

## 响应 ABA 胁迫的甘草 bZIP 转录因子的系统筛选与分析

武立伟, 徐志超, 王 清, 聂丽萍, 崔英贤, 王 瑀, 宋经元, 姚 辉\*

(中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 濒危药材繁育国家工程实验室, 北京 100193)

**摘要:** 甘草为我国最常用的大宗药材之一, 主要分布在干旱、半干旱区域, 有着重要的经济和生态价值。bZIP 转录因子在植物生物或非生物胁迫响应、生长发育、次生代谢产物合成等方面具有重要的调控作用。本研究利用 Illumina 高通量测序技术对不同浓度脱落酸 (ABA) 处理的甘草转录组进行测序, 并基于已发表的甘草全基因组数据, 以拟南芥基因组中发现的 bZIP 序列为参照, 鉴定了甘草中的 bZIP 转录因子。之后筛选 ABA 依赖 bZIP 转录因子基因作为候选基因, 对其编码蛋白理化性质、结构以及外源 ABA 胁迫下基因的表达模式进行分析。共鉴定到 69 个甘草 bZIP 转录因子家族基因, 命名为 *GubZIP1-69*, 并根据它们与拟南芥 bZIP 的同源相似性分为 A~I 以及 S 这 10 个亚家族。通过计算 69 个 *GubZIPs* 基因在不同外源 ABA 胁迫下的相对表达量, 筛选出可能参与 ABA 信号通路的调控基因, 即 *GubZIP1*、*GubZIP5*、*GubZIP8*、*GubZIP30*、*GubZIP33* 和 *GubZIP56*。外源 ABA 胁迫下候选 *GubZIPs* 基因的表达模式分析结果显示, 与 0 mg·L<sup>-1</sup> 浓度 ABA 处理下相比, 25 mg·L<sup>-1</sup> 的 ABA 没有引起基因的表达模式发生变化, 而在 50 mg·L<sup>-1</sup> 浓度 ABA 处理下的表达模式发生了明显的变化, 说明这些基因的表达响应 50 mg·L<sup>-1</sup> 浓度的 ABA, 即基因相对表达量均在处理后 3 h 下降, 6 h 之后逐渐上升, 除了 *GubZIP8*, 12 h 后基因相对表达量较 0 h 均显著上升。本研究为进一步开展甘草 bZIP 转录因子功能研究, 阐明其调控机制奠定了基础, 为今后利用分子育种方法培育优质甘草品种提供了科学依据。

**关键词:** 甘草; bZIP 转录因子; ABA 胁迫; 结构分析; 表达分析

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)03-0818-13

## Systematic screening and analysis of bZIP transcription factors in *Glycyrrhiza uralensis* and their response to ABA stress

WU Li-wei, XU Zhi-chao, WANG Qing, NIE Li-ping, CUI Ying-xian, WANG Yu,  
SONG Jing-yuan, YAO Hui\*

(National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

**Abstract:** Licorice, one of the most commonly used medicinal materials in China, grows mainly in arid and semi-arid regions and has important economic and ecological values. Basic leucine zipper (bZIP) transcription factors in plants play an important role in regulating biological or abiotic stress responses, growth, and secondary metabolite synthesis. bZIP transcription factors in the published whole genome database of *Glycyrrhiza uralensis* were identified using bZIP sequences found in *Arabidopsis thaliana* genome as reference, and ABA-dependent bZIP genes were identified by using Illumina high-throughput sequencing. The physical and chemical properties, structure of the encoded proteins, and the gene expression patterns with exogenous ABA stress were analyzed. A total of 69 bZIP transcription factor genes were identified in *G. uralensis*, named *Gubzip1-69*, and they were divided

收稿日期: 2021-09-16; 修回日期: 2021-10-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32070368); 科技部重点研发计划 (2019YFC1711100); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助 (2016-I2M-1-071).

\*通讯作者 Tel: 86-10-57833194, E-mail: scauyaoh@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1359

into 10 subfamilies (A-I and S) according to their similarity to bZIPs of *A. thaliana*. By calculating the relative expression levels of the 69 *GubZIPs* genes under different concentrations of exogenous ABA stress, genes that may be involved in the regulation of ABA signaling pathways were identified, namely *GubZIP1*, *GubZIP5*, *GubZIP8*, *GubZIP30*, *GubZIP33* and *GubZIP56*. The results of expression pattern analysis of these *GubZIPs* genes under exogenous ABA stress showed that the expression pattern of *GubZIPs* genes changed significantly with 50 mg·L<sup>-1</sup> ABA. The relative expression levels of these genes decreased 3 h after treatment, and gradually increased 6 h after treatment. Except for *GubZIP8*, the relative expression levels of these genes were significantly increased after 12 h. Further research on the function of bZIP transcription factors of *G. uralensis* and elucidating their regulatory mechanisms should be of interest and will provide a scientific basis for cultivating high-quality cultivars of *G. uralensis* through molecular breeding methods.

**Key words:** *Glycyrrhiza uralensis*; bZIP transcription factors; ABA stress; structure analysis; expression analysis

甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 为豆科多年生草本植物, 主要分布在宁夏、甘肃、新疆和内蒙古等干旱、半干旱区域<sup>[1]</sup>。甘草药用部位为根及根茎, 具有补脾益气, 清热解毒, 祛痰止咳, 缓急止痛, 调和诸药的功效<sup>[2]</sup>, 为我国最常用的大宗药材之一, 素有“十方九草”之说, 被称为“国老”, 在美国、日本等国家又被称为“仙草”、“神草”<sup>[3]</sup>。现代药理研究发现甘草具有抗炎、抗癌、抗病毒、保肝等多种功效<sup>[4-7]</sup>。除了药用, 甘草还作为添加剂和矫味剂应用于食品、烟草、日化以及畜牧等行业中。此外, 甘草是国家重点保护、管理的野生固沙植物, 在保护生态环境、防止沙漠化方面起着重要作用<sup>[8]</sup>。因甘草用途广泛, 自然资源匮乏, 被科技部列为首批中药现代化建设中药材生产质量管理规范 (GAP) 的中药材之一。因此, 人工栽培甘草成为市场需求的主要来源<sup>[9]</sup>。但是, 由于干旱等环境因子和甘草遗传因素的影响, 栽培甘草和野生甘草的活性成分含量存在显著差异, 栽培甘草的甘草酸含量普遍偏低, 达不到药典标准, 制约了甘草资源的可持续发展<sup>[10]</sup>。

脱落酸 (abscisic acid, ABA) 属于倍半萜类激素, 在植物生长过程中起到重要的作用。ABA除了促使叶片脱落外, 还能够通过内源合成、信号转导以及其他激素的互作等多方面调控次生代谢物质的合成<sup>[11]</sup>。有研究用ABA处理一年生甘草后, 甘草的活性成分含量明显增高, 这表明ABA与甘草活性成分的积累密切相关<sup>[12]</sup>。ABA信号调控途径是一个复杂的生物学过程, 需要多种信号因子、转录因子和功能基因的参与。有研究报道碱性亮氨酸拉链 (basic leucine zipper, bZIP) 转录因子能够通过参与ABA信号转导通路来调控次生代谢产物的合成<sup>[13]</sup>。Zhang等<sup>[14]</sup>为了阐明ABA介导的青蒿素生物合成机制, 采用100 μmol·L<sup>-1</sup>的ABA处理黄花蒿 (*Artemisia annua*) 植株, 双荧光素酶检测结果显示ABA能增强黄花蒿bZIP转录因子AabZIP1对青蒿素合成途径的关键酶基因*ADS*、

*CYP71AV1*启动子的转录活性, 而且在*AabZIP1*转录因子基因过表达且青蒿素含量明显增加的黄花蒿植株中分离出ABA受体蛋白AaPYL9, 表明AabZIP1可在ABA诱导合成青蒿素过程中起到关键的作用。短角蒲公英 (*Taraxacum brevicorniculatum*) 中的小橡胶粒子蛋白 (SRPP) 可在橡胶粒子结构稳定和天然橡胶合成中发挥重要作用<sup>[15]</sup>。Fricke等<sup>[16]</sup>研究发现短角蒲公英bZIP转录因子A亚家族成员TbbZIP1可与*TbSRPPI*基因启动子区域的顺式作用元件特异性结合, ABA能促进*TbbZIP1*和*TbSRPP*基因的表达, TbbZIP1转录因子在ABA信号转导途径中正向调控*TbSRPPI*基因的转录, 从而影响天然橡胶的合成。bZIP转录因子由碱性 (basic) 区和亮氨酸拉链 (leucine zipper) 区两部分构成。其碱性区高度保守, 位于bZIP结构域的N端, 亮氨酸拉链区保守度较低, 位于bZIP结构域的C端<sup>[17]</sup>。根据碱性区及其他保守序列的相似性, Jakoby等<sup>[18]</sup>将拟南芥的75个bZIP转录因子 (AtbZIP) 分为A~I和S共10个亚家族。TGA是拟南芥中抗病相关的bZIP转录因子, 当病原菌侵染植物后, 植物体内水杨酸含量上升, 使得中介蛋白NPR1从多聚体转化成单体同TGA蛋白作用, 以此来调控致病相关基因*PR*的表达, 从而增强植物的抗病性<sup>[19]</sup>。Zhang等<sup>[20]</sup>对拟南芥的研究发现, 其bZIP转录因子HY5和HYH通过上调花色苷生物合成途径下游的关键基因*DFR*, 促进花色苷的积累。bZIP转录因子在真核生物中分布广泛、相对保守<sup>[17]</sup>, 随着全基因组测序技术的进步, 目前已在多种高等植物中发现了bZIP转录因子, 如在玉米 (*Zea mays*) 基因组中鉴定出125个bZIP转录因子<sup>[21]</sup>、水稻 (*Oryza sativa*) 89个<sup>[22]</sup>、大豆 (*Glycine max*) 131个<sup>[23]</sup>、阳芋 (*Solanum tuberosum*) 65个<sup>[24]</sup>、烟草 (*Nicotiana tabacum*) 132个<sup>[25]</sup>、紫苜蓿 (*Medicago sativa*) 57个<sup>[26]</sup>。bZIP转录因子在植物生物或非生物胁迫响应<sup>[27]</sup>、生长发育<sup>[28]</sup>、次生代谢产物合成<sup>[14]</sup>等方面具有重要的调控作用。

