

胡萝卜*S*-腺苷甲硫氨酸脱羧酶*SAMDC*基因的克隆及其对非生物胁迫的响应

王广龙^{1,2,*}, 却枫², 陈伯清¹, 任旭琴¹, 王纪忠¹, 熊爱生^{2,*}

¹淮阴工学院生命科学与食品工程学院, 江苏淮安223003; ²南京农业大学园艺学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 农业部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 南京210095

摘要: *S*-腺苷甲硫氨酸脱羧酶是多胺生物合成过程中的关键酶, 对于植物生长发育和抵御逆境胁迫等过程具有重要作用。本研究利用RT-PCR方法从胡萝卜品种‘黑田五寸’中克隆得到一个编码*S*-腺苷甲硫氨酸脱羧酶的基因*DcSAMDC*。序列分析显示, 该基因包含一个全长1 086 bp的开放阅读框, 编码361个氨基酸。预测其蛋白质相对分子质量为40.16 kDa, 理论等电点为4.89。胡萝卜*S*-腺苷甲硫氨酸脱羧酶具有高度保守的酶原剪切位点和PEST结构域。进化分析表明, 胡萝卜*SAMDC*与葡萄的进化关系最为接近。荧光定量PCR分析显示, 胡萝卜*DcSAMDC*基因在叶片和根中的表达水平较高, 对高温(38°C)、低温(4°C)、模拟干旱(200 g·L⁻¹ PEG)和盐渍(200 g·L⁻¹ NaCl)胁迫有响应, 并且, 响应的时间较为迅速, 在胁迫1~4 h后表达水平升至最高。本研究结果表明, *DcSAMDC*基因可能在胡萝卜抵御非生物胁迫的过程中发挥重要作用。

关键词: *S*-腺苷甲硫氨酸脱羧酶; 克隆; 序列分析; 非生物胁迫; 表达分析; 胡萝卜

多胺(polyamines, PAs)是一类广泛存在于动植物体内具有较高生物活性、低分子量的脂肪族含氮碱(Kumar等1997)。高等植物中常见的多胺有腐胺(putrescine, Put)、亚精胺(spermidine, Spd)、精胺(spermine, Spm)等。多胺被认为是一类新型植物激素, 能够调节植物的生长和发育。随着研究的不断深入, 特别是近年来转基因等分子生物学手段的应用, 发现多胺在植物体内能与DNA、RNA和蛋白质等物质相互作用, 促进生长和发育, 延迟衰老, 提高抗逆性, 甚至与植物的生存密切相关(Agudelo-Romero等2013; Pál等2015; Sequera-Mutiozabal等2016)。

关于多胺的来源、代谢和转运机制已经较为清晰, 多个参与多胺生物合成的相关酶也已得到鉴定和分析(Tiburcio等1997)。其中, *S*-腺苷甲硫氨酸脱羧酶(*S*-adenosylmethioine decarboxylase, *SAMDC*)是亚精胺和精胺合成的关键酶(图1)。目前, 已从康乃馨(*Dianthus caryophyllus*) (Lee等1997)、小麦(*Triticum aestivum*) (Li和Chen 2000)、萝卜(*Raphanus sativus*) (丁淑丽等2007)、番茄(*Lycopersicon esculentum*) (刘志勇等2008)、甘蔗(*Saccharum officinarum*) (刘金仙等2010)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Wi等2014)和高羊茅(*Festuca arundinacea*) (曾庆飞等2015)等植物中陆续分离和克隆了编码*SAMDC*的基因, 并发现它们在多胺合成以及植物抵抗环境胁迫等过程中发挥重要作用。例如, 小麦和甘蔗中的研究发现, 盐胁迫和干旱胁迫可以诱导*SAMDC*

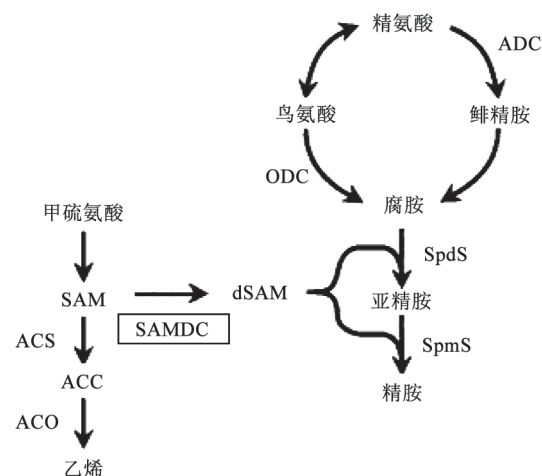


图1 多胺的生物合成途径

Fig.1 Polyamine biosynthetic pathway

ACC: 1-氨基环丙烷-1-羧酸; ACO: ACC氧化酶; ACS: ACC合成酶; ADC: 精氨酸脱氨酶; dSAM: 脱羧*S*-腺苷甲硫氨酸; ODC: 鸟氨酸脱羧酶; SAM: *S*-腺苷甲硫氨酸; *SAMDC*: *S*-腺苷甲硫氨酸脱羧酶; SpdS: 亚精胺合成酶; SpmS: 精胺合成酶。

基因表达, 说明*SAMDC*基因参与了小麦和甘蔗植株抵御逆境胁迫的过程(Li和Chen 2000; 刘金仙等2010)。Pillai和Akiyama (2004)研究了低温条件下

收稿 2016-09-23 修定 2017-01-20

资助 淮阴工学院博士科研启动基金(Z301B16531)、教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-11-0670)和江苏省自然科学基金杰出青年基金(BK20130027)。

