

# 冬瓜 *BhMAPK15* 基因的克隆及其非生物胁迫下的表达分析

叶新如 王彬 陈敏氩 刘建汀 曾美娟 朱海生\* 温庆放\*

(福建省蔬菜遗传育种重点实验室, 福建省农业科学院作物研究所/福建省农业科学院蔬菜研究中心, 福州 350013)

**摘要** 该文为探究 *MAPK15* 基因的结构和功能, 根据冬瓜 (*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.) 转录组高通量测序结果, 采用 RT-PCR 方法从冬瓜中分离得到 *MAPK15* 基因的完整编码序列, 命名为 *BhMAPK15*。序列分析表明, *BhMAPK15* 开放阅读框 (ORF) 长 1 704 bp, 编码 567 个氨基酸。亚细胞定位预测表明, *BhMAPK15* 可能定位于细胞核或细胞质。以 NCBI 数据库为基础, 从数据库中获得模式植物水稻、拟南芥和其他不同物种间的 *MAPK15* 家族成员, 分析该基因与这些成员的氨基酸序列、保守基序, 并构建系统进化树。经系统进化树分析表明, *BhMAPK15* 属于 D 组家族成员, 与甜瓜、南瓜、黄瓜和苦瓜的相似性较高。氨基酸序列和保守基序结果表明, 该基因家族成员保守性较高。实时荧光定量 PCR 分析表明, *BhMAPK15* 在不同组织器官中均有表达, 且非生物胁迫处理可以上调 *BhMAPK15* 的表达水平。上述研究结果表明, *BhMAPK15* 基因可能在冬瓜响应非生物胁迫中发挥作用。

**关键词** 冬瓜; *BhMAPK15*; 基因克隆; 非生物胁迫; 表达模式

## Cloning and Abiotic Stress Expression Analysis of *BhMAPK15* Gene in *Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.

YE Xinru, WANG Bin, CHEN Mindong, LIU Jianting, ZENG Meijuan, ZHU Haisheng\*, WEN Qingfang\*

(Fujian Key Laboratory of Vegetable Genetics and Breeding, Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences/Vegetable Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

**Abstract** In order to learn the structure and the function of *MAPK15* gene, the *BhMAPK15* gene was cloned from *Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn. by RT-PCR method based on transcriptome database. The sequence result showed that this gene contained an ORF (open reading frame) of 1 704 bp in length, which was predicted to encode a protein of 567 amino acid residues. Subcellular localization prediction indicated that *BhMAPK15* may be located in both the cytoplasm and nucleus. Furthermore, *BhMAPK15* gene family members were identified from plant species including model plant (*Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*) and other different species. The paper characterized them based on sequence alignment, conserved domain and phylogeny. And then, homologous comparison and evolutionary analysis revealed that *BhMAPK15* had the highest consistency with the *MAPK15* of *Cucumis melo*, *Cucurbita maxima*, *Cucumis sativus* and *Momordica charantia*. The results of amino acid sequence and conserved motif analysis

收稿日期: 2020-06-23 接受日期: 2020-07-17

福建省属公益类科研院所基本科研专项(批准号: 2018R1026-2)、福建省农业科学院科技创新团队建设项目(批准号: STIT2017-1-2)和福建省自然科学基金项目(批准号: 2019J01112)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0591-87582110, E-mail: zhs0246@163.com

Received: June 23, 2020 Accepted: July 17, 2020

This work was supported by Fujian Provincial Public Research Institute of Fundamental Research (Grant No.2018R1026-2), Scientific and Technological Innovation Team of Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.STIT2017-1-2), and Fujian Natural Science Foundation Project (Grant No.2019J01112)

\*Corresponding authors. Tel: +86-591-87582110, E-mail: zhs0246@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5328>

showed that the members of this gene family were more conserved. qRT-PCR analysis showed that the *BhMAPK15* was expressed in all tested tissues, and its expression level could be upregulated by abiotic stress treatment. The above results indicate that the *BhMAPK15* gene plays an important role in the response of abiotic stress.

**Keywords** *Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.; *BhMAPK15*; gene cloning; abiotic stress; expression profile

植物在整个生长和发育过程中都会受到非生物胁迫的影响,植物通过进化出复杂的信号转导机制和改变自身形态结构来响应胁迫<sup>[1]</sup>。由于植物自身的特性,它对外界环境的胁迫应答过程主要依靠各种信号转导途径完成,这个过程包括植物对胁迫信号识别、胁迫传递、受体对胁迫信号识别与传导等几个阶段<sup>[2]</sup>。蛋白质磷酸化是植物细胞信号转导的一种方式,主要通过植物感应部位对胁迫信号进行识别,在信号传递、信号级联放大等一系列过程中发挥重要作用。MAPK级联途径是重要的信号转导途径之一,该途径包含三种激酶:促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶(mitogen activated protein kinase kinase kinase, MAP3K)、促分裂原活化蛋白激酶激酶(mitogen activated protein kinase kinase, MAPKK)及促分裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)<sup>[3]</sup>。当发生生物或非生物胁迫时,该途径通过激活MAPK,外源信号经级联放大从而将细胞外信号传递到细胞内,最终完成细胞信号转导的过程<sup>[4]</sup>。MAPK是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,包含11个高度保守的亚结构域,活化区域序列包含TEY/TDY基序。依据系统发生关系,MAPK家族可以分为A、B、C和D 4组<sup>[5]</sup>。A组包含AtMAPK3/6/10,参与生物及非生物胁迫和一些激素反应<sup>[6-7]</sup>;B组参与细胞内信号转导及细胞分裂,包括AtMPK4/5/11/12/13<sup>[8]</sup>;C组参与信号转导和胁迫反应<sup>[9]</sup>;D组MAPK信息较少<sup>[10]</sup>。前人的研究表明,MAPK在植物非生物胁迫中发挥一定作用。例如, LONG等<sup>[11]</sup>研究表明,干旱处理后,转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)中*GbMPK3*增强其耐旱性,能够减少水分的损伤;XIONG等<sup>[12]</sup>发现,水稻(*Oryza sativa*)中的*OsMPK5*参与对盐胁迫的耐受性。此外,MPAK还在植物激素信号传导<sup>[13-16]</sup>、植物生长发育<sup>[17-18]</sup>、植物抗病等<sup>[19-20]</sup>方面起到作用。

冬瓜(*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.)属葫芦科冬瓜属一年生蔓性草本植物。在冬瓜生长周期中,会遭受低温、干旱等非生物胁迫影响,对其细胞造成不同程度的损伤,从而导致冬瓜生长发育及品质受到影响。因此,开展冬瓜抗逆研究在冬瓜应用基

础研究和指导生产上尤为重要。目前,对冬瓜的研究集中在种植管理<sup>[21-22]</sup>、药用价值<sup>[23-24]</sup>、营养物质<sup>[25]</sup>、遗传育种<sup>[26-28]</sup>等方面,而关于冬瓜抗逆方面研究较少。迄今为止,MAPK15基因功能鲜有研究,在冬瓜中尚未见报道。本研究在前期转录组高通量测序结果的基础上,克隆了冬瓜*BhMAPK15*基因,并检测了它们在不同时间经受低温、高温和干旱等非生物胁迫的表达模式,以期后续研究MAPK在冬瓜抗逆中的功能提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料为“黑皮冬瓜”,2019年9月播种于福建省农业科学院作物研究所蔬菜中心实验室。穴盘育苗,待幼苗长至三叶一心时,选择长势一致、无病害的幼苗分别放入人工恒温气候培养箱进行胁迫处理。每个处理进行3次重复。具体处理方法见表1。

