

文章编号:1000-8551(2020)04-0705-09

毛竹 LTR 反转录转座子 *PHRE8* 的鉴定 与转录模式分析

季航¹ 周明兵^{1,2,*} 蒋政勤¹ 郑浩¹ 徐芷馨¹¹浙江农林大学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创新中心,浙江 杭州 311300)

摘要: LTR 反转录转座子是植物基因组中重要的组成部分,可作为遗传工具在生物学研究上发挥重要作用。为探究毛竹中具有潜在活性的 LTR 反转录转座子,解析 LTR 反转录转座子转座激活机制,本研究从毛竹基因组中克隆 1 条典型的 LTR 反转录转座子序列,命名为 *PHRE8*,系统地分析了 *PHRE8* 的结构特征、插入特性和进化关系,并利用荧光定量 PCR 检测 *PHRE8* 在 DNA 甲基化抑制剂(5-氮杂胞苷)、辐射、高温、低温、高盐逆境胁迫下的转录水平。结果表明,*PHRE8* 属于 Ty3-gypsy 超家族,全长 5 296 bp,具有完整的 *GAG* 与 *POL* 结构域,插入时间约为 123.07 万年,是具有理论潜在活性的转座子;在不同胁迫处理下,与野生实生苗相比,*PHRE8* 的相对表达量均有所增加,猜测 *PHRE8* 在不同胁迫条件下,会激发其转录活性,影响宿主基因组结构和基因表达模式的变化,以适应外界环境改变。本研究结果为进一步探究毛竹基因组中活性转座子的功能奠定了一定的理论基础。

关键词: LTR 反转录转座子; 活性; 荧光定量 PCR; 逆境胁迫; 转录水平

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.04.0705

植物 LTR 反转录转座子主要由长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)、引物结合位点(primer binding site, PBS)、种属特异抗原(retrotransposon gag protein, *GAG*)基因、聚合酶(polymerase, *POL*)基因、多嘌呤序列(polypurinetrait, PPT)等构成^[1]。其中 LTR 为末端反向重复序列,包含了转录的起始和终止信号,通常含有较为丰富的顺式调控元件,不编码蛋白质, PBS 位于 5' 端 LTR 下游,当转座子发生转座时,与 tRNA 结合引导 cDNA 负链的生成, *GAG*、*POL* 基因属于编码区基因,编码与转座子复制和转座有关的酶类,结构与反转录的病毒结构相似, PPT 位于 3' 端 LTR 上游,作为引物引导第二条 cDNA 链的合成^[1-3]。 *POL* 基因中包含蛋白质水解酶基因(pepsin-like aspartate proteases, *PR*)、反转录酶基因(reverse transcriptases, *RT*)、RNA 酶基因(ribonuclease H, *RH*)及整合酶基因(integrase, *INT*)^[4]。依据 *POL* 基因中所编码的蛋白质

顺序, LTR 反转录转座子又分为 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 2 个超家族^[5]。这 2 类转座子的区别主要体现在 *INT* 基因的位置上^[6]。

研究表明,转座子长末端重复序列便于设计引物且易于跟踪,插入位点的多态性提供了生物突变的可能,基于反转录转座子插入的分子标记技术不断被开发应用^[7]。Woodrow 等^[8]根据香桃木基因组数据与 Ty1-copia 家族 *Tmc1* 转座子的特征设计 SSAP 标记引物,很好地区分了 4 个香桃木的供试品种。烟草中反转录转座子 *Ttn1* 通过农杆菌介导转化至大豆植物中,利用插入突变的特性,将 *Ttn1* 作为基因标签,研究大豆植物中编码重要农艺性状的基因^[9]。但有研究发现,大多数已知的 LTR 反转录转座子均处于静默的状态,一部分由于在漫长的植物基因进化过程发生基因突变,丧失了转座功能,因此被称为“退化的转座子”;另一部分则是由于生物为维持基因的稳定性通过

收稿日期:2018-10-08 接受日期:2019-02-24

基金项目:国家自然科学基金项目(31870656,31470615),浙江自然科学基金重点项目(LZ19C160001),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:季航,男,主要从事生物学研究。E-mail:1290362236@qq.com

* 通讯作者:周明兵,男,教授,主要从事毛竹生长发育研究。E-mail:zhoumingbing@zafu.edu.com

DNA 甲基化的修饰调控手段而导致了转座子沉默^[10]。然而,当植物所处环境条件发生改变时,一些具备转座条件的反转录转座子会被激活,发生转座并插入靶基因中,且会影响插入位点相邻基因的表达^[11]。如 Butelli 等^[12]发现反转录转座子 *Copia*-like 可在血橙处于低温条件下提升转录活性,影响调控花青苷相关基因的表达,促进花青苷的合成,使果实呈红色;蔡华等^[13]研究小麦远缘杂交不亲和的主效基因 *Kr1* 时发现,玉米转座子的插入导致在小麦及其与玉米的杂交组合中 *Kr1* 基因失活。

毛竹 (*Phyllostachys heterocycla* cv. *Pubescens*) 为禾本科刚竹属单轴散生型常绿乔木状竹类植物,是我国栽培历史最悠久、面积最广、经济价值最高的竹种之一,因此探寻毛竹中的丰富基因资源具有重要意义^[14]。目前已有关于毛竹基因表达调控方面的研究报道,王思雨等^[15]在毛竹转录因子 NF-Y 家族基因的鉴定和表达分析中发现,该家族基因参与了毛竹根的生长、笋的发育、开花的调控、光合作用与叶绿体发育的调控。LTR 反转录转座子在毛竹基因组中含量丰富,在基因表达调控发挥了重要作用^[16]。但关于毛竹 LTR 反转录转座子转座激活机制的研究尚鲜见报道。因此,获得活性 LTR 反转录转座子,解析 LTR 反转录转座子转座激活机制,可作为竹子诱变育种的遗传工具。通过对毛竹基因组上的 LTR 反转录转座子筛选,克隆 1 条典型的 LTR 反转录转座子序列,命名为 *PHRE8*。本试验通过对 *PHRE8* 的结构、分布进化以及转录激活模式进行系统研究,旨在探讨 *PHRE8* 的活性激活机制,为挖掘出更多的毛竹活性转座子资源奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用毛竹种子均取自广西灵川县同一株开花毛竹,从中选取大小一致、发育良好的种子并播种培育成实生苗。

