

水稻 *gypsy* 类逆转座子对不同胁迫条件的响应

徐玲^{1,2}, 杨静¹, 刘林¹, 李成云^{1*}

(1. 农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 云南 昆明, 650201; 2. 保山学院 资源环境学院, 云南 保山, 678000)

摘要: LTR 类逆转座子是水稻基因组中数量最多、分布最广的转座元件, 其中 Ty3-*gypsy* 类所占比例较大。根据 Ty3-*gypsy* 类逆转座子逆转录酶的保守区域, 采用简并引物, 通过 RT-PCR, 对 5 种胁迫处理(稻瘟菌、水杨酸、2,4-D、高盐及组织培养)后的云南地方水稻品种月亮谷的 cDNA 进行扩增, 并测序获得了一批转录片段, 分析不同胁迫条件诱导激活的 Ty3-*gypsy* 类逆转座子的特点。结果表明: 5 种胁迫处理都能诱导月亮谷中 Ty3-*gypsy* 类逆转座子的表达; 对不同胁迫响应的逆转座子序列大部分同源性较高, 且呈交叉分布, 仅有少部分具有胁迫响应的特异性, 说明很多 Ty3-*gypsy* 类逆转座子能对不同胁迫进行响应。

关键词: 水稻; Ty3-*gypsy* 类逆转座子; 胁迫; 响应

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2012)06-0591-06

Response of rice *gypsy* retrotransposons to different stress conditions

XU Ling^{1,2}, YANG Jing¹, LIU Lin¹, LI Cheng-yun^{1*}

(1. Key Laboratory of Agro-Biodiversity and Pest Management of Education Ministry of China, Kunming 650201, China; 2. Department of Resources and Environmental Sciences, Baoshan College, Baoshan, Yunnan 678000, China)

Abstract: LTR retrotransposons are the largest and most widely distributed transposable elements in rice, of which Ty3-*gypsy* class are more numerous. Using degenerate primers based on conserved region of reverse transcriptase gene in Ty3-*gypsy* retrotransposons, transcript fragments were amplified by RT-PCR and sequenced respectively from cDNAs of rice variety Acuche treated by 5 different stresses (*M. oryza*, SA, 2,4-D, high-salt and tissue culture) to analyze the characteristics of Ty3-*gypsy* retrotransposons activated by different stresses. The results showed that all the 5 different stresses could activate Ty3-*gypsy* retrotransposon; amino acid sequences of reverse transcriptase of retrotransposons responding to different stresses were highly conserved and distributed crossly, only few of them showed specificity of stress response, suggesting that many Ty3-*gypsy* retrotransposons could respond to different stresses.

key words: rice; Ty3-*gypsy* retrotransposon; stress; response

逆转座子是水稻基因组中最丰富的转座因子, 对于水稻基因组组成、进化和基因表达调控等都具有重要意义, 水稻逆转座子中 LTR 类型的组成成分最高, LTR 元件中 *gypsy* 类元件所占比例又要远大于 *copia* 类, 其数量为 *copia* 类的 4~5 倍^[1,2], 平均长度也为 *copia* 类的 2 倍^[3]。

很多研究^[4-6]认为, 逆转座子可能与植物的环境适应性有关。在植物基因组中, 大部分逆转座子通常以静止状态存在, 一些元件在生物及非生物因素胁迫下可被激活。生物因素包括各种病原物侵染

或接种, 以及病原物提取物等^[7]; 非生物因素包括原生质体分离^[8]、组织细胞培养^[9]、机械作用、茉莉酸(JA)、水杨酸(SA)、高盐胁迫^[10]等。

笔者以 Ty3-*gypsy* 类逆转座子为研究对象, 选取水稻种子液体悬浮培养 3 个月细胞、稻瘟菌 Y98-16 的孢子悬浮液(10^5 个/mL)、SA(2 mmol/L)和 2,4-D(50 mmol/L)喷雾接种和高盐溶液灌溉(100 mmol/L NaCl)等 5 种胁迫因素, 对被激活的逆转座子逆转录酶片段的序列特征和相似程度进行了初步的探讨。

收稿日期: 2012-06-12

基金项目: 国家“973”计划项目(2012CB722901; 2100CB100403)

