

丹参转录因子 *SmGRAS3* 的克隆、 亚细胞定位和表达分析

李雯瑞^{1,2}, 白朕卿³, 刘景玲³, 梁宗锁^{1,4*}

(1.中国科学院 水利部 水土保持研究所, 陕西 杨凌 712100; 2.中国科学院大学, 北京 100049;
3.西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100;
4.浙江理工大学 生命科学与医药学院, 浙江 杭州 310018)

[摘要] GRAS 转录因子在调控植物根生长与 GA 信号通路中起着重要作用。该研究克隆得到了 *SmGRAS3* 基因, 其开放阅读框 2 247 bp, 编码 748 个氨基酸。运用生物信息学软件对该基因编码的蛋白进行了理化性质与结构分析。该基因属于 GRAS 家族中的 SCL9 亚家族, 其启动子序列主要包含光响应、胁迫响应与激素响应等元件, 并可能与 GA 信号通路及抗逆反应相关蛋白互作。亚细胞定位显示 *SmGRAS3* 蛋白主要定位于细胞核。表达模式分析结果显示该基因的表达量在根中最高, 茎中最低, 光和低温均会诱导 *SmGRAS3* 的高表达。该研究为进一步探讨 *SmGRAS3* 基因在丹参根生长与抗逆过程中的作用奠定了基础。

[关键词] 丹参; *SmGRAS3*; 生物信息学; 亚细胞定位; 表达模式分析

Cloning, subcellular localization and expression pattern analysis of transcription factor *SmGRAS3* from *Salvia miltiorrhiza*

LI Wen-rui^{1,2}, BAI Zhen-qing³, LIU Jing-ling³, LIANG Zong-suo^{1,4*}

(1. Institute of Soil and Water Conservation, the Ministry of Water Resources, Chinese Academy of Sciences, Yangling 712100, China; 2. University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. College of Life Sciences, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China; 4. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

[Abstract] GRAS transcription factors play important roles in the regulation of plant root growth and GA signaling. In this study, *SmGRAS3* gene was cloned, which open reading frame was 2 247 bp, and encoding 748 amino acids. The physicochemical properties and structure of *SmGRAS3* and its encoded protein were analyzed by bioinformatics software. This gene belongs to the SCL9 subfamily of the GRAS family, and its promoter sequence mainly contains the light response, stress response, and hormone response elements. It may interact with the GA signal pathway and anti-stress related proteins. The subcellular localization showed that *SmGRAS3* protein was mainly located in the nucleus. The expression pattern analysis showed that the expression of *SmGRAS3* was the highest in the root and the lowest in the stem, and both light and low temperature could induce the high expression level of *SmGRAS3*. This study provides a foundation for further study on the roles of *SmGRAS3* gene in the root growth and stress tolerance of *Salvia miltiorrhiza*.

[Key words] *Salvia miltiorrhiza*; *SmGRAS3*; bioinformatics; subcellular localization; expression pattern analysis

doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20190829.108

[收稿日期] 2019-04-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81773835)

[通信作者] * 梁宗锁, E-mail: liangzs@ms.iswc.ac.cn

[作者简介] 李雯瑞, 博士研究生, 主要从事药用植物次生代谢调控的研究, E-mail: wrli227@163.com

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 为唇形科鼠尾草属多年生药用植物,其干燥根被广泛用于治疗心脑血管疾病、抗癌及炎症反应^[1-3]。丹参的有效活性成分主要分为 2 类: 水溶性的酚酸类成分,如丹酚酸 B 和迷迭香酸等; 以及脂溶性的丹参酮类成分,如丹参酮 I、丹参酮 II_A、隐丹参酮和二氢丹参酮 I^[4-5]。丹参具有较强的环境适应性,分布于我国及东南亚国家^[6]。由于以田间栽培为主,其产量和品质往往受到不利环境条件的影响,导致其产量和品质显著下降。光照、温度和水分是影响丹参产量和品质的主要环境因子,对提高丹参的产量具有重要的现实意义^[7]。另外,由于丹参中活性化合物含量低,供应有限,并不能满足人类日益增长的需求。因此,增强丹参的抗逆性与提高次生代谢产物的研究成为了热点,基因工程手段是提高转基因丹参产量与品质的有效方法。近年来,转录调控是解决这些问题的高效的策略^[8]。