* 共同通讯作者(E-mail: wanggl89@hyit.edu.cn; xiongaisheng@njau.edu.cn)。

不同水稻品种中SAMDC基因表达的差异,结果表明,耐冷型水稻中的SAMDC基因表达比低温敏感型更为活跃。

胡萝卜是伞形科重要蔬菜作物,营养价值丰富(Luby等2014; Li等2016)。我国是世界第一大胡萝卜生产国和主要出口国,种植面积接近世界胡萝卜总种植面积的40%,总产量则占世界总产量的1/3。胡萝卜的种植面积和产量还在持续、快速地提升。然而,胡萝卜在生产过程中容易遭受干旱、盐渍、高温和低温等非生物侵害,降低胡萝卜产量和品质,造成重大经济损失(黄蔚等2014)。因此,挖掘抗逆相关基因对于培育胡萝卜抗性品种、提高胡萝卜产量和品质具有重要意义。

本研究以胡萝卜品种‘黑田五寸’为试材,克隆并获得胡萝卜SAMDC基因,分析其序列特征,利用荧光定量PCR技术对胡萝卜DcSAMDC基因在不同组织和非生物胁迫条件下的表达特性进行研究。研究结果将为进一步开发和利用该基因奠定基础。

材料与方法

1 材料及处理

植物总RNA分离纯化试剂盒购自北京Tiangen公司,琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自杭州唯特洁公司,大肠杆菌菌株由南京农业大学伞形科作物遗传与种质创新实验室提供,Ex Taq聚合酶、pMD19-T质粒载体、DL2000 marker、cDNA第一链合成试剂盒和SYBR Premix Ex Taq荧光定量试剂盒均为大连TaKaRa公司产品。

供试材料为胡萝卜(*Daucus carota* L.)品种‘黑田五寸’,种植在南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室人工气候室。取2月龄的胡萝卜植株在上午9点分别进行高温(38°C)、低温(4°C)、PEG模拟干旱(200 g·L⁻¹ PEG)和盐渍(200 g·L⁻¹ NaCl)处理,分别在处理后1、2、4、8和24 h,取植株顶部第3~4片叶,以未经任何处理的植株作为对照。另外选取同时期未经处理的胡萝卜植株的根、叶柄和叶片用于基因的组织表达。样品用液氮速冻,并保存于-80°C冰箱。

2 RNA提取和cDNA合成

根据Tiangen公司植物总RNA分离纯化试剂盒的操作说明,提取不同部位以及不同非生物胁迫条件下的胡萝卜材料的总RNA,并通过TaKaRa

公司cDNA第一链合成试剂盒将提取的胡萝卜RNA反转录为cDNA。

3 胡萝卜DcSAMDC基因的克隆

根据拟南芥等其他物种的SAMDC基因序列,在本实验室测定的胡萝卜‘黑田五寸’基因组数据库中检索出DcSAMDC基因(Xu等2014)。设计一对引物DcSAMDC-F (5' ATGTCTTCCGAAGTTTCTGCAATTG 3')和DcSAMDC-R (5' TATTGATACTCTTTTCTTCTTTC 3'),以胡萝卜‘黑田五寸’cDNA为模板进行扩增。PCR反应程序为:94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1.5 min, 共32个循环; 72°C 10 min。通过12 g·L⁻¹琼脂糖凝胶电泳分离得到目标产物,与pMD19-T载体连接过夜,随后转化至大肠杆菌DH5α中,提取质粒经PCR鉴定后,由南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

4 序列分析

将预测的胡萝卜SAMDC氨基酸序列在NCBI数据库中进行检索,选取拟南芥等13个物种的SAMDC序列。采用DNAMAN软件对不同物种SAMDC进行序列比对和亲/疏水性分析。使用<http://www.expasy.org>网站相关软件完成氨基酸序列理化性质分析(Gasteiger等2003)。利用MEGA 5.1软件中的Neighbor-Joining方法构建同源进化树(Tamura等2011)。

5 实时定量PCR

荧光定量PCR采用CFX96荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司)及其相关配套软件完成。以胡萝卜ACTIN基因作为内参基因,ACTIN表达检测引物为BDACTIN-F (5' CGGTATTGTGTTGGACTCTGGTGAT 3')和BDACTIN-R (5' CAGCAAGGTCAAGACGGAGTATGG 3') (Tian等2015)。根据从‘黑田五寸’中扩增的DcSAMDC序列设计表达检测引物BDDcSAMDC-F (5' CCTGCCGTCTCTACTATTCACATTACA 3')和BDDcSAMDC-R (5' GCAACAAGGTCCTGAGATTAACAGAT 3')。根据SYBR Premix Ex Taq荧光定量试剂盒的说明构建反应体系,目的基因相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算,其中 $\Delta\Delta C_t = (C_{t\text{目的基因}} - C_{t\text{内参基因}})_{\text{处理}} - (C_{t\text{目的基因}} - C_{t\text{内参基因}})_{\text{对照}}$ 。

6 统计分析

采用Excel 2007和SPSS 16.0进行数据整理和统计分析,采用One-way ANOVA和Duncan测验对数据进行多重比较和差异显著性分析($P < 0.05$)。

实验结果

1 胡萝卜*DcSAMDC*基因的克隆

以胡萝卜品种‘黑田五寸’的cDNA为模板, 以*DcSAMDC*-F和*DcSAMDC*-R为上下游引物进行扩增, 得到1 000 bp左右的产物(图2)。克隆后, 进行序列测定, 结果发现胡萝卜‘黑田五寸’的*DcSAMDC*基因含有一个1 086 bp的开放阅读框, 编码361个氨基酸(图3)。预测其蛋白质相对分子量为40.16 kDa, 理论等电点为4.89。

2 胡萝卜*DcSAMDC*的氨基酸序列与理化性质分析

利用DNAMAN软件将胡萝卜*DcSAMDC*氨基酸序列与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, AAB17665.1)、亚麻荠(*Camelina sativa*, XP_010463654.1)、芥菜

