

一个毛竹 LTR 反转录转座子结构鉴定及表达模式分析

潘飞翔¹, 汤定钦¹, 周明兵^{1,2}

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 浙江省竹资源与高效利用协同创新中心 浙江农林大学, 浙江 杭州 311300

潘飞翔, 汤定钦, 周明兵. 一个毛竹 LTR 反转录转座子结构鉴定及表达模式分析. 生物工程学报, 2019, 35(3): 445–457.

Pan FX, Tang DQ, Zhou MB. Identification and expression pattern analysis of a Moso Bamboo LTR retrotransposon. Chin J Biotech, 2019, 35(3): 445–457.

摘要: 为了在毛竹中开发更多的活性 LTR 反转录转座子, 文中分析和鉴定了一个毛竹 LTR 反转录转座子 (Ph-LTR2), 系统分析了该转座子在逆境下的表达模式。Ph-LTR2 转座子全长 6 030 bp, 属于 Ty3-Gypsy 家族中的 Reina 亚家族。LTR 序列同源率为 96.41%, 插入时间约为 61.92 万年, 在基因组中有 5 个拷贝。Ph-LTR2 转座子结构域包括 GAG (种属特异抗原, gag protein) 蛋白域、PR (蛋白酶, Proteases) 蛋白域、RT (反转录酶, Reverse transcriptases) 蛋白域、RH (RNA 酶 H, Ribonuclease H) 蛋白域、INT (整合酶, Integrase) 蛋白域和 CHR (染色质组织修饰域, Chromatin organization modifier) 蛋白域。通过实时定量 PCR 检测了 INT、RT 和 RH 的表达模式, 确定 INT、RT 和 RH 在毛竹叶、笋、根存在组织表达特异性。在高温、低温、甲基化抑制剂、辐照与高盐等胁迫下, Ph-LTR2 转座子 INT、RT 和 RH 的转录水平不同程度地提高了, 具体来讲, INT、RT 和 RH 在高温、低温、甲基化抑制剂处理后转录水平上调; 在低剂量辐照处理和低浓度盐溶液处理后转录水平也上调, 但随剂量和浓度的增加表达水平又下降, 这些结果表明 Ph-LTR2 转座子的表达模式响应外界环境的变化, 但具体机制尚不清楚。本研究结果为开发基于 Ph-LTR2 转座子标签奠定了一定的理论基础。

关键词: LTR 反转录转座子, 环境胁迫, 毛竹实生苗, 实时荧光定量 PCR

Identification and expression pattern analysis of a Moso Bamboo LTR retrotransposon

Feixiang Pan¹, Dingqin Tang¹, and Mingbing Zhou^{1,2}

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: To develop more active LTR retrotransposons in *Phyllostachys edulis*, a *Ph. edulis* LTR retrotransposon

Received: August 1, 2018; **Accepted:** December 5, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31470615, 31870656), Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (No. LZ19C160001).

Corresponding author: Mingbing Zhou. Tel: +86-571-63731263; E-mail: zhoutingbing@zafu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31470615, 31870656), 浙江省自然科学基金 (No. LZ19C160001) 资助。

网络出版时间: 2019-01-09

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190108.1007.001.html>

(Ph-LTR2) was identified, and the expression pattern of the transposon under stress was systematically analyzed. Ph-LTR2 transposon is 6 030 bp in length and belongs to the Reina subfamily in the Ty3-Gypsy family. With the similarity of 96.41% of both LTR sequences, the Ph-LTR2 transposon inserted the moso bamboo genome about 61.92 thousand years ago. There are 5 copies identified in the genome. The Ph-LTR2 transposon domain includes GAG (gag protein) protein domain, PR (Proteases) protein domain, RT (Reverse transcriptase) protein domain, RH (Ribonuclease H) protein domain, INT (Integrase) protein domain and CHR (Chromatin organization modifier) protein domain. The expression patterns of INT, RT and RH were detected by real-time quantitative PCR. The three domains were found to have specific expression patterns at different tissues of the bamboo. Under the conditions of low/high temperature, methylation inhibitors treatments, irradiation and high salt stress, transcription levels of the three domains of the Ph-LTR2 transposon increased with different degrees. Specifically, after treatment with low/high temperature and methylation inhibitors, the transcription level was up-regulated; after low dose radiation treatment and low concentration of salt solution treatment, the transcription level was also increased, but the expression level decreased with increasing dose of radiation and concentration of salt solution. These results indicate that the expression pattern of the Ph-LTR2 transposon responds to the changes of the external environment, but the exact mechanism is not yet known. The results of this study laid a certain theoretical foundation for the development of the genetic tool based on Ph-LTR2 transposons.

Keywords: LTR retrotransposon, environmental stress, *Phyllostachys edulis* seedlings, real-time fluorescent quantitative PCR

转座子广泛存在于真核生物基因组中,是基因组的主要组成成分。转座子主要包括 DNA 转座子和 RNA 转座子, RNA 转座子又称为反转录转座子。长末端重复序列 (Long terminal repeat, LTR) 转座子属于反转录转座子的大类,包含有 Ty1-Copia、Ty3-Gypsy、Bel/Pao、Retroviridae、Caulimoviridae、LARD (Large retrotransposons derivatives) 和 TRIM (Terminal-repeat retrotransposons in miniature) 7 类^[1]。LTR 反转录转座子有自主转座子和非自主转座子两种。自主转座子结构完整,具有自主转座功能;而非自主转座子结构不完整,无法在单独存在时转座,只有在自主转座子的协助下才能发生转座。植物 LTR 反转录转座子的长度通常在 2–18 kb 之间,两端各有一个长度约 100–5 000 bp 正向重复的长末端重复序列 (LTRs),结构通常为 5'-TG...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)^[2]。LTRs 不编码蛋白质,但包含转录的起始信号、终止信号和一些顺式作用元件,而编码区有 1–3 个开放阅读框 (ORF) 编码转座所需的酶类,主要包括 2 个与转座有关的基因,即 GAG (种属特异抗原) 基因和

POL (聚合酶) 基因。GAG 基因编码的蛋白质 (Retrotransposon gag protein, GAG) 参与反转录转座子 RNA 的成熟与包装,使反转录转座子的 RNA 整合到基因组。POL 基因是反转录转座子复制和转座所必需的基因,包括编码蛋白酶基因 (Pepsin-like aspartate proteases, AP)、整合酶基因 (Integrase, INT)、反转录酶基因 (Reverse transcriptases, RT) 和 RNA 酶基因 (Ribonuclease H, RH)^[3-4]。

