

蓖麻 GRAS 转录因子家族的全基因组 分析及逆境胁迫响应

韩雯毓¹, 李国瑞^{2,3}, 风 兰³, 李孟建³, 白英俊¹, 孙佳欣³, 闫星伊¹, 王 双³, 赵秀平³, 陈永胜^{1,2,3}

(¹ 内蒙古民族大学农学院, 通辽 028000; ² 内蒙古自治区高校蓖麻产业工程技术研究中心 / 内蒙古自治区蓖麻育种重点实验室 / 内蒙古自治区蓖麻产业协同创新中心, 通辽 028000; ³ 内蒙古民族大学生命科学学院, 通辽 028000)

摘要: GRAS 转录因子在植物生长发育及逆境胁迫等多个生理生化途径中具有重要作用。本研究从蓖麻基因组中鉴定出 48 个 GRAS 转录因子, 对其理化性质、系统发育模式、基因结构与保守基序进行了分析。结果表明, 蓖麻 GRAS 基因编码的蛋白全部为亲水蛋白, 其中酸性蛋白质约占 94%, 等电点在 4.82~10.21 之间, 相对分子量介于 10096.8~90986.6 之间。GRAS 转录因子家族成员分为 11 个亚家族, 同一亚家族成员具有相似的基因结构与保守基序。利用 RT-qPCR 技术检测了根、茎、叶不同组织中的 5 个基因在干旱与盐胁迫下的表达情况, 结果表明, R_cGRASs 在不同组织中的表达具有特异性, 干旱与盐胁迫诱导 R_cGRAS14、R_cGRAS21、R_cGRAS35 的表达, 抑制 R_cGRAS1、R_cGRAS10 的表达。本研究结果为进一步研究 GRAS 转录因子在非生物胁迫中的功能提供参考。

关键词: 蓖麻; GRAS 转录因子; 生物信息学分析; 逆境胁迫

Genome-wide Analysis of GRAS Transcription Factors in *Ricinus communis* and Response to Abiotic Stresses

HAN Wen-yu¹, LI Guo-ru^{2,3}, FENG Lan³, LI Meng-jian³, BAI Ying-jun¹, SUN Jia-xin³, YAN Xing-yi¹, WANG Shuang³, ZHAO Xiu-ping³, CHEN Yong-sheng^{1,2,3}

(^{1a} College of Agronomy, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000; ² Inner Mongolia Industrial Engineering Research Center of Universities for Castor/Inner Mongolia Key Laboratory of Castor Breeding/Inner Mongolia Collaborative Innovation Center for Castor, Tongliao 028000; ³ College of Life Sciences, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000)

Abstract: GRAS transcription factors play important roles in many physiological and biochemical pathways involved in plant growth and development and stress responses. 48 GRAS transcription factors were identified in the genome of *Ricinus communis* L., and their physical and chemical properties, phylogenetic patterns, gene structure, and conserved motifs were analyzed. The proteins encoded by GRAS genes of castor are all hydrophilic, with acidic proteins accounting for about 94%, isoelectric points between 4.82-10.21, and relative molecular weights between 17305.2-90986.6. The GRAS transcription factors are divided into 11 subfamilies, and members of the same subfamily have similar gene structures and conserved motifs. RT-qPCR was used to detect the expression of five genes in roots, stems and leaves under drought and salt stresses. The results showed that the expression of R_cGRASs in different tissues was specific, and drought and salt stresses induced the expression

收稿日期: 2019-05-21 修回日期: 2019-06-23 网络出版日期: 2019-07-22

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190521002>

第一作者研究方向为蓖麻分子育种, E-mail: hanwenyu0212@126.com; 李国瑞为共同第一作者

通信作者: 陈永胜, 研究方向为蓖麻分子育种, E-mail: chenys_2000@163.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460353); 内蒙古自治区蓖麻育种重点实验室开放基金(MDK2018017, MDK2018018); 内蒙古民族大学自治区科技储备项目(2018NDCB05)

Foundation project: The National Natural Science Foundation of China(31460353), Inner Mongolia Key Laboratory of Castor Breeding Fund Project(MDK2018017, MDK2018018), Inner Mongolia University for Nationalities Autonomous Region Science and Technology Reserve Project(2018NDCB05)

of *RcGRAS14*, *RcGRAS21* and *RcGRAS35* but inhibited the expression of *RcGRAS1* and *RcGRAS10*. This study provides a reference for further study of the function of GRAS transcription factors in abiotic stresses.

Key words: castor (*Ricinus communis* L.); GRAS transcription factors; bioinformatic analysis; abiotic stresses

GRAS 转录因子长期以来被认为是植物特异性转录因子^[1-2]。然而,近几年有研究报道该基因家族存在于细菌基因组,并提出 GRAS 基因家族首先出现在细菌中,且属于罗斯曼折叠甲基转移酶(Rossmann fold methyltransferase)超家族^[3]。GRAS 转录因子由 3 个早期鉴定的功能基因 GIBBERELLIC-ACID INSENSITIVE (GAI)、REPRESSOR of GAI1 (RGA) 和 SCARECROW (SCR) 而命名,早期的 GRAS 家族蛋白在拟南芥中分为 8 个亚家族,分别为 DELLA、LAS (LS)、SCR、SHR、PAT1、HAM、LISCL (SCL9) 和 SCL3^[4]。近期的研究表明,GRAS 家族蛋白还包括由 SCL4/7 和 DLT 亚家族在内的 10 个亚家族构成^[5]。GRAS 基因编码的蛋白通常具有可变的 N 末端和高度保守的 C 末端,称为 GRAS 结构域,高度保守的 C 末端由 LHR I、VHIID、LHR II、PFYRE 和 SAW 5 个保守基序构成^[6]。N 末端具有较大差异,使得 GRAS 蛋白功能富有多样性,但 DELLA 蛋白在 N 末端区域含有 VHIID 和 DELLA 两个保守基序^[7]。全基因组分析结果显示,在拟南芥、水稻、白菜和番茄中分别存在 34、60、48 和 53 个 GRAS 基因^[7-9]。基于几种植物的研究,GRAS 转录因子具有多种功能并参与植物激素转导、逆境胁迫应答等生理进程。水稻中 DLT 亚家族成员 OsDLT 在油菜素类固醇信号传导中起作用^[10];拟南芥中 PAT1 亚家族成员 AtPAT1 正向调控光敏色素 A 信号的传递^[11];玉米 *ZmGRAS31* 参与植株体内抗旱、抗寒及抗盐等逆境胁迫应答^[12],胡杨中过表达 SCL4/7 亚家族的 *PeSCL7* 基因增强了转基因拟南芥植物的干旱和盐耐受性^[13]。

