

花叶矢竹转录组中的转座子表达分析

安苗苗, 刘 静, 郦 元, 周明兵

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: 以花叶矢竹 *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji* 10 种不同颜色 and 不同发育阶段的叶片转录组数据为基础, 调查了花叶矢竹中转座子的种类、数量以及选择性表达特性。结果表明: 花叶矢竹转录组中转座子类型丰富、数量繁多, 其中 RNA 转座子明显多于 DNA 转座子, 转座子 LTR/Copia 类型数量最多。绿叶的 5 个发育阶段中, 转座子主要在第 5 发育阶段高表达, 表明这些转座子可能参与了花叶矢竹叶片成熟过程。而在白叶 5 个发育阶段中, 转座子主要在第 1 发育阶段高表达; 对绿叶和白叶 5 个相对应的发育阶段分析表明, 白叶中高表达的转座子多于绿叶, 表明这些转座子可能参与了花叶矢竹叶色变异过程, 也可能是逆境胁迫导致转座子转座激活。图 3 表 3 参 25

关键词: 植物学; 花叶矢竹; 转座子; 表达模式

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)06-0935-09

Transposons expression analysis of transcriptome in *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji*

AN Miaomiao, LIU Jing, LI Yuan, ZHOU Mingbing

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To study the super-family, abundance, and expression patterns of transposons in *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji*, transcriptome data from 10 kinds of different colors and different leaf developmental stages were assembled. Transposons were identified by Protein-based RepeatMasking. Then a comparison analysis of transposons for the five corresponding developmental stages of green leaves and albino leaves was conducted. Results showed many different super-families of transposons in transcriptome with more RNA (74.06%) than DNA (23.36%) transposons and with LTR/Copia transposons (25.38%) the most abundant for all super-families. Among the five developmental stages of green leaves, the fifth developmental stage had the most high-level expressed transposons (49.48%). Also, among the five developmental stages of albino leaves, the first developmental stage had the most high-level expressed transposons. The comparison analysis of the five corresponding developmental stages of green and albino leaves showed more high-level expressed transposons in albino leaves (55.14%). Thus, in green leaves of *P. japonica* f. *akebonosuji*, transposons could be involved with leaf maturation; also to lay a foundation for whether transposons regulate leaf color variation, the green and albino leaf comparison revealed that transposons could influence leaf color variation with high expression of transposons due to stress from abnormal photosynthesis. [Ch, 3 fig, 3 tab, 25 ref.]

Key words: botany; *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji*; transposons; expression patterns

收稿日期: 2015-12-23; 修回日期: 2016-01-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31170565, 31270645, 31470615); 浙江自然科学基金杰出青年基金资助项目(LR12C16001)

作者简介: 安苗苗, 从事竹类植物基因组进化研究。E-mail: anmiaomiao0109@163.com。通信作者: 周明兵, 副教授, 博士, 从事竹类植物基因组进化研究。E-mail: zhoumingbing@zafu.edu.cn

花叶矢竹 *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji* 原产日本, 是矢竹的一个栽培变种, 属于矮小型混生竹种, 是一种优良的珍稀观赏竹种, 株高 2 m 左右^[1]。花叶矢竹在自然栽培过程中, 叶色会发生变异, 有全绿叶、全白叶和绿白相间条纹叶, 而且条纹叶中的绿条纹和白条纹的颜色深浅、形状和出现的个数和位置都具有不确定性, 还会随着栽培条件的变化而变化。随着转录组测序技术的发展, 越来越多的物种转录组被测序。为了了解花叶矢竹不同叶片转录组中的基因表达差异情况, 花叶矢竹的不同生长阶段和不同颜色的叶片转录组被测序, 这为分析花叶矢竹叶片发育和叶色变异提供了重要基础数据。转座子 (TEs 或 transposons) 也可称为转座因子或转座元件, 它是一段 DNA 序列, 能从同一染色体的一个位置转移到另一个位置, 或者从一条染色体转移到另一条染色体上^[2-4]。依据不同的转座机制, 可将转座子分为三大类: RNA 类转座子 (I 类转座子), DNA 类转座子 (II 类转座子) 和 Helitron 转座子 (II 类转座子中的滚筒式转座子)。RNA 类转座子也可称为反转录转座子, 是通过“复制和粘贴”的机制进行转座。该类转座子主要包括: 长末端重复反转录转座子 (LTRs), DIRs 转座子, PLE 转座子, 自主的非长末端反转录转座子 (LINEs) 和非自主的非长末端反转录转座子 (SINEs)。DNA 转座子是以 DNA 为中介在基因组中通过“剪切和粘贴”机制进行转座^[5]。该类转座子主要包括: TIR 类转座子、Crypton 转座子超家族、Maverick 转座子。虽然 Maverick 转座子被归类为 DNA 类转座子, 但是它的转座机制是滚环式, 属于 Helitron 转座子^[6], 内部含有一个负责链酶结构域的编码基因和复制起始的基序^[7]。转座子在宿主基因组跳跃, 会插入或脱离目的基因而关闭或恢复基因的表达活性^[8-9]。有文献报道^[10-11], 转座子转座可导致叶色或花色变化, 例如转座子 Mutator 插入到玉米 *Zea mays* 叶绿素合成以及光合作用有关基因中, 引起玉米白化突变体; 研究表明: 转座子 nDart1 插入水稻 *Oryza sativa* 叶绿体蛋白酶基因 *OsClpP5*, 使基因被破坏形成了叶色为浅黄色的 *pyl-v* 突变株^[12]; 康乃馨 *Dianthus caryophyllus* 花色由紫色变为深粉色就是由一个有活性的 hAT 型转座子 Tdic101 插入到 *F3'H* (flavonoid 3'-hydroxylase, 类黄酮 3'-羟化酶) 基因引起的^[13]; 日本 Iida 实验室研究发现, 蓝色花的矮牵牛 *Petunia hybrida* 突变为紫色花是由于转座子 Tpn4 插入到 *Pr* 基因, 影响了该基因的正常表达, 使之缺乏 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 因而液泡内的 pH 值降低, 突变株无法产生正常的亮蓝色, 因此, 蓝色的花冠檐上产生紫色的斑痕, 形成嵌合花色^[14]。本研究利用花叶矢竹不同颜色 and 不同发育阶段的 10 种叶片转录组数据, 分析花叶矢竹不同颜色 and 不同发育阶段叶片的转座子种类、数量及其选择性表达特性等, 这将为探索转座子是否参与花叶矢竹叶色变异奠定一定的基础。