### 1.2 方法

1.2.1 冬瓜*BhMAPK15*基因克隆 利用BioTeke公司通用植物总RNA提取试剂盒提取RNA,并用TaKaRa公司PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒反转录(具体操作依据说明书)获得cDNA第一链作为模板。基于前期转录组测序结果,筛选比对获得1条MAPK基因序列。根据引物设计原则,利用CE Design V 1.04设计引物(表2)。扩增PCR反应体系(25 μL): 10× LA Taq Buffer 2.5 μL, cDNA 1 μL, 上下游引物各1 μL, dNTP Mixture 0.5 μL, TaKaRa LA Taq 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 18.5 μL。反应程序: 94 °C预变性4 min; 94 °C变性45 s, 58 °C退火45 s, 72 °C延伸90 s, 35个循环; 72 °C延伸7 min。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,将目的条带切胶回收,连接到通用载体上,转化到大肠杆菌DH5α,筛菌后送至铂尚生物技术公司测序。

1.2.2 冬瓜*BhMAPK15*生物信息学分析 用NCBI在线工具ORF Finder软件寻找基因的开放阅读框(open reading frame, ORF);采用EXPASY(<http://www.Expasy.org>)中的ProtParam、SignalP 4.1 Server

表1 样品处理  
Table 1 Sample treatment

编号 Number	处理方法 Processing method	处理条件 Treatment conditions
1	4 °C	Contrast
2	4 °C	1 h
3	4 °C	6 h
4	4 °C	12 h
5	4 °C	24 h
6	42 °C	Contrast
7	42 °C	1 h
8	42 °C	6 h
9	42 °C	12 h
10	42 °C	24 h
11	Drought water loss	Contrast
12	Drought water loss	1 d
13	Drought water loss	2 d
14	Drought water loss	3 d
15	Drought water loss	4 d
16	Different tissue	Root
17	Different tissue	Stalk
18	Different tissue	Leaves
19	Different tissue	Flower

表2 冬瓜*BhMAPK15*基因克隆和表达分析引物

Table 2 Primers used for gene cloning and expression analysis of *BhMAPK15* in *B.hispida*

引物名称 Primers name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	引物用途 Application
BhMAPK15-F BhMAPK15-R	atg gcc atg gag gcc gaa ttc ATG CAG CCC GAT CAG AGA AG ccg ctg cag gtc gac gga tcc TTA GTA CCA GTT ATT TCC CGG TCC	Gene cloning
BhMAPK15-F BhMAPK15-R	GAG TTT CTT CTC GGG TAT GA GTT GTT GGT TCC GTG TTG	Real-time fluorescence quantitative PCR
EF-1 $\alpha$ -F EF-1 $\alpha$ -R	ACC GTC TAT CAA GCA CCC CCA AGT CCG CAG TCA AG	Reference gene

预测基因编码蛋白的分子量、理论等电点、保守结构域、信号肽等; SOPMA软件分析蛋白质的三级结构; NetPhos 3.1预测磷酸化位点; DNAMAN 6.0软件预测所编码蛋白的亲疏水性、比对多重序列; Wolf Psort([http:// wolfpsort.org/](http://wolfpsort.org/))、Cell-Ploc 2.0(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)和ProtComp(<http://www.softberry.com/>)软件进行亚细胞定位的预测分析; NCBI中Batch CD-Search确认结构域; Mega 5.0软件构建进化树; MEME(<http://meme-suite.org/index.html>)分析保守基序; STRING在线软件(<http://string-db.org/>)预测蛋白互作模式。

1.2.3 冬瓜*BhMAPK15*基因荧光定量PCR分析 根据

序列特异性, 设计基因荧光定量引物(表2), 以不同胁迫处理材料的cDNA为荧光定量PCR模板, *EF-1 $\alpha$* 作为内参基因。采用SYBR Green染料法, 参照TaKaRa公司的SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>试剂盒说明书操作。反应体系: 5  $\mu$ L SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>(2 $\times$ )、0.4  $\mu$ L Primer F(10  $\mu$ mol/L)、0.4  $\mu$ L Primer R(10  $\mu$ mol/L)、0.2  $\mu$ L Rox Reference Dye II(10  $\mu$ mol/L)、2  $\mu$ L cDNA、2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。反应程序: 95 °C预变性30 s, 95 °C变性5 s, 60 °C退火34 s, 40个循环, 结果采用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>算法进行分析。

1.2.4 数据处理 试验数据采用Excel 2010和SPSS 17.0进行整理分析。

## 2 结果

### 2.1 冬瓜*BhMAPK15*基因的克隆

利用课题组前期获得的冬瓜转录组测序结果, 对*MAPK*基因进行搜索, 初步得到冬瓜*MAPK*候选基因。利用NCBI数据库对候选基因结构域、ORF完整性等方面进行验证, 最终得到1个具有完整ORF的*MAPK*基因序列。根据基因的序列设计ORF引物, 冬

瓜叶片cDNA为模板, 进行PCR扩增, 结果发现大小约为1 700 bp的cDNA片段, 与预测片段大小基本一致。测序后, 得到基因完整的ORF序列, 大小为1 704 bp(图1和图2)。利用Blast软件与已知序列进行同源性比对, 结果表明, 该基因编码的氨基酸序列与甜瓜、黄瓜的同源性高。由此证实, 我们获得了1条冬瓜*MAPK*基因, 命名为*BhMAPK15*, 在GenBank登记注册, 登录

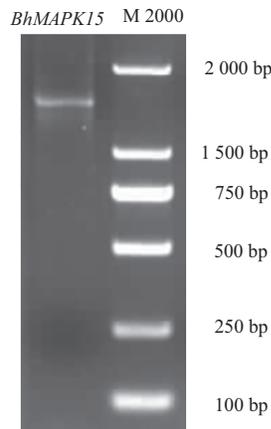
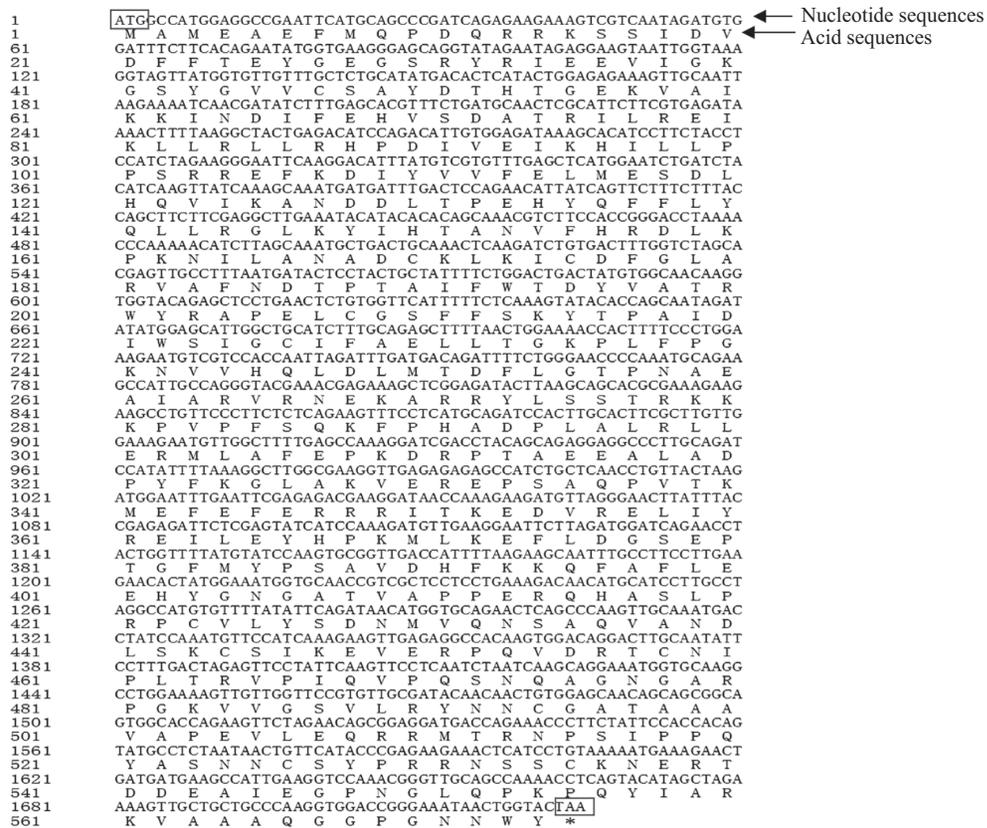


