

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.10.009

侯小进, 宋小蝶, 张梦, 等. 桃多胺合成 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶基因家族鉴定及对非生物胁迫的响应 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(10): 107-117.

桃多胺合成 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶基因家族鉴定及对非生物胁迫的响应

侯小进, 宋小蝶, 张梦, 张晓娜, 王格格, 王保全

河南科技学院 园艺园林学院, 河南 新乡 453003

摘要: S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶(SAMDC)是植物多胺合成途径中的一个关键酶, 通过调控植物体内多胺的含量来影响植物对逆境胁迫的响应. 为探究桃 *PpSAMDCs* 基因的功能, 利用生物信息学对桃 *PpSAMDCs* 基因进行鉴定及分析其蛋白序列特征, 并采用 qRT-PCR 分析 *PpSAMDCs* 基因在非生物胁迫下的表达模式. 结果表明: 在桃中共鉴定出 3 个 *PpSAMDCs* 基因, 进化分析显示 *PpSAMDC1* 位于植物外群, *PpSAMDC2* 和 *PpSAMDC3* 与蔷薇科植物 SAMDC 亲缘关系近. *PpSAMDCs* 均为亲水性蛋白, 二级结构以无规则卷曲为主, 无跨膜区和信号肽. *PpSAMDCs* 与多胺合成相关酶及甲基化转移酶发生互作. *PpSAMDCs* 启动子上含有多响应逆境胁迫的元件. 荧光定量结果表明: *PpSAMDC1* 受干旱和 NaCl 的诱导表达, 但对低温无应答; *PpSAMDC2* 参与桃对干旱、低温和盐害等逆境胁迫的调控; 干旱胁迫负向调控 *PpSAMDC3* 的表达, 但低温和盐胁迫却诱导该基因的表达.

关键词: 桃; *PpSAMDCs* 基因; 克隆; 生物信息学分析; 表达分析

中图分类号: S662.1

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1673-9868(2024)10-0107-11



Identification of S-adenosylmethionine Decarboxylase Gene Family Involved in Polyamines Synthesis in Peach and Its Response to Abiotic Stresses

HOU Xiaojin, SONG Xiaodie, ZHANG Meng,
ZHANG Xiaona, WANG Gege, WANG BaoquanCollege of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology,
Xinxiang Henan 453003, China

收稿日期: 2024-01-12

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD1000300); 河南省科技攻关项目(105020224050); 河南科技学院 2018 年博士科研启动项目(207010618005); 河南科技学院 2023 年大学生创新创业训练计划项目(2023CX059).

作者简介: 侯小进, 博士, 讲师, 主要从事桃逆境分子生物学研究.

通信作者: 王保全, 副教授.

Abstract: S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) is a key enzyme in plant polyamine synthesis pathway, which affects plant response to stress by regulating polyamines content. In order to explore the function of PpSAMDC genes in peach, PpSAMDC genes were identified and the protein sequence characteristics were analyzed using bioinformatics in the study. Real-time quantitative PCR was used to analyze expression pattern of *PpSAMDCs* under abiotic stresses. The results showed three *PpSAMDCs* were identified in the peach genome. The results of phylogenetic analysis indicated that PpSAMDC1 was located in outer group, while PpSAMDC2 and PpSAMDC3 were closely relative to SAMDC proteins of Rosaceae plants. All the *PpSAMDCs* proteins were hydrophilic and acidic proteins. The random coil was the main secondary structure of the protein, and no transmembrane regions and signal peptide were existed in all the PpSAMDC protein sequences. *PpSAMDCs* interacted with polyamine synthesis related enzymes and DNA methylation transferase. The multiple cis-acting elements response to stresses were found in the *PpSAMDCs* promoter sequences. Quantitative PCR results showed that *PpSAMDC1* expression was induced by drought and NaCl, but not affected by low temperature. *PpSAMDC2* was simultaneously involved in the regulation of peach in response to the stresses such as drought, low temperature and salt stress. Expression of *PpSAMDC3* was negatively regulated by drought stress, but induced by low temperature and salt stresses. The results of this study lay a foundation for further research on biological function and molecular mechanism of stress resistance of *PpSAMDCs* genes in peach.

Key words: peach; *PpSAMDCs*; cloning; bioinformatics; expression analysis

近年来,随着全球气候环境变化的加剧,植物在正常的生长发育过程中遭受干旱、低温、盐害等环境胁迫的现象时常发生,引起细胞内发生一系列不可控的生理生化变化,如活性氧积累、生物膜透性增大、渗透调节失调、光合速率下降等^[1-2],从而影响植物的生长和产量。

多胺(polyamines, PAs)作为植物体内广泛存在的一类生理活性调节物质,主要以腐胺、亚精胺和精胺形式存在^[3],在调节植物生长发育和缓解逆境胁迫等方面发挥重要作用^[4-6]. S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶(S-adenosylmethionine decarboxylase, SAMDC)作为多胺合成途径中一个关键限速酶,其主要功能是催化 S-腺苷甲硫氨酸发生脱羧反应并提供丙氨基,分别在亚精胺合成酶和精胺合成酶的作用下实现腐胺向亚精胺和精胺的转化^[7]. 目前已在甜橙^[8]、苹果^[9-10]、葡萄^[11]、杜梨^[12]、番茄^[13]、辣椒^[14]、甜瓜^[15]、胡萝卜^[16]、白菜^[17]、康乃馨^[18]等多种园艺植物中分离克隆出 SAMDC 基因,限速酶对不同的逆境胁迫会作出不同的响应,如胡萝卜 SAMDC 基因在高温、低温及盐胁迫等逆境胁迫中高表达,可能存在对多种逆境的交叉适应^[16];橡胶树在干旱、盐害胁迫下其 *HbSAMDC1* 基因被诱导表达,但在冷害胁迫下却被抑制表达^[19],表明 SAMDC 基因在植物抗旱、抗冷等逆境胁迫中起重要作用. 植物通过上调 SAMDC 基因的表达水平,以提高体内多胺的含量而增强植物对逆境胁迫的抵抗力. 例如烟草中过表达丹参 SAMDC 基因增强其抗旱性^[20];在拟南芥中过表达甜瓜 *CmSAMDC* 增强了转基因拟南芥的耐盐性^[21];车轴草 *TrSAMDC1* 受盐胁迫和干旱的诱导表达,超表达拟南芥后,植株体内多胺含量升高,增强了转基因植株的耐盐性和抗旱性^[22].

