

中国樱桃 LTR 类反转录转座子反转录酶序列的克隆和分析

刘厚宇^{1,2,3}, 吴敏芳¹, 文晓鹏^{1,*}

(¹ 贵州大学农业生物工程研究院/贵州大学生命科学院, 山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵阳 550025; ² 贵州大学林学院/贵州省森林资源与环境研究中心, 贵阳 550025; ³ 贵州省清镇市农业农村局, 贵州清镇 551400)

摘 要: 利用同源序列法根据 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 类反转录转座子反转录酶保守区设计简并引物, 从中国樱桃 (*Prunus pseudocerasus* Lindl.) 中分别扩增出约 260 和 430 bp 的目标片段, 并进行克隆、测序、序列分析及转录活性检测。共获得 44 条 Ty1-copia 类反转录酶序列, 13 条 Ty3-gypsy 类反转录酶序列, 序列间显示高度异质性, 部分序列存在缺失、终止密码子及移码突变。系统发育树显示 Ty1-copia 可以分为 TAR、Ale 两类, Ty3-gypsy 可以分为 Tat、Reina、Tekay 等 3 类。Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 类反转录酶 dN/dS 值均小于 1, 并且 Ty3-gypsy 高于 Ty1-copia。13 条 Ty1-copia 以及 7 条 Ty3-gypsy 反转录酶序列在樱桃正常生长条件下均有转录活性, 但不受 8 种非生物胁迫的诱导。PpRT7 在高温 (42 °C) 胁迫 24 h 时转录活性升高, 并且具有组织特异性。

关键词: 樱桃; 中国樱桃; Ty1-copia; Ty3-gypsy; 反转录酶; 序列分析; 转录活性

中图分类号: S 662.5

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 02-0355-15

Cloning and Analysis of LTR Reverse Transcriptase from Chinese Cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl.)

LIU Houyu^{1,2,3}, WU Minfang¹, and WEN Xiaopeng^{1,*}

(¹The Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Institute of Agro-bioengineering and College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China; ²Research Center for Forest Resources and Environment of Guizhou Province, College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550025, China; ³Agricultural and Rural Affairs Bureau of Qingzhen, Qingzhen, Guizhou 551400, China)

Abstract: In order to provide fundamental clue for genetic evolution and variation mechanism, the reverse transcriptase gene fragments of Ty1-copia and Ty3-gypsy were isolated and sequenced using degenerate oligonucleotide primers from genomic DNA of Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl.). And the transcriptional activity of retrotransposon were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that a total of 44 unique clones from Ty1-copia and 13 unique clones from Ty3-gypsy were obtained. Nucleotide sequence of Ty1-copia and Ty3-gypsy ranged in length from 262 to 269 bp and 414 to 435 bp, respectively. Alignment of nucleotide and amino acid sequences showed

收稿日期: 2019-12-31; 修回日期: 2020-02-14

基金项目: 贵州省农业攻关项目 (黔科合支撑[2016]2520)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xpwensc@hotmail.com)

the high heterogeneity in LTR retrotransposon. Both Ty1-*copia* and Ty3-*gypsy* groups displayed mutation including premature stop codons, frameshift mutation and deletion. Phylogenetic analysis showed there were two lineages (*TAR* and *Ale*) in Ty1-*copia* group, and three lineages (*Tat*, *Tekay*, *Reina*) in Ty3-*gypsy* group. Furthermore, ratios of non-synonymous to synonymous (dN/dS) of Ty1-*copia* and Ty3-*gypsy* were less than 1, and Ty3-*gypsy* were greater than those of Ty1-*copia*, suggesting that they were evolving under a subfunctionalization model driven by purifying selection. Transcriptional activity was detected in 13 Ty1-*copia* and 7 Ty3-*gypsy* RT sequences and didn't change as exposure to eight types of abiotic stresses. A Ty1-*copia* RT sequence named *PpRT7* was highly transcriptionally activated by high temperature (42 °C), and showed tissue specific expression.

Keywords: *Prunus pseudocerasus* Lindl.; Ty1-*copia*; Ty3-*gypsy*; reverse transcriptase; sequence analysis; transcriptional activity

反转录转座子 (Retrotransposon) 是在生物中广泛存在的一种转座元件 (Transposable Elements, TEs), 特点是反转录过程其转座通过 RNA 介导, 在反转录酶 (Reverse Transcriptase, RT) 的作用下反转录成染色体外 DNA (徐玲 等, 2012), 通过一系列复杂过程插入靶基因完成转座。随着转座活动的发生, 拷贝数会随之增加, 从而在植物基因组形成高拷贝 (Kumar & Bennetzen, 1999; Slotkin, 2010), 进而改变基因组的大小 (Lee & Kim, 2014)。长末端重复 (Long Terminal Repeat, LTR) 类是最主要的反转录转座子, 主要包含 Ty1-*copia* 和 Ty3-*gypsy* 两个亚族 (Wicker et al., 2007), 在一些植物中占很大比重, 比如在梨基因组中 Ty1-*copia* 和 Ty3-*gypsy* 类型分别占 25.5% 和 16.9% (Wu et al., 2013)。因此对其序列的特征以及转录水平进行研究有助于深层次解析反转录转座子在基因组进化过程中所起的关键作用 (Biswas et al., 2010; Kalendar et al., 2010)。

反转录转座子与环境适应相关, 基因组压力可以激活转座子从而提高遗传可塑性来适应不同环境条件。由于其自私 DNA 的属性, 转座元件通常状况下会沉默, 没有活性或者处于低活性的状态, 但是它们仍有恢复活性的潜能, 能够在生物或非生物胁迫下恢复活性, 对转录组的调节有重要影响 (McCue & Slotkin, 2012; Makarevitch et al., 2015)。迄今已对多种植物反转录转座子的系统进化、转座活性等进行了研究 (Rico-cabanas & José, 2007; 蒋爽 等, 2014; Huang et al., 2017; 郑浩 等, 2019)。

中国樱桃 (*Prunus pseudocerasus* Lindl) 起源于中国, 在长期进化过程中形成了丰富的遗传多样性 (黄晓姣 等, 2013)。目前还没有关于樱桃基因组反转录转座子的研究报道。本研究中以中国樱桃为材料, 克隆了樱桃 LTR 反转录转座子 Ty1-*copia* 和 Ty3-*gypsy* RT 片段, 并对其序列和转录活性进行分析, 旨在揭示反转录转座子在中国樱桃基因组进化中的作用, 并为新型分子标记的开发, 以及为揭示活性反转录转座子功能提供信息和基础。

1 材料与方法

1.1 材料及其总 DNA 的提取及检测

供试植物材料为实验室长期继代保存的贵州关岭县中国樱桃地方种质资源‘关岭樱桃’ (*Prunus pseudocerasus* ‘Guanling’) 组培苗叶片, 取样时间为继代后 30 d。樱桃基因组 DNA 提取采用北京天根公司 DNasecure Plant Kit 试剂盒。用琼脂糖凝胶 (0.8%) 电泳和微量核酸测定仪检测 DNA 质

量及浓度。

1.2 引物的设计及 PCR 扩增

根据植物 LTR 反转录转座子反转录酶 (RT) 保守基序设计相应的简并引物。Ty1-*copia* RT 序列引物设计 (Kumar et al., 1997), Rtp1: 5'-ACNGCNTTYTNCAYGG-3' 和 Rtp2: 5'-ARCATRTCRTCAC RTA-3'; Ty3-*gypsy* RT 序列引物设计 (Kumekawa et al., 1999), Gyrt1: 5'-AGMGRTATGTGYG TSGAYTAT-3'; Gyrt2: 5'-CAMCCMRAAMWCACAMTT-3', 其中 N = A + T + C + G, M = A + C, R = G + T, Y = C + T, S = C + G, W = A + T。

反应体系 20 μL : 10 ~ 50 ng 的模板 DNA, 正、反向引物各 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 10 μL Mix 及适量的 ddH₂O。其中 Mix 购自北京天根生化科技有限公司, 含 0.1 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ *Taq* polymerase, 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, 20 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.3), 100 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 3 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂, 以及其他稳定剂和增强剂。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 复性 1 min (Ty1-*copia*: 53 $^{\circ}\text{C}$; Ty3-*gypsy*: 50 $^{\circ}\text{C}$), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。取 3 μL 反应产物, 在含有 EB 的 1% 琼脂糖凝胶中, 以 5 V $\cdot \text{cm}^{-1}$ 的电压电泳 40 min, 然后于凝胶分析仪中观察并拍照保存。

