

巴西橡胶树 GRAS 基因家族鉴定及表达分析

李娟^{1,2,3}, 袁渊^{2,3}, 吴挺开^{2,3}, 邓治^{2,3*}, 程汉^{2,3*}

1. 浙江农林大学现代农学院, 浙江杭州 311300; 2. 中国热带农业科学院橡胶研究所/热带作物生物育种全国重点实验室, 海南海口 571101; 3. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572025

摘要: GRAS 是植物特有的转录因子, 在植物生长发育过程以及非生物胁迫应答中具有重要的调控作用, 然而在巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 中还未见关于该基因家族的报道。本研究利用生物信息学工具分析巴西橡胶树 GRAS 基因家族成员的蛋白质理化性质、系统进化关系、基因结构、染色体位置及启动子顺式作用元件, 利用转录组数据及实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析橡胶树 GRAS 基因的表达模式。结果表明: 在巴西橡胶树基因组中共鉴定到 91 个 GRAS 家族成员, 分别命名为 *HbGRAS1~HbGRAS91*, 其分子量在 14.07~89.46 kDa 之间。亚细胞定位预测结果显示, *HbGRAS* 蛋白主要定位于细胞核和叶绿体。系统发育分析将其划分为 14 个亚家族, 同一亚家族成员的基因结构和基序组成较为保守。橡胶树 GRAS 基因分布在除 11 号染色体外的其他 17 条染色体和 2 条 Scaffold 上, 其中 17 个 *HbGRAS* 基因组成 10 个串联重复事件。共线性分析显示, 片段重复区域中有 87 个 *HbGRAS* 基因, 说明片段重复可能是橡胶树 GRAS 基因扩张的主要驱动力。启动子顺式作用元件分析显示, 橡胶树 GRAS 家族包含多个植物激素和胁迫应答顺式作用元件。*HbGRAS* 基因表达具有组织特异性, 并与橡胶树叶片发育有关。GRAS 亚家族成员 *DELLA* 基因的表达与橡胶树木质部发育有关并受赤霉素 (gibberellin, GA) 抑制。本研究结果为橡胶树 GRAS 基因的功能研究提供参考。

关键词: 巴西橡胶树; GRAS 基因家族; 生物信息学; 基因表达; *DELLA*

中图分类号: S794.1 文献标志码: A

Genome-wide Identification and Expression Analysis of GRAS Gene Family in *Hevea brasiliensis*

LI Juan^{1,2,3}, YUAN Yuan^{2,3}, WU Tingkai^{2,3}, DENG Zhi^{2,3*}, CHENG Han^{2,3*}

1. College of Advanced Agricultural Sciences, Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang 311300, China; 2. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science / National Key Laboratory of Tropical Crop Breeding, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572025, China

Abstract: GRAS is a plant-specific transcription factor, which plays an important regulatory role in plant growth and development, and abiotic stress response. GRAS gene family has not been reported in *Hevea brasiliensis*. In this study, bioinformatics tools were used to analyze the physicochemical properties, phylogenetic relationships, gene structures, chromosome positions, and *cis*-acting elements of promoters of GRAS gene family members in *H. brasiliensis*. The expression patterns of *HbGRAS* were analyzed by transcriptome data and real-time quantitative PCR (qPCR). A total of 91 GRAS family members were identified from *H. brasiliensis* genome, named *HbGRAS1~HbGRAS91*, with molecular weights ranging from 14.07–89.46 kDa. The results of subcellular localization prediction showed that *HbGRAS* was mainly localized in the nucleus and chloroplast. Those proteins were divided into 14 subfamilies based on phylogenetic analysis. The gene structures and motif compositions within the same subfamily were relatively conserved. The 91 GRAS family members were distributed in 17 chromosomes and two scaffolds except for chromosome 11 in rubber tree.

收稿日期 2023-02-18; 修回日期 2023-03-20

基金项目 海南省自然科学基金高层次人才项目 (No. 321RC654); 海南省科技人才创新项目 (No. KJRC2023C18); 海南省自然科学基金青年基金项目 (No. 322QN409)。

作者简介 李娟 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 作物遗传资源研究与利用。*通信作者 (Corresponding author): 邓治 (DENG Zhi), E-mail: zizip@163.com; 程汉 (CHENG Han), E-mail: forcheng@gmail.com。

We found that 17 *HbGRAS* genes were involved in 10 tandem repeat events. Collinearity analysis revealed the segmental duplication regions containing 87 *HbGRAS* genes, suggested that gene fragment duplication may be the major driver of *GRAS* gene expansion in *H. brasiliensis*. *Cis*-acting element prediction showed that *HbGRAS* family contained multiple phytohormone and stress-responsive elements. The expression patterns of *HbGRAS* genes had tissue specificity and were associated with leaf development. The expressions of *DELLA* genes, a member of the *GRAS* subfamily, were related to the xylem development and were repressed by gibberellin (GA). Those results provide a reference for functional research on the *GRAS* genes in rubber trees.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; *GRAS* gene family; bioinformatics analysis; gene expression; *DELLA*

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.09.001

转录因子 (transcription factor, TF) 是功能基因组学的核心, 它是一种能与特异 DNA 序列结合的蛋白, 可以单独或其他蛋白形成复合体, 提高或阻断特定基因 RNA 聚合酶的招募, 调控基因的表达^[1]。转录因子在调控高等植物的生长发育和非生物胁迫响应中起重要作用^[2]。已知的转录因子包括 *GRAS*、*WRKY*、*AP2/EREBP*、*bZIP*、*MYB*、*MADS* 和 *bHLH* 等。

GRAS 家族是一类植物特有的转录因子, 其命名来源于该家族最早鉴定的 3 个功能特征基因 *GAI* (gibberellic-acid insensitive)、*RG1* (repressor of *GAI*-3 mutant)、*SCR* (scarecrow)^[3-5]。*GRAS* 蛋白的长度为 400~770 个氨基酸不等, 具有 1 个高度保守的 C-端 *GRAS* 结构域。*GRAS* 结构域约 390 个氨基酸, 由 5 个不同基序按照特定顺序排列组成: *LHR I* (leucine heptad repeat I)、*VHIID*、*LHR II* (leucine heptad repeat II)、*PFYRE* 和 *SAW*^[6]。其中, *VHIID* 基序与 2 个亮氨酸七肽重复区 (*LHR I* 和 *LHR II*) 结合形成 *LHR I-VHIID-LHR II* 复合体, 该结构可能在蛋白-DNA 或蛋白-蛋白互作中发挥关键功能^[7]。*PFYRE* 和 *SAW* 基序功能仍未阐明, 但这 2 个基序发生缺失或错义突变导致拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 表型异常^[4,8]。*GRAS* 蛋白的 N 端保守性较差, 但一些 *GRAS* 家族成员在 N 端区域含有保守的序列, 如 *DELLA* 亚家族包含 2 个保守的基序 *DELLA* 和 *TVHYNP*^[9]。最初根据拟南芥和水稻的研究将 *GRAS* 家族分为 *DELLA*、*HAM* (hairy meristem)、*PAT1* (phytochrome a signal transduction 1)、*LAS* (lateral suppressor)、*SHR* (short root)、*SCR*、*SCL3* (*SCR*-like 3)、*LISCL* (*lilium longiflorum SCR*-like) 等 8 个亚家族。而其他植物物种, 如番茄 (*Solanum lycopersicum*)^[10]、茶树 (*Camellia sinensis*)^[11] 和葡萄 (*Vitis vinifera*)^[12] 中有 13 个亚家族, 葫芦 (*Lagenaria siceraria*)^[13] 中有 16 个亚

家族, *CENCI* 等^[14] 将被子植物 *GRAS* 家族分为 17 个亚家族。目前, *GRAS* 基因家族已在多个物种中被报道, 其中拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[15] 有 33 个成员、水稻 (*Oryza sativa*)^[15] 有 60 个、玉米 (*Zea mays*)^[16] 有 86 个、大白菜 (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)^[17] 有 48 个、毛果杨 (*Populus trichocarpa*)^[18] 有 106 个、中国蔷薇 (*Rosa chinensis*)^[19] 有 56 个成员, 大戟科的木薯 (*Manihot esculenta*)^[20] 有 77 个、麻风树 (*Jatropha curcas*)^[21] 和蓖麻 (*Castor bean*)^[22] 均有 48 个成员。

GRAS 基因家族在植物生长发育、激素信号传导、逆境响应等多个生物学过程中发挥着重要的调控作用。如 *GRAS* 家族成员 *DELLA* 蛋白作为赤霉素 (gibberellin, GA) 信号转导途径的负调控因子, 通过与其他蛋白互作从而介导 GA 调控植物生长^[23]。此外, *DELLA* 还参与调控茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 信号转导^[24] 及次生细胞壁形成^[25-26]; *PAT1* 作为光敏色素 A 信号途径的正调控因子参与光信号途径调控^[27]; *HAM* 参与茎尖分生组织的生长发育^[28]; *SCR* 和 *SHR* 通过形成复合体进而共同调控拟南芥根和芽的径向生长^[29]; *SCL3* 参与调控陆地棉根的伸长^[30]; 在大豆中过表达 *GmGRAS37* 基因可以增强植株的耐旱和耐盐能力^[31]。近年来, 随着对 *GRAS* 基因的深入研究, 越来越多的证据表明, *GRAS* 基因家族在植物的适应性进化和环境适应性方面起着关键的作用^[32-34]。

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*), 简称橡胶树, 原产于巴西亚马逊河流域马拉岳西部地区, 是大戟科橡胶树属一种典型的热带雨林树种, 也是我国及世界热区的一种重要经济作物。橡胶树所产生的胶乳是天然橡胶的主要原料。天然橡胶是重要的战略物资和工业原料, 尽管世界上有 2000 多种产胶植物, 如银胶菊^[35]、橡胶草^[36] 和杜仲^[37] 等, 但目前所使用的天然橡胶约 98% 仍来源于橡胶树^[38]。随着橡胶树全基因组测序工作的完

成, 为基因家族的全基因组分析提供了便利, 也为橡胶树功能基因组学研究提供了可靠的基因组数据信息^[39-41]。基于 GRAS 基因家族在植物生长发育和逆境胁迫响应中的重要作用, 本研究利用生物信息学方法, 以橡胶树基因组为基础, 鉴定橡胶树 GRAS 基因家族成员, 并对其系统进化、基因结构、染色体位置和启动子顺式作用元件等进行分析, 利用转录组数据及 qPCR 技术分析 GRAS 基因表达模式, 从而为橡胶树 GRAS 基因功能的解析提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所采用的试验材料均来自于中国热带农业科学院试验场(海南省儋州市)种植的橡胶树(*Hevea brasiliensis*)热研 73397 品种。采集橡胶树不同组织(雌花、雄花、木质部、叶片、树皮和胶乳), 不同节间木质部(选取橡胶树顶端分生组织从上往下数第一、第三和第五节间木质部), 以及 150 mg/L 外源 GA₃ 处理 21 周后(每周喷洒处理 1 次)的橡胶树幼苗的木质部(以 H₂O 处理作为对照)样品, 立即置于液氮中, 带回实验室后于-80 °C 中保存备用。每 5 株树为 1 个生物学重复, 每个样品 3 个生物学重复。

1.2 方法

1.2.1 橡胶树 GRAS 家族成员的鉴定及理化性质分析 从 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载橡胶树基因组序列、蛋白质序列和注释信息。利用 Pfam 数据库(<http://pfam-legacy.xfam.org/>)下载的 GRAS 结构域(PF03514)和隐马尔可夫模型(HMM)文件, 通过 hmmer 3.0 软件筛选橡胶树基因组数据库中含有 GRAS 结构域的全部蛋白序列, 选取 e 值小于 1e⁻⁵ 的候选蛋白序列。使用 ClustalX 2.1 软件将候选蛋白序列进行一一比对去除冗余, 并通过 SMART(<https://smart.embl.de/>)和 NCBI-CDD 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)鉴定其保守结构域, 去除不含 GRAS 结构域的序列, 得到橡胶树 GRAS 家族成员。分别利用 ExPASy ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)和 Plant-mPLoc(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)在线软件进行氨基酸长度、分子量大小、等电点、疏水性等理化性质和亚细胞定位预测。

