

非生物胁迫对毛竹转座子衍生 TUCP 转录活性的影响

朱佰良, 丁一倩, 周明兵

(浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室/竹子研究院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】转座子 (TE) 是真核细胞基因组的重要组成部分, 其在毛竹 *Phyllostachys edulis* 基因组超过 63% 时, 易受胁迫诱导激活。分析非生物胁迫下, 来源于转座子的不确定编码潜力转录本 (TUCP) 的表达模式, 为转座子参与毛竹抗逆分子机制提供参考。【方法】采用生物信息学技术和手段, 在低温、高温、高盐、紫外照射等 4 种胁迫处理下, 研究毛竹 TE-TUCPs 及转座子邻近基因的转录特性和转录模式。通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证转录组来源的 TE-TUCPs 差异表达数据的可靠性。【结果】在毛竹 4 个胁迫处理转录本中, 共鉴定出 57 627 个 TE-TUCPs。TE-TUCPs 应对不同非生物胁迫表现出特异性表达模式。高温、高盐、紫外照射处理可以促进具有转录活性的 TE-TUCPs 附近基因差异表达, 但是低温会抑制具有转录活性的 TE-TUCPs 附近基因差异表达。【结论】TE-TUCPs 主要来源于 Ty1/*Copia* 和 Ty3/*Gypsy* 超家族。基因的表达潜能与近距离的 TE-TUCPs 表达潜能互相抑制。TE-TUCPs 转录情况会受到非生物胁迫作用来调控附近基因的表达以适应胁迫影响。图 7 表 2 参 44

关键词: 毛竹; 转座子 (TE); 不确定编码潜力转录本 (TUCP); 非生物胁迫

中图分类号: S718.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2024)00-0001-10

Effects of abiotic stress treatments on the transcriptional activity of transposable element-derived TUCP in *Phyllostachys edulis*

ZHU Bailiang, DING Yiqian, ZHOU Mingbing

(State Key Laboratory of Subtropical Silviculture/Bamboo Industry Institute, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] Transposable elements (TE), an essential component of eukaryotic genomes are prone to activation under stress when they account for over 63% of the *Phyllostachys edulis* genome. This study, with an analysis of the expression patterns of transcripts of uncertain coding potential (TUCP) from transposable elements under abiotic stress, is aimed to provide insights into the molecular mechanisms of TEs in stress resistance in *Ph. edulis*. [Method] First, bioinformatics techniques were employed to investigate the transcriptional characteristics and patterns of TE-TUCPs, and neighboring genes in *Ph. edulis* under 4 stress treatments: low temperature, high temperature, high salinity, and UV irradiation. Then the reliability of the differentially expressed TE-TUCPs, data derived from the transcriptome was validated using RT-qPCR. [Result] A total of 57 627 TE-TUCPs were identified from the transcripts of *Ph. edulis* under 4 stress treatments. These TE-TUCPs exhibited specific expression patterns in response to different abiotic stresses. High temperature, high salinity, and UV irradiation promoted differential expression of genes neighboring TE-TUCPs with transcriptional activity, whereas low temperature suppressed such differential expression.

收稿日期: 2024-03-01; 修回日期: 2024-05-10

基金项目: 浙江省自然科学基金重点资助项目 (LZ24C160002)

作者简介: 朱佰良 (ORCID: 0009-0005-1359-9782), 从事毛竹生长发育研究。E-mail: zhubailiang@stu.zafu.edu.cn.

通信作者: 周明兵 (ORCID: 0000-0001-5674-4410), 教授, 博士, 从事毛竹生长发育研究。E-mail: zhoumingbing@zafu.edu.cn

[**Conclusion**] TE-TUCPs were primarily derived from the Ty1/*Copia* and Ty3/*Gypsy* superfamilies. The expression potential of genes and that of nearby TE-TUCPs were mutually inhibitory and the transcription of TE-TUCPs was regulated by abiotic stress to modulate the expression of neighboring genes in response to stress. [Ch, 7 fig. 2 tab. 44 ref.]

Key words: *Phyllostachys edulis*; transposable elements (TE); transcripts of uncertain coding potential (TUCP); abiotic stresses

毛竹 *Phyllostachys edulis* 是中国亚热带地区分布最广泛的竹种, 约占中国竹林种植面积的 73.76%, 具有极高的生态价值和经济价值。但在非生物胁迫下, 毛竹林的种植面积显著减少^[1]。毛竹在生长发育过程中经历多种胁迫后会引发一系列生理生化变化, 最终影响毛竹的正常生长^[2]。

毛竹基因组由超过 63.24% 的转座子 (TE) 组成^[3]。TE 可以通过 2 种主要机制在基因组内移动: 复制-粘贴和剪切-粘贴。反转录转座子 (I 类) 通过 RNA 中间体利用复制-粘贴机制, 而 DNA 转座子 (II 类) 直接作为 DNA 片段利用剪切-粘贴或复制-粘贴机制在基因组内移动^[4-5]。TE 是真核生物基因组的动态组成部分, 可以被激活或沉默。TE 受表观遗传变化的影响较大^[6-7], 可以通过塑造表观基因组促进植物对非生物胁迫的适应性反应。对水稻 *Oryza sativa* 研究表明: 高盐和低温胁迫可诱导基因转录起始位点 100 bp 内插入 TE^[8]。转座子受逆境胁迫更容易发生转录^[9]。大麦 *Hordeum vulgare* 基因组中的 BARE-1 反转录转座子具有转录活性, 拷贝数与基因组大小、温度、水分、土壤类型、海拔等呈正相关^[10]。

不确定编码潜力转录本 (TUCP)^[11] 是一类具有明显组织特异性, 与基因间长链非编码 RNA 表达模式相似, 但序列保守性明显更高的一种转录本^[12]。TUCP 可以作为非编码调节因子, 翻译成小肽或在转录调节、细胞分化等多种生物活动中发挥作用^[13]。越来越多的真核生物基因组 TUCP 被高通量测序鉴定出来, 如棉花 *Gossypium* spp.^[14]、人类 *Homo sapiens*^[15]、罗非鱼 *Oreochromis mossambicus*^[16]、山羊 *Capra hircus*^[17] 和杜仲 *Eucommia ulmoides*^[18] 等。在拟南芥 *Arabidopsis thaliana*、水稻和玉米 *Zea mays* 中, TE 衍生的 TUCP 参与低温和盐的胁迫反应, 并影响种子发芽和幼苗绿化率^[19]。棉花中 TUCP 参与光合作用并影响生长发育过程^[14]。高温胁迫影响 TUCP 转录从而使红枣 *Ziziphus jujuba* 基因表达产生了整体性改变^[20]。

