药用大黄bZIP基因家族的全基因组鉴定及其UV-B处理下表达模式分析

梁玉杰[1,2,3], 唐 璟[1,2,3], 闫 锋[1,2,3], 高 静[1,2,3], 张明英[1,2,3], 李依民[1,2,3], 牛恒磊[1], 胡晓晨[2,3*], 张 岗[1,2,3*]

(1. 陕西中医药大学药学院/陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, 陕西 西安 712046; 2. 陕西中医药大学省部共建特色秦药资源研究开发国家重点实验室 (培育), 陕西 咸阳 712083; 3. 陕西中医药大学陕西省中医药管理局“秦药”研发重点实验室, 陕西 西安 712046)

摘要: 药用大黄 (*Rheum officinale* Baill.) 是我国大宗药材大黄的三基源之一, 主产于高海拔地区, 但其主要活性成分蒽醌类化合物的合成调控机制未知。UV-B (280～315 nm) 辐射是高海拔生境中的关键生态因子, 对药用大黄品质形成具有重要影响, 筛选和鉴定响应UV-B辐射的基因对解析蒽醌合成调控研究具有重要意义。bZIP (basic leucine zipper) 转录因子家族广泛参与植物生长发育、次生代谢产物合成以及胁迫响应, 但在药用大黄中尚未被系统研究。本研究基于药用大黄的全基因组, 系统筛选RobZIP基因家族, 分析其编码蛋白的理化性质、基因结构、系统发育关系、保守基序等特征。利用转录组数据筛选药用大黄根和根茎中高表达且响应UV-B辐射的*RobZIP*基因, 并进一步实验验证。结果表明, RobZIP基因家族包含94个成员, 除8号染色体外, 不均匀地分布在10条染色体上, 发生36次并联重复。RobZIP均为亲水性蛋白, 含64～780个氨基酸, 预测定位在细胞核。系统进化将*RobZIP*基因分为11个亚组, 同一亚族成员具有相似的基因结构和保守基序。共线性分析显示, 并联重复是*RobZIP*基因扩增的主要扩张模式。启动子顺式作用元件分析显示, *RobZIP*基因中含有大量与植物生长发育、激素调控网络及胁迫应答等方面相关的顺式作用元件。qRT-PCR分析显示, 组织特异性表达及响应UV-B的*RobZIP15*等8个基因与转录组数据分析结果一致。本研究系统分析药用大黄bZIP家族基因, 可为进一步研究其基因进化、UV-B辐射响应及在蒽醌类成分合成中潜在功能等奠定基础。

关键词: 药用大黄; bZIP转录因子; 系统进化分析; 紫外线B; 表达分析

中图分类号: R931 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)03-0973-17

Genome-wide identification of the bZIP gene family in *Rheum officinale* Baill. and analysis of the expression pattern under UV-B treatment

LIANG Yu-jie[1,2,3], TANG Jing[1,2,3], YAN Feng[1,2,3], GAO Jing[1,2,3], ZHANG Ming-ying[1,2,3], LI Yi-min[1,2,3], NIU Heng-lei[1], HU Xiao-chen[2,3*], ZHANG Gang[1,2,3*]

(*1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine/Engineering Research Center for Application and Development of Chinese Herbal Medicine in Qinling, Xi'an 712046, China; 2. State Key Laboratory of Research and Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation), Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China; 3. Shaanxi University of Chinese Medicine / Key Laboratory for Research and Development of "Qin Medicine" of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 712046, China*)

Abstract: *Rheum officinale* Baill., one of the three primary botanical sources of medicinal rhubarb in China, is

收稿日期: 2025-09-04; 修回日期: 2025-12-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973430); 陕西省重点产业创新链项目 (2021ZDLSF04-01); 陕西省自然科学基础研究计划项目 (2024JC-YBQN-0837); 秦创原中医药产业创新聚集区项目 (L2024-QCY-ZYYJJQ-X212; L2024-QCY-ZYYJJQ-X69); 陕西省教育厅服务地方专项计划项目 (24JC030).

*通讯作者 E-mail: huxc8918@163.com; jay_gumling2025@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1054

mainly cultivated in high-altitude regions. However, the regulatory mechanisms underlying the biosynthesis of its major active constituents, anthraquinones, remain poorly understood. UV-B radiation (280 − 315 nm) is a key ecological factor in high-altitude habitats, profoundly affecting the quality formation of *R. officinale*. Identifying UV-B-responsive genes is therefore essential for elucidating the regulatory pathways involved. The basic leucine zipper (bZIP) transcription factor family is known to regulate plant growth and development, secondary metabolite biosynthesis, and stress responses; however, a comprehensive analysis in *R. officinale* is still lacking. In this study, we conducted a genome-wide identification of the bZIP gene family in *R. officinale*, and systematically analyzed the physicochemical properties, gene structures, phylogenetic relationships, and conserved motifs. Transcriptome data were utilized to identify *RobZIPs* highly expressed in roots and rhizomes and responsive to UV-B radiation, followed by experimental validation. A total of 94 RobZIPs were identified, unevenly distributed across 10 chromosomes except chromosome 8, with 36 tandem duplication events observed. All RobZIP-encoded proteins are predicted to be hydrophilic, comprising 64 to 780 amino acids, and are primarily localized in the nucleus. Phylogenetic analysis classified the *RobZIP* genes into 11 subgroups, with members within the same subgroup exhibiting similar gene structures and conserved motifs. Collinearity analysis revealed that tandem duplication is the primary mode of expansion for the RobZIP gene family. Promoter *cis*-element analysis identified numerous elements associated with plant development, hormone signaling, and stress responses in *RobZIPs*. qRT-PCR analysis confirmed the tissue-specific expression and UV-B responsiveness of 8 *RobZIPs*, including *RobZIP15*, consistent with transcriptomic data. This study provides a comprehensive analysis of the bZIP gene family in *R. officinale*, laying the foundation for further investigations into their evolutionary dynamics, UV-B response mechanisms, and potential roles in anthraquinone biosynthesis.

Key words: *Rheum officinale* Baill.; bZIP transcription factor; phylogenetic analysis; UV-B; expression analysis

bZIP (basic leucine zipper) 转录因子属于植物中最大的转录因子家族之一, 其包括一个碱性区域 (basic region) 和一个亮氨酸拉链结构域 (leucine zipper)[1]。其中, 位于N端的碱性区域高度保守, 含有一个核定位信号和一个保守的N-X_7-R/K结构, 可特异性结合DNA; 而位于C端的亮氨酸拉链区域则相对保守性较低, 呈现为L-X_6-L-X_6-L结构, 并且含有大量的疏水残基。bZIP转录因子可通过疏水氨基酸之间的疏水作用力彼此缠绕, 形成同源二聚体或异源二聚体结构, 并依赖于碱性区域结合在双链DNA分子上发挥作用[2,3]。此外, 部分bZIP转录因子还含有转录激活结构域, 如GBFs (G-Box结合因子) 具有N端脯氨酸富集结构域, 该结构域作为激活域发挥作用[4,5]。bZIP转录因子通过特异性结合ABRE、A-box (TACGTA)、G-box (CACGTG)等DNA启动子区的顺式作用元件, 从而调节下游基因的表达[5-7]。

多个研究证明, bZIP转录因子广泛参与药用植物中黄酮类、酚酸类、萜类及生物碱类等次生代谢产物的生物合成。在黄花蒿中, bZIP类转录因子*AaHY5*通过响应光照信号, 激活青蒿素生物合成关键基因的表达, 从而正向调控光诱导的青蒿素合成过程[8]; *AaTGA6*响应SA诱导, 调控*ERF1*表达继而促进青蒿素的合成[9]; *AabZIPl*受ABA诱导并促进*AaMYC2*表达, 正向调控青蒿素的生物合成[10]。丹参SmbZIP3转录因子正调控*SmTAT*、*SmERF128*和*SmMYB9b*表达, 促进酚酸、丹参酮生物合成[11]。MeJA诱导雷公藤*TwTGA1*表达, 继而调控雷公藤内酯和倍半萜吡啶生物碱的生物合成; *TwTGA1*异源表达能显著提高烟草细胞中吡啶生物碱的含量和长春花生物碱的积累[12]。TmHY5直接调控菊苣酸生物合成关键酶基因的表达, 同时激活TmbZIP1转录因子介导ABA信号间接促进菊苣酸的积累[13]。忍冬LjbZIP8能够结合到苯丙氨酸解氨酶2 (*LjPAL2*)基因启动子区域的G-box元件, 抑制其转录活性, 从而负向调控绿原酸的生物合成[14]。刺五加*EsbZIP1*、*EsbZIP2*和*EsbZIP5*的过表达显著下调了三萜皂苷的含量[15]。在银杏叶中, bZIP转录因子*GbHY5*受UV-B辐射诱导促进银杏类黄酮的合成[16]。但是, 关于bZIP转录因子参与调控蒽醌类成分合成的研究尚未报道。

药用大黄是我国传统中药大黄的三基源之一, 以其干燥根和根茎入药, 具有泻下攻积、清热泻火、逐瘀通经、凉血解毒等功效[17]。现代药理研究表明大黄主要药效成分蒽醌类化合物具有泻下、抗菌、抗炎等多种药理作用[18-20]。目前, 蒽醌类物质合成的相关研究已在药用大黄[21]、掌叶大黄[22,23]、决明[24]、虎杖[25]等药用植物中报道, 但是合成途径及其调控机制都还有待完善。药用大黄主要分布在四川东北部、陕西南部与湖北西

北部的高海拔山区, 由于需求量日益增长, 野生资源逐渐减少, 以人工栽培为主[26,27]。蒽醌类活性成分是大黄的次生代谢产物, 其生物合成受遗传、地理环境等因素的影响[28-30]。作者前期在海拔1 300 ± 50、1 500 ± 50和1 700 ± 50 m处分别采集1、2、3年生3个不同生长年限的药用大黄, 发现蒽醌类成分含量随着海拔的升高而显著积累, 证明在一定范围内高海拔地区生长的药用大黄蒽醌类成分含量更高、品质更佳, 推测其可能与高海拔地区特有的强UV-B辐射有关[31]。而bZIP转录因子能够响应多种生物/非生物胁迫, 调控多种次生代谢途径中的关键酶基因的表达, 具有广泛调控作用。前期课题组基于药用大黄转录组数据, 初步鉴定到57个bZIP家族成员, 并筛选出可能参与蒽醌生物合成的候选基因[21]。然而, 转录组数据存在完整性限制, 本研究在此基础上基于全基因组数据挖掘药用大黄bZIP转录因子家族, 并利用生物信息手段分析其基因结构、蛋白结构、系统发育关系等特征。通过分析*RobZIP*基因在不同组织及UV-B处理下的表达模式, 为药用大黄bZIP转录因子的生物学功能研究提供新的思路。