桃(*Prunus persica* L.)作为我国一种重要的经济果树^[23],其生长和产量易受到不良环境的影响,因此,挖掘利用抗逆基因资源及培育桃抗逆新品种是应对逆境胁迫最经济有效的途径之一. 目前已从桃基因组上克隆出一个多胺合成途径基因(*PpADC*)^[24],转入番茄后内源 Put 和 Spm 含量明显增加,导致植株矮化和晚花表型^[25],但未见多胺合成途径中其他相关基因的报道. 因此,本研究利用同源序列法从桃基因组上鉴定多胺合成途径中的关键基因(*PpSAMDCs*),对其进行克隆,并利用生物信息学手段进行进化分析、理化性质分析、蛋白质二级和三级结构的预测、信号肽、跨膜区和互作蛋白的预测,分析启动子元件并探

究它们在非生物胁迫下的表达模式, 旨在为探究桃 *PpSAMDCs* 基因的生物学功能奠定基础, 也为桃的抗性育种提供重要的基因资源。

1 材料与方 法

1.1 试验材料及处理

本研究所用桃来自于河南省新乡市卫辉蟠桃园, 将层积处理过的实生毛桃种子播种于基质(体积比为草炭土: 蛭石=2: 1), 所有植物材料在培养室温度 25 °C, 16 h 光照/8 h 黑暗, 相对湿度为 60% 的环境下生长。选择长势一致、健壮的一个月龄的盆栽毛桃实生苗为试验材料, 分别利用自然干旱、4 °C 低温和 100 mM NaCl 模拟自然环境下的逆境胁迫, 每个处理 3 盆苗, 每盆种植 3 棵, 共 9 棵苗。干旱处理在 3 d 和 6 d 时取样, 低温处理在 2 h 和 4 h 时取样, 盐胁迫在 2 d 和 4 d 时取样, 取样时每棵植株剪取 3 个叶片, 以未经任何处理的植株为对照。取样后用锡箔纸包裹, 置于液氮中速冻, 放入 -80 °C 超低温冰箱中保存、备用。

1.2 桃基因组上 *PpSAMDCs* 基因的鉴定

通过拟南芥 TARI 数据库(<http://www.arabidopsis.org/>)下载拟南芥 5 个 *AtSAMDCs* 基因的 CDS 序列, 利用同源性搜索的方法, 在 Phytozome v13(<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>)网站选择桃基因组数据库(*Prunus persica* v2.1)进行 Blast, 鉴定出桃 *PpSAMDCs* 同源基因。从网站下载 *PpSAMDCs* 基因的转录本序列、CDS 序列、氨基酸序列及起始密码子 ATG 上游 2 000 bp 的启动子序列, 以便用于基因克隆、生物信息学分析及表达分析等。

1.3 总 RNA 提取与 cDNA 合成

采用总 RNA 提取试剂盒(生工生物工程股份有限公司, 上海)提取桃各个样品总 RNA, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计定性和定量检测 RNA, 采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa, 大连)对检测完整的 RNA 反转录成单链 cDNA, 具体操作方法按照说明书进行。

1.4 序列扩增及测序

依据获得的 *PpSAMDCs* 转录本序列, 利用 Primer premier 5 软件设计每个基因的特异性全长引物。引物由昆泰锐(武汉)生物技术有限责任公司合成, 全长扩增引物序列如表 1 所示。以毛桃叶片 cDNA 为模板, 利用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase(诺唯赞生物科技股份有限公司, 南京)进行 PCR 扩增, 扩增体系为 50 μ L, 具体操作按照说明书进行。扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 循环 35 次; 72 °C 延伸 5 min。取 5 μ L 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 利用 DNA 纯化试剂盒(SIMGEN, 杭州)回收目的片段, 连接 pBLUNT 载体(全式金生物技术有限公司, 北京), 并转化大肠杆菌 DH5 α , 对阳性单克隆送至昆泰锐(武汉)生物技术有限责任公司进行测序。

1.5 同源性及进化分析

利用 MEGA4 软件对 *PpSAMDCs* 蛋白和其他物种的 SAMDC 同源蛋白序列进行多序列比对, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, bootstrap 值设置为 1 000 次重复。利用 NCBI 网站中 BLASTP 程序对两个物种 SAMDC 蛋白序列进行同源性对比分析, 采用 DNAMAN 软件进行作图。

1.6 生物信息学分析

对测序正确的 *PpSAMDCs* 基因编码的蛋白序列进行生物信息学分析, 利用 NCBI 网站中 CDD 工具预测保守结构域, 采用 ExPASy 网站中的 ProParam 工具预测 *PpSAMDCs* 蛋白的理化特性, 运用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 工具分别预测 *PpSAMDCs* 蛋白的二级结构和三级结构, 利用 LocSignal 4.1 软件预测信号肽, 利用 TMHMM 预测 *PpSAMDCs* 蛋白的跨膜结构域, 利用 STRING 工具预测其互作蛋白, 使用在线工具 PlantCARE 分析 *PpSAMDCs* 启动子上的顺式作用元件。

1.7 荧光定量 PCR

采用 Primer premier 5 软件设计 *PpSAMDCs* 基因的特异性定量引物(表 1), 利用 TB Green ©

*Premix Ex Taq*TM 荧光定量试剂 (TaKaRa, 大连) 分析逆境胁迫下 *PpSAMDCs* 基因的表达模式, 具体的反应体系和反应程序参考说明书进行. 以桃 *PpTEF2* 为内参基因^[26], 对照中基因的表达归化为 1, 基因的相对表达量用 $FC = 2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式^[27] 计算, 每个样品进行 3 次生物学重复, 数值用 3 次生物学重复的平均值 ± 标准差表示.

表 1 本研究所用引物序列

引物名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>PpSAMDC1</i> -扩	ATGGCTGTGTCTGGTTTTGA	TCATCGTCGTCTTCTTCTCG
<i>PpSAMDC2</i> -扩	GCGACTGTAGTATCTTTGCG	ACAATAACTAGAGCCCACCA
<i>PpSAMDC3</i> -扩	TTTCTCGTACTTGTTCCTC	CTAGATCTTGTCCATAACTA
<i>PpSAMDC1</i> -qRT-PCR	GCCCTTTCCCTACACCAACT	GCTCGGTCATGCAGATTTTCG
<i>PpSAMDC2</i> -qRT-PCR	GGCACAGTCATACCCTCATC	AGCCTTCTCCCTGTCCAAAC
<i>PpSAMDC3</i> -qRT-PCR	CGTCGCTTTGCATACCACCA	TCCCTCGCTCCAGCAACCTTT
<i>PpTEF2</i> -qRT-PCR	GGTGTGACGATGAAGAGTGATG	TGAAGGAGAGGGAAGGTGAAAG

1.8 数据分析

使用 Excel 2010 对试验数据进行初步分析, 利用 T-test 进行两个样本的差异显著性分析, 然后采用 GraphPad Prism 软件制作图表.

