生 物 工 程 学 报
Chinese Journal of Biotechnology
CSTR: 32114.14.j.cjb.240474
DOI: 10.13345/j.cjb.240474

Feb. 25, 2025, 41(2): 857-868
http://journals.im.ac.cn/cjbcn
©2025 Chin J Biotech, All rights reserved

·农业生物技术·

黄瓜丝裂原活化蛋白激酶 *CsMPK4* 基因的功能鉴定

纪光昊[1,2]，鲁迁里[2]，余月[2]，王鹤冰[1*]，汤青林[2*]

1 重庆市农业科学院蔬菜花卉研究所，重庆 401329
2 西南大学 园艺园林学院，重庆 400715

纪光昊，鲁迁里，余月，王鹤冰，汤青林. 黄瓜丝裂原活化蛋白激酶 *CsMPK4* 基因的功能鉴定[J]. 生物工程学报，2025, 41(2): 857-868.
JI Guanghao, LU Qianli, YU Yue, WANG Hebing, TANG Qinglin. Function identification of the mitogen-activated protein kinase gene *CsMPK4* in cucumber[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 857-868.

摘　要：黄瓜是一种在全球范围内广泛栽培的蔬菜作物，高温等逆境胁迫会影响植株生长发育甚至导致其产量和品质降低。丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 家族在植物逆境响应中起着至关重要的作用。为研究黄瓜 *MPK4* 基因的功能及逆境响应机制，本研究克隆了 *CsMPK4* 基因，其编码 383 个氨基酸；实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)分析发现该基因在叶和花中表达量最高，根中次之，在茎和卷须中表达量最低。CsMPK4 定位于细胞核和细胞质，与甜瓜 CmMPK4 亲缘关系最近。过表达 *CsMPK4* 的黄瓜植株矮化健壮、卷须变短变少、幼苗更耐高温，幼叶中丙二醛含量降低，过氧化物酶和超氧化物歧化酶活性增强。进一步通过酵母双杂和双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)实验证明，黄瓜 CsMPK4 与缬氨酸-谷氨酰胺家族因子 CsVQ10 存在蛋白互作，表明 CsVQ10 可能协同 CsMPK4 参与黄瓜高温等逆境胁迫响应。本研究为深入探讨黄瓜 *CsMPK4* 逆境应答机制以及黄瓜抗逆育种等奠定了基础。

关键词：黄瓜；*CsMPK4* 基因；高温；蛋白互作

资助项目：国家大宗蔬菜产业技术体系(CARS-23)；重庆市农业科学院市级财政科研项目(cqaas2023sjczhx010)
This work was supported by the Technical System of National Bulk Vegetable Industry (CARS-23) and the Municipal Financial Research Project of Chongqing Academy of Agricultural Sciences (cqaas2023sjczhx010).
*Corresponding authors. E-mail: WANG Hebing, whebing@163.com; TANG Qinglin, tangql@swu.edu.cn
Received: 2024-06-07; Accepted: 2024-08-08; Published online: 2024-08-09

Function identification of the mitogen-activated protein kinase gene *CsMPK4* in cucumber

JI Guanghao[1,2], LU Qianli[2], YU Yue[2], WANG Hebing[1*], TANG Qinglin[2*]

1 Institute of Vegetables and Flowers, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China
2 College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Cucumber (*Cucumis sativus* L.) is one of the most widely cultivated vegetables in the world. High temperature and other stress conditions can affect the growth and development of this plant, even leading to the decreases in yield and quality. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) family plays a crucial role in plant stress responses. However, the role of *MPK4* in the stress response of cucumber remains to be reported. In this study, we cloned *CsMPK4*, which encoded 383 amino acid residues. The qRT-PCR results showed that the expression level of *CsMPK4* was the highest in leaves and flowers, moderate in roots, and the lowest in stems and tendrils. CsMPK4 was located in the nucleus and cytoplasm, and it had a close relationship with CmMPK4 in muskmelon. The cucumber plants overexpressing *CsMPK4* became stronger and shorter, with reduced length and quantity of tendrils. Moreover, the transgenic seedlings were more resistant to high temperatures, with decreased malondialdehyde (MDA) content and increased activities of peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) in young leaves. Furthermore, the protein-protein interaction between CsMPK4 and CsVQ10, a member of the valine-glutamine family, was confirmed by yeast two-hybrid and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays. The results suggested that CsVQ10 cooperated with CsMPK4 in response to the high temperature stress in cucumber. This study laid a foundation for the further study on the stress response mechanism of *CsMPK4* and the breeding of stress-resistant cucumber varieties.

Keywords: cucumber; *CsMPK4*; high temperature; interaction

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)原产于亚热带，属葫芦科喜温蔬菜，在我国的蔬菜消费中具有重要地位。黄瓜对栽培条件要求较高，对高温等逆境胁迫十分敏感，温度过高会严重影响黄瓜生长进程及生理活动，进而降低其产量和品质，极大影响经济效益。因此，开展黄瓜高温等抗逆相关基因功能鉴定及分子机制研究，对增强黄瓜抗逆能力、提升黄瓜品质等具有非常重要的意义。

温度上升引起的热应激效应对全球多地的农业发展均造成严重威胁。高温逆境胁迫会使植物发生一系列生理和生化变化。这些变化不利于植物正常生长发育，并且还会大大降低作物的产量。植物作为不可移动的生物，不断暴露于高温等非生物胁迫下，因而进化出多种复杂的应对机制以适应胁迫[1]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族在调节植物免疫和抗逆过程中发挥着重要作用。典型的 MAPK 级联由至少 1 个 MAPK、1 个 MAPK 激酶和 1 个 MAPKK 激酶组成，级联中最顶层的激酶导致下游的 MAPKK(s)的磷酸化和激活。激活的 MAPKK(s)依次磷酸化并激活 MAPK(s)，激活的 MAPK 可以磷酸化多种下游底物，包括转录因子、激酶等其他结构蛋白，从而导致细胞反应的激活。

高温胁迫会引起细胞膜的流动性改变，互作蛋白与热变性蛋白的结合能够感知这种变化，释放出热应激转录因子(heat stress transcription factors, HSF)，激活热应激基因。MAPKs 同样会被高温诱导激活，调节 *HSP* 基因的表达，这可能与热诱导的细胞膜流动性变化和钙信号传导相关。高温和低温胁迫均会引起植物的细胞膜流动性变化、钙信号和 MAPK 激活，以及活性氧(reative oxygen species, ROS)、一氧化氮和磷脂信号反应，甚至导致相应蛋白质泛素化和蛋白质降解。