蓖麻 (*Ricinus communis* L.) 为大戟科草本植物,具有耐贫瘠、耐干旱、耐盐碱等特性,是世界十大油料作物之一,有较高的经济价值^[14-15]。通辽市是我国蓖麻的主产区之一,干旱与盐胁迫是影响植物生长发育中重要的非生物限制因子,近年来,境内耕地的水分缺失与盐渍化,对蓖麻的生长造成了影响。蓖麻基因组测序于 2010 年初步完成,全基因组序列大约 350 Mb,但关于蓖麻 GRAS 转录因子家族的信息较为缺乏。本研究通过生物信息学技术鉴定了

蓖麻 GRAS 转录因子家族,分析其理化性质、基因结构、保守基序以及在干旱与盐胁迫下不同组织中的表达模式,为进一步研究 GRAS 转录因子在非生物胁迫中的功能研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 蓖麻 GRAS 转录因子家族的鉴定与理化性质分析

从蓖麻数据库 (<http://castorbean.Jcvi.org/index.php>) 中下载蓖麻基因组文件与基因组注释文件,GRAS 隐马尔科夫模型 (PF03514) 下载自 Pfam (<http://pfam.xfam.org>)^[16]。利用软件 HMMER3.0 扫描蓖麻全基因组蛋白序列,提取其中包含的 GRAS 结构域的蛋白序列,将所得序列提交至 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 与 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 进行批量比对^[17],去除冗余序列。理化性质使用在线分析软件 ExPASy Proteomics (http://web.expasy.org/compute_pi) 进行分析^[18]。

1.2 蓖麻 GRAS 转录因子家族系统发育分析

拟南芥 GRAS 转录因子家族序列下载自 TAIR (<http://www.Arabidopsis.org/>),利用 ClustalW 软件将拟南芥与蓖麻 GRAS 蛋白序列进行比对^[19],比对后的序列使用 MEGA7.0 构建系统进化树。

1.3 蓖麻 GRAS 转录因子基因结构与保守基序分析

基因保守基序 (Motif) 由在线软件 MEME5.2 (<http://meme-suite.org>) 分析获得^[20],设定基序预测数为 30,其余为默认参数。基因结构使用在线软件 GSDS (Gene Structure Display Server 2.0 <http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) 分析获得。

1.4 材料的培养及处理

以通辽当地优良蓖麻品系 2129 为试材,采用盆栽法,待蓖麻长出 4 片真叶后,选取长势一致的植株进行干旱 (霍格兰营养液 +30% PEG6000) 与盐 (霍格兰营养液 +0.2 mol/L NaCl) 胁迫处理。对照组采用霍格兰营养液浇灌。每组选取材料 18 株,每次重复 3 株,共设 3 次重复。分别采集处理 0、3、6、9、12 和 24 h 后的根、茎、叶组织,速冻并置于 -80 °C 保存备用。

1.5 蓖麻 GRAS 家族基因的表达分析

使用北京庄盟国际生物基因科技有限公司 RNA 提取试剂盒提取转基因蓖麻不同组织 RNA, 参照 TAKARA 公司 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行反转录, 获得 cDNA。以

蓖麻 18S 为内参基因, 参照 TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 试剂盒进行 RT-qPCR 试验, 3 次生物学重复, 引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因的相对表达量, 使用 DPS 软件进行差异显著性分析。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Sequences of primers used in this study

| 基因名称 Gene name | 上游引物 (5' -3') Forward primer | 下游引物 (5' -3') Reverse primer |
|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>RcGRAS9</i> | TTGGGTGCCTGCATAGTTGT | TGTCTAGACTTCATCTCCATCTCT |
| <i>RcGRAS10</i> | CCTCTCAGATGGGAACAGATGC | ACAGAGGAAGGAGCAGACCT |
| <i>RcGRAS21</i> | AGACCAACCTTCGCTTCAC | CTGAAACAACCTTCAGAAACCGC |
| <i>RcGRAS35</i> | TCAGGCAGTCGAGGTGCAAG | ACGGCAAGAGGATGACACAA |
| <i>RcGRAS48</i> | CAGCTACCAAATTAGGCAATCA | AACACCCAGCCAACATCCTC |
| 18S | TGCATGGTCTCTGATACGGCCAAG | AGGGGATAACCACCCATGAATCCA |

2 结果与分析

2.1 GRAS 转录因子家族成员的鉴定及其理化性质分析

以含有 GRAS 结构域的隐马尔科夫模型 (PF03514) 为靶序列, 使用 HMMER3.0 扫描和提取蓖麻基因组中具有 GRAS 结构域的蛋白序列, 综合 NCBI、Pfam 与 SMART 数据库的筛选与比对结果后, 鉴定出 48 个蓖麻 GRAS 转录因子

家族成员, 由于蓖麻基因组信息尚不完善, 无染色体信息, 因此按照其在 scaffolds 上的排列位置将其命名为 *RcGRAS1~RcGRAS48*。RcGRAS 转录因子家族成员的理化性质如表 2 所示。通过亲水性平均值可以看出, 蓖麻 GRAS 基因编码的蛋白全部为亲水蛋白, 且酸性蛋白质约占 94%, 其中最长的为 GRAS38 (843aa), 最短的为 GRAS36 (88aa), 等电点在 4.82~10.21 之间, 相对分子量介于 10096.8~90986.6 之间。

