

蒙古黄芪 GRF 转录因子家族全基因组鉴定及不同生长阶段表达分析

石志勇¹, 卢庚龙¹, 刘红军¹, 牛景萍¹, 赵 详², 李玉芳³, 张 全³, 梁建萍^{1,4*}

1. 山西农业大学生命科学学院, 山西 晋中 030801

2. 山西北岳神耆生物科技股份有限公司, 山西 大同 034400

3. 山西省浑源县现代农业发展中心, 山西 大同 037400

4. 山西农业大学 中兽医现代化山西省重点实验室, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 在全基因组水平鉴定蒙古黄芪生物调控因子 (Growth-regulating factors, GRF) 转录因子家族成员, 开展系统的生物信息学分析, 并探究该家族基因在黄芪不同生长期的表达模式, 为研究 GRF 转录因子调控黄芪次生代谢的分子机制提供基础。**方法** 通过生物信息学方法鉴定黄芪 GRF 转录因子家族, 对其编码蛋白的理化特性、保守结构域组成、潜在亚细胞定位、系统发育关系及启动子区顺式调控元件进行预测分析, 利用转录组数据研究 GRF 基因在黄芪不同生长期的表达模式, 并与黄芪根中黄酮皂苷含量数据进行基因表达与代谢物积累的相关性评估。**结果** 蒙古黄芪基因组共鉴定获得 9 个 GRF 转录因子家族成员, 分别定位在 7 条染色体, 聚类为 5 个亚家族。AmGRF 蛋白氨基酸残基数目在 320~642 aa, 均表现为亲水性特征, 不存在跨膜结构域及信号肽序列, 亚细胞定位均在细胞核。系统进化分析显示, AmGRF 转录因子与大豆 GRF 亲缘关系较近。AmGRF 基因启动子区存在大量与光信号响应、激素信号转导、生长发育及逆境胁迫应答相关的顺式作用元件。转录组数据表明, AmGRF 基因各成员在不同生长期根部组织的表达模式存在较大差异, 表明各家族成员可能在黄芪不同生长阶段中发挥特异的调控作用。基因表达与黄芪黄酮皂苷含量相关性分析显示, AmGRF3 和 AmGRF4 与黄芪根中黄酮代谢调控相关, AmGRF5、AmGRF6 和 AmGRF8 与黄芪根中皂苷代谢调控相关。**结论** 在全基因组水平对蒙古黄芪 GRF 基因家族进行鉴定和生信分析, 通过黄芪不同生长期根中皂苷黄酮含量测定和 GRF 基因表达数据, 鉴定出与黄芪黄酮皂苷代谢相关的 GRF 转录因子, 为深入解析该家族调控蒙古黄芪生长发育及次生代谢的生物学功能提供关键靶点。

关键词: 蒙古黄芪; GRF 转录因子; 生物信息学; 系统发育; 表达模式

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)13-4779-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.13.021

Genome-wide identification of GRF transcription factor family in *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and its expression analysis at different growth stages

SHI Zhiyong¹, LU Genglong¹, LIU Hongjun¹, NIU Jingping¹, ZHAO Xiang², LI Yufang³, ZHANG Quan³, LIANG Jianping^{1,4}

1. College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China

2. Shanxi Beiyue Shenqi Biotechnology Co., Ltd., Datong 034400, China

3. Modern Agricultural Development Center, Hunyuan County, Shanxi Province, Datong 037400, China

4. Shanxi Key Laboratory of Modernization of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To identify the growth-regulating factors (GRF) transcription factor family at the whole genome level of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* by bioinformatics methods, and analyze its expression pattern at different growth stages, providing a basis for studying the molecular mechanism of GRF transcription factors regulating the secondary metabolism of *A. membranaceus* var.

收稿日期: 2025-01-02

基金项目: 山西省科技成果转化引导专项 (202304021301059); 山西省科技重大专项计划“揭榜挂帅”项目 (202405071301030); 山西省现代农业中药材产业技术体系建设专项 (2025); 山西农业大学 2025 年度“特”“优”农业高质量发展科技支撑工程项目“恒山黄芪微生物接种播种技术示范” (TYGC25, 79-81)

作者简介: 石志勇, 讲师, 研究方向为药用植物生态栽培。E-mail: shizy@sxau.edu.cn

***通信作者:** 梁建萍, 教授, 博士生导师, 研究方向为药用植物生态栽培。E-mail: liangjp@sxau.edu.cn

mongholicus. **Methods** The GRF transcription factor family members of *A. membranaceus* var. *mongholicus* were identified, and their protein physicochemical properties, protein conserved motifs, subcellular localization, phylogenetic analysis, and *cis*-acting element prediction were analyzed by bioinformatics methods. The transcriptome data were used to study the expression pattern of the *GRF* gene in different growth stages of *A. membranaceus* var. *mongholicus*. **Results** A total of nine GRF transcription factors were identified, which were located on seven chromosomes and clustered into five subfamilies. The amino acid number of AmGRFs was 320—642 aa. They were all hydrophilic proteins without transmembrane structure and signal peptide structure, and all of which are located in the nucleus. Phylogenetic analysis showed that AmGRF transcription factors were closely related to soybean GRFs. There were a large number of *cis*-acting elements related to light signal response, hormone signal transduction, growth and development, and stress response to adverse conditions in the promoter region of *AmGRF* genes. Transcriptome data showed that the expression patterns of *AmGRF* genes in root tissues at different growth stages were quite different. This indicated that each family member may play a specific regulatory role in different growth stages of *A. membranaceus* var. *mongholicus*. Correlation analysis between gene expression and flavonoid and saponin content of *A. membranaceus* var. *mongholicus* showed that *AmGRF3* and *AmGRF4* were related to the regulation of flavonoid metabolism, while *AmGRF5*, *AmGRF6* and *AmGRF8* were related to the regulation of saponin metabolism in *A. membranaceus* var. *mongholicus* root. **Conclusion** The identification and bioinformatics analysis of the *GRF* gene family of *A. membranaceus* var. *mongholicus* were conducted at the whole-genome level. Based on the determination of saponin and flavonoid contents in the roots of *A. membranaceus* var. *mongholicus* at different growth stages and the expression data of *GRF* genes, the GRF transcription factors related to the metabolism of flavonoid saponins in *A. membranaceus* var. *mongholicus* were identified, providing key targets for in-depth analysis of the biological functions of this family in regulating the growth and development as well as secondary metabolism of *A. membranaceus* var. *mongholicus*.