黄瓜 MAPK 基因家族全基因组鉴定及转录谱分析发现，在高温、低温、干旱和霜霉病病原菌处理下，一部分 MAPK 基因特别是 *MPK4* 的表达水平发生了显著变化[2]。此外，valine-glutamine (VQ)家族成员也参与抗逆反应，在水稻中 OsMPKK10-OsMPK6-OsWRKY45 级联下调了 OsVQ1 的活性，OsVQ1 与 OsMPK6 之间存在反馈回路，说明 OsVQ1-OsMPK6 模块参与水稻的免疫反应[3]。目前虽然已有一些关于植物 MAPK 家族的研究，但关于黄瓜 MAPK 成员的功能鉴定及其与 VQ 家族协同参与抗逆的研究报道较少。

本研究克隆了黄瓜 MAPK 家族成员 *CsMPK4*，分析了 *CsMPK4* 基因的表达模式及其亚细胞定位，同时转基因超量表达了 *CsMPK4*，进行功能鉴定并探讨其高温胁迫应答效应，进一步通过酵母双杂和 BiFC 实验鉴定 CsMPK4 与 CsVQ10 蛋白互作关系，以期为黄瓜 *CsMPK4* 抗高温分子机制的深入研究及抗逆种质创新与品种选育等奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物、质粒载体与菌株

本研究中黄瓜和本氏烟草等植物材料由重庆市农业科学院、西南大学园艺园林学院提供并保存。

克隆载体 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司；亚细胞定位载体 pCAMBIA1300、转基因载体以及蛋白互作载体等均由本实验室保存。大肠杆菌 DH5α 和农杆菌 EHA105 等均由本实验室保存。

1.2 基因克隆

使用 RNAprep Pure Plant Kit [天根生化科技(北京)有限公司]提取黄瓜叶片 RNA，经过 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa 公司)反转录获得单链 cDNA，以此作为 *CsMPK4* 基因克隆的模板。

通过 NCBI 数据库中搜索基因序列，在葫芦科基因组网站(http://www.cucurbitgenomics. org/)进行序列比对，找到黄瓜 *CsMPK4* 基因(CsaV3_5G002510.1)，设计 *CsMPK4* 基因的上游引物 CsMPK4-F 和下游引物 CsMPK4-R (表 1)。

1.3 多序列比对及系统发育树分析

在 NCBI 数据库搜寻并下载黄瓜 CsMPK4 序列，以及水稻(*Oryza sativa*)、小米(*Setaria italic*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、玉米(*Zea mays*)、小麦(*Triticum aestivum*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、姜(*Zingiber officinale*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、豌豆(*Pisum sativum*)、甜菜(*Beta vulgaris*)、冬瓜(*Benincasa hispida*)、甜瓜(*Cucumis melo*)、欧芹(*Petroselinum crispum*)、向日葵(*Helianthus annuus*)、棉花(*Gossypium hirsutum*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、甘蓝型油菜(*Brassica napus*)、萝卜(*Raphanus sativus*)、辣椒(*Capsicum annuum*)的 MPK4 同源蛋白序列。使用 MEGA-X 中的 MUSCLE 比对法进行比对。采用 MEGA-X 软件，使用 neighbor-joining 方法并设置 bootstrap 值为 1 000，基于 MPK4 蛋白的多序列氨基酸比对结果来构建系统发育树。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Sequence (5′→3′)	Purpose
CsMPK4-F	TGCTGTAAATTCAGAGACCC	Gene cloning
CsMPK4-R	GACCAAACATCAATAGCAGC	Gene cloning
CsMPK4-qpcrF	ATCGAGTTCTACCACTGCCAC	qRT-PCR
CsMPK4-qpcrR	ACAGCAGCACAAACAAGACC	qRT-PCR
CsMPK4-SL-Sal I-F	GCGTCGACATGGCTACTAAAGAATCGAG	Localization
CsMPK4-SL-Spe I-R	GGACTAGTAACGCAAAGAGTCGTCCT	Localization
HG-MAPK4-F	CCGGAATTCATGGCTACTAAAGAATCGAG	Overexpression
HG-MAPK4-R	CCTTAATTAATCAAACGCAAAGAGTCGTCCT	Overexpression
pGADT7-CsMPK4-F	CCGGAATTCATGGCTACTAAAGAATCGAG	Yeast two-hybrid (Y2H)
pGADT7-CsMPK4-R	CGCGGATCCTCAAACGCAAAGAGTCGTCCT	Y2H
pYC-MPK4-F	cccaggcctactagtggatccATGGCTACTAAAGAATCGAGTTCTACC	Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)
pYC-MPK4-R	atcggggaaattcgtgagctcTCAAACGCAAAGAGTCGTCCT	BiFC
Actin-F	ATGGCCGATGCCGAGGATATT	qRT-PCR
Actin-R	CTTTTCTCTGTTAGCCTTTGGG	qRT-PCR

The restriction enzyme sites were underlined. The lower letters indicate the sequences used for seamless cloning into the vectors.

1.4 实时荧光定量分析

分别提取黄瓜的根、茎、花、叶、卷须的RNA，分析 *CsMPK4* 基因在不同组织中表达情况。设计黄瓜 *CsMPK4* 特异性定量 PCR 引物，以 ActinF/R 作为内参基因引物(表 1)。以 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)作为荧光染料，使用 CFX96 定量 PCR 仪进行实时荧光 PCR。PCR 扩增程序为：95 ℃预变性 30 s；95 ℃变性 10 s，58 ℃退火 30 s；循环 40 次。实验设 3 次重复，并通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析相对表达量。

1.5 载体构建

根据基因编码序列(coding sequence, CDS)设计亚克隆引物，分别构建黄瓜 *CsMPK4* 的酵母表达载体、转基因载体和双荧光素酶融合载体等，引物如表 1 所示。以中间克隆载体 pEASY-CsMPK4 的质粒为模板进行亚克隆，并分别将亚克隆产物和相应载体双酶切，凝胶电泳后回收大小正确的条带，进一步使用 Solution I 连接酶连接，并转化大肠杆菌。挑选阳性菌斑，摇菌 12−16 h，送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序，保存阳性菌液备用。

