

毛竹 *Phyllostachys edulis retrotransposon 7 (PHRE7)* 转座子的克隆与鉴定

蒋政勤¹, 周明兵^{1,2}, 郑浩¹, 季航¹, 徐芷馨¹

(1. 浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 浙江省竹资源与高效利用协同中心, 浙江 杭州 311300)

摘要: 长末端重复序列(LTR)反转录转座子广泛存在于植物基因组中, 本质是一段可移动的脱氧核糖核酸(DNA)序列。大多数 LTR 反转录转座子在外界环境变化下能够被激活转录, 对环境变化做出响应。为研究毛竹基因组中的 LTR 反转录转座子的转录活性及在非生物环境胁迫下表达量的具体变化, 克隆和鉴定了 1 个毛竹 *Phyllostachys edulis* 反转录转座子 *PHRE7*。该转座子全长为 6 073 bp, 属于 Ty1-copia 家族中的 Tork 分支, LTR 序列相似性为 96.7%, 插入时间为 126.923 万 a 前。对毛竹实生苗分别进行辐照(30, 50, 70 Gy), 甲基化抑制剂(50, 100, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 高温(42 $^{\circ}\text{C}$), 低温(4 $^{\circ}\text{C}$), 高盐(0.1, 0.2, 0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)等 5 种不同胁迫处理, 通过定量荧光聚合酶链式反应(PCR)检测, *PHRE7* 在 INT, RT 和 RH 等 3 个结构域中的表达量仅在辐照及 0.2~0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高盐处理下随处理强度的上升而下降, 其余所有处理(甲基化抑制剂、高温、低温、高盐 0.1~0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的表达量都随处理强度呈上升趋势。这些结果表明: *PHRE7* 转座子是一个具有转录活性的 LTR 反转录转座子, 且外界非生物环境胁迫对其表达模式有较大影响, 表明 *PHRE7* 转座子能够响应外界环境变化。图 7 表 2 参 42

关键词: 植物学; 毛竹; LTR 反转录转座子; 生物信息学; 逆境胁迫; 转录活性

中图分类号: S718.3; S795.72 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2019)05-0917-11

Cloning and characterization of a long terminal repeat retrotransposon (*Phyllostachys edulis retrotransposon 7*) in *Phyllostachys edulis*

JIANG Zhengqin¹, ZHOU Mingbing^{1,2}, ZHENG Hao¹, JI Hang¹, XU Zhixin¹

(1. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China;
2. Zhejiang Provincial Collaborative Innovation Center for Bamboo Resources and High-efficiency Utilization, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Long terminal repeats (LTR) retrotransposons, a type of mobile DNA sequence widely found in plant genomes, could be activated and transposed in response to changes in the environment. To study the transcriptional activity of LTR retrotransposons in the genome of *Phyllostachys edulis* and to determine the specific changes of their expression under abiotic stress, an LTR retrotransposon in *Phyllostachys edulis* (*PHRE 7*) was cloned and characterized. The total length of the transposon was 6 073 bp, belonging to the Tork branch in the Ty1-copia family. The homology of the LTR sequence was 96.7% with an insertion time of about 1.269 million years ago. The experiment had five different treatments including irradiation (30, 50, and 70 Gy), methylation inhibitor (50, 100, and 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), high temperature (42 $^{\circ}\text{C}$), low temperature (4 $^{\circ}\text{C}$) and salt stress (0.1, 0.2, and 0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on *Phyllostachys edulis* seedlings. Real-time fluorescence quantitative PCR was used for

收稿日期: 2018-10-10; 修回日期: 2018-11-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31870656, 31470615); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划资助项目(2018R412004)

作者简介: 蒋政勤, 从事毛竹转座子研究。E-mail: zhengqinjiang@163.com。通信作者: 周明兵, 教授, 博士, 从事毛竹分子生物研究。E-mail: zhoumingbing@zafu.edu.cn

the analysis of relative expression of transposon domains including RT (Reverse Transcriptase) protein domain, RH (Ribonuclease H) protein domain and INT (Integrase) protein domain in *PHRE7*. Results detected by real-time fluorescence quantitative PCR showed that under the conditions of low/high temperature, methylation inhibitors and the salt concentration ($0.1\text{--}0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), the expression level of three domains (INT, RT, RH) of *PHRE 7* were increased and the expression level under irradiation dose and the salt concentration ($0.2\text{--}0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were decreased. Thus, the *PHRE 7* transposon was a transcriptionally active LTR retrotransposon, and the abiotic environmental stress had a great influence on its expression pattern indicating that the *PHRE 7* transposon could respond to external environmental changes; however, the specific response mechanism, not yet being clear, means further research and analysis are still needed. [Ch, 7 fig. 2 tab. 42 ref.]

Key words: botany; *Phyllostachys edulis*; LTR retrotransposon; bioinformatics analysis; abiotic environmental stress; transcriptional activity