作者简介: 徐玲(1978—), 女, 云南陆良人, 博士, 讲师, 主要从事分子植物病理学研究, xuling09083@163.com; *通信作者, li.chengyun@gmail.com

1 材料与方法

1.1 材料

水稻品种月亮谷(云南地方品种);稻瘟菌(*M. oryzae*)菌株 Y98-16(农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室保存)。

1.2 方法

1.2.1 胁迫诱导处理

水稻品种月亮谷液体悬浮培养 3 个月后的细胞,去培养液后用无菌水洗 2 次,在吸水纸上吸干水分,液氮速冻后迅速置于 -80°C 冰箱中备用。

水稻品种月亮谷在温室培育至 3~4 叶期,分别用稻瘟菌 Y98-16 的孢子悬浮液(10^5 个/mL)、2 mmol/L 水杨酸(SA)和 50 mmol/L 2,4-D 喷雾接种和 100 mmol/L NaCl 溶液灌溉等 4 种方式处理,保温保湿 24 h 后,用无菌剪刀剪取水稻叶片,液氮速冻后迅速置于 -80°C 冰箱中备用。设置未做处理的水稻苗叶片材料为阴性对照。

1.2.2 水稻叶片总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

水稻材料采用 TRNzol 试剂抽提方法提取总 RNA。试验中所用器皿均经过烘烤、0.1%DEPC 水处理以去除 RNase。用 RNase-Free DNase 酶解去除 RNA 中残留的 DNA,置 -80°C 保存待用。用北京全氏金生物公司的逆转录试剂盒合成 cDNA 第一链,获得的 cDNA 立即置冰上冷却, -20°C 冻存。

1.2.3 Ty3 类转座子的克隆测序

根据 Ty3-gypsy 类逆转座子的逆转录酶(RT)保守序列特征,采用 Kumekawa 等^[11]针对 Ty3-gypsy 类逆转座子 RT 序列设计的简并引物对进行扩增。

PCR 反应体系为 100 μL : 50 μL 2 \times EasyTaq PCR Supermix, 5 μL 正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 5 μL 反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$) cDNA 模板 5 μL , 水的体积共 35 μL 。扩增程序为: 95°C 预变性 3 min; 35 个循环包括: 95°C 变性 40 s, 56°C 退火 50 s, 72°C 延伸 50 s; 循环后 72°C 延伸 10 min。

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离,回收并连接到 pEASY-T1 载体上,转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中。菌落 PCR 验证的阳性单克隆送上海英骏生物技术有限公司进行测序。选取每种胁迫诱导条件得到的阳性克隆 15~20 个进行测序。

1.2.4 序列比较

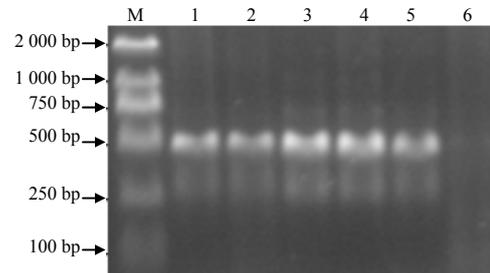
将测序结果除去引物两端多余序列后则为扩增到的目的序列,与 GenBank 中的序列用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行比较验证序列的真实性并获得序列的登录号,再用 Clustal X 软件对序列进行排序比对,用 Mega3 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 克隆诱导转录的 Ty3-gypsy 类逆转录酶片段

用逆转录酶基因的简并引物,从 5 种不同胁迫处理的水稻材料 cDNA 中均能扩增获得期望的约 430 bp 的带(图 1),说明几种胁迫都能诱导激活水稻 Ty3-gypsy 类逆转座子的表达。

将扩增产物回收并克隆到 pEASY-T1 载体上,得到一批阳性克隆,随机挑取每种胁迫处理诱导得到的克隆 15~20 个进行测序。测序得到的序列除去引物两端的多余序列则为扩增到的目的序列。以 Osgyrt 为前缀对不同胁迫诱导形成的序列进行命名,分别命名为 Osgyrt-tc、Osgyrt-Mg、Osgyrt-SA、Osgyrt-D、Osgyrt-St。