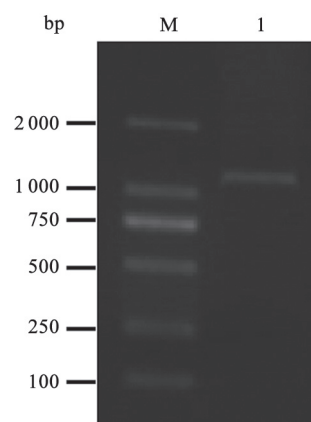


图2 胡萝卜*DcSAMDC*基因RT-PCR扩增
Fig.2 *DcSAMDC* gene amplified by RT-PCR from carrot
M: DNA分子量标准; 1: *DcSAMDC*基因。

```

ATGTCTCCGAAGTTTCTGCAATTGGTTTCGAAGGTTTGGAAAAGAGGCTGGAAATATCATTTTTTCGAGCCAAGT
1  M S S E V S A I G F E G F E K R L E I S F F E P S
TTCTTTGCTGACCCTGAAGGAAAGGGTTTACGTGTCCTTTCCAAAAACCAGCTCGATGAGTTTTTAGGACCTGCT
26  F F A D P E G K G L R V L S K N Q L D E F L G P A
GAATGCACTATTGTTGCGTCATTGTCCAATGAGCATGTTGACTCCTACGTTCTCTGAGTCCAGCCTATTTGTT
51  E C T I V A S L S N E H V D S Y V L S E S S L F V
TATGCTTACAAGATAATCATAAAAAACATGCGGGACAACAAAATTGCTGAAGTCCATCCCACCAATCTTGAAGTTG
76  Y A Y K I I I K T C G T T K L L K S I P P I L K L
GCTGATCTCTTTCCCTCACAGTCCGATCTGTGAGGTATACTCGTGGGTGCTTCATTTCCCCGGTGTCTAGTCC
101 A D S L S L T V R S V R Y T R G C F I F P G A Q S
TACCCTCATCGTAGTTTCTCAGAGGAAGTTTCTGTCCTTGATAATTATTTCCGAAAGCTTGGCTCAGGCAGCAA
126 Y P H R S F S E E V S V L D N Y F G K L G S G S K
GCTTACATTATGGGTGGTTCGGACAAACAAGAAATGGCATGTTATTCTGCCTGTGCTGCATCTACGCGCACT
151 A Y I M G G S D K Q Q K W H V Y S A C A A S T R T
CTTGACCCTGTACTACTATGAAATGTGCATGACTTCTCTGAACAGGATAAGGCTTCTGTTTTCTATAAAACC
176 L D P V Y T M E M C M T S L N R D K A S V F Y K T
AATTCAAGCTCAGCCACTTCGATGACTGATAAATCTGGTATACGAGATATTCTCCAAATTCAGGATATGTGAT
201 N S S S A T S M T D N S G I R D I L P N S R I C D
TTTGAATTTGACCCTGTGGTTATTCCATGAATGCTGTCGAGGGCCCTGCCGTCTACTATTACATTACACCT
226 F E F D P C G Y S M N A V E G P A V S T I H I T P
GAAGATGGTTTCAGTTATTCAAGCTTTGAAGCTGTTGGATATGATCCAAAATCTGTTAATCTCAGTGACCTGTT
251 E D G F S Y S S F E A V G Y D P K S V N L S D L V
GCCAGGTTCTTAAGTGTTCACCTGGGGAGTCTCTATAGCTCTCAAGCTGATATCGCATCTGAAGTACTACTC
276 A R V L N C F Q P G E F S I A L Q A D I A S E L L
GAAAAGACCAGCTCTGTACACGTCAAGGGTTATCGTGTGGAAGAGAAAAGTGTGAAGAGCTCGGAATGGACGGT
301 E K T S S V H V K G Y R V E E K T C E E L G M D G
TCCATCGTTTACCAGAAGTTCGTGAAGACAACCGAAAGATGTGAATCTCCTCGATCAGTCCGAAATGCTGCTGG
326 S I V Y Q K F V K T T E R C E S P R S V L K C C W
AAGGAGGAAGAGAAAGAAAAGGAGTATCAATAA
351 K E E E K E E K E Y Q *

```

图3 胡萝卜*DcSAMDC*基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide acid and deduced amino acid sequences of *DcSAMDC* gene from carrot

(*Brassica juncea*, AAS45435.1)、桃(*Prunus persica*, XP_007225621.1)、苹果(*Malus domestica*, NP_00128-0825.1)、番茄(*Solanum lycopersicum*, NP_00123-4699.1)、马铃薯(*Solanum tuberosum*, NP_00130-6788.1)、曼陀罗(*Datura stramonium*, Q96555.1)、橙子(*Citrus sinensis*, XP_015387008.1)、葡萄(*Vitis vinifera*, CAD98785.2)、可可(*Theobroma cacao*, XP_0070-45669.1)、苦瓜(*Momordica charantia*, AGL95795.1)和黄瓜(*Cucumis sativus*, KGN57743.1)等植物的SAMDC序列进行多重比对分析。结果发现,胡萝卜DcSAMDC与葡萄和桃SAMDC的同源性较高,分别达到了73.96%和71.75%。比对的14种植物的

SAMDC蛋白都包含酶原剪切位点(LSE-SSLF)结构域和与SAMDC蛋白降解相关的PEST (TIHITPED-GFSYASFE)结构域(Kumar等1997) (图4)。所有植物SAMDC的N端保守性较强,而C端的保守性相对较弱,功能结构域高度保守,显示了SAMDC的进化保守性。

对胡萝卜和其他13种植物的SAMDC氨基酸序列进行理化性质分析(表1)。这些植物的氨基酸残基数在357~366范围内,相对分子质量在40 kDa左右,理论等电点在4.29~4.89之间,酸性氨基酸(包括天冬氨酸和谷氨酸)多于碱性氨基酸(包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸),脂肪族氨基酸的比例相对较高,而芳香族氨基酸比例较低。