Key words: *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao; GRF transcription factor; bioinformatics; phylogeny; expression pattern

蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 是豆科黄芪属多年生草本植物,以根入药,主要药效成分为黄酮类化合物(如毛蕊异黄酮、芒柄花素)、三萜皂苷(如黄芪甲苷、异黄芪皂苷)及多糖组分等次生代谢物^[1]。黄芪素有“十药八芪”之称,是一味药用价值高,药理作用广泛的大宗药材,以山西浑源、甘肃陇西、内蒙古固阳、陕西子洲、及黑龙江牡丹江等产区为代表。黄芪在山西多地区均有种植,其中以浑源为黄芪“道地”产区,出品的正北芪是山西名贵道地药材。黄芪作为一种重要的药用植物,在中医药理学中有着悠久的历史^[2]。黄芪被广泛应用于调节免疫及心血管功能,并已证实具有抗氧化、抗炎等多种药理作用^[3-4]。

植物的生长发育过程受到各种外源和内生生物和非生物因素的调控,在此过程中转录因子起到关键作用^[5]。生物调控因子(Growth-regulating factors, GRF)转录因子作为一类重要的植物特异性转录因子,因其调控生长相关基因的能力而受到广泛研究^[6-9]。GRF 转录因子通过参与叶片形态发育、根尖分生组织活性、花器官分化、种子发育、激素信号传递及次生代谢调控,广泛响应发育和胁迫调控过程^[10-12]。已有研究证实,拟南芥 *AtGRF1/2* 过表达可增大叶片和子叶面积, *AtGRF8* 则调控花器

官发育^[13-15]。番茄中的 *GRF* 基因家族在生长过程中起着广泛作用, *SIGRF1* 在果实成熟期表达上调, *SIGRF10* 在营养组织高表达, *SIGRF4/8* 在花蕾富集, *SIGRF6* 在根中表达量最高^[16]。花生 *AhGRF5* 在荚果期显著激活^[17]。Chen 等^[12]研究发现过表达 *OsGRF7* 的水稻品系在高盐条件下的存活率更高,籽粒尺寸也比对照植株大,揭示 *OsGRF7* 调控水稻耐盐新机制。GRF 转录因子家族蛋白序列具有特定的高度保守结构域, N 末端含 QLQ (Gln-Leu-Gln) 和 WRC (Trp-Arg-Cys) 保守域。QLQ 结构域与酵母 SWI2/SNF2 蛋白的 N 末端具有高度同源性,是重要的蛋白质相互作用结构域。WRC 作为植物特有 DNA 结合域,介导核内靶基因转录调控^[18]。植物根系具有水分养分吸收、激素合成与运输、非生物胁迫响应、次生代谢物生物合成等功能^[19-21], GRF 转录因子在这些生物学过程中行使核心调控功能。而黄芪的药用价值体现在根内黄芪黄酮、黄芪皂苷等次生代谢物的积累,因此有必要研究 *GRF* 基因在黄芪根中的表达模式。

本研究旨在全基因组水平上利用生物信息学方法鉴定分析蒙古黄芪 GRF 转录因子家族的结构特征、功能分化及进化关系,并通过转录组分析黄芪各生长期 *GRF* 基因在根组织的表达,以期揭示其在黄芪生长发育、次生代谢物积累中的潜在作用

机制,为后期研究 GRF 转录因子调控蒙古黄芪次生代谢产物合成机制,药用价值提升提供理论数据基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

黄芪样本采于山西省浑源县千哨村(海拔 1 768 m; 113°33'26.225"E, 39°32'43.143"N)国家黄芪 GAP 种植基地。分别于两年生黄芪营养生长期、花期、果期、果熟期、落叶期采集根组织新鲜样本,其中转录组测序用样本置于液氮中带回实验室转存在 -80 °C 冰箱。对照品黄芪甲苷(批号 SA8640)、芦丁(批号 R8170-25g),质量分数均大于 98%,购于北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器

ThermoFisher StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪(赛默飞世尔科技公司),Agilent 2100 Bioanalyzer 生物分析仪(安捷伦科技有限公司),JHBE-50T 型闪氏提取器(河南盛孚生物科技有限公司),UV1900PC 双光束紫外可见分光光度计(美析仪器有限公司)。

2 方法

2.1 数据的获取

植物转录因子数据库(PlantTFDB, <https://planttfdb.gao-lab.org>)下载大豆、拟南芥、水稻 GRF 基因家族数据作为参考库^[22],从药用植物基因组数据库(<http://www.gpgenome.com/>)下载蒙古黄芪基因组数据^[23-24]。在 Pfam 蛋白质家族数据库(<https://pfam.xfam.org/>)获取 GRF 蛋白保守结构域(QLQ: PF08880, WRC: PF08879)隐马尔可夫模型文件。

2.2 黄芪 GRF 基因(*AmGRF*)家族成员的鉴定

对下载的黄芪基因组蛋白数据进行预处理后,采用 NCBI-BLAST 工具,以拟南芥、大豆和水稻的 GRF 蛋白为参照,在 E 值阈值 $\leq 1 \times 10^{-5}$ 条件下进行同源序列比对。同步运用 HMMER 工具包的 hmmsearch 模块,将黄芪蛋白序列与 Pfam 数据库获取的 GRF 蛋白保守结构域 HMM 模型进行匹配。综合上述双向筛选结果,最终确定蒙古黄芪 GRF 基因家族成员。利用 Tbtools 软件对 *AmGRF* 基因数据与基因组注释数据进行染色体定位^[25]。

2.3 *AmGRF* 基因家族的蛋白理化性质分析

AmGRF 蛋白家族的理化参数利用 ExPASy

(<https://web.expasy.org/protparam>)分析,包括氨基酸数目、相对分子质量、等电点、疏水性。通过 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)预测信号肽结构。采用 DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>)检测跨膜结构域。基于 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp>)预测蛋白亚细胞定位。

2.4 *AmGRF* 基因家族系统发育与保守基序分析

通过 MEGA 10.0 软件对黄芪、拟南芥、水稻及大豆的 GRF 蛋白序列执行多序列比对,基于邻接法(neighbor joining, NJ)构建系统进化树(bootstrap = 1 000)^[26]。进化树 nwk 格式文件经 iTOL 平台(<https://itol.embl.de>)进行美化处理。采用 MEME 工具(<http://meme-suite.org>)预测蛋白保守基序。

2.5 *AmGRF* 基因启动子顺式作用元件鉴定

应用 TBtools 工具截取 *AmGRF* 基因翻译起始位点上游 2 000 bp 区域作为启动子序列,通过 PlantCARE 数据库工具(<http://bionformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare>)预测顺式作用元件^[27],结果经由 TBtools 实现图形化展示。