本研究测定不同浓度 ABA 处理的甘草转录组数据并基于 Mochida 等<sup>[29]</sup>发表的甘草全基因组数据,以拟南芥基因组中发现的 bZIP 氨基酸序列为参照,鉴定出甘草 bZIP 转录因子并进行分析,为进一步开展甘草 bZIP 转录因子功能研究,阐明其调控机制奠定了基础。

## 材料与方法

**实验材料** 材料采自于甘肃省武威市民勤县,经中国医学科学院药用植物研究所林余霖研究员鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis*, 凭证标本保存于中国医学科学院药用植物研究所。样品分别用 0、25、50 mg·L<sup>-1</sup> 的 ABA 对两年生甘草的根部进行浸泡处理,并在处理后 3、6、12 h 收集根样品,立刻放入液氮中冷冻,并将其储存在 -80 °C 冰箱备用。

**总 RNA 提取及转录组测序** 总 RNA 采用 RNAPrep Pure Plant Plus Kit 试剂盒 (TIANGEN, DP441, 中国) 法提取, DNase I 处理去除基因组 DNA 后,根据操作流程利用 Illumina 高通量测序平台进行 RNA 测序。

**甘草 bZIP 转录因子鉴定与分析** 以拟南芥基因组中发现的 bZIP 氨基酸序列为参照,利用 BLASTP (the protein basic local alignment search tool) 对甘草基因组中的 bZIP 基因家族进行了 E 值阈值为  $1 \times 10^{-5}$  的鉴定,并用 DNAMAN 软件去除冗余基因,用 Apollo 软件对编码序列、DNA 序列和蛋白质序列信息进行了校正。利用 Gene Structure Display Server (GSDS 2.0) 在线工具 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 分析基因结构。利用 ExPaSy 网站 (<http://web.expasy.org/>) 测定 bZIPs 的氨基酸数量、分子质量 (MW)、理论等电点 (PI)、不稳定指数 (II)、脂肪族指数 (AI) 和亲水性总平均数 (GRAVY) 等性能。Multiple Em for Motif Elicitation (MEME, <http://memesuite.org/>) 被用来识别 motifs, E 值小于  $1 \times 10^{-30}$ 。应用 DNASTar Protean 软件提供的 Garnier-Robson 法预测 bZIP 编码蛋白的二级结构, SWISS-MODEL 在线工具 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 预测蛋白三级结构, Pfam 网站 (<http://pfam.xfam.org/search/batch>) 鉴定 bZIP 编码蛋白结构域。

**bZIPs 的系统发育分析** 为了确定 bZIP 家族的进化关系,利用 MAFFT 软件对拟南芥和甘草的 bZIP 全长蛋白序列进行比对,并利用 IQ-TREE 软件构建了最大似然 (ML) 系统发育树, Bootstrap 重复次数为 1 000。

**qRT-PCR 验证 bZIP 转录因子基因表达** 按照 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒中 (TaKaRa, 6210A, 中国) 的说明,将 RNA 反转录得到

cDNA 第 1 链。使用 Primer Premier 6 软件设计荧光定量分析的引物 (表 1)。以甘草 cDNA 为模板, *actin* 作为内参基因,反应体系按照 TB Green® Premix Ex Taq™ 试剂盒 (TaKaRa, RR420A, 中国) 说明书配置,每个反应重复 3 次,在 CFX96 Real-Time PCR Detection System 中进行。根据得到的 Ct 值,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算基因的相对表达。

**Table 1** The primers of six *GubZIPs* genes of *G. uralensis* used for qRT-PCR

Gene name	Primer name	Sequence (5' to 3')
<i>GubZIP1</i>	qbZIP1-F	GCGTAATCGACGAAAGGAAGC
<i>GubZIP1</i>	qbZIP1-R	TGAGGCGTGCATTCTCTTGA
<i>GubZIP5</i>	qbZIP5-F	TATCGAACCGTGAATCGGCA
<i>GubZIP5</i>	qbZIP5-R	TCACCCATTTGGGCTCTCAG
<i>GubZIP8</i>	qbZIP8-F	GCATCTCCTGGTGGAGCTTAT
<i>GubZIP8</i>	qbZIP8-R	TTCAGCTGTTCCACCTGGTC
<i>GubZIP30</i>	qbZIP30-F	TAGCACCCACGGCTCTACAA
<i>GubZIP30</i>	qbZIP30-R	TCACTGGAGGTCCAAATGCT
<i>GubZIP33</i>	qbZIP33-F	GCATGCATTGAGACCGAAGC
<i>GubZIP33</i>	qbZIP33-R	TAATGGGTTGCGTAGGGTGG
<i>GubZIP56</i>	qbZIP56-F	CAGCAAGCAAGGGAGAGGAA
<i>GubZIP56</i>	qbZIP56-R	TTGGTACCCTGTTGCTCCC
<i>Actin</i>	Actin-F	CTTGCTGGCCGTGATCTAAC
<i>Actin</i>	Actin-R	GCAACGGAATCTCTCAGCTC

## 结果及分析

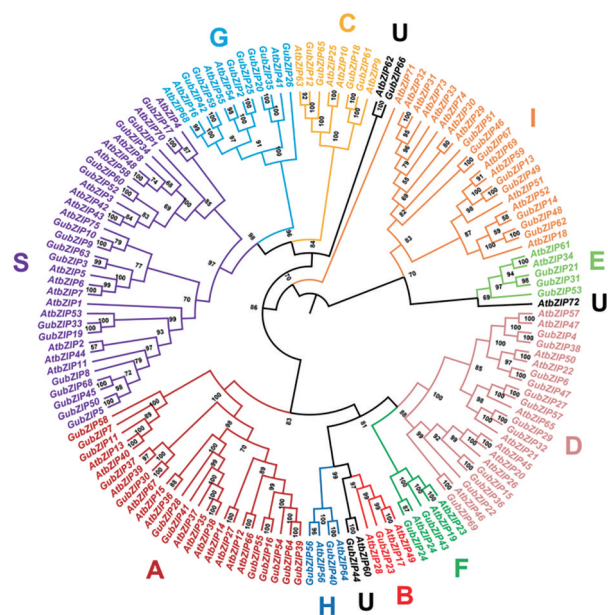
### 1 甘草 bZIP 全基因组鉴定及基因结构分析

本研究以 75 个拟南芥 bZIP 转录因子基因 *AtbZIPs* 为参考,对甘草 bZIP 家族基因组序列数据进行检测。基于甘草基因组和转录组数据,共鉴定到 69 个甘草 bZIP 转录因子家族基因,命名为 *GubZIP1-69*。根据它们与拟南芥 *AtbZIPs* 的同源相似性,分为 10 个亚家族,分别为 A~I 以及 S 亚家族,每个亚家族基因的结构和功能各不相同 (图 1)。其中 S 亚家族基因数目最多,为 16 个; B 亚家族数目最少,只有 1 个。 *GubZIP44* 和 *GubZIP66* 分别与拟南芥中未分组的 *AtbZIP60* 和 *AtbZIP62* 序列聚为一支,归为 U 亚家族。

对甘草 *GubZIPs* 基因的基因结构进行分析。结果显示,这些亚家族基因之间内含子的数量和长度上存在差异 (图 2)。 *GubZIPs* 基因的内含子数量为 0~15 个。 G 亚家族平均内含子数量最多, S 亚家族最少。 G 亚家族的 *GubZIP59* 基因含有的内含子数量最多,为 15 个。 S 亚家族中除了 *GubZIP45* 有 1 个内含子外,其他基因都没有内含子, F 亚家族的 *GubZIP24* 也没有内含子。同一亚家族的大多数成员具有相似的内含子/外显子结构,这与系统发育树中描述的进化关系一致。

### 2 *GubZIPs* 基因编码蛋白理化性质及 motif 结构分析

首先,对 69 个 *GubZIPs* 基因的物理特性进行了分析。结果显示,基因长度为 432~11 690 bp,蛋白质编



**Figure 1** Phylogenetic relationships of bZIP genes of *G. uralensis* and *A. thaliana*. A total of 69 *GubZIPs* from *G. uralensis* and 75 *AtbZIPs* from *A. thaliana* were included to construct maximum likelihood (ML) tree. Node labels represent values for bootstrap support

码区 CDS 长度为 396~2 367 bp, *GubZIPs* 蛋白序列包含 132~788 个氨基酸, 蛋白的分子质量 MW 为 15.68~85.39 kDa。理论等电点 PI 值在 4.97 到 10.18 之间, 平均为 7.26, 有 39 个蛋白的 PI 值小于 7.00, 30 个蛋白的 PI 值大于 7.00, 说明 *GubZIPs* 蛋白氨基酸酸碱性较为平衡。只有 *GubZIP24*、*GubZIP43* 和 *GubZIP56* 蛋白的不稳定指数 II 值小于 40, 为稳定蛋白, 其余为不稳定蛋白。脂肪族指数 AI 值在 46.20~92.93 之间。这些 *GubZIPs* 蛋白家族成员的总平均亲水性指数 GRAVY 均为负值, 均为亲水性蛋白 (表 2)。