图1 冬瓜*BhMAPK15*基因ORF扩增结果

Fig.1 Electrophoresis results of ORF in *BhMAPK15*



方框内为起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA); \*代表终止子; 奇数行为核苷酸序列; 偶数行为氨基酸序列。

The initiation codon (ATG) and termination codon (TGA) were labeled by box; \*indicates the termination coden; odd lines represent nucleotide sequences; even rows represent amino acid sequences.

图2 冬瓜*BhMAPK15*核苷酸序列及其相应的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and putative amino acid sequences of *B.hispida*

号为MT501727。

## 2.2 冬瓜BhMAPK15氨基酸序列分析

利用ProtParam对 *BhMAPK15* 编码的氨基酸序列与其相似性较高的15个作物和模式植物拟南芥、水稻的MAPK15序列进行预测分析。结果如表3所示,其中18个MAPK15基因所编码的氨基酸长度相差较大,在498~571个氨基酸(amino acid, aa)不等。氨基酸比例相差较小,碱性氨基酸数量均多于酸性氨基酸,属于碱性蛋白。进一步分析18个MAPK15蛋白的特征。18个MAPK15基因编码蛋白的分子量范围56.97~64.87 kDa,等电点在7.70~8.98。不稳定系数在34.72~43.02,稳定蛋白占比高于不稳定蛋白,占总数的76.47%。

## 2.3 冬瓜BhMAPK15二级结构预测与亲/疏水性分析

利用SOPMA预测BhMAPK15蛋白二级结构,结果显示,无规则卷曲(random coil)、 $\alpha$ 螺旋(alpha helix)为该蛋白主要构成元件,分别占蛋白总氨基酸的41.80%和40.92%;利用Phyre2预测BhMAPK15蛋白三级结构,结果如图3所示。

利用DNAMAN 5.0对BhMAPK15氨基酸序列预测分析。结果(图4A和图4B)表明,BhMAPK15第

219位的半胱氨酸(Cys)分值最高(2.61),疏水性最强,第130位的苯丙氨酸(Phe)分值最低(-1.86),亲水性最强。同时从图4A和图4B可以看出,亲水性氨基酸与疏水性氨基酸在分值区中均有存在,但负值区氨基酸数值占比大于正值区,具有大量亲水氨基酸,这与Protaram预测结果一致。

## 2.4 冬瓜BhMAPK15生物活性分析与亚细胞定位预测

BhMAPK15蛋白跨膜结构预测表明,BhMAPK15不存在跨膜结构,均位于膜外。SignalP 4.1 Server预测BhMAPK15不具有典型的信号肽剪切位点,属于非分泌蛋白。NetPhos 3.1 Server中的磷酸化位点预测结果显示,该蛋白共51个磷酸化修饰的位点,其中Ser位点23个、Thr14个、Tyr14个。

利用在线分析软件Wolf Psort、Cell-Ploc 2.0和ProtComp分析BhMAPK15的亚细胞定位,Wolf Psort预测结果表明,BhMAPK15定位于细胞核、细胞质,K值分别为3和8,其定位于细胞质的可能性最大;Cell-Ploc 2.0预测结果显示,BhMAPK15定位于细胞核;ProtComp预测结果显示,细胞核和细胞质的预测分值较高,分别为11.41和12.16。综合上述结果,推

表3 冬瓜与其他作物MAPK15基因的基本信息

Table 3 List of MAPK15 genes in *B.hispida* and other plants

作物 Plant	登录号 GenBank NO	氨基酸数 Number of aa	分子量/kDa Molecular weight /kDa	理论等电点 PI	不稳定系数 Instability index	氨基酸比例/% Amino acid ratio /%	
						酸性氨基酸 (Asp+Glu)	碱性氨基酸 (Arg+Lys)
<i>Benincasa hispida</i>	MT501727	567	64.65	8.81	37.85	71	80
<i>Cucumis melo</i>	XM_008460322.2	566	64.53	8.81	38.47	71	80
<i>Cucumis sativus</i>	XM_011658338.2	566	64.42	8.81	39.36	71	80
<i>Cucurbita maxima</i>	XM_023150266.1	566	64.56	8.81	38.65	71	80
<i>Glycine soja</i>	XM_028385980.1	571	64.87	8.64	41.45	73	80
<i>Gossypium hirsutum</i>	XM_016892503.1	555	63.47	8.76	41.12	72	80
<i>Hevea brasiliensis</i>	XM_021792368.1	562	64.10	8.75	34.72	71	79
<i>Malus domestica</i>	XM_008355023.3	564	64.08	8.81	36.32	72	81
<i>Momordica charantia</i>	XM_022282796.1	566	64.62	8.81	41.67	71	80
<i>Prunus avium</i>	XM_021950774.1	560	63.67	8.82	37.38	72	81
<i>Prunus mume</i>	XM_008224804.1	560	63.60	8.72	37.65	72	80
<i>Pyrus x bretschneideri</i>	XM_009341653.2	564	64.12	8.80	35.38	72	81
<i>Quercus lobata</i>	XM_031118432.1	564	64.11	8.73	36.30	73	81
<i>Ziziphus jujuba</i>	XM_016032771.2	559	64.29	8.73	37.22	73	81
<i>Arachis hypogaea</i>	XM_029290297.1	561	63.75	8.98	39.65	71	83
<i>Juglans regia</i>	XM_018984996.1	562	64.08	8.65	37.68	73	80
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g73670	555	62.43	7.70	43.02	74	75
<i>Oryza sativa</i>	XP_015637400	498	56.97	8.43	38.91	65	69