表 2 蓖麻 GRAS 转录因子家族成员的理化性质预测结果

Table 2 Analysis of primary structure and physical and chemical properties of GRAS transcription factors in castor

| 蛋白名称 Protein name | 基因名称 Gene name | 蛋白登录号 Protein accession | 基因登录号 Gene accession | 蛋白大小 (aa) Protein length | 分子量 (kD) Molecular weight | 等电点 Isoelectric point | 亲水性平均值 Grand average of hydropathicity | 脂肪族指数 Aliphatic amino acid index |
|----------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------|---|-------------------------------------|
| 27529.m000047 | <i>RcGRAS1</i> | XP_002534218 | LOC8273265 | 542 | 61122.8 | 5.72 | -0.373 | 75.07 |
| 27568.m000253 | <i>RcGRAS2</i> | XP_015582337 | LOC8258390 | 741 | 83116.3 | 5.37 | -0.457 | 80.94 |
| 27613.m000642 | <i>RcGRAS3</i> | XP_002529051 | LOC8277582 | 538 | 60047.7 | 5.50 | -0.365 | 79.80 |
| 28166.m001040 | <i>RcGRAS4</i> | XP_015577067 | LOC8286898 | 459 | 51523.1 | 6.25 | -0.483 | 79.06 |
| 28492.m000479 | <i>RcGRAS5</i> | XP_002529844 | LOC8279702 | 519 | 58016.8 | 5.92 | -0.211 | 85.36 |
| 28650.m000186 | <i>RcGRAS6</i> | XP_015583587 | LOC8287879 | 663 | 75257.7 | 5.92 | -0.529 | 69.76 |
| 28650.m000187 | <i>RcGRAS7</i> | XP_002533749 | LOC8287880 | 688 | 78173.8 | 6.32 | -0.591 | 73.56 |
| 28650.m000189 | <i>RcGRAS8</i> | XP_002533751 | LOC8287882 | 662 | 75340.7 | 6.16 | -0.565 | 73.69 |
| 28650.m000190 | <i>RcGRAS9</i> | XP_015583592 | LOC8287883 | 815 | 90986.6 | 5.17 | -0.562 | 67.13 |
| 28650.m000191 | <i>RcGRAS10</i> | XP_002533753 | LOC8287884 | 764 | 85580.0 | 5.28 | -0.490 | 74.95 |
| 28677.m000055 | <i>RcGRAS11</i> | XP_002534030 | LOC8258926 | 567 | 62550.4 | 5.14 | -0.327 | 81.41 |
| 28966.m000535 | <i>RcGRAS12</i> | EEF33169 | — | 160 | 17305.2 | 5.88 | -0.126 | 81.88 |
| 29634.m002156 | <i>RcGRAS13</i> | XP_002521601 | LOC8273423 | 608 | 66887.2 | 4.96 | -0.296 | 81.25 |
| 29646.m001070 | <i>RcGRAS14</i> | XP_002525108 | LOC8264193 | 539 | 60899.1 | 6.03 | -0.238 | 84.10 |
| 29648.m001919 | <i>RcGRAS15</i> | XP_002520249 | LOC8270417 | 559 | 62597.5 | 4.89 | -0.409 | 78.37 |
| 29661.m000901 | <i>RcGRAS16</i> | XP_002525254 | LOC8283347 | 440 | 49288.3 | 5.58 | -0.071 | 91.14 |
| 29661.m000923 | <i>RcGRAS17</i> | XP_002525276 | LOC8283369 | 512 | 58195.0 | 5.87 | -0.494 | 68.59 |
| 29692.m000540 | <i>RcGRAS18</i> | EEF34604 | LOC8262526 | 609 | 67287.9 | 5.73 | -0.317 | 81.54 |

表 2(续)