毛竹 *Phyllostachys edulis* 为禾本科 Gramineae 刚竹属 *Phyllostachys* 下的一个种, 在中国竹产业中有十分重要的地位。转座子是真核生物中一类重要的转座元件, 在毛竹基因组中有广泛分布。转座子又可称跳跃因子, 其实质是基因组染色体上能自主复制和位移的一段脱氧核糖核酸(DNA)序列, 可以直接从基因组内的一个位点移到另一个位点^[1], 其转座的发生会导致自身碱基位置的改变和(或)拷贝数的增加。转座子根据转座方式不同可分为 DNA 转座子(DNA transposon)和核糖核酸(RNA)反转录转座子(retrotransposon)。DNA 转座子是以 DNA 为中间媒介, 通过“剪切—粘贴”的方式移动, 最早在玉米 *Zea mays* 中发现^[2]。RNA 反转录转座子是以 RNA 为中间媒介, 依赖于反转录酶, 反转录成 DNA 后, 通过“复制—粘贴”的方式移动, 于 1984 年在玉米中首先被发现^[3]。RNA 反转录转座子又在酵母和动物基因组中被发现, 后被证实植物基因组中广泛存在^[4]。例如在小麦 *Triticum aestivum* 基因组中转座子高达 60%^[5], 玉米基因组中转座子比例高达 85%^[6]。RNA 反转录转座子根据其结构又可以分为长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)和非长末端重复序列(non-LTRs)^[7]。其中含有长末端重复序列的 LTR 反转录转座子是目前研究较多的一类反转录转座子, 几乎在所有高等植物基因组中都有分布^[8], 对植物基因组的结构、功能和进化有重要的作用。一个结构完整的 LTR 反转录转座子长度通常为 2~18 kb, 两端各有 1 个长度为 100~5 000 bp 序列同源的长末端重复序列 LTRs。LTR 末端为反向重复序列, 结构通常为 5'-TG-3'和 5'-CA-3', 在 5'和 3'末端两侧通常具有 4~6 bp 的末端靶位点重复序列(target site duplications, TSDs)^[9]。LTR 反转录转座子除两端的反向重复的长末端重复序列外, 其结构组成还包括引物结合位点(primer binding site, PBS), 多嘌呤序列(polypurine tract, PPT), 还有与转座机制有关的 GAG(gag protein)开放阅读框和 POL(polymerase)开放阅读框。目前, 已在多种植物中发现具有转录活性的 LTR 反转录转座子, 根据对活性的 LTR 转座子序列、进化关系和结构特征的分析, 发现活性 LTR 反转录转座子在结构上具有相似性^[10]: 均含有 2 个 LTR 区域、gag 基因区、pol 基因区(*pr*, *int*, *rt*, *rh*); LTR 区具有 1 个或多个顺式调控元件; 各个结构域均具有相应的关键保守氨基酸。根据转座子的长度、LTR 的长度和物种分布, 植物中的 Ty1/Copia 类转座子可分为 4 种类型, 分别为 Tork, Retrofit, Oryco 和 Sire; Ty3/Gypsy 类转座子可分为 6 种类型, 分别为 Tat, Athila, CRM, Reina, Del 和 Galadriel^[11]。LTR 反转录转座子是宿主染色体结构变异和基因组进化的重要调控因子^[12], 与植物性状稳定表达有关。在正常的生长环境条件下, 多数 LTR 反转录转座子不表达, 呈静止状态存在, 在受到逆境胁迫或 DNA 甲基化水平波动剧烈的情况下会被激活转座, 调节植物抗逆基因的表达, 从而发挥遗传可塑性来适应不同环境条件。例如, 云南地方水稻 *Oryza sativa* 品种‘月亮谷’‘Yuelianggu’(传统品种, Acuche)的幼苗在高盐处理后, 检测 3 个反转录转座子相关基因的表达水平, 发现在高盐胁迫下, 3 个基因都被诱导快速转录, 表达量均明显增加^[9]; 陆地棉 *Gossypium hirsutum* 品系‘棕彩选 1 号’‘Zongcaixuan No. 1’在低温胁迫下, 抵御低温起关键作用的 T10 和 T18 转座子在低温胁迫后均呈上调表达^[13], 禾本科单子叶植物高羊茅 *Festuca arundinacea* 在干旱胁迫下, 它们的甲基化程度增加, 干旱诱导 T10 和 T18 转座子甲基化。DNA 甲基化会抑制转座子的活性^[14]。所以当植物受到非生物环境胁迫时, 例如在高温、低温、高盐、辐照等逆境条件下, LTR 反转录转座子会被激活并插入到目的基因中进行转座, 影响周边基因的

表达模式和表达量^[15], 帮助植物适应不同的逆境胁迫。毛竹全基因组序列分析表明: LTR 反转录转座子在毛竹基因组含量最丰富, 占整个基因组的 37.3%(*Ty1-copia*, 12.3%; *Ty3-gypsy*, 24.6%)^[16]。为探究毛竹 LTR 反转录转座子在毛竹生长受到逆境胁迫时的响应模式, 本研究在毛竹基因组数据库中, 选取 1 条具有完整结构的 LTR 反转录转座子, 命名为 *PHRE7*, 对 *PHRE7* 转座子进行克隆与鉴定, 系统分析了 *PHRE7* 在胁迫下的表达模式。本研究结果将为系统阐明 LTR 反转录转座子非生物胁迫下的响应机制及揭示毛竹对环境适应的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

植物材料: 毛竹幼叶、竹笋、竹根取自浙江农林大学省部共建亚热带森林培育国家重点实验室的翠竹园, 样竹长势良好。毛竹实生苗均由同一株毛竹种子培育而来。毛竹种子均取自广西省灵川同一株开花毛竹, 为大小基本一致的饱满种子。

实验试剂: 用于提取 RNA 的 RNA Trizol 试剂, 克隆 *PHRE7* 反转录转座子的 pMD18-T 克隆载体, LA *Taq* 酶等聚合酶链式反应(PCR)试剂及 RNA 的反转录所需的 Prime Script™ RT Master Mix 和 SYBR® Premix Ex *Taq* II (Tli RNaseH Plus)。

1.2 实验材料处理

从同株毛竹上采集饱满且大小基本一致的优质种子, 分别进行辐照、甲基化抑制剂、高温、低温、高盐等 5 种不同的处理, 并留空白对照。

空白对照组种子处理: 先用无菌水清洗种子, 后用体积分数为 70%乙醇浸泡消毒 30 s, 再用无菌水冲洗 3 次, 然后在无菌水中浸泡 24 h 以恢复种子活力。取无菌培养皿, 放入无菌滤纸后用无菌水润湿, 再用镊子轻夹出毛竹种子, 置于滤纸上静待萌发。待长至 3~4 片叶后(2~3 周)将其转移至 *m*(珍珠岩):*m*(蛭石):*m*(泥炭土)=1:1:1 的基质中生长。

辐照处理: 挑选优质野生型毛竹种子 450 粒, 150 粒·组⁻¹, 分别接受 30, 50 和 70 Gy 等 3 个梯度的 ¹³⁷Cs- γ 射线辐照, 辐照地点为浙江省农业科学院作物与核技术利用研究所辐照中心, 做好不同梯度的标记, 后续与不做任何处理的空白对照组在相同条件下培育到长出 5 片叶^[17]。

甲基化抑制剂处理: 毛竹种子分别用 50.0, 150.0 和 250.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 5-氮杂胞苷浸种 24 h, 种子数量同辐照处理一致, 即每梯度 150 粒, 但在 5-氮杂胞苷处理前需用体积分数为 70%乙醇消毒 30 s, 无菌水冲洗 3 次进行消毒处理。随后与空白对照组在相同条件下培育。

高温和低温处理: 前面阶段与对照组的培育方法相同, 待毛竹实生苗长出 3~4 片叶后, 分别在培养箱进行高温 42 °C 处理 4 h 和低温 4 °C 处理 16 h, 每处理选取生长状况良好毛竹幼苗 10 株, 后续处理与空白对照组相同。

高盐处理: 前面阶段与对照组的培育方法相同, 待毛竹实生苗长出 3~4 片叶后, 分别用 0.1, 0.2 和 0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液 100 mL 浇灌 3 d^[18-19], 每处理选取生长状况良好毛竹幼苗 10 株, 后续处理与空白对照组相同。

