

• 药材与资源 •

基于全长转录组测序的掌叶大黄 *GRAS* 基因家族鉴定杜 桥^{1,2,3}, 唐 璟^{1,2,3}, 李依民^{1,2,3}, 张明英^{1,2,3}, 高 静^{1,2,3}, 彭 亮^{1,2,3}, 冯 昭^{2,3*}, 张 岗^{1,2,3*}

1. 陕西中医药大学药学院/陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, 陕西 西安 712046

2. 陕西中医药大学陕西省中医药管理局“秦药”研发重点实验室, 陕西 西安 712046

3. 陕西中医药大学省部共建特色秦药资源研究开发国家重点实验室, 陕西 咸阳 712083

摘要: 目的 基于全长转录组测序挖掘掌叶大黄 *Rheum palmatum* *GRAS* 基因 (*RpGRASs*) 家族成员, 并分析其在掌叶大黄叶、根和根茎中的表达及茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 处理下的表达模式。方法 利用生物信息学对掌叶大黄 *GRAS* 成员进行系统发育、保守结构域、蛋白理化性质和亚细胞定位分析; 基于转录组数据对 *RpGRASs* 基因的组织表达模式进行转录组测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 分析, 使用实时定量逆转录聚合酶链式反应 (real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR) 对筛选到的 3 个 *RpGRASs* 进行 MeJA 处理下的表达模式检测。结果 在掌叶大黄全长转录组数据中共鉴定得到 39 个 *RpGRASs* 成员。*RpGRASs* 蛋白主要为不稳定亲水蛋白, 定位于细胞核、叶绿体和细胞质; 各蛋白二级结构主要为无规则卷曲和 α 螺旋; 系统发育将该家族分为 PAT1、DELLA、HAM、SHR、SCR 和 SCL4/7 6 个亚族; *GRAS* 蛋白 C 端均含有典型的 LHRI、VHIID、LHRII、PFYRE 和 SAW 基序。*RpGRASs* 基因表达具有组织特异性, 在药用部位根及根茎中高表达的 *RpGRAS17*、*RpGRAS18*、*RpGRAS20* 受 MeJA 显著诱导。结论 掌叶大黄 *GRAS* 转录因子基因家族的系统鉴定及组织和 MeJA 诱导下的基因表达特征, 为深入研究 *GRAS* 基因的功能奠定基础。

关键词: 掌叶大黄; *GRAS* 转录因子; 茉莉酸甲酯; 基因家族; 表达模式

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)02-0617-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.02.023

Identification of *GRAS* gene family in *Rheum palmatum* based on full-length transcriptome sequencingDU Qiao^{1, 2, 3}, TANG Jing^{1, 2, 3}, LI Yimin^{1, 2, 3}, ZHANG Mingying^{1, 2, 3}, GAO Jing^{1, 2, 3}, PENG Liang^{1, 2, 3}, FENG Zhao^{2, 3}, ZHANG Gang^{1, 2, 3}

1. Engineering Research Center for Application and Development of Chinese Herbal Medicine in Qinling, College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

2. Key Laboratory for Research and Development of "Qin Medicine" of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

3. State Key Laboratory of Research and Development of Characteristic Qin Medicine Resources, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China

Abstract: Objective The members of *GRAS* gene family in *Rheum palmatum* were extracted based on full-length transcriptome sequencing, and their expression in leaves, roots and rhizomas and under methyl jasmonate (MeJA) treatment were analyzed. **Methods** The phylogeny, conserved domain, protein physicochemical properties and subcellular localization of *GRAS* members of *R. palmatum* were analyzed by bioinformatics. RNA sequencing (RNA-seq) analysis was performed on the tissue expression patterns of *RpGRASs* genes based on transcriptome data, and real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression patterns of the three selected *RpGRASs* genes under MeJA treatment. **Results** A total of 39 *RpGRASs* members were identified from

收稿日期: 2024-09-05

基金项目: 陕西省教育厅专项科研计划项目 (23JK0401); 咸阳市科学技术研究发展计划项目 (L2021-QCY-ZYYJJQ-X133); 陕西中医药大学学科创新团队项目 (2019-QN01)

作者简介: 杜 桥 (2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与分子生药学。E-mail: 2821428381@qq.com

*通信作者: 冯 昭, 男, 硕士, 高级实验师, 研究方向为中药资源评价与利用。E-mail: fengzhao2018@163.com

张 岗, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药资源与分子生药学。E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com

the full-length transcriptome data of *R. palmatum*. RpGRASs proteins were mainly unstable hydrophilic proteins located in the nucleus, chloroplast and cytoplasm. The secondary structure of each protein was mainly random coil and α helix. The family was divided into six subfamilies, namely PAT1, DELLA, HAM, SHR, SCR and SCL4/7. The C-terminal of GRAS protein contained typical LHRI, VHIIID, LHRII, PFYRE and SAW motifs. The expression of *RpGRASs* gene was tissue-specific, and *RpGRAS17*, *RpGRAS18* and *RpGRAS20* which were highly expressed in the roots and rhizomes of medicinal parts were significantly induced by MeJA. **Conclusion** The systematic identification and gene expression analyses of GRAS transcription factor family lay a foundation for further gene function analyses of GRASs in *R. palmatum*.

