南京农业大学学报 2026,49(4):768-778
Journal of Nanjing Agricultural University
http://nauxb.njau.edu.cn
DOI:10.7685/jnau.202506015

张雪梅,吴艳碧,揭彤,等. 生姜 *ZoNCED* 基因家族鉴定及表达分析[J]. 南京农业大学学报,2026,49(4):768-778.
Zhang X M, Wu Y B, Jie T, et al. Identification and expression analysis of *ZoNCED* gene family in ginger[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2026, 49(4): 768-778.

生姜 *ZoNCED* 基因家族鉴定及表达分析

张雪梅*,吴艳碧,揭彤,刘德麒,周婷婷,刘奕清

(长江大学香辛园艺植物种质创新与利用湖北省重点实验室/园艺园林学院,湖北 荆州 434025)

摘要:[**目的**]本文旨在揭示生姜 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(NCED)基因家族的分子特征及非生物胁迫表达特性。[**方法**]基于生姜全基因组数据,筛选鉴定出 10 个具有典型 NCED 保守结构域的 *ZoNCED* 家族基因,并利用生物信息学系统分析其理化性质、基因结构、保守结构域、启动子顺式作用元件、染色体定位、共线性关系和蛋白互作网络;同时,结合转录组数据和 RT-qPCR 技术验证该家族基因在盐胁迫下的表达模式。[**结果**]*ZoNCED* 基因编码蛋白的氨基酸长度为 205~646 aa,相对分子质量为 23 190.73~72 379.95,等电点 5.64~8.98。系统进化分析将 *ZoNCED* 分为 4 个亚家族(Ⅰ—Ⅳ),分别包含 2、2、1 和 5 个成员。启动子区富集 ABRE、MYB/MYC 等与非生物胁迫响应密切相关的顺式作用元件。*ZoNCED* 家族成员分布于 7 条染色体上,共线性分析表明串联复制和片段复制是家族扩张的主要机制。蛋白互作网络预测显示,ZoNCED05 可能作为枢纽蛋白参与调控植物生长发育和逆境响应过程。转录因子调控网络分析鉴定出 MIKE_MADS、Dof、C2H2、HD-ZIP、MYB 和 G2-like 等可能是参与 ZoNCED 表达调控的关键转录因子。此外,表达谱分析发现,*ZoNCED01*、*ZoNCED07* 和 *ZoNCED08* 在盐胁迫下显著上调表达。[**结论**]本研究首次系统解析了生姜 *ZoNCED* 基因家族的分子特征,揭示了其在非生物响应中的功能多样性及调控网络,为生姜抗逆分子育种提供了重要理论依据和候选基因资源。

关键词:生姜;*NCED* 基因家族;生物信息学;盐胁迫;基因表达模式;调控网络
中图分类号:S632.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-2030(2026)04-0768-11

Identification and expression analysis of *ZoNCED* gene family in ginger

ZAHNG Xuemei*, WU Yanbi, JIE Tong, LIU Deqi, ZHOU Tingting, LIU Yiqing

(Hubei Key Laboratory of Spices & Horticultural Plant Germplasm Innovation & Utilization/
College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

Abstract: [**Objectives**] This study aimed to uncover the molecular characteristics of the ginger 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) gene family and its expression patterns in response to abiotic stress. [**Methods**] Ten *ZoNCED* gene family members harboring conserved NCED domains were screened and identified from the ginger whole-genome. Systematic analyses were conducted to investigate their physicochemical properties, gene structures, conserved domains, promoter *cis*-acting elements, chromosomal localization, collinearity relationships and protein-protein interaction networks. Meanwhile, transcriptome data and RT-qPCR technology were employed to verify the expression patterns of these genes under salt stress. [**Results**] The ZoNCED-encoded proteins exhibited amino acid lengths ranging from 205 to 646 aa, molecular weights from 23 190.73 to 72 379.95, and isoelectric points (pI) of 5.64-8.98. Phylogenetic analysis classified the *ZoNCED* genes into four subfamilies (Ⅰ-Ⅳ), containing 2, 2, 1 and 5 members, respectively. The promoter regions were enriched with stress-responsive *cis*-acting elements, such as ABRE and MYB/MYC, implicating their roles in abiotic stress responses. Chromosomal mapping indicated that *ZoNCED* genes were distributed across seven chromosomes, and collinearity analysis demonstrated that tandem duplication and segmental duplication were the primary mechanisms driving family expansion. Protein-protein interaction network predictions indicated that ZoNCED05 might function as a hub protein to regulate plant growth and stress responses. Transcription factor regulatory network analysis identified potential key regulators of ZoNCED expression, including MIKE_MADS, Dof, C2H2, HD-ZIP, MYB, and G2-like families. Furthermore, expression profiling demonstrated that *ZoNCED01*, *ZoNCED07* and *ZoNCED08* significantly upregulated under salt stress. [**Conclusions**] This study provided the first comprehensive analysis of the *ZoNCED* gene family in ginger, uncovering its functional diversity and regulatory networks in abiotic stress responses, thereby offering valuable theoretical insights and candidate gene resources for molecular breeding of stress-resistant ginger varieties.

Keywords: *Zingiber officinale* Roscoe; *NCED* gene family; bioinformatics; salt stress; gene expression pattern; regulation network

收稿日期:2025-06-12
基金项目:湖北省教育厅科学研究计划青年人才项目(Q20231305);湖北省国际合作项目(2024EHA011);长江大学湿地生态与农业利用教育部工程研究中心开放基金项目(KFG202422)
作者简介:张雪梅,讲师,主要从事园艺植物抗性分子机制研究,E-mail:echozhang@yangtzeu.edu.cn。*通信作者。

生姜(*Zingiber officinale* Roscoe)作为重要的“药食同源”经济作物,在全球农业生产和食品医药领域具有重要价值[1]。然而,其生长发育过程极易受到干旱、盐碱和高温等非生物胁迫的影响,导致生姜产量和品质严重下降[2]。因此,深入解析生姜应对非生物胁迫的分子机制,对提高其抗逆性和栽培适应性具有重要意义。

9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase,NCED)是植物脱落酸(abscisic acid,ABA)生物合成的关键限速酶[3],该酶通过催化 9-顺式-紫黄质和 9-顺式-新黄质的氧化裂解反应,生成 ABA 合成前体黄氧素(xanthoxin)[4]。ABA 作为植物非生物胁迫响应的核心调控因子[5],通过激活气孔关闭、诱导胁迫相关基因表达及增强抗氧化防御系统等多种机制[6],在植物抗旱、耐盐碱及极端温度适应等过程中发挥核心作用[7]。研究表明,*NCED* 基因的表达水平和酶活性直接影响植物体内 ABA 含量,该基因在植物中通常以多基因家族形式存在[8],其成员在逆境胁迫下呈现显著差异表达模式[9-10]。例如,拟南芥有 9 个 *NCED* 基因,其中 *AtNCED3* 被证实是响应干旱胁迫的关键基因,其过表达可显著增强植物的抗旱性[11];水稻 *OsNCED3* 的过表达显著提高了植株的耐旱性和抗氧化能力[12];小麦 *NCED* 基因家族成员则参与调控对高渗的适应性响应[13]。

目前,关于植物 *NCED* 基因家族的研究已在拟南芥[11]、烟草[14]、水稻[8]、棉花[15]、玉米[16]等模式植物和主要农作物中取得显著进展。然而,在生姜这一重要经济作物中,*NCED* 基因家族的系统研究未见报道,其成员组成、表达特性及在抗逆中的功能机制尚不清楚。因此,本研究拟通过全基因组分析,借助生物信息学手段系统解析生姜 *NCED* 基因家族的特性及其在非生物胁迫响应中的调控网络,为阐明生姜抗逆分子机制和遗传改良提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　生姜 *ZoNCED* 基因家族鉴定与系统进化树构建