1.2.2 GRAS 的系统进化分析 通过 PlantTFdb(<http://planttfdb.gao-lab.org/index.php>)数据库和 NCBI 数据库下载拟南芥、毛果杨和水稻 GRAS 家族蛋白序列, 并与橡胶树 GRAS 蛋白序列进行多序列比对。利用 MEGA 11 软件, 采用邻接法(neighbor-joining method, NJ)构建系统进化树, bootstrap 设置为 1000 以测试进化树的可靠性。利用 Evolview(<https://www.evolgenius.info/evolview-v2/#login>)在线软件和 AI 软件进行结果美化。

1.2.3 橡胶树 GRAS 基因结构分析 根据橡胶树基因组注释信息, 利用在线网站 MEME(<https://meme-suite.org/meme/>)与 NCBI Batch CD-search(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)在线软件进行 motif 预测和保守结构域分析, 其中 motif 数量设置为 10, 其他参数均为默认值。通过使用 TBtools 软件对橡胶树 GRAS 家族的外显子-内含子结构进行分析, 并将系统进化树、蛋白保守基序、保守结构域和基因结构进行可视化展示。

1.2.4 橡胶树 GRAS 基因染色体定位分析 利用 TBtools 软件在橡胶树基因组注释信息的基础上, 将橡胶树 GRAS 基因定位到染色体上, 并作共线性分析, 同时利用该软件计算其 K_a/K_s 值。

1.2.5 橡胶树 GRAS 基因启动子顺式作用元件分析 选取橡胶树 GRAS 转录起始位点上游 2000 bp 的序列作为启动子分析区域, 利用 PlantCARE(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)在线软件进行启动子顺式作用元件预测, 并通过 TBtools 进行可视化展示。

1.2.6 基于 RNA-Seq 数据的基因表达分析 利用课题组前期获得的 RNA-Seq 数据, 以及 Hevea DB(<http://hevea.catas.cn/home/index>)数据库中公布的转录数据, 获得不同组织(胶乳、树皮、叶片、雌花、雄花和木质部)及叶片不同发育时期(古铜期、变色期、淡绿期和稳定期)的橡胶树 GRAS 家族成员的转录本 FPKM(fragments per kilobase of exon per million reads mapped)值, 并使用 TBtools 软件对橡胶树 GRAS 基因表达水平进行聚类及热图绘制。

1.2.7 qPCR 分析 对橡胶树 DELLA 亚家族 6 个成员组织的转录组表达数据进行 qPCR 验证, 并分析其在不同节间木质部及 GA₃ 处理下的表达模式。利用天根生化科技(北京)有限公司的 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒

(TIANGEN, Beijing, China) 提取样品总 RNA。采用 NanoDrop 2000 分光光度计和凝胶电泳检测 RNA 样品的浓度和完整性。将 1 μg RNA 样品用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (Takara, Dalian, China) 反转录为 cDNA。采用 Primer 3 软件设计 *HbGRAS* 基因的 qPCR 引

物 (表 1), 以 *YLS8* 为内参基因。将上述反转录得到的 cDNA 作为模板, 利用 2×Q3 SYBR qPCR Master Mix (Universal) (TOLOBIO, China) 进行 qPCR, 反应体系与扩增程序按照说明书进行。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达水平。本实验包括 3 个生物学重复和 3 个技术重复。

表 1 qPCR 引物
Tab. 1 Primers for qPCR

引物名称 Primer name	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')
YLS8	CCTCGTCGTCATCCGATTC	CAGGCACCTCAGTGATGTC
HbGRAS44	TGGGCCTGATTCTGGTAACAC	AACCGTAATTGTTGACGCAGG
HbGRAS58	TTAACTGGCATTGGCCCTCC	CCACGGAAAGCGAATCGAAC
HbGRAS62	CCTACATCGCCTTCAACCAC	CAAAGGAGCCACCAACCGTA
HbGRAS64	AGCACAGTCGAGATGTGGTG	GGTCTGTGGTTGCGGATTTC
HbGRAS82	GCCGCCTCTCTTAGCTGATG	AGTGTGTGTACGAGACGGAC
HbGRAS89	ACGAAGGAGAGATCCAAATC	GCAAGAAGCATCAGTATTGGTA

2 结果与分析

2.1 橡胶树 GRAS 基因家族成员鉴定与理化性质分析

根据 NCBI 数据库中下载的橡胶树蛋白质序列及隐马尔可夫模型, 结合 SMART 和 NCBI-CDD 数据库筛选和验证, 最终得到 91 个非冗余的橡胶树 GRAS 基因家族成员, 根据其在染色上的位置将其命名为 *HbGRAS1~HbGRAS91* (表 2)。理化性质分析结果显示, 橡胶树 GRAS 基因编码的蛋白长度在 117~824 个氨基酸之间, 其中 HbGRAS91 的氨基酸序列最短, HbGRAS9 最长。蛋白分子量在 14.07~89.46 kDa 之间, 等电点在 4.72 (HbGRAS 70) ~9.07 (HbGRAS21) 之间, 平均值为 6.90。蛋白总平均疏水性在 -0.656~0.151 之间, 其中, 除 HbGRAS12、HbGRAS32、HbGRAS59 和 HbGRAS61 的总平均疏水性大于 0 之外, 其余皆小于 0, 说明橡胶树 GRAS 家族成员大部分为亲水蛋白。蛋白亚细胞定位预测结果显示, 有 49 个 HbGRAS 蛋白定位于细胞核, 36 个定位于叶绿体, 3 个定位于质膜, 2 个定位于细胞质, 1 个定位于过氧化物酶体。

2.2 橡胶树 GRAS 基因家族系统进化分析

为解析橡胶树 GRAS 蛋白的特征, 分别从 PlantTFdb 和 NCBI 数据库中下载拟南芥、毛果杨和水稻 GRAS 家族蛋白序列, 与本研究鉴定得到的 91 个橡胶树 GRAS 家族成员的蛋白序列进行比对及系统进化分析。结果表明, GRAS 蛋白被

划分为 14 个亚家族, 分别是 Os19、HAM、SCL4/7、LAS、SCR、DLT、SCL3、Os4、Os43、DELLA、Pt20、LISCL、SHR 和 PAT1 (图 1)。其中 LISCL 亚家族的成员数目最多有 16 个, PAT1 亚家族有 13 个, HAM 亚家族有 11 个, SHR 亚家族有 10 个, Pt20 亚家族有 8 个, Os4、SCR 和 DELLA 亚家族各有 6 个, SCL3 亚家族有 5 个, Os19、Os43、SCL4/7、LAS 和 DLT 各亚家族仅有 2 个成员。比较不同植物之间 GRAS 各亚家族的数量发现, 橡胶树、拟南芥和水稻中 LISCL 亚家族的数量最多, 分别为 16、7 和 10 个。毛果杨中 DELLA 和 HAM 亚家族成员数量最多, 均为 14 个。Pt20 亚家族仅存在于橡胶树和毛果杨中, 而拟南芥无 Os4、Os43 和 Os19 亚家族成员 (表 3, 图 2A)。

2.3 橡胶树 GRAS 家族保守结构域和基因结构分析

保守基序分析发现, 大多数 motifs 位于序列 C 端, motif 6 存在于全部 HbGRAS 蛋白中, 且始终在 C 端。motif 1 大多与 motif 4、motif 5 或者 motif 10 相邻。同一亚族的 HbGRAS 成员通常具有相似的基序组成。例如, LISCL 亚族除 HbGRAS91 只含有 motif 2 和 motif 6 外, 其余均包括 motif 9、motif 7、motif 1、motif 8、motif 5、motif 3、motif 2、motif 6, DELLA 亚族均含有 motif 9、motif 7、motif 4、motif 1、motif 10、motif 3、motif 2、motif 6, HAM 亚家族成员仅含有 4 个保守的 motifs (图 2B)。

表 2 橡胶树 GRAS 基因家族理化性质及亚细胞定位预测

Tab. 2 Physicochemical properties and subcellular localization prediction of GRAS gene family in *Hevea brasiliensis*

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	氨基酸长度 Length of amino acid	分子量 Molecular weight /kDa	等电点 Isoelectric point	总平均疏水性 Total mean hydrophobicity	亚细胞定位预测 Subcellular location prediction
<i>HbGRAS1</i>	HB1G00388.t1	423	47.70	5.21	-0.418	细胞核
<i>HbGRAS2</i>	HB1G01849.t1	555	62.09	5.66	-0.628	细胞核
<i>HbGRAS3</i>	HB1G02033.t1	478	53.92	5.87	-0.153	叶绿体
<i>HbGRAS4</i>	HB2G00960.t1	446	49.58	6.34	-0.117	细胞核
<i>HbGRAS5</i>	HB2G01656.t1	596	68.04	6.69	-0.343	叶绿体
<i>HbGRAS6</i>	HB2G02237.t1	721	79.03	5.24	-0.273	细胞核
<i>HbGRAS7</i>	HB3G01006.t1	553	62.16	5.64	-0.311	细胞核
<i>HbGRAS8</i>	HB3G01280.t1	525	59.51	4.80	-0.334	叶绿体
<i>HbGRAS9</i>	HB3G01371.t1	824	89.46	6.09	-0.298	细胞核
<i>HbGRAS10</i>	HB4G00114.t1	381	42.22	5.19	-0.084	叶绿体
<i>HbGRAS11</i>	HB4G00115.t1	497	55.83	6.02	-0.245	叶绿体
<i>HbGRAS12</i>	HB4G00116.t1	326	36.57	7.61	0.073	质膜
<i>HbGRAS13</i>	HB4G00119.t1	570	64.84	5.01	-0.268	叶绿体
<i>HbGRAS14</i>	HB4G00120.t1	416	46.83	8.25	-0.018	叶绿体
<i>HbGRAS15</i>	HB4G00841.t1	535	59.08	4.89	-0.195	细胞核
<i>HbGRAS16</i>	HB4G01021.t1	569	63.28	5.88	-0.393	细胞核
<i>HbGRAS17</i>	HB5G00086.t1	784	85.18	5.82	-0.328	细胞核
<i>HbGRAS18</i>	HB5G00100.t1	784	85.19	5.90	-0.334	细胞核
<i>HbGRAS19</i>	HB5G00848.t1	519	59.14	4.93	-0.403	叶绿体
<i>HbGRAS20</i>	HB5G01030.t1	747	85.45	6.45	-0.593	叶绿体
<i>HbGRAS21</i>	HB5G01034.t1	573	65.85	9.07	-0.558	叶绿体
<i>HbGRAS22</i>	HB5G01163.t1	543	61.02	5.39	-0.314	细胞核
<i>HbGRAS23</i>	HB5G01220.t1	441	47.81	5.77	-0.181	叶绿体
<i>HbGRAS24</i>	HB6G00656.t1	457	51.50	5.27	-0.431	细胞核
<i>HbGRAS25</i>	HB6G01072.t1	664	73.37	6.06	-0.341	细胞核
<i>HbGRAS26</i>	HB6G01076.t1	683	75.37	5.82	-0.355	细胞核
<i>HbGRAS27</i>	HB6G01628.t1	542	60.82	5.93	-0.656	细胞核
<i>HbGRAS28</i>	HB6G01802.t1	475	53.49	5.92	-0.166	叶绿体
<i>HbGRAS29</i>	HB7G00201.t1	500	55.90	5.96	-0.172	细胞核
<i>HbGRAS30</i>	HB7G00392.t1	519	57.71	6.05	-0.149	细胞核
<i>HbGRAS31</i>	HB7G00738.t1	542	60.51	5.63	-0.242	细胞核
<i>HbGRAS32</i>	HB7G01350.t1	401	45.06	5.29	0.082	质膜
<i>HbGRAS33</i>	HB7G01368.t1	501	56.69	5.43	-0.419	叶绿体
<i>HbGRAS34</i>	HB7G01749.t1	488	56.23	5.03	-0.149	叶绿体
<i>HbGRAS35</i>	HB8G01417.t1	751	84.07	6.04	-0.396	叶绿体
<i>HbGRAS36</i>	HB9G00100.t1	726	79.32	5.91	-0.241	细胞核
<i>HbGRAS37</i>	HB9G01011.t1	450	50.71	5.82	-0.088	叶绿体
<i>HbGRAS38</i>	HB9G01128.t1	765	85.97	5.54	-0.513	细胞核
<i>HbGRAS39</i>	HB9G01129.t1	791	88.67	5.26	-0.533	细胞核
<i>HbGRAS40</i>	HB9G01130.t1	593	67.64	5.88	-0.279	叶绿体
<i>HbGRAS41</i>	HB9G01131.t1	695	79.10	6.16	-0.613	细胞核
<i>HbGRAS42</i>	HB9G01132.t1	682	77.60	5.99	-0.556	细胞核
<i>HbGRAS43</i>	HB9G01532.t1	606	66.29	4.97	-0.282	细胞核
<i>HbGRAS44</i>	HB9G01717.t1	616	66.93	5.24	-0.269	细胞核