大量 LTR 反转录转座子稳定存在于真核生物基因组内,在受到逆境和甲基化水平的改变而激活转座。短期铁过量会导致日本晴幼苗内部分 LTR 反转录转座子表达上调^[5],热处理可以激活粟酒裂殖酵母中一类 LTR 反转录转座子 Tf1^[6]和拟南芥中的 LTR 反转录转座子 ONSSEN^[7],激光辐射诱导水稻多个位点发生 MITE 类转座子 mPing 转座^[8],一些非生物因素 (如机械作用、水杨酸 (SA)、茉莉酮酸 (JA) 等) 可刺激 Tto1 转座子发生转座^[9],而活跃转座子又被甲基化而沉默^[10]。

LTR 反转录转座子在毛竹基因组含量也非常丰富,其中 Ty3-Gypsy 类 LTR 反转录转座子有 24.6%, Ty1-Copia 类 LTR 反转录转座子有 12.3%^[11],全部 LTR 反转录转座子占全部转座子序列的一半以

上, LTR 反转录转座子插入基因组的时间主要分布于 200–500 万年前, 晚于毛竹基因组四倍化的时间^[12]。目前, 本课题组已从毛竹基因组中克隆到 6 个全长的 LTR 反转录转座子 (*Ph-LTR1*、*PHRE1*、*PHRE2*、*PHRE3*、*PHRE4* 和 *PHRE5*)^[13–14], 其中 *PHRE1*、*PHRE2* 和 *PHRE5* 能在逆境下转录激活, *PHRE1* 和 *PHRE2* 还能在拟南芥异源转座。

为了在毛竹中开发更多的活性 LTR 反转录转座子, 应用于竹子诱变育种, 本研究利用公布的毛竹基因组数据库, 选取了一个结构完整、新近插入的 LTR 反转录转座子为研究对象, 命名为 Ph-LTR2 (*Phyllostachys edulis* LTR retrotransposon 2), 并对 Ph-LTR2 转座子的结构及在毛竹基因组的分布进行了系统分析, 通过实时荧光定量 PCR 详细调查 Ph-LTR2 在不同非生物胁迫下的表达模式, 揭示不同胁迫与 Ph-LTR2 转座活性的关系, 为开发基于 Ph-LTR2 转座子标签奠定了一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

毛竹幼叶、成熟叶和根以及笋均取自同一株毛竹 (栽种于浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验培育基地翠竹园)。

毛竹 *Phyllostachys edulis* 种子来自广西灵川县, 采自当年同一棵开花毛竹所结的种子, 经培育获得毛竹实生苗。

1.2 方法

1.2.1 毛竹基因组 DNA 与 RNA 的提取

实验中所有种子均采用同一棵毛竹当年所结的种子。将毛竹种子分成未处理种子、甲基化抑制剂处理种子、辐照处理种子 3 类。

未处理种子选择饱满以及大小相近的种子, 用蒸馏水冲洗 1 遍, 用 70% 酒精消毒种子表面 30 s, 再用蒸馏水冲洗 3 遍, 无菌蒸馏水浸种 24 h 以恢复种子活力。置于灭菌的双层滤纸上萌发, 25 °C

并全程黑暗, 保持水分充足, 2–3 周后将幼苗转入温室培养。种子萌发所需的营养土配比为: 珍珠岩: 蛭石: 泥炭土=1:1:1。萌发温度为 25 °C。当幼苗生长到 4 至 5 片叶时, 全部转移到直径 90 cm 的花盆中继续生长。

选择 5-氮杂胞苷作为甲基化抑制剂, 浓度设置 50、150、250 μmol/L, 共 3 个梯度。用 70% 酒精消毒种子表面 30 s, 无菌水冲洗 3 遍, 用不同浓度氮杂胞苷浸种 24 h。置于双层滤纸床上发芽。种子萌发环境 25 °C, 黑暗处理, 使用不同浓度的氮杂胞苷代替灭菌水浸润种子, 2–3 周后将幼苗移入温室继续培养 4 个月, 培养条件同未处理。每个梯度采 5 株作为重复。

辐照剂量设置 30、50、70 GY, 共 3 个梯度。辐射源为浙江省农业科学院作物与核技术利用研究所辐照中心提供的 ¹³⁷Cs-γ。种子辐照后同未处理种子一样, 萌发发芽。

选取萌发 90 d、长势一致且健康的未处理毛竹种子幼苗 (幼苗处于 8 叶 1 心期) 分成对照、高盐处理、高温胁迫处理及低温胁迫处理 4 组。对照组培养条件不变, 不做任何处理。将 NaCl 配置成 0.1、0.2、0.3 mol/L 的溶液对毛竹实生苗浇灌 3 d^[15], 后续处理同对照组。将高温组与低温组实生苗分别置于 42 °C 与 4 °C 培养箱, 分别处理 4 h 与 16 h^[16], 后续处理同对照组。

取对照组、辐照组、甲基化抑制剂组、高盐处理组、高温胁迫处理组及低温胁迫处理组的叶片液氮速冻, -80 °C 保存备用。

以毛竹嫩叶为实验材料, 通过 CTAB 法提取毛竹基因组 DNA, 检测浓度后 -20 °C 储存。取对照组、辐照组、甲基化抑制剂组、高盐处理组、高温胁迫处理组及低温胁迫处理组实生苗叶片, 与来自同一株野外毛竹的叶 (成熟叶)、笋以及根, 通过 Trizol 法提取总 RNA, 利用 TaKaRa 公司的 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit

试剂盒反转录成 cDNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存。

1.2.2 Ph-LTR2 的生物信息学分析

根据 Zhou 等建立的毛竹 LTR 反转录转座子数据库^[17], 选取了一个结构完整、新近插入的 LTR 反转录转座子为研究对象, 命名为 Ph-LTR2 (*Phyllostachys edulis* LTR retrotransposon 2)。为了分析 Ph-LTR2 转座子的序列特征, 利用 NetGene2 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) 工具查找 Ph-LTR2 转座子序列的外显子, 然后通过 DNAMAN 软件将其翻译为氨基酸序列, 通过 NCBI 上的 blastp 在线比对确认, 对转座子的结构进行鉴定。

在 Gypsy Database (http://www.gydb.org/index.php/Main_Page) 下载 Ty3-gypsy 各个家族的代表性反转录转座子 RT 氨基酸序列 (Del 亚家族的 Del、Retrosat2、Peabody 和 Tma, CRM 亚家族的 CRM 和 Beetle1, Reina 亚家族的 Reina、lfg7、Gimli 和 Gloin, REM1 亚家族的 REM1, Ty1-Copia 家族的 Olco1), 与 Ph-LTR2 转座子的 RT 氨基酸序列比对, 利用 MEGA6 软件中 Neighbor-Joining 方法构建进化树, 分析其所在的转座子家族。根据 Ph-LTR2 转座子序列在 BambooGDB 数据库 (<http://www.bamboogdb.org/index.jsp>) 中搜索 Ph-LTR2

