

杨培华, 张弛, 马佳伟, 等. 生姜 *HSP70* 家族基因鉴定及其响应高温胁迫的表达分析[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(4): 770-785.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.04.014

生姜 *HSP70* 家族基因鉴定及其响应高温胁迫的表达分析

杨培华¹, 张弛¹, 马佳伟¹, 刘佳颖¹, 万盼¹, 吴子昱¹, 梁红艳², 叶亮³, 朱永兴¹
(1. 长江大学园艺园林学院/香辛园艺植物种质创新与利用湖北省重点实验室, 湖北 荆州 434025; 2. 荆州市农业科学院, 湖北 荆州 434025; 3. 宜昌犁洋农业科技有限责任公司, 湖北 宜昌 443113)

摘要: 为解析生姜 (*Zingiber officinale* Roscoe) 热激蛋白 (Heat shock proteins, HSP) 基因家族的信息, 本研究基于生姜基因组数据, 分析鉴定了 *ZoHSP70* 家族基因及其表达模式, 并进一步利用实时荧光定量反转录聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 检测了 8 个 *ZoHSP70* 基因在高温胁迫下的表达特性。研究结果表明, 在生姜基因组中共鉴定到 31 个 *ZoHSP70* 家族基因; 系统进化树显示, *ZoHSP70* 家族基因可分为 5 个亚家族, 位于同一亚家族的 *HSP70* 基因具有相似的基因结构。 *ZoHSP70* 家族基因编码的蛋白质氨基酸序列长度在 163 aa 至 909 aa 之间, 相对分子量为 18 120~101 610, 除了 *ZoHSP70-26* 蛋白为碱性蛋白外, 其余均为酸性蛋白。物种内共线性分析结果表明, *ZoHSP70* 家族基因主要以片段复制为进化驱动力。顺式作用调控元件分析发现, *ZoHSP70* 家族基因上游启动子区域内含有与光响应、生长发育响应、逆境胁迫响应、激素响应相关的作用元件。转录组测序数据分析结果显示, *ZoHSP70* 家族基因有一定的组织表达特异性且响应干旱、低温等逆境胁迫, 其中, *ZoHSP70-10*、*ZoHSP70-24*、*ZoHSP70-30* 等基因在生姜不同生长期、不同组织以及干旱、低温和淹水胁迫下均有较高表达。qRT-PCR 分析结果表明, 与 0 h 相比, *ZoHSP70-24* 基因在高温胁迫处理 4 h 时表达量显著降低 ($P < 0.05$), 随着胁迫时间的延长, 其基因表达量迅速升高, 至 24 h 时表达量达到峰值; 基因 *ZoHSP70-4*、*ZoHSP70-10*、*ZoHSP70-20* 在高温胁迫处理 4 h 时表达量最高, 其余处理时间基因表达量均显著低于 4 h ($P < 0.05$), 但仍显著高于 CK 的表达量 ($P < 0.05$)。本研究结果为进一步解析生姜在不同非生物胁迫下 *HSP70* 家族基因参与调控的分子机制提供了理论参考。

关键词: 生姜; *HSP70* 家族基因; 高温胁迫; 表达分析

中图分类号: S632.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2026)04-0770-16

Identification of *HSP70* family genes in ginger and their expression analysis in response to high temperature stress

YANG Peihua¹, ZHANG Chi¹, MA Jiawei¹, LIU Jiaying¹, WAN Pan¹, WU Ziyu¹, LIANG Hongyan², YE Liang³, ZHU Yongxing¹

(1. College of Horticulture and Gardening, Yangtze University/Hubei Key Laboratory of Spices & Horticultural Plant Germplasm Innovation & Utilization, Jingzhou 434025, China; 2. Jingzhou Academy of Agricultural Sciences, Jingzhou 434025, China; 3. Yichang Lifeng Agricultural Science and Technology Co., Ltd., Yichang 443113, China)

收稿日期: 2025-07-25

基金项目: 湖北省国际科技合作项目 (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: 杨培华 (2001-), 女, 湖北恩施人, 硕士研究生, 主要从事蔬菜逆境生理研究。 (E-mail) yph919701@163.com

通讯作者: 朱永兴, (E-mail) xbnlzyx@163.com

Abstract: To analyze the information of heat shock protein (HSP) gene family in *Zingiber officinale* Roscoe, the *ZoHSP70* family genes and their expression patterns were analyzed and identified based on the ginger genome data, and the expression characteristics of eight *ZoHSP70* genes under high temperature stress were further detected by quantitative real-time reverse transcription polymerase

chain reaction (qRT-PCR). The results showed that 31 *ZoHSP70* family genes were identified in the ginger genome. The phylogenetic tree showed that *ZoHSP70* family genes could be divided into five subfamilies, and *HSP70* genes in the same subfamily exhibited similar gene structures. The amino acid sequence lengths of the proteins encoded by the *ZoHSP70* family genes ranged from 163 aa to 909 aa, with relative molecular weights ranging from 18 120 to 101 610. *ZoHSP70-26* is an alkaline protein, while the remaining proteins are acidic. Intra-species colinearity analysis showed that the *ZoHSP70* family genes were mainly driven by fragment replication. The analysis of *cis*-acting regulatory elements showed that the upstream promoter regions of *ZoHSP70* family genes contained elements related to light, growth and development response, stress response and hormone response. Transcriptome sequencing data analysis showed that *ZoHSP70* family genes had certain tissue expression specificity and responded to stresses such as drought and low temperature. Among them, genes such as *ZoHSP70-10*, *ZoHSP70-24*, and *ZoHSP70-30* showed higher expression levels across different growth stages, various tissues, and under drought, low temperature and waterlogging stresses. The results of qRT-PCR analysis showed that compared with 0 h, the expression of *ZoHSP70-24* gene was significantly decreased at 4 h under high temperature stress ($P < 0.05$). With the prolongation of stress time, the expression of *ZoHSP70-24* gene increased rapidly and reached the peak at 24 h. The expression levels of genes *ZoHSP70-4*, *ZoHSP70-10*, and *ZoHSP70-20* were the highest at 4 h of high temperature stress treatment, and the gene expression levels at other treatment time points were significantly lower than those at 4 h ($P < 0.05$), but still significantly higher than CK ($P < 0.05$). In summary, this study provides a theoretical reference for further analysis of the molecular mechanisms by which *HSP70* family genes participate in the regulation of ginger under different abiotic stresses.

Key words: ginger; *HSP70* family genes; high temperature stress; expression analysis

高温胁迫是影响植物生长发育的主要环境因子之一^[1]。近年来,全球气候变暖趋势加剧,极端高温天气频发给植物生存繁衍带来严峻挑战^[2]。当植物长时间暴露于高温环境中,其生理代谢与分子调控层面会启动一系列适应性响应,以此提升自身的抗逆能力,而这些响应过程大多与热激蛋白(Heat shock proteins, HSP)密切相关。HSP 是一类普遍存在于动植物体内的具有独特结构和功能的蛋白质^[3-4]。HSP 作为多种生命活动的分子伴侣,参与协助其他蛋白质的正确折叠,维持蛋白质活性并协助蛋白质的跨膜运输^[5]。基于相对分子量大小,植物 HSP 可分为 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40 和小分子 HSP^[6]。其中,HSP70 被认为是最高度保守的 HSP,其蛋白由 N 端高度保守的核苷酸结合域(NBD)和 C 端的保守底物结合域(SBD)2 个功能域组成,是分子伴侣和折叠催化细胞网络的核心组成部分,具有协助蛋白质正确折叠、修复受损蛋白质、防止蛋白质凝聚等多种生物功能^[7-8]。植物中 HSP70 主要定位于叶绿体、线粒体、细胞质和内质网等细胞器中,且多数存在于细胞质中发挥作用^[9-10]。

目前,在拟南芥^[11]、水稻^[12]、玉米^[13]、大豆^[14]等植物中分别鉴定到 18 个、32 个、35 个和 61 个 *HSP70* 基因。研究表明,*HSP70* 基因在植物生长发育中起着重要的调控作用,例如在烟草中,定位于细胞核的 *NtHSP70-1* 基因可参与维持细胞核内 DNA 的稳定性,过表达 *NtHSP70-1* 基因烟草植株长势旺盛且在持续高

温胁迫下存活率较高^[15]。异源过表达棉花 *GhHSP70-26* 转基因烟草植株的叶绿素含量和抗氧化酶活性比野生型烟草更高,根系生长也更旺盛^[16]。同时,已有大量研究结果证实,*HSP70* 家族基因在植物逆境胁迫响应中发挥关键调控作用。例如,大白菜基因组中鉴定出的 28 个 *HSP70* 同源基因里,有 16 个转录水平在高温处理下显著上调,暗示这类基因可能参与调控大白菜的热胁迫应答过程^[17]。拟南芥 *AtHSP70-3* 基因编码的蛋白质可与磷脂酶发生互作,通过协助植物细胞重建稳态,进而介导植株的耐热性^[18]。在 46 °C 极端高温胁迫下,过表达辣椒 *CaHSP70-2* 基因的转基因拟南芥植株存活率显著高于野生型^[19]。与之相反,拟南芥 *AtHSP70-15* 基因缺失突变体表现出植株矮小、生长迟缓的表型,且经高温处理后死亡率显著升高,这表明该基因不仅调控拟南芥的正常生长发育,还正向调控其高温胁迫耐受能力^[20]。此外,有研究表明,玉米 *HSP70* 家族基因可通过提升叶片抗氧化酶活性,减轻细胞氧化损伤,最终增强植株的高温胁迫耐受性^[21]。综上,*HSP70* 家族基因在植物生长发育进程及逆境胁迫响应中均具有不可或缺的调控功能。

生姜(*Zingiber officinale* Roscoe)是姜科姜属多年生草本植物,常作为一年生蔬菜栽培,是药食同源的特色蔬菜和重要的出口创汇农产品^[22]。近年来,中国生姜种植面积不断扩大,产量和出口量均居全球首位^[23]。生姜为浅根系作物,喜温暖湿润环境,不耐高温胁迫,

过高的环境温度易使其产生生理性热害,进而抑制植株生长发育,造成产量和品质下降,严重时甚至导致植株死亡^[24]。已有研究表明,*HSP70* 家族基因在植物耐热调控方面具有重要作用,但目前关于生姜 *HSP70* 家族基因的系统鉴定与功能解析仍较为匮乏。因此,本研究基于生姜全基因组测序数据,对其 *HSP70* 家族基因进行全基因组鉴定及表达模式分析,为深入揭示生姜 *HSP70* 家族基因的生物学功能提供理论支撑与数据参考。

