

节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶序列的克隆及比对

赵 芹^{①,②}, 谢大森^①, 江 骅, 罗少波, 彭庆务, 李明珠

(广东省农业科学院蔬菜研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 对 8 个节瓜(*Benincasa hispida* var. *chih-qua* How)品系基因组 DNA 中的 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶核苷酸序列进行扩增, 并对品系 A39FA 的 29 个克隆产物的核苷酸序列及翻译的氨基酸序列的系统进化和同源性进行了分析, 还对 29 条氨基酸序列进行了比对。扩增结果表明: 8 个节瓜品系的基因组 DNA 中均包含长度约 260 bp 的逆转录酶核苷酸片段; 从品系 A39FA 中获得的 29 条 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶核苷酸序列(CqRt1 至 CqRt29)的长度为 247 ~ 267 bp, 同源率为 46.2% ~ 98.1%, 而它们的氨基酸序列同源率为 26.7% ~ 98.8%。序列分析结果表明: 节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶核苷酸序列中碱基 A、T、G 和 C 的数量分别为 65 ~ 96, 47 ~ 92, 45 ~ 74 和 32 ~ 49, 所有序列均富含碱基 A 和 T, AT/GC 比为 1.35 ~ 2.33; 缺失突变是造成节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶核苷酸序列长度差异的主要因素, 在序列长度和碱基组成方面的明显差异表明节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶核苷酸序列具有高度异质性。翻译后的氨基酸序列中有 21 条序列存在终止密码子突变、12 条序列存在移框突变, 表明 Ty1-copia 类逆转座子是节瓜基因组内序列重组的热点。通过聚类分析可将 29 个逆转录酶核苷酸序列分为 5 个家族(Family), 分别包括 16、4、4、4 和 1 条序列, 其中 Family 1 可能是具有转座活性的逆转座子家族, 但存在转录活性的逆转录酶序列仅占全部序列数量的 20.69%。将每一家族中的 1 ~ 2 条序列与其他 15 种植物的 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶的氨基酸序列进行比对, 显示出较高的同源性。研究结果表明: 节瓜与其他植物的 Ty1-copia 类逆转座子可能有相同起源, 而且 Ty1-copia 类逆转座子可在不同类群间横向传递。

关键词: 节瓜; Ty1-copia 类逆转座子; 逆转录酶; 序列分析; 同源性; 系统发育

中图分类号: Q785; S542.9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2014)04-0017-10

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2014.04.03

Cloning and alignment of sequence of reverse transcriptase of Ty1-copia-like retrotransposon from *Benincasa hispida* var. *chih-qua* ZHAO Qin^{①,②}, XIE Dasen^①, JIANG Biao, LUO Shaobo, PENG Qingwu, LI Mingzhu (Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2014, 23(4): 17–26

Abstract: Nucleotide sequence of reverse transcriptase of Ty1-copia-like retrotransposon in genomic DNA from eight lines of *Benincasa hispida* var. *chih-qua* How was amplified, system evolution and homology of nucleotide sequence and translated amino acid sequence of 29 cloning products obtained from line A39FA were analyzed, and 29 amino acid sequences were aligned. The amplification results show that genomic DNA from eight lines of *B. hispida* var. *chih-qua* all includes reverse transcriptase nucleotide fragment with length about 260 bp. Length of 29 nucleotide sequences (from CqRt1 to CqRt29) of reverse transcriptase of Ty1-copia-like retrotransposon obtained from line A39FA is 247–267 bp with homologous rate of 46.2%–98.1%, while homologous rate of their amino acid sequences is 26.7%–98.8%. The sequence analysis results show that number of base A, T, G and C in nucleotide sequence of reverse transcriptase of Ty1-copia-like retrotransposon from *B. hispida* var. *chih-qua* is 65–96, 47–92, 45–74 and 32–49, respectively. All sequences are rich in base A and T, and AT/GC ratio is 1.35 –

收稿日期: 2013-12-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31311643); 广州市珠江科技新星专项资助项目(2013086)

作者简介: 赵 芹(1982—), 女, 山东泰安人, 博士, 副研究员, 主要从事蔬菜病理学与抗病育种方面的研究。

谢大森(1970—), 男, 江西遂川人, 博士, 研究员, 主要从事瓜类抗病育种及生物技术方面的研究。

^①并列第一作者

^②通信作者 E-mail: zhaoqin0802@126.com

2.33. Deletion mutation is the main reason inducing differences in length of nucleotide sequence of reverse transcriptase of Ty1-copia-like retrotransposon from *B. hispida* var. *chieh-qua*, and obvious differences in sequence length and base composition indicate that there is high heterogeneity in nucleotide sequence of reverse transcriptase of Ty1-copia-like retrotransposon from *B. hispida* var. *chieh-qua*. There is stop codon mutation in 21 sequences and frame shift mutation in 12 sequences from translated amino acid sequence, which indicates that Ty1-copia-like retrotransposon is the hot spot in sequence recombination within *B. hispida* var. *chieh-qua* genome. 29 nucleotide sequences of reverse transcriptase can be divided into 5 families, containing 16, 4, 4, 4 and 1 sequences, respectively. Family 1 might be a retrotransposon family with transposition activity, while number of reverse transcriptase sequence with transposition activity only accounts for 20.69% of total number of sequences. The alignment result on 1–2 amino acid sequences in each family of Ty1-copia-like retrotransposons from *B. hispida* var. *chieh-qua* and that of other 15 species shows higher homology. It is indicated that *B. hispida* var. *chieh-qua* and other species may possess the same origin, and Ty1-copia-like retrotransposon can be horizontally transferred among different taxa.

Key words: *Benincasa hispida* var. *chieh-qua* How; Ty1-copia-like retrotransposon; reverse transcriptase; sequence analysis; homology; system evolution

逆转座子是以 RNA 为中间产物, 在寄主基因组内不断转座增殖并影响寄主基因组大小、结构、功能及进化等的转座元件, 是真核生物中种类最多、分布最广的转座因子, 还是植物核基因组的重要组成部分, 通常约占核基因组大小的一半以上^[1]。根据 DNA 结构特征, 逆转座子可分为长末端重复序列 (long terminal repeat, LTR) 和非长末端重复序列 (non-long terminal repeat, non-LTR) 两类, 前者又可分为 Ty1-copia 类和 Ty3-gypsy 类, 其中 Ty1-copia 类在植物界中广泛分布, 且相关研究最多^[2]。

在受到各种生物和非生物因子的胁迫后, 植物体内的逆转座子活性被激活, 引起基因突变、基因组扩增及重排等, 导致植物发生遗传变异, 因此, 开展逆转座子的相关研究对研究植物基因组的组成、进化及基因的表达调控有重要意义。依据进化关系可将逆转座子划分为不同家族, 各家族内成员越复杂, 存在具转座活性的逆转座子的可能性越大、亲缘关系越近, 转座发生的时间也可能越近; 反之, 则转座历时久远, 继续转座的可能性也越小^[3]。目前, 对许多作物的逆转座子组成与分析已有研究报道^[4–6], 且逆转座子已广泛应用于植物种质资源及遗传育种研究, 如应用于钝稃野大麦 (*Hordeum spontaneum* C. Koch.)^[7]、豌豆属 (*Pisum* Linn.) 种类^[8]、野豌豆属 (*Vicia* Linn.) 种类^[9]、烟草 (*Nicotiana tabacum* Linn.)^[10]、茄子 (*Solanum melongena* Linn.)^[11]、柑橘属 (*Citrus* Linn.) 和枳属 (*Poncirus* Raf.) 种类^[12–14]、苹果 (*Malus pumila* Mill.)^[15–17] 和柿 (*Diospyros kaki* Thunb.)^[18–19] 等类群的种质鉴定、遗传图谱构建和系统进化等方面的研究。