1.3 PCR 产物回收、克隆及测序分析

1% 琼脂糖凝胶检测扩增产物, 并用天根胶回收试剂盒回收并纯化 PCR 产物。回收产物连接于 pMDTM19-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 ~ 20 h 后, 菌落 PCR 筛选阳性克隆。将阳性克隆在含有 100 mg $\cdot \text{L}^{-1}$ 氨基青霉素的 LB 液体培养基中培养 14 ~ 16 h 后, 直接将菌液委托北京诺赛基因组有限公司测序。

序列分析采用 BLAST 程序推导、比对获得反转录酶氨基酸序列, 核酸相似性分析采用 DNASTAR 软件, 多重比对采用 Clustal W 软件, 用 MEGA6.0 软件邻接法构建系统发育进化树, 利用自展法 (重复 1 000 次) 对做出的进化树进行评估。dN/dS 比值采用 DNAsp5.0 软件计算。

1.4 反转录酶序列活性检测

关岭樱桃半年生实生苗在模拟干旱 (10% PEG)、高温 (42 $^{\circ}\text{C}$)、低温 (-2 $^{\circ}\text{C}$)、紫外线 (波长 315 ~ 400 nm, 辐照度 0.68 ~ 0.80 W $\cdot \text{m}^{-2}$), 以及 IBA、ABA、GA、SA (均为 2 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$) 处理 24 h, 半定量 RT-PCR 法检测叶片反转录酶基因活性表达情况。利用 Real-time PCR 技术检测在根、茎、叶中的组织特异性, 以及高温 (42 $^{\circ}\text{C}$) 处理不同时间 (12、24、36 和 48 h) *PpRT7* 在叶中的转录活性变化, 每个处理 3 次重复。总 RNA 提取采用 Aidlab 公司的 easy spin plant RNA kit 试剂盒 (货号 RN09)。采用 TaKaRa 公司 RNA LA PCRTM KIT 试剂盒将 RNA 合成为第 1 链 cDNA。利用 Primer 5.0 软件根据每 1 条反转录转座子序列在非保守区设计引物, 舍去无法设计引物的序列。*PpRT7* 引物序列为 *PpRT7*-F: CGAATACCGTATGCAAGCTGAG, *PpRT7*-R: CACCACGACGCTTTAAGAA CAA; 内参基因为 18s 及 *actin*, 引物序列分别为 18s-F: TTTTATGCAACAACCTTCTGGT, 18s-R: TAGTGAACCGTTTCATTCCAAGC; Act-F: GTTATTCTTCATCGGCGCTTCG, Act-R: CTTCAACCAT TCCAGTTCCATTGTC。PCR 反应体系是 Mix 5 μL , cDNA 模板 1 μL , 引物 0.5 μL , 总体积 10 μL 。扩增程序为 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s。

2 结果与分析

2.1 LTR 反转录转座子反转录酶基因序列的克隆

利用简并引物扩增供试材料反转录酶 (RT) 序列, 获得 Ty1-*copia* 及 Ty3-*gypsy* 长度分别为 260 bp 和 430 bp 左右 (图 1), 这与在马尾松上的报道 (Fan et al., 2014) 一致。

将 PCR 产物回收、克隆、测序得到 44 条 Ty1-*copia* 以及 13 条 Ty3-*gypsy* RT 独立序列, 分别命名为 *PpRT* 和 *REPP*。

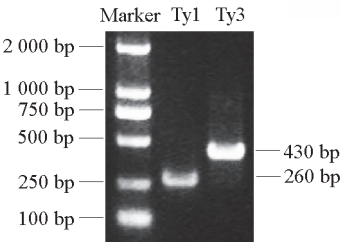


图 1 Ty1-*copia* 和 Ty3-*gypsy* 类反转录酶同源序列的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of Ty1-*copia* RT and Ty3-*gypsy* RT in *Prunus pseudocerasus*

2.2 LTR 反转录转座子反转录酶核酸序列特征分析

44 条 Ty1-*copia* 类反转录酶核酸序列长度在 262 ~ 269 bp 之间, 13 条 Ty3-*gypsy* 类反转录酶核酸序列长度在 414 ~ 525 bp 之间, 其中 432 bp 5 条、431 bp 2 条、429、425、525、435、423、433 bp 各 1 条, 显示出较大的长度变异 (表 1)。

表 1 樱桃基因组中 Ty1-*copia* 和 Ty3-*gypsy* 类反转录转座子反转录酶序列组成
Table 1 Base composition of Ty1-*copia* and Ty3-*gypsy* sequence in *Prunus pseudocerasus*

序列名称 Sequence name	大小/bp size	AT/CG 比例 AT/CG propotion	序列名称 Sequence name	大小/bp Size	AT/CG 比例 AT/CG propotion
<i>PpRT1</i>	266	1.58	<i>PpRT38</i>	266	1.53
<i>PpRT2</i>	265	1.5	<i>PpRT39</i>	266	1.58
<i>PpRT3</i>	260	1.39	<i>PpRT40</i>	266	1.42
<i>PpRT4</i>	262	1.82	<i>PpRT41</i>	263	1.29
<i>PpRT5</i>	266	1.49	<i>PpRT42</i>	263	1.46
<i>PpRT6</i>	263	1.39	<i>PpRT45</i>	263	1.37
<i>PpRT7</i>	263	1.29	<i>PpRT47</i>	263	1.33
<i>PpRT8</i>	266	1.49	<i>PpRT48</i>	263	1.35
<i>PpRT9</i>	263	1.33	<i>PpRT49</i>	266	1.63
<i>PpRT10</i>	266	1.51	<i>PpRT50</i>	263	1.37
<i>PpRT12</i>	263	1.29	<i>PpRT54</i>	266	1.53
<i>PpRT13</i>	266	1.4	<i>PpRT56</i>	263	1.46
<i>PpRT14</i>	266	1.44	<i>PpRT58</i>	266	1.42
<i>PpRT15</i>	263	1.25	<i>PpRT59</i>	266	1.56
<i>PpRT19</i>	263	1.41	<i>PpRT60</i>	263	1.27
<i>PpRT20</i>	266	1.53	<i>REPP5</i>	431	1.68
<i>PpRT21</i>	260	1.36	<i>REPP6</i>	414	1.54
<i>PpRT22</i>	266	1.44	<i>REPP7</i>	435	1.56
<i>PpRT23</i>	263	1.29	<i>REPP9</i>	432	1.82
<i>PpRT25</i>	266	1.56	<i>REPP11</i>	525	0.97
<i>PpRT26</i>	266	1.53	<i>REPP14</i>	432	0.98
<i>PpRT27</i>	263	1.31	<i>REPP15</i>	432	0.99
<i>PpRT29</i>	266	1.56	<i>REPP16</i>	432	1.01
<i>PpRT31</i>	263	1.23	<i>REPP17</i>	429	1.49
<i>PpRT32</i>	266	1.69	<i>REPP21</i>	423	1.12
<i>PpRT33</i>	263	1.44	<i>REPP25</i>	431	1.82
<i>PpRT35</i>	266	1.44	<i>REPP28</i>	432	0.98
<i>PpRT36</i>	266	1.63	<i>REPP29</i>	433	1.41
<i>PpRT37</i>	263	1.44			

AT/CG 比结果显示, Ty1-*copia* 类反转录酶在 1.23 ~ 1.82 之间, 平均 1.45。Ty3-*gypsy* 类反转录酶含量在 0.97 ~ 1.82 之间, 其中 < 1 的有 4 条, 平均 AT/CG 为 1.34。Ty1-*copia* 类反转录酶核酸序列相似性在 24.1% ~ 99.6% 之间, Ty3-*gypsy* 类反转录酶核酸序列相似性在 22.2% ~ 99.5% 之间, 显示高度的异质性。

