

甘蔗属大茎野生种 Ty1-copia 反转录转座子 逆转录酶序列克隆与特点分析

吴子莺¹, 杨 善¹, 钱 旺¹, 吴嘉云², 陈 柯¹,
张 珂¹, 李佩婷¹, 邓祖湖^{1,3}

(¹ 福建农林大学国家甘蔗工程技术研究中心, 福州 350002; ² 广东省生物工程研究所 / 广州甘蔗糖业研究所, 广州 510316;

³ 广西大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530002)

摘要: 为深入研究大茎野生种 Ty1-copia 反转录转座子逆转录酶序列 (RT, reverse transcriptase) 的特点, 本研究使用简并引物将 Ty1-copia RT 序列克隆、测序, 成功分离了 60 条 Ty1-copia 类 RT 序列, AT 比例为 46.0%~62.0%, 长度为 257~266 bp, 通过构建系统进化树分析, 可将其分成 6 大类。将这些碱基序列翻译成氨基酸序列, 通过 ClustalX 软件分析, 发现存在上游 TAFLHG、下游 YVDDM 以及中心 SLYGLKQ 保守结构域, 并出现编码阅读框移码突变、终止密码子突变的现象。与其他禾本科物种的 Ty1-copia RT 序列一起构建系统进化树, 结果发现可分成 10 类不同的进化谱系, 60 条大茎野生种 Ty1-copia RT 氨基酸序列中有 12 条序列归为 I 类 (Sre/Maximus)、有 10 条序列归为 II 类 (Retrofit/Ale)、有 18 条序列归为 III 类 (Ale)、有 17 条序列归为 X 类 (Tork/TAR), 仅有 3 条序列归为 VI 类 (Tork/Angela); 然而 Bianca 和 Oryco/Ivana 谱系未发现大茎野生种 Ty1-copia RT 序列, 表明其与甘蔗杂交种、高粱的亲缘关系近。通过斑点杂交结果, 可计算得到 Ty1-copia RT 序列在其基因组中拷贝数为 6.75×10^3 。FISH 结果显示, Ty1-copia RT 序列是弥散分布在染色体上, 其中部分染色体端粒上的信号比较强。这些结果将有助于今后大茎野生种生物多样性研究、基因组研究, 提供一定的参考依据。

关键词: 大茎野生种; Ty1-copia 反转录转座子; 荧光原位杂交; 进化分析; 甘蔗

Cloning and Characterisation of Reverse Transcriptase Sequences of Ty1-copia Retrotransposon in *Saccharum robustum*

WU Zi-ying¹, YANG Shan¹, QIAN Wang¹, WU Jia-yun², CHEN Ke¹,
ZHANG Ke¹, LI Pei-ting¹, DENG Zu-hu^{1,3}

(¹ National Engineering Research Center for Sugarcane, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

² Guangdong Provincial Bioengineering Institute/Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangzhou 510316;

³ State Key Laboratory for protection and utilization of subtropical agro-bioresources, Guangxi University, Nanning 530004)

Abstract: In order to investigate the characteristics of *S. robustum* E. W. Brandes & Jeswiet ex Grassl Ty1-copia retrotransposon reverse transcriptase (RT), the Ty1-copia RT sequences were isolated by PCR amplification with universal primers. Sixty Ty1-copia RT sequences were successfully isolated with a length of 257 to 266 bp. Through ClustalX software analysis, several conserved domains in the amino acid sequences were revealed,

收稿日期: 2019-05-06 修回日期: 2019-07-06 网络出版日期: 2019-08-21

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190506001>

第一作者主要从事甘蔗细胞生物学研究, E-mail: wuziyingfafu@outlook.com

通信作者: 邓祖湖, 从事甘蔗种质资源研究, E-mail: dengzuhu@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31771863, 31571730, 31401440); 福建省重大科技项目 (2015NZ0002-2); 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室开放项目 (SKLCUSA-b201606)

Foundation project: the National Natural Science Foundation of China (31771863, 31571730, 31401440), Technology Major Project of the Fujian Province of China (2015NZ0002-2), An Open Project of the Key Laboratory of Conservation and Utilization of Subtropical Agricultural Biological Resources (SKLCUSA-b201606)

such as TAFLHG, YVDDM and SLYGLKQ, which were found at the upstream, downstream and central parts, respectively. Several frameshift mutation in the code reading box and at the termination codon mutation were found. The phylogenetic tree analysis of Ty1-copia RT sequences of *S. robustum* E. W. Brandes & Jeswiet ex Grassl and other *Gramineae* species suggested ten different evolutionary lineages. 12 of *S. robustum* E. W. Brandes & Jeswiet ex Grassl Ty1-copia RT amino acid sequences were classified as class I (Sre/Maximus), 10 were classified as Class II (Retrofit/Ale), 18 were classified as Class III (Ale), 17 were classified as Class X (Tork/TAR), and 3 of the sequences were classified as Class VI (Tork/Angela). This analysis indicated that *S. robustum* E. W. Brandes & Jeswiet ex Grassl was closely related to the *Saccharum* spp. hybrid and *Sorghum*. Based on the result of dot blot hybridization, the copy number of the *S. robustum* E. W. Brandes & Jeswiet ex Grassl Ty1-copia RT sequence was calculated to be 6.75×10^3 in one genome. The FISH results showed that the *S. robustum* E. W. Brandes & Jeswiet ex Grassl Ty1-copia RT sequences were distributed on the chromosome, which the signal of telomere region was stronger than other regions in some chromosomes. These results would provide a reference for the biodiversity study and genome research of *S. robustum* E. W. Brandes & Jeswiet ex Grassl in the future.