转座子在毛竹基因组的分布。利用 PlantCARE 在线软件分析了 LTR 序列中顺式作用元件的组成。

在反转录过程中, 单一模板合成 LTR 反转录转座子两端的 LTR, 所以在整合至基因组时, DNA 序列是相同的。如果已知宿主的 DNA 替换速率, 就可通过计算同一转座子两端 LTR 序列的分化度来估算转座子的插入时间^[18]。比对 Ph-LTR2 转座子两端 LTR 序列的同源性, 求得分化度 K, 用公式 $T = K/2r$ (r 代表 LTR 序列的平均替换率, 约为 1.3×10^{-8} bp/年^[19]) 计算插入时间。

1.2.3 Ph-LTR2 的基因序列克隆与 cDNA 序列克隆

以提取的毛竹基因组 DNA 为模板扩增 Ph-LTR2 的基因序列 (引物见表 1), PCR 扩增反应体系: DNA, $1.0\text{ }\mu\text{L}$; $10 \times$ LA PCR 缓冲液, $5.0\text{ }\mu\text{L}$; dNTPs, $6.0\text{ }\mu\text{L}$; Ph-LTR2-F, $2.0\text{ }\mu\text{L}$; Ph-LTR2-R, $2.0\text{ }\mu\text{L}$; LA Taq, $0.5\text{ }\mu\text{L}$; ddH₂O 补充至 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。扩增参数: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后使用 SIMGEN 公司的凝胶 DNA 回收试剂盒回收, 连接到 pMD18-T 载体, 热击法转化到大肠杆菌菌株 DH5 α 中, 菌检后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

表 1 引物序列

Table 1 The sequence of primers

Primer	Sequence (5'-3')	Function
Ph-LTR2-F	CCCAAGAAGAGGATGTAAAG	Amplification of Ph-LTR2 transposon
Ph-LTR2-R	CAAAGGATCGCTGGTAGGAC	
PheACT2-2F	CAGCAACTGGGATGATATGGAGAA	RT-PCR primers for PheACT2
PheACT2-2R	TGGCAACGTACATAGCAGGAGTGT	
Ph-LTR2-INT-F	GGTGACCTCTGTGGCCCCGTA	INT domain primers for RT-PCR
Ph-LTR2-INT-R	TCCGTGCGTAGGACCCGAAGC	
Ph-LTR2-RT-F	ATCAAGGTTAGTGTGAGTCC	RT domain primers for RT-PCR
Ph-LTR2-RT-R	CCGAAGGTCCAACCTTAGAG	
Ph-LTR2-RH-F	TAGAGACGGATGCTTGTG	RH domain primers for RT-PCR
Ph-LTR2-RH-R	CTCCAGAATTGCCATTGC	
Ph-LTR2C-F	ATGGTGGCAAAGACTAGATCCCA	Amplification of Ph-LTR2 cDNA
Ph-LTR2C-R	TCAAGGAGTAAACTCGGGAAGGTC	

以毛竹笋 cDNA 为模板扩增 Ph-LTR2 的 cDNA 序列 (引物见表 1), PCR 扩增反应体系: cDNA, 1.0 μL ; 10 \times LA PCR 缓冲液, 5.0 μL ; dNTPs, 6.0 μL ; Ph-LTR2C-F, 2.0 μL ; Ph-LTR2C-R, 2.0 μL ; LA *Taq*, 0.5 μL ; dd H₂O 补充至 50 μL 。扩增参数: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后使用 SIMGEN 公司的凝胶 DNA 回收试剂盒回收, 经杭州擎科梓熙生物技术有限公司测序。

1.2.4 Ph-LTR2 转座子 INT、RT 和 RH 检测

采用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法检测 Ph-LTR2 转座子 INT、RT 和 RH 的表达水平。内参基因选取参考文献中的 ACT2-2, 命名为 PheACT2^[20]。分别在 Ph-LTR2 的 RT 序列、RH 序列和 INT 序列设计引物 (表 1), 根据不同引物在不同样品中的值, 按照 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 法 (无对照) 计算出 Ph-LTR2 转座子 INT、RT 和 RH 在不同部位的相对表达量^[20], 按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法 (有对照) 计算出不同处理下 Ph-LTR2 转座子 INT、RT 和 RH 的相对表达量。每个处理 3 组重复, 每个重复 3 个样本, 最终结果的平均值绘成柱形图, 在 SPSS 软件上采用 LSD 法分析各相对表达量与 CK 的显著性差异, 极显著结果 (误差水平小于 1%) 在柱形图上用星号表示。

2 结果与分析

2.1 Ph-LTR2 转座子序列克隆与 cDNA 序列检测

提取的毛竹基因组 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测; 用紫外分光光度计测定浓度为 1 000 ng/ μL 左右, OD_{260}/OD_{280} 值在 1.8–2.0 之间。DNA 质量和纯度都符合实验要求, 可用于后续实验。

以毛竹基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增 Ph-LTR2 转座子。Ph-LTR2 转座子全长 6 000 bp 左右 (图 1 的泳道 3)。PCR 扩增产物在琼脂糖凝胶电泳确认条带后割胶回收目的片段。

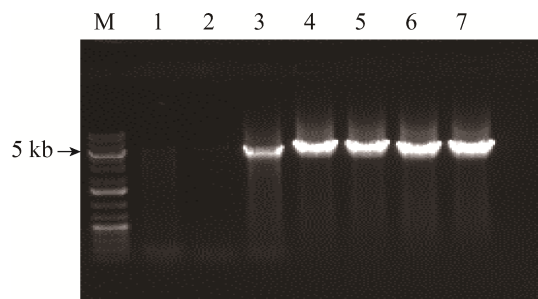


图 1 pMD18-Ph-LTR2 菌落 PCR 电泳图

Fig. 1 Colony PCR of pMD18-Ph-LTR2 in *E. coli*. M: marker; lane 1–2: negative control; lane 3: positive control; lane 4–7: positive colony.