转录因子在调控许多生物过程中起着关键作用。GRAS 蛋白家族是植物中特有的转录因子,在拟南芥、水稻、番茄、棉花、蓖麻、白菜、葡萄和丹参等许多高等植物中均有发现^[9-13],可分为 SCL9, SCR, DELLA, SHR, LAS, SCL3, PAT1, HAM 等亚家族^[14]。GRAS 转录因子在植物根发育、侧枝形成、光信号转导、赤霉素 GA 生物合成和信号转导等植物发育与信号转导过程中发挥着重要作用^[15-17]。如 SCR 和 SHR 形成复合物参与根干细胞生态位的维持、维管组织的分化、侧根和不定根的发育^[18-20]。DELLA 蛋白是 GA 调控植物生长的阻遏物,并作为 GA 信号通路的关键调控靶点^[21-22]。SCL 参与根细胞伸长、GA/DELLA 信号转导和抗逆反应^[23]。此外,还有研究报道一些 GRAS 蛋白也参与了抵抗非生物胁迫。如过表达 *SIGRAS40* 的番茄比野生型更能耐受干旱和盐胁迫^[24]。过表达葡萄 *VaPAT1* 基因的转基因拟南芥具有耐寒、耐旱和高耐盐性^[25]。尽管在其他植物中已经报道了 GRAS 蛋白的多种功能,但对药用植物丹参中 GRAS 蛋白的认识却十分有限。本课题组通过生物信息学方法分析发现,丹参中 GRAS 家族基因约有 30 多个, *SmGRAS3* 是其中最大的 GRAS 蛋白,并且对光照和低温等处理有显著响应。

因此本研究以药用模式植物丹参为材料,对 *SmGRAS3* 基因进行了生物信息学分析、亚细胞定位和组织特异性分析,同时也分析了在低温和光处理

下 *SmGRAS3* 基因的表达情况,旨在为深入研究丹参中的 *SmGRAS3* 基因功能奠定基础,进而为深入探讨 GRAS 转录因子在丹参根发育与抗逆调控方面的功能提供科学依据。

1 材料

1.1 植物

二年生的丹参样品采自西北农林科技大学药用植物园,经中科院水保所梁宗锁教授鉴定为唇形科鼠尾草植物丹参 *S. miltiorrhiza*。分别采集根、茎、叶、花蕾和花组织于液氮中速冻后于 -80 °C 保存备用。低温处理和强光照处理: 将丹参种子播种于营养钵中,于 25 °C,光照强度 8 000 lx,16 h/8 h 光周期下培养 60 d 后,用 4 °C 低温或黑暗 3 d 后持续光照处理幼苗 0, 0.5, 1, 3, 12, 24 h 后取幼叶,液氮速冻后于 -80 °C 保存备用。

1.2 菌种与载体

大肠杆菌 DH5 α 感受态购自北京天根生化科技有限公司。pMD19-T 克隆载体购自宝生物工程有限公司。pA7 载体为本实验室保存。

1.3 试剂

Pfu DNA 聚合酶、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自 Thermo 公司; *Taq* 酶、反转录试剂盒和荧光定量试剂盒均购自宝生物工程有限公司; 植物总 RNA 提取试剂盒和 DNA Marker 均购自于北京天根生化科技有限公司; DNA 回收纯化试剂盒和质粒提取试剂盒均购自 OMEGA 公司; PCR 引物合成于测序均由北京奥科技术有限公司合成。

2 方法

2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取各部分丹参组织约 100 mg 于液氮中迅速研磨成粉末,参照植物总 RNA 提取试剂盒的说明书提取丹参组织的总 RNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,并用核酸浓度检测仪测定其浓度和纯度。参照反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA。

2.2 *SmGRAS3* 基因克隆

设计引物 (*SmGRAS3*-F 5'-CGTTCATGGATC-CTTGGT-3'; *SmGRAS3*-R 5'-ATCAGACTCTATGCAGGGAC-3') 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 5 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经胶回收后连接 pMD19-T 载体,转化 DH5 α 进行

测序。

2.3 *SmGRAS3* 基因的生物信息学分析

用 NCBI 在线比对分析 *SmGRAS3* 氨基酸序列同源性,用 DNAMAN 软件进行序列比对;用 MEGA6.0 使用 NJ 法构建系统进化树;利用 ExPasy 进行氨基酸残基数目、组成、蛋白质相对分子质量、理论等电点和亲、疏水性的在线分析;分别用 SignalP 和 TMHMM 软件对 *SmGRAS3* 蛋白的信号肽与跨膜区进行分析;ProtScale 软件分析 *SmGRAS3* 的亲水性;用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 在线预测 *SmGRAS3* 蛋白的二、三级结构;利用 String 分析 *SmGRAS3* 蛋白的相互作用关系;用 PlantCARE 对 *SmGRAS3* 的启动子区域进行分析。