Key words: *Rheum palmatum* L.; GRAS transcription factors; methyl jasmonate; gene family; expression pattern

GRAS 是一类广泛存在于植物体内的转录因子, 该家族命名来源于最初确定的 3 个成员, 即 gibberellic acid insensitive (GAI)、repressor of GAI-3 mutant (RGA) 和 scarecrow (SCR)^[1]。GRAS 蛋白通常由 400~770 个氨基酸残基组成, C 端序列具有高度同源性, 其结构顺序为亮氨酸富集 I (LHRI)、VHIIID、亮氨酸富集 II (LHRII)、PFYRE 和 SAW 基序^[2]。LHRI 和 LHRII 都由 2 个重复单元 (A 和 B) 组成; VHIIID 可分为 3 个单元 (A、B、C); PFYRE 包含 3 个不同的部分 (P、FY 和 RE); SAW 由 4 个单元组成 (RVER、W-G、L-W 和 SAW)。其中 VHIIID 位于 LHRI 和 LHRII 两侧, 它被证明在蛋白质互作过程中发挥着至关重要的作用; N 端是 GRAS 蛋白执行特定功能的关键部分, 由于其长度和序列的高度可变性, 它可与各种靶蛋白相互作用, 并在植物信号转导过程中充当关键角色^[3]。

GRAS 在拟南芥中分为 8 个亚家族, 分别为 LISCL、PAT1、SCL3、DELLA、SCR、SHR、LAS 和 HAM^[4], 而后又新划分了 DLT 和 SCL4/7 2 个亚家族, 分别参与油菜素内脂的信号通路和环境胁迫的响应^[5-6]。自拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. 中发现第 1 个 GRAS 基因 SCR 以来^[7], GRAS 转录因子在植物生长发育、抗生物和非生物胁迫等方面的功能得到了广泛研究。如 *OsCIGR2* 通过激活 *OsHsf23* 的表达来抑制被病原菌感染的水稻 *Oryza sativa* L. 细胞的死亡^[8]。*OsGAI* 能够促进水杨酸 (salicylic acid, SA) 和茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 介导的防卫信号, 多重调控水稻的生长和先天免疫^[9]。在拟南芥中过表达胡杨 *Populus euphratica* Oliv. 的 GRAS 基因 *PeSCL7*, 可提高植物抗干旱胁迫的能力^[10]。*NtGRAS1* 在抗霉素 A 与 L-半胱氨酸诱导下能够增加烟草 *Nicotiana tabacum* L. 细胞内活性氧含量, 从而提高植株抗盐胁迫的能力^[11]。

掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 系蓼科大黄属植物, 其干燥根及根茎入药及中药大黄, 具有下瘀血、

血闭寒热、破癥瘕积聚、留饮宿食、荡涤肠胃等功效^[12]。大黄含有蒽醌类、酚类、鞣质、萜苷类、蒽酮类及有机酸等成分, 其中, 代表性组分蒽醌类具有抗炎、调脂、致泻、止血及抗肿瘤等活性^[13]。鉴于 GRAS 在植物生长发育及逆境胁迫中的重要作用, 现已在水稻 *Oryza sativa* L.^[14]、大麦 *Hordeum vulgare* L.^[15]、葡萄 *Vitis vinifera* L.^[16] 等植物中得到系统鉴定, 而在药用植物中的研究相对缓慢^[17], 因此本研究利用现有掌叶大黄全长转录组数据, 鉴定掌叶大黄 GRAS 转录因子家族成员并进行表达模式分析, 为筛选参与调控大黄生长发育及次生代谢生物合成的候选基因功能研究提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

2021 年 8 月在甘肃中医药大学和政药用植物园分别采集样品, 经陕西中医药大学胡本祥教授鉴定掌叶大黄 *R. palmatum* L. 一年生植株和成熟种子。

1.2 仪器和试剂

茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA, 上海源叶科技生物有限公司, 批号 A25D11L135642); PrimeScript™ RT Master Mix 反转录试剂盒、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme); StepOnePlus™ Real-Time PCR (qPCR) 仪 (美国 Applied Biosystems 公司)、K5800 型自动检测微量分光光度计 (凯奥公司)。

2 方法

2.1 样品的处理

在 200 g 泥炭土的黑色塑料花盆中点播大小一致的掌叶大黄种子, 每盆播 4 颗, 于 (23±2) °C, 光周期 16 h/8 h, 光照强度 9 000 lx 条件下培养。待植株生长至 1 月龄时挑选长势均匀、生命力旺盛的幼苗 3 株, 随后将根、叶等量混合, 使用液氮速冻后, 将其置于干冰中送广州基迪奥生物科技有限公司进行全长转录组测序分析。选取 3 株一年生掌叶大黄的根、根茎和叶各等量混合后进行 RNA-Seq 分析。对 1 月龄幼

苗喷施 200 $\mu\text{mol/L}$ MeJA, 以 0 h 为空白对照, 生物学重复 3 次, 分别于 3、6、12 和 24 h 处理后取样, 用液氮速冻后, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.2 *RpGRAS* 基因家族鉴定及特征分析

掌叶大黄全长转录组数据来源于课题组前期构建^[18]。通过 BlastX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 将 isoform 序列比对到蛋白数据库 Nr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、SwissProt (<http://www.expasy.ch/sprot>) 和 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>), 得到与给定 Isoform 具有最高序列相似性的蛋白, 从而得到蛋白功能注释信息。

使用 plant TFdb (<http://planttfdb.gao-lab.org/index.php>) 对预测的蛋白序列进行 hmmscan 比对, 将预测的转录因子归类后, 再通过 BlastX、ORF Finder 在线工具分析筛选具有完整开放阅读框 (open reading frame, ORF) 的全长 *GRAS* 基因。利用 ExPASy (<https://prosite.expasy.org/prosite.html>) 验证 *GRAS* 蛋白的保守结构域; 利用在线网站 WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>)、ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 和 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 分析掌叶大黄 *GRAS* 蛋白亚细胞定位、理化性质及二级结构。采用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/streme>) 以及 TBtools 进行保守基序分析。

2.3 *RpGRAS* 基因家族系统进化分析

借助 MEGA 7 对掌叶大黄、丹参和拟南芥

GRAS 蛋白进行系统进化分析, 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ), 自举值为 1 000 次。