1 研究方法

1.1 花叶矢竹转录组数据样本

本实验室具有花叶矢竹 10 种叶片材料的转录组数据。这 10 种叶片材料是根据叶片的颜色和长度来确定的。首先选择了 2 种极端颜色的叶片, 即全绿叶 (G) 和全白叶 (A); 又分别从这 2 种叶片中选择了卷曲叶最里面一层叶芽的 5 个不同发育阶段, 0.1~1.0 cm 长的刚刚抽出的叶芽为第 1 发育阶段 (G_1 和 A_1), 叶芽随时间逐渐发育伸长, 第 2 发育阶段 (G_2 和 A_2) 选择的叶芽长度是 1.0~5.0 cm, 长度 5.0~7.0 cm 的叶芽为第 3 发育阶段 (G_3 和 A_3), 长度 7.0~10.0 cm 的叶芽为第 4 发育阶段 (G_4 和 A_4), 长度 10.0~12.0 cm 的叶芽为第 5 发育阶段 (G_5 和 A_5)。

1.2 花叶矢竹转录组中转座子预测

将拼接后的绿叶 5 个发育阶段和白叶 5 个发育阶段的转录组序列提交到 repeatmasker 网站, 利用 Protein-based RepeatMasking 预测其中的转座子序列 (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/RepeatProtein-MaskRequest>), 对预测到的转座子通过 *e*-值进行筛选 ($e < 0.000\ 01$), 根据不同转座子的类型, 将筛选过的转座子进行分类分析。

1.3 转座子表达丰度平均值分析

按照转座子类型, 将从转录组中预测到的每条转座子的 FPKM 值 (expected number of fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced, 即每百万测序碱基中每千个转录子测序碱基中所包含的测序片段数) 合并, 除以每种类型转座子的数目, 得到每种类型转座子的平均 FPKM 值。

转座子根据转座机制可分为 RNA 类转座子 (I 类转座子)、DNA 类转座子 (II 类转座子) 和 Helitron

转座子(Ⅱ类转座子中的滚筒式转座子),根据上述方法算出样本 G_1, G_2, G_3, G_4, G_5 和 A_1, A_2, A_3, A_4, A_5 各转录组 RNA 类转座子的 FPKM 平均值、DNA 类转座子的 FPKM 平均值和 Helitron 转座子的 FPKM 平均值以及总的转座子 FPKM 平均值。

1.4 荧光定量聚合酶链式反应(PCR)

从预测筛选出的转座子中随机挑选 10 个转座子序列,用软件 Primer 5 设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物详细信息见表 1。

参照 Trizol 试剂(TaKaRa 公司,日本)方法提取上述绿叶和白叶各 5 个发育阶段叶片的总 RNA,然后用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒(PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit)将提取的 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 作为模板,基因 *PheACT2* 为内参^[15],参照 SYBR Green I Master(TaKaRa 公司,日本)说明书进行荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR),20.0 μL 的反应体系包括模板 cDNA 2.0 μL ,上下游引物各 0.8 μL ,灭菌的双蒸水 6.4 μL ,SYBR® *Premix Ex Taq II* 10.0 μL 。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$, 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,共 40 个循环。

表 1 转座子验证引物

Table 1 Primers of transposons verification

| 转座子类型 | 上游引物(5'→3') | 下游引物(5'→3') |
|-----------------|---------------------|--------------------|
| DNA/Academ | GCTAAAGCGGTAAGT | CATCTGTGGCAATCAGTA |
| DNA/EnSpm | GGGCATACTAATCGTAAAG | CCTCAAGCGTCACTGTCT |
| DNA/hAT | CTCAGTCACCTCCTCTT | CATCAATCTATCGCCAC |
| DNA/MuI | TGATACGGTCACTCTTACT | ATATGGATCTGGCTTTT |
| DNA/P | CAGTCTTGCTCGCCTCG | CGCCTCCATCTCCCTGT |
| DNA/PIF-Harbing | GACTTGGGCATGAGCAGC | CGTCGCCAAGGAGGACA |
| LINE | GCTCGATGGATTTAGTGG | GCCATCATGGAGCACAT |
| LTR/Copia | CGGCTCAAGATAGAGG | CACCGTCATCCGTAAT |
| LTR/ERV | TGGCTGAAGCATTCG | GCACGGTGGCATCAAG |
| RC/Helitron | ATGGTAGCCTGGATTTG | CCTTTGATCTCCCTGAA |

