

doi: 10.11733/j.issn.1007-0435.2026.09.004

引用格式: 曹磊, 杨忠富, 冯光燕, 等. 象草GRAS基因家族鉴定及表达分析[J]. 草地学报, 2026, 34(9): 3172–3184

CAO Lei, YANG Zhong-fu, FENG Guang-yan, et al. Identification and Expression Analysis of GRAS Gene Family in *Pennisetum purpureum*[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(9): 3172–3184

象草 GRAS 基因家族鉴定及表达分析

曹磊¹, 杨忠富², 冯光燕¹, 张新全^{1*}

(1. 四川农业大学草业科技学院, 四川 成都 611130; 2. 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: GRAS家族是植物体内普遍存在的一类特异性转录调控因子, 在调控植物生长发育、应对生物与非生物逆境胁迫等过程中发挥重要作用。探究象草GRAS基因家族基因的特征及功能, 解析其在低温胁迫下的调控作用具有重要意义。本研究以象草基因组数据为基础, 对GRAS家族成员进行鉴定, 并分析染色体位置、理化特性、基因结构特征、系统进化关系等, 以及低温胁迫条件下不同抗寒性象草材料的表达模式。结果表明, 在象草基因组中鉴定到18个GRAS基因, 分布在10条染色体上, 系统进化分析将其分为5个亚家族。顺式作用元件分析表明有10个*PpGRAS*成员的启动子区域含有低温应答相关调控元件。共线性分析表明象草与高粱(*Sorghum bicolor*)的同源基因数量显著多于水稻(*Oryza sativa*)。表达模式分析发现GRAS基因家族中多个成员, 特别是亚家族LISCL, 如基因*PpGRAS7*、*PpGRAS10*等的表达模式与材料的抗寒能力呈显著正相关。研究结果为深入探讨象草GRAS家族及其低温胁迫响应提供了有价值的信息。

关键词: 象草; GRAS基因家族; 低温胁迫

中图分类号: S813.9

文献标识码: A

文章编号: 1007-0435(2026)09-3172-13

Identification and Expression Analysis of GRAS Gene Family in *Pennisetum purpureum*

CAO Lei¹, YANG Zhong-fu², FENG Guang-yan¹, ZHANG Xin-quan^{1*}

(1. College of Grassland Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan Province 611130, China; 2. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang, Guizhou Province 550025, China)

Abstract: The GRAS family is a class of specific transcriptional regulatory factors widely present in plants, which play vital roles in regulating plant growth and development, as well as responses to biotic and abiotic stress. It is of great significance to explore the characteristics and functions of GRAS gene family in elephant grass (*Pennisetum purpureum*) and clarify their regulatory roles under low-temperature stress. Based on the genomic data of elephant grass, in this study we identified members of the GRAS gene family, and analyzed their chromosomal localization, physicochemical properties, gene structural characteristics, phylogenetic relationships, as well as the expression patterns of elephant grass materials with different cold resistance under low-temperature stress. The results showed that a total of 18 GRAS genes were identified in the elephant grass genome, which were distributed on 10 chromosomes and classified into five subfamilies via phylogenetic analysis. Cis-acting element analysis revealed that the promoter regions of 10 *PpGRAS* members contained regulatory elements related to low-temperature response. Collinearity analysis indicated that elephant grass shared more homologous genes with *Sorghum bicolor* than that with *Oryza sativa*. Expression pattern analysis demonstrated that the expression levels of multiple GRAS family members, especially genes such as *PpGRAS7* and *PpGRAS10* belonging to the LISCL subfamily, were significantly positively correlated with cold resistance capacity of materials. This study provides valuable references for further exploring the functions of elephant grass GRAS family and their response mechanisms to Low-temperature stress.

收稿日期: 2026-02-23; 修回日期: 2026-04-19

作者简介: 曹磊(1999-), 男, 汉族, 山西晋中人, 硕士研究生, 主要从事草种质资源创新与利用方向研究, E-mail: 209361903@qq.com;

*通信作者 Author for correspondence, E-mail: zhangxq@sicau.edu.cn

Key words: *Pennisetum purpureum*; GRAS gene family; low-temperature stress

象草(*Pennisetum purpureum* Schumach.)属于禾本科狼尾草属多年生C4草本植物,原产于非洲,现广泛栽培于热带和亚热带地区^[1-3]。象草生长迅速,株型高大,年干物质产量可达20~40 t·hm⁻²。象草因其粗蛋白含量高,较强的对干旱和高温的耐受性和再生能力,被公认为高产优质牧草^[4-6]。随着全球肉制品需求的不断增长及草食动物产品消费升级,提升象草产量与环境适应性已成为应对气候变化和生态农业挑战的研究焦点^[7]。然而,象草喜温暖湿润气候,耐寒性较差,栽培范围仅限于温暖气候区域^[8]。研究表明,象草在气温12℃~14℃时开始生长,23℃~35℃时生长迅速,5℃~10℃生长受抑,5℃以下时停止生长,持续低温冻害会造成严重损伤^[9-11]。因此,培育抗寒象草新品种是目前生产中急需解决的问题。

GRAS转录因子家族命名源于3个最早被研究的家族成员GAI(gibberellic acid insensitive)、RGA(repressor of *gal-3* mutant)和SCR(scarecrow)的特征字母^[12],是广泛存在于植物中的一类转录因子。GRAS基因家族成员C端的保守结构域分为5个多肽基序^[13],这一结构域对蛋白互作具有重要作用,而N端区域的可变性较强,包含无序蛋白^[14],主要参与植物发育过程中蛋白的特异性调节和分子识别^[15-16]。早期根据拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中GRAS蛋白的结构域,分为8个亚家族:SCR、DELLA(DELLA domain-containing protein)、Ls(Lateral suppressor)、SHR(Short root)、HAM(Hairless meristem)、SCL3(Scarecrow-like 3)、PAT1(Phytochrome A signal transduction 1)和LISCL(Lobe-inducing and SCL-like protein)^[17]。GRAS家族成员在多种植物中均发现参与低温胁迫,大豆(*Glycine max*)的PAT1亚家族则参与干旱、盐胁迫响应^[18]。过表达*SiGRAS40*能够提高番茄对干旱和盐胁迫的耐受性^[19],玉米*ZmGRAS20*过表达能够引起淀粉含量下降^[20]。独行菜(*Lepidium apetalum* Willd.)幼苗在低温胁迫处理后*LaSCL18*基因表达量迅速显著升高,初步推测*LaSCL18*基因表达与独行菜幼苗耐受低温有关^[21]。拟南芥中*CBF1*介导的低温诱导信号通路可通过调控赤霉素代谢影响DELLA蛋白积累,且DELLA蛋白能以非CBF诱导依赖的方式,显著增强CBF1介导的植株低温适应性与抗寒能力^[22]。有研究通过分析低温胁迫

下茄子*SmGRASs*的相对表达量,发现10个*SmGRASs*与正常条件相比表达差异显著,其中隶属于PAT1亚家族的*SmGRAS32*、*SmGRAS44*对低温胁迫有积极响应,表明该亚家族成员可积极响应低温胁迫^[23],Yuan等过表达山葡萄GRAS转录因子*VaPAT1*,证实PAT1亚家族基因能增强植物低温抗性^[24]。综上,GRAS基因参与到多种植物的生长发育和逆境信号应答过程中。目前,GRAS基因家族已分别在水稻^[25]、拟南芥^[26]、大豆(*Glycine max*)^[27]、大麦(*Hordeum vulgare*)^[28]、玉米(*Zea mays* L.)^[29]、鸭茅(*Dactylis glomerata* L.)^[30]、燕麦(*Avena sativa* L.)^[31]等植物中被鉴定出来。

低温胁迫是影响象草品质和产量的重要因素,解析不同抗寒性象草品种适应低温胁迫的差异可为抗寒象草新品种的培育奠定理论基础。本研究利用象草基因组数据库,以象草GRAS基因家族为研究对象,运用生物信息学方法,开展基因家族成员鉴定、染色体定位、保守基序分析、系统进化分析、共线性等相关研究,同时检测两种抗寒性差异明显的象草材料在低温胁迫条件下的基因表达水平,旨在为象草抗寒性分子育种提供理论支撑与技术保障。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验供试材料为象草耐低温材料‘桂牧一号’(GM1)与低温敏感材料‘热研4号’(RY4)。选取新鲜种茎先置于光照培养箱中水培15天,培养条件设置为12 h光照/12 h黑暗,昼夜温度分别为25℃/21℃,水培15天后,将材料转移至低温培养箱进行昼夜全低温4℃胁迫处理。于胁迫后0 d、3 d、5 d、7 d四个时间点采集根系样品,每个时间点设置3个生物学重复,取样后迅速保存于-80℃超低温冰箱,备用后续试验。

1.2 试验方法

1.2.1 象草GRAS基因家族成员鉴定 从象草数据库figshare(https://figshare.com/articles/dataset/elephant_grass_genome_fasta/15058173)下载象草基因组和蛋白序列文件,同时从TAIR数据库获取拟南芥GRAS基因的蛋白序列,从Ensembl Plants数