目前, 对毛竹转座子衍生 TUCP (TE-TUCP) 表达的综合分析尚未见报道。鉴于此, 本研究调查非生物胁迫下毛竹幼苗 TE-TUCP 活性的变化及附近基因的差异表达情况, 以期对转座子参与毛竹抗逆分子机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

采用单株母竹的毛竹种子进行水培育苗, 每盆 1 株毛竹幼苗, 每组 3 盆, 培养至毛竹幼苗五叶一心期。处理过程如下: 首先, 在 25 °C 暗培养箱中培养幼苗 3 d, 以避免可见光下紫外线的影响。接着, 对第 1 组幼苗进行冷胁迫处理 (C4), 即在 4 °C 下处理 16 h; 对第 2 组幼苗进行热应激处理 (H42), 即在 42 °C 下处理 4 h; 对第 3 组幼苗进行紫外线胁迫处理 (UV), 在 30 W 紫外线下处理 2 h; 第 4 组幼苗未经以上任何胁迫处理, 作为对照组 (ck); 对第 5 组幼苗进行盐胁迫处理 (Sa), 水培培养基中配置浓度为 200 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液培育幼苗 3 d; 对第 6 组幼苗多次浇水, 保持与第 5 组等体积的水培培养基, 培育幼苗 3 d, 作为盐胁迫处理的对照组 (wa)。所有样品均在当天 10:00 采集后在液氮中冷冻保存。

1.2 RNA-Seq 测序和基因表达水平分析

利用 DING 等^[21] 对毛竹幼苗 4 个胁迫处理 (低温、高温、高盐、紫外照射) 的全转录组数据 (登录号: PRJNA826540), 分析和鉴定基因表达水平。

用 Trimmomatic^[22] 软件进行质量控制; 使用 Hisat 2^[23] 软件将质控后获得的干净数据 (clean reads) 与毛竹参考基因组^[3] 进行序列比对获得 bam 类型文件; 利用 featureCounts 软件^[24] 计数, 得到每个基因在各个样本中的原始计数 (raw counts, R_C)。将原始计数导入 R 中, 利用 DESeq 2^[25] 进行差异表达分析。

在读取计数值后，对表达值进行归一化，并计算差异倍数 (F_C)。根据 $\log_2|F_C| > 0$ 和 $P < 0.05$ 选择差异表达基因。

1.3 TUCP 转录本的筛选

利用相同的全转录组测序数据，分析和鉴定 TUCP 表达水平。具体步骤如下：①数据预处理。首先使用 Cuffmerge 软件^[26]，对各样品拼接得到的转录本进行合并，去掉其中链方向不确定的转录本，得到本次测序完整的转录组信息。之后，对合并的转录本集合进行 TE-TUCP 的筛选。②转录本外显子 (exon) 个数筛选。过滤转录本拼接结果中大量低表达量、低可信度的单外显子转录本，选择 exon ≥ 2 个的转录本。③转录本长度筛选。选择长度 > 200 bp 的转录本。④mRNA 剔除。通过 Cuffcompare 软件，筛除具有编码能力的 mRNA，将余下的拼接转录本中，与毛竹基因组编码基因 exon 区域有重叠的转录本作为后续分析的 RNA。⑤转录本表达量筛选。通过 Cuffquant 计算每条转录本的表达量，选择 $R_C \geq 1$ 的转录本。⑥针对拼接得到的转录本，剔除 mRNA 转录本后，综合 CNCI^[27]、PFAM^[28]、CPC2^[29] 等编码潜能分析方法，进行 RNA 编码能力分析，将 3 个软件均表明无编码能力的转录本定义为 lncRNA (long non-coding RNA)；其余有部分编码能力，且至少包含 1 个开放阅读框 (ORF) 且非 lncRNA 转录本的即为 TUCP。

1.4 转座子的鉴定

利用 ZHOU 等^[30] 鉴定的毛竹基因组转座子，使用 RepeatMasker^[31] 鉴定毛竹参考基因组^[3] 中的转座子，分析已鉴定的转座子在毛竹基因组中的分布和含量。

1.5 TE-TUCP 的鉴定

使用 bedtools (<https://github.com/arq5x/bedtools2>)^[32] 分析 TE 和 TUCP 关系，以确定 TE 是否与 TUCP 重叠。与 TE 序列重叠超过 60% 的 TUCP 被鉴定为 TE 衍生的，简称为 TE-TUCP。为了评估 TE-TUCP 的表达模式，使用 StringTie^[33] 的合并函数组装 TE 转录本，合并至少 1 bp 的重叠区域，直到没有交集。随后，使用 Gffcompare 评估组装 TE 转录本的质量^[34]，最后估计 TE-TUCP 的表达丰度。将组装后的数据利用 featureCounts 软件对 bam 类型的输入文件进行计数，得到表达矩阵。使用 tximport R 包^[35] 将 featureCounts 输出的表达矩阵转换为 DESeq2 所需的格式。然后使用 DESeq2^[25] 识别差异表达的 TE-TUCP。 $P < 0.05$ 且 $\log_2|F_C| > 0$ 为显著差异表达的 TE-TUCP。将能转录出至少 1 个 TE-TUCP 的转座子定义为 TUCP-TE；否则，定义为 nonTUCP-TE。

1.6 差异表达基因 (DGEs) 的富集分析

使用 perl 脚本 check_GCbG_PlusForTE.pl 程序分别筛选 TUCP-TE 和 nonTUCP-TE 附近 5 000 bp 差异表达基因。使用 OmicShare (<https://www.omicshare.com/tools/>) 上的 Gogsea 对差异表达基因进行基因本体 (GO) 富集分析。组间样本基因表达差异筛选标准为： $\log_2|F_C| > 0$ 且 $P < 0.05$ 。保留前 30 条 GO 条目，通过矩阵点图显示结果。

1.7 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证候选基因

为了验证转录组测序结果的准确性，使用天根生化科技有限公司的 RNA 提取试剂盒 (DP441) 提取总 RNA。利用 TaKaRa Bio 公司的反转录试剂盒 (RR047A) 合成 cDNA，用 RT-qPCR 检测相对转录水平。从鉴定的差异表达 TE-TUCP 中随机挑选 4 个 TE-TUCP 及其附近基因，利用 PrimerPremier 6 设计 RT-qPCR 引物，使用翌圣生物科技股份有限公司的 Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (No Rox) (11201ES) 进行 RT-qPCR 试验，反应体系和程序参照试剂说明书，以毛竹肌动蛋白 (*Actin*) 作为内参基因。每个 RT-qPCR 设置 3 个生物重复和 3 个技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对基因表达水平^[36]。使用 Graphpad 可视化绘图。