2 结果与分析

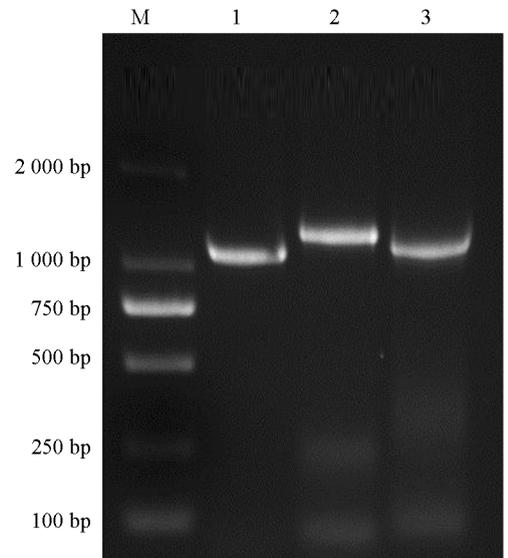
2.1 桃 *PpSAMDCs* 基因的鉴定和克隆

参考下载的拟南芥 *AtSAMDC1*(AT3G02470), *AtSAMDC2*(AT5G15950), *AtSAMDC3*(AT3G25570), *AtSAMDC4*(AT5G18930)和 *AtSAMDC5*(AT3G17715)基因的 CDS 序列, 采用同源搜索的方法在桃基因组数据库中进行比对, 共鉴定出 3 个 SAMDC 同源基因. 运用 NCBI 网站中的 CDD 工具对这 3 个基因进行功能结构域的预测, 结果显示都含有登录号 c103253, 都隶属于 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶家族. 根据它们在基因组上的位置分别命名为 *PpSAMDC1* (Prupe. 1G147600), *PpSAMDC2* (Prupe. 1G299500)和 *PpSAMDC3* (Prupe. 3G243900).

以毛桃叶片 cDNA 为模板, 利用扩增引物分别对 *PpSAMDC1*, *PpSAMDC2* 和 *PpSAMDC3* 进行 PCR 扩增, 结果显示, 分别获得一条清晰的特异性条带(图 1), 与目的基因大小一致. 纯化回收后连接 pBLUNT 载体并转化大肠杆菌, 挑选单克隆进行测序, 测序结果显示, *PpSAMDC1*, *PpSAMDC2* 和 *PpSAMDC3* 基因 cDNA 长度分别为 1 158 bp, 1 358 bp 和 1 197 bp, 开放阅读框的长度分别为 1 068 bp, 1 074 bp 和 1 125 bp, 分别编码 355 个、357 个和 374 个氨基酸.

2.2 桃 *PpSAMDCs* 蛋白的进化分析及同源性分析

为了分析桃 *PpSAMDCs* 蛋白的进化关系, 本研究以人 *HsSAMDC* 蛋白为外类群, 选取桃和拟南芥等 13 种植物 SAMDC 蛋白^[12] 构建系统进化树, 并进行同源性比对分析(图 2). 结果表明: 桃 *PpSAMDC1* 蛋白处于整个植物进化的外群中, 与其他物种亲缘关系都比较远, 序列同源性都很低, 在 34.42% 和 43.59% 之间. *PpSAMDC2* 与櫻桃



M 表示 2 000 bp marker, 数字 1~3 分别表示 *PpSAMDC1*~*PpSAMDC3* 基因的扩增结果.

图 1 桃 *PpSAMDCs* 基因 PCR 扩增结果

PpSAMDC 蛋白亲缘关系最近, 同源率为 97%, 其次是苹果 *MdSAMDC1* 和白梨 *PbSAMDC3*, 同源率分别为 88.57% 和 87.39%。PpSAMDC3 与苹果 *MdSAMDC2* 亲缘关系最近, 同源率最高, 为 89.6%。上述几个物种均属于蔷薇科植物, 说明桃 PpSAMDC2 和 PpSAMDC3 蛋白进化与植物进化具有一致性, 而 PpSAMDC1 氨基酸进化程度比较低。

