

• 药材与资源 •

人参 *GLP* 基因家族的鉴定及表达分析王雪帅^{1,2}, 王爱民^{1,2}, 于 双^{1,2}, 王康宇^{1,2}, 赵明珠^{1,2}, 王 义^{1,2*}, 张美萍^{1,2*}

1. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118

2. 吉林农业大学, 吉林省人参基因资源开发与利用工程研究中心, 吉林 长春 130118

摘要: 目的 为了解类萌发素蛋白(germin-like protein, GLP)在人参 *Panax ginseng* 中的功能, 对人参 *GLP* 基因(*PgGLPs*)家族进行了鉴定, 明确其不同类型组织材料的表达模式。方法 利用生物信息学分析了 *PgGLPs* 的染色体定位、基因结构、保守基序、进化关系、表达模式和顺式作用元件等。同时基于以上分析结果选取 4 条 *PgGLP* 基因研究其在人参种胚、愈伤组织、实生苗根、叶柄、叶不同组织材料中的表达情况。结果 在人参转录组数据库中鉴定得到 28 条 *PgGLP* 转录本, 染色体定位结果表明 *PgGLPs* 不均匀地分布在人参 12 条染色体上。系统发育分析将 *PgGLPs* 分为 3 个亚型, 分别包含 3、10、15 个成员, 其中亚型II中只包含 *PgGLPs*。顺式作用元件预测结果显示, *PgGLPs* 启动子区域存在多种与植物激素、生长发育、逆境胁迫相关响应元件。*PgGLP* 成员在人参不同组织部位中的表达水平差异较大, 4 条 *PgGLPs* 在人参种胚的表达普遍高于其他组织部位, 具有组织特异性, 其中 *PgGLP16-01* 在不同组织部位中的表达量高于其他 3 条基因。结论 鉴别出 28 个人参 *PgGLP* 家族成员, 其表达呈现组织特异性, *PgGLP* 基因家族的系统鉴定及表达分析为人参生长发育相关基因家族的研究奠定理论基础, 为进一步研究植物类萌发素蛋白提供参考。

关键词: 人参; 类萌发素蛋白; 基因家族; 生长发育; 表达分析

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)12-4387-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.12.021

Identification and expression analysis of *GLP* gene family in *Panax ginseng*WANG Xueshuai^{1,2}, WANG Aimin^{1,2}, YU Shuang^{1,2}, WANG Kangyu^{1,2}, ZHAO Mingzhu^{1,2}, WANG Yi^{1,2}, ZHANG Meiping^{1,2}

1. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. Jilin Engineering Research Center for Ginseng Gene Resource Development and Utilisation, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective To investigate the function of germin-like proteins in *Panax ginseng*, the *P. ginseng GLP* gene family was characterized to clarify its expression pattern in different types of tissue materials. **Methods** The chromosomal localisation, gene structure, conserved motifs, evolutionary relationships, expression patterns and cis-acting elements of *PgGLPs* were analysed using bioinformatics. Based on the above analysis, four *PgGLP* genes were selected to study their expression in six different tissue materials: *P. ginseng* embryos, adventitious roots, healing tissues, roots of living seedlings, petioles and leaves. **Results** In this study, 28 *PgGLP* transcripts were identified in the *P. ginseng* transcriptome database, and chromosomal localisation results showed that *PgGLPs* were unevenly distributed on 12 chromosomes of *P. ginseng*. Phylogenetic analysis classified *PgGLPs* into three isoforms containing 3, 10 and 15 members, respectively, with only *PgGLPs* in isoform II. cis-acting element prediction showed that there were several response elements in the promoter region of *PgGLPs* related to phytohormones, growth and development, and abiotic stress. The expression levels of *PgGLP* members varied widely in different tissue parts of *P. ginseng*, and four *PgGLPs* were found in different tissue parts of *P. ginseng*. *PgGLPs* were generally expressed at higher levels in *P. ginseng* seed embryos than in other tissues with tissue specificity, among which the expression of *PgGLP16-01* was higher than that of the other three genes in different tissues. **Conclusion** In this study, 28 members of the *P. ginseng PgGLP* family were identified and their expression showed tissue specificity. The systematic

收稿日期: 2025-01-02

基金项目: 吉林省科技厅项目(20240101227JC)

作者简介: 王雪帅, 男, 硕士研究生, 研究方向为植物功能基因组学。E-mail: 2417474504@qq.com

*通信作者: 王 义, 博士生导师, 研究方向为人参系统基因组学与分子设计育种。E-mail: yi.wang@jlau.edu.cn

张美萍, 博士生导师, 研究方向为人参功能基因组学与分子设计育种。E-mail: meiping.zhang@jlau.edu.cn

identification and expression analysis of the *P. ginseng* *PgGLP* gene family provides a theoretical basis for the study of *P. ginseng* growth and development related gene families and a reference for the further study of plant germin-like proteins.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Mey.; germin-like protein; gene family; growth and development; expression analysis

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 为五加科人参属多年生草本植物，是一味名贵中草药，被誉为百草之王^[1]。人参作为传统中草药历史悠久，人参皂苷是其活性成分，同时其中含有多糖、氨基酸、蛋白质、有机酸、生物碱、甾醇、黄酮以及木脂素等多种化学成分。人参具有增强记忆力^[2]、保护心脑血管系统^[3]、抗氧化^[4-5]、抗肿瘤^[6]、抗疲劳及辅助免疫^[7-8]等广泛的药理作用，在医药、食品、保健和化妆品行业有着广泛应用^[9]。人参喜荫蔽环境，对生长环境要求也比较高，其栽培生产受多种因素影响，且在人参生长发育过程中，会面临各种生物胁迫和非生物胁迫，生长周期长，其产量目前仍不能满足市场的实际需求^[10]。

类萌发素蛋白 (germin-like protein, GLP) 是一类与小麦萌发素序列高度相似的可溶性糖蛋白，同时也作为一类病程相关蛋白普遍存在于植物体内^[11]。GLP 属于 cupin 蛋白超家族，通常由 2 个外显子和一个内含子组成，并且在 C 端含有保守的 cupin 结构域^[12]，可与锰离子等金属离子结合^[13]。多项研究表明，GLP 是植物中广泛存在的一类蛋白家族，现已从拟南芥 *Arabidopsis thaliana* Heynh.、水稻 *Oryza sativa* L.、大豆 *Glycine max* Merr.、花生 *Arachis hypogaea* L.、谷子 *Setaria italica* Beauv.、香蕉 *Musa nana* Lour.、茶树 *Camellia sinensis* Kuntze. 和天山雪莲 *Saussurea involucrata* Sch. Bip. 等植物中鉴定出 GLP 蛋白的存在^[14-15]。目前，已在单子叶植物、双子叶植物、裸子植物和苔藓植物中成功鉴定得到上百种此类蛋白^[16-19]。植物 GLP 蛋白主要以受体、酶和结构蛋白的形式参与多种生理过程^[20]。GLP 广泛表达于不同器官，如根、茎、叶、花和种子^[21-23]，在调节植物生长发育如种子萌发^[24]、花和果实发育^[22]、胚胎发生^[25-26]等过程和抵御生物胁迫如病原真菌^[27]、细菌^[28]、病毒^[29]及非生物胁迫如冷冻和高温胁迫^[30-31]、干旱胁迫^[32-33]、重金属胁迫^[34-35]等方面发挥重要作用，它们在不同的植物发育阶段及不同的胁迫条件下也具有不同的功能^[19, 36]。

因此，深入研究植物 GLP 基因的功能对揭示植物生长发育和抗逆性机理具有重要的意义。人参中 GLP 基因尚未被研究，本研究对人参 GLP 基因

(*PgGLP*) 基因进行鉴定和分析，系统地解析 *PgGLP* 家族基因的基本信息、进化关系、基因结构、染色体定位、顺式作用元件等信息，并通过对其在人参种胚、愈伤组织、实生苗根、叶柄、叶不同组织材料的表达进行分析，为 *PgGLP* 基因的克隆和功能解析提供一定的理论基础。

