DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04078

专题

大麻 GRAS 转录因子家族的全基因组鉴定及镉胁迫下表达分析

尹明 杨大为 唐慧娟 潘根 李德芳 赵立宁 黄思齐*

中国农业科学院麻类研究所 / 农业农村部麻类生物学与加工重点实验室, 湖南长沙 410205

摘要: GRAS 转录因子在植物生长发育及抗逆境胁迫中具有重要作用。本文对大麻 GRAS 转录因子家族进行了全基因组鉴定, 对其理化性质、系统进化发育、基因结构、基因间的共线性关系进行了分析, 并利用云麻 1 号及内蒙古小粒大麻的转录组数据分析其在镉胁迫下的表达量变化。结果表明, 大麻基因组中鉴定出 54 个 GRAS 基因, 96.30% 的基因编码酸性蛋白, 长度为 415~757 aa, 分子质量为 46,405.05~85,748.52 kD, 等电点为 4.77~8.54, 划分为 9 个亚家族, 其中 PAT1、LS、SHR、HAM 保守性较高, PAT1、LISCL、CsGRAS1 出现大量基因串联重复, CSGRAS12 基因在 5 种植物的共线性分析中均存在。将 2 个大麻品种进行镉胁迫处理发现, 云麻 1 号株高下降 10.48%, 鲜重下降 6.33%; 内蒙古小粒大麻株高下降 66.07%, 鲜重下降 42.67%, 表明云麻 1 号较内蒙古小粒大麻更耐镉胁迫。云麻 1 号的 54 个 GRAS 基因中, 42 个(77.78%)基因表达上调 1.05~18.10, 11 个(20.37%)基因表达下调 0.13~0.91; 内蒙古小粒大麻的 54 个 GRAS 基因中, 27 个(50.00%)基因表达上调 1.01~6.46, 27 个(50.00%)基因表达下调 0.30~0.96。将两者 GRAS 基因进行同源基因鉴定并分析其表达情况发现, 耐镉品种云麻 1 号中 40 个同源 GRAS 基因较内蒙古小粒大麻在镉胁迫下的上调或下调幅度更明显, 表明这些 GRAS 基因与镉胁迫有明显相关性。本文可为挖掘和验证大麻 GRAS 基因提供参考。

关键词: 大麻; GRAS 转录因子; 系统发育分析; 基因结构分析; 表达分析

Genome-wide identification of GRAS transcription factor and expression analysis in response to cadmium stresses in hemp (*Cannabis sativa* L.)

YIN Ming, YANG Da-Wei, TANG Hui-Juan, PAN Gen, LI De-Fang, ZHAO Li-Ning, and HUANG Si-Qi*

Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biological and Processing for Bast Fiber Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Changsha 410205, Hunan, China

Abstract: GRAS transcription factors play important roles in plant growth, development and stress responses. In order to systematically analyze the GRAS transcription factor family in hemp, we performed a genome-wide identification of hemp GRAS genes, analyzed their physical and chemical properties, phylogenetic development, gene structure, and GRAS gene expression under cadmium stress in two hemp varieties (Yunma 1 and Inner Mongolia Xiaolidama). The results showed that there were 54 GRAS transcription factors in hemp genome, with the protein length from 415 to 757, encoding 96.30% of acidic proteins, the molecular weight from 46,405.05 to 85,748.52 kD and the isoelectric point from 4.77 to 8.54. These transcription factors were divided into nine subfamilies, among which, PAT1, LS, SHR, and HAM were more conserved, PAT1, LISCL, and CsGRAS1 had a large number of tandem repeats of genes, and CSGRAS12 genes were all present in collinearity analysis of five plants. Yunma 1 and Inner Mongolia Xiaolidama were treated with cadmium stress. Plant height and the fresh weight decreased in Yunma 1 and Inner Mongolia Xiaolidama, by 10.48%, 6.33% and 66.07%, 42.67%, respectively, indicating that Yunma 1 was more tolerant than Inner Mongolia Xiaolidama under cadmium stress. Among 54 GRAS genes in Yunma 1, 42 genes (77.78%) were up-regulated by 1.05–18.10, and 11 genes (20.37%) were down-regulated by 0.13–0.91. Among 54 GRAS genes in small-grain cannabis in Inner Mongolia, 27 genes (50.00%) were up-regulated by 1.01–6.46, and 27 genes (50.00%) were down-regulated by 0.30–0.96. This study showed that the 40 homologous GRAS gene in Yunma 1 were significantly up- or down-regulated than those in Inner Mongolia Xiaolidama under cadmium stress, indicating that these GRAS genes were significantly related to cadmium stress. This

本研究由国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-16-E02)资助。

This study was supported by the China Agriculture Research System (CARS-16-E02).

* 通信作者(Corresponding author): 黄思齐, E-mail: huangsiqi@caas.cn

第一作者联系方式: E-mail: 1586887698@qq.com

Received (收稿日期): 2020-03-27; Accepted (接受日期): 2020-11-13; Published online (网络出版日期): 2020-12-28.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20201228.1501.010.html>

study can provide a reference for subsequent mining and verification of GRAS genes in hemp.

Keywords: hemp; GRAS transcription factors; phylogenetic analysis; gene structure analysis; expression analysis

转录因子是一类能与基因序列上游特定序列结合的蛋白质,通过改变基因表达来调节生物学过程,在植物生长发育及对外界胁迫的响应中发挥重要作用^[1-2]。GRAS 转录因子由 *GAI*、*RGA* 和 *SCR* 3 个早期鉴定的功能基因而命名,被认为在植物的生长与抗逆境胁迫中具有重要作用,早期被认为只存在于植物中,近期发现细菌中也含有该基因家族,并有研究提出 GRAS 基因家族最早出现在细菌中的折叠甲基转移酶超家族中^[3-4]。GRAS 蛋白质一般至少由 350 个氨基酸组成^[5],包括 1 个高度保守的 C 端和 1 个可变的 N 端,其 C 端由 SAW、LRI、LRII、PFYRE 和 VHIID 5 个保守基序组成,其中 VHIID 最为保守,是 GRAS 蛋白的核心结构,存在于所有亚家族成员中^[6-8]。有研究发现,N 端是 GRAS 蛋白发挥特异性功能的重要部位,因为 N 末端含有 IDRs 序列,该序列表达时会与不同蛋白质结合,而后能够表现出蛋白质的特异性^[9-10]。早期的拟南芥 GRAS 基因分为 LS、PAT1、SCL3、DELLA、LISCL、SCR、HAM 和 SHR 8 个亚家族^[11],随后有研究在 8 个亚家族的基础上新增了 DLT 和 SCL4/7 亚家族,将 GRAS 基因分为 10 个亚家族^[12],不同的 GRAS 亚家族导致了该基因家族功能的多样性。有研究发现,GRAS 基因在植物根的形态建成、茎段分生组织的分化、激素信号转导、逆境胁迫响应等过程中发挥重要作用^[13-14]。比如 SCR 和 SHR 亚家族参与拟南芥侧根的发育,SHR/SCR/SCL3 在番茄丛枝菌根化过程中可能参与调控赤霉素^[15-16];PAT1 分支中的 PAT1 和 SCL21 参与了光敏色素 A (phytochrome, phyA) 的信号转导,使下胚轴在脱黄化时逐渐拉长^[17]; *OsDLT* 和 *OsGRAS19* 在水稻的油菜素类固醇 (brassinosteroids, BR) 信号转导中作为正向调节因子发挥作用^[18]。

