium_GLEAN_10062323	DoPRMT6	2382	793	89272.45	53.83	6.98	-0.128	叶绿体 Chloroplast

次为DoPRMT6, 而DoPRMT1分子量最小, 此趋势与氨基酸数变化一致。DoPRMT不稳定系数在29.52-53.83之间, 其中DoPRMT6不稳定系数最高。理论等电点(pI)在5.58-7.65之间, 仅有1个成员非酸性蛋白(pI > 7.00)。采用Plant-mPLOC在线网站对鉴定到的6个DoPRMT成员进行亚细胞定位预测, 发现DoPRMT1定位在细胞膜中, DoPRMT3和DoPRMT5均有定位在细胞核中, DoPRMT2、DoPRMT4和DoPRMT6定位在叶绿体中。同时, 存在3个成员(DoPRMT1、DoPRMT2、DoPRMT5)并未单一定位在细胞内的某个位置, 表明该类成员在表达模式、可能的功能和调控上存在多样性。

2.2 DoPRMT系统进化树

为更好地识别植物中PRMT之间的系统发育关系, 并评估这些成员在石斛、拟南芥和水稻中的进化关系, 从这3个物种中查找出共23个PRMT蛋白序列, 即9个AtPRMT、8个OsPRMT、6个DoPRMT构建系统发育进化树(图2)。PRMT根据催化精氨酸甲基化修饰的类型分为3种(I、II、III), PRMT1是其中最保守和最广泛表达的I型PRMT, 在石斛中存在有DoPRMT1、DoPRMT2两个同源序列。PRMT4被称为共激活物相关精氨酸甲基转移酶1(CARM1), 与PRMT1同属I型

酶, 影响转录和转录后基因表达, 研究发现拟南芥、水稻中分别包含了2个、1个成员^[33], 系统进化分析显示石斛中DoPRMT4和DoPRMT6与AtPRMT4、OsPRMT4属于同一分支。PRMT5/JBP1(Jak2结合蛋白1)是所有多细胞真核生物测序基因组中保守度最高、表达最广泛的成员之一^[34], 结果显示DoPRMT3与水稻、拟南芥的AtPRMT5具有最高的同源性, 属于II型甲基转移酶。I型精氨酸甲基转移酶还包括PRMT10, 石斛中DoPRMT5成员与PRMT10同源性最高。PRMT3、PRMT6和PRMT7在高等植物拟南芥、水稻中具有1或2个同源序列, 在石斛中没有。其中PRMT7属于III型精氨酸甲基转移酶。综上, 石斛中I型PRMT有5个(DoPRMT1、DoPRMT2、DoPRMT4、DoPRMT5、DoPRMT6), II型PRMT有1个(DoPRMT3), III型甲基转移酶在石斛中不存在同源序列。

2.3 DoPRMT蛋白质二级结构及三级结构预测

蛋白质序列本身决定了序列的结构, 而序列结构进而决定了其功能。对石斛PRMT蛋白的二维结构预测分析(表3)得到, DoPRMT蛋白质二级结构均由 α -螺旋、延伸链、 β -转角、无规卷曲等4部分组成。其中 α -螺旋和无规卷曲占比最大, 所占比例分别为27.11%-54.94%、17.28%-42.43%之间。而 β -转角占比较小, 所占比例在3.92%-8.95%之间。表明植物PRMT蛋白质整体结构的主要结构元件为 α -螺旋和无规卷曲。

了解蛋白质二级结构作为明晰蛋白质折叠模式和三级结构的基础, 并为研究蛋白质功能及其互作模式提供基础。借以对PRMT蛋白质二级结构分析的基础上, 进一步预测分析了DoPRMT的蛋白质三级结构, 发现该蛋白质主要由 α -螺旋和无规则卷曲组成, 同二级结构预测结果(图3)一致。DoPRMT各成员的蛋白质三级结构均有所差异, 推测它们可能行使着不同的生物学功能。

2.4 DoPRMT基因结构及蛋白质保守基序(motif)

内含子是基因组中的重要元件, 可调控转录的起始进而增强基因的表达。前人研究表明, 内含子数量及位置对基因的表达有重要的调控作用^[35-36]。DoPRMT家族成员均含有内含子, 其中4个成员内含子都在6个以上, DoPRMT3内含子数量最多, 为27个, 数量最少的为DoPRMT1, 仅有2个(图4A)。各成员基因结构外显子/内含子数量、位置变化趋势有所差异。

使用在线MEME软件对DoPRMT蛋白保守基序进行分析, 共鉴定到30个保守基序(图4B)。6个DoPRMT成员包含的motif数量和位置均有所差异, 其中含有motif最多的成员为DoPRMT3, 有25个, 而DoPRMT1含有最少的motif, 仅6个(motif 1-motif 4、motif 18、motif 27)。某些motif在各成员中均存在, 如motif 1、motif 4(图4C), 该保守基序同样存在于