节瓜 (*Benincasa hispida* var. *chieh-qua* How) 是华南地区特色蔬菜, 品种十分丰富。作者所在研究室曾通过镰刀菌酸离体筛选获得节瓜抗枯萎病突变体, 并通过航天诱变育种获得一系列有价值的育种材料, 但目前对节瓜不同品种的形成与进化关系不甚明了, 对节瓜各种生物学性状的遗传多样性研究报道也甚少。因此, 明确节瓜遗传进化及生物学性状与逆转座子之间的关系, 对追溯现有节瓜品种来源和培育优良节瓜品种具有重要意义。在前期采用抑制消减技术研究感病节瓜及其抗病突变体与枯萎病菌互作机制时, 作者所在研究室分离获得了与 Ty1-copia 多聚蛋白相似性很高的基因片段, 推测在接种枯萎病菌后节瓜逆转座子可能被激活^[20]。为此, 作者对节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶序列进行克隆和分析, 并研究其转录活性, 探讨节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶片段的变化特点及其与其他植物的相似性, 以期为节瓜基因组起源与进化及遗传多样性评价提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试节瓜品系 612FA、H2251、SY3、LT550、A06、A39FA、P3-1-2 和 LT8 的种子由研究室多代自交保存; 将其播种于灭菌基质上, 在温度 25 ℃、光照度 2 000 lx、光照时间 12 h · d⁻¹ 的人工气候箱中培养至幼苗长出 2 片真叶。

大肠杆菌菌株 DH5α 由本课题组保存; 琼脂糖购自广州威佳生物技术有限公司; Ex Taq DNA 聚合酶、

dNTPs 和 pMD18-T 载体试剂盒购自广州瑞真生物技术有限公司;DNA 回收试剂盒、CTAB、Amp 抗生素和 DNA marker 购自广州鼎国生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及逆转录酶片段的 PCR 扩增 采集新鲜叶片, 利用 CTAB 法提取基因组总 DNA, 将其溶解于少量灭菌双蒸水中。采用质量体积分数 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和 GENEQUANT 纳米紫外分光光度计(德国 Eppendorf 公司)检测总 DNA 的浓度和纯度, 于-20 ℃保存、备用。

参照文献[21]设计扩增逆转座子逆转录酶序列的上、下游引物, 上游引物 Ty1-F 的序列为 5'-ACNG CNTTRRTNCARGG-3', 下游引物 Ty1-R 的序列为 5'-AYCATYTCYTCNACYTA-3' (N=A/T/C/G, R=A/G, Y=T/C)。PCR 反应体系总体积 25 μL, 包括 50 ng DNA, 0.16 mmol · L⁻¹ dNTPs, 2.5 μL 10×Ex buffer(含 MgCl₂), 1.0 μmol · L⁻¹ 上、下游引物和 1 U Ex Taq DNA 聚合酶, 用灭菌双蒸水补足体积。PCR 反应在 GeneAmp PCR System 9700 PCR 仪(美国 ABI 公司)上完成, PCR 扩增程序为: 95 ℃ 预变性 3 min; 95 ℃ 变性 30 s, 45 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后于 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物用质量体积分数 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 并用 GeneGeniusBio Imaging System(美国 Bio-Rad 公司)进行观察和拍照。

1.2.2 PCR 产物的回收纯化与克隆分析 纯化的 PCR 产物与 pMD18-T 载体在 16 ℃ 条件下过夜连接, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 并用 Amp 抗生素和半乳糖苷酶的底物 X-gal 进行蓝白斑筛选; 挑取白斑菌落, 采用 M13 通用引物进行 PCR 扩增; 取 1 mL 阳性克隆菌液交由广州英骏生物技术有限公司测序。

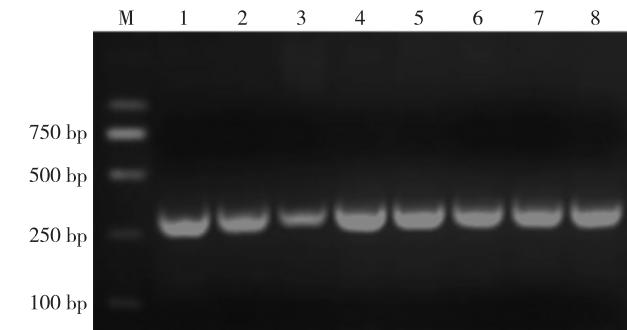
1.2.3 逆转录酶序列的测定及序列分析 利用 NCBI VecScreen 程序去除载体部分, 用 DNASTar 软件对获得的逆转录酶序列长度、碱基组成和 AT/GC 比等进行分析与序列同源比对, 结合 GenBank 中其他植物的相应序列构建系统进化树。

2 结果和分析

2.1 节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶基因序列的 PCR 扩增结果

利用设计的简并引物扩增 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶基因序列, 结果显示: 从 8 个节瓜品系中均

扩增得到长度约 260 bp 的逆转录酶基因序列片段(图 1), 与 Tao 等^[22]对枳[*Poncirus trifoliata* (Linn.) Raf.]Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶基因的研究结果一致, 说明 Ty1-copia 类逆转座子在节瓜中普遍存在。



M: DL2000 DNA marker; 1-8: 分别为节瓜品系 612FA、H2251、SY3、LT550、A39FA、A06、P3-1-2 和 LT8 Representing lines 612FA, H2251, SY3, LT550, A39FA, A06, P3-1-2 and LT8 of *Benincasa hispida* var. *chieh-qua* How, respectively.

图 1 8 个节瓜品系 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶基因序列的 PCR 扩增图谱

Fig. 1 PCR amplification pattern of sequence of reverse transcriptase gene of Ty1-copia-like retrotransposon from 8 lines of *Benincasa hispida* var. *chieh-qua* How

将品系 A39FA 的 PCR 扩增产物回收、克隆, 随机挑取 30 个菌落, 对 PCR 鉴定阳性的克隆测序, 获得 29 条核苷酸序列片段。利用 NCBI BLAST 程序进行同源搜索, 结果显示: 获得的所有片段均含有逆转录酶保守域, 与其他植物的 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶基因序列具有较高同源性, 说明从节瓜中获得的这些核苷酸序列片段均为 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶基因序列, 依次命名为 CqRt1 至 CqRt29。

2.2 节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶核苷酸序列组成分析

节瓜品系 A39FA 的 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶核苷酸序列的组成见表 1。29 个 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶核苷酸序列长度并不完全一致, 变化范围为 247 ~ 267 bp, 其中 CqRt24 序列最长, CqRt7 序列最短, 多数序列长度为 266 bp。Stergiou 等^[23]报道油橄榄(*Olea europaea* Linn.)的 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶核苷酸序列长度为 273 bp, 对应编码 91 个氨基酸; 而本研究获得的 29 个逆转录酶核苷酸序列长度均小于 273 bp, 均有不同程度的缺失, 说明缺失突变是造成节瓜逆转录酶核苷酸序列长度变化的主要原因。