2.6 黄芪不同生长期根中总黄酮和总皂苷含量测定

称取 1 g 黄芪根组织样本粉末溶于 30 mL 75%乙醇溶液,用闪氏提取仪于 120 V 下提 60 s, 4 °C 条件下以 5 000 r/min 离心 10 min 收集上清,沉淀重复提取 1 次,合并 2 次上清液。50 °C 浓缩至 2 mL,用 30%乙醇定容至 10 mL,获得待测样品溶液^[28]。

总黄酮含量依据硝酸铝比色法测定^[28],以芦丁为对照品,510 nm 波长检测,标准曲线回归方程 $Y = 7.6757X - 0.0083$, $R^2 = 0.9993$;总皂苷含量按香草醛-硫酸法检测^[29],以黄芪甲苷为对照品,544 nm 波长检测,标准曲线回归方程 $Y = 12.595X + 0.0199$, $R^2 = 0.9993$ 。根据吸光度(A)值代入方程计算含量,所有实验设 3 次生物学重复并进行统计学分析。

2.7 黄芪各生长期 *AmGRF* 基因根组织表达分析

课题组前期研究中测序了黄芪根部营养生长期至落叶期转录组数据^[30]。提取 *AmGRF* 基因表达谱,采用 TBtools 生成表达量热图。

通过实时荧光定量 PCR 验证 *AmGRF* 基因表达模式。引物由 Primer 6.0 设计(表 1),委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。使用 TransZol Up Plus RNA Kit(TransGen Biotech)试剂盒提取总 RNA,使用 EasyScript® One-Step gDNA Removal

表 1 *AmGRF* 基因实时荧光定量引物
Table 1 qRT-PCR primers of *AmGRF* genes

基因名	上游引物 (5'-3')	下游引物 (3'-5')
<i>AmGRF1</i>	CCAATCAACCTCTTCTACACCTCAAG	CAATGTTGTTGTTGTTGCTGCTCTT
<i>AmGRF2</i>	CACTCAACAACAGCATTACTACCACTACT	AGAAGGTGAAGGAGCAGCAGGAG
<i>AmGRF3</i>	CAAGAAGCCTCGCCATGATCCTAAT	ATCTCCATTTCAGCATCCACTCCAATC
<i>AmGRF4</i>	AAGCCTGTGGAATCTCAATCTCAATCT	GGAGCAAGTTGTGAAGTAGTAGTAGAAGA
<i>AmGRF5</i>	ATGAATAGCAGTGGTGGCAGTAGC	GAATAGGCAGAACAAGATCAGGTGGAA
<i>AmGRF6</i>	AGGACGATGTAGAAGGACGGATGG	GGCACTTGTGGAAGGTTCTGGAA
<i>AmGRF7</i>	TTCTTGACTCTGCCTCTTGCTCTC	GAACAACCTCTGTCTTGAAGATGAAG
<i>AmGRF8</i>	ACCTCACCAATCTCAGCAACACTT	CAGCAACAGCAGCAGCATCAAT
<i>AmGRF9</i>	CATCAACACCAACAACAACAACACTCA	GGAACAGCAGAACCAGCCAACAT

and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒反转录合成 cDNA, 使用 PerfectStart®Green qPCR SuperMix 试剂盒和 StepOnePlus 系统进行扩增。反应体系 20 μ L, 程序设定: 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 40 次循环 (94 $^{\circ}$ C、5 s, 60 $^{\circ}$ C、15 s, 72 $^{\circ}$ C、10 s)。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法测定相对表达量^[31]。利用 R 语言 Psych 和 Pheatmap 软件包将黄芪各生长期 *AmGRF* 基因表达数据和根部总黄酮和总皂苷含量数据进行 spearman 相关性分析, 并构建相关性热图。

3 结果与分析

3.1 *AmGRF* 基因家族成员的鉴定

通过 HMMER 软件包中 Hmsearch 工具和 Pfam 下载的保守结构域 QLQ (PF08880) 和 WRC (PF08879) 的隐马尔可夫文件对黄芪全基因组蛋白序列在 *E*-value 小于 1×10^{-5} 条件下进行搜索(表 2)。以蒙古黄芪全基因组蛋白序列作为查询, 下载的拟南芥、大豆、水稻 GRF 蛋白序列作为参考数据库在 *E*-value 小于 1×10^{-5} 条件下进行 BLAST 对比(表 3)。

综合 HMMER 和 BLAST 比对结果, 从蒙古黄芪基因组中共鉴定获得 9 个 *AmGRF* 基因家族成员。根据基因所在染色体位置信息命名为 *AmGRF1*~*AmGRF9* (图 1)。

3.2 *AmGRF* 基因的染色体分布

利用蒙古黄芪基因组数据, 将 *AmGRF* 基因定位于染色体(图 1)。9 个 *AmGRF* 基因家族成员分布在了蒙古黄芪的 7 条染色体上, 其中 5 号和 6 号染色体上均有 2 个家族成员, 1~4 和 9 号染色体上各含有 1 个家族成员。

3.3 *AmGRF* 蛋白理化性质分析

AmGRF 蛋白理化性质分析结果显示(表 4), 从

表 2 GRF 蛋白序列 HMMER 比对

Table 2 HMMER alignment of GRF protein sequence

基因ID	<i>E</i> 值	分数	结构域
Am01G009280.1	2.10×10^{-38}	130.4	WRC
Am01G001010.1	1.80×10^{-21}	76.1	WRC
Am05G010550.1	2.10×10^{-21}	75.9	WRC
Am09G017960.1	2.10×10^{-21}	75.9	WRC
Am05G010590.1	2.20×10^{-21}	75.9	WRC
Am06G015050.1	8.10×10^{-21}	74.1	WRC
Am06G023050.1	8.70×10^{-21}	74.0	WRC
Am02G003770.1	1.40×10^{-20}	73.3	WRC
Am03G012480.1	1.60×10^{-20}	73.1	WRC
Am04G009960.1	3.70×10^{-19}	68.7	WRC
Am06G002760.1	6.70×10^{-17}	61.5	WRC
Am02G020720.1	4.10×10^{-16}	59.0	WRC
Am09G013020.1	4.30×10^{-16}	58.9	WRC
Am05G026340.1	5.60×10^{-16}	58.6	WRC
Am02G026890.1	6.20×10^{-15}	55.2	WRC
Am02G003770.1	6.20×10^{-16}	58.4	QLQ
Am05G010550.1	9.70×10^{-16}	57.7	QLQ
Am05G010590.1	1.00×10^{-15}	57.7	QLQ
Am06G023050.1	1.80×10^{-15}	56.9	QLQ
Am06G015050.1	3.40×10^{-15}	56.0	QLQ
Am01G001010.1	3.60×10^{-15}	55.9	QLQ
Am04G009960.1	2.80×10^{-14}	53.1	QLQ
Am09G017960.1	1.50×10^{-12}	47.5	QLQ
Am03G012480.1	1.80×10^{-11}	44.1	QLQ
Am09G004890.1	5.10×10^{-10}	39.4	QLQ
Am01G008030.1	4.10×10^{-8}	33.4	QLQ

