

# 燕麦 EST 数据库中 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型 反转录转座子的频数分析

郭红媛<sup>1</sup> 贾举庆<sup>1\*</sup> 张莉<sup>1</sup> 靳艳婷<sup>1</sup> 侯莎莎<sup>1</sup> 杨武德<sup>1,2</sup>

(1. 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801;

2. 山西农业大学 旱作工程研究所, 山西 太谷 030801)

**摘要** 为研究转座元件(Transposable elements, TE<sub>s</sub>)在燕麦中的表达模式,以 14 个 Ty1-copia 型反转录转座子和 3 个 Ty3-gypsy 型反转录转座子序列为种子序列对燕麦属(*Avena*)表达序列标签(EST)数据库中的 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子进行检索和分析。结果表明:燕麦根中反转录转座子的频率显著高于叶( $P < 0.05$ );强降雨模式的胁迫环境下叶组织中反转录转座子的 EST 频率显著高于大气降雨下的( $P < 0.05$ ),约为正常条件下的( $E < e^{-10}$ , 0.12%)2 倍;Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子在根的分蘖期频率差异极显著( $P < 0.01$ )。这些结果揭示了燕麦属 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子的转录存在组织和发育的时空特异性及环境应答现象,为预测重复元件的表达模式提供了依据。同时,检索到的反转录转座子也有助于对燕麦基因组序列的注释。

**关键词** 燕麦属;反转录转座子;EST 数据库;转座子特异性表达

中图分类号 S 512.6; Q 81

文章编号 1007-4333(2014)04-0023-08

文献标志码 A

## Frequencies of Ty1-copia and Ty3-gypsy retroelements within the *Avena* EST database

GUO Hong-yuan<sup>1</sup>, JIA Ju-qing<sup>1\*</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>, JIN Yan-ting<sup>1</sup>, HOU Sha-sha<sup>1</sup>, YANG Wu-de<sup>1,2</sup>

(1. College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. Dryland Farming Engineer Institute, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

**Abstract** To investigate the expression pattern of Transposable elements (Transposable elements, TE<sub>s</sub>) in oat, fourteen Ty1-copia-type retrotransposon sequences and three Ty3-gypsy-type retrotransposon sequences were selected as seeded sequence to mine and analyse Ty1-copia-type and Ty3-gypsy-type retrotransposons in the *Avena* EST database of GenBank. The result showed the frequency of retrotransposons in root tissues was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in leaves. The frequency of retrotransposons in oat under high rainfall stress conditions (0.24% at  $E < e^{-10}$ ) was about to 2 folds higher than that of under ambient rainfall conditions (0.12% at  $E < e^{-10}$ ). The significant difference was estimated between Ty1-copia-type and Ty3-gypsy-type retrotransposons in root ( $P < 0.01$ ), but lack of significant differences in leaf. The result above suggested tissue-specific, developmental regulation and responses to the environment were existed in Ty1-copia-type and Ty3-gypsy-type retrotransposons of oat, which provided an indirect estimation of the patterns of transcriptional activity of these repetitive elements. The retrotransposons mined in *Avena* EST database are helpful to annotation of genomic sequences also.

**Key words** *Avena*; retrotransposons; EST database; transposon specific expression

收稿日期: 2013-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31101199); 山西省基础研究计划项目(2012021024-2); 山西农业大学“中青年学术带头人及学术骨干”项目(XG201209); 山西农业大学引进人才科研启动项目(XB2010009)