续表 2 橡胶树 GRAS 基因家族理化性质及亚细胞定位预测

Tab. 2 Physicochemical properties and subcellular localization prediction of GRAS gene family in *Hevea brasiliensis* (continued)

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	氨基酸长度 Length of amino acid	分子量 Molecular weight /kDa	等电点 Isoelectric point	总平均疏水性 Total mean hydro- phobicity	亚细胞定位预测 Subcellular location prediction
<i>HbGRAS45</i>	HB9G02123.t1	788	86.33	6.52	-0.348	细胞核
<i>HbGRAS46</i>	HB9G02263.t1	665	74.13	5.72	-0.384	细胞核
<i>HbGRAS47</i>	HB9G02672.t1	448	49.73	6.05	-0.094	细胞核
<i>HbGRAS48</i>	HB10G00207.t1	509	56.99	6.30	-0.187	细胞核
<i>HbGRAS49</i>	HB10G00413.t1	481	54.05	5.53	-0.128	质膜
<i>HbGRAS50</i>	HB10G00730.t1	541	61.31	5.75	-0.308	细胞核
<i>HbGRAS51</i>	HB10G00901.t1	445	49.79	5.42	-0.174	叶绿体
<i>HbGRAS52</i>	HB10G01429.t1	500	56.61	5.39	-0.383	叶绿体
<i>HbGRAS53</i>	HB10G01450.t1	461	51.60	5.59	-0.060	叶绿体
<i>HbGRAS54</i>	HB10G01677.t1	515	57.78	5.99	-0.070	细胞质
<i>HbGRAS55</i>	HB12G00727.t1	486	53.70	5.55	-0.253	叶绿体
<i>HbGRAS56</i>	HB12G00826.t1	586	65.58	4.94	-0.370	细胞核
<i>HbGRAS57</i>	HB12G01212.t1	460	52.28	6.35	-0.363	叶绿体
<i>HbGRAS58</i>	HB13G00766.t1	538	58.90	5.43	-0.065	细胞核
<i>HbGRAS59</i>	HB13G01444.t1	427	47.64	5.50	0.020	叶绿体
<i>HbGRAS60</i>	HB13G01796.t1	635	69.42	6.24	-0.400	细胞核
<i>HbGRAS61</i>	HB13G02058.t1	490	43.75	4.88	0.151	细胞质
<i>HbGRAS62</i>	HB14G00396.t1	441	48.47	5.29	-0.097	叶绿体
<i>HbGRAS63</i>	HB14G01685.t1	748	83.52	5.84	-0.397	叶绿体
<i>HbGRAS64</i>	HB15G00806.t1	634	69.90	5.50	-0.297	细胞核
<i>HbGRAS65</i>	HB15G01391.t1	569	63.25	5.79	-0.389	细胞核
<i>HbGRAS66</i>	HB15G01391.t1.1.5e735948	541	60.28	5.71	-0.419	细胞核
<i>HbGRAS67</i>	HB15G01545.t1	529	58.68	5.22	-0.276	细胞核
<i>HbGRAS68</i>	HB15G02227.t1	586	66.20	5.01	-0.166	叶绿体
<i>HbGRAS69</i>	HB16G00119.t1	446	50.25	5.10	-0.077	叶绿体
<i>HbGRAS70</i>	HB16G00306.t1	599	67.34	4.72	-0.111	叶绿体
<i>HbGRAS71</i>	HB16G00448.t1	457	52.19	6.18	-0.328	叶绿体
<i>HbGRAS72</i>	HB16G00620.t1	586	65.94	5.05	-0.395	细胞核
<i>HbGRAS73</i>	HB16G00747.t1	494	54.53	5.69	-0.214	叶绿体
<i>HbGRAS74</i>	HB16G00950.t1	450	50.70	6.06	-0.107	叶绿体
<i>HbGRAS75</i>	HB16G01057.t1	799	89.21	5.22	-0.454	细胞核
<i>HbGRAS76</i>	HB16G01058.t1	757	84.96	5.35	-0.483	细胞核
<i>HbGRAS77</i>	HB16G01059.t1	600	67.78	6.23	-0.251	叶绿体
<i>HbGRAS78</i>	HB16G01060.t1	701	79.84	5.59	-0.564	过氧化物酶体
<i>HbGRAS79</i>	HB16G01061.t1	689	78.37	5.79	-0.594	细胞核
<i>HbGRAS80</i>	HB16G01062.t1	682	77.49	5.69	-0.427	叶绿体
<i>HbGRAS81</i>	HB16G01451.t1	607	66.88	5.14	-0.300	细胞核
<i>HbGRAS82</i>	HB16G01623.t1	613	66.45	5.19	-0.229	细胞核
<i>HbGRAS83</i>	HB16G01816.t1	417	46.74	7.29	-0.101	叶绿体
<i>HbGRAS84</i>	HB16G02038.t1	780	85.45	6.12	-0.309	细胞核
<i>HbGRAS85</i>	HB16G02170.t1	666	73.99	5.94	-0.407	细胞核
<i>HbGRAS86</i>	HB17G00055.t1	529	58.96	4.85	-0.246	细胞核
<i>HbGRAS87</i>	HB17G00303.t1	635	69.42	7.56	-0.404	细胞核
<i>HbGRAS88</i>	HB17G00644.t1	521	58.05	5.66	-0.093	叶绿体
<i>HbGRAS89</i>	HB18G00909.t1	632	69.38	5.40	-0.256	细胞核
<i>HbGRAS90</i>	Scaf402_G00001.t1	412	46.58	5.11	-0.459	细胞核
<i>HbGRAS91</i>	Scaf409_G00006.t1	117	14.07	5.49	-0.642	叶绿体

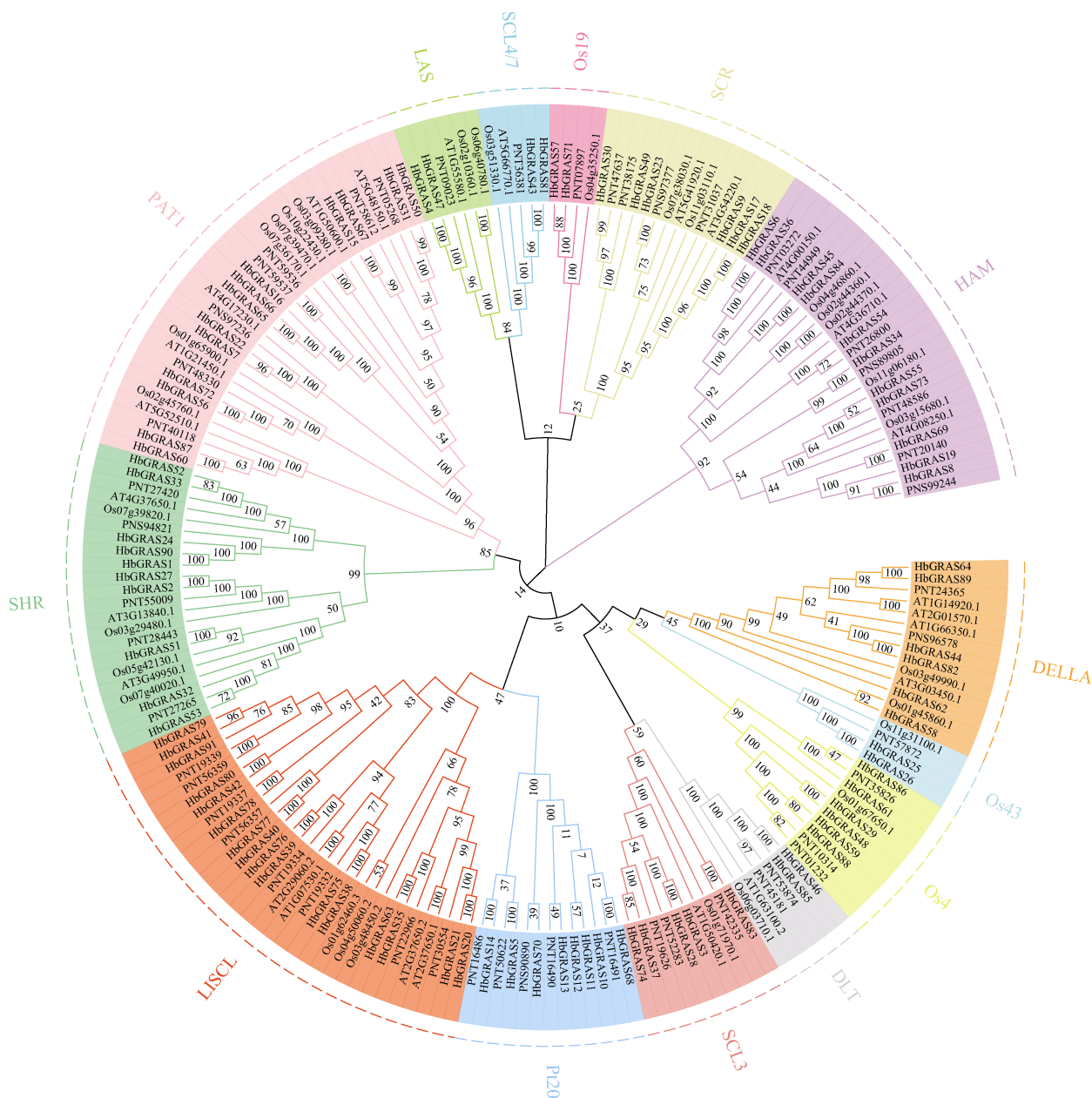


图 1 GRAS 蛋白的系统进化关系

Fig. 1 Phylogenetic relationships in GRAS proteins

保守结构域分析结果显示, *HbGRAS* 成员均含有 GRAS 或 GRAS superfamily 结构域, 除 *HbGRAS91* 外其他均位于 C 端, 而 DELLA 结构域仅存在于 DELLA 亚家族中。同一亚家族的成员其基因结构相似, 如 PAT1 亚家族仅有 GRAS 结构域, Pt20 亚家族仅有 GRAS superfamily 结构域。DELLA 亚家族中除 *HbGRAS62* 外, 其余均含有 DELLA 保守结构域 (图 2C)。

基因结构多样性是基因家族进化的重要组成部分^[42]。橡胶树 *GRAS* 基因具有 0~7 个数量不等的内含子, 其中 63 个 *HbGRAS* 无内含子, 18 个

HbGRAS 仅有 1 个内含子, *HbGRAS59* 含有 7 个内含子, 数量最多。DELLA、LAS、Os19、HAM 和 DLT 亚家族无内含子, Os4/7、SCL3 和 SHR 亚家族含有 0~1 个内含子, Os4 亚家族含有 0~7 个内含子 (图 2D)。总体来说, 系统进化中同一亚家族的橡胶树 *GRAS* 基因具有相似的外显子-内含子结构。