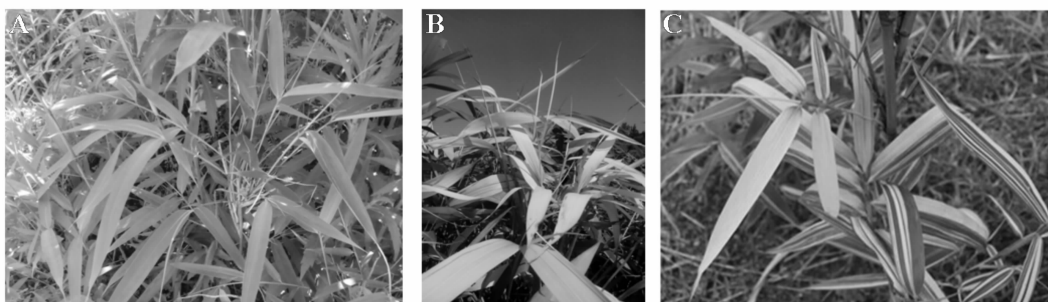
1.5 转座子表达模式分析

按样本转录组中的转座子 FPKM 比值大于 4,差值大于 2 的原则,除了筛选出在绿叶 5 个发育阶段之间和白叶 5 个发育阶段之间显著性差异表达的转座子序列,还筛选出白叶和绿叶各对应生长时期相比显著性差异表达的转座子序列。

2 结果与分析

2.1 花叶矢竹叶色变异的形态观察

根据花叶矢竹叶片颜色的不同,可将其叶片分成 3 种形态:全绿叶、全白叶和花叶。全绿叶是整张叶片都是绿色的(图 1A);整张叶片都是白色的叶片是全白叶(图 1B);花叶是一张叶片上既有绿色也有



A. 全绿叶; B. 全白叶; C. 条纹叶。

图 1 花叶矢竹的叶片形态

Figure 1 Leaf form of *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji*

白色, 绿白相间, 但是有的花叶绿色部分多于白色部分, 就形成了白条纹叶, 而有的花叶白色部分多于绿色部分, 就形成了绿条纹叶(图 1C)。

2.2 转录组序列中转座子类型及数量

从转录组中共预测到 57 890 个转座子序列, 筛选 e 值小于 0.000 01 的序列, 得到 1 627 条转座子序列。根据不同转座子的类型, 将这 1 627 个转座子进行分类分析, 可将其分为 3 个大类, 包括 1 205 个 RNA 转座子, 占总转座子的 74.06%; 380 个 DNA 转座子(23.36%)和 42 个 Helitron 转座子(2.58%)。RNA 转座子的数量远远多于 DNA 转座子数量。共有 22 种类型转座子, 其中 RNA 转座子 9 种, 包括 LINE, LTR/Copia, LTR/DIRS, LTR/ERV, LTR/Gypsy, LTR/Lenti, LTR/Ngaro, LTR/Pao 和 Other/subtelome; DNA 转座子 12 种, 包括 DNA/Academ, DNA/Chapaev, DNA/EnSpm, DNA/Crypton, DNA/Ginger, DNA/hAT, DNA/Maverick, DNA/MuLE, DNA/Novosib, DNA/P, DNA/PIF-Harbing 和 DNA/Sola。Helitron 转座子虽然被归为 DNA 类转座子, 但由于它的转座机制是滚环式, 所以单列为一类(表 2)。RNA 转座子中数量最多的是 LTR/Copia, 占总转座子数的 25.38%, 其中转座子 LINE, LTR/Gypsy 和 LTR/Pao 也占了很高比例, 分别为 16.72%, 15.18%和 9.96%; DNA 转座子中数量最多的是 DNA/hAT (8.85%)。

表 2 花叶矢竹转录组中的转座子类型及数量

Table 2 Super-family and abundance of transposons in transcriptome of *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji*

| 转座子类型 | 数量/个 | 所占比例/% | 转座子类型 | 数量/个 | 所占比例/% | 转座子类型 | 数量/个 | 所占比例/% |
|--------------|------|--------|-----------------|------|--------|-----------------|-------|--------|
| DNA/Academ | 35 | 2.15 | DNA/P | 13 | 0.80 | LTR/Ngaro | 3 | 0.18 |
| DNA/Chapaev | 10 | 0.61 | DNA/PIF-Harbing | 51 | 3.13 | LTR/Pao | 162 | 9.96 |
| DNA/EnSpm | 38 | 2.34 | DNA/Sola | 1 | 0.06 | Other/subtelome | 3 | 0.18 |
| DNA/Crypton | 1 | 0.06 | LINE | 272 | 16.72 | RC/Helitron | 42 | 2.58 |
| DNA/Ginger | 1 | 0.06 | LTR/Copia | 413 | 25.38 | DNA | 380 | 23.36 |
| DNA/hAT | 144 | 8.85 | LTR/DIRS | 2 | 0.12 | RNA | 1 205 | 74.06 |
| DNA/Maverick | 4 | 0.25 | LTR/ERV | 96 | 5.90 | RC | 42 | 2.58 |
| DNA/MuLE | 77 | 4.73 | LTR/Gypsy | 247 | 15.18 | 总和 | 1 627 | 100.00 |
| DNA/Novosib | 5 | 0.31 | LTR/Lenti | 7 | 0.43 | | | |

