

过表达黄瓜 *CsAGO1c* 基因降低 拟南芥植株的耐旱性

管丽丽, 况 勇, 肖 逸, 孙照龙, 甘德芳

(安徽农业大学园艺学院, 安徽 合肥 230036)

摘 要:克隆黄瓜 *CsAGO1c* 基因并研究干旱胁迫下的表达情况,构建 *CsAGO1c* 过表达载体农杆菌介导法转化拟南芥,研究干旱胁迫下 *CsAGO1c* 过表达拟南芥的表型及生理变化。结果表明:干旱胁迫下,*CsAGO1c* 基因在黄瓜根中的表达水平先下降后上升,*CsAGO1c* 表达水平在 6 h 下调 57%、在 12 h 下调 64%、在 24 h 上调 4.24 倍;在叶中呈现先下降后上升再下降的趋势,*CsAGO1c* 表达水平在 18 h 上调 1.16 倍。过表达拟南芥种子较野生型提早萌发,渗透试验显示,400 mmol · L⁻¹甘露醇处理明显抑制 OE2 根长的生长,其长度为 WT 的 54%;离体叶片失水率在 3、4、5 h 时分别为 WT 的 1.21 倍、1.27 倍、1.25 倍,均显著高于野生型。另外,干旱胁迫下过表达拟南芥叶片中超氧化物歧化酶活性约为 WT 的 64%,过氧化物酶活性约为 WT 的 51%,低于野生型。OE2 的丙二醛含量约为 WT 的 2.65 倍,显著高于野生型。说明异源表达 *CsAGO1c* 降低了拟南芥的耐旱性。

关键词:黄瓜;*CsAGO1c* 基因;过表达;拟南芥;耐旱性

中图分类号:S642.2; Q943.2 **文献标志码:**A

Overexpression of the cucumber *CsAGO1c* gene reduces drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*

GUAN Lili, KUANG Yong, XIAO Yi, SUN Zhaolong, GAN Defang

(College of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: *CsAGO1c* was cloned from the inbred line of cucumis variety ‘Xintaimici’, and its expression was analyzed under drought stress. An overexpression vector for *CsAGO1c* was constructed and used to transform *Arabidopsis* via Agrobacterium-mediated transformation. The phenotypic and physiological changes of the *CsAGO1c*-overexpressing plants were then studied under drought stress conditions. The results showed that the expression level of *CsAGO1c* in cucumber root first decreased and then increased. The expression level of *CsAGO1c* was down-regulated by 57% at 6 h, down-regulated by 64% at 12 h, and up-regulated by 4.24 times at 24 h. The expression level of *CsAGO1c* in the leaves decreased first, then increased and then decreased, and the expression level of *CsAGO1c* increased 1.16 times at 18 h. Overexpressed *Arabidopsis* seeds germinated earlier than the wild type. The penetration test showed that 400 mmol · L⁻¹ mannitol treatment significantly inhibited the growth of OE2 root length, which was 54% that of WT. The water loss rate of isolated leaves was 1.21, 1.27, and 1.25 times higher than that of the wild type (WT) at 3, 4, and 5 hours, respectively, showing a significantly greater loss compared to WT at all three time points. Additionally, under drought stress, the activities of superoxide dismutase and peroxidase in the overexpressing *Arabidopsis* lines were approximately 64% and 51% of those in WT, respectively, both significantly lower than WT levels. Meanwhile, the malondialdehyde content in OE2 was about three times higher than that of WT, indicating a marked increase. These findings suggest that heterologous expression of *CsAGO1c* reduces drought tolerance in *Arabidopsis*. This study provides valuable theoretical insight into the function of the *CsAGO1c* gene in cucumber and offers a foundation for breeding new drought-resistant cucumber varieties.

Keywords: cucumber; *CsAGO1c* gene; overexpression; *Arabidopsis*; drought tolerance

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是葫芦科一年生攀援草本植物,叶片大而薄,对水分反应特别敏感,干旱胁迫严重影响黄瓜的生长发育、产量和品质。Argonaute(AGO)蛋白是RNA诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)的主要组分,参与SRNA介导的基因沉默途径,能够调控SRNA靶基因的表达。植物AGO蛋白属于AGO-like亚家族,包括3个亚类,即AGO1/5/10、AGO2/3/7和AGO4/6/8/9^[1]。植物AGOs的作用模式主要有核苷酸内切、翻译抑制、RNA指导的DNA甲基化等,如拟南芥AGO1/2/4/7/10均可结合sRNAs并切割序列高度互补的靶标mRNA;AtAGO1和AtAGO10还可以与miRNA结合,抑制其序列高度互补的RNA翻译;另外,拟南芥AGO10可以整合来自AGO1的miRNA进而调控植物生长发育及病毒防御^[2]。

AGO蛋白作为RISC的核心元件,参与植物生长发育的调控^[3-4]。研究表明,AtAGO1在拟南芥多个器官的发育中发挥调控作用,调控侧生器官叶片、花瓣等的极性发育^[5-6];过表达AGO1的拟南芥叶片呈锯齿状,说明AtAGO1影响拟南芥叶片的发育^[7-8]。AGO3参与拟南芥生殖细胞发育^[9],AGO5参与调控拟南芥的开花时间^[10],AGO10通过时空上抑制miR165/166活性促进拟南芥根部顶端分生组织的维持^[11]。

