

毛竹LTR反转录转座子PHRE6的 克隆与转录活性分析

张赞一^{1,2} 周明兵^{1,2*} 汤定钦^{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, 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, 杭州 311300)

摘要 长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)反转录转座子是真核生物基因组中普遍存在的一类可移动的DNA序列, 因两端具有长末端重复序列而得名。大多数LTR反转录转座子能够感受外界环境的变化, 具有转录激活特性和转座激活特性。该研究从毛竹(*Phyllostachys edulis*, *Ph. edulis*)基因组中克隆出一条完整的LTR反转录转座子, 命名为PHRE6(*Phyllostachys edulis* retrotransposons 6), 该转座子全长为5 620 bp, 具有GAG和POL保守结构域。通过荧光定量PCR检测了PHRE6在DNA甲基化抑制剂和不同胁迫处理(包括辐照、高温、低温、高盐)的毛竹实生苗中转录水平的变化, 结果表明, 在DNA甲基化抑制剂处理后和高温(42 °C)、低温(16 °C、4 °C)、高盐(100 mmol/L、200 mmol/L、300 mmol/L NaCl溶液)胁迫处理下PHRE6表达水平均有显著提高。以上结果说明, PHRE6是一个具有转录活性的反转录转座子, 可能参与毛竹逆境响应过程。

关键词 毛竹; LTR反转录转座子; 非生物胁迫; 转录活性

Phyllostachys edulis LTR Transposon-Cloning and Transcriptional Activity Identification of PHRE6

Zhang Zanyi^{1,2}, Zhou Mingbing^{1,2*}, Tang Dingqin^{1,2}

¹State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China;

²Zhejiang Provincial Collaborative Innovation Center for Bamboo Resources and High-Efficiency Utilization, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China)

Abstract Long terminal repeats (LTR) retrotransposons are a type of mobile DNA sequence that is commonly found in eukaryotic genomes and are named after having long terminal repeats at both ends. Most LTR retrotransposons are able to sense changes in the external environment, with transcriptional activation and transposition activation properties. In this study, a complete LTR retrotransposon is cloned from the genome of *Phyllostachys edulis* (*Ph. edulis*), named PHRE6 (*Phyllostachys edulis* retrotransposons 6). The total length of the transposon is 5 620 bp which has GAG and POL conserved domains. The transcriptional changes of PHRE6 in DNA methylation inhibitors and the treatment of different stress treatments (including radiation, high temperature, low temperature and high salt) in *Phyllostachys edulis* seedlings are detected by Real-time fluorescence quantitative PCR and after DNA methylation inhibitor treatment. High temperature (42 °C), low temperature (16 °C, 4 °C), high salt (100 mmol/L, 200 mmol/L, 300 mmol/L NaCl solution) stress levels significantly increase the expression level.

收稿日期: 2018-04-24 接受日期: 2018-07-02

国家自然科学基金(批准号: 31470615、31870656)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-63731263, E-mail: zhoumingbing@zafu.edu.cn

Received: April 24, 2018 Accepted: July 2, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31470615, 31870656).

*Corresponding author. Tel: +86-571-63731263, E-mail: zhoumingbing@zafu.edu.cn

网络出版时间: 2018-08-29 13:55:23

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180829.1355.002.html>

This result indicates that *PHRE6* is a transcriptionally active retrotransposon and may be involved in the response process of *Ph. edulis*.

Keywords *Phyllostachys edulis*; LTR retrotransposon; transposition activity; abiotic stress

转座子是指在基因组中一类可以移动的DNA序列, 20世纪40年代末由Barbara McClintock在玉米中发现^[1]。根据转座机制可将转座子分为两类, I类为反转录转座子(retro-transposons), 以RNA为中间媒介, 遵循“复制-粘贴”的转座方式; II类为DNA转座子(DNA transposons), 在DNA介导下, 通过“剪切-粘贴”的方式进行转座^[2]。根据是否含有长末端重复序列(LTR)又可进一步将反转录转座子分为含有LTR的长末端重复序列(long-terminal repeat, LTR)和不含有LTR的非长末端重复序列(non-long terminal repeat, non-LTR)^[3]。

LTR反转录转座子是高等植物基因组的主要组成成分, 是植物基因组扩增和进化、染色体重排、基因结构和活性调节等的主要动力^[4]。植物LTR反转录转座子长度通常在2~18 Kb, 两端各有一个长度100~5 000 bp正向重复的长末端重复序列(LTRs)。LTR末端为反向重复序列, 通常为5'-TG...CA-3'。在5'和3'末端两侧通常具有4~6 bp的锚定重复位点(TSR)。反转录转座子LTRs不编码蛋白质, 但包含转录的起始信号和终止信号, 内部有1~3个开放阅读框(ORF)编码转座所需的酶类, 结构与反转录病毒十分相似。内部的编码区主要包括2个与转座有关的基因, 即GAG(gag protein)(种属特异抗原)基因、POL(聚合酶)基因。GAG基因编码的蛋白质参与反转录转座子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(pepsin-like aspartate proteases, PR)、整合酶(integrase, INT)、反转录酶(reverse transcriptases, RT)和RNA酶(ribonuclease H, RH)^[5]。依据这些蛋白质的顺序, LTR反转录转座子又可以分为Ty1-copia和Ty3-gypsy两个超家族^[6]。

目前已在多种植物中发现并克隆出活性反转录转座子, 例如: 水稻中的*Tos17*、*RIRE1*; 拟南芥中的*EVD*; 番茄中的*TLC1-1*; 小麦属中的*Ttd1a*、*OARE-1*与*BARE-1*; 百脉根中的*LORE1*; 甜橙中的*CIRE1*; 烟草中的*Tnt1*和*Tto1*; 玉米中的*PREM-2*、*Zeon-1*; 还有草莓中的*FaRE1*等。根据已知的活性LTR反转录转座子进行序列分析, 得到其进化关系

和结构特征, 归纳出植物活性LTR反转录转座子具有以下结构特点^[7]: (1)活性LTR反转录转座子主要集中于Ty1-copia类; (2)各个活性LTR反转录转座子的长度差异虽然长度差异比较大, 但是结构相似, 均含有两个LTR区域、GAG、PR、INT、RT和RH编码区; (3)LTR区具有一个或多个顺式调控元件; (4)各个结构域均具有相应的保守氨基酸。

但是, 转座子大量存在对植物基因组的稳定性有很大影响, 在正常生长环境下, 大部分反转录转座子是以静止状态存在的。有研究表明, 在DNA甲基化程度改变、胁迫等情况下其活性可能被激发^[8-10]。早在1984年, McClintock^[11]提出假设, 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。目前也有很多关于反转录转座子在各种胁迫条件下被激活的研究报道, 证实了该假设^[12-13]。例如: 甜橙(*Citrus sinensis*)中的*CIRE1*具有组织特异性, 正常生长情况下只在根中表达, 经机械作用处理后, 检测到在叶中*CIRE1*转录增加, 且转录产物具有同源性; 水稻品种月亮谷(Acuhe, 传统品种)的幼苗经100 mmol/L浓度的NaCl溶液处理后, 检测3个逆转录转座子相关基因的转录活性, 发现在高盐胁迫下, 3个基因的表达量均明显增加^[14]; 硬质小麦(*Triticum durum* L.)基因组中的*Ttd1a*在盐胁迫条件下, 可以与启动子结合进行转录^[15]; 金鱼草(*Antirrhinum majus* L.)的*Tam3*转座子在15 °C的低温胁迫下被激活发生转录^[16]; 37 °C、3 h胁迫后, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)反转录转座子*ONSEN*能够被激活进行反转录^[17]。在组织培养过程中, 水稻日本晴基因组中的*Tos17*反转录转座子甲基化程度降低, 转座活性提高; 大多数水稻中的*Tos17*在组织培养过程中, 都具有活性, 而粳稻*Moritawase*的则没有, 但是在种子经DNA甲基化抑制剂处理后便被激活^[12]。当植物受到外界条件影响, 尤其是逆境胁迫(机械作用、高温、低温、高盐、干旱等)时, 反转录转座子会被激活并插入到靶基因中, 影响周边基因的表达^[18]。DNA甲基化可以造成植物基因转录水平的沉默, 由于LTR转座子是以RNA介导的方式转座, 所以转录在其活性表达的过程中起到关键作用, 推测DNA甲基化会抑制转