本研究使用的生姜全基因组数据由长江大学香辛作物研究院完成测序[17]。为全面鉴定生姜 *NCED* 基因家族成员,首先从 NCBI 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)获取拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)的 *NCED* 基因家族的氨基酸序列作为参考序列,通过 BLASTp(*E*-value <10^{-10})对生姜基因组进行同源比对,筛选潜在的 NCED 家族成员,通过 Pfam 数据库(http://pfam.xfam.org/)进一步验证候选基因是否含有 NCED 特征性保守结构域(PF03055)。基于获得的 NCED 蛋白序列,采用 MEGA 11.0 软件对生姜、拟南芥和水稻的 NCED 蛋白进行多序列比对,比对参数:空位开放罚分 10,空位延伸罚分 0.2,使用 BLOSUM 系列矩阵。随后构建最大似然法(ML)系统发育树,具体参数:自举检验 1 000 次重复,JTT+G 模型,部分删除、站点覆盖截止值设置为 50%,分支交换过滤器强度为中等,最终生成 NWK 格式树文件,通过 Chiplot 在线平台(https://www.chiplot.online/)对系统发育树进行可视化展示,选用 Circular 布局以直观呈现不同物种 NCED 蛋白的进化关系。

1.2　生姜 ZoNCED 蛋白理化性质及其结构特征分析

使用 ExPASy 在线网站(https://web.expasy.org/protp aram/)对鉴定获得的生姜 ZoNCED 蛋白进行多维度理化性质分析,包括氨基酸残基数、理论分子质量、等电点(pI)、不稳定系数(instability index)、脂肪指数(aliphatic index)和总平均亲水性(grand average of hydropathicity,GRAVY)。通过 SignalP6.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)预测 ZoNCED 蛋白信号肽,通过 Plant-mPLoc(http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/? tdsourcetag=s_pcqq_aiomsg/)预测亚细胞定位。另外,基于生姜基因组注释文件(GFF3)提取 ZoNCED 基于的外显子-内含子的结构信息,通过 GSDS 2.0 进行可视化展示;采用 MEME Suite(https://meme-suite.org/meme/)进行基序预测,使用 InterProScan 数据集(http://www.example.com interpro/search/sequence/)对所识别的基序进行注释,最后使用 TBtools 软件整合基因结构信息,生成多要素综合展示图谱。

1.3　启动子顺式作用元件分析

通过 TBtools 软件中的 GFF3 序列提取工具,设置只提取 CDS 上游 2 000 bp 的序列,使用 PlantCARE 数据库(https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)进行分析,通过 TBtools 的 Basic Biosequence View 功能对预测结果进行可视化展示。

1.4 染色体定位及共线性分析

基于生姜基因组的注释文件,利用 TBtools 的 BLAST 和 MCScanX 功能对 *ZoNCED* 在染色体上的位置和串联重复进行可视化。采用 DIAMOND 对生姜基因组蛋白序列进行快速比对,参数设置:E-value 为 $1\times e^{-5}$,最小一致性为 40%,使用 TBtools 的 Advanced Circosg 功能对共线性区块进行可视化,得到 *ZoNCED* 物种内的同源基因图,并根据基因在染色体上的位置命名为 *ZoNCED01*—*ZoNCED10*。

1.5 蛋白互作网络与转录因子调控分析

采用 STRING v12.0 数据库(https://string-db.org/)构建 ZoNCED 蛋白互作网络,置信度阈值≥0.7,导出 TSV 格式文件,使用 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化处理。通过 TBtools 提取 *ZoNCED* 基因转录起始位点上游 2 000 bp 序列,提交至 PlantTFBD v5.0(https://planttfdb.gao-lab.org/)中的 Binding site prediction 模块,预测结合位点并通过 Cytoscape 软件将预测结果可视化。

1.6 非生物胁迫下的表达量分析

从 NCBI SRA 数据库获取 5 组生姜转录组数据(SRP064226),非生物胁迫处理包括盐胁迫(200 mmol·L^{-1})、干旱(15% PEG)、冷胁迫(4 ℃)、ABA 处理(100 μmol·L^{-1})、高温胁迫(40 ℃)。利用 fastq-dump v2.11.0 工具将获取的 SRA 格式数据转换成 paired-end fastq 格式,使用 Trimmomatic v0.39 软件对 fastq 数据进行质量控制,去除低质量的读段和接头序列。随后,采用 Trinity v2.0.6 软件进行从头组装,并采用 TransDecoder 进行开放阅读框(ORF)预测。为了评估不同处理条件下 *ZoNCED* 基因家族成员的表达水平,利用 Cufflinks 软件计算每个基因的标准化的 FPKM(fragments per kilobase of transcript per million mapped reads)值。FPKM 值经过 $\log_2$(FPKM+1)转换,以减少数据的偏态并提高可视化效果。最后使用 TBtools 软件包中的 HeatMap 功能,将转换后的 FPKM 值绘制成基因表达热图。

1.7 RT-qPCR 分析

以‘竹根姜’为试验材料,育苗基质为丹麦品氏托普泥炭土和珍珠岩(体积比 2∶1)。挑选健壮、大小一致且无病害的姜种进行晒种消毒,并于 26 ℃黑暗条件下催芽 7 d 至芽点长度约 1.5 cm 时,每盆放置 1 个姜块,播种于花盆(上径、底径、高分别为 25、20 和 30 cm)中。待株高长至 50 cm 左右时,选取长势一致且无病虫害的姜苗进行试验。设置 2 个处理:1)对照,正常水分管理;2)盐胁迫,用 400 mL 200 mmol·L^{-1} NaCl 溶液连续灌根处理 3 d,每个处理 5 株幼苗,每个处理 3 个生物学重复。取叶(第 3~4 片完全展开的叶)、茎(地上部第 2 节间)、根(新生侧根)和姜块(根茎膨大部位)样品,洗净擦干后用液氮迅速冷冻,置于−80 ℃冰箱保存备用。利用 RNA 提取试剂盒(Vazyme Biotech Co.,Ltd.)提取生姜根、茎、叶、姜块等不同组织部位的 RNA,RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Vazyme Biotech Co.,Ltd.)将 RNA 反转录合成 cDNA 后,作为模板用于实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)。利用 Primer Premier 5 软件设计生姜 *ZoNCED* 荧光定量 PCR 引物(表 1),以 *RBP* 为内参基因[18]。反应体系:SYBR Green Master Mix 10 μL,上、下游引物各 0.4 μL(10 μmol·L^{-1}),模板 cDNA(400 ng·μL^{-1})2.5 μL,用 ddH_2O 补足至 20 μL。在 CFX96 BioRad™ Real-Time PCR 仪(Bio-Rad,California,USA)上进行,扩增程序:95 ℃ 3 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,40 个循环;65 ℃ 5 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法[19]计算基因相对表达量。使用 Duncan's 多重比较处理数据,分析差异显著性,$P<0.05$。

表 1 生姜 *ZoNCED* 基因表达分析实时荧光定量引物

Table 1 Real-time fluorescent quantitative primers for expression analysis of ginger *ZoNCED* genes

命名 Name	基因 ID Gene ID	引物序列 Primer sequence(5′→3′)
ZoNCED01	Maker00039359	F:ACTACAAACACCATCGCCG;R:AACATTTCCTCGGCGGCAT
ZoNCED02	Maker00055774	F:GTCTCCCAAATCCGTCGCT;R:GATGACGGACGGAGTTACC
ZoNCED03	Maker00021573	F:GTCTTCCTCTGCTCTACGC;R:CCTTCCTCGCAGACCAACT
ZoNCED04	Maker00009372	F:ATGCTCGCCTTGACCTCTG;R:GAAGAGGAGCTGGTAGTCG
ZoNCED05	Maker00013296	F:CGTTTCCGAGCGTTGTGTC;R:GTCATCGGCCACCTTACGA
ZoNCED06	Maker00077446	F:GGAGAAGAAGAACGGAGGC;R:GGAGCGAAGTTGCCGGAAA
ZoNCED07	Maker00071002	F:GCTTCTTCTGATTCCCGCG;R:GTATCTGTCCTTCCACGGG
ZoNCED08	Maker00028570	F:CCAACCTCCCAAATCCACC;R:ACTACTCTCTACCGCCTCC
ZoNCED09	Maker00004877	F:CATCCGAAGAGAGTCCCAC;R:GCTCATAGCCAATGAACGGT
ZoNCED10	Maker00000353	F:CATCTCTTCCTCTTCCAGC;R:CTAGGTCGTTGATGACGGA
ZoRBP	MTCONS_00009943	F:CCTATGAAGCGTAGAAACACAAG;R:GGAAGGACAACATCCCAAATC