| 蛋白名称 Protein name | 基因名称 Gene name | 蛋白登录号 Protein accession | 基因登陆号 Gene accession | 蛋白大小 (aa) Protein length | 分子量 (kD) Molecular weight | 等电点 Isoelectric point | 亲水性平均值 Grand average of hydropathicity | 脂肪族指数 Aliphatic amino acid index |
|----------------------|-------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--|--|
| 29706.m001281 | <i>RcGRAS19</i> | XP_002521327 | LOC8284651 | 548 | 60960.7 | 5.85 | -0.602 | 73.50 |
| 29728.m000844 | <i>RcGRAS20</i> | XP_002526847 | LOC826274 | 471 | 53631.0 | 6.17 | -0.412 | 86.33 |
| 29767.m000200 | <i>RcGRAS21</i> | XP_015581974 | LOC8260239 | 740 | 83933.9 | 8.40 | -0.551 | 75.91 |
| 29790.m000809 | <i>RcGRAS22</i> | XP_002525912 | LOC8276945 | 416 | 46776.9 | 6.40 | -0.099 | 95.29 |
| 29807.m000482 | <i>RcGRAS23</i> | XP_002529354 | LOC8276206 | 536 | 58616.7 | 5.27 | -0.049 | 96.62 |
| 29820.m000985 | <i>RcGRAS24</i> | XP_002526658 | LOC8263098 | 517 | 59681.5 | 4.82 | -0.362 | 78.30 |
| 29820.m000986 | <i>RcGRAS25</i> | XP_002526659 | LOC8263099 | 509 | 57484.1 | 4.83 | -0.308 | 76.88 |
| 29872.m000537 | <i>RcGRAS26</i> | XP_002528186 | LOC8277220 | 442 | 48239.5 | 5.45 | -0.184 | 88.10 |
| 29889.m003281 | <i>RcGRAS27</i> | XP_002519210 | LOC8258800 | 454 | 51417.8 | 8.39 | -0.011 | 97.91 |
| 29889.m003282 | <i>RcGRAS28</i> | EEF43075 | — | 335 | 38304.9 | 5.10 | -0.425 | 78.30 |
| 29889.m003284 | <i>RcGRAS29</i> | XP_015574674 | LOC8258803 | 545 | 61000.11 | 4.99 | -0.192 | 85.94 |
| 29889.m003285 | <i>RcGRAS30</i> | XP_006419398 | LOC18031396 | 526 | 58433.45 | 5.78 | -0.165 | 87.89 |
| 29908.m006159 | <i>RcGRAS31</i> | XP_002513781 | LOC8274094 | 491 | 54282.8 | 5.64 | -0.311 | 79.31 |
| 29910.m000940 | <i>RcGRAS32</i> | XP_002523464 | LOC8282472 | 507 | 56534.09 | 6.86 | -0.139 | 92.37 |
| 29916.m000544 | <i>RcGRAS33</i> | XP_015580706 | LOC8265567 | 787 | 86369.7 | 6.32 | -0.316 | 81.79 |
| 29929.m004746 | <i>RcGRAS34</i> | XP_002515010 | LOC8278469 | 594 | 67317.41 | 5.09 | -0.298 | 81.63 |
| 29949.m000124 | <i>RcGRAS35</i> | XP_015583657 | LOC8284784 | 582 | 65343.7 | 6.30 | -0.209 | 86.31 |
| 29957.m001404 | <i>RcGRAS36</i> | XP_015580029 | LOC8262526 | 88 | 10096.8 | 10.21 | -0.273 | 84.32 |
| 30024.m001746 | <i>RcGRAS37</i> | XP_002516708 | LOC8261160 | 451 | 50679.6 | 6.38 | -0.138 | 99.29 |
| 30073.m002204 | <i>RcGRAS38</i> | XP_002519983 | LOC8283041 | 843 | 90820.9 | 6.11 | -0.291 | 76.80 |
| 30076.m004651 | <i>RcGRAS39</i> | XP_015572330 | LOC8267338 | 642 | 73135.4 | 5.70 | -0.363 | 75.52 |
| 30131.m007029 | <i>RcGRAS40</i> | XP_002512896 | LOC8285306 | 642 | 73135.35 | 6.36 | -0.312 | 78.71 |
| 30131.m007244 | <i>RcGRAS41</i> | XP_015570998 | LOC8260706 | 474 | 53756.9 | 5.93 | -0.187 | 96.14 |
| 30147.m013794 | <i>RcGRAS42</i> | XP_002511245 | LOC8266360 | 576 | 64817.84 | 5.34 | -0.221 | 87.33 |
| 30156.m001710 | <i>RcGRAS43</i> | XP_002515699 | LOC8276883 | 444 | 49717.5 | 5.13 | -0.180 | 88.96 |
| 30169.m006225 | <i>RcGRAS44</i> | XP_002513664 | LOC8277111 | 615 | 67440.7 | 6.16 | -0.460 | 76.44 |
| 30169.m006306 | <i>RcGRAS45</i> | XP_002513361 | LOC8268849 | 562 | 64012.76 | 5.50 | -0.230 | 83.99 |
| 30170.m013590 | <i>RcGRAS46</i> | XP_002510069 | LOC8265271 | 471 | 53788.6 | 5.68 | -0.296 | 84.37 |
| 30174.m008828 | <i>RcGRAS47</i> | XP_002511661 | LOC8265856 | 733 | 80414.8 | 5.73 | -0.291 | 84.92 |
| 30190.m011131 | <i>RcGRAS48</i> | XP_002509714 | LOC8265415 | 662 | 73804.1 | 5.70 | -0.424 | 77.76 |

2.2 GRAS 转录因子家族成员的系统发育分析

将拟南芥的 34 条 GRAS 家族成员序列与鉴定得到的 48 条蓖麻 GRAS 转录因子家族成员序列进行比对后,采用邻近法构建进化树。根据聚类结果,可将蓖麻 GRAS 转录因子家族划分为 11 个亚家族,其中 DELLA 亚家族成员 9 个, LAS(LS)亚家族成员 1 个, SCR 亚家族成员 4 个, SHR 亚家族成员 3 个, PAT1 亚家族成员 5 个, HAM 亚家族成员 6 个, LISCL(SCL9)亚家族成员 7 个和 SCL3 亚家族成员 2 个, SCL4/7 和 DLT 亚家族各 1 个。本研究新鉴定出的亚家族 RcGRAS29 含有 4 个成员,该亚家族不含任何拟南芥 GRAS 成员,单独形成一个分支(图 1)。

2.3 蓖麻 GRAS 转录因子家族基因结构及保守基序分析

使用在线软件 GSDS 对 48 个蓖麻 GRAS 成

员序列进行基因结构分析,可以看出,高达 68.75% (33/48) 的 GRAS 基因无内含子,同一亚家族的基因结构也极为相似。但 GRAS28、GRAS29 存在基因结构变异,这可能是由于在基因进化过程中内含子的增加或缺失所引起。为进一步研究蓖麻 GRAS 转录因子家族的序列特征,使用 MEME 对其保守基序进行了分析。图 2 可以看出,在同一亚家族的成员具有相似的保守基序,说明同一亚族成员的功能具有相似性。除 GRAS36 外,几乎所有成员均含有基序 6、8、24,表明这些基序在 GRAS 基因家族中具有重要作用,基序 12、16、17、21、25、26 是 LISCL 亚家族特有的,各亚家族之间基序分布的差异表明这些基因在进化过程中可能存在功能分歧。