目前多种植物的 GRAS 基因家族都已进行了全基因的鉴定与分析,在拟南芥^[19]、水稻^[20]、木薯^[21]、棉花^[22]和小麦^[5]中分别存在 34、60、77、150 和 153 个 GRAS 基因。在各个植物都开始深入研究和挖掘该基因家族时,众多麻类作物中尤其是大麻都还未见相关报道。大麻(*Cannabis sativa* L.)又称汉麻,用于纺织、医药、护肤保健等领域,其中四氢大麻酚 (tetrahydrocannabinol, THC) 含量低于 0.3% 的称为工

业大麻,近年来由于发现大麻对重金属具有较强的耐性,且具有较高的经济价值,大麻开始被用于修复重金属污染土壤^[23],有研究发现重金属可以降低大麻中的 THC 含量,并提升其大麻二酚(cannabidiol, CBD)含量^[24]。随着国际上对工业大麻的解禁及 CBD 医疗市场的扩大,培育耐重金属及其他非生物胁迫的工业大麻品种显得十分重要。而 GRAS 基因与植物生长及耐非生物胁迫有着密切的关系,已有研究发现,过表达玉米 *ZmGRAS31* 基因,可以改善玉米的耐盐性^[25];过表达山葡萄 *VaPAT1* 基因可以显著提高了拟南芥的耐旱性、耐寒性和耐盐性^[26],过表达毛竹 *PeSCL3* 基因可增强其耐旱性^[27],过表达小麦 *AtSCL14* 可增强其耐光氧化胁迫的能力^[5],虽然这些研究已证明 GRAS 家族与植物的非生物胁迫有关,但在 GRAS 家族与重金属镉胁迫之间还未有相关研究。

本研究旨在通过生物信息学方法在全基因组水平上对大麻 GRAS 基因的组成进行鉴定,分析其理化性质、进化关系、基因结构、共线性关系,同时利用 2 个大麻的镉胁迫下转录组数据及其 qPCR 验证分析该基因家族表达情况,以期为后续研究大麻 GRAS 基因功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 大麻 GRAS 基因的鉴定与理化性质分析

从 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载大麻基因组^[28]文件与基因组注释文件 (assembly number: GCA_900626175.2),从 TAIR 数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>) 中下载拟南芥 GRAS 基因序列。利用软件 TBtools 将拟南芥 GRAS 基因与大麻基因组进行 blast 序列比对 ($E\text{-value} < 1e-5$),筛选大麻中的 GRAS 家族候选基因。将候选基因提交至 uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)进行批量比对,验证候选基因是否含有 GRAS 保守结构域,删除假阳性基因。利用在线分析软件 ExPASy Proteomics (http://web.expasy.org/compute_pi)分析理化性质。

1.2 大麻 GRAS 基因系统进化树的构建和基因结构分析

将拟南芥与大麻的 GRAS 蛋白序列导入软件

MEGA 7.0 进行比对, 将比对后的结果采用相邻连接法(Neighbor-Joining, NJ; 执行参数: Bootstrap method 1000)构建系统进化树, 并利用软件 FigTree 完善美化进化树。利用在线软件 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)进行蛋白结构预测, 检测大麻 GRAS 的蛋白结构域(E-value<0.01)。利用在线软件 MEME (<http://meme-suite.org/>)分析大麻 GRAS 基因保守基序(Motif), 设定预测数为 10。利用软件 TBtools 从大麻基因组注释文件中提取大麻 GRAS 的相关编码序列(Coding Sequence: CDS)、非翻译区(Untranslated Region: UTR)。利用 TBtools 将进化树、蛋白结构域、基因保守基序、CDS、UTR 结合, 构建 GRAS 进化关系与结构的整体对比图。

1.3 大麻 GRAS 基因的染色体分布与共线性预测

利用软件 TBtools 从大麻基因组文件与基因注释文件中提取 GRAS 基因位置信息, 并构建 GRAS 基因在染色体上的物理图谱。利用软件 TBtools、MCScanX 和 Circos 计算并绘制大麻 GRAS 在染色体上存在的串联重复, 大麻不同染色体之间存在的共线性基因, 大麻与大豆(*Glycine max*)、雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*)、玉米(*Zea mays* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)不同物种间存在的共线性基因。

1.4 材料培养及处理与转录组测序

本试验选取 2 个大麻品种籽粒大小较一致的种子, 置于黑暗条件下 25℃ 萌发 3 d, 将幼苗移至 1/4 Hoagland 营养液中生长 5 d, 昼夜温度 24℃/16℃, 光周期 16 h/8 h (明/暗), 相对湿度 60%, 光强度 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。对生长 5 d 的幼苗进行处理: 对照(仅营养液) 12 h, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 的 CdCl_2 处理 12 h。在 2 个处理下取长势一致的植株, 用 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen)提取总 RNA, 并溶于无 RNase 的水中(TransGen Biotech, 中国), 用 NanDrop 2000 (Thermo Scientific, 美国)检测 RNA 的质量、纯度和完整性。使用 Illumina Truseq RNA 样品制备试剂盒构建 cDNA 文库, 设 3 个生物学重复, 之后进行转录组测序。通过 Illumina 测序平台(Illumina HiSeq 4000)进行测序, 通过 CASAVA Base Calling 分析将原始测序数据转换为 Sequenced Reads 或 Raw Reads, 并再次过滤以获取高质量的纯净读数。利用 TopHat2 与 HISAT2 两个软件将质控后的数据与 *Cannabis sativa* (版本号 GCF_900626175.2)参考基因组^[28]进行对比, 使用 String Tie 或 Cufflinks 软件对 Mapped Reads 进行拼接。将转录组原始数据匹配至全基因组分析得