将胶回收产物连接 pMD18-T 载体, 转入大肠杆菌 DH5 α , 菌落 PCR (图 1) 验证后将获得的阳性克隆送往 Invitrogen 公司测序, 测序验证成功的质粒命名为 pMD18-Ph-LTR2, 同时保存 pMD18-Ph-LTR2 的大肠杆菌菌液。

为验证该转座子是否能够转录, 以毛竹笋 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增 Ph-LTR2 转座子的 cDNA 序列。Ph-LTR2 转座子 ORF 长度约为 5 000 bp (图 2)。PCR 扩增产物测序结果与基因组预测一致。

2.2 基因的序列分析

2.2.1 Ph-LTR2 的结构特征

Ph-LTR2 全长 6 030 bp, 右端 LTR 长度为 478 bp, 左端 LTR 长度为 489 bp, 开放阅读框含

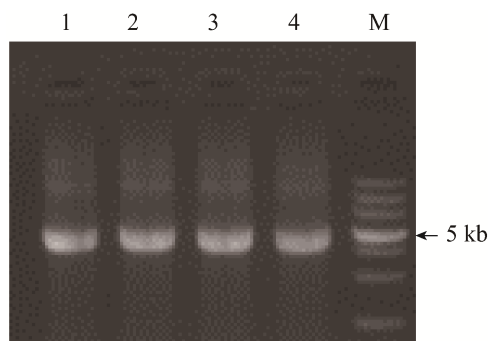


图 2 Ph-LTR2 转座子 cDNA 的 PCR 扩增电泳图

Fig. 2 The PCR result of Ph-LTR2 transposon cDNA. M: marker; lane 1–4: the PCR result from the same *P. edulis* shoots cDNA.

有转座所需 6 种酶的编码序列, 结构顺序依次为 5'-GAG-PR-RT-RH-INT-CHR-3', 根据结构属于 Ty3-Gypsy 家族成员。

Ph-LTR2 全长序列如图 3 所示, 包括左端 LTR (L-LTR)、6 种酶和右端 LTR (LTR-R) 的序列及结构。核苷酸序列编码区含有 4 971 bp 的开放阅读框, 共编码 1 659 个氨基酸。其中 211-391 位为反转录转座子 GAG 蛋白核心区, 其编码的蛋白主要负责反转录转座子 RNA 的成熟和包装, 其保守性较差; 第 553-642 位为 PR 蛋白酶核心区, 水解酶存在于很多反转录病毒、反转录转座子元件中, 参与反转录完成后, 负责将多聚蛋白前体切割为功能性多肽; 第 780-934 位为 RT 核心区, 编码反转录酶, 能够催化单链 RNA 或 DNA 合成 DNA, 是转座子转座的必要条件; 第 1 049-1 163 位为 LTR 反转录转座子中 Ty3-Gypsy 家族 RH 核心区,

编码核糖核酸酶 H, 这是一种广泛分布于原核生物和真核生物的水解酶, 负责原始 RNA 模板的水解, RNA 模板是病毒生命周期中逆转录过程后产生的 RNA/DNA 杂交体的一部分; 第 1 311-1 421 位为 INT 结构域, 负责编码整合酶, 催化反转录转座子插入宿主基因组; 第 1 608-1 651 位为染色质组织修饰域 (Chromatin organization modifier, CHR), 对染色质的重构及基因的表达起到重要作用。PBS 序列为 5'-TGTGTGGTATCAGAGCAAACAGCAGATCC-3', PPT 的序列为 5'-CAGAGTCGATTTTCCA AATAGGGGGGATAT-3'。

Ph-LTR2 转座子的 5' LTR 序列与 3' LTR 序列非常相似 (图 4), 只有其中 7 个核苷酸序列不一致。LTR 序列富含多种顺式作用元件, 包括: 3 个核心启动元件 TATA-box, 3 个启动元件 CAAT-box, 1 个与生长素相关的调控元件 TGA, 1 个与脱落

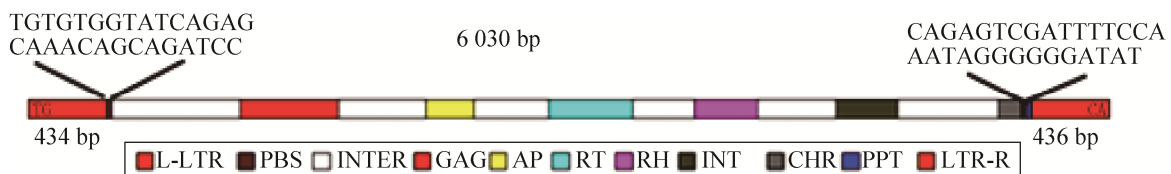


图 3 Ph-LTR2 转座子的结构

Fig. 3 Structure of the Ph-LTR2.



图 4 Ph-LTR2 转座子 LTR 序列比对示意图

Fig. 4 The alignment of LTR sequences of Ph-LTR2.

酸相关的调控元件 ABRE, 1 个茉莉酸甲酯调控元件 CGTGCA-motif, 1 个干旱反应元件 MBS (MYB binding site, MBS), 以上所有顺式作用元件均已在图 4 标出。

通过公式 $T=K/2r$ 推导插入时间。Ph-LTR2 转座子两端 LTR 同源性的 96.41%, 计算得出插入时间均约为 61.92 万年。

根据 Ph-LTR2 的结构可以推测 Ph-LTR2 属于 Ty3-Gypsy 家族, 在 Gypsy Database 下载其他 Ty3-Gypsy 各亚家族代表序列, 根据进化树拓扑结构可知 Ph-LTR2 属于 Ty3-Gypsy 的 Reina 亚家族 (图 5)。

2.2.2 Ph-LTR2 在基因组的分布

通过 Ph-LTR2 转座子序列在毛竹数据库的比对, 共鉴定 5 个拷贝, 以它们在 scaffold 的位置命名。分别为: PH01001192_35073-40113、PH01007203_7355-11931、PH01000426_369740-375716、PH01001071_150832-145883 和 PH01001876_177292-170516。

其中 PH01001876_177292-170516 缺失部分右侧 LTR 序列, PH01001192_35073-40113 缺失 GAG 基因区, PH01007203_7355-11931 缺失 INT 基因区, 除 PH01001876_177292-170516 外所有拷贝均缺失全部或部分左右 LTR 序列 (图 6)。PH01000426_369740-375716 和 Ph-LTR2 完全一致, 是同一个拷贝。

2.3 Ph-LTR2 转座子 INT、RT 和 RH 的表达模式分析

在 Ph-LTR2 转座子 6 个结构域中, 选取了 INT、RT 和 RH 检测它们的表达模式。比对 INT、RT 和 RH 在野生毛竹不同部位中的相对表达量, INT 在根中相对表达量最高, 叶片中略低于根, 笋的相对表达量最低; RH 在根里相对表达丰度最高, 其次是叶, 笋中表达最低; 而 RT 在叶片中表达丰度最高, 其次才是根, 笋中表达同样最低 (图 7)。三个结构域在不同组织相对表达量差异极显著。