采集空白对照组及 5 种胁迫处理下的毛竹实生苗的叶片, 每处理重复 3 株, 用液氮速冻, 于 -80 °C 保存备用。

1.3 方法

1.3.1 *PHRE7* 反转录转座子克隆 采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法从毛竹嫩叶中提取毛竹基因组 DNA^[20], 根据 *PHRE7* 的侧翼序列设计 1 对克隆引物(*PHRE7*-F 和 *PHRE7*-R, 具体序列见表 1)。以毛竹提取 DNA 作为克隆模板, 运用以上设计的克隆引物进行 PCR 扩增。具体扩增反应体系设计为: LA *Taq* 酶 0.5 μL , *PHRE7*-F 和 *PHRE7*-R 各 0.8 μL , 2 \times GC 缓冲液(buffer) 25.0 μL , 三磷酸碱基脱氧核苷酸混合液(dNTP mix) 4.0 μL , DNA 100 ng, 加无菌水补齐 50.0 μL 。具体反应条件设计为: 预变性 95 °C 5 min; 变性 94 °C 30 s, 退火 44 °C 30 s, 延伸 72 °C 5 min, 35 个循环; 终延伸 72 °C 10 min, 4 °C 保存。将 PCR 产物在质量分数为 1%琼脂糖电泳中分离, PCR 产物连接到 pMD20-T 克隆载体上, 胶回收目的片段并送生物公司测序。

1.3.2 *PHRE7* 反转录转座子编码域的相对表达量分析 分别提取毛竹未经处理叶片以及甲基化抑制剂、辐照、高温、低温、高盐等5种胁迫处理后实生苗叶片的RNA,在反转录酶的催化作用下反转录成cDNA模板,具体方法参照Trizol法^[21]。在RT,INT,RH序列3个可编码蛋白结构域内分别设计特异性引物(表1),对*PHRE7*的表达水平进行荧光定量PCR(qRT-PCR)分析,内参基因为毛竹*PheACT2*^[22]。荧光定量反应体系设计为10.0 μL:5.0 μL SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II,0.4 μL cDNA,0.2 μL 底物-5(primer-5),0.2 μL primer-3,4.2 μL 无菌水^[23]。反应条件如下:95 ℃ 7 min;预扩增95 ℃ 10 s,58 ℃ 10 s,72 ℃ 15 s,共30个循环。每个样品重复3次,按照 $2^{-\Delta\Delta}$ 的方法计算出不同胁迫处理条件下*PHRE7*的相对表达量。

1.3.3 *PHRE7* 反转录转座子结构和拷贝数分析 下载毛竹基因组数据,通过LTRharvest软件^[24](<http://www.zbh.uni-hamburg.de/forschung/genominformatik/software/ltrharvest.html>)对LTR转座子的长度、序列等进行分析,鉴定毛竹基因组LTR反转录转座子,再利用LTRdigestion软件^[25](<http://www.zbh.uni-hamburg.de/forschung/genominformatik/software/ltrdigest.html>),解析毛竹LTR反转录转座子结构并完成自动标注,通过cd-hit软件^[26]构建序列相似的非冗余基因集,分析各序列的相似程度,确定毛竹LTR反转录转座子的拷贝数。根据毛竹LTR反转录转座子拷贝以及转座子结构,选取1个结构完整的LTR反转录转座子作为研究对象,将其命名为*PHRE7*。*PHRE7*各个结构域由LTRdigestion软件鉴定,由编码区序列翻译的氨基酸序列提交到非冗余蛋白质数据库(NCBI),通过blastp进行比对确认,并由此建立*PHRE7*的结构图。

1.3.4 *PHRE7* 反转录转座子插入时间分析 将*PHRE7*的LTR序列输入MEGA7软件^[27],通过Muscle方法比对*PHRE7*转座子两端LTR序列的同源性,计算得分化度 k 。根据公式 $t=k/2r$ ^[28](t 为插入时间, r 为LTR序列的平均替换率, $1.3 \times 10^{-8} \text{ bp} \cdot \text{a}^{-1}$ ^[29]),计算得*PHRE7*插入时间。

1.3.5 *PHRE7* 反转录转座子LTR序列分析 通过克隆结果测序与该序列比对,确定序列完全一致性,明确开放性阅读框中的各蛋白编码区(PR,INT,RT,RH等)的位置。LTR反转录转座子的5'端LTR的U3区域都有丰富的顺式调控元件。为了分析鉴定转座子LTR区域中顺式调控元件的种类和分布情况,将LTR区域编码序列放入PlantCARE在线软件(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)^[30]中,直接分析得出该区域内的各个顺式作用元件并作出标记。

1.3.6 *PHRE7* 反转录转座子进化地位分析 利用Gypsy Database 2.0(http://www.gydb.org/index.php/Main_Page)查找并下载Ty1-copia家族其他成员(Oryco,Sire,Retrofit,Tork)的代表性反转录转座子RT氨基酸序列,与*PHRE7*转座子的RT氨基酸序列比对,利用MEGA7软件中的Muscle方法进行同源比对^[31],找出最佳模型,并通过该软件中的最大似然法(maximum likelihood,ML)构建进化树^[32],分析*PHRE7*所在的Ty1-copia家族亚家族位置。

2 结果与分析

2.1 *PHRE7* 的克隆

以毛竹DNA作为模板,通过PCR扩增*PHRE7*转座子,PCR扩增产物在质量分数为1%琼脂糖凝胶电泳后,割胶回收目的片段,送生物工程公司测序。电泳检测结果显示*PHRE7*转座子与预测的大小(6 073 bp)基本一致(图1)。

2.2 基因的序列分析

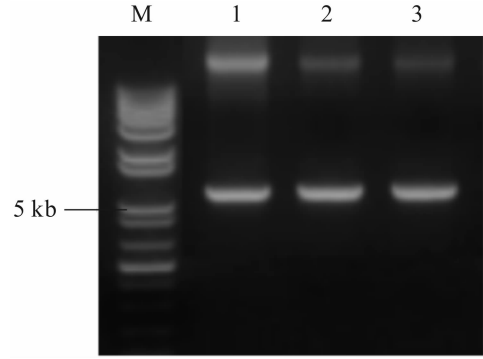
2.2.1 *PHRE7* 结构特征 *PHRE7*转座子全长为6 073 bp,测序结果与预测一致。*PHRE7*转座子组成为5'端和3'端的长末端重复序列和含5种酶的连续开放阅读框(ORF),结构顺序依次为5'-L-LTR-GAG-PR-INT-RT-RH-LTR-R-3'(图2)。各结构长度具体如下:左端LTR(L-LTR)长度为959 bp,右端LTR(LTR-