2　结果与分析

2.1　生姜 *ZoNCED* 基因家族鉴定与系统发育分析

通过对生姜全基因组数据的系统分析，共鉴定出 10 个具有完整 NCED 保守结构域的 *ZoNCED* 基因家族成员。基于最大似然法构建的系统发育树（图 1）显示，生姜 *ZoNCED* 基因家族可明确划分为 4 个亚群。Group Ⅰ：*ZoNCED04* 和 *ZoNCED09*；Group Ⅱ：*ZoNCED02* 和 *ZoNCED10*；Group Ⅲ：*ZoNCED05*；Group Ⅳ：*ZoNCED01*、*ZoNCED03*、*ZoNCED06*、*ZoNCED07* 和 *ZoNCED08*。

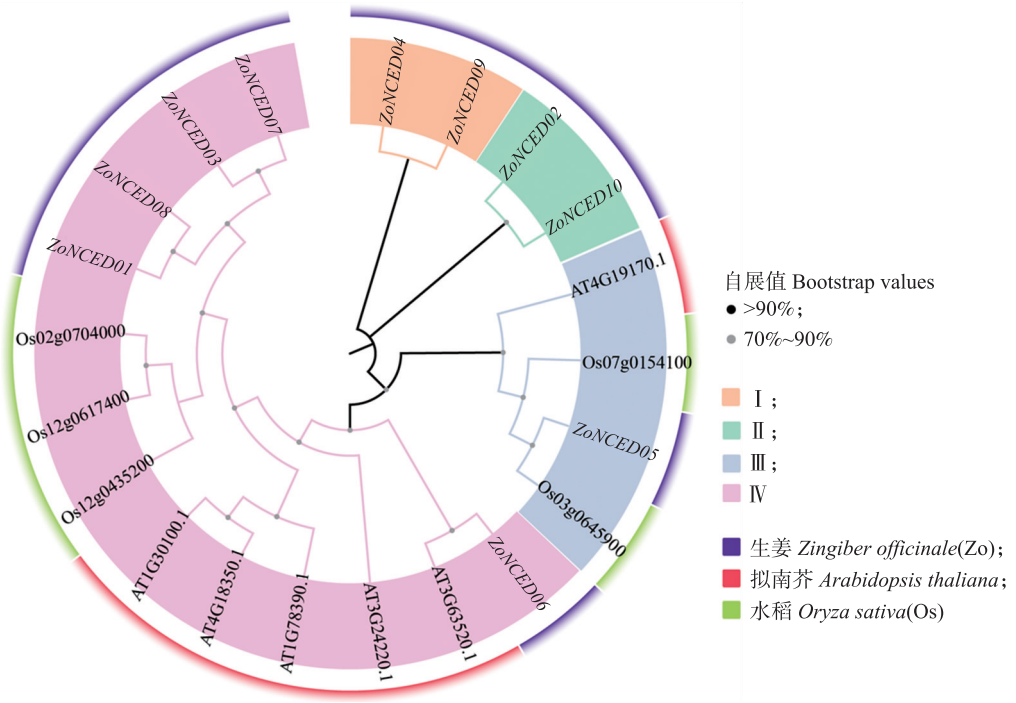

图 1　生姜、拟南芥和水稻 *NCED* 基因家族系统进化树

Fig. 1　Phylogenetic analysis of *NCED* genes family from *Zingiber officinale*, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*

2.2　生姜 ZoNCED 蛋白理化性质分析

如表 2 所示，10 个 ZoNCED 成员的氨基酸长度为 205~646 aa，平均长度为 542.3 aa；相对分子质量为 23 190.73~72 379.95；理论等电点为 5.64~8.98，其中，有 8 个等电点小于 7，偏酸性，2 个等电点大于 7，偏碱性；不稳定系数为 24.28~50.47，其中 ZoNCED06 和 ZoNCED09 不稳定指数小于 40，为稳定蛋白，其他 8 个不稳定指数大于 40，均为不稳定蛋白；大多数 ZoNCED 蛋白具有较高的脂肪指数，表明它们可能具有较好的热稳定性；该家族成员均为亲水性蛋白；亚细胞定位预测表明，多数 ZoNCED 蛋白定位于叶绿体，少数定位于细胞质。

表 2　生姜 ZoNCED 蛋白理化性质

Table 2　Physical and chemical properties of ZoNCED proteins in ginger

命名 Name	氨基酸数 Number of amino acids	相对分子质量 Relative molecular weight	等电点 Theoretical pI	不稳定系数 Instability index	脂肪指数 Aliphatic index	亲水性 Hydropathicity	亚细胞定位 Subcellular localization
ZoNCED01	593	65 395.26	5.69	45.81	85.03	−0.169	叶绿体 Chloroplast，细胞质 Cytoplasm
ZoNCED02	551	61 230.65	6.42	47.01	80.33	−0.306	细胞质 Cytoplasm
ZoNCED03	591	64 419.31	5.64	42.86	85.31	−0.092	叶绿体 Chloroplast
ZoNCED04	646	72 379.95	6.85	48.57	81.98	−0.181	细胞质 Cytoplasm
ZoNCED05	620	67 621.13	6.43	50.47	77.95	−0.233	叶绿体 Chloroplast，细胞质 Cytoplasm
ZoNCED06	468	52 538.71	7.70	24.28	84.57	−0.229	细胞质 Cytoplasm
ZoNCED07	583	64 574.15	6.04	45.20	80.12	−0.288	细胞质 Cytoplasm
ZoNCED08	609	67 724.03	5.94	41.69	80.89	−0.247	细胞质 Cytoplasm
ZoNCED09	205	23 190.73	8.98	28.08	86.98	−0.281	细胞质 Cytoplasm
ZoNCED10	557	61 172.38	5.72	47.15	83.34	−0.223	叶绿体 Chloroplast，细胞质 Cytoplasm

2.3 *ZoNCED* 基因结构特征分析

基因结构分析(图 2-A)显示,*ZoNCED* 家族成员呈现明显的结构分化。其中,5 个基因(*ZoNCED01*、*ZoNCED03*、*ZoNCED05*、*ZoNCED07*、*ZoNCED08*)没有内含子结构,其他的基因有 5 个或更多的内含子。在 UTR 区分布方面,*ZoNCED06*、*ZoNCED09*、*ZoNCED10* 具有 UTR 区,而 *ZoNCED02* 和 *ZoNCED04* 仅含有内含子和 CDS 区。保守结构域分析(图 2-B)证实,所有 *ZoNCED* 基因均含有典型的 NCED 保守结构域。进一步通过保守基序分析共鉴定出 10 个 motif(图 2-C),其中,ZoNCED09 含有的 motif 最少(1 个),ZoNCED01、ZoNCED03、ZoNCED07、ZoNCED08 含有的 motif 最多(10 个)。值得注意的是,系统发育分析表明,位于同一亚组的 *ZoNCED* 基因含有相似的 motif 组成模式,为理解各亚家族的功能分化提供了结构基础。