1 材料

本研究所采用的植物材料有实验室保存的裂口人参种子的胚、不定根、愈伤组织、人参实生苗的根、叶柄、叶 6 种不同组织材料，其中人参不定根、愈伤组织由外植体在培养基上诱导获得。本研究所用数据为实验室构建的人参转录组数据库，包括 4 个不同年生 (5、12、18、25 年)、14 个不同组织部位 (须根、支根、根皮、根心、芦头、芦笋、茎、大叶柄、小叶柄、叶片、果柄、果肉、果茎、种子) 以及 42 个农家栽培品种 (表 1) 的表达量数据^[37]。

表 1 人参 42 个农家栽培品种的来源

Table 1 Sources of 42 cultivated varieties of *P. ginseng*

编号	产地	编号	产地
S1	集安市花甸镇	S22	白山市江源区湾沟镇
S2	集安市财源镇	S23	白山市江源区湾沟镇
S3	集安市青沟镇	S24	白山市江源区湾沟镇
S4	集安市台山镇	S25	白山市江源区湾沟镇
S5	临江市三河城镇	S26	长白县马鹿沟镇
S6	临江市桦树镇	S27	长白县宝泉山镇
S7	临江市花山镇	S28	长白县宝泉山镇
S8	临江市桦树镇	S29	长白县龙泉镇
S9	临江市六道沟镇	S30	长白县龙泉镇
S10	临江市六道沟镇	S31	长白县十二道沟镇
S11	万良县兴参镇	S32	长白县金华乡
S12	万良县泉阳镇	S33	长白县撩荒地
S13	万良县水洞村	S34	长白县撩荒地
S14	汪清县复兴镇	S35	长白县十二道沟镇
S15	汪清县复兴镇	S36	白山市江源区湾沟镇
S16	汪清县复兴镇	S37	通化市通化县
S17	汪清县新电子	S38	通化市通化县
S18	汪清县新电子	S39	通化市通化县
S19	汪清县太平村	S40	万良县泉阳镇
S20	汪清县太平村	S41	临江市桦树镇
S21	汪清县太平村	S42	汪清县复兴镇

2 方法

2.1 *PgGLP* 基因家族成员的鉴定

为了较为完整和准确地鉴定 *PgGLP* 基因家族成员,首先,通过查阅文献获得 *GLP* 保守结构域的隐马尔可夫(HMM)模型序列号(PF00190),以此为依据在 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)下载其 HMM 序列号,将其作为问询序列与 Blast 本地化的人参转录组数据库进行比对,设置 *E*-value 为 1×10^{-6} 。然后,从综合药用植物组学(<https://www.bic.ac.cn/IMP>)下载 22 种外源物种、2 种近源物种(竹节参和屏边三七)及人参的 *GLP* 氨基酸序列,将获得的结果作为从人参转录组数据库中搜索 *PgGLP* 基因转录本的问询序列,设置 *E*-value 为 1×10^{-6} 。将上述获得的序列进行比对去重,初步获得 *PgGLP* 候选基因转录本。最后,通过 NCBI CD Search 在线网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)和 SMART Tool Online(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行筛选,保留具有 *GLP* 保守结构域 cupin-1 的基因,最终得到的转录本即为 *PgGLP* 基因家族成员,共 28 条。根据“*PgGLP*+基因号+转录本号”的方法将该家族成员重命名。

2.2 *PgGLP* 基因家族成员的染色体分布及共线性分析

通过 Blastn 将已鉴定获得的 *PgGLP* 基因与 人参基因组数据库比对,确定该家族成员在 人参基因组上的分布情况,并将 *PgGLPs* 定位到 人参染色体上。利用 MG2C 在线工具(<http://mg2c.iask.in/mg2c%5Fv2.1/>)可视化 *PgGLP* 基因家族成员在染色体上的定位。分析 *PgGLP* 基因家族在 人参染色体上的共线性情况并使用 R 4.3.3 可视化,来确定该家族在 人参基因组的基因复制现象。

2.3 *PgGLP* 基因家族的结构分析

将 *PgGLP* 基因家族成员鉴定完成后,利用 MEGA11 软件对 28 条 *PgGLPs* 进行多序列比对,并构建 人参 *PgGLP* 基因的系统进化树。通过在线网站 NCBI ORF Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)得到 *PgGLP* 基因家族成员的开放阅读框,获取其蛋白序列并整理形成 fasta 格式,将其上传至在线网站 MEME(<https://meme-suite.org/meme/>)进行 *PgGLPs* 保守基序分析,选择基序数量为 10,使用 TBtools (Version 2.121) 将其可视化。

2.4 *PgGLP* 基因家族的系统进化分析

从拟南芥基因数据库(<https://www.arabidopsis.org/>)下载拟南芥 *GLP* 蛋白序列,从水稻基因组数据库(<https://riceome.hzau.edu.cn/>)下载水稻 *GLP* 蛋白序列,从小麦数据库(<https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/>)下载小麦 *GLP* 蛋白序列,在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上获取花生和棉花 *GLP* 蛋白序列(表 2)。将获得的外源物种的 *GLP* 蛋白序列和具有完整结构域的 *PgGLPs* 进行多重序列比对,然后利用 MEGA (Version 11.0.13) 构建 *GLP* 基因的系统进化树,方法为最大似然法,bootstrap 设置为 2 000 次,其他参数默认。

2.5 *PgGLP* 基因家族的功能分析

将全部 *PgGLP* 基因序列提交至 Blast2GO (Version 5.2.5) 进行 GO 功能注释分析,获得其在 Biological Process、Molecular Function 和 Cellular Process 等方面的 GO 注释信息,整理提交至在线网站 ChiPlot(<https://www.chiplot.online/>)绘制韦恩图,并利用 R 语言对注释到 Level 2 水平上的基因进行气泡图绘制。

表 2 外源物种基因序列号

Table 2 Gene sequence numbers of exogenous species

植物类型	物种	基因(序列号)
模式植物	拟南芥 ^[38]	<i>AtGLP1-3</i> (AT1G10460.1)
		<i>AtGLP3-5</i> (AT3G04200.1)
		<i>AtGLP3-8</i> (AT3G10080.1)
		<i>AtGLP5-3</i> (AT5G38910.1)
		<i>AtGLP5-10</i> (AT5G39130.1)
单子叶植物	水稻 ^[38]	<i>OsGLP1-1</i> (Os01g0249200)
		<i>OsGLP2-1</i> (Os02g29000.1)
		<i>OsGLP3-3</i> (Os03g48750.1)
		<i>OsGLP4-1</i> (Os04g52720.1)
		<i>OsGLP8-2</i> (Os08g08960.1)
	小麦 ^[39]	<i>TaGLP2a</i> (CAB55558.1)
		<i>TaGLP2b</i> (CAB55559.1)
		<i>TaGLP3-1</i> (AJA71633.1)
		<i>TaGLP3-4</i> (AJA71636.1)
		<i>TaGLP3-9</i> (AJA71638.1)
双子叶植物	花生 ^[19]	<i>AhGLP1</i> (ADD71875.1)
		<i>AhGLP2</i> (ADD71876.1)
		<i>AhGLP3</i> (ADD71877.1)
		<i>AhGLP4</i> (ADD71878.1)
		<i>AhGLP5</i> (ADD71879.1)
		<i>AhGLP6</i> (ADD71880.1)
		<i>AhGLP7</i> (ADD71881.1)
		<i>AhGLP8</i> (ADD71882.1)
	海岛棉 ^[40]	<i>GbGLP2</i> (ABL86676.1)
	陆地棉 ^[40]	<i>GhGLP1</i> (AAF21988.2)

2.6 *PgGLP* 基因家族的表达模式分析

分别调取 *PgGLPs* 转录本在人参 42 个农家品种、14 个组织部位和 4 个不同年生人参主根中的表达量,对 *PgGLPs* 基因家族进行表达模式分析,并用 TBtools 可视化,构建表达量热图。