第一作者: 郭红媛, 讲师, 主要从事植物基因工程与植物抗逆研究, E-mail: guo\_hy@163.com

通讯作者: 贾举庆, 副教授, 主要从事燕麦抗逆性研究, E-mail: jiajuqing@126.com

反转录转座子(Retrotransposon)是转座元件(Transposable elements, TE<sub>s</sub>)中的一员,因其转座需经由 RNA 介导的反转录过程而得名<sup>[1]</sup>。反转录转座子在生物中广泛存在,目前共发现 5 种类型的反转录转座子:LTR 类、DIRS 类、PLE 类、LINE 类和 SINE 类<sup>[2]</sup>,其中 LTR 类中的 Ty1-*copia* 和 Ty3-*gypsy* 型反转录转座子,在植物中分布最广,几乎覆盖了所有高等植物种类,在一些大基因组作物中几乎占了基因组的 80%<sup>[3]</sup>。虽然反转录转座子是先通过转录合成 mRNA 后再反转录合成新元件整合到基因组中完成转座的,但研究发现大部分反转录转座子在基因组中是没有转录活性的。研究报道表明 mRNA 中的反转录转座子拷贝数要远低于基因组序列,如玉米反转录因子的重复序列在基因组序列中占 50%~80%,而在 mRNA 中却低于 10%<sup>[1]</sup>,即使有转录活性的反转录转座子在通常状况下往往是没有活性的,只有在某些胁迫条件,如细胞离体培养、CuCl<sub>2</sub>、盐、光、风等胁迫下才表现出转录活性<sup>[4-7]</sup>。对于反转录转座子在植物基因组中的功能,目前的研究普遍认为它可通过插入而改变基因的结构,引起基因复制、重排、倒位<sup>[8]</sup>;促进染色体的重排,成为进化的种子<sup>[9]</sup>;是物种基因组由小变大的主要驱动力<sup>[10]</sup>。近年来研究发现,反转录转座子在调控基因表达方面也发挥着重要的作用。研究一些有转录活性的反转录转座子发现,它们能改变寄主或邻近基因的结构和功能,这些改变通常是将自己的 LTR 作为启动子提供给寄主基因或插入寄主基因中成为有功能的内含子,开启基因的表达<sup>[11-13]</sup>。另有一些有转录活性的 LTR 类反转录转座子的转录产物是通过影响其附近的基因产生正义或反义的转录本,调控基因的表达<sup>[14]</sup>。此外还发现 5'LTR 上的顺式作用元件与植物应激防御信号通路联系<sup>[15-16]</sup>。

燕麦属(*Avena*)是一种抗逆性很强的世界性分布物种,适于在贫瘠、恶劣环境中生存,具有极强的繁衍能力。关于燕麦属反转录转座子的研究并不多,而有转录活性的只报道了 OARE-1。对 OARE-1 转录活性研究发现 OARE-1 对真菌、物理损伤、紫外光、茉莉酸和水杨酸胁迫敏感<sup>[17]</sup>,至于对其他逆境胁迫的研究尚无相关报道。燕麦属全世界约有 29 个种,这些物种涉及 A、B、C、D 4 个基因组,有二

倍、四倍和六倍体 3 种类型,六倍体栽培燕麦基因组庞大,约有 11 400 Mbp,在禾本科植物中仅小于六倍体小麦,因此推断反转录转座子在燕麦基因组进化中发挥着重要的作用。此外,研究发现 LTR 类反转录转座子在序列结构上有很大的异质性<sup>[18-19]</sup>,但其转录活性时空差异还未见报道。

表达序列标签(EST)是对 cDNA 的随机克隆片段,长度为 100~500 bp。EST 丰度越高表明对应基因在特异性组织中的表达越活跃。一些具特异生物学功能的基因与 EST 数据库中的其他序列比对后,可获得不同生长环境下、不同生长阶段和不同组织中这类基因的相对表达情况<sup>[20]</sup>。现有公布的细菌人工染色体(BAC)文库可为燕麦物种所用,部分 cDNA 克隆的测序结果也已公布于美国国立生物信息中心(NCBI)数据库中<sup>[21-22]</sup>。本研究拟利用不同环境条件、不同发育阶段和不同组织的 11 个 cDNA 文库中的燕麦 EST 序列,统计分析其燕麦属类 Ty1-*copia* 和 Ty3-*gypsy* 型反转录转座子序列在这些 EST 数据库中的频数,组织特异性分布频率以及转录活性的表现,对 Ty1-*copia* 和 Ty3-*gypsy* 型反转录转座子的转录模式进行估测,为研究反转录转座子在燕麦基因组进化、抗逆基因表达调控中的作用等方面进行有益的探索。此外,对这些重复序列显著相似的 ESTs 序列的分析将有助于对燕麦基因组序列的注释。

## 1 材料与与方法

### 1.1 序列来源

登录 NCBI 网站,利用 Entrez 检索系统对 GenBank 中的燕麦属 EST 数据库进行检索,得到来源于 11 个由根、叶、花序、胚乳以及种子等组织在胁迫或不同发育阶段构建 cDNA 文库的 79 585 条燕麦 EST 序列(表 1)。通过对燕麦属反转录转座子的检索找到 4 条 Ty1-*copia* 型反转录转座子的序列(*Avena strigosa*, AJ269530; *Avena vaviloviana*, Z49885; *Avena strigosa*, AJ223973; *Avena strigosa*, AJ269531),6 条燕麦反转录酶序列(*Avena sativa*, M94483; *Avena sativa*, AF378026; *Avena sativa*, AF378025; *Avena sativa*, AF378024; *Avena sativa*, AJ295096; *Avena sativa*, AJ295097),44 条其他燕麦反转录转座子序列(*Avena sativa*, AJ061327; JQ345717...)。另外,用同样的方法对其他物种的反

表 1 燕麦属 EST 数据库中 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子的频数

Table 1 Frequency of Ty1-copia and Ty3-gypsy-type retrotransposons in *Avena* EST databases