1.6 亚细胞定位

采用亚细胞定位载体 pCAMBIA1300，选择酶切位点 *Sal* I和 *Spe* I。分别对目的基因片段、载体质粒双酶切，然后电泳并回收目标条带，连接获得重组质粒 pCAMBIA1300-CsMPK4。重组子转化农杆菌，菌液在摇床(200 r/min, 28 ℃)培养 16−18 h。以实验保存的 35S::GFP 作为对照(定位于细胞膜和细胞核等部位)。采用无菌注射器对健康且生长良好的本氏烟叶片进行浸染，Zeiss LSM 510 META 激光共聚焦显微镜观察。

1.7 转基因植株的鉴定

采用本实验室保存的超表达载体 HG，选择酶切位点 *Eco*R I/*Pac* I，构建转基因超表达载体，然后转入农杆菌 EHA105，浸染黄瓜子叶并遗传转化，获得转基因黄瓜植株。以转基因黄瓜植株叶片 DNA 为模板，进行 PCR 扩增和阳性植株鉴定，收获转基因黄瓜种子。然后与非转基因黄瓜同期播种，提取叶片 RNA 并反转录，通过 qRT-PCR 检测 *CsMPK4* 基因相对表达水平。同时，对比观察转基因与非转基因株系表型。

为了分析转基因黄瓜株系对高温逆境胁迫的应答效应，取适量黄瓜种子萌发，生长 4 周

后进行高温胁迫处理：37 ℃ 12 h 光照/35 ℃ 12 h 黑暗(高温处理)，60 h 后观察表型，并取黄瓜叶片测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的含量，重复 3 次。

1.8 酵母双杂交

将构建的重组质粒 pGADT7-CsVQ10 转入 Y187 酵母感受态细胞，同时将 pGBKT7-CsMPK4 转入 Y2HGold 酵母。然后分别转化到对应的 SD/-Leu 和 SD/-Trp 酵母营养缺陷型固体培养基进行筛选，挑选单菌落，将其混合后放入含有 1 mL 2×YPDA 培养基的离心管中，培养 1 d。再加入 ddH_2O 重悬菌体，吹打混匀后吸取 100 μL 涂在 DDO (SD/-Leu/-Trp)固体培养基上，在 30 ℃培养箱倒置培养 2 d。挑取菌斑并移入装有 0.9% NaCl 溶液的 1.5 mL 离心管中，重悬菌体吹打混匀，转入 QDO/X/A (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-gal/AbA)酵母固体培养基，30 ℃培养箱静置培养 3 d，观察是否出现蓝色菌斑。

1.9 双分子荧光互补

将构建的重组质粒 pVYNE(R)-CsVQ10 和 pVYCE(R)-CsMPK4 以及相应空载体 pVYNE(R)和 pVYCE(R)分别转化农杆菌，加入 3 mL YEB 液体培养基，培养 16−18 h，然后用无菌注射器将其注入并浸染烟草叶片，黑暗条件下培养 24 h，在光照条件下培养 36 h；取样并放于载玻片上，在激光共聚焦显微镜下观察荧光。

2 结果与分析

2.1 黄瓜 *CsMPK4* 基因的克隆

提取黄瓜幼叶 RNA，并反转录为 cDNA 后作为模板，以 CsMPK4-F/CsMPK4-R 作为上下游引物组合(表 1)，进行 PCR 扩增克隆黄瓜 *CsMPK4* 基因，经过琼脂糖凝胶电泳后回收目标条带(图 1)。将目的片段与 pMD19-T 克隆载体连接，转化大肠杆菌后挑选阳性菌斑测序，获得黄瓜 *CsMPK4* 的 cDNA 序列，大小为 1 152 bp，编码 383 个氨基酸。

2.2 黄瓜 *CsMPK4* 基因表达分析

分别选用黄瓜的根、茎、叶、卷须和花等部位，采用 qRT-PCR 方法分析 *CsMPK4* 基因在不同组织的表达情况。发现黄瓜 *CsMPK4* 基因在不同组织中表达呈现明显差异，在花和叶中的表达量最为丰富，其次是根部，在卷须和茎部的表达量则相对较低(图 2)。

2.3 系统发育分析

利用软件 MEGA-X 分析黄瓜 CsMPK4 与其

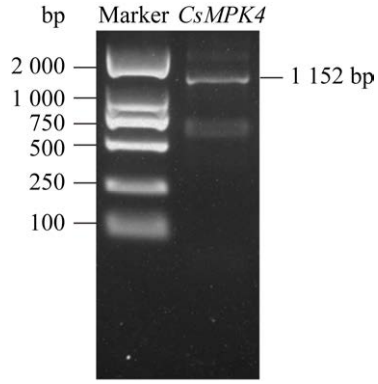

图 1 黄瓜 *CsMPK4* 扩增产物的电泳检测

Figure 1 Electrophoresis analysis of *CsMPK4* amplified products.

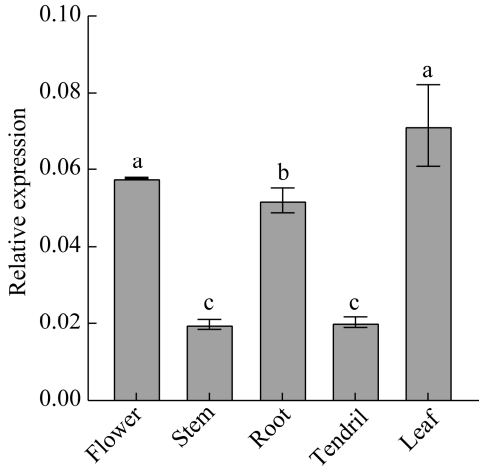

图 2 黄瓜 *CsMPK4* 基因组织特异性表达分析

Figure 2 Expression of *CsMPK4* in different tissues of cucumber. Different lowercase letters represent significant differences.