1.2 试验设计

1.2.1 对照(CK)处理 将野生型毛竹种子先用蒸馏水冲洗 1 遍,再用 70%酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 3 次。用无菌蒸馏水浸种 24 h。随后在黑暗条件(25℃)下置于无菌的双层滤纸上萌发,并保持充足的水分。种子萌发出胚芽后移栽至温室的营养土中培养,保持水分充足。营养土的配比为珍珠岩:泥炭土:蛭石=1:1:1。待长至 5~6 片叶子后取该处理实生苗的

叶片迅速用液氮速冻,-80℃保存备用。

1.2.2 DNA 甲基化抑制剂处理 将野生型毛竹种子先用蒸馏水冲洗 1 遍,再用 70%酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 3 次。用浓度分别为 50、150 和 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 5-氮杂胞苷浸种 24 h。随后在黑暗条件(25℃)下置于无菌的双层滤纸上萌发,期间持续使用 5-氮杂胞苷处理。种子萌发出胚芽后移栽至温室培养,条件同对照处理。待长至 5~6 片叶子后取该处理实生苗的叶片迅速用液氮速冻,-80℃保存备用。

1.2.3 辐射、高盐、高温、低温处理 选取长势一致、发育良好的毛竹实生苗分别作以下处理:在辐射剂量率为 1 $\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$,辐射剂量分别为 30、50 和 70 Gy 的 ¹³⁷Cs- γ 射线下进行辐射处理;用浓度分别为 0.1、0.2 和 0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液浇灌 72 h;42℃培养箱中培养 4 h;4℃培养箱中培养 16 h。分别取每处理实生苗的叶片迅速用液氮速冻,-80℃保存备用。

1.3 *PHRE8* 的生物信息学分析

1.3.1 结构鉴定与元件分析 在 <http://www.bamboogdb.org/> 中下载毛竹基因组数据,利用 LTRharvest 软件^[17]鉴定毛竹基因组 LTR 反转录转座子;利用 LTRdigestion 软件^[18]解析毛竹 LTR 反转录转座子结构,并剔除假阳性;利用 cd-hit 软件^[19]分析毛竹 LTR 反转录转座子的拷贝数。根据毛竹 LTR 反转录转座子结构的完整性和拷贝数,选取一个结构完整的 LTR 反转录转座子作为研究对象,将其命名为 *PHRE8*。*PHRE8* 各个结构域由 LTRdigestion 软件鉴定,并由此画出 *PHRE8* 及拷贝序列的结构图,由编码区序列翻译的氨基酸序列通过 NCBI 上的 BLAST 比对确认。转座子的转座诱导与启动子有关,有活性的转座子 5'端 LTR 的 U3 结构域存在较多的顺式调控元件,利用 PlantCARE 在线软件分析 *PHRE8* 的 LTR 序列上的顺式作用元件。

1.3.2 插入时间的估算 通过 LTR 反转录转座子 LTR 部分的相似性与宿主的核酸替换速率估算插入时间,在最初的 LTR 反转录转座子进行反转录时,其两端的 L-LTR 和 LTR-R 由同一个模版合成,因此 LTR 部分的同源性为 100%,但是随着植物基因组的变化,LTR 部分会发生不同程度的分化,导致同源性下降,根据宿主核酸的替换速率,计算插入时间^[20]。利用 MEGAX 软件^[21]比对 *PHRE8* 两端 LTR 序列的同源性,求分化度 K。插入时间计算公式如下:

$$T = K/2r \quad (1)$$

式中,T 为插入时间;K 为分化度;r 为 LTR 序列的平均替换率,约 1.3×10^{-8} bp/年^[22]。

1.3.3 进化关系分析 在 Gypsy Database (http://www.gydb.org/index.php/Main_Page) 下载 Ty3-gypsy 家族 (Reina 亚家族的 Gloin、Gimli 和 Reina, CRM 亚家族的 Beetle1 和 Cereba, G-Rhodo 亚家族的 G-Rhodo, Galadriel 亚家族的 Tntom1 和 Galadriel, REM1 亚家族

的 REM1, Del 亚家族的 Tma、Del 和 Retrosat-2) 转座子 RT 氨基酸序列 (表 1), 与 *PHRE8* 的 RT 氨基酸序列比对, 利用 MEGA6 软件中的邻接法 (Neighbor-Joining) 构建进化树, 分析其所属转座子家族。

表 1 植物典型 LTR 反转录转座子信息

Table 1 The information of typical plant LTR retrotransposon

名称 Name	Genbank 检索号 Genbank accession number	宿主 Organism	家族 Family
<i>Gloin</i>	AC007188	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	Ty3-gypsy
<i>Gimli</i>	AL049655	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	Ty3-gypsy
<i>Reina</i>	U69258	玉米 <i>Zea mays</i>	Ty3-gypsy
<i>Beetle1</i>	AJ539424	甜菜根 <i>Beta vulgaris</i>	Ty3-gypsy
<i>Cereba</i>	AF078801	大麦 <i>Hordeum vulgare</i>	Ty3-gypsy
<i>G-Rhodo</i>	114386440	角毛藻 <i>Rhodomonas salina</i>	Ty3-gypsy
<i>Tntom1</i>	AJ508603	烟草 <i>Nicotiana tomentosiformis</i>	Ty3-gypsy
<i>Galadriel</i>	AF119040	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	Ty3-gypsy
<i>REM1</i>	29423675	莱茵衣藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Ty3-gypsy
<i>Tma</i>	AC005398	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	Ty3-gypsy
<i>Del</i>	X13886	百合 <i>Lilium henryi</i>	Ty3-gypsy
<i>Retrosat-2</i>	AF111709	水稻 <i>Oryza sativa</i>	Ty3-gypsy