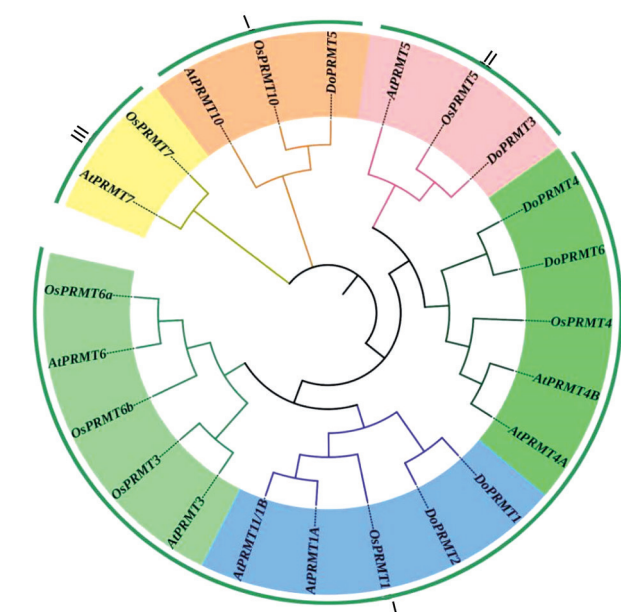


图2 铁皮石斛(Do)、水稻(Os)和拟南芥(At) PRMT蛋白的系统发育分析。

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

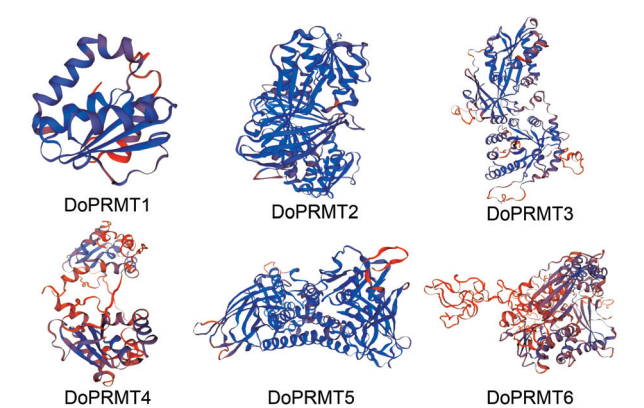


图3 铁皮石斛PRMT家族成员三维预测图。DoPRMT1-DoPRMT6对应模板分别为1f3l.1、5dst.1.A、5fa5.1.A、5ful.1.A、3r0q.1.A、6s70.1.A，DoPRMT1-DoPRMT6与模板相似度依次为0.47、0.48、0.42、0.32、0.51、0.43，DoPRMT1-DoPRMT6覆盖率依次为61.65%、56.19%、45.44%、28.76%、64.15%、51.29%。

Fig. 3 Three-dimensional prediction map of PRMT family members in *Dendrobium officinale*. DoPRMT1-DoPRMT6 corresponding templates are 1f3l.1, 5dst.1.A, 5fa5.1.A, 5ful.1.A, 3r0q.1.A, 6s70.1.A; the similarity between DoPRMT1-DoPRMT6 and the template is 0.47, 0.48, 0.42, 0.32, 0.51, 0.43; DoPRMT1-DoPRMT6 coverage rate is 61.65%, 56.19%, 45.44%, 28.76%, 64.15%, 51.29%.

保守结构域的区域。表明motif 1、motif 4可能是组成PRMT、PrmA域的基序，推测可能在调控植物生长发育过程中发挥

表3 铁皮石斛PRMT蛋白二级结构信息

Table 3 Secondary structure information of PRMT protein in *Dendrobium officinale*

蛋白名称 Protein name	DoPRMT1	DoPRMT2	DoPRMT3	DoPRMT4	DoPRMT5	DoPRMT6
α -螺旋 α -helix (r%)	54.94	38.49	37.26	44.41	37.86	27.11
延伸链 Extension chain (r%)	19.75	25.33	15.42	17.06	22.19	27.24
β -转角 β -turn (r%)	8.02	3.95	4.89	6.18	3.92	8.95
无规卷曲 Random curl (r%)	17.28	32.24	42.43	32.35	36.03	36.70

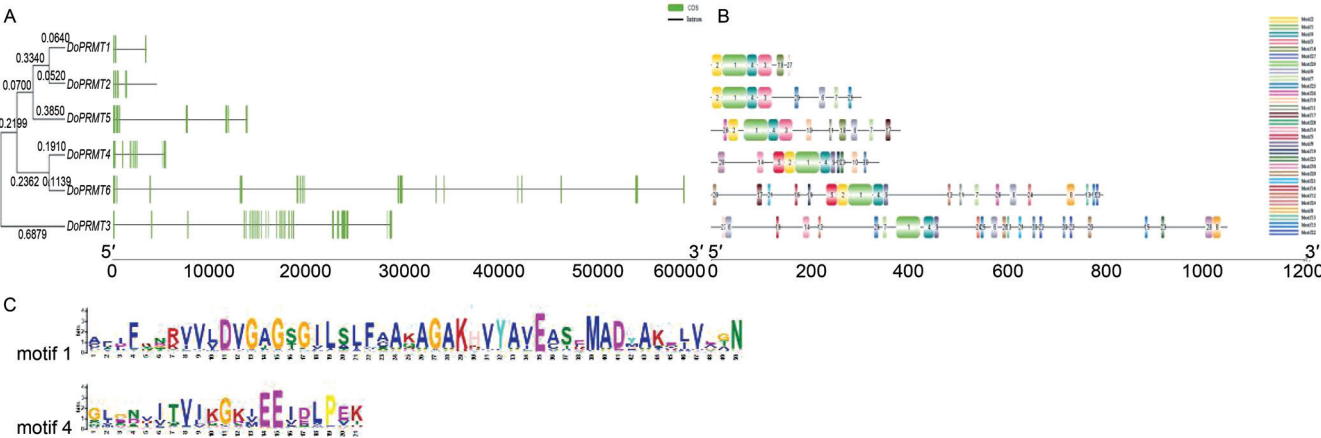


图4 铁皮石斛PRMT家族成员基因结构 (A)、蛋白保守基序 (motif 1-motif 30) 预测 (B) 以及motif 1、motif 4保守基序 (C)。

Fig. 4 Gene structure (A), protein conserved motif 1-motif 30 prediction of PRMT family members in *Dendrobium officinale* (B), and motif 1 and motif 4 Conservative motifs (C).

表4 铁皮石斛PRMT家族受调控的miRNA

Table 4 The miRNA prediction analysis of PRMT family in *Dendrobium officinale*

基因ID Gene ID	基因名称 Gene name	miRNA	期望值 Expectation	抑制方式 Inhibition
Dendrobium_GLEAN_10132534	DoPRMT1	miR7525	3.5	裂解 Cleavage
Dendrobium_GLEAN_10132536	DoPRMT2	miR7525	3.5	裂解 Cleavage
Dendrobium_GLEAN_10116216	DoPRMT3	miR5043	2.5	裂解 Cleavage
Dendrobium_GLEAN_10110081	DoPRMT4	miR867 miR1102 miR8011b	3.5	裂解 Cleavage
Dendrobium_GLEAN_10100768	DoPRMT5	miR3630	4.0	裂解 Cleavage
Dendrobium_GLEAN_10062323	DoPRMT6	miR2111	2.0	裂解 Cleavage