M DL2000 Marker; 1 组织培养; 2 稻瘟菌喷雾; 3 水杨酸喷雾; 4 2,4-D 喷雾; 5 NaCl 灌溉; 6 对照。

图 1 不同胁迫诱导转录的 Ty3-gypsy 类逆转录酶的 PCR 扩增片段

Fig.1 PCR amplification of Ty3-gypsy reverse transcriptase expressed under different treatments

2.2 转录的 Ty3-gypsy 类逆转录酶片段的序列比对和系统进化分析

共获得 70 条独立的序列: Osgyrt-tc1~16, Osgyrt-Mg1~17, Osgyrt-SA1~12, Osgyrt-D1~14, Osgyrt-St1~11。将所有序列在 GenBank 中用 BLAST 进行比较,结果表明,所有序列与 GenBank 中已上传的逆转座子逆转录酶序列相似性都很高(大于 94%),说明克隆到的逆转座子的真实性。

将这些核酸序列翻译为氨基酸序列后进行序列比对,大部分逆转录酶氨基酸序列间的相似性都很高,只有少数存在较高异质性(图 2),说明对不同

胁迫响应的逆转座子序列大部分同源性较高。不同胁迫诱导转录的逆转录酶序列大部分同源性在 90% 以上(图 2-A), 而同一胁迫, 如稻瘟菌诱导转录的逆转录酶序列差异最大的同源性仅为 36%(图 2-B), 可见不同胁迫诱导转录的序列同源性可以高于同一胁迫诱导转录的逆转录酶序列。

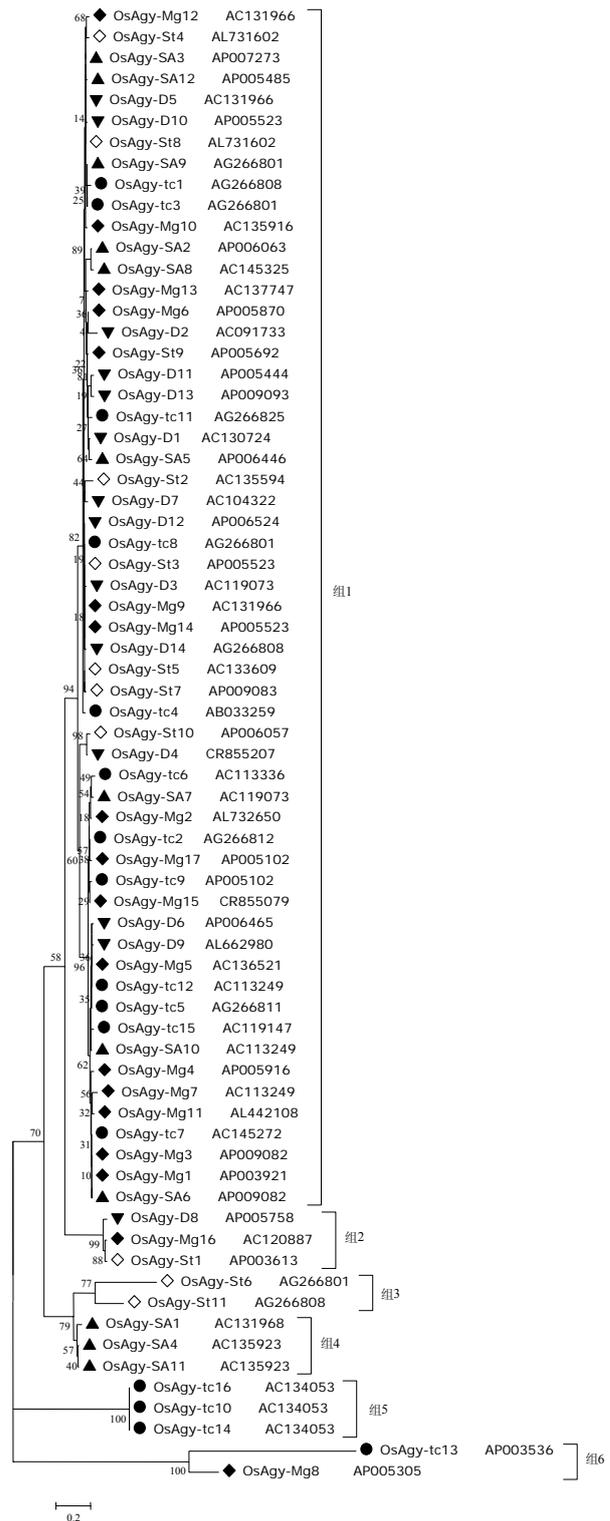
将获得的所有逆转录酶氨基酸序列用 MEGA3.0 进化分析软件系统进行分析, 得到 Neighbor-joining 系统进化树, 序列的登录号列于序列名称后(图 3)。根据进化树的分支程度把 70 条序列分为 6 组。大部分序列集中分布在第 1 组中, 约占序列总数的 81%, 说明这个家族的逆转座子较活跃, 也说明大部分被激活的 Ty3-gypsy 类逆转座子同源性较高。其他 5 组都分别只有 2~3 条序列, 与第 1 组中的大多数序列存在较高异质性。