到的工业大麻 GRAS 基因并统计 reads 数量, 并进一步换算成 FPKM 值进行比对分析。

1.5 实时荧光定量 PCR 验证

本试验随机选取转录组中 12 个 GRAS 家族基因进行实时荧光定量 PCR 验证, 利用 Primer 3 plus 设计荧光定量 PCR 引物, 内参基因选取 *Hemp actin*^[29], 其上下游引物序列为 Sense: 5'-CCAATAGCCTTG CATTCCAT-3'; Anti-sense: 5'-TCGATTGGAAAGC CGAATAC-3'。试验仪器使用 Bio-Rad (伯乐) CFX Connect 荧光定量 PCR 仪, 所取样品与 RNA-Seq 所选样品一致, 使用 TIANGEN 试剂盒提取 RNA, 用 TaKaRa 反转录试剂盒合成 cDNA, 利用 Aidlab 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 验证。反应条件为 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 GRAS 基因成员的鉴定及其理化性质分析

利用拟南芥 GRAS 基因与大麻基因组进行序列比对, 将获得的基因在 Swissport 数据库中进行结构域分析, 筛选出具有 GRAS 保守结构域的基因, 最终鉴定出 54 个大麻 GRAS 基因, 根据大麻基因 CDS 片段, 将 54 个 GRAS 基因命名为 *CsGRAS01~CsGRAS54* (表 1)。大麻 GRAS 蛋白长度为 415~757 aa, 平均长度 586 aa; 分子质量为 46,405.05~85,748.52 kD, 平均分子质量 66,199.41 kD; 等电点为 4.77~8.54, 其中等电点小于 7 的 GRAS 蛋白有 52 个, 偏酸性; 其余的 2 个 GRAS 蛋白等电点大于 7, 偏碱性。

2.2 GRAS 基因的系统进化树构建和基因结构分析

为深入理解大麻 GRAS 不同基因间的进化关系, 通过构建大麻与拟南芥中 GRAS 基因进化树, 将大麻中 54 个 GRAS 基因分成 LS、LISCL、SCR、HAM、SCL3、DELLA、PAT1、SHR、CsGRASA、CsGRASB 共 10 个亚家族(图 1)。其中 PAT1 亚家族成员最多, 含 13 个基因; SCL3 亚家族成员最少, 含 1 个基因。大麻中新鉴定出 2 个亚家族, CsGRASA 含有 5 个成员, CsGRASB 含有 3 个成员, 2 个亚家族都不含任何拟南芥 GRAS 成员, 单独形成一个分支, 而且亲缘关系较远。从图 2 可以看出, 相同亚家族的基因结构基本一致, 相同亚家族的保守基序也具有相似性, 表明同一个亚家族的基因具有相似的功能。在大麻 GRAS 基因中, 83.33% (45/54)的基因无内含子,

表 1 GRAS 基因及相关信息

Table 1 GRAS genes and their related information

基因名称 Gene name	NCBI 基因登录号 NCBI gene accession	蛋白长度 Length (aa)	等电点 pI	分子量 Molecular weight (kD)
<i>CsGRAS1</i>	LOC115696991	458	4.77	52,006.96
<i>CsGRAS2</i>	LOC115698980	494	5.15	54,901.55
<i>CsGRAS3</i>	LOC115698988	724	5.99	81,047.24
<i>CsGRAS4</i>	LOC115700662	455	5.66	49,596.06
<i>CsGRAS5</i>	LOC115701004	454	6.68	50,178.21
<i>CsGRAS6</i>	LOC115702418	528	5.24	57,541.56
<i>CsGRAS7</i>	LOC115703632	559	6.21	62,215.78
<i>CsGRAS8</i>	LOC115705736	722	5.77	78,760.91
<i>CsGRAS9</i>	LOC115705815	722	5.72	78,817.91
<i>CsGRAS10</i>	LOC115705915	721	5.74	78,730.89
<i>CsGRAS11</i>	LOC115706185	539	5.51	59,352.41
<i>CsGRAS12</i>	LOC115707313	544	6.33	61,258.62
<i>CsGRAS13</i>	LOC115710202	582	4.92	64,716.73
<i>CsGRAS14</i>	LOC115710247	582	4.92	64,716.73
<i>CsGRAS15</i>	LOC115710247	582	4.92	64,716.73
<i>CsGRAS16</i>	LOC115710247	582	4.92	64,716.73
<i>CsGRAS17</i>	LOC115710247	582	4.92	64,716.73
<i>CsGRAS18</i>	LOC115710247	582	4.92	64,716.73
<i>CsGRAS19</i>	LOC115710247	582	4.92	64,716.73
<i>CsGRAS20</i>	LOC115710262	514	4.93	57,833.13
<i>CsGRAS21</i>	LOC115711337	467	5.82	52,554.66
<i>CsGRAS22</i>	LOC115711473	549	6.13	61,322.10
<i>CsGRAS23</i>	LOC115712444	497	5.28	56,735.16
<i>CsGRAS24</i>	LOC115712525	504	5.68	56,355.13
<i>CsGRAS25</i>	LOC115712712	613	5.08	67,527.83
<i>CsGRAS26</i>	LOC115712875	508	6.30	56,609.53
<i>CsGRAS27</i>	LOC115714404	622	5.33	68,325.01
<i>CsGRAS28</i>	LOC115714408	600	5.95	66,439.36
<i>CsGRAS29</i>	LOC115715793	628	5.08	71,316.90
<i>CsGRAS30</i>	LOC115716239	617	6.03	68,009.17
<i>CsGRAS31</i>	LOC115716331	700	5.99	76,887.41
<i>CsGRAS32</i>	LOC115716409	616	6.19	67,882.02
<i>CsGRAS33</i>	LOC115716431	752	6.29	82,128.85
<i>CsGRAS34</i>	LOC115717012	697	5.36	77,185.61
<i>CsGRAS35</i>	LOC115718811	645	6.73	73,634.61
<i>CsGRAS36</i>	LOC115718865	746	5.80	85,106.83
<i>CsGRAS37</i>	LOC115718865	709	5.66	80,996.82
<i>CsGRAS38</i>	LOC115718866	630	7.24	72,454.10
<i>CsGRAS39</i>	LOC115718867	621	5.69	71,491.35
<i>CsGRAS40</i>	LOC115718867	551	6.37	63,913.20
<i>CsGRAS41</i>	LOC115718867	506	8.54	58,824.80
<i>CsGRAS42</i>	LOC115719316	749	5.03	84,965.93
<i>CsGRAS43</i>	LOC115719656	757	5.10	85,748.52
<i>CsGRAS44</i>	LOC115719656	636	5.20	73,211.22

(续表 1)