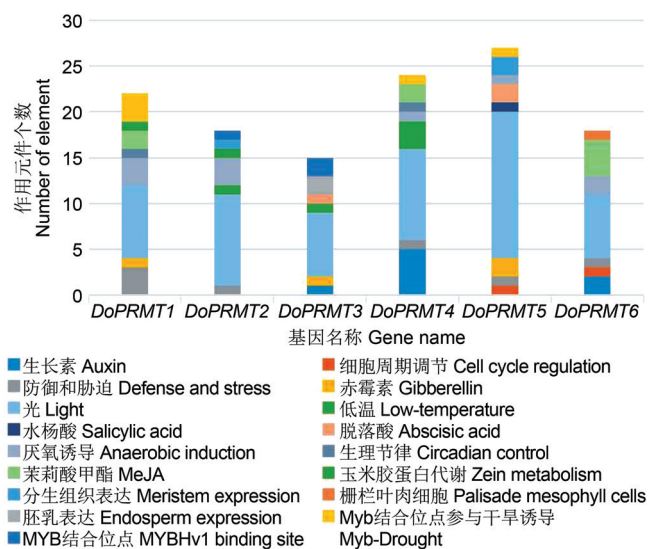


图5 铁皮石斛PRMT基因家族成员启动子顺式作用元件分布。

Fig. 5 Putative *cis*-acting element distribution in the promoter of PRMT gene family members in *Dendrobium officinale*.

在各成员之间都含有的元件。DoPRMT同样存在多个激素相关响应元件,其中50%家族成员含有生长素(TGA-element、AuxRR-core)响应元件,50%家族成员含有赤霉素(TATA-box、P-box)响应元件,16.7%家族成员含有水杨酸(TCA-element)响应元件,33.3%的家族成员含有脱落酸(ABRE)响应元件,50%家族成员含有茉莉酸甲酯(TGACG-element、CGTCA-element)响应元件,表明该类基因可能在植物生长发育及激素调控等方面有重要作用。其中DoPRMT2均不含有以上激素响应元件,说明该成员可能不参与激素信号的响应表达。

此外,DoPRMT仍存在多种逆境胁迫应答元件,其中3个成员(DoPRMT1、DoPRMT4、DoPRMT5)存在MYB结合位点干旱诱导(Myb-drought)的响应元件。除DoPRMT3成员外,其余成员均存在厌氧诱导元件。此外,3个成员(DoPRMT2、DoPRMT3、DoPRMT4)存在低温响应元件,5个成员(DoPRMT1、DoPRMT2、DoPRMT4、DoPRMT5、

DoPRMT6)存在防御和胁迫应答元件,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。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,如分生组织表达响应元件CAT-box、胚乳表达响应元件GCN4_motif、细胞周期调节元件MSA-like、生理节律调控作用元件circadian、MYB结合位点元件CCAAT-box等。

2.7 DoPRMT在不同组织部位的表达

利用qRT-PCR分析DoPRMT家族成员在金钗石斛根、茎、叶片的相对表达量(图6)。研究发现DoPRMT在各组织部位均有表达,DoPRMT2、DoPRMT3、DoPRMT4在叶中的表达相对较高,DoPRMT5在根部位的表达较高,各成员在茎中表达量均较低,表明DoPRMT家族成员在石斛不同组织部位的表达差异较大,且呈现组织特异性,推测DoPRMT可能参与着叶、根、茎等部位的生长发育过程。研究发现,同一类型甲基转移酶成员在不同组织部位存在相似的表达趋势,如I型甲基转移酶中成员DoPRMT1和DoPRMT2,在叶片中表达均较高,根次之,茎中最低。进化树分析发现,DoPRMT4、DoPRMT6与PRMT4同源性最高,二者在叶片中的表达均较高,根、茎组织部位表达差异均较小,此外,III型精氨酸甲基转移酶DoPRMT3同DoPRMT1的表达类似。表明相同类型的PRMT在植物不同组织部位中的表达模式差异较小。

2.8 DoPRMT对不同光周期的响应

石斛生长发育和代谢产物的积累很大程度上受到光照^[37]、温度^[38]和栽培条件的影响。利用qRT-PCR技术分析DoPRMT 6个基因在4/20、8/16、12/12、16/8、24/0(h,昼/夜)光照周期处理下的表达情况,发现不同光周期处理下PRMT家族成员表达模式有所差异(图7)。除DoPRMT4在12 h/12 h昼夜周期下表达较高之外,其余各成员均在24 h/0 h周期下表达量高,其中DoPRMT2在此光照条件下表达较高于其余成员。此外,在8 h/16 h光周期下DoPRMT3成员表达较高。各成员在4 h/20 h、16 h/8 h周期处理下的表达模式较为相似。表明该家族成员响应着不同光照周期的调控机制。存在部分基因于不同光照处理下表达量相近,如DoPRMT1、DoPRMT6在4 h/20 h、12 h/12 h(L/D)周期下表达趋势较为一致,而DoPRMT3、DoPRMT6分别在12 h/12 h/16 h/8 h、4