利用 MEME 在线预测甘草 bZIP 基因家族的保守 motif, 结果预测了 15 个 motif, 分别为 motif1~motif15 (表 3)。除 *GubZIP20* 外, 所有的 bZIP 蛋白质都含有 motif1, 说明 motif1 在甘草 bZIP 蛋白质中分布最广, 保守性最强。不同 motif 在蛋白质序列中的分布可为研究不同亚家族基因功能差异作为参考, 一些 motif 只存在于特定的基因家族中, motif14 是 G 家族特有的, motif2、motif5、motif6、motif7 和 motif8 是 D 家族特有的, motif9 和 motif11 是 A 家族特有的, motif15 是 I 家族特有的, motif10 只存在于 I 家族和 E 家族, motif12 只存在于 G 家族、B 家族和 S 家族。同一个亚家族所含有的 motif 高度相似, 支持了它们的密切进化关系 (图 3)。

### 3 甘草 bZIP 转录组表达水平分析

为了研究 *GubZIPs* 基因在不同外源 ABA 胁迫下

的表达模式, 本研究测定了它们的转录组数据, 并计算其 FPKM 值。69 个 *GubZIPs* 基因在不同外源 ABA 胁迫下的相对表达量如图 4 所示。有 30 个 *GubZIPs* 基因表达量相比于对照组在所有条件下均升高, 其中 *GubZIP1*、*GubZIP5*、*GubZIP8*、*GubZIP30*、*GubZIP33* 和 *GubZIP56* 这 6 个基因表达量是对照组的至少 3 倍, 说明这些基因对 ABA 胁迫更敏感, 可能参与了 ABA 信号通路的调控, 可作为候选基因继续研究。此外, *GubZIP26*、*GubZIP45*、*GubZIP48*、*GubZIP53* 和 *GubZIP55* 基因表达量相比于对照组在所有条件下均下降。*GubZIP54* 在所有条件下均检测不到或没有表达。

### 4 候选 *GubZIPs* 基因编码蛋白结构分析

应用 DNASTar Protean 软件提供的 Garnier-Robson 法预测 *GubZIP1*、*GubZIP5*、*GubZIP8*、*GubZIP30*、*GubZIP33* 和 *GubZIP56* 蛋白的二级结构, 二级结构以  $\alpha$  螺旋为主, 除 *GubZIP33* 没有  $\beta$  折叠外, 都伴有  $\beta$  折叠、转角 (turn)、无规则卷曲 (coil) 结构。应用 SWISS-MODLE 同源建模预测蛋白三级结构, 结果显示 *GubZIP1* 和 *GubZIP30* 蛋白为同源二聚体结构, 可以与镁离子结合; *GubZIP8* 和 *GubZIP33* 蛋白为异源二聚体结构, 可以与鸟苷二磷酸、鸟苷三磷酸和镁离子结合; *GubZIP56* 蛋白为单体结构, 可以与锌离子结合; *GubZIP5* 蛋白为同源二聚体结构 (图 5)。

不同结构域组合所产生的蛋白质本质上是不同的, 蛋白质结构域的识别对于分析蛋白质功能尤为重要。图 6 列出了 *GubZIP1*、*GubZIP5*、*GubZIP8*、*GubZIP30*、*GubZIP33* 和 *GubZIP56* 的蛋白结构域。结果显示所有的候选基因都含有 bZIP\_1 结构域, *GubZIP56* 除了含有 bZIP\_1 结构域还含有锌指蛋白结构域 (zf\_UDP)。

### 5 外源 ABA 胁迫下候选 *GubZIPs* 基因的表达模式分析

转录组数据结果表明, 不同浓度的外源 ABA 浸泡甘草根时, *GubZIP1*、*GubZIP5*、*GubZIP8*、*GubZIP30*、*GubZIP33* 和 *GubZIP56* 基因优先表达, 说明这些基因可能参与了 ABA 信号通路的调控。为进一步验证这些基因的表达模式, 分别用 0、25、50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 ABA 对两年生甘草的根部进行浸泡处理 3、6 和 12 h 后, 采用 qRT-PCR 检测 *GubZIP1*、*GubZIP5*、*GubZIP8*、*GubZIP30*、*GubZIP33* 和 *GubZIP56* 基因的表达情况 (图 7)。结果显示这些基因的表达模式与 ABA 的浓度相关, 在 0 和 25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度 ABA 处理下表达模式相同, 除了 *GubZIP5* 和 *GubZIP30* 在 0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度 ABA 处理下相对表达量变化不显著外, 其他基因相对表达量均在处理后 3 h 显著上升, 6 h 之后逐渐下降, 12 h 后基因相对表达量较 0 h 均显著下降。在 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度 ABA 处理下, 基因的表达模式与 0 和 25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度 ABA 处理下

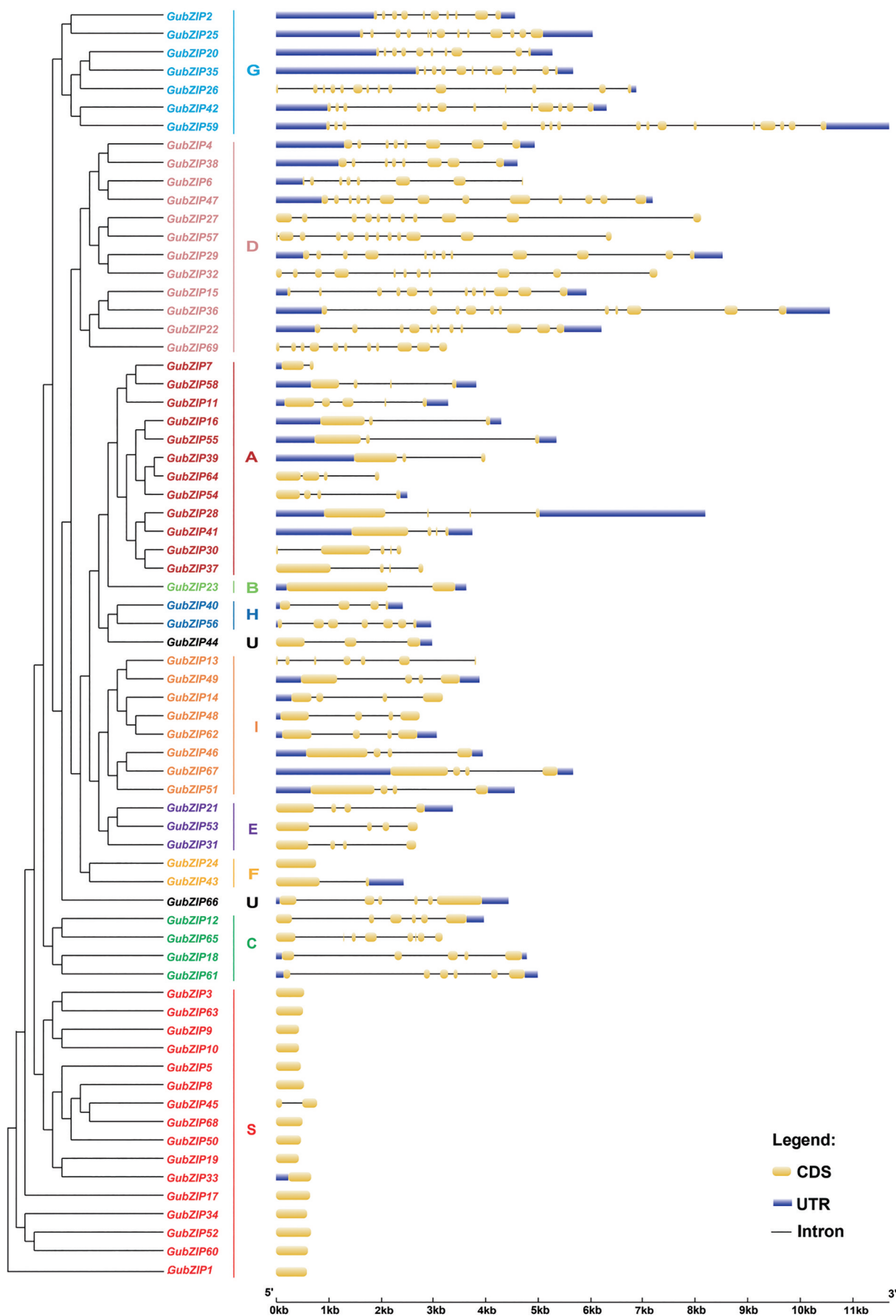


Figure 2 Exon-intron structure of *GubZIPs* genes based on their phylogenetic relationships

**Table 2** List of *GubZIPs* genes and their basic characterizations. CDS: Coding sequence; AA: Amino acids; MW: Molecular weight; PI: Theoretical pI; II: Instability index; AI: Aliphatic index; GRAVY: Grand average of hydropathicity