1 材料与方法

1.1 *ZoHSP70* 家族基因的鉴定及系统发育树的构建

从 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取水稻 (*Oryza sativa*) *HSP70* 蛋白氨基酸序列,从 Arabidopsis Information Resource 数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>) 获取拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *HSP70* 蛋白氨基酸序列,以水稻和拟南芥 *HSP70* 蛋白氨基酸序列为种子序列,在生姜基因组数据库^[25]使用 BLAST 工具进行同源序列比对,设置比对阈值为 $E < 1 \times 10^{-10}$,初步获得生姜候选 *HSP70* 蛋白氨基酸序列。从 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org>) 下载 *HSP70* 保守结构域对应的隐马尔可夫模型 (Pfam 登录号: PF00012),利用 HMMER 工具 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer>) 对候选氨基酸序列进行结构域匹配验证,同时通过 InterProScan 工具 (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>) 对候选氨基酸序列的功能结构域进行注释分析。结合上述结果,去除重复、冗余及注释信息不完整的氨基酸序列,得到初步筛选后的生姜 *HSP70* 蛋白氨基酸序列文件,最后利用 NCBI 保守结构域数据库 (CDD, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 对上述氨基酸序列进行结构域二次鉴定,剔除不包含典型 *HSP70* 保守结构域的氨基酸序列,最终确定 31 个生姜 *ZoHSP70* 家族基因。

将经过序列比对和结构域筛选后的 31 个生姜 *HSP70* 蛋白氨基酸序列与 18 个拟南芥和 32 个水稻^[26] *HSP70* 蛋白氨基酸序列利用 ClustalW2 软件进行多序列比对,并使用在线工具 Chiplot (<https://www.chiplot.online/>) 对进化树进行修饰。

1.2 *ZoHSP70* 蛋白特征分析和亚细胞定位分析

使用 ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *ZoHSP70* 蛋白的理化性质,包

括其氨基酸序列长度、亲水性、相对分子量、不稳定系数、原子总数和等电点。使用在线工具 SOPMA (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 对生姜 *ZoHSP70* 蛋白的二级结构进行分析对比。利用在线工具 Piant-mPLoc (http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Plant_multi) 预测 *ZoHSP70* 蛋白的亚细胞定位。

1.3 *ZoHSP70* 家族基因结构和保守基序分析

从生姜基因组 GFF3 文件中提取生姜 *ZoHSP70* 家族基因的基因注释,利用 TBtools 工具对生姜 31 个 *ZoHSP70* 家族基因进行结构分析,在线分析生姜 *HSP70* 家族基因的外显子和内含子的组成;使用 MEME 在线网站 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 对 31 个 *ZoHSP70* 家族基因进行保守基序识别,并通过 TBtools 软件绘图。

1.4 *ZoHSP70* 家族基因的染色体定位

根据生姜基因组的注释信息,通过 TBtools 获取 *ZoHSP70* 家族基因的染色体定位信息,利用 TBtools 工具封装的本地 BLAST+ 工具,对生姜全基因组编码的蛋白质氨基酸序列进行比对,获得同源基因配对结果,将该结果与基因组注释文件联合导入 TBtools 的 MCScanX 调用接口,分析生姜基因串联重复与片段重复事件,并绘制 *ZoHSP70* 家族基因的染色体定位图。

1.5 *ZoHSP70* 家族基因启动子顺式作用元件分析

通过 TBtools 提取生姜 *ZoHSP70* 家族基因起始密码子上游 2 000 bp 基因组 DNA 序列,并用 PlantCARE 在线生物信息学数据库与分析平台 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测该启动子区域的顺式作用元件,然后将所有顺式作用元件按照功能进行分类,最后通过 TBtools 进行可视化。

1.6 *ZoHSP70* 家族基因共线性分析

通过 TBtools 的 MCScanX 和 Gene Position Extrack 功能对生姜基因组编码的蛋白质氨基酸序列进行比对,得到生姜物种内的共线性关系,通过 Fasta Stasts 功能得到染色体长度文件。用共线性关系文件、染色体长度文件在 TBtools 的 Advanced Circos 功能区绘制 *ZoHSP70* 家族基因的物种内同源基因共线性图谱。使用 TBtools 软件对生姜和芭蕉 (*Musa basjoo*) 的基因和注释文件进行比对,获得 Ctl、Collinearity、GFF 文件,借助 TBtools 的 Dual Systemy Plot for MCscanX 功能处理以上文件,并绘制生姜 *HSP70* 家族基因和芭蕉 *HSP70*

家族基因的共线性关系图。

1.7 基于转录组测序数据的 ZoHSP70 家族基因表达模式分析

整合已报道转录组数据^[27-29]及本课题组有关生姜不同组织、不同发育阶段、各种逆境胁迫下的测序数据(登录号: PRJNA380847、PRJNA380972、PRJNA592215、PRJNA788194、PRJNA911443),提取 ZoHSP70 家族基因表达量。包括生姜红色茎外表皮(RO)、红色茎内表皮(RI)、根茎(Rh)、绿色茎(Gr)中 ZoHSP70 家族基因的表达量,根茎由下而上 5 个不同部位(Rh1~Rh5)及根(R)和茎(S)中 ZoHSP70 家族基因的表达量,不同温度(25 °C、4 °C 和 12 °C)下根茎中 ZoHSP70 家族基因的表达量,壳聚糖处理后当天、1 d 和 2 d(CK0、CK1、CK2)以及接种腐皮镰刀菌并添加壳聚糖处理当天、1 d 和 2 d(CS0、CS1、CS2)根茎中 ZoHSP70 家族基因的表达量,25 °C(CK)、2 °C 冷害(LT)、褪黑素(CK-MT)、褪黑素加 2 °C 冷害(LT-MT)处理后根茎中 ZoHSP70 家族基因的表达量,盐胁迫(NaCl)、干旱胁迫(PEG)、淹水胁迫(WL)、淹水胁迫前叶面喷施纳米硅溶液(WL+Si)生姜根(R)、茎(S)、叶(L)、根茎(Rh)中 ZoHSP70 家族基因的表达量。最后通过 TBtools 的 HeatMap Plot 功能软件完成表达模式的可视化。

1.8 微小 RNA (miRNA) 对 ZoHSP70 家族基因转录后的调控

为解析 ZoHSP70 家族基因的转录后调控机制,首先从已发表的研究结果中整理获取生姜 miRNA 成熟体序列^[30],随后将上述 miRNA 序列与 ZoHSP70 家族基因的 CDS 序列上传至 psRNATarget 在线分析工具(<https://www.zhaolab.org/psRNA>)^[31-32],预测 miRNA 与 ZoHSP70 家族基因的靶向调控关系,23 个 ZoHSP70 家族基因被预测到与已知 miRNA 存在可信的靶位点,最终利用 R 语言 ggalluvia 包构建桑基图,可视化呈现 miRNA 与 ZoHSP70 家族基因转录后之间的调控网络^[33]。

1.9 样品处理

供试材料为山东大姜姜种,由长江大学香辛作物研究院保存。选取健康饱满的姜种,置于温度 25 °C、相对湿度 70%、光周期为 24 h 全黑暗的人工气候培养箱中催芽,待芽长至 1.5 cm 时,移栽至长江大学西校区玻璃温室进行盆栽培育。盆栽容器规格为上口径 25 cm、底径 21 cm、高 26 cm,育苗基质采用丹麦品氏托普泥炭土与珍珠岩,二者的体积比为

3 : 1。待生姜幼苗株高达 50 cm 左右时,筛选长势一致、无病虫害的健康幼苗用于后续高温胁迫试验。预试验结果表明,40 °C 高温胁迫处理 7 d 后,生姜植株叶片出现萎蔫、枯黄等典型热害症状,但未达到致死程度^[24]。结合夏季塑料大棚田间观测条件——晴朗天气中午前后冠层温度常高达 40 °C 以上,本研究最终设定 42 °C 为高温胁迫温度,该条件既能够模拟田间极端高温环境,又可避免材料快速死亡以保证取样有效性。分别于高温胁迫处理 0 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h 时采集植株功能叶片,经液氮速冻后迅速转移至-80 °C 超低温冰箱中保存备用。

提取生姜叶片 RNA,检测浓度并反转录成 cDNA,进行实时荧光定量 PCR 分析,引物信息见表 1。以 RBP 基因为内参,使用 SYBR qPCR Master Mix 试剂(南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品)进行实时荧光定量反转录 PCR(qRT-PCR)检测。反应体系(20 μL)为正、反向引物各 1 μL,SYBR qPCR Master Mix 试剂 10 μL,cDNA 1 μL,最后用 ddH₂O 补足至 20 μL。扩增程序:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,55 °C 退火 30 s,40 次循环。每个样品重复 3 次。用 2^{-ΔΔCt} 方法计算相对表达水平^[34]。使用 Duncan's 新复极差法在 0.05 水平对各处理数据进行差异显著性检验。

表 1 生姜 ZoHSP70 家族基因与内参基因 RBP 的 qRT-PCR 扩增引物

Table 1 Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) amplification primers for ZoHSP70 family genes and reference gene RBP in ginger

基因 ID	基因名称	引物序列(5'→3')
Maker00044775	ZoHSP70-3	F:CAAAGAGCCAAACAAGGGG R:CCAAGGCTGACTGGAGCAA
Maker00023203	ZoHSP70-4	F:AAGGCAGTCATCACAGTCCC R:AAAAGTTCACACCACCCAGG
Maker00006071	ZoHSP70-10	F:CTGATGAGGCTGTGCTTATG R:GCTCTTTCTTTGTGGGGATG
Maker00037819	ZoHSP70-17	F:TAGGAAGTGGGGTTGATGTAAG R:AGAAATTGCTGCGGCTGT
Maker00030454	ZoHSP70-20	F:AAGCTGGTATCTTCGTGGAG R:GGGGATGGTAGTATTTCGTGTG
Maker00010347	ZoHSP70-24	F:TTCCCCAGATCACAGTTTGC R:GACTTGTACTTCTCCGCTTCC
Maker00000858	ZoHSP70-30	F:GGATCATCAATGAGCCAC R:AGACATCAAAAGTACCGCCA
Maker00001035	ZoHSP70-31	F:CTCGGATTGTTTCGGGAC R:AACGGCGAGTTAGTGCT
ACT	RBP	F:CCTATGAAGCGTAGAAACACAAG R:GAAGGACAACATCCCAAATC

2 结果与分析

2.1 生姜 *ZoHSP70* 家族基因及系统发育

经过序列比对和保守结构域分析,本研究从生姜基因组数据库中共鉴定出 31 个 *HSP70* 家族基因,将其命名为 *ZoHSP70-1~ZoHSP70-31*。对 18 个

拟南芥 *HSP70* 家族基因和 32 个水稻 *HSP70* 家族基因以及鉴定到的 31 个 *ZoHSP70* 家族基因构建系统发育树(图 1)。基于进化关系分析,生姜 *ZoHSP70* 家族基因可归类为 5 个亚家族,其中,第 VI 和第 I 亚家族基因最多,分别为 10 个和 9 个,第 IV 亚家族只有 *HSP70-2* 1 个基因。