2.4 橡胶树 *GRAS* 基因染色体定位和基因复制分析

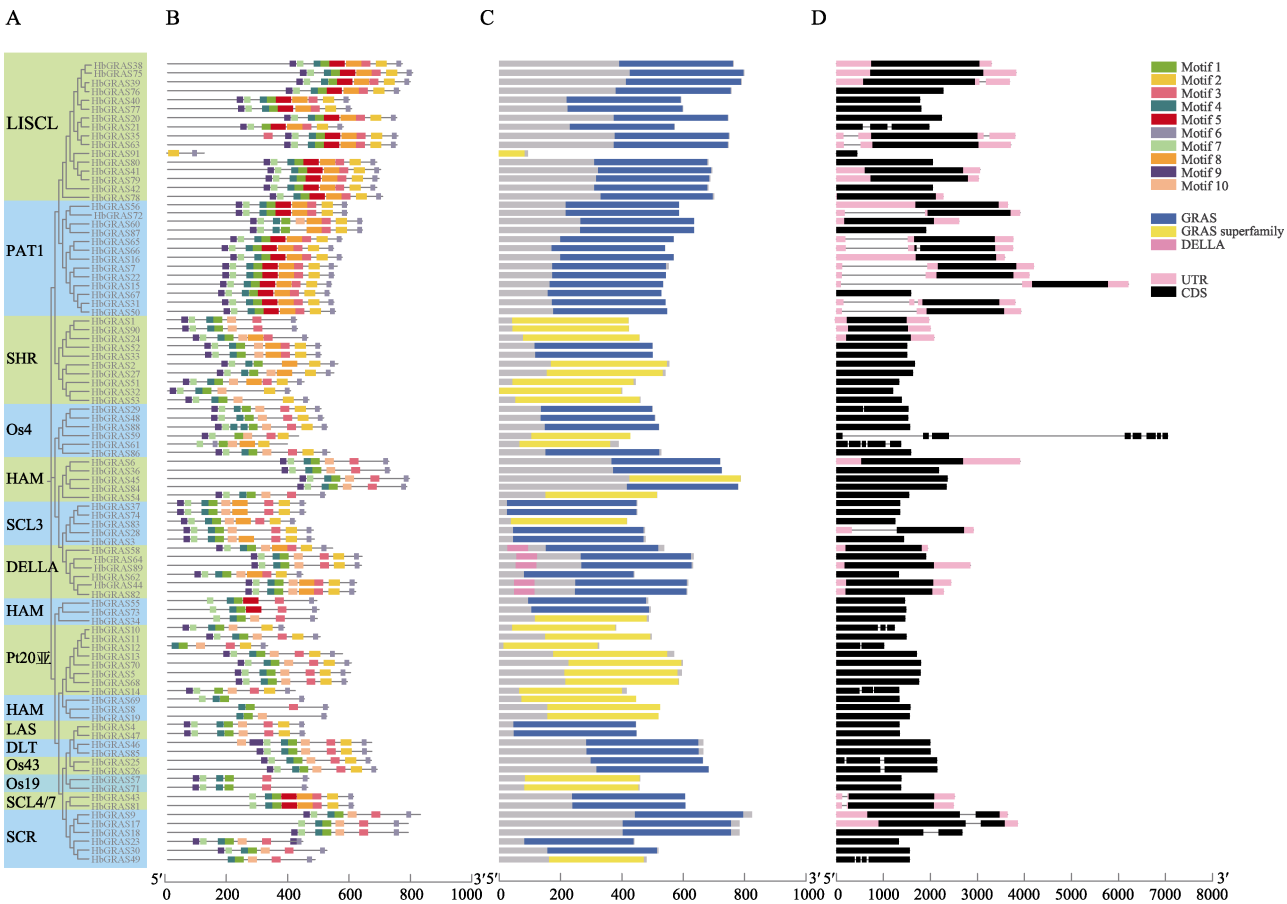
橡胶树 *GRAS* 基因的染色体定位如图 3 所示, 91 个 *HbGRAS* 基因分布于除 11 号染色体外的其

表 3 不同植物间 GRAS 各亚家族数量
Tab. 3 Numbers of GRAS subfamilies among different plants

亚家族名称 Subfamily name	橡胶树 <i>H. brasiliensis</i>	拟南芥 <i>A. thaliana</i>	水稻 <i>O. sativa</i>	毛果杨 <i>P. trichocarpa</i>
LISCL	16	7	10	12
PAT1	13	6	7	11
HAM	11	5	7	14
SHR	10	3	5	10
Os4	8	0	1	4
Pt20	8	0	0	8
DELLA	6	5	3	14
SCR	6	2	5	7
SCL3	5	1	7	4
SCL4/7	2	2	1	2
DLT	2	1	1	2
LAS	2	1	2	3
Os19	2	0	1	2
Os43	2	0	1	1

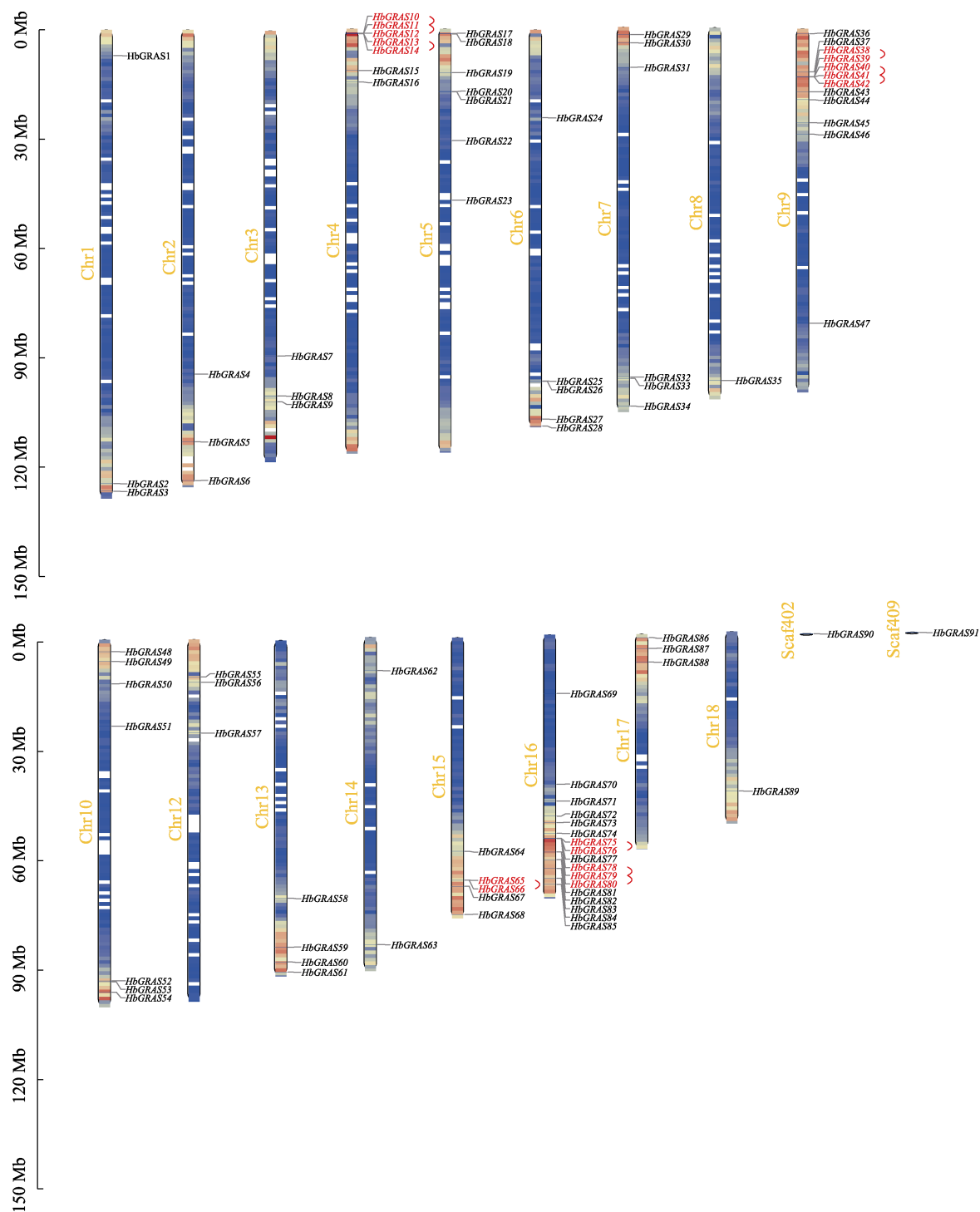
他 17 条染色体和 2 条 Scaffold 上, 并且每个染色体上分布的数目不同。16 号染色体上分布最多, 有 17 个基因, 约占总数的 18.68%, 其次是 9 号染色体分布有 12 个基因, 而 8 和 18 号染色体, 以及 Scaffold402 和 Scaffold409 分布最少, 各自仅含 1 个 *HbGRAS* 基因。

串联重复事件是指 200 kb 内包含 2 个或更多基因的染色体区^[43], 在基因组进化、调控和稳定性等方面具有重要的作用^[44]。在橡胶树 4、9、15 和 16 号等 4 条染色体上共发现 17 个 *HbGRAS* 基因的 10 个串联重复事件 (图 3)。共线性分析显示, 橡胶树 *GRAS* 基因片段重复区域中发现了 87 个基因 (图 4), 说明片段重复事件可能是橡胶树 *GRAS* 基因家族成员进化的主要原因。*HbGRAS* 家族的同源基因对的 K_a/K_s 值在 0.091~0.388 之间, 说明这些基因经过片段复制后发生了纯化选择。



A: 系统进化树; B: GRAS 蛋白基序分布; C: GRAS 蛋白结构域位置; D: GRAS 基因结构。
A: Phylogenetic tree; B: GRAS protein motif distribution; C: GRAS protein domain location; D: GRAS gene structure.

图 2 橡胶树 GRAS 蛋白序列的结构特征
Fig. 2 Structure of GRAS protein sequences in *H. brasiliensis*



红色字体表示串联重复基因，红色线条表示串联重复事件。
Red font indicates the tandem duplication genes, red line indicates a series of tandem repetition events.