材料与方法

实验材料 本研究于2022年9月在陕西省汉中市镇巴县小洋镇鲁家坝村 (E109°59′58″, N32°25′24″, 海拔1 234 m) 采集药用大黄干燥成熟种子, 经陕西中医药大学颜永刚教授鉴定为药用大黄*R. officinale*种子。选取大小相近、饱满的药用大黄种子, 使用去离子水浸泡1天, 期间换水2次; 用75%乙醇消毒30 s, 去离子水清洗2或3遍; 15% H_2O_2浸泡20 min, 去离子水清洗2或3遍。随后置于干净的滤纸上, 于光照培养箱中进行催芽。将发芽的种子点种于装有200 g泥炭土 (德国Klasmann) 的黑色塑料花盆中 (直径9 cm, 高12.5 cm), 每盆点种5颗种子, 首次浇水200 mL, 之后每隔两天浇水50 mL。培养温度为23 ± 2 ℃, 光照16 h/黑暗8 h交替, 光照强度为9 000 Lx。30天后, 选取长势一致, 无病虫害的幼苗分别进行UV-B (40 μW·cm^{-2}) 胁迫处理。以0 h作为空白对照, 分别于处理后2、6、12和24 h进行取样, 每组处理3个生物学重复, 于液氮中速冻, −80 ℃保存。

仪器 实时荧光定量PCR仪 (Step One Plus® Real-Time, 美国Thermo Fisher Scientific); 超微量紫外分光光度计 (K5800, 北京凯奥科技发展有限公司); 离心机 (Centrifuge5424, 德国Eppendorf); 电泳仪电源 (DYY-6D, 北京六一生物科技有限公司)。

RobZIP家族成员全基因组鉴定及理化性质分析 首先通过Pfam数据库 (https://pfam.xfam.org/) 的隐马尔可夫模型 (HMMs) 获得bZIP家族特征的bZIP结构域 (PF00170, PF07716, PF12498, PF03131), 从转录因子数据库 (TFDB) 及拟南芥数据库 (TAIR, https://www.arabidopsis.org/) 下载拟南芥bZIP家族成员蛋白序列作为参比序列。通过本地BLAST (E-value < 1e^{-5}) 及HMMER (默认参数) 检索药用大黄全基因组蛋白序列, 将两次结果进行合并, 获得药用大黄bZIP蛋白的初步筛选结果, 去除重复项并进行进一步鉴定。利用SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/)、Pfam (http://pfam-legacy.xfam.org/)、NCBI-CDD进行保守结构域验证, 最终鉴定到含有完整bZIP结构域的药用大黄bZIP家族成员。将获得的全部bZIP氨基酸序列提交至ExsPASY网站 (https://web.expasy.org/protparam/), 预测其蛋白质理化性质信息, 在亚细胞定位预测网站 (Cell Ploc-2.0,http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/) 预测其亚细胞定位。

RobZIP家族成员染色体定位、共线性分析及Ka/Ks计算 结合药用大黄基因组数据, 运用TBtools软件的Gene Locatin Visualize功能, 绘制基因的染色体位置信息图。根据基因在染色体的位置对药用大黄bZIP基因家族重命名。并绘制药用大黄bZIP家族基因共线性关系图, 利用TBtools软件计算串并联重复基因对之间的Ka/Ks比值。

RobZIP家族成员多序列比对及系统发育树构建 利用Jalview软件对药用大黄bZIP家族进行蛋白多重序列比对。利用MEGA7.0软件中邻接法 (neighbor joining method) 构建bZIP家族系统发育树 (bootstrap值设置为1 000); 根据拟南芥bZIP家族的分类对药用大黄bZIP家族进行类群的划分; 最后采用iTOL (https://itol.embl.de/) 对构建的进化树进行美化。

RobZIP家族成员基因结构和保守基序分析 利用在线工具MEME (https://meme-suite.org/meme/tools/meme) 在线预测药用大黄bZIP蛋白的保守基序 (Motif), Motif个数设置为12个, 重复次数设置为0, 保守性达到显著水平 ($P < 0.05$), 基序长度为8～70 bp, 其他参数均为默认值。结合基因注释的gff文件, 利用TBtools将基因结构、保守基序和进化树进行整合。

RobZIP家族成员与其他物种基因间的共线性分析 在拟南芥数据库 (https://www.arabidopsis.org/)、苦荞基因组数据库 (http://www.mbkbase.org/Pinku1/)、中国科学院昆明植物研究所科学数据中心 (https://data.iflora.cn/Home/Index)、大豆多维组学数据库 (https://ngdc.cncb.ac.cn/soyomics/index) 分别下载拟南芥、苦荞、塔黄、唐古特大黄、大豆等基因组数据及注释文件, 利用TBtools分析药用大黄及其他物种基因组的串/并

联复制事件, 并绘制大黄与不同物种bZIP家族基因之间的共线性关系图。

RobZIP家族成员顺式作用元件分析 利用TBtools软件从药用大黄基因组数据库中提取bZIP基因转录起始位点上游2 000 bp序列, 提交至Plant CARE网站 (https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/) 分析启动子顺式作用元件, 用TBtools进行可视化。

RobZIP家族成员基因表达模式分析 基于药用大黄不同年限、不同部位中基因的表达模式及在UV-B处理下的RNA-Seq转录组测序数据, 按照FDR < 0.05且 $|\log_2FC| \geqslant 1$ 筛选显著差异表达的*RobZIP*基因, 使用Tbtools软件进行聚类分析及热图的绘制。利用NCBI中Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 工具设计*RobZIP*基因引物, 以*β*-actin为内参基因[21](表1)。按照诺唯赞ChamQ SYBR qPCR Master Mix试剂盒进行加样。用实时荧光定量PCR仪对UV-B处理样品进行qRT-PCR检测, 使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因相对表达量。

数据分析和处理 利用SPSS 25.0单因素方差分析和Duncan多重比较方法进行显著性分析, $P < 0.05$为差异显著。使用GraphPad Prism 8.0.1绘制柱状图。

结果与讨论

1 RobZIP基因家族鉴定及理化性质分析

以拟南芥bZIP蛋白序列为参考序列, 利用本地BLAST及HMMER在药用大黄基因组数据库中鉴定到*RobZIP*基因家族成员94个。相较于前期课题组基于转录组数据鉴定的57个成员, 本研究在基因组水平上新鉴定出37个*RobZIP*基因, 表明全基因组数据能更加全面地揭示基因家族成员。根据其在染色体上从上到下的坐标顺序, 依次重命名为*RobZIP01*～*RobZIP94*。

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')
RobZIP15-F	ATCGCTAGGGTTGTGGAAGC
RobZIP15-R	CCAAACTCACAAGAACCGGC
RobZIP17-F	TGCTGTGGAGAGGTTGGATG
RobZIP17-R	CCCAAGTACCAACAGCCCTC
RobZIP33-F	AGGAGAATGCCAGGTTGAGG
RobZIP33-R	AGAGACCGAACATGACTGCG
RobZIP39-F	GTGAACGAGCTAGAGGCGAG
RobZIP39-R	TCCGTCCTGCTGTCGTATTC
RobZIP66-F	TTGCAAAGCGAGTTGAAGCC
RobZIP66-R	AAGTTCTCGGTGCTGACTGG
RobZIP67-F	CAGAGCAGCAGCAAGTGAAC
RobZIP67-R	TCGCGAAGGTAATCTGCCTG
RobZIP88-F	GCCTGGGAATACACACCTGG
RobZIP88-R	GGAGATCCAGCACCAACACC
RobZIP90-F	GGAGGAGCTCGACATGATGG
RobZIP90-R	CAAGGAGCTGCAGAACTTGC
β-actin-F	AGGGTCCAATGCTTTATC
β-actin-R	CAGTCTTCTCCACCACAA

蛋白理化性质结果显示 (表2), RobZIP编码的蛋白长度在64 aa (RobZIP04、RobZIP22、RobZIP25、RobZIP81)～780 aa (RobZIP57) 之间, 蛋白分子质量在7 372.26 Da (RobZIP22)～84 396.5 Da (RobZIP57) 之间, 理论等电点在4.87～11.13之间, 其中44个RobZIP蛋白理论等电点小于7, 为酸性蛋白, 50个RobZIP蛋白理论等电点大于7, 为碱性蛋白。RobZIP53、RobZIP55、RobZIP58、RobZIP61蛋白不稳定系数小于40, 为稳定蛋白; 其余不稳定系数大于40, 为不稳定蛋白。总平均亲水性均为负值, 说明RobZIP蛋白均为亲水性蛋白。此外, 亚细胞定位预测显示RobZIP均定位于细胞核。RobZIP家族蛋白的二级结构预测分析结果显示 (表3), 药用大黄bZIP蛋白二级结构主要包括*α*-螺旋、无规卷曲和延伸链, 所有蛋白均不存在*β*-折叠, 且*α*-螺旋 (16.08%～87.50%)、无规卷曲 (12.5%～76.37%) 占比最多, 而延伸链占比不足6.80%。

Table 2 Physicochemical properties of basic leucine zipper (bZIP) of *R. officinale*

Gene ID	Chromosome	Rename	Protein length/aa	Molecular weight/Da	Isoelectric point (pI)	Instability index	Protein GRAVY	Subcellular localization
evm.model.ctg3.1017	Chr01	RobZIP01	186	22 246.10	8.88	41.87	−0.998	Nucleus
evm.model.ctg3.1311	Chr01	RobZIP02	416	45 278.59	9.16	50.26	−0.720	Nucleus
evm.model.ctg3.3752	Chr01	RobZIP03	395	43 398.35	5.91	66.66	−0.787	Nucleus
evm.model.ctg6.581	Chr01	RobZIP04	64	7 428.23	6.72	85.93	−1.198	Nucleus
evm.model.ctg6.3012	Chr01	RobZIP05	264	28 930.50	5.48	47.97	−0.607	Nucleus
evm.model.ctg8.84	Chr02	RobZIP06	171	19 324.36	11.13	73.96	−0.763	Nucleus
evm.model.ctg8.863.1.66f59198	Chr02	RobZIP07	343	36 472.90	5.79	56.9	−0.875	Nucleus
evm.model.ctg8.6396	Chr02	RobZIP08	119	14 232.23	10.25	78.61	−0.927	Nucleus
evm.model.ctg8.8396_evm.model.ctg8.8397	Chr02	RobZIP09	334	35 495.23	6.14	48.05	−0.892	Nucleus
evm.model.ctg10.920	Chr02	RobZIP10	290	31 602.43	5.90	66.94	−0.574	Nucleus
evm.model.ctg10.2176	Chr02	RobZIP11	135	15 391.18	7.97	64.43	−0.896	Nucleus
evm.model.ctg10.2253	Chr02	RobZIP12	157	18 749.22	10.23	60.58	−1.026	Nucleus
evm.model.ctg10.2366	Chr02	RobZIP13	187	20 181.37	5.95	58.44	−0.633	Nucleus