表1 节瓜品系A39FA的Ty1-copia类逆转座子逆转录酶核苷酸序列的长度和碱基组成

Table 1 Length and base composition of nucleotide sequence of reverse transcriptase of Ty1-copia-like retrotransposon from line A39FA of *Benincasa hispida* var. *chieh-qu* How

序列 Sequence	长度/bp Length	AT/GC 比 Ratio of AT/GC	碱基数量		Base number	序列 Sequence	长度/bp Length	AT/GC 比 Ratio of AT/GC	碱基数量		Base number		
			A	T					G	C			
CqRt1	266	1.51	78	82	60	46	CqRt16	266	1.66	82	84	53	47
CqRt2	262	1.52	70	88	67	37	CqRt17	266	2.13	93	88	45	40
CqRt3	266	1.58	77	86	64	39	CqRt18	266	1.56	82	80	58	46
CqRt4	265	1.48	76	82	63	44	CqRt19	265	1.55	79	82	61	43
CqRt5	266	1.99	94	83	47	42	CqRt20	266	1.77	81	89	62	34
CqRt6	259	1.78	83	83	53	40	CqRt21	266	1.35	76	77	64	49
CqRt7	247	1.40	65	79	71	32	CqRt22	266	1.69	82	85	52	47
CqRt8	266	1.56	78	84	66	38	CqRt23	265	1.65	81	84	62	38
CqRt9	266	1.40	76	79	64	47	CqRt24	267	1.70	92	76	58	41
CqRt10	266	2.33	94	92	47	33	CqRt25	266	1.92	88	47	58	36
CqRt11	265	1.43	75	81	64	45	CqRt26	266	1.44	79	78	63	46
CqRt12	259	1.85	84	84	54	37	CqRt27	262	1.59	82	79	52	49
CqRt13	261	2.00	94	80	45	42	CqRt28	266	1.80	96	75	61	34
CqRt14	266	2.06	94	85	49	38	CqRt29	266	1.69	80	87	62	37
CqRt15	264	1.42	69	86	74	35							

要原因。对碱基组成的分析结果显示:节瓜Ty1-copia类逆转座子逆转录酶核苷酸序列中碱基A、T、G和C的数量分别为65~96、47~92、45~74和32~49,所有序列均富含碱基A和T,AT/GC比为1.35~2.33,与油橄榄的Ty1-copia类逆转座子逆转录酶核苷酸序列的碱基组成一致^[23]。

由此可见,由同一简并引物PCR扩增所得的节瓜Ty1-copia类逆转座子逆转录酶核苷酸序列并不一致,它们的碱基组成及序列长度均存在较大差异,表明节瓜品系内同一类群逆转座子间存在高度的异质性,苹果、黄瓜(*Cucumis sativus* Linn.)、辣椒(*Capsicum annuum* Linn.)和梨(*Pyrus* spp.)等植物也有类似特点^[24~27]。

2.3 节瓜Ty1-copia类逆转座子逆转录酶核苷酸序列的系统进化分析

为阐明节瓜中Ty1-copia类逆转座子间的相互关系,利用DNAStar中的MegAlign软件对29条逆转录酶核苷酸序列进行聚类分析,并构建系统进化树,结果见图2。根据核苷酸替代值可将29条序列分成5个家族(Family),同一家族内的序列代表来源于同一祖先的遗传家系,而不同家族包含的序列数差异则反映了各家族逆转座子转座过程的差异,包含克隆数越多的家族历史越久远。Family 5仅有1条序列,与其他家族的遗传距离较远;Family 1至Family 4分别包括16、4、4和4条序列,其中Family 1包含的序列数占

总序列数的55.17%,说明该家族是构成节瓜Ty1-copia类逆转座子的主要成分。

2.4 节瓜Ty1-copia类逆转座子逆转录酶核苷酸序列及氨基酸序列的同源性分析

节瓜Ty1-copia类逆转座子逆转录酶核苷酸序列及氨基酸序列的同源性分析结果见表2。

结合图2和表2,根据核苷酸替代值综合分析可见:在29条节瓜Ty1-copia类逆转座子逆转录酶核苷酸序列中CqRt6和CqRt12的遗传距离最近,其核苷酸序列和氨基酸序列的同源率均最高,分别达98.1%和98.8%;CqRt15与CqRt27的核苷酸序列同源率最低(46.2%),CqRt16与CqRt28的氨基酸序列同源率最低(26.7%),说明同一来源的逆转座子异质性较高。Family 1中CqRt9与CqRt11核苷酸序列遗传距离最近,其同源率为92.8%,氨基酸序列同源率为84.2%;Family 2中CqRt7与CqRt15核苷酸序列遗传距离最近,其同源率为91.5%,氨基酸序列同源率为84.1%;Family 3中CqRt20与CqRt29核苷酸序列遗传距离最近,其同源率为93.6%,氨基酸序列同源率为87.5%;Family 4中CqRt6与CqRt12核苷酸序列遗传距离最近。各家族所包含的克隆数越多、序列同源率越高,发生转座的时间越近,具有转座活性的可能性也越大。Family 1包含4个具有转录活性的逆转座子(CqRt14、CqRt18、CqRt21和CqRt24),可能是具有转座活性的逆转座子家族。