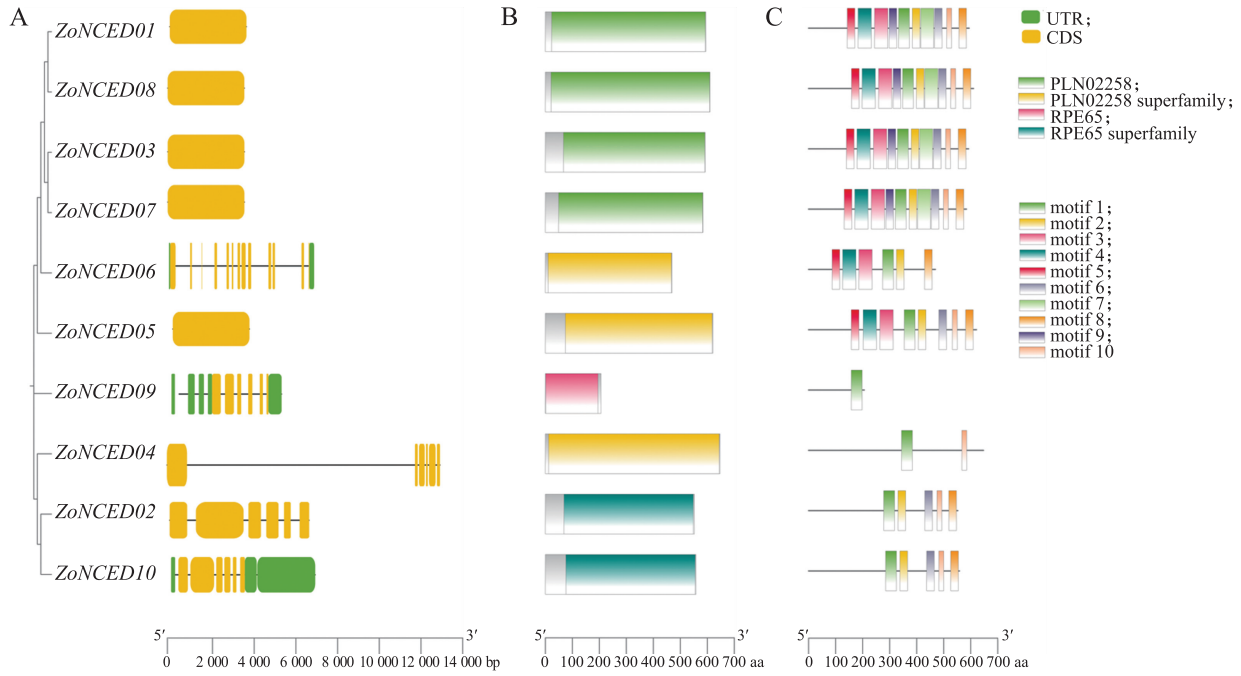

图 2 *ZoNCED* 家族基因结构分析

Fig. 2 Structure analysis of *ZoNCED* family genes

A. 基因结构 Gene structure;B. 保守结构域 Conserved domain;C. 保守基序 Conserved motif.

2.4 *ZoNCED* 启动子顺式作用元件分析

本研究对 10 个 *ZoNCED* 基因启动子区(转录起始位点上游 2 000 bp)进行系统的顺式作用元件分析,共鉴定出 40 种不同的顺式作用调控元件(图 3)。根据其生物学功能可分为四大类:光响应相关元件(13 种,占比 32.5%)、植物生长发育相关元件(10 种,占比 25.0%)、植物激素相关元件(9 种,占比 22.5%)及胁迫响应相关元件(8 种,占比 20.0%)。值得注意的是,Box 4、G-box 与 ABRE 元件在 *ZoNCED* 基因中为高表达调控核心元件。其中,Box 4 和 G-box 作为典型的光响应元件,与植物光合作用及光周期调控密切相关,暗示 *ZoNCED* 可能通过光信号通路参与生姜的生长发育和环境适应过程。同时,ABRE(脱落酸响应元件)的广泛分布进一步从分子水平证实了 *ZoNCED* 家族在 ABA 生物合成及信号转导中的核心作用。

2.5 生姜 *ZoNCED* 家族基因染色体定位及共线性分析

染色体定位分析结果(图 4)发现,10 个 *ZoNCED* 基因在生姜基因组中呈现不均匀分布特征。这些基因分布于 7 条不同的染色体上,其中 10 号染色体分布最为密集,含有 3 个家族成员(*ZoNCED03*、*ZoNCED04* 和 *ZoNCED05*);18 号染色体次之,分布有 2 个成员(*ZoNCED08* 和 *ZoNCED09*);其他 5 条染色体(2 号、5 号、8 号、13 号和 16 号)则各分布 1 个成员。这种不均匀的染色体分布模式可能反映了 *ZoNCED* 基因家族在进化过程中经历了复杂的基因组重排和复制事件。

通过多维度分析 *ZoNCED* 基因家族的基因组特征和进化关系,采用四层环形图(图 5)展示:最内圈(第 1 圈)标注染色体位置信息;第 2 圈以热图形式呈现全基因组基因密度分布;第 3 圈显示各 *ZoNCED* 基因的 GC 含量比值(GC ratio);最外圈(第 4 圈)同时展示 GC 偏移值(GC skew,蓝色表示)和 N 含量比值

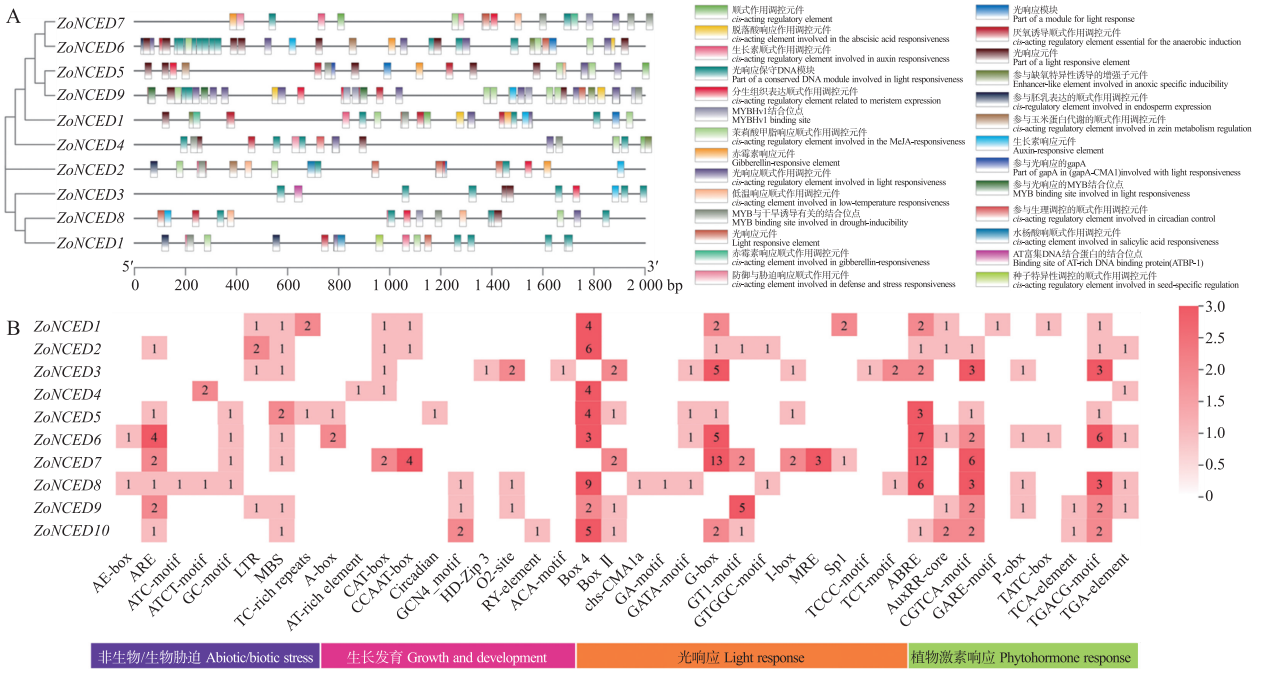

图 3　*ZoNCED* 基因顺式元件分析

Fig. 3　The *cis*-elements analysis of the *ZoNCED* genes

A. 顺式元件位置图 Location diagram of *cis*-elements; B. 顺式作用元件在 *ZoNCED* 基因启动子区域的分布 Distribution of *cis*-elements in the promoter regions of *ZoNCED* genes. 数字表示顺式作用元件的数量。The number represents the number of *cis*-elements.