2.3 LTR 反转录转座子反转录酶氨基酸序列分析

将克隆到的所有 Ty1-*copia* 反转录酶序列在 NCBI 数据库进行在线 BLASTx, 发现与不同物种的 Ty1-*copia* 反转录酶序列具有较高的相似性, 其中与梅 (*P. mume*)、桃 (*P. salicina*)、苹果 (*M. × domestica*) 等植物相似性最高。将推导的氨基酸利用 mega 6.0 进行计算, 序列间相似性在 51.9% ~ 100% 之间。

氨基酸序列多重序列比对结果 (图 2) 显示, 这些序列具有 Ty1-*copia* RT 序列典型的保守结构域, 其中 RT-BOX2 结构域为 TAFFHG, 与马尾松 (Fan et al., 2013)、火龙果 (范付华 等, 2012) 等

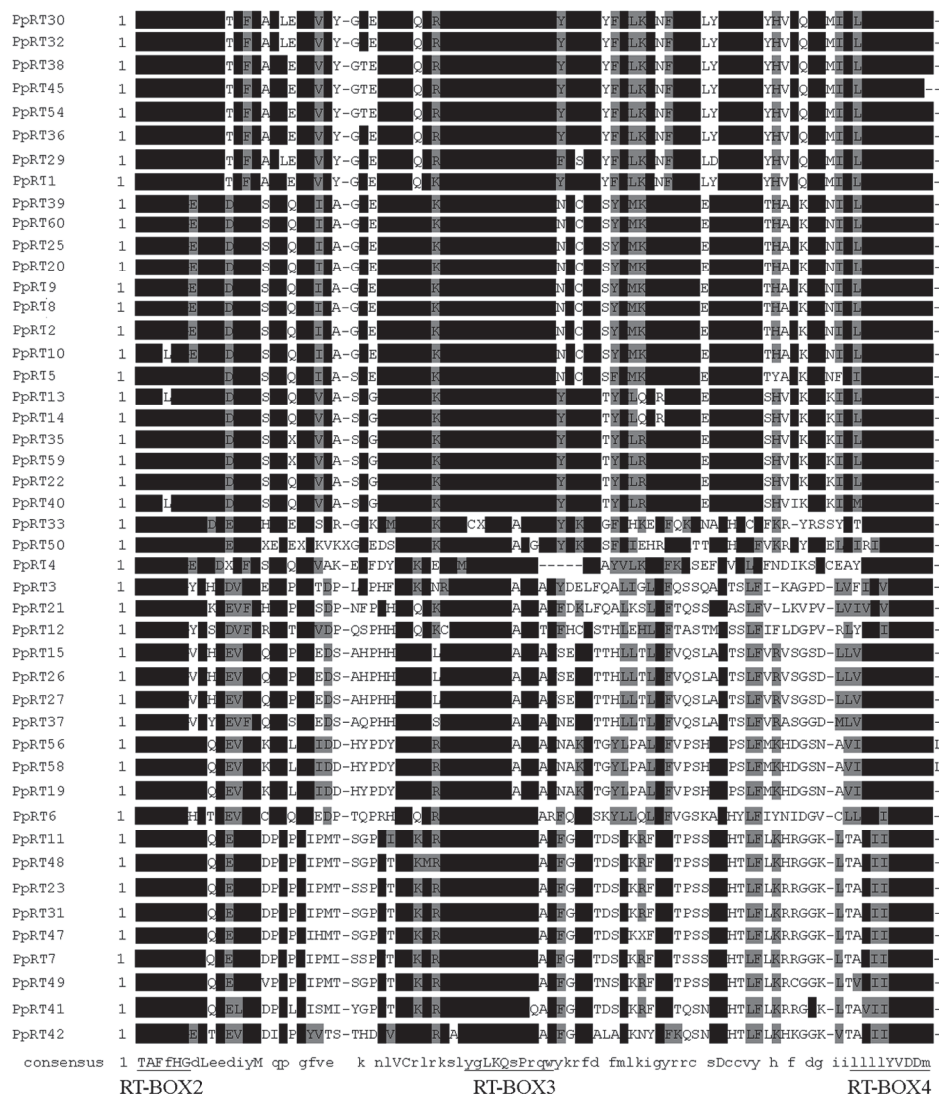


图 2 樱桃 Ty1-*copia* 类反转录酶氨基酸序列比对
Fig. 2 Alignment of reverse transcriptase in *Prunus pseudocerasus*

物种一致; RT-BOX3 结构域由 YGLKQAPRXW 组成, 相应位置的 L (亮氨酸)、K (赖氨酸)、Q (谷氨酰胺) 以及 P (脯氨酸) 是保守氨基酸; RT-BOX4 结构域由 LLLYVDDIL 以及 TALYVDDIL 组成, 富含 L (亮氨酸), 相应位置的 Y (酪氨酸) 和 D (天冬氨酸) 是保守氨基酸。

Ty1-*copia* 中 6 条序列出现终止密码子或者移码突变, 占总序列数的 13.95%。PpRT4、PpRT21 在第 28 位碱基 G 突变为 T, 第 30 位碱基 A 突变为 G, 从而形成 TAG 终止子; PpRT35、PpRT58 在第 52 位碱基 C 突变为 T, 形成 TAA 终止子; PpRT45 第 166 位碱基 C 突变成 T 形成 TGA 终止子; PpRT49 在第 46 位碱基 C 突变 G, 48 位碱基 A 突变 G, 形成 TAG 终止子, 在第 55 位碱基 G 突变成 T, 形成 TGA 终止子; PpRT33 在第 111 个碱基 T 突变成 A, 形成 TAA 终止子。PpRT4 在第 9 个氨基酸处发生移码突变。PpRT4 在第 43 个氨基酸处有 6 个氨基酸序列缺失。