Gene name	Gene /bp	CDS /bp	AA size	MW /kDa	PI	II	AI	GRAVY	Gene name	Gene /bp	CDS /bp	AA size	MW /kDa	PI	II	AI	GRAVY
<i>GubZIP1</i>	591	591	196	22.49	6.55	56.12	76.07	-0.687	<i>GubZIP36</i>	10560	1452	483	53.54	5.93	55.30	76.81	-0.578
<i>GubZIP2</i>	4555	996	331	35.30	9.07	50.86	48.94	-0.735	<i>GubZIP37</i>	2806	1236	411	45.14	9.28	59.35	62.82	-0.857
<i>GubZIP3</i>	534	534	177	20.99	9.63	67.25	58.42	-1.136	<i>GubZIP38</i>	4603	1083	360	41.15	6.48	52.51	80.81	-0.421
<i>GubZIP4</i>	4931	1089	362	41.20	6.27	57.73	80.11	-0.488	<i>GubZIP39</i>	3991	975	324	35.94	8.50	59.78	67.44	-0.810
<i>GubZIP5</i>	471	471	156	17.38	5.90	50.70	71.41	-0.612	<i>GubZIP40</i>	2415	609	202	22.82	9.69	54.95	51.14	-1.259
<i>GubZIP6</i>	4707	831	276	31.00	5.40	60.86	92.93	-0.393	<i>GubZIP41</i>	3741	1248	415	45.34	9.79	50.55	61.83	-0.832
<i>GubZIP7</i>	715	495	164	18.44	9.09	66.27	71.52	-0.940	<i>GubZIP42</i>	6302	1239	412	44.11	5.78	57.17	53.30	-0.902
<i>GubZIP8</i>	531	531	176	19.64	5.37	76.73	58.75	-0.706	<i>GubZIP43</i>	2430	897	298	32.66	5.89	38.23	69.73	-0.577
<i>GubZIP9</i>	435	435	144	16.51	6.83	73.60	81.94	-0.678	<i>GubZIP44</i>	2974	1017	338	37.90	5.03	60.28	83.96	-0.372
<i>GubZIP10</i>	435	435	144	16.89	9.13	66.40	83.26	-0.756	<i>GubZIP45</i>	781	396	132	15.68	10.16	61.21	84.92	-0.559
<i>GubZIP11</i>	3281	1044	347	38.51	7.90	54.06	77.90	-0.329	<i>GubZIP46</i>	3941	1674	557	61.74	6.69	68.37	52.39	-1.009
<i>GubZIP12</i>	3962	1215	404	43.86	6.43	61.02	66.86	-0.683	<i>GubZIP47</i>	7179	2001	666	76.37	8.77	46.34	82.66	-0.567
<i>GubZIP13</i>	3812	594	197	22.94	10.18	55.48	83.25	-0.652	<i>GubZIP48</i>	2737	1131	376	40.44	6.19	54.69	62.87	-0.717
<i>GubZIP14</i>	3180	981	326	36.25	6.10	59.36	69.23	-0.715	<i>GubZIP49</i>	3880	1275	424	46.23	5.91	58.88	57.85	-0.794
<i>GubZIP15</i>	5918	1419	472	52.39	8.30	57.34	78.60	-0.511	<i>GubZIP50</i>	474	474	157	17.65	6.92	52.81	83.82	-0.499
<i>GubZIP16</i>	4291	1005	334	36.54	7.08	48.12	65.69	-0.776	<i>GubZIP51</i>	4548	1671	556	60.84	6.48	58.75	58.83	-0.837
<i>GubZIP17</i>	648	648	215	24.40	6.89	62.61	68.98	-0.989	<i>GubZIP52</i>	666	666	221	25.65	5.97	70.18	67.47	-0.985
<i>GubZIP18</i>	4778	963	320	33.79	6.70	47.16	63.09	-0.560	<i>GubZIP53</i>	2699	1038	345	38.40	5.87	69.00	69.65	-0.741
<i>GubZIP19</i>	432	432	143	16.27	9.00	52.09	77.83	-0.683	<i>GubZIP54</i>	2501	738	245	28.15	10.16	44.91	61.67	-1.335
<i>GubZIP20</i>	5269	912	303	31.92	4.97	59.28	46.20	-0.768	<i>GubZIP55</i>	5344	1038	345	37.71	7.15	59.05	62.20	-0.810
<i>GubZIP21</i>	3368	1107	368	42.38	6.14	67.61	60.16	-1.183	<i>GubZIP56</i>	2955	987	328	35.90	6.34	39.51	53.54	-1.107
<i>GubZIP22</i>	6203	1392	463	51.14	8.53	56.99	71.97	-0.616	<i>GubZIP57</i>	6397	1530	509	57.09	8.88	59.87	73.26	-0.649
<i>GubZIP23</i>	3626	2367	788	85.39	5.74	49.41	62.98	-0.627	<i>GubZIP58</i>	3817	726	241	27.07	7.80	67.50	75.27	-0.868
<i>GubZIP24</i>	762	762	253	27.94	7.12	27.75	54.39	-0.803	<i>GubZIP59</i>	11690	1545	514	54.98	5.91	54.52	53.75	-0.818
<i>GubZIP25</i>	6036	1308	435	46.64	6.82	52.39	58.39	-0.830	<i>GubZIP60</i>	606	606	201	23.15	5.97	77.57	68.36	-0.885
<i>GubZIP26</i>	6867	1185	394	44.90	6.85	57.73	63.17	-0.911	<i>GubZIP61</i>	4988	900	299	32.85	5.11	46.45	68.16	-0.656
<i>GubZIP27</i>	8104	1584	527	58.76	6.29	66.54	72.47	-0.623	<i>GubZIP62</i>	3062	1149	382	41.10	5.96	46.34	57.30	-0.769
<i>GubZIP28</i>	8182	1305	434	46.71	9.42	43.15	60.94	-0.680	<i>GubZIP63</i>	513	513	170	19.57	9.12	69.61	66.59	-0.712
<i>GubZIP29</i>	8515	1515	504	55.97	6.33	49.14	75.89	-0.497	<i>GubZIP64</i>	1965	942	313	34.83	6.62	49.53	69.17	-0.794
<i>GubZIP30</i>	2386	1161	386	42.79	9.43	58.25	72.05	-0.721	<i>GubZIP65</i>	3175	1071	356	39.62	5.51	58.25	64.94	-0.265
<i>GubZIP31</i>	2670	963	320	36.13	6.14	66.27	54.94	-0.977	<i>GubZIP66</i>	4432	1602	533	59.57	8.61	63.40	62.80	-0.809
<i>GubZIP32</i>	7271	1356	451	49.38	8.78	52.14	77.69	-0.495	<i>GubZIP67</i>	5662	1605	534	59.10	7.03	72.28	67.17	-0.759
<i>GubZIP33</i>	669	438	145	16.41	7.87	54.46	86.90	-0.632	<i>GubZIP68</i>	504	504	167	18.85	9.37	64.14	60.24	-0.985
<i>GubZIP34</i>	591	591	196	22.51	5.65	61.84	73.11	-0.734	<i>GubZIP69</i>	3259	1374	457	50.66	6.47	43.47	79.02	-0.482
<i>GubZIP35</i>	5663	1029	342	36.26	7.68	52.18	52.31	-0.830									

**Table 3** The protein motifs and its composition of *GubZIP* of *G. uralensis*

Motif	Width	Multilevel consensus sequence	E value
1	29	EKRQRRMLSNRESARRSRLRKQAYVQELE	$2.5 \times 10^{-990}$
2	50	VDGILAHYDELFRKGLIAAKADVHLLSGMWKTPAERCFLWIGGFRPSEL	$2.8 \times 10^{-334}$
3	40	RKVZTLQNTENTLSAZLTKLQREYKLSSENNELKLRLZA	$3.5 \times 10^{-151}$
4	21	RQPALGELTLEEFVFLKLGALS	$4.3 \times 10^{-146}$
5	49	LKJJVPQJEPLTEQQJLGIYNLQSSQAEDALSQGMELQQSLSDTJA	$8.3 \times 10^{-195}$
6	41	VNSGAAAFDVEYARWLEEQNRQINELRAAVNSHASDTELRL	$2.7 \times 10^{-155}$
7	41	ANYMGQMAMAMGKLGTLGFRVQADNLRQQTQQMHRILTT	$5.0 \times 10^{-127}$
8	21	SRLKLTQLEQLQRARQQGLF	$8.3 \times 10^{-87}$
9	26	LQRQSLTLPGALSCKKTVDEVWRDIQ	$4.7 \times 10^{-76}$
10	28	MEQQAQLKDALNEALKKEVZRLRVATGZ	$5.9 \times 10^{-66}$
11	20	KPLGSMNLDELLKNIWTAE	$2.0 \times 10^{-56}$
12	21	PPPPHGFMASSPTPHPYMWGV	$1.7 \times 10^{-50}$
13	20	AEVSRLEENEELRQRLELL	$2.6 \times 10^{-54}$
14	29	PPPPPPYAMYPHGGIYAHPSPIGSSPF	$6.3 \times 10^{-45}$
15	27	SGSGEFSEEAKKAMPPDKLAEJALID	$9.3 \times 10^{-32}$