他作物中同源 MPK4 蛋白的系统发育情况(图3)。结果表明，黄瓜 CsMPK4 蛋白与其他 MPK4 蛋白高度相似。其中，黄瓜 CsMPK4 蛋白与甜瓜 CmMPK4 蛋白亲缘关系最近、同源性最高，而与辣椒 CaMPK4 蛋白亲缘关系最远。

2.4 黄瓜 CsMPK4 的亚细胞定位

首先通过在线网站 CELLO predicative system (http://cello.life.nctu.edu.tw/)对黄瓜 CsMPK4 亚细胞定位进行预测，发现黄瓜 CsMPK4 蛋白可能定位于细胞核及细胞质。然后通过注射烟草叶片瞬时浸染实验，对预测结果进行验证，使用荧光显微镜能够观察到烟草细胞核和细胞质内有荧光信号，说明黄瓜 CsMPK4 定位在细胞质和细胞核中(图 4)。

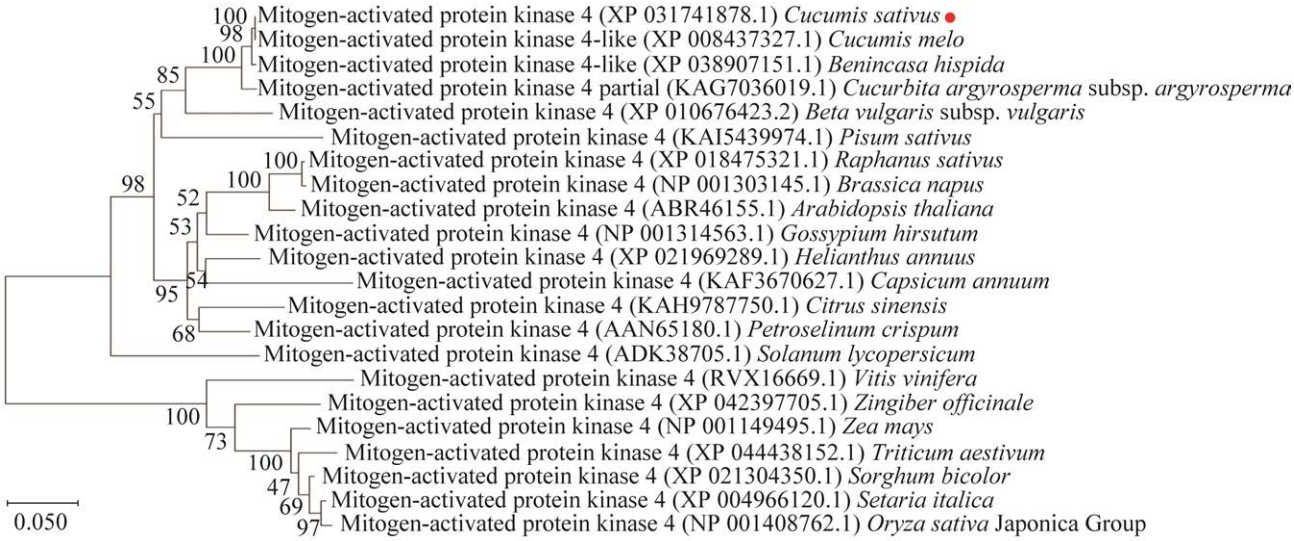

图 3 黄瓜 CsMPK4 蛋白与其他物种 MPK4 蛋白的系统发育分析 红色圆点所示为本研究 CsMPK4。

Figure 3 Phylogenetic tree of MPK4 proteins from cucumber and other species. The red dot indicates the CsMPK4 in this study.

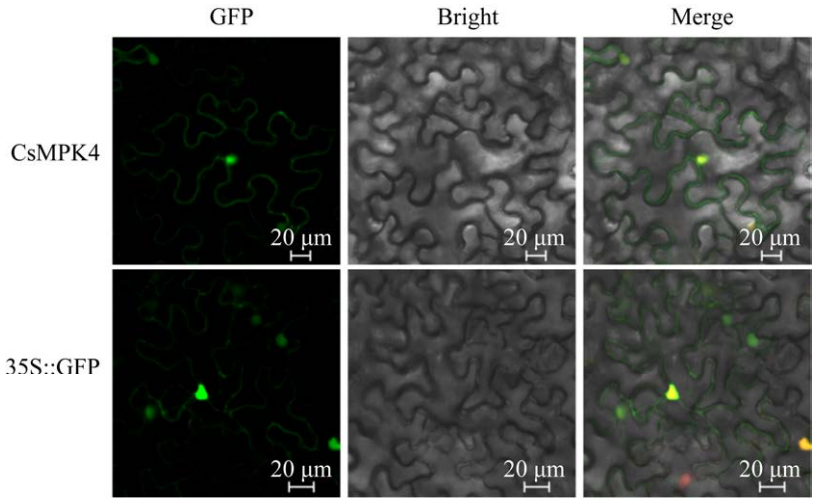

图 4 黄瓜 CsMPK4 在烟草叶片中的亚细胞定位

Figure 4 Subcellular localization of CsMPK4 in tobacco leaves.

2.5 黄瓜 *CsMPK4* 转基因过表达及表型鉴定

2.5.1 黄瓜 *CsMPK4* 转基因株系表达量检测

将重组质粒 HG-CsMPK4 转入农杆菌 EHA105 中，利用农杆菌介导浸染黄瓜子叶，获得黄瓜转基因阳性植株，留种获得转基因株系，然后与非转基因对照同时播种。分别提取幼苗期叶片 RNA，反转录为 cDNA，实时荧光定量 PCR 检测黄瓜 *CsMPK4* 基因的表达情况。经过 *t* 检验统计分析发现(图 5)，与非转基因对照植株(WT)相比，*CsMPK4* 基因在 4 个转基因黄瓜株系(OE-1、OE-4、OE-5 和 OE-6)中的表达水平均显著提高，其相对表达量是对照的 2.71−12.5 倍，说明 *CsMPK4* 在这些转基因株系中均超量表达。

2.5.2 黄瓜 *CsMPK4* 转基因植株表型鉴定

与非转基因对照(WT)相比，常温条件下黄瓜 *CsMPK4* 过表达株系(OE-4 和 OE-6)生长健壮、节间短、植株矮化，卷须少、短且生长发育延后(图 6)，表明超表达 *CsMPK4* 可影响黄瓜幼苗健壮程度，延缓生长速度。