Keywords: *Saccharum robustum* E. W. Brandes & Jeswiet ex Grassl; Ty1-copia retrotransposons; fluorescence in situ hybridization (FISH); evolutionary analysis; sugarcane

甘蔗 (*Saccharum* spp.) 是一年生或多年生 C4 植物, 为蜀黍族甘蔗亚族甘蔗属, 为世界上重要的糖料与能源作物之一^[1]。甘蔗属分为 6 个种: 热带种 (*S. officinarum* L.)、中国种 (*S. sinense* Roxb.)、印度种 (*S. barberi* Jeswiet)、肉质花穗种 (*S. edule* Hassk.)、割手密种 (*S. spontaneum* L.) 和大茎野生种 (*S. robustum* E. W. Brandes & Jeswiet ex Grassl)^[2]。有研究认为大茎野生种是热带种的祖先, 热带种是在新几内亚因为自然和人类的选择由大茎野生种进化而来^[3]。大茎野生种, 染色体数为 60~120, 6~12 倍体; 在甘蔗上杂交利用最为广泛的是 8 倍体大茎野生种, 8 倍体大茎野生种基因组大小约为 8.62 Gb/2C, DNA 含量约为 8.77 pg/2C^[4]。在甘蔗育种上, 大茎野生种因其植株高大、生势旺, 抗螟虫及抗风力强, 宿根性好而受到育种家们青睐。我国利用大茎野生种杂交后代作为亲本育成的甘蔗品种有湛蔗 79-177、桂糖 18 号、闽糖 92-949、赣蔗 18 号以及 ROC 10 等^[5]。由此说明, 大茎野生种对拓宽甘蔗遗传基础及品种改良具有重要意义。

转座子 (TE, Transposable elements) 是真核生物基因组的主要成分之一, 可以从原位上单独复制或断裂下来, 环化后插入另一位点, 并对其后的基因起修饰、调控作用^[6-7]。其中, 反转录转座子 (Retrotransposon) 作为数量最多的一类转座子, 是植物基因组的重要组成成分, 也是目前所知植物基因组中拷贝数最多的一种成分^[8-9]。反转录转座子在转座时, 先以 DNA 为模板, 在 RNA 聚合酶 II 的

作用下, 转录成一段 mRNA, 然后再以这段 mRNA 为模板反转录成 cDNA, 最后在整合酶的作用下将这段 cDNA 整合到基因组上新的位置^[6]。因此, 反转录转座子在着丝粒功能进化、基因数量、基因排序、基因表达等过程中扮演着重要的角色^[6, 10]。反转录转座子大部分本身没有功能, 但受到生物或非生物胁迫条件下、种间杂交或多倍体化作用时可被激活, 但其中被激活机制有待进一步研究^[11-12]。根据两端侧翼有无长末端重复 (LTRs, long terminal repeats), 反转录转座子可以分为两类: 长末端重复 (LTRs, long terminal repeats) 和非长末端重复 (non-LTRs, non-long terminal repeats)。根据序列相似性程度以及在多聚蛋白区域中的顺序, LTR 反转录转座子又可分为 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 两个亚类^[6]。

2018 年, Zhang 等^[13]发表了单倍体割手密 AP85-441 基因组数据, 首次将同源多倍体植物基因组组装到染色体水平, 完成组装的基因组中末端重复反转录转座子占 45.62%, 其中 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 分别占 14.19%、26.04%。由此可见, Ty1-copia 类反转录转座子是多倍体甘蔗基因组的重要组成部分之一。然而, 甘蔗属其他物种基因组未见报道, 也未见大茎野生种 Ty1-copia 反转录转座子相关研究报道。本研究利用简并引物, 从甘蔗属大茎野生种基因组中克隆、分离 60 条 Ty1-copia 反转录转座子反转录酶 (RT) 序列并分析其异质性、拷贝数、在染色体上定位分布特点, 并进行系统发育进化分析, 有助于了解大茎野生种基因组的结构、进化

和多样性,为今后分离具有转录活性的反转录转座子并应用于甘蔗分子育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

51NG3 (2n=8x=80),为大茎野生种,取自福建农林大学甘蔗种质资源圃。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取及 PCR 扩增 参照 Porebski 等^[14]改良的 CTAB 法提取 51NG3 的基因组 DNA。

参照 Flavell 等^[15]设计的一对简并引物 (F: 5'-ACNGCNTTYTNCAYGG-3'; R: 5'-ARCATR TCRTCACRTA-3'。R=A+G, Y=C+T, N=A+T+C+G) 用于扩增 Ty1-copia 反转录转座子逆转录酶序列。PCR 反应体系为 50 μ L: 含 5 μ L 10 \times LA Buffer、4 μ L dNTP Mix (2.5 mmol/ μ L)、0.25 μ L La Taq 酶 (5 U/ μ L)、2 μ L 50 ng/ μ L 模板 DNA、引物各 2 μ L (10 μ mol/L)、34.75 μ L ddH₂O。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 初始变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 45 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 最终在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 5 min。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。

1.2.2 克隆、测序及序列分析 1.5% 琼脂糖凝胶检测扩增产物,用 Gel/PCR Extraction Kit 回收琼脂糖凝胶纯化 PCR 产物。将纯化后 PCR 产物与 pMD19-T 载体 16 $^{\circ}$ C 链接 2 h,连接体系 10 μ L: 5 μ L Solution I、1 μ L pMD19-T、1 μ L 纯化 PCR 产物。将连接后的产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后,随机挑取单克隆,在含有 80 μ g/mL 氨苄青霉素 (AMP, ampicillin) 的 LB 液体培养基中过夜 4~6 h,经 PCR 鉴定为阳性的菌液送生工生物工程技术 (上海) 股份有限公司测序。

用 DNAMAN 比对测序的 Ty1-copia 反转录转座子碱基序列,去除载体序列,去除重复序列和过短序列,通过 EMBOSS Transeq 工具将 60 条碱基序列转化为氨基酸序列。通过 MEGA6.06 软件,采用邻接法分别构建大茎野生种 Ty1-copia 的碱基序列、氨基酸序列及其与其他物种的 Ty1-copia 氨基酸序列的系统发育进化树。通过 ClustalX 软件对 Ty1-copia 氨基酸序列进行比对分析。