数据库下载水稻 GRAS 家族蛋白序列,将两者作为查询序列,利用 TBtools 软件中的 Blast Compare Two Seqs 工具对象草蛋白序列进行同源性筛选,设置比对阈值为 $1e-5$,对两者结果取交集。将候选基因序列提交至 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)平台进行结构域验证,仅保留含有典型 GRAS 结构域的序列作为后续分析的核心成员。采用 ExPASy 在线网站(<http://web.expasy.org/protparam/>),对象草 GRAS 基因家族成员的理化性质进行系统性分析。

1.2.2 染色体定位及系统发育树构建 基于象草基因组注释信息,借助 TBtools 软件分析 GRAS 基因家族成员的染色体分布特征并完成可视化。在 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载拟南芥的基因组文件,利用 MEGA11.0 软件,针对拟南芥及象草的蛋白序列进行多序列比对,采用邻接法(neighbor-joining, NJ)进行系统进化分析,设置 Bootstrap 值为 1000,再通过 iTOL 在线工具(<http://itol.embl.de>)对进化树进行进一步标准化。

1.2.3 保守结构域、基因结构及启动子的顺式作用元件预测 使用 TBtools 软件对候选基因结构及保守基序组成进行系统性分析,判断基因的内含子和外显子的具体分布情况信息。同时,利用 TBtools 从象草 GRAS 基因组 DNA 序列转录起始密码子上游 2000 bp 获得启动子序列,将所得序列提交至 PlantCARE 网站对启动子区域的顺式作用元件进行分析。

1.2.4 象草 GRAS 基因家族低温胁迫下表达模式分析 运用植物总 RNA 提取试剂盒完成 RNA 提取,借助 Nano Drop 2000 微量分光光度计以及 1% 琼脂糖凝胶电泳技术检测 RNA 的纯度与完整性,经过质量验证达到合格标准的 RNA 样本,紧接着使用反转录试剂盒进行逆转录反应,得到 cDNA 产物,最终把合成的 cDNA 产物用双蒸水进行 10 倍的稀释,并且在 -20°C 的条件下进行冷冻保存,以便为后续实验提供使用。利用 Premier5(<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/>)软件平台来开展荧光定量 PCR 引物设计工作,借助本地 BLAST 数据库对引物特异性加以验证,以此保证扩增产物的长度可被控制在 80 bp 到 300 bp 的范围之内。

此次研究选用经由反转录合成得到的 cDNA 当作扩增的模板,借助 Bio-RAD CFX Connet 实时荧光定量 PCR 系统来展开 RT-qPCR 检测,在整个实验进程里,每一个样本都设置了三个技术重复,

以此来保证数据的可靠性。总反应体系为 $10\ \mu\text{L}$,包含 $1\ \mu\text{L}$ cDNA, $0.5\ \mu\text{L}$ 上游引物, $0.5\ \mu\text{L}$ 下游引物, $5\ \mu\text{L}$ SYBR 酶, ddH₂O 补至 $10\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为 95°C , 30 s; 95°C , 10 s; 60°C , 30 s, 40 个循环。溶解曲线采用默认。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法评估基因相对表达水平的倍数差异,基因上调或下调 1.5 倍以上被认为是表达差异显著($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 象草 GRAS 基因家族成员的鉴定及染色体定位分析

首先在基因组数据库中检索并下载象草 GRAS 基因的保守结构域隐马尔可夫模型(PF03514),使用 TBtools 软件中的 Simple HMM Search 程序,利用该模型在象草全基因组序列中进行同源比对,初步筛选获得 21 个 *PpGRAS* 候选基因。随后通过 SMART 和 Pfam 两个在线分析工具对候选基因进行结构域验证,手动剔除 3 个不含有完整 GRAS 结构域的序列,最终确定 18 个象草 GRAS 基因家族成员。依据这些基因在染色体上的分布位置顺序,将其依次命名为 *PpGRAS1*~*PpGRAS18*。

染色体定位结果显示,*PpGRAS* 基因家族 18 个成员分布于 10 条染色体上,其中, A1 号染色体上数目最多,有 5 个 *PpGRAS* 基因家族成员(图 1)。其次是 A7 号和 B6 号染色体,分别有 4 个和 3 个 *PpGRAS* 基因。A6 号染色体上有 2 个 *PpGRAS* 基因,其余染色体都只有 1 个 *PpGRAS* 基因。这些结果表明,象草 *PpGRAS* 基因家族成员在染色体上呈不均匀分布,且在染色体两端分布的数量较多。

2.2 象草 GRAS 基因家族的理化性质分析

对 *PpGRAS* 基因的分子质量、等电点及亚细胞定位预测进行了分析(表 2)。结果显示,象草 GRAS 基因家族成员所编码的氨基酸数量在 531~1200 个之间,分子质量在 58 337.7~133 516 kDa 之间。PI 分布于 4.85~10.07 之间。其中,有 13 个蛋白呈酸性,8 个蛋白呈碱性,平均 PI 为 6.97,数值小于 7,表明 *PpGRAS* 蛋白偏酸性。亚细胞定位预测显示属于 PAT1 亚家族的 *PpGRAS12*、*PpGRAS17*,属于 SCL3 亚家族的 *PpGRAS1*,以及属于 LISCL 亚家族的 *PpGRAS4*、*PpGRAS16* 位于叶绿体;属于

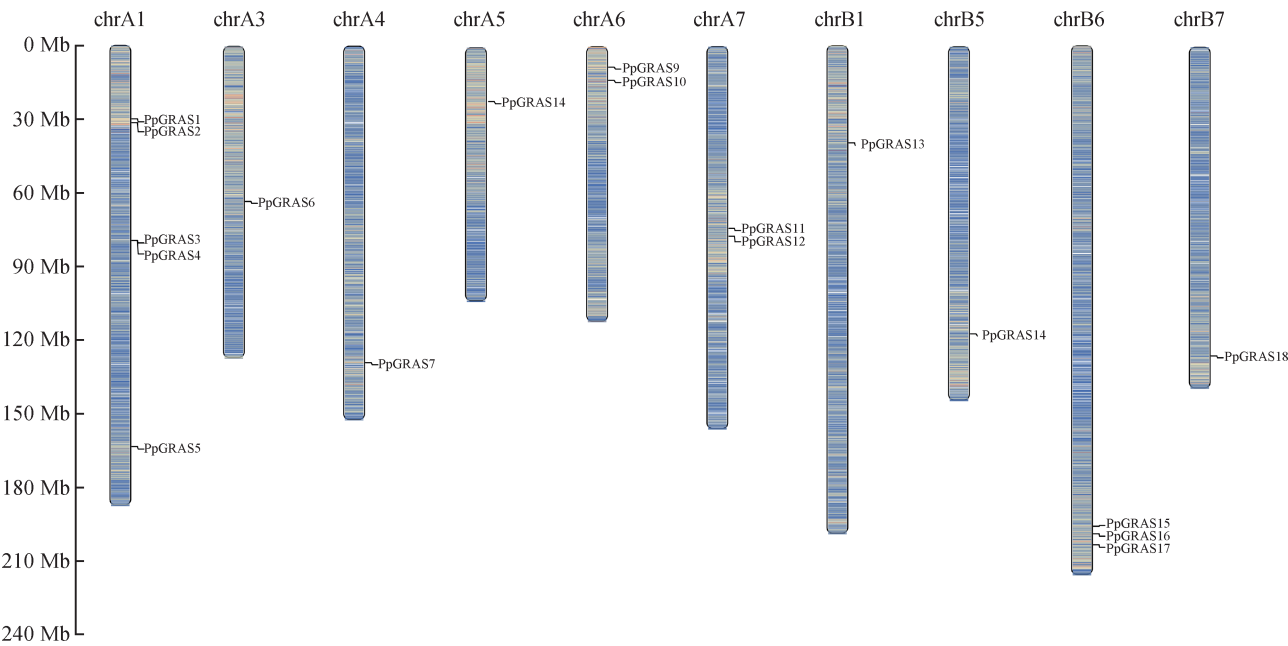


图 1 象草 GRAS 基因家族染色体定位

Fig. 1 Chromosomal localization of the GRAS gene family in *Pennisetum purpureum*

PAT1 亚家族的 PpGRAS9, PpGRAS13, PpGRAS5, PpGRAS8, PpGRAS15, 属于 SCR 亚家族的 PpGRAS2, 属于 LISCL 亚家族的 PpGRAS3, PpGRAS6, PpGRAS10, PpGRAS11, PpGRAS14 位于细胞核内, 属于 SHR 亚家族的 PpGRAS18 位于

细胞质中, 属于 LISCL 亚家族的 PpGRAS7 位于内膜。其他物种比如巴西橡胶树的 GRAS 蛋白大部分位于细胞核和叶绿体^[32]; 不结球白菜的 GRAS 成员大多数位于细胞核, 只有一个基因位于叶绿体^[33]。

