

葛金涛,王江英,汤雪燕,等.百合叶片磷脂酶基因家族转录组学分析[J].江苏农业科学,2022,50(3):36-42.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.03.006

百合叶片磷脂酶基因家族转录组学分析

葛金涛¹,王江英¹,汤雪燕¹,腾年军²,朱朋波¹,孙明伟¹,赵统利¹,邵小斌¹

(1.连云港市农业科学院,江苏连云港 222000;2.南京农业大学园艺学院,江苏南京 210095)

摘要:为探究磷脂酶基因家族在百合叶片中的表达情况,利用 Illumina 测序对百合正常叶片和叶烧病叶片进行转录组测序分析。测序共获得磷脂酶注释基因 274 个,分为 PLA1、PLA2、PLB、PLC 和 PLD 共 5 类。在 KEGG、NR、COG 和 Swiss-prot 等 4 个蛋白质数据库中都注释为磷脂酶基因的 Unigene 序列有 34 条,其中 PLA2、PLB、PLC 和 PLD 类磷脂酶基因参与酯类代谢、甘油磷脂代谢调控,在百合叶烧病发生过程中,PLA2 基因与 PLC 基因表达量上调,PLB 与 PLD 类既有上调表达基因也有下调表达基因。

关键词:百合;叶烧病;磷脂酶;注释基因;转录组测序;蛋白质数据库

中图分类号: S682.2⁺65.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)03-0036-06

百合是百合科百合属多年生草本球根植物,因其花姿雅致、叶片翠绿、茎秆挺直,常被作为鲜切花生产销售,目前已成为我国四大鲜切花之一,尤其在北方地区通过日光温室生产切花百合用于年宵花销售,具有较高的经济价值。在切花百合的生产过程中,部分品种由于缺钙会导致叶烧病的发生,其症状表现为在百合生长至 30~40 cm,花蕾出现前,顶部 6~10 张新叶离叶尖 2 cm 处出现灰白色病斑,后期逐渐向叶尖扩展,最后变成焦枯状,有学者推测细胞膜的不稳定是导致叶烧病发生的原因^[1-2]。

细胞膜的主要成分是磷脂,磷脂构成的磷脂双分子层不仅是分隔细胞质与外界环境的屏障,还能够感受外界刺激,产生信号传递物质^[3]。磷脂酶(phospholipase)是生物体内负责磷脂代谢和生物合成的一类酶^[4]。磷脂酶根据其催化反应的对象分为 5 类,分别是磷脂酶 A1(PLA1)、磷脂酶 A2(PLA2)、溶血磷脂酶(PLB)、磷脂酶 C(PLC)和磷脂酶 D(PLD)^[5],在植物中主要为 PLA1、PLA2、PLC 和 PLD 这 4 类^[6]。磷脂酶几乎参与植物体所有的

生命阶段,尤其在响应外界环境刺激中起着重要的作用^[7]。因此,研究其作用机制已成为近年来生物学重要且发展最迅速的领域之一。目前,磷脂酶基因已在许多植物中得到克隆和鉴定,但在百合中尚未开展相关研究^[8-10]。本研究利用 Illumina 测序对百合正常叶片和叶烧病叶片进行转录组测序分析,并通过数据筛选挖掘磷脂酶基因家族的基因信息,旨在为磷脂酶基因的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验采用百合品种 Tarrango 的 18 cm 周径种球种植于连云港市农业科学院东辛农场试验基地日光温室中,待百合长至 50 cm 左右,花苞从叶片中显露时,摘取百合植株同一部位正常叶片(TarCK)和叶烧病叶片(TarULN),放置于干冰保温盒中保存后送样。

1.2 Illumina 测序与序列组装

高通量测序委托苏州金唯智生物科技有限公司完成。使用二代测序数据质量统计软件 Cutadapt(version 1.9.1)对测序原始数据(Pass Filter Data)去除接头以及低质量序列等,后续信息分析用的 Clean Data。采用组装软件 Trinity 对样品数据从头组装,组装结果通过序列聚类做进一步序列拼接和去冗余处理,得到长的非冗余 unigene 序列。

1.3 序列分析与功能注释

Unigene 序列通过 Blast 比对到蛋白质数据库 NR、Uniprot、KEGG 和 COG,选择与给定 unigene 序

收稿日期:2021-05-28

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(20)3025];连云港市农业科学院青年基金(编号:QNJJ2004);江苏省政策引导类计划项目(苏北科技专项)(编号:SZ-LYG202039)。

作者简介:葛金涛(1987—),男,山东安丘人,硕士,助理研究员,主要从事园艺作物育种研究。E-mail:672643419@qq.com。

通信作者:邵小斌,研究员,主要从事园艺作物育种与栽培技术研究。

E-mail:382748523@qq.com。

列同源性最高的蛋白,分别获得 unigene 序列在 4 个数据库中的注释信息。

1.4 磷脂酶基因家族的筛选与数据分析

以磷脂酶(phospholipase)作为关键词,在获得的所有 unigene 序列注释信息中搜索和筛选,得到磷脂酶基因家族候选基因。对所获候选基因在百合正常叶片(TarCK)和叶烧病叶片(TarULN)中的表达进行差异分析,同时按所获得的注释信息对候选基因进行分类,并预测候选基因参与的代谢途径。对获得磷脂酶基因序列以 500 bp 为单位做序列长度统计分析。