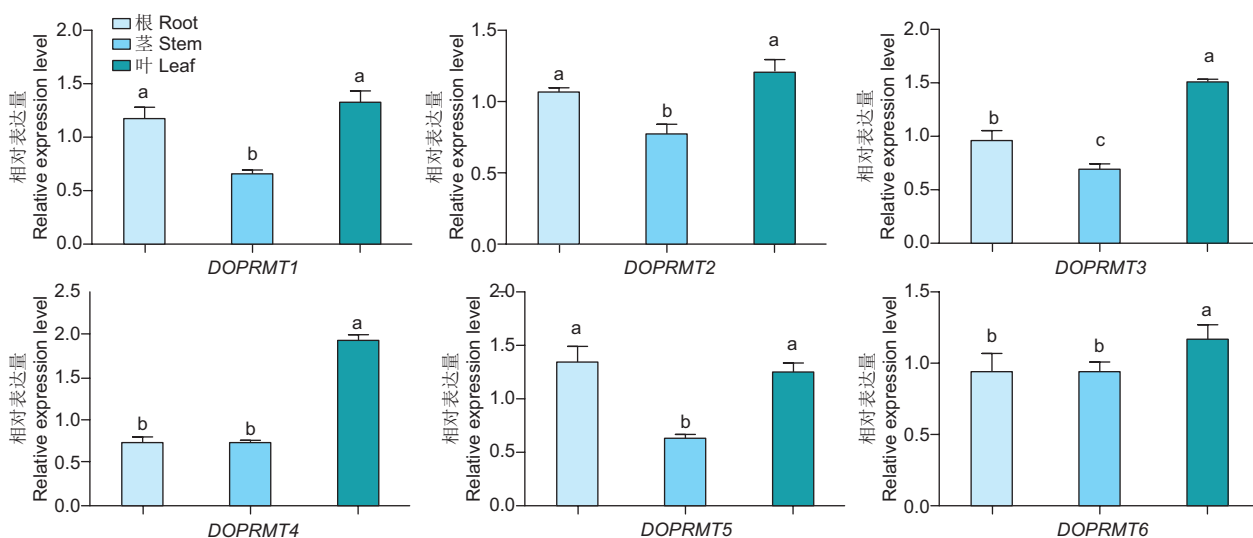


图6 PRMT家族成员在金钗石斛不同组织部位表达分析。不同小写字母表示组织间差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 6 Expression analysis of PRMT family members in different organs of *Dendrobium nobile*. Different lowercase letters indicate significant differences between the tissues at the level of 0.05.

h/20 h / 8 h/16 h下表达水平相似。

3 讨论

3.1 DoPRMT潜在功能的生物信息分析预测

PRMT在人类疾病、动物中的研究较为广泛,植物中相对较少。本研究从铁皮石斛基因组数据库鉴定出6个DoPRMT,与人(9)^[2]、鱼和海鞘(8)^[39]、灵芝(3)^[9]、拟南芥(9)^[10]、水稻(8)^[11]、玉米(8)^[12]、金银花(4)^[13]等相比成员数量差异基本相当。生信分析发现,石斛PRMT基因家族成员均含有内含子,且数量差异较大,其中相差数量最多为25个。内含子作为真核生物基因组的重要组成部分,参与着机体发育、基因表达、信号调控、细胞骨架构建等过程^[40-42],内含子对基因具有双向调控作用,其数量与位置都与基因的表达调控有着密不可分的联系^[43-45],石斛PRMT基因家族各成员内含子数量差异较大、总体分布较广泛。保守结构域分析得出,DoPRMT含有保守的PRMT结构域,与组蛋白的精氨酸作用位点结合催化组蛋白的甲基化过程^[12]。此外,还含有典型的PrmA保守结构域,是细菌中唯一确认催化L11甲基化的酶^[46]。PrmA保守区基因编码的蛋白质属于编码AdoMet-MTases超级家族,并参与着植物细胞的有丝分裂过程^[47]。

根据PRMT家族成员的类型分类,石斛、拟南芥和水稻PRMT基因家族在系统进化树上可被归为3种甲基化酶类型,在人类与动物中存在的PRMT2、PRMT8、PRMT9成员在植物上并未发现,仅存在另外的PRMTs (PRMT1、PRMT3-PRMT7、PRMT10)。有趣的是,PRMT11并不被认为是真正的PRMTs,而是属于PRMT1b的同源序列^[1]。石斛在拟南芥、水稻中的同源序列也仅存在于部分PRMTs中,在PRMT5和PRMT10中分别存在拟南芥和水稻中的一个同源序列,而PRMT1、PRMT4中存在两个同源序列,可见不同物种在系统发育进化关系上存在一定差异。研究发现,AtPRMT5通过调控植物生命周期各个阶段中mRNA前体的正确加工,保证了植物正常的生长发育过程^[48],启动子顺式作用元件与转录因子结合调控基因转录的精确起始和转录效率,在植物基因表达调控中起着至关重要的作用^[49]。启动子顺式作用元件分析发现,

DoPRMT存在大量光响应元件,部分成员存在胁迫、激素应答有关元件以及生长发育响应元件。研究表明EgPRMT10可能参与巨桉定植过程中植物激素通路的表达^[50],推测PRMT基因参与了石斛的激素应答调节过程。青蒿中的PRMT1能够参与响应低温胁迫过程^[51],DoPRMT家族启动子区域包含部分低温响应元件,推测PRMT基因也参与着石斛的低温胁迫应答过程。

3.2 DoPRMT响应不同组织部位及不同光周期的表达分析

同一基因在不同物种中表达调控方式不同,具有物种特异性,在同物种不同组织部位的表达模式仍存在差异,具有组织表达特异性。研究发现,PRMT1基因在香蕉根、茎、叶和果实中均有表达,但在茎与叶中表达量相对较高。但在果实采摘后不同时期同样呈现差异表达,并至乙烯跃变时该基因表达差异较显著^[52],推测MaPRMT主要参与着茎与叶的生长发育过程,并参与着乙烯合成前期SAM形式的生物合成反应。巨桉中发现,EgPRMT1在根毛的启动和伸长中发挥关键作用,且参与了细胞骨架形成的关键蛋白——微管蛋白的甲基化^[53],微管发挥着维持细胞形态、促进细胞内运输、参与细胞运动及细胞分裂的作用,推测PRMT1可能参与着巨桉的生长发育过程。OsPRMT在水稻根、茎、幼叶、花中均有显著表达,但所有成员均在成熟叶片中的表达较高,其中OsPRMT1和OsPRMT4成员的表达均高于其他同源基因^[11],推测该家族可能参与着水稻叶片的发育。AtPRMT5、AtPRMT10成员均通过调控开花基因FLC进而参与着植物开花响应过程^[15, 20]。Brcu PRMT5在菜薹不同组织部位的表达模式分析发现,在花器官中特异性表达最高,依次为茎、叶中的表达,根部表达量最低^[47]。金银花的研究发现,大多成员在花蕾中的表达高于叶片,表明LJPRMTs存在器官偏好性,并暗示金银花中PRMT可能较多参与花发育过程^[13]。从后期基于石斛次生代谢产物的研究角度出发,选用金钗石斛作为此次基因表达验证材料。多数DoPRMT成员在叶片部位表达量较高,茎中的表达均较低,少数成员在根中表达较高。推测DoPRMT可能在根、茎、叶片各自发育过程中起到一定调控作用,但具体调控机制待进一步研究。启动子区顺式作用元件分析发现,石斛