2.7 *PgGLP* 基因家族的顺式作用元件分析

利用 Blastn 将 *PgGLPs* 与中国人参基因组数据库进行比对,确定各基因在人参染色体上的分布,其次根据 NCBI 网站中收录的人参各染色体的基因组,调取 *PgGLP* 家族成员的上游 2 000 bp 序列,利用在线网站 Plant CARE 进行 *PgGLP* 基因的顺式作用元件预测,预测结果由 TBtools 软件进行可视化,RStudio 软件对预测结果进行热图可视化。

2.8 *PgGLP* 基因家族的互作分析

从人参转录组数据库中提取 *PgGLPs* 的表达量,利用 R 语言计算 *PgGLP* 基因之间的斯皮尔曼相关系数 (Spearman correlation coefficient),用 BioLayout Express3D (Version 3.4) 软件构建 *PgGLP* 基因家族成员间的协同互作网络图谱,并对所得到的

的结果进行分析。

2.9 *PgGLP* 基因在人参不同组织类型的表达分析

分别取实验室保存的裂口人参种胚及培养的人参不定根、愈伤组织、实生苗根、叶柄、叶不同组织材料,以人参不定根为对照,进行 qRT-PCR 分析。使用 ET101 型 RNA 提取试剂盒 (北京全式金技术股份有限公司) 提取人参不同组织中总 RNA,并使用 SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR (AG0305, SparkJade) 将其反转录成 cDNA 用于基因表达水平检测。以人参 *CYP* 为内参,设计 *PgGLP14-02*~*PgGLP17-01* 基因的荧光定量 PCR 引物 (表 3, 生工生物工程股份有限公司合成)。反应使用 2× Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix (G3326, 武汉塞维尔科技有限公司) 在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, Life Technologies) 上进行,用 Microsoft Excel 2021 软件统计荧光定量数据,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法统计基因相对表达水平情况,并使用独立样本 *t* 检验方法分析,利用 Graphad Prime 软件作图。每种组织材料设置 3 个生物学重复。

表 3 用于 qRT-PCR 的引物序列

Table 3 Primer sequence for qRT-PCR

基因名称	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
<i>PgCYP</i>	CAGGCAAAGAAAAAGTCAAGTG	AAAGAGACCCATTACAATACGC
<i>PgGLP14-02</i>	AGCTTGCTTTGGGACACTT	AGCAATGGGTTCGAATGGGT
<i>PgGLP15</i>	GGTGGTTTCAGTGAGGGGTT	TCAGTCTGCACCACATGCTT
<i>PgGLP16-01</i>	GCCAAAACATCAGCAGGCAA	GGGACAAATTGTGGTGGTGC
<i>PgGLP17-01</i>	AACCAACACCTTACCCTGCC	CCTCAACGGCGAAGGTTACT

3 结果与分析

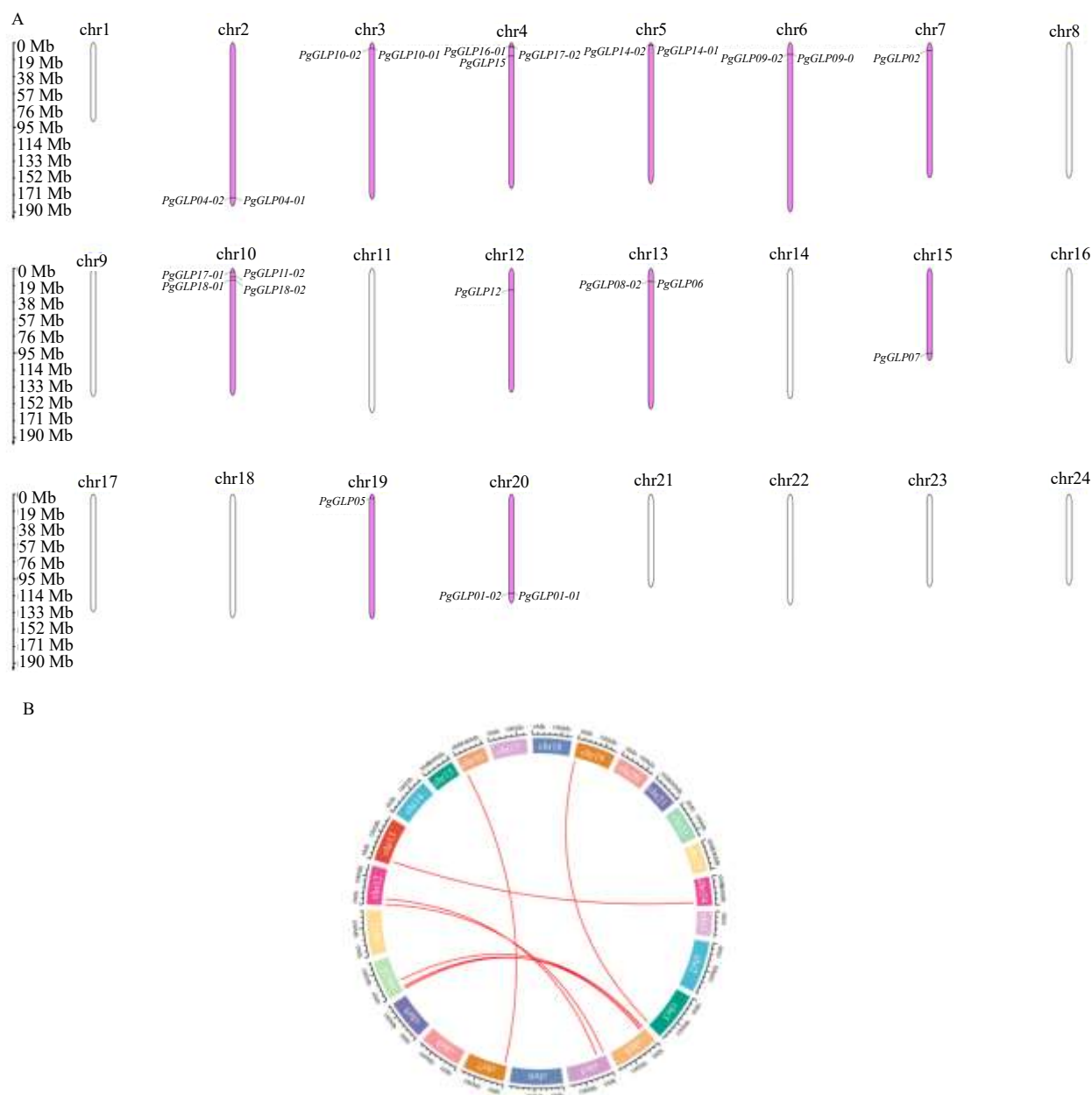
3.1 *PgGLP* 基因家族成员的鉴定

在人参转录组数据库中,共鉴定出 103 条含有 *GLP* 结构域 cupin-1 的转录序列。经过 NCBI CD-Search、ORF finder 和 SMART 等在线网站进行保守结构域分析,这些转录本中有 75 个保守结构域不完整或没有开放阅读框 (open reading frame, ORF) 内,其余 28 个转录本的 ORF 中包含完整的 *GLP* 结构域。因此,这 28 个转录本被用于后续分析。28 份人参 *PgGLP* 转录本被分类为 18 个 *PgGLP* 基因,命名为 *PgGLP01*~*PgGLP18*。同一基因的不同转录本通过数字后缀 (例如, -01) 来区分。这些转录本的长度从 663 到 2 163 不等,完整 ORF 的氨基酸数从 175 到 590 不等。

3.2 *PgGLPs* 的染色体定位和共线性分析

为确定 *PgGLPs* 在人参染色体上的分布,对上述

鉴定的 *PgGLP* 家族成员进行染色体定位和共线性分析。结果表明 *PgGLPs* 不均匀地分布在 12 条染色体上,其中染色体 chr 10 上定位到共 4 个 *PgGLP* 成员 *PgGLP11-02*、*PgGLP17-01*、*PgGLP18-01*、*PgGLP18-02*,是分布最多的。同时可以观察到同一基因的不同转录本在相同染色体位置,这是由于基因的可变性剪接及转录后修饰形成的,这些来自于同一位置基因的不同转录本,可能在生物体形成结构不同的蛋白质,从而行使不同的功能,这也是基因功能多样性的重要原因之一 (图 1-A)。共线性分析结果表明, *PgGLP* 基因家族具有共线性,可能发生分段重复事件 (图 1-B)。根据学者的研究,人参内部发生了 2 次独立的全基因组加倍事件,而加倍时间就可能是导致 *GLP* 基因家族成员分化形成不同结构的主要原因之一,基因的数量变异、结构变异、转座或反转录转座都是导致基因家族分化的重要因素。



A-PgGLPs 在人参染色体上的分布, B-PgGLPs 的共线性分析。
A-Distribution of PgGLPs on ginseng chromosomes, B-Covariance analysis of PgGLPs.