表 2 象草 GRAS 基因家族理化性质分析

Table 2 Physicochemical property analysis of the GRAS gene family in *Pennisetum purpureum*

亚家族分类 Groups	基因名称 Gene name	基因号 Gene ID	CDS 长度 CDS length/ bp	氨基酸长度 Protein length/ aa	染色体位置 Chromosome No.	分子量 MW/Da	等电点 PI	亚细胞定位 Predicted subcellular localization
SCL3	<i>PpGRAS1</i>	PenpuA10016626.g	1704	567	ChrA1	63 773.2	9.25	叶绿体 Chloroplast
SCR	<i>PpGRAS2</i>	PenpuA10016762.g	2232	743	ChrA1	78 939.7	10.07	细胞核 Cell nucleus
LISCL	<i>PpGRAS3</i>	PenpuA10018237.g	1857	619	ChrA1	67 357.6	5.22	细胞核 Cell nucleus
LISCL	<i>PpGRAS4</i>	PenpuA10018238.g	1596	531	ChrA1	58 337.7	5.20	叶绿体 Chloroplast
PAT1	<i>PpGRAS5</i>	PenpuA10020765.g	1674	557	ChrA1	62 138.7	4.85	细胞核 Cell nucleus
LISCL	<i>PpGRAS6</i>	PenpuA30056648.g	3564	1188	ChrA3	133 516	7.30	细胞核 Cell nucleus
LISCL	<i>PpGRAS7</i>	PenpuA40026263.g	1605	534	ChrA4	60 173.4	9.19	内膜 Endomembrane system
PAT1	<i>PpGRAS8</i>	PenpuA50059949.g	1605	534	ChrA5	59 268.6	5.95	细胞核 Cell nucleus
PAT1	<i>PpGRAS9</i>	PenpuA60065444.g	2397	798	ChrA6	88 798.9	5.71	细胞核 Cell nucleus
LISCL	<i>PpGRAS10</i>	PenpuA60065741.g	3603	1200	ChrA6	131 066.1	8.75	细胞核 Cell nucleus
LISCL	<i>PpGRAS11</i>	PenpuA70034922.g	2286	761	ChrA7	84 759.0	5.40	细胞核 Cell nucleus
PAT1	<i>PpGRAS12</i>	PenpuA70035079.g	1947	648	ChrA7	73 230.8	8.55	叶绿体 Chloroplast
PAT1	<i>PpGRAS13</i>	PenpuB10009749.g	1686	561	ChrB1	62 584.2	4.86	细胞核 Cell nucleus
LISCL	<i>PpGRAS14</i>	PenpuB50030781.g	2205	734	ChrB5	82 617.3	6.29	细胞核 Cell nucleus
PAT1	<i>PpGRAS15</i>	PenpuB60006528.g	1782	593	ChrB6	66 051.4	8.84	细胞核 Cell nucleus
LISCL	<i>PpGRAS16</i>	PenpuB60006698.g	2745	914	ChrB6	100 316.6	8.82	叶绿体 Chloroplast
PAT1	<i>PpGRAS17</i>	PenpuB60006966.g	1695	564	ChrB6	62 706.6	4.93	叶绿体 Chloroplast
SHR	<i>PpGRAS18</i>	PenpuB70041916.g	1779	592	ChrB7	63 674.5	6.20	细胞质 Extracellular space

2.3 象草 GRAS 家族的保守基序和基因结构分析

利用 Meme 鉴定了象草中 18 个 GRAS 蛋白的保

守基序(图 2A), 共预测了 10 个潜在的保守基序, 分别命名为基序 Motif1-10。发现 Motif1 和 Motif3 存在于

除 PpGRAS6 以外的 17 个 PpGRAS 蛋白中,说明这 3 个保守基序可能在 PpGRAS 蛋白的结构域中起到核心功能。其次只有 PpGRAS1、PpGRAS6 不包含 Motif4。表明他们在 GRAS 家族中可能相对保守。发现 Motif10 只存在于 PAT1 亚家族的 N 末端。GRAS 蛋白质的结构域分析结果显示(图 2B),存在 4 种类型的保守结构域,PAT1 和 LISCL 亚家族都含有 GRAS 结构域或 GRAS 超家族结构域。此外,LISCL

中的 PpGRAS10 有 GRAS 结构域也有 PHA03247 超家族结构域,PpGRAS6 蛋白有 GRAS 超家族结构域也有 LRR 结构域。基因结构分析显示(图 2C),18 个 PpGRAS 基因含有 1-7 个外显子,PpGRAS8 和 PpGRAS14 有 1 个外显子,22% 的 PpGRAS 基因含有 3 个外显子,33% 的 PpGRAS 基因含有 4 个外显子,PpGRAS9 有 7 个外显子。此外,有 1 个 GRAS 基因没有任何内含子,7 个基因有三个内含子。

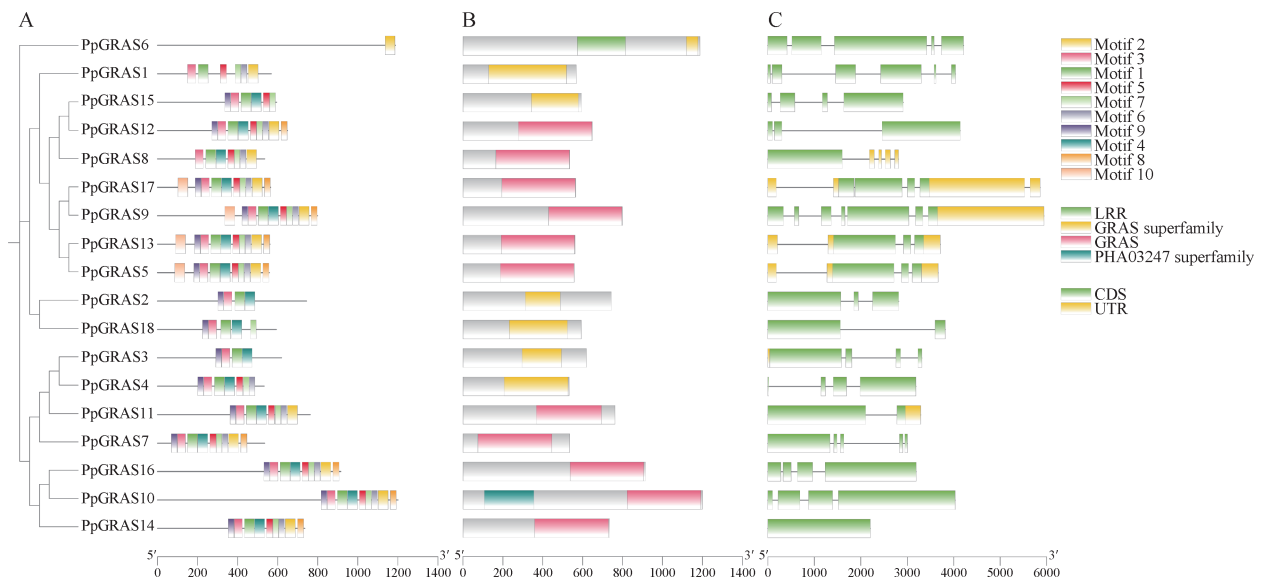


图 2 保守基序和基因结构分析

Fig. 2 Conserved motif and gene structure analysis of the GRAS gene family in *Pennisetum purpureum*

注:(A)PpGRAS 蛋白的保守基序分析。不同颜色方块代表 10 个保守基序。(B)保守结构域分析。不同颜色方框表示不同的保守结构域。(C)基因结构分析。方块代表外显子,黑色线条代表内含子

Note: (A) Conserved motif analysis of PpGRAS proteins. Different colored squares represent the 10 conserved motifs. (B) Conserved domain analysis. Different colored boxes indicate different conserved domains. (C) Gene structure analysis. squares represent exons, and black lines represent introns

2.4 象草 GRAS 家族基因启动子顺式作用元件预测

利用 TBtools 对象草 PpGRAS 基因家族启动子区域的顺式作用元件进行分析,根据功能可将其分为生长发育响应、植物激素调控及非生物胁迫响应 3 大类(图 3),共包含 21 种顺式作用元件。对 18 个 PpGRAS 基因的顺式作用元件分析表明,所有基因均含有光响应元件,有 11 个基因包含赤霉素响应元件,10 个基因含低温响应元件,且含低温响应元件的 10 个基因中有 5 个为 LISCL 亚家族成员,3 个为 PAT1 亚家族成员。此外,象草 PpGRAS 基因家族还含有多种功能特异的调控元件,可参与细胞周期调控、种子特异性表达、类黄酮生物合成等生物学过程,同时含有光响应 MYB 结合位点、干旱诱导 MYB 结合位点及昼夜节律相关调控元件,其可能在象草生长发育调控、非生物胁迫应答、信号传导

