

黄瓜属 *Ty1-copia* 类逆转座子逆转录酶序列的克隆及分析

江彪, 娄群峰, 刁卫平, 陈龙正, 张万萍, 陈劲枫*

(南京农业大学园艺学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘要: 根据 *Ty1-copia* 类逆转座子逆转录酶的保守区设计简并引物, 通过 PCR 扩增, 从黄瓜属野生种酸黄瓜 (*Cucumis hystrix* Chakr.) 和栽培黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 中均扩增出 260 bp 左右的目标条带。扩增产物经纯化后克隆于 pGEM-T Easy 质粒载体, 选择阳性克隆, 再经菌落 PCR 鉴定, 然后进行测序及序列分析, 获得了 21 条来源于酸黄瓜和栽培黄瓜的逆转录酶序列, 通过核苷酸聚类分为 5 个家族。这些核苷酸序列具有较高的异质性, 主要表现为缺失突变, 序列长度变化范围为 255 ~ 272 bp, 同源性范围为 27.0% ~ 98.1%。翻译成氨基酸后, 有 4 条序列出现终止密码子突变, 6 条序列表现出移框突变。将这些逆转录酶的氨基酸序列与已登录的不同物种同一类型逆转录酶的氨基酸序列进行聚类分析, 表明它们可能有共同的起源。

关键词: 黄瓜; *Ty1-copia* 类逆转座子; 逆转录酶; 异质性

中图分类号: S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 08-1147-08

The Cloning and Analysis of Reverse Transcriptase of *Ty1-copia*-like Retrotransposons in *Cucumis*

JIANG Biao, LOU Qun-feng, DIAO Wei-ping, CHEN Long-zheng, ZHANG Wan-ping, and CHEN Jin-feng*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

Abstract: Using degenerate oligonucleotide primers corresponding to conserved domains of the *Ty1-copia* retransposon reverse transcriptase, a fragment of 260 bp was amplified by PCR from *Cucumis hystrix* and *C. sativus*. The amplicons were cloned into pGEM-T Easy vector after purification, positive clones selected and identified by colony PCR, then sequenced and analyzed. Twenty-one different sequences of reverse transcriptase from *Cucumis hystrix* and *C. sativus* ‘Beijing Jietou’ were obtained, and five families were distinguished after cluster and alignment analyses of their nucleotide sequences. These sequences showed high heterogeneity mainly characterized by deletion mutation. The length of the nucleotide sequences varied from 255 to 272 bp, and homology ranged from 27.0% to 98.1%. When translated into amino acids, four sequences presented stop codon mutation, and six sequences presented frameshift mutation. The amino cluster and alignment analyses of these sequences with other reverse transcriptase sequences from other accessions showed that they may have the same origin.

Key words: *Cucumis*; *Ty1-copia*-like retrotransposons; reverse transcriptase; heterogeneity

收稿日期: 2008-02-29; 修回日期: 2008-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671419; 30700541); 国家高技术研究发展计划专项项目 (2006AA100108; 2006AA10Z108); 教育部高校博士点青年教师基金项目 (20070307034)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: jfchen@njau.edu.cn)

逆转座子 (retrotransposon) 是真核生物中种类最多、分布最广的转座因子, 其特殊的转座方式使其成为植物核基因组的重要组成部分, 通常占 DNA 总量的一半以上 (Kumar & Bennetzen, 1999), 有的物种如玉米中逆转录转座子甚至占到核基因组的 70% ~ 85% (Bevan et al., 1998), 在普通小麦中甚至高达 90% 以上 (Flavell, 1986)。由于逆转座子在基因组中的重要地位, 其序列的克隆与分析研究对于植物基因组组成、进化与基因的表达调控研究均有重要的意义。

逆转座子包括长末端重复逆转录转座子 (long terminal repeat, LTR) 和非长末端重复逆转录转座子 (non-long terminal repeat, non-LTR) (Kumar, 1996; Grandbastien, 1998)。LTR 又可分为 Ty1-*copia* 类和 Ty3-*gypsy* 类 (Voytas et al., 1992; Suoniemi et al., 1998), 其中 Ty1-*copia* 类在植物界广泛分布, 是研究最多的一类 (Flavell et al., 1992)。