2.4 基因表达模式分析及实时定量逆转录聚合酶链式反应 (real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR) 验证

基于 RNA-Seq 数据, 筛选出 *RpGRAS* 基因在掌叶大黄根、根茎和叶中的表达数据, 以 FPKM 值表示丰度, 运用 TBtools 绘制 *RpGRAS* 基因在不同组织中的基因表达热图, 分析其在掌叶大黄不同组织部位的表达模式。

参照 RN38-EASYspin Plus 植物 RNA 提取试剂盒说明书提取掌叶大黄各样品总 RNA, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, K5800 超微量分光光度计检测 RNA 浓度和纯度。使用反转录试剂盒合成 cDNA 第一链 (PrimeScriptTM RT Master Mix)。利用 RT-qPCR 检测 *RpGRAS* 基因响应激素相对表达量, 以 β -actin 为内参基因, *RpGRAS* 基因 RT-qPCR 引物参考 (表 1)。使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme) 进行 RT-qPCR, 20 μL 反应体系: 2 $\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL 、Forward/Reverse primer 各 0.8 μL 、cDNA 模板 2 μL 、50 $\times$ ROX Reference Dye 0.4 μL 、ddH₂O 6 μL 。反应程序: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、3 s, 退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 延伸 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 40 个循环, 反应结束后于 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s 条件下绘制熔解曲线。所有 RT-qPCR 反应技术重复和实验重复各 3 次, 应用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR

引物名称	Gene 号	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
<i>RpGRAS17</i>	Isoform0012728	GGATGCGGAAATTATCGCGG	CCATGAAAACCGGTCCGTTG
<i>RpGRAS18</i>	Isoform0012850	AGGAAAAGGCGGCATAGTTTAC	AAGGCGAGTTGGGAGAGTTT
<i>RpGRAS20</i>	Isoform0015113	CGCCTGAGTTTGATGATGCG	GGGGAATCGGAATCCTGCAA

2.5 统计学分析

应用 SPSS 26 软件对 *RpGRAS* 基因响应 MeJA 的表达量进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 代表显著差异。

3 结果与分析

3.1 *RpGRAS* 家族的鉴定和理化性质分析

掌叶大黄全长转录组 *GRAS* 家族共有 125 个 isoforms, 含完整开放阅读框 (open reading frame, ORF) 的 isoforms 有 54 个, 整理 ORF 差异位点合并重复, 最终得到 39 个全长 *GRAS* 转录因子, 重命名为 *RpGRAS1*~*RpGRAS39* (表 2), GenBank 登录

号为 PP084894~PP084932。蛋白氨基酸数目介于 244 (*RpGRAS30*)~758 (*RpGRAS1/31*) aa; 蛋白质的相对分子质量介于 26 341.64 (*RpGRAS30*)~82 263.12 (*RpGRAS31*); 蛋白质理论等电点介于 4.86 (*RpGRAS20*)~6.56 (*RpGRAS4*), 均为酸性蛋白。除 *RpGRAS27* 以外, 其余 *RpGRASs* 蛋白均属于疏水性蛋白; *RpGRAS3/15/28/33/36/39* 为稳定蛋白, 其余为不稳定蛋白。*RpGRASs* 家族蛋白二级结构主要由 α 螺旋和无规卷曲构成。亚细胞定位预测结果显示 39 个 *RpGRASs* 蛋白定位于细胞核、叶绿体和细胞质,

表 2 RpGRAS 家族理化性质及亚细胞定位信息

Table 2 Physical and chemical properties and subcellular localization of RpGRAS family