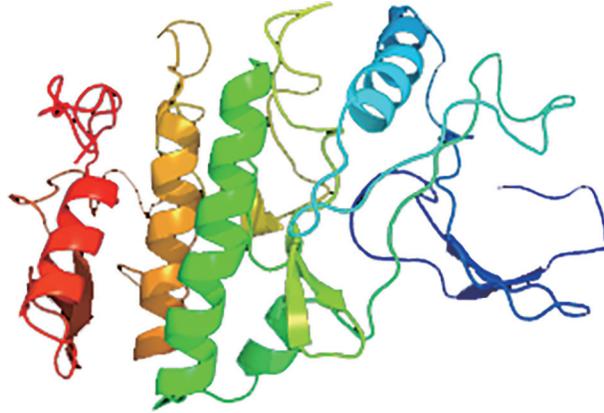
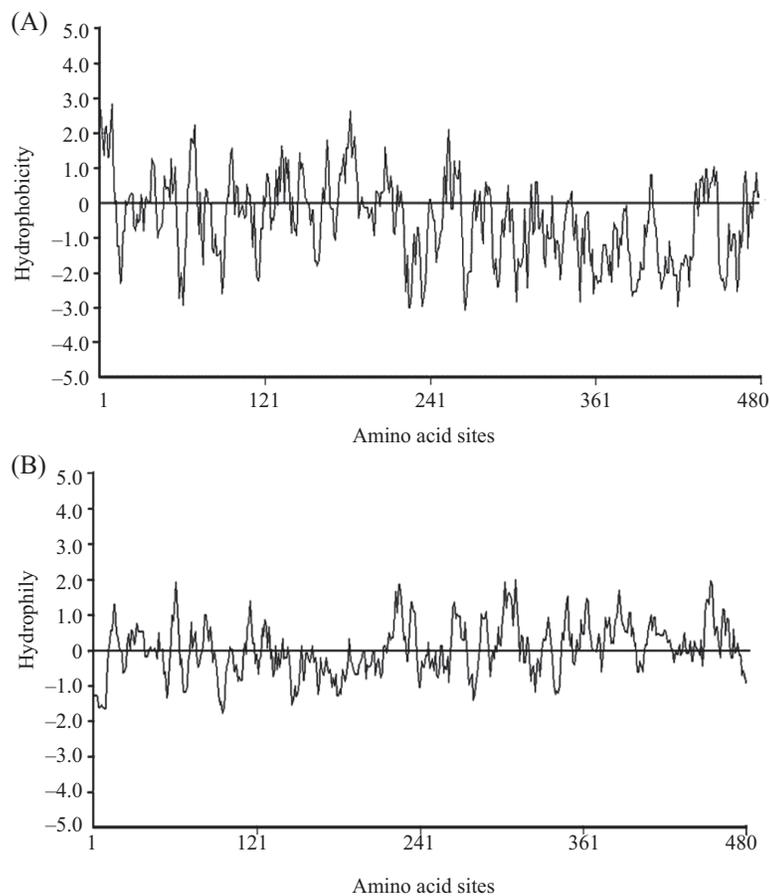


图3 冬瓜BhMAPK15三级结构预测

Fig.3 Prediction of BhMAPK15 tertiary structure in *B.hispida*

A: BhMAPK15氨基酸序列的疏水性分析; B: BhMAPK15氨基酸序列的亲水性分析。

A: analysis on the hydrophobicity of the amino acid sequence of BhMAPK15; B: analysis on the hydrophilicity of the amino acid sequence of BhMAPK15.

图4 冬瓜BhMAPK15蛋白亲疏水性分析

Fig.4 Hydrophobicity/hydrophilicity prediction of BhMAPK15 in *B.hispida*

测BhMAPK15可能定位于细胞核或细胞质。

## 2.5 冬瓜BhMAPK15氨基酸序列比对

利用NCBI数据库中CDD进行功能结构域分析, 结果显示, BhMAPK15均属于含TDY的MAPK成员, 含有ATP结合位点、多肽物底物结合位点A-loop等

多种保守的活性位点。仅含1个超家族结构域, 位于26~361个氨基酸位点间(图5A)。利用DNAMAN将*BhMAPK15*编码的氨基酸序列与其他六种作物进行比对(图5B), 比较氨基酸570个, 保守氨基酸561个, 其中完全保守氨基酸467个, 占82.51%。

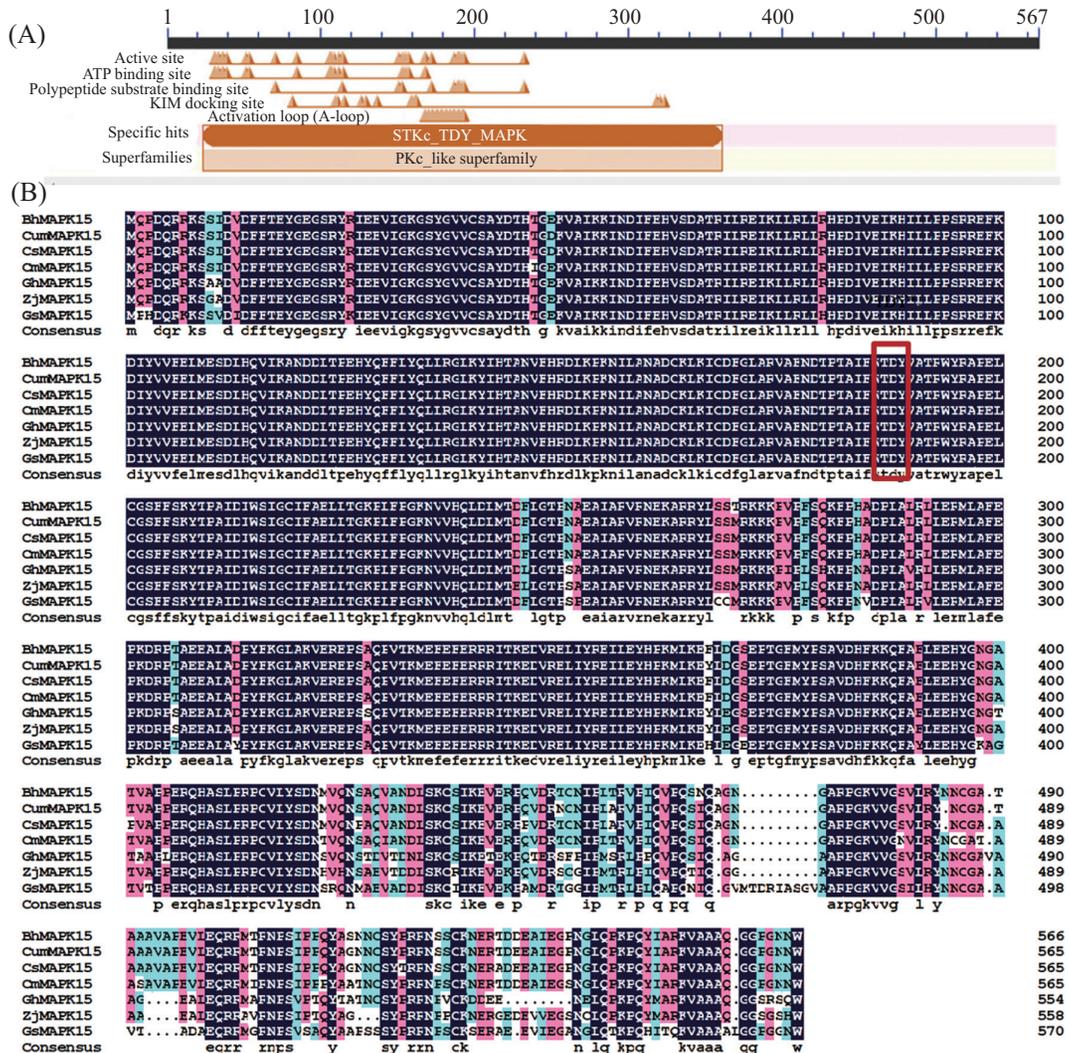
### 2.6 冬瓜BhMAPK15氨基酸序列进化树分析

利用 MEGA 5.0 构建冬瓜、拟南芥和水稻 MAPK15 的同源进化树。从进化树(图6)上可以看出,冬瓜 BhMAPK15 属于 D 组的 MAPK 成员,与 At-MAPK16 聚为一类,亲缘关系最近。进一步分析冬瓜 BhMAPK15 氨基酸序列与其他不同物种间的亲缘关系(图7),根据构建的进化树结果,MAPK 成员大致可以分为 I、II 两组, BhMAPK15 与同为葫芦科的甜瓜(*Cucumis melo*, XM\_008460322.2)、南瓜(*Cucurbita maxima*, XM\_023150266.1)、黄瓜(*Cucumis*