迄今已在多种主要作物中研究分析了逆转座子的种类和组成 (Pearce et al., 1996; Rogers & Pauls, 2000; Alix et al., 2005)。目前黄瓜属中关于逆转座子的研究很少。作者最近克隆获得了 Ty1-*copia* 类逆转座子的 LTR 区序列, 并开发出了黄瓜属基于 Ty1-*copia*-LTR 的 SSAP 标记系统 (Lou & Chen, 2007)。而有关该逆转座子具转录活性的部分, 即逆转录酶序列尚未见报道, 而逆转录酶序列的分离克隆是深入研究逆转座子是否具有转录活性的关键。

作者以 Ty1-*copia* 类逆转录酶的保守序列设计简并引物, 采用 PCR 方法进行黄瓜属植物逆转录酶序列的分离克隆, 首次从黄瓜属植物基因组 DNA 中分离克隆了 Ty1-*copia* 类逆转座子部分逆转录酶序列, 并通过序列分析初步研究其变化特点。

1 材料与方法

1.1 试验材料

共选用了黄瓜属中的 6 个材料。一个为黄瓜属珍稀野生种——酸黄瓜 (*Cucumis hystrix* Chakr., $2n=24$), 与栽培黄瓜的杂交亲和, 采集于云南西双版纳 (Chen et al., 1997)。其余 5 个均为栽培黄瓜 (*Cucumis sativus* L.), 其中‘北京截头’由中国农业科学院蔬菜花卉研究所戚章春研究员提供, 经本实验室多代自交保存; ‘长春密刺’购于新疆农业科学院园艺研究所, 经本实验室多代自交保存; ‘翠玉’、‘津春’和‘津绿’等购自南京市蔬菜种子子公司。

1.2 DNA 提取及逆转录酶扩增

植株长至第 5 片真叶时, 取刚展开的新叶, 采用 CTAB 法 (Murray & Thompson, 1980) 提取基因组 DNA, 利用琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭显色进行 DNA 浓度的定量。

参照文献 (Kumar et al., 1997) 设计逆转座子的逆转录酶引物。上游引物为: 5'-ACNGCNTTPy-PyTNCAPyGG-3'; 下游引物为 5'-APuCATPuTCPuTCNACPuTA-3', 其中 N = A + T + C + G, Py = A + G, Pu = T + C。

PCR 反应体系为: DNA 20 ng, 0.2 mmol · L⁻¹ dNTPs, 2.0 μL 10 × Buffer (含 MgCl₂), 1 U 的 *Taq* DNA 聚合酶 (购自 TaKaRa 公司), 加双蒸水至 20 μL。

扩增程序为: 94 °C 1 min; 94 °C 1 min, 45 °C 1 min, 72 °C 1 min, 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min; 整个 PCR 反应在 PTC-100™PCR 仪上完成。

1.3 PCR 产物的回收、克隆及转化

用 1% 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物, 并从凝胶上回收酸黄瓜和‘北京截头’两种材料的 PCR 扩增产物, 用 Bio Spin 胶回收试剂盒回收。

回收产物经纯化后连接于 pGEM-T Easy 载体 (Promega) 上, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 37 °C 培养 16 ~ 20 h 后, 蓝白斑筛选, 挑取白色单克隆, 在含有 100 mg · L⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 液体培

培养基中培养过夜后, PCR 鉴定阳性克隆。

1.4 逆转录酶序列测定及序列分析

将鉴定为阳性的菌液送往上海英骏生物技术有限公司测序。利用 DNASTar 和 DNAMAN 软件对获得的逆转录酶序列进行分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果、重组质粒的鉴定及测序

以逆转座子逆转录酶区域保守位点设计引物, PCR 结果表明, 在酸黄瓜和 5 个栽培黄瓜中均检测到了逆转录酶序列, 长度一致, 均为 260 bp 左右 (图 1), 这与前人的报道 (Voytas et al., 1992) 一致, 表明 Ty1-copia 类逆转座子在酸黄瓜和栽培黄瓜中普遍存在。

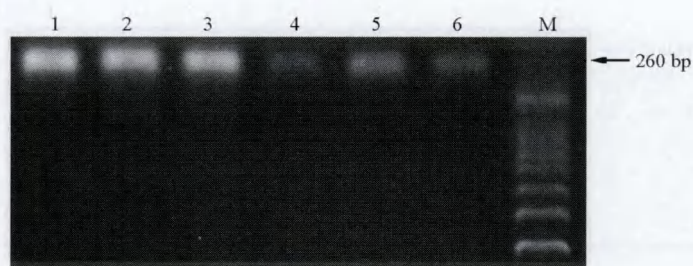


图 1 酸黄瓜和 5 种栽培黄瓜中逆转录酶序列的 PCR 扩增

M. Marker; 1. 酸黄瓜; 2. 北京截头; 3. 津春; 4. 津绿; 5. 翠玉; 6. 长春密刺。

Fig. 1 PCR amplification of reverse transcriptase from *Cucumis hystrix* Chakr. and five species of *Cucumis sativus* L.