AGO蛋白还参与调控植物逆境胁迫的应答^[12]。研究表明AGO1/2参与拟南芥响应逆境胁迫过程^[13],当细胞响应逆境胁迫时,AGO2与mRNA的相互作用会发生重构,并改变翻译效率^[14]。AGO4通过RNA-directed DNA methylation(RdDM)引导基因核染色质修饰、阻止隐性转录来维持或激活胁迫响应相关基因的表达^[15]。干旱胁迫下红豆植株*VaAGO10a*和*VaAGO10b*显著上调表达^[16],辣椒*CaAGO10b*也呈现上调表达^[17]。甘蔗*SsAGO10c*在渗透胁迫下显著上调表达^[18],而茶树*CsAGO10c*在高温和干旱同时处理下则显著下调表达^[19]。另外,下调表达*SIAGO4A*基因可显著提高番茄对干旱和盐胁迫的耐受性^[20]。研究表明,AGO1功能缺失促进叶片气孔关闭,从而提高拟南芥的耐旱性^[21];但也有研究表明,AGO1是脱落酸(Abscisic Acid, ABA)信号传导和抵抗干旱的负调控因子,拟南芥*ago1*突变体表现出ABA敏感性和耐旱性;进一步研究发现,拟南芥miR168a通过介导AtAGO1的表达以响应干旱和ABA胁迫^[22]。

目前,有关黄瓜Argonaute蛋白响应逆境胁迫的研究相对较少。我们前期采用干旱胁迫处理黄瓜植株,实时荧光定量PCR显示*CsAGO1s*呈现差异表达^[23];另外,干旱胁迫下的转录组研究发现*CsAGO1c*是差异表达基因,推测*CsAGO1c*可能参与黄瓜响应干旱胁迫过程。本研究克隆*CsAGO1c*基因,构建*CsAGO1c*过表达载体,农杆菌感染法转化拟南芥,研究干旱胁迫下过表达拟南芥的表型及相关生理指标变化。该研究结果对探明黄瓜*CsAGO1c*基因功能,以及对黄瓜的遗传改良和培育黄瓜抗旱新品种都具有重要的理论指导意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黄瓜‘新泰密刺’自交系由中国农业大学园艺学院陆晓蕾教授惠赠,2022年3月20日播种育苗,4月10日定植于安徽农业大学农萃园,花期套袋自交繁种。拟南芥(Col-0)由本实验室保存,种植于安徽农业大学园艺学院植物生长室。pBI121质粒由本实验室保存,pTOPO-Blunt Simple Vector购于北京艾德莱生物科技有限公司、大肠杆菌菌株DH5 α 和农杆菌菌株GV3101感受态均购自吐露港生物科技有限公司。

1.2 *CsAGO1c* 基因克隆及干旱胁迫下的表达分析

根据LOC101213206序列(包含N-末端、PAZ、MID和PIWI结构域)设计特异性引物(见表1),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以黄瓜幼果cDNA为模板,以两对引物*Cs1c-F1/Cs1c-R*和*Cs1c-F2/Cs1c-R2*(表1)扩增*CsAGO1c*基因,回收目的条带并测序验证。利用20%PEG-6000处理四叶期黄瓜幼苗,分别于处理后6、12、18、24 h提取黄瓜根和叶片总RNA,qRT-PCR检测*CsAGO1c*表达情况,引物见表1。试验设置3次生物学重复。

1.3 *CsAGO1c* 过表达载体构建以及对拟南芥的遗传转化

利用限制酶HindⅢ和Xba I双酶切pBI121载体使之线性化,采用ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit将*CsAGO1c*与线性化pBI121载体连接,生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证,重组质粒转化农杆菌GV3101感受态。采用花序感染法转化拟南芥,经筛选和鉴定获得*CsAGO1c*过表达拟南芥株系及后代种子。

表 1 *CsAGO1c* 基因克隆及实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 *CsAGO1c* gene cloning and real-time fluorescent quantitative PCR primers

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	作用 Function
<i>Cs1c-F</i>	GCTTTGTGTAAGATGGGGTCAAAT	扩增 <i>CsAGO1c</i> 及部分 5'-UTR Amplification of <i>CsAGO1c</i> and 5'-UTR
<i>Cs1c-R</i>	TCAGCAATAGAACATTACATTTTTCACCTC	
<i>Cs1c-F2</i>	ATGCCCTACATGCAAATGGAGC	扩增 <i>CsAGO1c</i> 基因 Amplification of <i>CsAGO1c</i>
<i>Cs1c-R2</i>	TCAGCAATAGAACATTACATTTTTCACCTC	
<i>Cs1c-q-F</i>	AGGAAAGGAAGGAGGAGAGCA	<i>CsAGO1c</i> 实时荧光定量 PCR 引物 Real-time fluorescent quantitative PCR primers for <i>CsAGO1c</i>
<i>Cs1c-q-R</i>	GGCTAGGAAGTGTTTGCTT	
<i>CsUBI-F</i>	CACCAAGCCCAAGAAGATC	
<i>CsUBI-R</i>	TAAACCTAATCACCACCAGC	
		实时荧光定量内参基因引物 Real-time fluorescence quantitative reference gene primers

1.4 *CsAGO1c* 过表达拟南芥表型分析

播种 T₃代(以下同)过表达和野生型(Col-0)拟南芥于 MS 培养基,4℃ 黑暗培养 3 d,然后置于 22℃,16 h 光照/8 h 黑暗下培养,14 d 后移入土中进行正常管理。调查和统计 WT、OE1、OE2 和 OE3 莲座叶、株高、花、角果等性状,每个株系各取 6 株进行统计。

1.5 *CsAGO1c* 过表达拟南芥的抗旱性分析

1.5.1 渗透胁迫下过表达拟南芥种子萌发及根长分析 过表达和野生型拟南芥种子点播到含 400 mmol·L⁻¹甘露醇的 MS 固体培养基中,每个株系点播 40 粒,3 次重复,以不加甘露醇的 MS 培养基为对照。以种子露白作为萌发记录标准,每隔一天统计一次种子萌发情况,连续统计 7 d。