基因名称	NCBI 基因登录号	蛋白长度	等电点	分子量
Gene name	NCBI gene accession	Length (aa)	pI	Molecular weight (kD)
<i>CsGRAS45</i>	LOC115719730	698	5.68	78,688.43
<i>CsGRAS46</i>	LOC115722004	577	4.94	66,178.24
<i>CsGRAS47</i>	LOC115723037	575	5.14	64,688.92
<i>CsGRAS48</i>	LOC115723133	436	5.58	49,164.54
<i>CsGRAS49</i>	LOC115723500	454	6.00	51,420.59
<i>CsGRAS50</i>	LOC115724710	577	6.05	64,503.06
<i>CsGRAS51</i>	LOC115724919	548	5.14	61,008.73
<i>CsGRAS52</i>	LOC115724919	415	5.20	46,405.05
<i>CsGRAS53</i>	LOC115725148	463	5.64	52,596.41
<i>CsGRAS54</i>	LOC115725491	756	6.16	85,229.91

图 1 大麻、拟南芥的 GRAS 基因系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of GRAS family in hemp and *Arabidopsis*

不同颜色表示不同的亚家族。同一颜色的不同基因均属同一亚家族。

Different colors indicate different subfamily, and different genes under the same color belong to the same subfamily.

图 2 大麻 GRAS 基因结构分析

Fig. 2 Gene structure analysis of GRAS genes in hemp

DELLA 亚家族有 3 个基因, 其中 *CsGRAS3* 的 Motif 分析中未发现 DELLA 结构域, 可能是相邻连接法的算法将基因错误划分到了 DELLA 亚家族, 也有可能是其高度可变的 N 端序列差异导致其不能与同一亚家族的基因进行聚类, 水稻中 GRAS 家族成员也有相似的结果^[30]。在所有大麻 GRAS 基因成员中都含有基序 1、3、5, 表明这 3 个基序在 GRAS 中高度保守(图 3), 具有重要作用。

2.3 大麻 GRAS 基因的染色体分布与共线性分析

大麻染色体上 GRAS 基因位置分析表明, 大麻 GRAS 基因分布在 10 个染色体上, 与染色体长短无显著相关性(图 4)。染色体 NC6 包含 10 个 GRAS 基

因, NC1 包含 9 个 GRAS 基因, 为含 GRAS 基因最多的 2 个染色体; NC9 包含的 GRAS 基因最少, 只有 1 个; 其他染色体包含 3~6 个 GRAS 基因。其中 5 个染色体上出现了基因的串联重复情况, 尤其在 NC1、NC6、NC7 三个染色体上, 出现了大量 GRAS 基因的串联重复(相同染色体上基因有红色线段连接, 表示相关基因为串联重复基因), 串联重复基因占全部 GRAS 基因的 44.44%, 表明大麻 GRAS 家族发生过明显的基因串联复制事件, 也表明基因串联重复事件在大麻 GRAS 家族的扩展中具有关键作用。通过大麻染色体间的共线性分析(有红色线段连接的为共线性基因)发现 4 对共线性基因(图 5), 除

(图 3)

图 3 大麻 GRAS 基因基序

Fig. 3 Gene motifs of GRAS in hemp

CsGRAS8 与 *CsGRAS9* 属 HAM 亚家族, 其他均分属不同亚家族, 这些基因是通过复制而得到相同连续顺序的旁系同源基因^[28]。通过旁系同源基因的预测, 我们了解到 NC5、NC6、NC8、NC10 等 4 个染色体可能经历过染色体的片段复制, 而这 4 个染色体都能联系到 NC10, 表明 NC10 可能是 4 个染色体中 GRAS 家族的关键染色体。为进一步了解大麻 GRAS 家族的进化机制, 构建了大麻与雷蒙德氏棉、大豆、水稻、玉米的 GRAS 家族共线性关系图(图 6 和图 7), 这 4 种植物分别属于双子叶与单子叶植物。最终鉴定出大麻与雷蒙德氏棉有 32 对直系同源基因、与大豆有 45 对直系同源基因、与水稻有 5 对直系同源基因、与玉米有 2 对直系同源基因, 这也符合大麻与 4 种对应植物的进化关系。对 5 种植物进行共线性分析发现, *GRAS6*、*GRAS8~10*、*GRAS14~19*、*GRAS23*、*GRAS33* 在 5 种植物中未被鉴定到, 其中大部分都是串联重复基因, 可能是大麻原有 GRAS 基因进行串联重复扩增而来, 这些基因可能是双子叶与单子叶植物 GRAS 基因功能差异的相关基因^[31], 而 *GRAS12* 在 5 种植物中都被鉴定到, 且该基因包含 GRAS 基因中的 motif 1~10, 推测该基因可能是双子叶植物与单子叶植物分化前就存在的 GRAS 基因。

2.4 镉胁迫下不同大麻耐性筛选

将云麻 1 号、甘肃大麻、内蒙古小粒大麻、内

蒙古油用大麻、内蒙古土右旗大麻、皖大麻 6 种大麻进行镉胁迫萌发试验发现, 云麻 1 号发芽率最高, 内蒙古小粒大麻发芽率最低。在镉胁迫水培试验中, 云麻 1 号镉处理组和对照组平均株高分别为 9.4 cm、10.5 cm, 平均鲜重分别为 7.4 g、7.9 g; 内蒙古小粒大麻镉处理组和对照组平均株高分别为 3.8 cm、11.2 cm, 平均鲜重分别为 4.3 g、7.5 g。在重度镉污染耕地中, 云麻 1 号鲜重产量达 21,134.40 kg hm⁻², 内蒙古小粒大麻鲜重产量达 11,173.95 kg hm⁻², 表明云麻 1 号较内蒙古小粒大麻更耐镉胁迫^[32]。

2.5 两个大麻品种在镉胁迫下 GRAS 基因的表达分析及 qPCR 验证

为了解大麻 GRAS 基因在正常条件及镉胁迫条件下的表达情况, 对云麻 1 号及内蒙古小粒大麻在 2 个环境下的植株进行了转录组测定, 表中各组基因的表达量均为 3 个重复的平均数。结果显示, 在云麻 1 号的转录组数据中(表 2), 11 个基因表达下降(占比 20.37%), 下降倍数为 0.13~0.91, 42 个基因表达上调(占比 77.78%), 上调倍数为 1.05~18.10; 1 个基因表达未发生变化(占比 1.85%); 其中 28 个基因变化值差异显著。在内蒙古小粒大麻的转录组数据中(表 3), 27 个基因表达下降(占比 50.00%), 下降倍数为 0.30~0.96, 27 个基因表达上调(占比 50.00%), 上调倍数为 1.01~6.46; 其中 18 个基因变化值差异显

图 4 大麻 GRAS 基因的染色体定位

Fig. 4 Chromosomal locations of GRAS genes in hemp

图 5 大麻染色体间 GRAS 基因共线性分析
Fig. 5 GRAS synteny analysis among chromosomes in hemp

图 6 雷蒙德氏棉、大麻、水稻间 GRAS 基因共线性分析
Fig. 6 Synteny analysis of GRAS genes between *Gossypium raimondii*, *Cannabis sativa* L., and *Oryza sativa* L.