2 结果与分析

2.1 磷脂酶基因注释分析统计

在本次高通量测序过程中,共有 274 条 Unigene 序列被注释为磷脂酶基因(表 1)。其中 COG 蛋白质数据库中得到注释为磷脂酶基因的 unigene 序列最多,为 201 条,其次为 Uniprot 和 NR 数据库中,分别为 170 条和 126 条,KEGG 注释的 unigene 序列最少,为 62 条,在 4 个蛋白质数据库中都注释为磷脂酶基因的 unigene 序列有 34 条(图 1),并且注释的磷脂酶基因类型一致,其中分泌磷脂酶 *PLA2* 基因 4 条,序列长度在 500 ~ 1 000 bp 之间,*PLC* 基因 9 条,*PLD* 基因 24 条(表 2)。

表 1 磷脂酶基因注释分析统计 条

注释数据库 unigene 序列数量	数据库			
	NR	COG	Uniprot	KEGG
289	126	201	170	62

最多,尤其是 *PLB* 基因较多,经分析是 COG 数据库中注释为溶血磷脂酶基因(*PLB* 基因)的 39 个基因,在 NR 数据库中注释为咖啡酰莽草酯酶 *CSE* 基因(caffeoylshikimate esterase)。有 3 个基因在 COG 数据库中注释为 *CSE* 基因,而在 NR 数据库中注释为 *PLB* 基因。通过比对 NCBI 数据库中的 *CSE* 基因与 *PLB* 基因发现,*CSE* 基因与 *PLB* 基因具有很高的相似度,通过 MEGA 6.06 构建同源进化树分析,*CSE* 基因与部分 *PLB* 基因的同源性高于 *PLB* 基因之间的同源性(图 3)。在 KEGG 数据库中有 12 个基因注释为 lysophospholipase II (溶血磷脂酶基因 *LYPLA2*),在 Uniprot 数据库中注释为 acyl - protein thioesterase (酰基蛋白硫脂酶 *APT*),利用 MEGA 6.06 构建百合 *LYPLA2* 与 NCBI 数据库中登录的 *APT* 基因的同源进化树,发现百合 *LYPLA2* 基因与非洲油棕、枣椰树和野芭蕉的 *APT* - 2 基因同源性较高(图 4),通过 DNAMAN6.0 软件多序列对比分析百合 *LYPLA2* 基因与非洲油棕、枣椰树和野芭蕉的 *APT* - 2 基因同源性均高于 83%。同时百合 *LYPLA2* 基因与 NCBI 中深圳拟兰、铁皮石斛和豇豆植物登录的 *lysophospholipase II* 基因同源性较高(图 5),同源性均在 73% 以上。

通过比对 4 个蛋白数据库中注释基因发现,同 *CSE* 基因一样与磷脂酶基因具有较高同源性的基因还有 *LYSOPL2*、acylglycerol lipase、acyl - protein thioesterase、peroxiredoxin6、1 - Cys peroxiredoxin 和 acriflavine resistance protein B(表 3)。

上述基因与磷脂酶类基因均具有较高的同源性,其中 *LYSOPL2* 属于 MGAT 蛋白类似基因,包含 1 个水解酶或者乙酰基转移酶结构域和 1 个溶血磷脂酶结构域。一般属于多功能酶,同时具有乙酰基转移酶活性和水解酶活性^[11]。过氧化还原蛋白 6 (peroxiredoxin 6, Prdx6) 是一种具有 GSH 过氧化物酶和磷脂酶 A2 活性的双功能蛋白^[12]。

2.3 代谢通路分析

对上述在 4 个蛋白库都得到注释的磷脂酶基因进行代谢通路分析(图 6),*PLA2* 基因参与了甘油磷脂代谢调控合成 1 - acyl - sn - glycerol - 3 - phosphocholine,参与醚脂类代谢调控合成 1 - alkyl - sn - glycerol - 3 - phosphocholine (lyso PAF) 和 1 - (1 - alkenyl) - sn - glycerol - 3 - phosphoethanolamine (lysoplasmalogen),在百合叶烧病发生过程中,*PLA2* 基因表达量上调。溶血磷脂酶基因