2.4 *SmGRAS3* 蛋白的亚细胞定位

根据 *SmGRAS3* 基因 ORF 序列,两端分别选取 *Xho* I 和 *Spe* I 作为酶切位点设计引物(*F-Xho* I: 5'-GGGCTCGAGATGGATCCTTGGTTCA-3'; *R-Spe* I: 5'-TTTACTAGTGCTGCAGGGACCCAACAC-3'),基因扩增产物与 pA7 载体质粒进行酶切后,用 T4 连接酶连入 pA7 质粒 GFP 基因的上游构建融合表达载体 pA7-*SmGRAS3*。每 1 μg 融合表达载体质粒用 0.15 mg 金粉包被后利用基因枪轰击洋葱表皮细胞,轰击距离 6 cm,轰击压力 1 500 psi (1 psi ≈ 6.895 kPa),真空度 88 kPa。细胞于 25 °C 暗培养 24 h 后,在激光共聚焦显微镜下观察融合蛋白的表达。将 pA7 空质粒包被后轰击洋葱表皮细胞作为对照。

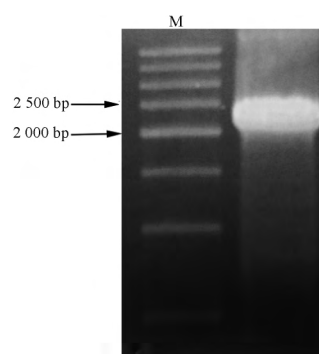
2.5 qRT-PCR 分析

利用实时荧光定量 PCR 仪分析 *SmGRAS3* 在丹参不同组织部位以及胁迫处理下的表达模式。利用 Primer Premier v6.0 设计 qRT-PCR 特异引物 *SmGRAS3* (*F* 5'-CCTTGCTCTACGTGCTGCTGAGAA-3'; *R* 5'-ACTGCTGCTTGTATACTCGCTGGA-3'),按照 SYBR® Premix EX Taq™ II (perfect real time) 试剂盒提供的说明书进行 qRT-PCR 反应。PCR 反应条件如下: 95 °C 30 s, 1 个循环; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。熔解曲线条件设置为 65~95 °C, 5 s, 每升高 0.5 °C 收集 1 次荧光。以植物的持家基因之一 β -actin 基因 (*F* 5'-GGTGCCCTGAGGTCCTGTT-3'; *R* 5'-AGGAACCACCGATCCAGACA-3') 作为内参,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量^[26]。所有样品均设 3 个技术性和生物学重复,利用 SPSS 23 软件进行显著性分析。

3 结果与分析

3.1 *SmGRAS3* 基因 cDNA 全长序列的克隆

以 cDNA 为模板 PCR 扩增目的基因,得到 2 300 bp 左右的单一特异条带(图 1)。通过 TA 克隆获得重组质粒 pT-*SmGRAS3*,测序结果表明 *SmGRAS3* 基因的 CDS 序列长 2 247 bp,与前期课题组已提交至 NCBI 的登录号为 KY534888 的序列一致。



M. 500 bp ladder maker.

图 1 *SmGRAS3* 基因的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agrose gel electrophoresis of the amplification products of *SmGRAS3*

3.2 *SmGRAS3* 基因的生物信息学分析

3.2.1 序列分析 用 DNASTar 预测 *SmGRAS3* 基因编码 748 个氨基酸,其中 71 个强碱性氨基酸(K, R), 107 个强酸性氨基酸(D, E), 245 个疏水性氨基酸(A, I, L, F, W, V), 203 个极性氨基酸(N, C, Q, S, T, Y)。预测其相对分子质量为 83.94 kDa,等电点为 4.953。在线 Blastp 结果发现 *SmGRAS3* 蛋白包含 GRAS 保守结构域(图 2A)。与其他物种的 GRAS 蛋白多序列比对结果显示 *SmGRAS3* 蛋白含有 GRAS 家族的保守结构域 VHIID 结构域(图 2B)。