1.4 *PHRE8* 的表达量检测

1.4.1 毛竹基因 RNA 的提取 在低温条件下, 取各处理实生苗叶片, 采用 Trizol 法^[23] 提取 RNA, 利用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 [TaKaRa (日本) 公司] 反转录成 cDNA, -20℃ 保存备用。

1.4.2 实时荧光定量 PCR 分析 对 *PHRE8* 的 *POL* 基因部分的 *RT*、*RH*、*INT* 保守区域段设计引物 (表 2)。以毛竹 *PheACT2-1*^[24] 作为内参基因, 对在不同逆境胁迫下 *PHRE8* 的 *RT*、*RH* 和 *INT* 3 个编码域进行实时荧光定量 PCR 分析。荧光定量 PCR 反应体系 (10 μL): SYBR® Premix Ex Taq™ II 5 μL, cDNA 0.8 μL, 上下游引物各 0.4 μL, 无菌水 3.4 μL。反应程序: 95℃ 预变性 7 min, 95℃ 变性 10 s, 58℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 15 s, 30 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 法^[25] 计算 3 个结构域在不用处理下的基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *PHRE8* 的序列分析

2.1.1 *PHRE8* 及其拷贝的结构 *PHRE8* 全长 5 297 bp, 包括两端的 LTRs 区域和 1 个较长的开放阅

表 2 引物序列

Table 2 The sequences of primers

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
<i>PheACT2-1F</i>	GATCGAGCATGCTATTGTTAGCA
<i>PheACT2-1R</i>	TTGTACGTCCTCCACTGGCAGATAGG
<i>PHRE8-INT-F</i>	GTTCCACGGACCTCACAGATA
<i>PHRE8-INT-R</i>	CCTCCCTCCTTGACGACTTA
<i>PHRE8-RT-F</i>	CCTCCCTCCTTGACGACTTA
<i>PHRE8-RT-R</i>	ACAACTAGGCACGATAAAGG
<i>PHRE8-RH-F</i>	GACGACGATGTTGACAGC
<i>PHRE8-RH-R</i>	TGCACGACGATGTTGAGA

读框 (open reading frame, ORF)。右端 LTR 长度为 388 bp, 左端 LTR 长度为 394 bp, 结构顺序依次为 5'-GAG-PR-RT-RH-INT-3', 属于 Ty3-copia 家族成员。编码区含有 4 244 bp 的 ORF, 共编码 1 414 个氨基酸。1 450~1 558 bp 为 GAG 核心区, 1 738~1 969 bp 为 PR 核心区, 2 286~2 955 bp 为 RT 核心区, 3 099~3 444 bp 为 RH 核心区, 3 681~4 590 bp 为 INT 核心区。PBS 序列为 5'-AATCTGGTATCAGAGCTAGATTCGG-3',

位于5'端LTR下游。PPT的序列为5'-ACCGTACAGG TATCCTCAGTTGCAA-3',位于3'端LTR上游。利用cd-hit软件鉴定出PHRE8的其他5个拷贝,将各个拷贝进行命名(表3)。LTRdigestion鉴定5个拷贝均具有完整的结构(图1)。

表3 PHRE8及其拷贝的命名

Table 3 Naming of PHRE8 and its copies

拷贝名称 Copy name	拼接序列 Scaffold	序列区 Suquence region
PHRE8	PH01000001	649882~655178
PHRE8-1	PH01000685	50832~55982
PHRE8-2	PH01001014	521207~526369
PHRE8-3	PH01002289	4784~10051
PHRE8-4	PH01003755	1596533~1601804
PHRE8-5	PH01000685	129794~135063

1.2.2 PHRE8及其拷贝的插入时间对比 比对PHRE8两端LTR序列的同源性得到分化度K为0.032。利用相同方法得到PHRE8其他5个拷贝的分化度K依次为0.039(PHRE8-5)、0.038(PHRE8-4)、0.016(PHRE8-3)、0.047(PHRE8-2)和0.051(PHRE8-1)。通过式(1)计算PHRE8的插入时间为123.07万年前,PHRE8其他5个拷贝插入时间依次为150.00万年前(PHRE8-5)、146.15万年前(PHRE8-4)、146.15万年前(PHRE8-3)、180.77万年前(PHRE8-2)和196.15万年前(PHRE8-1)。比对其他拷贝PHRE8的插入时间较晚,因此PHRE8理论上存在转录活性的可能性更高(图2)。

1.2.3 PHRE8的顺式作用元件分析 通过在线软件PlantCARE分析了LTR部分所包含的顺式作用元件(图3)。LTR部分富含顺式作用元件,如启动子和增强子区域中常见的顺式作用元件CAAT-box,光响应顺式作用元件GA-motif,光响应顺式作用元件TCCC-motif等。