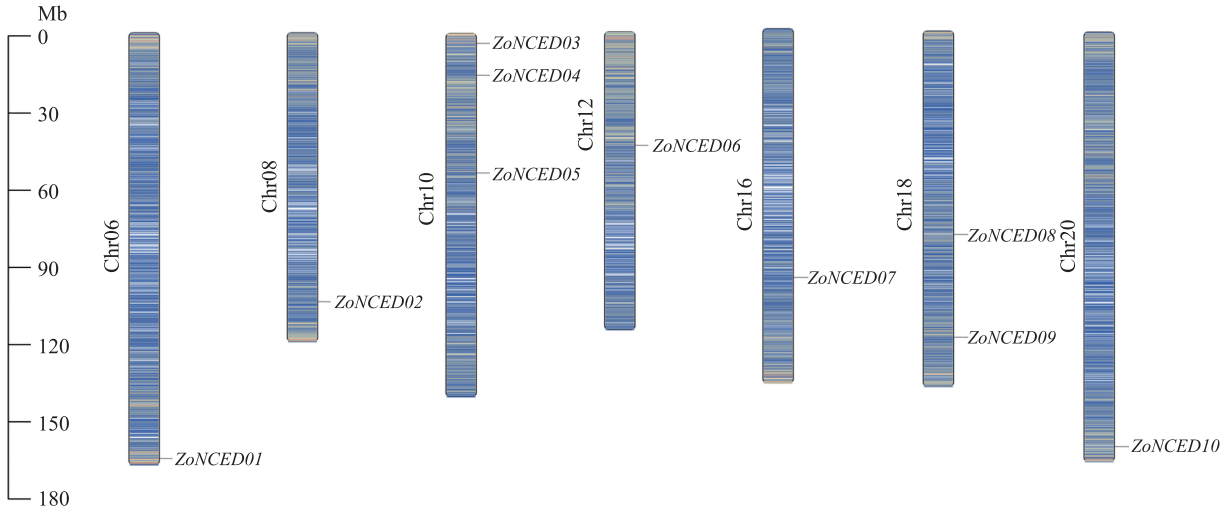

图 4　*ZoNCED* 家族基因染色体定位

Fig. 4　Chromosomal localization of *ZoNCED* family genes

(N ratio,红色表示)。共线性分析共鉴定出 2 对片段重复基因:*ZoNCED02/ZoNCED10* 和 *ZoNCED04/ZoNCED07*,这些重复事件可能通过基因剂量效应促进了 *ZoNCED* 基因家族的功能分化。值得注意的是,这 2 对重复基因分别属于不同的系统发育亚家族,暗示其在进化过程中可能获得了新的功能特性,为生姜适应环境变化提供了重要的遗传基础。

选取代表性物种(拟南芥、玉米、水稻、大蕉)进行系统共线性分析,结果(图 6)显示,生姜与双子叶植物拟南芥仅存在 1 对共线基因(*ZoNCED05-AtNCED3*),而与单子叶植物水稻(3 对)、玉米(3 对)和大蕉(15 对)的共线基因数量更多。这一发现从基因组水平证实了生姜作为单子叶植物,其 *NCED* 基因家族与单子叶近缘物种具有更紧密的进化关系。特别值得注意的是,生姜与大蕉存在 15 对共线基因,远多于其他单子叶植物,这可能与两者同属 *Zingiberales* 目有关,反映了物种间的系统发育距离。

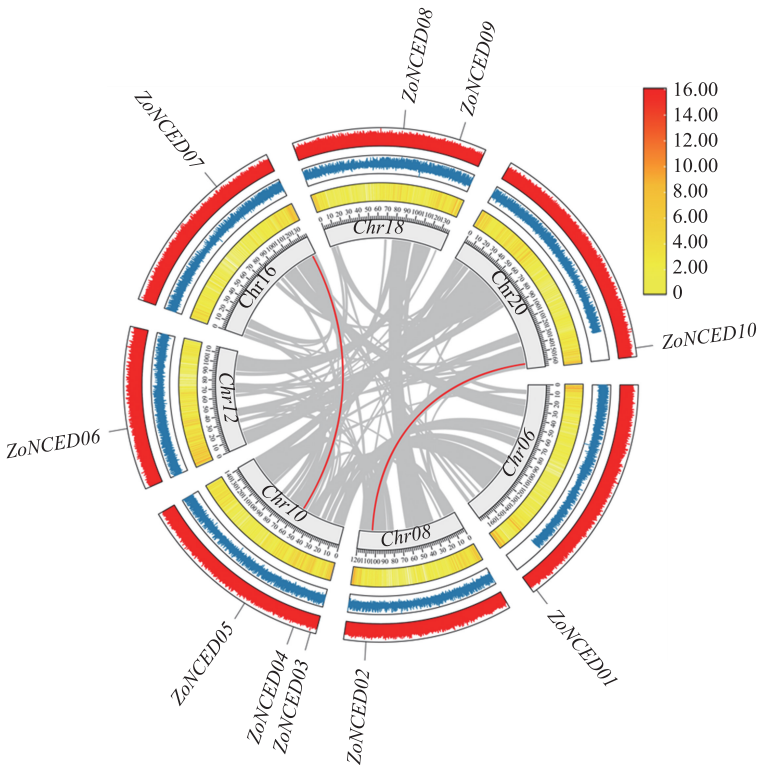

图 5 生姜 *ZoNCED* 家族基因间共线性

Fig. 5 Collinearity between members of *ZoNECD* in ginger

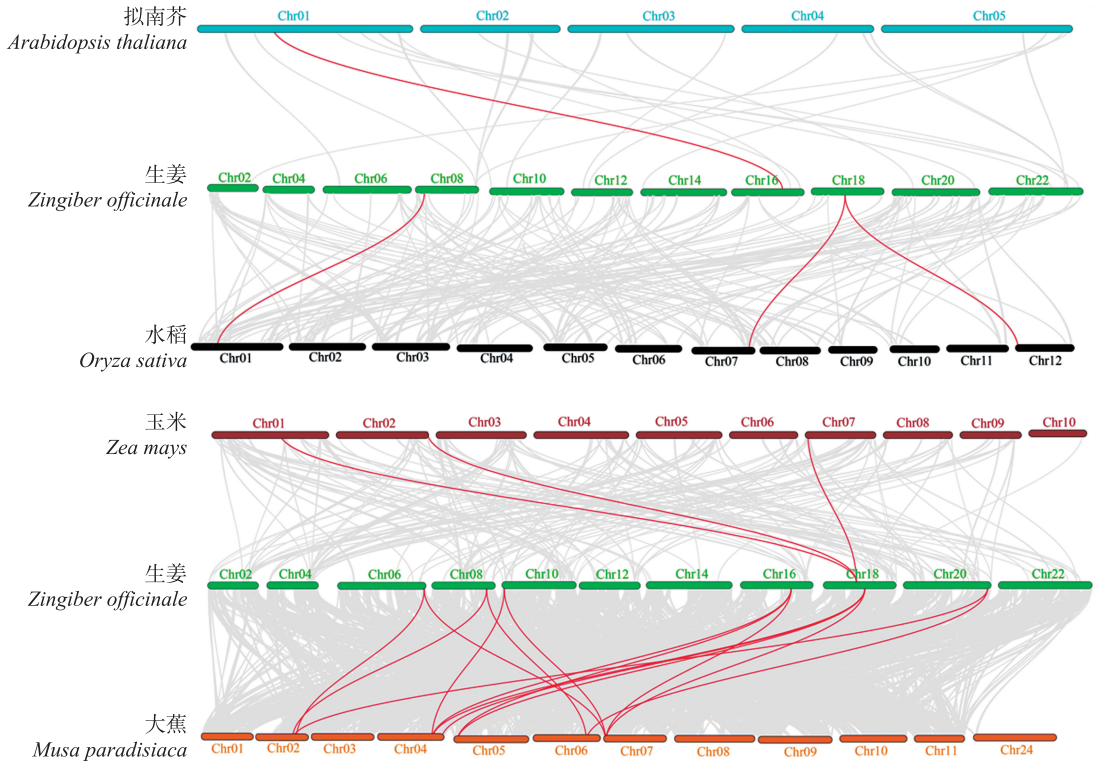

图 6 生姜、拟南芥、水稻、玉米、大蕉间 *NCED* 基因组共线性

Fig. 6 *NCED* genomic collinearity between *Z. officinale*, *A. thaliana*, *O. sativa*, *Zea mays* and *Musa paradisiaca*