Continued

Gene ID	Chromosome	Rename	Protein length/aa	Molecular weight/Da	Isoelectric point (pI)	Instability index	Protein GRAVY	Subcellular localization
evm.model.ctg10.3721	Chr02	RobZIP14	236	27 348.57	6.53	61.26	−0.848	Nucleus
evm.model.ctg10.3920	Chr02	RobZIP15	177	9 150.47	9.06	68.98	−0.565	Nucleus
evm.model.ctg10.4310	Chr02	RobZIP16	271	30 121.44	6.77	59.46	−0.893	Nucleus
evm.model.ctg17.64	Chr03	RobZIP17	349	40 259.89	6.58	52.79	−0.459	Nucleus
evm.model.ctg17.117.1.66f5917f	Chr03	RobZIP18	410	46 586.60	9.03	59.71	−0.763	Nucleus
evm.model.ctg17.334	Chr03	RobZIP19	525	57 218.75	6.69	61.16	−0.704	Nucleus
evm.model.ctg17.725	Chr03	RobZIP20	372	42 270.70	6.85	62.13	−1.001	Nucleus
evm.model.ctg17.756	Chr03	RobZIP21	157	18 235.81	10.06	68.19	−0.735	Nucleus
evm.model.ctg17.1939	Chr03	RobZIP22	64	7 372.26	10.78	64.82	−1.170	Nucleus
evm.model.ctg17.2560	Chr03	RobZIP23	387	43 342.00	5.83	59.38	−0.758	Nucleus
evm.model.ctg17.3329	Chr03	RobZIP24	377	42 992.93	7.83	61.50	−0.45	Nucleus
evm.model.ctg23.805	Chr03	RobZIP25	64	7 390.42	10.78	74.94	−1.052	Nucleus
evm.model.ctg29.3237	Chr03	RobZIP26	136	15 381.27	5.96	48.44	−0.746	Nucleus
evm.model.ctg29.3259.1.66f59183	Chr03	RobZIP27	254	27 393.45	7.09	40.57	−0.667	Nucleus
evm.model.ctg31.251	Chr04	RobZIP28	328	35 699.44	5.10	54.82	−0.556	Nucleus
evm.model.ctg33.358	Chr04	RobZIP29	425	45 062.01	7.14	56.00	−0.684	Nucleus
evm.model.ctg33.3146	Chr04	RobZIP30	518	56 006.25	7.10	66.81	−0.773	Nucleus
evm.model.ctg34.144	Chr04	RobZIP31	185	20 604.66	9.87	62.10	−0.429	Nucleus
evm.model.ctg34.257	Chr04	RobZIP32	127	14 325.30	10.15	51.82	−0.576	Nucleus
evm.model.ctg34.585	Chr04	RobZIP33	168	18 844.34	9.27	67.52	−0.610	Nucleus
evm.model.ctg34.1653	Chr04	RobZIP34	144	16 508.95	5.72	61.96	−0.531	Nucleus
evm.model.ctg37.720	Chr05	RobZIP35	137	15 801.70	7.75	63.79	−0.911	Nucleus
evm.model.ctg37.1305	Chr05	RobZIP36	185	20 377.12	9.72	56.63	−0.759	Nucleus
evm.model.ctg37.1565	Chr05	RobZIP37	132	14 947.63	6.49	58.42	−0.780	Nucleus
evm.model.ctg39.284	Chr05	RobZIP38	469	51 311.58	8.60	54.63	−0.460	Nucleus
evm.model.ctg39.1012	Chr05	RobZIP39	168	18 485.32	9.51	67.04	−1.167	Nucleus
evm.model.ctg40.1556	Chr05	RobZIP40	254	27 694.06	6.01	52.96	−0.573	Nucleus
evm.model.ctg42.521	Chr05	RobZIP41	324	34 715.48	7.17	59.15	−0.957	Nucleus
evm.model.ctg42.1414	Chr05	RobZIP42	148	17 535.58	6.31	52.67	−0.863	Nucleus
evm.model.ctg44.86	Chr06	RobZIP43	166	19 597.96	8.97	53.04	−0.992	Nucleus
evm.model.ctg44.205	Chr06	RobZIP44	422	45 474.09	9.43	49.07	−0.605	Nucleus
evm.model.ctg44.314	Chr06	RobZIP45	157	18 749.22	10.23	60.58	−1.026	Nucleus
evm.model.ctg44.379	Chr06	RobZIP46	492	54 437.33	6.78	72.40	−0.910	Nucleus
evm.model.ctg44.491	Chr06	RobZIP47	373	40 987.75	7.75	50.95	−0.589	Nucleus
evm.model.ctg44.507	Chr06	RobZIP48	310	33 978.23	6.70	57.99	−0.731	Nucleus
evm.model.ctg44.1072	Chr06	RobZIP49	394	42 526.62	6.99	63.25	−0.696	Nucleus
evm.model.ctg44.1723	Chr06	RobZIP50	388	42 097.54	6.85	57.30	−0.740	Nucleus
evm.model.ctg44.3965	Chr06	RobZIP51	341	37 641.91	6.55	54.98	−0.714	Nucleus
evm.model.ctg44.4871	Chr06	RobZIP52	360	39 542.60	5.96	59.06	−0.823	Nucleus
evm.model.ctg44.8913	Chr06	RobZIP53	279	30 131.46	5.85	27.80	−0.684	Nucleus
evm.model.ctg46.1288	Chr07	RobZIP54	220	24 638.45	5.89	63.96	−0.778	Nucleus
evm.model.ctg46.1854	Chr07	RobZIP55	120	13 632.40	9.02	37.86	−0.770	Nucleus
evm.model.ctg46.2286.1.66f5918a	Chr07	RobZIP56	372	42 180.97	7.08	58.62	−0.422	Nucleus
evm.model.ctg47.1753	Chr07	RobZIP57	780	84 396.50	5.96	44.35	−0.529	Nucleus
evm.model.ctg47.1838	Chr07	RobZIP58	388	43 318.53	6.42	6.41	−0.620	Nucleus
evm.model.ctg47.2312	Chr07	RobZIP59	532	58 468.54	6.65	64.11	−0.618	Nucleus
evm.model.ctg47.2870	Chr07	RobZIP60	76	8 858.88	9.18	81.92	−1.071	Nucleus
evm.model.ctg50.1639	Chr07	RobZIP61	236	26 033.95	5.58	30.77	−0.667	Nucleus
evm.model.ctg50.2100	Chr07	RobZIP62	144	16 554.88	5.25	60.66	−0.627	Nucleus
evm.model.ctg50.2907	Chr07	RobZIP63	406	43 219.87	7.17	63.64	−0.851	Nucleus
evm.model.ctg50.3987	Chr07	RobZIP64	285	31 018.98	6.02	60.29	−0.542	Nucleus
evm.model.ctg50.4279	Chr07	RobZIP65	174	19 961.57	6.23	66.94	−0.690	Nucleus
evm.model.ctg62.129	Chr09	RobZIP66	424	45 043.90	8.43	53.61	−0.767	Nucleus
evm.model.ctg62.457	Chr09	RobZIP67	345	39 355.74	9.15	61.90	−0.464	Nucleus
evm.model.ctg62.772	Chr09	RobZIP68	332	37 153.79	8.63	57.10	−0.554	Nucleus
evm.model.ctg63.391.1.66f59192	Chr09	RobZIP69	201	22 829.09	8.76	54.68	−0.458	Nucleus
evm.model.ctg63.777	Chr09	RobZIP70	440	47 499.29	9.45	52.37	−0.616	Nucleus
evm.model.ctg63.1257	Chr09	RobZIP71	330	36 193.39	6.27	56.74	−0.638	Nucleus
evm.model.ctg63.2471	Chr09	RobZIP72	422	45 603.80	6.68	58.02	−0.659	Nucleus

Continued

Gene ID	Chromosome	Rename	Protein length/aa	Molecular weight/Da	Isoelectric point (pI)	Instability index	Protein GRAVY	Subcellular localization
evm.model.ctg63.3324	Chr09	RobZIP73	306	34 422.46	7.09	65.83	−0.813	Nucleus
evm.model.ctg66.99	Chr10	RobZIP74	765	83 207.94	6.06	49.59	−0.591	Nucleus
evm.model.ctg66.134	Chr10	RobZIP75	265	29 767.49	9.63	56.60	−0.781	Nucleus
evm.model.ctg66.1798	Chr10	RobZIP76	300	33 491.39	5.77	51.00	−0.898	Nucleus
evm.model.ctg66.3485	Chr10	RobZIP77	294	32 984.04	5.86	56.53	−0.815	Nucleus
evm.model.ctg67.488	Chr10	RobZIP78	166	19 448.64	9.84	69.80	−1.023	Nucleus
evm.model.ctg67.2722	Chr10	RobZIP79	143	16 287.31	7.83	61.11	−0.782	Nucleus
evm.model.ctg67.3556	Chr10	RobZIP80	76	8 635.21	9.66	54.09	−0.325	Nucleus
evm.model.ctg67.3756	Chr10	RobZIP81	64	7 373.24	10.71	85.45	−1.192	Nucleus
evm.model.ctg67.4173	Chr10	RobZIP82	297	33 355.60	5.04	67.48	−0.544	Nucleus
evm.model.ctg67.4181	Chr10	RobZIP83	352	38 943.43	4.87	55.35	−0.589	Nucleus
evm.model.ctg67.4510	Chr10	RobZIP84	333	36 215.92	5.46	59.88	−0.654	Nucleus
evm.model.ctg69.3590	Chr11	RobZIP85	486	53 434.26	8.49	55.31	−0.392	Nucleus
evm.model.ctg69.3753	Chr11	RobZIP86	262	30 320.23	8.53	58.87	−0.826	Nucleus
evm.model.ctg69.6109	Chr11	RobZIP87	189	21 959.52	9.26	53.84	−0.983	Nucleus
evm.model.ctg71.2446	Chr11	RobZIP88	442	47 586.27	9.63	50.83	−0.670	Nucleus
evm.model.ctg71.2770	Chr11	RobZIP89	159	17 375.39	9.25	56.05	−0.647	Nucleus
evm.model.ctg71.2948	Chr11	RobZIP90	120	14 054.00	9.73	54.14	−0.880	Nucleus
evm.model.ctg71.3091	Chr11	RobZIP91	117	13 018.74	9.89	57.75	−0.690	Nucleus
evm.model.ctg71.3202	Chr11	RobZIP92	365	39 591.66	8.72	64.31	−0.908	Nucleus
evm.model.ctg71.3223	Chr11	RobZIP93	257	28 393.70	5.77	65.24	−0.696	Nucleus
evm.model.ctg72.48	Chr11	RobZIP94	387	42 282.35	5.84	55.66	−0.818	Nucleus

2 RobZIP家族成员多序列比对及系统发育分析

利用Jalview对94个RobZIPs的氨基酸序列进行多序列比对 (图1), 发现94个RobZIPs都包含基本碱性区域和亮氨酸拉链结构域。保守区域部分氨基酸被疏水残基取代, 其中RobZIP04碱性区域的R/K被一个谷氨酰胺 (Q) 取代; 亮氨酸拉链的部分亮氨酸被异亮氨酸 (I)、缬氨酸 (M)、甲硫氨酸 (F) 等疏水氨基酸取代。