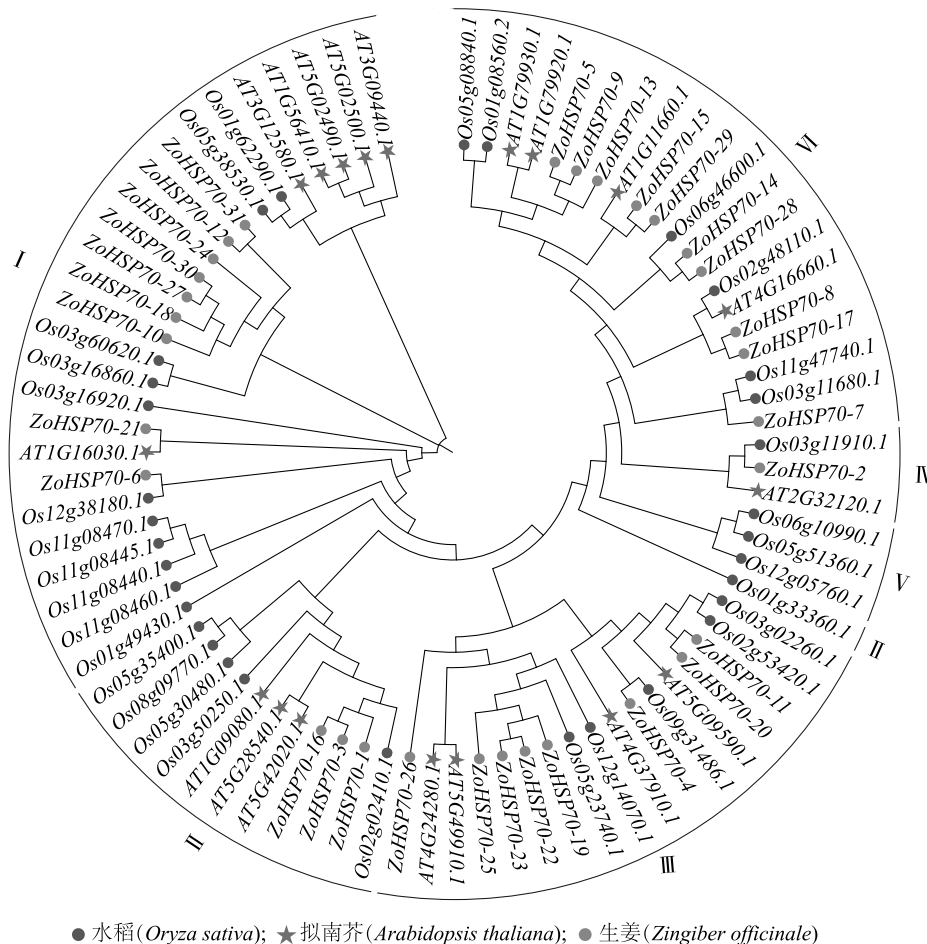


图 1 生姜、拟南芥和水稻 *HSP70* 家族基因的系统发育分析结果

Fig.1 Phylogenetic analysis of *HSP70* family genes in *Zingiber officinale*, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*

2.2 生姜 *ZoHSP70* 蛋白特征及亚细胞定位

31 个生姜 *ZoHSP70* 蛋白理化性质的基本信息如表 2 所示,*ZoHSP70* 蛋白的氨基酸序列平均长度为 609 aa,分布范围在 163 aa 至 909 aa 之间,其中,*ZoHSP70-6* 氨基酸序列长度最短 (163 aa),*ZoHSP70-17* 氨基酸序列长度最长 (909 aa)。*ZoHSP70-6* 相对分子量最低 (18 120),*ZoHSP70-17* 相对分子量最高 (101 610)。等电点平均值为 5.53,分布范围为 4.96~9.53,*HSP70-26* 的等电点大于 7.00,呈碱性,其余蛋白质的等电点均小于 7.00,

为酸性蛋白。*ZoHSP70* 蛋白不稳定系数介于 29.66 (*HSP70-1* 蛋白) 和 47.94 (*HSP70-14* 蛋白)。*HSP70-14*、*HSP70-13*、*HSP70-15*、*HSP70-9*、*HSP70-28*、*HSP70-20*、*HSP70-5*、*HSP70-8* 蛋白的不稳定系数在 40.00 以上,为不稳定蛋白,其余蛋白质不稳定系数在 40.00 以下,为稳定蛋白。*ZoHSP70* 蛋白亲水性指数为 -0.737~0.102,*HSP70-2* 蛋白和 *HSP70-26* 蛋白的亲水性指数大于 0,为疏水性蛋白,其余均小于 0,为亲水性蛋白。信号肽预测发现,*HSP70-1*、*HSP70-8*、*HSP70-17* 蛋白具有信号肽,为分泌蛋白,

其余蛋白质均不具备信号肽,不属于分泌蛋白。亚细胞定位预测分析发现,大部分 ZoHSP70 蛋白定位于线粒体,6 个分布在叶绿体,7 个定位于细胞核。此外,如图 2 所示,ZoHSP70 蛋白家族成员的二级结

构完整,其中 α 螺旋的占比最大,达到 33.45%~51.51%,其次是无规则卷曲,达到 26.67%~40.89%, β 转角的占比最少,仅占整体结构的 1.72%~11.04%。

表 2 生姜 ZoHSP70 蛋白的特性

Table 2 Characteristics of ZoHSP70 proteins in ginger

基因名称	基因 ID	ZoHSP70 家族基因编码的蛋白质						
		氨基酸序列长度(aa)	相对分子量	等电点	不稳定系数	亲水性指数	有无信号肽	亚细胞定位
ZoHSP70-1	Maker00012394	663	73 110	5.10	29.66	-0.458	有	细胞核、内质网
ZoHSP70-2	Maker00064336	595	64 490	5.54	38.58	0.102	无	线粒体
ZoHSP70-3	Maker00044775	547	60 630	4.96	30.95	-0.533	无	细胞核、内质网
ZoHSP70-4	Maker00023203	684	73 270	5.74	39.49	-0.267	无	线粒体
ZoHSP70-5	Maker00023287	845	93 340	5.08	41.55	-0.465	无	线粒体
ZoHSP70-6	Maker00055729	163	18 120	5.34	32.87	-0.257	无	线粒体
ZoHSP70-7	Maker00069587	586	63 940	5.68	35.08	-0.332	无	线粒体
ZoHSP70-8	Maker00013295	891	99 420	5.16	41.28	-0.404	有	线粒体
ZoHSP70-9	Maker00054348	811	89 980	5.59	42.78	-0.371	无	线粒体
ZoHSP70-10	Maker00006071	473	52 240	5.03	36.97	-0.512	无	线粒体
ZoHSP70-11	Maker00077723	676	72 870	5.39	38.42	-0.253	无	线粒体
ZoHSP70-12	Maker00077893	498	54 510	5.22	36.01	-0.448	无	细胞核
ZoHSP70-13	Maker00078144	895	99 010	5.20	44.53	-0.420	无	线粒体
ZoHSP70-14	Maker00078857	406	46 290	5.08	47.94	-0.703	无	线粒体
ZoHSP70-15	Maker00078991	414	46 400	6.43	43.82	-0.116	无	线粒体
ZoHSP70-16	Maker00050583	689	76 130	5.07	30.97	-0.401	无	细胞核、内质网
ZoHSP70-17	Maker00037819	909	101 610	5.14	39.06	-0.391	有	线粒体
ZoHSP70-18	Maker00068459	518	56 730	4.98	35.86	-0.431	无	线粒体、内质网
ZoHSP70-19	Maker00029056	700	74 980	5.13	31.70	-0.316	无	叶绿体
ZoHSP70-20	Maker00030454	713	77 000	6.18	42.04	-0.279	无	线粒体
ZoHSP70-21	Maker00057583	539	59 480	5.20	32.21	-0.467	无	线粒体、内质网
ZoHSP70-22	Maker00000308	690	74 320	5.11	32.51	-0.279	无	叶绿体
ZoHSP70-23	Maker00000597	819	87 870	6.40	37.96	-0.361	无	叶绿体
ZoHSP70-24	Maker00010347	475	52 340	5.03	35.67	-0.486	无	叶绿体
ZoHSP70-25	Maker00011681	699	74 830	5.34	34.86	-0.305	无	叶绿体
ZoHSP70-26	Maker00036744	555	59 280	9.53	33.91	0.054	无	叶绿体
ZoHSP70-27	Maker00061554	562	62 190	5.31	35.70	-0.377	无	细胞核
ZoHSP70-28	Maker00073429	431	49 790	5.53	42.13	-0.737	无	细胞核、线粒体
ZoHSP70-29	Maker00073455	465	51 770	6.61	39.59	-0.104	无	线粒体
ZoHSP70-30	Maker00000858	473	52 260	5.08	35.98	-0.522	无	线粒体
ZoHSP70-31	Maker00001035	499	54 630	5.21	33.02	-0.460	无	细胞核

2.3 生姜 ZoHSP70 家族基因结构和保守基序

对 ZoHSP70 家族基因的外显子、内含子结构进行可视化,结果如图 3A 所示。从图 3A 可知,生姜 31 个 ZoHSP70 家族基因均包含内含子与编码区域

(CDS),但在基因序列长度及内含子、外显子数量上具有明显差异。基因 ZoHSP70-6 和 ZoHSP70-11 的编码区域数量最多,均为 14 个,基因 ZoHSP70-5、ZoHSP70-7、ZoHSP70-10、ZoHSP70-18、ZoHSP70-28 和

ZoHSP70-31 均只包含 1 个编码区域,其余家族基因的编码区域数量在2~13 个。ZoHSP70-3、ZoHSP70-6、ZoHSP70-11、ZoHSP70-23、ZoHSP70-26 和 ZoHSP70-29 都包含上游和下游非翻译序列,基因 ZoHSP70-4、ZoHSP70-9、ZoHSP70-12、ZoHSP70-16、ZoHSP70-20、ZoHSP70-22 和 ZoHSP70-25 只含有下游非编码区,还

有 16 个家族基因上下游均不含非编码序列。如图 3B 所示,从 ZoHSP70 家族基因中鉴定到 10 个 motif,其中 ZoHSP70-14 不含 motif 结构; ZoHSP70-1、ZoHSP7-4 和 ZoHSP70-16 含有的 motif 最多,均为 10 个,此外,有 17 个 ZoHSP70 家族基因同时含有 motif6 和 motif7,说明 motif6 和 motif7 高度保守。