种名 Name of species	发育时期 Develop. stage	组织类型 Tissue type	ESTs 的数量 No. of ESTs	Ty1-copia 的 EST 数量 $E < e^{-20}$ ( $E < e^{-10}$ ) No. of ESTs	Ty3-gypsy 的 EST 数量 $E < e^{-20}$ ( $E < e^{-10}$ ) No. of ESTs	总数 Total	频率 Frequency
<i>Avena barbata</i>	分蘖期 Tillering	叶 Leaf	10 301	1(1)	2(5)	3(6)	0.03(0.06)
		根 Root	23 715	2(8)	10(30)	12(38)	0.05(0.16)
	孕穗期 Booting	叶 Leaf	20 226	3(17)	7(19)	10(36)	0.05(0.18)
<i>Avena sativa</i>	萌发期 Germination period	根 Root	2 520	27(33)	6(12)	33(45)	1.31(1.78)
		黄化叶 Etiolated leaf	2 823	3(6)	4(7)	7(13)	0.25(0.46)
	苗期 Seeding	绿叶 Green leaf	2 205	1(1)	1(1)	1(2)	0.05(0.09)
		开花期 Flowering stage	花序 Inflorescence	19	0(0)	0(0)	0(0)
	颖果形成期 Watery	种子 Seed	4 457	1(2)	2(3)	3(5)	0.07(0.11)
	乳熟前期 Early milk	种子 Seed	2 902	1(3)	0(3)	1(6)	0.03(0.21)
	乳熟后期 Late milk	种子 Seed	10 352	3(4)	5(8)	8(12)	0.08(0.12)
	幼嫩胚乳期 Immature endosperm stage	胚乳 Endosperm	65	0(0)	0(0)	0(0)	0.00(0.00)
	合计 Total		79 585	42(75)	28(84)	70(159)	0.09(0.20)

转录转座子检索,找到大麦 *Hordeum vulgare* (BARE1, Z17327. 1; CEREB, AF078801. 1; BAGY-1, Y14573), 小麦 *Triticum aestivum* (WIS-2-1A, X63184. 1; WHRE1, AB14747. 1), 小麦 *Triticum monococcum* (WIS-2-1A, AF339051), 黑麦 *Secale cereale* (R1713, X64100. 1) 等核酸序列。

### 1.2 Blast 比对

使用 NCBI 在线 BLASTN 检索程序对 GenBank 中的燕麦 EST 数据库进行 BLASTN 检索燕麦类反转录转座子 EST 序列,具体检索分类数据库为: *Avena*(taxid:4496)。以期望值  $E < e^{-20}$  和 BLASTN

得分大于 100 为第 1 次检索阈值,满足条件的序列被认为反转录转座子同源序列(搜索条件越严格,所得序列相似程度越高,相应的生物学功能可能更接近)。这种严格的选择阈值摒弃了一些与反转录转座子表现出较少相似的 ESTs 序列,及减少检索结果中 ESTs 序列的假阳性数量。然后以期望值  $E < e^{-10}$  和 BLASTN 得分高于 100 为阈值进行第 2 次检索(适当降低反转录转座子的选择严格性)。对所有满足搜索条件的 ESTs 序列进行组装(拼接后分析以避免出现假阳性和假阴性结果)、比对与统计分析。

Ty1-copia 型 ESTs 同源序列用 4 条燕麦属

Ty1-*copia* 型反转录转座子序列 (AJ269530, Z49885, AJ223973, AJ269531), 4 条 Ty1-*copia* 型燕麦反转录酶序列 (M94483, AF378026, AF378025, AF378024) 和来源于大麦属 *Hordeum vulgare* (BARE1, Z17327. 1), 小麦属 *Triticum aestivum* (WIS-2-1A, X63184. 1), 小麦属 *Triticum monococcum* (WIS-2-1A, AF339051), 黑麦属 *Secale cereale* (R1713, X64100. 1) 的 Ty1-*copia* 型序列在燕麦属 EST 数据库中进行 BLASTN 比对; Ty3-*gypsy* 型 ESTs 同源序列用 2 条燕麦 Ty3-*gypsy* 型反转录酶序列 (AJ295096, AJ295097), 几条小麦属等物种的相关序列 *H. vulgare* (CEREBA, AF078801. 1; BAGY-1, Y14573), 几条 *T. aestivum* (WHRE1, AB014747. 1) 检索。44 条其他燕麦反转录转座子核酸序列在燕麦属 EST 数据库中同样进行逐条比对。对于检索合格的所有燕麦类反转录转座子 EST 序列, 首先按照基因登录号去除重复序列, 然后经过逐一比对、去除重复序列后进行统计。因与种子序列匹配较好的燕麦 EST 序列来源 (种类、组织类型、cDNA 文库、处理方法、条件) 不同, 即使有几条序列与反转录转座子特征序列某个结构域的转录部位一致, 也不能认为它们是重复序列, 这是检索燕麦 EST 库中所得反转录转座子频率的一个构成部分。其次, 对剩余各种情况下检索到的序列分别利用在线拼接软件拼接 (环境、处理方式等相同条件下检索到的燕麦 EST 序列通过拼接, 如果能拼接上就认为是重复序列, 只保留 1 条)、比对后去除重复序列。最后分情况计数、统计。