使用 SignalP 5.0 软件对 *SmGRAS3* 进行分析,结果发现 *SmGRAS3* 蛋白不含信号肽,为非分泌性蛋白(图 3A)。使用 TMHMM 在线预测结果表明 *SmGRAS3* 不含跨膜区(图 3B),说明 *SmGRAS3* 不是跨膜蛋白质。事实上 *SmGRAS3* 作为一个转录因子,需要进入细胞核与 DNA 相应区域结合进而发挥转录调控的功能,上述预测结果与这一描述在理论上是相符合的。

使用 ProtScale 进行预测分析,结果显示 *SmGRAS3* 为亲水性蛋白质,亲水性肽段分布在整个

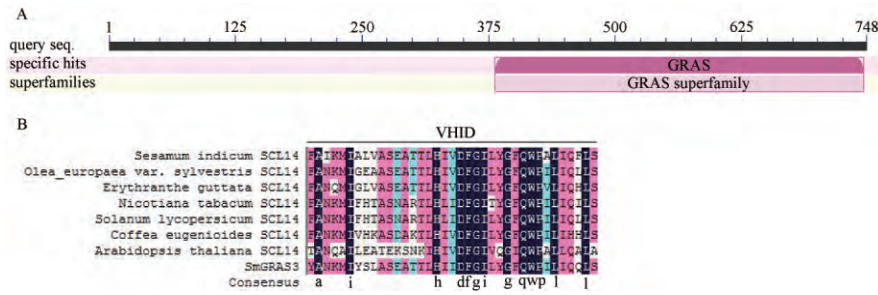


图2 *SmGRAS3* 基因的保守结构域和多序列比对

Fig.2 Conservative domain and multiple sequence alignment of *SmGRAS3*

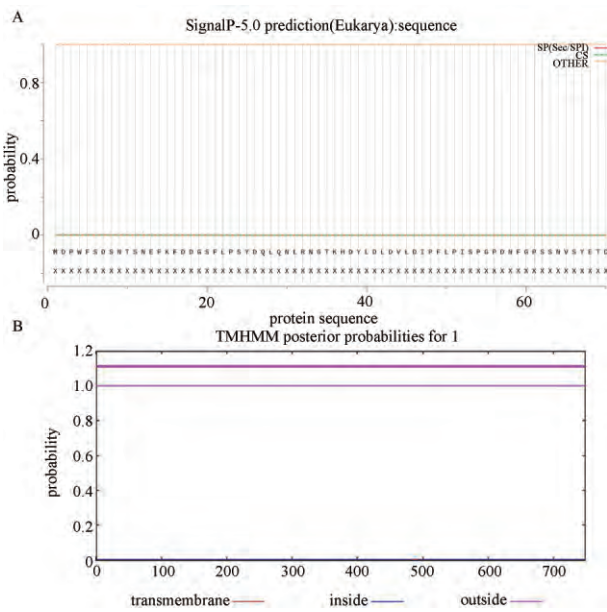


图3 *SmGRAS3* 信号肽位点和跨膜结构预测

Fig.3 Signal peptide and transmembrane structure domain of *SmGRAS3* predicted online

蛋白质氨基酸序列中, 明显多于疏水性肽段(图4)。这些结果说明了 *SmGRAS3* 是亲水蛋白质, 在细胞中处于水溶状态。

3.2.2 蛋白二级与三级结构预测 SOPMA 蛋白质二级结构预测结果显示 *SmGRAS3* 蛋白由 38.77% 的 α -螺旋, 8.42% 的延伸链, 3.88% 的 β -转角和 48.93% 的无规则卷曲构成(图5A)。用 SWISS-MODEL 对 *SmGRAS3* 蛋白结构域的三维空间结构进行预测, 序列的一致性为 24.06%, 为单体寡核苷酸, 序列与模板序列的相似度为 0.33, 覆盖为 0.50, 为 GRAS 家族 SHORT-ROOT 蛋白, 与目标基因相吻合(图5B)。