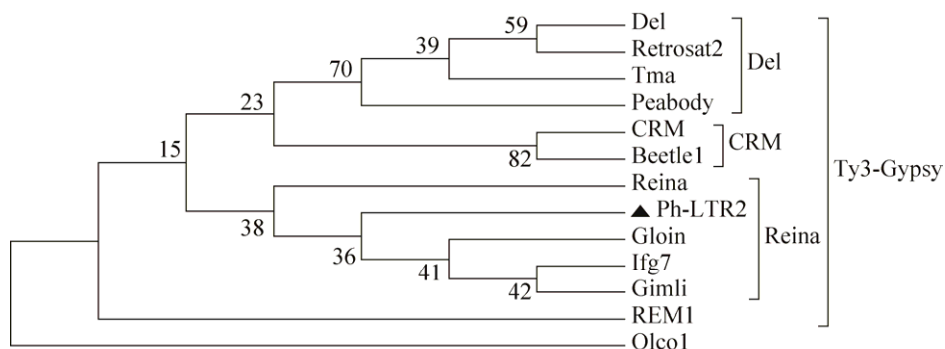


图 5 Ph-LTR2 转座子进化树

Fig. 5 Ph-LTR2 phylogenetic tree.

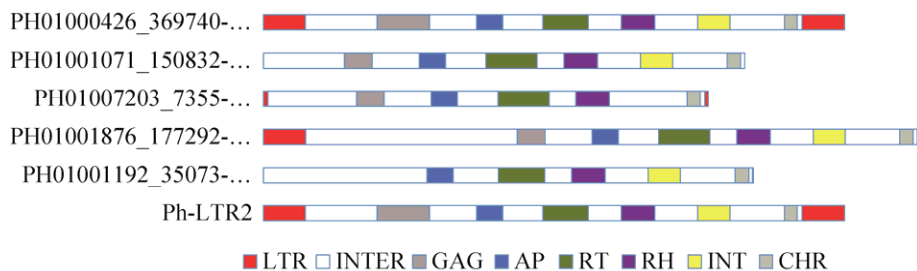


图 6 Ph-LTR2 转座子在基因组中的各拷贝序列比对图

Fig. 6 The copy sequence alignment of Ph-LTR2 in *P. edulis* genome.

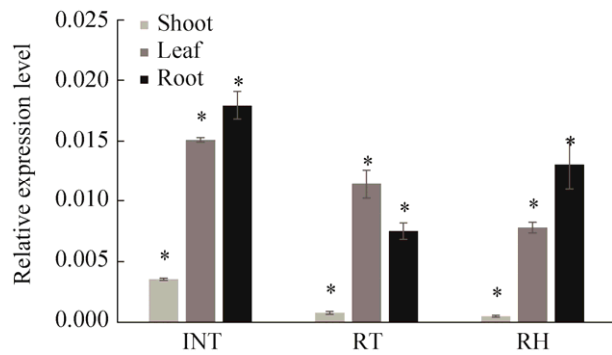


图7 Ph-LTR2 转座子 INT、RT 和 RH 在不同部位相对表达量

Fig. 7 Relative expression level of INT, RT and RH of Ph-LTR2 in bamboo shoots, leaves and roots. Statistical significance was calculated using LSD *t*-test (* $P < 0.001$).

在辐照处理过程中, INT、RT 和 RH 的相对表达量呈现先上升后下降的趋势, 在 30 GY 处理

的时候大幅上升, 50 GY 辐照下开始下降, 70 GY 时 INT、RT 和 RH 的相对表达量继续下降, 但幅度不大。其中 RT 的变化幅度最大, 在 30 GY 的表达量上调最为明显, 涨幅达到了 44 倍, 随着辐射剂量增加, 相对表达量下降的也最大, 50 GY 时下降为原来的 3.03%, 70 GY 时降为 30GY 的 2.18%; INT 变化程度略小于 RT, 30 GY 辐射处理组相对表达量上升明显, 涨幅为 31 倍, 50 GY 和 70 GY 的相对表达量相近, 下降到 30 GY 时的 9.82% 和 9.20%, 幅度小于 RT; RH 表达水平变化不大, 其他结构域涨幅最大的 30 GY 只有对照组的 1.3 倍, 50 GY 和 70 GY 相对 30 GY 的下降程度也不大, 只下降了 22.96% 和 20.16% (图 8A)。

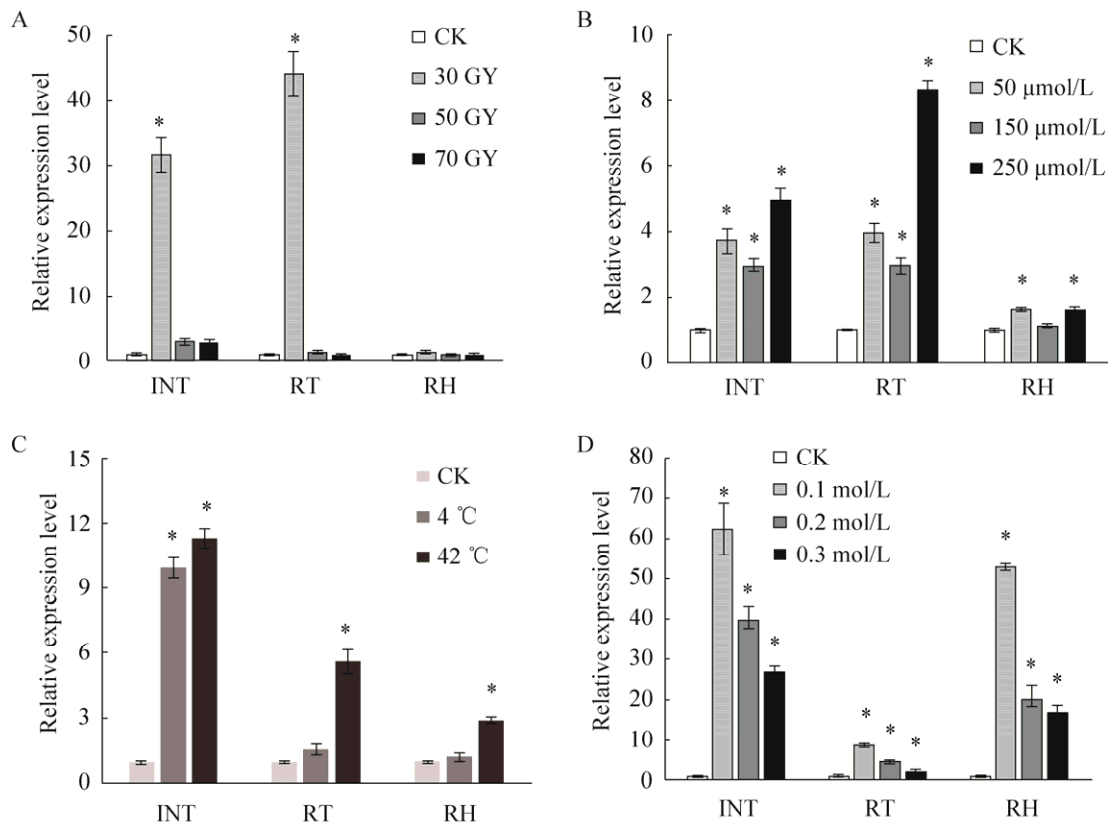


图8 不同处理 Ph-LTR2 转座子 INT、RT 和 RH 相对表达量

Fig. 8 Relative expression level of INT, RT and RH of Ph-LTR2 in treatment bamboo seedlings. (A) Radiation treatment. (B) Methylation inhibitor treatment. (C) Different temperature stress. (D) Different concentrations of salt solution. Statistical significance was calculated using LSD *t*-test (* $P < 0.001$).