疏水性 (GRAVY 值) 来看, 所有蛋白质的 GRAVY 值都是负数, 表明它们倾向于亲水性, GRAVY 值越小, 蛋白质的亲水性越强。9 个 *AmGRF* 蛋白的氨基酸数量在 320~642 aa, 相对分子质量大小在 35 861.43~69 908.11。其中 *AmGRF2* 和 *AmGRF3* 蛋白序列长度为 642 aa 和 512 aa, 其余 7 个 *AmGRF* 蛋白序列长度均在 300~400 aa。*AmGRF* 蛋白等电点介于 6.74~9.16, 均不具有跨膜结构和信号肽结构, 亚细胞定位预测结果显示, 所有 *AmGRF* 蛋白均定位于细胞核(表 4)。

表 3 GRF 蛋白序列 BLAST 比对

Table 3 BLAST alignment of GRF protein sequence

查询序列	目标基因	相似性/%	E值	比特分数
Am01G036950.1	<i>AtGRF12</i>	80.992	2.08×10^{-152}	418
Am01G001010.1	<i>GmGRF6</i>	71.271	8.87×10^{-159}	440
Am01G009280.1	<i>OsGRF4</i>	46.018	7.75×10^{-29}	107
Am01G009280.1	<i>OsGRF4</i>	60.870	2.49×10^{-15}	68.2
Am02G026890.1	<i>AtGRF5</i>	46.341	1.64×10^{-8}	48.5
Am02G020720.1	<i>OsGRF10</i>	34.722	1.19×10^{-8}	46.2
Am02G003770.1	<i>GmGRF21</i>	62.963	0	684
Am03G012480.1	<i>GmGRF4</i>	55.401	6.56×10^{-154}	444
Am03G008960.1	<i>AtGRF12</i>	72.047	7.70×10^{-133}	369
Am03G008390.1	<i>AtGRF12</i>	66.809	1.98×10^{-117}	329
Am04G018980.1	<i>AtGRF12</i>	74.180	1.07×10^{-133}	370
Am04G009960.1	<i>GmGRF1</i>	68.047	8.86×10^{-160}	442
Am04G015280.1	<i>AtGRF12</i>	84.556	5.49×10^{-166}	452
Am04G024000.1	<i>AtGRF12</i>	80.184	1.07×10^{-135}	375
Am05G026340.1	<i>OsGRF10</i>	50.000	7.56×10^{-9}	48.5
Am05G010550.1	<i>GmGRF13</i>	83.988	0	551
Am05G018060.1	<i>AtGRF12</i>	79.724	8.36×10^{-135}	373
Am05G022920.1	<i>AtGRF12</i>	78.968	4.74×10^{-146}	401
Am05G021800.1	<i>AtGRF12</i>	80.567	9.63×10^{-154}	421
Am05G010590.1	<i>GmGRF13</i>	84.195	0	550
Am06G002760.1	<i>OsGRF11</i>	48.889	3.46×10^{-9}	50.1
Am06G022530.1	<i>AtGRF12</i>	71.032	2.72×10^{-139}	385
Am06G015050.1	<i>GmGRF7</i>	71.316	4.93×10^{-171}	473
Am06G004620.1	<i>AtGRF12</i>	75.820	9.77×10^{-144}	396
Am06G023050.1	<i>GmGRF17</i>	71.712	3.79×10^{-172}	477
Am07G006370.1	<i>AtGRF11</i>	67.442	6.13×10^{-15}	61.6
Am08G000390.1	<i>AtGRF12</i>	70.817	5.03×10^{-129}	359
Am09G017960.1	<i>GmGRF3</i>	70.496	7.04×10^{-160}	445
Am09G013020.1	<i>AtGRF7</i>	33.028	1.47×10^{-10}	52.8
Am09G007880.1	<i>AtGRF11</i>	51.020	1.66×10^{-9}	46.6
Am09G012830.1	<i>AtGRF12</i>	79.817	1.38×10^{-135}	375

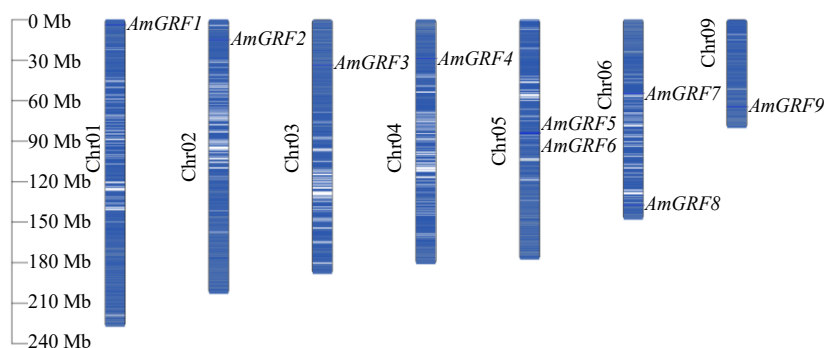


图 1 *AmGRF* 基因的染色体分布

Fig. 1 Chromosomal distribution of *AmGRF* genes

3.4 *AmGRF* 基因家族系统发育分析

为了深入解析 *AmGRF* 基因家族的进化特征，采用 MEGA11 对 9 个黄芪 (*Am*)、22 个大豆 (*Gm*)、13 个拟南芥 (*At*) 和 12 个水稻 (*Os*) GRF 蛋白序列执行多序列比对，基于邻接法 (NJ) 构建系统发育树 (bootstrap=1 000)。依据进化树结构特征将该基因家

族划分为 5 个进化亚群 (图 2)。其中 *AmGRF4* 位于亚家族 II，*AmGRF2* 位于亚家族 III，*AmGRF3* 和 *AmGRF9* 位于亚家族 IV，*AmGRF1*、*AmGRF5*、*AmGRF6*、*AmGRF7* 和 *AmGRF8* 位于亚家族 V。亚家族 V 中含有最多数量的 *AmGRF* 基因家族成员。亚家族 I 位于整个进化树基部，其中只有拟南芥和水稻的 *GRF* 成员，而