不同胁迫诱导形成的水稻 Ty3-gypsy 类逆转座子逆转录酶序列大部分呈随机交叉分布, 这与序列比对结果中“不同胁迫激活的序列同源性较高, 而同一胁迫激活的序列也可以存在较大异质性”是一致的。只有少数序列具有胁迫响应的特异性, 同一胁迫诱导转录的逆转录酶序列形成了独立的家族, 如第 3 组为响应盐胁迫所特有, 第 4 组为响应水杨酸胁迫所特有, 第 5 组为响应组织培养胁迫所特有。

3 讨论

Voytas 等^[12]发现动物、植物、微生物的逆转座子逆转录酶序列平均相似性达 46%。基于植物逆转座子逆转录酶区域的高度保守片段, 用 PCR 方法已在多种植物中扩增出逆转座子^[13-14]。本研究同样基于植物 Ty3-gypsy 类逆转座子逆转录酶区域的高保守性来扩增和克隆响应不同胁迫条件的逆转录酶序列。

a. 多种胁迫都能激活逆转座子的表达。用多种胁迫处理 (稻瘟菌、水杨酸、2,4-D、高盐、组织培养) 后, 分析被激活的 Ty3-gypsy 类逆转座子逆转录酶片段的序列特征和相似程度, 结果表明这些胁迫都能激活 Ty3-gypsy 类逆转座子的转录。近年来关于逆转座子被多种胁迫激活的报道很多, 如烟草中逆转座子 *Tnt1* 和 *Tto1* 在病原菌侵染、组织培养、水杨酸、茉莉酸、伤害诱导等胁迫条件下都具有转



分支上的数字代表树的分支程度, 基于 1 000 次重复的自展率。
 Osgyrt-Mg; Osgyrt-SA; ▼ Osgyrt-D; ◇ Osgyrt-St; ● Osgyrt-tc。

图 3 不同胁迫激活的 Ty3-gypsy 类逆转录酶氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Neighbor-joining tree of reverse transcriptase amino acid sequences of gypsy-like activated by different treatments

录活性^[5, 15] 稻瘟菌中逆转座子 MAGGY 能被热击、CuSO₄、氧化等胁迫所激活^[16]。这些发现将不断地揭示逆转座子的转录机制及其在植物应激响应过程中的功能。

从本研究中逆转座子对多种胁迫的应答,可以推断它们在胁迫条件下是活跃的。很多研究认为逆转座子在植物适应环境胁迫中担当了重要角色^[4-5]。但逆转座子激活究竟是否对植物抗病性有贡献还值得探讨。逆转座子在环境胁迫下的激活为植物在多样性环境中的生存提供了一种基因组的可塑性机制^[17],可能参与了植物基因组对胁迫的反应,以使植物适应胁迫而得以生存^[4]。