对计数资料采用四格表的  $\chi^2$  检验和 Fisher 确切

概率法<sup>[23-25]</sup>进行统计分析和确切概率的计算与分析。结果由 SPSS 19.0 和 EXCEL 2003 统计分析所得。

$n \geq 40$  且所有的  $T \geq 5$  时, 可用

$$\chi^2 = \sum \frac{(A - T)^2}{T}$$

$n \geq 40$ , 但有  $1 \leq T < 5$  时, 可用

$$\chi_c^2 = \sum \frac{(|A - T| - 0.5)^2}{T}$$

$n < 40$  或  $T < 1$  时, 用四格表资料的 Fisher 确切概率法。

$n$ : 总计;  $A$ : 实际频数;  $T$ : 理论频数;  $\chi_c^2$ : 连续性校正的卡方值。

## 2 结果与分析

燕麦属 EST 数据库中共收集 79 585 条源于 11 个 cDNA 文库的反转录转座子序列, 见表 1。其中 68. 2% 源于 *Avena barbata*, 31. 8% 源于 *Avena sativa*。在严格的 BLASTN 检索条件 ( $E < e^{-20}$  且得分大于 100) 下, 有 42 条 (0. 05%) EST 序列显著相似于 Ty1-*copia* 型反转录转座子, 28 条 (0. 04%) EST 序列显著相似于 Ty3-*gypsy* 型反转录转座子, 这 2 种类型反转录转座子在总数据库中检索到的频率为 0. 09%。当 BLASTN 检索条件变成  $E < e^{-10}$  且得分大于 100 时, 类 Ty1-*copia* 和 Ty3-*gypsy* 型反转录转座子序列在总 ESTs 序列中的频率由 0. 09% 增加到 0. 20%, 这种有转录活性的反转录转座子的频率与小麦所报道的结果相似<sup>[20]</sup>。搜索到的反转录转座子结构与报道的 LTR 反转录转座子<sup>[2]</sup> 及 OARE-1 (GenBank 登录号: AB061327)<sup>[17]</sup> (图 1) 结构高度相似。

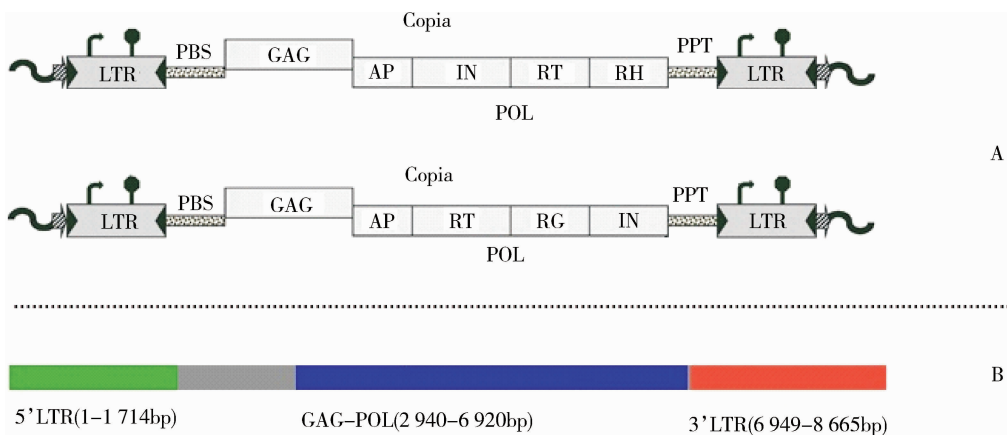


图 1 LTR 类反转录转座子 (A)<sup>[2]</sup> 和燕麦 Ty1-*copia* 型反转录转座子 OARE-1 结构示意图 (B)

Fig. 1 Structure of the LTR retrotransposon (A) and Ty1-*copia*-type retrotransposon OARE-1 in oat (B)