图 1 染色体定位与共线性分析

Fig. 1 Chromosome localisation and covariance analysis

3.3 PgGLP 基因家族的结构分析

为了研究 PgGLPs 的结构特征,分析 PgGLP 成员的保守基序和保守结构域,并进行了 PgGLPs 的系统发育分析(图 2)。PgGLP 基因家族成员的保守基序在 1~10,处于不同分支的 PgGLPs 的保守基序也存在差异,其中 motif 1、motif 2 和 motif 3 几乎存在于所有成员中,且所有人参 PgGLP 家族成员均有一个高度保守的 GLP 结构域 cupin-1,同一分支的 PgGLPs 表现出相似的基序特征,这些

PgGLPs 可能具有相同或相似的生物学功能。

3.4 PgGLP 基因家族的系统进化分析

为了解 PgGLPs 的系统进化模式,分别选取了模式植物拟南芥,单子叶植物水稻、小麦,双子叶植物棉花、花生,获取其 GLP 蛋白序列,并将 28 条 PgGLPs 的蛋白序列与来自以上 5 个不同物种的 GLP 蛋白序列进行多序列比对,构建 GLP 系统发育树(图 3)。28 个 PgGLPs 可以与拟南芥、水稻、小麦、棉花和花生的外源 GLP 一起聚集成 3 个进

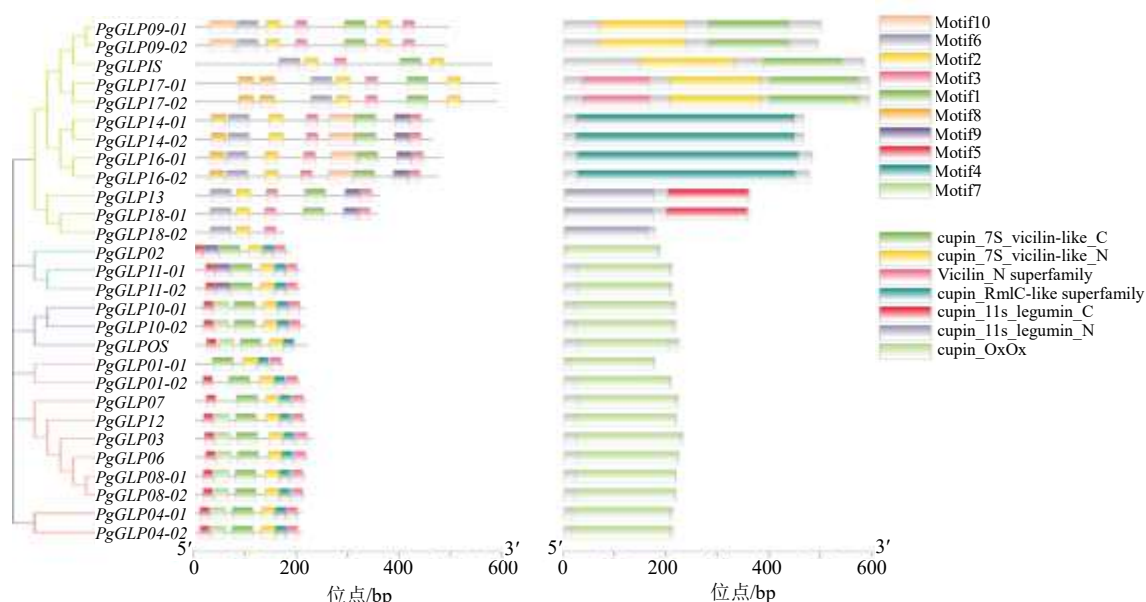
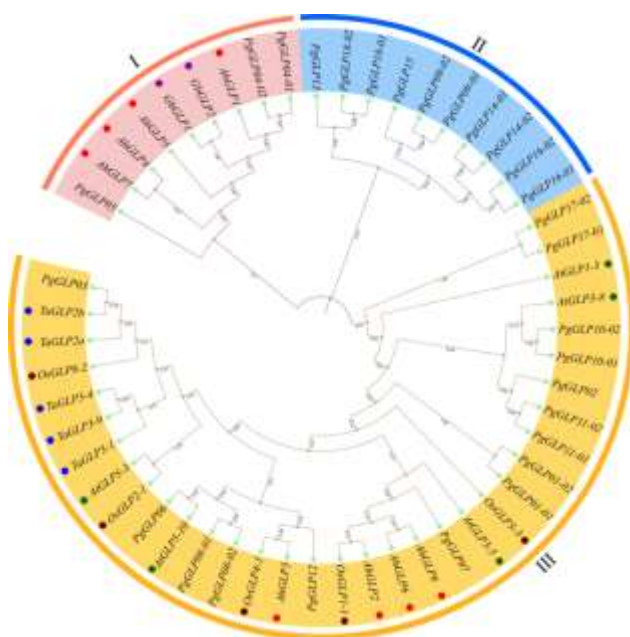


图 2 *PgGLPs* 保守基序和保守结构域分析

Fig. 2 Analysis of *PgGLPs* gene structure and conserved structural domains



图中不同颜色的○标注用以区分 5 个外源物种 *GLPs*。

The different colors of ○ in the figure are used to distinguish between the five exogenous species of *GLPs*.

图 3 *PgGLPs* 的系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *PgGLPs*

化支 (I、II、III)。其中亚型 III 中包含 15 个 *PgGLPs*，是人参中 *GLP* 成员最多的亚型，该亚型中如 *ThGLP3* 等外源物种 *GLP* 已被验证具有调节植物生长发育和抵抗胁迫的功能。亚型 II 中仅包含 *PgGLPs*，亚型 I 中包含的 *PgGLPs* 最少，仅 3 个。这与基因结构分析的结果可以相互呼应，亚型 II 中

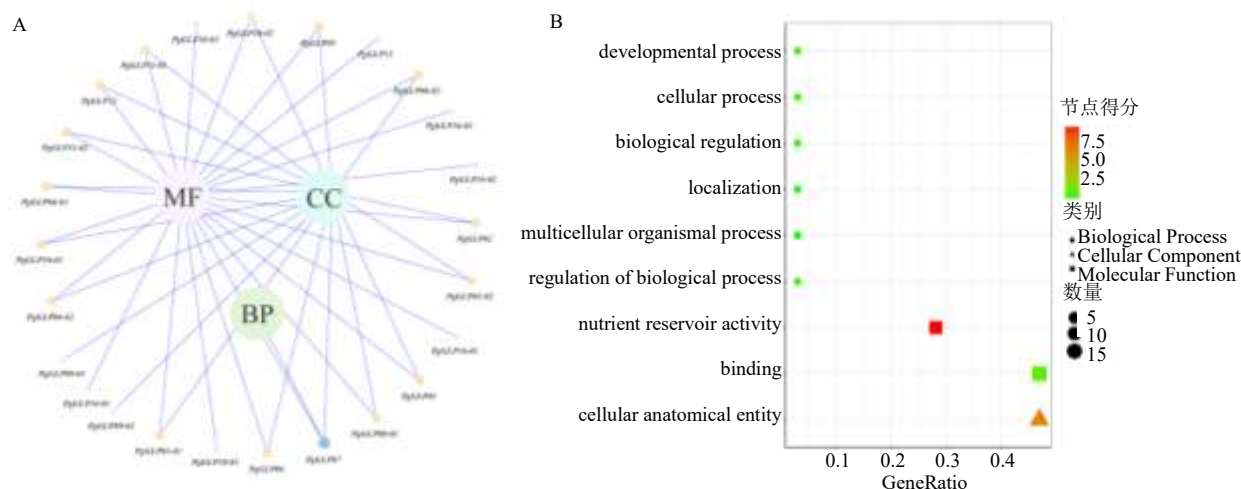
所归属的家族成员在保守基序及保守结构的分析中也聚类到一个支，并在 motif 与 CDS 中表现出与家族其他成员的特异性。