利用MEGA7.0的邻接法构建药用大黄和拟南芥bZIP系统发育树 (图2), 研究药用大黄的94个RobZIP与拟南芥78个AtbZIP转录因子之间的进化关系。根据拟南芥的分组规则将所有bZIPs分为13个亚族 (A～K和M、S), 除了J和M亚族, 其他11个亚族都同时含有拟南芥和药用大黄bZIP成员, I亚族进一步分为I-a和I-b。其中, S组成员最多, 包含RobZIP成员23个, AtbZIP成员17个。同一亚家族, 与AtbZIP亲缘关系较近的RobZIP转录因子可能具有相类似的功能。

3 RobZIP家族成员染色体定位、共线性分析及Ka/Ks计算

*RobZIP*基因均能在染色体上找到定位 (图3A), 但分布不均匀。除8号染色体没有*RobZIP*基因外, 其他10条染色体上均分布有*RobZIP*基因, 其中7号染色体上分布的*RobZIP*基因数目最多, 共12个*RobZIPs*基因。为深入了解药用大黄bZIP基因家族的扩张模式, 对药用大黄基因组内的基因复制事件进行了鉴定和分析 (图3B)。结果表明, 药用大黄bZIP基因在染色体上并没有发生串联重复, 但发生36次片段复制事件, 涉及10条染色体上的44个基因。其中, 7号染色体上发生的片段重复事件最为频繁且与其他多条染色体间存在片段复制事件的交互, 这与该染色体分布的*RobZIP*基因数量最多 (12个) 相一致, 表明其在RobZIP基因家族扩张中扮演了核心角色。虽然其中的1个复制事件 (*RobZIP75/RobZIP77*) 的两个成员都是来自同一条染色体上 (chr10), 但是它们之间的距离大于200 kb, 所以它们依旧属于基因的片段复制。共线性基因对的Ka/Ks比值均小于1, 说明在进化过程中这些基因受纯化选择, 功能相对稳定 (表4)。

4 RobZIP家族成员基因结构和保守基序分析

使用MEME在线工具对94个RobZIPs蛋白序列进行保守基序分析, 共鉴定出12个Motif (图4b、d)。结果表明, 除RobZIP32不含Motif1外, 其余所有RobZIP蛋白均含有Motif1, 推测该基序为典型的碱性亮氨酸拉链结构域; Motif2、Motif3和Motif7为D亚族特有基序, Motif4存在E和I亚族成员中, 此外, G亚族中RobZIP63也含有该基序, Motif9只存在于A亚族, Motif10只存在于A和I亚族。同一亚族拥有相似种类、数目和位置的Motif的RobZIP可能具有相似的功能。

基因结构分析结果显示 (图4c), 23个RobZIP无UTR区, 这些成员不均匀地分布在A、E、F、I和S亚族中。A亚族含有2～5个外显子和1～5个内含子; C亚族成员都有6个外显子和5个内含子; D亚族含有5～

Table 3 The secondary structure analysis of bZIP proteins in *R. officinale*

Protein name	Secondary structure				Protein name	Secondary structure			
	Alpha helix (h)	Beta turn (Tt)	Random coil (Cc)	Extended strand (Ee)		Alpha helix (h)	Beta turn (Tt)	Random coil (Cc)	Extended strand (Ee)
RobZIP01	47.85	0.00	52.15	0.00	RobZIP48	35.81	0.00	63.23	0.97
RobZIP02	27.88	0.00	70.91	1.20	RobZIP49	36.29	0.00	62.94	0.76
RobZIP03	34.43	0.00	64.81	0.76	RobZIP50	33.25	0.00	66.75	0.00
RobZIP04	73.44	0.00	26.56	0.00	RobZIP51	33.43	0.00	66.57	0.00
RobZIP05	37.50	0.00	60.61	1.89	RobZIP52	31.11	0.00	67.78	1.11
RobZIP06	42.69	0.00	57.31	0.00	RobZIP53	32.97	0.00	67.03	0.00
RobZIP07	28.86	0.00	69.39	1.75	RobZIP54	42.73	0.00	57.27	0.00
RobZIP08	68.07	0.00	31.93	0.00	RobZIP55	57.50	0.00	40.62	1.88
RobZIP09	29.64	0.00	68.56	1.80	RobZIP56	55.91	0.00	40.86	3.23
RobZIP10	40.00	0.00	60.00	0.00	RobZIP57	16.90	0.00	76.37	6.73
RobZIP11	49.63	0.00	48.89	1.48	RobZIP58	60.31	0.00	34.54	5.15
RobZIP12	58.60	0.00	41.40	0.00	RobZIP59	51.50	0.00	45.30	3.20
RobZIP13	52.94	0.00	45.45	1.60	RobZIP60	86.84	0.00	13.16	0.00
RobZIP14	39.41	0.00	59.32	1.27	RobZIP61	35.17	0.00	64.83	0.00
RobZIP15	61.02	0.00	37.29	1.69	RobZIP62	68.75	0.00	31.25	0.00
RobZIP16	40.96	0.00	58.30	0.74	RobZIP63	24.14	0.00	74.14	1.72
RobZIP17	63.61	0.00	33.52	2.87	RobZIP64	41.75	0.00	58.25	0.00
RobZIP18	35.37	0.00	63.66	0.98	RobZIP65	56.90	0.00	43.10	0.00
RobZIP19	25.71	0.00	74.29	0.00	RobZIP66	27.12	0.00	71.23	1.65
RobZIP20	31.72	0.00	67.74	0.54	RobZIP67	62.32	0.00	34.78	2.90
RobZIP21	59.87	0.00	40.13	0.00	RobZIP68	69.88	0.00	26.51	3.61
RobZIP22	81.25	0.00	18.75	0.00	RobZIP69	46.27	0.00	51.74	1.99
RobZIP23	31.27	0.00	67.70	1.03	RobZIP70	27.27	0.00	71.14	1.59
RobZIP24	60.21	0.00	37.40	2.39	RobZIP71	34.55	0.00	64.85	0.61
RobZIP25	87.50	0.00	12.50	0.00	RobZIP72	31.99	0.00	67.06	0.95
RobZIP26	67.65	0.00	32.35	0.00	RobZIP73	42.16	0.00	55.88	1.96
RobZIP27	36.61	0.00	62.60	0.79	RobZIP74	16.08	0.00	77.12	6.80
RobZIP28	33.54	0.00	64.94	1.52	RobZIP75	40.00	0.00	60.00	0.00
RobZIP29	27.29	0.00	72.00	0.71	RobZIP76	33.03	0.00	64.83	2.14
RobZIP30	24.13	0.00	75.87	0.00	RobZIP77	35.03	0.00	62.93	2.04
RobZIP31	49.73	0.00	48.65	1.62	RobZIP78	53.01	0.00	46.39	0.60
RobZIP32	75.59	0.00	24.41	0.00	RobZIP79	60.84	0.00	39.16	0.00
RobZIP33	50.60	0.00	47.02	2.38	RobZIP80	81.58	0.00	15.79	2.63
RobZIP34	62.50	0.00	37.50	0.00	RobZIP81	84.38	0.00	12.50	3.12
RobZIP35	35.77	0.00	59.85	4.38	RobZIP82	41.75	0.00	57.58	0.67
RobZIP36	39.46	0.00	56.22	4.32	RobZIP83	34.94	0.00	63.92	1.14
RobZIP37	54.55	0.00	45.45	0.00	RobZIP84	33.33	0.00	66.07	0.60
RobZIP38	55.65	0.00	40.30	4.05	RobZIP85	53.09	0.00	44.44	2.47
RobZIP39	41.67	0.00	58.33	0.00	RobZIP86	45.42	0.00	54.20	0.38
RobZIP40	39.37	0.00	60.63	0.00	RobZIP87	46.56	0.00	53.44	0.00
RobZIP41	28.40	0.00	68.52	3.09	RobZIP88	31.67	0.00	66.29	2.04
RobZIP42	60.14	0.00	39.86	0.00	RobZIP89	60.26	0.00	39.74	0.00
RobZIP43	54.82	0.00	45.18	0.00	RobZIP90	81.67	0.00	18.33	0.00
RobZIP44	30.09	0.00	68.72	1.18	RobZIP91	83.76	0.00	16.24	0.00
RobZIP45	62.67	0.00	37.33	0.00	RobZIP92	34.79	0.00	63.56	1.64
RobZIP46	27.03	0.00	72.97	0.00	RobZIP93	43.58	0.00	55.64	0.78
RobZIP47	32.17	0.00	67.83	0.00	RobZIP94	31.01	0.00	67.96	1.03

12个外显子和4～11个内含子; E亚族含有2～4个外显子和2～5个内含子; G亚族成员中, 除*RobZIP07*、*RobZIP41*和*RobZIP63*外, 其他成员均含有12个外显子和12个内含子; I亚族含有3或4个外显子和2～4个内含子; S亚族所有成员和F亚族两个成员 (*RobZIP55*、*RobZIP61*) 基因结构中不含内含子, 且S亚族成员只有一个外显子。同一亚组的基因结构高度保守, 包括外显子的数量以及内含子/外显子的长度。

5 RobZIP与其他物种基因间的共线性分析

为进一步探究bZIP基因的起源和进化关系, 对药用大黄、拟南芥、大豆、何首乌、塔黄和唐古特大黄进行种间bZIP基因共线性分析 (图5)。药用大黄bZIP基因中, 有35个基因与拟南芥基因构成47对共线性基因; 43个基因与大豆基因构成101对共线性基因; 76个基因与同科药用植物何首乌基因构成147对共线性基因。药用大黄bZIP基因与同属药用植物塔黄、唐古特大黄分