表 4 黄芪 GRF 转录因子蛋白特征

Table 4 Protein characteristics of AmGRF transcription factors

基因ID	基因名	长度/aa	相对分子质量	等电点	亲水性	信号肽	跨膜结构	亚细胞定位
Am01G001010.1	<i>AmGRF1</i>	330	37 790.22	8.66	-1.092	无	0	细胞核
Am02G003770.1	<i>AmGRF2</i>	642	69 908.11	7.77	-0.690	无	0	细胞核
Am03G012480.1	<i>AmGRF3</i>	512	55 486.16	7.00	-0.751	无	0	细胞核
Am04G009960.1	<i>AmGRF4</i>	320	36 089.21	9.16	-0.839	无	0	细胞核
Am05G010550.1	<i>AmGRF5</i>	325	36 018.75	7.72	-0.759	无	0	细胞核
Am05G010590.1	<i>AmGRF6</i>	332	36 824.78	7.71	-0.720	无	0	细胞核
Am06G015050.1	<i>AmGRF7</i>	353	40 208.41	8.67	-0.906	无	0	细胞核
Am06G023050.1	<i>AmGRF8</i>	368	41 999.23	6.74	-0.941	无	0	细胞核
Am09G017960.1	<i>AmGRF9</i>	357	39 125.40	8.34	-0.727	无	0	细胞核

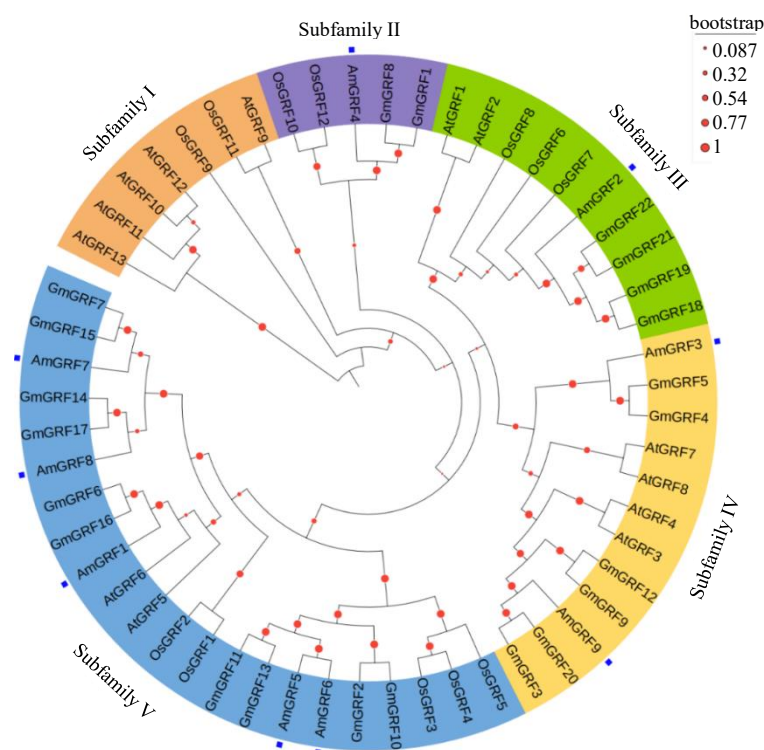


图 2 黄芪、大豆、拟南芥、水稻 GRF 基因家族系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of GRF gene family in *A. membranaceus* var. *mongholicus* (Am), *Glycine max* (L.) Merr. (Gm), *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (At) and *Oryza sativa* L. (Os)

黄芪和大豆的 GRF 成员在该分支中缺失。系统进化关系表明 *AmGRF* 基因家族成员多与同为豆科的大豆 GRF 基因成员聚为一支，亲缘关系较近。

3.5 AmGRF 蛋白结构分析

保守基序预测结果表明，所有 AmGRF 蛋白均包含 motif1 (WRC) 与 motif2 (QLQ)。序列比对证实这 2 个基序区域具有高度保守的氨基酸组成(图 3)。进化关系相近的成员具有近似数量的保守基序，进化树中同一分支的 AmGRF5、AmGRF6、

AmGRF7 和 AmGRF8 含有的基序数量较多，分别为 9、9、6 和 6 个保守基序(图 4)。其中 AmGRF1、AmGRF2 和 AmGRF4 鉴定出 4 个保守基序，而归属第 IV 亚家族的 AmGRF3 和 AmGRF9 所含保守基序数量较少。基因结构分析结果显示(图 4)，*AmGRF* 基因含有 3 到 4 个外显子结构。

3.6 AmGRF 基因顺式作用元件分析

对 *AmGRF* 基因启动子区(转录起始位点上游 2 000 bp)的顺式作用元件预测分析(图 5)。结果

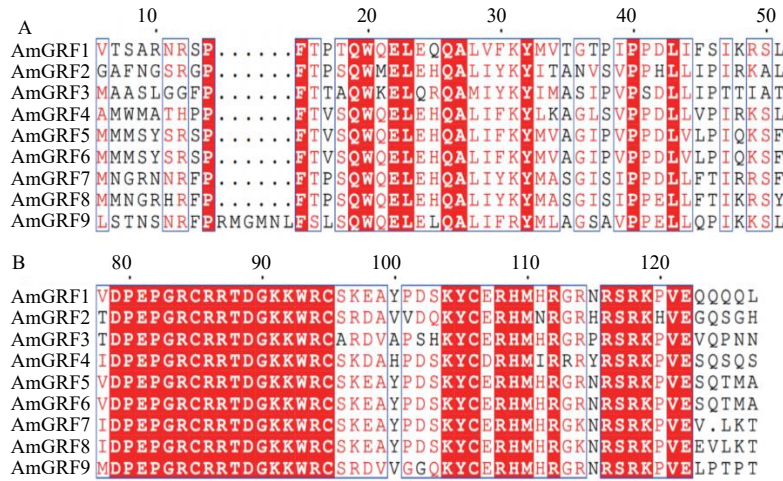


图 3 AmGRF 蛋白 WRC (A) 和 QLQ (B) 保守区序列比对

Fig. 3 Conserved sequence alignment of WRC (A) and QLQ (B) motifs of AmGRF proteins