座子的活性, 以保持基因组的稳定性。

在毛竹(*Phyllostachys edulis*)基因组中, 转座子序列占到整个基因组大小的59%, 其中LTR反转录转座子序列含量达37.3%^[19]。为了鉴定毛竹潜在活性的LTR反转录转座子以及更深入研究毛竹LTR反转录转座子的功能, 本研究通过生物信息学方法从毛竹基因组中获得一个完整的LTR反转录转座子, 并系统地探讨了该转座子的结构特征与其对非生物胁迫的响应。

1 材料与方

1.1 材料

组织差异性表达研究所选材料(笋节、根、叶子)来自于浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室的翠竹园中同一棵长势良好的成熟毛竹。

胁迫处理所选材料为大小一致的种子及半年生实生苗, 这些均来自广西桂林灵川县。

1.2 处理

1.2.1 甲基化抑制剂处理 5-氮杂胞苷浓度设置为50、150、250 $\mu\text{mol/L}$ 三个梯度, 挑选饱满种子300颗, 用70%酒精消毒30 s, 无菌水冲洗3次, 用不同浓度氮杂胞苷浸种24 h。为了利于药物渗透发挥作用, 在无菌条件下将种子胚乳顶端切去2 mm, 置于滤纸上黑暗中萌发, 温度25 $^{\circ}\text{C}$, 期间持续使用氮杂胞苷处理, 待种子胚芽萌发15天取完整的毛竹胚芽, 迅速置于液氮中冷冻, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存^[20-21]。

1.2.2 辐照、温度、高盐胁迫处理 半年生毛竹实生苗(温度25 $^{\circ}\text{C}$, 光周期为光/暗: 16 h/8 h), 分别接受以下处理: ^{137}Cs - γ 射线的辐照, 辐照剂量率为1 Gy/min,

辐照剂量分别设置为30 Gy、50 Gy和70 Gy; 温度设置为42 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、16 $^{\circ}\text{C}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 处理4 h; 100 mmol/L、200 mmol/L、300 mmol/L NaCl溶液100 mL浇灌72 h进行高盐处理^[21-23]。随后立即取野生型、辐照、温度、高盐四组毛竹实生苗的叶片液氮速冻, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用, 每个处理取4株重复。

所用克隆受体菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为本实验室保存。RNA Trizol试剂、克隆载体pMD18-T、LA Taq DNA Polymerase等PCR相关试剂、Prime ScriptTM RT Master Mix、SYBR[®] Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus)均购自TaKaRa公司。

1.3 PHRE6转座子的克隆

利用公布的毛竹基因组数据库, 通过LTR-struct^[24-25]软件查找基因组中完整结构的LTR转座子, 新获得的一个结构完整的LTR转座子, 命名为PHRE6。在毛竹基因组中, 以该转座子全长的侧翼序列设计引物(表1), 以毛竹嫩叶为实验材料, CTAB法提取毛竹DNA^[26]。以毛竹DNA为模板进行扩增, 扩增反应体系如下: 0.5 μL LA Taq Polymerase、0.8 μL PHRE6-F、0.8 μL PHRE6-R、25 μL 2 \times GC Buffer、4 μL dNTP mix、100 ng DNA, 加无菌水补至50 μL 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 49.8 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s(根据引物选择合适的退火温度), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将PCR产物在1%琼脂糖电泳分离, 割胶回收, 连接到pMD18-T载体上然后进行测序。

1.4 PHRE6生物信息学分析

1.4.1 PHRE6的鉴定和在毛竹基因组的分布 将PHRE6的核酸序列提交到NetGene2Server(<http://>

表1 引物序列

Table 1 The sequences of primers

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
PHRE6-F	GTT TGT CTT TTG TAG CAC CTG GG
PHRE6-R	TAG GCG ACG CCT TAA TAA CCA T
PheACT2-1-F	GAT CGA GCA TGG TAT TGT TAG CA
PheACT2-1-R	TTG TAC GTC CAC TGG CAT AGA GG
LTR-RT-F	GCG CTA CTT CCT CCT CGT C
LTR-RT-R	GAA CTC ACC GCC GTT GTC C
LTR-RH-F	GAC ACG AGC AAG AGC ACC A
LTR-RH-R	CCA CAG AGC CTG AGT AGA AGC
LTR-INT-F	GGT GAC CTC TGT GGC CCC GTA A
LTR-INT-R	TCC GTG CGT AGG ACC CGA AGC

www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/)查找编码区范围,通过DNAMAN中翻译,并将翻译的序列提交到NCBI非冗余蛋白质数据库,通过blastp比对验证,对该转座子的编码域进行鉴定并构建结构图。根据得到的PHRE6转座子的序列在毛竹基因组数据中分别进行blast比对分析,检索与之相对应的各个拷贝,包括自主转座子和非自主转座子,并对这些转座子进行结构分析。

1.4.2 LTR序列分析 转座子的转座诱导与启动子有关,并且具有活性的反转录转座子5'端LTR的U3区域都有顺式调控元件。为了系统的解析PHRE6转座子LTR区域中顺式调控元件的情况,利用PlantCARE在线软件^[27]分析了其LTR区域具有的各个元件。

在反转录过程中, LTR转座子两端的LTRs是由单一模板合成的,在整合进基因组时, DNA序列是相同的。已知宿主的DNA替换速率,就可通过计算同一转座子两端LTR的分化度来估算转座子的插入时间。将PHRE6的LTR序列通过MEGA7.0软件中的Muscle方法同源比对,计算K值,根据公式插入时间 $T=K/2r$ ^[28](r代表LTR序列的平均替换率,约为 1.3×10^{-8} bp/年^[29])计算PHRE6的插入时间。

1.4.3 PHRE6各结构的保守结构域鉴定 在Gypsy Database 2.0(http://www.gydb.org/index.php/Main_

Page)查找Ty1-copia家族其他成员的各个结构域的序列,将PHRE6转座子的PBS、PPT序列及GAG、PR、INT、RT、RH五个酶的氨基酸序列与其进行比对,鉴定出PHRE6各结构的保守结构域。

1.4.4 PHRE6的进化分析 将PHRE6的RT酶氨基酸序列,与Ty1-copia家族(Oryco、Sire、Retrofit、Tork)和Ty3-gypsy超家族中的Athila4-1转座子的RT氨基酸序列(GenBank检索号见表2),利用MEGA7.0软件中的Muscle方法同源比对^[30]后找出最佳模型,并通过该软件中的最大似然法构建进化树。

1.5 毛竹不同部位及胁迫条件下PHRE6转座子转录活性分析

采用Trizol法^[31]分别提取毛竹种子、根、笋、叶片以及胁迫处理后实生苗叶片的总RNA,反转录成cDNA为模板。根据RT、INT、RH序列的保守区域设计特异性引物(表1),对PHRE6的表达量进行实时荧光定量PCR(RT-qPCR)分析,同时以毛竹PheACT2-1为内参基因^[32]。RT-qPCR反应体系为(10 μ L): 5 μ L SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II、0.4 μ L cDNA、0.2 μ L Primer-5、0.2 μ L Primer-3、4.2 μ L 无菌水。RT-qPCR反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 7 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 共30个循环。