等关键生物学过程中发挥作用。

2.5 象草 GRAS 基因家族共线性分析

象草 GRAS 基因家族种内共线性分析显示,18 个家族成员中存在 6 对共线性关系(图 4):B1 号染色体上的 PpGRAS13 分别与 A1 号、A6 号、B6 号染色体上的 PpGRAS 基因为同源基因;A6 号与 B6 号、A6 号与 A1 号、B4 号与 A3 号、A1 号与 B6 号染色体间各存在 1 对同源基因,这些结果为象草 GRAS 家族进化研究提供了重要基础。

此外,象草与水稻、高粱、紫色狼尾草的种间共线性分析表明(图 5),三者与象草的 GRAS 同源基因对数量存在差异,分别为 13 对、19 对和 31 对。其中象草与紫色狼尾草的 GRAS 基因直系同源共线性最显著,表明二者亲缘关系最为密切。

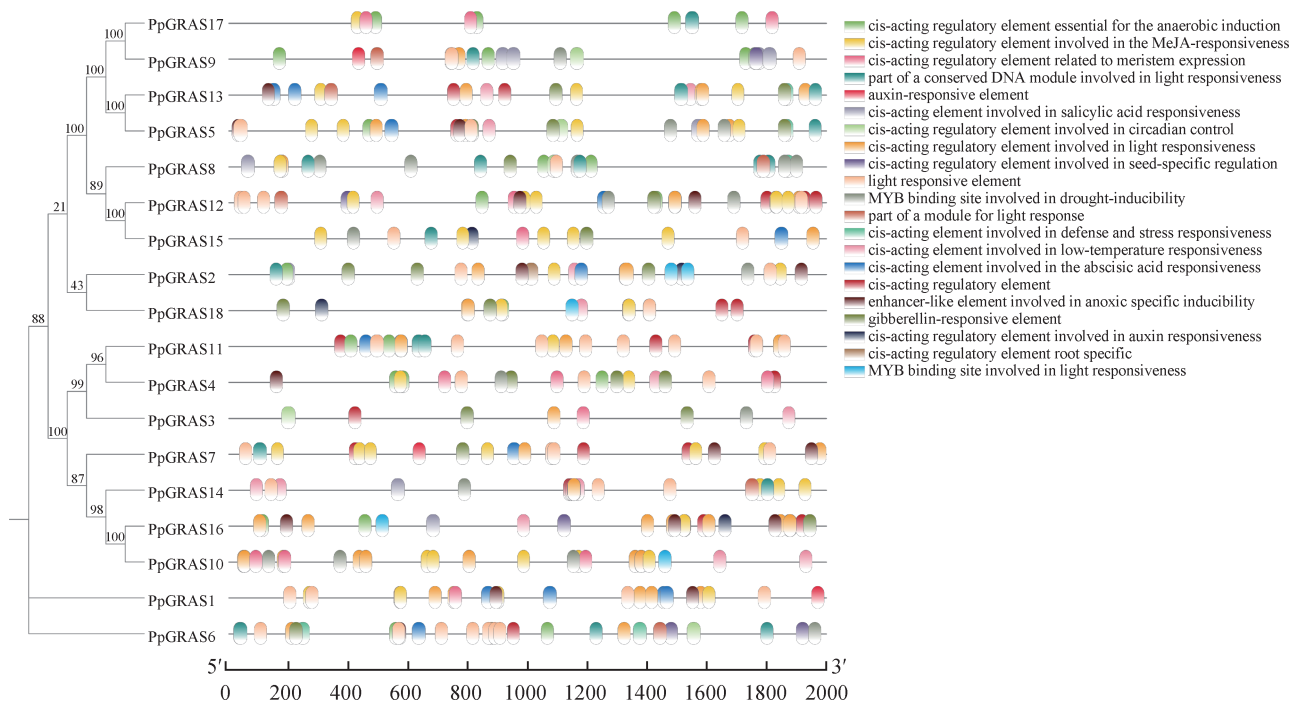


图3 象草 GRAS 基因家族顺式作用元件预测

Fig. 3 Prediction of cis-acting elements in the GRAS gene family of *Pennisetum purpureum*

注:方块代表顺式作用元件

Note: squares represent cis-acting elements

2.6 象草 GRAS 基因家族系统进化分析

利用 MEGA11.0 对拟南芥和象草的 GRAS 蛋白序列构建系统进化树,研究不同物种间 GRAS 蛋白的进化多样性。系统进化树的结果显示,18 个 PpGRAS 蛋白随机分布在系统进化树中(图 6)。依据进化树聚类结果可将 18 个象草 GRAS 蛋白划分为 5 个亚家族(SCR, SCL3, PAT1, SHR 和 LISCL),且象草 GRAS 蛋白在各亚家族中的成员分布不均匀,数量差异显著,LISCL 亚家族包含的家族成员最多,有 8 个 GRAS 蛋白,是系统发育树中成员数量最多的分支;其次是 PAT1 亚家族,包含 7 个 GRAS 蛋白;SCR、SHR 和 SCL3 亚家族中所含成员数量最少,均仅含 1 个 GRAS 蛋白;而 DELLA 和 HAM 亚家族中未发现象草 GRAS 蛋白分布,因此不列入象草 GRAS 蛋白亚家族分类中。

2.7 象草 GRAS 基因家族在低温胁迫下的表达模式分析

为了验证象草 *PgGRAS* 基因能否响应温度胁迫,采用 RT-qPCR 检测了 *PgGRAS* 基因在低温胁迫下的表达水平。RT-qPCR 结果表明(图 7),18 个 *PpGRAS* 基因都对低温胁迫有显著响应,但其相对表达量随着低温时间的延长而改变。在耐寒材料

GM1 中,只有 *PpGRAS4*、*PpGRAS11* 两个基因在三个处理时间段表达水平均比 0 h 表达水平高,但是 *PpGRAS4* 只在处理 3 d 的表达水平极显著上升,*PpGRAS11* 在处理 3 d、5 d、7 d 后的表达水平均极显著上升。*PpGRAS1*, *PpGRAS4*, *PpGRAS6*, *PpGRAS7*, *PpGRAS10*, *PpGRAS11*, *PpGRAS14*, *PpGRAS18* 基因在处理 3 d 时表达水平均极显著上升。*PpGRAS2*、*PpGRAS15* 表达水平均下降,*PpGRAS2* 处理 7 d 时显著下降。*PpGRAS15* 在处理 3 d、5 d、7 d 时的表达水平均极显著下降。*PpGRAS3* 在处理 3 d 时表达下调,5 d、7 d 时上调。在低温敏感材料 RY4 中,只有 *PpGRAS2*、*PpGRAS3* 在四个处理时间段表达水平均上升,*PpGRAS2* 在处理 5 d、7 d 时表达水平显著上升,*PpGRAS3* 在处理 5 d、7 d 时表达水平极显著上升,其他基因在三个处理时间段均表达水平下降。可以发现在低温胁迫处理下,象草 GM1 与 RY4 的 GRAS 基因家族表达模式具有差异。只有基因 *PpGRAS3* 表达模式在两个象草品种中相似,均为随着时间延长,表达水平逐渐上升,7 d 时表达水平与对照相比差异极显著。GM1 中多数 GRAS 基因在低温处理 3 d 时表达水平显著上升,随后于 5 d、7 d 逐渐下降,呈现出“先诱导升高、后适度下调”的表达趋势,表明该品种可在低温胁迫初期快速激活