*sativus*, XM\_011658338.2)和苦瓜(*Momordica charantia*, XM\_022282796.1)聚为一支,说明 BhMAPK15 蛋白与它们之间的亲缘关系相对较近,与豆科的野生大豆(*Glycine soja*, XM\_028385980.1)、花生(*Arachis hypogaea*, XM\_029290297.1)亲缘关系较远。

### 2.7 冬瓜BhMAPK15保守基序分析

对冬瓜、水稻、拟南芥和其他不同物种间的 MAPK 蛋白序列进行保守基序(motif)分析,18 条蛋白序列最终得到 18 个保守基序,每条蛋白序列分布情况如图 8 所示。结果表明, I 组 14 个成员中除了

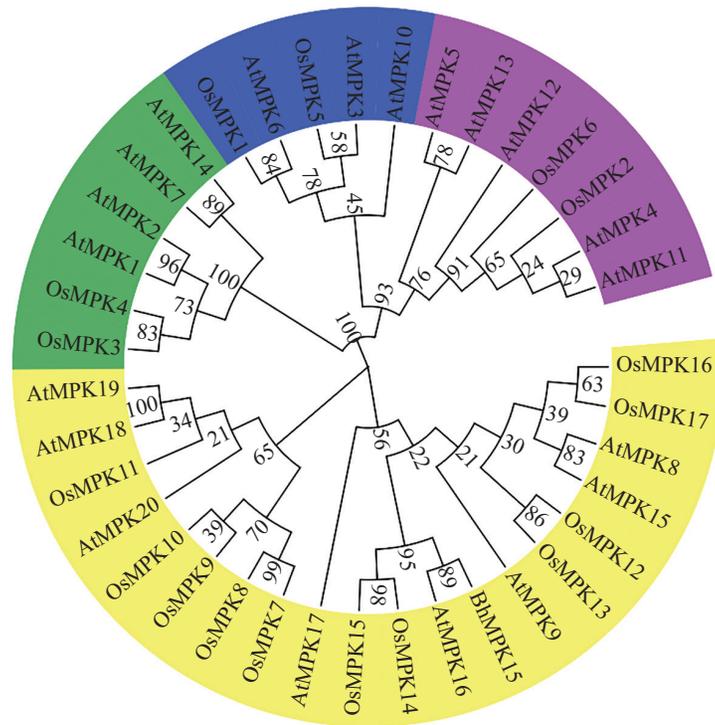


A: BhMAPK15 保守结构域分析; B: 冬瓜 BhMAPK15 与其他物种氨基酸序列的多重比对; 方框内为 TEY 三肽模体结构。BhMAPK15.冬瓜 (MT501727); CumMAPK15.甜瓜(XM\_008460322.2); CsMAPK15.黄瓜(XM\_011658338.2); CmMAPK15.南瓜(XM\_023150266.1); GhMAPK15.棉花 (XM\_016892503.1); ZjMAPK15.枣(XM\_016032771.2); GsMAPK15.野生大豆(XM\_028385980.1)。

A: conserved domain analysis of BhMAPK15; B: multiple alignment of amino acid sequences between BhMAPK15 from *B.hispida* and other plants; the TEY phosphorylation motifs are indicated by box. BhMAPK15.*Benincasa hispida*(MT501727); CumMAPK15.*Cucumis melo*(XM\_008460322.2); CsMAPK15.*Cucumis sativus*(XM\_011658338.2); CmMAPK15.*Cucurbita maxima*(XM\_023150266.1); GhMAPK15.*Gossypium hirsutum*(XM\_016892503.1); ZjMAPK15.*Ziziphus jujuba*(XM\_016032771.2); GsMAPK15.*Glycine soja*(XM\_028385980.1).

图5 BhMAPK15保守结构域与多重序列比对分析结果

Fig.5 Conserved domain and multiple sequence alignment analysis results of BhMAPK15



At: 拟南芥; Os: 水稻。蓝色表示A亚家族MAPK; 紫色表示B亚家族MAPK; 绿色表示C亚家族MAPK; 黄色表示D亚家族MAPK。  
At: *Arabidopsis thaliana*; Os: *Oryza sativa*. Blue indicates MAPK group A; Purple indicates MAPK group B; Green indicates MAPK group C; Yellow indicates MAPK group D.

图6 冬瓜与水稻和拟南芥的系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of MAPK15 proteins in *B.hispida*, *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*

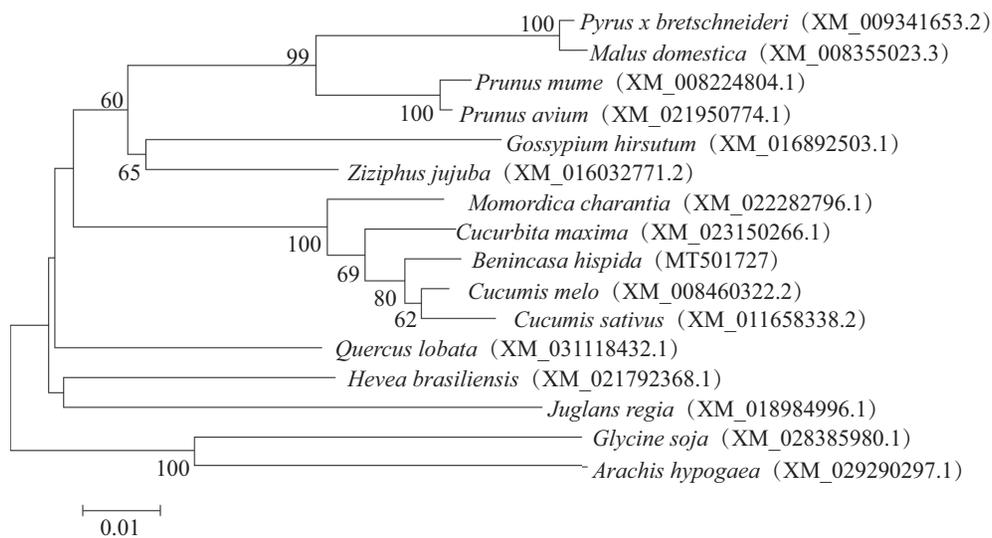


图7 冬瓜与其他物种MAPK15蛋白的系统进化树

Fig.7 Phylogenetic tree of MAPK15 proteins in *B.hispida* and other species

棉花 (*Gossypium hirsutum*, XM\_016892503.1)、苦瓜 (*Momordica charantia*, XM\_022282796.1)、南瓜 (*Cucurbita maxima*, XM\_023150266.1), 其余11条蛋白序列包含全部18个保守基序。II组成员野生大豆 (*Glycine soja*, XM\_028385980.1)和花生 (*Arachis hypogaea*, XM\_029290297.1)均不具有 motif18, 分别有保守基序

16和17个。水稻 (*Oryza sativa*, XP\_015615372)和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, Atlg73670)的保守基序数量与两组成员相比相差较大, 水稻有12个保守基序, 而拟南芥仅含7个保守基序。

## 2.8 冬瓜*BhMAPK15*潜在互作关系

利用STRING在线软件预测*BhMAPK15*蛋白可

能的互作关系(图9)。BhMAPK15蛋白进化树结果显示, BhMAPK15与AtMAPK16亲缘关系最近, 因此, 以拟南芥数据库为参考, MAPK16与XPO1A和XPO1B的互作系数均达到0.938, 与CDC2互作系数为

0.925。XPO1A、XPO1B、CDC2参与了多种细胞生命活动, XPO1A参与热诱导的氧化应激反应, CDC2在细胞周期调控中发挥作用。我们推测, MAPK16可以与XPO1A相互作用来响应非生物胁迫。