过表达和野生型拟南芥种子正常培养 7 d 后,转入含 300、400、500 mmol·L⁻¹甘露醇的 MS 固体培养基中,竖直放置培养 21 d 后测量根长,以不加甘露醇的为对照,3 次重复。

1.5.2 过表达拟南芥离体叶片的失水率及气孔开度分析 离体叶片失水率参照肖胜华等^[24]的方法,选取过表达及野生型拟南芥大小一致的莲座叶,称量并记录初始鲜质量。正面朝上放置于 25℃、相对湿度 40%~50%条件下,分别在 30 min 及 1、2、3、4、5 h 时称重,记录数据并计算,3 次重复。叶片失水率(%)=(初始重量-处理后叶片重量)/(初始重量)×100%。

气孔开度参照 Wang 等^[25]的方法。选取过表达和野生型拟南芥莲座叶片漂浮在含 10 mmol·L⁻¹ KCl、50 mmol·L⁻¹ CaCl₂ 及 10 mmol·L⁻¹ MES(pH 6.15)的溶液中,22℃ 及 100 μmol·m⁻²·s⁻¹光照培养箱中处理 3 h,再加入 10 μmol·L⁻¹ ABA,相同条件下孵育 3 h,以未经 ABA 处理的样品为对照。随后剥离下表皮,置于 Axio vert.A1 倒置荧光显微镜(德国 Zeiss)上观察气孔开闭情况,对照组和处理组

各观察 3 个视野,每个视野随机观察 7 个气孔,利用 IMAGEJ 软件测量气孔长度和宽度,气孔开度=气孔宽度/气孔长度。

1.5.3 断水处理下过表达拟南芥的生理指标分析 播种过表达和野生型拟南芥,4℃ 黑暗培养 3 d,再正常培养 14 d 后,移栽到营养钵(营养土:蛭石=2:1)中,生长 14 d 后进行断水处理 11 d,正常浇水管理的作为对照。野生型与过表达拟南芥株系各取 6 个植株。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性及丙二醛(MDA)含量测定参照周念念^[26]的方法,脯氨酸含量测定采用酸性茚三酮比色法^[27]。

1.6 数据分析

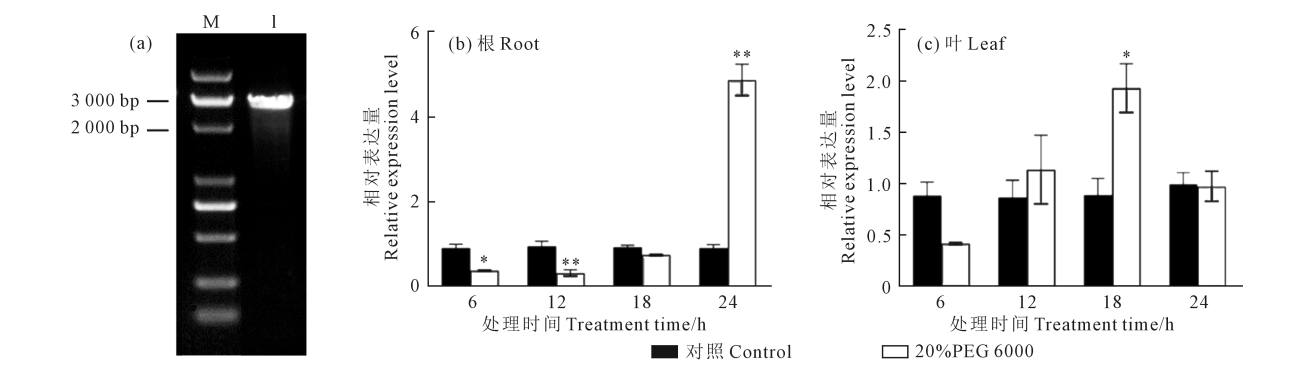
使用 Excel 记录和整理试验数据,利用 Graph Pad Prism 软件进行数据差异显著性分析以及图形绘制。

2 结果与分析

2.1 *CsAGO1c* 基因克隆及干旱胁迫下的表达分析

以黄瓜幼果 cDNA 为模板 PCR 扩增 *CsAGO1c* 基因,得到长度约 3 000 bp 条带,测序结果显示大小为 2781 bp,与数据库公布序列一致(图 1a)。编码 926 个氨基酸,包含 AGO 蛋白典型结构域即 N-末端结构域、PAZ 结构域、PIWI 结构域和 MID 结构域。

利用 20%PEG-6000 处理四叶期黄瓜幼苗,在处理后不同时间提取黄瓜根和叶片总 RNA,qRT-PCR 检测 *CsAGO1c* 表达情况。结果显示干旱胁迫下黄瓜根中 *CsAGO1c* 表达量呈现先下降后上升的变化趋势,在 6、12、24 h 的表达量差异达显著或极显著水平(图 1b),*CsAGO1c* 表达水平在 6 h 下调 57%、在 12 h 下调 64%、在 24 h 上调 4.24 倍;黄瓜叶片中 *CsAGO1c* 表达量呈现先下降后上调再下调的趋势,*CsAGO1c* 表达水平在 18 h 上调 1.16 倍,表达差异达显著水平(图 1c)。猜测 *CsAGO1c* 可能参与黄瓜响应干旱胁迫过程。



注: * * 和 * 分别表示显著性水平为 $P<0.01$ 和 $P<0.05$, 下同。图 1a 中, M; 5 000 marker; 1; *CsAGO1c* 基因扩增产物。
Note: * * and * represent significance levels at $P<0.01$ and $P<0.05$, respectively. The same below. In figure 1a, M; 5 000 marker; 1; Amplified product of *CsAGO1c* gene.