1.6 数据处理及统计学分析

荧光定量PCR实验中,每个样品4次重复反应,

表2 活性LTR反转录转座子信息

Table 2 The information of active LTR retrotransposons

名称 Name	GenBank检索号 GenBank accession number	宿主 Organism	家族 Family
Araco	AC079131	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ty1-copia
Oryco1-1	AL928755	<i>Oryza sativa</i>	Ty1-copia
Poco	AC210386	<i>Populus trichocarpa</i>	Ty1-copia
Oryco1-2	AL606630	<i>Oryza sativa</i>	Ty1-copia
TSI-9	AB210221	<i>Setaria italica</i>	Ty1-copia
SIRE1-4	AY205608	<i>Glycine max</i>	Ty1-copia
Opie-2	AC104473	<i>Oryza sativa</i>	Ty1-copia
Koala	DQ365823	<i>Oryza australiensis</i>	Ty1-copia
Fourf	AF391808	<i>Zea mays</i>	Ty1-copia
Sto-4	AF082133	<i>Zea mays</i>	Ty1-copia
Tork4	EU105455	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ty1-copia
Tto1	D83003	<i>Nicotiana tabacum</i>	Ty1-copia
Tnt1	X13777	<i>Nicotiana tabacum</i>	Ty1-copia
Tos17	AL564904	<i>Oryza sativa</i>	Ty1-copia
BARE-1	Z17327	<i>Hordeum vulgare</i>	Ty1-copia
OARE-1	AJ223973	<i>Avena sativa</i>	Ty1-copia
RIRE7	AB033235	<i>Oryza sativa</i>	Ty3-gypsy
Athila4-1	AC007209	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ty3-gypsy

以3次生物学重复结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算PHRE6的RT、RH、INT三个区域的相对表达量并用SPSS 19.0软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 毛竹PHRE6反转录转座子全长的克隆与序列分析

2.1.1 PHRE6的克隆 以毛竹DNA为模板, 通过PCR扩增PHRE6转座子。PHRE6转座子全长5 620 bp, 5'引物PHRE6-F设计在上游241 bp处, 3'引物PHRE6-R设计在下游301 bp处, 片段大小为6 162 bp(图1)。

2.1.2 PHRE6的序列分析 (1)PHRE6转座子结构特征。从毛竹基因中克隆获得的PHRE6转座子测序结果与已知序列一致, 全长序列如图2所示。PHRE6转座子全长5 620 bp, 包括两端的长末端重复序列(LTRs)区域和一个很长的开放阅读框(ORF)。LTR长326 bp, 末端为5'-TG...CA-3'的反向重复序列。核苷酸序列编码区含有4 821 bp的开放阅读框, 共编码1 607个氨基酸。1 531~1 845 bp为GAG核心区, 2 645~2 831 bp为PR核心区, 2 884~3 219 bp为INT核心区, 3 808~4 551 bp为RT核心区, 4 808~5 187 bp为RH核心区。编码区结构域的顺序为GAG-PR-INT-RT-RH(图3), 属于Ty1-copia家族成员。将PHRE6转座子序列提交到毛竹基因组数据库(BambooGDB), 通过blastn检索PHRE6转座子其他拷贝, 在毛竹基因组中找到的3个两端LTR序列完整的拷贝, 但其在编码区都发生了不同程度

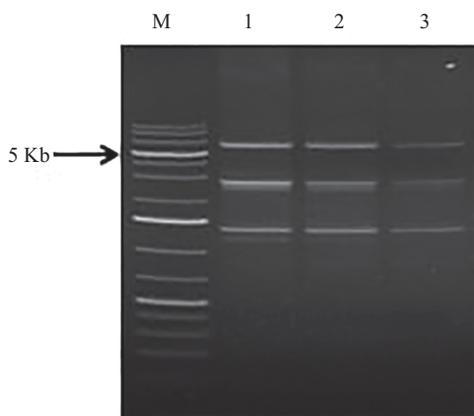
的缺失(图4)。

(2)PHRE6转座子的LTR序列。PHRE6转座子的LTR长326 bp, 从5'到3'碱基序列为TG开始AC结束, 其中3个核苷酸序列不一致, 同源性和99.08%, 计算的插入时间约为34.62万年。对LTR序列中包含的顺式元件进行预测分析(图5), 结果表明, LTR区域含有多个CAAT-box的位置预测, 而位于220 bp处最为准确。除了含有CAAT-box、TATA-box启动子元件外, 还含有其他应答元件和顺式作用元件, 其中一个与糖代谢反应相关的调控元件TATCCAT/C-motif位于7 bp位置, 一个光响应元件的GAG-motif位于253 bp位置, 一个胚乳表达顺式调控元件Skn-1_motif位于264 bp位置, 一个光响应元件Sp1位于269 bp位置。

对于PHRE6及其在基因组中的其他拷贝的插入时间比较如图6所示, PHRE6的插入时间为34.62万年, PH01000277_496203_496564拷贝插入时间为7.31万年, PH01000490_227108_228132拷贝插入时间为4.62万年, PH01000372_704699_706283插入时间为2.31万年。经计算可知, 在这四个拷贝中, PHRE6的插入时间最早。

(3)PHRE6转座子的PBS和PPT序列。PHRE6转座子引物结合位点(PBS)列为AGT GGT ATC AGA GCC GTA CT, 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。将包含PHRE6在内的几个长末端反转录转座子进行PBS部分的序列比对(图7), 其中, PHRE6与TtoI^[33]相似性为82.35%, 和TosI^[7]、RIRE7^[35]相似性均为70.59%; 多嘌呤序列(PPT)为GAG ACA CAC AAG ACT TAG GGG GAG AG, 位于3'端LTR上游, 作为引物引导第二条cDNA链的合成。PHRE6的PPT序列与OARE-I^[36]、BARE-I^[37]以及TtoI的相似性分别达到72.73%、64.29%、64.29%。

(4)PHRE6转座子编码区分析。PHRE6的编码区具备完整的转座需要的5种酶, GAG蛋白有四个保守结构域, 分别为GAG-BOX1、GAG-BOX2、GAG-BOX3、GAG-BOX4。PHRE6属于Ty1-copia家族, 所以GAG-BOX1、GAG-BOX2、GAG-BOX3属于UBN2结构域, GAG-BOX4是锌指结构域(ZnF_CCHC)。图8A对比结果表明, 锌指结构保守性最强。PR蛋白具有三个保守结构域(图8B), 在INT蛋白中存在GKGY结构域(图8C)^[38]。RT蛋白具有四个保守结构域(图8D), 负责将mRNA反转录为cDNA,



M: Maker; 1~3: 同一毛竹基因组扩增结果。

M: Maker; 1-3: the PCR result from the same *Ph. edulis* genome.

图1 全长PHRE6转座子PCR扩增电泳图

Fig.1 The PCR result of full-length PHRE6

是PHRE6中保守性最高的编码区。在RH蛋白的保守结构域中, 有很多位置的氨基酸在活性LTR反转录转座子中都是高度同源的, 例如第1个结构域中D12、S16和G19^[39]在PHRE6中也是保守的(图8)。

(5)PHRE6转座子的分类。经过对编码区的分析(图8)可以看出, RT区域保守性最高, 利用各个活

性LTR反转录转座子的RT区域氨基酸序列构建进化树。结果表明(图9), PHRE6属于Ty1-copia家族中的Oryco分支, 与水稻中的Oryco1-2同源性最高。