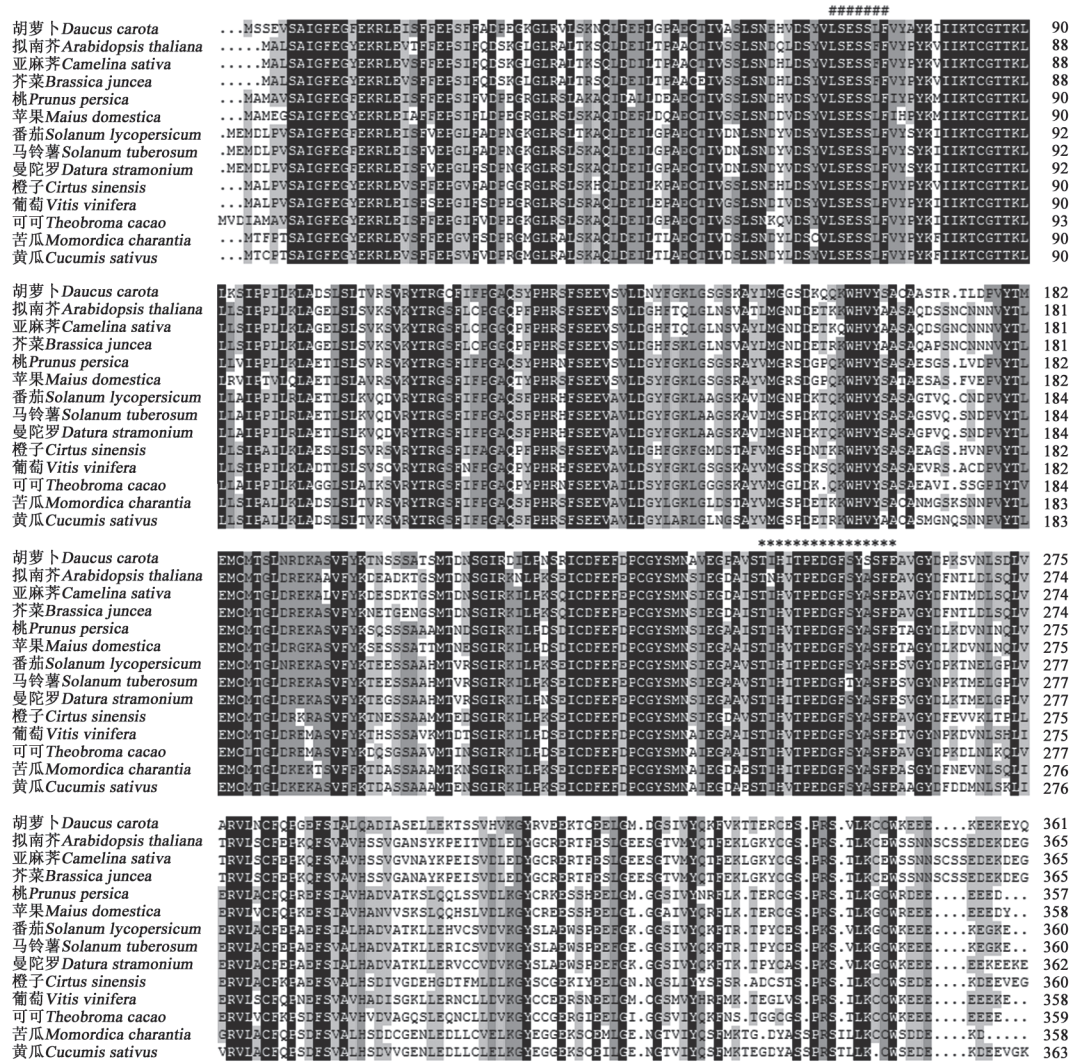


图4 胡萝卜中推导的SAMDC氨基酸序列与其他物种SAMDC的同源性比对
Fig.4 Alignment of the predicted SAMDC amino acid sequences in carrot and other plant species

#表示酶原剪切位点结构域,*表示PEST结构域。

表1 不同植物来源的SAMDC氨基酸组成成分及理化性质的比较

Table 1 Comparison of composition and physical and chemical characteristics of amino sequences of SAMDC from different plant species

| 植物 | 氨基酸残基数 | 理论相对分子质量/kDa | 理论等电点 | 碱性氨基酸比例/% | 酸性氨基酸比例/% | 脂肪族氨基酸比例/% | 芳香族氨基酸比例/% |
|-----|--------|--------------|-------|-----------|-----------|------------|------------|
| 胡萝卜 | 361 | 40.16 | 4.89 | 11.91 | 13.57 | 81.72 | 10.53 |
| 拟南芥 | 366 | 40.35 | 4.42 | 10.11 | 14.21 | 82.79 | 10.11 |
| 亚麻荠 | 366 | 40.43 | 4.44 | 10.11 | 13.93 | 81.97 | 10.38 |
| 芥菜 | 366 | 40.41 | 4.54 | 10.38 | 13.66 | 81.97 | 10.38 |
| 桃 | 357 | 39.38 | 4.68 | 11.48 | 14.01 | 82.07 | 9.80 |
| 苹果 | 358 | 39.80 | 4.61 | 11.45 | 14.53 | 81.84 | 10.34 |
| 番茄 | 360 | 39.75 | 4.83 | 11.94 | 13.89 | 80.56 | 10.28 |
| 马铃薯 | 360 | 39.73 | 4.71 | 11.67 | 14.17 | 80.56 | 10.28 |
| 曼陀罗 | 362 | 39.96 | 4.67 | 11.60 | 14.36 | 80.66 | 10.22 |
| 橙子 | 361 | 39.85 | 4.71 | 11.91 | 14.40 | 79.78 | 10.80 |
| 葡萄 | 358 | 39.72 | 4.71 | 11.73 | 14.25 | 80.73 | 9.50 |
| 可可 | 359 | 38.98 | 4.55 | 10.03 | 13.09 | 82.73 | 9.75 |
| 苦瓜 | 358 | 39.32 | 4.36 | 10.06 | 14.25 | 81.56 | 10.61 |
| 黄瓜 | 364 | 40.07 | 4.29 | 9.62 | 14.84 | 81.59 | 10.71 |