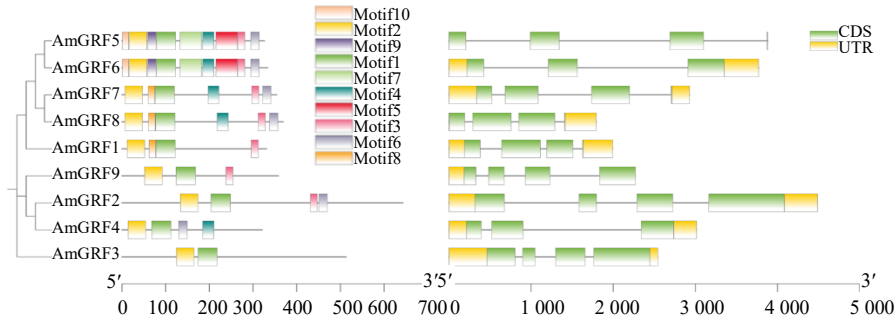


图 4 AmGRF 蛋白保守结构域分析

Fig. 4 Conserved structural domains of AmGRF proteins

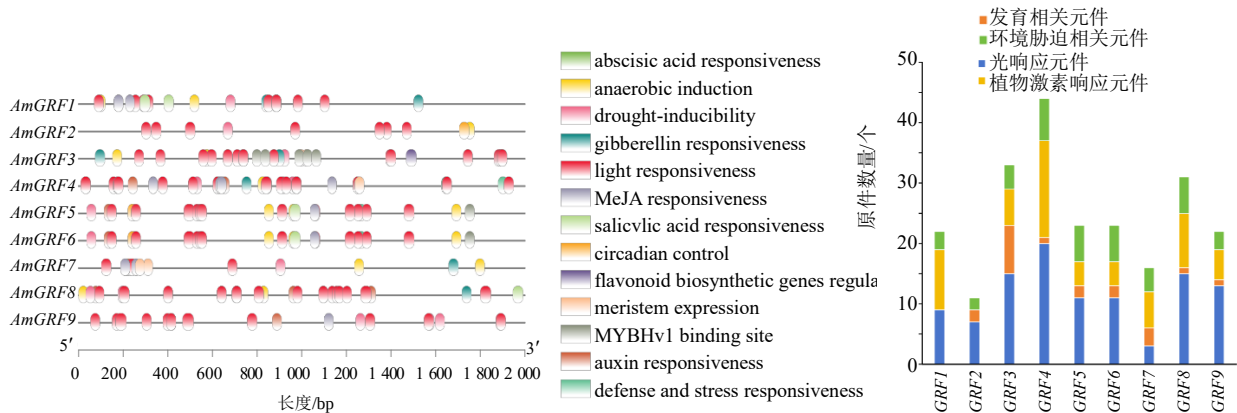


图 5 *AmGRF* 基因顺式作用元件分析

Fig. 5 *Cis*-acting elements of *AmGRF* genes

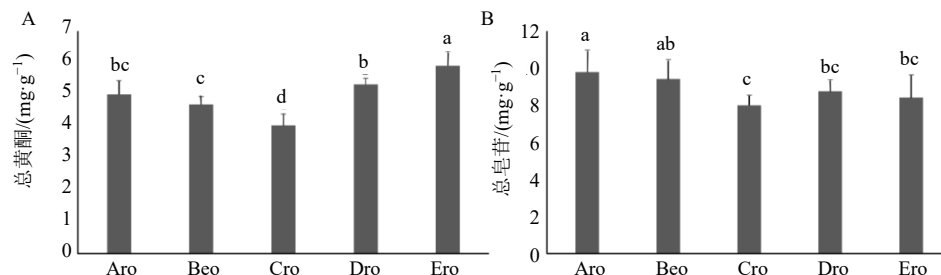
显示 *AmGRF* 基因家族的启动子富集多种功能顺式作用元件, 包括赤霉素、生长素、水杨酸、茉莉酸等植物激素响应元件, 缺氧特异性诱导的增强子元件、防御与应激响应元件、干旱诱导元件、低温响应元件、

伤口反应元件、类黄酮生物合成基因调控等环境胁迫相关元件, 昼夜节律、分生组织、胚乳表达相关的发育调控元件, 光响应元件, 核心启动子元件, MYBHv1 结合位点, MYB 结合位点等。其中 *AmGRF4* 基因的

顺式作用元件数量最多,有 44 个,包含大量激素响应元件与胁迫应激响应相关元件。*AmGRF1*、*AmGRF4*、*AmGRF7*、*AmGRF8*、*AmGRF9* 含有激素响应元件较多, *AmGRF4*、*AmGRF5*、*AmGRF6*、*AmGRF7* 含有胁迫响应相关元件较多。

3.7 黄芪不同生长期根部黄酮和皂苷含量测定

黄芪不同生长期根中总黄酮含量测定结果显



不同字母表示差异显著, $P < 0.05$; Aro-营养生长期; Bro-花期; Cro-果期; Dro-果熟期; Ero-落叶期, 下同。

Different letters indicated significant differences, $P < 0.05$; Aro-vegetative period; Bro-flowering period; Cro-fruited period; Dro-fruit maturity period; Ero-deciduous period; same as below Figs.

图 6 黄芪不同生长期根中黄酮 (A) 和皂苷 (B) 含量

Fig. 6 Content of flavonoid (A) and saponins (B) in root tissue of *A. membranaceus* var. *mongholicus* at different growth periods

3.8 黄芪不同生长阶段根中 *AmGRF* 基因表达分析

黄芪营养生长期至落叶期根部转录组数据显示 (图 7-A), *AmGRF8* 在黄芪各生长阶段根中的表达量均最高, 整个生命周期中表达呈逐渐下降趋势, 营养生长期表达量是落叶期的 2.5 倍。*AmGRF6* 和 *AmGRF9* 表达量则是在营养生长期和花期较高, 随后下降趋势更加显著, *AmGRF6* 营养生长期表达量是落叶期的 59 倍。而 *AmGRF3* 和 *AmGRF4* 的表

示 (图 6-A), 总黄酮积累水平在营养生长期至果期呈递减趋势, 果熟期显著升高, 落叶期含量达到最高。推测黄芪在花期和果期生殖阶段消耗了较多营养, 降低了根中的营养供给。根中总皂苷含量测定结果显示 (图 6-B), 总皂苷含量呈现出先降后升再降的趋势, 在营养生长期根中总皂苷含量最高。

达量则呈现先降后升趋势, 落叶期表达达到最高。*AmGRF1*、*AmGRF2*、*AmGRF5* 和 *AmGRF7* 则在各生长期的表达量均较低。

基于 *AmGRF* 基因表达量与根中总黄酮、总皂苷含量相关性分析 (图 7-B), *AmGRF3* 及 *AmGRF4* 表达水平与黄酮积累量显著相关, *AmGRF5*、*AmGRF8* 和 *AmGRF9* 与皂苷含量显著相关。