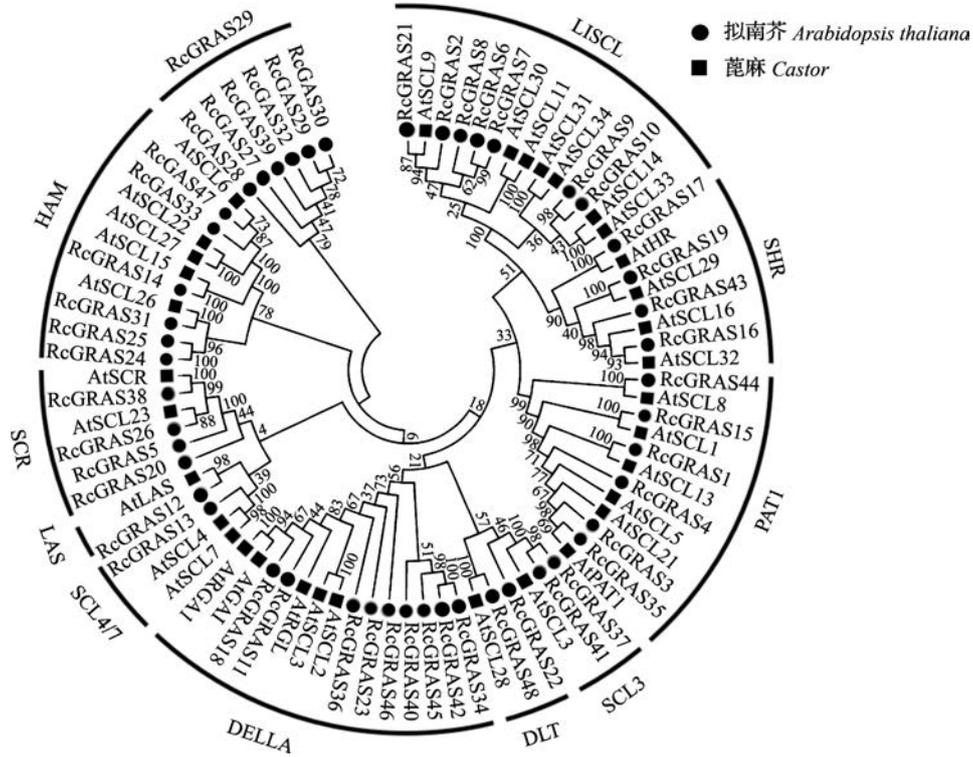


图 1 蓖麻与拟南芥 GRAS 转录因子家族进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree of GRAS transcription factors in castor and *Arabidopsis thaliana*