表1 引物序列

Table 1 Primers sequence	
引物名称	引物序列(5'→3')
<i>PHRE7</i> -F	GTTTGTCTTTTGTAGCACCTGGG
<i>PHRE7</i> -R	TAGCGCAGCCCTTAATAACCAT
<i>PheACT2</i> -1-F	GATCGAGCATGGTATTGTTAGCA
<i>PheACT2</i> -1-R	TTGTACGTCCACTGGCATAAGG
<i>PHRE7</i> -RT-F	GCGCACTTCTCTCCTCGTC
<i>PHRE7</i> -RT-R	GAACTCACC GCCGTTGTCC
<i>PHRE7</i> -RH-F	GACACGAGCAAGAGCACCA
<i>PHRE7</i> -RH-R	CCACAGAGCCTGAGTAGAAGC
<i>PHRE7</i> -INT-F	GGTGACCTCTGTGGCCCGTAA
<i>PHRE7</i> -INT-R	TCCGTGCGTAGGACCCGAAGC

R)为 3'端 LTR 的反向重复序列,长度也为 959 bp,相似性为 96.7%。计算得插入时间约为 126.92 万 a 前。开放阅读框核苷酸编码区总长度为 1 524 bp,共编码氨基酸 507 个,GAG 核心区位置在 1 030~1 744 bp,主要与反转录转座子 RNA 的成熟和包装有关;PR 核心区为是水解酶的编码区,位置在 1 978~2 224 bp,与反转录后多聚蛋白前体切割为功能性多肽有关;INT 核心区是整合酶的编码区,位置在 2 365~3 004 bp,用于催化反转录转座子插入宿主基因组的整个过程^[33];RT 核心区是反转录酶的编码区,位置在 3 580~4 312 bp,用于催化单链 RNA 或 DNA 合成 DNA 的过程,是转座子转座的必不可少的酶;RH 核心区位置在 4 624~5 020 bp,用于编码核糖核酸酶 H。核糖核酸酶 H 是水解酶的一种,负责原始 RNA 模板的水解。根据编码区结构顺序 GAG-PR-INT-RT-RH,可确定 *PHRE7* 反转录转座子是 Ty1-gypsy 家族成员。通过 cd-hit 软件^[26]对比毛竹基因组中的转座子,鉴定出 *PHRE7* 相似的序列,即其拷贝。结果显示:*PHRE7* 存在相似的其他 10 个拷贝,根据拷贝位置不同,分别把 10 个拷贝命名(表 2)为 *PHRE7-1*, *PHRE7-2*, *PHRE7-3*, *PHRE7-4*, *PHRE7-5*, *PHRE7-6*, *PHRE7-7*, *PHRE7-8*, *PHRE7-9* 和 *PHRE7-10*, 10 个拷贝的结构也相对完整(图 2)。

2.2.2 *PHRE7* 转座子 LTR 序列分析 在 LTR 序列中,顺式作用元件含量丰富。经分析得,核心启动元件有 TATA-box, CAAT-box, CCAAT-box, 其中 TATA-box 有 6 个, CAAT-box 有 21 个, CCAAT-box 有 2 个,除启动子元件外还有 2 个光响应元件(4cl-CMA2b 和 chs-CMA2b), 2 个与脱落酸相关的调控元件(ABRE), 3 个压力响应元件(SIRE), 1 个参与蛋白代谢调节的顺式作用元件(O2-site)(图 3)。对毛竹基



M: 标记; 1~3: 同一毛竹基因组扩增结果
图 1 全长 *PHRE7* 转座子 PCR 扩增电泳图

Figure 1 PCR result of full-length *PHRE7*

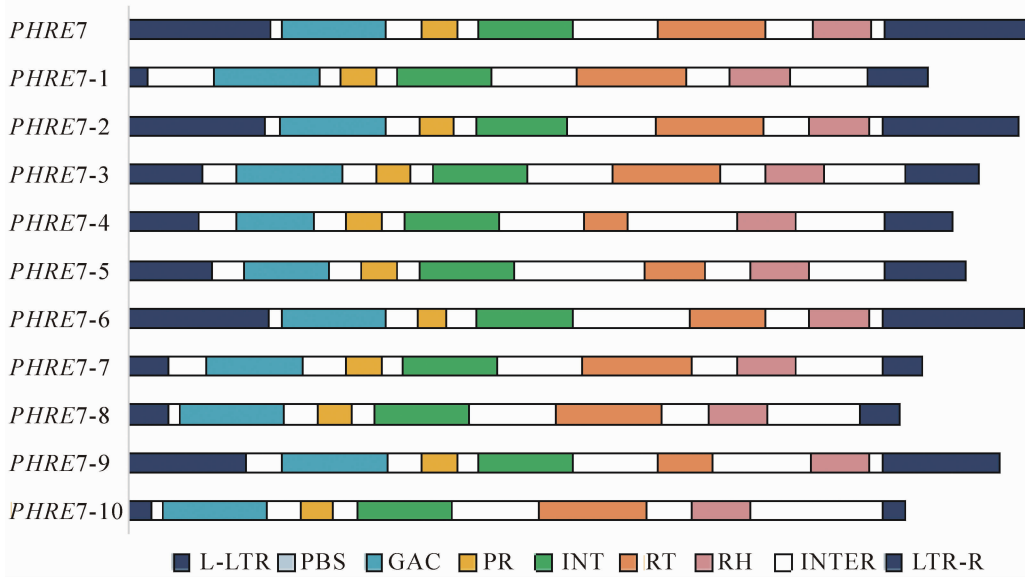


图 2 毛竹基因组中 *PHRE7* 及其 10 个拷贝的结构分析示意图

Figure 2 Structure of the *PHRE7* and its copies in *Phyllostachys edulis* genome

表 2 *PHRE7* 及其拷贝在毛竹基因组的命名及位置

Table 2 Names and locations of *PHRE7* and its copy in the *Phyllostachys edulis* genome

名称	序列位置	碱基位置	名称	序列位置	碱基位置
<i>PHRE7</i>	PH01000609	256 585~262 657	<i>PHRE7-6</i>	PH01001295	475 824~481 878
<i>PHRE7-1</i>	PH01000184	227~5 444	<i>PHRE7-7</i>	PH01001742	36 010~41 384
<i>PHRE7-2</i>	PH01000747	76 552~82 573	<i>PHRE7-8</i>	PH01003022	52 957~58 176
<i>PHRE7-3</i>	PH01000851	338 020~343 621	<i>PHRE7-9</i>	PH01004243	161 656~167 548
<i>PHRE7-4</i>	PH01000860	62 168~67 744	<i>PHRE7-10</i>	PH01009135	362 134~367 394
<i>PHRE7-5</i>	PH01001053	12 140~17 800			