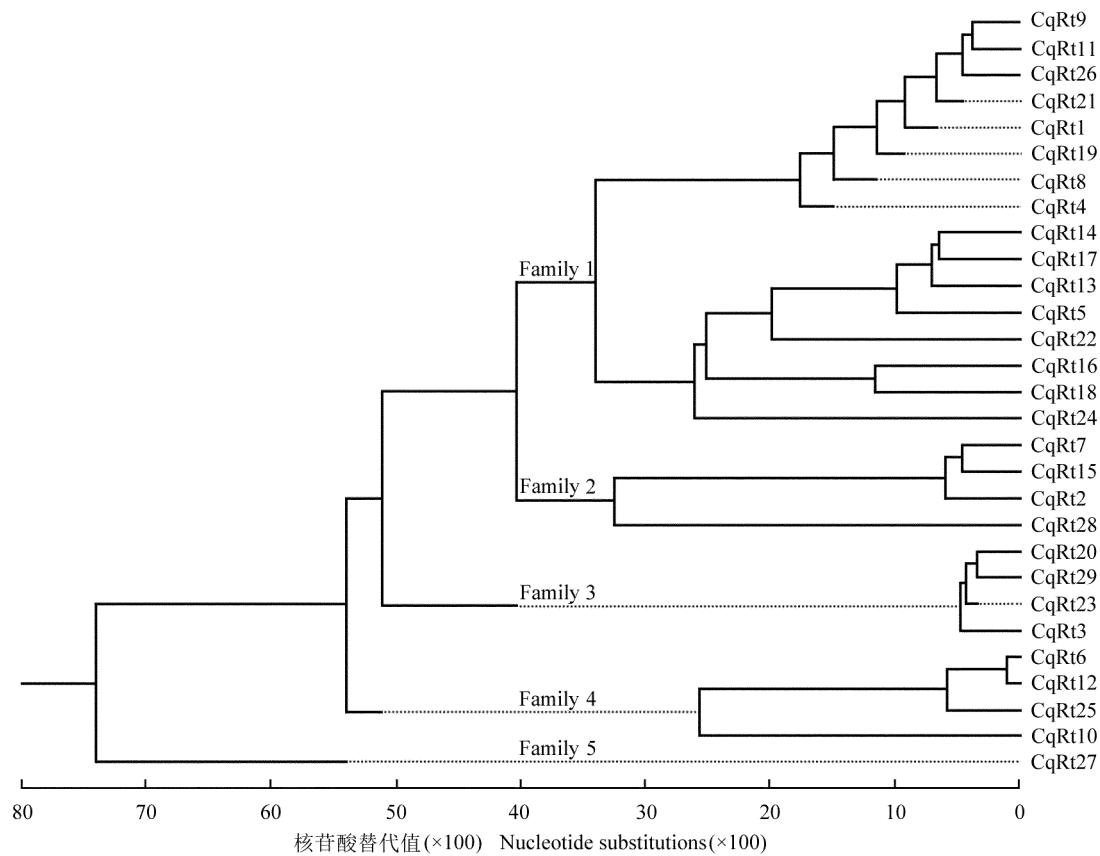


图2 节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶核苷酸序列的系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of nucleotide sequence of reverse transcriptase of Ty1-copia-like retrotransposon from *Benincasa hispida* var. *chieh-qua* How

表2 节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶核苷酸序列与氨基酸序列的同源率¹⁾

Table 2 Homologous rate among nucleotide sequences and among amino acid sequences of reverse transcriptase of Ty1-copia-like retrotransposon from *Benincasa hispida* var. *chieh-qua* How¹⁾

序列 Sequence	各序列间的同源率/% Homologous rate among different sequences														
	CqRt1	CqRt2	CqRt3	CqRt4	CqRt5	CqRt6	CqRt7	CqRt8	CqRt9	CqRt10	CqRt11	CqRt12	CqRt13	CqRt14	CqRt15
CqRt1	—	40.2	60.2	87.4	55.7	48.8	47.6	84.1	92.0	56.8	84.1	49.4	53.5	54.5	43.7
CqRt2	54.8	—	43.7	45.3	41.4	37.6	84.1	42.5	39.1	35.6	39.1	38.1	35.3	35.6	80.5
CqRt3	62.8	53.3	—	62.1	54.5	59.3	48.8	63.6	60.2	56.8	59.1	60.0	52.3	53.4	44.8
CqRt4	89.4	54.2	64.2	—	56.3	48.2	51.9	85.1	87.4	56.3	80.5	48.8	54.1	57.5	47.7
CqRt5	57.5	51.0	58.3	58.5	—	45.3	41.5	55.7	55.7	54.5	54.5	45.9	75.6	79.5	39.1
CqRt6	61.0	52.0	64.1	60.1	56.4	—	38.8	52.3	48.8	52.3	52.3	98.8	48.8	47.7	40.0
CqRt7	54.1	91.1	54.1	53.5	49.6	52.3	—	47.6	46.3	41.5	43.9	39.2	37.5	41.5	84.1
CqRt8	88.7	54.0	63.2	88.3	57.1	59.1	53.7	—	85.2	54.5	49.4	53.5	56.8	41.4	33.7
CqRt9	91.0	51.0	61.7	92.1	57.5	59.5	50.4	88.0	—	54.5	84.2	49.4	53.5	56.8	41.4
CqRt10	57.9	49.4	62.0	58.1	63.9	63.7	53.3	56.4	56.0	—	55.7	50.6	55.8	61.4	37.9
CqRt11	89.4	51.5	61.5	89.8	58.5	59.7	50.6	88.3	92.8	56.2	—	50.6	51.2	55.7	41.4
CqRt12	61.4	51.6	63.3	60.1	56.8	98.1	54.0	59.1	59.1	63.7	59.3	—	49.4	45.9	40.5
CqRt13	59.8	53.1	62.8	61.2	83.5	59.1	51.9	58.6	59.8	67.4	59.6	59.1	—	80.2	35.3
CqRt14	57.5	50.6	59.8	59.6	83.1	57.1	51.2	57.9	57.5	69.9	56.2	57.9	87.7	—	34.5
CqRt15	52.9	87.4	51.7	54.2	51.0	52.3	91.5	52.5	50.6	52.1	51.1	53.1	51.6	51.0	—
CqRt16	60.8	51.5	55.1	61.7	64.2	53.5	49.8	61.9	59.6	58.5	59.5	53.5	66.2	64.2	49.6
CqRt17	58.6	54.4	60.5	60.4	82.7	57.9	53.3	57.9	56.8	67.3	56.6	58.3	87.4	88.3	52.9

续表2 Table 2 (Continued)