2.6 黄瓜 *CsMPK4* 过表达株系的热胁迫响应

为了探讨黄瓜 *CsMPK4* 基因是否对幼苗耐热性有影响，利用 37 ℃高温处理 2−3 叶期黄瓜幼苗 48 h，观察表型并测定丙二醛(MDA)、超

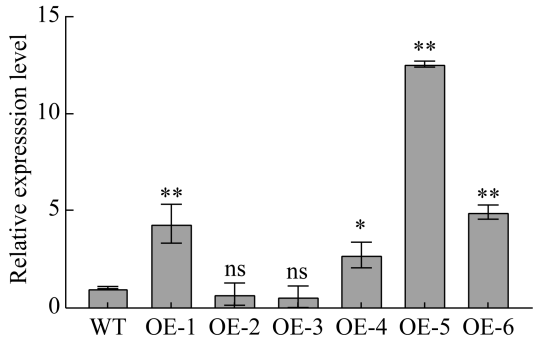

图 5 黄瓜转基因株系 *CsMPK4* 表达水平检测 WT：野生型黄瓜；OE-1、OE-2、OE-3、OE-4、OE-5 和 OE-6：*CsMPK4* 转基因黄瓜株系。

Figure 5 Detection of *CsMPK4* expression in transgenic cucumber plants. WT: Wild type cucumber plants; OE-1, OE-2, OE-3, OE-4, OE-5 and OE-6: Transgenic *CsMPK4* cucumber lines. *T*-test was used for significance analysis. ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

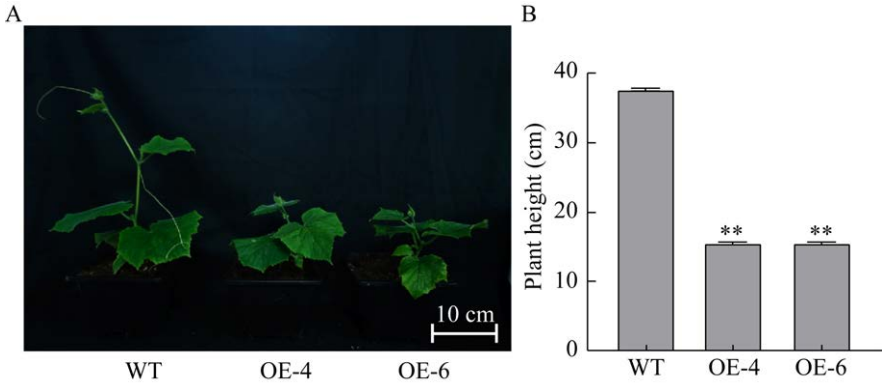

图 6 常温下黄瓜 *CsMPK4* 转基因株系的株型(A)和植株高度(B) WT：野生型黄瓜；OE-4 和 OE-6：*CsMPK4* 过表达株系。

Figure 6 Phynotypes (A) and plant height (B) of transgenic *CsMPK4* lines under normal temperature. WT: Wild type; OE-4 and OE-6: Transgenic *CsMPK4* lines. *t*-test was used for significance analysis. **: $P<0.01$.

氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)含量。结果发现，*CsMPK4* 转基因黄瓜幼苗的真叶相比未转基因对照而言萎蔫程度较轻，表现出一定程度的耐热性。

高温处理后，黄瓜 *CsMPK4* 转基因株系的 MDA 含量显著低于未转基因对照(图 7A)。同时，转基因株系 SOD 和 POD 的酶活性均有一定程度提高，且显著高于非转基因植株对照(图 7B、7C)。证明转基因 *CsMPK4* 株系在高温下受胁迫较轻，黄瓜 *CsMPK4* 基因可缓解高温胁迫。

2.7 黄瓜 CsMPK4 与 CsVQ10 蛋白互作分析

2.7.1 酵母双杂鉴定蛋白互作

已有研究发现 MAPK 家族与 VQ 家族成员可通过蛋白互作参与逆境响应[3]，黄瓜 CsMPK4 是否会与 VQ 成员协同作用尚不明晰。为深入探讨黄瓜 *CsMPK4* 的分子作用机制，本研究将构建的酵母质粒 pGBKT7-CsMPK4 与 pGADT7-CsVQ10 融合后进行酵母双杂交实验。结果发现，在 30 ℃培养 3−5 d 的 QDO/X/A 酵母平板上，CsMPK4 与 CsVQ10 的融合菌株以及阳性对照均能够长出蓝色菌斑，而阴性对照不能生长(图 8)。表明黄瓜 CsMPK4 与 CsVQ10 蛋白在酵母系统中能够激活报告基因，发生直接的蛋白相互作用。

2.7.2 双分子荧光互补技术鉴定蛋白互作

为进一步验证黄瓜 CsMPK4 与 CsVQ10 之间的互作关系，将双分子荧光互补的重组质粒 pVYCE(R)-CsMPK4 与 pVYNE(R)-CsVQ10 分别转入农杆菌，之后注射烟草叶片。同时设置 pVYCE(R)-CsMPK4 与空载体 pVYNE(R)的阴性对照。之后在激光共聚焦显微镜下观察，可以看出阴性对照组没有黄色荧光，而实验处理组(CsMPK4+CsVQ10)出现了黄色荧光(图 9)。表明黄瓜 CsMPK4 与 CsVQ10 在烟草植株体内发生了蛋白互作，这与酵母双杂交的结果相吻合。推测黄瓜 CsMPK4 可能通过与 CsVQ10 蛋白互作，参与高温胁迫等响应。

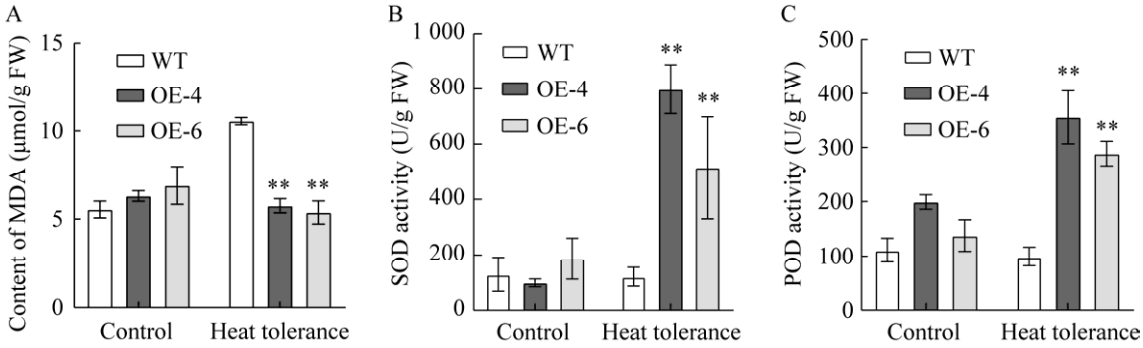

图 7 高温胁迫下转基因黄瓜植株中 MDA(A)、SOD(B)和 POD(C)含量 Control：对照组；Heat tolerance：高温处理组；WT：未转基因黄瓜对照；OE-4 和 OE-6：*CsMPK4* 过表达黄瓜株系；FW：鲜重。