基因名	基因 ID	氨基酸数目	相对分子质量	等电点	不稳定指数	疏水性指数	脂肪族指数	占比/%				亚细胞定位
								α-螺旋	扩展链	β-转角	无规则卷曲	
RpGRAS1	Isoform0001305	758	82 257.11	5.85	54.11	-0.246	80.34	29.55	13.06	3.96	53.43	细胞核
RpGRAS2	Isoform0003917	609	65 406.75	5.36	51.19	-0.200	82.18	44.83	10.34	4.93	39.90	细胞质
RpGRAS3	Isoform0005647	565	61 760.59	5.98	39.78	-0.130	85.86	36.99	14.69	3.54	44.78	叶绿体
RpGRAS4	Isoform0005841	664	71 602.31	6.56	52.59	-0.456	71.28	40.06	10.69	5.27	43.98	细胞核
RpGRAS5	Isoform0006256	559	60 738.85	5.22	44.39	-0.153	84.83	47.94	7.69	5.72	38.64	细胞质
RpGRAS6	Isoform0007507	545	61 142.14	6.22	56.07	-0.387	76.42	43.85	12.11	4.04	40.00	细胞核
RpGRAS7	Isoform0007586	567	61 058.11	5.34	49.87	-0.123	85.52	47.44	10.23	4.06	38.27	叶绿体
RpGRAS8	Isoform0008751	581	64 301.53	5.77	57.21	-0.358	78.09	42.34	11.88	3.61	42.17	细胞核
RpGRAS9	Isoform0008833	519	58 435.25	5.55	45.71	-0.299	80.44	44.89	10.79	4.82	39.50	细胞核
RpGRAS10	Isoform0009011	560	61 304.18	5.98	40.34	-0.117	86.80	37.32	11.79	2.86	48.04	叶绿体
RpGRAS11	Isoform0009088	631	68 688.19	6.56	51.42	-0.468	73.61	42.00	9.98	5.55	42.47	细胞核
RpGRAS12	Isoform0009840	594	65 828.63	4.97	53.31	-0.258	79.36	38.72	9.93	3.20	48.15	细胞核
RpGRAS13	Isoform0009872	533	59 755.17	5.40	59.04	-0.333	79.96	42.96	9.76	4.50	42.78	细胞核
RpGRAS14	Isoform0010570	516	57 531.72	4.91	44.76	-0.388	75.76	45.16	10.47	5.43	38.95	细胞核
RpGRAS15	Isoform0011090	565	61 747.60	5.98	39.78	-0.125	85.86	36.99	14.16	2.65	46.19	叶绿体
RpGRAS16	Isoform0012286	560	60 775.91	5.22	44.55	-0.151	85.38	46.07	9.11	5.18	39.64	细胞质
RpGRAS17	Isoform0012728	552	59 803.79	5.20	44.39	-0.126	85.91	47.28	9.06	5.62	38.04	细胞质
RpGRAS18	Isoform0012850	525	58 437.70	6.23	49.20	-0.266	82.10	45.90	9.90	4.38	39.81	叶绿体
RpGRAS19	Isoform0014703	433	46 546.66	5.88	43.94	-0.081	86.74	50.58	12.01	5.77	31.64	叶绿体
RpGRAS20	Isoform0015113	518	57 367.61	4.86	49.30	-0.292	80.42	47.68	9.07	4.25	39.00	细胞核
RpGRAS21	Isoform0017216	442	49 001.14	5.75	50.81	-0.276	78.42	48.87	10.18	5.66	35.29	细胞核
RpGRAS22	Isoform0018340	508	56 652.68	4.90	43.91	-0.399	75.41	45.67	11.61	5.71	37.01	细胞核
RpGRAS23	Isoform0019663	478	53 100.08	6.13	49.64	-0.226	85.59	45.61	10.88	4.60	38.91	细胞质
RpGRAS24	Isoform0020605	477	51 785.43	5.50	47.18	-0.345	77.13	46.54	10.69	5.45	37.32	细胞质
RpGRAS25	Isoform0021026	477	53 404.38	6.42	46.68	-0.317	88.16	49.90	10.69	4.61	34.80	细胞核
RpGRAS26	Isoform0026468	428	47 436.97	5.25	40.62	-0.256	79.28	50.23	10.98	5.14	33.64	细胞质
RpGRAS27	Isoform0030732	393	43 107.50	5.87	49.65	0.089	102.8	48.85	11.70	4.33	35.11	细胞核
RpGRAS28	Isoform0032185	379	42 218.42	5.82	38.16	-0.206	82.08	53.30	10.82	6.07	29.82	叶绿体
RpGRAS29	Isoform0043512	304	33 920.72	6.36	47.15	-0.047	90.53	48.03	16.78	5.59	29.61	细胞外
RpGRAS30	Isoform0044453	244	26 341.64	5.43	41.10	-0.141	83.07	48.36	11.48	7.38	32.79	细胞质
RpGRAS31	Isoform0002135	758	82 263.12	5.85	54.16	-0.246	79.83	28.63	12.14	3.56	55.67	细胞核
RpGRAS32	Isoform0009615	559	60 784.88	5.22	44.17	-0.158	84.65	46.33	9.66	5.19	38.82	细胞核
RpGRAS33	Isoform0011519	565	61 777.62	5.98	39.92	-0.132	86.04	35.93	14.51	3.36	46.19	叶绿体
RpGRAS34	Isoform0012826	516	57 530.68	4.94	45.02	-0.389	76.32	44.96	12.02	5.04	37.98	细胞核
RpGRAS35	Isoform0014438	519	58 494.32	5.63	46.96	-0.304	80.44	45.28	11.18	4.62	38.92	细胞核
RpGRAS36	Isoform0014941	565	61 786.63	6.02	38.99	-0.132	86.04	35.93	15.22	4.07	44.78	叶绿体
RpGRAS37	Isoform0015192	518	57 395.66	4.86	49.30	-0.288	80.79	49.23	9.85	4.25	36.68	细胞核
RpGRAS38	Isoform0020766	519	58 407.19	5.47	45.82	-0.297	80.44	45.86	10.40	4.05	39.69	细胞核
RpGRAS39	Isoform0035902	379	42 247.40	5.97	36.89	-0.223	82.08	54.62	11.87	6.60	26.91	叶绿体

说明 RpGRAS 成员可在不同的微环境中发挥作用。

3.2 RpGRAS 基因进化关系分析

使用 MEGA 7 软件将前期鉴定得到的掌叶大黄、拟南芥和丹参的 GRAS 蛋白序列采用 NJ 构建系统发育树，设置使用默认参数。根据拟南芥和丹参亚家族分类方法，将 RpGRAS 蛋白聚在其中的 6 个亚家族，分别是 PAT1、DELLA、HAM、SHR、

SCR 和 SCL4/7 (图 1)，而 DLT、LAS、SCL3、LISCL 亚族中不包含鉴定到的 RpGRAS 蛋白。系统发育树显示，在 6 个 RpGRAS 家族中，PAT1 亚家族的成员最多，含有 18 个成员；其次是 DELLA 和 HAM 亚家族，各含有 8 个成员；SHR 亚家族含有 3 个成员；而 SCR 和 SCL4/7 亚家族所含基因最少，均只含有 1 个成员。