因组中 LTR 反转录转座子 *PHRE7* 及其 10 个拷贝的插入时间进行分析, 结果显示: *PHRE7* 的插入时间为 126.92 万 a 前, *PHRE7-1* 拷贝插入时间为 223.08 万 a 前, *PHRE7-2* 拷贝插入时间为 150.00 万 a 前, *PHRE7-3* 插入时间为 142.31 万 a 前, *PHRE7-4* 插入时间为 261.54 万 a 前, *PHRE7-5* 插入时间为 126.92 万 a 前, *PHRE7-6* 插入时间为 403.85 万 a 前, *PHRE7-7* 插入时间为 442.31 万 a 前, *PHRE7-8* 插入时间为 238.46 万 a 前, *PHRE7-9* 插入时间为 219.23 万 a 前, *PHRE7-10* 插入时间为 307.69 万 a 前。经计算可知: 在这 11 个序列中, *PHRE7* 与 *PHRE7-5* 的插入时间相同, 为 126.92 万 a 前, 在 11 个序列中插入时间最晚, 说明 *PHRE7* 是其中结构完整且最为年轻的反转录转座子(图 4)。

2.2.3 *PHRE7* 转座子进化分析 为了探究 *PHRE7* 反转录转座子和植物中其他 LTR 反转录转座子的进化关系, 利用保守性最高 RT 区域编码序列构建了 *PHRE7* 和其他植物典型的反转录转座子系统进化树^[34]。根据进化树(图 5)可知: *PHRE7* 属于 Ty1-copia 家族中 4 个分支(Oryco, Sire, Retrofit, Tork)的 Tork 分支。

2.3 *PHRE7* 在不同处理中的表达模式分析

为分析 *PHRE7* 的组织表达模式, 在 *PHRE7* 转座子 6 个结构域中选择 INT, RT, RH 等 3 个结构域



图 3 *PHRE7* 反转录转座子 LTR 序列顺式元件分析

Figure 3 Analysis of the cis-regulatory motifs in *PHRE7*

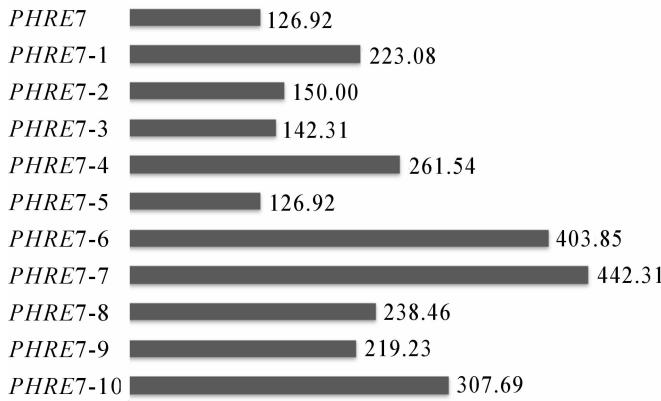


图 4 PHRE7 反转录转座子及各个拷贝的插入时间

Figure 4 Insertion time of PHRE7 and its copies

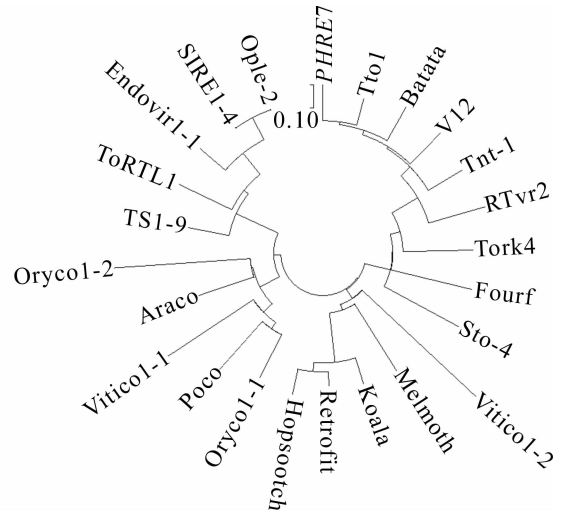


图 5 PHRE7 反转录转座子系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of PHRE7 and other plant retrotransposons

进行表达量分析。PHRE7 反转录转座子 RT, RH, INT 等 3 个结构域在毛竹竹根、竹叶、竹笋等 3 个不同部位中均有表达, 且在叶中相对表达量最大, 在竹笋和根相对表达丰度依次降低(图 6)。

PHRE7 3 个结构域(INT, RT, RH)在竹根、竹叶、竹笋不同部位的表达量上有差异, 竹叶中的表达量均为最高。为了探讨不同非生物环境胁迫条件对 PHRE7 反转录转座子表达的影响, 研究通过定量荧光 PCR 对经过不同处理(辐照、甲基化抑制剂、高/低温、高盐)的毛竹实生苗叶片中 PHRE7 转座子的 3 个结构域(INT, RT, RH)表达进行了定量检测和分析。

在 0.1, 0.2, 0.3 mol·L⁻¹ 高盐处理后, 高盐胁迫下 PHRE7 的 RT, RH 和 INT 等 3 个结构域表达量呈现先上升再下降的趋势, 在 0.1~0.2 mol·L⁻¹ 时呈上升趋势, 0.2 mol·L⁻¹ 左右各结构域达到表达量最高值, 0.2~0.3 mol·L⁻¹ 表达量逐渐下降。3 个结构域中 INT 结构域表达量变化幅度较大, RT 和 RH 结构域表达量相对较接近, 且变化幅度相对较小(图 7A)。

经 50.0, 100.0, 150.0 μmol·L⁻¹ 浓度甲基化抑制剂处理, 各结构域的相对表达量随甲基化抑制剂浓度的增大逐渐升高。50.0 μmol·L⁻¹ 处理组相对空白对照组表达量显著提升, 100.0 μmol·L⁻¹ 与 150.0 μmol·L⁻¹ 分别与前一甲基化抑制剂浓度处理组相比, 表达量也均有上升。3 个结构域中 INT 表达量最高, RT 结构域表达量升高幅度比 INT 小(图 7B)。