Ty3-*gypsy* 的 13 条序列中, 有 7 条序列发生突变, 其中 REPp 6 在第 178 位碱基 C 突变成 T (图 3),

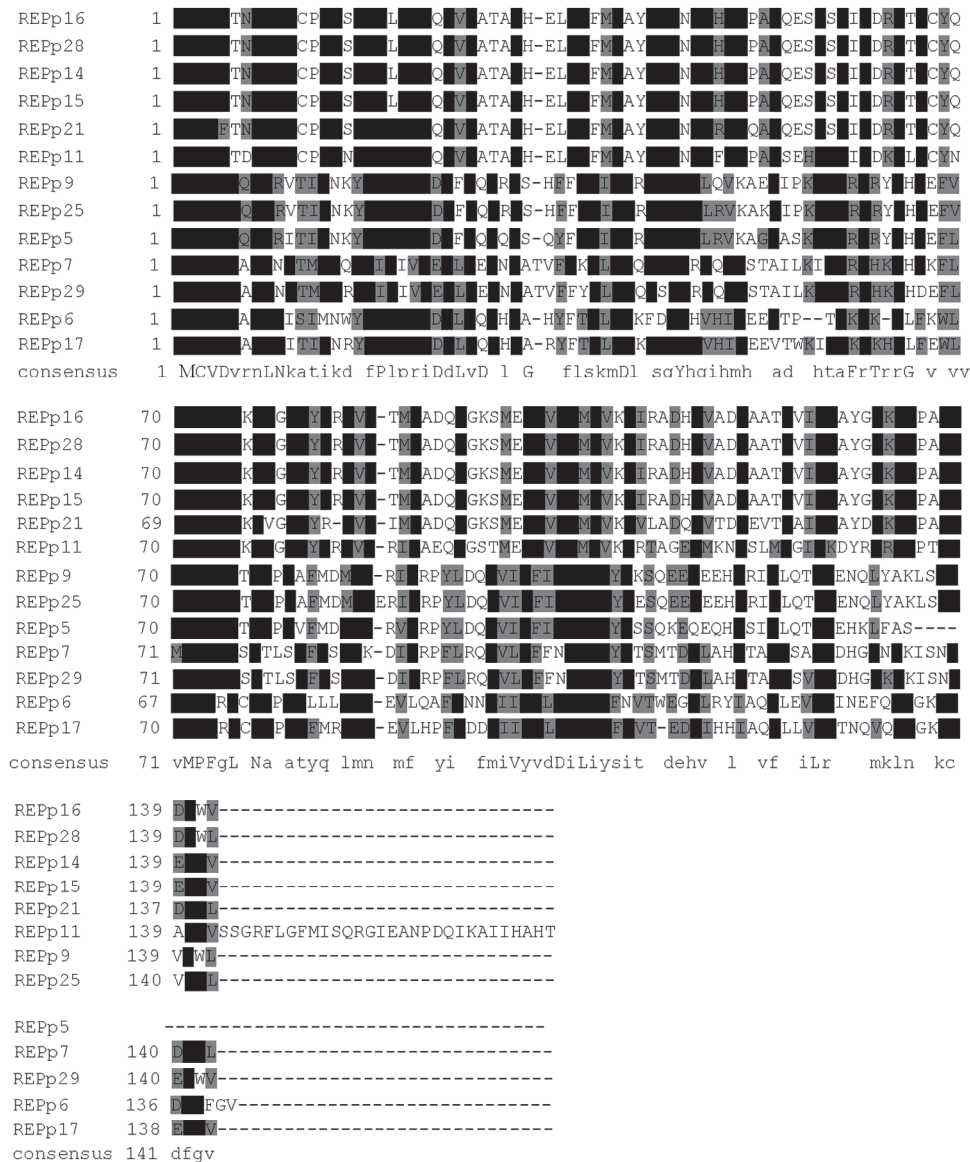


图 3 Ty3-gypsy 类反转录酶氨基酸序列比较

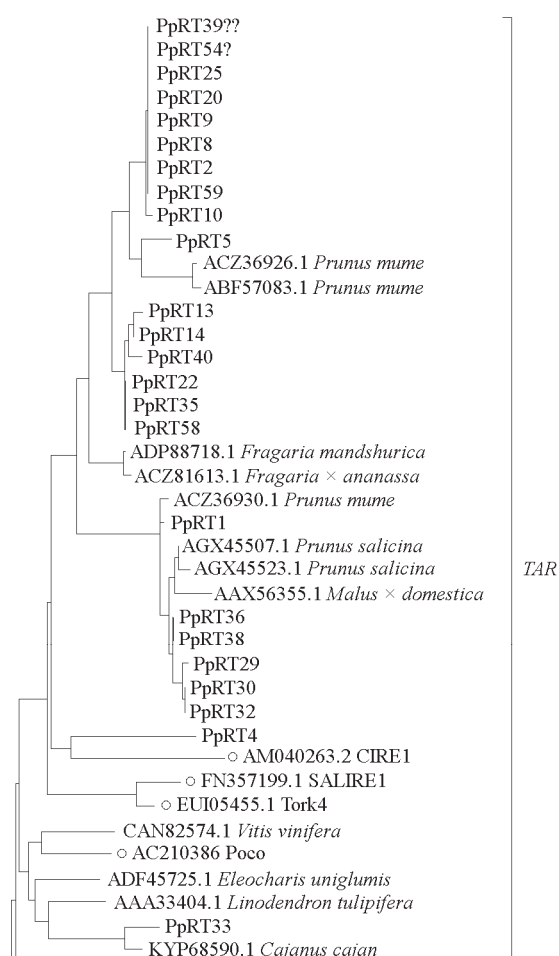
Fig. 3 Alignment of the amino acid of Ty3-gypsy reverse transcriptase in *Prunus pseudocerasus*

形成 TCG 终止子; *REp21* 在第 245 位碱基 G 突变为 A, 形成 TAA 终止子; *REp17* 在第 336 位碱基 A 突变为 G, 形成 TAG 终止子. *REp6* 在第 79 位, *REp7* 在第 37 位, *REp21* 在 87 位, *REp29* 在 34 位氨基酸处移码突变, *REp5* 在 3'端有明显的缺失. 对比两类 RT 序列突变率发现, Ty1-*copia* 为 13.95%, 远低于 Ty3-*gypsy* 的 53.84%.

BLAST 分析表明, 所有 Ty3-*gypsy* 序列都与其他物种有较高的相似性, 尤其与同为蔷薇科李亚属的梅 (*P. mume*) 相似性最高. 以保守基序为基础推测所得序列开放阅读框, 应用软件 Mega6.0 对氨基酸序列进行序列相似性计算和比对, 结果显示, 氨基酸相似性在 46.7% ~ 100% 之间. 比对结果 (图 3) 可以看出, Ty3-*gypsy* 类反转录转座子反转录酶序列上游都存在一个保守区域“MCVDY”, 这与火龙果 (彭磊 等, 2017)、桂花 (王庆竹 等, 2018) 上的研究一致.

2.4 LTR 反转录转座子 RT 氨基酸系统发育树

34 条对应了 6 个已报道的 Ty1-*copia* 类反转录酶支系 *Ivana*、*Maximus*、*Ale*、*TAR*、*Bianca* 以及 *Angela* (Wicker & Keller, 2007) 与 44 条中国樱桃 RT 序列以及来自于 NCBI 的不同物种的 25 条反转录酶氨基酸序列进行系统发育树分析. 结果如图 4 所示, 有 23 条樱桃 *copia* 反转录酶序列属于 *TAR* 类支系, 余下 21 条序列属于 *Ale* 支系, 其中有 19 条序列属于 *AleA-2* 亚支系, *PpRT2*、*PpRT3* 属于 *AleA-1* 亚支系.



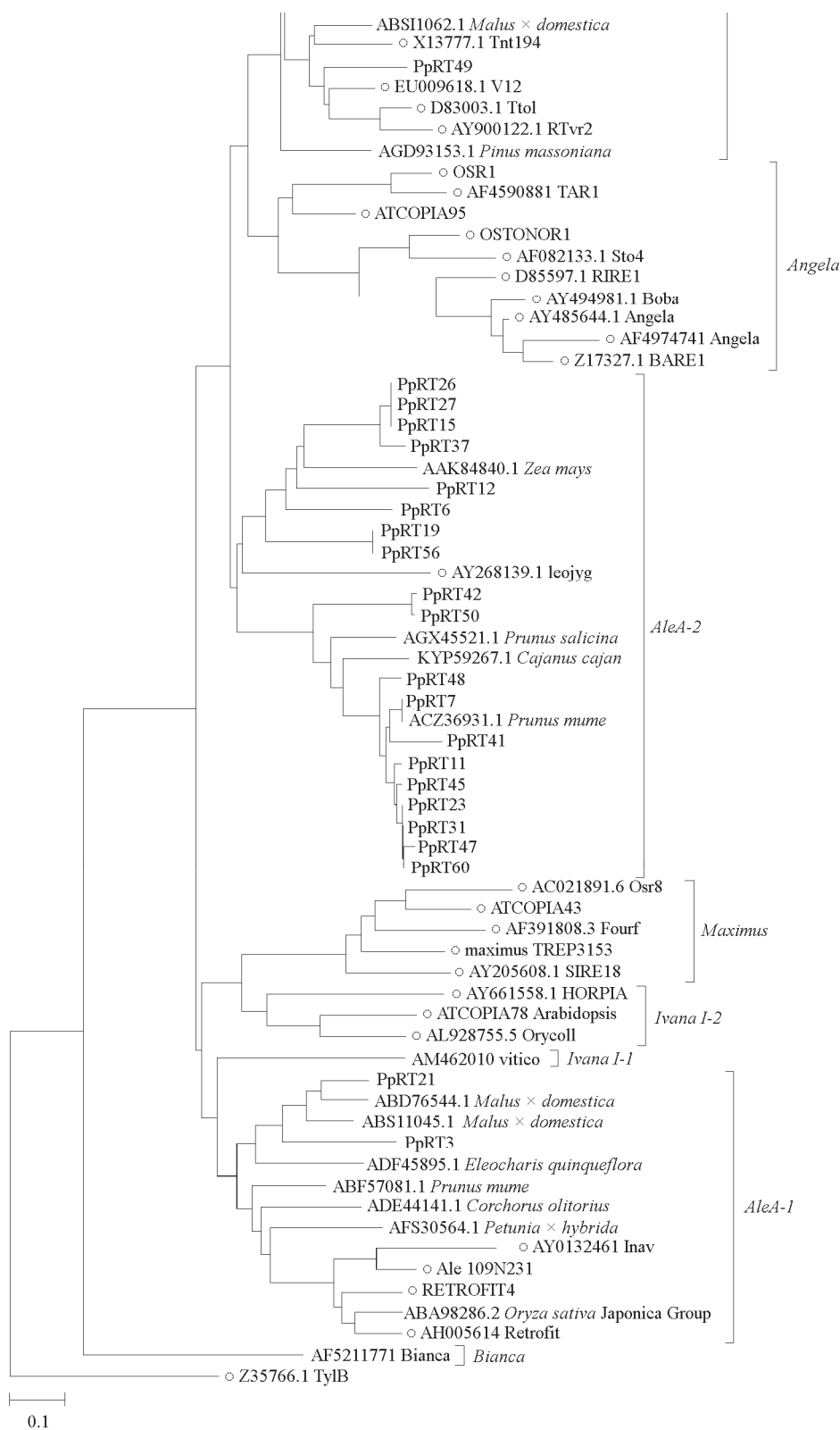


图 4 Ty1-copia 反转录转座子反转录酶基因氨基酸序列系统进化树

圆形分支代表鉴定为 6 个原始支系的序列。

Fig. 4 Phylogenetic analysis of Ty1-copia retrotransposons from *Prunus pseudocerasus* with other plants

Branches with circle shape indicated there sequences were identified from 6 primitive clades.