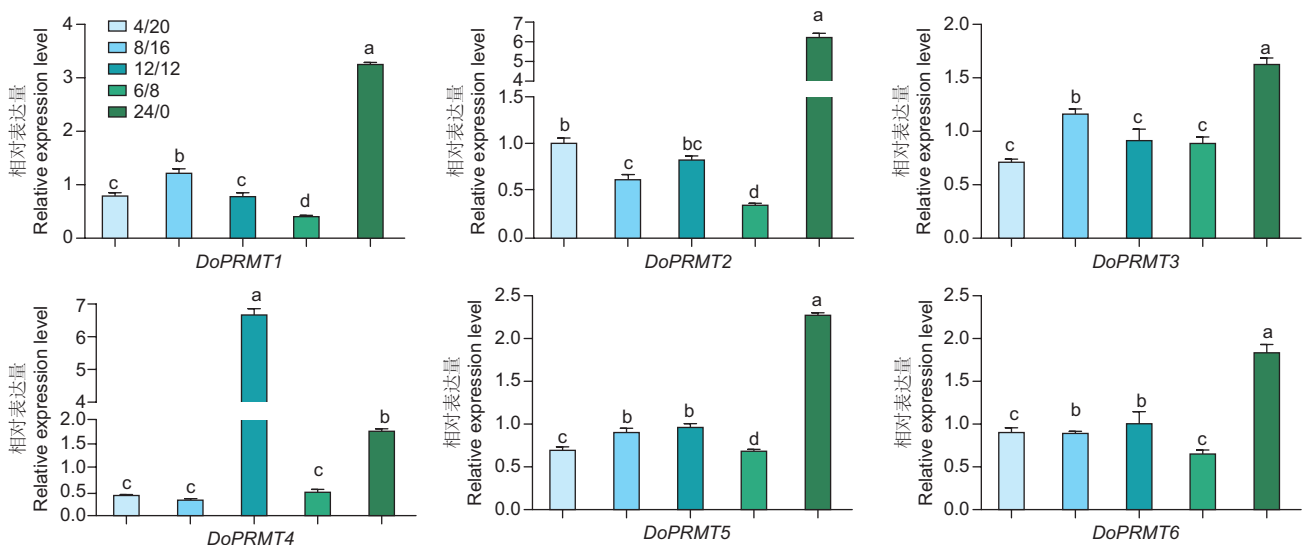


图7 PRMT家族成员在不同光周期下的表达分析。不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 7 Expression analysis of PRMT family members in various photoperiod. Different lowercase letters indicate significant differences between the treatments at the level of 0.05.

PRMT家族部分成员存在分生组织及细胞周期响应元件,在不同组织部位的表达均出现了显著响应。同一类型成员,如*DoPRMT4*和*DoPRMT6*,在不同组织中表达模式相似,推测这些基因之间存在功能冗余。对菜薹的研究发现,PRMT在根系中表达极低或不表达^[47],但本研究结果与之有所差异,*DoPRMT*在根组织部位均有所表达,且*DoPRMT5*在根中的表达较高,表明PRMT仍参与着石斛中根系的形态建成。

有研究表明,生物钟核心组分PRRs的功能缺失呈现光周期依赖性的特殊表型,揭示了生物钟调控植物光周期依赖性生长的新机制^[54]。进一步研究发现,AtPRMT蛋白通过光呼吸代谢途径参与了开花时间等植物生长发育过程,同时PRMT5可通过调控mRNA前体的拼接过程进而响应生物钟相关基因PRRs的表达等^[55],推测PRMT5在光周期感知过程中同样发挥着重要作用。本研究利用qRT-PCR技术探究了*DoPRMT*对不同光周期的响应模式,启动子区含有大量光响应元件的成员*DoPRMT2*、*DoPRMT4*和*DoPRMT5*在不同光周期处理下有明显的响应表达,一定程度上表明该家族基因表达趋势与启动子顺式作用元件预测结果^[56]较为一致。*DoPRMT3*同拟南芥中响应生物钟节律调控的*AtPRMT5*同源性最高^[16, 57],该成员在24 h/0 h光周期下表达显著上调,研究表明PRMT5参与调控RUBISCO ACTIVASE (RCA)可变剪切的过程,而RCA产生的mRNA,所编码的蛋白活性受光的调节,推测*DoPRMT3*可能间接地参与了光信号的诱导表达。随着光照时间的增加,*DoPRMT*表达趋势较为一致,大都呈现“N”字型的变化趋势。少数成员在8 h/16 h、12 h/12 h周期下表达量较高,多数成员在24 h/0 h光周期下高表达,猜测石斛生长发育过程中此类基因表达可能与长日照条件存在协同作用。PRMT4因其具有独特的转录共激活活性,又被称作CAM1

(coactivator associated arginine methyltransferase)^[1],研究发现PRMT4、PRMT5可在光信号途径中被诱导表达^[10],进化树分析表明,石斛中存在PRMT4的两个同源序列DoPRMT4、DoPRMT6, DoPRMT3同模式植物中PRMT5处于同一分支,推测他们之间功能相近,参与光响应信号的转导。另外,有文献报道PRMT蛋白可通过表观遗传修饰参与光周期信号转导途径,进一步参与植物晚花过程^[18]。生殖生长阶段的推迟相应地延长了植物营养积累阶段,促进更多代谢物质的累积。前人研究表明表观遗传调控参与药用植物次生代谢产物的合成^[58],因而表观调控因子的发掘对揭示植物代谢调控机理的研究具有重要的意义。综上,推测PRMT可能是通过光信号转导途径进而参与了植物次生代谢产物的积累过程。这些结果都为进一步研究石斛PRMT家族的生物学功能提供了参考依据。

4 结论

基于铁皮石斛基因组数据库,采用本地Blast方法,共筛选鉴定出6个PRMT家族成员;进行了一系列生物信息学分析,系统分析了该家族成员蛋白理化特性、基因结构特征、进化树发育关系、亚细胞定位、调控的miRNA、启动子顺式作用元件等,结果表明各成员启动子区域均含有大量光响应元件;进一步探讨了*DoPRMT*在金钗石斛中的表达响应模式,发现多数成员在全日照条件下高表达,少数成员在短日照/日中性条件下表达量较高,推测PRMT家族成员参与响应着不同光照条件的表达,同时具有组织特异性表达,该家族成员启动子区含有部分激素和胁迫响应元件,猜测DoPRMT家族成员可能仍参与激素及胁迫响应过程。本研究结果可为进一步探讨石斛PRMT基因的生物学功能提供一定的数据支持和理论基础。