3.2.3 进化树分析 初步生物信息学分析显示

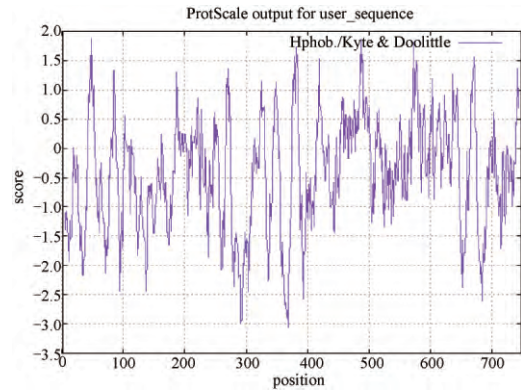


图4 *SmGRAS3* 蛋白亲水性分析

Fig.4 Hydrophilicity analysis of *SmGRAS3*

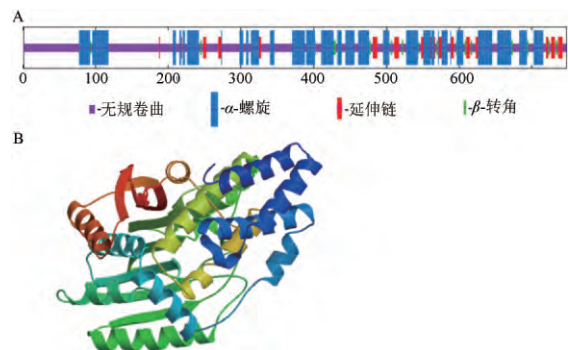


图5 *SmGRAS3* 的二级结构(A)和三维空间(B)结构预测

Fig.5 Predicted secondary structure (A) and 3-D structure (B) of *SmGRAS3*

SmGRAS3 与拟南芥 SCL9 亚家族同源性较高, 因此利用 MEGA 6.0 对丹参 *SmGRAS3* 的氨基酸序列与拟南芥 SCL9 亚家族的 GRAS 氨基酸序列进行比对, 并用邻接法构建系统进化树(图6)。结果显示, *SmGRAS3* 和拟南芥 GRAS 家族的 SCL9 亚家族基因聚为一类。

3.2.4 启动子分析 利用 PlantCARE 对 *SmGRAS3*

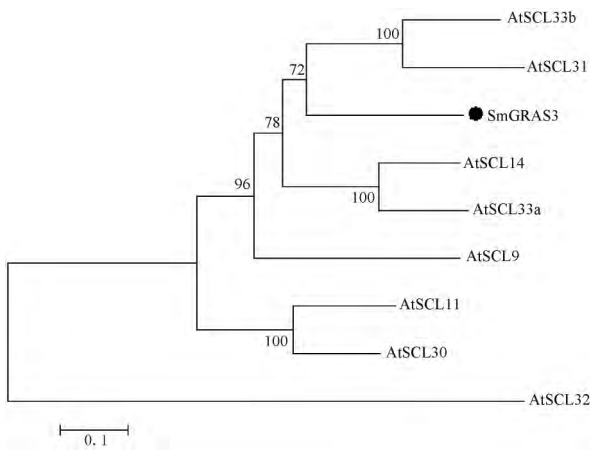


图6 SmGRAS3与拟南芥AtGRAS蛋白基于NJ构建的系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of SmGRAS3 and Arabidopsis AtGRAS proteins based on NJ method

基因起始密码子上游约2 000 bp的序列进行分析,结果显示,该序列中含有包含ACE,G-box,TC-CC-motif,GATA-motif,LAMP-element,Box-II and Box-4等光响应元件,ARE,LTR和MBS等逆境响应原件,以及ABRE,CGTCA-motif,TGACC-motif,TATC-box,TCE-element等激素响应元件。部分响应元件见表1,推测该基因的表达可能受到上述各因素的调控。

3.2.5 相互作用蛋白分析 使用String软件对SmGRAS3蛋白进行分析,结果表明SmGRAS3与GA信号通路的GID1和SLY,GA合成途径基因GA3OX1,以及激素与逆境响应基因DWF1和AHBP-1B等多个功能领域的蛋白因子存在相互作用,说明SmGRAS3可能在GA的信号通路与抗逆方面具有重要的功能(图7)。

表1 SmGRAS3启动子响应元件

Table 1 The response elements of SmGRAS3

元件名称	功能
ABRE	参与ABA响应的顺式作用元件
ACE/G-box	参与光响应的顺式作用元件
TCCC-/GATA-motif/LAMP-element/Box-II /4	部分光敏元件
ARE	厌氧诱导必需的顺式作用元件
CGTCA-/TGACC-motif	参与MeJA响应的顺式作用元件
LTR	参与低温响应的顺式作用元件
TATC-box	参与GA响应的顺式作用元件
TCE-element	参与SA响应的顺式作用元件
MBS	参与干旱诱导的MYB结合位点