3.5 *PgGLP* 基因家族的功能分析

在生物体中，基因通常执行不同功能，为了解 *PgGLP* 基因家族的主要功能，对源自 18 个 *PgGLPs*

基因的 28 条转录本进行了 GO 功能注释(图 4-A)。共有 25 个 *PgGLPs* 被注释到功能类别, 其中, 有 22 个 *PgGLPs* 注释到分子功能(molecular function, MF), 有 17 个注释到细胞组分(cellular component, CC), 只有 1 个基因被注释到生物过程(biological process, BP)。与此同时, 功能注释为分子功能的 15 个 *PgGLPs* 也被注释到细胞组分, 且有 1 个 *PgGLP* 成员同时被注释到 3 种功能分类中, 可以体现出 *PgGLPs* 在人参中功能的多样性, 说明同一条转录本可能具有不同的生物学功能。接下来对 *PgGLPs* 在

Level 2 水平上进一步分析, 在 Level2 水平上 *PgGLPs* 注释到了 9 个不同功能(图 4-B), 分别为发育过程、生物过程调节、细胞过程、生物调节、多细胞生物过程、定位、营养储存活性、结合、细胞解剖实体。这些功能注释分析结果与前人在其他物种中研究 *GLP* 家族的功能相互吻合, 可能在植物体内 *GLP* 就是通过生物过程调节或与其他蛋白、基因结合从而影响植物细胞的形态及营养物质, 进而对植物表型及抗逆过程做出调节, 表明 *PgGLPs* 在人参生长发育中发挥重要作用。



A-*PgGLPs* 的 GO 功能注释的韦恩图; B-Level 2 水平上 GO 功能注释的气泡图。

A-Venn plots of GO functional annotations for *PgGLPs*; B-bubble plots of GO functional annotations at the Level 2.

图 4 *PgGLPs* 的 GO 功能注释分析

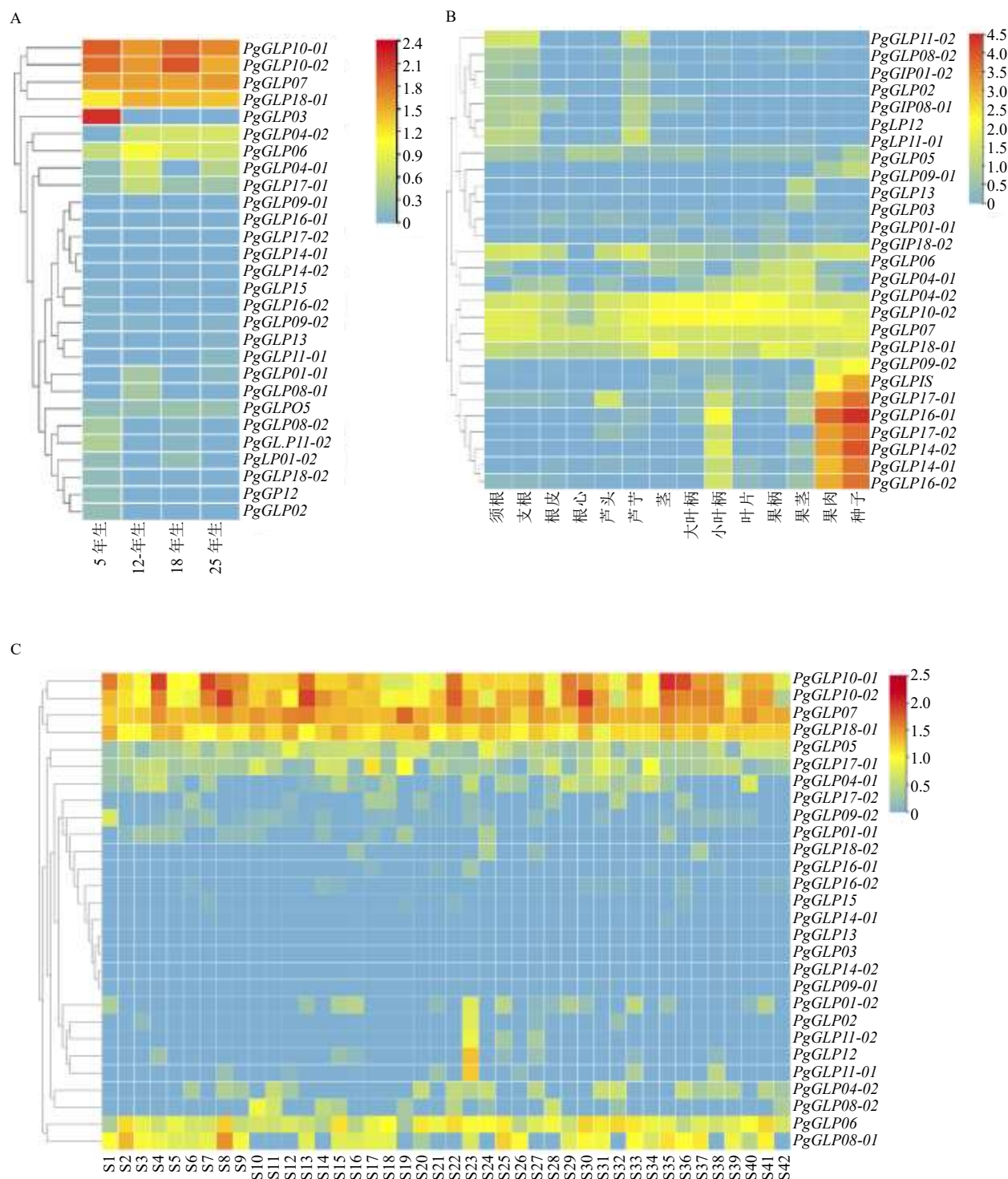
Fig. 4 GO functional annotation analysis of *PgGLPs*

3.6 *PgGLP* 基因家族的表达模式分析

为了解 *PgGLP* 基因家族成员在人参中的表达活动规律, 对 *PgGLPs* 在 4 个不同参龄人参主根, 四年生人参 14 个组织部位和 42 个农家品种中分别进行了表达模式分析, 结果表明, *PgGLPs* 转录本在不同组织、不同年生人参根系和不同农家品种中的表达量差异较大。

在人参 4 个不同年生人参主根中(5、12、18、25 年)表达可发现, 4 个不同年生人参主根中表达的转录本数量分别为 18、12、12、13 个。其中 7 个(25%) *PgGLPs* 在 4 个不同年生根中均有表达, 23 个(82%) *PgGLPs* 至少在一个参龄的根中表达, 有 5 个(18%) *PgGLPs* 在 4 个不同年生人参主根中均不表达, 可能这些 *PgGLPs* 在人参特定的组织部位发挥生物学功能, 其表达具有组织特异性, 例如 *PgGLP14-01*、*PgGLP14-02* 在人参主根中不表达,