1.2.3 含 Digoxigenin-11-dUTP (DIG) 标记 51NG3 的 Ty1-copia 探针制备 用 PCR DIG Probe Synthesis 试剂盒制备 Digoxigenin-11-dUTP (DIG) 标记

51NG3 的 Ty1-copia 探针,具体按照说明书进行制备。

1.2.4 中期相染体制片 选用具有良好根点的 51NG3 材料进行培根,将蔗茎剪成单芽茎,洗净后用 0.5% 多菌灵溶液浸泡过夜杀菌。然后,洗净蔗茎,将其平摆在铺着两层纱布的托盘中,蔗茎上面也盖上纱布,期间必须保持湿润,放入 25 $^{\circ}$ C 培养箱中避光培养。待蔗茎上根长至 2~3 cm 时,用 2 mmol/L 羟基脲溶液处理 18 h; 然后用纯水将蔗茎浸洗 1 次,转入纯水中处理 4 h; 最后用 1 μ mol/L 氟乐灵处理 4 h; 以富集中期细胞。剪下根尖,统一参照 Huang 等^[16]描述的方法进行酶解制备染色体玻片。

1.2.5 斑点杂交 将不含 DIG 标记 51NG3 基因组 DNA 稀释成 500 ng/ μ L、400 ng/ μ L、250 ng/ μ L、200 ng/ μ L、125 ng/ μ L、100 ng/ μ L、62.5 ng/ μ L、50 ng/ μ L, 将 51NG3 Ty1-copia PCR 产物稀释成 1.5 ng/ μ L、1.0 ng/ μ L、0.75 ng/ μ L、0.50 ng/ μ L、0.375 ng/ μ L、0.30 ng/ μ L、0.25 ng/ μ L、0.187 ng/ μ L, 在 100 $^{\circ}$ C 水浴锅中变性 5 min,随即马上放置冰水中处理 10 min。将变性后的样品整齐点在印迹膜上,每个点加 1.0 μ L,重复 2 次,使用参数为 1.5 J、245 nm 的紫外交联仪照射带有样品的印迹膜,使得样品固定在膜上。后续杂交、洗脱等实验步骤具体参照 Huang 等^[16]方法进行。通过 ImageJ 软件将不同浓度的基因组 DNA 和 Ty1-copia 杂交信号转化成灰度值进行量化,具体参照 Schneider 等^[17]方法来估算 Ty1-copia 类反转录转座子在 51NG3 单个基因组中的拷贝数。

1.2.6 荧光原位杂交 将 100 ng DIG 标记的 Ty1-copia 探针,50% 去离子甲酰胺,10% 硫酸葡聚糖和 2 \times SSC 的杂交混合物 (总体积 50 μ L) 在 97 $^{\circ}$ C 变性 10 min,冰水浴 10 min。后续染色体玻片变性、杂交、洗脱及 FISH 图像捕获等实验步骤参照 Yang 等^[18]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 Ty1-copia 类反转录转座子 RT 序列分析

用简并引物成功克隆了 Ty1-copia 类反转录转座子 RT 序列,随机选取 83 个单克隆测序,去除重复序列和过短序列,共获得 60 条 Ty1-copia 类反转录转座子序列,序列编号为 SrTy1-copia-1~SrTy1-copia-60, GenBank 登录号为 MK781830~MK781889。从表 1 可知,60 条 Ty1-copia 类反转

表 1 大茎野生种 Ty1-copia 类反转录转座子碱基序列

Table 1 The nucleotide sequence of *S. robustum* E. W. Brandes & Jeswiet ex Grassl Ty1-copia retrotransposon

序列号 Sequence No.	大小 (bp) Size	AT 比例 (%) AT proportion	登录号 Accession number	序列号 Sequence No.	大小 (bp) Size	AT 比例 (%) AT proportion	登录号 Accession number
SrTy1-copia-1	263	61.6	MK781830	SrTy1-copia-31	257	52.9	MK7818360
SrTy1-copia-2	257	53.7	MK781831	SrTy1-copia-32	263	60.5	MK7818361
SrTy1-copia-3	257	53.7	MK781832	SrTy1-copia-33	263	50.6	MK7818362
SrTy1-copia-4	257	53.7	MK781833	SrTy1-copia-34	263	61.2	MK7818363
SrTy1-copia-5	263	61.6	MK781834	SrTy1-copia-35	257	53.7	MK7818364
SrTy1-copia-6	263	52.5	MK781835	SrTy1-copia-36	263	60.1	MK7818365
SrTy1-copia-7	257	55.3	MK781836	SrTy1-copia-37	257	53.7	MK7818366
SrTy1-copia-8	257	55.6	MK781837	SrTy1-copia-38	263	60.8	MK7818367
SrTy1-copia-9	262	51.1	MK781838	SrTy1-copia-39	263	60.1	MK7818368
SrTy1-copia-10	263	61.2	MK781839	SrTy1-copia-40	257	52.9	MK7818369
SrTy1-copia-11	263	48.3	MK7818340	SrTy1-copia-41	257	53.3	MK7818370
SrTy1-copia-12	263	51.7	MK7818341	SrTy1-copia-42	233	56.2	MK7818371
SrTy1-copia-13	263	61.2	MK7818342	SrTy1-copia-43	263	55.1	MK7818372
SrTy1-copia-14	260	61.5	MK7818343	SrTy1-copia-44	263	55.1	MK7818373
SrTy1-copia-15	257	53.3	MK7818344	SrTy1-copia-45	263	56.3	MK7818374
SrTy1-copia-16	263	46.0	MK7818345	SrTy1-copia-46	263	59.7	MK7818375
SrTy1-copia-17	263	53.6	MK7818346	SrTy1-copia-47	263	49.4	MK7818376
SrTy1-copia-18	263	60.8	MK7818347	SrTy1-copia-48	260	53.8	MK7818377
SrTy1-copia-19	257	53.3	MK7818348	SrTy1-copia-49	263	55.9	MK7818378
SrTy1-copia-20	260	54.2	MK7818349	SrTy1-copia-50	257	50.2	MK7818379
SrTy1-copia-21	263	60.5	MK7818350	SrTy1-copia-51	263	55.1	MK7818380
SrTy1-copia-22	263	62.0	MK7818351	SrTy1-copia-52	263	54.4	MK7818381
SrTy1-copia-23	266	61.3	MK7818352	SrTy1-copia-53	263	55.5	MK7818382
SrTy1-copia-24	257	53.3	MK7818353	SrTy1-copia-54	263	55.9	MK7818383
SrTy1-copia-25	257	53.7	MK7818354	SrTy1-copia-55	263	57.4	MK7818384
SrTy1-copia-26	263	60.8	MK7818355	SrTy1-copia-56	263	50.6	MK7818385
SrTy1-copia-27	260	53.8	MK7818356	SrTy1-copia-57	263	55.5	MK7818386
SrTy1-copia-28	263	60.1	MK7818357	SrTy1-copia-58	263	56.7	MK7818387
SrTy1-copia-29	263	59.7	MK7818358	SrTy1-copia-59	263	46.8	MK7818388
SrTy1-copia-30	263	60.8	MK7818359	SrTy1-copia-60	263	61.2	MK7818389