M. Marker; 1. *Cucumis hystrix*; 2. Beijing Jietou; 3. Jinchun; 4. Jinlü;
5. Cuiyu; 6. Changchun Mici.

将以酸黄瓜和栽培黄瓜‘北京截头’为模板扩增得到的 260 bp 左右的片段回收纯化, 克隆测序后, 共得到 21 条不同的序列, 其中 6 条来自酸黄瓜 (编号以 Chrt 开头), 15 条来自‘北京截头’ (编号以 Csrt 开头), 均与已报道的其它物种的 RT 保守区域吻合。

2.2 Ty1-copia 类逆转录酶的异质性

所有 21 条序列均与已知植物 Ty1-copia 类逆转座子的逆转录酶序列有很高的同源性, 说明其逆转座子是真实的。

这些序列已提交到 GenBank 中, 登录号分别为: EU162101 ~ EU162106、EU162109 ~ EU162122 和 EU162124。所有序列富含碱基 AT, AT 与 GC 的比例范围为 1.02 ~ 1.83, 与 Stergiou 等 (2002) 的试验结果一致。

21 条逆转录酶的核苷酸序列变化范围为 255 ~ 272 bp (表 1)。而前人的研究结果表明该序列长度为 273 bp (Voytas et al., 1992), 21 条序列长度均少于 273 bp, 都有不同程度的缺失, 说明缺失是造成黄瓜逆转录酶序列长度变化的主要原因。

从表 2 可以看出, 酸黄瓜中逆转录酶序列间同源性范围为 27.0% ~ 57.6%, 北京截头序列间为 30.1% ~ 98.1%, 两者所有序列间同源性范围为 27.0% ~ 98.1%。由此可看出, 由同一简并引物获得的逆转座子的逆转录酶序列并不完全一致, 它们在长度、碱基变化上的多态性表明黄瓜属同一类逆转座子存在高度的异质性。

表 1 黄瓜中逆转录酶序列的组成

Table 1 Base composition of reverse transcriptase in cucumber

序列号 Sequence No.	大小/bp Size	AT/GC	登录号 GenBank number
chrt1	266	1.66	EU162101
chrt2	260	1.43	EU162102
chrt3	255	1.63	EU162103
chrt4	263	1.35	EU162104
chrt5	272	1.62	EU162105
chrt6	261	1.51	EU162106
csrt1	258	1.69	EU162109
csrt2	265	1.76	EU162110
csrt3	263	1.44	EU162111
csrt4	263	1.33	EU162112
csrt5	266	1.80	EU162113
csrt6	257	1.02	EU162114
csrt7	264	1.72	EU162115
csrt8	263	1.59	EU162116
csrt9	264	1.72	EU162117
csrt10	264	1.69	EU162118
csrt11	263	1.33	EU162119
csrt12	263	1.46	EU162120
csrt13	263	1.29	EU162121
csrt14	266	1.83	EU162122
csrt15	266	1.83	EU162124

表 2 黄瓜中逆转录酶的序列差异百分率 (左下方) 和同源性 (右上方)

Table 2 The divergence (below the diagonal) and percent identity (above the diagonal) of reverse transcriptase in cucumber