而在人参种子中高表达。*PgGLPs* 在 5 年生人参根中表达数量最多(图 5-A)。在人参 14 个组织部位中, 所有 28 个 *PgGLPs* 均有表达, 而且大多数 *PgGLPs* 基因通常在人参的 2 个或多个组织中表达, 如 *PgGLP14-01*、*PgGLP14-02*、*PgGLP15*、*PgGLP16-01*、*PgGLP16-02*、*PgGLP17-01*、*PgGLP17-02* 只在人参果肉和种子中高表达, 显著高于其他组织部位, 这表明 *PgGLP* 基因家族成员在人参中的表达具有组织特异性(图 5-B)。如图 5-C 所示, 在 42 个人参品种中, *PgGLPs* 基因有 24 个至少在 1 个品种中表达, 有 4 条基因在所有品种中均不表达, 有 6 条基因在 42 个农家品种中均有表达(图 5-C)。这表明 *PgGLP* 基因家族成员在人参不同农家品种中的表达存在差异, 而这种选择性表达的差异, 也可能说明 *GLP* 基因家族成员可能在植物的不同组织部位及不同发育时期发挥功能。部分不表达的基



A-PgGLPs 在 4 个不同年生人参主根中的表达热图; B-PgGLPs 在 14 个不同组织部位的表达热图; C-PgGLPs 在 42 个农家栽培品种的表达热图。

A-heatmap of PgGLPs expression in four different annual ginseng primary roots; B-heatmap of PgGLPs expression in 14 different tissue sites; C-heatmap of PgGLPs expression in 42 agricultural cultivars.

图 5 PgGLPs 的表达模式分析

Fig. 5 Expression pattern analysis of PgGLPs

因可能是具有组织特异性,在该部位不表达,可能是该基因为诱导性基因,在未接收信号分子时表达情况维持在一个低水平,这也与前人研究的 GLP 可能响

应逆境胁迫因子表达,从而发挥抗逆功能相吻合。

3.7 PgGLPs 的顺式作用元件分析

为了进一步探索 PgGLPs 在人参中的功能,对

位于翻译起始位点上游 2 000 bp 的顺式作用元件进行分析(图 6)。按功能可将它们分为生长发育、激素和应激相关的反应元件, *PgGLP* 基因家族具有如生长素、赤霉素、脱落酸、茉莉酸甲酯和水杨酸等激素类响应元件; 如干旱胁迫、厌氧感应、低温响应、防御和压力反应能力和伤口响应元件等胁迫

响应元件; 如细胞周期调控、分生组织表达、种子特异性调节、类黄酮生物合成基因调控、胚乳表达等生长发育响应元件。根据顺式作用元件分析可知, *PgGLPs* 基因上广泛存在生长发育、激素以及逆境生理的响应元件, 表明 *PgGLPs* 可能在人参生长发育和逆境胁迫方面具有重要作用。

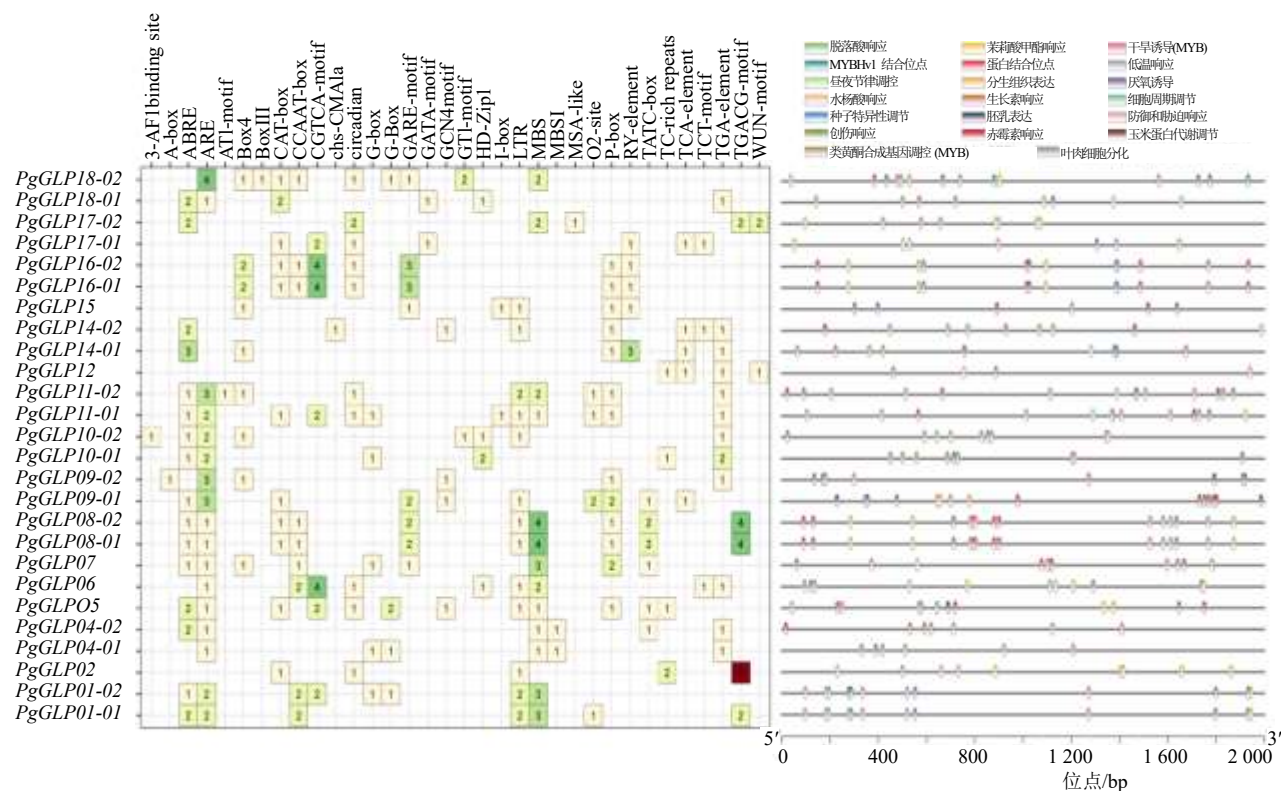


图 6 *PgGLPs* 顺式作用元件分析

Fig. 6 Analysis of cis-acting elements of *PgGLPs*

3.8 *PgGLP* 基因家族的互作分析

目前研究表明, 基因家族成员在参与生物学过程中不是单独发挥作用的, 大多是以协同互作的方式行使其功能。为考察 *PgGLPs* 基因成员之间的表达关联, 根据 *PgGLPs* 在 42 个不同农家品种中的表达情况, 构建 *PgGLP* 基因家族成员间的共表达网络图谱。在人参 42 个农家品种中, 24 条 *PgGLPs* 转录本形成了共表达网络, 该互作网络由 24 个节点和 32 条连线形成, 共聚集在 2 个 cluster 中, 每个 cluster 中的基因存在互作关系(图 7)。

3.9 *PgGLP* 基因在人参不同组织类型的表达分析

基因的表达分析可以为研究其功能提供重要参考, 因此根据上述分析结果选取 4 条基因研究了 *PgGLP* 基因家族成员在人参种胚、愈伤组织、实生苗根、叶柄、叶 5 种组织类型中的表达情况(图 8)。4 条 *PgGLP* 基因在人参的不同组织中的表达模式