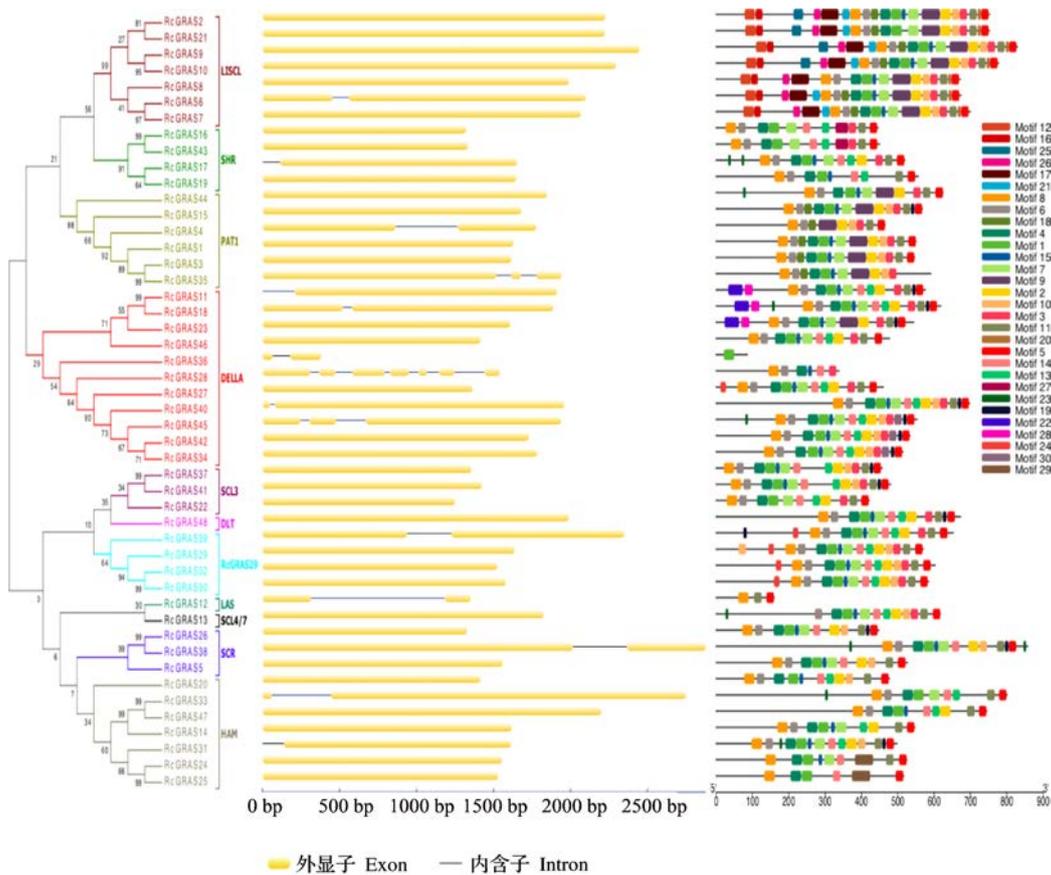


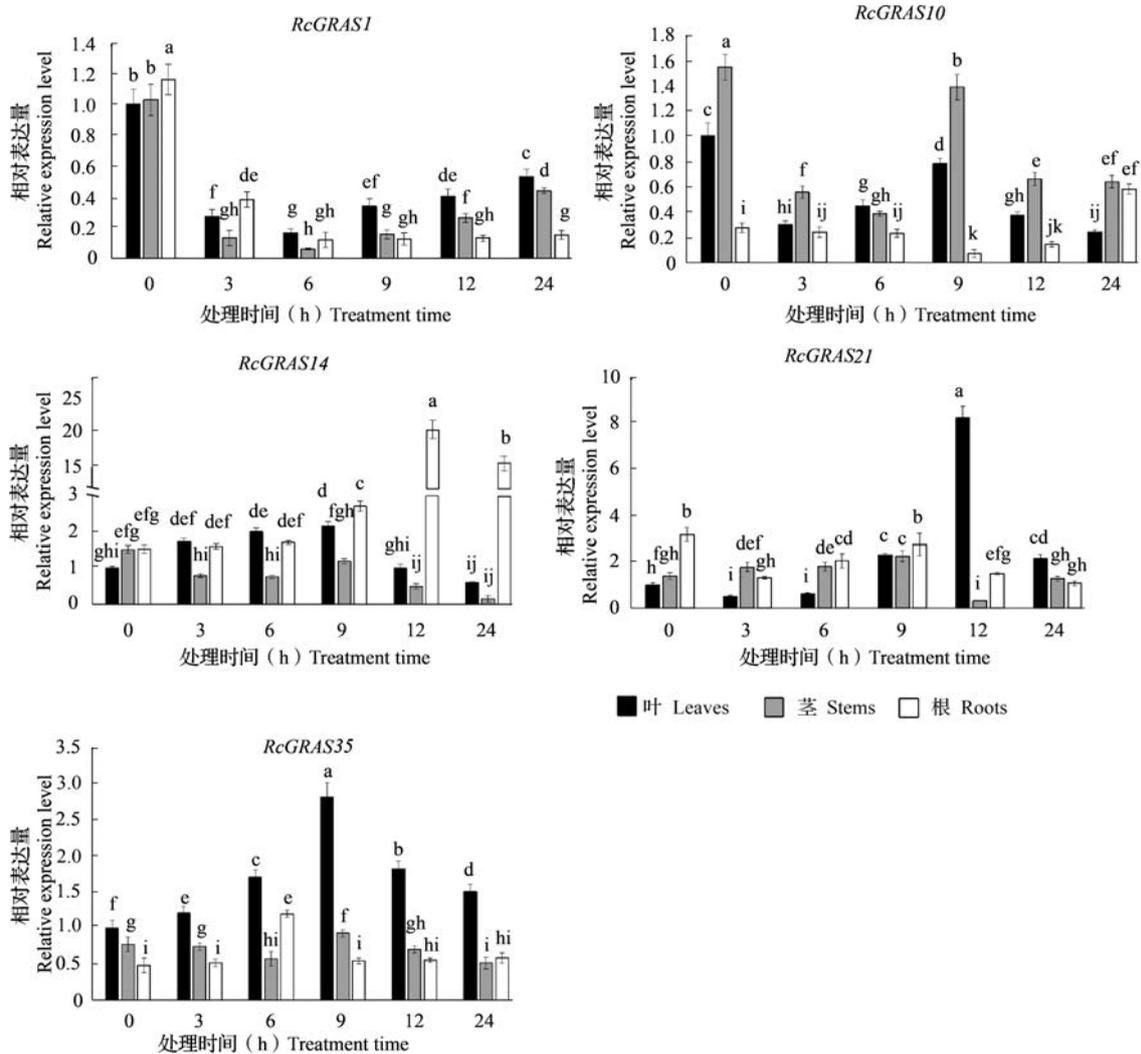
图 2 蓖麻 GRAS 转录因子家族基因结构与保守基序

Fig. 2 Gene structure and conserved motif of GRAS transcription factors in castor

2.4 蓖麻 GRASs 基因在干旱胁迫下的表达模式分析

为了解蓖麻 GRAS 在逆境胁迫下的应答模式, 利用 RT-qPCR 技术检测干旱胁迫下不同组织中 5 个 GRAS 基因的表达情况 (图 3)。结果显示, 在未胁迫处理情况下, *RcGRAS1*、*RcGRAS14*、*RcGRAS21* 在 3 种组织中的表达量依次为根 > 茎 > 叶, *RcGRAS35* 则与之相反, *RcGRAS10* 在茎中的表达量最高。干旱胁迫诱导 *RcGRAS14*、*RcGRAS21*、*RcGRAS35* 的表

达, 在 30% PEG 处理下, 相比于 0 h 的对照, 根中的 *RcGRAS1*、*RcGRAS21* 下调表达; 随着处理时间的增加, *RcGRAS14*、*RcGRAS21*、*RcGRAS35* 在叶中的表达量先上调后下调; *RcGRAS1*、*RcGRAS14* 在茎中的表达量先降低后升高。此外, 在处理时间达 12 h 时, *RcGRAS21* 在叶中表达上调最明显, *RcGRAS14* 在根中表达上调最明显。



不同字母表示 0.05 水平显著差异。下同

Letters on the bars indicate significant difference at 0.05. The same as following

图 3 干旱处理下蓖麻 *RcGRASs* 基因的表达水平

Fig. 3 Expression level of *RcGRAS* genes in drought treatment

2.5 蓖麻 GRASs 基因在盐胁迫下的表达模式分析

在 0.2 mol/L 盐胁迫处理下, 5 个 GRASs 基因的表达情况如图 4 所示。相比 0 h 处理的对照组, 当处理时间达 6 h 时, *RcGRAS14*、*RcGRAS35* 在根中的表达量最高, 当处理时间达 3 h 时, *RcGRAS21* 在茎中的表达量最高, 当处理时间达 12 h 时,

RcGRAS14 在叶中的表达量最高。随着处理时间的增加, *RcGRAS1* 在 3 种组织中都呈现出先下调又上调的趋势, *RcGRAS14*、*RcGRAS21* 则与之相反。这些结果表明盐胁迫诱导 *RcGRAS14*、*RcGRAS21*、*RcGRAS35* 的表达。