chrt1	chrt2	chrt3	chrt4	chrt5	chrt6	csrt1	csrt2	csrt3	csrt4	csrt5	csrt6	csrt7	csrt8	csrt9	csrt10	csrt11	csrt12	csrt13	csrt14	csrt15
1 *	41.3	34.0	48.9	33.8	37.6	56.9	87.6	50.6	49.6	90.6	33.0	54.9	49.2	55.6	54.948.9	48.1	49.2	87.2	90.6	
2	112.1		39.0	45.5	35.2	57.6	41.2	42.0	46.2	34.5	42.4	35.2	42.4	45.1	42.8	41.344.7	36.7	45.5	40.9	42.0
3	155.1	123.1		35.5	27.0	43.2	35.5	34.4	34.4	34.7	32.8	46.7	37.5	34.4	36.7	36.335.1	34.0	34.7	32.4	32.0
4	84.2	96.9	143.4		33.3	44.6	42.7	47.9	96.2	53.9	49.4	36.0	41.6	95.1	41.2	40.496.6	53.9	96.3	47.6	49.1
5	160.4	145.6	257.1	167.4		36.6	31.9	34.7	34.0	37.7	35.8	29.9	33.3	33.7	33.2	32.534.0	39.7	33.7	34.1	34.4
6	131.0	63.2	103.3	103.0	134.2		43.1	38.4	43.8	34.0	39.9	34.9	48.1	41.9	48.9	47.442.5	35.2	43.1	36.9	38.8
7	63.3	115.7	146.2	107.0	220.0	105.5		58.1	42.7	44.6	57.3	36.2	51.2	42.3	52.7	51.243.8	42.7	42.7	58.5	56.9
8	13.7	108.4	152.0	87.7	151.5	129.3	60.4		48.3	46.6	88.4	33.0	53.0	48.7	53.0	52.248.9	45.7	49.1	92.2	88.1
9	79.6	94.6	152.3	3.9	164.1	104.5	107.1	86.5		50.4	50.6	35.2	40.4	95.5	40.4	39.695.8	54.0	96.2	48.3	50.6
10	82.6	155.1	149.2	74.9	133.3	175.0	100.2	94.3	73.5		49.3	33.3	40.1	53.6	39.6	37.754.5	93.3	54.7	48.9	49.6
11	10.2	106.9	165.0	83.0	144.1	120.0	62.7	12.8	79.6	86.4		30.1	52.2	50.2	53.0	51.150.0	49.8	50.2	86.9	97.8
12	164.0	148.8	93.9	140.2	198.1	148.5	147.6	166.6	145.4	161.7	184.0		31.0	35.2	30.3	29.935.6	33.0	36.0	32.2	30.7
13	68.1	107.3	131.5	116.4	165.0	89.2	77.9	73.8	120.0	136.4	76.2	241.4		40.4	97.8	98.141.8	37.8	40.1	51.9	51.9
14	83.0	98.9	151.9	5.1	161.7	114.9	108.7	85.3	4.7	75.9	80.7	145.4	121.7		40.4	40.195.5	54.7	96.3	49.8	50.9
15	66.1	105.6	135.9	118.0	161.9	86.6	73.7	75.8	120.0	127.1	74.0	247.8	2.3	121.7		97.841.4	38.2	39.7	52.2	51.5
16	68.1	112.3	138.3	122.1	168.4	91.7	77.9	75.9	123.5	138.5	79.4	251.4	1.9	123.1	2.3		40.7	37.1	39.3	51.9
17	84.2	99.5	146.3	3.5	158.7	113.2	102.3	85.3	4.3	73.7	81.8	152.7	115.9	4.7	117.6	121.5		55.1	97.4	48.1
18	87.7	142.0	157.6	74.7	119.7	156.7	108.1	97.2	73.3	7.2	83.0	163.6	136.2	72.5	133.7	141.471.3		54.7	46.8	49.4
19	83.0	96.9	149.5	3.9	162.8	110.0	106.9	84.2	3.9	72.9	80.7	140.2	123.3	3.9	125.2	127.1	2.7	72.4		49.1
20	14.2	114.5	168.4	89.0	154.4	138.5	59.7	8.4	86.5	88.2	14.7	172.7	78.2	81.9	76.0	77.187.7	93.9	84.1		87.8
21	10.1	108.6	172.5	84.2	151.9	126.2	63.5	13.2	79.6	86.2	2.3	188.5	78.3	78.5	78.3	80.785.4	84.5	80.7	13.7	

* 1; chrt1; 2; chrt2; 3; chrt3; 4; chrt4; 5; chrt5; 6; chrt6; 7; csrt1; 8; csrt2; 9; csrt3; 10; csrt4; 11; csrt5; 12; csrt6; 13; csrt7; 14; csrt8; 15; csrt9; 16; csrt10; 17; csrt11; 18; csrt12; 19; csrt13; 20; csrt14; 21; csrt15.