图 1 大茎野生种 Ty1-copia 类反转录转座子 RT 碱基序列系统进化树
Fig. 1 Phylogenetic tree of Ty1-copia retrotransposon RT nucleotide sequences in *S. robustum* E. W. Brandes & Jeswiet ex Grassl

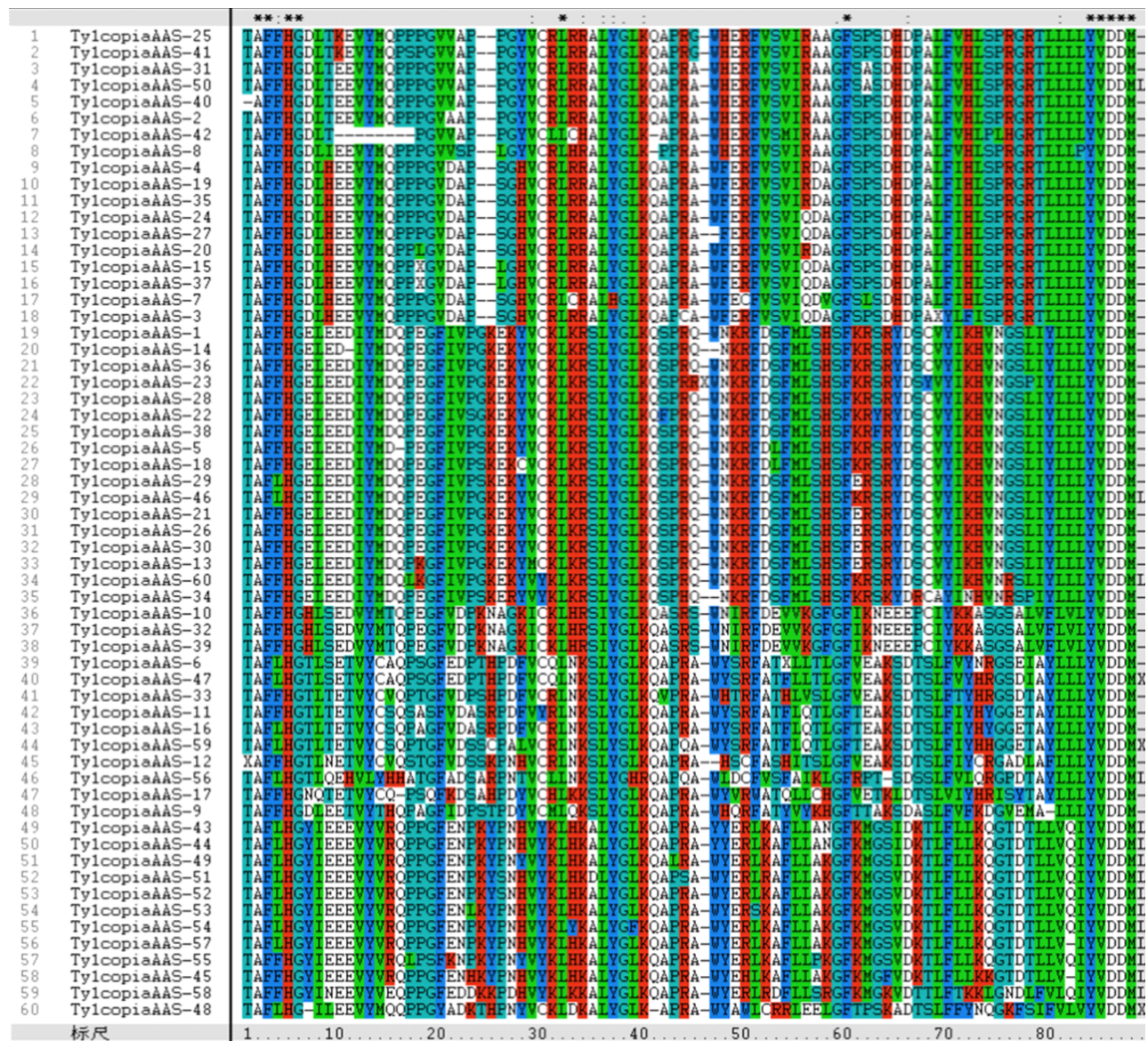


图2 大茎野生种 Ty1-copia RT 氨基酸序列比对分析

Fig. 2 The amino sequence alignment of reverse transcriptase in *S. robustum* E. W. Brandes & Jeswiet ex Grassl