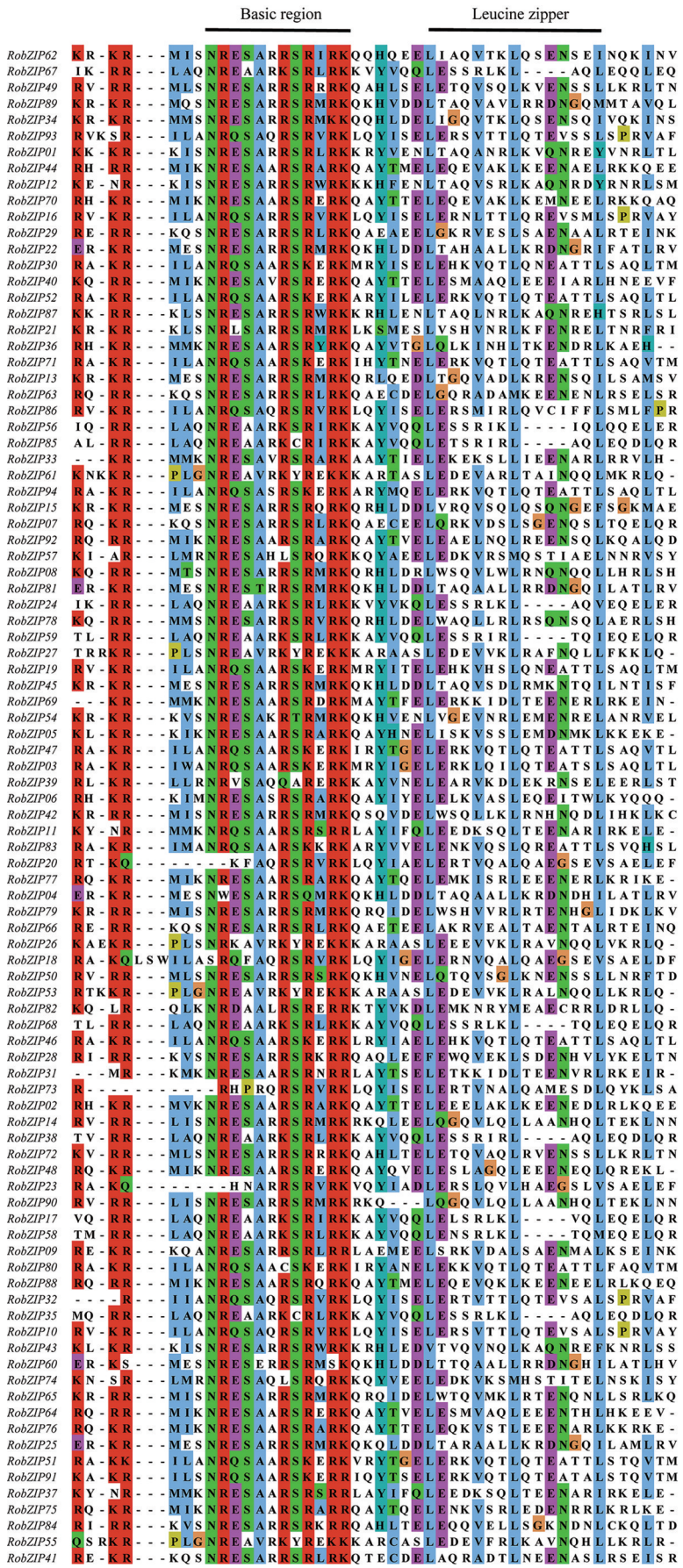


Figure 1 Multiple sequence alignment of bZIP proteins of *R. officinale*

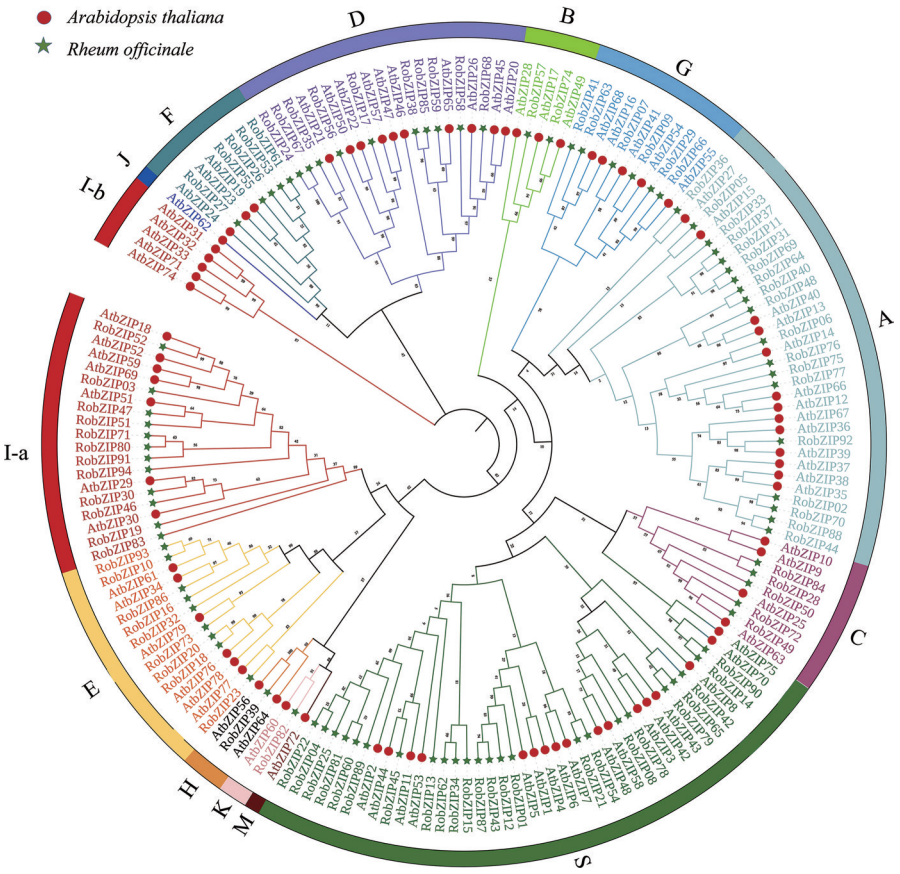


Figure 2 Phylogenetic tree of bZIP proteins of *R. officinale* and *Arabidopsis thaliana*

Table 4 Ka/Ks analysis of duplicated bZIP genes in *R. officinale*. Ka represents non-synonymous mutations, while Ks represents synonymous mutations

Gene name 1	Gene name 2	Replication mode	Ka	Ks	Ka/Ks	Gene name 1	Gene name 2	Replication mode	Ka	Ks	Ka/Ks
RobZIP01	*RobZIP43*	segmental	0.301 4	1.397 6	0.215 7	*RobZIP42*	*RobZIP79*	segmental	0.354 6	2.271 4	0.156 1
RobZIP02	*RobZIP44*	segmental	0.236 1	0.819 7	0.288 0	*RobZIP47*	*RobZIP51*	segmental	0.210 4	1.197 4	0.175 7
RobZIP02	*RobZIP70*	segmental	0.196 9	0.772 0	0.255 1	*RobZIP49*	*RobZIP50*	segmental	0.223 8	0.745 3	0.300 3
RobZIP02	*RobZIP88*	segmental	0.171 1	0.475 1	0.360 0	*RobZIP49*	*RobZIP72*	segmental	0.159 6	0.522 0	0.305 8
RobZIP01	*RobZIP87*	segmental	0.311 3	0.767 9	0.405 4	*RobZIP44*	*RobZIP70*	segmental	0.162 2	0.875 4	0.185 3
RobZIP11	*RobZIP33*	segmental	0.340 1	1.621 3	0.209 8	*RobZIP47*	*RobZIP71*	segmental	0.138 0	0.850 0	0.162 3
RobZIP06	*RobZIP36*	segmental	0.531 2	1.317 3	0.403 3	*RobZIP51*	*RobZIP71*	segmental	0.196 9	0.930 9	0.211 5
RobZIP13	*RobZIP45*	segmental	0.280 8	0.784 0	0.358 1	*RobZIP51*	*RobZIP91*	segmental	0.147 3	0.493 4	0.298 5
RobZIP14	*RobZIP65*	segmental	0.582 7	1.641 0	0.355 1	*RobZIP44*	*RobZIP88*	segmental	0.175 0	0.843 0	0.207 6
RobZIP11	*RobZIP69*	segmental	0.579 1	1.285 7	0.450 5	*RobZIP45*	*RobZIP89*	segmental	0.228 9	1.462 8	0.156 5
RobZIP10	*RobZIP93*	segmental	0.294 1	0.770 1	0.381 9	*RobZIP47*	*RobZIP91*	segmental	0.116 8	0.811 8	0.143 8
RobZIP17	*RobZIP35*	segmental	0.194 1	1.170 0	0.165 9	*RobZIP52*	*RobZIP94*	segmental	0.106 5	0.641 7	0.166 0
RobZIP21	*RobZIP54*	segmental	0.348 7	0.716 3	0.486 8	*RobZIP43*	*RobZIP87*	segmental	0.202 7	0.978 3	0.207 2
RobZIP34	*RobZIP62*	segmental	0.124 4	0.763 1	0.163 0	*RobZIP65*	*RobZIP79*	segmental	0.293 4	1.049 5	0.279 5
RobZIP33	*RobZIP69*	segmental	0.549 4	1.371 9	0.400 5	*RobZIP57*	*RobZIP74*	segmental	0.261 9	0.857 0	0.305 6
RobZIP42	*RobZIP65*	segmental	0.396 1	1.817 0	0.218 0	*RobZIP70*	*RobZIP88*	segmental	0.174 9	0.947 1	0.184 6
RobZIP40	*RobZIP64*	segmental	0.167 9	0.631 7	0.265 9	*RobZIP71*	*RobZIP91*	segmental	0.132 8	1.006 9	0.131 9
RobZIP41	*RobZIP63*	segmental	0.136 4	0.428 0	0.318 6	*RobZIP75*	*RobZIP77*	segmental	0.194 6	1.074 8	0.181 1

别构成145对、127对共线性基因, 分别涉及79和78个药用大黄bZIP基因。药用大黄中26个bZIP基因与5个物种均有共线性关系。此外, 24个药用大黄bZIP基因与何首乌、塔黄和唐古特大黄基因均有共线性关系, 而与拟南芥和大豆没有这种关系。这表明同属蓼科的bZIP家族在进化过程中, 可能具有较高的保守性。