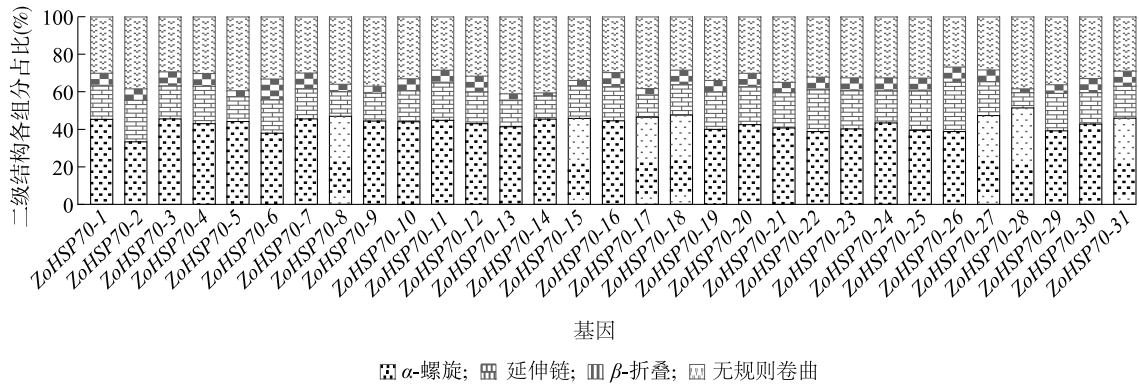


图 2 ZoHSP70 蛋白二级结构

Fig.2 Secondary structure of ZoHSP70 protein

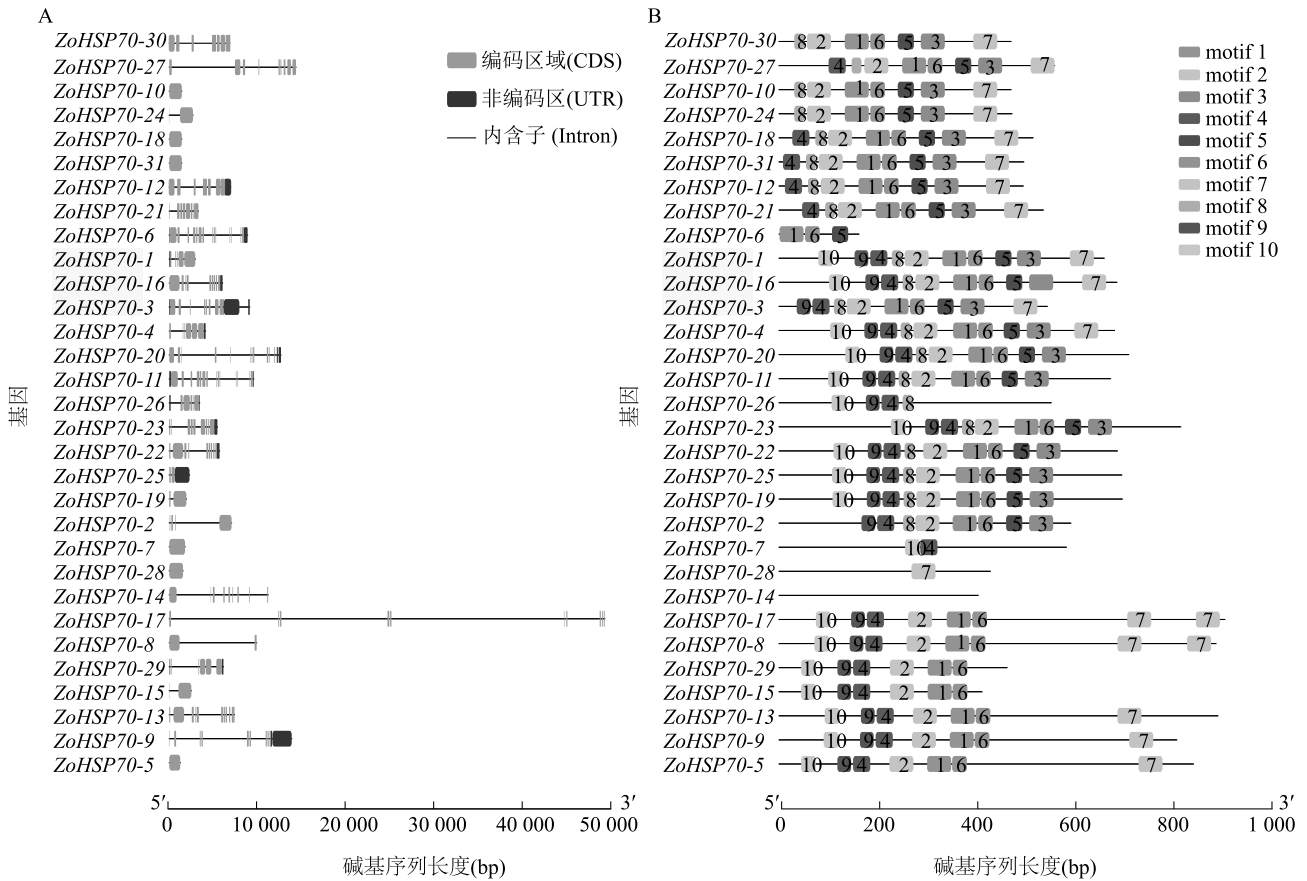


图 3 ZoHSP70 家族基因结构和保守基序

Fig.3 Gene structures and conserved motifs of ZoHSP70 family genes

2.4 生姜 *ZoHSP70* 家族基因的染色体定位

如图 4 所示,31 个 *ZoHSP70* 家族基因分别定位于 10 条不同的染色体上。其中,定位于 20 号染色体上的基因最多,有 8 个,12 号染色体和 8 号染色体上分别有 6 个和 4 个基因,18 号染色

体上定位到 3 个基因,2 号染色体、10 号染色体、16 号染色体、22 号染色体上分别定位到 2 个基因,4 号染色体和 14 号染色体上定位到的基因数量最少,均为 1 个基因。

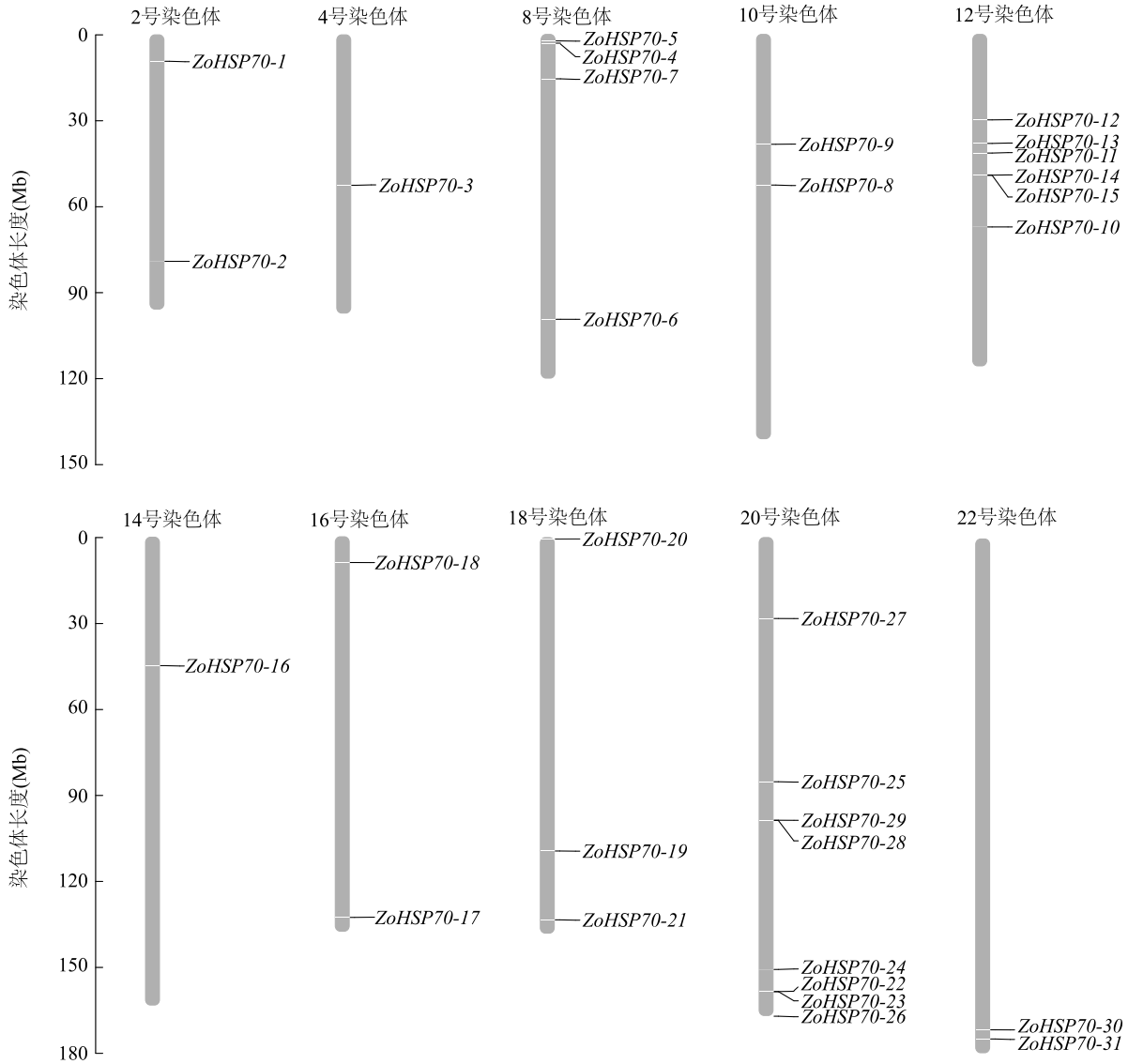


图 4 生姜 *ZoHSP70* 家族基因的染色体分布

Fig.4 Chromosomal distribution of *ZoHSP70* family genes in ginger

2.5 生姜 *ZoHSP70* 家族基因启动子区域顺式作用元件

如图 5 所示,从 31 个 *ZoHSP70* 家族基因上游 2 000 bp 启动子区域共鉴定到 58 种顺式作用元件,这些顺式作用元件分为光响应元件、生长发育响应元件、植物激素响应元件和逆境胁迫响应元

件 4 组。其中,光响应元件种类最多,有 21 种,植物激素响应元件和生长发育响应元件均有 13 种,逆境胁迫响应元件有 11 种。光响应元件 G-box 和 Box4 元件数量最多,分别有 111 个和 69 个。逆境响应元件中,*ZoHSP70* 家族基因中有 25 个含有厌氧诱导元件 ARE,且该元件数量最多,有 60 个。

生长发育响应元件中核心启动子元件 TATA 元件和 CAAT 元件数量最多, 分别有 1 029 个和 429 个, 且每个 *ZoHSP70* 家族基因都包含这 2 种元件。激素响应元件中, 茉莉酸甲酯响应元件 CGTCA 和

TGACG 数量分别为 92 个和 58 个, 脱落酸响应元件 ABRE 数量为 90 个, 24 个 *ZoHSP70* 家族基因含有该元件。

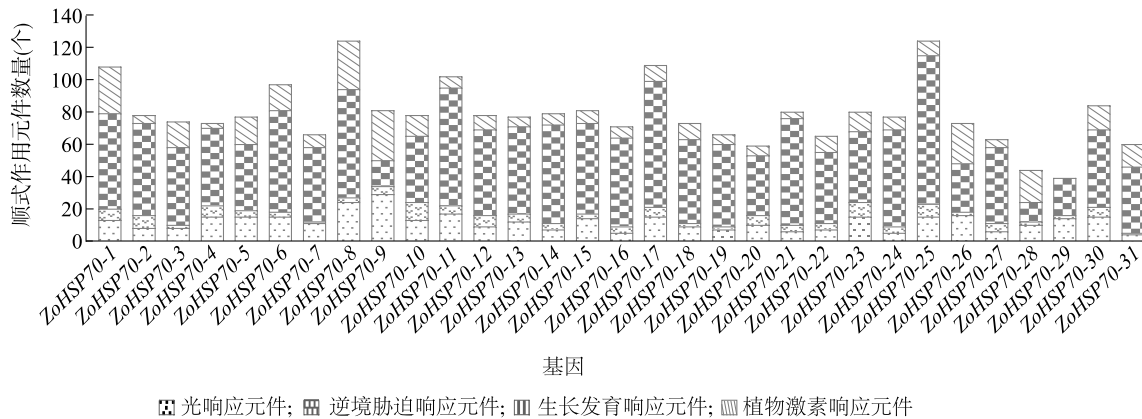


图 5 生姜 *ZoHSP70* 家族基因的顺式作用元件分析结果

Fig.5 Analysis results of *cis*-acting elements in *ZoHSP70* family genes of ginger