### 2.1 不同水分胁迫下的反转录转座子频数分析

对不同降雨模式(胁迫与正常降雨条件)下的燕麦(*Avena barbata*)叶组织构建的 cDNA 文库中 2 类反转录转座子的 EST 序列频数进行统计分析发现,强降雨(胁迫)条件下燕麦 cDNA 文库中的或 LTR 类 Ty1-copia 型反转录转座子频率( $E < e^{-10}$  且得分大于 100 时为 0.10%)高于大气降雨下(正常降雨条件)燕麦 cDNA 文库中 Ty1-copia 型反转录转座子频率( $E < e^{-10}$  且得分大于 100 时为 0.07%); Ty3-gypsy 型反转录转座子频率在强降雨条件下( $E < e^{-10}$  且得分大于 100 时为 0.14%)同样高于正常条件下的频率

( $E < e^{-10}$  且得分大于 100 时为 0.05%),且胁迫条件下的频率是正常条件下的 2.8 倍。对 2 种类型的反转录转座子序列总计后发现,胁迫后总的反转录转座子序列的频率(0.24%)约为正常条件(0.12%)下的 2 倍( $E < e^{-10}$  且得分大于 100 时),即胁迫后燕麦属 cDNA 文库中 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子比正常燕麦属 cDNA 文库中增加了 1 倍(表 2)。经  $\chi^2$  检验,强降雨(胁迫)条件下叶中反转录转座子(Ty1-copia 和 Ty3-gypsy)频率显著高于大气降雨(非胁迫)下的( $P = 0.0432$ ),表明强降雨条件可能诱导了一部分反转录转座子的转录。

表 2 不同降雨模式下燕麦属叶组织中 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子的频率

Table 2 Frequency of *Avena* Ty1-copia and Ty3-gypsy-type retrotransposons in leaf tissue under different rainfall

EST 频数 Frequency of EST	强降雨 High rainfall	大气降雨 Ambient rainfall	合计 Total
ESTs 的数量 No. of ESTs	10 080	10 146	20 226
Ty1-copia 的 EST 数量 $E < e^{-20}$ ( $E < e^{-10}$ ) No. of significant hits to Ty1-copia	1(10)	2(7)	3(17)
Ty3-gypsy 的 EST 数量 $E < e^{-20}$ ( $E < e^{-10}$ ) No. of significant hits to Ty3-gypsy	4(14)	3(5)	7(19)
反转录转座子 ESTs 的频率 $E < e^{-20}$ ( $E < e^{-10}$ ) Frequency of ESTs significantly similar to any retroelement at $E < e^{-20}$ ( $E < e^{-10}$ )	0.05(0.24)	0.05(0.12)	0.05(0.18)

### 2.2 不同组织间的频率分析

为研究反转录转座子表达特异性,分别对不同物种、组织和发育时期构建的 cDNA 文库中的 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子的频数进行统计分析发现, *A. sativa* 在萌发期的根中 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子序列的频率为 1.79%,而叶中这 2 种类型的反转录转座子频率为 0.46%,卡方检验表明反转录转座子在 2 种组织中差异达到极显著水平。对 *A. barbata* 根和叶的反转录转座子序列的频率统计发现,根为 0.16%,叶为 0.06%,两者之间存在显著差异(表 3)。对颖果发

育期种子中的 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子频率的分析说明 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子表达也带有明显的时间特性(图 2)。利用确切概率法对 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子的活化模式统计后发现,无论是 *A. sativa* 还是 *A. barbata* 叶中 2 种类型的反转录转座子的活化模式基本相同,而 *A. sativa* 萌发期的根中 Ty1-copia 型反转录转座子显著多于 Ty3-gypsy 型反转录转座子( $P_{Ty1 vs Ty3} = 0.0029^{**}$ ); *A. barbata* 分蘖期的根中 Ty3-gypsy 型反转录转座子显著多于 Ty1-copia 型反转录转座子( $P_{Ty1 vs Ty3} = 0.0007^{**}$ )(表 3)。

表3 组织间(中)总反转录转座子序列的相对频率分析

Table 3 Comparison of the total frequency of retrotransposons in cDNA libraries from different tissues and between the relative frequencies in the same tissues

种名 Name of species	发育时期 Develop stage	组织 Tissue	ESTs 的 个数 Number of ESTs	Ty1- <i>copia</i>	Ty3- <i>gypsy</i>	总数/% Total	Fisher 确切概率 Fisher exact test	
							$P_{Ty1 vs Ty3}$	组织间 Between tissues
<i>Avena sativa</i>	萌发期(6 d) Germination period (6-days-old)	根 Root	2 520	33	12	1.79	0.002 9**	$P=3.06E-6$ **
		叶 Leaf	2 823	6	7	0.46		
<i>Avena barbata</i>	分蘖期 Tillering	根 Root	23 715	8	30	0.16	0.000 7**	$P=0.016 2^*$
		叶 Leaf	10 301	1	5	0.06		
	孕穗期 Booting	叶 Leaf	10 146	7	5	0.12	0.772 8	$P=0.147 9$
		叶 Leaf						

注: \* 表示在 0.05 水平显著差异, \*\* 表示在 0.01 水平极显著差异。BLASTN 检索阈值为  $E < e^{-10}$ 。

Note: \* Shows significantly different at 0.05 level and \*\* Shows significantly different at 0.01 level. BLASTN threshold =  $E < e^{-10}$ .