2.6 蛋白相互作用和转录因子结合位点分析

蛋白互作网络分析结果(图 7-A)显示,ZoNCED05 蛋白表现出显著的枢纽特性,其互作连接度显著高于其他家族成员,表明该蛋白可能在调控网络中发挥核心协调作用,通过整合多个 ZoNCED 蛋白的活性来优化 ABA 合成效率。进一步的 GO 富集分析(图 7-B)揭示,*ZoNCED* 基因家族显著富集于 3 个关键代谢

通路:类胡萝卜素分解代谢(GO:0016117)、脱落酸生物合成(GO:0009688)以及萜类与倍半萜类代谢(GO:0006694)。这些功能特征表明 ZoNCED 家族不仅在 ABA 合成中起核心作用,还通过参与多种次生代谢途径,在协调植物生长发育与环境胁迫响应中发挥枢纽功能。

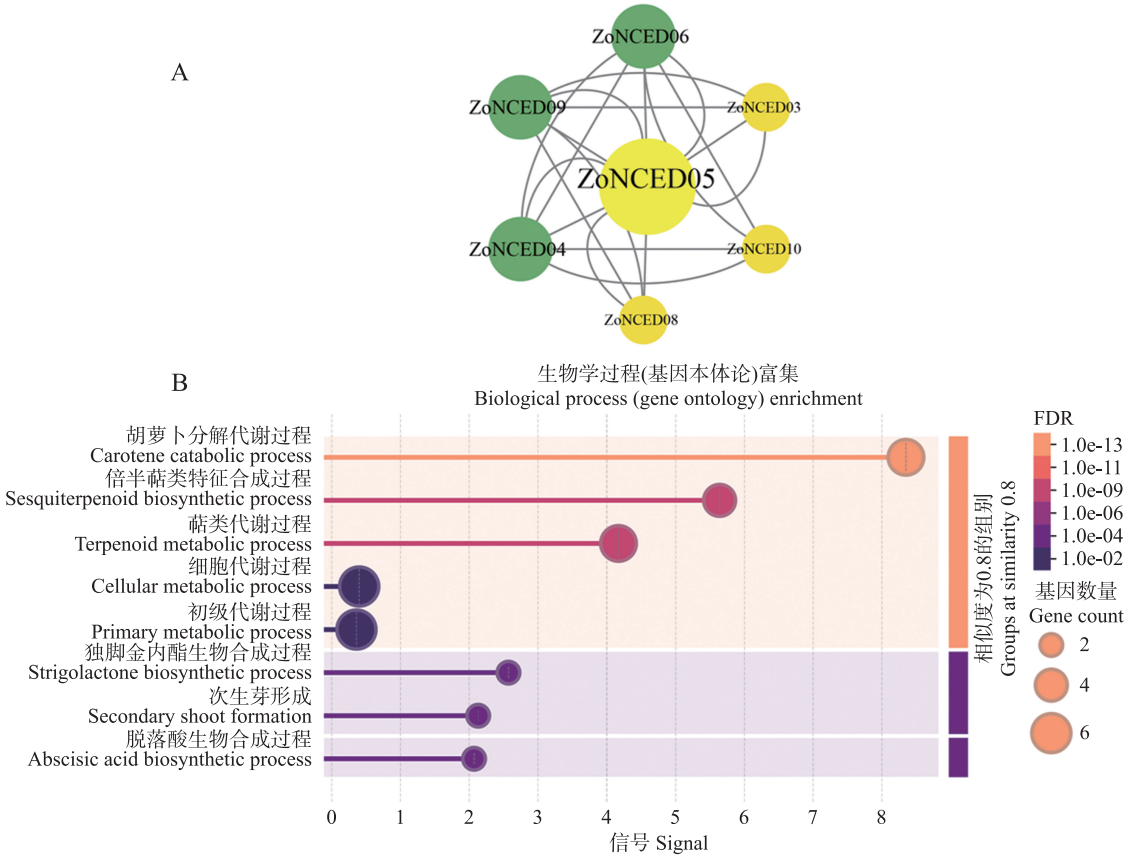

图 7　*ZoNCED* 基因家族蛋白相互作用分析图

Fig. 7　Protein-protein interaction analysis diagram of the *ZoNCED* gene family

A.ZoNCED 蛋白互作网络 Protein-protein interaction network of the ZoNCED proteins;B. 基因本体论 GO 富集分析图 Gene ontology(GO) enrichment analysis diagram.

通过转录因子结合位点分析(图 8),共鉴定出 34 个 TF 家族可潜在调控 *ZoNCED* 基因表达,其中,MIKE_MADS、Dof、C2H2、HD-ZIP、MYB 和 G2-like 转录因子表现出最高的结合频率,这些 TF 可能在 *ZoNCED* 表达调控中发挥关键作用。

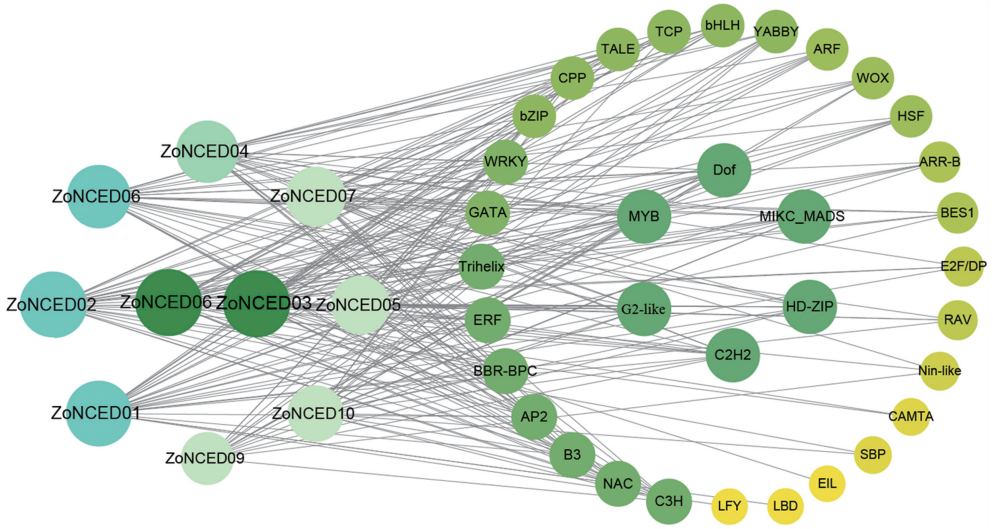

图 8　*ZoNCED* 家族基因 TF 结合位点

Fig. 8　Transcription factor(TF) binding sites in *ZoNCED* family genes

2.7 *ZoNCED* 响应非生物胁迫的表达分析及 RT-qPCR 验证

通过系统分析不同胁迫条件下 *ZoNCED* 基因的表达模式，结果（图 9-A）发现该家族成员呈现显著的功能分化。其中，*ZoNCED01*、*ZoNCED07* 和 *ZoNCED08* 在盐胁迫处理下表达量显著上调（2.0～2.5 倍）；*ZoNCED05* 和 *ZoNCED06* 在盐胁迫处理下表达水平显著下调；*ZoNCED10* 在 ABA 处理下轻微上调（1.0～1.5 倍），在高温处理下显著下调；而 *ZoNCED03*、*ZoNCED04* 和 *ZoNCED09* 在各种处理下均没有表达。综合可知，*ZoNCED* 在盐胁迫处理下表达差异明显，表明该家族基因可能在盐胁迫响应过程中发挥关键作用。