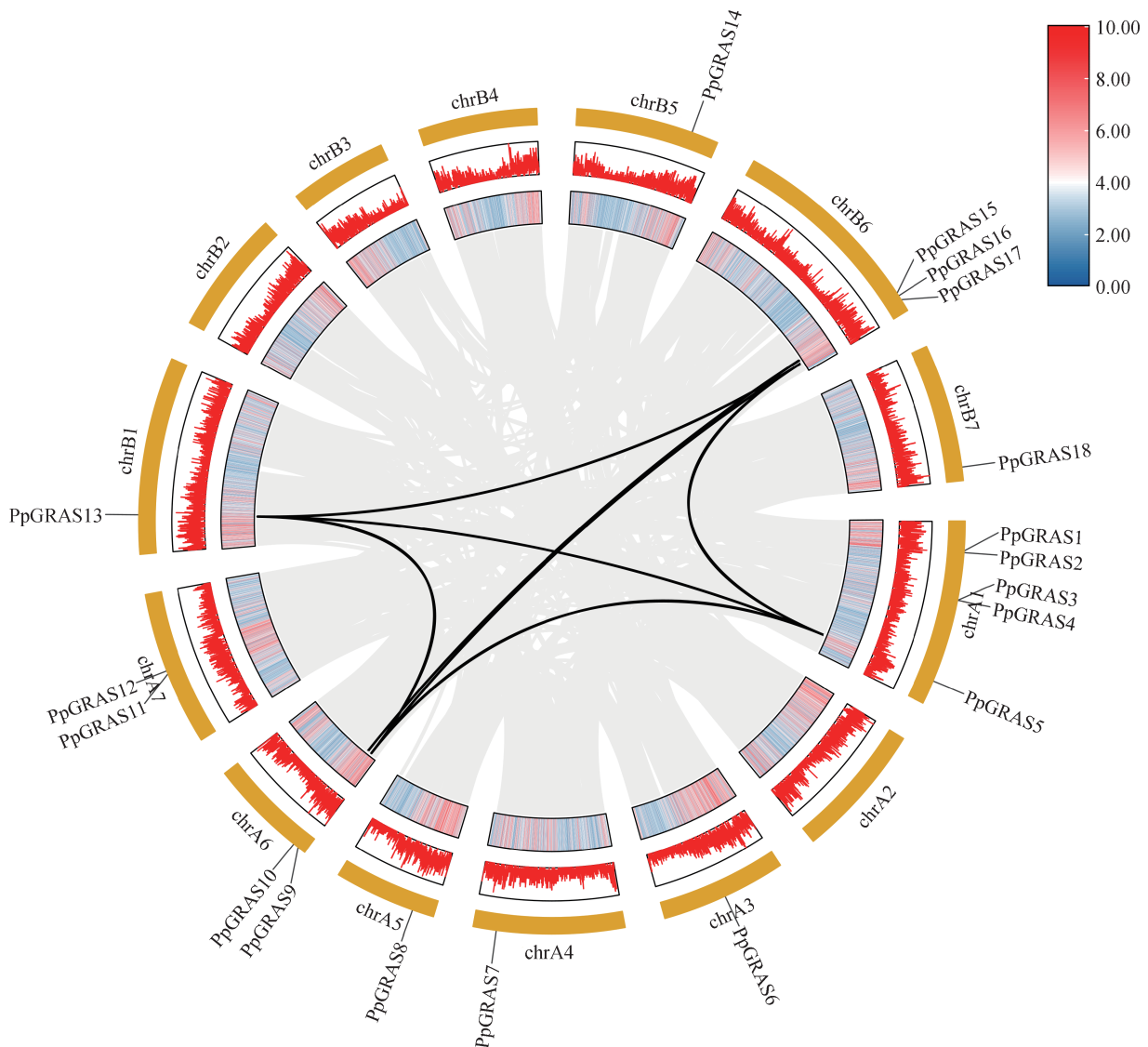


图4 象草GRAS基因家族种内共线性分析

Fig. 4 Intraspecific collinearity analysis of the GRAS gene family in *Pennisetum purpureum*

GRAS转录因子介导的抗寒信号通路,及时启动低温调控,并在后期及时维持生理稳态,体现出高效的低温响应与低温胁迫适应能力;而RY4中多数GRAS基因的表达水平随低温处理时间延长(3、5、7 d)持续呈下降趋势,表明其可能对低温信号的感知效率低,抗寒相关基因难以被有效激活,表现出较弱的抗寒性。上述差异表明,象草GRAS基因家族在低温下的早期快速诱导激活模式与象草品种抗寒能力密切相关,可以初步判断出GM1具有较强抗寒性,而RY4抗寒性较弱。

3 讨论

基因家族的精准鉴定是开展后续功能与进化

分析的基础,保守结构域的完整性是判断基因家族成员有效性的核心标准。本研究利用GRAS基因保守结构域隐马尔可夫模型(PF03514),结合象草全基因组序列筛选,初步鉴定到21个PpGRAS候选基因,经SMART和Pfam软件验证,剔除3个不具备完整保守结构域的候选基因,最终确定18个象草GRAS基因家族成员(PpGRAS1-PpGRAS18)。这一鉴定结果与近缘物种相比存在一定差异,例如高粱中鉴定出86个GRAS家族成员^[34],水稻中鉴定出60个^[25],推测这种差异可能与物种进化过程中的基因组复制、缺失事件相关,也可能与象草基因组组装完整性及筛选标准的严谨性有关,同时暗示象草GRAS基因家族在进化过程中可能发生了收缩,其功能分化可能更具特异性。

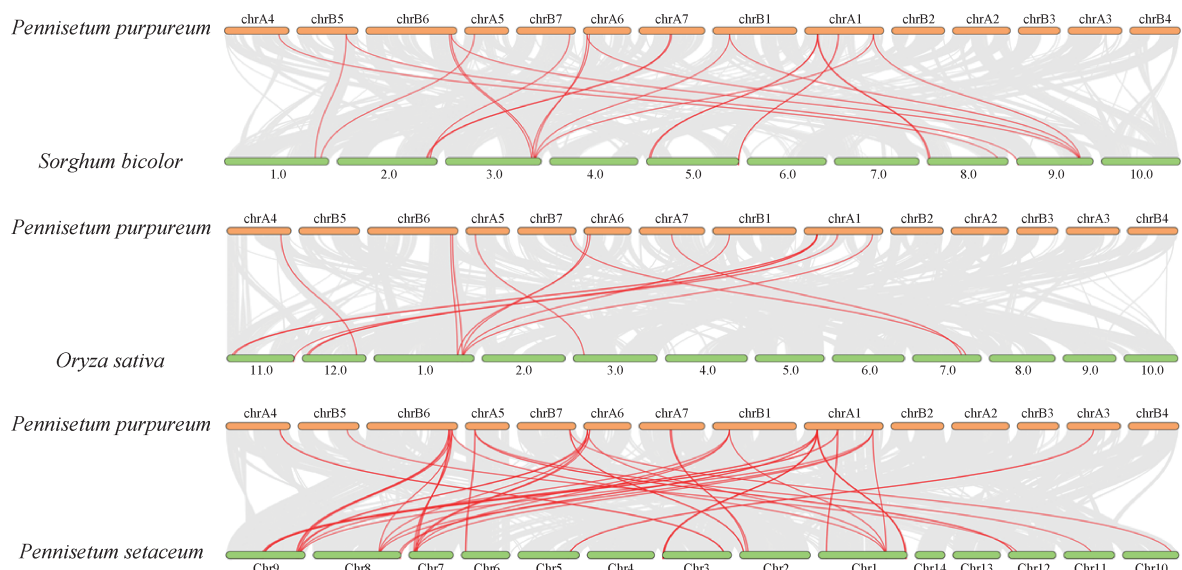


图 5 象草与高粱、水稻、紫色狼尾草 GRAS 基因的共线性分析

Fig. 5 Collinearity analysis of GRAS genes among *Pennisetum purpureum*, *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa*, and *Pennisetum setaceum*