图 3 橡胶树 GRAS 基因的染色体定位

Fig. 3 Chromosomal localization of GRAS genes in *H. brasiliensis*

2.5 橡胶树 GRAS 基因启动子顺式作用元件分析

启动子区顺式作用元件分析结果显示，橡胶树 GRAS 家族主要包含植物激素应答顺式作用元件，如 GA、茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA)、脱落酸 (abscisic acid, ABA)、生长素 (auxin) 和

水杨酸 (salicylic acid, SA) 响应元件，胁迫应答顺式作用元件，如伤害、干旱和低温响应元件，以及参与分生组织、胚乳、种子等时空表达及光响应的顺式作用元件等。其中，光响应元件在全部 91 个 *HbGRAS* 基因中都存在且数量最多，有

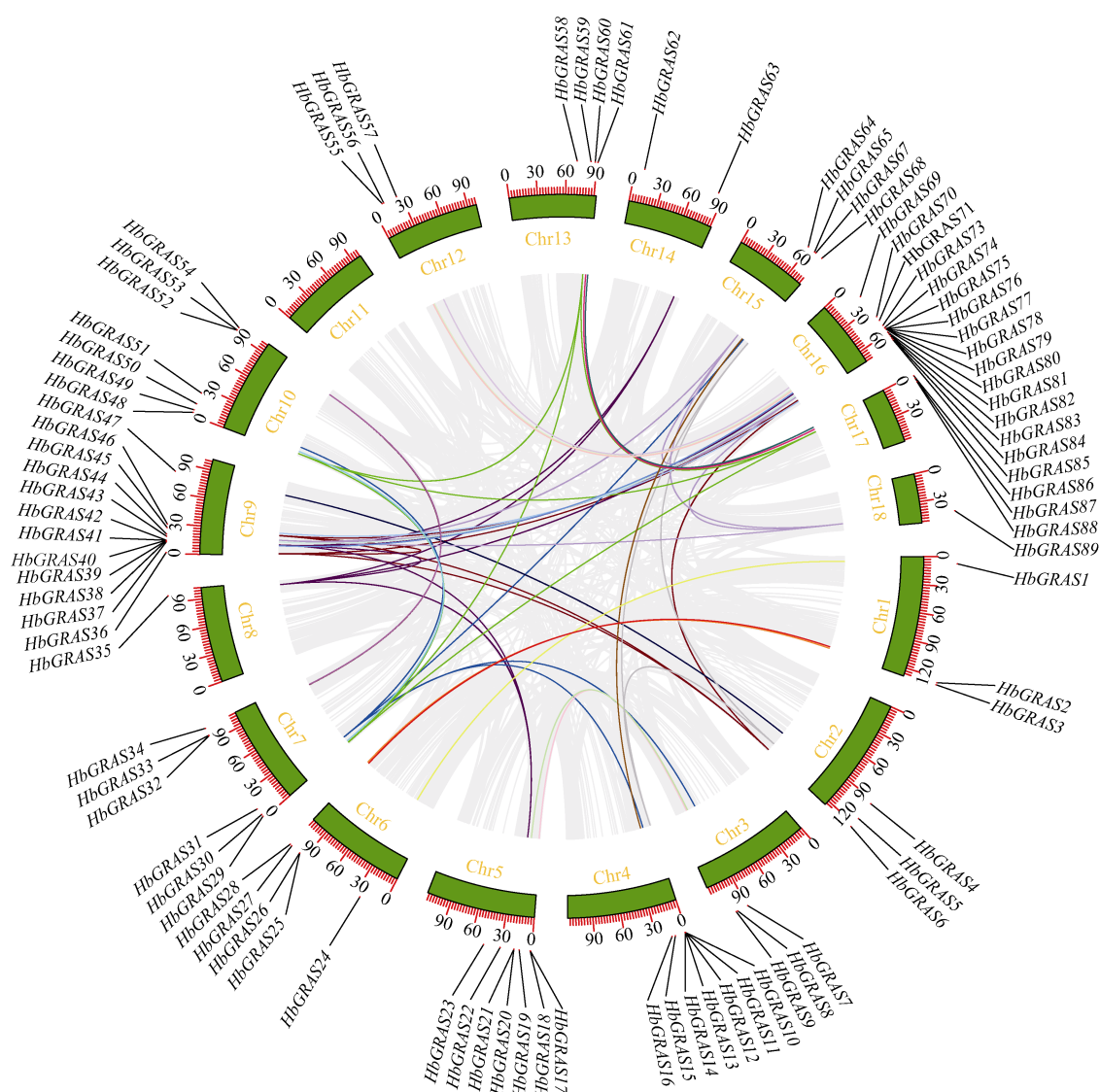


图 4 橡胶树 GRAS 基因的共线性分析

Fig. 4 Collinearity analysis of GRAS genes in *H. brasiliensis*

1111 个。其次,是茉莉酸甲酯响应元件有 178 个,厌氧诱导元件 164 个,脱落酸响应元件 129 个,GA 响应元件 85 个,其中数量最少的元件是光敏色素互作因子、SEF1 因子结合位点和参与栅栏叶肉细胞分化的顺式作用元件,各有 2 个(图 5)。上述结果表明, *HbGRAS* 可能参与多种植物激素和环境胁迫应答,在植物生长发育和逆境胁迫响应中起着重要作用。

2.6 橡胶树 GRAS 基因家族成员表达分析

HbGRAS 基因在橡胶树胶乳、树皮、叶片、雌花、雄花和木质部等不同组织的表达模式如图 6 所示,其中 *HbGRAS11*、*HbGRAS12*、*HbGRAS26*、*HbGRAS30*、*HbGRAS42*、*HbGRAS48*、*HbGRAS49*、*HbGRAS59* 和 *HbGRAS69* 等 9 个基因在所有检测

组织中均不表达。*HbGRAS45* 和 *HbGRAS84* 在胶乳中高表达, *HbGRAS67* 在树皮和木质部中表达量较高, *HbGRAS82* 在叶片和木质部中的表达丰度较高。雄花中表达丰度最高的是 *HbGRAS60*,其次是 *HbGRAS87*。不同亚族中 *HbGRAS* 的组织表达模式也不尽相同,比如 LAS 和 Pt20 亚家族成员在所有组织中的表达水平都低于其他亚家族,而 PAT1、DELLA 和 SCL4/7 亚家族的相对表达量较其他各亚族略高。

为进一步了解 *HbGRAS* 在橡胶树叶片发育中的作用,从 Hevea DB 数据库下载 *HbGRAS* 基因在橡胶树叶片不同发育时期的转录组数据,表达模式分析结果显示,DELLA 亚家族中 *HbGRAS44* 随着叶片的发育进程表达量逐渐上调,而 *HbGRAS58*、

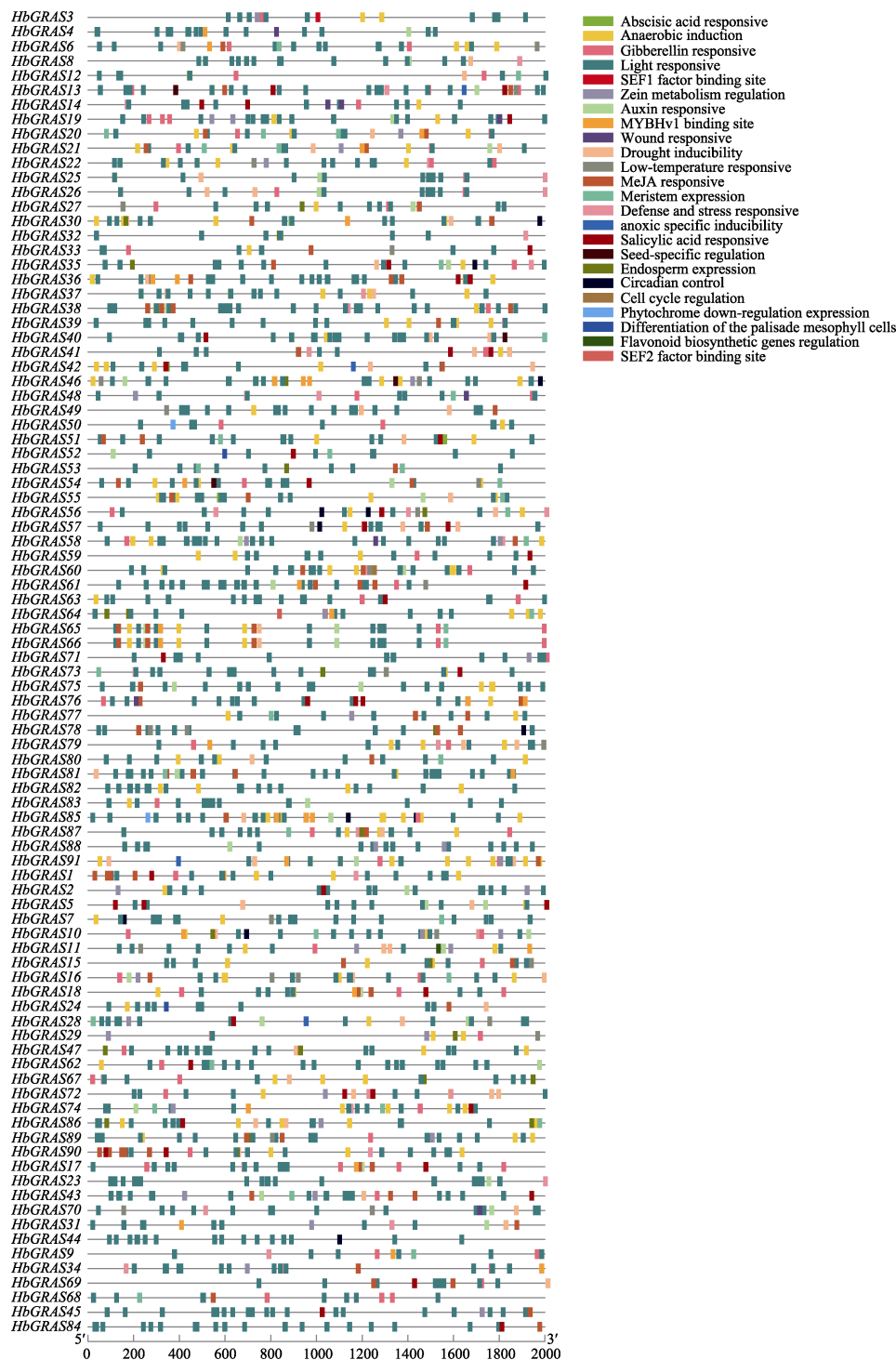


图 5 橡胶树 GRAS 基因启动子区域的顺式作用元件预测

Fig. 5 Prediction of *cis*-acting element in the promoter region of rubber tree GRAS genes

HbGRAS64、*HbGRAS82* 和 *HbGRAS89* 则逐渐下调表达；PAT1 亚家族中 *HbGRAS7* 和 *HbGRAS60*，HAM 亚家族中 *HbGRAS6* 和 *HbGRAS36* 均随着叶片的成熟表达量逐渐上调。HAM 亚族中 *HbGRAS84* 和 *HbGRAS54* 在变色期和淡绿期的表达量相对较高（图 7），说明 *HbGRAS* 基因表达与叶片发育有

关，但可能存在功能差异。

作为 GRAS 家族的重要成员，DELLA 是 GA 信号传导途径的负调控因子，在植物生长发育过程中发挥重要作用^[45]。因此，进一步利用 qPCR 技术分析橡胶树 DELLA 亚家族成员的基因表达模式。结果显示 *HbGRAS62* 在树皮中表达量