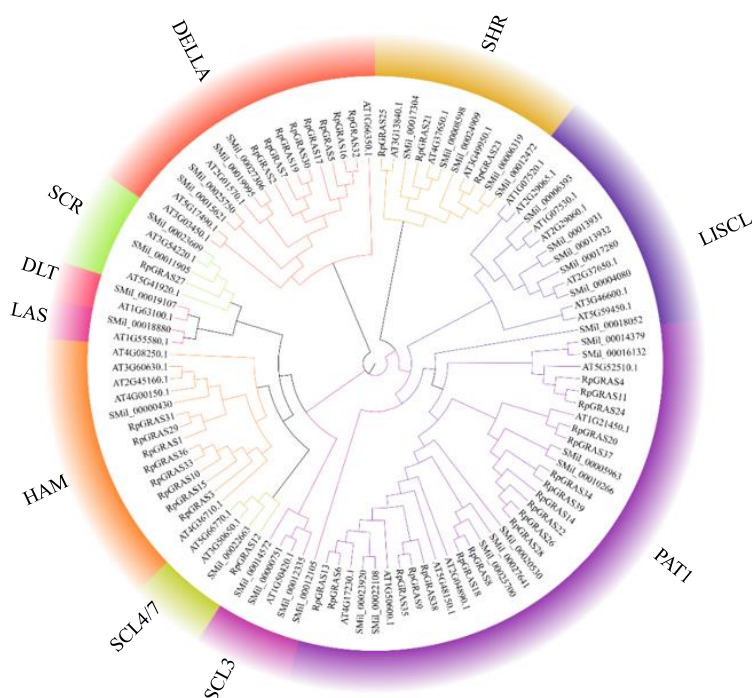


图 1 掌叶大黄、拟南芥和丹参 GRAS 家族系统发育树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis of GRAS family from *R. palmatum* (Rp), *Arabidopsis thaliana* (At) and *Salvia miltiorrhiza* (Sm)

3.3 *RpGRAS* 基因家族保守基序分析

利用在线软件 MEME 对掌叶大黄 39 个 *RpGRAS* 蛋白序列进行保守基序分析 (图 2)。结果表明,不同 *RpGRAS* 转录因子包含的保守基序数量及种类存在着差异。所有 GRAS 成员都含有 Motif 3、4。Motif 3 含有 SAW 基序且存在于 C 端末尾, Motif 1、2、4、7、8 含有 PFYRE 基序,可以看出 Motif 3、4 保守度最高,表明这些基序可能在 GRAS 家族中发挥着重要作用。Motif 1 在 HAM 和 SCR 亚族中完全丢失; Motif 1 和 Motif 6 在 HAM 亚族中完全丢失; Motif 1、2、3、4、5、6、7、9 都存在于 PAT1 亚族。其中, PAT1 亚族的 *RpGRAS29* 和 DELLA 的 *RpGRAS30* 这 2 个基因基序缺失严重。结构域分析显示, 39 个 *RpGRAS* 基因均具有 GRAS 结构域。

3.4 *RpGRAS* 基因家族不同部位表达量

将 39 个 *RpGRAS* 基因在 3 个部位的差异表达数据进行层级聚类。结果表明 (图 3), *GRAS* 基因在不同部位差异表达,大多数在根中表达水平偏高,分别有 14 和 11 个基因在根和根茎中高表达,其中 *RpGRAS5*、*RpGRAS12*、*RpGRAS16*、*17* 在根和根茎中高表达。PAT1、HAM 和 SHR 亚家族的基因在根、

根茎和叶中均有表达; DELLA 和 SCL4/7 亚家族主要在根和根茎中高表达,在叶中低表达; SCR 在叶和根中高表达,在根茎中低表达。

3.5 MeJA 处理下 *RpGRAS* 基因的相对表达量

qRT-PCR 检测 3 个 *GRAS* 基因在 MeJA 处理 3、6、12、24 h 的表达谱。如图 4 所示,以 0 h (CK) 为对照, MeJA 处理下 *RpGRAS17* 和 *RpGRAS20* 在 24 h 内表达上调,呈先上升后下降的趋势,且 *RpGRAS17* 在 6 h 达到峰值,为 CK 的 3.62 倍; *RpGRAS20* 在 12 h 达到峰值,为 CK 的 3.41 倍; *RpGRAS18* 在 6 h 后被显著抑制,并在 12 h 到达谷值为 CK 的 0.09 倍。

4 讨论

GRAS 家族是一类重要的植物特异性转录因子,该基因家族成员广泛参与植物生长发育、信号转导和非生物胁迫反应^[19]。本研究通过掌叶大黄全长转录组数据,鉴定到 39 条全长 *RpGRAS* 基因,这与拟南芥^[20]、丹参 *Salvia miltiorrhiza* L.^[21] 等植物中鉴定得到的 GRAS 家族基因数量相近。*RpGRAS* 蛋白主要为不稳定性亲水蛋白,仅 *RpGRAS3*、*RpGRAS15*、*RpGRAS28*、*RpGRAS33*、*RpGRAS36*、