2.2 PHRE6转录活性分析

2.2.1 PHRE6在毛竹不同部位中的表达 为揭示PHRE6的组织表达模式, 采用实时荧光定量PCR的

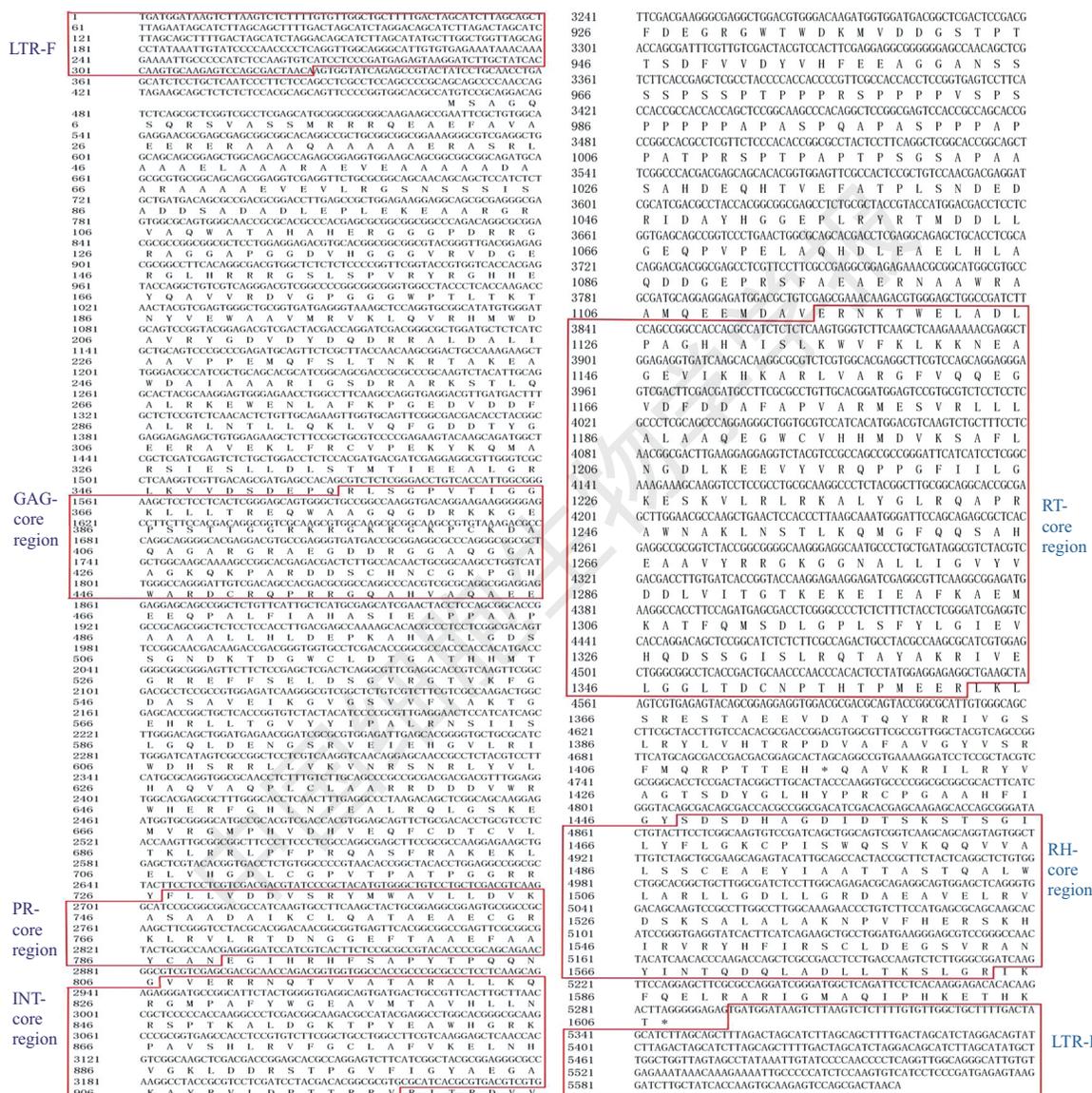


图2 PHRE6转座子序列全长

Fig.2 The full-length sequence of PHRE6

5 620 bp



图3 PHRE6转座子结构

Fig.3 Structure of the PHRE6

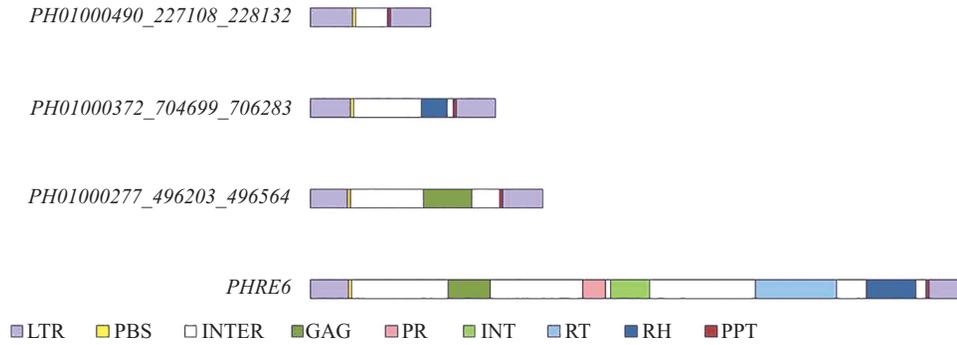


图4 毛竹基因组中PHRE6的各拷贝结构图

Fig.4 Structure of PHRE6 and its copies in *Ph. edulis* genome

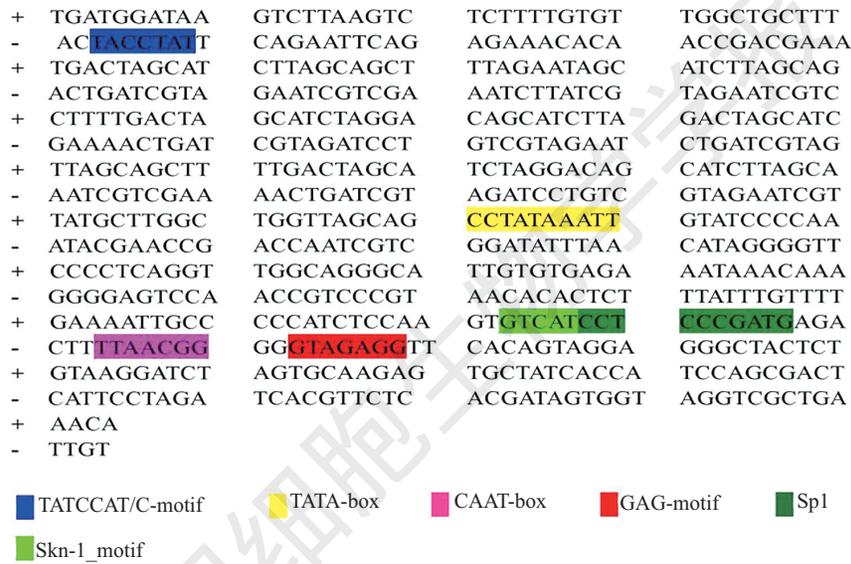


图5 PHRE6转座子LTR序列顺式元件预测

Fig.5 The putative cis-regulatory motifs in the PHRE6

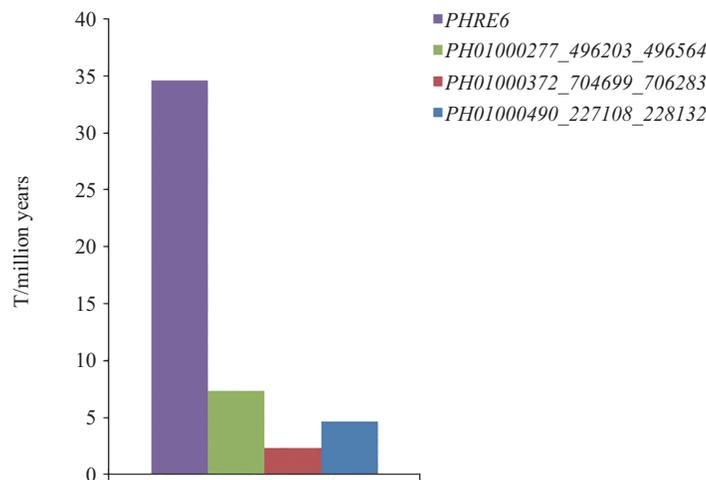


图6 PHRE6转座子各个拷贝的插入时间

Fig.6 Insertion time of each copy of PHRE6 transposon

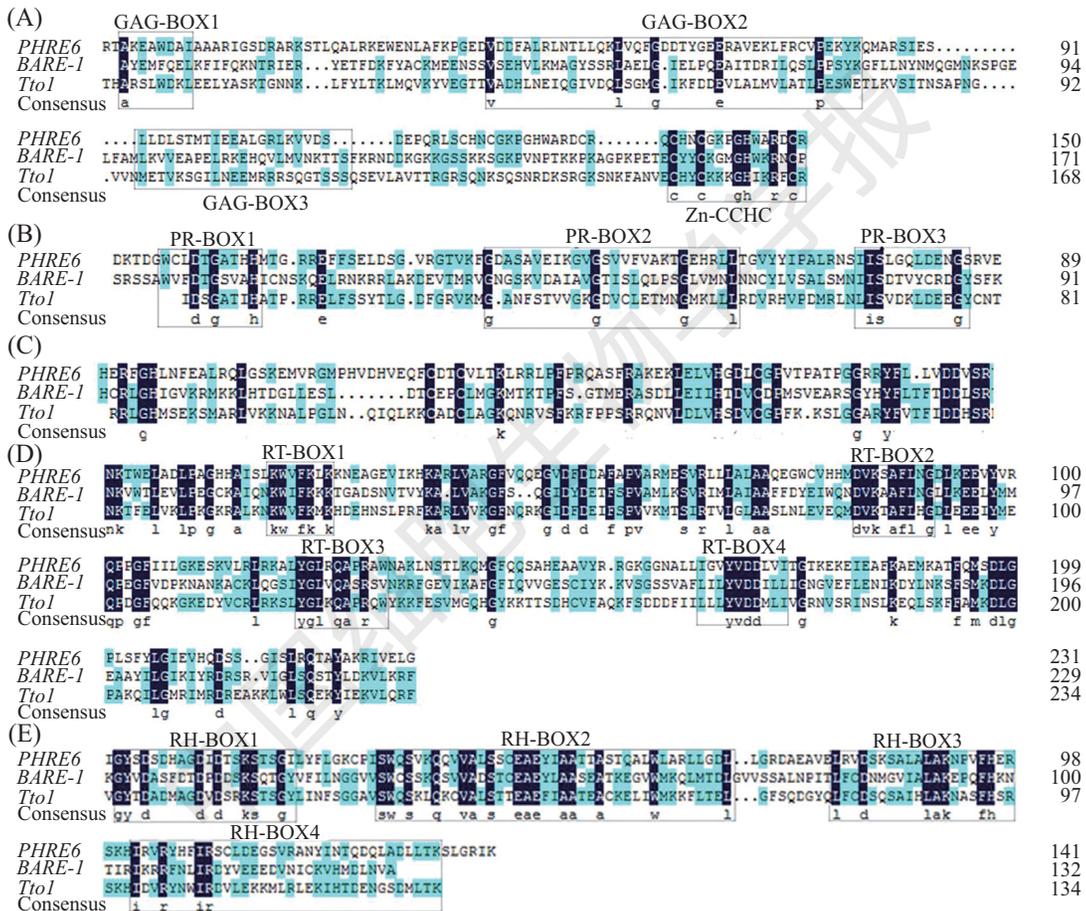


黑色表示同源率为100%，粉色表示同源率大于75%，蓝色表示同源率大于等于50%。

Black indicates 100% homology, pink indicates greater than 75% and blue indicates greater than or equal to 50%.

图7 PHRE6和其他类似转座子之间的PBS、PPT序列比对图

Fig.7 Comparison of the PBS and PPT between PHRE6 and other retrotransposons



A: GAG蛋白保守域分析图; B: PR蛋白保守域分析图; C: INT蛋白保守域分析图; D: RT蛋白保守域分析图; E: RH蛋白保守域分析图。黑色表示同源率为100%，蓝色表示同源率大于等于50%。