图 1 *CsAGO1c* 基因的 PCR 扩增及干旱胁迫下的表达分析
Fig.1 PCR amplification of *CsAGO1c* gene and expression analysis under drought stress

2.2 *CsAGO1c* 过表达拟南芥表型分析

为分析过表达 *CsAGO1c* 对拟南芥生长发育影响,比较 T_3 代 *CsAGO1c* 过表达拟南芥株系和 WT 植株的表型。结果表明过表达拟南芥与 WT 植株生长无明显差异(图 2a),过表达拟南芥的叶片与 WT 也未见明显差异(图 2b)。待植株进入成熟期,对其主茎、角果长进行观察分析,结果显示,差异均不显著(图 2c~e)。

2.3 *CsAGO1c* 过表达拟南芥抗旱性分析

2.3.1 渗透胁迫下过表达拟南芥种子萌发及根长 T_3 代过表达拟南芥和 WT 种子点播到 MS 和含 $400\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇的 MS 培养基中培养,统计种子萌发情况。结果显示过表达拟南芥和 WT 种子在两种培养基上的萌发情况存在差异(图 3a、b),在 MS 培养基上培养 7 d,OE1、OE2 和 WT 种子萌发率分别为 86.47%、97.56%和 99.27%(图 3c);而在含甘露醇的 MS 培养基上培养 7 d,OE1、OE2 和 WT 种子萌发均受到抑制,萌发率分别为 82.54%、93.62%和 73.06%,WT 种子萌发率较过表达拟南芥更低,下降了 26.21%,OE1 和 OE2 萌发率分别下降 3.93%和 3.94%(图 3d)。

T_3 代过表达拟南芥和 WT 培养 7 d 后,转移至含 0 、 300 、 400 、 $500\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇的 MS 培养基上,21 d 后测量拟南芥根长。结果表明在无甘露醇的 MS 培养基中,过表达拟南芥和 WT 根长无显著差异(图 4a、e),随着甘露醇浓度的升高,拟南芥生长受到抑制,其中 $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇处理下,过表达拟南芥与 WT 差异不显著(图 4b、f); $400\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇处理下,过表达拟南芥根长受抑制程度大于 WT,且 OE2 与 WT 根长差异显著,OE2 的根长为 WT 的 54%(图 4c、g); $500\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇处理

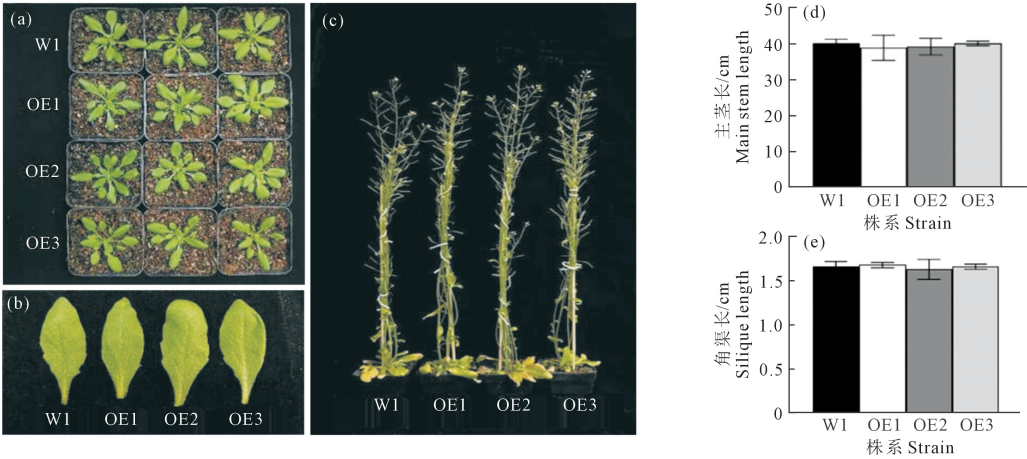
下,过表达拟南芥 OE1 和 OE2 根长受抑制程度较大,但差异不显著(图 4d、h)。

2.3.2 过表达拟南芥离体叶片失水率及气孔开度 离体叶片失水率在很大程度上反映植株叶片的保水能力。为分析过表达拟南芥叶片保水能力,剪取 WT 和过表达拟南芥株系莲座叶片,称取叶片初始鲜质量及处理后 30 min、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 的质量,测定其失水率。结果表明随着时间的延长,过表达拟南芥和 WT 的失水率都升高,但过表达拟南芥叶片失水率高于 WT,OE1 在 4 h 和 5 h 的失水率与 WT 差异显著,OE2 在 3、4、5 h 的失水率与 WT 差异均达到显著水平(图 5a)。说明异源过表达 *CsAGO1c* 促进了拟南芥叶片水分散失。

叶片失水率主要取决于气孔开度,而气孔开度受到 ABA 信号诱导。为了解过表达 *CsAGO1c* 是否调控 ABA 信号依赖的气孔开度,利用外源 ABA 处理过表达拟南芥及 WT 叶片。结果显示, $0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 处理下,野生型和过表达拟南芥叶片失水率差异不明显, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 处理下,过表达拟南芥和 WT 叶片气孔开度都减小,但两者之间差异不明显(图 5b、c)。

2.3.3 断水处理对过表达拟南芥表型及生理指标的影响 为了评估 *CsAGO1c* 过表达拟南芥的耐旱性,选取长势一致的过表达拟南芥和 WT 进行断水试验。断水 11 d 后,OE1 与 WT 的生长状态差异不明显,但 OE2 萎焉程度较 WT 高(图 6a、b)。

断水处理后过表达拟南芥不同株系 SOD 和 POD 的活性均显著低于野生型,其活性为野生型的 64%和 51%(图 6c、d)。MDA 含量反映膜脂过氧化程度,可用于评价植株遭受干旱胁迫的程度。正常生长情况下,WT 和过表达拟南芥叶片 MDA 的含



注:(a):WT 和过表达拟南芥植株表型;(b):WT 和过表达拟南芥叶片表型;(c):WT 和过表达拟南芥成熟期表型。

Note:(a):Phenotypes of WT and overexpressed *Arabidopsis* plants; (b):Leaves of WT and overexpressed *Arabidopsis*; (c): Mature phenotype of WT and overexpressed *Arabidopsis*.