对 *AmGRF* 基因进行 qRT-PCR 检测 (图 8), 基因的 qRT-PCR 相对表达数据与转录组数据变化

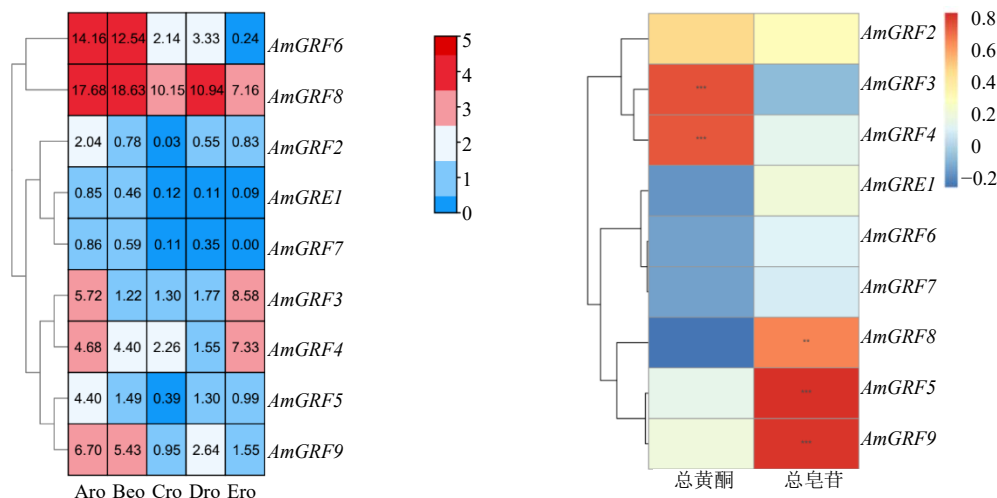


图 7 黄芪不同生长阶段 *AmGRF* 基因表达

Fig. 7 Expression of *AmGRF* genes in different growth stages of *A. membranaceus* var. *mongholicus*

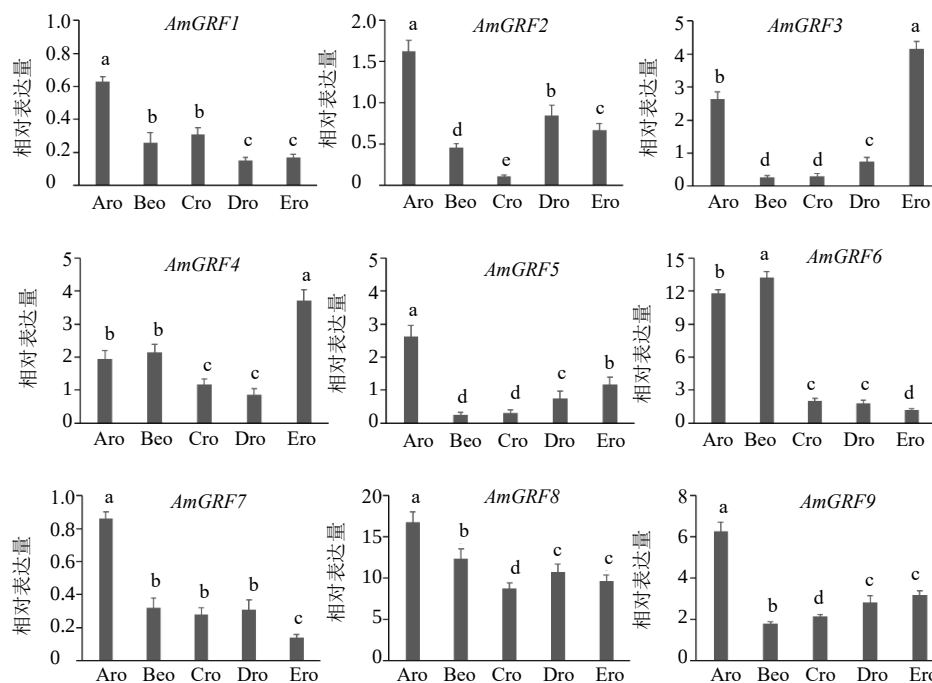


图 8 *AmGRF* 基因相对表达分析

Fig. 8 Relative expression analysis of *AmGRF* genes

趋于一致，验证了转录组数据结果的可靠性。

4 讨论

植物特有的 GRF 转录因子在参与植物的早期生长发育、植物激素调节、植物组织或器官的形成、逆境胁迫响应及次生代谢物生物合成中发挥重要的调控作用^[6-11]。本研究通过生物信息学方法在蒙古黄芪全基因组中共鉴定出 9 个 *GRF* 基因家族成员，分布在蒙古黄芪的 7 条染色体中。理化性质分析结果显示，*AmGRFs* 均为亲水蛋白，不具有跨膜结构和信号肽，所有成员亚细胞定位在细胞核。黄芪与大豆、拟南芥、水稻的 *GRF* 基因家族系统进化分析结果显示，*AmGRF* 基因可分为 5 个亚家族，聚在同一分支的成员理化性质、保守结构域更为相似，推测具有相似的生物学功能，且 *AmGRF* 基因家族成员与同为豆科植物的大豆 *GRF* 家族成员亲缘关系较近。其中聚在第 III 亚家族同一分支的 *AmGRF5*、*AmGRF6*、*AmGRF7*、*AmGRF8* 含有的保守结构域数目较多。基因启动子区的顺式作用元件是植物响应内外信号的作用位点，在基因表达调控中发挥重要作用。顺式作用元件分析结果表明，*AmGRF* 基因启动子区含有大量植物激素响应、光响应及胁迫响应功能相关元件，推测 *GRF* 基因在黄芪生长发育、激素调节和逆境胁迫响应中扮演

重要角色。黄芪各生长期（营养生长期、花期、果期、果熟期、落叶期）根组织转录组数据显示，*GRF* 基因家族成员在不同生长期的表达量存在较大差异，分为 3 种表达模式。其中 *AmGRF5*、*AmGRF6*、*AmGRF8*、*AmGRF9* 在营养生长期表达量最高，并且有逐渐下降的趋势。*AmGRF3* 和 *AmGRF4* 则是在营养生长期和落叶期表达量较高，并且在落叶期达到最高，其他生长阶段表达量较低。*AmGRF1*、*AmGRF2*、*AmGRF7* 在各生长期表达量均较低。根据黄芪不同生长期根中 *GRF* 基因表达量和黄酮及皂苷积累量相关性分析推测，*AmGRF3* 和 *AmGRF4* 与根中黄酮代谢调控相关，*AmGRF5*、*AmGRF8* 和 *AmGRF9* 与根中皂苷代谢调控相关。