不同强度的辐照胁迫下, INT, RT, RH 等 3 个结构域表达量均高于对照组。在 30 Gy 辐照强度下, 各结构域表达量达最大值, 后随着辐照强度的增加, 各结构域表达量呈下降趋势。INT 结构域中 30 Gy 辐照处理后的表达量与 50 Gy 辐照处理后的表达量比值接近于 2, RH 和 RT 结构域在 50 Gy 或 70 Gy 辐照强度处理下表达量均相近, INT 结构域相对表达量与 RH 和 RT 结构域相比下降幅度最大(图 7C)。

4 °C 低温和 42 °C 高温胁迫处理后, PHRE7 反转录转座子的 INT, RT, RH 等 3 个结构域的表达量均有提高, 且高温处理对表达量影响更大, 上升更为显著, 表达量约为低温处理的 1.5 倍。RT 和 INT 结构域表达量上升幅度高于 RH(图 7D)。

3 讨论

PHRE7 是 1 条结构完整的反转录转座子, 按照结构域排列顺序鉴定属于 Ty1-copia 分支, 具备转座

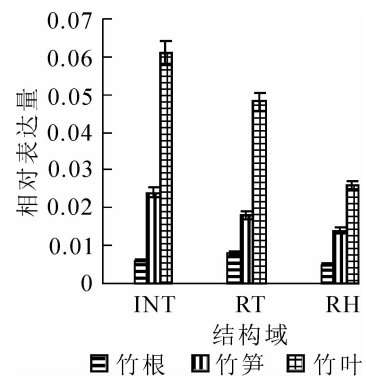


图 6 PHRE7 反转录转座子 INT, RT, RH 等 3 个结构域在毛竹竹笋、竹根、竹叶中的表达量

Figure 6 Expression levels of INT, RT and RH domains of PHRE7 in root, shoot and leaf of *Phyllostachys edulis*

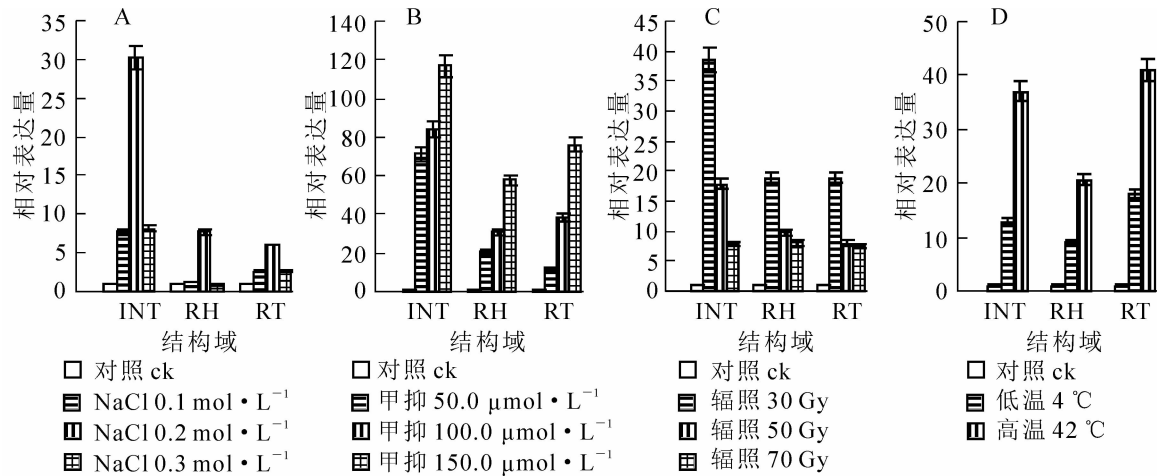


图7 不同处理条件下 *PHRE7* 反转录转座子 INT, RT, RH 等 3 个结构域的表达量

Figure 7 Expression levels of the INT, RT and RH domains of *PHRE7* under different treatments

所需的所有酶和相似度极高的长末端重复序列(96.7%)。*PHRE7* 的 LTR 中含有丰富的顺式作用元件, 在外界的非生物环境的胁迫下可能会诱导转座子激活进行转座。*PHRE7* 反转录转座子的插入时间为 126.92 万 a 前, 在植物基因中, 很多五六百万年前插入的转座子仍存在活性, 例如水稻愈伤组织中的 *Tos17* 反转录转座子插入时间约在 700 万 a 前, 现仍能够进行转座^[35]。相比而言 *PHRE7* 较为年轻, 故推测其是仍具有转录活性的反转录转座子。

PHRE7 反转录转座子各结构域完整, 该转座子其他拷贝存在不同结构域间的缺失。转座致使宿主基因组出现断裂和重排的现象, 还会影响宿主基因表达, 导致宿主基因组处于不稳定的状态。以上现象会激活宿主对 LTR 转座子活性抑制机制, 导致 LTR 转座子在进化发展过程中, 各结构域间出现基因片段丢失现象, 控制该转座子的自主转座。所以, *PHRE7* 反转录转座子及其 10 条拷贝可能是由共同祖先演化变异而来, 而 *PHRE7* 反转录转座子在宿主基因调节机制下依然保持其完整的结构。

PHRE7 在毛竹各部位的表达存在差异性。在毛竹竹笋、竹根和竹叶等 3 个不同部位表达量对比中, *PHRE7* 在竹叶中的表达量相对较高。有研究证明: 活性 LTR 反转录转座子在不同部位间的表达具有选择性和特异性, 可能与 LTR 反转录转座子长末端重复序列中的顺式作用元件和其他元件的存在有关, 各类元件与调控物质的作用不同, 对 LTR 转座子的表达量也存在一定影响。

毛竹实生苗在甲基化抑制剂、辐照、高盐、高温和低温等 5 个不同处理后, 3 个结构域表达量均比对照高, 表明 *PHRE7* 是 1 个具有转录活性的转座子, 转录活性受外界环境变化的影响。

LTR 反转录转座子的转座活性与其甲基化程度有较大程度的关联。通常情况下 DNA 甲基化可以作为基因沉默的一种表观遗传标记^[36]。在毛竹基因组中, 编码区占比较小, 非编码 DNA 序列^[37]大量存在。为保证基因表达的准确性, 植物体要尽可能减少非编码区基因对转录过程的干扰, 因此在正常条件下, 非编码区 DNA 较少或基本不表达。而在甲基化抑制剂作用下, 许多存在于非编码区的转座子会通过去甲基化作用解除限制使非编码 DNA 得以激活表达^[38], 因此发生甲基化抑制剂作用下各结构域表达量显著上调现象, 且甲基化抑制剂的浓度越高, 表达量越高, 呈正相关。