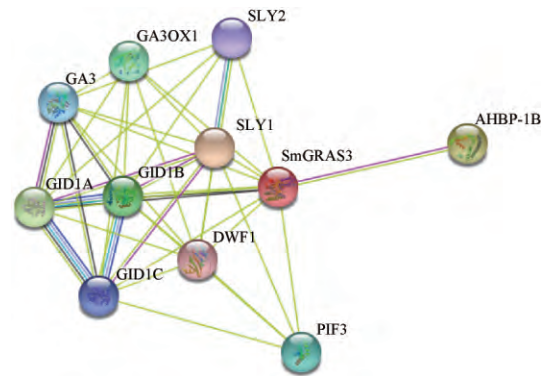


图7 SmGRAS3蛋白质相互作用分析

Fig.7 Analysis of protein-protein interactions of SmGRAS3

3.3 SmGRAS3蛋白的亚细胞定位

利用洋葱表皮细胞的瞬时转化体系,在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)的表达。在转化pA7空载体的洋葱表皮细胞中,GFP散布于整个细胞中。在转化pA7-SmGRAS3的洋葱表皮细胞中,只有细胞核部位观察到了绿色荧光,并与核特异染料DAPI的蓝色荧光完全重合,说明SmGRAS3是一个核定位蛋白(图8)。

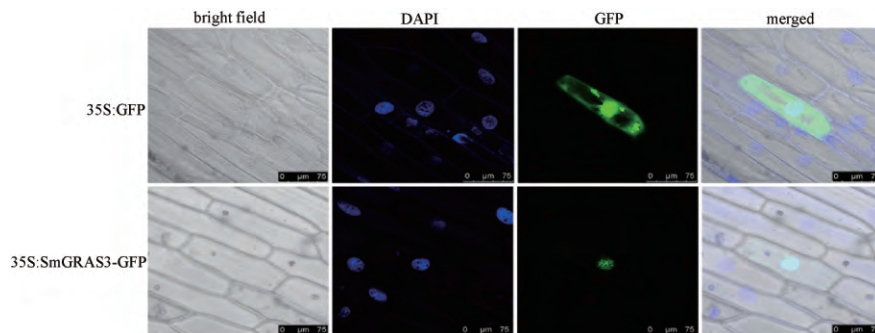
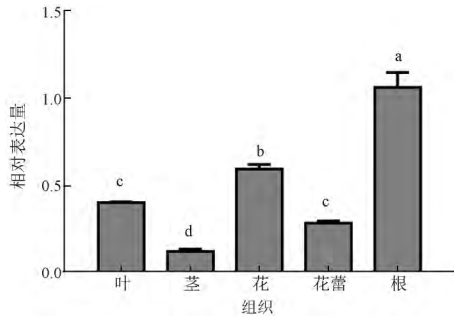


图8 SmGRAS3蛋白在洋葱表皮中的亚细胞定位

Fig.8 Subcellular localization of SmGRAS3 in onion epidermis cells

3.4 *SmGRAS3* 基因的表达分析

SmGRAS3 在初花期不同组织中均有表达(图9) 并且表达差异较大。以根中的表达量为标准进行比较, 在根中表达水平最高, 花中其次, 在茎中最低, 并且 *SmGRAS3* 在根中的转录水平是茎中的 5 倍多。由此推测 *SmGRAS3* 可能在根与花的生长发育中发挥重要作用。



不同字母表示有显著差异 $P < 0.05$ (图 10 同)。

图 9 *SmGRAS3* 的组织特异性表达

Fig.9 Expression pattern of *SmGRAS3* in different tissues

光处理可诱导 *SmGRAS3* 基因的表达(图 10), 黑暗处理 3 d 后(0 h) *SmGRAS3* 的表达量下降, 光照 0.5 h 后恢复正常, 之后表达量逐渐升高, 在 3 h 达到最高值, 是对照(CK)的 4 倍, 3 h 后逐渐降低。低温处理后, *SmGRAS3* 表达量有所提高, 3 h 达到最大值, 达到 0 h 的 5 倍左右, 3 h 后有所降低, 在 24 h 又稍有升高(图 10)。