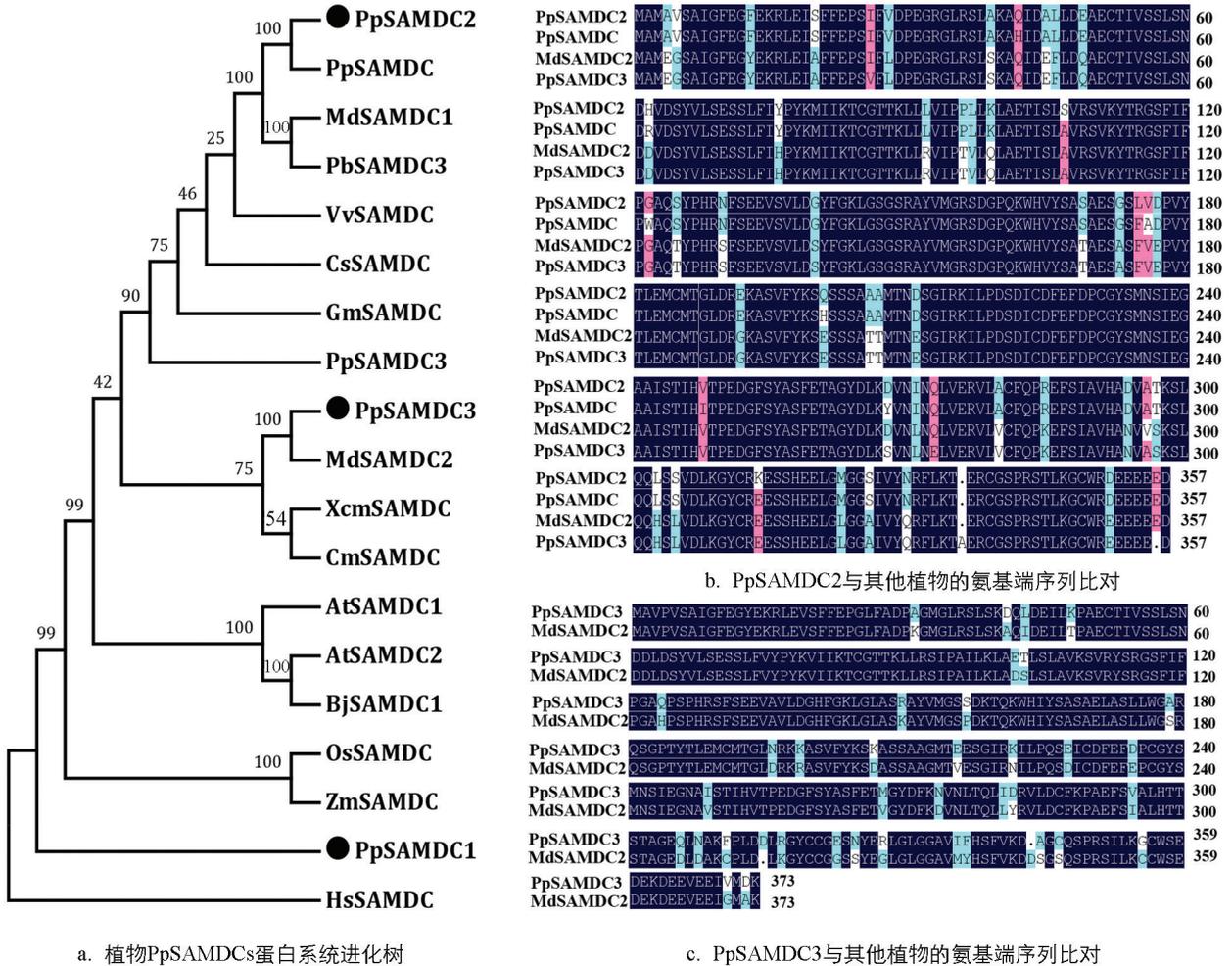


图 2 植物 SAMDCs 蛋白的系统进化树及同源性分析

2.3 桃 PpSAMDCs 蛋白的理化特性分析

利用 ExPASy 网站中的 ProtParam 数据库分析 PpSAMDCs 蛋白的理化特性, 结果显示 PpSAMDC1, PpSAMDC2 和 PpSAMDC3 蛋白相对分子质量分别为 39.74 kDa, 39.38 kDa 和 41.01 kDa, 脂溶指数分别为 72.76, 80.03 和 81.12, 等电点分别为 5.10, 4.94 和 5.12, 亲水性系数均为负值; PpSAMDC1 蛋白的不稳定指数小于 40, 而 PpSAMDC2 和 PpSAMDC3 蛋白不稳定指数大于 40, 表明 PpSAMDC1 蛋白是一个亲水的、稳定的酸性蛋白, 而 PpSAMDC2 和 PpSAMDC3 蛋白为亲水的、不稳定的酸性蛋白。

2.4 桃 PpSAMDCs 的蛋白结构、信号肽及跨膜结构分析

利用 SOPMA 工具预测 PpSAMDCs 蛋白的二级结构, 结果显示 PpSAMDC1 蛋白含有 α 螺旋 32.68%、延伸链 16.62%、 β 转角 5.62%、无规则卷曲 45.07%; PpSAMDC2 蛋白含有 α 螺旋 34.45%、延伸链 18.77%、 β 转角 8.40%、无规则卷曲 38.38%; PpSAMDC3 蛋白含有 α 螺旋 33.96%、延伸链 16.31%、 β 转角 5.61%、无规则卷曲 44.12%。利用 SWISS-MODEL 在线工具对 PpSAMDCs 蛋白进行同源建模并预测三级结构, 从中筛选 GMQE(Global Model Quality Estimation)接近 1、QMEAN(Qualitative Model Energy Analysis)分值接近 0 且序列比对相似度高大于 30% 的蛋白为模板, 预测结果显示 PpSAM-

DC1 蛋白与山荆子 SAMDC 蛋白相似性最高, 为 85.55%, 因此以该蛋白为模板进行 PpSAMDC1 蛋白的三级结构预测; PpSAMDC2 蛋白与曼陀罗 SAMDC 蛋白相似性最高, 为 73.39%, 因此采用曼陀罗 SAMDC 蛋白为模板构建 PpSAMDC2 蛋白的三级结构; PpSAMDC3 蛋白与樱桃 SAMDC 蛋白相似性最高, 为 97.86%, 用樱桃 SAMDC 为模板构建 PpSAMDC3 蛋白的三级结构. 利用 LocSignalP 4.1 工具预测 PpSAMDCs 蛋白信号肽, 预测结果表明 PpSAMDCs 蛋白均无信号肽, 属于非分泌性蛋白质. 利用 TMHMM 2.0 在线工具预测 PpSAMDCs 蛋白的跨膜结构, 预测结果显示桃 PpSAMDCs 蛋白均无明显的跨膜结构, 表明 PpSAMDCs 蛋白并非生物膜上的功能蛋白(图 3).