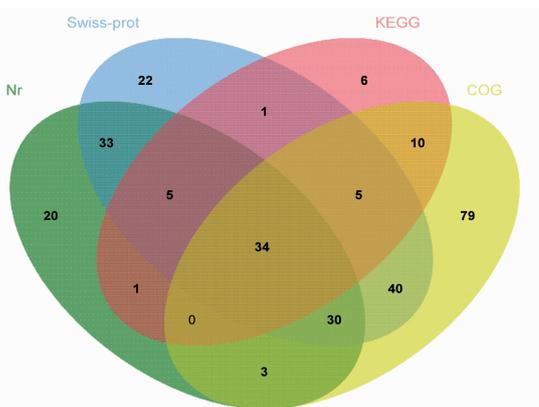


图 1 磷脂酶基因各数据库注释结果韦恩图

2.2 各蛋白数据库中磷脂酶基因的种类和数量分析

由图 2 可知,COG 数据库中注释的磷脂酶基因

表 2 在 4 个蛋白库都得到注释的磷脂酶基因

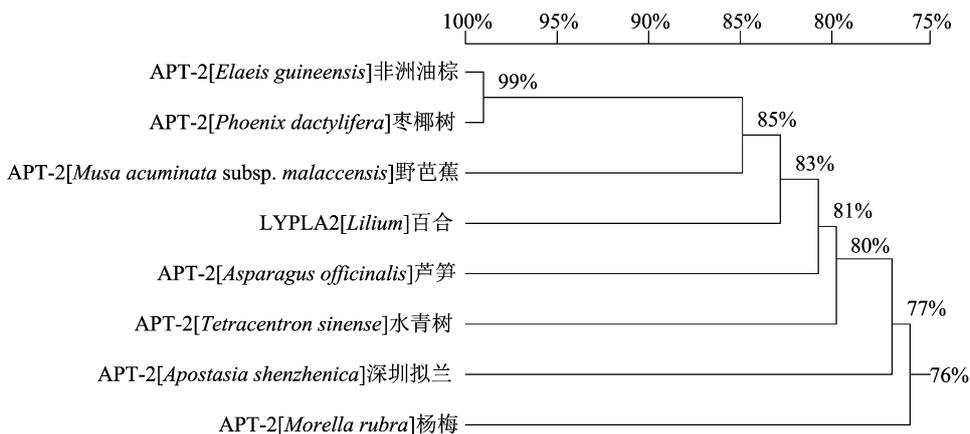
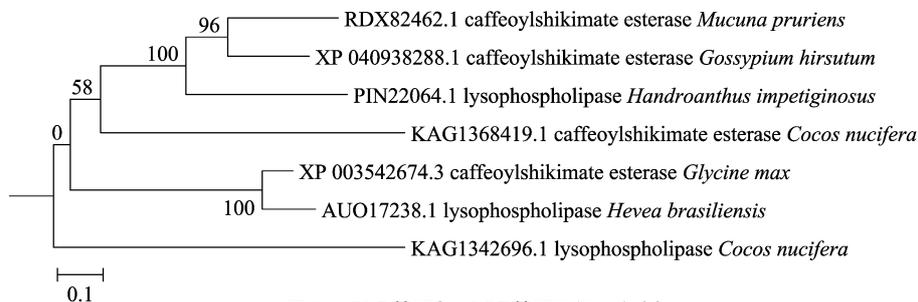
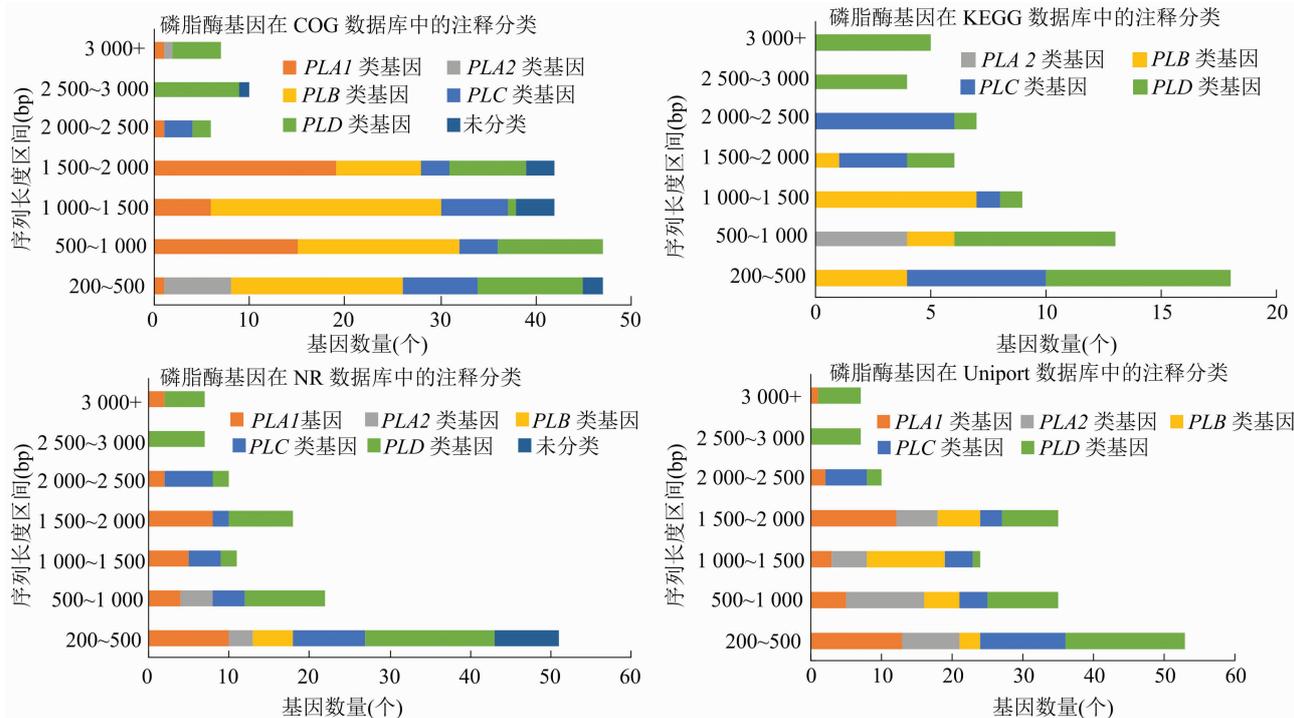
基因序号	基因长度 (bp)	NR 数据库蛋白信息	COG 数据库中基因信息	Uniprot 数据库中基因信息	KEGG 中基因名称
DN43195c0g14i1	600	gi 695077554 ref XP009386123.1	gnl CDD 232018	gi 75303620 sp Q8S8N6.1 PLA2AARATH	SPLA2
DN46166c0g1i1	674	gi 695077554 ref XP009386123.1	gnl CDD 232018	gi 122246818 sp Q10E50.1 PLA23ORYSJ	SPLA2
DN69200c1g1i1	578	gi 743851870 ref XP010940246.1	gnl CDD 232018	gi 75267474 sp Q9XG80.1 PLA21ORYSJ	SPLA2
DN73618c0g1i1	933	gi 695077554 ref XP009386123.1	gnl CDD 232018	gi 75303620 sp Q8S8N6.1 PLA2AARATH	SPLA2
DN27780c0g1i1	232	gi 304243 gb AAA30700.1	gnl CDD 229207	gi 17433757 sp Q15147.3 PLCB4HUMAN	PLCB
DN70052c0g1i2	1 812	gi 58759047 gb AAW81960.1	gnl CDD 228118	gi 75311691 sp Q9LY51.1 PLCD7ARATH	PLCD
DN72264c2g1i5	1 830	gi 743842581 ref XP010937846.1	gnl CDD 228118	gi 75281793 sp Q39033.1 PLCD2ARATH	PLCD
DN87429c0g2i1	204	gi 58759047 gb AAW81960.1	gnl CDD 228118	gi 172045743 sp Q8GV43.2 PLCD6ARATH	PLCD
DN87429c0g3i1	1 028	gi 58759047 gb AAW81960.1	gnl CDD 228118	gi 172045743 sp Q8GV43.2 PLCD6ARATH	PLCD
DN55292c0g1i1	2 063	gi 58759047 gb AAW81960.1	gnl CDD 228118	gi 172045743 sp Q8GV43.2 PLCD6ARATH	PLCD
DN55292c0g1i2	2 128	gi 58759047 gb AAW81960.1	gnl CDD 228118	gi 172045743 sp Q8GV43.2 PLCD6ARATH	PLCD
DN58085c0g1i1	2 287	gi 58759049 gb AAW81961.1	gnl CDD 228118	gi 75306038 sp Q944C1.2 PLCD4ARATH	PLCD
DN59231c0g1i5	2 162	gi 743842581 ref XP010937846.1	gnl CDD 228118	gi 75281793 sp Q39033.1 PLCD2ARATH	PLCD
DN44911c0g1i1	748	gi 695045790 ref XP009410696.1	gnl CDD 229271	gi 20139278 sp Q9T053.1 PLDG1ARATH	PLD12
DN46974c0g1i1	3 636	gi 672143791 ref XP008795779.1	gnl CDD 229271	gi 20139230 sp Q9LRZ5.1 PLDZ1ARATH	PLD12
DN71367c0g1i2	935	gi 695070082 ref XP009382053.1	gnl CDD 229271	gi 20139135 sp Q9C5Y0.2 PLDD1ARATH	PLD12