b. 对不同胁迫响应的 Ty3-*gypsy* 类逆转录酶序列同源性高。植物逆转座子的逆转录酶序列,无论是 Ty1-*copia* 类还是 Ty3-*gypsy* 类,都存在很大的异质性^[10]。水稻逆转座子的逆转录酶氨基酸序列也有很大异质性, Wang 等^[18]报道水稻中逆转录酶差异达 1%~64%。然而本研究中序列比对和系统进化分析都发现被不同胁迫激活转录的 Ty3-*gypsy* 类逆转录酶氨基酸序列亲缘关系较近,大部分集中分布在第 1 组中,相似性在 90%以上。虽然胁迫条件不同,但被激活的逆转录酶序列同源性很高,说明不同胁迫条件是可以激活相似的逆转录酶序列的。与基因组中逆转座子的逆转录酶序列相比,具有转录活性的逆转录酶序列的异质性较低,这种特征在其他植物中也有类似报道^[19]。高等植物的逆转座子以多家族、高拷贝形式存在,且具高度异质性^[20]。由于本文所取克隆代表数量有限和采用的胁迫处理方式较少,是否胁迫激活的逆转座子异质性较低还需要更多的证据。

植物逆转座子家族内成员相似程度越高,可能发生转座的时间就越近,具有转座活性的可能性就越大^[13]。第 1 组中的代表成员同源性较高,且在多种胁迫条件下都活跃转录,说明很多 *gypsy* 类逆转座子能对不同胁迫进行响应,也说明该组所对应的逆转座子家族较活跃,可能目前仍存在具有转座能力的成员。

c. 不同胁迫激活的 Ty3-*gypsy* 类逆转录酶序列的分布。虽然胁迫处理的条件不同,但大部分被激活转录的 *gypsy* 类逆转座子的逆转录酶序列形成交

叉分布,表明水稻 *gypsy* 类逆转座子中存在很多能对不同胁迫做出响应的成分。也有少数序列具有胁迫响应的特异性,说明水稻 *gypsy* 类逆转座子中也存在部分只在特定胁迫条件下才会被激活的组分。

植物在长期的进化过程中形成了复杂的防御和抗性机制,逆转座子的激活表达可能与植物的防御反应具有一定联系。植物防御反应的调控非常复杂,各种防御信号途径之间既有区别也有交叉,不同的环境胁迫可以激活相似的信号通路,引起相似的细胞应答,例如拟南芥的 AtMYB2 转录因子在缺氧条件下表达增强,同时也增强了干旱应答基因 *rd22* 和 *AtADH1* 的表达;在干旱胁迫下 AtMYB2 也作为 ABA 诱导的转录激活子发挥作用^[21]。逆转座子位于基因与基因之间,可能作为一种顺式作用元件参与基因的表达与调控^[22],或影响邻近基因的表达^[23],但逆转座子在植物防御反应的调控过程中究竟发挥什么功能尚不清楚。推测不同胁迫条件下水稻可能产生了某些相似的胁迫信号分子,或者共享了一部分信号通路,从而激活了部分序列相似的逆转座子家族,导致部分逆转座子对不同胁迫条件做出响应,这也说明激活这些逆转座子的不同胁迫信号途径间存在网络交叉关系。而只在特定胁迫条件下才被激活的这部分逆转座子,可能这些胁迫条件下水稻还产生了某些区别于其他胁迫条件的信号分子,激活了具有该胁迫响应特异性的一些逆转座子,说明激活这部分逆转座子的胁迫信号途径是独立的。但对不同胁迫都能做出响应的逆转座子及具有胁迫响应特异性的逆转座子,其下游分别可能会影响哪些基因的表达,从而在对逆境的防御反应中发挥作用还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Gao L, McCarthy E M, Ganko E W, et al. Evolutionary history of *Oryza sativa* L. TR retrotransposons: A preliminary survey of the rice genome sequences[J]. BMC Genomics, 2004, 5(1): 18.
- [2] Turcotte K, Srinivasan S, Bureau T. Survey of transposable elements from rice genomic sequences[J]. Plant J, 2001, 25(2): 169-179.
- [3] McCarthy E M, Liu J, G Lizhi, et al. Long terminal repeat retrotransposons of *Oryza sativa*[J]. Genome Biol, 2002,