图 2 过表达拟南芥表型分析

Fig.2 Phenotypic analysis of *CsAGO1c* overexpressed *Arabidopsis*

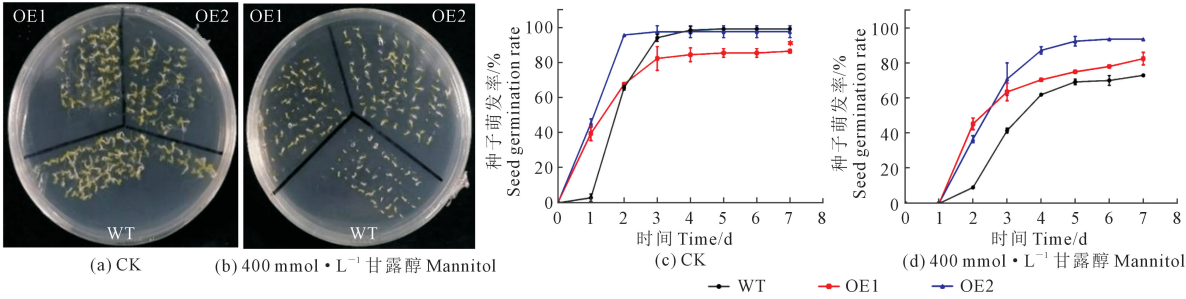


图 3 渗透胁迫 7d 过表达拟南芥种子萌发率分析

Fig.3 Germination rate analysis of overexpressed *Arabidopsis* seeds after 7 days of osmotic stress

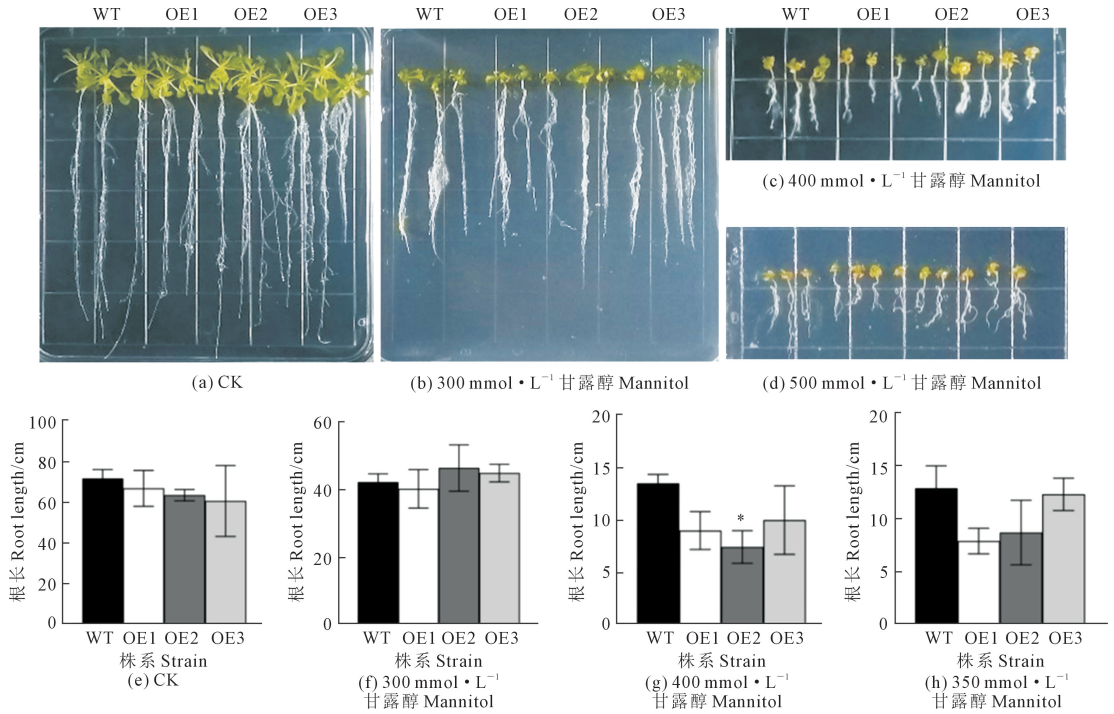


图 4 渗透胁迫 21d 过表达拟南芥根长分析

Fig.4 Root length analysis of overexpressed *Arabidopsis* after 21 days of osmotic stress