Figure 7 Contents of MDA (A), SOD (B) and POD (C) in cucumber plants under heat stress. Control: Non-heat treatment group; Heat tolerance: Heat treatment group. WT: Wild-type cucumber plants; OE-4 and OE-6: Transgenic *CsMPK4* cucumber plants; FW: Fresh weight. **: $P<0.01$.

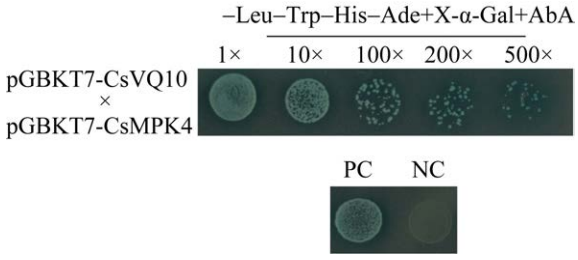

图 8 CsMPK4 与 CsVQ10 的酵母相互作用

Figure 8 Protein interactions of CsMPK4 with CsVQ10 in yeast. PC: Positive control; NC: Negative control.

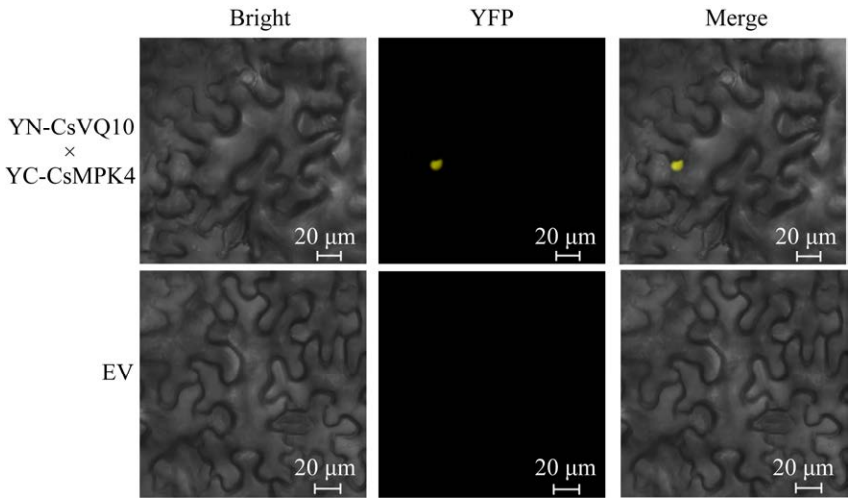

图 9　CsMPK4 与 CsVQ10 双分子荧光互补鉴定
Figure 9　Protein interactions of CsMPK4 with CsVQ10 in BiFC assays. EV: Empty vector.

3　讨论与结论

植物丝裂原活化蛋白激酶 MAPKs 参与多种逆境胁迫响应，包括温度、盐碱、干旱等。为了深入研究黄瓜中 *CsMPK4* 基因的功能，本研究首先克隆了黄瓜 *CsMPK4* 基因，并预测其生物学功能。亚细胞定位显示，黄瓜 CsMPK4 蛋白定位于细胞质和细胞核。qRT-PCR 分析发现，黄瓜 *CsMPK4* 在叶片中表达量最高，其次是花，在茎和卷须中表达量低，说明黄瓜 *CsMPK4* 在不同组织中的表达量存在差异。

高温胁迫下，过表达玉米 *ZmMAPK1* 基因能够增强植株对干旱和高温胁迫的耐受性，防止叶绿素的损失和活性氧清除物的生成[4]。番茄 *RBOH1*、*MPK1* 和 *MPK2* 在高温应激的耐受性中起着重要作用，*RBOH1* 和 *MPK2* 基因沉默后会降低油菜素内酯诱导的抗逆性[5]。利用 CRISPR/Cas9 技术敲除番茄 *SIMPK3* 基因，发现与野生型相比，*SIMPK3* 敲除突变体在高温胁迫下耐热性更好，并且突变体的热激蛋白和热激转录因子基因表达水平显著提高，表明 *SIMPK3* 能够作为负调控因子参与番茄高温胁迫响应[6]。Li 等[7]发现，高温处理后由 Ca^{2+}和 CaM3 组成的细胞信号级联激活 *MPK6*，参与高温诱导下拟南芥的细胞程序性死亡进程。

本研究构建了黄瓜 *CsMPK4* 过表达载体，并通过农杆菌介导法获得 *CsMPK4* 过表达的黄瓜植株。发现 *CsMPK4* 过表达转基因黄瓜植株相比于非转基因对照，生长健壮、发育延迟、卷须变短变少。与对照相比，在 37 ℃高温胁迫 48 h 后，*CsMPK4* 转基因黄瓜幼苗叶片萎蔫程度较轻，子叶维持绿色；MDA 含量也显著低于对照；SOD 和 POD 酶活性显著高于对照。由此表明 *CsMPK4* 过表达黄瓜植株的耐热性高于非转基因对照，*CsMPK4* 基因参与黄瓜的热胁迫反应。

MAPK 在植物中是高度保守的 Ser/Thr 类蛋白激酶[8]。植物 MAPK 数量众多、功能多样、调控机制复杂精细，除了能参与植物多种胁迫应答，还能参与磷酸化修饰，例如在拟南芥中，MAPKK 蛋白 AtANP1 可启动与 AtMPK3 的磷酸化级联反应，在冷胁迫下正向调节冻害耐受性[4]。另外，水稻 OsMKK6-OsMPK3 级联反应