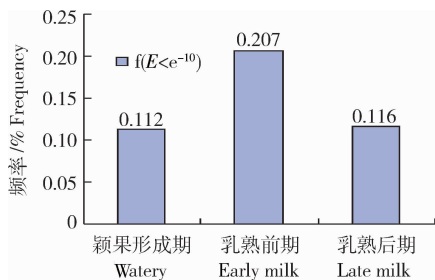


图2 反转录转座子在种子不同发育时期的频率

Fig. 2 Frequency of retrotransposons in seed on different development stage

### 3 讨论

#### 3.1 燕麦 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子表达特性与水分胁迫的关系

Ty1-*copia* 和 Ty3-*gypsy* 型反转录转座子在转座元件中属于 LTR 型反转录转座子,这种类型的反转录转座子在结构上都有共同之处,即 5'端和 3'端各有 1 长末端重复序列。研究发现,大部分的植物 LTR 型反转录转座子在正常生长条件下是没有活性的,即不发生转录过程,但一些胁迫条件或环境的改变能激活 LTR 型反转录转座子发生转录,如在组织离体培养条件下玉米中的 BS1<sup>[26]</sup>、水稻中的 Tos17<sup>[27]</sup>、蒺藜和苜蓿中的 MERE1<sup>[28]</sup>,冷胁迫条件

下紫花苜蓿中的 MCIRE<sup>[29]</sup>、玉米中的 ZmMI1<sup>[30]</sup>、橙子中的 Tcs1 和 Tcs2<sup>[31]</sup>,热胁迫条件下拟南芥中的 ONSEN<sup>[32]</sup>,氮和盐胁迫下小麦的 Morgane<sup>[33]</sup> 和 Ttd1a<sup>[34]</sup> 都被激活而发生转录。燕麦中的 OARE-1 对真菌、物理损伤、紫外光、茉莉酸和水杨酸胁迫敏感<sup>[17]</sup>,但水分胁迫激活反转录转座子例子在燕麦和其他植物中还未见报道。本研究对强降雨和大气降雨(正常降雨)条件下燕麦叶中的有转录活性的反转录转座子频数进行统计分析,发现水分胁迫可诱导一些反转录转座子的转录活性上升,强降雨条件下的频率与大气降雨条件下的频率差异显著( $P=0.042 3$ )。而对于干旱胁迫条件下的燕麦反转录转座子转录情况由于没有相关的 EST 数据而无法统计。

#### 3.2 燕麦 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子的选择性表达

基因的选择性表达贯穿于生物体整个生长发育阶段, Ty1-*copia* 和 Ty3-*gypsy* 型反转录转座子表达也同样具有时空性。如 *Tnt1* 只在根中表达,且表达水平很低<sup>[35]</sup>,而 *Tto1*, *Tos10* 和 *Tos17* 则在除叶外的所有组织中表达<sup>[27,36]</sup>,对燕麦萌发期的根和叶 EST 库中的 Ty1-*copia* 和 Ty3-*gypsy* 型反转录转座子频数进行统计后,本研究也发现 Ty1-*copia*

和 Ty3-gypsy 型反转录转座子组织表达的特异性: 根中 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子总频率(1.79%)明显大于叶中 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子总频率(0.46%), 差异达到极显著水平。分蘖期的根和叶中 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子总频率差异也达到显著水平。究其原因可能与根所处环境较叶更为复杂、受到胁迫和改变更多有关。除了组织特异性表达外, Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子表达还具有发育的时间特异性, 如对燕麦颖果发育期种子中的 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子频数的分析发现 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子表达具明显的时间特性; 对 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子的活化模式进行统计分析后发现, 萌发期的根中 Ty1-copia 型反转录转座子显著多于 Ty3-gypsy 型反转录转座子, 分蘖期的根中 Ty3-gypsy 型反转录转座子显著多于 Ty1-copia 型反转录转座子, 这些现象在玉米中也同样存在: 反转录转座子 PREM-2 表达只在孢子早期可以检测到<sup>[37]</sup>。禾本科作物分蘖期间主要增长根系以及建立合理群体结构, 这时期的根部代谢活动旺盛。燕麦为禾本科植物, 根系发达且极抗旱, 在分蘖期根发育相关基因表达活跃, 酶、内源激素等物质都有变化。本研究得出的分蘖期燕麦根中 Ty3-gypsy 型反转录转座子显著多于叶等其他组织以及其他时期的, 揭示了在分蘖期 Ty3-gypsy 型比 Ty1-copia 型可能更多地调控根系生长中的主要代谢物质的活性及水平。这说明即使均为 LTR 型反转录转座子, Ty1-copia 型和 Ty3-gypsy 型反转录转座子的激活模式也存在特异性, 这种特异性不仅与环境条件刺激有关, 与器官发育也可能有关。以上结果可为将来深入研究燕麦 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 型反转录转座子的调控机理提供参考。