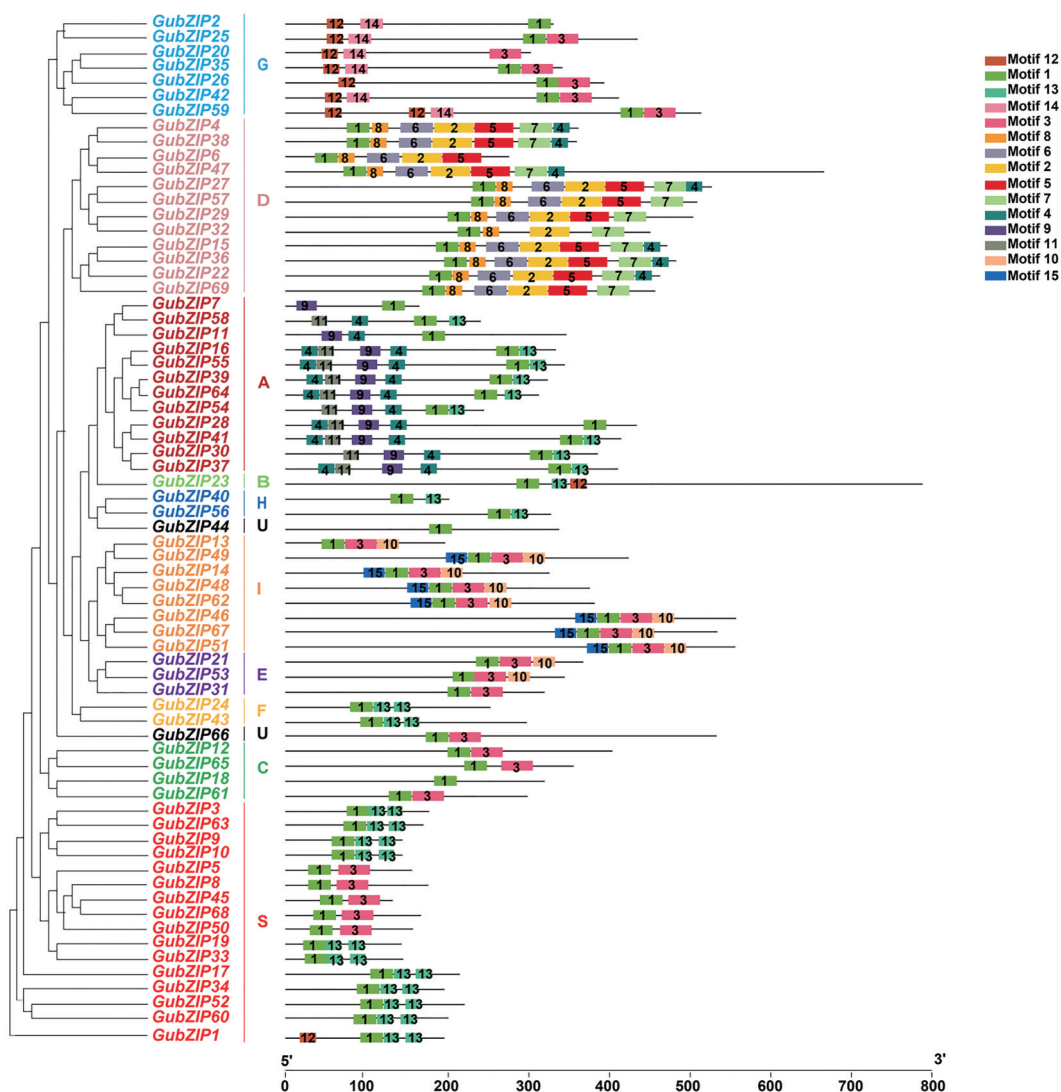


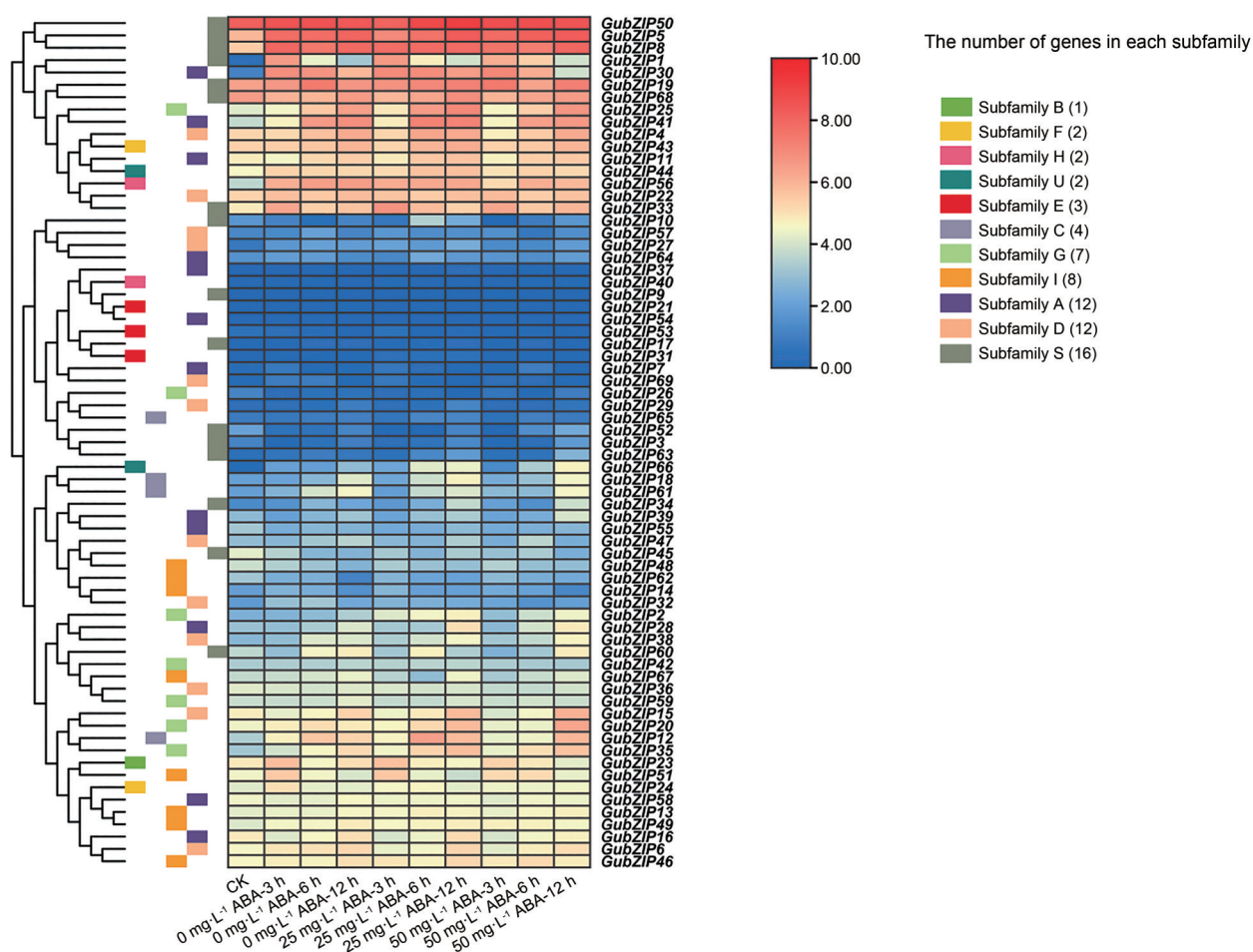
Figure 3 Classification of *G. uralensis* bZIP family and converted motifs

相反, 基因相对表达量均在处理后 3 h 下降, 6 h 之后逐渐上升, 除了 *GubZIP8*, 12 h 后基因相对表达量较 0 h 均显著上升。

### 讨论

ABA 信号调控途径是一个复杂的生物学过程, 需要多种信号因子、转录因子和功能基因的参与, 其过程大致如下: ABA 可与其受体 PYR/PYL/RCAR (pyrabactin resistance/PYR-like/regulatory components of ABA receptors, PYLs) 蛋白家族结合<sup>[30]</sup>。ABA 的共受体 A 类型的蛋白磷酸酶 2C (PP2Cs) 如 ABI1、ABI2、HAB1 和 PP2CA 可使 PYL 与 ABA 的亲和力增加近 100 倍<sup>[31]</sup>。ABA 进入 PYL 的中央疏水区域, 诱导疏水区域处于关闭状态, 并创建一个 PP2Cs 结合表面<sup>[32]</sup>。在 PYL-ABA-PP2C 复合物的里面, PP2C 中一个色氨酸残基插入到 ABA 结合区域, 将 ABA 锁定在该区域, 复合物中 PP2C

的蛋白磷酸酶活性被 ABA-PYL 复合体所抑制<sup>[30]</sup>。ABA-PYL 对 PP2Cs 的结合和抑制导致蔗糖非发酵型蛋白激酶 SnRK2s (sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2s) 从 PP2Cs 的结合中释放出来。释放的 SnRK2s 通过自身磷酸化激活, 并磷酸化许多下游的效应蛋白包括转录因子、SLAC1 (slow anion channel-associated 1)、RbohD/F (respiratory burst oxidase homologs), 以此来实现信号的传递以及细胞对 ABA 的响应<sup>[33]</sup>。ABA 激活的 SnRK2s 也可以使质膜 NADPH 氧化酶 RbohF 磷酸化, 在质体外空间产生  $O_2^{\cdot -}$ ,  $O_2^{\cdot -}$  随后形成  $H_2O_2$ , 作为信号分子调节包括气孔关闭在内的各种 ABA 应答过程<sup>[34]</sup>。 $H_2O_2$  也可以调节  $Ca^{2+}$  信号从而影响 ABA 的应答<sup>[35]</sup>。除了诱导  $H_2O_2$  和  $Ca^{2+}$  信号, ABA 也引发一氧化氮 (NO) 和磷脂分子如 PA (磷脂酸) 的合成<sup>[36]</sup>, NO 抑制 SnRK2s 和 PYLs, PA 调节 Rboh 蛋白活性<sup>[36]</sup>, 继而进行信号转导, 通过调节蛋白与转录因子等特异结合, 激活干旱胁



**Figure 4** Expression profiles analysis of *GubZIPs* genes under various ABA stresses at different times. CK indicated the plants without soaking and was used as control. The 3, 6 and 12 h labels indicated the time after treatment. The 0, 25, and 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  labels indicated the different ABA concentrations. The bar on the top right corner represented the FPKM values, and different colors denote various expression levels

迫下ABA依赖基因的表达,使植物对干旱胁迫做出响应<sup>[37,38]</sup>。甘蓝型油菜中参与干旱胁迫下的ABA信号转导途径的相关转录因子BnMYC2、BnNAC485<sup>[39]</sup>和蛋白激酶BnCIPK6、BnCBL1和BnGA1<sup>[40,41]</sup>基因也被鉴定或分离出来,这些基因在ABA的处理下其表达会上调。

bZIP转录因子是普遍存在于植物中的一类转录因子,本研究以75个拟南芥*AtbZIPs*基因为参考,基于甘草基因组和转录组数据,共鉴定到69个甘草bZIP转录因子家族基因,与拟南芥*AtbZIPs*序列构建系统发育树,根据同源相似性,将甘草bZIP转录因子(*GubZIPs*)分为A~I以及S这10个亚家族。拟南芥*AtbZIPs*中有3个基因*AtbZIP60*、*AtbZIP62*和*AtbZIP72*并未分到这10个亚家族中,甘草的*GubZIP44*和*GubZIP66*分别与拟南芥中的*AtbZIP60*和*AtbZIP62*序列聚为一支,将其归为U亚家族。每个亚家族基因都在植物的生长发育过程中起到重要的作用,A亚家族主要参与ABA和各