序列 Sequence	各序列间的同源率/% Homologous rate among different sequences														
	CqRt1	CqRt2	CqRt3	CqRt4	CqRt5	CqRt6	CqRt7	CqRt8	CqRt9	CqRt10	CqRt11	CqRt12	CqRt13	CqRt14	CqRt15
CqRt18	59.8	49.0	57.9	61.1	63.5	55.2	50.4	59.4	60.9	59.0	60.8	55.2	64.4	65.0	51.7
CqRt19	91.3	55.4	62.6	91.3	58.5	59.3	54.3	89.8	90.9	57.4	90.9	59.3	61.2	58.1	53.8
CqRt20	60.9	52.1	92.1	63.4	57.9	62.9	55.3	62.4	61.3	63.5	61.5	62.9	62.5	61.3	51.7
CqRt21	91.4	52.9	63.5	90.9	58.6	61.8	52.8	89.8	92.1	57.5	91.7	62.5	62.1	59.4	51.3
CqRt22	62.0	54.0	57.5	61.5	69.9	54.8	52.8	63.5	60.9	60.5	61.9	55.6	70.9	69.9	52.1
CqRt23	63.4	53.5	94.0	65.2	59.2	64.7	53.9	63.8	63.8	63.8	62.1	64.3	64.6	61.1	52.3
CqRt24	61.3	51.7	60.9	61.9	66.9	56.4	53.7	60.9	59.8	61.7	59.2	56.4	65.9	63.9	53.6
CqRt25	57.1	51.3	61.7	58.5	52.6	89.2	52.4	56.4	56.8	62.4	55.5	89.6	57.5	57.5	51.0
CqRt26	91.4	54.0	62.8	90.2	57.1	62.5	52.8	89.1	93.2	58.3	90.2	61.8	60.2	57.9	51.3
CqRt27	56.5	47.3	58.0	58.4	54.2	54.1	49.0	51.9	54.6	58.0	54.8	54.1	55.6	54.6	46.2
CqRt28	52.5	57.9	54.4	55.8	50.6	52.8	58.2	55.2	53.7	52.9	55.4	52.0	52.0	50.2	55.8
CqRt29	61.3	53.3	91.4	62.6	57.9	64.5	54.9	63.2	61.3	63.2	61.1	62.8	64.9	59.8	52.5
序列 Sequence	各序列间的同源率/% Homologous rate among different sequences														
Sequence	CqRt16	CqRt17	CqRt18	CqRt19	CqRt20	CqRt21	CqRt22	CqRt23	CqRt24	CqRt25	CqRt26	CqRt27	CqRt28	CqRt29	
CqRt1	32.6	52.3	60.2	85.2	54.5	86.4	55.7	56.8	61.4	44.3	90.9	48.3	40.9	55.7	
CqRt2	30.6	41.4	33.3	41.4	40.2	42.5	40.2	42.5	39.1	39.1	41.4	33.7	43.7	43.7	
CqRt3	27.9	54.5	59.1	58.0	87.5	63.6	54.5	93.2	55.7	55.7	63.6	43.7	42.0	86.4	
CqRt4	37.6	55.2	64.4	85.1	60.9	59.8	44.8	60.9	59.8	44.8	87.4	43.0	46.0	57.5	
CqRt5	30.2	77.3	55.7	54.5	50.0	59.1	72.7	52.3	64.8	39.8	59.1	41.4	35.2	52.3	
CqRt6	31.0	46.5	51.2	47.7	57.0	53.5	47.7	57.0	47.7	82.6	51.2	40.0	40.7	59.3	
CqRt7	33.8	43.9	41.5	48.8	45.1	50.0	42.7	46.3	43.9	40.2	48.8	38.3	47.6	45.1	
CqRt8	52.3	60.2	83.0	54.5	56.8	85.2	58.0	60.2	59.1	46.6	87.5	40.2	44.3	60.2	
CqRt9	33.7	52.3	60.0	82.3	54.5	88.6	55.7	56.8	59.1	45.5	93.2	48.3	42.0	55.7	
CqRt10	31.4	53.4	55.7	54.5	55.7	59.1	54.5	53.4	61.4	50.0	58.0	44.8	39.8	54.5	
CqRt11	33.7	52.3	62.5	79.5	55.7	86.4	59.1	55.7	58.0	47.7	89.8	44.8	44.3	59.1	
CqRt12	28.9	47.1	49.4	48.2	55.3	54.1	48.2	57.6	45.9	81.2	51.8	38.1	38.8	57.6	
CqRt13	29.8	75.6	54.7	52.3	50.0	55.8	65.1	51.2	57.0	41.9	54.7	41.2	32.6	48.8	
CqRt14	32.6	80.7	62.5	52.3	52.3	59.1	71.6	51.1	62.5	42.0	58.0	41.4	37.5	52.3	
CqRt15	30.6	36.8	36.8	44.8	41.4	46.0	39.1	43.7	41.4	39.1	44.8	32.6	43.7	42.5	
CqRt16	—	31.4	36.0	34.9	29.1	34.9	32.6	29.1	27.6	29.1	34.9	28.2	26.7	29.1	
CqRt17	63.8	—	55.7	52.3	51.1	56.8	69.3	51.1	56.8	38.6	55.7	43.7	39.8	87.5	
CqRt18	80.8	61.3	—	58.0	58.0	65.9	59.1	56.8	61.4	45.5	63.6	43.7	38.6	56.8	
CqRt19	60.6	59.6	60.4	—	54.5	84.1	58.0	55.7	58.0	42.0	86.4	40.2	40.9	54.5	
CqRt20	56.2	60.9	58.6	61.9	—	58.0	53.4	88.6	54.5	53.4	58.0	43.7	39.8	87.5	
CqRt21	62.6	60.9	60.5	92.1	62.0	—	60.2	60.2	63.6	47.7	94.3	46.0	44.3	59.1	
CqRt22	64.9	67.7	63.2	64.2	59.4	62.8	—	53.2	60.2	40.9	59.1	39.1	35.2	52.3	
CqRt23	57.6	61.5	59.6	63.6	94.7	64.2	59.2	—	54.5	53.4	60.2	41.4	42.0	87.5	
CqRt24	63.0	64.7	61.7	60.4	59.8	63.2	60.9	60.4	—	42.0	62.5	43.7	43.2	55.7	
CqRt25	50.9	56.4	53.8	56.2	60.5	58.6	53.4	63.0	54.5	—	46.6	36.8	36.4	56.8	
CqRt26	62.6	58.6	60.9	90.2	60.5	92.1	63.5	64.2	60.5	59.0	—	46.0	43.2	59.1	
CqRt27	56.3	58.0	53.4	54.4	58.0	56.1	52.7	58.2	52.3	50.0	55.7	—	36.8	42.5	
CqRt28	48.1	50.2	46.7	55.0	56.0	54.4	51.4	54.7	54.4	52.1	54.8	48.8	—	43.2	
CqRt29	57.4	60.2	59.0	61.1	93.6	62.0	58.3	95.5	59.8	63.2	61.3	56.1	55.2	—	

¹⁾ 横线下方的数值为核苷酸序列间的同源率, 横线上方的数值为氨基酸序列间的同源率 Datums under the diagonal are homologous rate among nucleotide sequences and those above the diagonal are homologous rate among amino acid sequences.

2.5 节瓜中 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶氨基酸序列的突变分析

参照已报道的 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶的

氨基酸保守序列, 将 29 条节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶的核苷酸序列翻译成氨基酸序列, 结果见图 3。在 29 条序列中, 有 12 条氨基酸序列发生移框突

变, 分别是 CqRt2(第 17 位氨基酸)、CqRt4(第 36 位氨基酸)、CqRt6(第 14 位氨基酸)、CqRt7(第 17 位氨基酸)、CqRt11(第 17 位氨基酸)、CqRt12(第 14 位氨基酸)、CqRt13(第 23 和第 74 位氨基酸)、CqRt15(第

44 位氨基酸)、CqRt16(第 18 位氨基酸)、CqRt23(第 66 位氨基酸)、CqRt24(第 39 位氨基酸)和 CqRt27(第 39 位氨基酸)。21 个逆转录酶序列存在终止密码子突变, 其中 CqRt15 分别在第 16、第 23、第 38 和第