根据聚类情况, 可以推测部分序列发生水平传递, 如 *TAR* 支系中, *PpRT4*、*PpRT33*、*PpRT49* 分别在单独的亚组, 与其他樱桃 *copia* 序列距离较远, 分别与来自于脐橙 (*Citrus sinensis*)、木豆 (*Cajanus cajan*)、葡萄 (*Vitis vinifera*) 等经鉴定为 *TAR* 支系的非蔷薇科物种序列相似性高。*Ale* 类中也有部分序列与玉米 (*Zea mays*)、木豆等亲缘关系较远的植物聚在一起。*TAR* 支系中 19 条序列则与草莓 (*F. mandshurica*)、李 (*P. salicina*)、苹果 (*M. domestica*) 等蔷薇科植物聚在一起, 具有蔷薇科特异性。

将 13 条樱桃 Ty3-gypsy 类反转录酶序列与已鉴别的 22 条其他物种的反转录酶序列与一起进行构建进化树 (图 5), 该 22 条序列分别对应 6 个支系, 分别为 *Athila*、*Reina*、*Tat*、*CRM*、*Tekay* 以

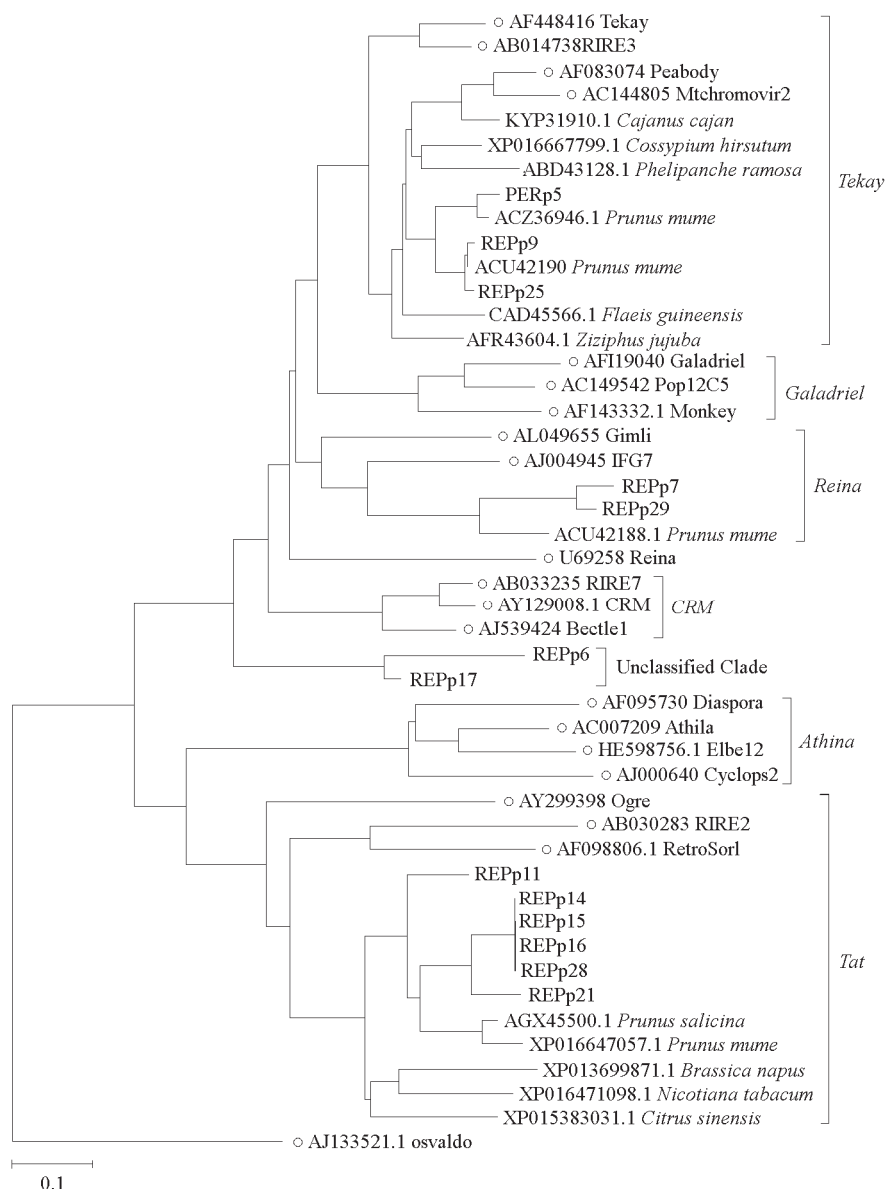


图 5 Ty3-gypsy 类反转录转座子反转录酶基因氨基酸序列进化树

圆形分支代表鉴定为 6 个原始支系的序列。

Fig. 5 Phylogenetic analysis of Ty3-gypsy retrotransposons from *Cerasus pseudocerasus* with other plants

Branches with circle shape indicated there sequences were identified from 6 primitive clades.

及 *Galadrie* (Llorens et al., 2009; 蒋爽 等, 2014)。结果 (图 5) 显示, *REp5*、*REp25*、*REp9* 等 3 条序列属于 *Tekay*, *REp7*、*REp29* 属于 *Reina*, *REp11*、*REp21*、*REp14*、*REp15*、*REp16*、*REp28* 等 6 条序列属于 *Tat*, *REp17* 与 *REp6* 不属于 6 种支系范围, 有待进一步研究。

2.5 同义突变率和非同义突变率分析

同义突变 (Synonymous substitution rate, dS) 和 非同义突变 (Nonsynonymous substitution rate, dN) 的比值 (dN/dS) 常常用作检测能编码蛋白的基因受到何种选择作用。假设 dN/dS = 1, 则是中性替换, 如果 dN/dS > 1, 说明基因在进化过程受到自然选择, 而 dN/dS < 1 则说明进化过程受纯化选择影响。去除缺陷的序列, 即含有提前终止密码子、缺失以及移码突变的序列 (包含 Ty3-gypsy 中 *Reina* 和未分类支系)。

dN/dS 计算结果显 (表 2) 示, 樱桃 Ty1-copia 3 个支系在 0.2166 ~ 0.2402 之间, 均遭受较强的纯化选择。Ty3-gypsy *Tekay* 及 *Tat* 支系分别为 0.540 和 0.902, 说明遭受纯化选择, *Tat* 接近于中性选择。

表 2 樱桃中 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 类反转座子反转录酶序列同义突变率和非同义突变率分析
Table 2 Average nonsynonymous (dN) and synonymous (dS) substitution rates for clades belonging to Ty1-copia and Ty3-gypsy, respectively

反转录转座子 Retrotransposon	支系 Clade	序列数量 Number of clones	同义突变率 Synonymous (dS)	非同义突变率 Nonsynonymous (dN)
Ty1-copia	<i>TAR</i>	22	1.7076	0.3528
	<i>AleA-1</i>	19	1.3006	0.3128
	<i>AleA-2</i>	2	1.7145	0.3717
Ty3-gypsy	<i>Tekay</i>	2	0.835	0.79
	<i>Tat</i>	4	0.386	0.403

注: 支系中的每个 RT 序列与其它序列的 dN 和 dS 的平均值。
Note: The values were averages of dN's and dS's for comparisons of each RT coding sequence with other member sequences of the same clade.