### 3.3 植物 LTR 类反转录转座子研究方法

LTR 类反转录转座子在一些大基因组作物中几乎占了基因组的 80%, 它们在植物基因组重塑、进化和基因表达调控中起着重要的作用<sup>[8-9]</sup>, 而其中有转录活性的 LTR 类反转录转座子又为研究的重点。LTR 类反转录转座子虽然在结构上存在很大的异质性<sup>[18-19]</sup>, 但 RT 和 RH 结构域均存在一定的保守性, 因为利用保守序列设计兼并引物可实现对 LTR 类反转录转座子的克隆, 利用此方法已从水稻<sup>[27]</sup>、马铃薯<sup>[38]</sup>、燕麦<sup>[17]</sup>、高粱<sup>[39]</sup> 获得 LTR 类反

转录转座子。随后 EST 库构建与基因芯片技术为研究 LTR 类反转录转座子提供了便利<sup>[40-42]</sup>。本研究具有转录活性的 LTR 类反转录转座子即来自于燕麦不同组织和不同条件下的 cDNA 文库。近年来基于 LTR 类反转录转座子的 Tiling 芯片技术<sup>[43]</sup>和第二代测序技术<sup>[44-45]</sup>已应用到 LTR 类反转录转座子的表达研究中, 为燕麦 LTR 类反转录转座子的研究提供了新的方法与思路。

### 参 考 文 献

- [1] Kumar A, Bennetzen J L. Plant retrotransposons[J]. Annu Rev Genet, 1999, 33: 479-532
- [2] Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements [J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(12): 973-982
- [3] 仲晓芳. 菰 (ZIZANIA + LATIFOLIA) TY1COPIALIKE 反转录转座子反转座酶序列的克隆和分析[D]. 长春: 东北师范大学, 2005: 1-10
- [4] Grandbastien M A, Lucas H, More J B, et al. The expression of the tobacco *Tnt1* is linked to plant defence responses [J]. Genetica, 1997, 100: 241-252
- [5] Grandbastien M A, Audeon C, Bonnard E, et al. Stress activation and genomic impact of *Tnt1* retrotransposon in *Solanaceae* [J]. Cytogenet Genome Res, 2005, 110: 229-241
- [6] Hirochika H. Retrotransposons of rice: Their regulation and use for genome analysis [J]. Plant Mol Biol, 1997, 35: 231-240
- [7] Pasqualina W, Giovanni P, Stefania F. Polymorphism of a new Ty1-copia retrotransposon in durum wheat under salt and light stresses [J]. Theor Appl Genet, 2010, 121: 311-322
- [8] Flagel L E, Wendel J F. Gene duplication and evolutionary novelty in plants [J]. New Phytol, 2009, 183: 557-564
- [9] Feschotte C, Pritham E J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes [J]. Annu Rev Genet, 2007, 41: 331-368
- [10] Agren J A, Wright S I. Co-evolution between transposable elements and their hosts: A major factor in genome size evolution [J]. Chromosome Res, 2011, 19: 777-786
- [11] Wessler S R, Bureau T E, White S E. LTR-retrotransposons and MITEs: Important players in the evolution of plant genomes [J]. Curr Opin Genet Dev, 1995, 5: 814-821
- [12] Marillonnet S, Wessler S R. Retrotransposon insertion into the maize waxy gene results in tissue-specific RNA processing [J]. Plant Cell, 1997, 9: 967-978
- [13] Hayashi K, Yoshida H. Refunctionalization of the ancient rice blast disease resistance gene *Pit* by the recruitment of a retrotransposon as a promoter [J]. Plant J, 2009, 57: 413-425
- [14] Kashkush K, Khasdan V. Large-scale survey of cytosine methylation of retrotransposons and the impact of readout transcription from long terminal repeats on expression of