A: the conserved domains of GAG protein; B: the conserved domains of PR protein; C: the conserved domains of INT protein; D: the conserved domains of RT protein; E: the conserved domains of RH protein. Black indicates 100% homology and blue indicates greater than or equal to 50%.

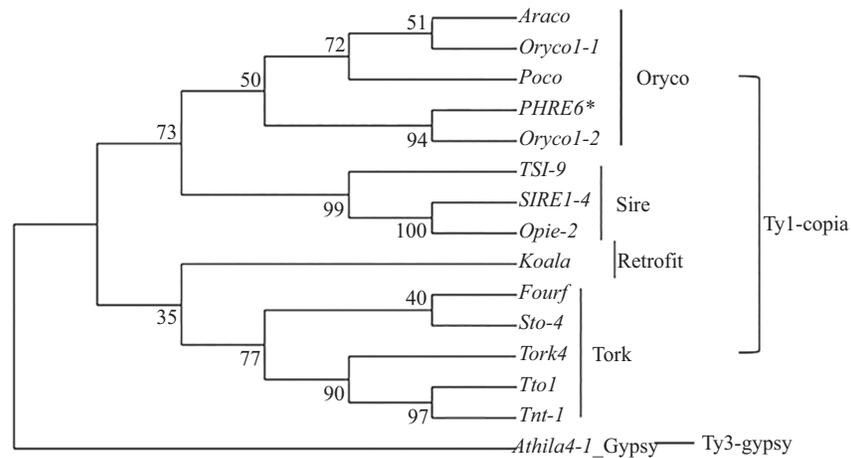
图8 PHRE6编码区的特征

Fig.8 The features of the PHRE6 coding region

方法对其在毛竹的根、笋、叶片中的表达进行了分析。结果表明(图10), PHRE6的INT、RT、RH三个结构域在各组织中均有表达,且在叶中表达丰度最高,笋中次之,根中表达量较少,并且在这三个不同组织部位, PHRE6的表达量存在显著差异性。三个

结构域在三个组织材料的表达呈协调一致性。

2.2.2 PHRE6在不同处理毛竹中的表达 为了探讨环境因子对PHRE6转座子表达的影响,对野生型(对照)和处理后的毛竹实生苗叶片及种子中PHRE6转座子的表达进行了定量分析。结果表明,

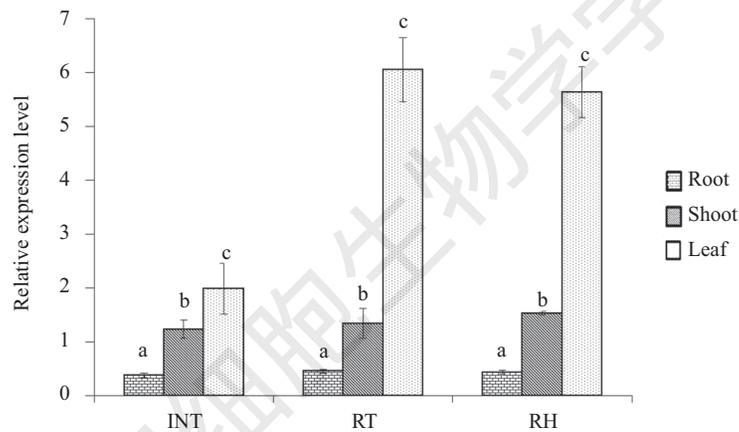


*代表本文的转座子。

* represents the transposon of this paper.

图9 *PHRE6*与其他活性LTR转座子的聚类分析图

Fig.9 Phylogenetic analysis of the reverse transcriptase encoded by *PHRE6* and other plant retrotransposons



字母相同表示组间差异不显著; 字母不同表示组间差异显著, $P < 0.05$ 。

Those with the same letters indicate that the difference between groups is not significant; those with the different letters indicate that the difference between groups is significant, $P < 0.05$.