2.3 逆转录酶的核苷酸序列和氨基酸序列分析

为阐明黄瓜中 *Ty1-copia* 类逆转座子间的相互关系, 利用 DNASTar 对分离到的 21 条逆转录酶序列进行聚类分析, 构建黄瓜中该类逆转座子的系统发育进化树 (图 2)。

根据进化树 branch 的长度把这 21 条 RT 序列分成 5 个家族 (Family1 ~ 5), 代表由同一祖先而来的遗传家系。其中 Family5 只有一个序列, 把它各自单独列为一族, 与其余家族的遗传距离较大。Family1、Family2 和 Family3 分别包括 5 个、4 个和 9 个序列, 这 3 个家族约占克隆总数的 86%, 说明这 3 个家族是构成黄瓜逆转座子的主要成分。

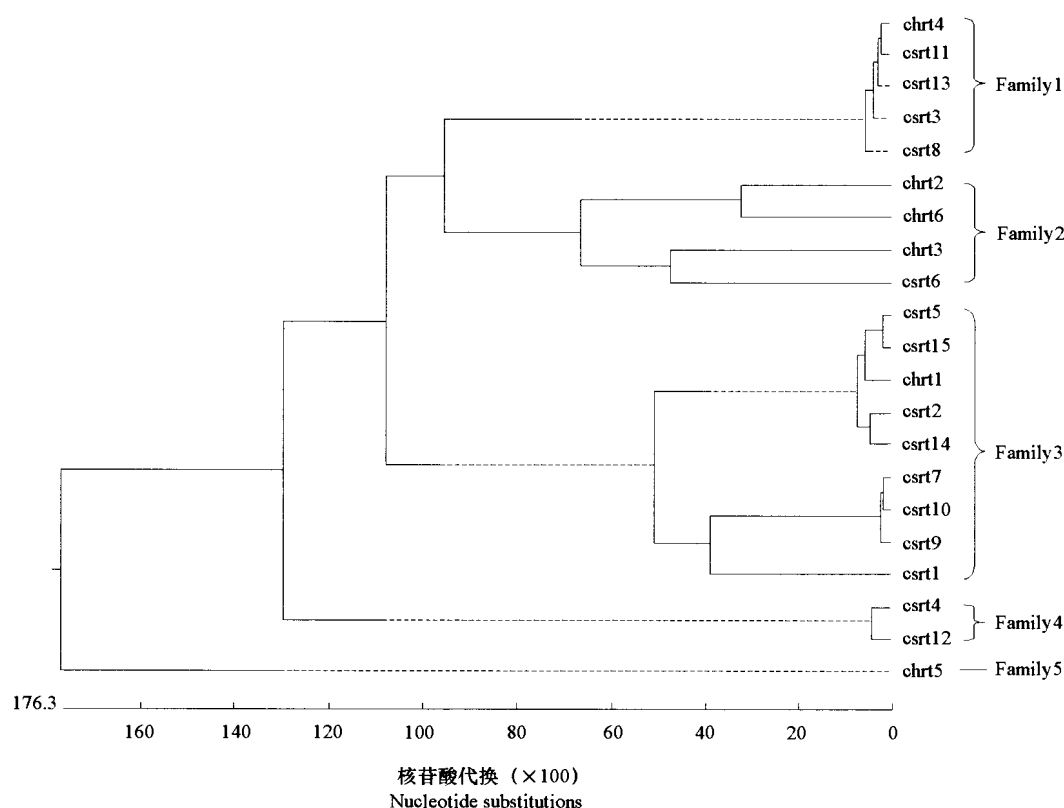


图 2 黄瓜逆转录酶序列进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of sequences of reverse transcriptase in cucumber