- adjacent rice genes[J]. *Genetics*, 2007, 177(4): 1975-1985
- [15] Grandbastien M A. Stress activation and genomic impact of plant retrotransposons[J]. *J Soc Biol*, 2004, 198(4): 425-432
- [16] Pouteau S, Grandbastien M A, Boccara M. Microbial elicitors of plant defence responses activate transcription of a retrotransposon[J]. *Plant J*, 1994, 5(4): 535-542
- [17] Kimura Y, Tosa Y, Shimada S, et al. OARE-1, a Ty1-copia retrotransposon in oat activated by abiotic and biotic stresses [J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(12): 1345-1348
- [18] 范付华, 乔光, 郑思成, 等. 火龙果 Ty1-copia 类反转录转座子反转录酶序列的克隆及分析[J]. *园艺学报*, 2012, 39(2): 265-272
- [19] 侯小改, 郭大龙, 黄燕梅, 等. 牡丹 Ty3-gypsy 类反转录转座子反转录酶序列的克隆及分析[J]. *园艺学报*, 2013, 40(1): 98-106
- [20] Echenique V, Stamova B, Wolters P, et al. Frequencies of Ty1-copia and Ty3-gypsy retroelements within the *Triticeae* EST databases[J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 840-844
- [21] Swarbreck S M, Lindquist E A, Ackerly D D, et al. Analysis of leaf and root transcriptomes of soil-grown *Avena barbata* plants[J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(2): 317-332
- [22] Becher R. EST-derived microsatellites as a rich source of molecular markers for oats[J]. *Plant Breed*, 2007, 126: 274-278
- [23] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 130-144
- [24] 徐荣祥. 烧伤治疗大全[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2008
- [25] 李晖. 实用医学统计方法[M]. 南京: 河海大学出版社, 1989: 232-272
- [26] Johns M A, Mottinger J, Freeling M. A low copy number, copia-like transposon in maize[J]. *EMBO J*, 1985, 4: 1093-1101
- [27] Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, et al. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(15): 7783-7788
- [28] Rakocevic A, Mondy S, Tirichine L, et al. MERE1, a low-copy-number copia-type retroelement in *Medicago truncatula* active during tissue culture[J]. *Plant Physiol*, 2009, 151: 1250-1263
- [29] Ivashuta S, Naumkina M, Gau M, et al. Genotype-dependent transcriptional activation of novel repetitive elements during cold acclimation of alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. *Plant J*, 2002, 31: 615-627
- [30] Steward N, Ito M, Yamaguchi Y, et al. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 37741-37746
- [31] Butelli E, Licciardello C, Zhang Y, et al. Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges[J]. *Plant Cell*, 2012, 24: 1242-1255
- [32] Ito H, Gaubert H, Bucher E, et al. An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress[J]. *Nature*, 2011, 472: 115-119
- [33] Sabot F, Sourdille P, Chantret N, et al. Morgane, a new LTR retrotransposon group, and its subfamilies in wheats [J]. *Genetica*, 2006, 128: 439-447
- [34] Woodrow P, Pontecorvo G, Ciarmiello L F, et al. Ttd1a promoter is involved in DNA-protein binding by salt and light stresses[J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 3787-3794
- [35] Pouteau S, Huttner E, Grandbastien M A, et al. Specific expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon in protoplasts [J]. *EMBO J*, 1991, 10(7): 1911-1918
- [36] Hirochika H. Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture[J]. *EMBO J*, 1993, 12(6): 2521-2528
- [37] Turcich M P, Bokhari-Riza A, Hamilton D A, et al. PREM-2, a copia-type retroelement in maize is expressed preferentially in early microspores[J]. *Sex Plant Reprod*, 1996, 9(2): 65-74
- [38] Pearce S R, Kumar A, Flavell A J. Activation of the Ty1-copia group retrotransposons of potato (*Solanum tuberosum*) during protoplast isolation[J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 16: 949-953
- [39] Muthukumar B, Bennetzen J L. Isolation and characterization of genomic and transcribed retrotransposon sequences from sorghum[J]. *Mol Genet Genomics*, 2004, 271: 308-316
- [40] Araujo P G, Rossi M, de Jesus E M, et al. Transcriptionally active transposable elements in recent hybrid sugarcane[J]. *Plant J*, 2005, 44: 707-717
- [41] Ansari K I, Walter S, Brennan J M, et al. Retrotransposon and gene activation in wheat in response to mycotoxigenic and nonmycotoxigenic-associated Fusarium stress[J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 114: 927-937
- [42] Ay N, Clauss K, Barth O, et al. Identification and characterization of novel senescence-associated genes from barley (*Hordeum vulgare*) primary leaves [J]. *Plant Biol (Stuttg)*, 2008, 10: 121-135
- [43] Picault N, Chaparro C, Piegu B, et al. Identification of an active LTR retrotransposon in rice[J]. *Plant J*, 2009, 58: 754-765
- [44] Sabot F, Picault N, El-Baidouri M, et al. Transpositional landscape of the rice genome revealed by paired-end mapping of high-throughput re-sequencing data[J]. *Plant J*, 2011, 66: 241-246
- [45] Miyao A, Nakagome M, Ohnuma T, et al. Molecular spectrum of somaclonal variation in regenerated rice revealed by whole-genome sequencing[J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53: 256-264