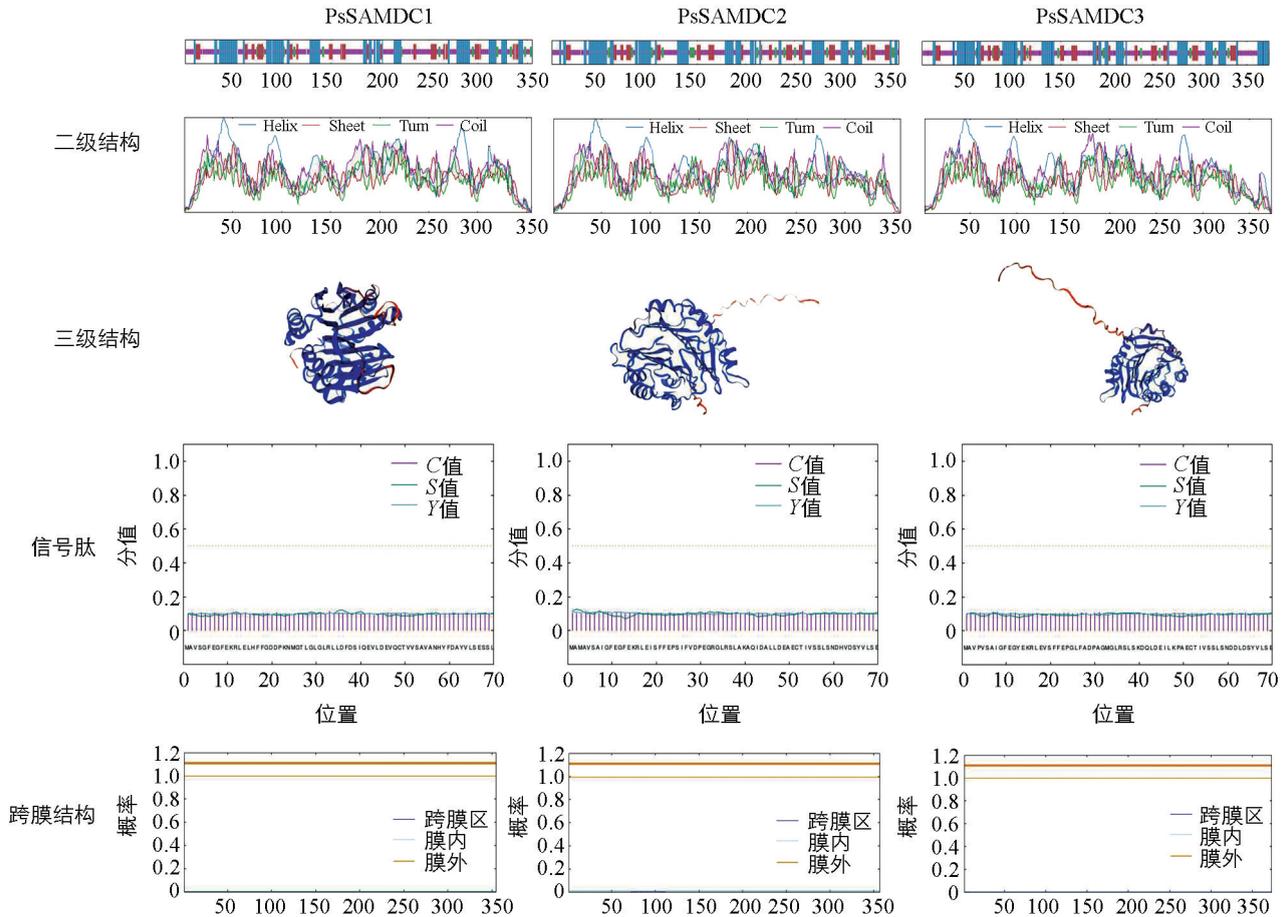


图 3 桃 PpSAMDCs 蛋白的蛋白结构、信号肽及跨膜结构域

2.5 桃 PpSAMDCs 互作蛋白预测

为揭示桃 PpSAMDCs 蛋白的功能及调控机制, 利用 STRING 在线分析工具预测 PpSAMDC1, PpSAMDC2 和 PpSAMDC3 蛋白的互作网络. 预测结果表明: PpSAMDCs 蛋白均与 3 个亚精胺合成酶 (EMJ23702、EMJ19352、EMJ11235)、1 个精胺合成酶 (EMJ23466)、2 个 DNA(5-胞嘧啶)甲基转移酶 (EMJ04405 和 EMJ09271) 和 3 个 S-腺苷甲硫氨酸合成酶 (EMJ03317、EMJ08533、EMJ20481) 发生互作. 此外, PpSAMDC1 蛋白还与另一个精胺合成酶 (EMJ23523) 发生互作, PpSAMDC2 和 PpSAMDC3 蛋白与另一个 S-腺苷甲硫氨酸合成酶 (EMJ24212) 存在互作关系. 同时 PpSAMDC1, PpSAMDC2 和 PpSAMDC3 存在两两互作的关系(图 4).

2.6 PpSAMDCs 启动子顺式作用元件分析

通过 Plant CARE 在线软件对 PpSAMDCs 启动子的顺式作用元件进行分析, 结果显示: PpSAMDC2 和 PpSAMDC3 均含有 1 个 MYB 参与的干旱诱导元件(MBS), 分别含有 2 个和 1 个参与低温的诱导元件 (LTR). PpSAMDC1, PpSAMDC2 和 PpSAMDC3 都含有对厌氧诱导相关顺式作用元件(ARE)、多种光

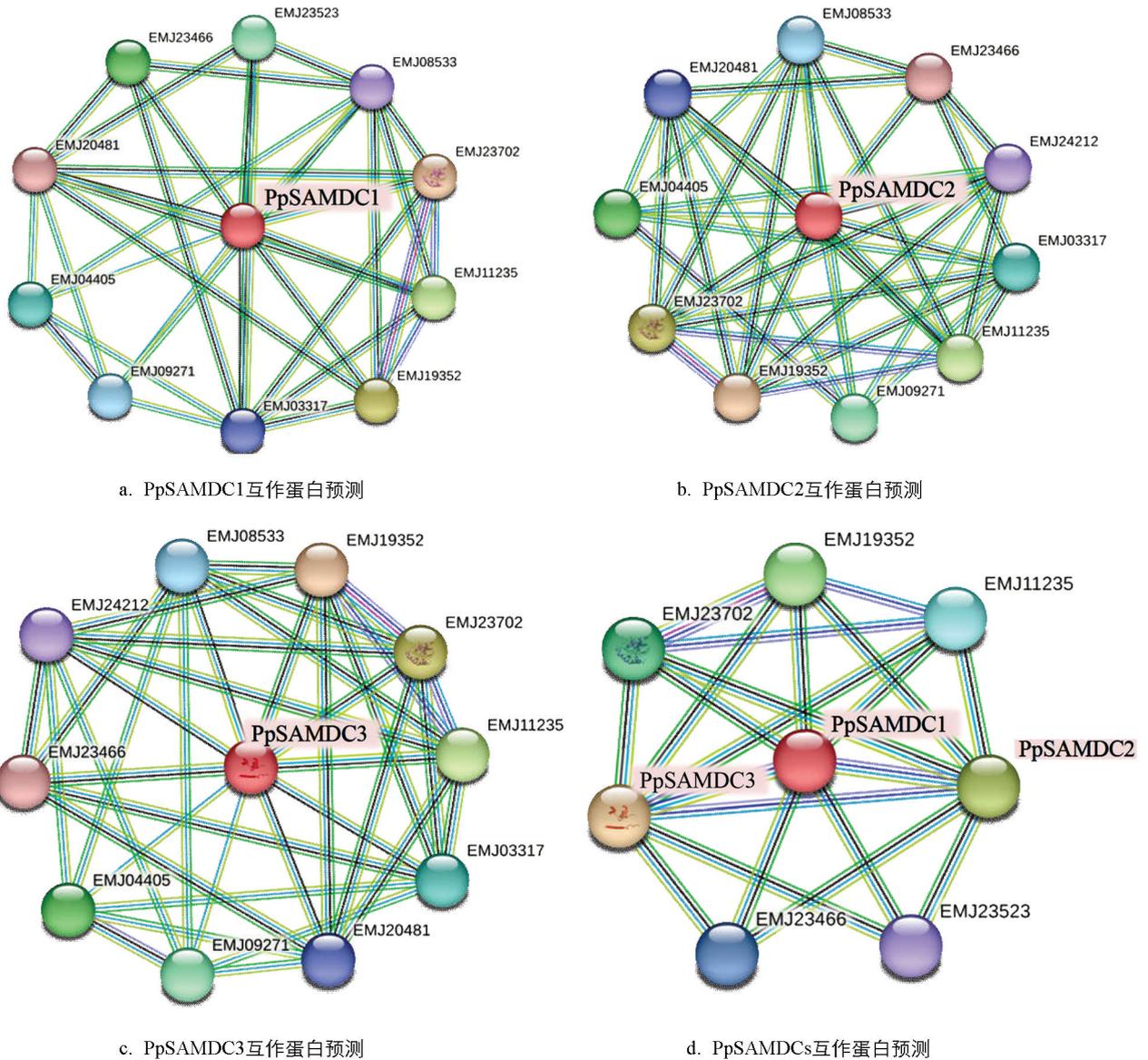


图 4 桃 PpSAMDCs 互作蛋白预测

响应作用元件 (I-box、GT1-motif、chs-Unit 1 ml、AE-box、G-box、G-Box、3-AF1 binding site、Sp1、TCT-motif、AE-box、Pc-CMA2c、Box II、Box 4、circadian、GATA-motif) 和脱落酸响应元件 (ABRE), 此外, *PpSAMDCs* 启动子包含多个转录起始核心元件 (TATA-box)、多个增强子区保守作用元件 (CAAT-box) 和 1 个分生组织表达相关调控元件 (CAT-box)。序列分析结果表明, *PpSAMDC1*, *PpSAMDC2* 和 *PpSAMDC3* 可能参与干旱、低温、光信号响应、厌氧调节等非生物胁迫及激素调控与分生组织发育等生物代谢过程 (图 5)。