6 RobZIP基因家族成员顺式作用元件分析

对RobZIPs家族成员的启动子区域 (ATG上游

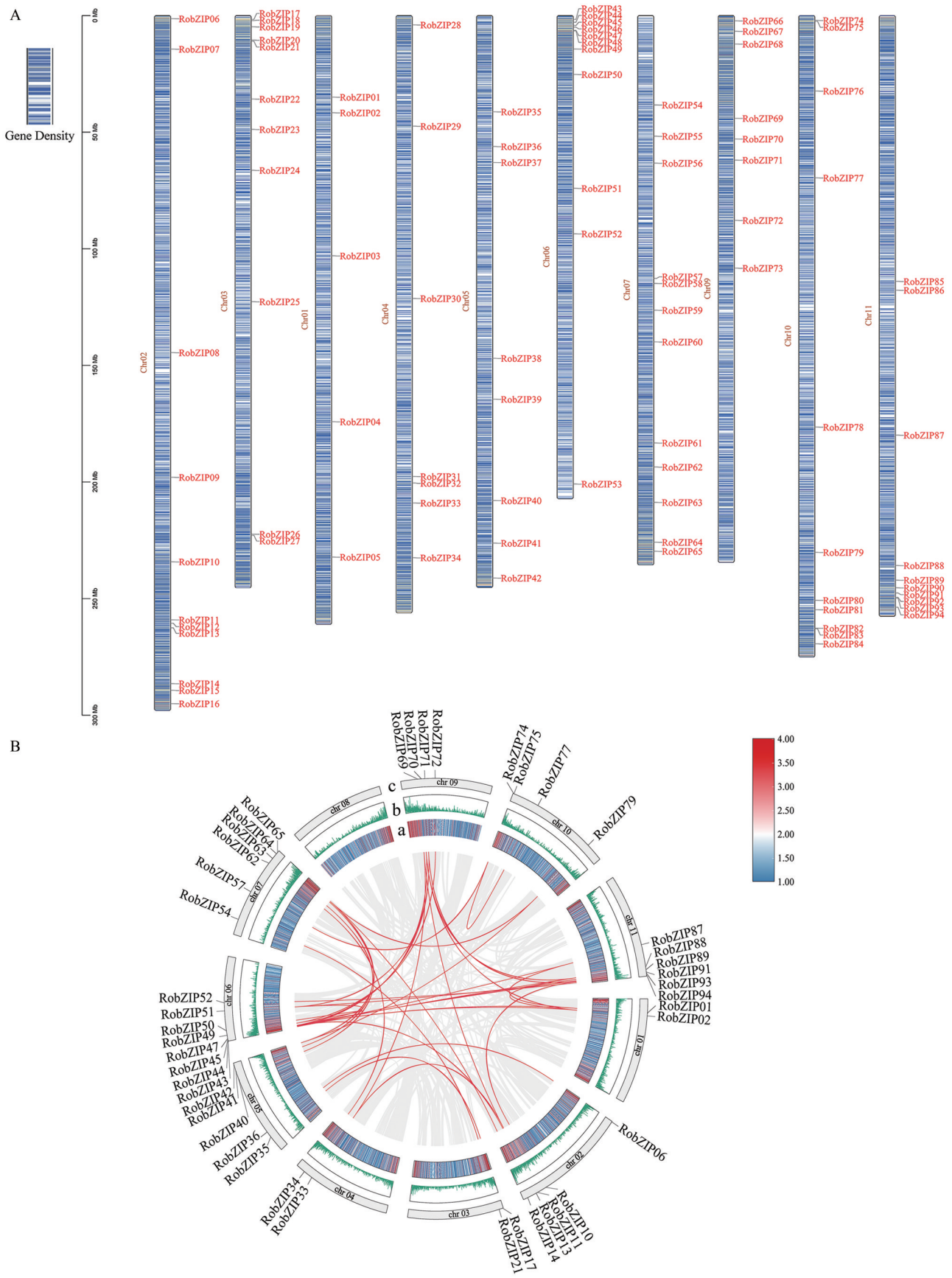


Figure 3 Chromosome distribution and collinearity relationship of bZIPs in *R. officinale*. A: Chromosome distribution; B: Collinearity relationship (a: Gene density; b: Gene expression level; c: Chromosome number)

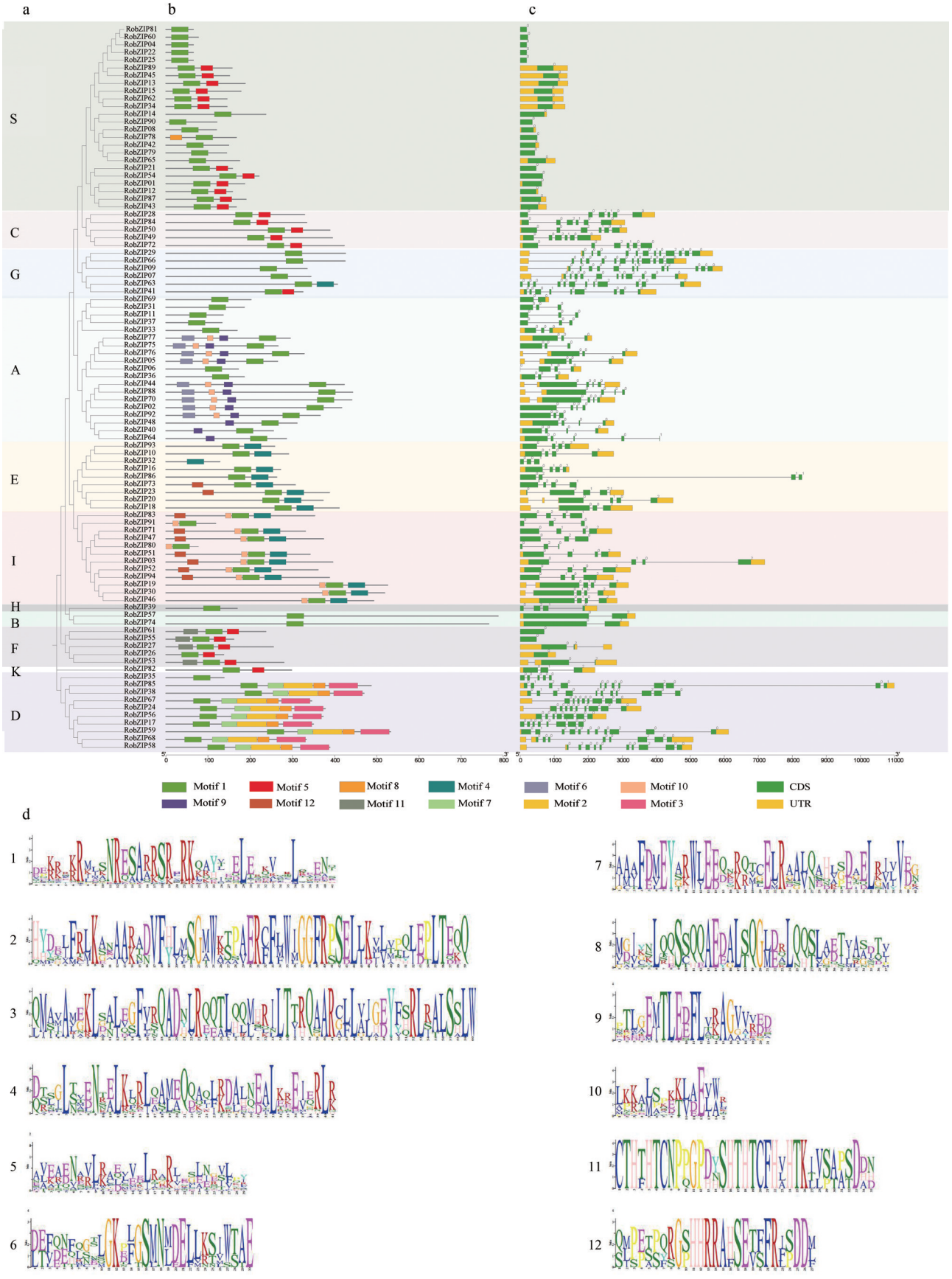


Figure 4 Motif identification, and gene structure analysis of bZIPs in *R. officinale*. a: Phylogenetic tree; b: Distribution of conserved motifs; c: Gene structure; d: Conserved motifs

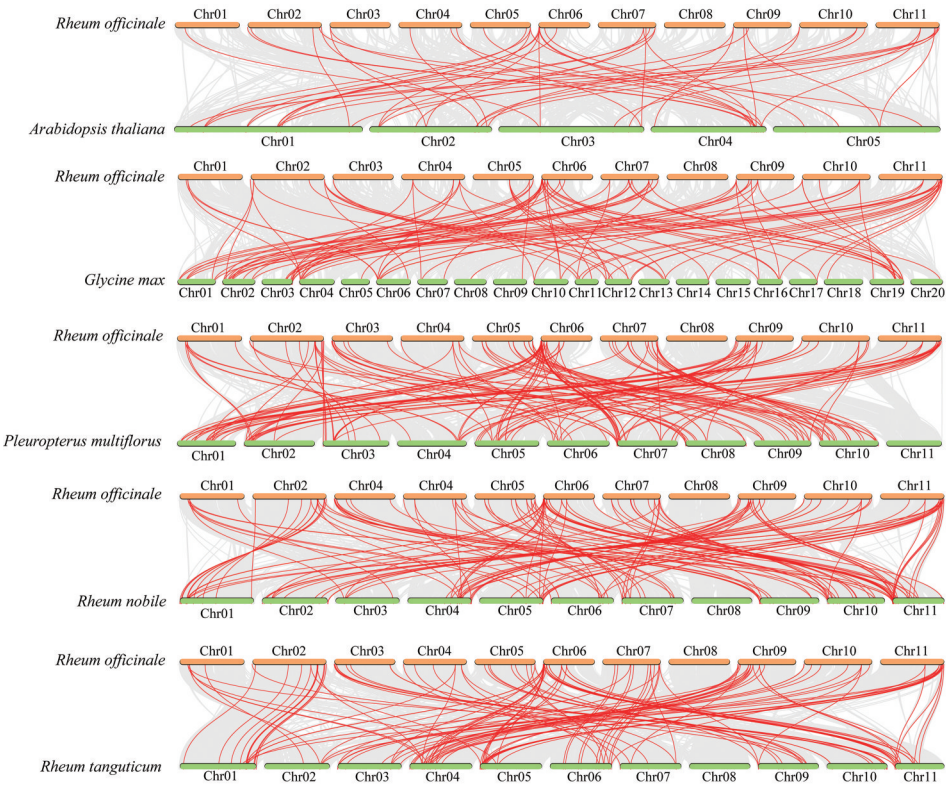


Figure 5 Comparative analysis of gene synteny for bZIP genes in *R. officinale* and other species

2 000 bp) 进行预测和分析 (图6), 发现光响应类、激素响应类、生长发育调控类、胁迫响应类等多种具有典型功能的顺式作用元件。光响应类的顺式元件广泛存在于每个RobZIP家族成员中; 大部分成员也都包含激素类相应元件, 其中ABA响应元件 (ABRE)、茉莉酸甲酯响应元件 (CGTCA-motif和TGACG-motif) 等数量最多; 生长发育类的元件包括CAT-box、RY-element和NON-box等; 在6个基因 (*RobZIP40*、*RobZIP43*、*RobZIP62*、*RobZIP67*、*RobZIP79*、*RobZIP84*) 中发现一类可能参与黄酮类化合物生物合成基因调控的MBSI元件。91个*RobZIPs*的启动子区域含有胁迫应答的元件, 如79个基因含有厌氧诱导元件 (ARE)、48个基因含有干旱胁迫的应答有关元件 (MBS)、38个基因含有植物胁迫应答调控过程相关元件 (TC-rich repeats)、3个基因含有机械伤害或物理损伤的响应元件 (WUN-motif)。

7 RobZIP基因家族成员表达模式分析

基于药用大黄不同器官及不同生长年限的RNA-seq数据, 对*RobZIP*基因在药用大黄中的表达模式进行了系统分析。在药用大黄根、根茎和叶的转录组数据中 (图7A), 共检索获得89个*RobZIPs*基因的FPKM值 (*RobZIP07*、*RobZIP18*、*RobZIP27*、*RobZIP56*、*RobZIP69*未被检索到)。按照聚类将*RobZIP*基因的表达模式分为I～IV组, I组和III组在不同年限的不同部位中的表达没有规律性, II组*RobZIP*基因主要在药用大黄叶中表达, IV-a组中7个*RobZIPs*基因在所有被分析的样本中的FPKM值均为0, IV-b组*RobZIP*基因主要在根或(及) 根茎中表达。