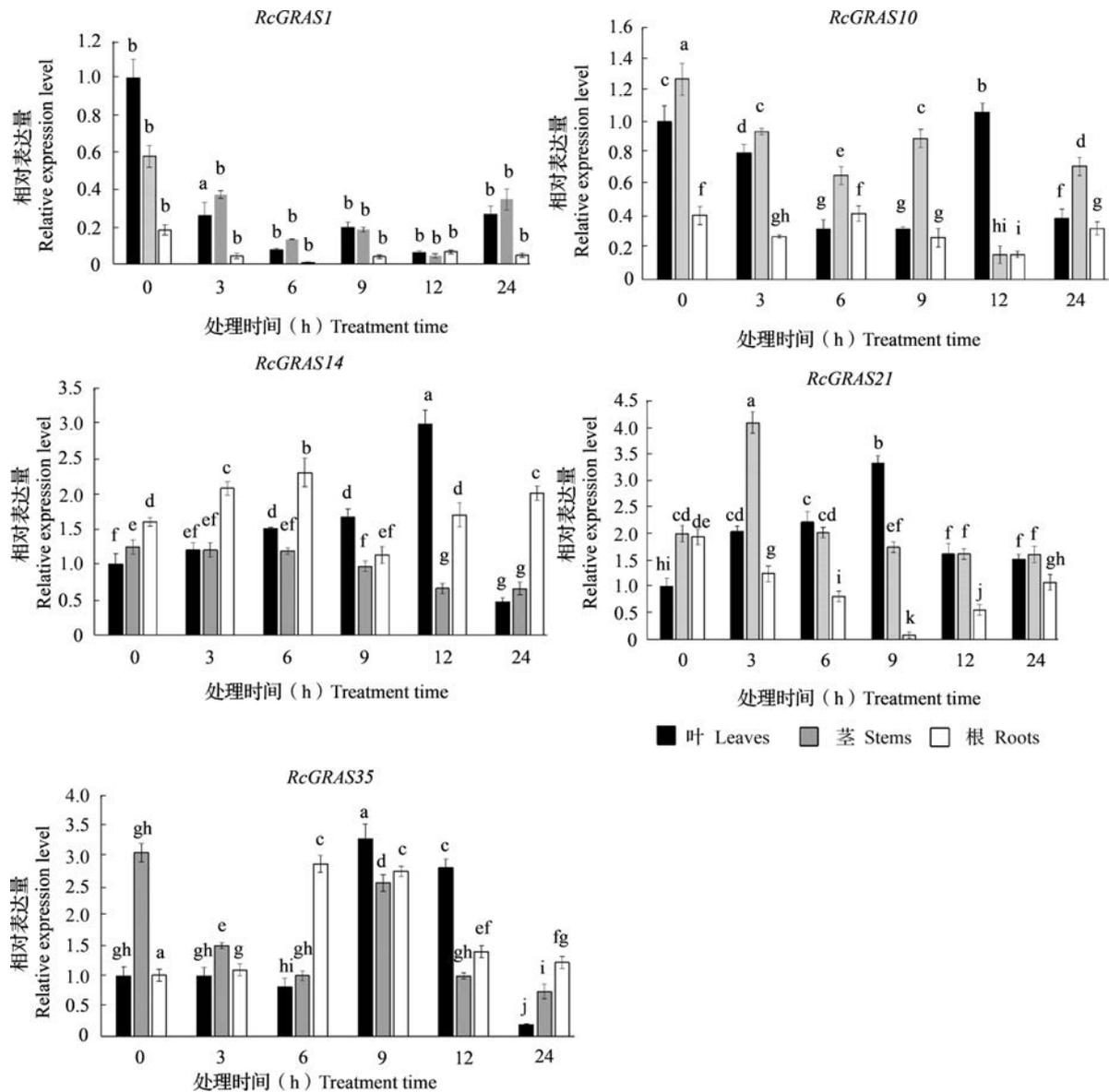


图4 盐处理下蓖麻 *RcGRAS*s 基因的表达水平
Fig. 4 Expression level of *RcGRAS* genes in salt treatment

3 讨论

随着高通量测序时代的到来,多种生物基因组测序的完成,数据库中存储了大量的序列信息,利用生物信息学技术手段对基因进行分析已经成为育种人挖掘基因功能的主要方式。目前,已有多物种的转录因子家族被鉴定与分析,与其他转录因子家族相比,GRAS 转录因子家族的研究进展相对较慢。

本研究从蓖麻基因组中鉴定出 48 个 GRAS 转录因子家族成员,对其理化性质、系统发育、基因结构以及保守基序进行了分析。相比于拟南芥的系统发育分析结果^[6],蓖麻 GRAS 转录因子家族有 4 个成员单独形成一个分支,我们将其命名 *RcGRAS29*

亚家族。当蓖麻 GRAS 家族与拟南芥家族成员同时进行聚类分析时,该亚家族有 GRAS28、GRAS27、GRAS39、GRAS32、GRAS29、GRAS30 共 6 个成员,当单独进行蓖麻 GRAS 转录因子家族聚类分析时,发现 GRAS27、GRAS28 与 DELLA 亚家族成员形成一个分支;我们推测这 4 个成员可能是在基因进化过程形成的假基因,对蓖麻在适应环境的进化中具有特定的作用;也可能是由于 GRAS 家族成员高度可变的 N 末端引起的序列差异使其不能和其他成员成功聚类。在水稻 GRAS 转录因子家族成员分类中也有相似的聚类结果^[21]。基因结构的差异在基因家族的进化中发挥了至关重要的作用,是物种形成的适应过程,更有利于植物适应环境的变迁。GRAS28、GRAS29 基

因结构的变异, 可以使其更加适应自然环境的不利条件。在同一亚家族间, 大多数蓖麻 GRAS 蛋白具有相似的基序, 推测同一亚家族的成员具有相似的功能; 但在不同亚家族之间也存在显著差异, 如基序 12、16、17、21、25、26 仅存在于 LISCL 亚家族, 基序 22、28 仅存在于 DELLA 亚家族。