DN74368c0g2i3	3 887	gi 743828618 ref XP010933911.1	gnl CDD 229271	gi 374095514 sp P93733.4 PLDB1ARATH	PLD12
DN74368c0g2i7	1 594	gi 695021933 ref XP009398073.1	gnl CDD 229271	gi 374095514 sp P93733.4 PLDB1ARATH	PLD12
DN2402c0g1i1	334	gi 695068352 ref XP009381115.1	gnl CDD 229271	gi 108935871 sp Q43007.2 PLDA1ORYSJ	PLD12
DN31298c0g1i1	2 694	gi 670428155 ref XP008654846.1	gnl CDD 229271	gi 2499708 sp Q43270.1 PLDA1MAIZE	PLD12
DN33819c0g1i1	1 088	gi 695068352 ref XP009381115.1	gnl CDD 229271	gi 108935871 sp Q43007.2 PLDA1ORYSJ	PLD12
DN42332c0g1i2	1 708	gi 672165915 ref XP008802877.1	gnl CDD 229271	gi 20139135 sp Q9C5Y0.2 PLDD1ARATH	PLD12
DN42826c0g2i2	3 564	gi 672143791 ref XP008795779.1	gnl CDD 229271	gi 20139230 sp Q9LRZ5.1 PLDZ1ARATH	PLD12
DN43021c0g1i1	705	gi 743875172 ref XP010907269.1	gnl CDD 229271	gi 2499708 sp Q43270.1 PLDA1MAIZE	PLD12
DN48662c0g1i1	498	gi 695068352 ref XP009381115.1	gnl CDD 229271	gi 108935871 sp Q43007.2 PLDA1ORYSJ	PLD12
DN53268c0g1i1	3 464	gi 743828618 ref XP010933911.1	gnl CDD 229271	gi 374095514 sp P93733.4 PLDB1ARATH	PLD12
DN55671c1g1i8	3 221	gi 743828618 ref XP010933911.1	gnl CDD 229271	gi 374095514 sp P93733.4 PLDB1ARATH	PLD12
DN56129c0g1i1	2 992	gi 743855336 ref XP010941358.1	gnl CDD 229271	gi 20139135 sp Q9C5Y0.2 PLDD1ARATH	PLD12
DN56889c0g1i1	2 799	gi 695068352 ref XP009381115.1	gnl CDD 229271	gi 108935871 sp Q43007.2 PLDA1ORYSJ	PLD12
DN69576c0g1i1	724	gi 743875172 ref XP010907269.1	gnl CDD 229271	gi 108935871 sp Q43007.2 PLDA1ORYSJ	PLD12
DN89798c1g1i1	2 220	gi 672113608 ref XP008811755.1	gnl CDD 229271	gi 20139135 sp Q9C5Y0.2 PLDD1ARATH	PLD12
DN42575c1g1i1	411	gi 743845072 ref XP010938491.1	gnl CDD 229271	gi 20139230 sp Q9LRZ5.1 PLDZ1ARATH	PLD12
DN45220c0g1i1	525	gi 695068352 ref XP009381115.1	gnl CDD 229271	gi 2499708 sp Q43270.1 PLDA1MAIZE	PLD12
DN60614c0g2i1	2 975	gi 657968377 ref XP008375890.1	gnl CDD 229271	gi 374095514 sp P93733.4 PLDB1ARATH	PLD12