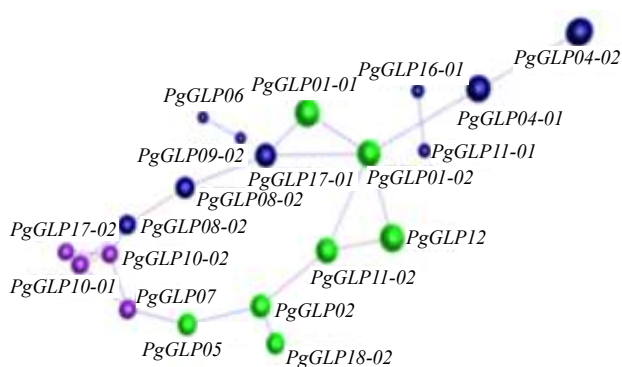
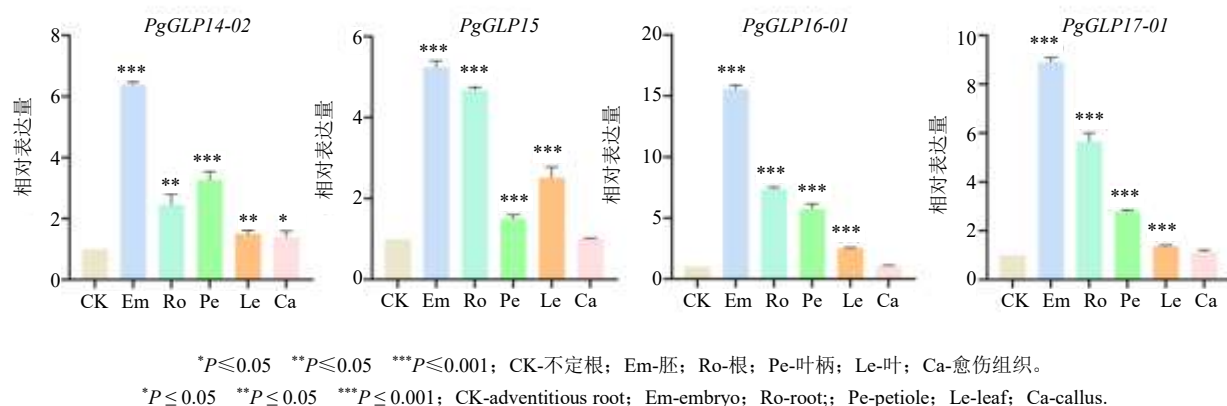


图 7 *PgGLPs* 的互作网络分析

Fig. 7 Interaction network analysis of *PgGLPs*

不同, *PgGLP14-02*、*PgGLP15*、*PgGLP16-01*、*PgGLP17-01* 在人参实生苗根和叶柄中表达量较高, 在种胚中的表达量最高, *PgGLP16-01*、*PgGLP17-01* 在不同组织部位中表达量趋势一致, 且 *PgGLP16-01* 在人参种胚中表达量高于其他几条

图 8 *PgGLP* 家族基因的组织特异性表达分析Fig. 8 Tissue specific expression analysis of *PgGLP* family gene in *P. ginseng*

基因,说明 *PgGLPs* 基因的表达具有组织特异性。此外,4条 *PgGLPs* 基因普遍在人参不同组织中表达,表明它们可能在生命活动中发挥广泛的作用。而这种表达现象也表明,这4个基因家族成员均表现出在完整植物组织中的高表达,且遵循发育全能性越高,表达程度越高的规律。而诱导产生的愈伤组织虽然在全能性的方面相较于根、叶柄、叶要高,但其在发育过程中不同步,易发生遗传变异,且多为嵌合体,遗传稳定性差,这可能是导致 *GLP* 在这种无序的细胞团中并没有表现出较高的表达的原因。

4 讨论

植物类萌发素蛋白 *GLP* 在植物中发挥重要的功能,几乎所有植物中都包含此类蛋白。迄今为止,在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* Heynh.^[38]、水稻 *Oryza sativa* L.^[38]、大豆 *Glycine max* Merr.^[41]、香蕉 *Musa nana* Lour.^[42]、花生 *Arachis hypogaea* L.^[43]、龙眼 *Dimocarpus longan* Lour.^[44]和茶树 *Camellia sinensis* Kuntze.^[23]等植物中分别鉴定出32、43、21、44、36、35、8个 *GLP* 成员。本研究首次从人参中鉴定得到28个 *PgGLP* 成员,人参中 *PgGLPs* 数量和其他物种相比居中,不同植物物种间 *GLP* 家族基因数量也不尽相同。此外, *PgGLP* 家族成员不均匀地定位在12条染色体上,各条染色体上包含1~4个成员,并存在串联复制的基因具有同源进化关系,表明 *PgGLP* 基因家族的扩增可能是由基因复制事件造成的,在植物基因组中,基因复制和分化是基因家族扩张和新功能演化的必要步骤^[45]。基因结构的改变似乎影响了不同成员的表达水平和功能^[46-47]。

植物 *GLP* 蛋白可以参与到植物生长发育、抗逆生理、激素响应等过程,调节人参中 *PgGLP* 基因

的表达能够影响人参的生长发育,在中药层面上影响着药材的品质。基因启动子的顺式作用元件是调控多种生物过程的重要分子开关^[48-49],通过分析 *PgGLP* 基因启动子区域的顺式作用元件,发现人参中该家族成员的启动子区域不仅包括干旱和低温响应元件,还有比如生长素、赤霉素、脱落酸、茉莉酸甲酯响应元件等激素响应元件以及分生组织表达、种子特异性调节、胚乳表达等生长发育响应元件等。这意味着 *PgGLP* 基因不仅可以参与胁迫响应过程,而且还参与了对人参生长发育的调控。*PgGLPs* 在人参不同组织材料中 qRT-PCR 的结果表明, *PgGLP14-02*、*PgGLP15*、*PgGLP16-01*、*PgGLP17-01* 在人参种胚、愈伤组织、实生苗根、叶柄、叶5种组织中均有表达,且具有组织表达特异性,4条基因在人参实生苗的根和叶柄中表达量较高,且在人参种胚中的表达量显著高于其他组织,与四年生人参14个不同组织部位的表达模式相吻合,推测其可能参与人参种胚的发育,与种子萌发等生理过程相关,并在幼苗的根和叶柄的生长发育中发挥功能,表明 *PgGLP* 家族成员在人参生长发育过程中的功能多样性。

综上所述,本研究从人参中筛选鉴定了18个 *PgGLP* 基因下的28个转录本,并对其基因结构、进化关系、表达模式和顺式作用元件进行了分析。此外,还研究了 *PgGLP* 基因人参种胚、愈伤组织、实生苗根、叶柄、叶5种组织类型中的表达情况。研究结果表明, *PgGLP* 基因家族的成员在功能上是多样化的,在人参的不同组织中表现出不同的表达模式,具有组织特异性,进一步证实了 *PgGLP* 基因家族在人参生长发育中的作用,为今后人参遗传育