2 结果与分析

2.1 毛竹 TUCP 的筛选

毛竹幼苗全转录组测序数据共获得 1 749 524 个转录本。在这些转录本的基础上使用 Cuffmerge 进行数据预处理，保留 1 008 312 个转录本。通过表达量筛选，获得 567 404 个表达量至少为 1 的转录本。

如图 1 所示：CPC2 预测出 6 434 个 TUCP，CNCI 预测出 73 035 个 TUCP，PFAM 预测出

26 040 个 TUCP, 共预测出 87 409 个 TUCP。对 TUCP 的结构分析表明: TUCP 的平均长度为 759.73 bp, 比 mRNA 的平均长度短, 但比 lncRNA 的平均长度 (241.02 bp) 长。

2.2 TE 和 TE-TUCP 的鉴定

通过 RepeatMasker 对毛竹参考基因组注释, 共得到 991 865 条转座子。根据上述鉴定的 87 409 个 TUCP 在基因组的位置和转座子在基因组的位置, 共有 57 627 个 TUCP 与 TE 序列重叠超过 60%, 命名为 TE-TUCP。其中来源反转录转座子 (RE) 的 TE-TUCP 非常丰富, 占 73.60%。

如表 1 所示: 鉴定的转座子中, TE-TUCP 中有 17 265 个来源于 LTR/Copia 超家族, 23 980 个来源于 LTR/Gypsy 超家族。LTR/Copia 和 LTR/Gypsy 来源的 TUCP 数量占有所有 TE-TUCP 的 71.57%, 说明 LTR-TE-TUCP 含量丰富, 可能与 LTR/Copia 和 LTR/Gypsy 在毛竹基因组含量丰富 (54.97%)^[37] 有关。DNA-TE-TUCP 占有所有转座子来源的 TUCP 的 20.75%。其中 DNA/CMC-EnSpm 类型转座子 (66.39%) 和 DNA/MULE-MuDR 类型转座子 (55.56%) 在 TUCP-TE 中增加, 可能是非生物胁迫导致。

2.3 不同非生物胁迫下 TE-TUCP 的差异表达

从图 2 可见: C4 与 ck 处理组共筛选出 261 个上调 TE-TUCP, 246 个下调 TE-TUCP (图 2A)。H42 与 ck 处理组共筛选出 199 个上调 TE-TUCP, 127 个下调 TE-TUCP (图 2B)。UV 与 ck 处理组共筛选出 270 个上调 TE-TUCP, 178 个下调 TE-TUCP (图 2C)。Sa 与 wa 处理组共筛选出 97 个上调 TE-TUCP, 66 个下调 TE-TUCP (图 2D)。TE-TUCP 表现出胁迫特异性表达模式, 在冷、盐胁迫下下调个数多于上调个数, 在热和紫外胁迫下上调个数多于下调个数。

2.4 TUCP-TE 和 nonTUCP-TE 附近 5 000 bp 距离内基因表达模式分析

对 TUCP-TE 附近 4 646 个基因研究发现: C4 与 ck 处理组共筛选出 758 个上调基因, 833 个下调基因 (图 3A), 差异表达基因占有所有附近基因的 34.24%。H42 与 ck 处理组共筛选出 358 个上调基因, 334 个下调基因 (图 3B), 差异表达基因占有所有附近基因的 14.89%。UV 与 ck 处理组共筛选出 739 个上调基因, 596 个下调基因 (图 3C), 差异表达基因占有所有附近基因的 28.73%。Sa 与 wa 处理组共筛选出 320 个上调基因, 201 个下调基因 (图 3D), 差异表达基因占有所有附近基因的 11.21%。

对 nonTUCP-TE 附近 2 456 个基因研究发现: C4 与 ck 处理组共筛选出 474 个上调基因, 496 个下调基因 (图 4A), 差异表达基因占有所有附近基因的 39.50%。H42 与 ck 处理组共筛选出 287 个上调基因, 225 个下调基因 (图 4B), 差异表达基因占有所有附近基因的 20.85%。UV 与 ck 处理组共筛选出 475 个上调基因, 383 个下调基因 (图 4C), 差异表达基因占有所有附近基因的 34.93%。Sa 与 wa 处理组共筛选出