- 3(10) : research0053.1-0053.11 .
- [4] McClintock B . The significance of responses of the genome to challenge[J] . Science , 1984 , 226 : 792-801 .
- [5] Wessler S R . Plant retrotransposons : Turned on by stress[J] . Curr Biol , 1996(6) : 959-961 .
- [6] Grandbastien M A . Activation of plant retrotransposons under stress conditions[J] . Trends in Plant Science , 1998(3) : 181-187 .
- [7] Mhiri C , Pierre J G M De Wit , Grandbastien M A . Activation of the promoter of the *Tnt1* retrotransposon in tomato after inoculation with the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*[J] . Molecular Plant-Microbe Interactions , 1999 , 12 : 592-603 .
- [8] Takeda S , Sugimoto K , Otsuki H . Transcriptional activation of the tobacco retrotransposon *Tto1* by wounding and methyl jasmonate[J] . Plant Molecular Biology , 1998 , 36 : 365-376 .
- [9] Pearce S R , Harrison G , Li D , et al . The Ty1-*copia* group retrotransposons in *Vicia* species : Copy number , sequence heterogeneity and chromosomal localisation[J] . Mol Gen Genet , 1996 , 250(3) : 305-315 .
- [10] 胡志昂 , 姜国强 , 邓馨 , 等 . 野大豆种群转座子和转录因子的多样性和分子适应[J] . 植物生态学报 , 2007 , 31(5) : 952-959 .
- [11] Kumekawa N , Ohtsubo E , Ohtsubo H . Identification and phylogenetic analysis of *gypsy*-type retrotransposons in the plant kingdom[J] . Genes Genet Syst , 1999 , 74(6) : 299-307 .
- [12] Voytas D F , Cummings M P , Koniczny A , et al . *Copia*-like retrotransposons are ubiquitous among plants[J] . Proc Natl Acad Sci USA , 1992 , 89(15) : 7124-7128 .
- [13] Tang Y M , Ma Y Z , Li L C , et al . Identification and characterization of reverse transcriptase domain of transcriptionally active retrotransposons in wheat genomes[J] . J Integrative Plant Biol , 2005 , 47(5) : 604-612 .
- [14] Sun H Y , Dai H Y , Zhao G L . Genome-wide characterization of long terminal repeat-retrotransposons in apple reveals the differences in heterogeneity and copy number between Ty1-*copia* and Ty3-*gypsy* retrotransposons[J] . J Integr Plant Biol , 2008 , 50(9) : 1130-1139 .
- [15] Mhiri C , Morel J B , Vernhettes S , et al . The promoter of the tobacco *Tnt1* retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress[J] . Plant Mol Biol , 1997 , 33(2) : 257-266 .
- [16] Ikeda K , Nakayashiki H , Takagi M , et al . Heat shock , copper sulfate and oxidative stress activate the retrotransposon *MAGGY* resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*[J] . Mol Genet Genomics , 2001 , 266(2) : 318-325 .
- [17] McDonald J F . Transposable elements : possible catalysts of organismic evolution[J] . Trends Ecol Evol , 1995 , 10(3) : 123-126 .
- [18] Wang S , Zhang Q , Maughan P J , et al . *Copia*-like retrotransposons in rice : Sequence heterogeneity , species distribution and chromosomal locations[J] . Plant Mol Biol , 1997 , 33(6) : 1051-1058 .
- [19] Ma Y , He P , Sun Hy , et al . Isolation and characterization of transcriptionally active Ty1-*copia* retrotransposons in *Fragaria ananassa*[J] . Agricultural Science in China , 2010 , 9(3) : 337-345 .
- [20] Kumar A , Bennetzen J L . Plant Retrotransposons[J] . Annu Rev Genet , 1999 , 33 : 479-532 .
- [21] Hoeren F U , Dolferus R , Wu Y , et al . Evidence for a role for *AtMYB2* in the induction of the *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase gene (*ADHI*) low oxygen[J] . Genetics , 1998 , 149 : 479-490 .
- [22] Hirochika H . Retrotransposons of rice : Their regulation and use for genome analysis[J] . Plant Mol Biol , 1997 , 35 : 231-240 .
- [23] Le Q H , Melayah D , Bonnard E , et al . Distribution dynamics of the *Tnt1* retrotransposon in tobacco[J] . Mol Genet Genomics , 2007 , 278(6) : 639-651 .

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维