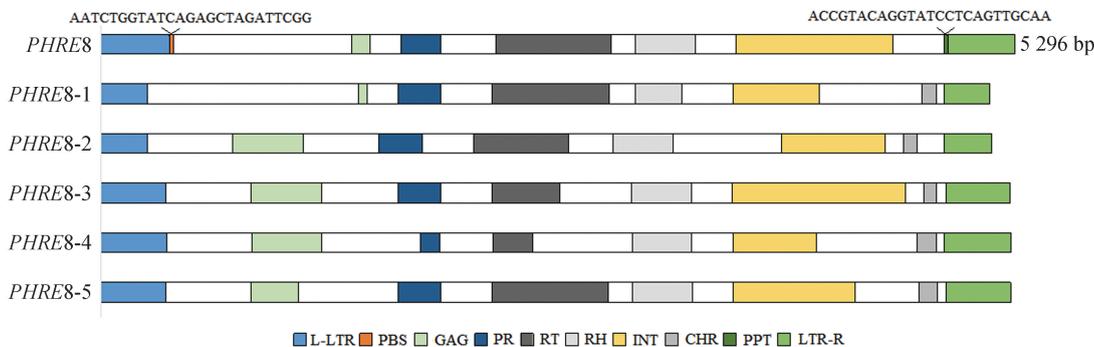


图1 PHRE8及其拷贝的结构

Fig.1 Structure of PHRE8 and its copies

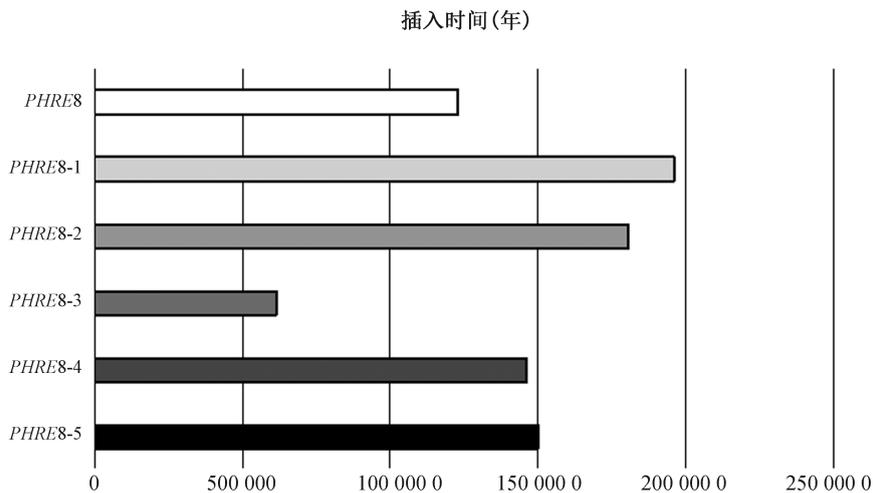
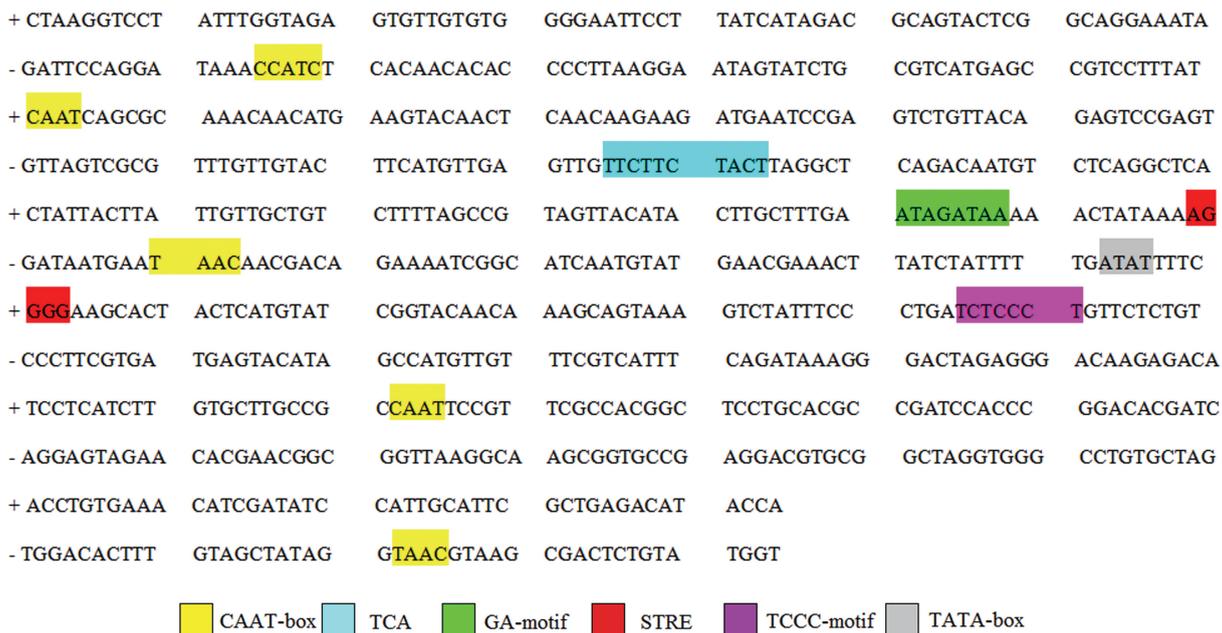