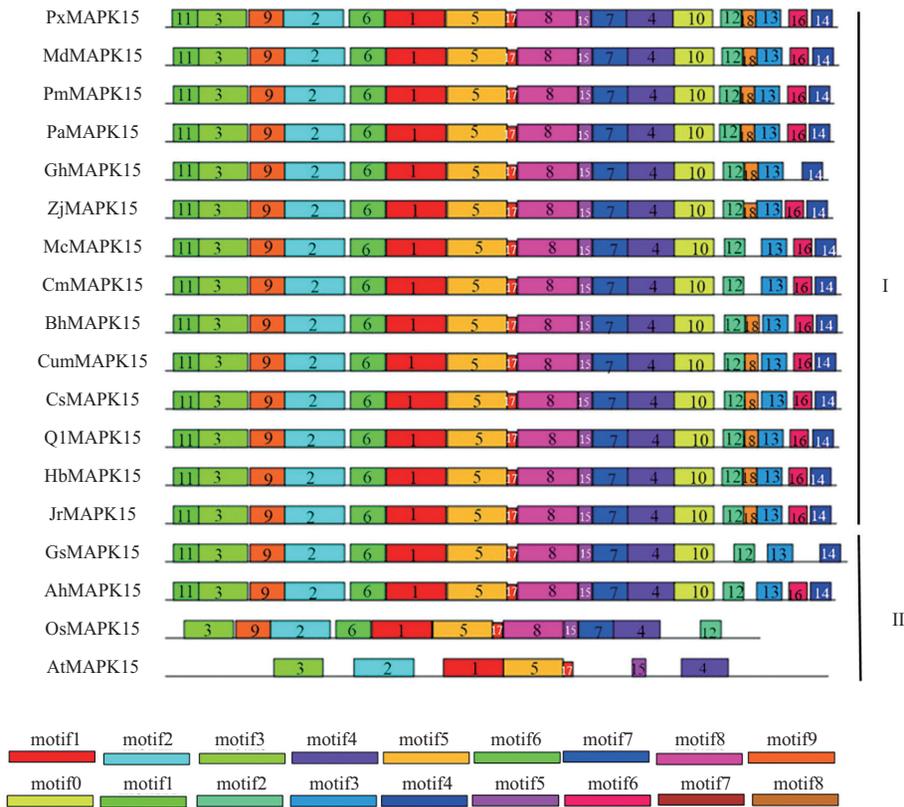


图8 冬瓜、水稻、拟南芥和其他物种MAPK15蛋白保守基序

Fig.8 Conserved motifs of MAPK15 proteins from *B.hispida*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* and other species

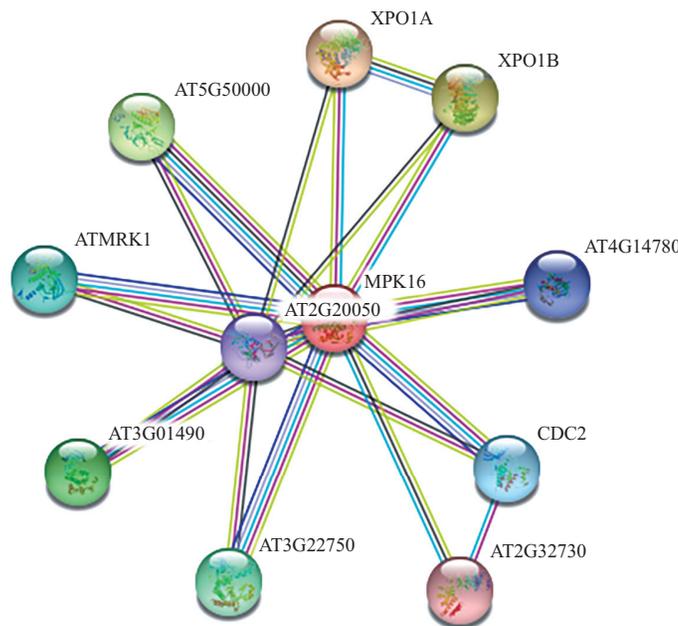
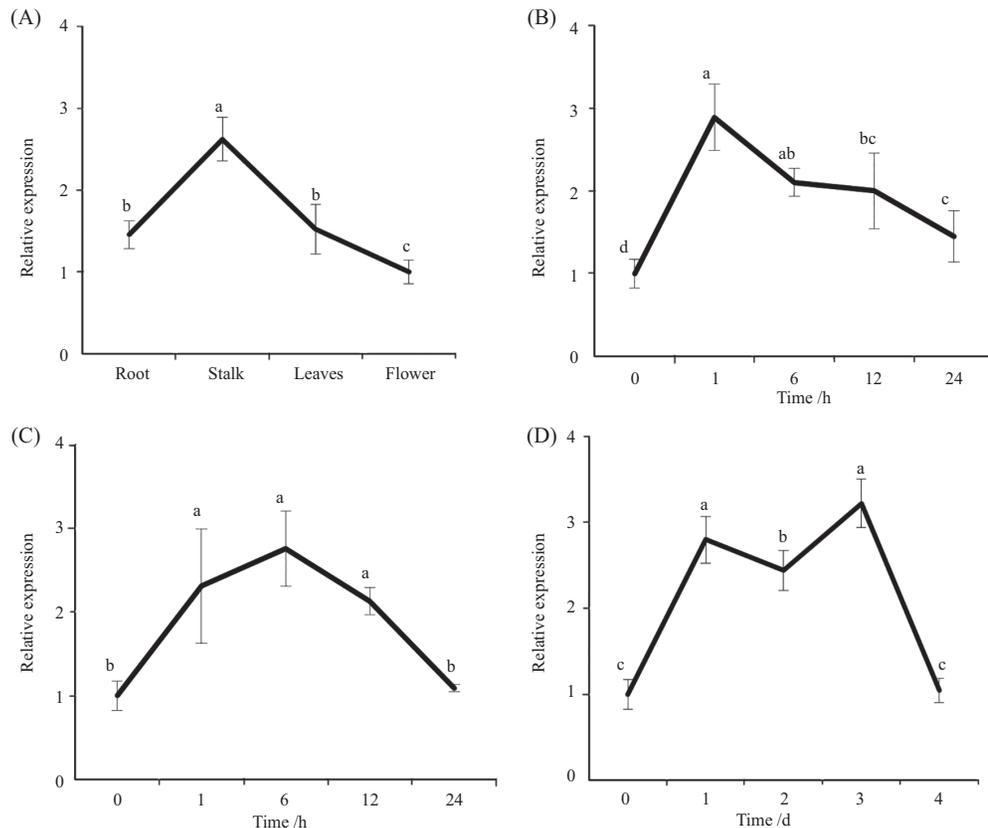


图9 以拟南芥蛋白质数据库为参考预测BhMAPK15蛋白互作模式

Fig.9 Interaction network of BhMAPK15 based on *Arabidopsis* protein database



A: 不同组织*BhMAPK15*基因表达水平; B: 低温处理下*BhMAPK15*基因表达水平; C: 高温处理下*BhMAPK15*基因表达水平; D: 干旱处理下*BhMAPK15*基因表达水平。相同字母表示组间差异不显著( $P>0.05$ ); 不同字母表示组间差异显著( $P<0.05$ )。

A: the *BhMAPK15* expression level in different tissue; B: the *BhMAPK15* expression level in low temperature treatment; C: the *BhMAPK15* expression level in high temperature treatment; D: the *BhMAPK15* expression level in drought treatment. Those with the same letters indicate that the difference between groups is not significant ( $P>0.05$ ); those with the different letters indicate that the difference between groups is significant ( $P<0.05$ ).