逆境胁迫致使毛竹体内的激素水平、离子水平和甲基化水平等都发生一定程度的变化, 从而影响转座子的转座活性^[39], 引起表达量的变化, 这也是 LTR 反转录转座子对逆境做出的一种适应^[40]。辐射能引起植物变异。本研究结果显示: 辐照条件下, *PHRE7* 转座子表达量比空白对照组要高, 但是随辐照强度的增强表达量发生下调, 其可能原因是高辐射对毛竹实生苗造成不可恢复的伤害, 致使毛竹的自身调节功能不足以抵御外界辐照的伤害, 各结构域表达量随辐照强度的增强而下降。

在高盐胁迫下, 植物体内含水量会下降, 水分过低会引起植物代谢和光合作用异常^[41]。*PHRE7* 的 LTR 序列中存在光响应元件(4cl-CMA2b 和 chs-CMA2b), 表明 *PHRE7* 转座子转录可能受光合作用调节。在高盐作用下, *PHRE7* 表达量随盐浓度的升高呈现先上升后下降趋势。其可能原因是盐浓度提升致使毛竹实生苗光合作用异常^[42], 转座子得以激活表达, *PHRE7* 结构域表达量升高。

PHRE7 在 4 °C 低温和 42 °C 高温处理下, 表达量较对照组均有上调, 且 42 °C 较 4 °C 更为显著。温度胁迫是植物中常发生的胁迫类型, 温度对催化各类植物生理活动的酶活性有显著影响, 但极端温度胁迫会造成基因组甲基化水平下降。在此效应下, *PHRE7* 结构域的表达量呈上调变化。

本研究对毛竹反转录转座子 *PHRE7* 的序列、结构以及在典型非生物环境胁迫下的表达量进行了系统的研究, 发现 *PHRE7* 的表达量会在环境影响下有所变化, 能对外界环境胁迫做出响应, 是具有转录活性的 LTR 反转录转座子, 但具体的响应机制尚未清楚, 仍需进一步的研究。

4 参考文献

- [1] MCCLINTOCK B. Chromosome organization and genic expression [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1951, **16**(2): 13 – 47.
- [2] 瞿绍洪, 张文俊, 景建康, 等. 玉米转座因子 *Ac* 在单倍体烟草中转座的研究[J]. *遗传学报*, 1998, **25**(2): 150 – 154.
QU Shaohong, ZHANG Wenjun, JING Jiankang, *et al.* Transposition behavior of the maize transposable element *Ac* in transgenic haploid tobacco [J]. *Acta Gen Sin*, 1998, **25**(2): 150 – 154.
- [3] 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.
- [4] 程旭东, 凌宏清. 植物基因组中的非 LTR 反转录转座子 SINEs 和 LINEs [J]. *遗传*, 2006, **28**(6): 731 – 736.
CHENG Xudong, LING Hongqing. Non-LTR retrotransposons: LINEs and SINEs in plant genome [J]. *Hereditas*, 2006, **28**(6): 731 – 736.
- [5] WICKER T, TAUDIEN S, HOUBEN A, *et al.* A whole-genome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley [J]. *Plant J*, 2009, **59**(5): 712 – 722.
- [6] SCHNABLE P S, WARE D, FULTON R S, *et al.* The B73 maize genome: complexity, diversity and dynamics [J]. *Science*, 2009, **326**(5956): 1112 – 1115.
- [7] 周敏, 汤定钦, 周明兵. 一个毛竹典型 LTR 转座子的克隆、鉴定及进化分析[J]. *竹子研究汇刊*, 2014, **33**(3): 1 – 10.
ZHOU Min, TANG Dingqin, ZHOU Mingbing. Cloning, characterization and phylogenetic analysis of a typical long terminal repeat retrotransposon in *Phyllostachys heterocycla cv. pubescens* [J]. *J Bamboo Res*, 2014, **33**(3): 1 – 10.
- [8] EICKBUSH T H, JAMBURUTHUGODA V K. The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases [J]. *Virus Res*, 2008, **134**(1/2): 221 – 234.
- [9] VITTE C, PANAUD O, QUESNEVILLE H. LTR retrotransposons in rice (*Oryza sativa* L.): recent burst amplifications followed by rapid DNA loss [J]. *BMC Genomics*, 2007, **8**(1): 218. doi: 10.1186/1471-2164/8/218.
- [10] 梁琳琳, 周明兵. 植物活性长末端重复序列反转录转座子研究进展[J]. *生物工程学报*, 2016, **32**(4): 409 – 429.
LIANG Linlin, ZHOU Mingbing. Plant active LTR retrotransposons: a review [J]. *Chin J Biotechnol*, 2016, **32**(4): 409 – 429.
- [11] LLORÉNS C, FUTAMI R, COVELLI L, *et al.* The Gypsy database (GyDB) of mobile genetic elements: release 2.0 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**(suppl 1): 70 – 74. doi: 10.1093/nar/gkq1061.
- [12] REY O, DANCHIN E, MIROUZE M, *et al.* Adaptation to global change: a transposable element-epigenetics perspective [J]. *Trends Ecol Evol*, 2016, **31**(7): 514 – 526.
- [13] 徐玲, 杨静, 刘林, 等. 3 个水稻逆转座子相关基因的逆境响应特征[J]. *植物病理学报*, 2014, **44**(2): 147 – 155.
XU Ling, YANG Jing, LIU Lin, *et al.* Stress responses of three retrotransposon-related genes in rice [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2014, **44**(2): 147 – 155.
- [14] 唐晓梅, 王艳, 马东伟, 等. 干旱胁迫下高羊茅基因组甲基化分析[J]. *草业学报*, 2015, **24**(4): 164 – 173.
TANG Xiaomei, WANG Yan, MA Dongwei, *et al.* Analysis of DNA methylation of tall fescue in response to drought