LYPLA2 基因参与了甘油磷脂代谢调控合成 sn - glycerol - 3 - phosphocholine。PLC 基因在甘油磷脂代谢调控中调控合成 1, 2 - diacyl - sn - glycerol, 在醚脂类代谢调控中调控合成 2 - acyl - 1 - (lalkenyl) - sn - glycerol, 在百合叶烧病发生过程中, PLC 基因表达量上调。PLD 基因参与了甘油磷脂代谢调控合成 1, 2 - diacyl - sn - glycerol - 3P, 在醚脂类代谢中调控合成 2 - acyl - 1 - (lalkenyl) - sn - glycerol - 3 - phosphate (plasmenic

acid)。

3 讨论与结论

磷脂酶是催化磷脂水解释放游离脂肪酸的一类复杂而重要的酶, 在植物体内分布广泛。其中 PLAs 根据序列同源性和进化关系一般分为 3 类: 磷脂酶 A1 (PLA1)、patatin like 磷脂酶 (pPLA) 和低分子量分泌磷脂酶 A2 (sPLA2)^[13-14]。也有学者将 PLAs 分为 4 类: 水解磷脂酰胆碱(PC)的 PLA1、偏爱



磷脂酸 (PA) 的 PLA1 (PA - PLA1)、sPLA2 和 pPLA^[15]。在本次试验中百合的 PLA 基因检测出 PLA1 基因 (以 *phospholipase A1 - Iy1* 为主)、*secretory phospholipase A2* 和 *Ca²⁺ - independent Phospholipase*

A2。在 COG 中有 31 条基因注释为 *Ca²⁺ - independent Phospholipase* 的 A2 基因,而在 NR 数据库中 31 条基因均注释为 *patatin - like protein*,同时在 Uniprot 数据中 31 条基因同时注释为 *patatin - like*