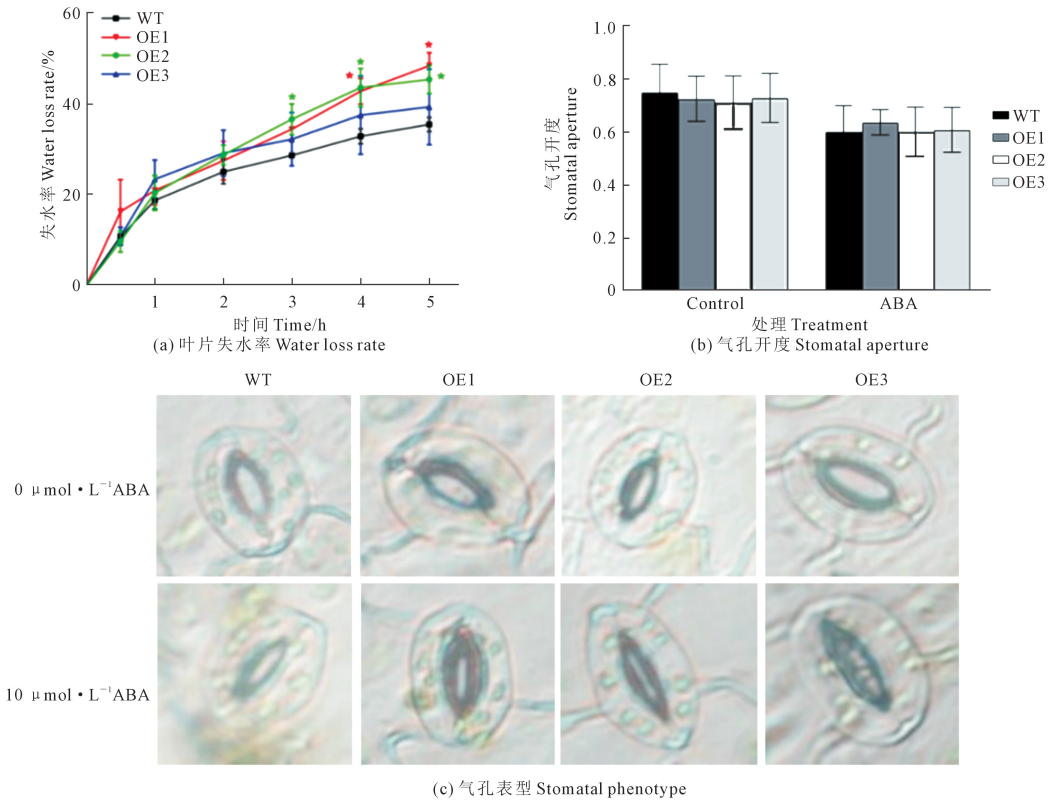


图 5 过表达拟南芥叶片失水率及气孔开度分析
Fig.5 Analysis of water loss rate and stomatal aperture of overexpressed *Arabidopsis thaliana* leaves

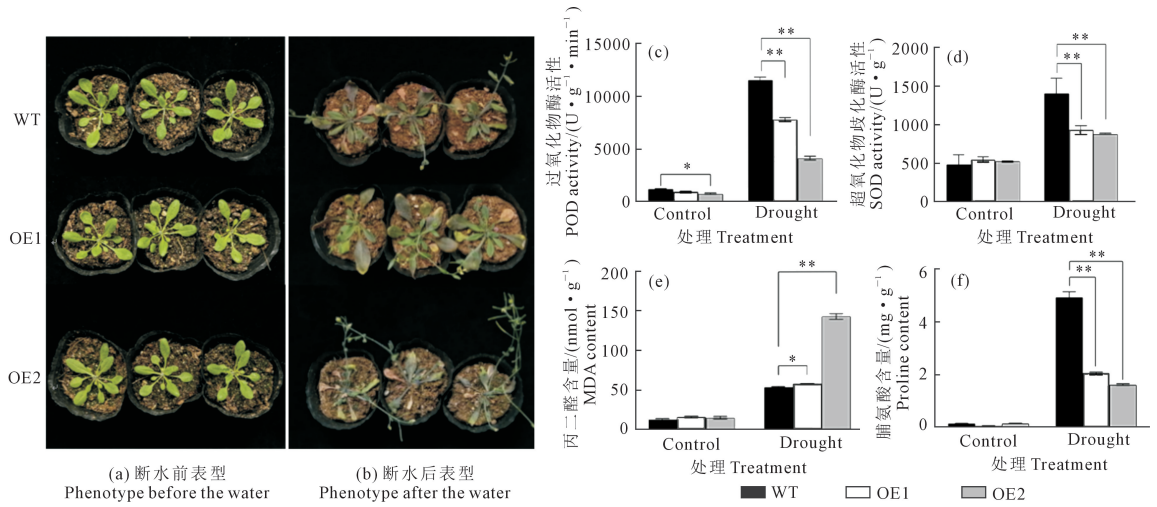


图 6 断水处理对过表达拟南芥表型及生理指标的影响
Fig.6 Effect of water deprivation on phenotype and physiological indexes of overexpressed *Arabidopsis* leaves

量差异不显著,断水处理 11 d 后,过表达拟南芥叶片中的 MDA 含量显著高于野生型,为野生型的 2.65 倍(图 6e)。另外,断水处理后,不同过表达拟南芥株系的脯氨酸含量均极显著低于 WT(图 6f)。

3 讨 论

3.1 黄瓜 *CsAGO1c* 基因克隆及表达分析

植物 AGO 家族具有 4 个核心结构域:N-末端结构域、PAZ 结构域、PIWI 结构域和 MID 结构域。

利用 AGO 蛋白保守结构域搜索葫芦科基因组数据库,搜索到基因序列号 Csa1G408700(只含 N-末端和 PAZ 结构域)和 Csa1G408710(只含 MID 和 PIWI 结构域),但两者结构域均不完整。因此,又根据 Csa1G408700 和 Csa1G408710 序列,利用 NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库中 blast 功能,搜索到序列号 XM_004146242.3(含 N-末端、PAZ、MID 和 PIWI 等完整结构域)。因此以 XM_004146242.3 作为 *CsAGO1c* 参考序列设计引物,