图10 *PHRE6*在笋、根、叶中的表达量

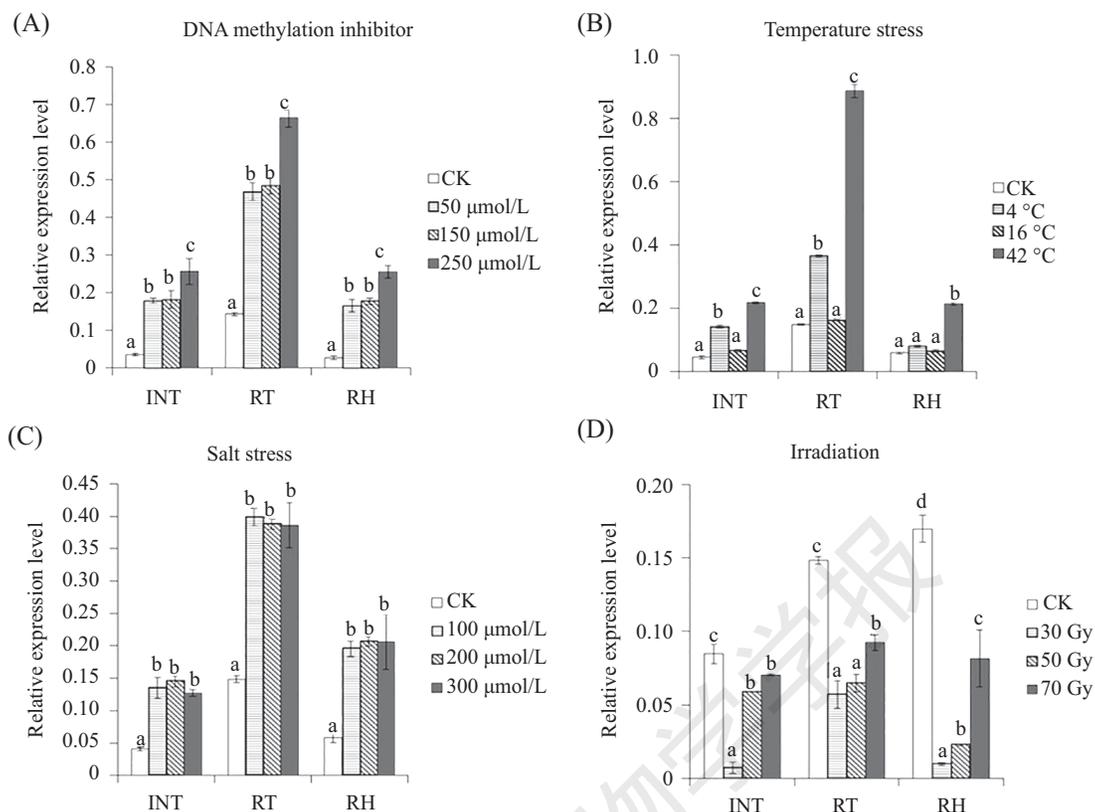
Fig.10 Expression levels of *PHRE6* transcripts in root, shoot and leaf of *Ph. edulis* by RT-qPCR

在不同浓度的DNA甲基化抑制剂处理的种子中, *PHRE6*转座子的INT、RT、RH三个结构域表达量均有显著提高, 其中50 $\mu\text{mol/L}$ 和150 $\mu\text{mol/L}$ 两个浓度处理后, 表达量的提高情况相差不大, 在250 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理后, 表达量发生了更为显著地提高(图11A)。不同温度处理后, 受到低温4 $^{\circ}\text{C}$ 和高温42 $^{\circ}\text{C}$ 胁迫后的*PHRE6*转座子的INT、RT以及RH三个结构域的表达量均有明显的上升, 且高温处理影响更大, 约为低温处理的1倍, 为野生型实生苗的5倍, 16 $^{\circ}\text{C}$ 的处理下, *PHRE6*的表达量略有提升, 但并无显著差异(图11B)。NaCl处理后发现, *PHRE6*的三个结构域表达量均有所提高, 并且对于不同浓度影响下的

提升情况相差不大, 但是相对野生型实生苗有显著地提高, INT、RT、RH结构域表达量均约为野生型实生苗的3倍(图11C)。与以上胁迫处理后情况不同的是, 在30 Gy、50 Gy、70 Gy强度辐照胁迫处理后的*PHRE6*三个结构域的表达量相对野生型实生苗发生了明显下降, INT和RH结构域在30 Gy处理后的表达量仅为野生型的8%和5%, RT结构域的表达量为野生型的34%, 但同时随着辐照强度的提升表达量呈现逐渐恢复的趋势(图11D)。

3 讨论

通过上述分析得到, *PHRE6*是一条结构完整的



A: *PHRE6*在不同DNA甲基化抑制剂处理种子中的相对表达水平; B: *PHRE6*在不同温度胁迫后的表达量; C: *PHRE6*在高盐胁迫后的表达量; D: *PHRE6*在辐照胁迫后的表达量。字母相同表示组间差异不显著; 字母不同表示组间差异显著, $P < 0.05$ 。

A: relative expression levels of *PHRE6* in seeds treated with different DNA methylation inhibitors; B: relative expression level of *PHRE6* in cold and heat stress seedlings; C: relative expression level of *PHRE6* in NaCl stress seedlings; D: relative expression level of *PHRE6* in radiation treatment seedlings. Those with the same lower case letters indicate that the difference between groups is not significant; those with the different letters indicate that the difference between groups is significant, $P < 0.05$.

图11 不同处理条件下*PHRE6*的表达分析

Fig.11 Expression of *PHRE6* under different treatments

LTR反转录转座子, 插入时间近34.62万年。在植物基因组中, 很多几百万年内插入的LTR转座子还存在活性, 如*Tos17*转座子插入时间为700万年, 仍检测到转座活性^[40]。与插入时间为几百万年的活性LTR转座子相比, *PHRE6*转座子是一个比较年轻的转座子。另外, 根据在毛竹基因组中找到的其他3个拷贝来看, 这三个转座子的结构都不完整。而从基因组中克隆出来的*PHRE6*的测序结果表明, 其结构完整, 全长LTR转座子具有自主转座的潜在活性, 这种活性会激发植物基因组的抑制机制, 导致转座过程中序列缺失。许多LTR转座子甚至丢失了编码区或LTR序列^[41], 其转座活性也从高到低, 最后演化成solo-LTR或者截断分子直至失活^[42-46], 推测另外三个拷贝可能就是*PHRE6*发生转座而来。因此, 从序列特征分析方面认为*PHRE6*可能具有潜在的活性。

基于序列分析的基础, 接下来分析的*PHRE6*在

成熟毛竹根、笋、叶片三个组织部位中的表达情况, 结果表明, 在未经处理的成熟毛竹中, 该转座子也具有一定表达量, 并且在叶片中的表达量明显高于另外两个组织。有些研究证实, 一些LTR反转录转座子的转座活性具有组织表达特异性, 例如: 烟草中的*Tnt1*转座子在正常情况下也具有转座活性, 而且只在根中表达^[47]; 大麦中的*BARE-1*转座子也具有组织特异性, 在愈伤组织和叶诱导的原生质体中表达^[48]; 玉米中的*PREM-2*同样在正常情况下具有转录活性, 并具有组织特异性, 其主要在单核的小孢子中表达^[49]。这些组织特异性表达都与其转座子内包含着相应的响应元件有关。

在三个梯度的DNA甲基化抑制剂、辐照、高盐以及温度处理后, *PHRE6*的三个编码结构域都发生了不同情况的表达量的变化, 除了在30 Gy、50 Gy、70 Gy三个强度的辐照处理后表达量为下降之外, 其

余情况均呈上升趋势。这表明, *PHRE6*是具有转录活性的, 并且以上四种胁迫均对其转录活性造成影响。这说明, *PHRE6*的表达和毛竹的防御反应有一定的联系。通过对*PHRE6*的LTR区域序列分析表明, 有多种与逆境相关的顺式作用元件, 这也意味着它可能参与逆境胁迫的应答调控。

LTR反转录转座子的转座过程是非常复杂的, 首先在细胞核内转录形成mRNA, 该mRNA既作为复制所需的模板, 又要翻译为相关的蛋白质。作为模板在RT蛋白的作用下进行反转录, 通过RT合成第1条cDNA负链, 再以此为模板合成第2条正链。cDNA负链以宿主细胞内对应的tRNA作引物, mRNA 5'端LTR下游的PBS位点与tRNA起始甲硫氨酸(tRNAⁱMet)的3'端序列互补形成短的RNA双链, RT利用tRNA 3'端自由羟基为引物, 合成互补的DNA杂交链。编码的RH蛋白水解杂交链上的RNA, 释放cDNA负链, 以位于3'端LTR上游的PPT作为引物, 引导第2条DNA的合成, 最后在INT整合酶的作用下整合到基因组中新的插入位点^[34]。而在整个过程中, 每一个环节都可能受到影响, 因此也出现了*RT*、*RH*、*INT*三个基因表达量的不同, 而反转录作为转座活动的第一环节, *RT*基因的表达量也呈现最高的状态。在组织差异性表达部分, 我们发现在叶片中*RT*、*RH*的表达明显高于*INT*的表达, 同时三个基因在叶片中的表达量均比在根和笋中的高, 这可能和该条LTR中包含光响应元件有关, 因而*PHRE6*在叶片中的转录活性更高, 这三个基因均有表达则是该条转座子具有转录活性的基础体现。