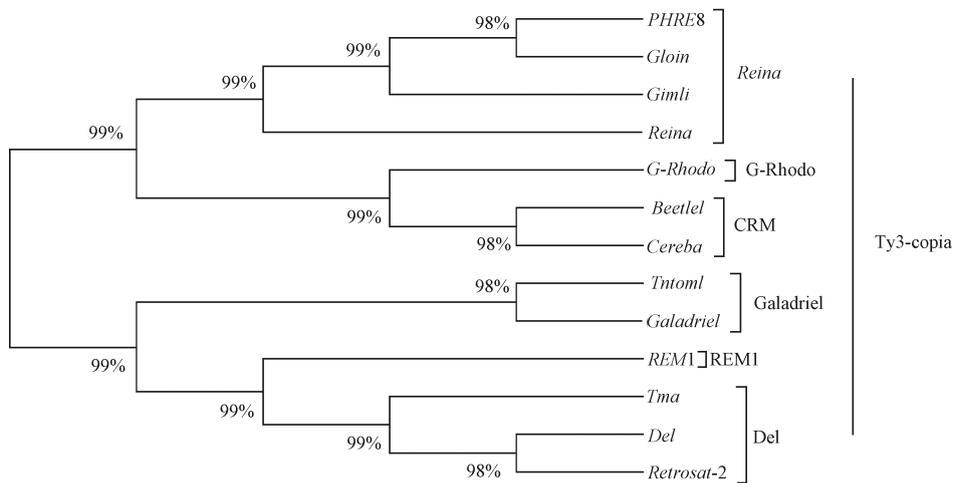
图2 PHRE8及其拷贝的插入时间

Fig.2 Insertion time of PHRE8 and its copies

图 3 *PHRE8* LTR 序列的顺式作用元件分析Fig.3 The analysis of cis-regulatory motifs in LTR sequences of *PHRE8*

1.2.4 *PHRE8* 进化关系分析 为分析 *PHRE8* 与其他转座子之间的相似性及进化关系,利用其他已知典型的 LTR 反转录转座子的 RT 区域氨基酸序列

(表 1)与 *PHRE8* 的 RT 区域氨基酸序列进行比对,构建进化树。结果表明,转座子 *PHRE8* 属于 *Reina* 分支,其与 *Gloin* 的同源性最高(图 4)。

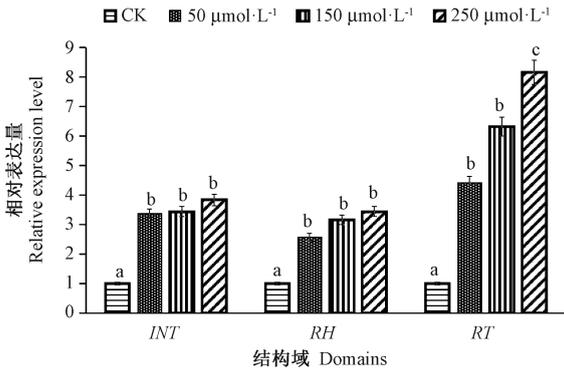
图 4 *PHRE8* 的进化关系分析Fig.4 Analysis of the evolutionary relationship of *PHRE8*

2.2 *PHRE8* 在不同胁迫处理下 3 个结构域的表达模式

2.2.1 DNA 甲基化抑制剂处理对结构域表达量的影响 由图 5 可知,*INT*、*RH* 和 *RT* 3 个结构域的表达量相对于野生型实生苗均显著提升。*RH* 与 *INT* 结构域相对表达量在各浓度梯度均低于 *RT* 结构域,且随着 DNA 甲基化抑制剂浓度的增加,*RH* 和 *INT* 处理组间相对表达

量均差异不显著。随着 DNA 甲基化抑制剂浓度的增加,*RT* 结构域相对表达量增幅较大,在 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下的相对表达量显著高于其他两个浓度。

2.2.2 不同辐射处理对结构域表达量的影响 由图 6 可知,与野生实生苗相比,不同辐射处理各个结构域的相对表达量均有所提升。其中 *INT* 和 *RT* 结构域的



注:不同小写字母表示相同处理下不同剂量间差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences at 0.05 level between different radiation dose under the same treatment. The same as following.

图5 DNA甲基化抑制剂处理下 *PHRES* 结构域的表达水平

Fig.5 Expression level of domains of *PHRES* under DNA methylation inhibitor treatments

相对表达量均在 30 Gy 处理下达到最大值,继续增加辐射剂量其相对表达量呈下降趋势,尤其在 70 Gy 处理下,相对表达量与野生实生苗均无显著差异。*RH* 结构域的相对表达量随着辐射剂量的增加呈缓慢上升的趋势,但各辐射剂量下无显著差异。

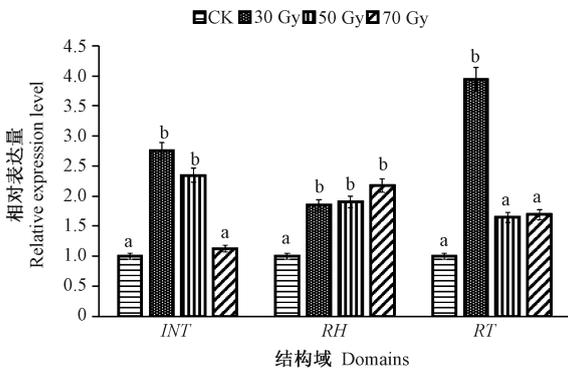


图6 辐射处理下 *PHRES* 结构域的表达水平

Fig.6 Expression levels of domains of *PHRES* under irradiation treatments

2.2.3 低温和高温胁迫处理对结构域表达量的影响

由图7可知,在4℃低温与42℃高温胁迫处理下,3个结构域相对表达量均显著高于野生实生苗。在 *INT* 与 *RT* 结构域中,42℃高温胁迫处理下的相对表达量显著高于4℃低温胁迫处理。*INT* 结构域相对表达量在4℃低温与42℃高温胁迫处理下均高于 *RH* 和 *RT* 结构域。此外,4℃低温和42℃高温处理下 *RH* 结构域