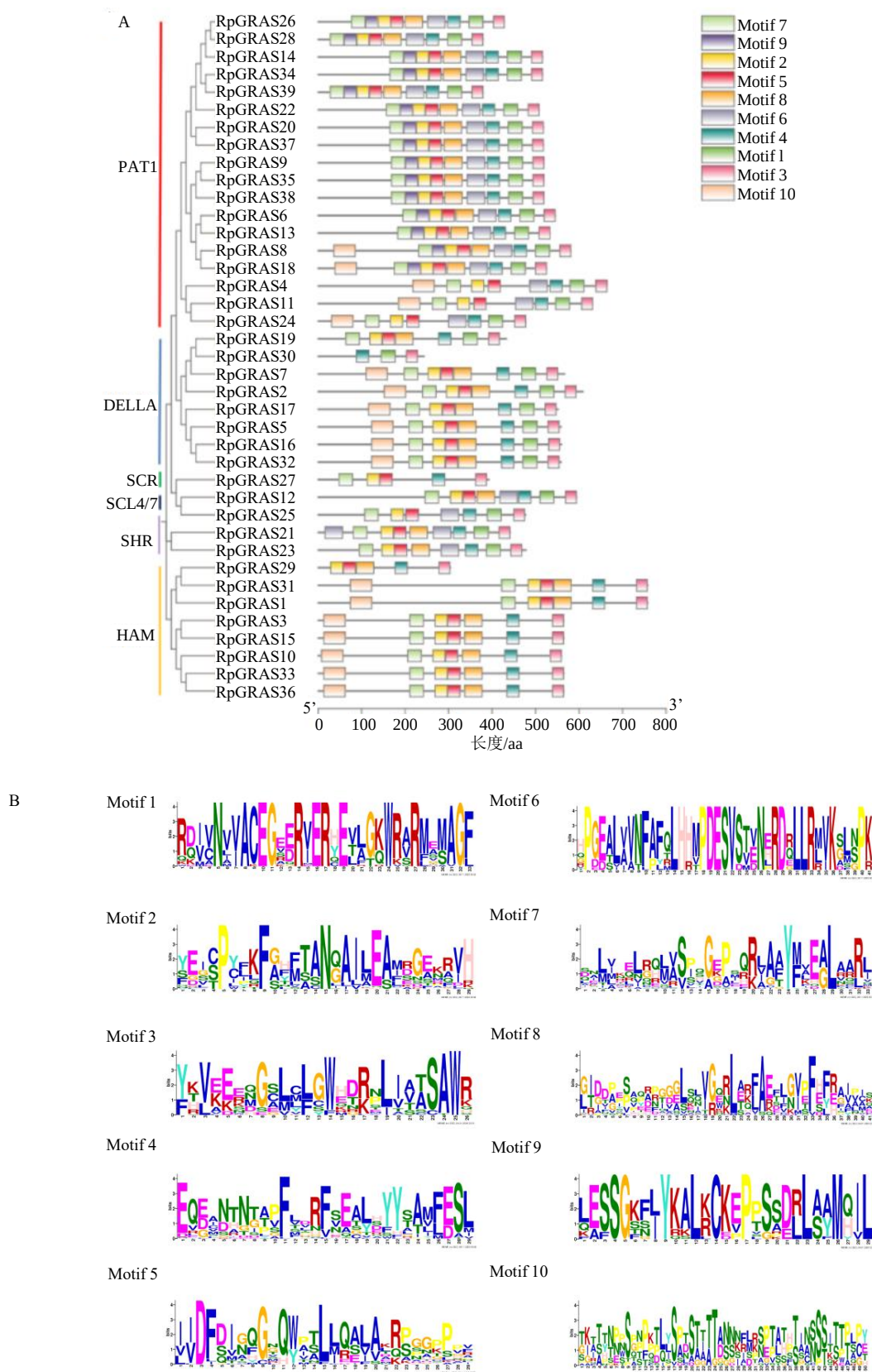


图 2 掌叶大黄 GRAS 蛋白进化树和保守基序分析 (A) 和保守基序标签 (B)

Fig. 2 GRAS protein evolutionary tree and conserved motif analysis of *R. palmatum* (A) and conserved motif (B) signatures

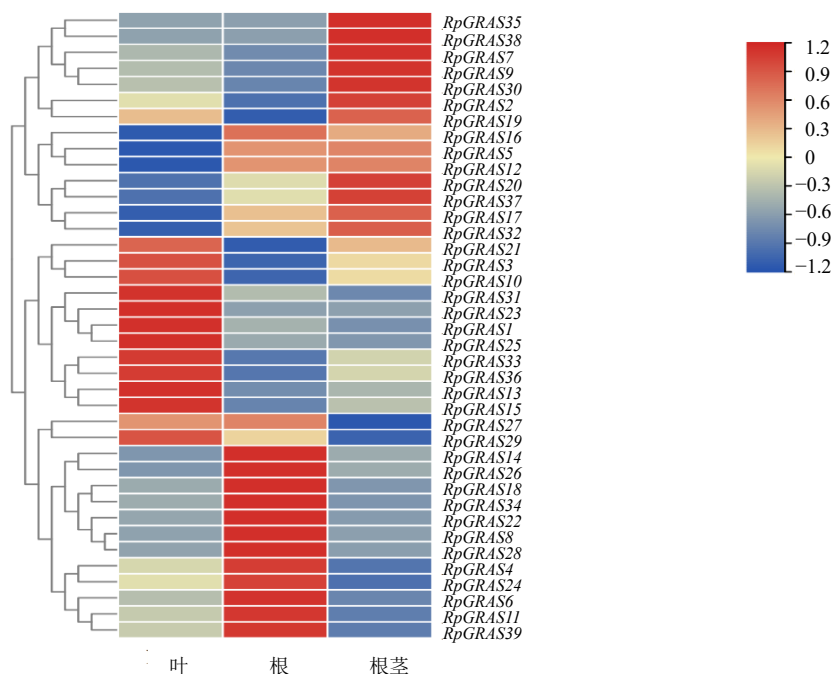
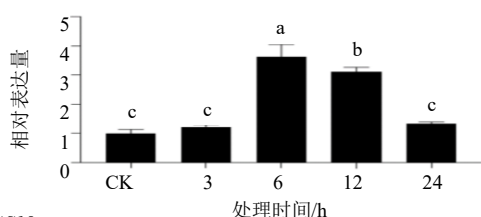


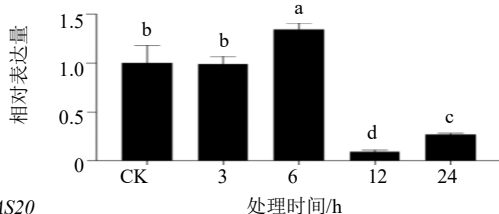
图 3 *RpGRAS* 基因在大黄 3 种器官中的表达模式

Fig. 3 Expression patterns of *RpGRAS* genes in three organs of *R. palmatum*

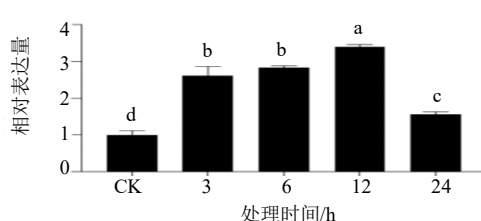
RpGRAS17



RpGRAS18



RpGRAS20



不同小写字母表示各时间点差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters above columns represent statistically significant ($P < 0.05$) across differences time points.