3 胡萝卜SAMDC基因预测的蛋白质氨基酸亲/疏水性

对本试验中克隆的‘黑田五寸’*DcSAMDC*基因预测的氨基酸序列进行亲/疏水性分析(图5)。结果

表明, 该蛋白的第353位的谷氨酸、第355位的赖氨酸和第356位的谷氨酸亲水性最强。疏水性最强的位点为第276位的丙氨酸, 其次为第55位的缬氨酸和第56位的丙氨酸。

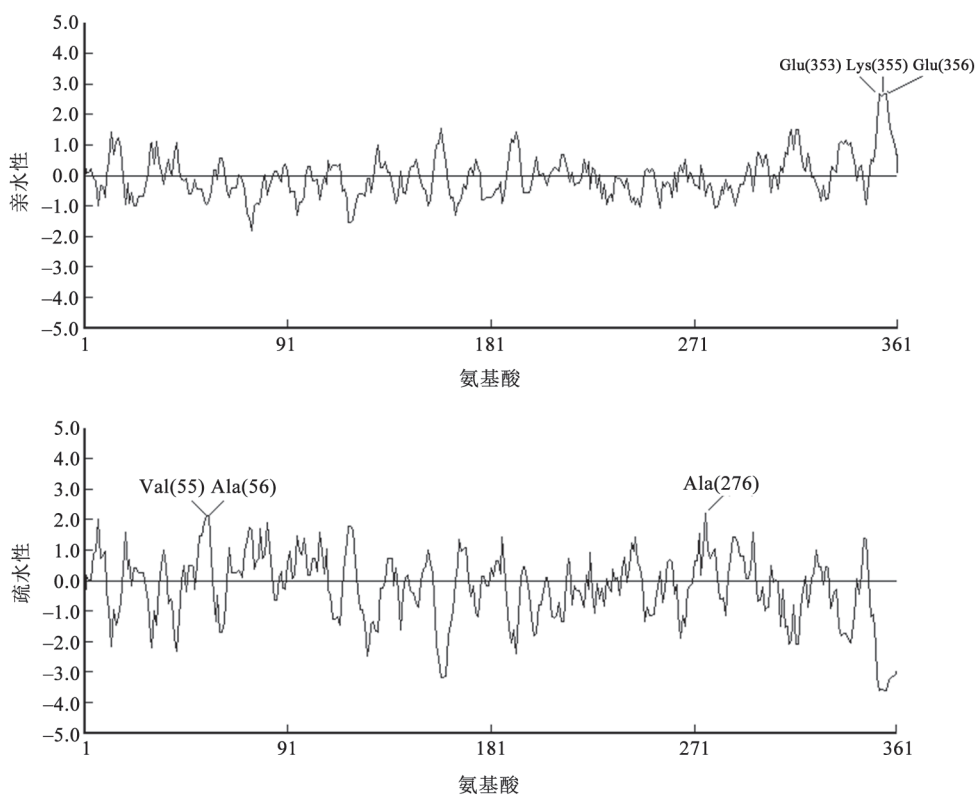


图5 胡萝卜中DcSAMDC氨基酸序列的亲水性和疏水性分析

Fig.5 Predicted hydrophilicity and hydrophobicity of amino acid sequences of DcSAMDC from carrot

4 胡萝卜DcSAMDC的同源进化分析

选取胡萝卜和拟南芥等13种植物,分析SAMDC在这些物种中的进化关系。结果表明,胡萝卜DcSAMDC与葡萄的进化关系最为接近,其次是桃和苹果(图6)。苦瓜和黄瓜的SAMDC同属于葫芦科分支,拟南芥、亚麻荠和芥菜的SAMDC同属十字花科分支,番茄、马铃薯和曼陀罗的SAMDC同属茄科分支。

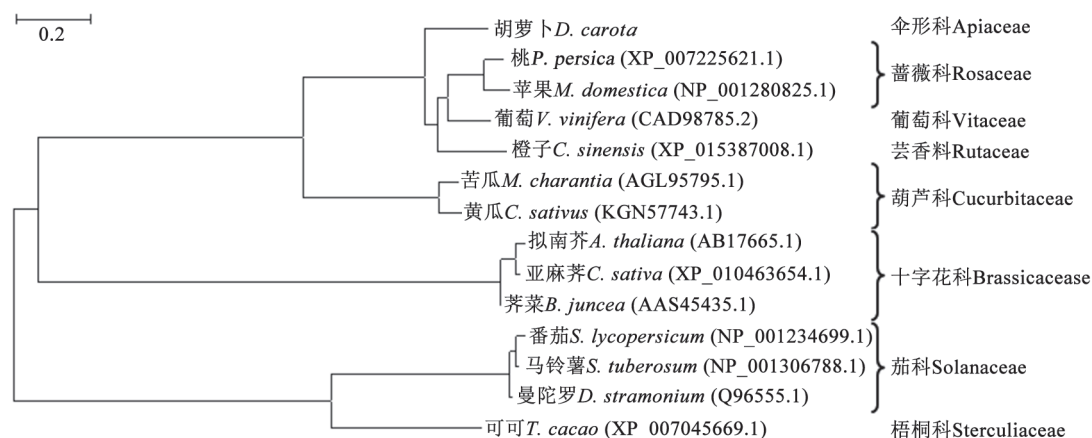


图6 不同物种SAMDC氨基酸序列的系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of amino acid sequences of SAMDC from several plant species

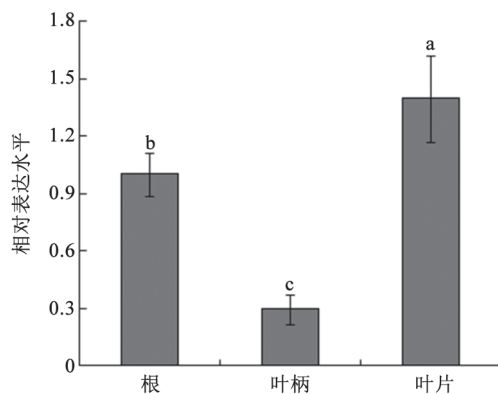


图7 DcSAMDC基因在不同胡萝卜组织中的相对表达水平

Fig.7 Expression levels of DcSAMDC gene in different carrot tissues

数值用3个生物学重复的平均值 \pm 标准偏差来表示,不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