的相对表达量均最低,且处理间无显著差异。

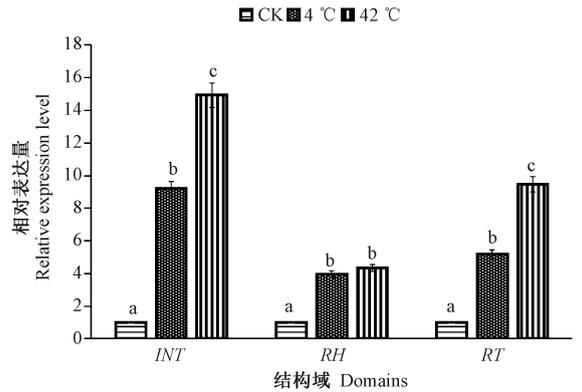


图7 高温和低温处理下 *PHRES* 结构域的表达水平

Fig.7 Expression levels of domains of *PHRES* under high and low temperature treatments

1.2.4 高盐胁迫处理对结构域表达量的影响 由图8可知,在高盐处理下,3个结构域的相对表达量与野生型实生苗相比都有显著提升。*INT* 结构域相对表达量随着 NaCl 浓度的增加呈先增加后降低的趋势,在 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理下达到最大值。*RH* 结构域的相对表达量的变化趋势与 *INT* 结构域基本一致,在 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理下,相对表达量达到最大值,之后随着浓度增加,其相对表达量降低,但处理组间差异不显著。*RT* 结构域相对表达量在 0.1 、 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理下均显著高于 $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理。

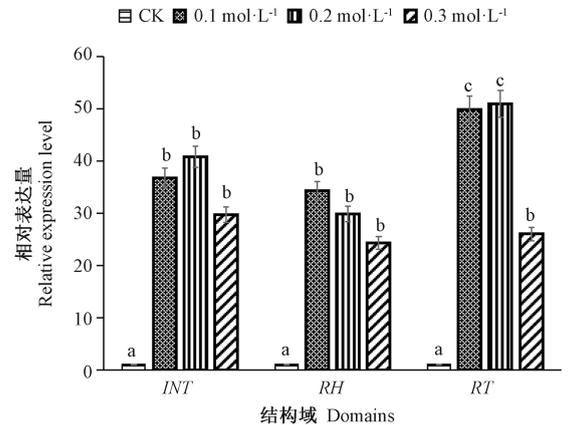


图8 高盐处理下 *PHRES* 结构域的表达水平

Fig.8 Expression levels of domains of *PHRES* under high salt treatment

3 讨论

PHRES 是一个拥有完整结构的 LTR 反转录转座

子,包括长末端重复序列、GAG 蛋白核心区、PR 蛋白酶核心区、RT 核心区、RH 核心区、INT 结构域、PBS 多嘌呤序列与 PPT 引物结合位点^[1],根据 *POL* 基因中 *PR*、*RT*、*RH*、*INT* 核心区的位置顺序,推测 *PHRE8* 属于 Ty3-gypsy 家族成员。*PHRE8* 的插入时间为 123.07 万年,与插入时间为 700 万年的活性 *Tos17* 反转录转座子相比,*PHRE8* 是一个相对年轻的转座子,考虑到该转座子及其拷贝的结构均完整,*PHRE8* 很可能是一个具有潜在活性的反转录转座子。

本研究发现 *PHRE8* 的 3 个结构域 (*INT*、*RH* 和 *RT*) 在 DNA 甲基化抑制剂、辐射、高盐、低温和高温处理后,其核心结构域呈现出不同情况的表达量变化,说明 *PHRE8* 是一个具有转录活性的 LTR 反转录转座子,在受到胁迫时通过改变其转录水平适应环境改变。

研究表明,在一些非生物胁迫下如高温、低温、高盐、重金属等,植物能够通过复杂的基因调控机制适应各种环境变化,如引起 DNA 甲基化水平的变化^[26]、激活转座子^[27]等。激光辐射、高压诱导、远缘杂交等均可导致水稻中较常见转座子 *mPing* 的激活^[28-30]。在植物中,DNA 甲基化作为一种修饰调控手段,可直接干扰转录因子与启动子识别序列结合,也可形成特异的转录抑制物调控基因表达,还可通过改变染色质的结构抑制基因的转录表达,在基因表达调控中发挥重要的作用^[31]。毛竹基因组中非编码基因存在着多个具备转座能力的转座子,DNA 甲基化会影响转座子的活性表达。如庄婷婷^[32]采用 NO 处理水稻基因组 DNA,发现其能够定向诱导水稻基因发生一定程度 DNA 去甲基化变异,同时有一些转座子的转座活性被激活,说明转座子的激活与 DNA 去甲基化有一定的联系。本研究采用不同浓度的甲基化抑制剂对实生苗进行处理,结果发现植物发生了不同程度的 DNA 去甲基化变异,*PHRE8* 的 3 个结构域的相对表达量均增加,因此降低 DNA 甲基化程度可能会激发 *PHRE8* 的潜在转座活性。

王静子等^[33]利用 γ 射线在分子水平上辐射水稻基因组,结果表明其可诱导全基因组低 DNA 甲基化,还能激活转座子 *mPing* 及其转座伙伴 *Pong*^[34]。本研究中,与野生实生苗相比,毛竹经 30、50、70 Gy 辐射处理后 *PHRE8* 相对表达量均增加,说明 *PHRE8* 的转座活性被激发。其原因可能是由于辐射处理引起了 *PHRE8* DNA 甲基化变异,导致其相对表达量升高。随着辐射剂量的增加,*PHRE8* 相对表达量有所下降,其原因可能是过强的辐射导致植物细胞结构破坏或物化活性损伤,影响了植物的胁迫反应机制^[35]。