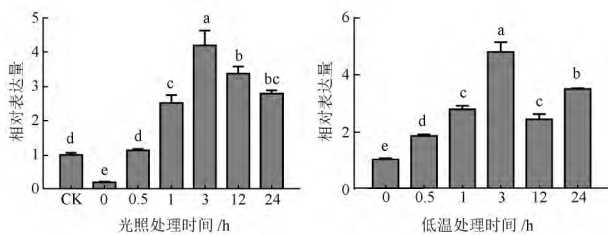


图 10 *SmGRAS3* 在光照和低温处理下的表达模式

Fig.10 Expression patterns of *SmGRAS3* in light and low temperature treatment

4 讨论

GRAS 家族是植物特有的转录因子, 其家族基因在很多植物植物中被克隆, 如拟南芥、番茄、葡萄和水稻等^[9-11], 并在植物的生长发育中有着十分重要的功能。第一个被鉴定的 GRAS 基因 *SCR* 在拟

南芥根部的皮层或内皮原始细胞中表达, 与 *SHR* 相互作用形成复合物来调控根的径向组织^[19, 27]。*PAT1* 参与介导了植物色素和防御信号通路^[28]。玉米 *ZmGRAS31* 基因在低温胁迫下表达量显著升高, 推测其可能与幼苗耐低温有关^[29]。本研究中克隆得到的 *SmGRAS3* 基因, 通过 Blast 比对分析发现其具有 GRAS 蛋白家族保守的 GRAS 结构域与 VHIID 结构域, 并且进化树分析其与拟南芥 *SCL9* 亚家族成员聚为一支。*SCL9* 亚家族基因被报道参与了植物的逆境响应、不定根形成与生长素响应等生物过程^[23]。其亚家族基因 *AtSCL14* 被证明是激活胁迫诱导启动子的关键^[30]。

本研究的生物信息学分析与亚细胞定位结果表明, *SmGRAS3* 蛋白是核定位蛋白, 作为转录因子行使其调控功能。组织特异性结果表明 *SmGRAS3* 在根与花中表达水平最高, 暗示其可能参与了根与花的生长发育调控过程。这与前人报道的 GRAS 转录因子家族功能相一致。另外, 通过分析 *SmGRAS3* 的启动子序列, 作者发现了有很多光响应、低温响应、干旱响应和激素响应元件, 推测其可能参与了植物体内各种逆境胁迫应答^[31]。于是作者用光照和低温处理了丹参幼苗, 结果表明 *SmGRAS3* 在光照和低温处理中的表达量均有显著上调。这与启动子作用元件的预测相一致, 提供了又一有力证据证明其可能参与了光响应与低温响应。此外, 互作蛋白分析显示, *SmGRAS3* 可能与 GA 信号通路的受体 *GID1* 和 *SLY*, GA 合成途径基因以及激素与逆境响应基因等多个功能领域的蛋白因子存在相互作用, 进一步提供了 *SmGRAS3* 在 GA 的信号通路与抗逆方面具有重要功能的证据。

众所周知, 丹参具有十分重要的药用价值, 因此如何提高其抗逆性与药用部位根的产量具有十分重要的现实意义。而目前关于可以同时调控根系生长与增强抗逆性的功能基因的研究还较少, 本研究显示了 *SmGRAS3* 参与了调控丹参根的生长与逆境响应。即便如此, 要全面了解丹参中 *SmGRAS3* 蛋白是如何调控根的生长与逆境响应, 还需要做更多的工作, 以便能更好了解 *SmGRAS3* 的功能。本研究为后续 *SmGRAS3* 基因功能研究提供了理论依据, 并为提高丹参药材产量提供了理论指导。

[参考文献]