图10 冬瓜*BhMAPK15*基因在不同组织、低温、高温及干旱胁迫后表达情况

Fig.10 Expression profile of *BhMAPK15* gene in different organizations, low, high temperature and drought treatment

## 2.9 冬瓜*BhMAPK15*基因的表达分析

**2.9.1 *BhMAPK15*在不同组织中的表达模式分析** 为了研究冬瓜不同组织中*BhMAPK15*基因的表达模式, 采用实时荧光定量PCR检测。结果表明, 冬瓜中*BhMAPK15*基因在根、茎、叶、花中均有表达, 但表达量有所差异, 具有一定的表达特异性。*BhMAPK15*在茎中表达量最高, 其次是叶和根, 而在花中的表达量最低(图10)。

**2.9.2 *BhMAPK15*在不同逆境胁迫下的表达模式分析** 为了研究在不同逆境胁迫下*BhMAPK15*基因的表达模式, 采用实时荧光定量PCR检测了冬瓜苗在低温、高温和干旱条件下基因的表达情况, 结果如图10所示, 植株在低温胁迫下, *BhMAPK15*表达量在1 h内上升幅度较大, 6~12 h表达量有所下降, 但仍高于0 h。在高温胁迫前期, *BhMAPK15*表达量随着时间增长而上升, 在6 h时达到最大, 随后基因表达

量下降, 24 h时表达量几乎恢复至原来水平。干旱胁迫处理下, *BhMAPK15*表达量呈现先上升后下降再上升再下降的趋势, 在第三天时, 表达量最高, 约为0 h的3.2倍, 与对照组差异显著。结果表明, 该基因可能参与冬瓜非生物胁迫响应。

## 3 讨论

植物在整个生长周期中会受到低温、高温、干旱等各类非生物胁迫的影响。为了适应和抵御这些胁迫, 植物构建了一套系统的机制来应对它们。促分裂原活化蛋白激酶级联途径(MAPK cascades)是真核生物进化上保守的信号转导系统, 在调节植物生长发育、响应生物及非生物胁迫等方面起到重要作用<sup>[29-30]</sup>。本研究以转录组测序为基础, 从冬瓜中克隆得到1个MAPK家族成员, 命名为*BhMAPK15*。*BhMAPK15*属于D亚家族, ORF全长1 704 bp。为了了解

MAPK15家族成员生物学信息、进化关系等相关方面,从NCBI数据库中选取15个不同物种作物和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*) 2种模式植物的MAPK15进一步分析。通过分析18个MAPK基因的分子量、理论等电点、不稳定系数、保守基序等信息发现,18个MAPK基因差异不大,表明MAPK15基因家族成员在进化过程中的保守性较高。

在不同作物研究中发现,MAPK可能存在于各种不同的细胞器。程宁等<sup>[31]</sup>在桃(*Amygdalus persica*)的研究中发现,MAPK定位于细胞核。在茶树(*Camellia sinensis*)和番茄(*Solanum lycopersicum*)研究中发现,MAPK可能定位在细胞核和细胞质中<sup>[32-33]</sup>。POPESCU等<sup>[34]</sup>研究证明,MAPK可能存在于细胞质。本研究中BhMAPK15亚细胞定位预测定位于细胞质和细胞核中,我们推测,细胞核中的BhMAPK15可能通过级联途径激活靶物质来发挥作用;细胞质中的BhMAPK15则可能通过移动至细胞核作用于核中蛋白或直接作用于胞质内蛋白来调节相关基因的表达<sup>[35-36]</sup>。

将冬瓜BhMAPK15基因编码的氨基酸序列与17个水稻、20个拟南芥的MAPK序列进行比对,构建进化树。结果表明,BhMAPK15与拟南芥的AtMAPK16、水稻的OsMAPK14、OsMAPK15氨基酸序列相似性最高。杨丹丹课题组<sup>[37]</sup>对水稻OsMAPK14基因研究发现,该基因功能涉及非生物胁迫应答。根据前期研究结果,杨丹丹<sup>[37]</sup>对与之前源性最高的OsMAPK15基因开展研究。结果表明,OsMAPK15基因对干旱、高盐两种胁迫均有应答,而过表达OsMAPK15基因可以提高拟南芥转基因植株耐受性。OsMAPK15在植物抗病中也发挥一定作用。已有研究表明,OsMAPK15基因可能通过调节水稻的植物激素水杨酸(salicylic acid, SA)和茉莉酸(jasmonic acid, JA)信号通路来调控抗性<sup>[38]</sup>。以上研究说明,MAPK家族可能参与胁迫应答,并在其中有着重要作用。本研究分析了冬瓜BhMAPK15基因在不同组织中的表达情况。结果表明,所测的组织中(根、茎、叶、花)BhMAPK15均有表达,根中的表达量最高。说明BhMAPK15可能在相应器官发育或蛋白信号转导中发生作用。非生物胁迫下的表达情况表明,BhMAPK15在低温、高温、干旱的诱导下,均不同程度被诱导,出现表达上调。因此,我们推测BhMAPK15基因在不同胁迫下可能参与不同信号转导途径。

以拟南芥数据库为参考,利用STRING软件预测BhMAPK15蛋白潜在的互作关系。根据预测结果,推测BhMAPK15可能与XPO1A、XPO1B发生互作,通过参与某个级联途径在植物的非生物胁迫反应中发挥作用。XPO1A、XPO1B属于Exextin家族成员,它们作为一种核输出信号蛋白,对植物生长发育起着至关重要的作用,参与各类生物学过程,包括ABA信号途径调节、非生物胁迫调节等过程。已有研究表明,拟南芥中XPO1A能够响应干旱胁迫,提高抗旱性<sup>[39-41]</sup>。而BhMAPK15与XPO1A、XPO1B能否相互作用参与调控非生物胁迫过程,则需要进一步证实。后续可以利用质谱分析、酵母双杂交、双分子荧光互补、染色质免疫共沉淀等方法来对BhMAPK15和XPO1A、XPO1B之间相互关系进一步进行验证,了解它们在非生物胁迫反应中的响应机制。

### 参考文献 (References)

- [1] MIZOGUCHI T, ICHIMURA K, SHINOZAKI K. Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases [J]. Trends Biotechnol, 1997, 15: 15-9.
- [2] SINHA A K, JAGGI M, RAGHURAM B, et al. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress [J]. Plant Signal Behav, 2011, 6(2): 196-203.
- [3] CAKIR B, KILICKAYA A O. Mitogen-activated protein kinase cascades in *Vitis vinifera* [J]. Trends Plant Sci, 2015, 6: 556.
- [4] RISPAIL N, SOANES D, ANT C, et al. Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi [J]. Fungal Genet Biol, 2009, 46(4): 287-98.
- [5] MOHANTA T K, ARORA P K, MOHANTA N, et al. Identification of new members of the MAPK gene family in plants shows diverse conserved domains and novel activation loop variants [J]. BMC Genom, 2015, 16: 58.
- [6] DROILLARD M, BOUDUSOCQ M, BARBIER-BRYGOO H, et al. Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions, involvement of the MAP kinases at MPK3 and AtMPK6 [J]. FEBS Lett, 2002, doi: 10.1016/s0014-5793(02)03162-9.
- [7] GUO H L, FENG P Q, CHI W, et al. Plastid-nucleus communication involves calcium-modulated MAPK signalling [J]. Nat Commun, 2016, doi: 10.1038/ncomms12173.
- [8] 朱自果, 张庆田, 李秀杰, 等. 燕山葡萄MAPK基因的克隆、亚细胞定位及表达分析[J]. 农业生物技术学报(ZHU Z G, ZHANG Q T, LI X J, et al. Cloning, subcellular localization and expression analysis of MAPK genes from *Vitis yeshanensis* [J]. Journal of Agricultural Biotechnology), 2020, 28(3): 429-40.
- [9] DE ZELICOURT A, COLCOMBET J, HIRT H. The role of MAPK modules and ABA during abiotic stress signaling [J]. Trends Plant Sci, 2016, 21(8): 677-85.
- [10] ICHIMURA K, SHINOZAKI K G, SHEEN J, et al. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature