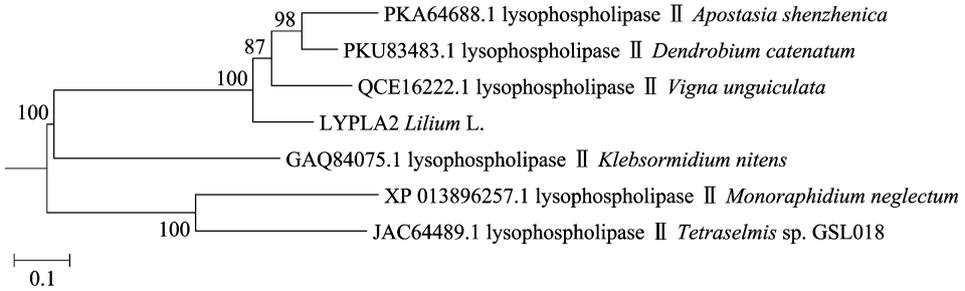


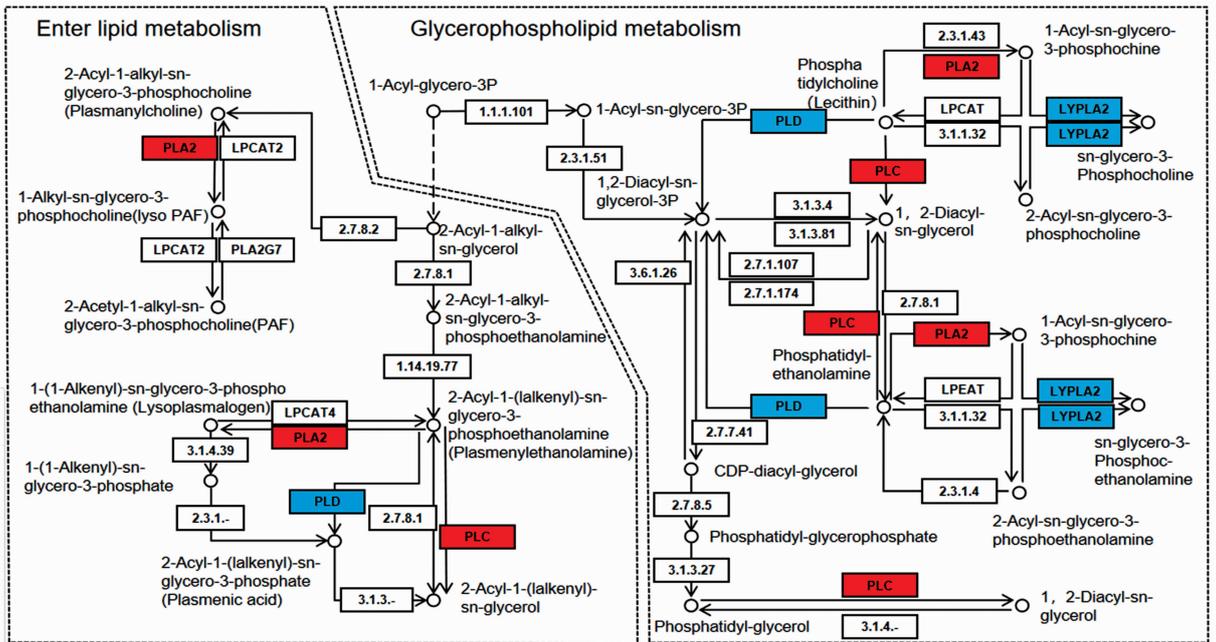
图5 百合 LYPLA2 基因与其他植物 lysophospholipase II 基因同源进化树

表 3 百合转录组测序中与磷脂酶基因具有较高同源性的基因

结构类似基因	磷脂酶基因
MGAT 蛋白类似基因 <i>LYSOPL2</i>	<i>PLB</i>
咖啡酰莽草酯酶基因 (caffeyolshikimate esterase)	<i>PLB</i>
酰基甘油脂肪酶基因 (acylglycerol lipase)	<i>PLA2</i>
酰基蛋白硫脂酶 APT 基因 (acyl - protein thioesterase)	<i>PLB</i>
过氧化物还原蛋白 6 基因 (peroxiredoxin6)	<i>PLA2</i>
吡黄抗性蛋白 B 基因 (acriflavine resistance protein B)	<i>PLC</i>

protein 和 patatin - related phospholipase A。这表明磷脂酶 A (patatin - related phospholipase A, pPLA) 与动物 *iPLA2* (钙离子非依赖型磷脂酶 A2) 为同源蛋白质,催化磷脂分子中 sn - 1 和 sn - 2 酰基酯键的水解,与 Holk 等的研究结果^[16]一致。

PLB 是一种非常重要的代谢酶类,广泛存在于动植物及微生物体内,在植物中尚未见报道,具有水解酶、溶血磷脂酶和转酰基酶活性。水解酶和溶血磷脂酶活性是能够水解磷脂和溶血磷脂的 Sn - 1



红色标注表示上调表达的基因; 蓝色标注表示为基因家族中既有上调表达基因, 又有下调表达基因; 没有标注颜色的基因为恒定表达的基因

图6 磷脂酶参与的代谢途径

和 Sn - 2 位酯键,生成相应的甘油酰磷脂和脂肪酸,该酶在磷脂的分解代谢中具有非常重要的作用。Kegg 数据库中,PLB 基因家族分为 12 条基因注释为 lysophospholipase II (LYPLA2 K06130) 和 2 条基因注释为 pldB (K01048),PLB 即溶血磷脂酶基因的特异性较低,在注释时通常不能与其他脂酶基因区别,如咖啡酰莽草酯酶 (caffeyolshikimate esterase) 和

单甘油酯脂肪酶 (monoglyceride lipase),其原因是上述 3 类基因都具有溶血磷脂酶结构域,因此它们的基因序列相似度较高^[17],PLB 基因与 APT 基因不能区分是因为多个基因兼具溶血磷脂酶活性和酰基蛋白硫脂酶活性^[18-19]。

PLC 在植物内起到膜脂重构和胞内信号传导的作用^[20],根据底物亲和力和细胞功能的差异分为磷

脂酰肌醇特异性 PLC (PI - PLC) 和磷脂酰胆碱 - PLC (PC - PLC)^[21-22], PI - PLC 水解磷酸肌醇, 产生肌醇 1,4,5 - 三磷酸 (IP3) 和二酰甘油 (DAG), 可能是第 2 信使^[20,23]。IP3 可以快速合成 hexakisphosphate (IP6) 并触发 Ca²⁺ 内流, 而 DAG 可以被 DAG kinase (DGK) 磷酸化并转化为磷脂酸 (PAs)^[24]。与 PI - PLC 不同, PC - PLC 也称为非特异性 PLC (NPC), 优先水解常见的膜磷脂, 如 PC、磷脂酰乙醇胺 (PE) 和磷脂酰丝氨酸 (PS)^[21]。在本次试验中, 磷脂酶 C 分为 PLC β (K05858) 和 PLC ζ (k05857) 和 plc (k01114) 3 类。phosphatidylinositol - specific phospholipase C1 (PI - PLC)、non - specific phospholipase C1 (NPC) 和 non - hemolytic phospholipase C (非溶血性磷脂酶 C) PLC - N 与 phospholipase C, phosphocholine - specific 一样。