[1] Dong Y Z, Morrisnatschke S L, Lee K H. Biosynthesis, total

- syntheses, and antitumor activity of tanshinones and their analogs as potential therapeutic agents [J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28(3): 529.
- [2] Liu H M, Ma S L, Xia H R, et al. Anti-inflammatory activities and potential mechanisms of phenolic acids isolated from *Salvia miltiorrhiza* f. *alba* roots in THP-1 macrophages [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 222: 201.
- [3] 楼招欢, 夏榕蔓, 李晓娟, 等. 丹参二萜醌活化 ERS 介导的凋亡通路抗肺癌作用机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(24): 4900.
- [4] 王涛, 张慧, 赵丹, 等. 丹参波长叠加指纹图谱及多指标成分测定研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(2): 338.
- [5] Pei T L, Ma P D, Ding K, et al. SmJAZ8 acts as a core repressor regulating JA-induced biosynthesis of salvianolic acids and tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *J Exp Bot*, 2018, 69(7): 1663.
- [6] Wang H Q, Wu Y C, Yang X B, et al. SmLEA2, a gene for late embryogenesis abundant protein isolated from *Salvia miltiorrhiza*, confers tolerance to drought and salt stress in *Escherichia coli* and *S. miltiorrhiza* [J]. *Protoplasma*, 2017, 254(2): 685.
- [7] Liu H Y, Wang X D, Wang D H, et al. Effect of drought stress on growth and accumulation of active constituents in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Ind Crop Prod*, 2011, 33(1): 84.
- [8] Sun M H, Shi M, Wang Y, et al. The AP2/ERF transcription factor SmERF115 positively regulates the biosynthesis of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Exp Bot*, 2019, 70: 243.
- [9] Tian C G, Wan P, Sun S H, et al. Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 54(4): 519.
- [10] Huang W, Xian Z Q, Kang X, et al. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of GRAS gene family in tomato [J]. *BMC Plant Biol*, 2015, 15: 209.
- [11] Grimplet J, Agudelo-Romero P, Teixeira R T, et al. Structural and functional analysis of the GRAS gene family in Grapevine indicates a role of GRAS proteins in the control of development and stress responses [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 353.
- [12] Zhang B, Liu J, Yang Z E, et al. Genome-wide analysis of GRAS transcription factor gene family in *Gossypium hirsutum* L [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 348.
- [13] 白朕卿. 丹参酮合成关键基因 SmCPS1 与 SmKSL1 转录调控研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [14] Bolle C. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development [J]. *Planta*, 2004, 218(5): 683.
- [15] Livne S, Lor V S, Nir I, et al. Uncovering DELLA-independent gibberellin responses by characterizing new tomato procerca mutants [J]. *Plant Cell*, 2015, 27(6): 1579.
- [16] Xue L, Cui H T, Buer B, et al. Network of GRAS transcription factors involved in the control of arbuscule development in *Lotus japonicus* [J]. *Plant Physiol*, 2015, 167(3): 854.
- [17] Heck C, Kuhn H, Heidt S, et al. Symbiotic fungi control plant root cortex development through the novel GRAS transcription factor MIG1 [J]. *Curr Biol*, 2016, 26(20): 2770.
- [18] Lucas M, Swarup R, Paponov I A, et al. Short-Root regulates primary, lateral, and adventitious root development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2011, 155(1): 384.
- [19] Cui H C, Levesque M P, Vernoux T, et al. An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants [J]. *Science*, 2007, 316(5823): 421.
- [20] Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, et al. The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling [J]. *Cell*, 2000, 101(5): 555.
- [21] Murase K, Hirano Y, Sun T P, et al. Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1 [J]. *Nature*, 2008, 456(7221): 459.
- [22] Yoshida H, Hirano K, Sato T, et al. DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the indeterminate domain family proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2014, 111(9): 7861.
- [23] Hakoshima T. Structural basis of the specific interactions of GRAS family proteins [J]. *FEBS Lett*, 2018, 592(4): 489.
- [24] Liu Y D, Huang W, Xian Z Q, et al. Overexpression of Sl-GRAS40 in tomato enhances tolerance to abiotic stresses and influences auxin and gibberellin signaling [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1659.
- [25] Yuan Y Y, Fang L C, Karungo S K, et al. Overexpression of VaPAT1, a GRAS transcription factor from *Vitis amurensis*, confers abiotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(3): 655.
- [26] 李红艳, 刘景玲, 金伟波, 等. 丹参类黄酮 3-O 糖基转移酶基因 SmUF3GT 的克隆、亚细胞定位及时空表达分析 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(10): 2038.
- [27] Laura D L, Joanna W D, Jocelyn E M, et al. 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.
- [28] Patricia T G, Birgit H, Cordelia B. Two GRAS proteins, SCARECROW-LIKE21 and PHYTOCHROME A SIGNAL TRANSDUCTION1, function cooperatively in phytochrome A signal transduction [J]. *Plant Physiol*, 2013, 161(1): 291.
- [29] 殷龙飞, 王朝阳, 吴忠义, 等. 玉米 *ZmGRAS31* 基因的克隆及功能研究 [J]. *作物学报*, 2019, 45(7): 1029.
- [30] Fode B, Siemsen T, Corinna T, et al. The *Arabidopsis* GRAS protein SCL14 interacts with class II TGA transcription factors and is essential for the activation of stress-inducible promoters [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(11): 3122.
- [31] 赵停, 李静, 彭亮, 等. 钠盐胁迫对远志种子萌发特性的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(17): 60.

[责任编辑 吕冬梅]