2.3 不同类型转座子的表达丰度平均值

转座子的表达丰度是检测转座子转座活性的一个重要指标。从表 3 中可见: 转座子总表达丰度平均值在绿叶 5 个不同发育阶段中上下浮动, 而在白叶 5 个不同发育阶段中是随着发育逐渐减小的。

RNA 转座子表达丰度平均值高于 DNA 转座子, RC/Helitron 型转座子表达丰度平均值最小; 不同类型转座子的表达丰度平均值也是不同的, RNA 转座子 9 种类型中, LTR/Pao 型转座子表达丰度平均值最高, 在所有类型转座子中表达量居第 2 位; DNA 转座子 12 种类型中, DNA/sola 型转座子表达量显著高于其他类型转座子, 并居于所有类型转座子中的第 1 位。LTR/Pao 型转座子和 DNA/sola 型转座子的表达丰度平均值在绿叶和白叶 5 个发育阶段的趋势与转座子总表达丰度平均值的趋势相似。表达丰度平均值相对较高的转座子类型还有 LTR/Lenti。但无论在绿叶还是白叶的 5 个发育阶段中, 其表达丰度平均值的趋势均随着叶片发育成熟逐渐减小。

2.4 荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)验证转座子的相对表达量

从 1 627 条转座子序列中, 随机选出 10 条转座子序列进行荧光定量 qRT-PCR 验证, 结果如图 2。可见, qRT-PCR 所得到的转座子在各个样本中的相对表达量值, 与其转录组数据的 FPKM 值的趋势基本上是一致的。

2.5 不同转座子的选择性表达分析

从 1 627 条转座子中, 按转座子 FPKM 比值大于 4, 差值大于 2 的原则, 筛选出绿叶 5 个发育阶段之间、白叶 5 个发育阶段之间以及绿叶和白叶对应发育阶段之间表达显著性差异的转座子序列。绿叶 5 个发育阶段之间表达存在显著性差异的有 194 个转座子, 白叶 5 个发育阶段之间表达存在显著性差异的有 181 个转座子, 绿叶和白叶相对应 5 个发育阶段之间表达存在显著性差异的有 107 个转座子。

表 3 花叶矢竹绿叶和白叶各 5 种发育阶段中不同转座子的表达丰度平均值

Table 3 Different transposons' average expression level in five developmental stages of green leaves and albino leaves of *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji*

| 转座子类型 | 绿叶 | | | | | 白叶 | | | | |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | G ₁ | G ₂ | G ₃ | G ₄ | G ₅ | A ₁ | A ₂ | A ₃ | A ₄ | A ₅ |
| DNA/Academ | 46.52 | 33.68 | 36.33 | 34.10 | 29.07 | 43.16 | 30.79 | 29.12 | 23.75 | 22.28 |
| DNA/Chapaev | 21.47 | 16.41 | 20.69 | 16.78 | 16.34 | 19.54 | 18.70 | 18.59 | 18.95 | 16.06 |
| DNA/EnSpm | 31.57 | 38.66 | 35.34 | 35.59 | 35.32 | 33.11 | 38.02 | 36.57 | 38.01 | 43.30 |
| DNA/Crypton | 20.56 | 12.82 | 18.50 | 10.81 | 12.45 | 21.71 | 9.73 | 16.11 | 15.10 | 10.94 |
| DNA/Ginger | 18.51 | 18.03 | 19.62 | 22.99 | 28.90 | 29.14 | 22.05 | 28.99 | 20.30 | 26.52 |
| DNA/hAT | 34.47 | 29.66 | 31.55 | 29.45 | 27.34 | 32.82 | 28.65 | 29.03 | 16.64 | 25.12 |
| DNA/Maverick | 6.61 | 15.41 | 13.54 | 16.72 | 18.05 | 8.68 | 18.75 | 20.08 | 79.73 | 26.83 |
| DNA/Mu | 20.57 | 14.59 | 16.43 | 14.62 | 13.68 | 19.66 | 15.86 | 14.67 | 14.09 | 12.72 |
| DNA/NovosibLE | 21.76 | 21.83 | 19.78 | 21.47 | 20.86 | 21.18 | 22.20 | 24.14 | 24.06 | 19.88 |
| DNA/P | 18.02 | 43.16 | 40.24 | 51.92 | 61.69 | 20.30 | 49.31 | 57.43 | 65.97 | 74.25 |
| DNA/PIF-Harbing | 31.55 | 53.37 | 24.37 | 44.78 | 84.14 | 60.80 | 44.56 | 37.59 | 38.43 | 22.33 |
| DNA/Sola | 275.37 | 176.92 | 204.89 | 235.67 | 167.55 | 306.03 | 149.75 | 117.70 | 73.31 | 84.45 |
| LINE | 39.40 | 37.36 | 35.91 | 35.12 | 32.87 | 38.14 | 34.72 | 34.53 | 32.73 | 31.33 |
| LTR/Copia | 30.94 | 31.35 | 28.61 | 30.40 | 32.18 | 32.26 | 30.99 | 28.86 | 27.82 | 31.32 |
| LTR/DIRS | 14.95 | 19.80 | 11.65 | 16.11 | 14.56 | 14.07 | 15.86 | 15.57 | 16.93 | 19.17 |
| LTR/ERV | 37.72 | 38.19 | 35.24 | 36.87 | 36.74 | 38.34 | 36.22 | 35.74 | 32.58 | 32.37 |
| LTR/Gypsy | 31.95 | 28.19 | 28.56 | 28.29 | 28.90 | 32.60 | 28.88 | 27.66 | 26.89 | 25.01 |
| LTR/Lenti | 105.03 | 84.54 | 83.28 | 62.48 | 52.75 | 94.82 | 67.84 | 64.05 | 54.81 | 37.93 |
| LTR/Ngaro | 19.82 | 12.24 | 13.34 | 13.18 | 9.36 | 14.90 | 10.01 | 11.53 | 9.86 | 6.67 |
| LTR/Pao | 134.25 | 154.24 | 123.43 | 124.61 | 121.10 | 147.02 | 131.70 | 118.89 | 112.61 | 106.39 |
| Other/subtelome | 60.09 | 37.78 | 35.71 | 35.13 | 35.56 | 58.28 | 39.96 | 34.65 | 29.86 | 29.97 |
| RC/Helitron | 34.89 | 25.38 | 31.60 | 25.17 | 20.74 | 29.50 | 23.17 | 23.74 | 21.20 | 16.38 |
| DNA | 31.23 | 31.70 | 28.39 | 30.69 | 34.92 | 34.75 | 30.44 | 29.38 | 28.27 | 26.28 |
| RNA | 47.94 | 49.38 | 43.79 | 44.35 | 44.02 | 49.92 | 45.52 | 42.70 | 40.61 | 40.16 |
| RC | 34.89 | 25.38 | 31.60 | 25.17 | 20.74 | 29.50 | 23.17 | 23.74 | 21.20 | 16.38 |
| 总和 | 43.70 | 44.63 | 39.88 | 40.66 | 41.30 | 45.85 | 41.42 | 39.10 | 37.23 | 36.31 |