磷脂酶 D 是一类能够水解磷脂质生成磷脂酸和羟基化合物的酶, 其催化部位为磷脂质的磷酸二酯键^[25]。在百合中磷脂酶 D 分为磷脂酰肌醇 - 聚糖特异性磷脂酶 D (phosphatidylinositol - glycan - specific phospholipase D)、糖基磷脂酰肌醇 - 磷脂酶 D (glycosylphosphatidylinositol phospholipase D) GPI - PLD (EC: 3. 1. 4. 50); PLD3_4 (EC: 3. 1. 4. 4) 和 PLD1_2 (EC: 3. 1. 4. 4), 其中 PLD1_2 又分为 5 类 PLD α 1、PLD ζ 1、PLD γ 1、PLD β 1、PLD δ 1。磷脂酶 D 基因结构特异性强, 26 条 *PLD* 基因在 4 个数据库都得到注释。

植物体内存在的磷脂酶主要为 PLA1、PLA2、PLC 和 PLD, 在 NCBI 数据库中已检测到多种植物的 *PLB* 基因序列。在本次转录组测序中, 虽然有多个 *PLA1* 基因对到 4 个蛋白质数据库中, 但都没有注释到任何代谢通路上。测序获得的 *PLB* 基因与其他植物的溶血磷脂酶基因具有较高同源性, 其功能分析需要进一步验证。百合磷脂酶候选 unigene 的获得为进一步开展百合磷脂酶基因的克隆及功能鉴定奠定了基础, 同时能为后续百合磷脂酶相关代谢途径及分子机制解析提供数据支持。

参考文献:

[1] Berghoef J. Effect of calcium on tipburn of *Lilium* 'Pirate' [J]. Acta Hort, 1986, 177(61): 433 - 438.

[2] Chang Y C, Miller W B. The relationship between leaf enclosure, transpiration, and upper leaf necrosis on *Lilium* 'Star Gazer' [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2004, 129(1): 128 - 133.

[3] 杨 阳, 王晶慧. 百合响应非生物胁迫的分子机制研究 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(15): 5046 - 5054.

[4] Campos M L. A novel role for a phospholipase D in plant immunity [J]. Plant Physiology, 2020, 183(1): 33 - 34.

[5] 李晓薇, 耿舒涵, 赵 旭, 等. 亚麻芥未成熟胚中磷脂酶基因家族的转录组学分析 [J]. 中国油料作物学报, 2018, 40(6): 793 - 800.

[6] Wang G L, Ryu S, Wang X M. Plant phospholipases: an overview [J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 861: 123 - 137.

[7] Hong Y Y, Pan X Q, Welti R, et al. The effect of phospholipase D α 3 on *Arabidopsis* response to hyperosmotic stress and glucose [J]. Plant Signaling & Behavior, 2008, 3(12): 1099 - 1100.

[8] Jang J H, Lee O R. Overexpression of ginseng patatin - related phospholipase *pPLAIII β* alters the polarity of cell growth and decreases lignin content in *Arabidopsis* [J]. Journal of Ginseng Research, 2020, 44(2): 321 - 331.

[9] Hong Y Y, Zhao J A, Guo L A, et al. Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses [J]. Progress in Lipid Research, 2016, 62: 55 - 74.

[10] Gonorazky G, Guzzo M C, Abd - El - haliem A M, et al. Silencing of the tomato phosphatidylinositol - phospholipase C2 (SIPLC2) reduces plant susceptibility to *Botrytis cinerea* [J]. Molecular Plant Pathology, 2016, 17(9): 1354 - 1363.

[11] Shi X, Chye M L. An *Arabidopsis* family of six acyl - CoA - binding proteins has three cytosolic members [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2009, 47(6): 479 - 484.

[12] Manevich Y, Fisher A B. Peroxiredoxin 6, a 1 - Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2005, 38(11): 1422 - 1432.

[13] Scherer G F E, Ryu S B, Wang X M, et al. Patatin - related phospholipase A: nomenclature, subfamilies and functions in plants [J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(12): 693 - 700.

[14] Chen G Q, Greer M S, Lager I, et al. Identification and characterization of an LCAT - like *Arabidopsis thaliana* gene encoding a novel phospholipase A [J]. FEBS Letters, 2012, 586(4): 373 - 377.

[15] Ryu S B. Phospholipid - derived signaling mediated by phospholipase A in plants [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(5): 229 - 235.

[16] Holk A, Rietz S, Zahn M, et al. Molecular identification of cytosolic, patatin - related phospholipases A from *Arabidopsis* with potential functions in plant signal transduction [J]. Plant Physiology, 2002, 130(1): 90 - 101.