2.6 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 转录活性检测

对 20 条 Ty1-copia 与 9 条 Ty3-gypsy 类反转录酶序列设计特异引物进行半定量 RT-PCR, 检测其不同非生物胁迫条件下中国樱桃叶片中的转录活性。

结果 (图 6) 显示, 21 条序列在处理前就具有转录活性, 但是在不同非生物胁迫下, 只有高温 (42 °C) 胁迫引起 1 条反转录转座子 (*PpRT7*) 活性升高, 该序列属于 *AleA-2* 亚支。其余 20 条序列在各种胁迫条件活性无变化, 说明正常生长状态下具有活性, 但是可能不受非生物胁迫影响。这部分序列有 13 条属于 Ty1-copia 类 (其中 5 条属于 *TAR* 类, 8 条属于 *Ale* 类), 7 条属于 Ty3-gypsy 类 (其中 *Tekay* 类有 3 条, *Rina* 类 2 条, *Tat* 类 1 条, 未分类支系 1 条)。不同反转录转座子之间转录活性表达水平有差异, 另外有活性的反转录转座子分布在各个支系中, 并没有家族特异性。7 条序列没有转录活性, 包括了 Ty1-copia 的 5 条序列 (其中 3 条属于 *Ale* 类, 2 条属于 *Takey* 类), Ty3-gypsy 的 2 条序列 (均属于 *Tat*)。

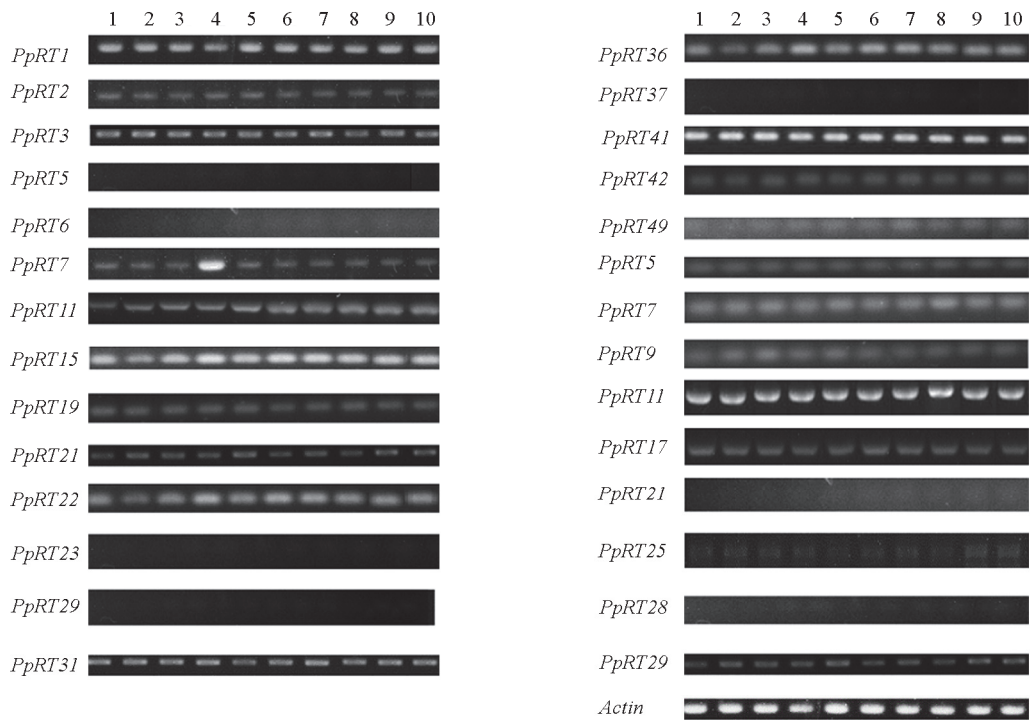


图 6 Ty1-copia 及 Ty3-gypsy RT 基因在非生物胁迫下转录活性检测

1 ~ 10 分别是处理前、对照、模拟干旱 (PEG)、高温 (42 °C)、低温 (-2 °C)、紫外线、IBA、ABA、GA、SA。

Fig. 6 Transcriptional activity of Ty1-copia and Ty3-gypsy subjected to abiotic treatments

1 - 10 indicated before treatment, control, and treatment by drought (PEG), heat (42 °C), cold (-2 °C), UV, indole butyric acid, abscisic acid, gibberellic acid, salicylic acid, respectively.

2.7 PpRT7 表达分析

对 PpRT7 组织特异性检测, 结果 (图 7) 显示, PpRT7 在正常生长的根、茎、叶中均有活性, 叶是根和茎的 2.47 和 2.25 倍 ($P < 0.05$), 茎与根中并无显著差异, 说明在樱桃不同组织中 R_pRT7 均有活性且具有组织特异性。

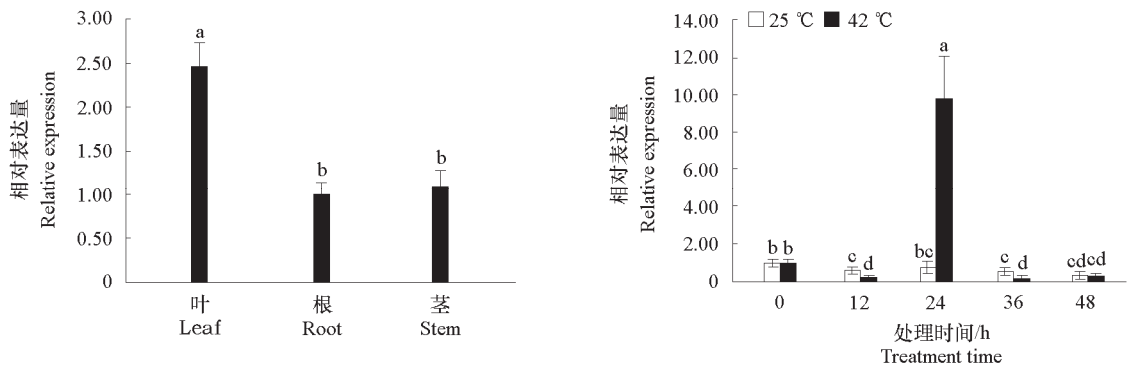


图 7 PpRT7 在不同组织和高温处理的表达特性

不同小写字母表示 0.05 水平差异显著。

Fig. 7 Transcriptional activity under high temperature and in different organs of PpRT7

Different lowercase letters represent significant difference at 0.05.

鉴于 *PpRT7* 在叶中活性较高, 且叶片在分子、生理、形态等方面都是受高温影响最大的器官(刘志刚 等, 2011), 进一步对高温(42 °C)处理下叶片中转录活性变化进行研究。结果(图 7)显示, *PpRT7* 在高温处理前有一定活性, 处理 12 h 后降低, 24 h 急剧增强近 10 倍, 36 h 后下降到处理前水平之下; 对照(25 °C)变化不大, 有逐步降低的趋势。高温处理除了处理 24 h, 其余所有时间段活性均低于处理前, 说明高温容易引起樱桃 *PpRT7* 表达的升高, 这与半定量 RT-PCR 结果一致。

3 讨论

高度的移码突变和终止子突变是反转录转座子反转录酶序列的特征之一, 如在石蒜中有 70.59% 的 *Ty1-copia* (周芬静 等, 2015), 在火龙果中有 67.07% 的 *Ty3-gypsy* (彭磊 等, 2017)。Wang 等(2010)在果梅中发现 *Ty1-copia* 突变率 32.3%、*Ty3-gypsy* 为 27.5%, 均低于大多数植物。本研究中樱桃 *Ty1-copia* 突变率 13.95%, *Ty3-gypsy* 为 53.84%, 其中 *Ty1-copia* 低于已报道的所有物种, 说明樱桃是 *Ty1-copia* 突变率较低的物种。果梅与樱桃亲缘关系较为相近, 同样存在低突变率的现象, 是否与亲缘关系有所关联, 低突变率的原因和生物学意义是什么, 还需进一步研究。与大多数植物(Wang et al., 2010; 马焱, 2014)一样, 樱桃反转录酶序列 dN/dS 也小于 1, 说明反转录酶序列经历了纯化选择, 分离的序列有潜在的活性(Hurst, 2002)。对樱桃反转录酶序列活性水平检测实结果也证明这一点。*Ty3-gypsy* dN/dS 高于 *Ty1-copia*, *Ty3-gypsy* 不同群组间差异较大, 说明不同类型、不同群组之间选择压力和进化情况也不同。