在甲基化抑制剂处理组中, INT、RT 和 RH 的相对表达量大致呈现上升趋势, 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时相对表达量上升, 150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时相对表达量较 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度略微下降, 在 250 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度处理下达到最高值。其中 RT 的相对表达量涨幅最大, 尤其是 250 $\mu\text{mol/L}$ 时远高于其他结构域, 相对于对照组涨了 8.3 倍, 差异极显著; INT 在 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 150 $\mu\text{mol/L}$ 时与 RT 的相对表达量相近, 250 $\mu\text{mol/L}$ 时上升, 但程度低于 RT, 相对 CK 只涨了 4.9 倍, 差异极显著; RH 在 3 个浓度的甲基化抑制剂处理中略微上升, 150 $\mu\text{mol/L}$ 上升最少, 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 250 $\mu\text{mol/L}$ 上升幅度相近, 略大于 150 $\mu\text{mol/L}$, 但相对于其他两个结构域来说, 上升的幅度非常低, 3 个浓度相对于对照组分别上升了 1.6 倍、1.2 倍和 1.6 倍, 差异均不显著 (图 8B)。

在低温处理组中, INT、RT 和 RH 的相对表达量均升高, 其中 INT 升高的幅度最大, 相对于对照组上升了 9.9 倍, 差异极显著, RT 其次, 但升高幅度不大, 只有 1.6 倍, 差异不显著, RH 变化近似于 RT, 只上升 1.2 倍, 同样差异不显著 (图 8C)。而高温处理组中, INT、RT 和 RH 的相对表达量均大幅升高, 上升幅度高于低温处理组, INT 升高的幅度最大, 上升达 11 倍, 差异极显著, 但相较于低温处理结果变化不大, RT 上升幅度虽然次于 INT, 上升达 5 倍, 差异极显著, 但与低温处理组相比, 上升的幅度明显, RH 相较其他两个结构域依旧变化不大, 但也可以明显看出有所上调, 涨幅达 3 倍, 差异极显著 (图 8C)。

在高盐处理组中, INT、RT 和 RH 的相对表达量基本呈现先上升后下降的趋势。在 0.1 mol/L 处理组中, INT、RT 和 RH 的相对表达量达到最高值, 分别达到对照组的 62 倍、5 倍和 52 倍, 在 0.2 mol/L 和 0.3 mol/L 处理组中持续下降, INT 分别下降了 36% 和 57%, RT 下降了 45% 和 75%, RH 分别下降了 62% 和 68%。其中 INT 与 RH 相对表达量变化相近, 远远大于 RT (图 8D)。

3 讨论

本研究通过生物信息学技术和分子生物学手段鉴定一个典型的 LTR 反转录转座子 Ph-LTR2, 该反转录转座子具有转座所需的 6 种酶和高度相似 LTR 的序列, 是一个结构完整的反转录转座子, 且在毛竹笋 cDNA 中检测到其表达, 说明其具有表达活性。Ph-LTR2 的 LTR 序列中富含顺式调控元件, 可能会在一些外界胁迫下激活转座, 可以作为毛竹基因标签开发的候选转座子。

3.1 Ph-LTR2 转座子是一个结构完整、富含顺式调控元件的转座子

毛竹 Ph-LTR2 反转录转座子具有完整的 LTR 序列及转座必需的所有结构域, 包括左端 LTR、6 个酶 (GAG、PR、RT、RH、INT、CHR) 和右端 LTR, 结构完整, 同时经过实验检测, Ph-LTR2 具有转录活性, 这些都表明其可能具备转座能力。

在植物基因组中, 有报道过几百万年内插入的 LTR 转座子还存在活性, 如小麦中的 Wis_116F02-1、水稻中的 Mtr6 和 Mtr76^[21-23]。Ph-LTR2 转座子 5' LTR 长 478 bp, 3' LTR 长 489 bp, 存在 7 个碱基突变, LTR 序列同源为 96.41%, 插入时间约为 61.92 万年。相较于插入时间为几百万年的活性 LTR 转座子来说, Ph-LTR2 转座子还属于非常年轻的转座子, 可能依然具有活性。

Ph-LTR2 的 LTR 序列中富含顺式调控元件, 包括: 3 个核心启动元件 TATA-box, 3 个启动元件 CAAT-box, 1 个茉莉酸甲酯调控元件 CGTGCA-motif, 1 个与生长素相关的调控元件 TGA, 1 个干旱反应元件 MBS, 1 个与脱落酸相关的调控元件 ABRE。而茉莉酸甲酯、脱落酸、生长素调控元件和干旱反应元件与外界环境变化有着重大关联, 因此可能会在一些外界胁迫下激活转座。

3.2 Ph-LTR2 转座子能够响应外界环境变化, 改变 INT、RT 和 RH 的表达模式

1) 细胞 DNA 甲基化与转座子转录活性关系
转座子转录活性与 DNA 甲基化密切相关。DNA 甲基化是生物体应对转座子转座的一种手段, 通过全基因组甲基化分析, 转座子序列更容易被甲基化^[24-25]。转座子在植物内会被甲基化而沉默^[10,26], 在 DNA 甲基转移酶或染色质重塑因子 DDM1 缺失突变体中, 一些转座子被去甲基化而解除阻遏被激活^[27-28]。甲基化水平在植物不同部位与不同时期也不同, 一些生长发育旺盛的部位 DNA 甲基化程度高, 而这些部分转座子活性往往受到抑制, 如种子^[29]、花药^[30]和茎尖^[31]。

本研究的结果显示甲基化抑制剂对 Ph-LTR2 反转录转座子的活性有促进作用。甲基化抑制剂在一定程度上可以降低 DNA 的甲基化^[32], 因此降低基因组的 DNA 的甲基化水平可能可以激活 Ph-LTR2 反转录转座子的转座行为。同时也发现笋期的 Ph-LTR2 反转录转座子的活性被明显抑制, 这可能和笋期这个时期的甲基化水平变化有关。