前人研究表明, GRAS 转录因子在植物生长发育及逆境胁迫等多个生理生化途径中具有重要作用。本研究中 RT-qPCR 结果表明, 干旱与盐胁迫诱导 *RcGRAS14*、*RcGRAS21*、*RcGRAS35* 表达。在根中, 盐胁迫诱导 *RcGRAS14*、*RcGRAS35* 上调表达; 相反的, 茎中 *RcGRAS14* 在盐处理 24 h 内持续下调, 在根与叶中, 干旱与盐胁迫同时诱导 *RcGRAS14*、*RcGRAS21*、*RcGRAS35* 上调表达, 推测其介导了根与叶的特异性表达。由此可见, *RcGRASs* 参与多胁迫的复杂调控网络。本研究为进一步研究 GRAS 转录因子在非生物胁迫中的功能研究提供参考。

参考文献

- [1] Torres-Galea P, Hirtreiter B, Bolle C. Two GRAS proteins, SCARECROW-LIKE21 and PHYTOCHROME A SIGNAL TRANSDUCTION1, function cooperatively in phytochrome A signal transduction. *Plant Physiology*, 2013, 161 (1): 291-304
- [2] Heo J O, Chang K S, Kim I A, Lee M H, Lee S A, Song S K, Lee M M, Lim J. Funneling of gibberellin signaling by the GRAS transcription regulator SCARECROW-LIKE 3 in the *Arabidopsis* root. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108 (5): 2166-2171
- [3] Zhang D, Iyer L M, Aravind L. Bacterial GRAS domain proteins throw new light on gibberellic acid response mechanisms. *Bioinformatics*, 2012, 28 (19): 2407
- [4] Pysh L D, Wysocka-Diller J W, Camilleri C, Bouchez D, Benfey P N. The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *The Plant Journal*, 2010, 18 (1): 111-119
- [5] Sun X, Xue B, Jones W T, Rikkerink E, Dunker A K, Uversky V N. A functionally required unfoldome from the plant kingdom: intrinsically disordered N-terminal domains of GRAS proteins are involved in molecular recognition during plant development. *Plant Molecular Biology*, 2011, 77 (3): 205-223
- [6] Bolle C. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta*, 2004, 218 (5): 683-692
- [7] Song X M, Ying L, Xi L H. Genome-wide analysis of the GRAS gene family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *BMC Genomics*, 2014, 103 (1): 135-146
- [8] Chen J, Cheng T, Wang P, Tian L, Wang J P, Luo Y M, Wang J J, Yang L M, Shi J S. Genome-wide bioinformatics analysis of DELLA-family proteins from plants. *Plant Omics Journal*, 2013, 6 (3): 201-207
- [9] Tian C, Wan P, Sun S, Li J, Chen M. Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 2004, 54 (4): 519-532
- [10] Li X, Qiao Q, Fu Z, Wang Y, Xiong G, Zeng D, Wang X, Liu X, Teng S, Hiroshi F, Yuan M, Luok D, Han B, Li J. Control of tillering in rice. *Nature (London)*, 2003, 422 (6932): 618-621
- [11] Guang W, Xian Z, Xia K, Tang N, Li Z. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of GRAS gene family in tomato. *BMC Plant Biology*, 2015, 15 (1): 209
- [12] 殷龙飞, 王朝阳, 吴忠义, 张中保, 于荣. 玉米 *ZmGRAS31* 基因的克隆及功能研究. *作物学报*, 2019, 45 (7): 1029-1037
- [12] Yin L F, Wang Z Y, Wu Z Y, Zhang Z B, Yu R. Cloning and functional analysis of *ZmGRAS31* gene in maize. *Acta Agronomica Sinica*, 2019, 45 (7): 1029-1037
- [13] Sturman J. Shoot meristem maintenance is controlled by a GRAS-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes and Development*, 2002, 16 (17): 2213-2218
- [14] 杨丽凤, 常如慧, 李国瑞, 狄建军, 徐雅楠, 梁塔娜, 张艳欣, 李丽丽, 孙洪玲, 隋久香, 黄凤兰. 喷施草铵膦与草甘膦对蓖麻叶片生理生化的影响研究. *内蒙古民族大学学报: 自然科学版*, 2018, 33 (5): 411-416
- [14] Yang L F, Chang R H, Li G R, Di J J, Xu Y N, Liang T N, Zhang Y X, Li L L, Sun H L, Sui J X, Huang F L. Effects of spraying glyphosate and glufosinate on physiological and biochemical characteristics of castor leaves. *Journal of Inner Mongolia University for Nationalities: Natural Sciences Edition*, 2018, 33 (5): 411-416
- [15] Chan A P, Crabtree J, Zhao Q, Lorenzi H, Orvis J, Puiu D, Melake-Berhan A, Jones K M, Redman J, Chen G, Cahoon E B, Gedil M, Stanke M, Haas B J, Wortman J R, Fraser-Liggett C M, Ravel J, Rabinowicz P D. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. *Nature Biotechnology*, 2010, 28 (9): 951-956
- [16] Finn R D, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt R Y, Eddy S R, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer E L L, Tate J, Punta M. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42 (D1): D222-D230
- [17] Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 7: Recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40 (D): D302-D305
- [18] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel R D, Bairoch A. ExPASy: the proteomics server for indepth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Resarch*, 2003, 31 (13): 3784-3788
- [19] Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson T J, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson J D, Higgins D G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 2011, 7: 539
- [20] Bailey T L, Johnson J, Grant C E, Noble W S. The MEME suite. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43 (W1): W39-W49
- [21] Liu X, Widmer A. Genome-wide comparative analysis of the GRAS gene family in *Populus*, *Arabidopsis* and rice. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2014, 32 (6): 1129-1145