分别对绿叶中 194 个显著性差异表达转座子进行分析，在每个发育阶段高表达的转座子中既有 DNA 转座子也有 RNA 转座子(图 3A)。总的来看，G₅ 发育阶段较高表达量的转座子明显多于其他发育阶段，RNA 转座子明显多于 DNA 转座子。G₁ 发育阶段，有 29 个转座子较高表达，有 RNA 转座子 16 个，DNA 转座子 11 个以及 2 个 RC/Helitron 转座子。G₂ 发育阶段有 22 个 RNA 转座子、7 个 DNA 转座子和 1 个 RC/Helitron 转座子较高表达。G₃ 发育阶段有 10 个 RNA 转座子、8 个 DNA 转座子和 2 个 RC/Helitron 转座子较高表达，共 20 个。G₄ 发育阶段共有 17 个 RNA 转座子、2 个 DNA 转座子较高表达。G₅ 发育阶段有 71 个 RNA 转座子、24 个 DNA 转座子、1 个 RC/Helitron 转座子较高表达，共 96 个，占绿叶中显著性差异表达转座子总数的 49.48%。

分别对白叶中 181 个显著性差异表达转座子进行分析，A₁ 发育阶段高表达的转座子多于其他的发育阶段(图 3B)。A₁ 阶段有 75 个高表达转座子，占白叶中显著性差异表达转座子总数的 41.44%，其中 RNA 转座子有 42 个，DNA 转座子有 28 个，RC/Helitron 转座子有 5 个。A₂ 阶段只有 6 个高表达的转座子，RNA 转座子有 4 个，DNA 转座子有 2 个。A₃ 阶段高表达转座子有 14 个，RNA 转座子有 7 个，DNA 转座子有 4 个。A₄ 发育阶段有 32 个高表达转座子，24 个 RNA 转座子，DNA 转座子只有 6 个。A₅ 发育阶段有 53 个高表达转座子，无 RC/Helitron 转座子；RNA 转座子有 45 个，8 个 DNA 转座子。

绿叶和白叶的各对应的发育时期相比较，有 107 个转座子表达有显著性差异，依然是 RNA 转座子数量远多于 DNA 转座子。总体来说白叶中较高表达量的转座子数量多于绿叶。第 1 发育阶段白叶中较