从黄瓜幼果中克隆 *CsAGO1c* 基因,结果显示 *CsAGO1c* 扩增序列与参考序列一致。*CsAGO1c* 蛋白与甜瓜、南瓜等瓜类同源 AGO 蛋白具有高度保守性,与拟南芥 *AtAGO10* 属于同一分支,且与 *AtAGO1* 同源性高,猜测 *CsAGO1c* 可能与 *AGO10* 和 *AGO1* 具有相似的功能。研究表明拟南芥 *ago1* 突变体表现出 ABA 敏感性和耐旱性^[22]。研究发现,*AGO10* 同源蛋白在干旱胁迫下显著差异表达,茶树 *CsAGO10c* 在高温和干旱处理时显著下调表达^[19],辣椒 *CaAGO10b* 在干旱和盐胁迫下上调表达^[17],干旱胁迫下杨树叶片 *PtAGO10a* 和 *PtAGO10b* 的表达水平是先升高后降低、再升高后降低的趋势^[28]。课题组前期研究也发现黄瓜 *CsAGO1c* 在干旱胁迫下高表达^[23]。本研究利用 PEG6000 模拟干旱胁迫处理黄瓜幼苗,分析 *CsAGO1c* 基因的表达模式,结果发现干旱胁迫下 *CsAGO1c* 在根中的表达水平是先下降后上升,而在叶片中的表达水平是先上升后下降的趋势,这与杨树叶片中 *PtAGO10a* 和 *PtAGO10b* 的表达趋势有差异。因此干旱胁迫下 *CsAGO1c* 的表达模式暗示其可能是黄瓜响应干旱胁迫的重要调控因子。

3.2 过表达 *CsAGO1c* 降低拟南芥抗旱性

甘露醇作为渗透调节物质被广泛用于模拟植物干旱胁迫。随着甘露醇浓度的提高,*CsAGO1c* 过表达拟南芥根长受抑制程度大于野生型拟南芥。离体叶片失水率反映植株叶片的保水能力,而叶片失水率又取决于气孔开度。干旱胁迫会导致脱落酸(ABA)增多,当脱落酸到达保卫细胞时,通过分支信号级联关闭气孔来降低蒸腾速率。Lin 等^[29]研究表明拟南芥 *tppi1* 突变体通过调节气孔开度降低抗旱性,其中 *tppi1* 突变体叶片失水率明显高于野生型,且 ABA 处理后,*tppi1* 突变体叶片的气孔开度明显大于野生型。本研究 *CsAGO1c* 过表达拟南芥叶片失水率提高,外源 ABA 处理后过表达拟南芥叶片气孔开度没有显著变化。说明过表达拟南芥不是通过 ABA 信号依赖的气孔开度来调节气孔开闭和蒸腾作用。

干旱胁迫下活性氧过量积累引起脂质过氧化,造成 MDA 含量增加^[30],而 MDA 含量又反映了植株遭受干旱胁迫的程度。Huang 等^[20]研究发现,过表达 *SIAGO4A* 番茄 MDA 含量显著高于野生型,且比野生型更容易出现叶片萎焉等干燥性状。本研究 *CsAGO1c* 过表达拟南芥在干旱胁迫下叶片中 MDA 含量显著高于野生型,而且受损程度也较野生型严重。说明异源表达 *CsAGO1c* 降低了拟南芥对干旱

的抗性。SOD 和 POD 是生物体抗氧化酶系统中的重要组分,能够清除体内多余的活性氧,其活性大小也可以反映植株对干旱胁迫的响应程度。Huang 等^[20]研究表明,干旱胁迫下过表达 *SIAGO4A* 番茄 SOD 和过氧化氢酶活性显著下降,导致耐旱性降低。本研究 *CsAGO1c* 过表达拟南芥在断水胁迫处理下 SOD 和 POD 活性显著降低,脯氨酸含量显著下降,说明异源过表达 *CsAGO1c* 降低了拟南芥植株对干旱胁迫的抵抗能力。

4 结 论

(1) PEG-6000 胁迫处理下黄瓜 *CsAGO1c* 的表达水平存在差异,在根中的表达水平先下降后上升,在叶中呈现先上升后下降趋势。

(2) 渗透胁迫处理下过表达拟南芥种子较野生型提早萌发,离体叶片失水率显著高于野生型。

(3) 断水处理下过表达拟南芥叶片中抗氧化酶的活性和脯氨酸含量显著低于野生型,而丙二醛含量则显著高于野生型。

综上所述,异源过表达 *CsAGO1c* 降低了拟南芥的耐旱性。本研究可为探明黄瓜 *CsAGO1c* 基因功能以及培育黄瓜抗旱新品种提供理论参考。

参 考 文 献:

- [1] MALLORY A, VAUCHERET H. Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(12): 3879-3889.
- [2] 蒲伟军, 谭冰兰, 朱莉. Argonaute 蛋白在植物逆境胁迫响应中的功能[J]. *中国农业科技导报*, 2021, 23(2): 17-26.
- [3] PU W J, TAN B L, ZHU L. Progress on the biological functions of Argonaute proteins in response to stress in plants[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2021, 23(2): 17-26.
- [4] LIU X, TANG S, JIA G, et al. The C-terminal motif of SiAGO1b is required for the regulation of growth, development and stress responses in foxtail millet (*Setaria italica* (L.) P. Beauv.) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(11): 3237-3249.
- [5] ZHONG J, HE W, PENG Z, et al. A putative AGO protein, OsAGO17, positively regulates grain size and grain weight through Os-miR397b in rice [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 8(4): 916-928.
- [6] DU F, GONG W, BOSCA S, et al. Dose-dependent AGO1 mediated inhibition of the miRNA165/166 pathway modulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* shoot apical meristem[J]. *Plant Communications*, 2019, 1(1): 100002.
- [7] RÉ D A, CAMBIAGNO D A, ARCE A L, et al. Curly leaf regulates microRNA activity by controlling ARGONAUTE 1 degradation in plants [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(1): 72-87.
- [8] CARBONELL A, FAHLGREN N, GARCIA-RUIZ H, et al. Functional analysis of three *Arabidopsis* ARGONAUTES using slicer-defective

mutants[J]. *Plant Cell*, 2012, 24(9): 3613-3629.