基于UV-B处理药用大黄的RNA-seq数据, 共筛选到36个显著差异表达*RobZIPs*基因 (图7B)。其中, 14个*RobZIPs*基因在UV-B处理2 h后表达上调, 22个*RobZIPs*基因表达下调。被UV-B诱导表达的基因中, *RobZIP15*、*RobZIP17*、*RobZIP33*等基因在大黄药用部位根或根茎中的表达量较高且响应UV-B。

8 RobZIP候选基因的表达模式验证

为了进一步分析RobZIP家族基因对UV-B处理的响应程度, 分别采集UV-B处理0、2、6、12、24 h后的药用大黄叶片, 对响应UV-B处理2 h的8个候选差异基因表达进行qPCR验证。结果显示 (图8), 相比对照 (ck), *RobZIP15*在12 h表达量达到峰值, 24 h大幅下降但仍然高于对照组; *RobZIP39*、*RobZIP66*、*RobZIP88*在2 h表达量达到峰值; *RobZIP17*和*RobZIP90*呈现先下调后上升趋势, 24 h表达量达到峰值; *RobZIP33*和*RobZIP67*在6 h和12 h表达量降到谷底, 随后在24 h上升到同2 h一样水平。8个差异基因在2 h的表达变化与转录组测序结果一致。



Figure 6 *Cis*-acting elements prediction in the bZIP genes of *R. officinale*. A: Phylogenetic tree; B: Statistics of *cis*-acting elements; C: Positions of *cis*-acting elements

讨论

bZIP转录因子在调控植物生长发育、胁迫响应及次生代谢产物合成中发挥重要功能。本研究基于二倍体药用大黄基因组数据, 鉴定到94个bZIP基因家族成员(*RobZIP01*～*RobZIP94*), 其数量显著多于丹参 (70)[32]、黄花蒿 (78)[33]、野菊 (75)[34]、红花 (52)[35]、火麻仁 (55)[36]、桔梗 (47)[37]、薏苡 (81)[38]等已报道的药用植物。该差异可能主要源于物种特异的基因家族扩张模式。共线性分析表明, 片段复制是RobZIP家族扩增的主要动力 (图3B), 直接导致了其bZIP成员数量的显著增多, 不同于以串联重复或全基因组复制为主要扩张机制的药用植物。相较于前期基于转录组数据鉴定的57个成员[21], 基因组数据提供了更完整的家族图谱。依据拟南芥系统, RobZIPs被分为13个亚族, 其中S亚族成员最多 (23个), 而J和M亚族缺失, 这与甜菜、火麻仁中的分类模式一致。基因结构与保守基序分析显示, Motif1为所有RobZIPs共有的典型bZIP结构域, 且同一亚族成员结构相似, 支持了进化树分类的可靠性。

RobZIPs在染色体上呈不均匀分布。共检测到36次片段复制事件, 涉及44个基因, 且其Ka/Ks比值均 < 1, 表明片段复制是家族扩张的主要驱动力, 并在进化过程中受到纯化选择, 功能相对保守。跨物种共线性分析显示, 药用大黄bZIP与拟南芥共线性基因较少, 但与近缘物种塔黄、唐古特大黄存在大量共线性基因对。值得注意的是, 26个RobZIPs在5个物种 (包括药用大黄、塔黄、唐古特大黄、拟南芥、大豆) 中均存在

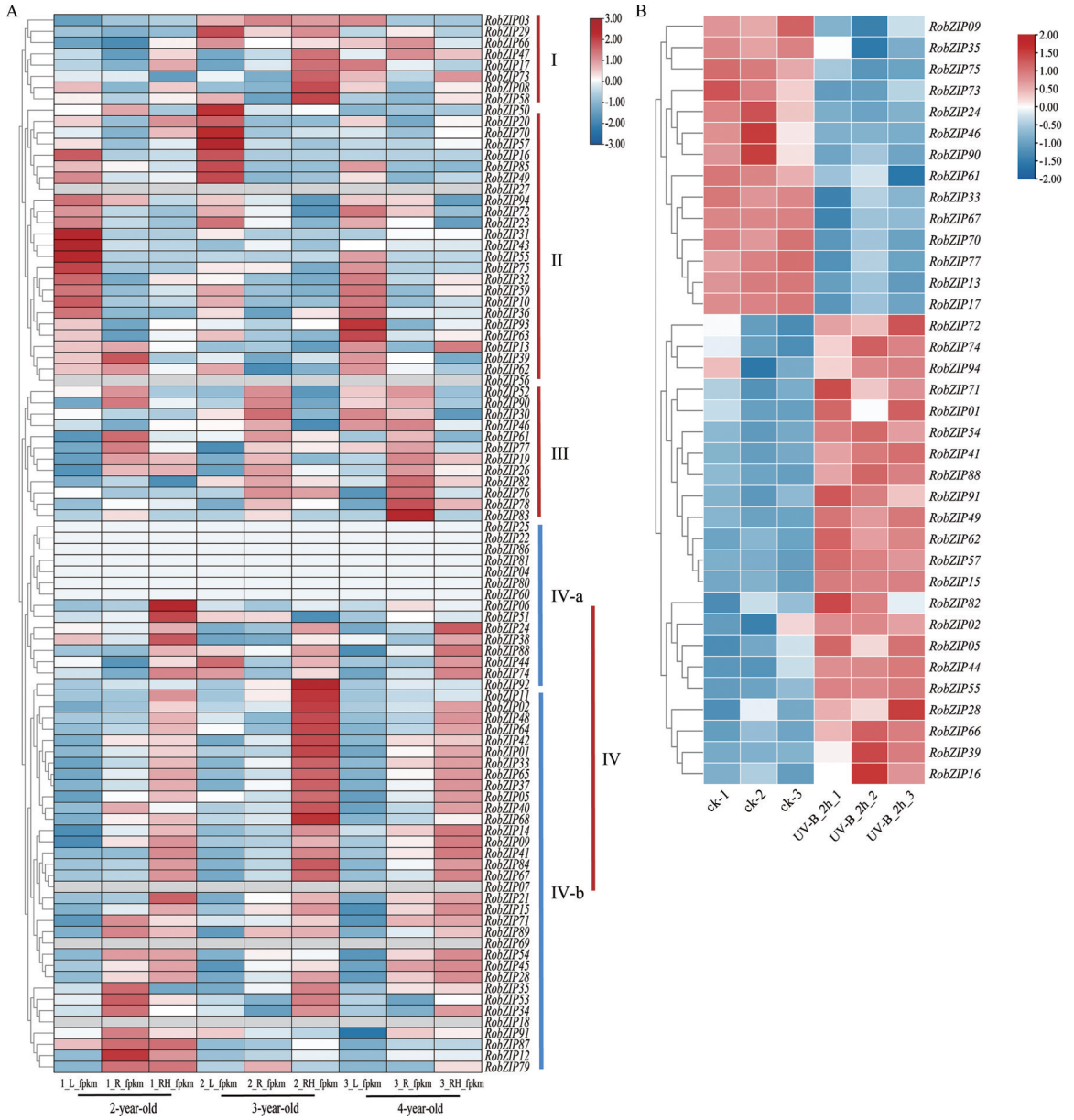


Figure 7 Expression patterns of bZIP gene family in *R. officinale*. A: Expression patterns of *RobZIPs* in different tissues of 2- to 4-year-old plants; B: Expression patterns of *RobZIPs* after 2 h of UV-B treatment. ck: Control

共线性, 暗示其功能高度保守; 另有 24 个 RobZIPs 仅与何首乌、塔黄和唐古特大黄共线性, 提示其在近缘物种进化中具有同源性, 可能在家族进化中扮演关键角色。

植物次生代谢物积累常具组织特异性。五味子木脂素类化合物主要在果实和根中富集, 其中五味子乙素在果实中的积累与 *PAL1*、*C4H-2*、*CAD1* 等基因的表达密切相关; 在根中的积累则与 *CCR5*、*SDH4*、*CYP8* 等基因的表达相关[39]。唐古特大黄不同组织及不同生长阶段根中的代谢物组成和积累模式存在显著差异, 蒽醌类化合物主要在根及根茎中积累, 与基因的特异性表达密切相关[40]。在四倍体药用大黄中, 蒽醌生物合成相关的重要基因 (如 *CHS* 和 *UGT73*) 在根部的表达量显著高于其他组织[41]。作者最新的研究发现, 相较于 2 年生、3 年生的药用大黄根和根茎, 4 年生的蒽醌类成分含量更高, 而 *CYP450*、*WRKY* 等基因在根或根茎中差异表达[42]。RNA-Seq 分析表明, *RobZIPs* 表达亦呈现组织偏好性: II组基因主要在叶中表达, 而IV-b 组基因则在根或根茎中优势表达。其中, *RobZIP28* 在根及根茎中的表达量随年限 (2～4 年生) 增长而增加。因此, 推测这些在药用大黄根及根茎中高表达的基因可能参与调控其生长发育、蒽醌等次生代谢产物合成。

在植物的生长发育过程中, 不断遭受外界的生物胁迫和非生物胁迫, 而顺式作用元件则在基因转录起

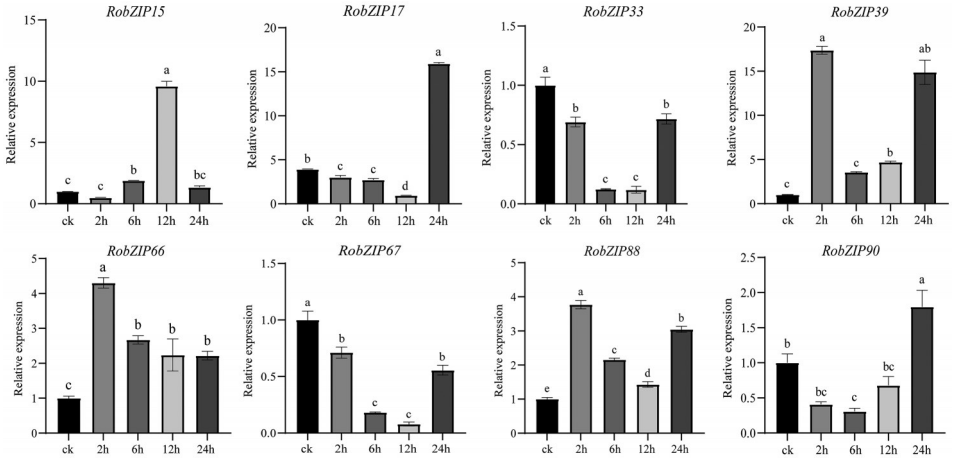


Figure 8 Expression patterns of *RobZIP* genes under UV-B stress. Different lowercase letters above the columns represent statistically significant for differences in processing times ($P < 0.05$)