为验证转录组数据的可靠性，通过 RT-qPCR 分析了 *ZoNCED* 基因家族在盐胁迫下的组织特异性表达特征，结果（图 9-B）显示，在叶片组织中，*ZoNCED05* 和 *ZoNCED06* 表达量显著下调，而 *ZoNCED01*、*ZoNCED07*、*ZoNCED08* 表达量则显著上调，与转录组数据高度一致。在茎中表现出独特的响应模式，*ZoNCED02*、*ZoNCED03*、*ZoNCED08* 和 *ZoNCED09* 表达量上调（1.37～4.30 倍），*ZoNCED04* 和 *ZoNCED05* 表达量下调，而 *ZoNCED01*、*ZoNCED06*、*ZoNCED07* 和 *ZoNCED10* 表达量无显著性差异，表明这些基因可能不参与茎组织的盐胁迫响应。在根中响应最为显著，其中 *ZoNCED01* 和 *ZoNCED09* 表达量急剧上调（6.75～23.20 倍），表明这 2 个基因可能是根系应对盐胁迫的关键调控因子；而 *ZoNCED02*、*ZoNCED03*、*ZoNCED04*、*ZoNCED06*、*ZoNCED07* 和 *ZoNCED08* 表达量则轻微下调；*ZoNCED05* 和 *ZoNCED10* 表达量下调。在根茎中，*ZoNCED01*、*ZoNCED06*、*ZoNCED08*、*ZoNCED09* 和 *ZoNCED10* 表达量上调，*ZoNCED02*、*ZoNCED04* 和 *ZoNCED05* 表达量下调，*ZoNCED03* 和 *ZoNCED07* 无显著差异。这些结果不仅证实 *ZoNCED* 家族成员在盐胁迫响应中存在明显的功能分化，还揭示了 *ZoNCED01*、*ZoNCED07* 和 *ZoNCED08* 在叶片组织中以及 *ZoNCED01* 和 *ZoNCED09* 在根组织中的核心作用，后续可通过基因编辑等手段进一步验证这些基因的功能。

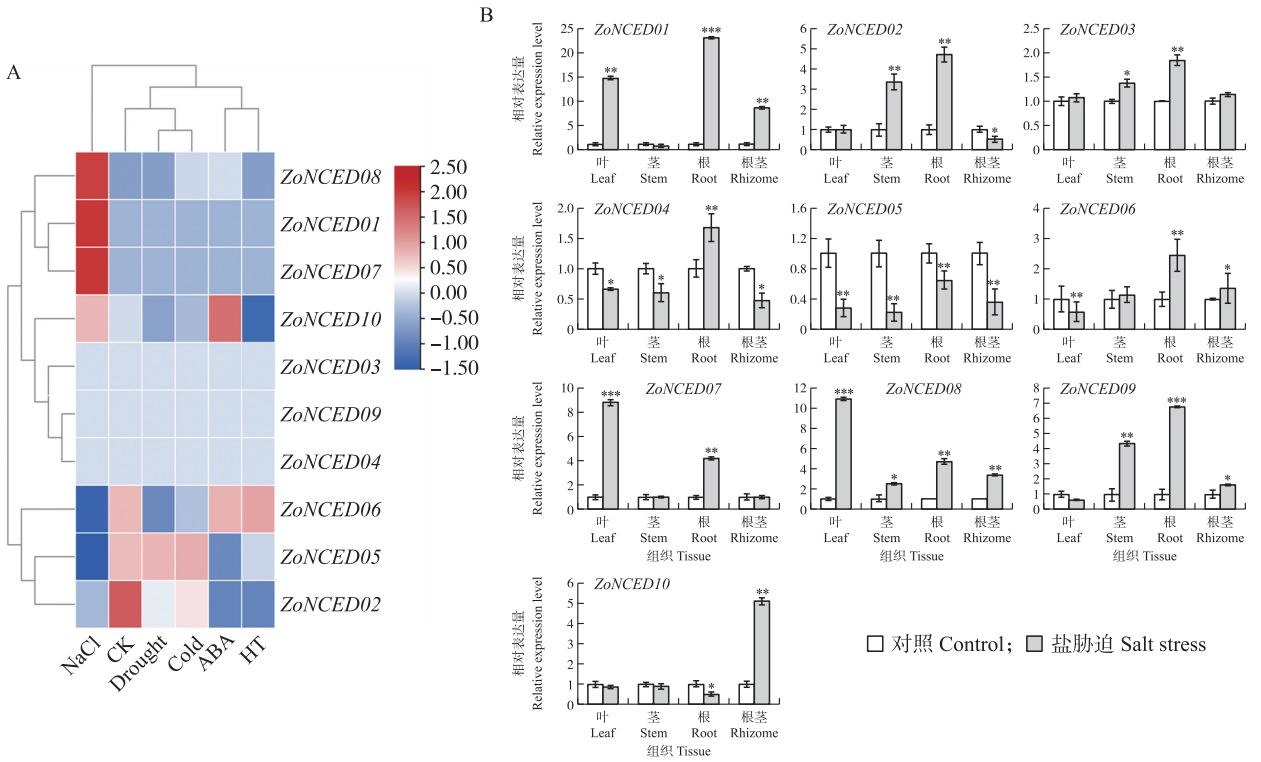

图 9 *ZoNCED* 在非生物胁迫下的表达模式分析

Fig. 9 The expression pattern analysis of *ZoNCED* under abiotic stresses

A. *ZoNCED* 在非生物胁迫下热图分析 The heatmap analysis of *ZoNCED* under abiotic stresses；B. 盐胁迫下 *ZoNCED* 在生姜叶、茎、根、根茎中的表达模式 The expression pattern of *ZoNCED* in ginger's leaf，stem，root and rhizome.

NaCl：盐胁迫 Salt stress；CK：正常条件 Normal conditions；Drought：干旱胁迫 Drought stress；Clod：冷害胁迫 Cold stress；ABA：脱落酸处理 Abscisic acid treatment；HT：高温处理 High-temperature treatment. * $P<0.05$，** $P<0.01$，*** $P<0.001$.

3　讨论与结论

非生物胁迫(如盐碱、干旱等)是制约作物产量和品质的重要因素[20]。作为植物应对逆境胁迫的核心信号分子,脱落酸(ABA)通过调控气孔关闭、激活抗逆相关基因表达等机制增强植物的环境适应能力[21]。已有研究表明,*NCED* 基因家族对 ABA 生物合成具有核心调控作用[22],过表达 *NCED* 能显著提升转基因植物内源 ABA 水平[23]。本研究从生姜基因组中共鉴定出 10 个 *ZoNCED*,各成员在基因结构、表达模式和调控机制等方面均表现出显著的特异性,为深入理解生姜抗逆分子机制提供了新视角。

系统发育分析表明,生姜 *ZoNCED* 基因家族可分为 4 个亚家族(Group Ⅰ—Ⅳ),其成员数量(10 个)介于拟南芥(9 个)和水稻(5 个)之间[24]。值得注意的是,共线性分析揭示生姜与大蕉存在 15 对共线基因,显著多于水稻(3 对)和拟南芥(1 对),这一发现不仅支持生姜的单子叶植物分类地位,更提示其 NCED 家族扩张可能依赖于单子叶植物特有的全基因组复制事件[25]。与拟南芥主要依赖串联复制不同,生姜 *ZoNCED* 家族更倾向于通过片段复制(如 *ZoNCED04*—*ZoNCED07*)实现基因扩张,反映出不同植物类群在进化策略上的分化。分析 *ZoNCED* 家族基因结构特征发现,50% 的成员(*ZoNCED01*、*ZoNCED03*、*ZoNCED05*、*ZoNCED07* 和 *ZoNCED08*)无内含子,显著高于拟南芥(11%)和水稻(20%)[26]。这类结构简化可能会提升转录效率,使植物能够快速响应环境胁迫[23]。与此同时,保留多内含子结构的成员(如 *ZoNCED04* 和 *ZoNCED10*)可能通过可变剪接产生功能多样性,暗示生姜 NCED 家族在进化过程中形成了更为复杂的调控网络。