15 和 Ty1copia AAS-37 在第 18 位氨基酸处发生终止密码子突变, Ty1copia AAS-23 在第 47 位氨基酸处发生终止密码子突变, Ty1copia AAS-6 在第 54 位氨基酸处发生终止密码子突变, Ty1copia AAS-3 在第 70 位氨基酸处发生终止密码子突变。

为了明确大茎野生种基因组中克隆得到的 60 条 Ty1-copia 类 RT 氨基酸序列之间的关系, 利用 MEGA6.0 软件邻接法构建相应的系统发育进化树。从图 3 可知, 所有氨基酸序列分为 4 类。其中第 I 类包含 20 条序列, 占总数的 33.3%; 第 II 类、第 III

类、第 IV 类分别包含 18 条、10 条、12 条序列, 占总数的 30%、16.7%、20%。

通过 Ty1-copia RT 氨基酸序列构建系统进化树研究了大茎野生种与其他禾本科物种(甘蔗、小麦、大麦、水稻、高粱、玉米)的相关 Ty1-copia 反转录转座子 RT 序列之间的关系。从图 4 可知, 将它们分成 10 个不同的进化谱系(I-X)。I 类中的 12 条大茎野生种 Ty1-copia RT 序列具有较高相似性, 其与甘蔗杂交种的 Sre/Maximus 谱系聚类; II 类大茎野生种 10 条 Ty1-copia RT 序列与玉米、高粱、甘蔗的 Retrofit/Ale 谱系聚为一类; III 类 18 条大茎野生

大茎野生种是甘蔗重要的野生种质之一,为甘蔗杂交育种及其遗传多样性等研究提供了丰富的基因库。然而,尚未有可供利用的大茎野生种基因组图谱,对其基因组及其进化分类知之甚少。反转

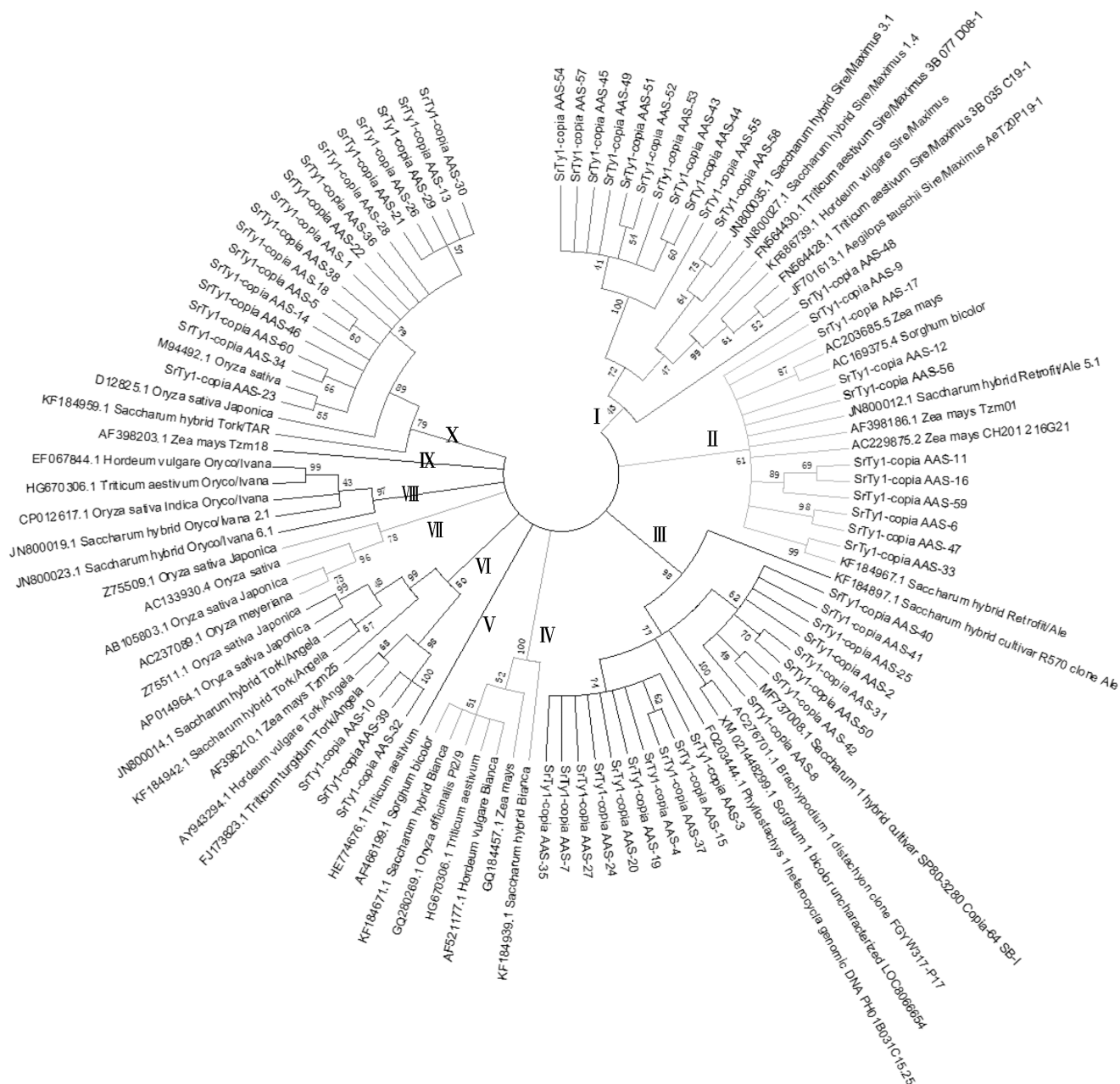


图4 大茎野生种与其他禾本科物种的 Ty1-copia 类氨基酸序列进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of Ty1-copia retrotransposon amino acid sequences in *S. robustum* E. W. Brandes & Jeswiet ex Grassl and other Gramineae species