图 4 3 个 *GRAS* 基因在 MeJA 激素处理下的表达

Fig. 4 Expression profiles of three *GRAS* genes treated with MeJA

RpGRAS39 为稳定性亲水蛋白, 这可能是 *RpGRAS* 蛋白非保守区域氨基酸存在差异的结果。多序列比对和保守基序分析发现, 部分 *RpGRAS* 基因缺失 Motif, 在 HAM 亚族中仅 *RpGRAS29* 缺少 LHRI 结构域和 Motif 1、3、6、7、9, 在 DELLA 亚族中仅 *RpGRAS30* 缺少 LHRI、VHIID 结构域和 Motif 2、5、6、7、8、9, 因此推测 Motif 7、9 和 Motif 5、8 分别为 LHRI 和 VHIID 保守结构域的重要组成部分, 但这些保守基序的作用还需进一步的研究, 以阐明它们在掌叶大黄生长中的潜在功能。

系统进化分析显示 *RpGRAS* 蛋白分为 6 个亚族, 同一亚家族成员因其具有相似的保守结构域, 可能具有相似功能。SHR 和 SCR 是拟南芥根尖分生活性和根辐射形态的重要转录因子^[22], *RpGRAS27* 与 SCR 同源, 均为 SCR 亚族且在根中高表达, 暗示 *RpGRAS27* 可能在掌叶大黄根部发育中发挥着重要作用; *RpGRAS2*、*RpGRAS5*、*RpGRAS7*、*RpGRAS16*、*RpGRAS17*、*RpGRAS19*、*RpGRAS30*、*RpGRAS32* 被归类为 DELLA 亚族, 在根茎中均为高表达, 在拟南芥中大部分 DELLA 亚族的基因已被证实是赤霉素 (gibberellins acid, GA) 信号通路的抑制因子, 其保守的 DELLA 结构域是 GA 信号感知所必需的^[23], 因此, 推测这些 *RpGRAS* 基因在 GA 信号通路中发挥作用。PAT1 亚族广泛参

与植物抗逆境胁迫,如葡萄 *VaPAT1* 基因在拟南芥中过表达可提高植物抗逆性^[24];棉花 *Gossypium hirsutum* L. 中部分 PAT1 亚家族的基因响应盐胁迫、干旱胁迫和高低温胁迫^[25],预测掌叶大黄 PAT1 亚族基因可能参与非生物胁迫。在拟南芥 HAM 亚族中 *HAM*、*HAM2* 和 *HAM3* 以及 *HAM4* 参与维持植物分生组织的自我更新能力^[26],推测与拟南芥 HAM 亚族聚类的 *RpGRAS1*、*RpGRAS3*、*RpGRAS10*、*RpGRAS15*、*RpGRAS29*、*RpGRAS31*、*RpGRAS33*、*RpGRAS36* 可能在掌叶大黄中也有相似的功能。

GRAS 基因在植物生长发育及生物合成中的作用可以通过它们在激素信号通路中的作用表现出来,而 MeJA 等植物激素在增强植物对生物和非生物胁迫的防御反应中也扮演关键角色^[27]。如御谷 *Pennisetum americanum* *PgGRAS46* 在干旱胁迫下经 MeJA 处理后表达上调^[28]; *GhSCL13-2A* 通过介导 JA 等信号通路和活性氧的积累,正向调节棉花对棉花黄萎病菌的抗性^[29]; *VaPAT1* 可通过调节 JA 生物合成从而在葡萄抗寒应激反应中起关键作用^[30]。在拟南芥中,增强 JA 信号可促进与 JA 负调控因子(jasmonate ZIM-domain, JAZ)蛋白结合的 DELLA 蛋白游离,从而调控下游 PIF3 转录因子,抑制下胚轴伸长^[31]。DELLA 蛋白 *RpGRAS17*、PAT1 蛋白 *RpGRAS18* 和 *RpGRAS20* 在 MeJA 处理下基因表达显著上调, *RpGRAS17*、*RpGRAS18* 在 6 h 时到达峰值, *RpGRAS20* 在 12 h 时到达峰值。推测这些基因可能参与 JA 信号转导,从而在掌叶大黄生长发育及抗逆反应中起到调控作用。此外,在拟南芥中,DELLA 被证明促进花青素的积累^[32],还参与黄酮醇生物合成调控^[33]。因此,响应 MeJA 的 *RpGRASs* 基因可能在掌叶大黄生长发育、抗逆及次生代谢物生物合成中发挥功能,其分子功能有待于进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Peng J, Carol P, Richards D E, *et al.* The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses [J]. *Genes Dev*, 1997, 11(23): 3194-3205.
- [2] Pysh L D, Wysocka-Diller J W, Camilleri C, *et al.* The *GRAS* gene family in *Arabidopsis*: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes [J]. *Plant J*, 1999, 18(1): 111-119.
- [3] Sun X L, Jones W T, Rikkerink E H A. GRAS proteins: The versatile roles of intrinsically disordered proteins in plant signalling [J]. *Biochem J*, 2012, 442(1): 1-12.
- [4] Bolle C. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development [J]. *Planta*, 2004, 218(5): 683-692.
- [5] Sun X L, Xue B, Jones W T, *et al.* A functionally required unfoldome from the plant Kingdom: Intrinsically disordered *N*-terminal domains of GRAS proteins are involved in molecular recognition during plant development [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 77(3): 205-223.
- [6] Hakoshima T. Structural basis of the specific interactions of GRAS family proteins [J]. *FEBS Lett*, 2018, 592(4): 489-501.
- [7] Benfey P N, Linstead P J, Roberts K, *et al.* Root development in *Arabidopsis*: Four mutants with dramatically altered root morphogenesis [J]. *Development*, 1993, 119(1): 57-70.
- [8] Tanabe S, Onodera H, Hara N, *et al.* The elicitor-responsive gene for a GRAS family protein, CIGR2, suppresses cell death in rice inoculated with rice blast fungus via activation of a heat shock transcription factor, OsHsf23 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2016, 80(1): 145-151.
- [9] Li L L, Zhang H H, Yang Z H, *et al.* Independently evolved viral effectors convergently suppress DELLA protein SLR1-mediated broad-spectrum antiviral immunity in rice [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6920.
- [10] Ma H S, Liang D, Shuai P, *et al.* The salt- and drought-inducible poplar GRAS protein SCL7 confers salt and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(14): 4011-4019.
- [11] Czikkell B E, Maxwell D P. NtGRAS1, a novel stress-induced member of the GRAS family in tobacco, localizes to the nucleus [J]. *J Plant Physiol*, 2007, 164(9): 1220-1230.
- [12] 赵霞, 李元敏, 李依民, 等. 基于全长转录组测序的掌叶大黄 *RI-MYB* 基因家族鉴定分析 [J]. *药学学报*, 2023, 58(5): 1354-1363.
- [13] Zhang L, Liu H Y, Qin L L, *et al.* Global chemical profiling based quality evaluation approach of rhubarb using ultra performance liquid chromatography with tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(3): 511-522.
- [14] Dutta M, Saha A, Moin M, *et al.* Genome-wide identification, transcript profiling and bioinformatic analyses of GRAS transcription factor genes in rice [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 777285.