种提供了理论依据。*PgGLP* 基因家族的鉴定和综合分析, 将为人参功能基因组学的深入研究提供理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ratan Z A, Haidere M F, Hong Y H, *et al.* Pharmacological potential of ginseng and its major component ginsenosides [J]. *J Ginseng Res*, 2021, 45(2): 199-210.
- [2] Zhang G Z, Liu A L, Zhou Y B, *et al.* *Panax ginseng* ginsenoside-Rg2 protects memory impairment via anti-apoptosis in a rat model with vascular dementia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 115(3): 441-448.
- [3] Hyun S H, Bhilare K D, In G, *et al.* Effects of *Panax ginseng* and ginsenosides on oxidative stress and cardiovascular diseases: Pharmacological and therapeutic roles [J]. *J Ginseng Res*, 2022, 46(1): 33-38.
- [4] Chen F, Huang G L. Antioxidant activity of polysaccharides from different sources of ginseng [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125: 906-908.
- [5] Cho W C S, Chung W S, Lee S K W, *et al.* Ginsenoside Re of *Panax ginseng* possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 550(1/2/3): 173-179.
- [6] Li W Z, Wang Y F, Zhou X B, *et al.* The anti-tumor efficacy of 20(S)-protopanaxadiol, an active metabolite of ginseng, according to fasting on hepatocellular carcinoma [J]. *J Ginseng Res*, 2022, 46(1): 167-174.
- [7] Arring N M, Millstine D, Marks L A, *et al.* Ginseng as a treatment for fatigue: A systematic review [J]. *J Altern Complement Med*, 2018, 24(7): 624-633.
- [8] Qu Q S, Yang F, Zhao C Y, *et al.* Effects of fermented ginseng on the gut microbiota and immunity of rats with antibiotic-associated diarrhea [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113594.
- [9] Li X Y, Sun L W, Zhao D Q. Current status and problem-solving strategies for ginseng industry [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(12): 883-886.
- [10] 任广勇, 杨忠亮, 黄飞, 等. 中国人参品种选育及 SNP 技术应用研究进展 [J]. *人参研究*, 2023, 35(5): 44-48.
- [11] Das A, Pramanik K, Sharma R, *et al.* In-silico study of biotic and abiotic stress-related transcription factor binding sites in the promoter regions of rice germin-like protein genes [J]. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0211887.
- [12] Khuri S, Bakker F T, Dunwell J M. Phylogeny, function, and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins [J]. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(4): 593-605.
- [13] Chakraborty S, Chakraborty N, Jain D, *et al.* Active site geometry of oxalate decarboxylase from *Flammulina velutipes*: Role of histidine-coordinated manganese in substrate recognition [J]. *Protein Sci*, 2002, 11(9): 2138-2147.
- [14] 李波, 许昕蕾. 植物类萌发素蛋白研究进展 [J]. *现代农业科技*, 2021(19): 199-201.
- [15] 刘超, 张林华, 邱红林, 等. 天山雪莲 *SikGLP* 基因的克隆及表达分析 [J]. *植物研究*, 2013, 33(4): 461-467.
- [16] Sakamoto A, Nishimura T, Miyaki Y I, *et al.* In vitro and in vivo evidence for oxalate oxidase activity of a germin-like protein from *Azalea* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 458(3): 536-542.
- [17] Dunwell J M. Cupins: A new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins [J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1998, 15: 1-32.
- [18] Shutov A D, Braun H, Chesnokov Y V, *et al.* A gene encoding a vicilin-like protein is specifically expressed in fern spores. Evolutionary pathway of seed storage globulins [J]. *Eur J Biochem*, 1998, 252(1): 79-89.
- [19] Wang T, Chen X P, Zhu F H, *et al.* Characterization of peanut germin-like proteins, *AhGLPs* in plant development and defense [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61722.
- [20] Ilyas M, Rasheed A, Mahmood T. Functional characterization of germin and germin-like protein genes in various plant species using transgenic approaches [J]. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(9): 1405-1421.
- [21] Bruno L, Spadafora N D, Iaria D, *et al.* Developmental stimuli and stress factors affect expression of *CIGLPI*, an emerging allergen-related gene in *Citrus limon* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2014, 79: 31-40.
- [22] El-Sharkawy I, Mila I, Bouzayen M, *et al.* Regulation of two germin-like protein genes during plum fruit development [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(6): 1761-1770.
- [23] Fu J Y, Wang X C, Mao T F, *et al.* Identification and functional analysis of germin-like protein Gene family in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Sci Hort*, 2018, 234: 166-175.
- [24] Wang H T, Zhang Y M, Xiao N, *et al.* Rice *GERMIN-LIKE PROTEIN 2-1* functions in seed dormancy under the control of abscisic acid and gibberellic acid signaling pathways [J]. *Plant Physiol*, 2020, 183(3): 1157-1170.
- [25] Mathieu M, Lelu-Walter M A, Blervacq A S, *et al.* Germin-like genes are expressed during somatic embryogenesis and early development of conifers [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 61(4/5): 615-627.
- [26] Mathieu M, Neutelings G, Hawkins S, *et al.* Cloning of a

- pine germin-like protein (GLP) gene promoter and analysis of its activity in transgenic tobacco Bright Yellow 2 cells [J]. *Physiol Plant*, 2003, 117(3): 425-434.
- [27] Manosalva P M, Davidson R M, Liu B, *et al.* A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease resistance in rice [J]. *Plant Physiol*, 2009, 149(1): 286-296.
- [28] Gucciardo S, Wisniewski J P, Brewin N J, *et al.* A germin-like protein with superoxide dismutase activity in pea nodules with high protein sequence identity to a putative rhicadhesin receptor [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58(5): 1161-1171.
- [29] Irian S, Xu P, Dai X B, *et al.* Regulation of a virus-induced lethal disease in tomato revealed by LongSAGE analysis [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2007, 20(12): 1477-1488.
- [30] Membré N, Bernier F, Staiger D, *et al.* *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: Common and specific features point to a variety of functions [J]. *Planta*, 2000, 211(3): 345-354.
- [31] Lee J Y, Lee D H. Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* pollen undergoing cold stress [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 517-529.
- [32] Pinheiro C, Kehr J, Ricardo C P. Effect of water stress on lupin stem protein analysed by two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Planta*, 2005, 221(5): 716-728.
- [33] Zhu J M, Alvarez S, Marsh E L, *et al.* Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. II. Region-specific changes in water soluble and lightly ionically bound proteins under water deficit [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145(4): 1533-1548.
- [34] van de Mortel J E, Schat H, Moerland P D, *et al.* Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* [J]. *Plant Cell Environ*, 2008, 31(3): 301-324.
- [35] Sung D Y, Lee D, Harris H, *et al.* Identification of an arsenic tolerant double mutant with a thiol-mediated component and increased arsenic tolerance in phyA mutants [J]. *Plant J*, 2007, 49(6): 1064-1075.
- [36] Leitner A, Jensen-Jarolim E, Grimm R, *et al.* Allergens in pepper and paprika. Immunologic investigation of the celery-birch-mugwort-spice syndrome [J]. *Allergy*, 1998, 53(1): 36-41.
- [37] Wang K Y, Jiang S C, Sun C Y, *et al.* The spatial and temporal transcriptomic landscapes of ginseng, *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18283.
- [38] Li L, Xu X H, Chen C, *et al.* Genome-wide characterization and expression analysis of the germin-like protein family in rice and *Arabidopsis* [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(10): 1622.
- [39] Yuan B J, Yang Y L, Fan P, *et al.* Genome-wide identification and characterization of germin and germin-like proteins (GLPs) and their response under powdery mildew stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Mol Biol Report*, 2021, 39(4): 821-832.
- [40] Sun M L, Ye Z X, Tan J F, *et al.* A cotton germin-like protein *GbGLP2* controls fiber length via regulating genes involved in secondary cell wall synthesis [J]. *Mol Breed*, 2020, 40(10): 98.
- [41] Lu M, Han Y P, Gao J G, *et al.* Identification and analysis of the germin-like gene family in soybean [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 620.
- [42] 刘范, 田娜, 孙雪丽, 等. 香蕉 GLP 基因家族全基因组鉴定及表达分析 [J]. 园艺学报, 2020, 47(10): 1930-1946.
- [43] Chen X P, Wang M L, Holbrook C, *et al.* Identification and characterization of a multigene family encoding germin-like proteins in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Plant Mol Biol Report*, 2011, 29(2): 389-403.
- [44] 李卓蕴. GLP 家族全基因组鉴定及 *GLP1-5-1* 在龙眼中的功能研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2023.
- [45] 谭政委, 郭水柱, 苏小雨, 等. 全基因组水平金银花 *TCP* 基因家族的鉴定及表达模式分析 [J]. 中草药, 2024, 55(5): 1665-1676.
- [46] Faraji S, Heidari P, Amouei H, *et al.* Investigation and computational analysis of the sulfotransferase (SOT) gene family in potato (*Solanum tuberosum*): Insights into sulfur adjustment for proper development and stimuli responses [J]. *Plants*, 2021, 10(12): 2597.
- [47] Heidari P, Puresmaeli F, Mora-Poblete F. Genome-wide identification and molecular evolution of the magnesium transporter (MGT) gene family in *Citrullus lanatus* and *Cucumis sativus* [J]. *Agronomy*, 2022, 12(10): 2253.
- [48] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Organization of *Cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(2): 88-94.
- [49] Xiao S, Chu Y, Chen Y, *et al.* Genome-wide identification and transcriptional profiling analysis of PIN/PILS auxin transporter gene families in *Panax ginseng* [J]. *Chin Herb Med*, 2021, 14(1): 48-57.

[责任编辑 时圣明]