著。将表 2 与表 3 中 GRAS 基因按照增长倍数递增而排列, 云麻 1 号与内蒙古小粒大麻中 GRAS 基因家族部分基因对照组(CK 组)表达量均为 0, 无法计算倍数, 改为增加量(Cd-CK)。

2.6 两个大麻品种中同源基因对比及 qPCR 验证
为进一步对比 2 个品种 GRAS 基因的表达情况变化, 本研究将 2 个品种的 GRAS 家族基因在正常环境下(YCK 与 NCK)及镉胁迫环境下(YCd 与 NCd)

图 7 大豆、大麻、玉米间 GRAS 基因共线性分析
Fig. 7 Synteny analysis of GRAS genes between *Glycine max*, *Cannabis sativa* L., and *Zea mays* L.

图 8 两个大麻品种在正常环境与镉胁迫环境的生长状况
Fig. 8 Growth status of two hemp varieties under normal and cadmium stress environment

表 2 云麻 1 号 GRAS 基因表达
Table 2 Relative expression of GRAS genes in Yunma 1

基因名称 Gene name	云麻 1 号对照组 Yunma 1 control check	云麻镉胁迫组 Yunma 1 cadmium stress	变化值 Fold change	基因名称 Gene name	云麻对照组 Yunma 1 control check	云麻镉胁迫组 Yunma 1 cadmium stress	变化值 Fold change
<i>CsGRAS24</i>	2.44	0.33	0.13*	<i>CsGRAS28</i>	2.31	4.07	1.76*
<i>CsGRAS46</i>	4.02	0.58	0.14*	<i>CsGRAS13</i>	4.74	9.76	2.06*
<i>CsGRAS25</i>	42.77	20.24	0.47*	<i>CsGRAS32</i>	13.12	27.08	2.06*
<i>CsGRAS33</i>	6.56	3.12	0.48*	<i>CsGRAS52</i>	8.33	18.67	2.24*
<i>CsGRAS2</i>	1.62	0.78	0.48	<i>CsGRAS1</i>	0.21	0.46	2.24
<i>CsGRAS11</i>	30.07	14.91	0.50*	<i>CsGRAS29</i>	0.21	0.46	2.24
<i>CsGRAS22</i>	1.63	0.91	0.56	<i>CsGRAS12</i>	19.52	44.15	2.26*
<i>CsGRAS54</i>	6.20	4.59	0.74	<i>CsGRAS30</i>	7.67	18.41	2.40*
<i>CsGRAS6</i>	0.32	0.28	0.88	<i>CsGRAS5</i>	0.37	0.97	2.65
<i>CsGRAS42</i>	9.74	8.87	0.91	<i>CsGRAS7</i>	1.00	2.68	2.69*
<i>CsGRAS48</i>	0.25	0.26	1.05	<i>CsGRAS38</i>	2.22	6.10	2.75*
<i>CsGRAS9</i>	6.16	6.88	1.12	<i>CsGRAS43</i>	0.74	2.10	2.85*
<i>CsGRAS4</i>	8.31	9.43	1.14	<i>CsGRAS47</i>	0.04	0.11	2.91
<i>CsGRAS21</i>	2.66	3.16	1.19	<i>CsGRAS40</i>	0.31	0.99	3.19
<i>CsGRAS20</i>	0.76	0.93	1.21	<i>CsGRAS17</i>	3.35	11.74	3.51*
<i>CsGRAS10</i>	7.49	9.54	1.27	<i>CsGRAS37</i>	12.42	61.52	4.95*
<i>CsGRAS36</i>	8.79	11.82	1.34	<i>CsGRAS41</i>	0.21	1.19	5.59*
<i>CsGRAS31</i>	14.46	19.51	1.35	<i>CsGRAS26</i>	0.04	0.21	5.64
<i>CsGRAS23</i>	0.20	0.27	1.37	<i>CsGRAS50</i>	8.33	57.94	6.96*

(续表 2)

基因名称 Gene name	云麻 1 号对照组 Yunma 1 control check	云麻镉胁迫组 Yunma 1 cadmium stress	变化值 Fold change	基因名称 Gene name	云麻对照组 Yunma 1 control check	云麻镉胁迫组 Yunma 1 cadmium stress	变化值 Fold change
<i>CsGRAS15</i>	3.04	4.43	1.46	<i>CsGRAS3</i>	0.01	0.14	10.50*
<i>CsGRAS49</i>	0.97	1.44	1.49	<i>CsGRAS39</i>	0.03	0.60	18.10*
<i>CsGRAS8</i>	8.98	13.70	1.53*	<i>CsGRAS18</i>	0.00	0.30	0.30*
<i>CsGRAS27</i>	18.49	28.66	1.55*	<i>CsGRAS19</i>	0.00	0.17	0.17*
<i>CsGRAS44</i>	4.33	6.75	1.56	<i>CsGRAS34</i>	0.00	0.03	0.03
<i>CsGRAS16</i>	0.32	0.51	1.59	<i>CsGRAS35</i>	0.00	0.32	0.32*
<i>CsGRAS14</i>	0.76	1.24	1.62*	<i>CsGRAS45</i>	0.00	0.00	0.00
<i>CsGRAS51</i>	6.82	11.11	1.63*	<i>CsGRAS53</i>	0.27	0.00	-0.27*

表示在 0.05 水平显著差异。 means significant difference at the 0.05 probability level.