2) 逆境与转座子转录活性的关系

逆境胁迫会导致植物体内甲基化水平、内源激素水平与离子浓度等各类生理生化水平的改变, 这些改变会导致转座子活性的改变^[5,10,33]。逆境胁迫过程中的生理生化水平改变的是一个整体, 因此虽然部分实验与调控元件关联度不大, 但是无法确定这些胁迫会不会以间接的途径影响转座子的活性, 所以所有的逆境胁迫实验都是必要的。

辐射作为一种现今常用的育种手段, 其对转座子的转座具有一定影响。有研究显示, γ 射线会激活水稻 mPing 等内源转座子转座, 以及导致 DNA 甲基化变异^[34], 本实验结果显示低剂量的辐射会上调 Ph-LTR2 转座子的活性。而随着剂量增加 Ph-LTR2 转座子的活性随之下降, 推测其原因

是高剂量的辐射对植物体的伤害太大, 对植物造成的破坏已经超过植物本身应对能力^[35]。

低温和高温胁迫都是植物常见的胁迫, 这些胁迫会使植物生理发生变化^[36-39]。实验结果显示 Ph-LTR2 转座子 INT、RT 和 RH 的转录水平上调(图 8C), Ph-LTR2 转座子的 LTR 区域含有丰富的顺式调控元件, 不适宜植物生长的温度可能导致毛竹的一些转录因子表达增强, 如抗寒相关转录因子 CBF1、DREB1、MYB 和 WRKY 表达量上升^[40], 这些转录因子有一定几率与 Ph-LTR2 转座子顺式调控元件结合, 调控 Ph-LTR2 转座子结构域转录水平。

植物在盐胁迫下, 体内一氧化氮和茉莉酸积累^[41], 甲基化水平也会降低^[42], 这有一定概率是 Ph-LTR2 转座子在不同浓度盐胁迫下 INT、RT 和 RH 均有不同程度升高的原因(图 8D), 这些变化在某种程度上导致 Ph-LTR2 转座子活性的改变。

4 结论

本研究通过对 Ph-LTR2 的结构、进化及不同胁迫下的表达量进行研究, 发现 Ph-LTR2 的活性具有组织特异性, 且会被甲基化抑制剂激活, 证明 Ph-LTR2 在植物体中会因甲基化而沉默, 同时在高盐、高温、低温和辐射胁迫下活性均有上升, 证明胁迫会促进 Ph-LTR2 转座, 这可能与这些胁迫会导致甲基化水平改变有关。而数量众多的顺式作用元件也从另一个角度证明 Ph-LTR2 是一个对外界环境变化敏感的反转录转座子。

REFERENCES

- [1] Llorens C, Futami R, Covelli L, et al. The Gypsy Database (GyDB) of mobile genetic elements: release 2.0. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(D1): D70-D74.
- [2] Vitte C, Panaud O, Quesneville H. LTR retrotransposons in rice (*Oryza sativa*, L.): recent burst amplifications followed by rapid DNA loss.

- BMC Genomics, 2007, 8(1): 218.
- [3] Eickbush TH, Jamburuthugoda VK. The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases. *Virus Res*, 2008, 134(1/2): 221–234.
- [4] Liang LL, Zhou MB. Plant active LTR retrotransposons: a review. *Chin J Biotech*, 2016, 32(4): 409–429 (in Chinese).
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. *生物工程学报*, 2016, 32(4): 409–429.
- [5] Finatto T, de Oliveira AC, Chaparro C, et al. Abiotic stress and genome dynamics: specific genes and transposable elements response to iron excess in rice. *Rice*, 2015, 8(1): 13.
- [6] Feng G, Leem YE, Levin HL. Transposon integration enhances expression of stress response genes. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(2): 775–789.
- [7] Ito H, Gaubert H, Bucher E, et al. An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature*, 2011, 472(7341): 115–119.
- [8] Wang D. Heritable alterations in DNA methylation pattern and mobilization of transposon induced by laser irradiation in Jijing88[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2011 (in Chinese).
王丹. 激光辐射诱导水稻吉粳 88 号可遗传 DNA 甲基化变异和转座子转座激活的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
- [9] Takeda S, Sugimoto K, Otsuki H, et al. A 13-bp *cis*-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon *Tto1* is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors. *Plant J*, 1999, 18(4): 383–393.
- [10] Saze H, Kakutani T. Differentiation of epigenetic modifications between transposons and genes. *Curr Opin Plant Biol*, 2011, 14(1): 81–87.
- [11] Peng ZH, Lu Y, Li LB, et al. The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*). *Nat Genet*, 2013, 45(4): 456–461.
- [12] Hu T, Ma YJ, Li XP, et al. Identification and evolutionary study of full-length LTR-retrotransposons in moso bamboo genome. *Mol Plant Breed*, 2014, 12(6): 1265–1274 (in Chinese).
胡陶, 马艳军, 李雪平, 等. 毛竹全长 LTR 逆转座子的鉴定和进化分析. *分子植物育种*, 2014, 12(6): 1265–1274.
- [13] Zhou M, Tang DQ, Zhou MB. Cloning, characterization and phylogenetic analysis of a typical long terminal repeat retrotransposon in *Phyllostachys heterocycla* cv. *pubescens*. *J Bamboo Res*, 2014, 33(3): 1–10 (in Chinese).
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. *竹子研究汇刊*, 2014, 33(3): 1–10.
- [14] Zhou M. Cloning, identification and analysis characteristics of LINEs and Ty3-gypsy retrotransposons from bamboo[D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2014 (in Chinese).
周敏. 竹子 LINEs、Ty3-gypsy 类转座子的克隆、鉴定及特性分析[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2014.
- [15] Yang Y, Huang YW, Luo SP, et al. Effects of NaCl stress on chlorophyll fluorescence and physiological characteristics of moso bamboo seedlings. *J Bamboo Res*, 2010, 29(1): 29–32, 35 (in Chinese).
杨洋, 黄业伟, 罗淑萍, 等. NaCl 胁迫对毛竹幼苗叶绿素荧光特性及生理指标的影响. *竹子学报*, 2010, 29(1): 29–32, 35.
- [16] Liu LL, Chen L, Zhang CY, et al. Characterization of two LEA genes and their response to abiotic stresses in wheat. *Sci Agric Sin*, 2014, 47(19): 3736–3745 (in Chinese).
刘露露, 陈雷, 张春艳, 等. 两个小麦 LEA 基因的特征及其对非生物胁迫的响应. *中国农业科学*, 2014, 47(19): 3736–3745.
- [17] Zhou MB, Hu BJ, Zhu YH. Genome-wide characterization and evolution analysis of long terminal repeat retroelements in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Tree Genet Genom*, 2017, 13(2): 43.
- [18] Sanmiguel P, Gaut BS, Tikhonov A, et al. The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat Genetics*, 1998, 20(1): 43–45.
- [19] Ma JX, Jackson SA. Retrotransposon accumulation and satellite amplification mediated by segmental duplication facilitate centromere expansion in rice. *Genome Res*, 2006, 16(2): 251–259.
- [20] Qi FY, Hu T, Peng ZH, et al. Screening of reference