CqRt1	T A F F H G E L E E V I Y M A Q P K G Y E T T G K N D M V F R H R S I Y G- K Q S S - R Q W Y
CqRt2	T A F F H G D L * E E V I Y M E H P P R F V A Q G E N G T V C R C K S I Y E- K * S P - Q A W F
CqRt3	T A F F H G E L E E E I Y M T Q P D G I Q C P G K E D Y V C K X K S I Y G- K Q S P - R Q W Y
CqRt4	T A F F H G E L E E V I Y M A Q P K G Y E Y V K G K E D M V C R L H R S I Y G- K Q S P - R * W Y
CqRt5	T A F F H G H I K E T I Y M I Q P E G F R Y F G E N I N C L N T S I Y G- K Q S P - R C W Y
CqRt6	T A F L H G D L H E A I Y - Q P E G F E E K W D K I V C K L X K R I Y G- T * A P - R Q W Y
CqRt7	T A F F H G D F Q E E V Y M E Q T K - - - G E N G T V C R I R K S I Y G- K Q S P - R A M F
CqRt8	T A F F H G E L E E V I Y M A Q L K G Y E Y V K G K E D M V C R L H R S I Y G- K * S P - R Q W Y
CqRt9	T A F F H G E L E E V I Y M A Q P K G Y E T T G K D M V C R L H R S I Y G- K Q S S - R Q W Y
CqRt10	T A F L H G K L E E H I Y M M Q P K G S E K Y L K D I V C K X K S I Y R- K Q P P - R C W Y
CqRt11	T A F L H G E L E E V I Y J A Q P X G Y E Y V K G K E D M V C C L H R S I F G- K * S P - R Q W Y
CqRt12	T A F F H G D L H E A I - - - Q P E G F E E K W D K I V C K L X K R I Y G- T * A P - R Q W Y
CqRt13	T A F F H G H L E E T I Y M T Q P E G F E V K I K R K F C L L N K S I Y G- K Q S P - R C * Y
CqRt14	T A F L H G H I E E T I Y M M Q P K G I E E V K G K E D M V C R L H R S I Y G- K Q S P - R C W Y
CqRt15	T A F F H G D L Q E E V Y M E S L G I V A * G E N G M V C R I R K S I Y - K * S P - R A W F
CqRt16	T A F L H G F V D E E V Y M S Q P E G Y E V R G * - R R L C M S T * K V Y L R P Q I V P - * M L E
CqRt17	T A F F H G H L E E T I Y V T Q P K R F E V K G K E N I F C L I N K F I Y G- K * Q S P - R C W Y
CqRt18	T A F L H G F L E E V I Y M S Q P X G Y E Y V K G K E D Y M C L I X E I Y N G- K Q S P - R C W N
CqRt19	T A F F H G E I R E V I Y M A Q P K G Y E M I V G K D M V C R L H R S I Y G- K Q S L - R Q W Y
CqRt20	S A F L H G E L E E E I Y M T Q P D G I Q C P S K E D Y V C K X K S I Y G- K Q S P - R * W Y
CqRt21	T A F F H G D L E E E V I Y M A Q P K G Y E M I V G K E D M V C H I H R S I Y G- K Q S P - R C W Y
CqRt22	T A F F H G H L D E V I Y I V Q P K G F E * K G K E D I Y C L L N K S I * G- L K Q S P - R C W Y
CqRt23	T A F F H G E L E E E I Y M T Q P D G I Q C P G K E D Y V C K X K S I Y G- K Q S P - R Q W Y
CqRt24	T A F L H G L E N E T I Y M K Q P Q G Y V K K G E E D L V F L L N K S I Y G G L K Q S P - R C W Y
CqRt25	T A F L H G D L H E E I Y M E Q P E * V E E C W D K I V C K X N S L H G- R * A P - R Q W Y
CqRt26	T A F F H G E L E E V I Y M A Q P K G Y E Y V K G K E D M V C R L H R S I Y G- K Q S P - R Q W Y
CqRt27	T A F L H G N L E E T I Y M T Q P R G V H S S R S R A K V Y K L N R F I Y G- K Q A S - R S W N
CqRt28	T A F L H G E L N E X V Y V E Q P X G Y Q K I G G H I V Y E L H K A L Y G- L * A P - R A * F
CqRt29	T A F L H G E L K E E I Y M T Q P D R F Q C P G K E D Y V C K L M K S I Y G- L * S P - R Q W Y
CqRt1	I K F D T F - I K * G F H R S S Y D P C M V * K L S Y K G I T Y T L I Y Y D D M
CqRt2	G K F N Q V - I E S F G M R K S T S N H S I F F I R S - E G D V I L L V V Y Y D D M
CqRt3	K * F D S Y - M I G L G Y N R S P Y D Y C V Y R N K S D D G S M I Y L I Y Y D D M
CqRt4	I K F D T F - I K * G F Y K S S Y G A C L Y * K L S Y K G T I Y T L I Y Y D D M
CqRt5	R R F N D Y - I S S I E E K R S S Y D I C I Y V N T S S Y K D K V Y L I Y Y D D M
CqRt6	K K F D S F - M I N N D Y K R T T A D S C V Y F R K F P T G N F I L I Y Y D D M
CqRt7	G K F S Q V - I E S F G M R K S R S N H S V F F I R S - E G G V I L L V V Y Y D D M
CqRt8	I K F D T F - I K Q Q F H R S * Y D V C M Y R E L S K K G T Y I Y L I Y Y D D M
CqRt9	C Q Q F H R S Y G T Q V Y * K L S Q G T I Y T L I Y Y D D M
CqRt10	K K F D E F - I T G I N F K R S K F D P C V Y L K K V S N D K K L Y L I Y Y D D M
CqRt11	I K F D T F - I S R G F H R S F Y D A C V Y W L S O K G T I Y T L I Y Y D D M
CqRt12	K K F D S F - M I N N D Y K R T T A D S C V Y F R K F P T G N F I L I Y Y D D M
CqRt13	K K L M T - - I S S I R I K R R S F D I C A Y V N T G S Y Q D K V Y L I Y Y D D M
CqRt14	K K V S D Y - S S I R F R S S F G I C V Y V N T G S Y N D K V R E I Y Y D D M
CqRt15	G K F S Q V - I E N F G I R K S T L D H S I F F I R S - E G G V I L L V V Y Y D D M
CqRt16	H K V * * I C I E E W L L * K L L * Q L C L H K H R F L H S S - Y L V T Y Y D D M
CqRt17	K I F N D Y - I S S I G L K S S F D I C V Y V N T S S Y N D K V Y L F I Y Y D D M
CqRt18	K R F S D F - V Q X K N G F Y R S F Y D S C V Y I N I G S C T H P I Y L L I Y Y D D M
CqRt19	S R F D U F - I K * G F H K S S Y D A C M W E S * K G I T Y T L I Y Y D D M
CqRt20	K R F D S Y - M I R L G Y N K S L Y B C C V Y H N K A D D G S M I Y L I Y Y D D M
CqRt21	I K F D A F - I K Q Q F Y R S S Y D A C V Y W L S O K G T I Y T L I Y Y D D M
CqRt22	R R F N D Y - I E S I R F Q K S T Y D I C T Y V N S T T Y R N K V Y L I Y Y D D M
CqRt23	K * F D S Y - M I R L G Y N R S P Y D L L Y H N K A D D G S M I Y L I Y Y D D M
CqRt24	D R F D E V - I T K M G F K R S S Y D W V Y T N S K S L K E P V Y L I Y Y D D M
CqRt25	K K F D S F - M I N N N Y K R I T A Y F C V Y F R K F P V G N F I T L I Y Y D D M
CqRt26	I K F D K F - I K Q Q F H R S S Y D A C V Y W L S O K G T I Y T L I Y Y D D M
CqRt27	I I F N A T - V K S F G F D Q N V D E P C V Y K I I N - S S V A F I L I Y Y D D M
CqRt28	S R I E A H - L I D E G F Q R C D S E Q I L F T K R S M E G K I I I V S V Y Y D D M
CqRt29	K R F D S Y - M I R L G Y N R S P Y D C C V Y H N K A N H G S M I Y L I Y Y D D M

“*”: 终止密码子 Stop codon; “-”: 用于优化联配的缺口 Gaps used for optimal alignment. 下划线标注的氨基酸为移框翻译的位点 Amino acids with underlines represent the frame shift translation sites.