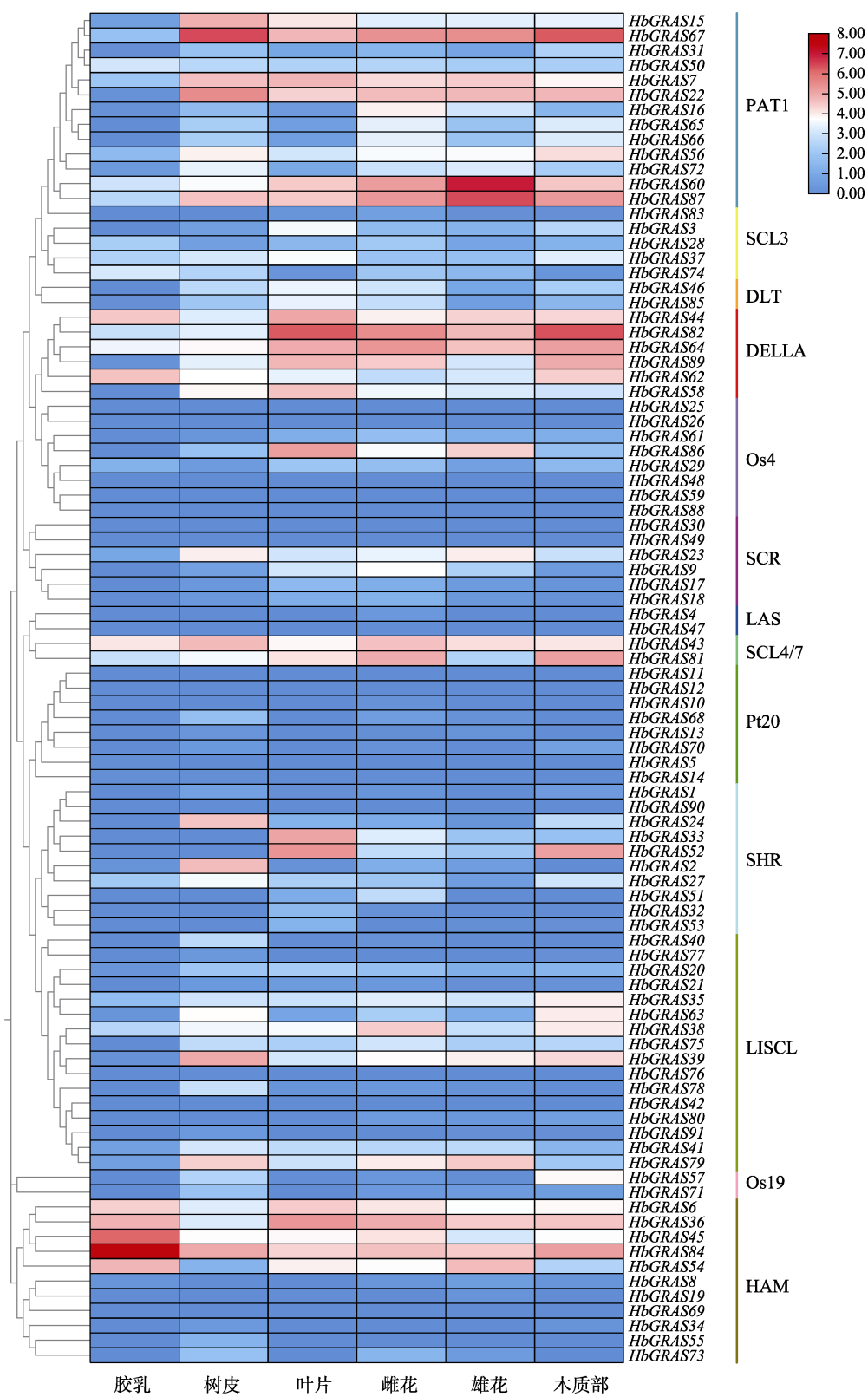


图 6 橡胶树不同组织中 *HbGRAS* 基因表达模式

Fig. 6 Expression patterns of *HbGRAS* genes in different tissues of *H. brasiliensis*

最高，木质部中表达量最低，而 RNA-Seq 结果显示表达量最高和最低的组织分别为胶乳和雌花。其余 5 个 *DELLA* 基因表达量最高和最低的组织均与 RNA-seq 结果一致，其中 *HbGRAS44* 分别为叶片和树皮、*HbGRAS58* 分别为叶片和胶乳、*HbGRAS64* 分别为雌花和胶乳、*HbGRAS82* 和

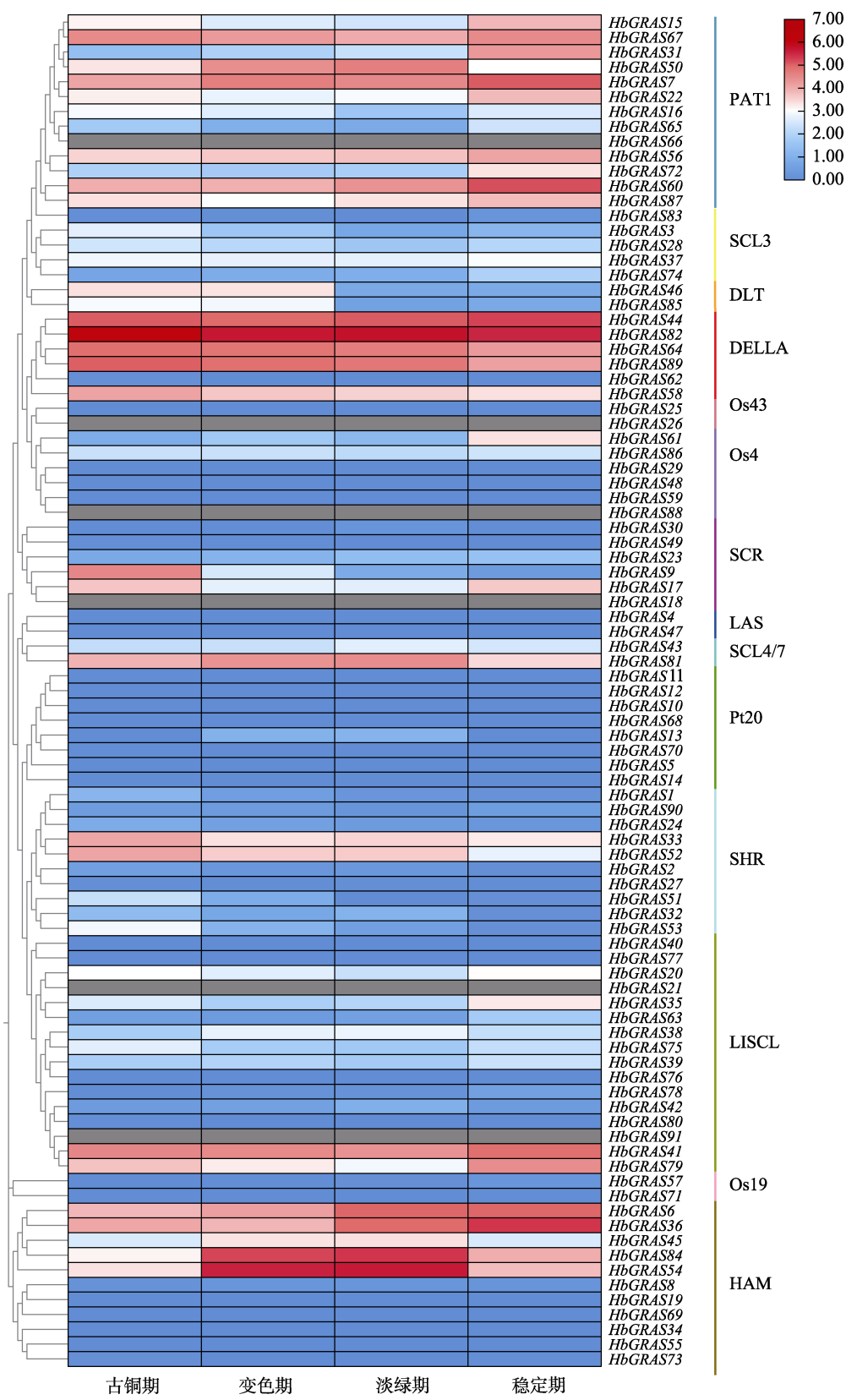


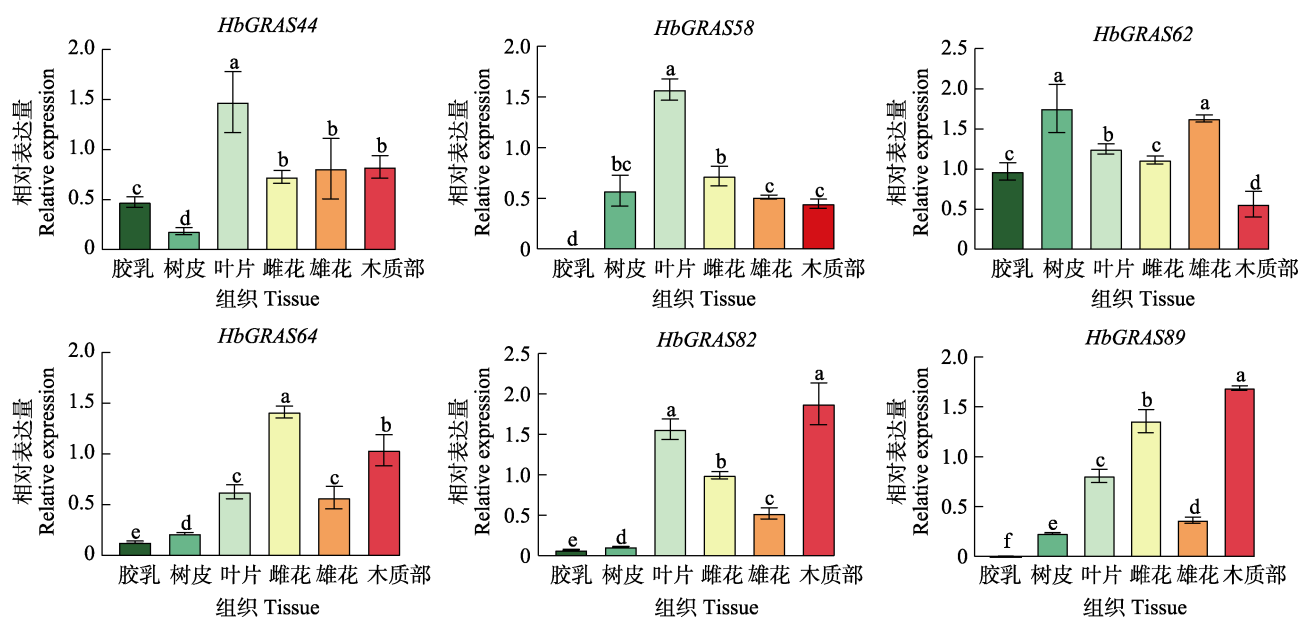
图 7 橡胶树不同叶片发育时期中 *HbGRAS* 基因表达模式

Fig. 7 Expression patterns of *HbGRAS* genes in leaves at different developmental stages of *H. brasiliensis*

HbGRAS89 均分别为木质部和胶乳（图 8）。造成 *HbGRAS62* qPCR 和 RNA-Seq 表达模式不一致的原因可能与 2 种技术本身的差异（即转录组测序是对该基因的所有转录本定量，而 qPCR 则可能

不能代表所有的转录本)有关。在不同节间木质部中,除 *HbGRAS62* 外,其余 5 个橡胶树 *DELLA* 基因均随木质化程度加深上调表达(图 9),说明

橡胶树 *DELLA* 基因可能参与橡胶树茎的次生细胞壁形成。外源 GA_3 处理抑制 *DELLA* 亚家族成员表达(图 10),说明 *DELLA* 基因表达受 GA 调控。

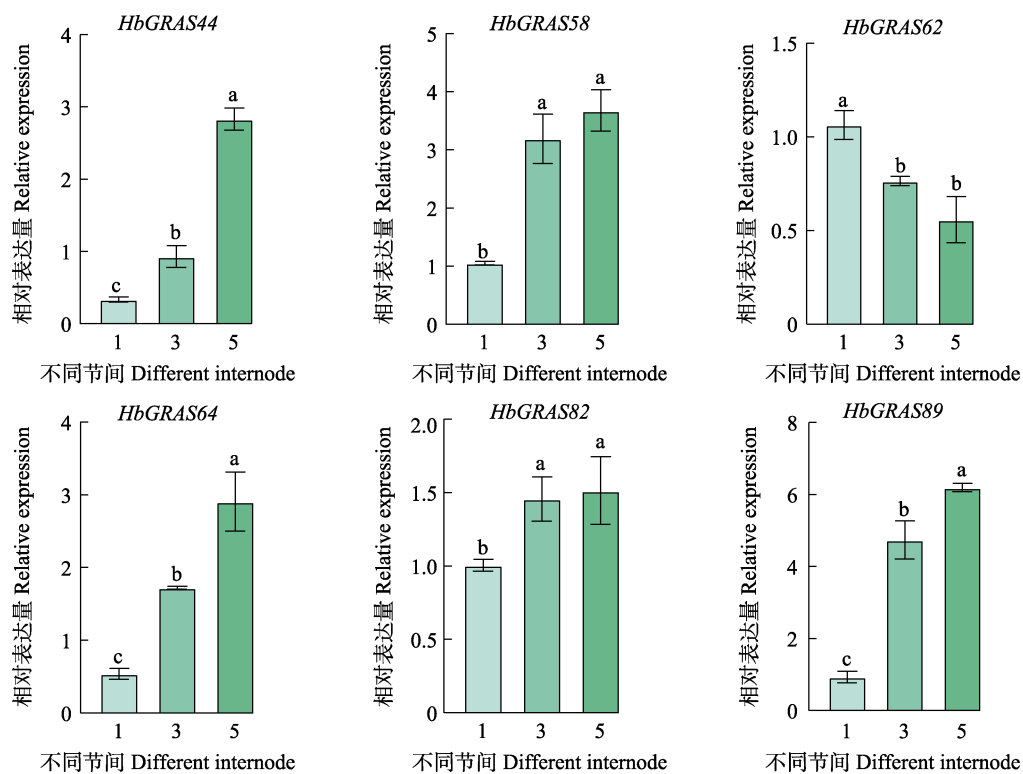


不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 8 橡胶树不同组织中 *HbDELLA* 基因表达模式