种胁迫信号;B和F亚家族在盐胁迫中起到重要的作用;C亚家族较为保守,可以响应环境胁迫和病原侵染;D亚家族的作用体现在抗击病原和植物发育两个方面;E亚家族与花粉壁的形成有关,且调控花粉发育的几个代谢途径;G和H亚家族主要参与光信号的感应和传导;I和S亚家族都参与微管系统的调节,但S亚家族功能更为广泛,受干旱、低温、无氧和机械损伤处理激活,还参与花发育等<sup>[42]</sup>。其中,A亚家族bZIP基因的信号传递主要依赖于ABA信号途径,如拟南芥A亚族的AREB/ABF(ABA-response element binding protein/ABA-responsive element binding factor)类bZIP转录因子,可激活非生物逆境胁迫下的ABA依赖基因的表达<sup>[43]</sup>。其中,ABF1主要参与低温、ABA胁迫应答,ABF2与ABF4主要参与干旱、高盐、高温及氧化胁迫应答,而ABF3则受到ABA、低温胁迫的诱导<sup>[43-45]</sup>。

有研究表明bZIP转录因子对盐和干旱胁迫有很

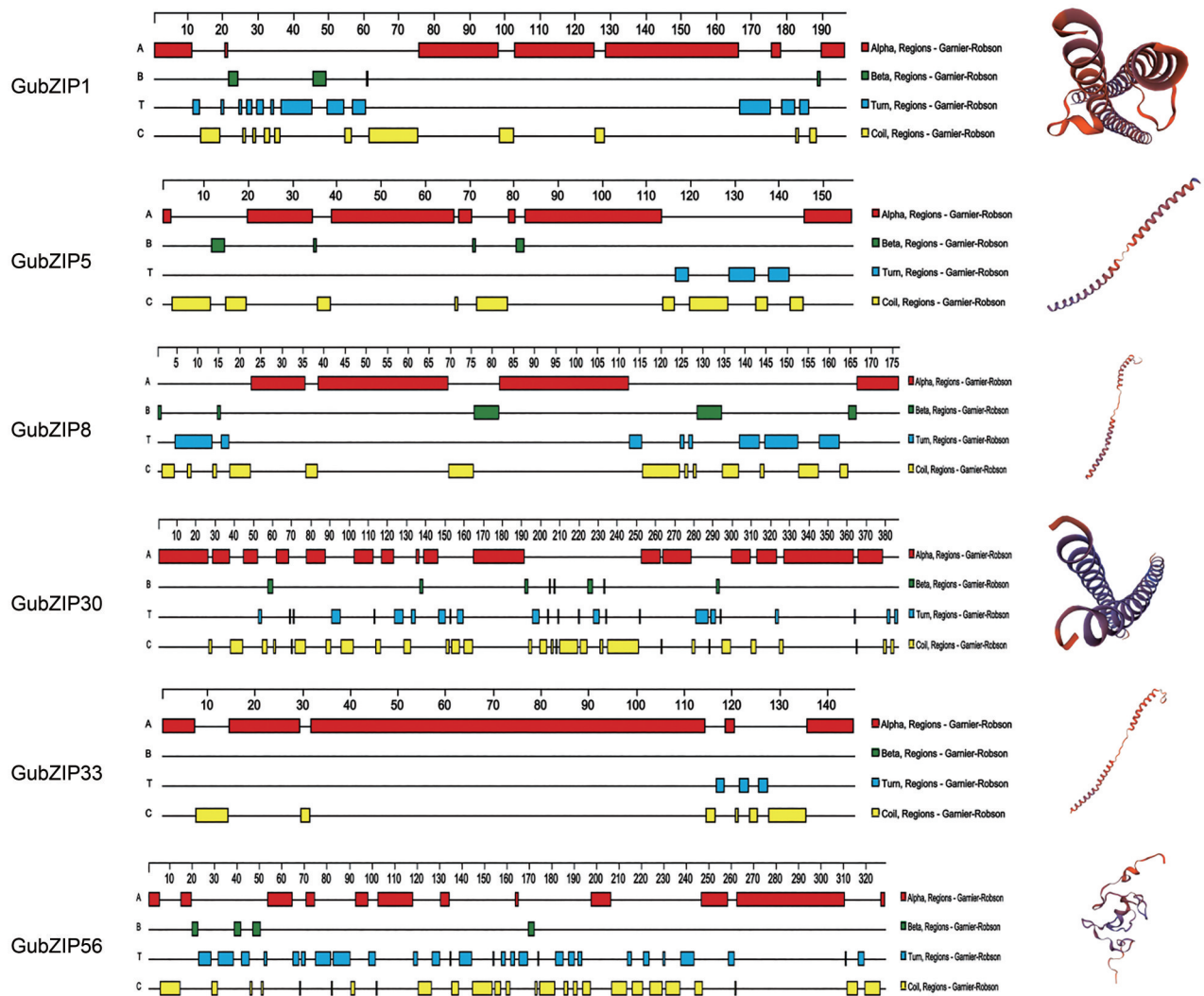


Figure 5 Secondary and tertiary structures of the encoded proteins

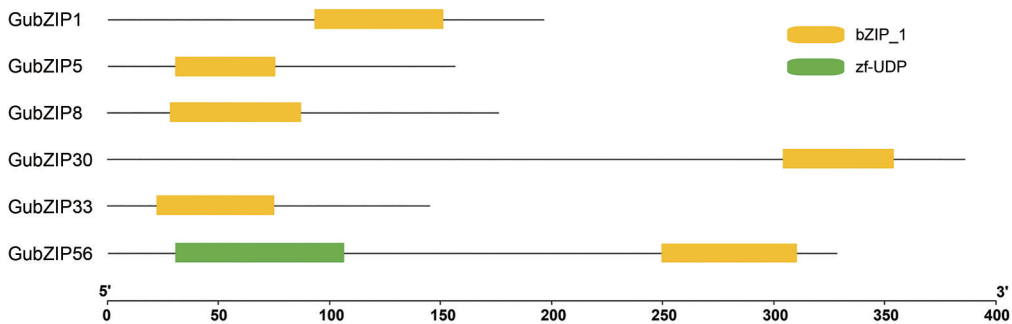
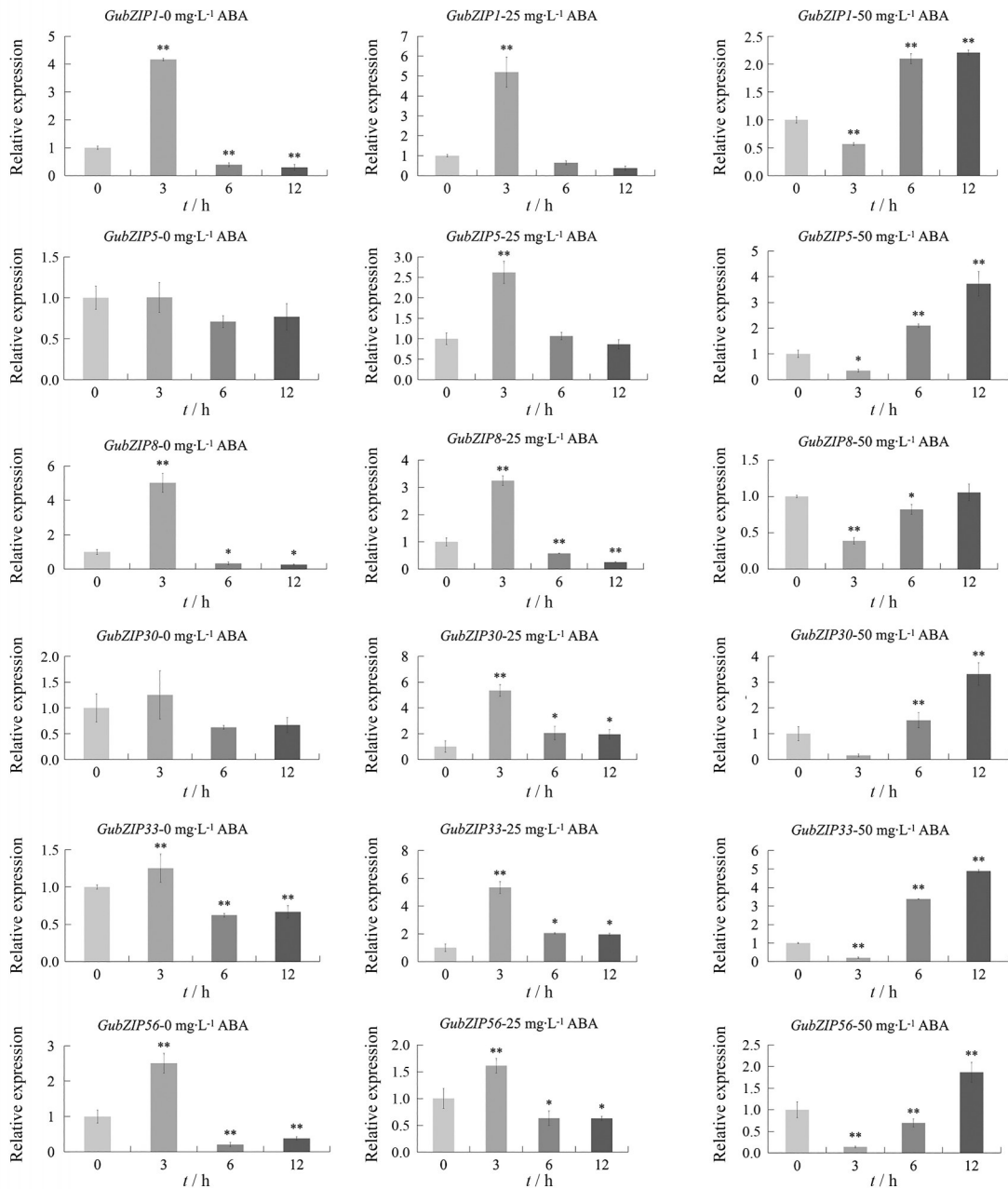