[8] 李素芬, 赵燕, 冀芦沙. *AGO1* 基因对拟南芥叶边缘锯齿状发育的影响[J]. 河北科技大学学报, 2014, 35(1): 51-57.

LI S F, ZHAO Y, JI L S. Influences of *AGO1* to the development of the *Arabidopsis* leaves with the serration margin[J]. *Journal of Hebei University of Science and Technology*, 2014, 35(1): 51-57.

[9] JULLIEN P E, GROB S, MARCHAIS A, et al. Functional characterization of *Arabidopsis* ARGONAUTE 3 in reproductive tissues [J]. *Plant Journal*, 2020, 103(5): 1796-1809.

[10] TUCKER M R, OKADA T, HU Y, et al. Somatic small RNA pathways promote the mitotic events of megagametogenesis during female reproductive development in *Arabidopsis*[J]. *Development*, 2012, 139(8): 1399-1404.

[11] ZHOU Y Y, HONDA M, ZHU H L, et al. Spatiotemporal sequestration of miR165/166 by *Arabidopsis* Argonaute10 promotes shoot apical meristem maintenance[J]. *Cell Reports*, 2015, 10(11): 1819-1827.

[12] SONG X W, LI Y, CAO X F, et al. MicroRNAs and their regulatory roles in plant-environment interactions[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70: 489-525.

[13] DOLATA J, BAJCZYK M, BIELEWICZ D, et al. Salt stress reveals a new role for ARGONAUTE1 in miRNA biogenesis at the transcriptional and post-transcriptional levels[J]. *Plant Physiology*, 2016, 172(1): 297-312.

[14] KARGINOV F V, HANNON G J. Remodeling of Ago2-mRNA interactions upon cellular stress reflects miRNA complementarity and correlates with altered translation rates [J]. *Genes & Development*, 2013, 27(14): 1624-1632.

[15] AU P C K, DENNIS E S, WANG M B. Analysis of Argonaute 4-associated long non-coding RNA in *Arabidopsis thaliana* sheds novel insights into gene regulation through RNA-directed DNA methylation [J]. *Genes*, 2017, 8(8): 198.

[16] LI Y Q, MA E Z, YANG K, et al. Genome-wide analysis of key gene families in RNA silencing and their responses to biotic and drought stresses in adzuki bean[J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 195.

[17] QIN L, MO N, MUHAMMAD T, et al. Genome-wide analysis of *DCL*, *AGO*, and *RDR* gene families in pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(4): 1038.

[18] CUI D L, MENG J Y, REN X Y, et al. Genome-wide identification and characterization of *DCL*, *AGO* and *RDR* gene families in *Saccharum spontaneum*[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 13202.

[19] KRISHNATREYA D B, BARUAH P M, DOWARAH B, et al. Genome-wide identification, evolutionary relationship and expression analysis of *AGO*, *DCL* and *RDR* family genes in tea[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 8679.

[20] HUANG W, XIAN Z Q, HU G J, et al. SLAGO4A, a core factor of RNA-directed DNA methylation (RdDM) pathway, plays an important role under salt and drought stress in tomato[J]. *Molecular Breeding*, 2016, 36(3): 28.

[21] WESTWOOD J H, MCCANN L, NAISH M, et al. A viral RNA silencing suppressor interferes with abscisic acid-mediated signalling and induces drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2013, 14(2): 158-170.

[22] LI W, CUI X, MENG Z L, et al. Transcriptional regulation of *Arabidopsis* MIR168a and ARGONAUTE1 homeostasis in abscisic acid and abiotic stress responses [J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(3): 1279-1292.

[23] GAN D F, ZHAN M D, YANG F, et al. Expression analysis of Argonaute, Dicer-like, and RNA-dependent RNA polymerase genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) in response to abiotic stress[J]. *Journal of Genetics*, 2017, 96(2): 235-249.

[24] 肖胜华, 陆妍, 李安子, 等. 棉花 AP2/ERF 转录因子 *GhTINY2* 负调控植株抗盐性的功能分析[J]. 作物学报, 2024, 50(1): 126-137.

XIAO S H, LU Y, LI A Z, et al. Function analysis of an AP2/ERF transcription factor *GhTINY2* in cotton negatively regulating salt tolerance[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2024, 50(1): 126-137.

[25] WANG Q L, LIU P, JING H, et al. JM27-mediated histone H3K9 demethylation positively regulates drought-stress responses in *Arabidopsis*[J]. *New Phytologist*, 2021, 232(1): 221-236.

[26] 周念念. 逆境胁迫对茭白 *Zizania latifolia* 基因表达及生理活性的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2022.

ZHOU N N. Effects of adversity stress on the expression of *ZiChi* genes and physiological activity in *Zizania latifolia*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2022.

[27] 蔡永萍. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2014: 10.

CAI Y P. *Plant physiology experiment instruction* [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2014: 10.

[28] LI H Y, WANG Z B, GAO Y W, et al. Genome-wide identification of the Argonaute protein family and its expression analysis under PEG6000, ABA and heat treatments in *Populus alba* × *P. glandulosa* [J]. *Forests*, 2023, 14(5): 1015.

[29] LIN Q F, WANG S, DAO Y H, et al. *Arabidopsis thaliana* trehalose-6-phosphate phosphatase gene *TPPI* enhances drought tolerance by regulating stomatal apertures [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(14): 4285-4297.

[30] LIM C, KANG K, SHIM Y, et al. Inactivating transcription factor *OsWRKY5* enhances drought tolerance through abscisic acid signaling pathways[J]. *Plant Physiology*, 2021, 188(4): 1900-1916.