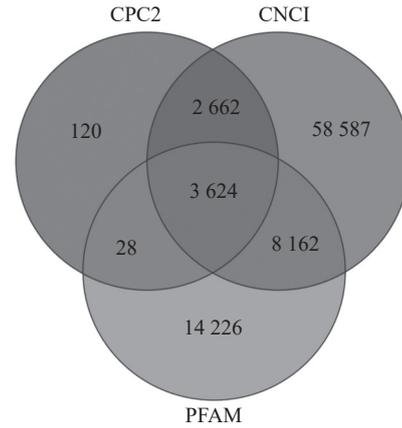


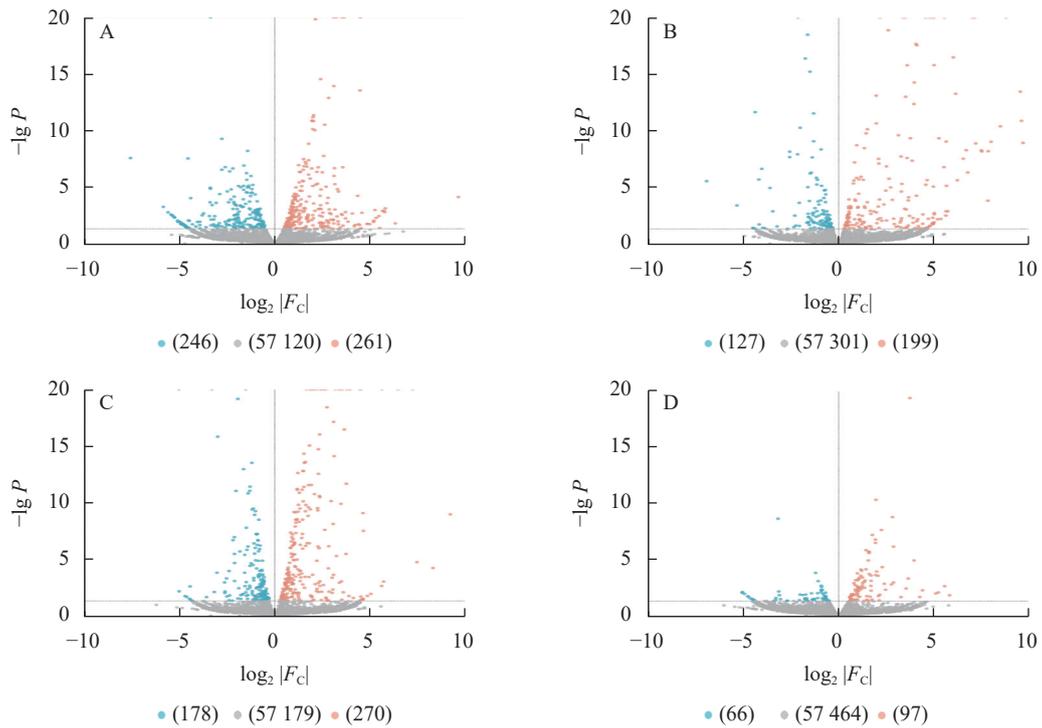
图 1 TUCP 筛选结果

Figure 1 Results of TUCP screening

表 1 毛竹 TE-TUCP 转座子来源

Table 1 Sources of TE-TUCP transposons in *Ph. edulis*

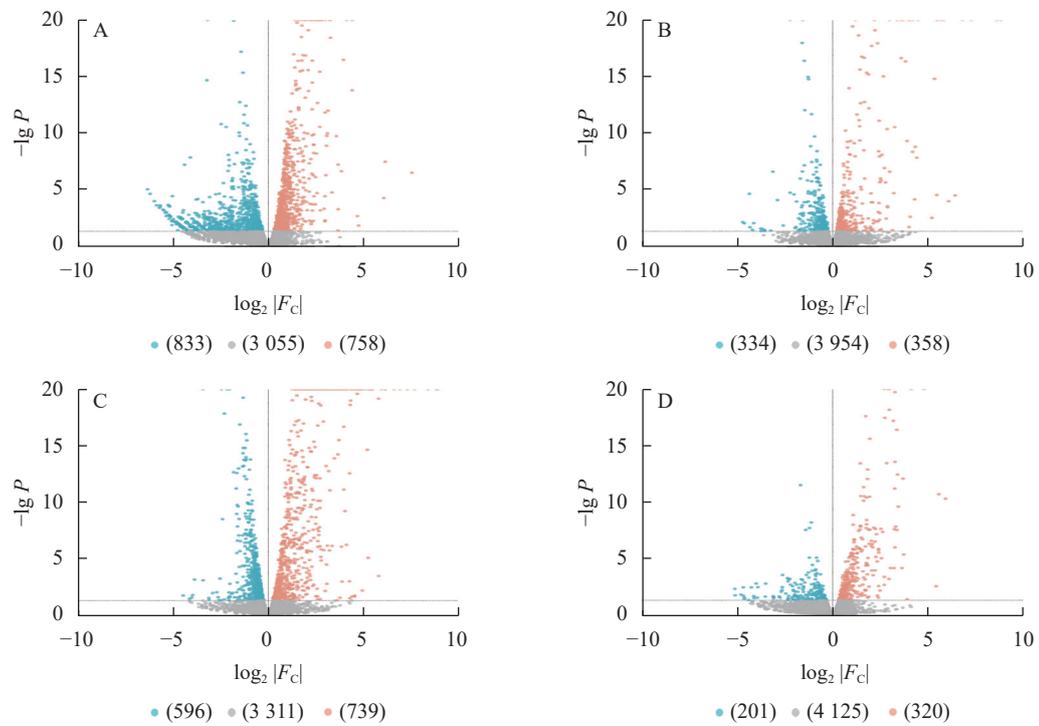
转座子来源分类	TUCP-TE/ 个	nonTUCP-TE/ 个	数量合 计/个
DNA	45	115	160
DNA/CMC-EnSpm	2 994	1 516	4 510
DNA/hAT	4	18	22
DNA/hAT-Ac	745	907	1 652
DNA/hAT-Tag1	17	26	43
DNA/hAT-Tip100	228	209	437
DNA/MULE-MuDR	2 368	1 894	4 262
DNA/PIF-Harbinger	112	154	266
DNA/TcMar-Stowaway	153	452	605
LINE/L1	1 040	1 050	2 090
Low_complexity	4	9	13
LTR	68	1 058	1 126
LTR/Caulimovirus	6	39	45
LTR/Copia	8 456	8 809	17 265
LTR/Gypsy	10 662	13 318	23 980
Other/centromeric	2	2	4
RC/Helitron	241	427	668
Simple_repeat	112	341	453
SINE/L1	6	6	12
SINE		2	2
未知		12	12
合计	27 263	30 364	57 627



A~D 分别表示在冷 (C4)、热 (H42)、紫外 (UV)、盐 (Sa) 处理组中 TE-TUCP 差异表达。蓝色表示与对照处理显著下调的 TE-TUCP 数量 ($P < 0.05$)；黄色表示与对照处理显著上调的 TE-TUCP 数量 ($P < 0.05$)；灰色表示与对照处理无显著差异的 TE-TUCP 数量。