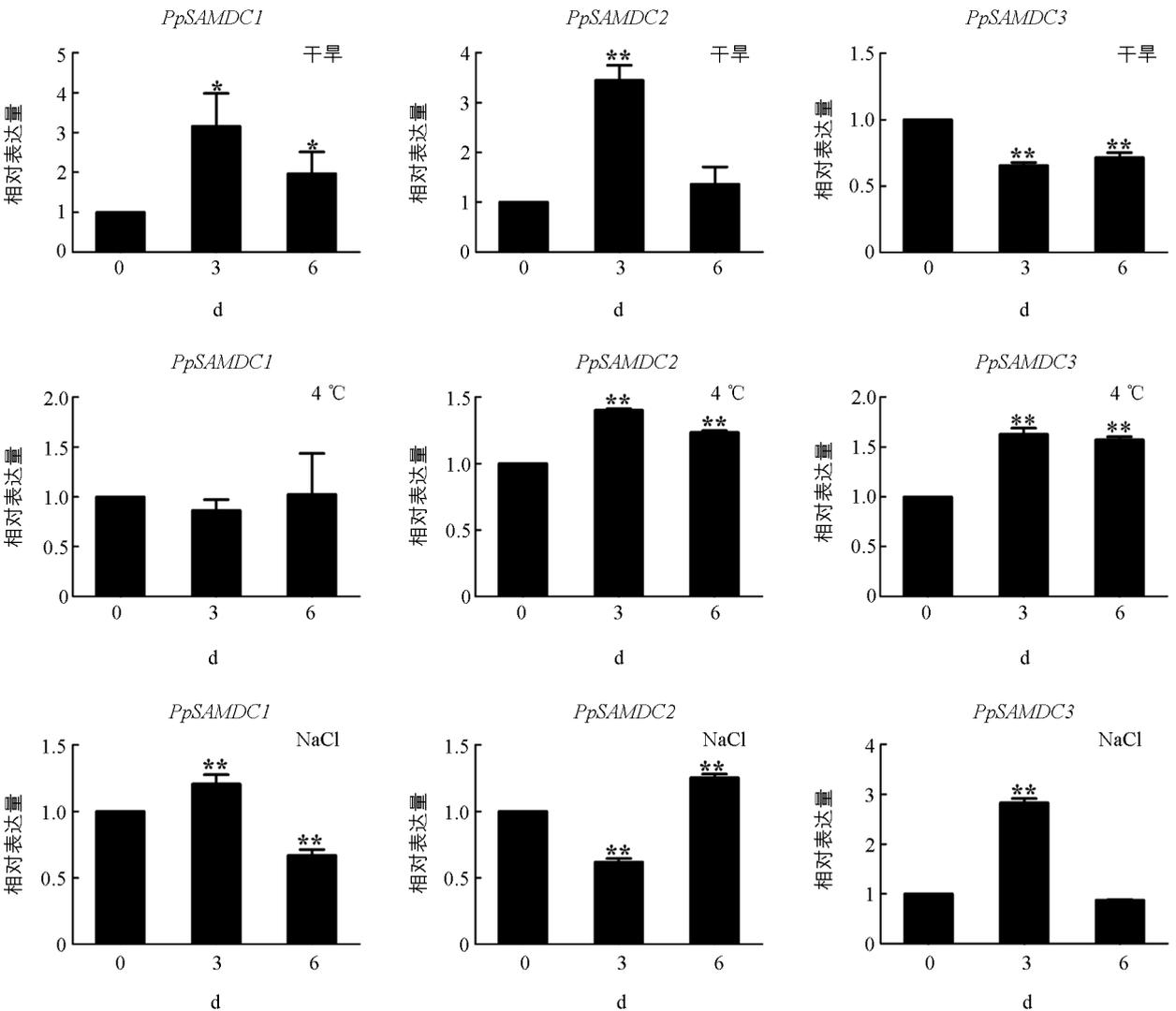
2.7 *PpSAMDCs* 基因在不同非生物胁迫下的表达分析

为了进一步探究桃 *PpSAMDCs* 基因对非生物胁迫的响应, 本研究利用实时荧光定量 PCR 分析 *PpSAMDCs* 基因在干旱、低温和盐胁迫下的表达模式 (图 6)。在干旱胁迫下, *PpSAMDC1* 和 *PpSAMDC2* 基因的表达呈现先升高后下降的趋势, 处理 3 h 表达量达到峰值, 分别为对照 (0 d) 的 3.15 倍和 3.44 倍; 干旱胁迫降低 *PpSAMDC3* 基因的表达, 与对照相比, 在 3 d 和 6 d 表达量分别下调 35% 和 29%。在低温胁迫下, *PpSAMDC1* 的表达量无明显变化, 但低温却诱导 *PpSAMDC2* 和 *PpSAMDC3* 基因的表达。与对照 (0 h) 相比, 在低温处理 3 h 和 6 h 时, *PpSAMDC2* 基因表达分别上调 40% 和 23%,

PpSAMDC3 基因的表达量分别上调 62%和 57%，差异均具有统计学意义。盐胁迫促进 *PpSAMDC1* 和 *PpSAMDC3* 基因的表达，随着处理时间的延长均呈现先升后降的表达趋势，在盐处理 2 d 时达到最高值，分别为对照(0 d)的 1.2 倍和 2.8 倍；*PpSAMDC2* 基因在盐胁迫下呈现先降后升的表达趋势，与对照相比，显著均具有统计学意义。

<i>PpSAMDC1</i>	0	0	1	0	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	13	24
<i>PpSAMDC2</i>	1	2	3	1	0	1	0	2	2	0	1	1	0	0	0	0	3	0	0	1	2	0	2	0	2	1	0	0	0	0	29	17
<i>PpSAMDC3</i>	1	1	4	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	3	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	3	0	3	3	2	1	16	10