温度是调控植物生长发育和分布最重要的因素之一^[36-37]。本研究中,毛竹实生苗在高温 42℃ 与低温 4℃ 处理下,*PHRE8* 中 3 个结构域的相对表达量均有所升高,且 *PHRE8* 在高温处理下相对表达量更高,说明毛竹实生苗对高温更敏感。当植物受到高温、重金属等刺激时,可诱导调节应激反应,保护机体防止细胞损伤的热激蛋白质的产生^[38]。*PHRE8* 中含有与温度有关的顺式作用元件,且毛竹中也含有热激蛋白 *HSP20*、*HSP70*、*HSP90* 基因^[39],猜测在极端温度下,*PHRE8* 的激活会影响毛竹热激蛋白的合成与运输,是植物极端温度应答的一部分。

王萌^[40]在小麦盐胁迫应答机制的研究中发现,参与盐胁迫下的应答基因,受到了 DNA 甲基化的修饰调控。也有研究表明,在盐胁迫条件下,转座子会发生转座插入,影响邻近基因的表达^[41]。本研究中,毛竹实生苗经 0.1、0.2、0.3 mol·L⁻¹ NaCl 处理后,*PHRE8* 中 3 个结构域的相对表达量均有所上升,说明该转座子参与了盐胁迫的应答机制,猜测 *PHRE8* 是通过插入影响相邻的盐胁迫应答基因,改变基因表达量以抵御高盐环境胁迫。面对逆境胁迫时,植物基因会发生一些复杂的变化来提高植物在胁迫下的耐受能力。大量研究表明,DNA 甲基化的修饰与调控作用在整个应答机制中占据了主导地位^[42-43]。但逆境胁迫下植物 LTR 反转录转座子转录活性的变化与 DNA 甲基化程度改变的关系和相关调控机制还需进一步更深入的研究。

4 结论

本研究结果表明,毛竹 *PHRE8* 是一个结构域完整、插入时间较晚、富含顺式作用元件的 LTR 反转录转座子,属于 Ty3-gypsy 超家族;*PHRE8* 属于 *Reina* 分支,其与 *Gloin* 的同源性最高;*PHRE8* 在 DNA 甲基化抑制剂(5-氮杂胞苷)、辐射、高温、低温、高盐胁迫处理下,其 3 个结构域的相对表达量都有不用程度的增加,说明 *PHRE8* 有可能参与了毛竹在逆境胁迫下的应答机制。该试验结果为研究毛竹基因组中转座子功能奠定了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] Kumar A, Bennetzen J L. Plant retrotransposons[J]. Annual Review of Genetics, 1999, 33(1):479-532
- [2] 陈志伟, 吴为人. 植物中的反转录转座子及其应用[J]. 遗传, 2004, 26(1):122-126
- [3] 王石平, 张启发. 高等植物基因组中的反转录转座子[J]. 植物学报, 1998, 40(4):291-297