在植物分化前, *Ty1-copia* 及 *Ty3-gypsy* 分别有 6 个原始支系, 广泛存在于小麦、水稻和拟南芥中(Wicker & Keller, 2007; Lloren et al., 2009), 后来植物进化历程中, 很多保留了部分原始支系。蒋爽等(2014)在梨全基因组中发现 *Ty1-copia* 存在所有 6 个原始支系, *Ty3-gypsy* 存在 5 类原始支系。转录转座子在不同的物种中的进化历程不同(Kolano et al., 2013)。由于中国樱桃基因组没有发布, 限于分离技术, *Ty1-copia* 只得到 *TAR* 和 *Ale* 两个原始支系, *Ty3-gypsy* 存在 *Tekay*、*Reina*、*Tat* 等 3 个原始支系以及 1 个未分类的支系。樱桃 *TAR* 支系中, *PpRT4*、*PpRT49*、*PpRT33* 与包含一些单子叶植物的众多远缘植物聚在一起, 推测可能是古老的序列, 这类序列可能从不同物种间水平传递到樱桃, 而 *TAR* 支系其他序列数量较多的亚组则具有蔷薇科的特异性, 推测这些亚组的序列可能是 *PpRT4*、*PpRT49*、*PpRT33* 纵向传递而来, 在蔷薇科的进化中有多次转座。本研究获得的序列, 为开发反转录转座子分子标记和研究中国樱桃反转录转座子分类提供了一定的依据。

很多物种中都发现反转录转座子静止的, 在非生物或者生物胁迫下才会产生活性(Wang et al., 2010; Fan et al., 2014; 彭磊 等, 2017)。与大多数研究不同的是, 75% 的 *Ty1-copia* 和 *Ty3-gypsy* 反转录转座子在正常生长状态下的樱桃中具有转录活性, 而且几乎每个支系都存在。关于这种现象, 在其他植物上也有少数的报道, 比如百脉根(*Lotus japonicus*)中的转座子 *LORE1* 在正常生长状况下具有转录活性, 且不受组培的诱导(Lene et al., 2005), 正常生长的梨组织中有反转录转座子的转录(蒋爽 等, 2014)。一种观点认为, 反转录转座子的转座大部分是有害的, 具有转录活性反转录转座子反转录酶基因, 但很可能并不能转座, 因为转座过程需要转录、RNA 加工、mRNA 输出以及翻译后修饰等步骤, 一旦出错就会限制转座活性, 故转座发生较少(徐玲 等, 2012; 梁琳琳和周明兵, 2016)。也有一些观点认为, 绝大部分反转录转座子的插入发生在基因间区, 对功能基因的表达并无影响, 所以这些发生在基因组中的插入突变并不能影响植物的生长发育, 因而这种变异不受环境选择(蒋爽 等, 2016)。究竟这类正常生长状态下活性转座子有什么作用, 有待进一步研究。

除此之外, 具有提前终止密码子和移码突变的也被视为没有活性的序列。然而本研究中 *PpRT49*、*REPP7*、*REPP17* 有终止密码子或移码突变, 但是依然具有转录活性。在铁皮石斛 (李聪 等, 2014)、火龙果 (彭磊 等, 2017) 中也发现这种现象。原因可能是反转录转座子在长期的进化过程中, 形成了一套有利于自身生存的机制, 从而通过各种方式促进其转座 (李聪 等, 2014)。反转录病毒 mRNA 在编码酶蛋白时, 会发生移码翻译 (Frameshift reading) 而避开终止密码子 (Rajput et al., 2010)。

反转录转座子受高温胁迫激活是研究的热点, 如反转录转座子 *ONSEN* 在近年来有着深入的研究 (Pecinka et al., 2010; Matsunaga et al., 2012; Ito et al., 2013; Cao et al., 2015)。本研究中发现 1 条受到高温诱导后活性升高的序列 *PpRT7*。温度是影响樱桃地理分布的重要因子, 是欧洲甜樱桃在南方栽培受限的重要原因, 另外昼夜温差也会影响花芽形成 (李明 等, 2014)。*PpRT7* 将为进一步研究反转录转座子在樱桃高温胁迫中的机制提供基础。

References

- Biswas M K, Baig M N R, Cheng Yun-jiang, Den Xiu-xin. 2010. Retrotransposon based genetic similarity within the genus *Citrus* and its relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57: 963 – 972.
- Cao Y F, Jiang Y R, Ding M Q, He S E, Zhang H, Lin L F, Rong J K. 2015. Molecular characterization of a transcriptionally active Ty1-copia-like retrotransposon in *Gossypium*. *Plant Cell Reports*, 34 (6): 1037 – 1047.
- Fan F H, Wen X P, Ding G J, Cui B W. 2013. Isolation, identification, and characterization of genomic LTR retrotransposon sequences from masson pine (*Pinus massoniana*). *Tree Genetics & Genomes*, 9: 1237 – 1246.
- Fan Fuhua, Qiao Guang, Zheng Sicheng, Wen Xiaopeng. 2012. Cloning and analysis of reverse transcriptase of Ty1-copia retrotransposons in *Hylocereus undatus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (2): 265 – 272. (in Chinese)
- 范付华, 乔 光, 郑思成, 文晓鹏. 2012. 火龙果 Ty1-copia 类反转录转座子反转录酶序列的克隆及分析. *园艺学报*, 39 (2): 265 – 272.
- Huang Jianhua, Wang Yushuai, Liu Wenwen. 2017. EARE-1, a transcriptionally active Ty1/Copia-Like retrotransposon has colonized the genome of *excoecaria agallocha* through horizontal transfer. *Frontiers in Plant Science*, 8: 45.
- Huang Xiaojiao, Wang Xiaorong, Chen Tao, Chen Jiao, Tang Haoru. 2013. Research progress of germplasm diversity in Chinese cherry (*Cerasus pseudocerasus*). *Journal of Fruit Science*, (3): 470 – 479. (in Chinese)
- 黄晓皎, 王小蓉, 陈 涛, 陈 娇, 汤浩茹. 2013. 中国樱桃遗传资源多样性研究进展. *果树学报*, (3): 470 – 479.
- Hurst L D. 2002. The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution. *Trends in Genetics*, 18 (9): 486 – 487.
- Ito H, Yoshida T, Tsukahara S, Kawabe A. 2013. Evolution of the *ONSEN* retrotransposon group activated upon heat stress in Brassicaceae. *Gene*, 518: 256 – 261.
- Jiang Shuang, Cai Dan-ying, Teng Yuan-wen. 2014. Prediction, evolution and expression analysis of reverse transcriptase of LTR retrotransposons in pear. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (11): 2196 – 2207. (in Chinese)
- 蒋 爽, 蔡丹英, 滕元文. 2014. 梨反转录转座子逆转录酶序列预测及其进化和转录分析. *园艺学报*, 41 (11): 2196 – 2207.
- Jiang Shuang, Luo Jun, Sun Yong-wang, Cai Dan-ying, Teng Yuan-wen. 2016. Prediction of ORF for GAG of Ty1-copia retrotransposons in pear and its expression analysis in response to light. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (8): 1577 – 1584. (in Chinese)
- 蒋 爽, 骆 军, 孙永旺, 蔡丹英, 滕元文. 2016. 梨 Ty1-copia 类反转录转座子 GAG 开放阅读框预测和光响应下的表达分析. *园艺学报*, 43 (8): 1577 – 1584.
- Kalendar R, Flavell A J, Ellis T H N, Sjakste T, Moisy C, Schulman A H. 2010. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity*, 106: 520 – 530.
- Kolano B, Bednara E, Werss Schneeweiss H. 2013. Isolation and characterization of reverse transcriptase fragments of LTR retrotransposons from