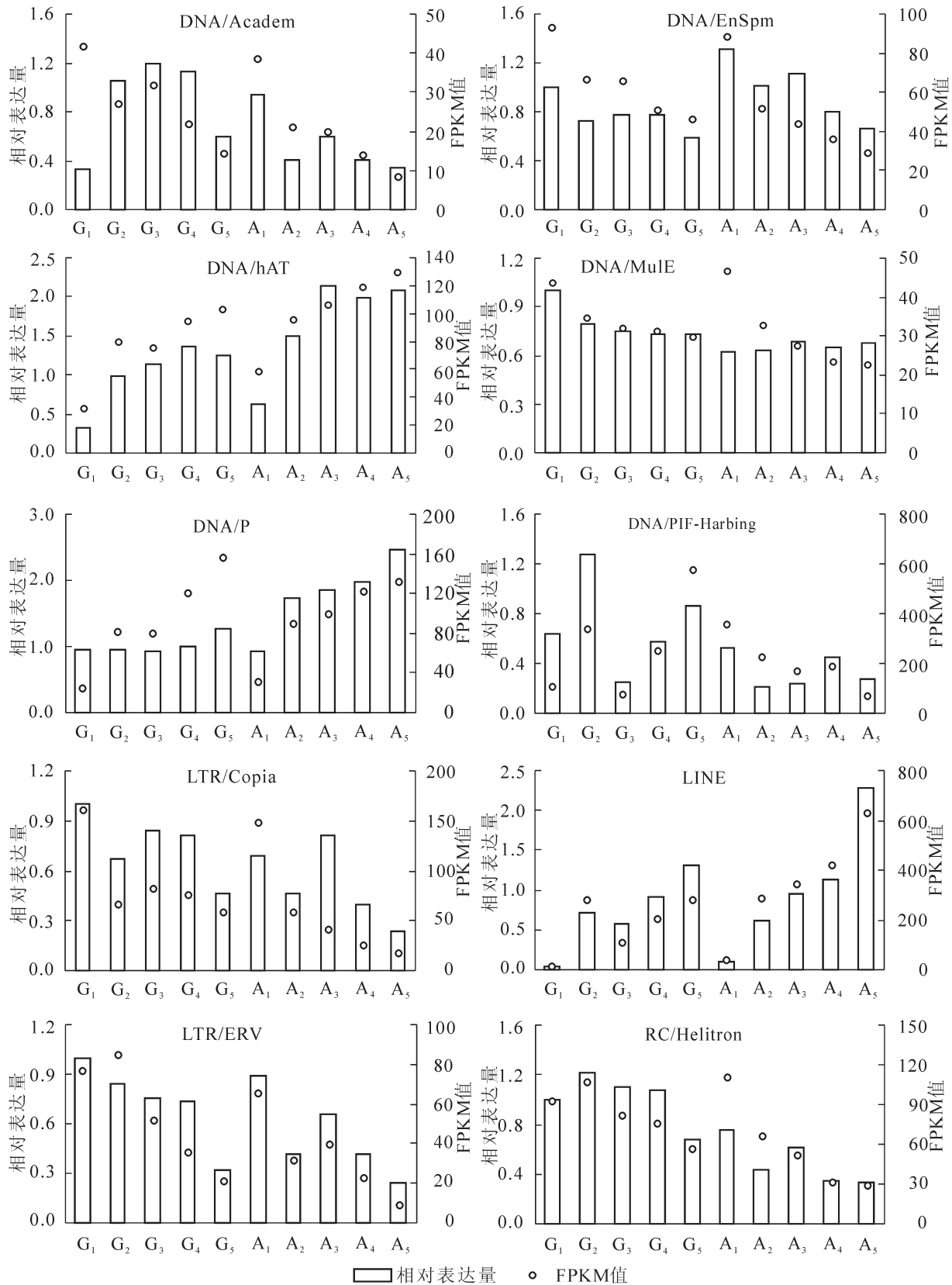


图2 转座子的相对表达量与其相对应的 FPKM 值

Figure 2 Relative expression level and FPKM value of transposons

高表达的转座子数量有 12 个，绿叶中仅有 6 个较高表达转座子；第 2 发育阶段白叶有 7 个较高表达的转座子，绿叶中有 6 个；第 3 发育阶段白叶中没有较高表达的转座子，而绿叶中只有 5 个；第 4 发育阶段白叶中有 13 个较高表达的转座子，绿叶中有 6 个；第 5 发育阶段，白叶中的较高表达的转座子数为

27 个，绿叶中有 25 个较高表达的转座子(图 3C)。

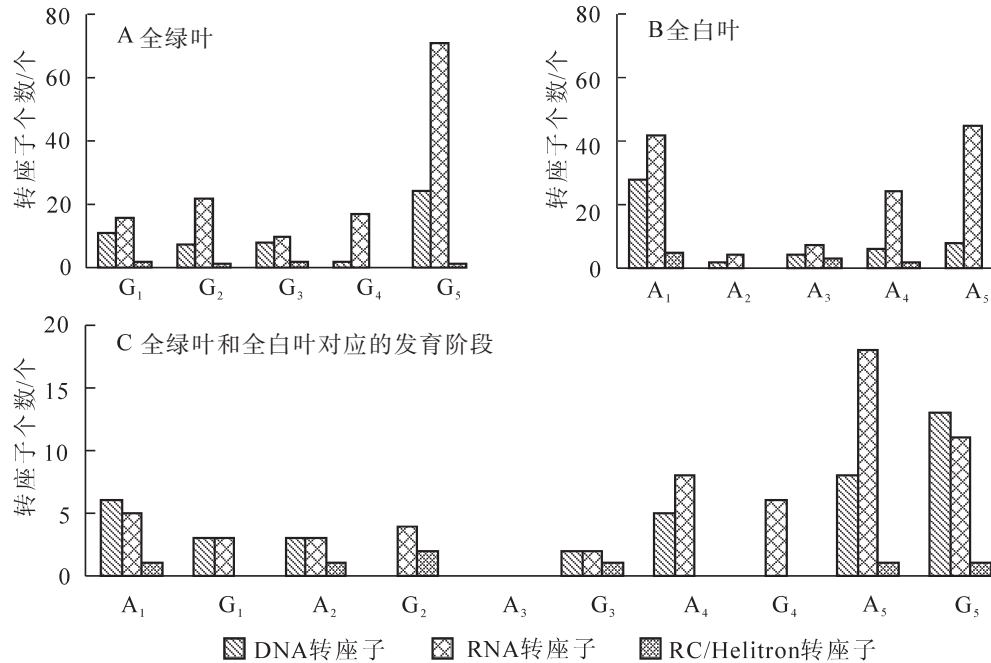


图 3 花叶矢竹不同发育阶段显著性差异表达转座子的类型和数量

Figure 3 Type and number of transposons with significant difference expression level among different development stages of leaves of *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji*