5.2 在不同非生物胁迫条件下的分析

高温(38°C)、低温(4°C)、模拟干旱(200 g·L⁻¹ PEG)和盐渍(200 g·L⁻¹ NaCl)处理均可以诱导‘黑田五寸’DcSAMDC基因表达水平发生变化(图8)。总

5 胡萝卜DcSAMDC基因在不同组织及非生物胁迫条件下的表达分析

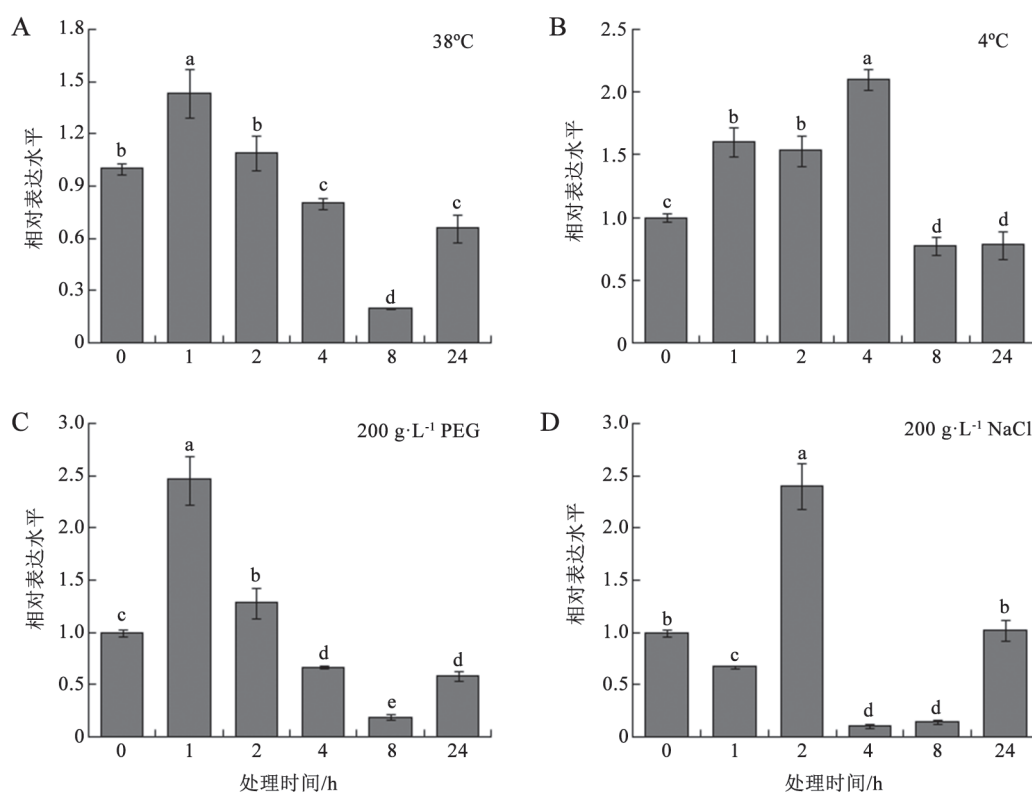
5.1 在不同组织中表达水平的分析

通过荧光定量PCR技术检测DcSAMDC基因在胡萝卜‘黑田五寸’根、叶柄和叶片的表达情况。结果表明,DcSAMDC基因在胡萝卜不同组织中均有表达,但表达量显著不同,在叶片中的表达水平最高,分别是根和叶柄的1.39倍和4.69倍(图7)。

的来说,不同非生物胁迫处理后,DcSAMDC基因表达呈先升高后下降的趋势。高温处理1 h后,DcSAMDC基因的表达量达到最高,随后下降,并在处理8 h后降至最低。DcSAMDC基因对低温胁迫的反应相对较慢,其表达水平在处理4 h后达到最高,之后显著下降。DcSAMDC基因在模拟干旱胁迫条件下的表达模式与其在高温胁迫下类似,PEG模拟的干旱胁迫处理1 h后,DcSAMDC基因的相对表达水平较对照提高了1.46倍。盐胁迫处理2 h后,DcSAMDC表达升至最高,之后显著下降,并在4 h降至最低。

讨 论

多胺在植物逆境胁迫响应和生长发育等过程中起重要作用(Wimalasekera等2011)。SAMDC是多胺生物合成的一个限速酶,其反应底物同时也参与乙烯的合成和代谢(图1)(Sauter等2013)。近年来,通过基因工程技术发现SAMDC基因在植物抗逆过程中发挥重要作用(Shi和Chan 2014)。胡萝

图8 *DcSAMDC*基因在不同非生物胁迫条件下的相对表达水平Fig.8 Expression levels of *DcSAMDC* gene under different abiotic stresses in carrot
数值用3个生物学重复的平均值±标准偏差来表示, 不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

卜是伞形科重要蔬菜作物, 但关于胡萝卜SAMDC基因及其响应逆境胁迫的相关研究还未见报道。

本研究从胡萝卜中克隆的胡萝卜SAMDC基因编码的氨基酸数目为361个, 这与拟南芥、番茄等双子叶植物的氨基酸数目差别不大, 而甘蔗、高羊茅等单子叶植物SAMDC的氨基酸数目在395个左右, 这说明双子叶植物和单子叶植物的SAMDC在进化上存在明显的差异(刘志勇等2008; 刘金仙等2010; 曾庆飞等2015)。胡萝卜SAMDC具有高度保守的酶原剪切位点和与SAMDC蛋白快速降解相关的PEST结构域。酶原剪切位点可将胡萝卜SAMDC分为较长的 α 亚基和较短的 β 亚基, 而PEST结构域可能与SAMDC酶活性快速变化以响应生长和环境信号相关(Li和Chen 2000; Tian等2004)。