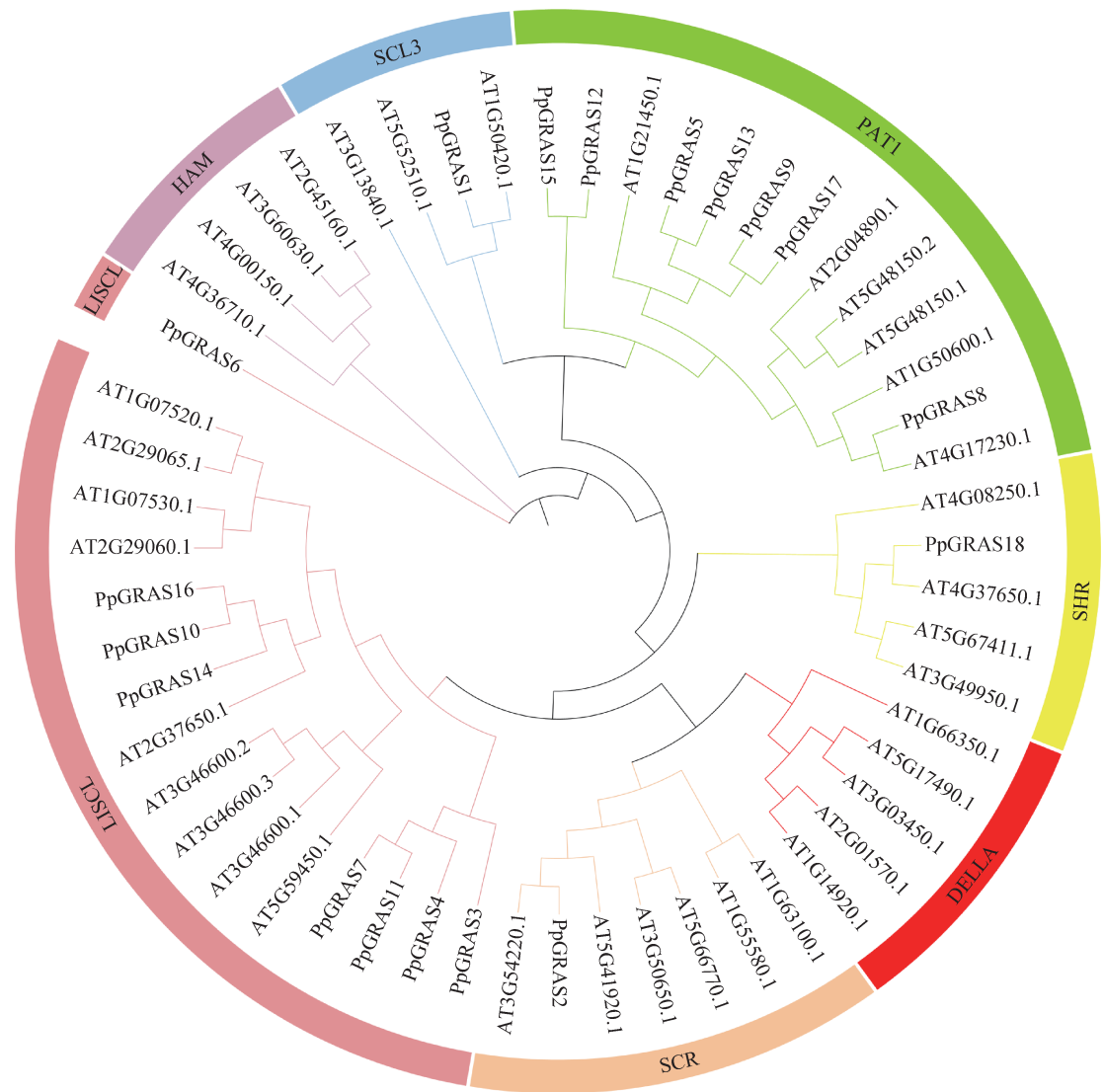
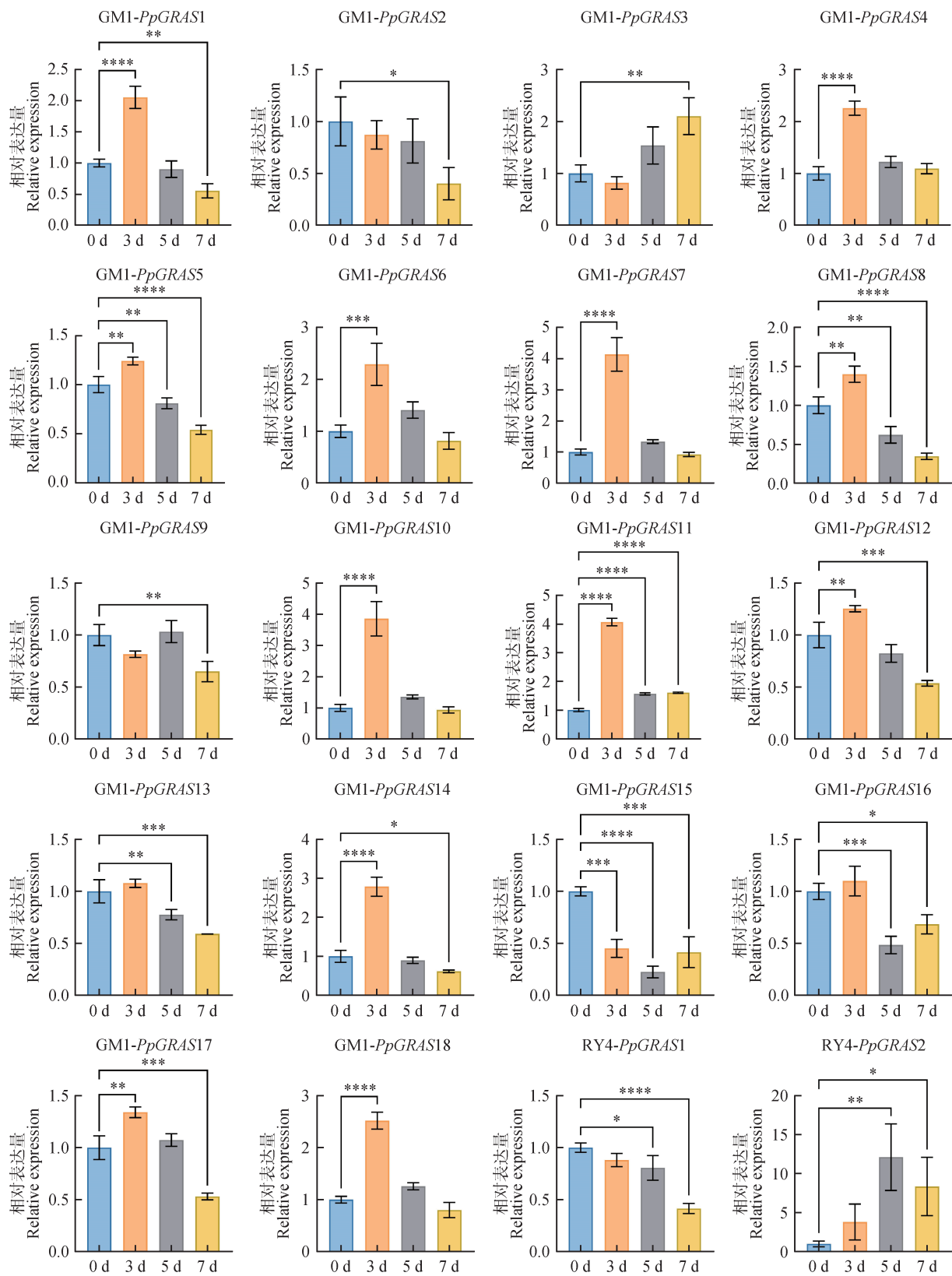


图 6 象草与拟南芥 GRAS 的系统进化树

Figure 6 Phylogenetic tree of GRAS genes from *Pennisetum setaceum* and *Arabidopsis*



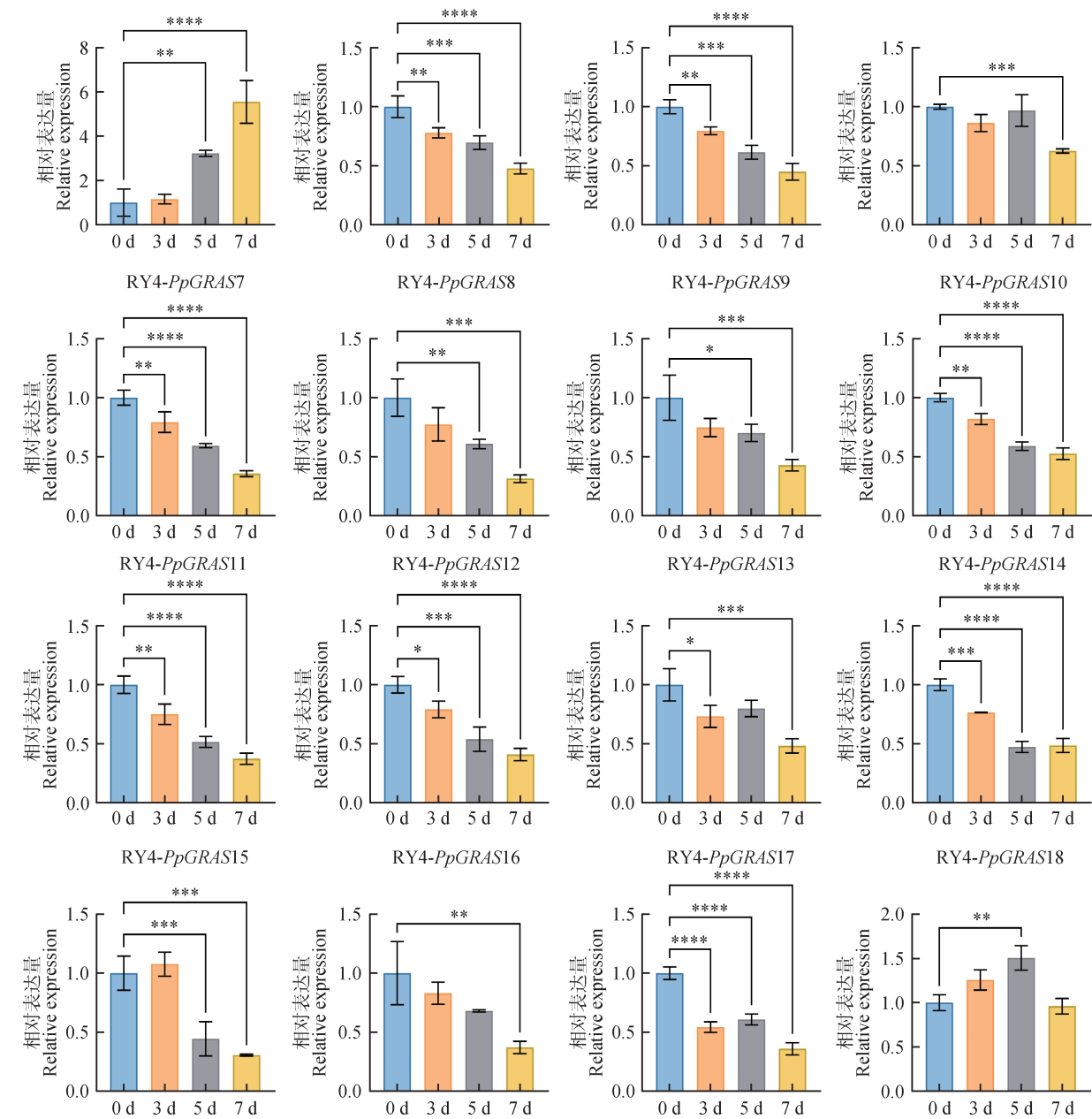


图 7 *PpGRAS* 基因在低温胁迫下的表达模式分析

Figure 7 Expression pattern analysis of PpGRAS genes under low-temperature stress