Figure 6 Protein functional domains of *GubZIPs* genes

强的响应功能, 其基因的高表达分别使拟南芥<sup>[23]</sup>、棉花<sup>[46]</sup>、水稻<sup>[47]</sup>和玉米<sup>[48]</sup>具有良好的耐旱性和耐盐性。此外, bZIP 转录因子能够通过参与 ABA 信号转导通路来调控次生代谢产物的合成。植物次生代谢产物种类繁多、结构迥异, 一般可分为萜类、酚类 (如黄酮类) 和含氮化合物 (如生物碱等) 3 大类, bZIP 转录因子对这 3 类化合物生物合成的调控均有报道<sup>[13]</sup>。Zhang 等<sup>[14]</sup>

首先从黄花蒿腺毛高表达的 64 个 bZIP 转录因子中鉴定出 6 个 A 亚家族成员, 并将这 6 个转录因子及青蒿素合成途径的关键酶基因 *ADS* 和 *CYP71AV1* 转化烟草叶片, 双荧光素酶检测结果预测 AabZIP1 可激活这 2 个关键酶基因的启动子, 酵母单杂交实验结果显示 AabZIP1 可与 *ADS* 和 *CYP71AV1* 基因启动子元件 ABRE 直接结合, 并激活 2 个关键酶基因的表达; 之后构建



**Figure 7** Expression patterns of *GubZIPs* genes in response to ABA. The relative expression of *GubZIPs* was examined after treatments with diverse concentrations of exogenous ABA for the indicated period. The *actin* gene in *G. uralensis* was used as internal control. The gene expression value at 0 h was set as 1. The values are expressed as means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs expression value at 0 h

黄花蒿 AabZIP1 过表达载体转化黄花蒿植株, 可使青蒿素含量明显增加, 说明转录因子 AabZIP1 正向调控青蒿素的合成; 最后又通过实验阐明了 ABA 介导的青蒿素生物合成机制。Os bZIP23 转录因子在水稻抗旱性中起重要作用, 有研究发现 Os bZIP23 可以正向调控 *OsPP2C49*, 而在水稻中过表达 *OsPP2C49* 会导致 ABA 反应敏感性显著降低和快速脱水, ABA 生物合成的关键基因 *OsNCED4* 也受到 Os bZIP23 的正调控, 表明 Os bZIP23 在水稻 ABA 信号转导、生物合成和抗旱性

中起中枢调节作用<sup>[49]</sup>。Okada 等<sup>[50]</sup>构建了水稻 bZIP 转录因子 *OsTGAPI* 基因过表达载体转化水稻, 使萜类植保素生物合成途径中的 5 个关键酶基因表达量大幅提高, 萜类植保素含量明显增加; 当敲除 *OsTGAPI* 基因时, 上述 5 个关键酶基因几乎不表达, 萜类植保素的合成受到显著抑制, 说明 *OsTGAPI* 是萜类植保素生物合成途径的核心调控因子。覆盆子果实的颜色有红色、金色和黑色, 黄酮类次生代谢产物花青素是影响其果实颜色的重要因素, 研究表明 bZIP 转录因子可影响红色覆盆

子中花青素的合成<sup>[51]</sup>。柿子中MYB转录因子DkMyb4可正向调控原花青素合成途径基因的表达,进而影响其含量<sup>[52]</sup>。Akagi等<sup>[53]</sup>从柿子果实中分离出一个高表达的bZIP转录因子基因*DkbZIP5*,构建过表达载体转化柿子叶片,检测发现*DkMyb4*基因表达量增加,愈伤组织中积累大量的原花青素。bZIP调控次生代谢产物合成的机制较为复杂,有1个转录因子调控一种次生代谢产物生物合成的情况<sup>[16]</sup>,也有2个或2种不同转录因子共同调节的现象<sup>[53,54]</sup>。Zhang等<sup>[55]</sup>发现丹参bZIP基因家族中的*SmbZIP7*和*SmbZIP20*可能参与丹参酮生物合成的调控。刘宝玲等<sup>[56]</sup>发现在干旱和盐胁迫条件下,多数谷子*SibZIPs*基因不同程度地被诱导表达,预示着部分*SibZIP*成员在谷子干旱和盐胁迫响应中起重要作用,共表达关联性分析进一步揭示19个谷子*SibZIP*转录因子可通过与蛋白激酶或NPR1相关调节蛋白等互作介导谷子胁迫响应。bZIP转录因子识别核心序列为ACGT的顺式作用元件。ABRE (ABA-responsive element) 在依赖ABA的基因表达中作为顺式作用元件,在很多ABA响应基因中均存在,能被很多bZIP类转录因子识别,调控逆境诱导表达基因的表达<sup>[57]</sup>。Nieva等<sup>[58]</sup>研究发现玉米的两个bZIP转录因子EmBP-2和ZmBZ-1都是与ABREs结合并参与了ABA诱导基因*rab28*的表达,它们的活性受ABA和磷酸化的调节。Dröge-Laser等<sup>[59]</sup>用无毒的丁香假单胞菌处理大豆bZIP转录因子G/HBF-1,其被快速磷酸化,并与关键酶*CHS*基因启动子区顺式作用元件H-box和G-box相结合,激活*CHS*基因的表达,黄酮类植素的含量大幅增加。有的bZIP转录因子在化合物生物合成的过程中起到负调控作用。所有萜类吲哚生物碱的合成都起源于中心分子异胡豆苷,而异胡豆苷合酶(STR)是催化其生成的关键酶。Sibérial等<sup>[54]</sup>发现长春花bZIP转录因子CrGBF1和CrGBF2能特异性结合G-box区;将Crgbf1和Crgbf2融合基因转化长春花细胞,检测到STR启动子被显著抑制,说明GBF1和GBF2负调控关键酶STR基因的表达,减少萜类吲哚生物碱的合成与积累。植物次生代谢产物生物合成的途径烦琐,且受到多种酶催化,但转录因子可以激活多个次生代谢产物合成酶基因协同表达,从而有效调控次生代谢途径,因此寻找调控酶基因表达的转录因子对植物次生代谢研究有着重要的意义,已有越来越多的转录因子也在不同的药用植物中被鉴定<sup>[60-63]</sup>。

本研究基于不同浓度ABA处理的甘草转录组数据,计算了69个*GubZIPs*基因在不同外源ABA胁迫下的相对表达量,并以此筛选出6个可能参与ABA信号通路的调控的基因,即*GubZIP1*、*GubZIP5*、*GubZIP8*、

*GubZIP30*、*GubZIP33*和*GubZIP56*,作为候选基因继续研究。为验证候选基因的表达模式,采用qRT-PCR检测不同浓度ABA处理下基因的表达情况。本研究实验过程中将两年生甘草浸泡在ABA溶液中,与传统的甘草种植相比,实验过程中甘草根所处的环境主要为水,故设计0 mg·L<sup>-1</sup>的ABA处理作为参照。结果显示基因在25 mg·L<sup>-1</sup>浓度ABA处理下的表达模式与0 mg·L<sup>-1</sup>浓度ABA处理下相同,说明25 mg·L<sup>-1</sup>的ABA浓度过低,没有引起基因的表达发生变化,而在50 mg·L<sup>-1</sup>浓度ABA处理下的表达模式与0 mg·L<sup>-1</sup>浓度ABA处理下相比发生了明显的变化,说明这些基因的表达响应50 mg·L<sup>-1</sup>浓度的ABA。本研究不仅有利于对甘草bZIP转录因子分类、性质和结构的认识与了解,还为进一步开展甘草bZIP转录因子功能研究,阐明其调控机制奠定了基础。

**作者贡献:** 武立伟负责样品制备、实验操作、数据分析和论文撰写;徐志超负责研究课题总体设计生信分析和论文修改;王清负责实验操作;聂丽萍负责数据分析;崔英贤负责样品制备;王瑀负责提供实验材料;宋经元负责实验指导;姚辉负责研究课题总体设计、实验指导、论文修改及论文终稿审查。

**利益冲突:** 本文所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Li S, Xu L, Chen D, et al. Flora of China. Vol. 10 (Fabaceae) [M]. Beijing: Science Press, 2010.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- [3] Yang R, Wang L, Liu Y. Research progress on tissue culture of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2014, 45: 1796-1802.
- [4] Hawthorne S, Gallagher S. Effects of glycyrrhetic acid and liquorice extract on cell proliferation and prostate-specific antigen secretion in LNCaP prostate cancer cells [J]. J Pharm Pharmacol, 2008, 60: 661-666.
- [5] Ming LJ, Yin AC. Therapeutic effects of glycyrrhizic acid [J]. Nat Prod Commun, 2013, 8: 415-418.
- [6] Shin EM, Zhou HY, Guo LY, et al. Anti-inflammatory effects of glycyrol isolated from *Glycyrrhiza uralensis* in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8: 1524-1532.
- [7] Shin YW, Bae EA, Lee B, et al. *In vitro* and *in vivo* antiallergic effects of *Glycyrrhiza glabra* and its components [J]. Planta Med, 2007, 73: 257-261.
- [8] Ye X, Xue J, Xie X, et al. Effects of different disturbances on plant growth and content of main medicinal ingredients of rhizomatous clonal plant *Glycyrrhiza uralensis* in a natural popu-