表 3 内蒙古小粒大麻 GRAS 基因表达

Table 3 Relative expression of GRAS genes in Inner Mongolia Xiaolidama

基因名称 Gene name	内蒙大麻对照组 Inner Mongolia Xiaolidama control check	内蒙大麻镉胁迫组 Inner Mongolia Xiaolidama cadmium stress	变化值 Fold change	基因名称 Gene name	内蒙大麻对照组 Inner Mongolia Xiaolidama control check	内蒙大麻镉胁迫组 Inner Mongolia Xiaolidama cadmium stress	变化值 Fold change
<i>CsGRAS24</i>	5.40	1.61	0.30*	<i>CsGRAS31</i>	20.57	20.70	1.01
<i>CsGRAS53</i>	0.84	0.37	0.44*	<i>CsGRAS40</i>	0.60	0.62	1.02
<i>CsGRAS22</i>	2.70	1.35	0.50*	<i>CsGRAS39</i>	0.31	0.33	1.05
<i>CsGRAS48</i>	0.34	0.17	0.50	<i>CsGRAS42</i>	9.72	10.66	1.10
<i>CsGRAS25</i>	49.36	28.23	0.57*	<i>CsGRAS4</i>	8.38	9.73	1.16
<i>CsGRAS21</i>	2.54	1.61	0.63	<i>CsGRAS44</i>	4.87	5.91	1.21
<i>CsGRAS33</i>	12.12	7.76	0.64*	<i>CsGRAS52</i>	12.38	15.14	1.22
<i>CsGRAS36</i>	10.98	7.07	0.64	<i>CsGRAS13</i>	6.41	8.78	1.37
<i>CsGRAS41</i>	1.27	0.97	0.76	<i>CsGRAS47</i>	0.08	0.11	1.38
<i>CsGRAS17</i>	8.55	6.64	0.78	<i>CsGRAS28</i>	1.85	2.58	1.39
<i>CsGRAS11</i>	37.71	29.54	0.78	<i>CsGRAS30</i>	12.06	17.68	1.47*
<i>CsGRAS18</i>	0.22	0.18	0.78*	<i>CsGRAS9</i>	6.75	9.90	1.47*
<i>CsGRAS20</i>	0.28	0.23	0.79	<i>CsGRAS51</i>	14.04	21.05	1.50*
<i>CsGRAS7</i>	1.70	1.39	0.82	<i>CsGRAS38</i>	2.68	4.34	1.62
<i>CsGRAS6</i>	0.28	0.23	0.82	<i>CsGRAS12</i>	17.93	31.35	1.75*
<i>CsGRAS1</i>	0.48	0.40	0.83	<i>CsGRAS15</i>	1.82	3.65	2.00
<i>CsGRAS29</i>	0.48	0.40	0.83	<i>CsGRAS45</i>	0.04	0.10	2.73
<i>CsGRAS14</i>	1.08	0.94	0.87	<i>CsGRAS16</i>	0.10	0.30	3.00
<i>CsGRAS27</i>	20.63	18.12	0.88	<i>CsGRAS50</i>	13.12	41.91	3.19*
<i>CsGRAS23</i>	0.29	0.26	0.89	<i>CsGRAS3</i>	0.01	0.05	3.38
<i>CsGRAS49</i>	1.10	0.99	0.89	<i>CsGRAS5</i>	0.31	1.20	3.87*
<i>CsGRAS32</i>	13.96	12.66	0.91	<i>CsGRAS37</i>	8.00	34.34	4.29*
<i>CsGRAS8</i>	14.56	13.35	0.92	<i>CsGRAS43</i>	2.10	9.65	4.59*
<i>CsGRAS10</i>	4.19	3.87	0.92	<i>CsGRAS26</i>	0.08	0.50	6.46*
<i>CsGRAS54</i>	7.36	6.96	0.94	<i>CsGRAS19</i>	0.00	0.17	0.17*
<i>CsGRAS46</i>	1.17	1.12	0.95	<i>CsGRAS34</i>	0.00	0.23	0.23*
<i>CsGRAS2</i>	2.82	2.71	0.96	<i>CsGRAS35</i>	0.00	0.89	0.89*

表示在 0.05 水平显著差异。 means significant differences at the 0.05 probability level.

表达进行比对(图 9), 并对大麻 GRAS 基因与镉胁迫进行关联分析。根据 GRAS 基因在不同品种大麻不同环境下的表达量, 将图 9 中的 54 个 GRAS 基因从上往下划分, *CsGRAS25~CsGRAS46* 在 2 种大麻中都表达下调; *CsGRAS34~CsGRAS43* 与 *CsGRAS3~CsGRAS44* 在 2 种大麻中都表达上调; *CsGRAS48~CsGRAS20* 与 *CsGRAS31~CsGRAS40* 在云麻 1 号中表达上调, 在内蒙古小粒大麻中表达下调, 其中 33 个基因在云麻 1 号中的上调与下调幅度都比内蒙古小粒大麻更加明显。从 2 个大麻转录组数据中挑选了 12 个基因进行 RT-qPCR 验证 (图 9), 只有 *YMCsGRAS44* 表达趋势与转录组结果不一致, 其他基因的 qPCR 验证均与转录组一致, 表明转录组结果较为可靠。

3 讨论

随着高通量测序技术的发展, 越来越多的植物

基因组完成了测序, 而基因家族分析也成了育种方向挖掘基因功能有效的生物信息学手段。目前, WRKY^[33]、核苷酸结合位点基因家族(nucleotide binding site, NBS)^[34]、MADS^[35]等基因家族在很多物种中都被鉴定出来, 并进行了系统的研究与分析, 而 GRAS 基因家族在各种作物中, 尤其是各麻类作物中的研究还相对缓慢。

本研究从大麻基因组中鉴定出 54 个 GRAS 家族基因, 将拟南芥与大麻 GRAS 基因构建系统进化树后发现, 有 2 个亚家族未包含拟南芥 GRAS 基因。通过系统进化树、基因结构与 Motif 对比发现, *CsGRASB* 亚家族中的 *CsGRAS5* 可归纳到 *SCL3* 亚家族, *CsGRAS20* 与 *CsGRAS22* 可能为 *CsGRAS25* 与 *CsGRAS11* 演变得到, 在演变过程中丢失了 DELLA 结构域, 在大麻 GRAS 家族鉴定中也未发现含 DELLA 结构域的 GRAS 基因, 表明 DELLA 结构域在不同物种间 GRAS 家族中的高度可变性^[36]。而

图 9 GRAS 同源基因表达
Fig. 9 Relative expression of GRAS homologous genes

图 10 12 个基因的 qPCR 验证表达

Fig. 10 qPCR expression of 12 genes

*, **, *** 分别表示在 0.05、0.01 和 0.001 水平显著差异。

*, **, *** mean significant differences at the 0.05, 0.01, and 0.001 probability levels, respectively.