注: *表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$), ***表示差异高度极显著($P<0.001$), ****表示差异极极显著($P<0.0001$)

Note: * indicates significant difference at $P<0.05$, ** indicates highly significant difference at $P<0.01$, *** indicates extremely significant difference at $P<0.001$, **** indicates extremely significant difference at $P<0.0001$

本研究在象草全基因组中共鉴定出 18 个 *PpGRAS* 基因,根据染色体定位分析,大多数 *PpGRAS* 基因被定位到象草染色体的末端区域,该结果与玉米^[29]、二穗短柄草^[35](*Brachypodium distachyon*)中的研究结果相似,体现了 GRAS 基因家族染色体分布的普遍性规律。染色体两端通常为端粒区域,是基因重组和变异的高频区域,*PpGRAS* 基因在该区域的富集分布,说明 *PpGRAS* 基因可能经历了一定程度的收缩或扩张,

使这些基因更容易在染色体的顶端或底端被图位克隆^[36]。其中 A1 号染色体上 *PpGRAS* 基因的高度集中,推测该染色体可能是象草 GRAS 基因家族进化的核心区域,这些集中分布的基因可能源于串联重复事件,而串联重复是基因家族扩张、功能冗余及新功能产生的重要途径,后续可进一步验证该区域基因的重复特征及其功能关联性。象草 *PpGRAS* 基因数量为 18 个,拟南芥中为 32 个,这一差异表明 GRAS 基因家族在不同物种

中经历了不同的进化过程。

理化性质分析揭示了PpGRAS蛋白的基本分子特征,其编码氨基酸数量、分子质量和等电点(PI)存在明显差异,PI分布在4.85~10.07之间,且多数蛋白(13个)呈酸性(平均PI=6.97),表明PpGRAS蛋白在电荷性质上具有多样性,可能与蛋白稳定性、亚细胞定位及结合靶基因的特异性相关。PpGRAS蛋白的亚细胞定位具有明显的亚家族特异性:PAT1, SCL3, LISCL亚家族部分成员定位于叶绿体, PAT1, SCR, LISCL亚家族多数成员定位于细胞核, SHR亚家族的PpGRAS18定位于细胞质, LISCL亚家族的PpGRAS7定位于内膜。这与已有研究结果既有一致性也有差异性,例如巴西橡胶树^[32]、不结球白菜^[33]的GRAS蛋白大部分定位于细胞核,而象草中部分GRAS蛋白定位于叶绿体、细胞质及内膜,暗示象草GRAS基因家族功能的多样性,细胞核定位的成员可能参与基因转录调控,叶绿体定位的成员可能参与光合作用、叶绿体发育或叶绿体介导的胁迫响应,细胞质及内膜定位的成员可能参与信号传导或物质转运,为后续解析具体功能提供了重要线索。

系统发育分析显示,根据树状拓扑结构和水稻或拟南芥的分类,18个GRAS蛋白进一步划分为5个亚家族。成员分布极不均匀,其中LISCL亚家族(8个成员)和PAT1亚家族(7个成员)为优势亚家族,而SCR, SHR, SCL3亚家族仅各含1个成员, DELLA, LS, HAM亚家族无成员分布。这种亚家族分布特征与其他植物存在明显差异,例如水稻、高粱的GRAS基因家族均包含DELLA, LS, HAM亚家族。象草中缺失这3个亚家族,推测可能是在进化过程中,这些亚家族基因发生了丢失,也可能是由于象草GRAS基因的序列变异较大,导致其无法被聚类到这3个亚家族中,说明象草GRAS基因家族的功能分化具有特异性,DELLA亚家族与赤霉素介导的生长抑制和逆境响应有关^[37],其缺失可能意味着象草的抗逆、生长调控机制与水稻、高粱存在差异,而LISCL和PAT1亚家族的优势分布,推测这两个亚家族可能在象草的生长发育和逆境响应中发挥主导作用,这与后续低温胁迫表达模式分析中,多数LISCL、PAT1亚家族成员显著响应低温胁迫的结果相印证。从各个亚群来看,象草的成员数均小于或等于水稻的成员数。此外,18个PpGRAS蛋白的C末端区域是基于基序保守的,这与以前的研究结果一致。相反,它们有一个可变的N-末端区域,这表明GRAS蛋白的生物网络具有更

高的功能多样性和复杂性。

象草GRAS转录因子家族基因结构整体保守性较强。基因长期进化中,结构变异至关重要,内含子会随基因组演化从而实现进化。本研究发现,55%的象草GRAS家族成员含3~4个外显子,与其他植物该家族特征吻合,印证其进化保守性;另有10个PpGRAS基因所含外显子数量为4-12个,推测其进化中发生外显子、内含子插入或丢失,可能影响基因生物学功能。启动子顺式元件分析显示,10个PpGRAS基因启动子含低温响应元件,且10个基因表达水平平均比对照组显著上升,据此推测,这些低温响应元件可能与其他转录因子相互协同,共同调控PpGRAS基因的表达过程。

低温是影响象草生长发育、产量和品质的主要非生物胁迫因素之一,而GRAS基因家族在植物低温胁迫响应中发挥着重要作用,因此解析PpGRAS基因在低温胁迫下的表达模式,是挖掘抗寒候选基因的关键。本研究qRT-PCR结果表明,18个PpGRAS基因均对低温胁迫有显著响应,但表达模式存在明显差异,且在耐寒材料“桂牧一号”和低温敏感材料“热研4号”中的响应特征截然不同,体现了PpGRAS基因在象草抗寒调控中的多样性和特异性。

在耐寒材料“桂牧一号”中,PpGRAS4、PpGRAS11在四个低温处理时间段(0 d, 3 d, 5 d, 7 d)的表达水平均呈上升趋势,其中PpGRAS11在3 d, 5 d, 7 d时均极显著上升,PpGRAS4仅在3 d时极显著上升,表明这两个基因可能是象草耐寒调控中的核心正向调控基因,能够持续响应低温胁迫,增强植株的耐寒性。此外,PpGRAS1, PpGRAS6, PpGRAS7等8个基因在低温处理3 d时极显著上升,推测这些基因可能参与低温胁迫早期的快速响应,通过快速上调表达启动抗寒信号通路,为植株抵御低温胁迫奠定基础。而PpGRAS2、PpGRAS15在整个低温处理过程中表达水平均下降(PpGRAS15极显著下降),表明这两个基因可能是低温胁迫响应中的负向调控基因,其表达抑制可能有利于象草抵御低温胁迫;PpGRAS3的表达模式呈先下调(3 d)后上调(5 d, 7 d)的趋势,推测其可能参与低温胁迫中期和后期的响应调控,功能较为特殊。

在低温敏感材料“热研4号”中,仅PpGRAS2、PpGRAS3在四个处理时间段均上升,且在后期(5 d, 7 d)显著或极显著上升,而其他基因均呈下降趋势,这种表达模式与耐寒材料形成鲜明对比。推测耐寒材

料中多数 *PpGRAS* 基因的上调表达,可能是其具有较强耐寒性的重要分子机制——正向调控基因(如 *PpGRAS4*、*PpGRAS11*)的持续上调,能够激活下游抗寒相关基因的表达,增强植株的抗寒能力;而敏感材料中多数基因的下调表达,可能导致抗寒信号通路无法有效激活,植株难以抵御低温胁迫。此外,结合启动子顺式作用元件分析,10个低温响应相关的 *PpGRAS* 基因中,5个属于 LISCL 亚家族、3个属于 PAT1 亚家族,而这两个亚家族的多数成员在耐寒材料中显著上调表达,进一步证实 LISCL 和 PAT1 亚家族是象草 GRAS 基因家族中参与低温胁迫响应的核心亚家族,其中 *PpGRAS4*、*PpGRAS11*(LISCL 亚家族)可作为象草抗寒育种的核心候选基因,后续可通过转基因、基因编辑等技术验证其功能。

4 结论

本研究系统鉴定到18个含有完整保守结构域的 GRAS 家族成员,位于10条染色体上并分为5个亚家族,其成员分布与亚家族划分体现了该基因家族进化中的功能保守性与分化性。该家族基因编码的蛋白大部分为酸性、不稳定疏水蛋白,种间共线性分析出象草与狼尾草的亲缘性最近。顺式作用元件预测象草 GRAS 基因中含有大量光响应、低温响应、赤霉素响应和生长素响应等元件,表明该家族可能参与植物光反应、低温胁迫响应及激素调控等生物学过程。耐寒型象草品种 GM1 在经低温胁迫处理后,部分 *PpGRAS* 基因表达水平显著上调,表明此类基因可能在象草响应低温胁迫的过程中扮演着关键角色。本研究填补了象草 GRAS 基因耐寒功能研究空白,为象草耐寒性分子育种提供了候选基因与理论支撑。