3 讨论

自美国细胞遗传学家 McClintock^[16]在研究玉米遗传的过程中发现转座子起，越来越多的转座子被发现和研究。转座子在宿主基因组跳跃，插入或脱离目的基因从而关闭或恢复基因的表达活性^[8-9]，可见转座子在调控基因表达方面发挥着很大作用。本研究对比花叶矢竹 10 个转录组数据，分析了花叶矢竹中 1 627 条共 22 类转座子序列。结果表明：花叶矢竹转录组中的转座子含量丰富，种类繁多，其中 RNA 转座子占 74.06%，DNA 转座子占 23.36%，Helitron 转座子只占 2.58%。RNA 转座子中数量最多的类型是转座子 LTR/Copia 占 25.38%，DNA 转座子中数量最多的类型是转座子 DNA/hAT。花叶矢竹转录组数据中 RNA 转座子的数量明显多于 DNA 转座子，并且转座子 LTR/Copia 明显多于其他类型的转座子。这与其他研究相似，即 RNA 转座子在生物中广泛存在^[17]，其中 LTR/Copia 型转座子在植物中分布最广^[18]。

基因的选择性表达贯穿于生物体整个生长发育阶段，既具有组织特异性也具有时间特异性^[19-21]。经荧光定量 PCR 验证，转座子在花叶矢竹中的表达也具有时间和空间的特异性(图 2)。本研究对花叶矢竹全绿叶和全白叶 5 个发育阶段之间显著性差异表达的转座子表达模式分析表明：无论在哪个发育阶段，RNA 转座子数量都多于 DNA 转座子，不同发育时期高表达的转座子类型基本上不同。绿叶中第 5 发育阶段有较高表达量的转座子明显多于其他发育阶段，说明叶片后期成熟期间有大量的转座子表达，这些高表达转座子可能参与了叶片成熟过程；而白叶中高表达量的转座子主要出现在第 1 发育阶段，这些在白叶第 1 发育阶段高表达的转座子可能参与了白叶早期发育过程^[10]。

通过对花叶矢竹全绿叶和全白叶相对应的 5 个发育阶段显著性差异表达的转座子表达模式分析，发现总体白叶中的高表达转座子数量高于绿叶中的转座子。在白叶中高表达的转座子可能参与了花叶矢竹叶色变异过程，也可能是逆境胁迫导致转座子转座激活。白叶缺乏叶绿素，无法进行正常的光合作用，再加上白叶的透光率较高，强光可能会导致白叶出现光损伤和光过度氧化，使白叶发育受到一定的胁迫^[22]，因此，这种胁迫可能导致白叶中大量转座子的转座激活。事实上，已有大量的研究表明，转座子在逆境胁迫下转座频率大大增加^[23-24]，如生活在黄河入海口的野大豆 *Glycine soja* 盐渍种群有多拷贝及