- [15] 孔豆豆, 毛成志, 王蕾, 等. 大麦基因组 GRAS 基因家族的全基因组鉴定与表达分析 [J]. 分子植物育种, 2021, 19(1): 22-33.
- [16] 孙欣, 王晨, 房经贵, 等. 葡萄 GRAS 基因家族生物信息学分析 [J]. 江西农业学报, 2011, 23(7): 1-8.
- [17] 刘云辉, 李坤, 王洋, 等. 药用植物中 GRAS 转录因子的功能研究进展 [J]. 浙江农林大学学报, 2019, 36(6): 1233-1240.
- [18] 王雪茹, 杜鹃, 李依民, 等. 掌叶大黄全长转录组测序分析 [J/OL]. 分子植物育种, [2024-01-29] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220704.1326.005.html>.
- [19] Niu Y L, Zhao T T, Xu X Y, *et al.* Genome-wide identification and characterization of GRAS transcription factors in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. *PeerJ*, 2017, 5: e3955.
- [20] Lee M H, Kim B, Song S K, *et al.* Large-scale analysis of the GRAS gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 67(6): 659-670.
- [21] Li W R, Liu C F, Liu J L, *et al.* Transcriptomic analysis reveals the GRAS family genes respond to gibberellin in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 727.
- [22] Cui H C, Levesque M P, Vernoux T, *et al.* An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants [J]. *Science*, 2007, 316(5823): 421-425.
- [23] Zhang Z L, Ogawa M, Fleet C M, *et al.* Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(5): 2160-2165.
- [24] Yuan Y Y, Fang L C, Karungo S K, *et al.* Overexpression of VaPAT1, a GRAS transcription factor from *Vitis amurens*, confers abiotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(3): 655-666.
- [25] Zhang B, Liu J, Yang Z E, *et al.* Genome-wide analysis of GRAS transcription factor gene family in *Gossypium hirsutum* L [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 348.
- [26] Engstrom E M, Andersen C M, Gumulak-Smith J, *et al.* *Arabidopsis* homologs of the petunia hairy meristem gene are required for maintenance of shoot and root indeterminacy [J]. *Plant Physiol*, 2011, 155(2): 735-750.
- [27] 何雅丽, 陈振江, 魏学凯, 等. 喷施茉莉酮酸甲酯及感染内生真菌促进醉马草抗虫性的生理作用研究 [J]. 草业学报, 2020, 29(3): 121-129.
- [28] Jha D K, Chanwala J, Sandeep I S, *et al.* Comprehensive identification and expression analysis of GRAS gene family under abiotic stress and phytohormone treatments in Pearl millet [J]. *Funct Plant Biol*, 2021, 48(10): 1039-1052.
- [29] Chen C, Lu L L, Ma S Y, *et al.* Analysis of PAT1 subfamily members in the GRAS family of upland cotton and functional characterization of GhSCL13-2A in *Verticillium dahliae* resistance [J]. *Plant Cell Rep*, 2023, 42(3): 487-504.
- [30] Wang Z M, Wong D C J, Wang Y, *et al.* GRAS-domain transcription factor PAT1 regulates jasmonic acid biosynthesis in grape cold stress response [J]. *Plant Physiol*, 2021, 186(3): 1660-1678.
- [31] Yang D L, Yao J, Mei C S, *et al.* Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(19): E1192-E1200.
- [32] Bassel G W, Mullen R T, Bewley J D. ProcerA is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): Effects on the seed and vegetative plant [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(3): 585-593.
- [33] Tan H J, Man C, Xie Y, *et al.* A crucial role of GA-regulated flavonol biosynthesis in root growth of *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 2019, 12(4): 521-537.

[责任编辑 时圣明]