将这 21 个逆转录酶翻译氨基酸, 参照 *Ty1-copia* 类逆转座子逆转录酶基因的氨基酸保守序列, 在翻译过程中有 6 条序列发生了移框突变, 分别是: chr3 (第 39 个氨基酸处)、chr6 (第 48 个氨基酸处)、csrt1 (第 57 个氨基酸处)、csrt7 (第 37 个氨基酸处)、csrt9 (第 37 个氨基酸处)、csrt10 (第 37 个氨基酸处)。有 4 条序列即 chr3、chr5、chr6 和 csrt3 发生了终止密码子突变, 其中 chr3 在第 25、26、57、62 和 72 个氨基酸处发生了 5 个终止密码子突变; chr5 在第 76 个氨基酸处发生了 1 个终止密码子突变; chr6 在第 75 个氨基酸处发生了 1 个终止密码子突变; csrt3 在第 23 个氨基酸处发生了 1 个终止密码子突变 (图 3)。因此推测, 移框突变和终止密码子突变也可能是逆转座子异质性的原因。

```

dnt1 TAFLHGYLE ETIYMHVHPKGFVQ... GKEDLYCLLKRS IYGLKQ SPRCWYRRFDDFIASLG FQ.RSSYDMCVY INSTTYKD KVVLLLYVDDMX
dnt2 TAFLHGDLQEEVYMEQPPGFVAQ... G. SDKVCRLRKS IYGLKQ SPRAWFGKFSQALVCFGMKKSTYDHSVYRQSD. KG.IVLLVVYVDDMX
dnt3 TAFLHGDLHHEEVYVQL IWCLGG..... E * TFR.LRQL IYGLKKVHGHLK IIVKNLSNSE * RKEN * ...ITHSSTNNL * I CVILLVYVDDMX
dnt4 TAFLHGDLQEEVYMEQPPGFVAQ... GESDKVCRLRKS IYGLKQS PRAWFG. KFSQALVCFGMKKSTSDHSVYRQSD. KG.IVLLVVYVDDMX
dnt5 TAFFHGDLFREVYMDLPLGYKPNL TIQGEKIVCELHKFVY GIKQASRWFA. KFSQFL I.S.IGF. QQS KANYLLFKG * G. NNF.LALLVYVDDMX
dnt6 TAFLHGDLQEEVYMEQPPGFVAQ... G. SDKVCRLRKS IYGLKQSS. CVVWKFQNALVCFGEKKNTYDPFVYRQFE * G.I.VLLVYVDDMX
csrt1 TAFLHGYLDET IYMVQPKGFVQ... GKEDLYCLLKRS IYGLE QSPR. CWIL.WF... Y.IQT. EFN RSSYDMCV. YINSTTYKEMVFFLLYVDDMX
csrt2 TAFLHGDLQEEVYMEQPPGFVAQ... G. SDKVCRLRKS IYGLKQSPR. AWFG. KFSQALVCFGMKKSTYDHSVYRQSD. KG.IVLLVVYVDDMX
csrt3 TAFFHGDLQEEVYMEQPPGFVA*... GESDKVCRLRKS IYGLKQSPRAWFG. KFSQAFVCFGMKKSTSDHSVYRQSD. KG.IVLLVVYVDDMX
csrt4 TAFLHGELEEEVYVTQPEGFEVS... NEKHVYKLSKALYGLRQAPRAWNL. RLDRSLKELD.FGKCTQEQA VYTRREE. EECVLGVYVDDMX
csrt5 TAFLHGYLEETIYMVQPKGFVQ... GKEYLYC LLKRS IYGLKQS. PRCWYR.FDDFIASLG.FQRSSYD.IVYVNSTTYKDKVYLLYVDDMX
csrt6 TAFLHGDLQEEVYMEQPPGFVQ... PPNKVC LLRALYGLKQAPRAWFA.T.FSS.TLTQLGFTS.SSHDN.ALFTRTT.HG.IVLLLYVDDMX
csrt7 TAFLHGYLEETIYMVQPKGFVQ... GKEDLYRLKRS IYGLKQSPRYWYKR.FDDFIASLG.FQRSSYDMCVHINTT TYKGVYLLYVDDMX
csrt8 TAFFHGDLQEEVYMEQPPGFVAQ... GESDKVCRLRKS IYGLKQSPRAWFG. KFSQALVCFGMKKSTSDQS.VLYRSD. KG.IVLLVVYVDDMX
csrt9 TAFLHGYLEET. IYMVQPKGFVQ... GKEDLYRL. KKS IYGLKQSPRYWYKR.FDDFIASLG.FQRSSYDMCVH.INTT TYKGVYLLYVDDMX
csrt10 TAFLHGYLEET. IYTVQPKGFVQ... GKEDLYRL. KKS IYGLKQSPRYWYKR.FDDFIASLG.FQRSSYDMCVH.INTT TYKGVYLLYVDDMX
csrt11 TAFLHGDLQEEVYMEQPPGFVAQ... GESDKVCRLRKS IYGLKQSPRAWFG. KFSQALVCFGMKKSTSDH.SVF.YERSD. KG.IVLLVVYVDDMX
csrt12 TAFFHGELEEEVYV.TQPEGFEVP... NEKHVYRLSNALYGLRQAPRAWNL.RLDRSLKDLG.FRKTQEQALY.TRREK. EECVLGVYVDDMX
csrt13 TAFLHGDLQEEVYMEQPPGFVAQ... GESDKVCRLRKS IYGLKQSPRAWFGKFSQALVCFGMKKSTSDH.SVF.YERSE. KG.IVLLVVYVDDMX
csrt14 TAFLHGYLDET IYMVQPKGFVQ... GKEDLYCLLKRS IYRLKQSPRYWYRRFDDFIASLG.FQRSSYDMCVY.I.NSTTY.KDNVYLLYVDDMX
csrt15 TAFLHGYLEETIYMVQPKGFVQ... GKEYLYCLLKRS IYGLKQSP.RCWYRRFDDFIASLG.FQRSSYDLYVY.I.NSTTY.KDKVYLLYVDDMX