图 2 毛竹 TE-TUCP 表达模式分析

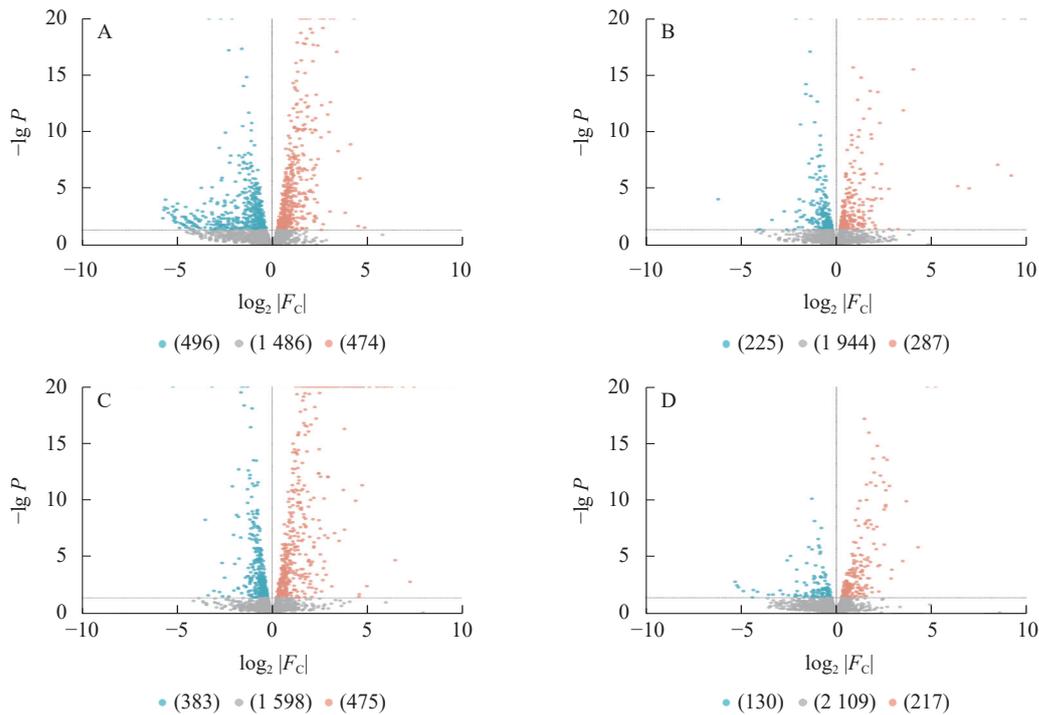
Figure 2 Analysis of TE-TUCP expression pattern in *Ph. edulis*



A~D 分别表示在冷 (C4)、热 (H42)、紫外 (UV)、盐 (Sa) 处理组中 TUCP-TE 附近基因表达模式分析。蓝色表示与对照处理显著下调的 TUCP-TE 数量 ($P < 0.05$)；黄色表示与对照处理显著上调的 TUCP-TE 数量 ($P < 0.05$)；灰色表示与对照处理无显著差异的 TE-TUCP 数量。

图 3 毛竹 TUCP-TE 附近基因表达模式分析

Figure 3 Analysis of gene expression patterns in the vicinity of *Ph. edulis* TUCP-TE



A~D 分别表示在冷 (C4)、热 (H42)、紫外 (UV)、盐 (Sa) 处理组中 nonTUCP-TE 差异表达。蓝色表示与对照处理显著下调的 nonTUCP-TE 数量 ($P < 0.05$)；黄色表示与对照处理显著上调的 nonTUCP-TE 数量 ($P < 0.05$)；灰色表示与对照处理无显著差异的 nonTUCP-TE 数量。

图 4 毛竹 nonTUCP-TE 附近基因表达模式分析

Figure 4 Analysis of gene expression patterns in the vicinity of *Ph. edulis* nonTUCP-TE

217 个上调基因, 130 个下调基因 (图 4D), 差异表达基因占所有附近基因的 14.13%。可见, 除了低温处理外, 高温、高盐、紫外照射处理组 TUCP-TE 附近 5 000 bp 距离内基因差异表达数量均比 nonTUCP-TE 高, 表明高温、高盐、紫外照射可以促进 TUCP-TE 附近差异基因表达, 但是低温会抑制 TUCP-TE 附近差异基因表达。

2.5 TUCP-TE 和 nonTUCP-TE 附近 5 000 bp 距离内差异表达基因富集分析

在附近 5 000 bp 距离内, 分别取 TUCP-TE 和 nonTUCP-TE 差异表达基因合集 2 592、1 591 个基因进行 GO 富集分析。如图 5 所示: 与 nonTUCP-TE 相比, 非生物胁迫下, TUCP-TE 附近 5 000 bp 距离内差异表达基因, 除了共同显著富集在细胞、细胞组分、细胞内、细胞内组分、代谢过程外, 还额外显著富集在与非生物胁迫相关的催化活性、水解酶活性、对辐射反应、对光刺激反应、对渗透胁迫的反应等方面。表明非生物胁迫可以促进毛竹 TUCP-TE 附近相关基因的表达。

2.6 TE-TUCP 与基因距离对基因表达模式的影响及附近基因表达水平统计

如图 6 所示: nonTUCP-TE 附近 1 500 bp 内的差异表达基因比 TUCP-TE 相同距离内差异表达基因的数量多, 且在越靠近 nonTUCP-TE 的位置, 差异表达基因集中。在附近 1 500 bp 内, TUCP-TE 附近越靠近 TUCP, 差异表达基因就数量越少, 而在距离 2 000~3 000 bp 内, TUCP-TE 附近差异表达基因数量较多。说明基因的表达潜能与邻近 TE-TUCP 的表达潜能互相抑制。2 000~3 000 bp 是 TE-TUCP 对基因影响较明显的范围。同时, TUCP-TE 附近差异表达基因平均表达量为 757.1, 低于 nonTUCP-TE (1 245.5)。TUCP-TE 附近差异表达基因表达水平与 nonTUCP-TE 相比, 整体水平上表达峰更低, 说明非生物胁迫可能会抑制 TE-TUCP 附近基因的整体表达水平。

2.7 RT-qPCR 验证结果

为了验证转录组测序数据分析结果的准确性, 从鉴定的差异表达 TE-TUCP 中随机挑选 4 个 TE-TUCP 及其附近基因, 分别是 TE-TUCP1 和 PH02Gene02823、TE-TUCP2 和 PH02Gene14564、TE-TUCP3 和 PH02Gene16722, 以及 TE-TUCP4 和 PH02Gene25649。引物见表 2。如图 7 所示: TE-TUCP 和邻近基因的 RT-qPCR 结果与转录组分析结果一致, 说明转录组测序数据分析结果是可靠的。

3 讨论

植物基因组中转座子含量丰富，毛竹基因组共鉴定出 TE 序列 991 865 条，占基因组大小的 63%^[3]。在桑树 *Morus alba* 基因组共检测到 TE 序列 286 122 条，占基因组大小的 32%^[38]，玉米基因组中转座子占比 70%^[39]，高粱 *Sorghum bicolor* 基因组中转座子占比 55%^[40]，水稻基因组中转座子占比 26%^[41]。可见，TE 在植物基因组中占比较高。