参考文献 [References]

- Ahmad A, Cao XF. Plant PRMTs broaden the scope of arginine methylation [J]. *J Genet Genomics*, 2012, **39** (5): 195-208
- Herrmann F, Pably P, Eckerich C, Bedford MT, Fackelmayer FO. Human protein arginine methyltransferases *in vivo*—distinct properties of eight canonical members of the PRMT family [J]. *J Cell Sci*, 2009, **122** (5): 667-677
- Lynch M, Conery JS. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes [J]. *Science*, 2000, **290** (5494): 1151-1155
- Wolf SS. The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, **66** (13): 2109-2121
- Katsanis N, Yaspo ML, Fisher EMC. Identification and mapping of a novel human gene, *HRMT1L1*, homologous to the rat protein arginine *N*-methyltransferase 1 (*PRMT1*) gene [J]. *Mamm Genome*, 1997, **8** (7): 526-529
- Pollack BP, Kotenko SV, He W, Izotova LS, Barnoski BL, Pestka S. The Human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with jak kinases and contains protein methyltransferase activity [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274** (44): 31531-31542
- Zurita-Lopez CI, Sandberg T, Kelly R, Clarke SG. Human protein arginine methyltransferase 7 (PRMT7) is a type III enzyme forming ω -NG-monomethylated arginine residues [J]. *J Biol Chem*, 2012, **287** (11): 7859-7870
- Yan D, Zhang Y, Niu L, Yuan Y, Cao X. Identification and characterization of two closely related histone H4 arginine 3 methyltransferases in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biochem J*, 2007, **408** (1): 113-121
- 查良平, 刘爽, 赵玉洋, 袁媛, 黄璐琦. 灵芝精氨酸甲基转移酶基因鉴定及表达分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, **22** (15): 28-32 [Cha LP, Liu S, Zhao YY, Yuan Y, Huang LQ. Identification and expression analysis of arginine methyltransferase genes in *Ganoderma* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2016, **22** (15): 28-32]
- Hernando CE, Sanchez SE, Mancini E, Yanovsky MJ. Genome wide comparative analysis of the effects of PRMT5 and PRMT4/CARM1 arginine methyltransferases on the *Arabidopsis thaliana* transcriptome [J]. *BMC Genomics*, 2015, **16** (1): 192
- Ahmad A, Dong YZ, Cao XF. Characterization of the PRMT gene family in rice reveals conservation of arginine methylation [J]. *PLoS One*, 2011, **6** (8): e22664
- 钱叶雄, 徐士杰, 张亚男, 张梦飞. 玉米精氨酸甲基转移酶蛋白家族生物信息学分析[J]. 生物技术进展, 2014, **4** (1): 22-29 [Qian YX, Xu SJ, Zhang YN, Zhang MF. Bioinformatics analysis of PRMT protein family in maize [J]. *Curr Biotechnol*, 2014, **4** (1): 22-29]
- 齐琳洁, 袁媛, 黄璐琦, 龙平, 查良平, 王尧龙. 金银花组蛋白甲基转移酶基因生物信息学及表达分析[J]. 中国中药杂志, 2015, **40** (11): 2062-2067 [Qi LJ, Yuan Y, Huang LQ, Long P, Cha LP, Wang