2.6 生姜 *ZoHSP70* 家族基因的共线性

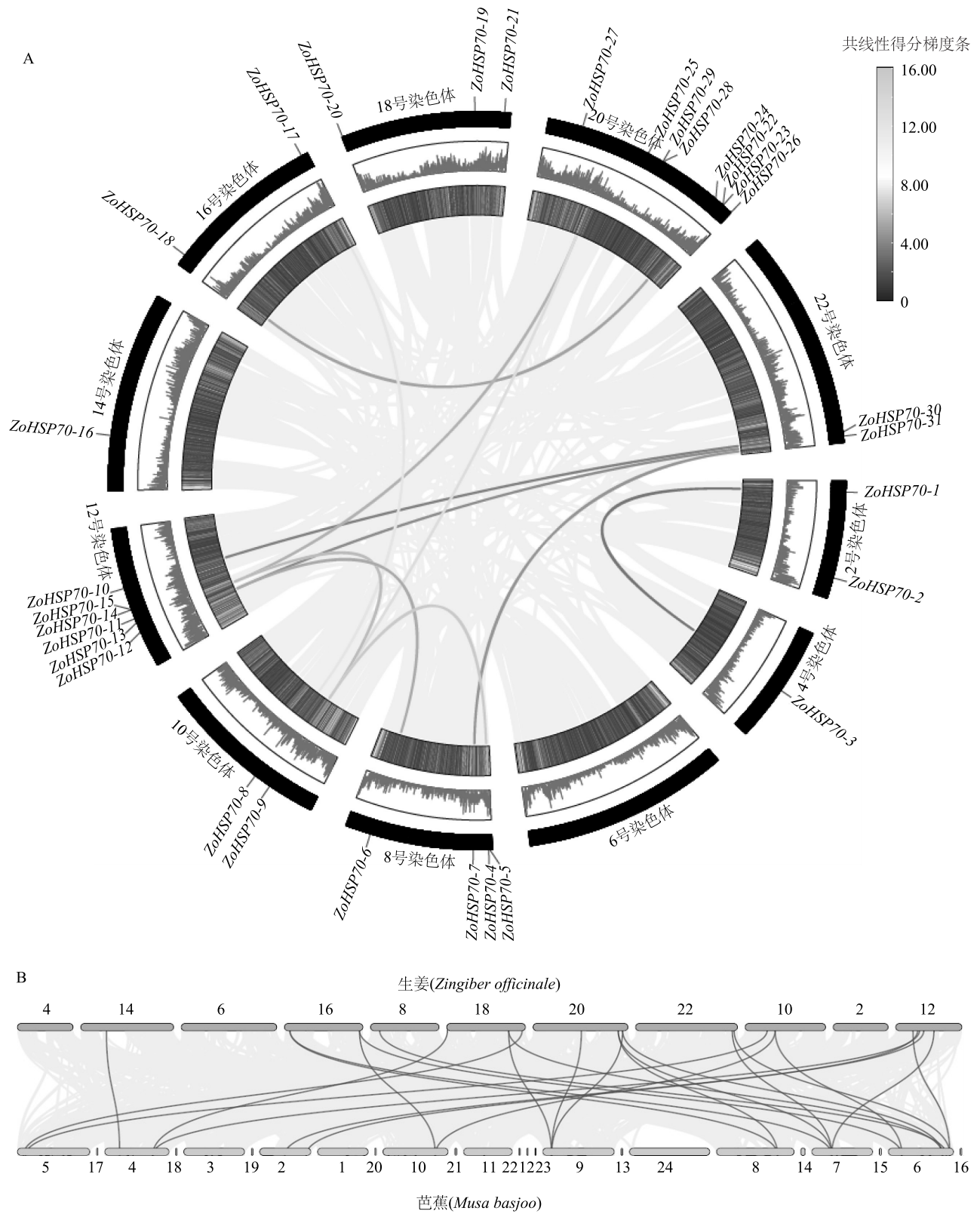
为进一步探究生姜物种内 *ZoHSP70* 家族基因的复制情况, 本研究对基因组进行共线性分析, 结果如图 6A 所示, 11 对 *ZoHSP70* 家族基因出现了片段复制, 分别分布在 2 号染色体、4 号染色体、8 号染色体、12 号染色体、16 号染色体和 20 号染色体上, 其中, 12 号染色体上有 5 个共线基因对。物种间的共线性关系如图 6B 所示, 生姜和芭蕉间有 25 对片段复制, 分别分布在生姜 8 号染色体、10 号染色体、12 号染色体、14 号染色体、16 号染色体、18 号染色体、20 号染色体和 22 号染色体上, 其中, 12 号染色体和 20 号染色体上共线基因对最多, 均为 5 对。

2.7 生姜 *ZoHSP70* 家族基因的表达模式

如图 7 所示, *ZoHSP70* 家族基因在生姜不同组织和处理下的表达模式具有较大差异。基因 *ZoHSP70-10*、*ZoHSP70-24* 和 *ZoHSP70-30* 在生姜红色茎外表皮 (RO)、红色茎内表皮 (RI)、根茎 (Rh)、绿色茎 (Gr) 中具有较高的表达量。*ZoHSP70-1*、*ZoHSP70-6*、*ZoHSP70-7*、*ZoHSP70-12*、*ZoHSP70-13*、*ZoHSP70-22*、*ZoHSP70-27*、*ZoHSP70-28*、*ZoHSP70-29*、*ZoHSP70-31* 等 10 个基因在这些组织中几乎不表达 (图 7A)。*ZoHSP70-10*、*ZoHSP70-16*、*ZoHSP70-24* 和 *ZoHSP70-30* 在根茎的 5 个不同部位中均有较高的表达量, *ZoHSP70-10* 和 *ZoHSP70-30* 在茎中的

表达量最高, *ZoHSP70-24* 在根中的表达量最高。*ZoHSP70-27*、*ZoHSP70-28* 和 *ZoHSP70-29* 在根茎的 5 个不同部位中均无表达 (图 7B)。在 4 °C 时, *ZoHSP70-10* 基因表达量与 CK (25 °C) 相比下降, 在 12 °C 时其表达量出现回升, 此外 *ZoHSP70-10* 相较于同家族其他基因在不同温度下均有较高的表达量; *ZoHSP70-30* 基因表达量在 4 °C 时与 CK 相比为上调表达, 12 °C 时其表达量虽然低于 4 °C 时, 但仍高于 CK; *ZoHSP70-24* 在 4 °C 时与 CK 相比为下调表达, 12 °C 时特异性高表达 (图 7C)。

基因 *ZoHSP70-10* 在单独接种腐皮镰刀菌后有着较高的表达水平; 接种腐皮镰刀菌+壳聚糖处理 1 d 表达量降至最低水平, 接种腐皮镰刀菌+壳聚糖后 3 d 表达量回升。*ZoHSP70-1*、*ZoHSP70-3*、*ZoHSP70-5*、*ZoHSP70-16*、*ZoHSP70-24* 和 *ZoHSP70-30* 等多个基因在接种腐皮镰刀菌后随着处理时间的推移表达量逐渐降低。基因 *ZoHSP70-27* 在不同处理下均不表达 (图 7D)。基因 *ZoHSP70-10* 在低温胁迫处理后表达量显著升高, 与单独低温胁迫处理相比, 低温加褪黑素处理下基因 *ZoHSP70-10* 的表达量显著下调。同 CK 相比, 低温胁迫和低温胁迫加褪黑素处理下, 基因 *ZoHSP70-24* 和 *ZoHSP70-30* 表达显著下调。此外, 与 CK 相比, 在褪黑素处理下基因 *ZoHSP70-16* 的表达量显著升高 (图 7E)。



A: ZoHSP70 家族基因种内共线性分析; B: 生姜 HSP70 家族基因和芭蕉 HSP70 家族基因共线性分析(图上数字表示染色体名称)。

图6 生姜 ZoHSP70 基因种内及种间共线性分析结果

Fig.6 Intraspecific and interspecific collinearity analysis results of ZoHSP70 genes in ginger

ZoHSP70 家族基因在不同非生物胁迫下生姜叶片、根、根茎和茎中的表达情况如图 7F 所示。基因 *ZoHSP70-10* 在各处理下的表达水平均是整个家族基因中最高的。与 CK 相比,在盐胁迫下叶片中基因 *ZoHSP70-4*、*ZoHSP70-16*、*ZoHSP70-19* 和 *ZoHSP70-24* 的表达量显著高于 CK。此外,与 CK 相比,盐胁迫下 *ZoHSP70-24* 在根中显著下调表达,基因 *ZoHSP70-16* 盐胁迫下在根茎中显著上调表达。干旱胁迫下,基因 *ZoHSP70-24* 在生姜根系中具有较高的表达水平,与 CK 相比,干旱胁迫下基因 *ZoHSP70-10*、*ZoHSP70-30* 和 *ZoHSP70-31* 在根系中均上调表达。淹水胁迫下,基因 *ZoHSP70-10* 的表达量下调,淹水胁迫前纳米硅处理,其表达量与 CK 持平。淹水胁迫下基因 *ZoHSP70-3*、*ZoHSP70-4*、*ZoHSP70-12*、*ZoHSP70-31* 在根系中显著上调表达,淹水胁迫前纳米硅处理,这些基因的表达水平降低。淹水胁迫下基因 *ZoHSP70-24* 在根系中显著下调表达,淹水胁迫前纳米硅处理,其表达量进一步降低。此外,淹水胁迫下基因 *ZoHSP70-10* 在生姜根系中下调表达,而淹水胁迫前纳米硅处理,其表达量上升。

2.8 miRNA 对 *ZoHSP70* 家族基因转录后的调控

miRNA 与 *ZoHSP70* 家族基因之间的靶向关系分析结果显示,23 个 *ZoHSP70* 家族基因可能受到 53 个生姜 miRNA 的转录后调控。其中,miR169e_3 通过翻译抑制调控 *ZoHSP70-4* 基因的表达,miR171b-5p_1 通过翻译抑制调控 *ZoHSP70-13* 基因的表达,miR396g-5p_1 通过翻译抑制调控 *ZoHSP70-7* 基因的表达,miR477a_4 通过翻译抑制调控 *ZoHSP70-29* 基因的表达,miR319b-3p 和 miR319b_2 可能同时通过翻译抑制调控 *ZoHSP70-27* 基因的表达,而其余 47 个 miRNA 则以剪切抑制调控 *ZoHSP70* 基因的表达。同一个 miRNA 可靶向多个 *ZoHSP70* 基因,miR396b-5p 可能靶向 5 个 *ZoHSP70* 基因,包括基因 *ZoHSP70-6*、*ZoHSP70-16*、*ZoHSP70-24*、*ZoHSP70-25* 和 *ZoHSP70-26*。miR396d 可能靶向基因 *ZoHSP70-19*、*ZoHSP70-22*、*ZoHSP70-23*、*ZoHSP70-25* 和 *ZoHSP70-26*。此外,miR396a-5p 和 miR396b-5p 可能同时靶向基因 *ZoHSP70-24* 和 *ZoHSP70-26*,而 14 个 miRNA 可能共同调控基因 *ZoHSP70-27* 的表达。10 个 miRNA 可能共同调控基因 *ZoHSP70-25* 的表达。这一发现表明多个 miRNA 可以靶向调控 *ZoHSP70* 家族基因,形成错综复杂的 miRNA-mRNA 调控网络,参与 *ZoHSP70* 家族基因转