图 3 节瓜 29 条 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶氨基酸序列的比对
Fig. 3 Alignment of 29 amino acid sequences of reverse transcriptase of Ty1-copia-like retrotransposon from *Benincasa hispida* var. *chieh-qua* How

41位氨基酸处存在4个终止密码子突变,CqRt4(第45、第56和第69位氨基酸)和CqRt19(第6、第56和第73位氨基酸)存在3个终止密码子突变,CqRt1(第57和第70位氨基酸)、CqRt2(第9和第41位氨基酸)、CqRt8(第41和第63位氨基酸)、CqRt16(第41和第55位氨基酸)、CqRt22(第22和第37位氨基酸)、CqRt28(第19和第41位氨基酸)和CqRt25(第41和第46位氨基酸)存在2个密码子突变,CqRt3(第49位氨基酸)、CqRt5(第25位氨基酸)、CqRt6(第39位氨基酸)、CqRt9(第70位氨基酸)、CqRt11(第41位氨基酸)、CqRt12(第39位氨基酸)、CqRt13(第45位氨基酸)、CqRt17(第40位氨基酸)、CqRt20(第45位氨基酸)、CqRt23(第49位氨基酸)和CqRt29(第41位氨基酸)存在1个终止密码子突变。存在转录活性的逆转录酶序列为CqRt7、CqRt10、CqRt14、CqRt18、CqRt21和CqRt24,只占全部序列数量的20.69%,所以导致逆转座子突变、无法表达及逆转座子异质性的重要原因可能为移框突变与终止密码子突变。

2.6 节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶氨基酸序列的系统进化分析

将29条节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶氨基酸序列进行NCBI BLASTx同源搜索,结果显示:来

源于节瓜的29条逆转录酶氨基酸序列比较复杂,与黄瓜、水稻(*Oryza sativa* Linn.)、草莓(*Fragaria × ananassa* Duch.)、番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)、葡萄(*Vitis vinifera* Linn.)、芸薹(*Brassica campestris* Linn.)、甜菜(*Beta vulgaris* Linn.)及藜属(*Chenopodium* Linn.)种类的Ty1-copia类逆转座子逆转录酶基因的氨基酸序列有较高同源性。

从29条节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶的每一个家族选取1~2个序列,结合GenBank上登录的部分植物的Ty1-copia类逆转座子逆转录酶基因的氨基酸序列,利用DNAStar软件构建进化树,结果见图4。结果表明:供试逆转录酶氨基酸序列在聚类图中分为6组,第1组包括CqRt21氨基酸序列以及甜瓜(*Cucumis melo* Linn., CAJ65841)、*Cucumis × hytivus* J. F. Chen et J. H. Kirkbr. (ADQ85918)、甜橙[*Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck, CAJ41396]和茶树[*Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze., CAJ09747]的Ty1-copia类逆转座子逆转录酶基因的氨基酸序列;第2组包括*Populus ciliata* Wall. ex Royle (AAT73703)、梅(*Prunus mume* Sieb. et Zucc., ACZ36925)和欧洲云杉(*Picea abies* (Linn.) H. Karst., CAA11919)的Ty1-copia类逆转座子逆转录酶基因的氨基酸序列;第3组包括

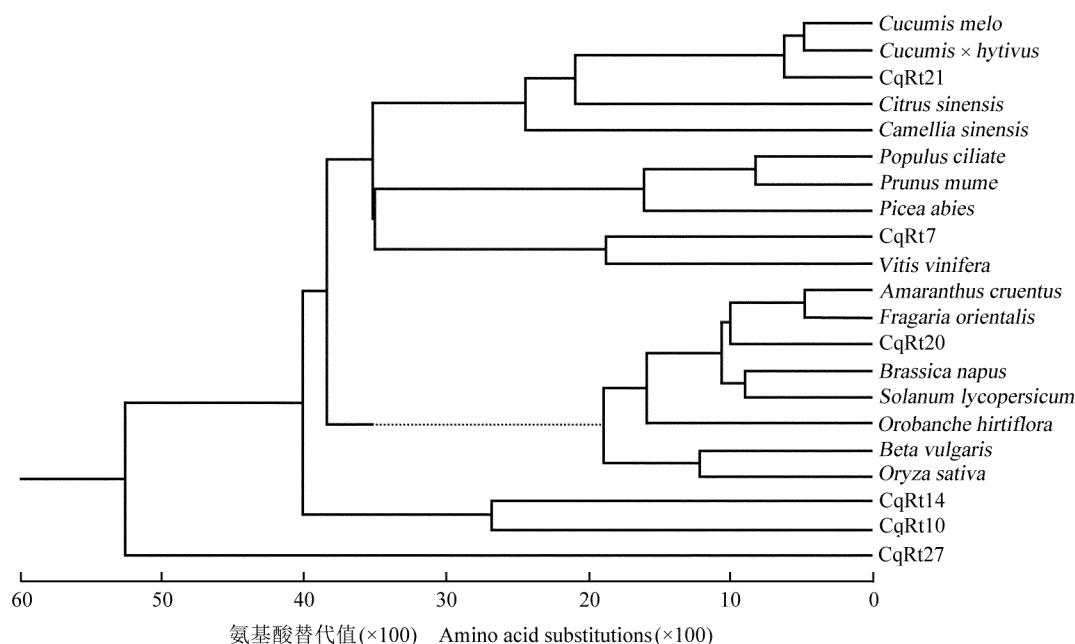


图4 节瓜与其他植物 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶氨基酸序列的系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of amino acid sequence of reverse transcriptase of Ty1-copia-like retrotransposon from *Benincasa hispida* var. *chieh-quai* How and other species

CqRt7 氨基酸序列和葡萄 (XP_002272586) 的 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶基因的氨基酸序列; 第 4 组包括 CqRt20 氨基酸序列以及 *Amaranthus cruentus* Linn. (AAG44312)、东方草莓 (*Fragaria orientalis* Lozinsk., ADP88729)、欧洲油菜 (*Brassica napus* Linn., AAA32987)、*Solanum lycopersicum* Linn. (AAC34606)、*Orobanche hirtiflora* (Reut.) Tzvelev (ABD19053)、甜菜 (T14589) 和水稻 (T03662) 的 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶基因的氨基酸序列; 第 5 组包括 CqRt14 和 CqRt10 氨基酸序列, 且与其他家族遗传距离较远; CqRt27 氨基酸序列与其他植物的 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶氨基酸序列的亲缘关系最远, 单独聚为 1 个分支, 为第 6 组。

上述分析结果表明: 不同植物种类的 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶基因的亲缘关系相近或起源于相同祖先, 但有些逆转座子在不同种或属间的同源性高于种内或属内, 因此植物基因组中的逆转座子不仅可以在物种世代间纵向传递, 还可以在不同属的类群间或同属的不同种间横向传递。

3 讨论和结论

本研究首次对节瓜中的 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶基因序列进行 PCR 扩增, 从 8 条节瓜品系中均扩增得到 260 bp 左右的目的片段, 说明 Ty1-copia 类逆转座子在节瓜中广泛存在。获得的节瓜 29 条逆转录酶核苷酸序列长度变化范围是 247~267 bp, 小于枳的逆转录酶核苷酸序列长度 (273 bp)^[22]; 且 29 条 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶核苷酸序列长度相差 20 bp, 小于辣椒^[25]和苹果^[24] Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶核苷酸序列的长度变异, 但大于黄瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶核苷酸序列的长度变异^[26]; 其中 21 条序列存在 1~4 个终止密码子突变, 12 条序列存在移码突变。因此推测节瓜逆转座子高度异质性群体形成的主要原因是缺失突变、移码突变及终止密码子突变。逆转座子以自身携带的无校对功能的逆转录酶产生 RNA 中间产物进行增殖, 碱基错配率较高; 另外, 长期进化过程中, 生物体通过各种方式抑制逆转座子转座造成致死突变, 而逆转座子在胁迫条件下不断转录与转座形成基因组的多样性与遗传变异^[28~29], 两者的相互作用使节瓜 Ty1-copia 类逆转座子这类古老元件在不断转座与世代传递过程