图 5 桃 *PpSAMDCs* 启动子上的顺式作用元件分析



* 表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义; ** 表示 $p < 0.01$, 差异有统计学意义。

图 6 桃 *PpSAMDCs* 基因在不同非生物胁迫下的表达分析

3 讨论与讨论

3.1 讨论

多胺是植物体内具有重要生理效应的生理活性物质, SAMDC 是多胺合成途径中的一个关键酶, 为精胺和亚精胺的生物合成提供丙氨基, 在调控植物的生长发育和提高植物抗逆性方面起着非常重要的作用^[28]. SAMDC 基因已经在多种植物中克隆并进行功能验证, 但未见关于桃 SAMDC 基因的报道. 鉴于此, 本研究利用同源序列法从毛桃叶片 cDNA 中克隆出 3 个 SAMDC 同源基因, 即 *PpSAMDC1*, *PpSAMDC2* 和 *PpSAMDC3*, 编码区长度分别为 1 068 bp, 1 074 bp 和 1 125 bp, 分别编码 355 个、357 个和 374 个氨基酸. 在其他植物中也发现存在多个 SAMDC 基因, 比如拟南芥 5 个^[29]、苹果 8 个^[10]、棉花 14 个^[30]、康乃馨 2 个^[18]等, 但有些植物基因组上只有单个 SAMDC 基因, 比如柑橘^[8,31]、葡萄^[11]、杜梨^[12]、甜瓜^[15]等. 一般来讲, 同一家族的基因可能存在功能上的分化, 有些基因出现功能的冗余, 这些冗余基因在某些情况下可以增加生物体的生存能力, 例如在环境变化或生物体发育过程中, 它们可以提供额外的保护和适应能力^[32].

利用生物信息学手段分析基因编码蛋白的结构有助于了解该基因的功能. 通过分析植物 SAMDC 同源基因的进化关系, *PpSAMDC1* 氨基酸进化程度低, 位于整个植物界的外群, 而 *PpSAMDC2* 和 *PpSAMDC3* 与其他蔷薇科植物 SAMDC 蛋白亲缘关系近, 与植物的进化较一致. 通过对桃 *PpSAMDCs* 蛋白序列的分析可知, 桃 *PpSAMDCs* 蛋白均为亲水的酸性蛋白, 二级结构以无规则卷曲和 α 螺旋为主, 均无跨膜结构和信号肽, 属于非分泌性蛋白. 这些蛋白结构的分析结果与砂糖橘 *CrSAMDC*^[31]、花生 *AhSAMDC*^[33]、刚毛柞柳 *ThSAMDC*^[34]、白菜 *BrSAMDC*^[17] 等分析结果一致.

目前关于 SAMDC 的研究只集中在合成途径和功能研究上, 而调控机制却知之甚少. Peng 等^[35]发现羊草中一个转录因子——脱水反应结合蛋白 *LcDREB2* 与 *LcSAMDC2* 启动子上的 DRE 元件结合, 增强了 *LcSAMDC2* 基因的表达, 从而加强羊草的抗盐性. 本研究利用 STRING 工具分析 *PpSAMDCs* 与亚精胺合成酶、精胺合成酶、S-腺苷甲硫氨酸合成酶发生互作, 表明参与多胺生物合成的基因存在互作关系. 此外, 桃 *PpSAMDCs* 还与两个 DNA 甲基化转移酶发生互作, 暗示 *PpSAMDCs* 可能参与到桃的表观遗传调控途径中, 拓展了桃 *PpSAMDCs* 基因的功能. 互作网络的分析为进一步探索 *PpSAMDCs* 基因在多胺缓解逆境胁迫响应的调控机制提供了一定的理论支撑.

在逆境胁迫条件下, 植物体内 SAMDC 基因表达量升高, 通过增加多胺含量增强植物对逆境的抵抗能力, 缓解逆境对植物造成的伤害^[28]. Liu 等^[11]在葡萄中克隆出 *VvSAMDC* 片段, 并且受盐胁迫的诱导. Zhao 等^[9]发现苹果 *MdSAMDC2* 在低温、盐和干旱胁迫后被诱导表达, 表明该基因在苹果逆境胁迫中发挥重要调节作用. 本研究发现桃 *PpSAMDCs* 启动子上含有对干旱、低温、ABA 激素等响应的顺式作用元件, 定量 PCR 结果表明, 桃 *PpSAMDCs* 基因对不同的非生物胁迫的应答反应不同, 存在功能上的分化. *PpSAMDC1* 基因对干旱及盐胁迫能快速响应, 但对低温无应答; *PpSAMDC2* 基因在干旱、低温和盐害等逆境胁迫下表达量均升高, 功能更为广泛; 低温和盐胁迫促进 *PpSAMDC3* 基因的表达, 但干旱胁迫却抑制该基因的表达. 桃树相比其他果树耐旱性更强, 推测桃抗旱强的原因可能是通过 *PpSAMDC1* 和 *PpSAMDC2* 合成多胺缓解干旱对植物的伤害. 苹果中的 5 个 *MdSAMDCs* 对逆境胁迫也存在不同的应答, 但是 *MdSAMDC1* 能同时被 5 种逆境诱导, 因此 *MdSAMDC1* 被认为是苹果 SAMDC 活性的主效基因^[10]. 由于低温、干旱和盐胁迫都诱导 *PpSAMDC2* 基因的表达, 所以 *PpSAMDC2* 基因是桃 SAMDC 基因家族中行使抗性功能的主要基因. 该研究挖掘和鉴定了桃抗逆的重要基因资源, 为桃的抗逆新品种的定向培育奠定了理论基础.

3.2 结论

本研究从桃基因组中鉴定出 3 个 *PpSAMDCs* 成员, 并对其进化关系、理化特性、二级结构和三级结

构、信号肽、跨膜区和互作蛋白进行分析,同时探究它们在干旱、低温和盐胁迫下的表达模式.结果表明:这 3 个成员在不同逆境胁迫中可能扮演不同的角色,为探究桃 *PpSAMDCs* 基因的生物学功能和调控机制奠定基础,为培育桃抗逆品种提供重要基因资源.