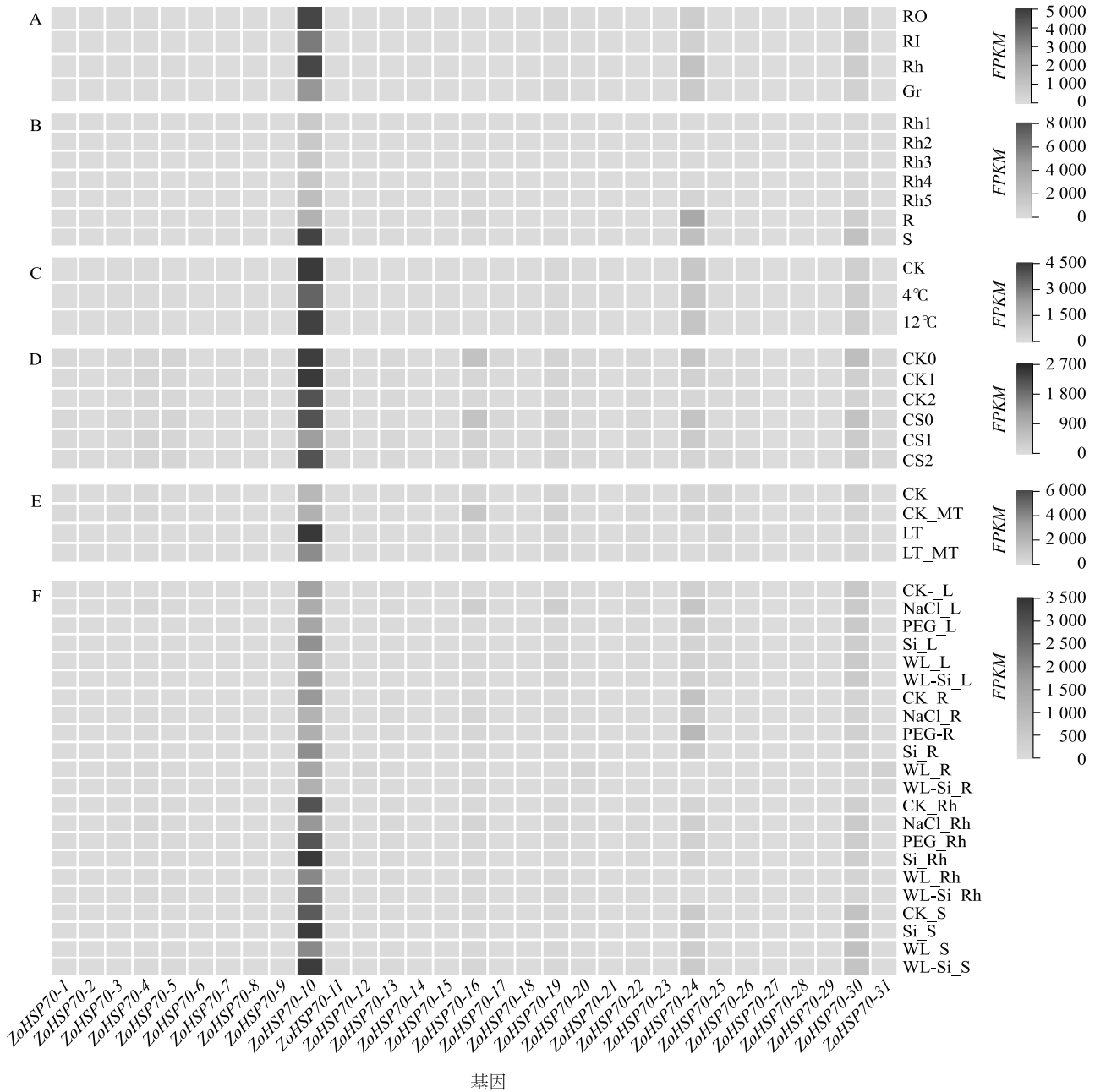
录后的调控和表达重塑。

2.9 基于 qRT-PCR 分析的生姜 *ZoHSP70* 家族基因表达水平

为进一步探索 *ZoHSP70* 家族基因在高温胁迫下的表达量,本研究采用 qRT-PCR 对挑选的 8 个 *ZoHSP70* 家族基因(*ZoHSP70-3*、*ZoHSP70-4*、*ZoHSP70-10*、*ZoHSP70-17*、*ZoHSP70-20*、*ZoHSP70-24*、*ZoHSP70-30*、*ZoHSP70-31*)的表达量进行分析。结果(图 8)显示,与 0 h 相比,高温胁迫 4 h、8 h、12 h、24 h 和 48 h 时 8 个基因的表达整体呈现显著上升趋势($P < 0.05$)。基因 *ZoHSP70-3* 在整个处理时间表达量呈现先升高后降低再升高再降低的变化趋势,24 h 时表达量达到峰值;基因 *ZoHSP70-4*、*ZoHSP70-10* 和 *ZoHSP70-20* 在高温处理 4 h 时表达量最高;基因 *ZoHSP70-17* 和 *ZoHSP70-31* 在高温处理 24 h 时表达量最高。基因 *ZoHSP70-24* 在高温处理 4 h 时表达量急剧下降,然后随着高温处理时间延长其基因表达量迅速上升,并在 24 h 达到峰值。基因 *ZoHSP70-30* 表达量呈现先急剧升高后大幅下降再趋于稳定的趋势,高温处理 8 h 时其表达量最高。

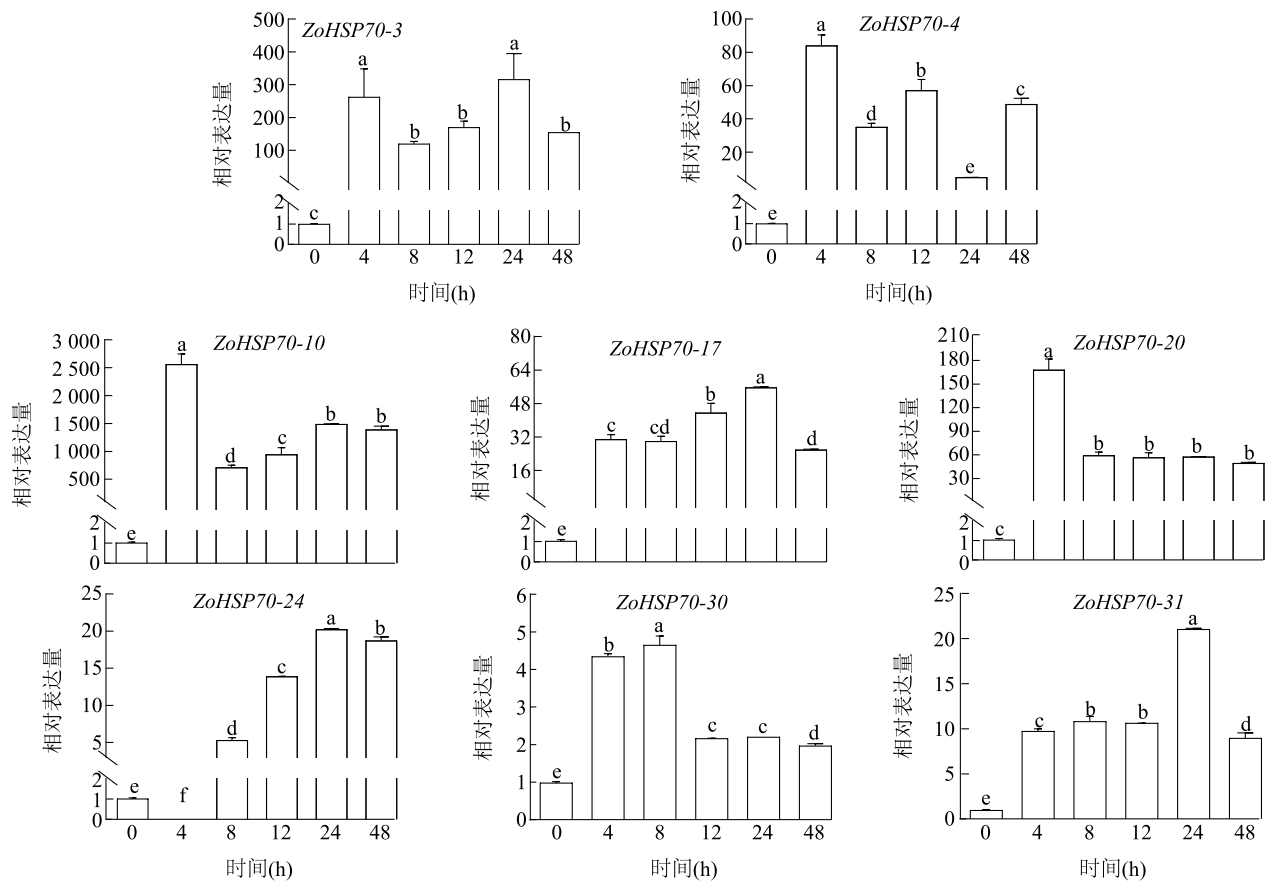
3 讨论

近年来生姜产业已成为乡村振兴的关键产业之一^[35],随着全球气候变暖,极端高温对生姜生长发育造成不利影响,严重限制了其产业的可持续发展^[36]。本研究利用生物信息技术对生姜 *HSP70* 家族基因进行系统鉴定,从生姜基因组数据库中鉴定出 31 个 *ZoHSP70* 家族基因。通过构建生姜、拟南芥和水稻的 *HSP70* 家族基因系统发育进化树,初步将 *ZoHSP70* 家族基因分为 5 个亚家族。对 *ZoHSP70* 家族基因编码蛋白的理化特性分析结果显示,绝大多数 *ZoHSP70* 蛋白为亲水性蛋白,且具有较高的蛋白质稳定性。亚细胞定位预测结果表明,大多数 *ZoHSP70* 蛋白亚细胞定位于线粒体和叶绿体中,另有部分成员分别定位于细胞核及内质网中。凡超等^[26]对荔枝 LcHSP70 蛋白进行亚细胞定位预测发现,其家族蛋白质多数定位于细胞质,少数定位于细胞核、线粒体和内质网中,与本研究结果具有相似性。而徐波等^[37]对薏苡 ClHSP70 蛋白的预测结果显示,该物种 HSP70 蛋白除分布于上述亚细胞结构外,还存在质膜与胞外。上述研究结果表明,*ZoHSP70* 蛋白可在植物细胞的多个位点行使生物学功能,同时也反映出 HSP70 蛋白的亚细胞定位模式在不同物种间存在一定差异性。