能够调节寒冷信号传导及其耐受性[9]。硫化氢(H_2S)能够通过 AtMPK4 介导减轻冷胁迫效应，并且二者能够共同调节一系列冷响应基因的表达，H_2S 在冷胁迫条件下通过 MPK4 依赖的方式抑制气孔的开放；这说明 MPK4 位于 H_2S 介导的冷胁迫响应通路的下游，H_2S 和 MPK4 共同调节冷响应基因的表达和气孔运动，以帮助植物应对冷胁迫[10]。冷驯化会激活拟南芥 MPK4，促发 MEKK1-MKK2-MPK4 级联反应，导致 MEKK1 和 MKK2 的磷酸化以及冷诱导基因 *COR15a* 的表达[11]。MYB15 作为一种冷信号的转录抑制因子，其活性受到 MPK6 介导的磷酸化的调控；MPK6 通过磷酸化 MYB15 的 Ser168 位点，降低了 MYB15 与 *CBF3* 启动子结合的亲和力，从而影响植物的抗冷性[12]。在番茄中，硝酸还原酶(nitrite reductase, NR)沉默导致 S-亚硝基化谷胱甘肽还原酶(S-nitroso glutathione reductase, GSNOR)活性和 MPK1/MPK2 活性降低，从而降低植株抗冷性。相比之下，*GSNOR* 的沉默会降低 NR 活性，增加 NO 积累并激活 MPK1/2，增强冷驯化诱导的冷耐受性[13]。此外，共同沉默 *MPK*1 和 *MPK2* 降低了 NR 依赖 NO 的产生和冷驯化诱导的抗冷性[13]。多囊泡体形成调控因子 5 (LYST-interacting protein 5, LIP5)作为 MPK3/MPK6 的关键靶点，在植物免疫系统中发挥重要作用。MPK3/MPK6 通过对 LIP5 磷酸化，进而调控 MVB 通路，使植物对高温、盐胁迫抗性提高[12]。*StMAPKs* 在转录水平上参与了马铃薯对热胁迫的反应。在马铃薯热处理后，通过激活 *WRKY22* 和 *WRKY29*，引起 *StMAPK6* 和 *StMAPK* 的转录水平显著提高。与 *StMAPK6* 和 *StMAPK19* 相比，*StMAPK2* 的表达水平更高[14-15]。

缬氨酸-谷氨酰胺(VQ)基序蛋白是一类转录调控辅助因子。VQ 蛋白具有独特的分子特性，氨基酸仅在 VQ 结构域高度保守，并且通过与 WRKY、MAPK 等蛋白相互作用，参与多种信号通路，调控植物生长发育以及对生物和非生物胁迫的防御反应[15]。许多 VQ 家族基因能够响应逆境胁迫、病原体入侵或植物激素处理，增加或降低表达水平，调节植物生长发育进程[16-18]。

拟南芥缬氨酸-谷氨酰胺基序蛋白(VQ-motif-containing protein, VQPs)的一个亚群被 MPK3/6 磷酸化后，更名为 MPK3/6-targeted VQPs (MVQs)，该复合物能够调节植物防御基因的转录[18-19]。AtVQ4/MVQ1 能够被 MPK3/6 磷酸化，导致该蛋白稳定性降低或者出现降解，从而不能有效抑制 WRKYs 活性。下游抗病基因的表达水平随着磷酸化水平的升高而升高。MAPK3/6 参与 AtVQ4/MVQ1、WRKYs 的相互作用，有效调节了拟南芥的免疫应答[19]。AtVQ21 可以连接 MPK4 和 WRKY33 形成三元复合物，可以相互作用进而限制 WRKY33 的活性。病原体感染植物后，活化的 MPK4 磷酸化 AtVQ21，导致复合物 MPK4-AtVQ21-WRKY33 的变性分离，完全释放 WRKY33，并靶向抗毒素基因 *PAD3* 启动子调控其表达，增强植物对病原体的抗性[20-23]。番茄 SIVQ6 为 SIMPK1 的磷酸化底物，在抵抗高温、干旱和盐等非生物胁迫中起重要作用[24]。水稻 OsVQ1 与 OsMPK6 相互作用，*OsVQ1* 敲除突变体对水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)表现出更强的抗性，积累更高水平的过氧化氢，并在自然生长条件下表现出延迟开花表型[25]。OsMPK6 与 OsVQ13 也能够相互作用，激活 OsMPK6-OsWRKY45 组分，正向调节茉莉酸(jasmonic acid, JA)信号通路，介导水稻对白叶枯病的抗性[25]。OsMPK4 可以磷酸化 OsVQ14 和 OsVQ32 并与其相互作用，OsVQ14 和 OsVQ32

作为 OsMPKK6-OsMPK4 信号级联的底物，增强了水稻对 *Xoo* 的抗性[26]。在小麦中，TaVQ4 与 MPK3/6 相互作用，并在植物抵抗干旱胁迫中作为 MPK3/6 的磷酸化底物发挥作用[27]。本研究通过酵母双杂交和 BiFC 实验发现，黄瓜 CsMPK4 能够与 CsVQ10 蛋白相互作用。这提示 CsVQ10 蛋白能够协同 CsMPK4 在黄瓜高温等逆境胁迫中发挥重要作用。

本研究阐释了黄瓜丝裂原活化蛋白激酶 *CsMPK4* 基因的功能及其抗逆机制，对黄瓜分子育种具有借鉴意义。但黄瓜 CsMPK4 调控哪些下游基因，以及如何通过精确调节黄瓜 *CsMPK4* 及其磷酸化修饰水平从而调控黄瓜抗逆性还有待深入研究。

REFERENCES

[1] ZHU JK. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. Cell, 2016, 167(2): 313-324.

[2] WANG J, PAN CT, WANG Y, YE L, WU J, CHEN LF, ZOU T, LU G. Genome-wide identification of MAPK, MAPKK, and MAPKKK gene families and transcriptional profiling analysis during development and stress response in cucumber[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 386.

[3] WANG PL, LI J, ZHANG ZZ, ZHANG QL, LI XH, XIAO JH, MA HG, WANG SP. OsVQ1 links rice immunity and flowering *via* interaction with a mitogen-activated protein kinase OsMPK6[J]. Plant Cell Reports, 2021, 40(10): 1989-1999.