Fig. 8 Expression patterns of *HbDELLA* genes in different tissues of *H. brasiliensis*

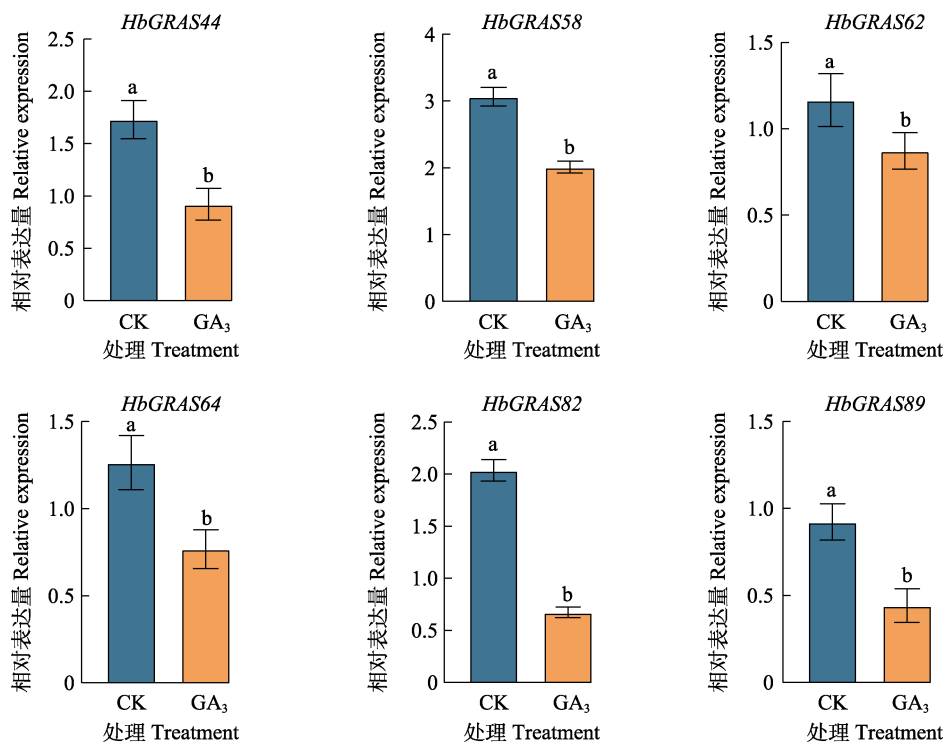


不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 9 橡胶树不同节间中 *HbDELLA* 基因表达模式

Fig. 9 Expression patterns of *HbDELLA* genes in different internodes of *H. brasiliensis*



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 10 GA_3 处理下橡胶树 *HbDELLA* 基因表达模式

Fig. 10 Expression patterns of *HbDELLA* genes under GA_3 treatment of *H. brasiliensis*

3 讨论

GRAS 作为植物中特有的一类转录因子，在植物的生长发育以及非生物胁迫应答中具有重要的调控作用，但目前在橡胶树中尚无该转录因子家族分析相关的研究报道。本研究从橡胶树全基因组中筛选并鉴定到 HbGRAS 基因家族成员 91 个，所有 HbGRAS 蛋白在结构上存在显著差异，表明其高度复杂。其成员数量与拟南芥 (33 个)、水稻 (60 个)、玉米 (86 个)、葡萄 (43 个)、辣椒 (50 个)^[46]、杨树 (106 个)、苹果 (127 个)^[47] 等物种相比差异较大，较同科的木薯 (77 个)、蓖麻 (48 个) 和麻风树 (48 个) 中 GRAS 基因数量明显增加，且蛋白长度在 117~824 个氨基酸之间变化，这种较大的差异可能与基因组大小或基因复制事件有关^[20]。系统进化分析显示，HbGRAS 蛋白可分为 14 个亚家族，而在水稻的每个亚群中均鉴定到 HbGRAS 蛋白，这表明 GRAS 家族的分化可能早于单、双子叶植物的分化。橡胶树 GRAS 亚族数量与木薯一致^[20]，其中 LISCL 成员最多 (16 个, 17.58%)，与拟南芥和水稻等植物相似^[15]，表明这些 GRAS 基因家族在长期进化过程中可能具有较强的分化能力。基于系统进化关系和多序

列比对结果，发现大多数 HbGRAS 蛋白的 N 端包含 1 个高度无序的区域，这导致了 GRAS 蛋白的多样化，并影响了其功能分化。DELLA 亚家族蛋白 N 端相对保守。橡胶树 DELLA 亚家族成员中除 HbGRAS62 无 DELLA 保守结构域外，其余 5 个均含有 DELLA 结构域，这可能是 *HbGRAS62* 在进化过程中发生了 *DELLA* 基因的丢失事件，或者该基因不包含典型的“DELLA”和“DXLLX”五肽结构而导致^[48]。

分析 91 个 *HbGRAS* 基因的内含子和外显子结构发现，无内含子的 *HbGRAS* 基因比例 (69.23%) 与同科的木薯 (53.25%)^[20]、蓖麻 (78.3%)^[22] 和麻风树 (95.83%)^[21] 类似，均较高。内含子可以增加基因长度及重组频率，有利于物种进化^[49]。虽然内含子较少的基因在物种进化或重组中没有优势，但它们往往对压力反应迅速^[50]。因此，推测许多橡胶树 GRAS 基因成员可能会对环境变化做出快速响应。

基因扩增是基因组进化的重要驱动力，可以导致新的功能基因的产生和新物种的分化，从而使植物在进化过程中更好地适应环境^[17]。染色体定位结果显示，*HbGRAS* 基因位于除 Chr11 外的

几乎所有染色体上,这可能是进化过程中发生片段丢失或染色体移位导致。同时,发现有 17 个 *HbGRAS* 基因 (18.68%) 发生串联重复事件,所有具有串联重复序列的 *HbGRAS* 基因均来自同一亚家族,且主要集中在 LISCL 亚家族中 (58.82%)。这意味着,基因复制保留在全基因组复制后存在一定程度的偏倚,不同亚家族的保留和丢失也不同。另外,有研究发现,如果蛋白质与基因编码的其他产物存在相互作用,则在复制事件发生后,这类基因会发生偏置^[51]。共线性分析显示,片段重复区域中有 87 个 *HbGRAS* 基因 (95.6%),说明片段重复在橡胶树 *GRAS* 基因进化中可能发挥主要作用。

GA 促进植物次生细胞壁形成^[52], *DELLA* 通过与相关转录因子互作调控水稻次生细胞壁中纤维素合成^[53]。外施 GA₃ 抑制橡胶树木质部 *DELLA* 表达, *DELLA* 亚家族成员 *HbGRAS82* 和 *HbGRAS89* 在木质部中高表达,且随橡胶树木质化程度加深上调表达,故推测它们可能参与橡胶树次生细胞壁的形成。拟南芥 *DELLA* 蛋白竞争性地阻止阻遏蛋白 JAZ 与转录因子 MYC2 结合,从而提高 MYC2 对靶基因的调控能力^[54]; WILD 等^[55]证实拟南芥 RGL3 能分别与 MYC2 和 JAZ 蛋白互作,进而调控 JA 介导的响应; MYC2 是调控橡胶生物合成途径之一——JA 信号途径的关键因子。吴绍华等^[56]发现割胶和 MeJA 调控橡胶树 *HbGAIP-B* 基因的表达。本研究结果显示橡胶树 *DELLA* 亚家族成员在胶乳中均有表达,且除 *HbGRAS44* 外其他成员都含有 MeJA 响应元件。据此,推测橡胶树 *DELLA* 基因可能通过调控 JA 信号途径参与橡胶生物合成。以上结果为进一步研究橡胶树 *GRAS* 基因的生物学功能、调控橡胶树生长发育与逆境响应的分子机制奠定了一定的理论基础。

参考文献

- [1] HO-PLÁGARO T, MOLINERO-ROSALES N, FLORES D F, DÍAZ M V, GARCÍA-GARRIDO J M. Identification and expression analysis of GRAS transcription factor genes involved in the control of arbuscular mycorrhizal development in tomato[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019 (10): 14.
- [2] BIRKENBIHL R P, JACH G, SAEDLER H, HUIJSER P. Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 352(3): 585-596.
- [3] PENG J R, CAROL P, RICHARDS D E, KING K E, COWLING R J, MURPHY G P, HARBERD N P. The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses[J]. *Genes and Development*, 1997, 11(23): 3194-3205.
- [4] SILVERSTONE A L, CIAMPAGLIO C N, SUN T P. The *Arabidopsis* *RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway[J]. *The Plant Cell*, 1998, 10(2): 155-169.
- [5] DILAURENZIO L, WY SOCKADILLER J, MALAMY J E, PYSH L, HELARIUTTA Y, FRESHOUR G, HAHN M G, FELDMANN K A, BENFEY P N. The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root[J]. *Cell*, 1996, 86(3): 423-433.
- [6] WASEEM M, NKURIKIYIMFURA O, NIYITANGA S, JAKADA B H, SHAHEEN I, ASLAM M M. GRAS transcription factors emerging regulator in plants growth, development, and multiple stresses[J]. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(10): 9673-9685.
- [7] PYSH L D, WY SOCKA-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[J]. *The Plant Journal*, 1999, 18(1): 111-119.
- [8] ITOH H, UEGUCHI-TANAKA M, SATO Y, ASHIKARI M, MATSUOKA M. The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of *SLENDER RICE1* in nuclei[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14(1): 57-70.
- [9] SUN X L, 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[J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 77(3): 205-223.
- [10] HUANG W, XIAN Z Q, KANG X, TANG N, LI Z G. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of GRAS gene family in tomato[J]. *BMC Plant Biology*, 2015, 15: 209.
- [11] WANG Y X, LIU Z W, WU Z J, LI H, WANG W L, CUI X, ZHUANG J. Genome-wide identification and expression analysis of GRAS family transcription factors in tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 3949.
- [12] GRIMPLET J, AGUDELO-ROMERO P, TEIXEIRA R T, MARTINEZ-ZAPATER J M, FORTES A M. Structural and functional analysis of the GRAS gene family in grapevine indicates a role of GRAS proteins in the control of develop-