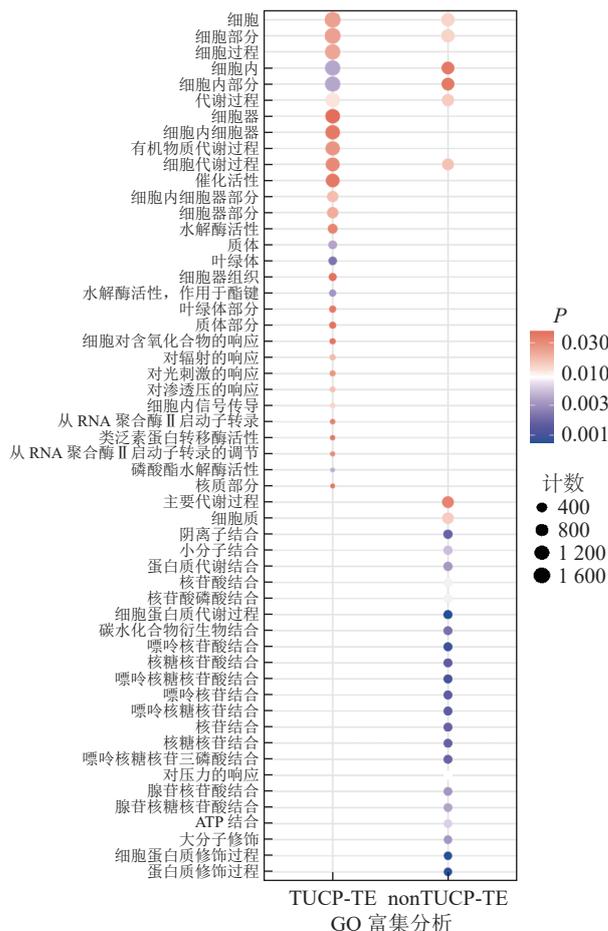
本研究表明：毛竹共鉴定出 87 409 个 TUCP，它们的平均长度比 mRNA 的平均长度短，但比 lncRNA 的平均长度长。TUCP、mRNA 和 lncRNA 之间的 ORF 长度具有相同的规律。这与其他植物研究结果相似^[14, 17]。

含有应激响应顺式调控元件的 TE 通过表观遗传修饰对环境胁迫表现出快速反应。例如，番茄 *Solanum lycopersicum* 基因组中属于 Ty1/Copia 超家族的反转录转座子在干旱胁迫和脱落酸 (ABA) 作用下被激活^[42]。番茄和烟草 *Nicotiana tabacum* 中的 TE 可被低温特异性触发和激活^[43]。以上研究表明：TE 衍生的 TUCP 能在非生物胁迫下调控自身转录和附近基因的表达。毛竹 57 627 个 TE-TUCP，65.9% 来自 TE。TE-TUCP 主要来源于 Ty1/Copia 和 Ty3/Gypsy 超家族。TE-TUCP 表现出胁迫特异性表达模式，在冷、盐胁迫下下调数量大于上调数量，在热胁迫和紫外胁迫下上调数量大于下调数量。

本研究发现：低温胁迫抑制 TUCP-TE 附近基因差异表达，高盐胁迫促进 TUCP-TE 附近基因差异表达，TE-TUCP 与附近基因的表达潜能互相抑制，这之前拟南芥中 TUCP 与附近基因转录水平呈负相关结果一致^[19]。另外，高温胁迫也能促进 TUCP-TE 附近基因差异表达。红枣转录组研究表明：TUCP 改变了附近基因表达以适应高温环境^[20]。本研究还发现：紫外胁迫下，TE-TUCP 促进光刺激反应相关基因差异表达。棉花中 TUCP 参与光合作用并影响生长发育过程^[14]。GO 富集分析结果显示：TE-TUCP 通过调控关键基因在非生物胁迫反应中发挥重要作用。这与 TE 在非生物胁迫下可重新激活转录从而应对环境条件变化的结论相一致^[44]。

4 结论

在 4 种胁迫处理的转录组数据中，共识别出 57 627 个毛竹 TE-TUCP。这些 TE-TUCP 在面对不同的非生物胁迫时，展现出了各自独特的表达模式。它们主要源自 Ty1/Copia 和 Ty3/Gypsy 这 2 个超家族。基因自身的表达潜力与邻近的 TE-TUCP 的表达潜力之间存在着一种相互抑制的现象。此外，非生物胁迫