CsGRASA 亚家族虽然与 HAM 亚家族亲缘关系最近, 但两者差异较大, 无法合并为一个亚家族。故大麻 GRAS 基因一共鉴定出 9 个亚家族, 其中 CsGRASA 亚家族是大麻新 GRAS 基因亚家族。

本研究通过对大麻染色体间 GRAS 家族基因进行共线性分析发现, PAT1 与 SHR、SCR 与 PAT1、HAM 与 LISCL 等不同亚家族间有共线性基因对, 表明这些亚家族有染色体片段复制的相关性。而通过构建大麻、雷蒙德氏棉、大豆、水稻、玉米基因组 GRAS 共线性分析发现, PAT1、LS、SHR、HAM 在大麻、雷蒙德氏棉、水稻中有直系同源基因, 说明这些家族的保守性较强, 而 *CsGRAS12* 在 5 种植物中都存在, 属于 SHR 亚家族, 表明其保守性最强, 可能在单双子叶植物分化前就存在^[33], 且该基因在 2 个大麻品种镉胁迫下都上调表达, 可作为后续研究的关键基因之一。而演化的过程中, GRAS 家族在 PAT1、LISCL、CsGRASA 上又发生了大量基因的串联重复, 这表明大麻 GRAS 的染色体片段复制与导基因串联重复是大麻出现 54 个 GRAS 基因的关键步骤。

本研究将镉耐受性不同的 2 种大麻进行 GRAS

家族基因表达量比对发现, 在镉胁迫下该基因家族表达量发生了明显的变化, 表明镉胁迫会显著影响大麻 GRAS 基因表达。其中大部分 GRAS 基因在更耐镉胁迫的云麻 1 号中上调表达明显, 表明 GRAS 基因家族与大麻的镉胁迫耐受性明显相关, 上调大麻 GRAS 家族基因可能会提高大麻的镉胁迫耐受性。通过图 8 中 2 种大麻的形态对比发现, 云麻 1 号在 2 种环境中形态未有显著差异, 但内蒙古小粒大麻在镉胁迫环境下根系明显变短, 而 GRAS 基因可以调控植物的根系生长及维管束的发育^[37], 推测是镉胁迫抑制了内蒙古小粒大麻部分 GRAS 基因表达而影响大麻根系的生长。其中 *CsGRAS48*、*CsGRAS21*、*CsGRAS36*、*CsGRAS7* 等 4 个基因在云麻 1 号中表达上调, 但在内蒙古小粒大麻中明显下调, 推测其与大麻的根系发育有关。在植物激素方面, 2 个 DELLA 基因: *CsGRAS11* 与 *CsGRAS25* 都表达下调, 而 DELLA 基因负调控赤霉素途径, 推测大麻在镉胁迫环境下增加赤霉素等植物激素以缓解外界的镉胁迫^[38]。而属于 LISCL 亚家族的 *CsGRAS39* 与 *CsGRAS39* 在云麻 1 号中明显表达上调, 在内蒙古小粒大麻中未发生变化, 推测其为改变植物的光

转导途径来应对外界的环境变化^[36]。将转录组中的 12 个基因进行 qPCR 验证发现, 其中 91.66% 的基因变化趋势与转录组结果相同, 表明转录组的结果较可靠。

4 结论

通过对大麻全基因组的序列比对, 共获得 GRAS 家族 54 个成员, 分属 9 个不同亚家族, 具有典型的 GRAS 或 DELLA 保守结构域。通过生物信息学方法分析大麻 GRAS 家族的理化指标、系统进化关系、基因结构、共线性关系表明, 染色体片段复制与串联重复复制对大麻形成 54 个 GRAS 基因起重要作用, 而转录组数据及 qPCR 验证都表明, GRAS 基因与大麻应对镉胁迫有明显相关性, 但其主要影响的代谢通路及不同基因之间的协同作用还需进一步研究。

References

- [1] Zheng X W, Yi D X, Shao L H, Li C. In silico genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of the R2R3-MYB gene family in *Medicago truncatula*. *J Integr Agric*, 2017, 16: 1576–1591.
- [2] Borrill P, Harrington S A, Uauy C. Genome-wide sequence and expression analysis of the NAC transcription factor family in polyploid wheat. *G3: Genes Genom Genet*, 2017, 7: 3019–3029.
- [3] Carolin H, Hannah K, Sven H, Stefanie W, Nina R, Natalia R. Symbiotic fungi control plant root cortex development through the novel GRAS transcription factor MIG1. *Curr Biol*, 2016, 26: 2770–2778.
- [4] Zhang L, Li Q, Chen J F, Chen W S. Computational identification and systematic classification of novel GRAS genes in *Isatis indigotica*. *Chin J Nat Med*, 2016, 14: 161–176.
- [5] Chen K M, Li H W, Chen Y F, Zheng Q, Li B, Li Z S. *TaSCL14*, a novel wheat (*Triticum aestivum* L.) GRAS gene, regulates plant growth, photosynthesis, tolerance to photooxidative stress, and senescence. *J Genet Genomics*, 2015, 42: 21–32.
- [6] Li S P, Zhao Y H, Zhao Z, Wu X L, Sun L F, Liu Q S, Wu Y K. Crystal structure of the GRAS domain of SCARECROW-LIKE7 in *Oryza sativa*. *Plant Cell*, 2016, 28: 1025–1034.
- [7] Zhang H, Mi L M, Xu L, Yu C X, Li C, Chen C L. Genome-wide identification, characterization, interaction network and expression profile of GRAS gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Sci Rep*, 2019, 9: 59–66.
- [8] Liu S, Xuan L, Xu L A, Huang M R, Xu M. Molecular cloning, expression analysis and subcellular localization of four DELLA genes from hybrid poplar. *Springerplus*, 2016, 5: 1–8.
- [9] 王树林. 马铃薯 StGRAS 基因家族鉴定与 *StGAI* 基因克隆及其遗传转化. 甘肃农业大学硕士学位论文, 甘肃兰州, 2019. Wang S L. Identification of StGRAS Gene Family and Cloning of *StGAI* Gene and Its Genetic Transformation in Potato. MS Thesis of Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu, China, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [10] Thieulin P G, Avilan L, Kojadinovic M, Gontero B. Fairy tails: flexibility and function of intrinsically disordered extensions in the photosynthetic world. *Front Mol Biosci*, 2015, 2: 23, doi: 10.3389/fmolb.2015.00023.
- [11] Guo Y Y, Wu H Y, Li X, Li Q, Zhao X Y, Duan X Q, An Y R, Lyu W, An H L. Identification and expression of GRAS family genes in maize (*Zea mays* L.). *PLoS One*, 2017, 12: e0185418.
- [12] Liu M Y, Huang L, Ma Z T, Sun W T, Wu Q, Tang Z Z, Bu T L, Li C L, Chen H. Genome-wide identification, expression analysis and functional study of the GRAS gene family in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 342, doi: 10.1186/s12870-019-1951-3.
- [13] Zeng X, Ling H, Chen X M, Guo S X. Genome-wide identification, phylogeny and function analysis of GRAS gene family in *Dendrobium catenatum* (Orchidaceae). *Gene*, 2019, 705: 5–15.
- [14] Lu J X, Wang T, Xu Z D, Sun L D, Zhang Q X. Genome-wide analysis of the GRAS gene family in *Prunus mume*. *Mol Genet Genomics*, 2015, 1: 303–317.
- [15] Jia Y B, Tian H Y, Li H J, Yu Q Q, Wang L, Friml J, Ding Z J. The *Arabidopsis thaliana* elongator complex subunit 2 epigenetically affects root development. *J Exp Bot*, 2015, 66: 4631–4642.
- [16] Tania H P, Nuria M R, David F F, Miriam V D, José M G G. Identification and expression analysis of GRAS transcription factor genes involved in the control of arbuscular mycorrhizal development in tomato. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 268, doi: 10.3389/fpls.2019.00268.
- [17] 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. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 1004, doi: 10.3390/ijms17071004.
- [18] Xie J, Liao H X, Wang X W, Zhang X B, Ni J L, Li Y Y, Tian W J, Sang X C. DLT/OsGRAS-32, regulating leaf width and thickness by controlling cell number in *Oryza sativa*. *Mol Breed*, 2019, 39: 1–11.
- [19] Yuan Y Y, Fang L C, Karungo S K, Zhang L L, Gao Y Y, Li S H, Xin H P. Overexpression of VaPAT1, a GRAS transcription factor from *Vitis amurens*, confers abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 2016, 35: 655–666.
- [20] Chen Y Q, Tai S S, Wang D W, Ding A M, Sun T T, Wang W F, Sun Y H. Homology-based analysis of the GRAS gene family in tobacco. *Genet Mol Res*, 2015, 14: 188–200.
- [21] 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. *BMC Plant Biol*, 2020, 20: 46, doi: 10.1186/s12870-020-2242-8.
- [22] 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. *BMC Genomics*, 2018, 19: 348, doi: 10.1186/s12864-018-4722-x.
- [23] 许艳萍, 吕品, 张庆滢, 郭蓉, 邓纲, 郭鸿彦, 杨明. 不同工业大麻品种对田间 5 种重金属吸收积累特性的比较. 农业资源与环境学报, 2020, 37: 106–114. Xu Y P, Lyu P, Zhang Q Y, Guo R, Deng G, Guo H Y, Yang M. Comparison of the absorption and accumulation characteristics of