参考文献:

- [1] 张俊霞,刘晓鹏,向极钎.植物抗氧化系统对逆境胁迫的动态响应[J].湖北民族学院学报(自然科学版),2015,33(4):435-439.
- [2] 王娟,李德全.逆境条件下植物体内渗透调节物质的积累与活性氧代谢[J].植物学通报,2001,36(4):459-465.
- [3] 刘颖,王莹,龙萃,等.植物多胺代谢途径研究进展[J].生物工程学报,2011,27(2):147-155.
- [4] GE C M, CUI X, WANG Y H, et al. BUD2, Encoding an S-Adenosylmethionine Decarboxylase, Is Required for *Arabidopsis* Growth and Development [J]. Cell Research, 2006, 16(5): 446-456.
- [5] CHEN M, CHEN J J, FANG J Y, et al. Down-Regulation of S-Adenosylmethionine Decarboxylase Genes Results in Reduced Plant Length, Pollen Viability, and Abiotic Stress Tolerance [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2014, 116(3): 311-322.
- [6] CHEN D D, SHAO Q S, YIN L H, et al. Polyamine Function in Plants: Metabolism, Regulation on Development, and Roles in Abiotic Stress Responses [J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 9: 1945.
- [7] LIU J H, WANG W, WU H, et al. Polyamines Function in Stress Tolerance: From Synthesis to Regulation [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 827.
- [8] WANG J, LIU J H, KUROSAWA T, et al. Cloning, Biochemical Identification, and Expression Analysis of a Gene Encoding S-adenosylmethionine Decarboxylase in Navel Orange (*Citrus sinensis* Osbeck) [J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2010, 85(3): 219-226.
- [9] ZHAO L L, SONG L Q, YOU C X, et al. Functional Characterization of the Apple *MdSAMDC2* Gene by Ectopic Promoter Analysis and Over-Expression in Tobacco [J]. Biologia Plantarum, 2010, 54(4): 631-638.
- [10] GONG X Q, DOU F F, CHENG X, et al. Genome-Wide Identification of Genes Involved in Polyamine Biosynthesis and the Role of Exogenous Polyamines in *Malus hupehensis* Rehd. under Alkaline Stress [J]. Gene, 2018, 669: 52-62.
- [11] LIU J H, NAKAJIMA I, MORIGUCHI T. Effects of Salt and Osmotic Stresses on Free Polyamine Content and Expression of Polyamine Biosynthetic Genes in *Vitis vinifera* [J]. Biologia Plantarum, 2011, 55(2): 340-344.
- [12] 张梅,王然,马春晖,等.杜梨 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶基因的克隆与生物信息学分析[J].华北农学报,2013,28(1): 82-87.
- [13] SINHA R, RAJAM M V. RNAi Silencing of Three Homologues of S-Adenosylmethionine Decarboxylase Gene in Tapetal Tissue of Tomato Results in Male Sterility [J]. Plant Molecular Biology, 2013, 82(1-2): 169-180.
- [14] WI S J, KIM S J, KIM W T, et al. Constitutive S-Adenosylmethionine Decarboxylase Gene Expression Increases Drought Tolerance through Inhibition of Reactive Oxygen Species Accumulation in *Arabidopsis* [J]. Planta, 2014, 239(5): 979-988.
- [15] 刘长命,张显,王永琦.甜瓜 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶基因的克隆及白粉病诱导表达分析[J].生物工程学报,2018,34(6):928-936.
- [16] 王广龙,却枫,陈伯清,等.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[J].植物生理学报,2017,53(3):413-421.
- [17] 唐文武,吴秀兰.白菜 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶 *BrSAMDC* 基因的克隆、表达及生物信息学分析[J].分子植物育种,2020,18(11):3485-3492.
- [18] LEE M M, LEE S H, PARK K Y. Characterization and Expression of Two Members of the S-Adenosylmethionine Decarboxylase Gene Family in Carnation Flower [J]. Plant Molecular Biology, 1997, 34(3): 371-382.
- [19] ZHAO M M, LIU H, DENG Z, et al. Molecular Cloning and Characterization of S-Adenosylmethionine Decarboxylase

- Gene in Rubber Tree (*Hevea Brasiliensis*) [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2017, 23(2): 281-290.
- [20] LIU Y, SUN G, ZHONG Z H, et al. Overexpression of SAMDC Gene from *Salvia miltiorrhiza* Enhances Drought Tolerance in Transgenic Tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(5): 729-738.
- [21] 刘长命, 张显, 王永琦. 转甜瓜 *CmSAMDC* 基因拟南芥的获得及其耐盐性研究 [J]. *西北植物学报*, 2018, 38(7): 1179-1186.
- [22] JIA T, HOU J R, IQBAL M Z, et al. Overexpression of the White Clover *TrSAMDC1* Gene Enhanced Salt and Drought Resistance in *Arabidopsis Thaliana* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 165: 147-160.
- [23] 王力荣. 我国桃产业现状与发展建议 [J]. *中国果树*, 2021(10): 1-5.
- [24] 王保全, 张晓娜, 刘继红, 等. 桃树 *PpADC* 基因克隆及逆境胁迫表达分析 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2020, 45(7): 34-41.
- [25] 王保全, 张晓娜, 李国怀. 超表达桃树 *PpADC* 基因导致番茄矮化和晚花研究 [J]. *河南农业科学*, 2020, 49(10): 101-107.
- [26] TONG Z G, GAO Z H, WANG F, et al. Selection of Reliable Reference Genes for Gene Expression Studies in Peach Using Real-Time PCR [J]. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10: 71.
- [27] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [28] 王文娟, 师尚礼, 何龙, 等. 干旱胁迫下多胺在植物体内的积累及其作用 [J]. *草业学报*, 2023, 32(6): 186-202.
- [29] MAJUMDAR R, SHAO L, TURLAPATI S A, et al. Polyamines in the Life of *Arabidopsis*: Profiling the Expression of S-Adenosylmethionine Decarboxylase (SAMDC) Gene Family during Its Life Cycle [J]. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1): 264.
- [30] TANG X X, WU L, WANG F L, et al. Ectopic Expression of *GhSAMDC3* Enhanced Salt Tolerance Due to Accumulated Spd Content and Activation of Salt Tolerance-Related Genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *DNA and Cell Biology*, 2021, 40(9): 1144-1157.
- [31] 唐文武, 吴秀兰. 沙糖橘 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶基因克隆及表达分析 [J]. *南方农业学报*, 2020, 51(6): 1369-1376.
- [32] 蔡昆争, 段舜山. 基因的功能冗余 [J]. *生态学杂志*, 2001, 20(4): 61-64.
- [33] MENG D Y, YANG S, XING J Y, et al. Peanut (*Arachis hypogaea* L.) S-Adenosylmethionine Decarboxylase Confers Transgenic Tobacco with Elevated Tolerance to Salt Stress [J]. *Plant Biology*, 2021, 23(2): 341-350.
- [34] 张玉, 张悦, 张春蕊, 等. 刚毛柞柳腺苷甲硫氨酸脱羧酶(ThSAMDC)基因的克隆与胁迫下的表达分析 [J]. *植物研究*, 2018, 38(1): 132-140.
- [35] PENG X J, ZHANG L X, ZHANG L X, et al. The Transcriptional Factor LcDREB2 Cooperates with LcSAMDC2 to Contribute to Salt Tolerance in *Leymus chinensis* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2013, 113(2): 245-256.