研究表明, SAMDC基因在幼嫩或分裂较为活跃的组织中表达水平较高, 而在相对老化或分裂能力较弱的组织中表达较低(Mad Arif等1994)。在棉花中的研究发现, SAMDC在不同组织中的表达水平有较大差异(王凡龙等2015)。本研究中, SAMDC

在根、叶柄和叶片中均有表达, 但在叶片和根中的表达水平较高, 在叶柄中的表达水平较低, 具有明显的组织特异性。SAMDC基因在植物抵御逆境的过程中也具有重要的作用。高温条件下, 过表达酵母SAMDC基因的番茄植株内亚精胺和精胺含量分别较对照提高了1.7倍和2.4倍。同时, 相关抗氧化酶的活性也得到提高, 膜脂过氧化得到缓解(Cheng等2009)。类似地, 拟南芥中过表达辣椒SAMDC基因可以增强植株清除活性氧自由基的能力, 提高植株在干旱胁迫条件下的抗性(Wi等2014)。而沉默烟草中的SAMDC基因会导致植物生长发生改变, 盐胁迫条件下植物生长活力减弱, 抗氧化能力以及光合能力下降(Mellidou等2016)。本研究中, 胡萝卜SAMDC基因均能响应各种非生物胁迫, 同时, 响应的时间较为迅速, 在胁迫1~4 h后表达水平升至最高, 这可能与SAMDC的快速降解相关, 以适应植物细胞对多胺变化的需求(Tian等2004)。因此推测本研究克隆的*DcSAMDC*基因对于提高胡萝卜在非生物胁迫条件下的抗性具有重要作用。

参考文献

- Agudelo-Romero P, Bortolotti C, Pais MS, Tiburcio AF, Fortes AM (2013). Study of polyamines during grape ripening indicate an important role of polyamine catabolism. *Plant Physiol Biochem*, 67: 105–119
- Cheng L, Zou Y, Ding S, Zhang J, Yu X, Cao J, Lu G (2009). Polyamine accumulation in transgenic tomato enhances the tolerance to high temperature stress. *J Integr Plant Biol*, 51 (5): 489–499
- Ding SL, Lu G, Li JY, Ren Y, Cao JS (2007). Cloning and evolutionary analysis of homologous sequences of *SAMDC* gene in Cruciferae. *Hereditas*, 29 (1): 109–117 (in Chinese with English abstract) [丁淑丽, 卢钢, 李建勇, 任彦, 曹家树(2007). 十字花科植物*SAMDC*基因同源序列的克隆与进化分析. *遗传*, 29 (1): 109–117]
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A (2003). ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 31 (13): 3784–3788
- Huang W, Wang F, Tan GF, Xu ZS, Li MY, Xiong AS (2014). Isolation and analysis of expression profiles under abiotic stress treatments of two AP2/ERF-B1 group transcription factor genes from *Daucus carota*. *Plant Physiol J*, 50 (8): 1184–1194 (in Chinese with English abstract) [黄蔚, 王枫, 谭国飞, 徐志胜, 李梦瑶, 熊爱生(2014). 胡萝卜AP2/ERF-B1亚族两个转录因子基因的克隆及其非生物胁迫响应分析. *植物生理学报*, 50 (8): 1184–1194]
- Kumar A, Altabella T, Taylor MA, Tiburcio AF (1997). Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci*, 2 (4): 124–130
- Lee MM, Sun HL, Park KY (1997). Characterization and expression of two members of the *S*-adenosylmethionine decarboxylase gene family in carnation flower. *Plant Mol Biol*, 34 (34): 371–382
- Li MY, Xu ZS, Tian C, Huang Y, Wang F, Xiong AS (2016). Genomic identification of WRKY transcription factors in carrot (*Daucus carota*) and analysis of evolution and homologous groups for plants. *Sci Rep*, 6: 23101
- Li ZY, Chen SY (2000). Isolation and characterization of a salt- and drought-inducible gene for *S*-adenosylmethionine decarboxylase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Plant Physiol*, 156 (3): 386–393
- Liu JX, Que YX, Guo JL, Xu LP, Xu JS, Chen RK (2010). Molecular cloning of sugarcane *S*-adenosylmethionine decarboxylase gene (*Sc-SAMDC*) and its expression analysis. *Sci Agric Sin*, 43 (7): 1448–1457 (in Chinese with English abstract) [刘金仙, 阙友雄, 郭晋隆, 许莉萍, 徐景升, 陈如凯(2010). 甘蔗*S*-腺苷蛋氨酸脱羧酶基因*Sc-SAMDC*的克隆和表达分析. *中国农业科学*, 43 (7): 1448–1457]
- Liu ZY, Wang XX, Gao JC, Guo YM, Du YC, Ye XL (2008). Cloning and sequence analysis of a *S*-adenosylmethionine decarboxylase gene (*SISAMDC1*) in tomato. *Acta Horti Sin*, 35 (8): 1137–1146 (in Chinese with English abstract) [刘志勇, 王孝宣, 高建昌, 国艳梅, 杜永臣, 叶雪凌(2008). 番茄*S*-腺苷蛋氨酸脱羧酶基因*SISAMDC1*的克隆与序列分析. *园艺学报*, 35 (8): 1137–1146]
- Luby CH, Maeda HA, Goldman IL (2014). Genetic and phenological variation of tocopherol (vitamin E) content in wild (*Daucus carota* L. var. *carota*) and domesticated carrot (*D. carota* L. var. *sativa*). *Hortic Res*, 1: 14015
- Mad Arif SA, Taylor MA, George LA, Butler AR, Burch LR, Davies HV, Stark MJ, Kumar A (1994). Characterisation of the *S*-adenosylmethionine decarboxylase (*SAMDC*) gene of potato. *Plant Mol Biol*, 26 (1): 327–338
- Mellidou I, Moschou PN, Ioannidis NE, Pankou C, Gemes K, Valasakis C, Andronis EA, Beris D, Haralampidis K, Roussis A, et al (2016). Silencing *S*-adenosyl-L-methionine decarboxylase (*SAMDC*) in *Nicotiana tabacum* points at a polyamine-dependent trade-off between growth and tolerance responses. *Front Plant Sci*, 7: 379
- Pál M, Szalai G, Janda T (2015). Speculation: polyamines are important in abiotic stress signaling. *Plant Sci*, 237: 16–23
- Pillai MA, Akiyama T (2004). Differential expression of an *S*-adenosyl-L-methionine decarboxylase gene involved in polyamine biosynthesis under low temperature stress in *japonica* and *indica* rice genotypes. *Mol Genet Genomics*, 271 (2): 141–149
- Sauter M, Moffatt B, Saechao MC, Hell R, Wirtz M (2013). Methionine salvage and *S*-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. *Biochem J*, 451 (2): 145–154
- Sequera-Mutiozabal MI, Erban A, Kopka J, Atanasov KE, Bastida J, Fotopoulos V, Alcázar R, Tiburcio AF (2016). Global metabolic profiling of *Arabidopsis polyamine oxidase 4* (*AtPAO4*) loss-of-function mutants exhibiting delayed dark-induced senescence. *Front Plant Sci*, 7: 173
- Shi H, Chan Z (2014). Improvement of plant abiotic stress tolerance through modulation of the polyamine pathway. *J Integr Plant Biol*, 56 (2): 114–121
- Tamura K, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28 (10): 2731–2739
- Tian AG, Zhao JY, Zhang JS, Gai JY, Chen SY (2004). Genomic characterization of the *S*-adenosylmethionine decarboxylase genes from soybean. *Theor Appl Genet*, 108 (5): 842–850
- Tian C, Jiang Q, Wang F, Wang GL, Xu ZS, Xiong AS (2015). Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves. *PLoS One*, 10 (2): e0117569
- Tiburcio AF, Altabella T, Borrell A, Masgrau C (1997). Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol Plant*, 100 (3): 664–674
- Wang FL, Zhu HG, Cheng WH, Liu YC, Cheng XQ, Sun J (2015). Cloning and induced expression analysis of *GhSAMDC2/3/4* in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Cotton Sci*, 27 (1): 176–183 (in Chinese with English abstract) [王凡龙, 朱华国, 程文翰, 刘永昌, 成新琪, 孙杰(2015). 棉花*S*-腺苷蛋氨酸脱羧酶基因(*GhSAMDC2/3/4*)的克隆及其诱导表达分析. *棉花学报*, 27 (1): 176–183]
- Wi SJ, Kin SJ, Kim WT, Park KY (2014). Constitutive *S*-adenosylmethionine decarboxylase gene expression increases drought tolerance through inhibition of reactive oxygen species accumulation in *Arabidopsis*. *Planta*, 239 (5): 979–988