- lation [J]. *Chin J Plant Ecol* (植物生态学报), 2020, 44: 951-961.
- [9] Huang M, Wang W, Wei S. Investigation on medicinal plant resources of *Glycyrrhiza uralensis* in China and chemical assessment of its underground part [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 947-952.
- [10] Wei S, Wang W, Wang J, et al. Preliminary study in glycyrrhizin content and its influencing factors of wild and cultivated in different region of China [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37: 1341-1345.
- [11] Zhang R, Wang X, Gao W. Regulation mechanism of plant hormones on secondary metabolites [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2020, 45: 4205-4210.
- [12] Qiao J, Luo Z, Li Y, et al. Effect of abscisic acid on accumulation of five active components in root of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Molecules*, 2017, 22: 1982.
- [13] Zhang Y, Xu Z, Ji A, et al. Regulation of secondary metabolite biosynthesis by bZIP transcription factors in plants [J]. *Plant Sci J* (植物科学学报), 2017, 35: 128-137.
- [14] Zhang F, Fu X, Lv Z, et al. A basic leucine zipper transcription factor, AabZIP1, connects abscisic acid signaling with artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Mol Plant*, 2015, 8: 163-175.
- [15] Collins-Silva J, Nural AT, Skaggs A, et al. Altered levels of the *Taraxacum kok-saghyz* (Russian dandelion) small rubber particle protein, TkSRPP3, result in qualitative and quantitative changes in rubber metabolism [J]. *Phytochemistry*, 2012, 79: 46-56.
- [16] Fricke J, Hillebrand A, Twyman RM, et al. Abscisic acid-dependent regulation of small rubber particle protein gene expression in *Taraxacum brevicorniculatum* is mediated by TbbZIP1 [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54: 448-464.
- [17] Hurst HC. Transcription factors. 1: bZIP proteins [J]. *Protein Profile*, 1994, 1: 123-168.
- [18] Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 106-111.
- [19] Johnson C, Boden E, Arias J. Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 1846-1858.
- [20] Zhang Y, Zheng S, Liu Z, et al. Both HY5 and HYH are necessary regulators for low temperature-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* seedlings [J]. *J Plant Physiol*, 2011, 168: 367-374.
- [21] Wei K, Chen J, Wang Y, et al. Genome-wide analysis of bZIP-encoding genes in maize [J]. *DNA Res*, 2012, 19: 463-476.
- [22] Nijhawan A, Jain M, Tyagi AK, et al. Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146: 333-350.
- [23] Liao Y, Zou HF, Wei W, et al. Soybean GmbZIP44, GmbZIP62 and GmbZIP78 genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2008, 228: 225-240.
- [24] Zhao P, Ye M, Wang R, et al. Systematic identification and functional analysis of potato (*Solanum tuberosum* L.) bZIP transcription factors and overexpression of potato bZIP transcription factor StbZIP-65 enhances salt tolerance [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 161: 155-167.
- [25] Li Z, Chao J, Li X, et al. Systematic analysis of the bZIP family in tobacco and functional characterization of NtbZIP62 involvement in salt stress [J]. *Agronomy*, 2021, 11: 148.
- [26] Liu S, Qin B, Fang Q, et al. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of the bZIP gene family in alfalfa (*Medicago Sativa*) [J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2021, 35: 905-916.
- [27] Shearer HL, Cheng YT, Wang L, et al. Arabidopsis clade I TGA transcription factors regulate plant defenses in an NPR1-independent fashion [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2012, 25: 1459-1468.
- [28] Hossain MA, Cho JI, Han M, et al. The ABRE-binding bZIP transcription factor OsABF2 is a positive regulator of abiotic stress and ABA signaling in rice [J]. *J Plant Physiol*, 2010, 167: 1512-1520.
- [29] Mochida K, Sakurai T, Seki H, et al. Draft genome assembly and annotation of *Glycyrrhiza uralensis*, a medicinal legume [J]. *Plant J*, 2017, 89: 181-194.
- [30] Park SY, Fung P, Nishimura N, et al. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins [J]. *Science*, 2009, 324: 1068-1071.
- [31] Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, et al. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors [J]. *Science*, 2009, 324: 1064-1068.
- [32] Melcher K, Ng LM, Zhou XE, et al. A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors [J]. *Nature*, 2009, 462: 602-608.
- [33] Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, et al. *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signalling pathway [J]. *Nature*, 2009, 462: 660-664.
- [34] Sirichandra C, Gu D, Hu HC, et al. Phosphorylation of the *Arabidopsis* AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583: 2982-2986.
- [35] Hua D, Wang C, He J, et al. A plasma membrane receptor kinase, GHR1, mediates abscisic acid- and hydrogen peroxide-regulated stomatal movement in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2012, 24: 2546-2561.
- [36] Hou Q, Ufer G, Bartels D. Lipid signalling in plant responses to abiotic stress [J]. *Plant Cell Environ*, 2016, 39: 1029-1048.
- [37] Shulaev V, Cortes D, Miller G, et al. Metabolomics for plant stress response [J]. *Physiol Plant*, 2008, 132: 199-208.
- [38] Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK. Cell signaling during cold, drought, and salt stress [J]. *Plant Cell*, 2002, 14 Suppl (Suppl): S165-183.
- [39] Ying L, Chen H, Cai W. BnNAC485 is involved in abiotic stress responses and flowering time in *Brassica napus* [J]. *Plant Physiol*

- Biochem, 2014, 79: 77-87.
- [40] Chen L, Ren F, Zhou L, et al. The *Brassica napus* calcineurin B-Like 1/CBL-interacting protein kinase 6 (CBL1/CIPK6) component is involved in the plant response to abiotic stress and ABA signalling [J]. J Exp Bot, 2012, 63: 6211-6222.
- [41] Gao Y, Li T, Liu Y, et al. Isolation and characterization of gene encoding G protein  $\alpha$  subunit protein responsive to plant hormones and abiotic stresses in *Brassica napus* [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37: 3957-3965.
- [42] Qi X, Wang X. Analysis of bZIP transcription factor family in grape and the response to sugar and ABA signals [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2021. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210602.1613.012.html>.
- [43] Bai Y, Zhu W, Hu X, et al. Genome-wide analysis of the bZIP gene family identifies two ABI5-Like bZIP transcription factors, BrABI5a and BrABI5b, as positive modulators of ABA signalling in Chinese cabbage [J]. PLoS One, 2016, 11: e0158966.
- [44] Noman A, Liu Z, Aqeel M, et al. Basic leucine zipper domain transcription factors: the vanguards in plant immunity [J]. Biotechnol Lett, 2017, 39: 1779-1791.
- [45] Uno Y, Furihata T, Abe H, et al. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97: 11632-11637.
- [46] Liang C, Meng Z, Meng Z, et al. GhABF2, a bZIP transcription factor, confers drought and salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Sci Rep, 2016, 6: 35040.
- [47] Liu C, Mao B, Ou S, et al. OsbZIP71, a bZIP transcription factor, confers salinity and drought tolerance in rice [J]. Plant Mol Biol, 2014, 84: 19-36.
- [48] Ying S, Zhang DF, Fu J, et al. Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor, ZmbZIP72, confers drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Planta, 2012, 235: 253-266.
- [49] Zong W, Tang N, Yang J, et al. Feedback regulation of ABA signaling and biosynthesis by a bZIP transcription factor targets drought-resistance-related genes [J]. Plant Physiol, 2016, 171: 2810-2825.
- [50] Okada A, Okada K, Miyamoto K, et al. OsTGAP1, a bZIP transcription factor, coordinately regulates the inductive production of diterpenoid phytoalexins in rice [J]. J Biol Chem, 2009, 284: 26510-26518.
- [51] McCallum S, Woodhead M, Hackett CA, et al. Genetic and environmental effects influencing fruit colour and QTL analysis in raspberry [J]. Theor Appl Genet, 2010, 121: 611-627.
- [52] Akagi T, Ikegami A, Tsujimoto T, et al. DkMyb4 is a Myb transcription factor involved in proanthocyanidin biosynthesis in persimmon fruit [J]. Plant Physiol, 2009, 151: 2028-2045.
- [53] Akagi T, Katayama-Ikegami A, Kobayashi S, et al. Seasonal abscisic acid signal and a basic leucine zipper transcription factor, DkbZIP5, regulate proanthocyanidin biosynthesis in persimmon fruit [J]. Plant Physiol, 2012, 158: 1089-1102.
- [54] Sibérl Y, Benhamron S, Memelink J, et al. Catharanthus roseus G-box binding factors 1 and 2 act as repressors of strictosidine synthase gene expression in cell cultures [J]. Plant Mol Biol, 2001, 45: 477-488.
- [55] 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.
- [56] Liu B, Zhang L, Sun Y, et al. Genome-wide characterization of bZIP transcription factors in foxtail millet and their expression profiles in response to drought and salt stresses [J]. Chin Bull Bot (植物学报), 2016, 51: 473-487.
- [57] Kim SY. The role of ABF family bZIP class transcription factors in stress response [J]. Physiol Plant, 2006, 126: 519-527.
- [58] Nieva C, Busk PK, Domínguez-Puigjaner E, et al. Isolation and functional characterisation of two new bZIP maize regulators of the ABA responsive gene rab28 [J]. Plant Mol Biol, 2005, 58: 899-914.
- [59] Dröge-Laser W, Kaiser A, Lindsay WP, et al. Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses [J]. EMBO J, 1997, 16: 726-738.
- [60] Li Y, Zhang N, Li H, et al. Cloning and expression characteristics of a transcription factor gene RpMYB4 in *Rheum palmatum* L. [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 1170-1177.
- [61] Zhan Z, Li X. Biosynthesis and transcriptional regulation of tanshinones and salvianolic acids [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 2110-2121.
- [62] Feng F, Lv R, Li Y, et al. Characterization and expression analysis of the transcription factor BcWRKY70 in *Bupleurum chinense* DC [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 3184-3189.
- [63] Xu J, Hu Z, He H, et al. Identification and expression analysis of the DaNAC transcription factor family in *Dipsacus asper* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 3325-3330.