中形成了高度异质性。

逆转座子广泛分布于植物基因组中, 可在世代间纵向传递, 也可在物种间横向传递^[30~31], 部分物种的逆转座子只能在种或属间检测出来, 而有些逆转座子则可在多种物种间检测出来, 因此成为研究物种在种或属间进化与分化的依据以及推测其起源及与物种间相互关系的重要工具^[32]。前人研究表明, 同一植物类群的逆转座子保守性较强, 但序列变异较大, 导致种内异质性差异有时高于种或属间的异质性差异^[24]。本研究中, 随机克隆的 29 条节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶序列中, CqRT16 序列与 CqRT28 序列的同源率只有 26.7%, 而 NCBI BLASTx 同源搜索结果表明, 节瓜与黄瓜、甜瓜、草莓、甜菜、水稻、葡萄等植物的 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶序列的相似性较高, 其中 CqRT21 序列与黄瓜 (ADQ85918) 氨基酸序列的同源率高达 90%, 这也在一定程度上说明这些物种的 Ty1-copia 类逆转座子可能有相同起源, 在一定程度上为研究节瓜的起源提供了依据。在系统进化树上, 节瓜 29 条逆转录酶核苷酸序列可分为包含不同序列数量的 5 个家族, 反映了各家族逆转座子的转录过程与历史地位可能存在差异, 对节瓜基因组进化的作用也可能各异。

研究结果显示: 节瓜 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶序列在节瓜不同品系中广泛存在, 可为进一步分离 Ty1-copia 类逆转座子、研究其起源进化和转录活性特征及开发鉴评种质的分子标记奠定了基础。

参考文献:

- [1] KUMAR A, BENNETZEN J L. Plant retrotransposons [J]. Annual Review of Genetics, 1999, 33: 479~532.
- [2] FLAVELLA J, SMITH D B, KUMAR A. Extreme heterogeneity of Ty1-copia group retrotransposons in plants [J]. Molecular and General Genetics, 1992, 231: 233~242.
- [3] TAM S M, MHIRI C, VOGELAAR A, et al. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 110: 819~831.
- [4] 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 Reports, 1996, 15: 949~953.
- [5] ROGERS S A, PAULS K P. Ty1-copia-like retrotransposons of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [J]. Genome, 2000, 43: 887~894.
- [6] ALIX K, RYDER C D, MOORE J, et al. The genomic organization of retrotransposons in *Brassica oleracea* [J]. Plant Molecular Biology,

- 2005, 59: 839–851.
- [7] KALENDAR R, TANSKANEN J, IMMONEN S, et al. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97: 6603–6607.
- [8] ELLIS T H N, POYSER S J, KNOX M R, et al. Polymorphism of insertion sites of *Ty1-copia* class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea [J]. Molecular and General Genetics, 1998, 260: 9–19.
- [9] SANZ A M, GONZALEZ S G, SYED N H, et al. Genetic diversity analysis in *Vicia* species using retrotransposon-based SSAP markers [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2007, 278: 433–441.
- [10] PETIT M, LIM K Y, JULIO E, et al. Differential impact of retrotransposon populations on the genome of allotetraploid tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2007, 278: 1–15.
- [11] 王利英, 杜永臣, 张斌, 等. 茄子 IRAP 和 REMAP 分子标记的开发 [J]. 园艺学报, 2008, 35(9): 1363–1367.
- [12] BERNET G P, ASINS M J. Identification and genomic distribution of *gypsy* like retrotransposons in *Citrus* and *Poncirus* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 108: 121–130.
- [13] BRETÓM P, RUIZ C, PINA J A, et al. The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 21: 285–293.
- [14] RUIZ C, ASINS M J. Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106: 826–836.
- [15] ANTONIUS-KLEMOLA K, KALENDAR R, SCHULMAN A H. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 112: 999–1008.
- [16] SUN H Y, DAI H Y, ZHAO G L, et al. 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]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50: 1130–1139.
- [17] VENTURI S, DONDINI L, DONINI P, et al. Retrotransposon characterisation and fingerprinting of apple clones by S-SAP markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 112: 440–444.
- [18] DU X Y, ZHANG Q L, LUO Z R. Development of retrotransposon primers and their utilization for germplasm identification in *Diospyros* spp. (Ebenaceae) [J]. Tree Genetics and Genomes, 2009, 5: 235–245.
- [19] GUO D L, ZHANG H Q, LUO Z R. Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis [J]. Plant Science, 2006, 170: 528–533.
- [20] 赵芹, 谢大森, 罗少波, 等. 节瓜与枯萎病菌互作中抑制消减文库的构建及初步分析 [J]. 园艺学报, 2013, 41(增刊): 2687.
- [21] YAO J L, DONGY H, MORRIS B A T. Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98: 1306–1311.
- [22] TAO N G, WEI J, LIU Y Z, et al. *Copia*-like retrotransposons in a precocious mutant of trifoliate orange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] [J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2006, 81: 1038–1042.
- [23] STERGIOU G, KATSIOTIS A, HAGIDIMITRIOU M, et al. Genomic and chromosomal organization of *Ty1-copia*-like sequences in *Olea europaea* and evolutionary relationships of *Olea retroelements* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104: 926–933.
- [24] 孙俊, 房经贵, 高兵, 等. 苹果中 *Ty1-copia* 型逆转座子逆转录酶序列的克隆及分析 [J]. 果树学报, 2005, 22(3): 193–197.
- [25] 刁卫平, 王述彬, 刘金兵, 等. 辣椒 *Ty1-copia* 类逆转座子逆转录酶序列的克隆及分析 [J]. 分子植物育种, 2012, 10(1): 55–61.
- [26] 江彪, 娄群峰, 刁卫平, 等. 黄瓜属 *Ty1-copia* 类逆转座子逆转录酶序列的克隆及分析 [J]. 园艺学报, 2008, 35(8): 1147–1154.
- [27] 张靖国, 胡红菊, 田瑞, 等. 梨 *Ty1-copia* 类逆转座子逆转录酶序列的克隆及分析 [J]. 湖北农业科学, 2012, 51(9): 4388–4390.
- [28] STEINHAUER D A, HOLLAND J J. Direct method for quantitation of extreme polymerase error frequencies at selected single base sites in viral RNA [J]. Journal of Virology, 1986, 57: 219–228.
- [29] 肖栋, 侯喜林, 马景蕃, 等. 不结球白菜 *Ty1-copia* 类逆转座子序列的克隆及表达 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(4): 643–649.
- [30] DOOLITTLE R F, FENG D F, JOHNSON M S, et al. Origins and evolutionary relationship of retroviruses [J]. The Quarterly Review of Biology, 1989, 64: 1–30.
- [31] KUMAR A. The evolution of plant retroviruses: moving to green pasture [J]. Trends in Plant Science, 1998, 3: 371–374.
- [32] GRANDBASTIEN M A. Retroelements in higher plants [J]. Trends in Genetics, 1992, 8: 103–108.

(责任编辑: 张明霞)