本研究从蒙古黄芪中鉴定出 9 个 *AmGRF* 基因家族成员，系统解析其理化性质、亚细胞定位、系统发育、保守基序、顺式作用元件及表达模式。*AmGRF* 基因启动子区域含有大量光响应、生长发育、激素调控和胁迫响应相关的顺式作用元件，揭示了其潜在生物学功能。基因表达的差异性表明 *AmGRF* 基因家族各成员可能在黄芪各生长阶段的生长发育中具有多样的调控作用。*GRF* 基因表达与黄芪根中黄酮皂苷含量相关性分析表明，*AmGRF3* 和 *AmGRF4* 与黄芪根中黄酮代谢调控相关，*AmGRF5*、*AmGRF8* 和 *AmGRF9*

与根中皂苷代谢调控相关。本研究为深入探讨 GRF 转录因子调控蒙古黄芪生长发育与次生代谢物合成的分子机制提供理论支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 裴文茜, 何凡, 程春松, 等. 中药黄芪质量评价方法的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(5): 620-628.
- [2] 李付平, 靳子明, 刘成松, 等. 黄芪活性成分抗结肠癌作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(10): 3549-3557.
- [3] 王祯, 张俊令, 焦宏基, 等. 黄芪有效成分的药理作用与质量控制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(4): 917-924.
- [4] 姚萱航, 刘翠晶, 常晶茹, 等. 2 种类型膜荚黄芪主要药效成分含量及关键酶基因表达量差异研究 [J]. 中草药, 2021, 52(7): 2072-2081.
- [5] Tian H, An L, Wang P, *et al.* Review of *Astragalus membranaceus* polysaccharides: Extraction process, structural features, bioactivities and applications [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 17(1): 56-69.
- [6] Omidbakhshfar M A, Proost S, Fujikura U, *et al.* Growth-regulating factors (GRFs): A small transcription factor family with important functions in plant biology [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(7): 998-1010.
- [7] 马超, 原佳乐, 张苏, 等. GRF 转录因子对植物生长发育及胁迫响应调控的分子机制 [J]. 核农学报, 2017, 31(11): 2145-2153.
- [8] 田娜, 刘范, 伍俊为, 等. 香蕉 GRF 基因家族的全基因组鉴定及表达分析 [J]. 果树学报, 2020, 37(12): 1821-1835.
- [9] Chen X H, Zhang J, Wang S J, *et al.* Genome-wide molecular evolution analysis of the GRF and GIF gene families in Plantae (Archaeplastida) [J]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1): 74.
- [10] Fonini L S, Lazzarotto F, Barros P M, *et al.* Molecular evolution and diversification of the GRF transcription factor family [J]. *Genet Mol Biol*, 2020, 43(3): 20200080.
- [11] Du W X, Yang J F, Li Q, *et al.* Genome-wide identification and characterization of growth regulatory factor family genes in *Medicago* [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 6905.
- [12] Chen Y P, Dan Z W, Li S Q. GROWTH REGULATING FACTOR 7-mediated arbutin metabolism enhances rice salt tolerance [J]. *Plant Cell*, 2024, 36(8): 2834-2850.
- [13] Kim J S, Mizoi J, Kidokoro S, *et al.* *Arabidopsis* growth-regulating factor7 functions as a transcriptional repressor of abscisic acid- and osmotic stress-responsive genes, including DREB2A [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(8): 3393-3405.
- [14] Debernardi J M, Mecchia M A, Vercruyssen L, *et al.* Post-transcriptional control of GRF transcription factors by microRNA miR396 and GIF co-activator affects leaf size and longevity [J]. *Plant J*, 2014, 79(3): 413-426.
- [15] Liang G, He H, Li Y, *et al.* Molecular mechanism of microRNA396 mediating pistil development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2014, 164(1): 249-258.
- [16] 袁岐, 张春利, 赵婷婷, 等. 番茄 GRF 转录因子家族的生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(8): 2949-2956.
- [17] 陈娜, 迟晓元, 程果, 等. 花生中低温胁迫相关转录因子基因的筛选 [J]. 核农学报, 2016, 30(1): 19-27.
- [18] Meng L Y, Li X M, Hou Y, *et al.* Functional conservation and divergence in plant-specific GRF gene family revealed by sequences and expression analysis [J]. *Open Life Sci*, 2022, 17(1): 155-171.
- [19] Bari R, Jones J D G. Role of plant hormones in plant defence responses [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 69(4): 473-488.
- [20] Falik O, Mordoch Y, Ben-Natan D, *et al.* Plant responsiveness to root-root communication of stress cues [J]. *Ann Bot*, 2012, 110(2): 271-280.
- [21] Hu L F, Robert C A M, Cadot S, *et al.* Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2738.
- [22] Tian F, Yang D C, Meng Y Q, *et al.* PlantRegMap: Charting functional regulatory maps in plants [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D1104-D1113.
- [23] Chen Y, Fang T, Su H, *et al.* A reference-grade genome assembly for *Astragalus mongholicus* and insights into the biosynthesis and high accumulation of triterpenoids and flavonoids in its roots [J]. *Plant Commun*, 2023, 4(2): 100469.
- [24] Liao B S, Hu H Y, Xiao S M, *et al.* Global Pharmacopoeia Genome Database is an integrated and mineable genomic database for traditional medicines derived from eight international pharmacopoeias [J]. *Sci China Life Sci*, 2022, 65(4): 809-817.
- [25] Chen C J, Wu Y, Li J W, *et al.* TBtools-II: A “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining [J]. *Mol Plant*, 2023, 16(11): 1733-1742.
- [26] Kumar S, Stecher G, Li M, *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [27] Lescot M, Déhais P, Thijs G, *et al.* PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1): 325-327.
- [28] 代吉瑞, 魏文峰, 霍金海, 等. 不同采收期刺五加叶黄酮类成分动态变化分析 [J]. 中国农学通报, 2019, 35(12): 151-156.
- [29] 赵强强, 韩丽, 熊永爱, 等. 闪式与回流提取黄芪皂苷工艺比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 1-3.
- [30] Liang J P, Li W Q, Jia X Y, *et al.* Transcriptome sequencing and characterization of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* root reveals key genes involved in flavonoids biosynthesis [J]. *Genes Genomics*, 2020, 42(8): 901-914.
- [31] Erickson H S, Albert P S, Gillespie J W, *et al.* Assessment of normalization strategies for quantitative RT-PCR using microdissected tissue samples [J]. *Lab Invest*, 2007, 87(9): 951-962.

[责任编辑 时圣明]