[17] Gao W, Li H Y, Xiao S, et al. Protein interactors of acyl - CoA - binding protein ACBP2 mediate cadmium tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Signaling & Behavior, 2010, 5(8): 1025 - 1027.

[18] Wang A J, Johnson C A, Jones Y, et al. Subcellular localization and PKC - dependent regulation of the human lysophospholipase A/acyl - protein thioesterase in WISH cells [J]. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2000, 1484(2/3):

梁燕妮,黄银霞,魏诗琴,等. 紫芽六堡茶转录组 SSR 位点序列分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(3):42-48.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.03.007

紫芽六堡茶转录组 SSR 位点序列分析

梁燕妮,黄银霞,魏诗琴,陈秋雨

(梧州学院,广西梧州 543002)

摘要:以广西梧州紫芽六堡茶为研究对象,运用 MISA 软件对转录组测序获得的 165 570 条 unigene 序列(总长度为 240 177 233 bp),进行 SSR 位点搜索。使用 Excel 软件对 SSR 位点的出现频率、基元类型、基元组成、平均距离等进行处理分析。结果表明,共在 10 058 条 unigene 中找到符合条件的 SSR 位点 11 482 个,出现频率为 6.93%,平均距离为 20.92 kb,平均长度为 20.80 bp。紫芽六堡茶转录组 SSR 中,双碱基重复是主要的重复类型,占总 SSR 的 19.03%,GA/TC、GAA/TTC、AAAT/ATTT、AAAAG/CTTT 分别是双碱基、三碱基、四碱基、五碱基的优势重复单元。序列长度大于 20 bp 的 SSR 位点数占总 SSR 的 44.05%,其中长度为 24 bp 的 SSR 位点数最多,占 SSR 总数的 16.01%。说明紫芽六堡茶转录组 SSR 种类丰富、可用性高、多态性高。通过对 SSR 位点的分布特征和序列特征进行分析,可为后续六堡茶的进化、品种鉴定、分子育种等研究提供依据。

关键词:茶树;六堡茶;转录组;SSR 位点;序列分析

中图分类号:S571.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)03-0042-07

六堡茶因其原产于广西壮族自治区梧州苍梧县六堡镇而得名,为广西特色优质的历史名茶,并以其“红、浓、陈、醇”的特性闻名于世。六堡茶的制作以六堡镇的群体种茶树为原料,六堡群体种茶树为灌木型中小叶种,树势开展,分枝密。从芽色分,以青苗茶为主,占 60%,紫芽茶占 20%,茶树红紫色芽叶是一种特异茶叶资源,紫芽六堡茶树由于富含花青素成为当前茶树新品种开发利用的热点及研

究的重点。

简单重复序列(simple sequence repeat,简称 SSR)别称微卫星 DNA,以 1~6 个碱基为核心序列,具有多态性高、重复性好、稳定性高等特点^[1],随着现代分子技术的发展,SSR 技术已广泛应用于植物分子辅助育种、种质资源遗传多样性、绘制遗传图谱等方面的研究中。毛娟等利用 30 对茶树核心 SSR 引物,对 3 个代表性的野生和栽培大理茶居群进行遗传分析^[2]。陈春林等从紫娟茶树转录组 46 041 条单基因簇(unigene)中筛选出 57 976 个 SSR 位点,并对 SSR 序列的分布特征进行了分析,筛选出 44 对高质量引物^[3]。班秋艳等对陕西及临近 8 个省份 118 份茶树资源利用表达序列标签(EST)-SSR

收稿日期:2021-10-17

基金项目:广西自然科学基金青年科学基金(编号:2020GXNSFBA159007);梧州高新区梧州学院产学研项目(编号:2020G012);广西大学生创新创业项目(编号:202111354113)。

作者简介:梁燕妮(1980—),女,广西梧州人,硕士,高级实验师,主要从事分子生物学研究。E-mail:371200021@qq.com。

207-214.

[19] Hirano T, Kishi M, Sugimoto H, et al. Thioesterase activity and subcellular localization of acylprotein thioesterase 1/lysophospholipase 1[J]. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2009, 1791(8):797-805.

[20] Meldrum E, Parker P J, Carozzi A. The PtdIns-PLC superfamily and signal transduction[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (-Molecular Cell Research)*, 1991, 1092(1):49-71.

[21] Kocourková D, Krčková Z, Pejchar P, et al. The phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C NPC₄ plays a role in response of *Arabidopsis* roots to salt stress[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(11):3753-3763.

[22] Pokotylo I, Kolesnikov Y, Kravets V, et al. Plant phosphoinositide-dependent phospholipases C: Variations around a canonical theme[J]. *Biochimie*, 2014, 96:144-157.

[23] Salinas-Mondragon R E, Kajla J D, Perera I Y, et al. Role of inositol 1,4,5-triphosphate signalling in gravitropic and phototropic gene expression[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2010, 33(12):2041-2055.

[24] Wang X M, Devaiah S P, Zhang W H, et al. Signaling functions of phosphatidic acid[J]. *Progress in Lipid Research*, 2006, 45(3):250-278.

[25] 杨学利,马沁沁,袁向华,等. 磷脂酶 D 及其催化机制的研究进展[J]. *中国油脂*, 2016, 41(3):80-84.