A: 生姜不同组织 *ZoHSP70* 家族基因的表达量 (RO: 红色茎外皮; RI: 红色茎内表皮; Rh: 根茎; Gr: 绿色茎)。B: 生姜不同发育阶段及根和茎中 *ZoHSP70* 家族基因的表达量 (Rh1~Rh5: 根茎由下而上 5 个不同部位; R: 根; S: 茎)。C: 不同温度处理下生姜根茎中 *ZoHSP70* 家族基因的表达量 (CK: 对照, 25 °C)。D: 壳聚糖处理不同时间以及接种腐皮镰刀菌并添加壳聚糖处理后不同时间根茎中 *ZoHSP70* 家族基因的表达量 (CK0: 对照, 壳聚糖处理当天; CK1: 壳聚糖处理后 1 d; CK2: 壳聚糖处理后 2 d; CS0: 接种腐皮镰刀菌并添加壳聚糖处理当天; CS1: 接种腐皮镰刀菌并添加壳聚糖处理 1 d; CS2: 接种腐皮镰刀菌并添加壳聚糖处理 2 d)。E: 冷害及褪黑素处理后生姜中 *ZoHSP70* 家族基因的表达量 (CK: 对照, 25 °C; CK_MT: 对照, 褪黑素处理; LT: 冷害处理, 2 °C; LT_MT: 褪黑素加 2 °C 冷害处理)。F: 不同非生物胁迫下生姜各组织中 *ZoHSP70* 家族基因的表达量 (CK_L: 对照叶片; NaCl_L: 盐胁迫处理叶片; PEG_L: 干旱胁迫处理叶片; Si_L: 喷施纳米硅溶液处理叶片; WL_L: 淹水胁迫处理叶片; WL_Si_L: 淹水胁迫前喷施纳米硅溶液处理叶片; CK_R: 对照根; NaCl_R: 盐胁迫处理根; PEG_R: 干旱胁迫处理根; Si_R: 喷施纳米硅溶液处理根; WL_R: 淹水胁迫处理根; WL_Si_R: 淹水胁迫前叶面喷施纳米硅溶液处理根; CK_Rh: 对照根茎; NaCl_Rh: 盐胁迫处理根茎; PEG_Rh: 干旱胁迫处理根茎; Si_Rh: 喷施纳米硅溶液处理根茎; WL_Rh: 淹水胁迫根茎; WL_Si_Rh: 淹水胁迫前叶面喷施纳米硅溶液处理根茎; CK_S: 对照茎; Si_S: 喷施纳米硅溶液处理茎; WL_S: 淹水胁迫茎; WL_Si_S: 淹水胁迫前叶面喷施纳米硅溶液处理茎)。FPKM: 每百万条比对上的读段中, 每千碱基长度的转录本所对应的片段数。

图 7 生姜 *ZoHSP70* 家族基因在不同组织和处理下的表达量
 Fig.7 Expression levels of ginger *ZoHSP70* family genes under different tissues and treatments



图柱上不同小写字母表示不同处理时间间差异显著($P < 0.05$)。

图8 8个生姜 *ZoHSP70* 家族基因在高温胁迫下的表达量

Fig.8 Expression levels of eight *ZoHSP70* family genes in ginger under high temperature stress

基因编码区的保守基序是生物体中一种重要的功能和进化标志,它们在基因表达调控、蛋白质功能维持以及生物进化研究中都具有重要意义^[38]。根据系统发育进化树可知,生姜 *ZoHSP70* 家族基因可分为5个亚家族。将生姜保守基序与系统进化树结合分析发现,位于同一系统发育分组的 *ZoHSP70* 家族基因具有相似的保守基序,而不同分组的保守基序的数量及类型各不相同且有特定的基序出现。第I亚家族 *ZoHSP70-6* 和第VI亚家族 *ZoHSP70-28* 保守基序较少,第VI亚家族 *ZoHSP70-14* 甚至没有保守基序。较少的保守基序可能使得基因组在进化过程中更容易发生变异和重组,使生物体具有更强的进化灵活性,从而快速适应环境变化。外显子和内含子在基因表达和调控中相互协作,共同确保基因的正确转录、剪接和翻译,在基因结构的进化和功能分化中起着至关重要的作用^[39]。生姜 *ZoHSP70* 家族基因结构显示, *ZoHSP70* 家族基因编码区域数量介于1~14个,不同

基因的外显子和内含子结构具有一定差异。类似的,玉米^[40]、枣树^[41]、棉花^[42]等物种中所鉴定到的 *HSP70* 家族基因均包含了丰富的内含子和外显子结构,同一亚家族内的基因在内含子和外显子结构上具有较高的相似性,而不同亚家族基因间具有较大差异。这些结构的差异可以增加基因功能的多样性,有助于植物在不同的逆境条件下调节基因表达,进而增强其适应能力。

基因复制包括串联复制和片段复制,是基因家族扩张和植物基因组进化的主要驱动力^[43]。前人研究发现,12个黄瓜 *CsHSP70* 家族基因中出现了1对片段复制基因^[44];21个南瓜 *CmoHSP70* 家族基因中出现9对片段复制基因^[45],说明片段复制是南瓜和黄瓜 *HSP70* 家族基因扩张的主要驱动力。本研究中31个生姜 *ZoHSP70* 家族基因出现了11对片段复制基因,这表明,生姜 *ZoHSP70* 家族基因可能主要以片段重复促进其基因家族的扩增和进化。鉴于生姜和芭蕉在进化中

有着较为相近的亲缘关系^[46],本研究对生姜和芭蕉 HSP70 家族基因进行共线性分析,发现生姜与芭蕉 HSP70 家族基因存在 25 对大片段复制基因,表明生姜与芭蕉的 HSP70 家族基因具有较高的同源性。

启动子顺式作用元件是转录因子的结合位点,决定转录效率并调控下游基因的表达,影响植物胁迫响应、激素响应和生长发育进程等多种过程^[47]。相关研究结果表明,HSP70 家族基因广泛响应植物的生长发育及抗逆性调控^[48]。本研究在 ZoHSP70 家族基因上游 2 000 bp 的启动子区域共鉴定到 58 种顺式作用元件,涉及光响应、逆境胁迫响应、生长发育响应、激素响应 4 大类。光响应元件与逆境胁迫响应元件分析结果显示,G-box(光响应元件)与 Box4(光响应元件)的数量占比最高,其次为 GT1-motif(光响应元件)与 ARE(厌氧诱导响应元件)。彭慧敏等^[36]对荔枝 HSP70 家族基因的研究发现,18 个 LcHSP70 基因的启动子区域共包含 47 个 ARE 元件、58 个 G-box 元件、43 个 Box4 元件,该研究结果与本研究的元件分布特征一致。此外,本研究中与生长发育相关的顺式作用元件以 TATA-box 和 CAAT-box 为核心元件;在激素响应元件中,CGTCA(茉莉酸甲酯响应元件)的数量最多,其次为 ABRE(脱落酸响应元件)。丁亚东等^[49]研究发现,辣椒 20 个 CaHSP70 家族基因中,有 17 个基因的启动子区域含有 CGTCA 元件,16 个含有 ABRE 元件。Ni 等^[16]的研究结果证实,棉花 GhHSP70-26 家族基因的启动子区域存在 ABRE 元件,且该元件可通过响应脱落酸(ABA)信号介导棉花的逆境胁迫响应过程。综上分析推测,ZoHSP70 家族基因可能通过启动子区域内的各类顺式作用元件在调控生姜生长发育进程、介导植物激素信号应答以及响应非生物胁迫等方面发挥重要作用。

植物微小 RNA(miRNA)可通过抑制靶基因的转录或翻译实现其负调控作用,在植物生长发育及逆境胁迫响应中发挥重要作用^[50]。例如,miR396 通过靶向生长调节因子(Growth-regulating factors,GRF)来调节细胞的增殖和分化,从而影响拟南芥的生长发育,并增强其抗逆能力^[51]。在烟草中过表达 Sp-miR396a-5p 可以增加水分保持能力、脯氨酸含量,并减少活性氧(ROS)的积累,从而提高烟草对盐、干旱和冷害的耐受性^[52]。本研究发现 miR396b-5p 和 miR396d 等都可能靶向多个 ZoHSP70 蛋白,推测

miRNA396 可能与 ZoHSP70 蛋白形成调控模块影响生姜的生长发育以及应激响应,因此,后续可通过分子生物学试验进一步解析 miR396 如何调控 ZoHSP70 家族基因来介导植物对胁迫的响应。

为进一步揭示 ZoHSP70 家族基因在生姜不同组织及生长条件下的表达模式,本研究借助已发表的生姜基因转录组数据,分析了 ZoHSP70 家族基因在不同生长时期、不同部位以及不同生长条件下的表达情况。结果表明,基因 ZoHSP70-10 在生姜不同组织和不同生长条件下的表达量是整个 ZoHSP70 家族基因中最高的,且在低温胁迫下显著上调,推测其在生姜生长发育调控及低温响应中具有重要作用。大量研究结果证实,HSP70 家族基因参与植物的逆境响应,例如,甜菜 *BtHSP70-2*、*BtHSP70-15* 和 *BtHSP70-17* 基因受盐胁迫诱导后上调表达^[8]。苹果 *MdHSP70-38* 基因在盐胁迫下被诱导显著上调表达,且过表达该基因的苹果植株耐盐性增强^[53]。*GhHSP70-26* 基因正向调控棉花的干旱胁迫响应^[16]。黄瓜 *CsHSP70-1* 基因受干旱胁迫诱导后显著上调表达^[44]。本研究中,ZoHSP70 家族基因在多种非生物胁迫或生物胁迫下被显著诱导,例如,ZoHSP70-10 基因在不同生长条件下均有较高表达量,ZoHSP70-31 基因在淹水胁迫下表达水平升高,ZoHSP70-24 基因在盐胁迫和低温胁迫下被显著诱导,说明 ZoHSP70 家族基因的表达受到不同胁迫的诱导,因此,后续应进一步探究不同 ZoHSP70 家族基因在生姜胁迫响应中的具体作用机制。

大量研究结果表明,HSP70 家族基因受到高温胁迫的诱导,例如,枣树中,ZjHSP70-3、ZjHSP70-5、ZjHSP70-6 等多个 HSP70 家族基因在 42 °C 高温胁迫下被显著诱导^[41]。在大豆中,61 个 GmHSP70 家族基因中有 55 个在 42 °C 的高温处理下表现出上调表达,上调倍数从 2 倍到 241 倍不等^[14]。番茄的 25 个 HSP70 家族基因中有 20 个在高温胁迫下显著上调表达,尤其是 *SlHSP70-20*、*SlHSP70-22* 受高温诱导上调表达最显著^[54]。为了进一步验证生姜 ZoHSP70 家族基因在高温胁迫下的表达模式,本研究挑选了 8 个在多数组织和逆境胁迫处理下均有表达的基因进行 qRT-PCR 检测,发现与 0 h 相比,基因 ZoHSP70-4、ZoHSP70-10 和 ZoHSP70-20 在高温胁迫 4 h、8 h、24 h、48 h 表达均显著上调,且在高温胁迫 4 h 表达量最高,说明这几个基因对高温胁迫的响应较早。其余 5 个基因也都不同程度响应高温胁迫,推测这些基因可能在生姜耐热性中发