参考文献

- [1] 焦文静. 紫象草花色苷的提取纯化、结构分析及特性研究[D]. 福州:福建农林大学,2015:1-2
JIAO W J. Extraction, purification, structure analysis and characteristics of anthocyanins from purple *Pennisetum purpureum* [D]. fuzhou: Fujian Fujian Agriculture and Forestry University, 2015: 1-2
- [2] DAUD Z, HATTA M Z M, KASSIM A S M, et al. Analysis of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) as a potential alternative fibre in paper industry[J]. Material Research Innovations, 2014, 18(Suppl. 6): 18-20
- [3] 黄其芬. 不同添加剂对杂交象草青贮品质的影响[D]. 福州:福建农林大学,2012:1-3
HUANG Q F. Effects of different additives on silage quality of hybrid elephant grass (*Pennisetum purpureum*) [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012:1-3
- [4] 王庆斌. 象草辐照芽变选育耐寒植株的初步研究[J]. 贵州农业科学,2003(6): 17-19
WANG Q B. Preliminary study on breeding of cold-resistant plants by irradiation-induced bud mutation of *Pennisetum purpureum* [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2003(6): 17-19
- [5] ZHANG X, GU H, DING C, et al. Path coefficient and cluster analyses of yield and morphological traits in *Pennisetum purpureum* [J]. Tropical Grasslands, 2010, 44(2): 95-102
- [6] 易显凤,赖志强,蔡小艳,等. 紫色象草的高产栽培与开发利用[J]. 草业与畜牧,2012(1):22-23
YI X F, LAI Z Q, CAI X Y, et al. High-yield cultivation and utilization of purple *Pennisetum purpureum* [J]. Prataculture & Animal Husbandry, 2012(1): 22-23
- [7] ALEMAYEHU N, ABEL T, ALOK K, et al. Opportunities for Napier grass (*pennisetum purpureum*) improvement using molecular genetics[J]. Agronomy, 2017, 7(2): 28
- [8] MUKTAR M, TESHOME A, HANSON J, et al. Genotyping by sequencing provides new insights into the diversity of Napier grass (*Cenchrus purpureus*) and reveals variation in genome-wide LD patterns between collections [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 6936
- [9] 温晓娜,简有志,解新明. 象草资源的综合开发利用[J]. 草业科学,2009,26(9):108-112
WEN X N, JIAN Y Z, XIE X M. Comprehensive development and utilization of *Pennisetum purpureum* resources [J]. Pratacultural Science, 2009, 26(9): 108-112
- [10] 丁迪云,陈卫东,陈杰雄,等. 狼尾草属牧草品种比较试验[J]. 广东农业科学,2019, 46(8): 8-13
DING D Y, CHEN W D, CHEN J X, et al. Comparative experiment on *Pennisetum* forage varieties [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2019, 46(8): 8-13
- [11] 马姗姗,杨静静,曲德辉,等. 过表达 C2H2 型锌指蛋白基因 *PdbZFP26* 提高山新杨耐盐性[J]. 林业科学,2023,59(1):110-118
MA S S, YANG J J, QU D H, et al. Overexpression of C2H2-type zinc finger protein gene *PdbZFP26* enhances salt tolerance in *Populus davidiana* × *P. bolleana* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2023, 59(1): 110-118
- [12] AOYANAGI T, IKEYA S, KOBAYASHI A, et al. Gene Regulation via the Combination of Transcription Factors in the INDETERMINATE DOMAIN and GRAS Families [J]. Genes, 2020, 11(6): 613
- [13] 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 Journal for Cell & Molecular Biology, 2010, 18(1): 111-119
- [14] HIRANO Y, NAKAGAWA M, SUYAMA T, et al. Structure of the SHR-SCR heterodimer bound to the BIRD/IDD transcriptional factor JKD [J]. Nature Plants, 2017, 3: 17010
- [15] LU X, LIU W, XIANG C, et al. Genome-Wide Characterization of GRAS Family and Their Potential Roles in Cold Toler-

- ance of *Cucumber* (*Cucumis sativus* L.) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(11): 3857
- [16] BOLLE C. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development [J]. Planta, 2004, 218(5): 683-692
- [17] 牛义岭, 姜秀明, 许向阳, 等. 植物转录因子GRAS蛋白的研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(9): 2519-2524
- NIU Y L, JIANG X M, XU X Y, et al. Research progress of plant transcription factor GRAS proteins [J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(9): 2519-2524
- [18] SUN X L, JONES W T, RIKKERINK E. GRAS proteins: the versatile roles of intrinsically disordered proteins in plant signalling [J]. BIOCHEM Journal, 2012, 442(1): 1-12
- [19] YUDONG L, WEI H, ZHIQIANG X, et al. Overexpression of *SlGRAS40* in Tomato Enhances Tolerance to Abiotic Stresses and Influences Auxin and Gibberellin Signaling [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1659
- [20] WANG X, LI G, SUN Y, et al. Genome-wide analysis and characterization of GRAS family in switchgrass [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 6096-6114
- [21] 李丽丽, 曾卫军, 李艳红, 等. 独行菜GRAS转录因子家族分析及 *LaSCL18* 基因克隆与冷相关性研究 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(9): 3428-3437
- LI L L, ZENG W J, LI Y H, et al. Genome-wide analysis of GRAS transcription factor family and cloning and cold response of *LaSCL18* gene in *Lepidium apetalum* [J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(9): 3428-3437
- [22] ACHARD P, GONG F, CHEMINANT S, et al. The cold-inducible *CBF1* factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism [J]. The Plant Cell, 2008, 20(8): 2117-2129
- [23] YANG T, LI C, ZHANG H, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the GRAS transcription in eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 932731
- [24] YUAN Y, FANG L, KARUNGO S K, et al. Overexpression of *VaPAT1*, a GRAS transcription factor from *Vitis amurens*, confers abiotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Reports, 2016(35): 655-666
- [25] 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
- [26] TIAN C, WAN P, SUN S, et al. Genome-Wide Analysis of the GRAS Gene Family in Rice and *Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54(4): 519-532
- [27] WANG L, DING X, GAO Y, et al. Genome-wide identification and characterization of GRAS genes in soybean (*Glycine max*) [J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 415
- [28] TO V T, SHI Q, ZHANG Y, et al. Genome-Wide Analysis of the GRAS Gene Family in Barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Genes, 2020, 11(5): 553
- [29] 吴占清, 陈威, 赵展, 等. 玉米GRAS基因家族的全基因组鉴定及生物信息学分析 [J]. 中国农业科技导报, 2024, 26(3): 15-25
- WU Z Q, CHEN W, ZHAO Z, et al. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of GRAS gene family in maize (*Zea mays* L.) [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2024, 26(3): 15-25
- [30] XU X, FENG G, HUANG L, et al. Genome-wide identification, structural analysis and expression profiles of GRAS gene family in orchardgrass [J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(3): 1845-1857
- [31] 潘静. 燕麦对盐、干旱胁迫的生理响应及其GRAS基因家族鉴定与表达分析 [D]. 成都: 西南民族大学, 2023: 55
- PAN J. Physiological response of oat to salt and drought stress and identification and expression analysis of GRAS gene family [D]. Chengdu: Southwest Minzu University, 2023: 55
- [32] 李娟, 袁渊, 吴挺开, 等. 巴西橡胶树GRAS基因家族鉴定及表达分析 [J]. 热带作物学报, 2024, 45(9): 1761-1779
- LI J, YUAN Y, WU T K, et al. Identification and expression analysis of GRAS gene family in *Hevea brasiliensis* [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(9): 1761-1779
- [33] 卢宏杰, 侯喜林. 不结球白菜GRAS基因家族鉴定及其在低温胁迫下的表达分析 [J/OL]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240418.1221.010,2024-04-19/2026-06-15>
- LU H J, HOU X L. Identification of GRAS gene family in non-heading Chinese cabbage and its expression analysis under low temperature stress [J/OL]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240418.1221.010,2024-04-19/2026-06-15>
- [34] 杨溥原, 梁红凯, 殷丛培, 等. 高粱GRAS基因家族全基因组鉴定及其对烯效唑的响应 [J]. 河北农业大学学报, 2021, 44(5): 1-13
- YANG P Y, LIANG H K, YIN C P, et al. Genome-wide identification of GRAS gene family in sorghum and its response to uniconazole [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2021, 44(5): 1-13
- [35] 唐泽珺. 二穗短柄草BdGRAS家族基因鉴定与表达分析 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2021: 16-17
- TANG Z J. Identification and expression analysis of BdGRAS family genes in *Brachypodium distachyon* [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2021: 16-17
- [36] 朱婷. 大麦bHLH转录因子家族的鉴定及系统进化和表达分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019: 39
- ZHU T. Identification, phylogenetic evolution and expression analysis of bHLH transcription factor family in barley [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2019: 39
- [37] 韩慧, 张秀海, 郭建波, 等. DELLA蛋白在植物中的功能 [J/OL]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20241216.1105.002,2024-12-26/2026-06-15>

(责任编辑 彭露茜)