- Wimalasekera R, Tebartz F, Scherer GF (2011). Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci*, 181 (5): 593–603
- Xu ZS, Tan HW, Wang F, Hou XL, Xiong AS (2014). CarrotDB: a genomic and transcriptomic database for carrot. *Database*, 2014: bau096
- Zeng QF, Yang CY, Li XD, Wu JH, Wang XL (2015). Cloning of *SAMDC* gene from *Festuca arundinacea* Qiancao No. 1 and construction of its plant expression vector. *Pratac Sci*, 32 (8): 1237–1242 (in Chinese with English abstract) [曾庆飞, 杨春燕, 李小冬, 吴佳海, 王小利(2015). 高羊茅野草1号SAMDC基因的克隆及植物表达载体的构建. *草业科学*, 32 (8): 1237–1242]

Cloning of *S*-adenosylmethioine decarboxylase gene *SAMDC* from *Daucus carota* and its response to abiotic stresses

WANG Guang-Long^{1,2,*}, QUE Feng², CHEN Bo-Qing¹, REN Xu-Qin¹, WANG Ji-Zhong¹, XIONG Ai-Sheng^{2,*}

¹*School of Life Science and Food Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaiian 223003, China;* ²*State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*

Abstract: *S*-adenosylmethioine decarboxylase (SAMDC), a key enzyme involved in polyamine biosynthesis, plays important roles in plant development and resistance against adverse circumstances. In this study, a gene *DcSAMDC* that encodes *S*-adenosylmethioine decarboxylase was cloned from carrot cultivar ‘Kurodagosun’ using RT-PCR. Sequence analysis indicated that the *DcSAMDC* gene harbored an open reading frame of 1 086 bp encoding 361 amino acids. The relative molecular mass of its protein was predicted to be 40.16 kDa with a theoretical isoelectric point of 4.89. *DcSAMDC* possesses highly conserved function domains, proenzyme cleavage site and PEST domain. The evolutionary relationship of *DcSAMDC* was more close to grape (*Vitis vinifera*). Quantitative real-time PCR analysis indicated that carrot *DcSAMDC* gene was highly expressed in the leaves and roots. Moreover, this gene can respond to high temperature (38°C), low temperature (4°C), PEG-induced drought (200 g·L⁻¹ PEG), and salinity (200 g·L⁻¹ NaCl), and its expression levels were highest from 1 to 4 h after treatment. The results suggested that *DcSAMDC* gene may play important roles in carrot plant tolerance to abiotic stresses.

Key words: *S*-adenosylmethioine decarboxylase; clone; sequence analysis; abiotic stress; expression analysis; *Daucus carota*

Received 2016-09-23 Accepted 2017-01-20

This work was supported by the Scientific Research Foundation for Doctor from Huaiyin Institute of Technology (Grant No. Z301B16531), New Century Excellent Talent of the Ministry of Education (Grant No. NCET-11-0670), and Jiangsu Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars (Grant No. BK20130027).

*Co-corresponding author (E-mail: wanggl89@hyit.edu.cn; xiongaisheng@njau.edu.cn).