[4] WU LJ, ZU XF, ZHANG HM, WU LC, XI ZY, CHEN YH. Overexpression of *ZmMAPK1* enhances drought and heat stress in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Molecular Biology, 2015, 88(4/5): 429-443.

[5] NIE WF, WANG MM, XIA XJ, ZHOU YH, SHI K, CHEN ZX, YU JQ. Silencing of tomato *RBOH1* and *MPK2* abolishes brassinosteroid-induced H_2O_2 generation and stress tolerance[J]. Plant, Cell & Environment, 2013, 36(4): 789-803.

[6] YU WQ, WANG L, ZHAO RR, SHENG JP, ZHANG SJ, LI R, SHEN L. Knockout of *SlMAPK3* enhances tolerance to heat stress involving ROS homeostasis in tomato plants[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 354.

[7] LI Z, YUE HY, XING D. MAP Kinase 6-mediated activation of vacuolar processing enzyme modulates heat shock-induced programmed cell death in *Arabidopsis*[J]. New Phytologist, 2012, 195(1): 85-96.

[8] 张鑫苗，伍国强，魏明. MAPK 在植物响应逆境胁迫中的作用[J]. 草业学报, 2024, 33(1): 182-197.
ZHANG XM, WU GQ, WEI M. The role of MAPK in plant response to abiotic stress[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2024, 33(1): 182-197 (in Chinese).

[9] WEI XS, LIU S, SUN C, XIE GS, WANG LQ. Convergence and divergence: signal perception and transduction mechanisms of cold stress in *Arabidopsis* and rice[J]. Plants, 2021, 10(9): 1864.

[10] DU XZ, JIN ZP, LIU DM, YANG GD, PEI YX. Hydrogen sulfide alleviates the cold stress through MPK4 in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 120: 112-119.

[11] FURUYA T, MATSUOKA D, NANMORI T. Membrane rigidification functions upstream of the MEKK1-MKK2-MPK4 cascade during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*[J]. FEBS Letters, 2014, 588(11): 2025-2030.

[12] KIM SH, KIM HS, BAHK S, AN J, YOO Y, KIM JY, CHUNG WS. Phosphorylation of the transcriptional repressor MYB15 by mitogen-activated protein kinase 6 is required for freezing tolerance in *Arabidopsis*[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(11): 6613-6627.

[13] LV XZ, GE SB, JALAL AHAMMED G, XIANG X, GUO ZX, YU JQ, ZHOU YH. Crosstalk between nitric oxide and MPK1/2 mediates cold acclimation-induced chilling tolerance in tomato[J]. Plant & Cell Physiology, 2017, 58(11): 1963-1975.

[14] WANG F, YANG Y, WANG Z, ZHOU J, FAN BF, CHEN ZX. A critical role of lyst-interacting protein5, a positive regulator of multivesicular body biogenesis, in plant responses to heat and salt stresses[J]. Plant Physiology, 2015, 169(1): 497-511.

[15] ZAYNAB M, HUSSAIN A, SHARIF Y, FATIMA M, SAJID M, REHMAN N, YANG XW, KHAN KA, GHRAMH HA, LI SF. Mitogen-activated protein kinase expression profiling revealed its role in regulating stress responses in potato (*Solanum tuberosum*)[J]. Plants, 2021, 10(7): 1371.

[16] TIAN JF, ZHANG JH, FRANCIS F. The role and pathway of VQ family in plant growth, immunity, and stress response[J]. Planta, 2023, 259(1): 16.

[17] ZHANG GY, WANG FD, LI JJ, DING Q, ZHANG YH, LI HY, ZHANG JN, GAO JW. Genome-wide identification and analysis of the VQ motif-containing protein family in Chinese cabbage *(Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(12): 28683-28704.

[18] SONG WB, ZHAO HM, ZHANG XB, LEI L, LAI JS. Genome-wide identification of VQ motif-containing proteins and their expression profiles under abiotic stresses in maize[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 6: 1177.

[19] JIANG SY, SEVUGAN M, RAMACHANDRAN S. Valine-glutamine (VQ) motif coding genes are ancient and non-plant-specific with comprehensive expression regulation by various biotic and abiotic stresses[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 342.

[20] PECHER P, ESCHEN-LIPPOLD L, HERKLOTZ S, KUHLE K, NAUMANN K, BETHKE G, UHRIG J, WEYHE M, SCHEEL D, LEE J. The *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 target a subclass of 'VQ-motif'-containing proteins to regulate immune responses[J]. New Phytologist, 2014, 203(2): 592-606.

[21] QIU JL, ZHOU L, YUN BW, NIELSEN HB, FIIL BK, PETERSEN K, MACKINLAY J, LOAKE GJ, MUNDY J, MORRIS PC. *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1[J]. Plant Physiology, 2008, 148(1): 212-222.

[22] FIIL BK, PETERSEN M. Constitutive expression of MKS1 confers susceptibility to *Botrytis cinerea* infection independent of PAD3 expression[J]. Plant Signaling & Behavior, 2011, 6(10): 1425-1427.

[23] KOLUPAEV YE, OBOZNYI AI, SHVIDENKO NV. Role of hydrogen peroxide in generation of a signal inducing heat tolerance of wheat seedlings[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2013, 60(2): 227-234.

[24] DING HD, YUAN GB, MO SR, QIAN Y, WU Y, CHEN Q, XU XY, WU XX, GE CL. Genome-wide analysis of the plant-specific VQ motif-containing proteins in tomato (*Solanum lycopersicum*) and characterization of SlVQ6 in thermotolerance[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 143: 29-39.

[25] UJI Y, KASHIHARA K, KIYAMA H, MOCHIZUKI S, AKIMITSU K, GOMI K. Jasmonic acid-induced VQ-motif-containing protein OsVQ13 influences the OsWRKY45 signaling pathway and grain size by associating with OsMPK6 in rice[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(12): 2917.

[26] LI N, YANG ZY, LI J, XIE WY, QIN XF, KANG YR, ZHANG QL, LI XH, XIAO JH, MA HG, WANG SP. Two VQ proteins are substrates of the OsMPKK6-OsMPK4 cascade in rice defense against bacterial blight[J]. Rice, 2021, 14(1): 39.

[27] ZHANG MM, ZHANG SQ. Mitogen-activated protein kinase cascades in plant signaling[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(2): 301-341.