- [J]. Trends Plant Sci, 2002, 7(7): 301-8.
- [11] LONG L, GAO W, XU L, et al. GbMPK3, a mitogen-activated protein kinase from cotton, enhances drought and oxidative stress tolerance in tobacco [J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2014, 116(2): 153-62.
- [12] XIONG L, YANG Y. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase [J]. Plant Cell, 2003, 15: 745-59.
- [13] SHI J, AN H L, ZHANG L, et al. *GhMPK7*, a novel multiple stress-responsive cotton group C MAPK gene, has a role in broad spectrum disease resistance and plant development [J]. Plant Mol Biol, 2010, 74(1): 1-17.
- [15] YU Y, ZHEN S, WANG S, et al. Comparative transcriptome analysis of wheat embryo and endosperm responses to ABA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresses during seed germination [J]. BMC Genom, 2016, 17(1): 1-18.
- [16] DANQUAH A, ZELICOURT A D, COLCOMBET J, et al. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses [J]. Biotechnol Adv, 2013, 32 (1): 40-52.
- [17] BECK M, KOMIS G, ZIEMANN A, et al. Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytotubulin microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana* [J]. New Phytol, 2011, 189(4): 1069-83.
- [18] KOSETSU K, MATSUNAGA S, NAKAGAMI H, et al. The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, 2010, 22(11): 3778-90.
- [19] MENG X, ZHANG S. MAPK cascades in plant disease resistance signaling [J]. Annu Rev Phytopathol, 2013, 51(1): 245-66.
- [20] MAO G, MENG X, LIU Y, et al. Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive mapks drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2011, 23(4): 1639-53.
- [21] 路志强, 路志芳. 冬瓜栽培技术[J]. 上海蔬菜(LU Z Q, LU Z F. Cultivation techniques of winter melon [J]. Shanghai vegetables), 2019, 1: 27-30.
- [22] 张雪芬. 不同嫁接方法对黑皮冬瓜的果实性状及产量影响[J]. 现代农业研究(ZHANG X F. Effects of different grafting methods on fruit characters and yield of winter melon [J]. Modern Agriculture Research), 2020, 26(5): 85-7.
- [23] 周琪, 曹雪姣, 刘丽坤, 等. 冬瓜粗提物对小鼠紫外线晒伤皮肤的修复作用[J]. 天然产物研究与开发(ZHOU Q, CAO X J, LIU L K, et al. Rehabilitation effects of *Benincasa hispida* extract on UV-induced sunburn skin in mice [J]. Natural Product Research and Development), 2016, 28(9): 1475-8+98.
- [24] 夏明, 阮叶萍. 冬瓜提取物抗小鼠胃溃疡活性研究[J]. 食品科学(XIA M, RUAN Y P. Study on anti-gastric ulcer activity of winter melon extract in mice [J]. Food Science), 2005, 4: 243-6.
- [25] WU C M, LIOU S E, CHANG Y H, et al. Volatile compounds of the wax gourd (*Benincasa hispida* Cogn.) and a wax gourd beverage [J]. J food sci, 1987, 52(1): 132-4.
- [26] PANDEY S, KUMAR S, MISHRA U, et al. Genetic diversity in Indian ash gourd (*Benincasa hispida*) accessions as revealed by quantitative traits and RAPD markers [J]. Sci Hortic, 2008, 118: 80-6.
- [27] JIANG B, XIE D, LIU W, et al. De novo assembly and characterization of the transcriptome, and development of SSR markers in wax gourd (*Benincasa hispida*) [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71054.
- [28] JIANG B, LIU W R, XIE D, et al. High-density genetic map construction and gene mapping of pericarp color in wax gourd using specific-locus amplified fragment (SLAF) sequencing [J]. BMC Genom, 2015, 16: 1035.
- [29] HAMEL L P, NICOLE M C, SRITUBTIM S, et al. Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families [J]. Trends Plant Sci, 2006, 11(4): 192-8.
- [30] RODRIGUEZ M S, PETERSEN M, MUNDY J. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants [J]. Annu Rev Plant Biol, 2010, 61: 621-49.
- [31] 程宁, 冀美玲, 张泽杰, 等. 桃MPK3基因的克隆、表达及生物信息学分析[J]. 核农学报(CHENG N, YI M L, ZHANG Z E, et al. Cloning, expression and bioinformatics analysis of *MPK3* in peach [J]. Journal Nuclear Agriculture Science), 2020, 34(3): 468-76.
- [32] 王洁, 王燕, 潘长田, 等. 番茄SIMAPK9-2基因分离及表达分析[J]. 核农学报(WANG J, WANG Y, PAN C T, et al. Cloning and expression analysis of *SIMAPK9-2* in *Solanum Lycopersicum* L [J]. Journal of Nuclear Agriculture Science), 2016, 30(8): 1480-90.
- [33] 曹红利, 陈丹, 叶乃兴, 等. 茶树CsMAPK3的全长克隆及其逆境表达分析[J]. 园艺学报(CAO L H, CHEN D, YE N X, et al. Cloning and abiotic stress expression analysis of *CSMAPK3* gene in tea plant [J]. Acta Horticulturae Sinica), 2017, 44(11): 2203-14.
- [34] POPESCU S C, POPESCU G V, BACHAN S, et al. MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays [J]. Genes Dev, 2009, 23(1): 80-92.
- [35] SMÉKALOVÁ V, DOSKOČILOVÁ A, KOMIS G, et al. Cross-talk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants [J]. Biotechnol Adv, 2014, 32(1): 2-11.
- [36] SHEIKH A H, ESCHEN-LIPPOLD L, PECHER P, et al. Regulation of WRKY46 transcription factor function by mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* [J]. Front Plant Sci, 2016, 7(R87): 61.
- [37] 杨丹丹. 水稻OsMAPK15基因的克隆及功能的初步鉴定[D]. 河南: 河南师范大学, 2015.
- [38] HONG Y B, LIU Q, CAO Y R, et al. The *OsMPK15* negatively regulates magnaporthe oryza and xoo disease resistance via sa and ja signaling pathway in rice [J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 752.
- [39] 辛董董, 李桂荣, 郭卫丽, 等. 甜瓜MAPK基因的表达分析[J]. 北方园艺(XIN D D, LI G R, GUO L W, et al. Expression analysis of MAPK gene of muskmelon [J]. Northern Horticulture), 2018(24): 21-6.
- [40] STANKOVIC N, SCHLOESSER M, JORIS M, et al. Dynamic distribution and interaction of the *Arabidopsis* SRSF1 subfamily splicing factors [J]. Plant physiol, 2016, 170: 1000-13.
- [41] XU X Z, WAN W, JIANG G B, et al. Nucleocytoplasmic trafficking of the *Arabidopsis* WD40 repeat protein XIW1 regulates ABI5 stability and abscisic acid responses [J]. Elsevier Inc, 2019, 12(12): 1598-611.