- [4] 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
- [5] Xiong Y, Eickbush T H. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences[J]. *Embo Journal*, 1990, 9(10): 3353-3362
- [6] 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: 35-36
- [7] 李宏, 黄晓天. 高等植物转座子的超家族及其应用[J]. 亚热带植物科学, 2010, 39(3): 93-96
- [8] Woodrow P, Pontecorvo G, Ciarmiello L F. Isolation of Ty1-copia retrotransposon in myrtle genome and development of S-SAP molecular marker[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4): 3409-3418
- [9] Cui Y, Barampura S, Stacey M G, Hancock C N, Findley S, Mathieu M, Zhang Z, Parrott W A, Stacey G. Tnt1 retrotransposon mutagenesis: A tool for soybean functional genomics [J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(1): 36
- [10] 蒋爽, 滕元文, 宗宇, 蔡丹英. 植物 LTR 反转录转座子的研究进展[J]. 西北植物学报, 2013, 33(11): 2354-2360
- [11] Domingues D S, Cruz G M, Metcalfe C J, Nogueira F T, Vicentini R, Alves C S, Sluys M V. Analysis of plant LTR-retrotransposons at the fine-scale family level reveals individual molecular patterns[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 1-14
- [12] Butelli E, Licciardello C, Zhang Y, Liu J, Mackay S, Bailey P, Reforgiato-Recupero G, Martin C. Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges[J]. *Plant Cell*, 2012, 24(3): 1242-1255
- [13] 蔡华, 赵维萍, 许柱, 江伟, 姚运涛, 赵怡然. 普通小麦显性 *Kr1* 和隐性 *kr1* 基因的分子结构差异[J]. 核农学报, 2016, 30(5): 841-849
- [14] 耿伯介, 王正平. 中国植物志第九卷[M]. 北京: 科学出版社, 1996
- [15] 王思雨, 傅鹰, 周明兵. 毛竹 NF-Y 家族基因的鉴定与表达分析[J]. 核农学报, 2018, 32(8): 1513-1527
- [16] Peng Z H, Lu Y, Li L B, Zhao Q, Feng Q, Gao Z M, Lu H Y, Hu T, Yao N, Liu K Y, Li Y, Fan D L, Guo Y L, Li W J, Lu Y Q, Weng Q J, Zhou C C, Zhang L, Huang T, Zhao Y, Zhu C R, Liu X G, Yang X W, Wang T, Miao K, Zhuang C Y, Cao X L, Tang W L, Liu G S, Liu Y L, Chen J, Liu Z J, Yuan L C, Liu Z H, Huang X H, Lu T T, Fei B H, Ning Z M, Han B, Jiang Z H. The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(4): 456-461
- [17] Ellinghaus D, Kurtz S, Willhoeft U. LTRharvest, an efficient and flexible software for *de novo* detection of LTR retrotransposons[J]. *Bmc Bioinformatics*, 2008, 9(1): 1-14
- [18] Steinbiss S, Willhoeft U, Gremme G, Kurtz S. Fine-grained annotation and classification of *de novo* predicted LTR retrotransposons[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(21): 7002
- [19] Li W, Godzik A. Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(13): 1658
- [20] Sanmiguel P, Gaut B S, Tikhonov A P, Nakajima Y, Bennetzen J L. The paleontology of intergene retrotransposons of maize [J]. *Nature Genetics*, 1998, 20(1): 43-45
- [21] Kumar S, Stecher G, Li M, Knayaz C, Tamura K. Mega X. Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549
- [22] Knackstedt M A, Arns C H, Saadatfar M, Senden T J, Limaye A, Sakellariou A, Sheppard A P, Sok R, Schrof W, Steininger H. Elastic and transport properties of cellular solids derived from three-dimensional tomographic images [J]. *Proceedings: Mathematical Physical & Engineering Sciences*, 2006, 462(2073): 2833-2862
- [23] Gao Z M, Li X P, Li L B, Peng Z H. An effective method for total RNA isolation from bamboo [J]. *Chinese Forestry Science and Technology*, 2006, 5(3): 52-54
- [24] 齐飞艳, 胡陶, 彭镇华, 高健. 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
- [25] Livak K T, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [26] 史玉杰, 李庆贺, 刘晓辉. DNA 甲基化与基因表达调控研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(7): 90-96
- [27] Beguiristain T, Grandbastien M A, Puigdomenech P, Casacuberta J M. Three Tnt1 subfamilies show different stress-associated patterns of expression in tobacco. Consequences for retrotransposon control and evolution in plants[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(1): 212-221
- [28] 王大庆. 激光辐射诱导水稻日本晴转座子 mPing 转座激活和可遗传 DNA 甲基化变异研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2009: 12-14
- [29] 龙坤坤. 高压诱导水稻发生可遗传 DNA 甲基化变异和转座子 mPing 及 Pong 的转座激活[D]. 长春: 东北师范大学, 2006: 26-37
- [30] 曹东慧. 水稻与玉米、狼尾草远缘杂交诱发甲基化变异和转座子 mPing 及 Pong 的激活[D]. 长春: 东北师范大学, 2009: 20-25
- [31] 孟彩凤, 周颖. DNA 甲基化对植物生长发育的调控研究[J]. 安徽农学通报, 2015, 21(10): 29-32
- [32] 庄婷婷. NO 胁迫诱导水稻 DNA 甲基化变异及转座子和基因的转录激活[D]. 长春: 东北师范大学, 2008: 17-19
- [33] 王静子, 褚晓源. 低剂量辐射诱导的基因组不稳定性与 DNA 甲基化相关性研究[J]. 医学研究生学报, 2013, 26(8): 855-858
- [34] 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]. 长春: 东北师范大学, 2008: 26
- [35] 高丽美. He-Ne 激光辐射对高羊茅幼苗耐盐性响应的调控及作用机理[D]. 太原: 山西师范大学, 2016: 50-51
- [36] Gunn S, Farrar J F. Effects of a 4°C increase in temperature on partitioning of leaf area and dry mass, root respiration and carbohydrates[J]. *Functional Ecology*, 2010, 13(S1): 12-20
- [37] 方精云. 我国森林植被带的生态气候学分析[J]. 生态学报, 1990, 11(4): 377-387
- [38] 马晨曦, 王磊, 朱保建, 刘朝良, 奥村克纯. 重金属对 HeLa 细胞中热激蛋白 70 (*HSP70*) 表达的影响[J]. 激光生物学报, 2013, 22(2): 136-141

- [39] 张颖. 毛竹花发育4个时期关键调控途径筛选与相关基因研究[D]. 北京:中国林业科学研究院, 2014: 84
- [40] 王萌. DNA甲基化对小麦盐胁迫应答基因的影响研究[D]. 济南:山东大学, 2015: 27-48
- [41] 曾怡锦. 温、热带玉米特异转座子的验证及功能初探[D]. 成都:四川农业大学, 2016: 29-32
- [42] Grativol C, Hemery A S, Ferreira P C. Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1819(2): 176
- [43] Sabbah S, Raise M, Tal M. Methylation of DNA in NaCl-adapted cells of potato [J]. *Plant Cell Reports*, 1995, 14(7): 467-470

Identification and Transcription-Pattern Analysis of *PHRE8* Moso Bamboo LTR Retrotransposon

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

(¹ State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Hangzhou, Zhejiang 311300;

² Zhejiang Provincial Collaborative Innovation Center for Bamboo Resources and High-Efficiency Utilization, Zhejiang A & F University, Hangzhou, Zhejiang 311300)

Abstract: The LTR retrotransposon is an important component of the plant genome and plays an important role in biological research as a genetic tool. In order to explore potentially active LTR retrotransposon in *Phyllostachys edulis* and analyze the transposition activation mechanism of LTR retrotransposon, a typical LTR retrotransposon sequence from *Phyllostachys edulis* genome named *PHRE8* (*Phyllostachys edulis* retrotransposon 8) was cloned in this study, its structural characteristics, insertion characteristics as well as evolutionary relationship were systematically analyzed, and the transcription level of *PHRE8* under DNA methylation inhibitor (5-azacytidine), irradiation, high temperature, low temperature and high salt stress was detected by fluorescent quantitative PCR. The results indicate that the *PHRE8* belongs to the Ty3-gypsy superfamily, has a full length of 5 296 bp with a complete *GAG* and *POL* domain and its insertion time is about 1 230 700 years. *PHRE8* is a theoretically active transposon. Compared with wild seedlings, the relative expression of *PHRE8* under different non-biotic stress increase. It is speculated that *PHRE8* will stimulate transcriptional activity under different stress conditions, which may affect the changes of host genome structure and gene expression patterns to adapt to changes in the external environment. The identification and transcriptional pattern analysis of *PHRE8* laid the theoretical foundation for further exploration of active transposons in *Phyllostachys edulis*.

Keywords: LTR retrotransposon, activity, fluorescent quantitative PCR, adversity stress, transcription level