启动子顺式作用元件分析显示,生姜 NCED 家族不仅含有典型的 ABRE(脱落酸响应元件)和 MYB/MYC 结合位点[11],其光响应元件(如 Box 4、G-box 等)占比(32.5%)更是显著高于水稻(约 15%)和拟南芥(约 20%)[8,11],这一发现与生姜作为喜光作物的生态特性高度吻合,提示其 *NCED* 基因可能通过光信号通路与 ABA 合成途径的协同调控,实现对环境变化的精确响应。此外,亚细胞定位预测显示 80% ZoNCED 蛋白定位于叶绿体,与番茄 SlNCED1 的报道一致[27],进一步支持其在类胡萝卜素代谢中的重要作用。表达分析揭示,生姜 *ZoNCED* 基因在盐胁迫下的表达变化呈现组织特异性:*ZoNCED01*、*ZoNCED07* 和 *ZoNCED08* 表达量显著上调,*ZoNCED05* 和 *ZoNCED06* 表达量则下调,这种双向调控模式与水稻 *OsNCED4* 的报道相似[8],不同于拟南芥的单向上调模式[11]。然而,与盐胁迫的显著响应形成对比的是,在高温和干旱胁迫下该家族基因的表达变化整体不显著且差异较小,表明生姜 NCED 家族在转录层面的响应具有胁迫特异性,可能主要参与盐胁迫响应途径,对于高温和干旱胁迫,其功能可能更依赖于转录后调控(如蛋白活性调节)或特定组织/细胞类型中的精细表达。此外,部分成员(*ZoNCED03*、*ZoNCED04* 和 *ZoNCED09*)在各类胁迫下均无显著表达变化,提示其可能参与发育调控等基础生理过程。

综上所述,本研究通过多维度跨物种比较,系统揭示了生姜 *ZoNCED* 基因家族的进化特征与表达模式,相较于拟南芥等模式植物,生姜 *ZoNCED* 家族通过多样化的基因复制事件和启动子元件组成,形成了更复杂的 ABA 调控网络,尤其在光信号与胁迫响应的协同调控中表现出独特性。与单子叶植物的进化亲缘性及胁迫响应模式的相似性,使其成为作物抗逆基因挖掘的重要资源。后续研究可聚焦 *ZoNCED01*、*ZoNCED07* 和 *ZoNCED08* 的功能验证及其与下游 ABA 信号通路的互作,进一步揭示其在生姜生长发育和逆境响应中的具体功能。

参考文献 References:

[1] Liu D Q, Zhang P, Zhou T T, et al. Genome-wide characterization and expression analysis of the bHLH gene family in response to abiotic stresses in *Zingiber officinale* Roscoe[J]. BMC Genomics, 2025, 26(1): 143.

[2] 杨映,张玲玲,梁华儒,等. 生姜种质资源耐干热性评价及其鉴定指标筛选[J]. 中国生态农业学报(中英文),2024,32(5):860-876.
Yang Y, Zhang L L, Liang H R, et al. Evaluation of the drought and heat tolerance of the ginger germplasm resource and its screening of identification indexes[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2024, 32(5): 860-876(in Chinese with English abstract).

[3] Liu D, Qiu C Y, Zeng Y R, et al. Molecular and enzymatic characterization of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenases from mulberry[J]. The Protein Journal, 2022, 41(4/5): 504-514.

[4] Priya R, Siva R. Analysis of phylogenetic and functional diverge in plant nine-*cis*- epoxycarotenoid dioxygenase gene family[J]. Journal of Plant Research, 2015, 128(4): 519-534.

[5] Rai G K, Khanday D M, Choudhary S M, et al. Unlocking nature's stress buster: abscisic acid's crucial role in defending plants against abiotic

stress[J]. Plant Stress,2024,11:100359.

[6] Hirayama T,Shinozaki K. Perception and transduction of abscisic acid signals:keys to the function of the versatile plant hormone ABA[J]. Trends in Plant Science,2007,12(8):343-351.

[7] Huang Y,Jiao Y,Xie N K,et al. OsNCED5,a 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene,regulates salt and water stress tolerance and leaf senescence in rice[J]. Plant Science,2019,287:110188.

[8] Xiang Z P,Zhang L,Zhang M Z,et al. *OsNCED5* confers cold stress tolerance through regulating ROS homeostasis in rice[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2025,220:109455.

[9] Islam M S U,Shing P,Ahmed M,et al. Genome-wide identification and characterization of NCED gene family in soybean(*Glycine max* L.)and their expression profiles in response to various abiotic stress treatments[J]. PLoS One,2025,20(3):e0319952.

[10] Zhu P P,Li R L,Fan W,et al. A mulberry 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene *MaNCED1* is involved in plant growth regulation and confers salt and drought tolerance in transgenic tobacco[J]. Frontiers in Plant Science,2023,14:1228902.

[11] Iuchi S,Kobayashi M,Taji T,et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase,a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal,2001,27(4):325-333.

[12] Hwang S G,Chen H C,Huang W Y,et al. Ectopic expression of rice *OsNCED3* in *Arabidopsis* increases ABA level and alters leaf morphology[J]. Plant Science,2010,178(1):12-22.

[13] Gallé á,Csiszár J,Benyó D,et al. Isohydric and anisohydric strategies of wheat genotypes under osmotic stress:biosynthesis and function of ABA in stress responses[J]. Journal of Plant Physiology,2013,170(16):1389-1399.

[14] Yang Y X,Zhou Q Q,Xu J Y,et al. RNA interference of *NtNCED3* reduces drought tolerance and impairs plant growth through feedback regulation of isoprenoids in *Nicotiana tabacum*[J]. Environmental and Experimental Botany,2018,155:332-344.

[15] Cai X,Jiang Z X,Tang L Y,et al. Genome-wide characterization of carotenoid oxygenase gene family in three cotton species and functional identification of *GaNCED3* in drought and salt stress[J]. Journal of Applied Genetics,2021,62(4):527-543.

[16] Harrison P J,Chandler J,Thompson A J,et al. *In vitro* assay and inhibition of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase(NCED)from *Solanum lycopersicum* and *Zea mays*[M]//Mononuclear Non-heme Iron Dependent Enzymes Part B. Amsterdam:Elsevier,2024:291-312.

[17] Li H L,Wu L,Dong Z M,et al. Haplotype-resolved genome of diploid ginger(*Zingiber officinale*)and its unique gingerol biosynthetic pathway[J]. Horticulture Research,2021,8:189.

[18] Li G,Ma J W,Yin J L,et al. Identification of reference genes for reverse transcription-quantitative PCR analysis of ginger under abiotic stress and for postharvest biology studies[J]. Frontiers in Plant Science,2022,13:893495.

[19] Livak K J,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ method[J]. Methods,2001,25(4):402-408.

[20] Huang Y,Jiao Y,Yang S,et al. *SiNCED1*,a 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *S. italica*,is involved in drought tolerance and seed germination in transgenic *Arabidopsis*[J]. Frontiers in Plant Science,2023,14:1121809.

[21] Zha D D,He Y X,Song J H. Regulatory role of ABA-responsive element binding factors in plant abiotic stress response[J]. Physiologia Plantarum,2025,177(2):e70233.

[22] Qin X Q,Zeevaart J A D. The 9-*cis*-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1999,96(26):15354-15361.

[23] Qin X Q,Zeevaart J A D. Overexpression of a 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance[J]. Plant Physiology,2002,128(2):544-551.

[24] Zhai X W,Kai W B,Huang Y M,et al. *OsNCED3* and *OsPYL1* promote the closure of rice florets by regulating sugar transporters through endogenous abscisic acid[J]. Journal of Integrative Agriculture,2025,24(2):441-452.

[25] Qiao L Y,Zhang X J,Han X,et al. A genome-wide analysis of the auxin/indole-3-acetic acid gene family in hexaploid bread wheat(*Triticum aestivum* L.)[J]. Frontiers in Plant Science,2015,6:770.

[26] 徐学中,汪婷,万旺,等. 水稻ABA生物合成基因 *OsNCED3* 响应干旱胁迫[J]. 作物学报,2018,44(1):24-31.
Xu X Z,Wang T,Wan W,et al. ABA biosynthesis gene *OsNCED3* confers drought stress tolerance in rice[J]. Acta Agronomica Sinica,2018,44(1):24-31(in Chinese with English abstract).

[27] An W W,Wang G Z,Dou J H,et al. Protective mechanisms of exogenous melatonin on chlorophyll metabolism and photosynthesis in tomato seedlings under heat stress[J]. Frontiers in Plant Science,2025,16:1519950.

责任编辑:范雪梅