多样性的 Gypsy 类转座子^[25]。

4 参考文献

- [1] 杨海芸, 王晓芹, 张宁, 等. 日本花叶矢竹组织培养与叶色变异研究[J]. 竹子研究汇刊, 2010, **29**(4): 15 – 20.
YANG Haiyun, WANG Xiaoqin, ZHANG Ning, *et al.* Tissue culture and leaf color variation of *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji* [J]. *J Bamboo Res*, 2010, **29**(4): 15 – 20.
- [2] McCLINTOCK B. Chromosome organization and genic expression [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1951, **16** (2): 13 – 47.
- [3] McCLINTOCK B. The significance of responses of the genome to challenge [J]. *Science*, 1984, **226**(4676): 792 – 801.
- [4] 高东迎, 何冰, 孙立华. 水稻转座子研究进展[J]. 植物学通报, 2007, **24**(5): 667 – 676.
GAO Dongying, HE Bing, SUN Lihua. Research advances on transposable elements in rice [J]. *Chin Bull Bot*, 2007, **24**(5): 667 – 676.
- [5] 何承忠, 陈宝昆, 江涛, 等. 植物转座子的研究与应用[J]. 西南农业学报, 2004, **17**(3): 399 – 403.
HE Chengzhong, CHEN Baokun, JIANG Tao, *et al.* Application and research on transposons of plants [J]. *Southwest China J Agric Sci*, 2004, **17**(3): 399 – 403.
- [6] KAPITONOV V V, JURKA J. Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, **103** (12): 4540 – 4545.
- [7] 马焱. 桑树全基因组转座子的鉴定及特征分析[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
MA Bi. *Genome-wide Identification and Characterization of Transposable Elements in Mulberry (Morus notabilis)* [D]. Chongqing: Southwest University, 2014.
- [8] 李军, 李洪清, 吴萍, 等. 转座子在观赏植物嵌合花色形成中的应用[J]. 植物生理学通讯, 2005, **41**(4): 542 – 546.
LI Jun, LI Hongqing, WU Ping, *et al.* Application of transposons in making variegated flower color in ornamental plants [J]. *Plant Physiol Commun*, 2005, **41**(4): 542 – 546.
- [9] 刘晓红, 李叶峰, 彭丽媛, 等. 裂叶牵牛突变体的研究[J]. 安徽农业科学, 2011, **39**(28): 17214 – 17216.
LIU Xiaohong, LI Yefeng, PENG Liyuan, *et al.* Study on the mutants of *Pharbitis nil* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2011, **39** (28): 17214 – 17216.
- [10] 王婷婷, 翟立红, 苏旭, 等. Mutator 诱导的玉米白化突变体插入位点的遗传分析及代谢途径的构建[J]. 中国农业科学, 2010, **43**(22): 4571 – 4578.
WANG Tingting, ZHAI Lihong, SU Xu, *et al.* Genetic analysis and construction of metabolic pathway by mutator-mediated albino mutant insertion sites in *Zea mays* L. [J]. *Sci Agric Sin*, 2010, **43**(22): 4571 – 4578.
- [11] SLOTKIN R, FREELING M, LISCH D. Mu killer causes the heritable inactivation of the mutator family of transposable elements in *Zea mays* [J]. *Genetics*, 2003, **165**(2): 781 – 797.
- [12] TSUGANE K, MAEKAWA M, TAKAGI K, *et al.* An active DNA transposon nDart causing leaf variegation and mutable dwarfism and its related elements in rice [J]. *Plant J Cell Mol Boil*, 2006, **45**(1): 46 – 57.
- [13] MOMOSE M, NAKAYAMA M, ITOH Y, *et al.* An active hAT transposable element causing bud mutation of carnation by insertion into the flavonoid 3'-hydroxylase gene [J]. *Eur J Clin Invest*, 1974, **4**(4): 247 – 252.
- [14] 李美茹, 李洪清, 孙梓健, 等. 影响蓝色花着色的因素[J]. 植物生理学通讯, 2003, **39**(1): 51 – 55.
LI Meiru, LI Hongqing, SUN Zijian, *et al.* Factors of influencing blue flower color [J]. *Plant Physiol Commun*, 2003, **39**(1): 51 – 55.
- [15] 齐飞艳, 胡陶, 彭镇华, 等. 毛竹实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选及成花基因 *PheTFL1* 表达分析[J]. 西北植物学报, 2013, **33**(1): 48 – 52.
QI Feiyan, HU Tao, PENG Zhenhua, *et al.* Screening of reference genes used in qRT-PCR and expression analysis of *PheTFL1* gene in moso bamboo [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2013, **33**(1): 48 – 52.
- [16] McCLINTOCK B. The origin and behavior of mutable loci in maize [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 1950, **36**(6): 344 – 355.
- [17] WICKER T, SABOT F, HUA-VAN A, *et al.* A unified classification system for eukaryotic transposable elements[J]. *Nat Rev Genet*, 2007, **8**(12): 973 – 982.

- [18] 仲晓芳. 菰 (*Zizania latifolia*) Ty1/copia-like 反转座子反转座酶序列的克隆和分析[D]. 长春: 东北师范大学, 2005.
ZHONG Xiaofang. *Isolation and Characterization of Ty1/copia-like Retrotransposons of Wild Rice (Zizania latifolia)* [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2005.
- [19] 郭红媛, 贾举庆, 张莉, 等. 燕麦 EST 数据库中 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子的频数分析[J]. 中国农业大学学报, 2014, **19**(4): 23 – 30.
GUO Hongyuan, JIA Juqing, ZHANG Li, *et al.* Frequencies of Ty1-copia and Ty3-gypsy retroelements within the Avena EST database [J]. *J China Agric Univ*, 2014, **19**(4): 23 – 30.
- [20] HIROCHIKA H, SUGIMOTO K, OTSUKI Y, *et al.* Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 1996, **93**(15): 7783 – 7788.
- [21] HIROCHIKA H. Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture [J]. *Embo J*, 1993, **12**(6): 2521 – 2528.
- [22] 杨海芸. 花叶矢竹叶色变异机理研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2015.
YANG Haiyun. *Study on Mechanism of Leaf Color Variation of Pseudosasa japonica f. akebonosuji* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2015.
- [23] DOMINGUES D S, CRUZ G M, METCALFE C J, *et al.* Analysis of plant LTR-retrotransposons at the fine-scale family level reveals individual molecular patterns [J]. *BMC Gen*, 2012, **13**(4): 1 – 14.
- [24] GRANDBASTIEN M A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions [J]. *Trends Plant Sci*, 1998, **3**(5): 181 – 187.
- [25] 胡志昂, 姜国强, 邓馨, 等. 野大豆种群转座子和转录因子的多样性和分子适应[J]. 植物生态学报, 2007, **31**(5): 952 – 959.
HU Zhiang, JIANG Guoqiang, DENG Xin, *et al.* Molecular adaptation through diversity of retrotransposons and transcriptional factors in populations of wild soybean (*Glycine soja*) [J]. *J Plant Ecol*, 2007, **31**(5): 952 – 959.