录转座子是植物基因组的重要组成部分,在植物基因组进化、基因分化、基因表达等方面起着重要作用^[19]。在许多植物中,通用简并引物进行PCR扩增获得Ty1-copia类反转录转座子RT序列,广泛用于研究生物多样性与物种系统进化分析^[7,20]。本研究中,成功分离了60条Ty1-copia类反转录转座子RT序列,AT比例为46.0%~62.0%;长度为257~266 bp;通过构建系统进化树分析,可将这些序列分成6大类。将这些碱基序列翻译成氨基酸序列,通过ClustalX软件分析,这些序列均存在上游TAFLHG、

下游YVDDM以及中心SLYGLKQ保守结构域。氨基酸序列中出现编码阅读框移码突变、终止密码子突变的现象。同时,将这些Ty1-copia类氨基酸序列构建系统进化树后发现,可分成4大类。由此表明,本研究所分离的Ty1-copia类反转录转座子RT序列具有很高的异质性。前人分析克隆的番茄^[21]、桂花^[22]、斑茅等^[16]Ty1-copia类RT序列亦发现有高度的异质性。这是促使植物物种多样性产生、促使植物进化的强大动力之一。对Ty1-copia反转录转座子RT序列高度异质性产生的机制尚

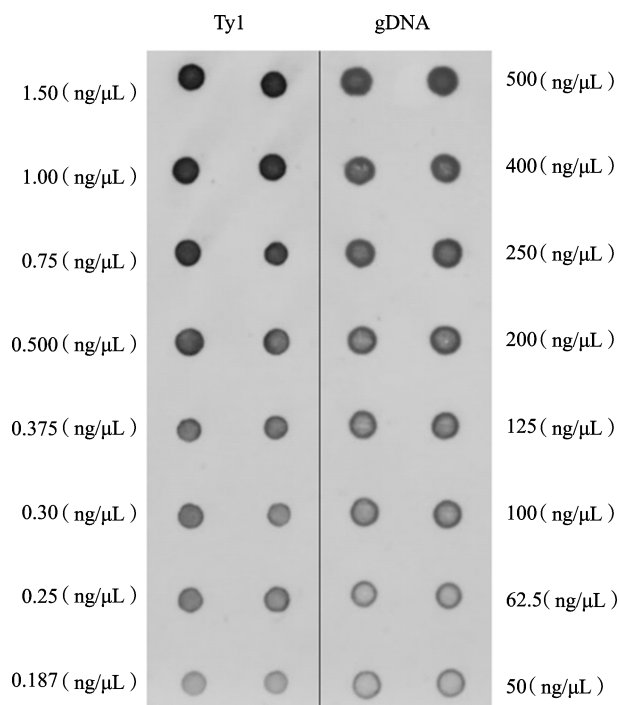
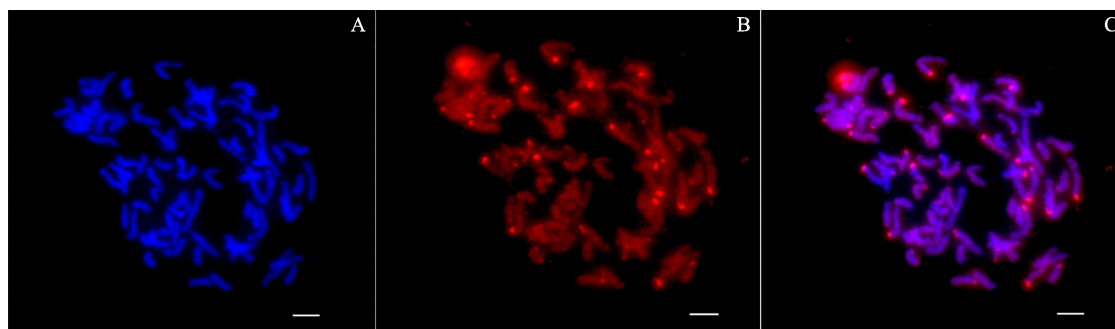


图 5 大茎野生种 Ty1-copia RT 序列斑点杂交
Fig. 5 Dot-blot hybridization of Ty1-copia RT sequences



A: 所有染色体被 DAPI 染成蓝色; B: 红色为 DIG 标记 Ty1-copia 类 RT 序列探针杂交信号; C: 蓝色、红色叠加图片; 比例尺 = 5 μm
A: Chromosomes were stained by DAPI with blue signal, B: Ty1-copia RT sequence probes were labelled by DIG with red hybrid signal, C: Merged images of two signals, Scale bars = 5 μm

图 6 大茎野生种 51NG3 的 Ty1-copia 类反转录转座子 RT 序列在染色体上定位

Fig. 6 Chromosomal location of Ty1-copia RT sequences from *S. robustum* E. W. Brandes & Jeswiet ex Grassl 51NG3

未清楚,但有学者研究认为可能有以下几种原因造成:(1)反转录酶没有校对功能,使用逆转录过程中 RNA 翻译成 cDNA 会发生许多错误,因此,每个复制的碱基序列会产生不确定的突变率^[23]。(2)进化谱系中远缘物种之间的水平传播和垂直传播,可能使得反转录转座子产生分化,进而造成其高度异质性^[24]。

本研究对大茎野生种与其他禾本科物种的 Ty1-copia 反转录转座子 RT 序列之间关系进行了研究,结果发现,它们分成了 10 个不同的进化谱系(I-VIII),其中大茎野生种 Ty1-copia 类氨基酸

序列有 20% 归为 I 类(Sre/Maximus)、有 16.7% 归为 II 类(Retrofit/Ale)、有 30% 归为 III 类(Ale)、有 28.3% 归为 X 类(Tork/TAR);仅有 5% 的序列归为 VI 类(Tork/Angela);然而 Bianca 和 Oryco/Ivana 谱系未发现大茎野生种 Ty1-copia RT 序列。在甘蔗杂交种 R570 的染色体上能清楚检测到以 Ale 和 Maximus 谱系的 Ty1-copia RT 序列为探针的 FISH 杂交信号,而未能检测到 Angela 和 Ivana 的杂交信号^[25]。因此,表明本研究克隆分离的 Ty1-copia 反转录转座子 RT 序列是正确、可信的。同时,也表明大茎野生种与甘蔗杂交种、高粱的亲缘关系比较近,