毛竹 TUCP-TE 和 nonTUCP-TE 附近差异表达基因的前 30 个分子功能 GO 富集分析。

图 5 GO 富集分析

Figure 5 GO enrichment analysis

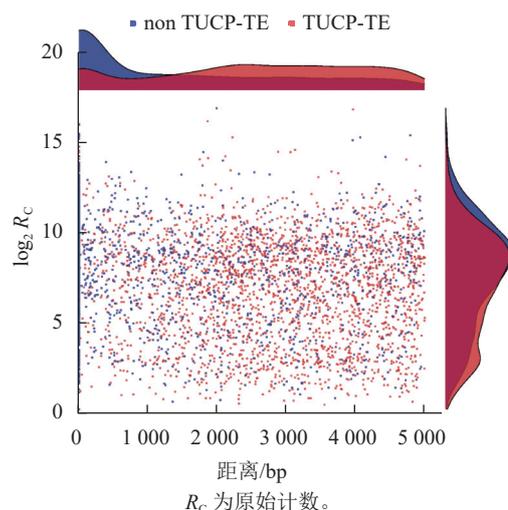


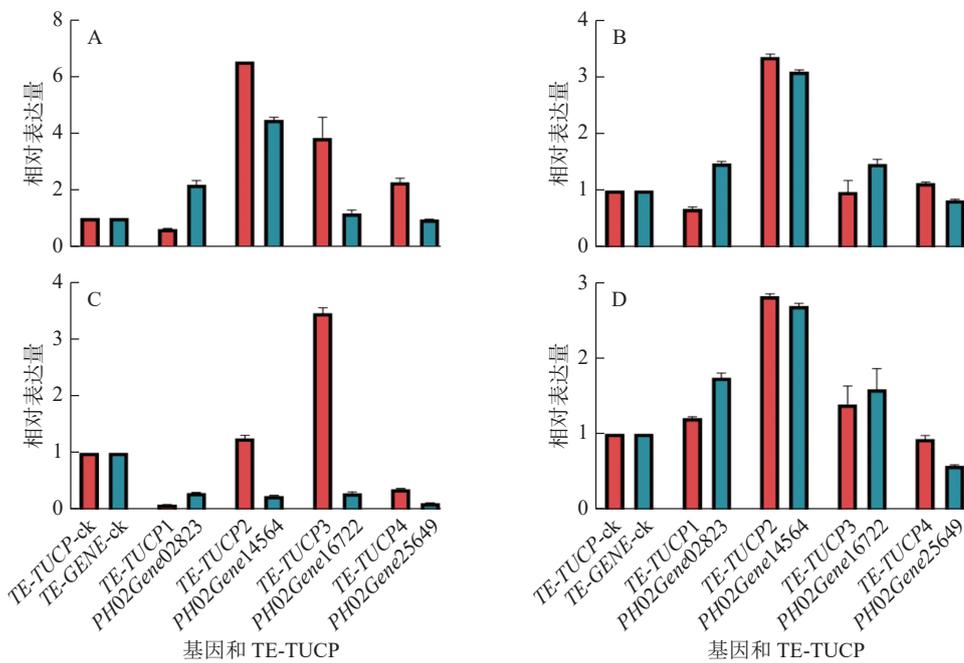
图 6 TE-TUCP 与基因距离、基因表达水平统计散点图

Figure 6 Scatterplot of TE-TUCP versus gene distance and gene expression level statistics

表2 引物序列信息

Table 2 Primer sequence information

引物名称	序列(5'→3')	引物名称	序列(5'→3')
TE-TUCP1-F	AACAAGGCAGCGCAGCAGAC	TE-TUCP3-R	AACTAATGGAAGCGGACGCACG
TE-TUCP1-R	TTGGCGGCACCTTAGGCTGA	PH02Gene16722-F	CGAATGGCAGGAGGAGCAGAGA
PH02Gene02823-F	CTCCACGCCATCAACACCAAG	PH02Gene16722-R	TCTTGCCCTTGCCGAAGTGGA
PH02Gene02823-R	ACTGAGGAGGGAGGAGGCAACT	TE-TUCP4-F	AGGCAGATTCGCAGGTGGTT
TE-TUCP2-F	ATGGTGTGTGGTGTGCGTG	TE-TUCP4-R	ATTCACCAGCATCCAGCTTGGC
TE-TUCP2-R	CGGCAGATTGCGTGCATACATA	PH02Gene25649-F	AATTGCACCTGCCTGCTGGATG
PH02Gene14564-F	GGAAGGTCAGGCACCAACGATG	PH02Gene25649-R	ACCTCCGTCCTGCTGCTTTG
PH02Gene14564-R	AGCCACCACTGCTACCGTAGTC	Actin-F	ATACGTTCTCAGCTATTCTT
TE-TUCP3-F	AGCCACGGATTACAGCAACAAGG	Actin-R	CCGAGCTTCTCTTTATGTCCT



A~D 分别表示在冷 (C4)、热 (H42)、紫外 (UV)、盐 (Sa) 处理组中 TE-TUCP 和邻近基因的 RT-qPCR 结果。相对表达量均表示与对照相比的数值。

图7 4个TE-TUCP及其邻近4个基因的RT-qPCR表达分析

Figure 7 RT-qPCR expression analysis of 4 TE-TUCP and four nearby genes

迫还会通过调控 TE-TUCP 的转录情况，来影响周边基因的表达，从而帮助毛竹适应这些胁迫条件。

5 参考文献

- [1] LIU Yuli, ZHOU Guomo, DU Huaqiang, *et al.* Soil respiration of a moso bamboo forest significantly affected by gross ecosystem productivity and leaf area index in an extreme drought event [J/OL]. *PeerJ*, 2018, **6**: e5747[2024-02-20]. doi: 10.7717/peerj.5747.
- [2] RAMAKRISHNAN M, YRJÄLÄ K, VINOD K K, *et al.* Genetics and genomics of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*): current status, future challenges, and biotechnological opportunities toward a sustainable bamboo industry [J/OL]. *Food and Energy Security*, 2020, **9**(4): e229[2024-02-20]. doi: 10.1002/fes3.229.
- [3] ZHAO Hansheng, GAO Zhimin, WANG Le, *et al.* Chromosome-level reference genome and alternative splicing atlas of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J/OL]. *GigaScience*, 2018, **7**(10): giy115[2024-02-20]. doi: 10.1093/gigascience/giy115.
- [4] BOURQUE G, BURNS K H, GEHRING M, *et al.* Ten things you should know about transposable elements [J/OL]. *Genome Biology*, 2018, **19**: 199[2024-02-20]. doi: 10.1186/s13059-018-1577-z.