- genes used in qRT-PCR and expression analysis of *PheTFL1* gene in Moso Bamboo. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2013, 33(1): 48–52 (in Chinese).
- 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. *西北植物学报*, 2013, 33(1): 48–52.
- [21] Ma J, Bennetzen JL. Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(34): 12404–12410.
- [22] Sanmiguel PJ, Ramakrishna W, Bennetzen JL, et al. Transposable elements, genes and recombination in a 215-kb contig from wheat chromosome 5A^m. *Funct Integr Genomics*, 2002, 2(1/2): 70–80.
- [23] Liu JS, Hao W. LTR retrotransposon landscape in *Medicago truncatula*: more rapid removal than in rice. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 382.
- [24] Lippman Z, Gendrel AV, Black M, et al. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*, 2004, 430(6998): 471–476.
- [25] Zhang XY, Yazaki J, Sundaresan A, et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*, 2006, 126(6): 1189–1201.
- [26] Willing EM, Rawat V, Mandáková T, et al. Genome expansion of *Arabis alpina* linked with retrotransposition and reduced symmetric DNA methylation. *Nat Plants*, 2015, 1(2): 14023.
- [27] Miura A, Yonebayashi S, Watanabe K, et al. Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature*, 2001, 411(6834): 212–214.
- [28] Singer T, Yordan C, Martienssen RA. Robertson's *Mutator* transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene *Decrease in DNA Methylation (DDM1)*. *Genes Dev*, 2001, 15(5): 591–602.
- [29] Feng S, Jacobsen SE, Reik W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*, 2010, 330(6004): 622–627.
- [30] Slotkin RK, Vaughn M, Borges F, et al. Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell*, 2009, 136(3): 461–472.
- [31] Tamaki S, Tsuji H, Matsumoto A, et al. FT-like proteins induce transposon silencing in the shoot apex during floral induction in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(8): E901–E910.
- [32] Liu QX. DNA methylation research of *Oryza sativa* (*Nipponbare*) after treated with 5-Aza-2'-deoxycytidine[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014 (in Chinese).
- 刘秋香. DNA 甲基化抑制剂 5-Aza-2'-deoxycytidine 处理后水稻的 DNA 甲基化研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [33] Zhou ZB. Expressive activity of retrotransposon *atrl* by stresses and the effect in *fanchangchang jujube* by phytoplasma[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- 周张彬. 逆转座子 *atrl* 胁迫诱导表达活性研究及植原体对繁昌长枣的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2014.
- [34] Jiang LL. Mobilization of transposons *mPing* and *pong* and alterations in DNA methylation induced by γ irradiation in rice[D]. Harbin: Northeast Normal University, 2008 (in Chinese).
- 姜丽丽. γ 射线诱导水稻转座子 *mPing* 及 *Pong* 的激活和 DNA 甲基化的变异[D]. 哈尔滨: 东北师范大学, 2008.
- [35] Wang XX. Biological effects induced on moso seed by ⁶⁰Coy-irradiation[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- 王新新. ⁶⁰Coy 射线辐照毛竹种子的生物学诱变效应[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [36] Rao YC, Yang YL, Huang LC, et al. Research progress on cold stress in rice. *Mol Plant Breed*, 2013, 11(3): 443–450 (in Chinese).
- 饶玉春, 杨窑龙, 黄李超, 等. 水稻耐冷胁迫的研究进展. *分子植物育种*, 2013, 11(3): 443–450.
- [37] Yu XC, Xing YX, Ma H, et al. Changes of hormone in grafted and non grafted cucumber seedlings under low temperature stress. *Acta Hortict Sin*, 1999, 26(6): 406–407 (in Chinese).
- 于贤昌, 邢禹贤, 马红, 等. 低温胁迫下黄瓜嫁接苗和自根苗内源激素的变化. *园艺学报*, 1999, 26(6): 406–407.
- [38] Shen Man. Preliminary study on the relations between membrane permeability, endogenous hormones and cold resistance of ivy. *Acta Hortict*

- Sin, 2005, 32(1): 141–144 (in Chinese).
沈漫. 常春藤质膜透性和内源激素与抗寒性关系初探. 园艺学报, 2005, 32(1): 141–144.
- [39] Song Y, Cui XS, Chen JJ, et al. The profiling of eleven phytohormones in *Pyropia haitanensis* under different high-temperature environments. *J Fish China*, 2017, 41(10): 1578–1587 (in Chinese).
宋悦, 崔晓山, 陈娟娟, 等. 不同高温胁迫条件下的坛紫菜中植物激素分析. 水产学报, 2017, 41(10): 1578–1587.
- [40] Feng FM, Shi SJ, Cao Y, et al. Effects of chilling and freezing stress on the physiological metabolism and the expression of cold-related transcription factors in seedlings of *Phyllostachys heterocyclus* cv. *Pubescens*. *J Bamboo Res*, 2014, 33(2): 29–33 (in Chinese).
冯芳敏, 史世京, 曹颖, 等. 冷冻胁迫对毛竹幼苗生理代谢及抗寒相关转录因子表达的影响. 竹子研究汇刊, 2014, 33(2): 29–33.
- [41] Li J, Chen K, Tang J, et al. Relationship between nitric oxide and JA accumulation in maize seedling under NaCl stress. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2008, 28(8): 1629–1636 (in Chinese).
李杰, 陈康, 唐静, 等. NaCl 胁迫下玉米幼苗中一氧化氮与茉莉酸积累的关系. 西北植物学报, 2008, 28(8): 1629–1636.
- [42] Lu XK, Wang DL, Yin ZJ, et al. Genomic DNA methylation polymorphism analysis of cotton under NaCl and Na₂CO₃ stress. *Sci Agrict Sin*, 2014, 47(16): 3132–3142 (in Chinese).
陆许可, 王德龙, 阴祖军, 等. NaCl 和 Na₂CO₃ 对不同棉花基因组的 DNA 甲基化影响. 中国农业科学, 2014, 47(16): 3132–3142.

(本文责编 郝丽芳)