而玉米次之;与水稻、小麦、大麦亲缘关系较远。这与 Brown 等^[26]、Nair 等^[27] 研究分析大茎野生种的亲缘进化关系的结果一致。

此外,近些年许多学者对 Ty1-copia 类反转录转座子在基因组中的拷贝数及染色体上定位进行了研究^[28-29]。反转录转座子 RT 序列普遍存在植物基因组中,从低拷贝(<100)到高拷贝(>1000)在不同植物中各不相同。唐益苗等^[30]发现反转录转座子随着基因组增大,拷贝数及其占整个基因组比例有增加的趋势。拟南芥(121 Mbp)、水稻(389 Mbp)中反转录转座子分别占其基因组的5%、17%,约有20、1000个拷贝数^[19,31]。苹果(742 Mbp)基因组中 Ty1-copia 反转录转座子 RT 序列有 5.0×10^3 拷贝数^[32]。本研究通过斑点杂交结果可知大茎野生种(8.6 Gbp)的 Ty1-copia 反转录转座子 RT 序列在其基因组中拷贝数为 6.75×10^3 ,表明 Ty1-copia RT 序列在大茎野生种中有很高的拷贝数。同时,通过 FISH 将 Ty1-copia RT 序列定位于大茎野生种染色体上,结果表明, Ty1-copia 反转录转座子 RT 序列是弥散分布在染色体上,染色体臂、着丝粒、亚端粒与端粒区域均有明显的信号,而部分染色体端粒上的信号比较强。Ty1-copia RT 序列在染色体上的分布模式与前人研究甘蔗杂交种^[24]的结果类似,因为甘蔗杂交种为异源杂合体,基本包含有甘蔗属热带种、割手密、大茎野生种中的2种或2种以上血缘,由此推断甘蔗属热带种、割手密的 Ty1-copia 类 RT 序列在染色体上的分布模式应该为散布式。而与洋葱^[33]、斑茅^[16]的大部分 Ty1-copia 反转录转座子 RT 序列定位于染色体亚端粒上的结果不同。

参考文献

- [1] 方静平, 阙友雄, 陈如凯. 甘蔗属起源及其与近缘属进化关系研究进展. 热带作物学报, 2014, 35(4): 816-822
Fang J P, Que Y X, Chen R K. A review of *Saccharum* origin and its evolutionary relationship with related genera. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(4): 816-822
- [2] Irvine J E. *Saccharum* species as horticultural classes. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 82(2): 186-194
- [3] Grivet L, Daniels C, Glaszmann J C, D'Hont A. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. Ethnobotany Research and Applications, 2004, 2(1): 9-17
- [4] Zhang J S, Nagai C, Yu Q Y, Pan Y B, Tomas A S, Schnell R J, Comstock J C, Arumuganathan A K, Ming R. Genome size variation in three *Saccharum* species. Euphytica, 2012, 185(3): 511-519
- [5] 吴嘉云. 甘蔗与斑茅后代染色体遗传分析及抗性初步评价. 福州: 福建农林大学, 2013
Wu J Y. The Chromosome inheritance for the hybrid progeny of *S. officinarum* L. and *E. arundinaceum* and germplasm resistance preliminary evaluation. Fuzhou: Fujian Agricultural and Forestry University, 2013
- [6] Kumar A, Bennetzen J L. Plant retrotransposons. Annual Review of Genetics, 1999, 33(1): 479-532
- [7] Feschotte C, Jiang N, Susan R W. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. Nature Reviews Genetics, 2002, 3(5): 329-341
- [8] Flavell A J, Pearce S R, Heslop-Harrison J S P, Kumar A. The evolution of Ty1-copia group retrotransposons in eukaryote genomes. Genetica, 1997, 6: 185-195
- [9] Schulman A H. Retrotransposon replication in plants. Current Opinion in Virology, 2013, 3(6): 604-614
- [10] Baucom R S, Estill J C, Leebensmack J, Bennetzen J L. Natural selection on gene function drives the evolution of LTR retrotransposon families in the rice genome. Genome Research, 2009, 19(2): 243-254
- [11] Vicent C M, Kalendar R, Schulman A H. Schulman variability, recombination, and mosaic evolution of the Barley *BARE-1* retrotransposon. Journal of Molecular Evolution, 2005, 61(3): 275-291
- [12] Kimura Y, Tosa Y, Shimada S, Sogo R, Kusaba M, Sunaga T, Betsuyaku S, Eto Y, Nakayashiki H, Mayama S. *OARE-1*, a Ty1-copia retrotransposon in Oat activated by abiotic and biotic stresses. Plant & Cell Physiology, 2001, 42(12): 1345-1354
- [13] Zhang J S, Zhang X T, Tang H B, Zhang Q, Hua X T, Ma X K, Zhu F, Jones T, Zhu X G, Bowers J, Wai C M, Zheng C F, Shi Y, Chen S, Xu X M, Yue J J, Nelson D R., Huang L X, Li Z, Xu H, Zhou D, Wang Y J, Hu W J, Lin J San, Deng Y J, Pandey N, Mancini M, Zerpa D, Nguyen J K, Wang L M, Yu L, Xin Y H, Ge L F, Arro J, Han J O, Chakrabarty S, Pushko M, Zhang W P, Ma Y H, Ma P P, Lv M J, Chen F M, Zheng G Y, Xu J S, Yang Z H, Deng F, Chen X Q, Liao Z Y, Zhang X X, Lin Z C, Lin H, Yan H S, Kuang Z, Zhong W M, Liang P P, Wang G F, Yuan Y, Shi J X, Hou J X, Lin J X, Jin J J, Cao P J, Shen Q C, Jiang Q, Zhou P, Ma Y Y, Zhang X D, Xu R R, Liu J, Zhou Y M, Jia H F, Ma Q, Qi R, Zhang Z L, Fang J P, Fang H K, Song J J, Wang M J, Dong G R, Wang G, Chen Z, Ma T, Liu H, Dhungana S R, Huss S E, Yang X P, Sharma A, Trujillo J H, Martinez M C, Hudson M, Riascos J J, Schuler M, Chen L Q, Braun D M, Li L, Yu Q Y, Wang J P, Wang K, Schatz M C, Heckerman D, Van S M A, Souza G M, Moore P H, Sankoff D, VanBuren R, Paterson A H, Nagai C, Ming R. Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L. Nature Genetics, 2018, 50(11): 1565-1573
- [14] Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 15(1): 8-15
- [15] Flavell A J, Smith D B, Kumar A. Extreme heterogeneity of Ty1-copia group retrotransposons in plants. Molecular & General Genetics Mgg, 1992, 231(2): 233-242
- [16] Huang Y J, Luo L, Hu X G, Yu F, Yang Y Q, Deng Z H, Wu J Y, Chen R K, Zhang M Q. Characterization, genomic