- YL. Bioinformatics analysis and expressed level of histone methyltransferase genes in *Lonicera japonica* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2015, **40** (11): 2062-2067]
- 14 Pei YX, Niu LF, Lu FL, Liu CY, Zhai JX, Kong XF, Cao XF. Mutations in the Type II protein arginine methyltransferase AtPRMT5 result in pleiotropic developmental defects in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2007, **144** (4): 1913-1923
- 15 Niu LF, Lu FL, Pei YX, Liu CY, Cao XF. Regulation of flowering time by the protein arginine methyltransferase AtPRMT10 [J]. *EMBO Rep*, 2007, **8** (12): 1190-1195
- 16 Hong S, Song HR, Lutz K, Kerstetter RA, Michael TP, McClung CR. Type II protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) is required for circadian period determination in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PNAS*, 2010, **107** (49): 21211-21216
- 17 Zhang ZL, Zhang SP, Zhang Y, Wang X, Li D, Li Q L, Yue MH, Li Q, Zhang YE, Xu YY. *Arabidopsis* floral initiator SKB1 confers high salt tolerance by regulating transcription and pre-mRNA splicing through altering histone H4R3 and small nuclear ribonucleoprotein LSM4 methylation [J]. *Plant Cell*, 2011, **23** (1): 396-411
- 18 Schmitz RJ, Sung S, Amasino RM. Histone arginine methylation is required for vernalization-induced epigenetic silencing of FLC in winter-annual *Arabidopsis thaliana* [J]. *PNAS*, 2008, **105** (2): 411-416
- 19 Wang X, Zhang Y, Ma Q, Zhang ZL, Xue YB, Bao SL, Chong K. SKB1-mediated symmetric dimethylation of histone H4R3 controls flowering time in *Arabidopsis* [J]. *EMBO J*, 2014, **26** (7): 1934-1941
- 20 Deng X, Gu L, Liu C, Lu T, Lu F, Lu Z, Cui P, Pei Y, Wang B, Hu S. Arginine methylation mediated by the *Arabidopsis* homolog of PRMT5 is essential for proper pre-mRNA splicing [J]. *PNAS*, 2010, **107** (44): 19114-19119
- 21 Fan HJ, Zhang ZL, Wang N, Cui Y, Sun H, Liu Y, Wu HL, Zheng SS, Bao SL, Ling HQ. SKB1/PRMT5-mediated histone H4R3 dimethylation of *lb* subgroup *bHLH* genes negatively regulates iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2014, **77** (2): 209-221
- 22 Fu YL, Zhang GB, Lv XF, Guan Y, Yi HY, Gong JM. *Arabidopsis* histone methylase CAU1/PRMT5/SKB1 acts as an epigenetic suppressor of the calcium signaling gene *CAS* to mediate stomatal closure in response to extracellular calcium [J]. *Plant Cell*, 2013, **25** (8): 2878-2891
- 23 Hu P, Zhao HW, Zhu P, Xiao YS, Miao WL, Wang YS, Jin HL. Dual regulation of *Arabidopsis* AGO2 by arginine methylation [J]. *Nat Com*, 2019, **10** (1): 844
- 24 吴立叶, 王国梁, 刘文德. 稻瘟病菌不同生长期蛋白精氨酸甲基转移酶基因的表达分析[J]. 生物技术通报, 2017, **33** (6): 104-111 [Wu LY, Wang GL, Liu WD. Expression analysis of protein arginine methyltransferase genes in *Magnaporthe oryzae* [J]. *Biotechnol Bull*, 2017, **33** (6): 104-111]
- 25 王杰, 葛颖华, 周萃, 童晔玲, 任泽明. 鲜铁皮石斛提取物对Lewis肺癌小鼠VEGF、PCNA、MVD的影响[J]. 中华中医药学刊, 2014, **32** (11): 2760-2762 [Wang J, Ge YH, Zhou C, Tong YL, Ren ZM. Effect of extracts from fresh *Dendrobium candidum* on VEGF, PCNA and MVD of mice with lewis lung cancer [J]. *Chin Arch Trad Chin Med*, 2014, **32** (11): 2760-2762]
- 26 郁美娟, 孟庆华, 黄德音, 赵亚平. 石斛属植物有效成分及药理作用研究[J]. 中成药, 2003, **25** (11): 58-61 [Yu MJ, Meng QH, Huang DY, Zhao YP. Study on the effective ingredients and pharmacological effects of *Dendrobium* [J]. *Chin Trad Patent Med*, 2003, **25** (11): 58-61]
- 27 罗傲霜, 淳泽, 葛绍荣, 罗傲雪, 范益军, 刘鹏, 彭文景. 选鞘石斛多糖降血糖作用研究[J]. 应用与环境生物学报, 2006, **12** (3): 334-337 [Luo AS, Chun Z, Ge SR, Luo AX, Fan YJ, Liu P, Peng WJ. Effect of *Dendrobium denneanum* polysaccharide reducing blood glucose *in vivo* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2006, **12** (3): 334-337]
- 28 Campos KO, Kerbauy GB. Thermoperiodic effect on flowering and endogenous hormonal status in *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. *J Plant Physiol*, 2004, **161** (12): 1385-1387
- 29 李程, 裴忠孝, 甘林叶, 贾楠, 王彩云, 胡惠蓉. 光周期对春石斛开花及多胺含量的影响[J]. 植物生理学报, 2014, **50** (8): 1167-1170 [Li C, Pei ZX, Gan LY, Jia N, Wang CY, Hu HR. Effects of photoperiod on flowering and polyamine contents of nobile-type *Dendrobium* [J]. *Plant Physiol J*, 2014, **50** (8): 1167-1170]
- 30 谢析颖. 霍山石斛生物钟相关基因克隆及其与培养物糖含量分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2017 [Xie XY. Cloning of circadian clock-related genes in *Dendrobium huoshanense* and their relations with polysaccharides content [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2017]
- 31 李艳萍, 李海燕, 纪晓婉, 岑志芳, 颜金武, 吴剑峰. 金钗石斛叶中总黄酮的提取分离及体外抗阿尔茨海默病活性研究[J]. 中国药房, 2018, **29** (3): 330-333 [Li YP, Li HY, Ji XW, Chen ZF, Yan JW, Wu JF. Separation and extraction of total flavonoids from *Dendrobium nobile* leaves and study on its antiAlzheimer's disease activity *in vitro* [J]. *Chin Pharm*, 2018, **29** (3): 330-333]
- 32 Chen CJ, Xia R, Chen H, He YH. TBtools, a toolkit for biologists integrating various HTS-data handling tools with a user-friendly interface [J]. *BioRxiv*, 2018: 289660
- 33 Schurter BT, Koh SS, Chen DG, Bunick GJ, Harp JM, Hanson BL, Henschen-Edman A, Mackay DR, Stallcup MR, Aswad DW. Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1 [J]. *Biochemistry*, 2001, **40** (19): 5747-5756
- 34 Bachand F. Protein arginine methyltransferases: from unicellular eukaryotes to humans [J]. *Euk Cell*, 2007, **6** (6): 889-898
- 35 王红飞, 尚庆茂. 黄瓜SAUR基因家族的鉴定与表达分析[J]. 园艺学报, 2019, **46** (6): 1093-1111 [Wang HF, Shang QM. Genome-wide identification and expression analysis of the SAUR gene family in *Cucumis sativus* [J]. *Acta Horticult Sin*, 2019, **46** (6): 1093-1111]
- 36 Parra G, Bradnam K, Rose AB, Ian K. Comparative and functional analysis of intron-mediated enhancement signals reveals conserved features among plants [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39** (13): 5328-5337
- 37 Li JL, Zhao Z, Liu HC, Luo CL, Wang HL. Influence of light intensity and water content of medium on total dendrobine of *Dendrobium nobile* Lindl [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2017, **10** (11): 1095-1100
- 38 郝丽丽, 张习敏, 张卫方, 乙引. 温度对金钗石斛生长及代谢的影响[J]. 中草药, 2012, **43** (2): 372-374 [Hao LL, Zhang XM, Zhang WF, Yi Y. Effect of temperature on growth and metabolism of *Dendrobium nobile* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 2012, **43** (2): 372-374]
- 39 Hung CM, Li C. Identification and phylogenetic analyses of the protein arginine methyltransferase gene family in fish and ascidians [J]. *Gene*, 2004, **340** (2): 179-187
- 40 Cremer T, Cremer M, Dietzel S, Müller S, Solovei I, Fakan S. Chromosome territories—a functional nuclear landscape [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, **18** (3): 307-316
- 41 Jeong YM. Distinct roles of the first introns on the expression of *Arabidopsis* profilin gene family members [J]. *Plant Physiol*, 2005,