```

图3 黄瓜中逆转录酶氨基酸序列比较

* 终止密码子；“.”为优化联配而产生的缺口；下划线的氨基酸为移框翻译的位点。

Fig. 3 The amino sequence alignment of reverse transcriptase in cucumber

* Stop code; “.” Gaps introduced for optimal alignment;

Frameshift mutations are underlined.

从 GenBank 中搜索到已登录的来源于不同生物的逆转录酶的氨基酸序列，与作者从黄瓜属中克隆的 21 条逆转录酶的氨基酸序列用 DNAMAN 软件构建有根进化树（图 4）。结果显示作者所克隆到的逆转录酶氨基酸序列与苹果、马铃薯、番茄、拟南芥、水稻等有较高的同源性。

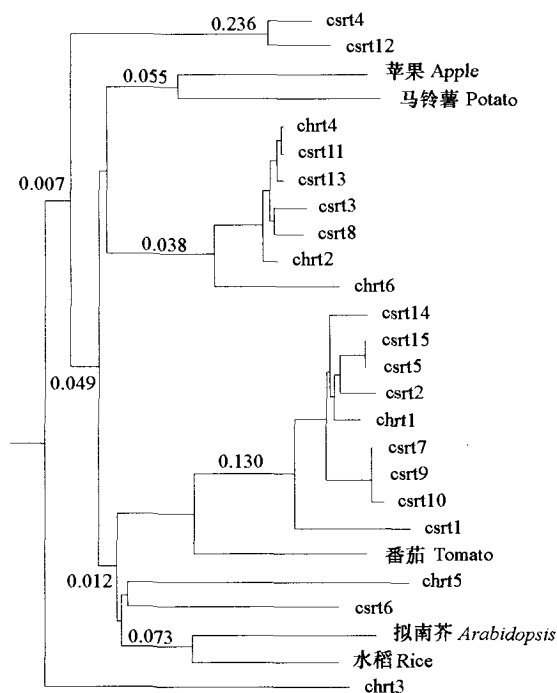


图4 黄瓜与其它植物部分逆转录酶的氨基酸序列的进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of amino sequences of partial reverse transcriptase in cucumber and other accessions

3 讨论

本研究首次对黄瓜属植物中的 Ty1-copia 类逆转座子逆转录酶序列进行 PCR 扩增, 从野生种酸黄瓜和五个栽培黄瓜中均扩增出 260 bp 左右的目标片段, 说明 Ty1-copia 类逆转座子在黄瓜中广泛存在。逆转座子的增殖方式是以 DNA→RNA→DNA 的方式依靠其自身携带的逆转录酶进行的, 由于该酶没有校对功能, 其碱基错配率比 DNA 聚合酶高 10 000 倍以上, 此外寄主的防御机制也会促使逆转座子变异, 因此在长期进化过程中, 逆转座子形成了高度异质性的群体 (Steinhauer & Holland, 1986)。从酸黄瓜和栽培黄瓜‘北京截头’中获得了 21 条逆转录酶序列, 这些序列表现出很大的变异性, 其核苷酸序列变化范围为 255 ~ 272 bp, 而前人的研究表明该序列长度为 273 bp (Voytas et al., 1992), 说明黄瓜中 Ty1-copia 类逆转座子存在缺失突变; 翻译成氨基酸后, 6 个序列发生了移框突变, 4 个序列发生了 1 ~ 5 个不同程度的终止密码子突变。因此缺失突变、移框突变以及终止密码子突变可能是造成逆转座子异质性的主要原因。

分析黄瓜中所获得的 21 条逆转录酶序列的同源性, 可将它们分为 5 个家族。不同家族含有的逆转录酶序列数不同, 反应了各家族逆转座子转座过程的差异, 家族内所含克隆数越多, 表明该家族存在的历史越久远, 其逆转座子具有转座活性的可能性就越大。