始的调节过程中发挥着关键的作用[43]。为进一步探究*RobZIPs*基因的潜在功能, 通过基因启动子元件分析发现富含激素响应元件及胁迫响应元件, 表明其可能广泛参与激素信号转导和胁迫应答。此外, 所有成员均含光响应元件, 提示其对光信号的普遍响应。UV-B辐射是太阳光一部分, 对植物的形态建成、生理代谢等方面具有显著影响[44]。本研究基于UV-B处理的药用大黄幼苗转录组数据, 筛选到36个差异表达的*RobZIPs*。*RobZIP15*、*RobZIP66*、*RobZIP88*在根或根茎中高表达且响应UV-B。尤为重要的是, 拟南芥HY5的同源基因*RobZIP39*在叶和根茎中高表达, 并被UV-B显著诱导。鉴于光信号核心因子HY5在拟南芥[45]、苹果[46]、银杏[16]等植物中被证实调控次生代谢 (如花青素、黄酮醇), 且前期研究发现MeJA、高海拔 (强UV-B辐射特征) 及光照能显著促进大黄蒽醌积累[23,31], 本研究推测RobZIP39可能是响应UV-B信号并调控蒽醌合成的关键因子。后续的研究, 将利用药用大黄转基因毛状根体系, 结合转录组共表达分析、ChIP-PCR和双荧光素酶报告系统等技术进一步揭示RobZIP候选基因对蒽醌合成关键酶基因的转录调控作用。

作者贡献: 胡晓晨、张岗、李依民负责论文思路设计; 胡晓晨、张岗、唐璟负责数据分析及论文撰写; 梁玉杰、唐璟、闫锋负责样品采集、数据挖掘及表达分析; 张明英、高静和牛恒磊负责生物信息学分析。所有的作者都对原稿的最终版本做出了贡献。

利益冲突: 无相关利益冲突。

References

[1] Glover JN, Harrison SC. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA [J]. Nature, 1995, 373: 257-261.

[2] Dröge-Laser W, Snoek BL, Snel B, et al. The *Arabidopsis* bZIP transcription factor family-an update [J]. Curr Opin Plant Biol, 2018, 45: 36-49.

[3] Kouzarides T, Ziff E. Leucine zippers of Fos, Jun and GCN4 dictate dimerization specificity and thereby control DNA binding [J]. Nature, 1989, 340: 568-571.

[4] Sui X, Singh SK, Patra B, et al. Cross-family transcription factor interaction between MYC2 and GBFs modulates terpenoid indole alkaloid biosynthesis [J]. J Exp Bot, 2018, 69: 4267-4281.

[5] Menkens AE, Schindler U, Cashmore AR. The G-box: A ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins [J]. Trends Biochem Sci, 1995, 20: 506-510.

[6] Izawa T, Foster R, Chua NH. Plant bZIP protein DNA binding specificity [J]. J Mol Biol, 1993, 230: 1131-1144.

[7] Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, et al. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation [J]. Plant J, 2010, 61: 672-685.

[8] Hao X, Zhong Y, Nï Tzmann HW, et al. Light-induced artemisinin biosynthesis is regulated by the bZIP transcription factor AaHY5 in *Artemisia annua* [J]. Plant Cell Physiol, 2019, 60: 1747-1760.

[9] Lv Z, Guo Z, Zhang L, et al. Interaction of bZIP transcription factor TGA6 with salicylic acid signaling modulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. J Exp Bot, 2019, 70: 3969-3979.

[10] Shu G, Tang Y, Yuan M, et al. Molecular insights into AabZIP1-mediated regulation on artemisinin biosynthesis and drought tolerance in *Artemisia annua* [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12: 1500-1513.

[11] Shi M, Zhu R, Zhang Y, et al. A novel WRKY34-bZIP3 module regulates phenolic acid and tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Metab Eng, 2022, 73: 182-191.

[12] Han J, Liu HT, Wang SC, et al. A class I TGA transcription factor from *Tripterygium wilfordii* Hook. f. modulates the biosynthesis of secondary metabolites in both native and heterologous hosts [J]. Plant Sci, 2020, 290: 110293.

[13] Liu Q, Wu Z, Qi X, et al. TmCOP1-TmHY5 module-mediated blue light signal promotes chicoric acid biosynthesis in *Taraxacum mongolicum* [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23: 839-856.

[14] Zha L, Liu S, Liu J, et al. DNA methylation influences chlorogenic acid biosynthesis in *Lonicera japonica* by mediating LjbZIP8 to regulate phenylalanine ammonia-lyase 2 expression [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1178.

[15] Li C, Jiao M, Zhao X, et al. bZIP transcription factor responds to changes in light quality and affects saponins synthesis in *Eleutherococcus senticosus* [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 279 (Pt 2): 135273.

[16] Liu S, Gu X, Jiang Y, et al. UV-B promotes flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba* by inducing the *GbHY5-GbMYB1-GbFLS* module [J]. Hortic Res, 2023, 10: uhad118.

[17] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. 2020 Ed. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 24-25.

[18] Cui Y, Chen LJ, Huang T, et al. The pharmacology, toxicology and therapeutic potential of anthraquinone derivative emodin [J]. Chin J Nat Med, 2020, 18: 425-435.

[19] Yao M, Li J, He M, et al. Investigation and identification of the multiple components of *Rheum officinale* Baill. using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry and data mining strategy [J]. J Sep Sci, 2021, 44: 681-690.

[20] Feng G, Bi J, Jin W, et al. Effect of Rhei Radix et Rhizoma and Eupolyphaga Steleophaga on liver protection mechanism based on pharmacokinetics and metabonomics [J]. Chin Herb Med, 2024, 16: 121-131.

[21] Tang J, Li YM, Wang Y, et al. Comparative transcriptome analysis and identification of candidate bZIP transcription factors involved in anthraquinone biosynthesis in *Rheum officinale* Baill [J]. Genomics, 2024, 116: 110948.

[22] Yang L, Sun J, Zhang T, et al. Comparative transcriptome analysis and HPLC reveal candidate genes associated with synthesis of bioactive constituents in *Rheum palmatum* complex [J]. Physiol Mol Biol Plants, 2024, 30: 1239-1252.

[23] Zhao X, Yan F, Li Y, et al. Comparative transcriptome analysis and identification of candidate R2R3-MYB genes involved in anthraquinone biosynthesis in *Rheum palmatum* L. [J]. Chin Med, 2024, 19: 23.

[24] Kang SH, Pandey RP, Lee CM, et al. Genome-enabled discovery of anthraquinone biosynthesis in *Senna tora* [J]. Nat Commun, 2020, 11: 5875.

[25] Wang XW, Hu HY, Wu ZJ, et al. Tissue-specific transcriptome analyses reveal candidate genes for stilbene, flavonoid and anthraquinone biosynthesis in the medicinal plant *Polygonum cuspidatum* [J]. BMC Genomics, 2021, 22: 353.

[26] Wang Y, Song LK, Wang XN, et al. Textual research on germplasm and distribution of Rhei Radix et Rhizoma [J]. China Pharm (中国药房), 2013, 24: 1040-1043.

[27] Wang XM, Hou XQ, Zhang YQ, et al. Distribution pattern of genuine species of rhubarb as traditional Chinese medicine [J]. J Med Plants Res, 2010, 4: 1865-1876.

[28] Nidhi V, Shukla S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites [J]. J Appl Res Med Aromat Plants, 2015, 2: 105-133.

[29] Meng L, Hu HJ, Shang T, et al. Genotype, environment and their interactions of functional components in *Rheum palmatum* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2018, 43: 2495-2502.

[30] Yang FR, Ran JD, Liu HT, et al. Geographic variation of functional components and the climatic response characteristics of *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.. [J]. Acta Ecol Sin (生态学报), 2021, 41: 3645-3655.

[31] Yan YG, Wang HY, Deng C, et al. Effects of growth years, altitude, and light factors on contents of eight components in *Rheum officinale* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 2285-2291.

[32] Zhang Y, Xu Z, Ji A, et al. Genomic survey of bZIP transcription factor genes related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Acta Pharm Sin B, 2018, 8: 295-305.

[33] Wang XW, Wu D, Shi YH, et al. bZIP transcription factor gene family and light regulation expression pattern analysis in *Artemisia Annua* [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol (世界科学技术－中医药现代化), 2021, 23: 20-32.

[34] Liu H, Huang QM, Liu YJ, et al. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of *Chrysanthemum indicum* bZIP transcription factor [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2022, 20: 4586-4600.

[35] Li H, Li L, Shangguan G, et al. Genome-wide identification and expression analysis of bZIP gene family in *Carthamus tinctorius* L [J]. Sci Rep, 2020, 10: 15521.

[36] Huai H, Ning K, Hou C, et al. The identification of bZIP gene family in *Cannabis sativa* L. and its preliminary research of the function in regulation of lipid metabolism [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2022, 57: 2528-2542.

[37] Wang Z, Wang P, Cao H, et al. Genome-wide identification of bZIP transcription factors and their expression analysis in *Platycodon grandiflorus* under abiotic stress [J]. Front Plant Sci, 2024, 15: 1403220.

[38] Wang Y, Chen CM, Wang J, et al. Genome-wide identification and expression analysis of bZIP gene family under abiotic stress in *Coix lacryma-jobi* L. [J]. Chin J Trop Crops (热带作物学报), 2022, 43: 2006-2020.

[39] Sun B, Wang P, Guan M, et al. Tissue-specific transcriptome and

metabolome analyses reveal candidate genes for lignan biosynthesis in the medicinal plant *Schisandra sphenanthera* [J]. BMC Genomics, 2023, 24: 607.

[40] Zhao S, Xiong F, Li J, et al. Metabolomic characteristics and anthraquinones accumulation patterns of *Rhubarb* in different tissues and roots from different developmental stages [J]. Food Biosci, 2024, 62: 105426.

[41] Zhang H, He Q, Xing L, et al. The haplotype-resolved genome assembly of autotetraploid rhubarb *Rheum officinale* provides insights into its genome evolution and massive accumulation of anthraquinones [J]. Plant Commun, 2024, 5: 100677.

[42] Li YM, Wang XR, Yang G, et al. Profiling the accumulation of ten bioactive compounds in *Rheum officinale* across different growth years using integrated HPLC and transcriptomic approaches [J]. Med Plant Biol, 2025, 4: e022.

[43] Zou C, Sun K, Mackaluso JD, et al. *Cis*-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108: 14992-14997.

[44] Podolec R, Demarsy E, Ulm R. Perception and signaling of ultraviolet-B radiation in plants [J]. Annu Rev Plant Biol, 2021, 72: 793-822.

[45] Lee J, He K, Stolc V, et al. Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development [J]. Plant Cell, 2007, 19: 731-749.

[46] Mao Z, Jiang H, Wang S, et al. The MdHY5-MdWRKY41-MdMYB transcription factor cascade regulates the anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in red-fleshed apple [J]. Plant Sci, 2021, 306: 110848.