- ment and stress responses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 353.
- [13] SIDHU N S, PRUTHI G, SINGH S, BISHNOI R, SINGLA D. Genome-wide identification and analysis of GRAS transcription factors in the bottle gourd genome[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 9.
- [14] CENCI A, ROUARD M. Evolutionary analyses of GRAS transcription factors in angiosperms[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 273.
- [15] TIAN C G, WAN P, SUN S H, LI J Y, CHEN M S. Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and *Arabidopsis*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 54(4): 519-532.
- [16] GUO Y Y, WE H Y, LI X, LI Q, ZHAO X Y, DUAN X Q, AN Y R, LV W, AN H L. Identification and expression of GRAS family genes in maize (*Zea mays* L.)[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): 17.
- [17] SONG X M, LIU T K, DUAN W K, MA Q H, REN J, WANG Z, LI Y, HOU X L. Genome-wide analysis of the GRAS gene family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp *pekinensis*)[J]. *Genomics*, 2014, 103(1): 135-146.
- [18] LIU X Y, WIDMER A. Genome-wide comparative analysis of the GRAS gene family in *Populus*, *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2014, 32(6): 1129-1145.
- [19] KUMARI P, GAHLAUT V, KAUR E, SINGH S, KUMAR S, JAISWAL V. Genome-wide identification of GRAS transcription factors and their potential roles in growth and development of rose (*Rosa chinensis*)[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2023, 42(3): 1505-1521.
- [20] SHAN Z Y, LUO X L, WU M Y, WEI L M, FAN Z P, ZHU Y M. Genome-wide identification and expression of GRAS gene family members in cassava[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 16.
- [21] WU Z Y, WU P Z, CHEN Y P, LI M R, WU G J, JIANG H W. Genome-wide analysis of the GRAS gene family in physic nut (*Jatropha curcas* L.)[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(4): 19211-19224.
- [22] XU W, CHEN Z X, AHMED N, HAN B, CUI Q H, LIU A Z. Genome-wide identification, evolutionary analysis, and stress responses of the GRAS gene family in castor beans[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7): 16.
- [23] WANG Y J, DENG D X. Molecular basis and evolutionary pattern of GA-GID1-DELLA regulatory module[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2014, 289(1): 1-9.
- [24] HOU X L, LEE L Y C, XIA K F, YEN Y Y, YU H. DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs[J]. *Developmental Cell*, 2010, 19(6): 884-894.
- [25] FELIPO-BENAVENT A, URBEZ C, BLANCO-TOURINÁN N, SERRANO-MISLATA A, BAUMBERGER N, ACHARD P, AGUSTÍ J, BLÁZQUEZ M A, ALABADÍ D. Regulation of xylem fiber differentiation by gibberellins through DELLA-KNAT1 interaction[J]. *Development*, 2018, 145(23): 7.
- [26] WANG Y, YU W T, RAN L F, CHEN Z, WANG C N, DOU Y, QIN Y Y, SUO Q W, LI Y H, ZENG J Y, LIANG A M, DAI Y L, WU Y P, OUYANG X F, XIAO Y H. DELLANAC interactions mediate GA signaling to promote secondary cell wall formation in cotton stem[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 655127.
- [27] TORRES-GALEA P, HIRTREITER B, BOLLE C. Two GRAS proteins, SCARECROW-LIKE21 and PHYTOCHROME A SIGNAL TRANSDUCTION1, function cooperatively in phytochrome a signal transduction[J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(1): 291-304.
- [28] ENGSTROM E M. Phylogenetic analysis of GRAS proteins from moss, lycophyte and vascular plant lineages reveals that GRAS genes arose and underwent substantial diversification in the ancestral lineage common to bryophytes and vascular plants[J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2011, 6(6): 850-854.
- [29] HELARIUTTA Y, FUKAKI H, WYSOCKA-DILLER J, NAKAJIMA K, JUNG J, SENA G, HAUSER M T, BENFEY P N. The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling[J]. *Cell*, 2000, 101(5): 555-567.
- [30] ZHANG B, LIU J, YANG Z E, CHEN E Y, ZHANG C J, ZHANG X Y, LI F G. Genome-wide analysis of GRAS transcription factor gene family in *Gossypium hirsutum* L.[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 348.
- [31] WANG T T, YU T F, FU J D, SU H G, CHEN J, ZHOU Y B, CHEN M, GUO J, MA Y Z, WEI W L, XU Z S. Genome-wide analysis of the GRAS gene family and functional identification of *GmGRAS37* in drought and salt tolerance[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 604690.
- [32] LIU Y F, WANG W. Characterization of the GRAS gene family reveals their contribution to the high adaptability of wheat[J]. *PeerJ*, 2021, 9: e10811.
- [33] NEVES C, RIBEIRO B, AMARO R, EXPOSITO J, GRIMPLET J, FORTES A M. Network of GRAS transcription factors in plant development, fruit ripening and stress responses[J]. *Horticulture Research*, 2023, 10(12): 18.
- [34] JAISWAL V, KAKKAR M, KUMARI P, ZINTA G, GAHLAUT V, KUMAR S. Multifaceted roles of GRAS transcription factors in growth and stress responses in plants[J]. *iScience*, 2022, 25(9): 24.
- [35] ROUSSET A, AMOR A, PUNVICHAI T, PERINO S,

- PALU S, DORGET M, PIOCH D, CHEMAT F. Guayule (*Parthenium argentatum* A. Gray), a renewable resource for natural polyisoprene and resin: composition, processes and applications[J]. *Molecules*, 2021, 26(3): 22.
- [36] LIN T, XU X, DU H L, FAN X L, CHEN Q W, HAI C Y, ZHOU Z J, SU X, KOU L Q, GAO Q, DENG L W, JIANG J S, YOU H L, MA Y H, CHENG Z K, WANG G D, LIANG C Z, ZHANG G M, YU H, LI J Y. Extensive sequence divergence between the reference genomes of *Taraxacum kok-saghyz* and *Taraxacum mongolicum*[J]. *Science China-Life Science*, 2022, 65(3): 515-528.
- [37] LI Y, WEI H R, YANG J, DU K, LI J, ZHANG Y, QIU T, LIU Z, REN Y Y, SONG L J, KANG X Y. High-quality de novo assembly of the *Eucommia ulmoides* haploid genome provides new insights into evolution and rubber biosynthesis[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7(1): 14.
- [38] CHAO J Q, WU S H, SHI M J, XU X, GAO Q, DU H L, GAO B, GUO D, YANG S G, ZHANG S X, LI Y, FAN X L, HAI C Y, KOU L Q, ZHANG J, WANG Z W, LI Y, XUE W B, XU J, DENG X M, HUANG X, GAO X S, ZHANG X F, HU Y S, ZENG X, LI W G, ZHANG L S, PENG S Q, WU J L, HAO B Z, WANG X C, YU H, LI J Y, LIANG C Z, TIAN W M. Genomic insight into domestication of rubber tree[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 13.
- [39] TANG C R, YANG M, FANG Y J, LUO Y F, GAO S H, XIAO X H, AN Z W, ZHOU B H, ZHANG B, TAN X Y, YEANG H Y, QIN Y X, YANG J H, LIN Q, MEI H L, MONTORO P, LONG X Y, QI J Y, HUA Y W, HE Z L, SUN M, LI W J, ZENG X, CHENG H, LIU Y, YANG J, TIAN W M, ZHUANG N S, ZENG R Z, LI D J, HE P, LI Z, ZOU Z, LI S L, LI C J, WANG J X, WEI D, LAI C Q, LUO W, YU J, HU S N, HUANG H S. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation[J]. *Nature Plants*, 2016, 2(6): 10.
- [40] LIU J, SHI C, SHI C C, LI W, ZHANG Q J, ZHANG Y, LI K, LU H F, SHI C, ZHU S T, XIAO Z Y, NAN H, YUE Y, ZHU X G, WU Y, HONG X N, FAN G Y, TONG Y, ZHANG D, MAO C L, LIU Y L, HAO S J, LIU W Q, LV M Q, ZHANG H B, LIU Y, HU-TANG G R, WANG J P, WANG J H, SUN Y H, NI S B, CHEN W B, ZHANG X C, JIAO Y N, EICHLER E E, LI G H, LIU X, GAO L Z. The chromosome-based rubber tree genome provides new insights into spurge genome evolution and rubber biosynthesis[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(2): 336-350.
- [41] CHENG H, SONG X M, HU Y S, WU T K, YANG Q H, AN Z W, FENG S Y, DENG Z, WU W G, ZENG X, TU M, WANG X Y, HUANG H S. Chromosome-level wild *Hevea brasiliensis* genome provides new tools for genomic-assisted breeding and valuable loci to elevate rubber yield[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(5): 1058-1072.
- [42] WEI Y X, SHI H T, XIA Z Q, TIE W W, DING Z H, YAN Y, WANG W Q, HU W, LI K M. Genome-wide identification and expression analysis of the WRKY gene family in cassava[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 25.
- [43] CANNON S B, MITRA A, BAUMGARTEN A, YOUNG N D, MAY G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC Plant Biology*, 2004, 4: 10.
- [44] 戴玉兰. 卫星串联重复序列 pSc119.2 在小麦 7D 染色体上插入区域的确定及邻近序列特征分析[D]. 成都: 四川农业大学, 2023.
- DAI Y L. Determination of insertion site and analysis of adjacent sequence features of satellite tandem repeat pSc119.2 on wheat chromosome 7D[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [45] 白云赫, 朱旭东, 樊秀彩, 王晨, 张文颖, 刘崇怀, 房经贵. 植物 DELLA 蛋白及其应答赤霉素信号调控植物生长发育的研究进展[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(8): 2509-2516.
- BAI Y H, ZHU X D, FAN X C, WANG C, ZHANG W Y, LIU C H, FANG J G. Research progress of plant DELLA proteins and its response to gibberellin signal regulating plant growth and development[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(8): 2509-2516. (in Chinese)
- [46] LIU B L, SUN Y, XUE J N, JIA X Y, LI R Z. Genome-wide characterization and expression analysis of GRAS gene family in pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. *PeerJ*, 2018, 6: e4796.
- [47] FAN S, ZHANG D, GAO C, ZHAO M, WU H Q, LI Y M, SHEN Y W, HAN M Y. Identification, classification, and expression analysis of GRAS gene family in *Malus domestica*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 253.
- [48] WANG P F, ZHANG Q Q, CHEN Y C, ZHAO Y X, REN F S, SHI H M, WU X Y. Comprehensive identification and analysis of *DELLA* genes throughout the plant kingdom[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 12.
- [49] SHABALINA S A, OGURTSOV A Y, SPIRIDONOV A N, NOVICHKOV P S, SPIRIDONOV N A, KOONIN E V. Distinct patterns of expression and evolution of intronless and intron-containing mammalian genes[J]. *Molecular Biology Evolution*, 2010, 27(8): 1745-1749.
- [50] JAIN M, KHURANA P, TYAGI A K, KHURANA J P. Genome-wide analysis of intronless genes in rice and *Arabidopsis*[J]. *Functional and Integrative Genomics*, 2008, 8(1): 69-78.
- [51] FREELING M. Bias in plant gene content following different sorts of duplication: tandem, whole-genome, segmental,

- or by transposition[J]. Annual Review of Plant Biology, 2009, 60: 433-453.
- [52] YE Y F, LIU B M, ZHAO M, WU K, CHENG W M, CHEN X B, LIU Q, LIU Z, FU X D, WU Y J. *CEF1/OsMYB103L* is involved in GA-mediated regulation of secondary wall biosynthesis in rice[J]. Plant Molecular Biology, 2015, 89(4/5): 385-401.
- [53] HUANG D B, WANG S G, ZHANG B C, SHANGGUAN K K, SHI Y Y, ZHANG D M, LIU X L, WU K, XU Z P, FU X D, ZHOU Y H. A gibberellin-mediated DELLA-NAC signaling cascade regulates cellulose synthesis in rice[J]. The Plant Cell, 2015, 27(6): 1681-1696.
- [54] 吴绍华, 张世鑫, 陈月昇, 田维敏. 橡胶树 DELLA 蛋白编码基因 *HbGAI* 的克隆与表达分析[J]. 西北植物学报, 2015, 35(11): 2157-2163.
- WU S H, ZHANG S X, CHEN Y Y, TIAN W M. Cloning and expression analysis of *HbGAI* gene in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.)[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2015, 35(11): 2157-2163. (in Chinese)
- [55] WILD M, DAVIÈRE J M, CHEMINANT S, REGNAULT T, BAUMBERGER N, HEINTZ D, BALTZ R, GENSCHIK P, ACHARD P. The *Arabidopsis* DELLA *RGA-LIKE3* is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses[J]. The Plant Cell, 2012, 24(8): 3307-3319.
- [56] 吴绍华, 郝泽芸, 张世鑫, 邓小敏, 田维敏. 橡胶树 *HbGAIP-B* 基因的克隆与表达分析[J]. 热带作物学报, 2016, 37(5): 881-887.
- WU S H, HAO Z Y, ZHANG S X, DENG X M, TIAN W M. Molecular cloning and expression of *HbGAIP-B* gene in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.)[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2016, 37(5): 881-887. (in Chinese)