- 140 (1): 196
- 42 唐馨, 苟萍. 内含子的功能[J]. 生命的化学, 2019, **39** (4): 772-777 [Tang X, Gou P. The introns function [J]. *Chem Life*, 2019, **39** (4): 772-777]
- 43 Hong X, Scofield DG, Lynch M. Intron size, abundance, and distribution within untranslated regions of genes [J]. *Mol Biol Evol*, 2006, **23** (12): 2392-2404
- 44 关峰, 韦正乙, 王云鹏, 林春晶, 邢少辰, 马景勇. 内含子数量改变 *GUS* 基因的瞬时表达调控[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, **30** (5): 571-576 [Guan F, Wei ZY, Wang YP, Lin CJ, Xing SC, Ma JY. Alteration of transient expression pattern caused by number of intron in *GUS* expression cassette [J]. *Genomics Appl Biol*, 2011, **30** (5): 571-576]
- 45 周红军. 真核生物内含子大小、位置以及内含子中 ncRNA 分布的比较基因组学分析[D]. 北京: 北京师范大学, 2008 [Zhou HJ. Comparative genomic analysis of intron size, location and ncRNA distribution in eukaryotes [D]. Beijing: Beijing Normal University, 2008]
- 46 Vanet A, Plumbridge JA, Guérin M, Alix JH. Ribosomal protein methylation in *Escherichia coli*: the gene *prmA*, encoding the ribosomal protein L11 methyltransferase, is dispensable [J]. *Mol Microbiol*, 1994, **14** (5): 947-958
- 47 肖旭峰, 张祎, 吴智明, 杨寅桂. 菜薹蛋白精氨酸甲基转移酶基因 *BrcuPRMT5* 的克隆及表达分析[J]. 园艺学报, 2017, **44** (6): 1181-1188 [Xiao XF, Zhang Y, Wu ZM, Yang YG. Cloning, sequence analysis and expression profile of protein arginine *n*-methyltransferase gene *BrcuPRMT5* in flowering Chinese cabbage [J]. *Acta Horticult Sin*, 2017, **44** (6): 1181-1188]
- 48 邓娴. 拟南芥蛋白精氨酸甲基转移酶 *AtPRMT5* 调节 mRNA 前体拼接的功能研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2011 [Deng X. Study on the function of *Arabidopsis* protein arginine methyltransferase *AtPRMT5* to regulate the splicing of mRNA precursor [D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences University, 2011]
- 49 郭晋艳, 郑晓瑜, 邹翠霞, 李秋莉. 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[J]. 生物技术通报, 2011, (4): 16-20 [Guo JY, Zheng XY, Zou CX, Li QL. Research progress of *cis*-elements of abiotic stress inducible promoters and associated transcription factors [J]. *Biol Bull*, 2011, (4): 16-20]
- 50 Plett K, Raposo A, Anderson I, Piller S, Plett J. Protein arginine methyltransferase expression affects ectomycorrhizal symbiosis and the regulation of hormone signaling pathways [J]. *Mol Plant Microbiol*, 2019, **32** (10): 1291-1302
- 51 Jiang X, Yao F, Li X, Jia BL, Zhong GY, Zhang JF, Zou XY, Hou L. Molecular cloning, characterization and expression analysis of the protein arginine *N*-methyltransferase 1 gene (*As-PRMT1*) from *Artemia sinica* [J]. *Gene*, 2015, **565** (1): 122-129
- 52 刘凡, 张建斌, 贾彩红, 杨景豪, 徐碧玉, 金志强. 香蕉 *MaPRMT1* 基因的分离及表达分析[J]. 安徽农业科学, 2008, **36** (27): 11671-11673+11676 [Liu F, Zhang JB, Jia CH, Yang JH, Xu BY, Jin ZQ. Isolation and expression analysis of *MaPRMT1* gene in banana [J]. *Agric Sci Technol*, 2008, **36** (27): 11671-11673+11676]
- 53 Plett KL, Raposo AE, Bullivant S, Anderson IC, Piller SC, Plett JM. Root morphogenic pathways in *Eucalyptus grandis* are modified by the activity of protein arginine methyltransferases [J]. *BMC Plant Biol*, 2017, **17** (1): 62
- 54 Li N, Zhang Y, He Y, Wang Y, Wang L. Pseudo response regulators regulate photoperiodic hypocotyl growth by repressing PIF4/5 transcription [J]. *Plant Physiol*, 2020, **183** (2): 686-699
- 55 孔祥凤. 拟南芥蛋白精氨酸甲基转移酶 *AtPRMT5* 调控开花的分子机理研究[D]. 北京: 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 2008 [Kong XF. Molecular mechanism of *Arabidopsis* protein arginine methyltransferase *AtPRMT5* regulating flowering [D]. Beijing: Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, 2008]
- 56 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. 香蕉 *Aux/IAA* 基因家族的全基因组鉴定及表达分析[J]. 园艺学报, 2019, **46** (10): 1919-1935 [Sun XL, Liu F, Tian N, Xiang LL, Hao XY, Wang Y, Peng L, Wang TC, Cheng CZ, Lai ZX. Genome-wide identification and expression analysis of *Aux/IAA* gene family in Banana [J]. *Acta Horticult Sin*, 2019, **46** (10): 1919-1935]
- 57 Sanchez SE, Petrillo E, Beckwith EJ, Zhang X, Rugnone ML, Hernando CE, Cuevas JC, Godoy HM, Depetris-Chauvin A, Simpson CG, Brown JW, Cerdán PD, Borevitz JO, Mas P, Ceriani MF, Kornblihtt AR, Yanovsky MJ. A methyl transferase links the circadian clock to the regulation of alternative splicing [J]. *Nature*, 2010, **468** (7320): 112-116
- 58 刘爽, 袁媛, 黄璐琦, 查良平, 周骏辉, 刘勇. 探讨组蛋白甲基化修饰在次生代谢产物调控中的作用[J]. 生命的化学, 2016, **36** (4): 431-436 [Liu S, Yuan Y, Huang LQ, Cha LP, Zhou JH, Liu Y. Exploring the functions of histone methylation in regulating secondary metabolites [J]. *Chem Life*, 2016, **36** (4): 431-436]