通常情况下, 转座子的活性都是受到抑制的。研究表明, 在毛竹基因组中, 基因仅仅占一小部分, 在大量非编码DNA存在的情况下, 实现精确控制基因的表达, 降低周围的转录噪音对生物体至关重要, DNA甲基化作为一种可遗传的修饰方式为非编码DNA的长期沉默提供了一种有效的抑制机制^[50]。而非编码区DNA中, 绝大部分是已经失去转座活性的转座元件以及具有潜在转座活性的转座子, 因此认为DNA甲基化会抑制反转录转座子的转录活性。根据反转录转座子的转座机制, 可知发生转录是该类转座子转座的第一步。本文用DNA甲基化抑制剂处理毛竹实生苗发现, *RHRE6*的表达量提高, 并且在250 μmol/L的浓度处理情况下, 转录活性最高。

LTR反转录转座子在一般情况下不发生转座,

但是可以在一系列胁迫条件下被激活^[51], 这是反转录转座子在长期进化过程中对宿主基因组的一种适应^[52]。在本研究结果中, *PHRE6*在30 Gy、50 Gy、70 Gy三个强度的辐照处理后表达量相对野生型的实生苗有所下降, 但是表达量的变化与辐照强度之间有一定规律, 随着辐照强度的提高, 表达量也在升高。也有研究表明, 用100 Gy、300 Gy ⁶⁰Coγ辐照处理小麦种子, *WIS2-1A*反转录转座子的表达量随着种子培养时间表达量呈现明显下降的趋势, 而在接受500 Gy处理后培养的45 h后, 表达量发生了提高^[53]。虽然辐照会诱导全基因组DNA低甲基化, 但是这种影响并不稳定, 目前证实, 大剂量及低剂量电离辐射(是指剂量在0.2 Gy以内的低线性能量转移辐射或0.05 Gy以内的高线性能量辐射)可诱导全基因组DNA低甲基化, 且程度因照射剂量、射线性质、照射方式及组织的不同而有所差异^[54]。

*PHRE6*在低温4 °C和高温42 °C胁迫后的毛竹实生苗叶片中的表达量均发生了上调。对于温度胁迫对转座子活性的影响, 有研究将其归于温度对DNA甲基化的影响, 从而影响到转座子的活性, Finnegan等^[55]研究中提出低温降低了植物体内DNA甲基化水平。同时在黄瓜中的一个研究证实, 低温处理6 h和24 h后, 与开始低温前相比, 对照组中黄瓜叶片的DNA甲基化水平逐渐降低^[56]。在本研究中, *PHRE6*表达量在高温低温胁迫下的变化, 除了温度通过影响甲基化的因素以外, 这可能还和*PHRE6*转座子本身的LTR区中含有的调控糖含量的顺式元件有关, 高温和低温会影响植物体内糖代谢酶的活性^[57]。*PHRE6*在三个梯度的高盐胁迫后的表达量也发生了明显上调, 在盐分胁迫下, 植物的代谢就会受到干扰而发生紊乱, 盐胁迫会通过降低水势抑制光合作用^[58], 而*PHRE6*中含有光响应元件并且自身在叶片中表达量较高, 所以在盐胁迫下*PHRE6*表达量的提高可能与光合作用的调节相关。

*PHRE6*在三个梯度的高盐胁迫后的表达量也发生了明显上调。在盐胁迫下, 植物的代谢就会受到干扰而发生紊乱, 盐胁迫会通过降低水势抑制光合作用^[26], 而*PHRE6*中含有光响应元件并且自身在叶片中表达量较高, 所以在盐胁迫下*PHRE6*表达量的提高可能与光合作用的调节相关。在上述外界条件影响的情况下, *PHRE6*反转录转座子, RNA水平发生变化, 同时参与了植物体内的多个通路的调控, 但

其具体的转录过程和参与机制还需进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 McClintock B. Chromosome organization and gene expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1951; 16(2): 13-47.
- 2 Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, *et al.* A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* 2009; 8(12): 973-82.
- 3 McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in *maize*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1950; 36(6): 344-55.
- 4 Bennetzen JL. The contributions of retroelements to plant genome organization, function and evolution. *Trends Microbiol* 1996; 4(9): 347-53.
- 5 Bowen NJ, McDonald JF. *Drosophila* euchromatic LTR retrotransposons are much younger than the host species in which they reside. *Genome Res* 2001; 11(9): 1527-40.
- 6 Xiong Y, Eickbush TH. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J* 1990; 9(10): 3353-62.
- 7 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*(Liang Linlin, Zhou Mingbing. *Plant active LTR retrotransposons: a review*. *Chinese Journal of Biotechnology*) 2016; 32(4): 409-29.
- 8 Wessler SR. Turned on by stress. *Plant retrotransposons*. *Curr Biol* 1996; 6(8): 959-61.
- 9 Liu B, Wendel JF. Retrotransposon activation followed by rapid repression in introgressed rice plants. *Genome* 2000; 43(5): 874-80.
- 10 Ito H, Takemori K, Kawai J, Suzuki T. AT1 receptor antagonist prevents brain edema without lowering blood pressure. *Acta Neurochir Suppl* 2000; 76: 141-5.
- 11 McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 1984; 226(4676): 792-801.
- 12 Chaoyang C, Daigen M, Hirochika H. Epigenetic regulation of the rice retrotransposon *Tos17*. *Mol Genet Genomics* 2006; 276(4): 378-90.
- 13 Beguiristain T, Grandbastien MA, Puigdomènech P, Casacuberta JM. Three *Tnt1* subfamilies show different stress-associated patterns of expression in tobacco. Consequences for retrotransposon control and evolution in plants. *Plant Physiol* 2001; 127(1): 212-21.
- 14 徐玲, 杨静, 刘林. 三个水稻逆转座子相关基因的逆境响应特征. *植物病理学报*(Xu Ling, Yang Jing, Liu Lin. *Stress responses of three retrotransposon-related genes in rice*. *Acta Phytopathologica Sinica*) 2014; 44(2): 147-55.
- 15 Woodrow P, Pontecorvo G, Fantaccione S, Fuggi A, Kafantaris I, Parisi D, *et al.* Polymorphism of a new Ty1-copia, retrotransposon in durum wheat under salt and light stresses. *Theor Appl Genet* 2010; 121(2): 311-22.
- 16 Hashida SN, Kitamura K, Mikami T, Kishima Y. Temperature shift coordinately changes the activity and the methylation state of transposon *Tam3* in *Antirrhinum majus*. *Plant Physiol* 2003; 132(3): 1207-16.
- 17 Pecinka A, Dinh HQ, Baubec T, Rosa M, Lettner N, Mittelsten Scheid O. Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2010; 22(9): 3118-29.
- 18 Domingues DS, Cruz GM, Metcalfe CJ, Nogueira FT, Vicentini R, Alves Cde S, *et al.* Analysis of plant LTR-retrotransposons at the fine-scale family level reveals individual molecular patterns. *BMC Genomics* 2012; 13: 137.
- 19 Peng Z, Lu Y, Li L, Zhao Q, Feng Q, Gao Z. The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*). *Nat Genet* 2013; 45(4): 456-61.
- 20 黄志明, 李晨曦, 陈磊, 江涛, 苏军, 冈义人, 等. 毛竹4个miRNA在胚芽萌发过程的表达响应研究. *热带作物学报*(Huang Zhiming, Li Chenxi, Chen Lei, Jiang Tao, Su Jun, Gang Yiren, *et al.* *Research of four mi RNAs response during embryo morphogenesis progress in Phyllostachys edulis*. *Chinese Journal of Tropical Crops*) 2017; 11: 2112-8.
- 21 陈昂, 周明兵, 汤定钦. -(137)Cs- γ 辐照及5-氮杂胞苷处理毛竹种子对其实生苗甲基化水平的影响. *核农学报*(Chen Ang, Zhou Mingbing, Tang Dingqin. *The effects of -(137)Cs- γ and 5-azaC on the methylation level of Phyllostachys heterocycle seedlings*. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*) 2017; 31(2): 218-24.
- 22 冯芳敏, 史世京, 曹颖. 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*(Feng Fangmin, Shi Shijing, Cao Ying. *Effects of chilling and freezing stress on the Physiological Metabolism and the expression of cold-related transcription factors in seedlings of Phyllostachys heterocycle*. *Journal of Bamboo Research*) 2014; 33(2): 29-33.
- 23 王丽丽, 赵韩生, 孙化雨, 董丽莉, 姜永峰, 高志民. 毛竹miR397和miR143的克隆及其逆境胁迫响应表达分析. *林业科学*(Wang Lili, Zhao Hansheng, Sun Huayu, Dong Lili, Lou Yongfeng, Gao Zhimin. *Cloning and expression analysis of miR397 and miR143 in Phyllostachys edulis under stresses*. *Scientia Silvae Sinicae*) 2015; 51(6): 63-70.
- 24 McCarthy EM, Liu J, Lizhi G, McDonald JF. Long terminal repeat retrotransposons of *Oryza sativa*. *Genome Biol* 2002; 3(10): 1-11.
- 25 McCarthy EM, McDonald JF. LTR_STRUC: a novel search and identification program for LTR retrotransposons. *Bioinformatics* 2003; 19(3): 362-7.
- 26 何奇江, 李楠, 周文伟. 盐胁迫对雷竹叶绿素含量的影响. *竹子研究汇刊*(He Qijiang, Li Nan, Zhou Wenwei. *The response of chlorophyll content of Phyllostachys violascens to NaCl stress*. *Journal of Bamboo Research*) 2014; 33(2): 58-62.
- 27 Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, *et al.* PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(1): 325-7.
- 28 Feschotte C, Jiang N, Wessler SR. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat Rev Genet* 2002; 3(5): 329-41.
- 29 Ma J, Jackson SA. Retrotransposon accumulation and satellite amplification mediated by segmental duplication facilitate centromere expansion in rice. *Genome Res* 2006; 16(2): 251-9.
- 30 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28(10): 2731-9.
- 31 Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular

- weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 1980; 8(19): 4321-5.
- 32 Gao Zhimin, Li Xueping, Li Lubin, Peng Zhenhua. An effective method for total RNA isolation from bamboo. *Chinese Forestry Science and Technology* 2006; 3=: 52-4.
- 33 齐飞艳, 胡陶, 彭镇华. 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*(Qi Feiyan, Hu Tao, Peng Zhenhua. Screening of reference genes used in qRT-PCR and expression analysis of *PheTFL1* gene in moso bamboo. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*) 2013; 33(1): 48-52.
- 34 Boeke JD. Transposable elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mobile DNA* 1989; 335-74.
- 35 Kumekawa N, Ohmido N, Fukui K, Ohtsubo E, Ohtsubo H. A new gypsy-type retrotransposon, *RIRE7*: preferential insertion into the tandem repeat sequence TrsD in pericentromeric heterochromatin regions of rice chromosomes. *Mol Genet Genomics* 2001; 265(3): 480-8.
- 36 Linares C, Serna A, Fominaya A. Chromosomal organization of a sequence related to LTR-like elements of Ty1-copia retrotransposons in *Avena* species. *Genome* 1999; 42(4): 706-13.
- 37 Manninen I, Schulman AH. BARE-1, a copia-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol Biol* 1993; 22(5): 829-46.
- 38 Peterson-Burch BD, Voytas DF. Genes of the Pseudoviridae (Ty1/copia retrotransposons). *Mol Biol Evol* 2002; 19(11): 1832-45.
- 39 Malik HS, Eickbush TH. Phylogenetic analysis of ribonuclease H domains suggests a late, chimeric origin of LTR retrotransposable elements and retroviruses. *Genome Res* 2001; 11(7): 1187-97.
- 40 Casacuberta JM, Santiago N. Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes. *Gene* 2003; 311(2): 1-11.
- 41 Rico-cabanas L, Martínez-izquierdo JA. *CIRE1*, a novel transcriptionally active Ty1-copia retrotransposon from *Citrus sinensis*. *Mol Gen Genet* 2007; 277(4): 365-77.
- 42 Devos KM, Brown JK, Bennetzen JL. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in Arabidopsis. *Genome Res* 2002; 12(7): 1075-9.
- 43 Kalendar R, Tanskanen J, Immonen S, Nevo E, Schulman AH. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(12): 6603-7.
- 44 Ma J, Bennetzen JL. Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(34): 12404-10.
- 45 Wang H, Liu JS. LTR retrotransposon landscape in *Medicago truncatula*: more rapid removal than in rice. *BMC Genomics* 2008; 9(1): 382.
- 46 Wang H, Xu Z, Yu H. LTR retrotransposons reveal recent extensive inter-subspecies nonreciprocal recombination in Asian cultivated rice. *BMC Genomics* 2008; 9(1): 565.
- 47 Pouteau S, Huttner E, Grandbastien MA, Caboche M. Specific expression of the tobacco *Tnt1* retrotransposon in protoplasts. *EMBO J* 1991; 10(7): 1911-8.
- 48 Soleimani VD, Baum BR, Johnson DA. Quantification of the retrotransposon *BARE-1* reveals the dynamic nature of the barley genome. *Genome* 2006; 49(4): 389-96.
- 49 Turcich MP, Bokhari-Riza A, Hamilton DA, He C, Messier W. *PREM2*, a copia-type retroelement in *maize* is expressed preferentially in early microspores. *Sex Plant Reprod* 1996; 9(2): 65-74.
- 50 Grandbastien MA. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plant Sci* 1998; 3(5): 181-7.
- 51 Fedoroff N. Transposons and genome evolution in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(13): 7002-7.
- 52 Beguiristain T, Grandbastien MA, Puigdomènech P, Casacuberta JM. Three *Tnt1* subfamilies show different stress-associated patterns of expression in tobacco. Consequences for retrotransposon control and evolution in plants. *Plant Physiol* 2001; 127(1): 212-21.
- 53 Lisch D. How important are transposons for plant evolution. *Nat Rev Genet* 2013; 14(1): 49-61.
- 54 赵慧茹, 押辉远, 谷运红. 60Co γ 辐照对小麦反转录转座子*WIS2-1A*表达活性的影响. *河南农业科学*(Zhao Huiru, Ya Huiyuan, Gu Yunhong. Effect of 60Co γ irradiation on the expression activity of retrotransposon *WIS2-1A*. *Journal of Henan Agricultural Sciences*) 2009; 3: 20-2.
- 55 王静子. 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. *医学研究生学报*(Wang Jingzi. Relationship between low-dose radiation induced genomic instability and DNA methylation. *Journal of Medical Postgraduates*) 2013; 26(8): 855-8.
- 56 Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10(2): 217-23.
- 57 邢潇晨, 崔金霞, 刘慧英. 5-azaC处理对低温弱光胁迫下黄瓜幼苗抗氧化酶活性的影响. *石河子大学学报(自然科学版)*[Xing Xiaochen, Cui Jinxia, Liu Huiying. Effect of 5-azacytidine on antioxidant systems of leaves in cucumber under low temperature and light stress. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*] 2014; 32(4): 422-6.
- 58 Zhou Q, Wang YH, Xu NY, Zhang CX, Zhou ZG, Chen BL. Effects of air temperature on enzyme activities of cotton plants related to saccharide metabolism of cotton fiber. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* 2009; 20(1): 149-56.