- based on methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J]. *Acta Pratac Sin*, 2015, **24**(4): 164 – 173.
- [15] DOMINGUES D S, CRUZ G M Q, METCALFE C J, *et al.* Analysis of plant LTR-retrotransposons at the fine-scale family level reveals individual molecular patterns [J]. *BMC Genomics*, 2012, **13**(1): 137. doi: 10.1186/1471-2164-13-137.
- [16] PENG Zhenhua, LU Ying, LI Lubin, *et al.* The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nat Genet*, 2013, **45**(4): 456 – 461.
- [17] 李聪. 冷胁迫下铁皮石斛转录组及 Ty1-copia 类反转录转座子表达分析[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2014.
LI Cong. *Transcriptome of Dendrobium officinale under Cold Stress and Isolation and Expression Analysis of Ty1-copia Group Retrotransposons* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2014.
- [18] 王丽丽, 赵韩生, 孙化雨, 等. 毛竹 miR397 和 miR1432 的克隆及其逆境胁迫响应表达分析[J]. 林业科学, 2015, **51**(6): 63 – 70.
WANG Lili, ZHAO Hansheng, SUN Huayu, *et al.* Cloning and expression analysis of miR397 and miR1432 in *Phyllostachys edulis* under stresses [J]. *Sci Sil Sin*, 2015, **51**(6): 63 – 70.
- [19] 何奇江, 李楠, 周文伟, 等. 盐胁迫对雷竹叶叶绿素含量的影响[J]. 竹子研究汇刊, 2014, **33**(2): 58 – 62.
HE Qijiang, LI Nan, ZHOU Wenwei, *et al.* The response of chlorophyll content of *Phyllostachys violascens* to NaCl stress [J]. *J Bamboo Res*, 2014, **33**(2): 58 – 62.
- [20] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucl Acids Res*, 1980, **8**(19): 4321 – 4325.
- [21] 孙德权, 郭启高, 胡玉林, 等. 改良 Trizol 法提取香蕉叶片总 RNA[J]. 广东农业科学, 2009(5): 162 – 164.
SUN Dequan, GUO Qigao, HU Yulin, *et al.* Extraction of total RNA from banana with improved Trizol method [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2009(5): 162 – 164.
- [22] 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 in qRT-PCR and expression analysis of *PheTFL1* gene in moso bamboo [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2013, **33**(1): 48 – 52.
- [23] PFAFFL M W, LANGE I G, MEYER H H D. The gastrointestinal tract as target of steroid hormone action: quantification of steroid receptor mRNA expression (AR, ER α , ER β and PR) in 10 bovine gastrointestinal tract compartments by kinetic RT-PCR [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, **84**(2): 159 – 166.
- [24] ELLINGHAUS D, KURTZ S, WILLHOEFT U. *LTRharvest*, an efficient and flexible software for *de novo* detection of LTR retrotransposons [J]. *BMC Bioinform*, 2008, **9**(1): 18. doi: 10.1186/1471-2105-9-18.
- [25] STEINBISS S, WILLHOEFT U, GREMME G, *et al.* Fine-grained annotation and classification of *de novo* predicted LTR retrotransposons [J]. *Nucl Acids Res*, 2009, **37**(21): 7002 – 7013.
- [26] LI Weizhong, GODZIK A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences [J]. *Bioinformatics*, 2006, **22**(13): 1658 – 1659.
- [27] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, **33**(7): 1870 – 1874.
- [28] FESCHOTTE C, JIANG Ning, WESSLER S R. Plant transposable elements: where genetics meets genomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, **3**(5): 329 – 341.
- [29] MA Jianxin, JACKSON S A. Retrotransposon accumulation and satellite amplification mediated by segmental duplication facilitate centromere expansion in rice [J]. *Genome Res*, 2006, **16**(2): 251 – 259.
- [30] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, *et al.* PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences [J]. *Nucl Acids Res*, 2002, **30**(1): 325 – 327.
- [31] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, **28**(10): 2731 – 2739.
- [32] 虞洪杰. 植物 LTR 反转录转座子的预测和注释及邻聚法构建系统进化树研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
YU Hongjie. *Prediction and Annotation of LTR Retrotransposons in Plant and a New Method to Construct Phylogenetic Trees* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011.
- [33] 闫红飞. 小麦抗叶锈基因 *Lr38*, *Lr45* 分子标记及抗病相关分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.

- YAN Hongfei. *Molecular Markers for Lr38, Lr45 and Their Resistance-related Analysis Against Wheat Leaf Rust* [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2009.
- [34] 宋程威, 郭大龙, 张曦, 等. 牡丹 LINE 类反转录转座子 RT 序列的克隆及分析[J]. 园艺学报, 2014, **41**(1): 157 – 164.
- SONG Chengwei, GUO Dalong, ZHANG Xi, *et al.* Cloning and analysis of reverse transcriptase of LINE-retrotransposons of tree peony (*Paeonia*) [J]. *Acta Horti Sin.*, 2014, **41**(1): 157 – 164.
- [35] RICO-CABANAS L, MARTÍNEZ-IZQUIERDO J A. CIRE1, a novel transcriptionally active *Ty1-copia* retrotransposon from *Citrus sinensis* [J]. *Mol Genet Genom*, 2007, **277**(4): 365 – 377.
- [36] 刘秋香. DNA 甲基化酶抑制剂 5-Aza-2'-deoxycytidine 处理后水稻的 DNA 甲基化研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- LIU Qiuxiang. *DNA Methylation Research of Oryza sativa (Nipponbare) after Treated with 5-Aza-2'-deoxycytidine* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [37] 陈建军, 王瑛. 植物基因组大小进化的研究进展[J]. 遗传, 2009, **31**(5): 464 – 470.
- CHEN Jianjun, WANG Ying. Recent progress in plant genome size evolution [J]. *Hereditas*, 2009, **31**(5): 464 – 470.
- [38] MIURA Y, CHIBA T, TOMITA I, *et al.* Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice [J]. *J Nutr*, 2001, **131**(1): 27 – 32.
- [39] BEGUIRISTAIN T, GRANDBASTIEN M A, PUIGDOMÈNECH P, *et al.* Three Tnt1 subfamilies show different stress-associated patterns of expression in tobacco. Consequences for retrotransposon control and evolution in plants [J]. *Plant Physiol*, 2001, **127**(1): 212 – 221.
- [40] LISCH D. How important are transposons for plant evolution? [J]. *Nat Rev Genet*, 2013, **14**(1): 49 – 61.
- [41] 应叶青, 郭璟, 魏建芬, 等. 水分胁迫下毛竹幼苗光合及叶绿素荧光特性的响应[J]. 北京林业大学学报, 2009, **31**(6): 128 – 133.
- YING Yeqing, GUO Jing, WEI Jianfen, *et al.* Photosynthetic and chlorophyll fluorescent responses of *Phyllostachys pubescens* seedlings to water deficiency stress [J]. *J Beijing For Univ*, 2009, **31**(6): 128 – 133.
- [42] 孟昱. 盐胁迫对毛竹实生苗叶片电阻抗参数及叶绿素荧光特性的影响[D]. 保定: 河北农业大学, 2010.
- MENG Yu. *Effects of NaCl Stress on Electrical Impedance Spectroscopy Parameters and Chlorophyll Fluorescence Characteristics of Moso Bamboo(Phyllostachys edulis) Seedling Leaves* [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2010.