- [5] RAMAKRISHNAN M, PAPOLU P K, MULLASSERI S, *et al.* The role of LTR retro transposons in plant genetic engineering: how to control their transposition in the genome [J]. *Plant Cell Reports*, 2023, **42**(1): 3 – 15.
- [6] LIU Beibei, Zhao Meixia. How transposable elements are recognized and epigenetically silenced in plants? [J/OL]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2023, **75**: 102428 [2024-02-20]. doi: 10.1016/j.pbi.2023.102428.
- [7] RAMAKRISHNAN M, SATISH L, KALENDAR R, *et al.* The dynamism of transposon methylation for plant development and stress adaptation [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, **22**(21): 11387 [2024-02-20]. doi: 10.3390/ijms222111387.
- [8] NAITO K, FENG Zhang, TSUKIYAMA T, *et al.* Unexpected consequences of a sudden and massive transposon amplification on rice gene expression [J]. *Nature*, 2009, **461**(7267): 1130 – 1134.
- [9] ZHOU Mingbing, ZHU Yihang, BAI Youhuang, *et al.* Transcriptionally active LTR retroelement-related sequences and their relationship with small RNA in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J/OL]. *Molecular Breeding*, 2017, **37**(10): 132 [2024-02-20]. doi: 10.1007/s11032-017-0733-6.
- [10] SUONIEMI A, NARVANTO A, SCHULMAN A H. The BARE-1 retrotransposon is transcribed in barley from an LTR promoter active in transient assays [J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, **31**(2): 295 – 306.
- [11] CABILI M N, TRAPNELL C, GOFF L, *et al.* Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses [J]. *Genes & Development*, 2011, **25**(18): 1915 – 1942.
- [12] WASHIETL S, KELLIS M, GARBER M. Evolutionary dynamics and tissue specificity of human long noncoding RNAs in six mammals [J]. *Genome Research*, 2014, **24**(4): 616 – 628.
- [13] KONDO T, PLAZA S, ZANET J, *et al.* Small peptides switch the transcriptional activity of shavenbaby during drosophila embryogenesis [J]. *Science*, 2010, **329**(5989): 336 – 339.
- [14] SALIH H, GONG Wengfang, HE Shoupu, *et al.* Comparative transcriptome analysis of TUCPs in *Gossypium hirsutum* ligo-lintless-1 mutant and their proposed functions in cotton fiber development [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2019, **294**(1): 23 – 34.
- [15] XIAO Ke, YANG Yuemei, BIAN Yanyan, *et al.* Identification of differentially expressed long noncoding RNAs in human knee osteoarthritis [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, **120**(3): 4620 – 4633.
- [16] LUO Honglin, YANG Huizan, LIN Yong, *et al.* LncRNA and mRNA profiling during activation of tilapia macrophages by HSP70 and antigen [J]. *Oncotarget*, 2017, **8**(58): 98455 – 98470.
- [17] LIU Yong, QI Bing, XIE Juan, *et al.* Filtered reproductive long non-coding RNAs by genome-wide analyses of goat ovary at different estrus periods [J]. *BMC Genomics*, 2018, **19**(1): 866 [2024-02-20]. doi:10.1186/s12864-018-5268-7.
- [18] LIU Huimin, LU Yan, WANG Juan, *et al.* Genome-wide screening of long non-coding RNAs involved in rubber biosynthesis [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, **60**(11): 1070 – 1082.
- [19] WANG Dong, QU Zhipeng, YANG Lan, *et al.* Transposable elements (TEs) contribute to stress-related long intergenic noncoding RNAs in plants [J]. *Plant Journal*, 2017, **90**(1): 133 – 146.
- [20] HAO Qin, YANG Lei, FAN Dingyu, *et al.* The transcriptomic response to heat stress of a jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) cultivar is featured with changed expression of long noncoding RNAs [J/OL]. *PLoS One*, 2021, **16**(5): e0249663 [2024-02-20]. doi: 10.1371/journal.pone.0249663.
- [21] DING Yiqian, ZOU Longhai, WU Jiajun, *et al.* The pattern of DNA methylation alteration, and its association with the expression changes of non-coding RNAs and mRNAs in moso bamboo under abiotic stress [J/OL]. *Plant Science*, 2022, **325**: 111451 [2024-02-20]. doi: 10.1016/j.plantsci.2022.111451.
- [22] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, **30**(15): 2114 – 2134.
- [23] KIM D, PAGGI J M, PARK C, *et al.* Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype [J]. *Nature Biotechnology*, 2019, **37**(8): 907 – 915.
- [24] LIAO Yang, SMYTH G K, SHI Wei. FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features [J]. *Bioinformatics*, 2014, **30**(7): 923 – 930.
- [25] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J/OL]. *Genome Biology*, 2014, **15**: 550 [2024-02-20]. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.

- [26] TRAPNELL C, ROBERTS A, GOFF L, *et al.* Differential gene and transcript expression analysis of RNA-Seq experiments with TopHat and Cufflinks [J]. *Nature Protocols*, 2012, 7(3): 562 – 578.
- [27] SUN Liang, LUO Haitao, BU Dechao, *et al.* Utilizing sequence intrinsic composition to classify protein-coding and long non-coding transcripts [J/OL]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(17): e166[2024-02-20]. doi: 10.1093/nar/gkt646.
- [28] MISTRY J, BATEMAN A, FINN R D. Predicting active site residue annotations in the Pfam database [J/OL]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 298[2024-02-20]. doi:10.1186/1471-2105-8-298.
- [29] KANG Yujian, YANG Dechang, KONG Lei, *et al.* CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W12 – W16.
- [30] ZHOU Mingbing, TAO Guiyun, PI Peiyao, *et al.* Genome-wide characterization and evolution analysis of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Planta*, 2016, 244(4): 775 – 787.
- [31] CHEN Nansheng. Using RepeatMasker to identify repetitive elements in genomic sequences [J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2004, 5(1): 4 – 10.
- [32] QUINLAN A R, HALL I M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(6): 841 – 842.
- [33] PERTEA M, PERTEA G M, ANTONESCU C M, *et al.* StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-Seq reads [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(3): 290 – 295.
- [34] PERTEA G, PERTEA M. GFF Utilities: GffRead and GffCompare [J/OL]. *F1000Research*, 2020, 9: 304[2024-02-20]. doi: 10.12688/f1000research.23297.2.
- [35] SONESON C, LOVE M I, ROBINSON M D. Differential analyses for RNA-Seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences [J/OL]. *F1000Research*, 2015, 4: 1521[2024-02-20]. doi: 10.12688/f1000research.7563.2.
- [36] 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.
- [37] 陈娅欣, 周明兵. 毛竹长末端重复序列反转录转座子的全基因组特征及进化分析[J]. *浙江农林大学学报*, 2021, 38(3): 455 – 463.
- CHEN Yaxin, ZHOU Mingbing. Genome-wide characteristics and evolution analysis of long terminal repeat retrotransposons in *Phyllostachys edulis* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2021, 38(3): 455 – 463.
- [38] XIN Youchao, MA Bi, XIANG Zhonghua, *et al.* Amplification of miniature inverted-repeat transposable elements and the associated impact on gene regulation and alternative splicing in mulberry (*Morus notabilis*) [J/OL]. *Mobile DNA*, 2019, 10: 27[2024-02-20]. doi: 10.1186/s13100-019-0169-0.
- [39] XU Ling, ZHANG Yu, SU Yuan, *et al.* Structure and evolution of full-length LTR retrotransposons in rice genome [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2010, 287(1/2): 19 – 28.
- [40] PATERSON A H, BOWERS J E, BRUGGMANN R, *et al.* The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses [J]. *Nature*, 2009, 457(7229): 551 – 556.
- [41] WANG Hao, XU Zhao, YU Hongjie. LTR retrotransposons reveal recent extensive inter-subspecies nonreciprocal recombination in Asian cultivated rice [J/OL]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 565[2024-02-20]. doi: 10.1186/1471-2164-9-565.
- [42] SALLAM N, MOUSSA M. DNA methylation changes stimulated by drought stress in ABA-deficient maize mutant [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 160: 218 – 224.
- [43] BENOIT M, DROST H G, CATONI M, *et al.* Environmental and epigenetic regulation of retrotransposons in tomato [J/OL]. *PLoS Genetics*, 2019, 15(9): e1008370[2024-02-20]. doi: 10.1371/journal.pgen.1008370.
- [44] CASACUBERTA E, GONZÁLEZ J. The impact of transposable elements in environmental adaptation [J]. *Molecular Ecology*, 2013, 22(6): 1503 – 1517.