- five heavy metals among different industrial hemp varieties. *J Agric Resour Environ*, 2020, 37: 106–114 (in Chinese with English abstract).
- [24] Husain R, Weeden H, Bogush D, Deguchi M, Soliman M, Potlakayala S, Katam R, Goldman S, Rudrabhatla S. Enhanced tolerance of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) plants on abandoned mine land soil leads to overexpression of cannabinoids. *PLoS One*, 2019, 14: e0221570.
- [25] 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: 1029–1037.
Yin L F, Wang Z Y, Wu Z Y, Zhang Z B, Yu R. Cloning and functional analysis of *ZmGRAS31* gene in maize. *Acta Agron Sin*, 2019, 45: 1029–1037 (in Chinese with English abstract).
- [26] Yuan Y Y, Fang L C, Karungo S K, Zhang L L, Gao Y Y, Li S H, Xin H P. Overexpression of *VaPAT1*, a GRAS transcription factor from *Vitis amurens*, confers abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 2016, 35: 655–666.
- [27] 董丽莉, 赵韩生, 李利超, 孙化雨, 王丽丽, 高志民. 毛竹 *PeSCL3* 基因表达特征及其启动子活性研究. *热带亚热带植物学报*, 2016, 24: 252–258.
Dong L L, Zhao H S, Li L C, Sun H Y, Wang L L, Gao Z M. Expression characteristics and promoter activity analysis of *PeSCL3* gene from *Phyllostachys edulis*. *J Trop Subtrop Bot*, 2016, 24: 252–258 (in Chinese with English abstract).
- [28] Lavery K U, Stout J M, Sullivan M J, Shah H, Gill N, Holbrook L, Deikus G, Sebra R, Hughes T R, Page J E, van Bakel H. A physical and genetic map of *Cannabis sativa* identifies extensive rearrangements at the THC/CBD acid synthase loci. *Genome Res*, 2019, 29: 146–156.
- [29] Peng H, He X J, Gao J, Ma H X, Zhang Z M, Shen Y O, Pan G T, Lin H J. Transcriptomic changes during maize roots development responsive to cadmium (Cd) pollution using comparative RNAseq-based approach. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464: 1040–1047.
- [30] Liu X Y, Widmer A. Genome-wide comparative analysis of the GRAS gene family in *Populus*, *Arabidopsis* and rice. *Plant Mol Biol Rep*, 2014, 32: 1129–1145.
- [31] Liu C Y, Xie T, Chen C J, Luan A P, Long J M, Li C H, Ding Y Q, He Y H. Genome-wide organization and expression profiling of the R2R3-MYB transcription factor family in pineapple (*Ananas comosus*). *BMC Genomics*, 2017, 18: 503, doi: 10.1186/s12864-017-3896-y.
- [32] 黄玉敏. 不同工业大麻品种耐镉性及原花青素缓解镉胁迫功能分析. 中国农业科学院研究生院硕士学位论文, 北京, 2019.
Huang Y M. Cadmium Tolerance in Different Hemp Varieties and Analysis of Proanthocyanins in Relieving Cadmium Stress. MS Thesis of Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [33] Xie T, Chen C J, Li C H, Liu J R, Liu C Y, He Y H. Genome-wide investigation of WRKY gene family in pineapple: evolution and expression profiles during development and stress. *BMC Genomics*, 2018, 19: 490, doi: 10.1186/s12864-018-4880-x.
- [34] Vannozzi A, Wong D C J, Höll J, Hmam I, Matus J T, Bogs J, Ziegler T, Dry I, Barcaccia G, Lucchin M. Combinatorial regulation of stilbene synthase genes by WRKY and MYB transcription factors in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Physiol*, 2018, 59: 1043–1059.
- [35] Die J V, Román B, Qi X P, Rowland L J. Genome-scale examination of NBS-encoding genes in blueberry. *Sci Rep*, 2018, 8: 3429, doi: 10.1038/s41598-018-21738-7.
- [36] 孔豆豆, 毛成志, 王蕾, 王寒冬, 张怀刚, 徐金青, 沈裕虎. 大麦基因组 GRAS 基因家族的全基因组鉴定与表达分析. *分子植物育种*, 2019, 22: 1–23.
Kong D D, Mao C Z, Wang L, Wang H D, Zhang H G, Xu J Q, Shen Y H. Genome-wide identification and phylogenetic analysis of the GRAS gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol Plant Breed*, 2019, 22: 1–23 (in Chinese with English abstract).
- [37] 魏斐. 全基因组鉴定甘蓝型油菜 GRAS 基因家族. 郑州大学硕士学位论文, 河南郑州, 2018.
Wei F. Genome-wide Identification GRAS Gene Family in *Brassica napus*. MS Thesis of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [38] Dill A, Jung H S, Sun T P. The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 14162–14167.