- the genome of *Chenopodium quinoa* (Amaranthaceae) . Plant Cell Reports, 32 (10): 1575 – 1588.
- Kumar A, Bennetzen J. 1999. Plant retrotransposons. Annu Rev Genet, 33 (1): 479 – 532.
- Kumar A, Pearce S R, Mclean K, Harrison G, Heslop J S, Waugh R, Flavell A J. 1997. The Ty1-*copia* group of retrotransposons in plants: genomic organization, evolution and use as molecular markers. Genetics, 100: 205 – 217.
- Kumekawa N, Ohtsubo E, Ohtsubo H. 1999. Identification and phylogenetic analysis of *gypsy*-type retrotransposons in the plant kingdom. Genes Genet Syst, 74: 299 – 307.
- Lee S I, Kim N S. 2014. Transposable elements and genome size variations in plants. Genomics Inform, 12: 87 – 97.
- Lene H M, Eigo I F, Sinmona R. 2005. LORE1, an active low-copy-number Ty3-*gypsy* retrotransposon family in the model legume *Lotus japonicus*. The Plant Journal, 44: 372 – 381.
- Li Cong, Si Jinping, Gao Yanhui, Zhu Yuqiu, Jiang Yuan. 2014. Effect of ABA on transcriptionally active Ty1-*copia* retrotransposons in *Dendrobium officinale*. China Journal of Chinese Materia Medica, 39 (10): 1788 – 1794. (in Chinese)
- 李 聪, 斯金平, 高燕会, 朱玉球, 蒋 园. 2014. 脱落酸对铁皮石斛 Ty1-*copia* 类反转录转座子转录活性的影响. 中国中药杂志, 39 (10): 1788 – 1794.
- Li Ming, Zhao Gairong, Liu Congli, Li Yuhong. 2014. Comparative analysis on ecological and climatic factors of the sweet cherry main production area at home and abroad. Journal of Fruit Science, 31 (Suppl): 169 – 174. (in Chinese)
- 李 明, 赵改荣, 刘聪利, 李玉红. 2014. 国内外欧洲甜樱桃主产区生态气候比较与分析. 果树学报, 31 (增刊): 169 – 174.
- Liang Linlin, Zhou Mingbing. 2016. Plant active LTR retrotransposons: a review. Chin J Biotech, 32 (4): 409 – 429. (in Chinese)
- 梁琳琳, 周明兵. 2016. 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, 32 (4): 409 – 429.
- Liu Zhigang, Fan Bingyou, Wang Rong, Shi Guoan, Hu Yonghong. 2011. Advance in anatomy and physiology of heat resistance in plants. Hubei Agricultural Sciences, 50 (1): 17 – 20. (in Chinese)
- 刘志刚, 范丙友, 王 荣, 史国安, 胡永红. 2011. 植物抗热的解剖学与生理学研究进展. 湖北农业科学, 50 (1): 17 – 20.
- Llorens C, Munoz Pomer A, Bernad L, Botella H, Moya A. 2009. Network dynamics of eukaryotic LTR retroelements beyond phylogenetic trees. Biol Direct, 4: 41.
- Ma Bi. 2014. Genome-wide identification and characterization of transposable elements in mulberry (*Morus notabilis*) [Ph. D. Dissertation] Chongqing: Southwest University of China. (in Chinese)
- 马 焱. 2014. 桑树全基因组转座子的鉴定与特征分析[博士论文]. 重庆: 西南大学.
- Makarevitch I, Amanda W, Patrick W, Michelle S, Candice H, Jeffrey R, Nathan S. 2015. Transposable elements contribute to activation of maize genes in response to abiotic stress. PLoS Genetic, 11 (1): e1004915.
- Matsunaga W, Kobayashi A, Kato A, Hidetaka I. 2012. The effects of heat induction and the siRNA biogenesis pathway on the transgenerational transposition of ONSEN, a copia-like retrotransposon in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiology, 53: 824 – 833.
- McCue Andrea D, Slotkin R Keith. 2012. Transposable element small RNAs as regulators of gene expression. Trends in Genetics, doi: 10.1016/j.tig.2012.09.001.
- Pecinka A, Dinh H Q, Baubec T, Rosa M, Lettner N, Schirer M. 2010. Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in *Arabidopsis*. Plant Cell, 22: 3118 – 3129.
- Peng Lei, Wu Yan, Liu Xiao-cui, Yang Kun, Fan Fu-hua, Wen Xiao-peng. 2017. Cloning and analysis of reverse transcriptase of Ty3-*gypsy* retrotransposon in *Hylocereus undatus*. Journal of Fruit Science, 34 (2): 186 – 195. (in Chinese)
- 彭 磊, 吴 艳, 刘小翠, 杨 鹏, 范付华, 文晓鹏. 2017. 火龙果 Ty3-*gypsy* 类反转录转座子反转录酶序列的克隆及分析. 果树学报, 34 (2): 186 – 195.
- Rajput M K, Upadhyaya K C. 2010. Characterization of heterogeneity in Ty1-*copia* group retrotransposons in chickpea (*Cicer arietinum*L.) .

- Molecular Biology, 44 (4): 529 – 535.
- Rico-Cabanas L, José A M. 2007. CIRE1, a novel transcriptionally active Ty1-copia retrotransposon from *Citrus sinensis*. Molecular Genetics and Genomics, 277 (4): 365 – 377.
- Slotkin R K. 2010. The epigenetic control of the Athila family of retrotransposons in *Arabidopsis*. Epigenetics, 5 (6): 483 – 490.
- Wang F, Tong Z G, Sun J, Shen Y Y, Zhou J. 2010. Genome-wide detection of Ty1-copia and Ty3-gypsy group retrotransposons in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) . African Journal of Biotechnology, 9 (50): 8583 – 8596.
- Wang Qingzhu, Li Huiping, Wen Xiaopeng, Fan Fuhua. 2018. Cloning and analysis of reverse transcriptase of LTR retrotransposons in *Osmanthus fragrans*. Acta Horticulturae Sinica, 45 (2): 309 – 320. (in Chinese)
- 王庆竹, 李慧平, 文晓鹏, 范付华. 2018. 桂花 LTR 类反转录转座子 RT 序列的克隆及分析. 园艺学报, 45 (2): 309 – 320
- Wicker T, Keller B. 2007. Genome-wide comparative analysis of copia retrotransposons in *Triticeae*, rice, and *Arabidopsis* reveals conserved ancient evolutionary lineages and distinct dynamics of individual copia families. Genome Research, 17 (7): 1072 – 1081.
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennerzen J L, Capy P, Chalhou B, Flavell A, LEROY P, Morgante M, Panaud O, Paux E, Sanmuguel P, Schulman A H. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. Nat Rev Genet, 8: 973 – 982
- Wu J, Wang Z, Shi Z, Zhang S. 2013. The genome of the pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) . Genome Research, 23 (2): 396 – 408.
- Xu Ling, Yang Jing, Liu Lin, Li Chengyun. 2012. Research progress in retrotransposons of plants. Acta Agriculturae Jiangxi, 24 (6): 42 – 46. (in Chinese)
- 徐 玲, 杨 静, 刘 林, 李成云. 2012. 植物反转录转座子的研究进展. 江西农业学报, 24 (6): 42 – 46.
- Zheng Hao, Ji Hang, Jiang Zheng-qin, Xu Zhi-xin, Zhou Ming-bing. 2019. Identification and transcription activity analysis of a full-length LTR retrotransposon of PHRE9 in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) . Journal of Agricultural Biotechnology, 27 (4): 645 – 655. (in Chinese)
- 郑 浩, 季 航, 蒋政勤, 徐芷馨, 周明兵. 2019. 一个毛竹 LTR 转座子 PHRE9 的全长鉴定与转录活性分析. 农业生物技术学报, 27 (4): 645 – 655.
- Zhou Fen-jing, Gao Yan-hui, Tong Zai-kang. 2015. Cloning and analysis of reverse transcriptase gene (RT) of Ty1-copia retrotransposons in *Lycoris radiata*. Journal of Agricultural Biotechnology, 23 (4): 469 – 480
- 周芬静, 高燕会, 童再康. 2015. 石蒜 Ty1-copia 类反转录转座子反转录酶基因 (RT) 的克隆与分析. 农业生物技术学报, 23 (4): 469 – 480.