- organization, abundance, and chromosomal distribution of Ty1-copia retrotransposons in *Erianthus arundinaceus*. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 924
- [17] Schneider C A, Rasband W S, Eliceiri K W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 2012, 9 (7): 671
- [18] Yang S, Zeng K, Chen K, Wu J Y, Wang Q N, Li X T, Deng Z H, Huang Y J, Huang F, Chen R K. Chromosome transmission in BC4 progenies of intergeneric hybrids between *Saccharum spp.* and *Erianthus arundinaceus* (Retz.) Jeswiet. *Scientific Reports*, 2019, 9 (1): 2528
- [19] McCarthy E M, Liu J D, Gao L Z, McDonald J F. Long terminal repeat retrotransposons of *Oryza sativa*. *Genome Biology*, 2002, 3 (10): R0053.1-R0053.11
- [20] Lee S I, Park K C, Son J H, Hwang Y J, Lim K B, Song Y S, Kim J H, Kim N S. Isolation and characterization of novel Ty1-copia-like retrotransposons from lily. *Genome*, 2013, 56 (9): 495-503
- [21] Yanez M, Verdugo I, Rodriguez M, Prat S, Ruiz L S. Highly heterogeneous families of Ty1/copia retrotransposons in the *Lycopersicon chilense* genome. *Gene*, 1998, 222 (2): 223-228
- [22] 王庆竹, 李慧平, 文晓鹏, 范付华. 桂花 LTR 类反转录转座子 RT 序列的克隆及分析. *园艺学报*, 2018, 45 (2): 309-320
Wang Q Z, Li H P, Wen X P, Fan F H. Cloning and analysis of reverse transcriptase of LTR retrotransposons in *Osmanthus fragrans*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45 (2): 309-320
- [23] Jiang B, Wu Z M, Lou Q F, Wang D, Zhang W P, Chen J F. Genetic diversity of Ty1-copia retrotransposons in a wild species of *Cucumis* (*C. hystrix*). *Scientia Horticulturae*, 2010, 127 (1): 46-53
- [24] Woodrow P, Ciarmiello L F, Fantaccione S, Annunziata M G, Pontecorvo G, Carillo P. Ty1-copia group retrotransposons and the evolution of retroelements in several angiosperm plants: evidence of horizontal transmission. *Bioinformatics*, 2012, 28 (6): 267-271
- [25] Domingues D S, Cruz G M, Metcalfe C J, Nogueira F T, Vicentini R, Alves C S, Van S M A. Analysis of plant LTR-retrotransposons at the fine-scale family level reveals individual molecular patterns. *BMC Genomics*, 2012, 13 (1): 137
- [26] Brown J S, Schnell R J, Power E J, Douglas S L, Kuhn D N. Analysis of clonal germplasm from five *Saccharum* species: *S. barberi*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. sinense* and *S. spontaneum*. A study of inter-and intra species relationships using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2007, 54 (3): 627-648
- [27] Nair N V, Nair S, Sreenivasan T V, Mohan M. Analysis of genetic diversity and phylogeny in *Saccharum* and related genera using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1999, 46 (1): 73-79
- [28] Alipour A, Tsuchimoto S, Sakai H, Ohmido N, Fukui K. Structural characterization of copia-type retrotransposons leads to insights into the marker development in a biofuel crop, *Jatropha curcas* L. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6 (1): 129
- [29] Kolano B, Bednara E, Weiss-Schneeweiss H. Isolation and characterization of reverse transcriptase fragments of LTR retrotransposons from the genome of *Chenopodium quinoa* (*Amaranthaceae*). *Plant Cell Reports*, 2013, 32 (10): 1575-1588
- [30] 唐益苗, 马有志. 植物反转录转座子及其在功能基因组学中的应用. *植物遗传资源学报*, 2005, 6 (2): 221-225
Tang Y M, Ma Y Z. Characteristics of plant retrotransposons and their applications in functional genomics. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2005, 6 (2): 221-225
- [31] Pereira V. Insertion bias and purifying selection of retrotransposons in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Genome Biology*, 2004, 5 (10): R79
- [32] Sun H Y, Dai H Y, Zhao G L, Ma Y, Ou C Q, Li H, Li L G, Zhang Z H. 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. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50 (9): 1130-1139
- [33] Pearce S R, Pich U, Harrison G, Flavell A J, Heslop-Harrison J S P, Schubert I, Kumar A. The Ty1-copia group retrotransposons of *Allium cepa* are distributed throughout the chromosomes but are enriched in the terminal heterochromatin. *Chromosome Research*, 1996, 4 (5): 357-364