挥关键作用,但其具体功能有待进一步探究。

4 结论

本研究从生姜基因组数据库中共鉴定出 31 个 *ZoHSP70* 家族基因,系统发育分析将其分为 5 个亚家族。大多 *ZoHSP70* 蛋白为亲水性蛋白,亚细胞定位于多个部位,主要定位于叶绿体、线粒体中。除 1 个蛋白质为碱性外其余均为酸性蛋白。表达模式分析结果显示,*ZoHSP70* 家族基因可能参与调控生姜生长发育和非生物胁迫响应,对高温胁迫的响应尤为显著,但不同 *ZoHSP70* 家族基因在应答非生物胁迫时的具体表达模式和功能有待进一步深入探究。

参考文献:

- [1] ZHANG H M, ZHU J H, GONG Z Z, et al. Abiotic stress responses in plants[J]. Nature Reviews Genetics, 2022, 23(2): 104-119.
- [2] QIAN D, WANG M X, NIU Y, et al. Sexual reproduction in plants under high temperature and drought stress[J]. Cell Reports, 2025, 44(3): 115390.
- [3] SINGH G, SARKAR N K, GROVER A. HSP70, sHSPs and ubiquitin proteins modulate HsfA6a-mediated HSP101 transcript expression in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Physiologia Plantarum, 2021, 173(4): 2055-2067.
- [4] SHAN Q, MA F T, WEI J Y, et al. Physiological functions of heat shock proteins[J]. Current Protein & Peptide Science, 2020, 21(8): 751-760.
- [5] MONDAL S, KARMAKAR S, PANDA D, et al. Crucial plant processes under heat stress and tolerance through heat shock proteins[J]. Plant Stress, 2023, 10: 100227.
- [6] USMAN M G, RAFII M Y, MARTINI M Y, et al. Molecular analysis of HSP70 mechanisms in plants and their function in response to stress[J]. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, 2017, 33(1): 26-39.
- [7] 逢洪波, 潘英杰, 李嘉琦, 等. 向日葵 *HSP70* 基因家族成员的全基因组鉴定与生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(18): 5918-5929.
- [8] ALAM P, AL BALAWI T, MANZOOR M A, et al. Genome-wide analysis of *HSP70* gene family in *Beta vulgaris* and in-silico expression under environmental stress [J]. BMC Plant Biology, 2025, 25(1): 214.
- [9] JASROTIA R S, JAISWAL S, YADAV P K, et al. Genome-wide analysis of HSP70 family protein in *Vigna radiata* and coexpression analysis under abiotic and biotic stress[J]. Journal of Computational Biology, 2020, 27(5): 738-754.
- [10] BERKA M, KOPECKÁ R, BERKOVÁ V, et al. Regulation of heat shock proteins 70 and their role in plant immunity[J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(7): 1894-1909.
- [11] LIN B L, WANG J S, LIU H C, et al. Genomic analysis of the HSP70 superfamily in *Arabidopsis thaliana* [J]. Cell Stress & Chaperones, 2001, 6(3): 201-208.
- [12] SARKAR N K, KUNDNANI P, GROVER A. Functional analysis of HSP70 superfamily proteins of rice (*Oryza sativa*) [J]. Cell Stress and Chaperones, 2013, 18(4): 427-437.
- [13] 宋晋辉, 马海莲, 瓮巧云, 等. 玉米 *HSP70* 基因家族的全基因组鉴定与分析[J]. 核农学报, 2017, 31(7): 1245-1254.
- [14] ZHANG L, ZHAO H K, DONG Q L, et al. Genome-wide analysis and expression profiling under heat and drought treatments of *HSP70* gene family in soybean (*Glycine max* L.) [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 773.
- [15] CHO E K, CHOI Y J. A nuclear-localized *HSP70* confers thermo-protective activity and drought-stress tolerance on plants [J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(4): 597-606.
- [16] NI Z Y, LIU N, YU Y H, et al. The cotton 70-kDa heat shock protein GhHSP70-26 plays a positive role in the drought stress response [J]. Environmental and Experimental Botany, 2021, 191: 104628.
- [17] TABUSAM J, SHI Q L, FENG D L, et al. *HSP70* gene family in *Brassica rapa*: genome-wide identification, characterization, and expression patterns in response to heat and cold stress [J]. Cells, 2022, 11(15): 2316.
- [18] SONG P, JIA Q R, XIAO X K, et al. HSP70-3 interacts with phospholipase *dδ* and participates in heat stress defense [J]. Plant Physiology, 2021, 185(3): 1148-1165.
- [19] GUO M, LIU J H, MA X, et al. Genome-wide analysis of the *HSP70* family genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) and functional identification of *CaHSP70-2* involvement in heat stress [J]. Plant Science, 2016, 252: 246-256.
- [20] JUNGKUNZ I, LINK K, VOGEL F, et al. *AtHSP70-15*-deficient *Arabidopsis* plants are characterized by reduced growth, a constitutive cytosolic protein response and enhanced resistance to *TuMV* [J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2011, 66(6): 983-995.
- [21] 胡秀丽, 李艳辉, 杨海荣, 等. *HSP70* 可提高干旱高温复合胁迫诱导的玉米叶片抗氧化防护能力 [J]. 作物学报, 2010, 36(4): 636-644.
- [22] 朱永兴, 江怡梵, 尹军良, 等. 猕猴桃/生姜间作对生姜光合特性及产量的影响 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2025, 40(1): 128-134.
- [23] 唐宁, 吕健飞, 谢奇珩, 等. 不同种植年限生姜土壤质量变化规律 [J]. 浙江农业科学, 2023, 64(10): 2413-2417.
- [24] 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.
- [25] 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(1): 189.

- [26] 凡超,杨杰,陈蓉,等.荔枝 *HSP70* 家族鉴定及其响应非生物胁迫的表达分析[J].生物工程学报,2024,40(4):1102-1119.
- [27] 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.
- [28] JIANG Y S, HUANG M J, ZHANG M X, et al. Transcriptome analysis provides novel insights into high-soil-moisture-elevated susceptibility to *Ralstonia solanacearum* infection in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe cv. Southwest) [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 132: 547-556.
- [29] HUANG M J, XING H T, LI Z X, et al. Identification and expression profile of the soil moisture and *Ralstonia solanacearum* response CYPome in ginger (*Zingiber officinale*) [J]. *Peer J*, 2021, 9: 11755.
- [30] XING H T, LI Y, REN Y, et al. Genome-wide investigation of microRNAs and expression profiles during rhizome development in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) [J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 49.
- [31] FANG Z W, JIANG W Q, HE Y Q, et al. Genome-wide identification, structure characterization, and expression profiling of dof transcription factor gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Agronomy*, 2020, 10(2): 294.
- [32] WANG W P, CUI H, XIAO X F, et al. Genome-wide identification of cotton (*Gossypium* spp.) trehalose-6-phosphate phosphatase (*TPP*) gene family members and the role of *GhTPP22* in the response to drought stress [J]. *Plants*, 2022, 11(8): 1079.
- [33] YIN J L, YAN J H, HOU L, et al. Identification and functional deciphering suggested the regulatory roles of long intergenic ncRNAs (lincRNAs) in increasing grafting pepper resistance to *Phytophthora capsici* [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 868.
- [34] YIN J L, LIU M Y, MA D F, et al. Identification of circular RNAs and their targets during tomato fruit ripening [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, 136: 90-98.
- [35] 刘小岑,吴艳碧,田野,等.干旱胁迫对不同品种生姜苗期生长发育的影响[J].南京农业大学学报,2024,47(5):843-853.
- [36] 彭慧敏,马佳伟,李港,等.生姜-葡萄立体间作模式对生姜夏季的生长、光合及抗氧化酶的影响[J].山东农业大学学报(自然科学版),2023,54(2):159-165.
- [37] 徐波,周晨卉,李项辉,等.薏苡(*Coix lacryma-jobi* L.) *HSP70* 基因家族鉴定及在高温和干旱胁迫下的表达[J].应用与环境生物学报,2025,31(4):604-617.
- [38] 尹军良,李婧怡,韩硕,等.生姜 *NHX* 基因家族成员鉴定及其在硅缓解盐胁迫中的表达特征[J].中国农业科学,2024,57(19):3848-3869.
- [39] 郭昌权,李丹琪,惠馨冉,等.姜 *DUF966* 基因家族成员鉴定与表达分析[J].园艺学报,2024,51(9):2031-2047.
- [40] JIANG L Y, HU W J, QIAN Y X, et al. Genome-wide identification, classification and expression analysis of the *HSF* and *HSP70* gene families in maize [J]. *Gene*, 2021, 770: 145348.
- [41] PANZADE K P, KALE S S, CHAVAN N R, et al. Genome-wide analysis of *HSP70* and *HSP100* gene families in *Ziziphus jujuba* [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2021, 26(2): 341-353.
- [42] REHMAN A, ATIF R M, QAYYUM A, et al. Genome-wide identification and characterization of *HSP70* gene family in four species of cotton [J]. *Genomics*, 2020, 112(6): 4442-4453.
- [43] 席克勇,田野,王艳红,等.生姜 *IPY* 基因家族的鉴定与表达分析[J].植物遗传资源学报,2024,25(2):279-293.
- [44] ZHOU Z X, XIAO L D, ZHAO J D, et al. Comprehensive genomic analysis and expression profile of *HSP70* gene family related to abiotic and biotic stress in cucumber [J]. *Horticulturae*, 2023, 9(9): 1057.
- [45] DAVOUDI M, CHEN J F, LOU Q F. Genome-wide identification and expression analysis of heat shock protein 70 (*HSP70*) gene family in pumpkin (*Cucurbita moschata*) rootstock under drought stress suggested the potential role of these chaperones in stress tolerance [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1918.
- [46] XIAO D Y, JIANG Y J, WANG Z F, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the *HSP90* gene family in relation to developmental and abiotic stress in ginger (*Zingiber officinale* roscoe) [J]. *Plants*, 2025, 14(11): 1660.
- [47] 王艳红,席克勇,田野,等.姜 *GST* 基因家族成员鉴定与表达分析[J].园艺学报,2024,51(8):1803-1822.
- [48] REN W C, DING B S, DONG W H, et al. Unveiling *HSP40/60/70/90/100* gene families and abiotic stress response in *Jerusalem artichoke* [J]. *Gene*, 2024, 893: 147912.
- [49] 丁亚东,舒黄英,高崇伦,等.中国辣椒热激蛋白 *HSP70* 基因家族分析[J].植物科学学报,2021,39(2):152-162.
- [50] CHOU K C, SHEN H B. Plant-mPLOC: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization [J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): 11335.
- [51] RODRIGUEZ R E, MECCHIA M A, DEBERNARDI J M, et al. Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396 [J]. *Development*, 2010, 137(1): 103-112.
- [52] CHEN L, LUAN Y S, ZHAI J M. Sp-miR396a-5p acts as a stress-responsive genes regulator by conferring tolerance to abiotic stresses and susceptibility to *Phytophthora nicotianae* infection in transgenic tobacco [J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(12): 2013-2025.
- [53] HAN X X, SONG C H, FANG S, et al. Systematic identification and analysis of the *HSP70* genes reveals *MdHSP70-38* enhanced salt tolerance in transgenic tobacco and apple [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 289: 138943.
- [54] VU N T, NGUYEN N B T, HA H H, et al. Evolutionary analysis and expression profiling of the *HSP70* gene family in response to abiotic stresses in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. *Science Progress*, 2023, 106(1): 368504221148843.

(责任编辑:黄克玲)