逆转座子在植物界的广泛分布及其序列的高度异质性表明, 逆转座子在早期的植物中已出现, 是一个较为古老的转座元件。作为基因组的成分之一, 它们能在世代间遗传给下一代 (Doolittle et al., 1989)。此外, 逆转座子还可在物种间进行横向传递 (Kumar, 1998)。通过与其它作物逆转录酶的氨基酸聚类分析 (图 4), 发现黄瓜 Ty1-copia 类逆转录酶与苹果、马铃薯、番茄、拟南芥、水稻等其它植物有较高的同源性, 表明它们可能有共同的起源, 这可能是不同物种间逆转座子横向传递的结果, 进一步说明了生物界有共同的起源。

本实验室利用黄瓜属野生种酸黄瓜与栽培黄瓜杂交获得了许多种间材料, 下一步将利用本研究获得的酸黄瓜逆转录酶序列为探针进行原位杂交, 研究酸黄瓜的染色体片段在这些种间中间材料中的分布, 这对于基因组组成、进化及优良基因发掘将具有重要意义。

References

- Alix K, Ryder C D, Moore J, King G J, Heslop-Harrison J S. 2005. The genomic organization of retrotransposons in *Brassica oleracea*. *Plant Molecular Biology*, 59: 839 - 851.
- Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C, Bergkamp R, Dirkse W. 1998. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 391: 485 - 488.
- Chen J F, Staub J E, Tashiro Y, Isshiki S. 1997. Successful interspecific hybridization between *Cucumis sativus* L. and *C. hystrix* Chakr. *Euphytica*, 96: 413 - 419.
- Doolittle R F, Feng D F, Johnson M S, McClure M A. 1989. Origins and evolutionary relationships of retroviruses. *Q Rev Biol*, 64 (1): 1 - 30.
- Flavell R B. 1986. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 312: 227 - 242.
- Flavell A J, Smith D, Kumar A. 1992. Extreme heterogeneity of Ty1-copia group retrotransposons in plants. *Mol Gen Genet*, 231: 233 - 242.
- Grandbastien M A. 1998. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plant Sci*, 3: 181 - 187.
- Kumar A. 1996. The adventures of the Ty1-copia group of retrotransposons in plants. *Trends Genet*, 12: 41 - 43.
- Kumar A. 1998. The evolution of plant retroviruses: Moving to green pasture. *Trends Plant Sci*, 3: 371 - 374.
- Kumar A, Bennetzen J L. 1999. Plant retrotransposons. *Annu Genet*, 33: 479 - 532.
- Kumar A, Pearce S R, McLean K, Harrison G, Heslop-Harrison J S, Waugh R, Flavell A J. 1997. The Ty1-copia group of retrotransposons in plants: Genomic organization, evolution, and use as molecular markers. *Genetica*, 100: 205 - 217.
- Lou Q F, Chen J F. 2007. Ty1-copia retrotransposon-based SSAP marker development and its potential in genetic study of cucurbits. *Genome*,

50: 802–810.

Murray H G, Thompson W F. 1980. Rapid isolation of higher weight DNA. Nucl Acids Res, 8: 4321.

Pearce S R, Kumar A, Flavell A J. 1996. Activation of the Tyl-copia group retrotransposons of potato (*Solanum tuberosum*) during protoplast isolation. Plant Cell Reports, 15: 949–953.

Rogers S A, Pauls K P. 2000. Tyl-copia-like retrotransposons of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Genome, 43: 887–894.

Steinhauer D A, Holland J J. 1986. Direct method for quantitation of extreme polymerase error frequencies at selected single base sites in viral RNA. J Virol, 57: 219–228.

Stergiou G, Katsiotis A, Hagidimitriou M, Loukas M. 2002. Genomic and chromosomal organization of Tyl-copia-like sequences in *Olea europaea* and evolutionary relationships of *Olea retroelements*. Theor Appl Genet, 104: 926–933.

Suoniemi A, Tanskanen J, Schulman A H. 1998. Gypsy-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom. Plant, 13: 699–705.

Voytas D F, Cummings M P, Konerczny A K, Ausubel F M, Rodermerl S R. 1992. Copia-like retrotransposons are ubiquitous among plants. Proc Natl Acad Sci USA, 89: 7124–7128.

中国园艺学会番茄分会 2008 年年会通知

中国园艺学会番茄分会 2006 年 8 月在沈阳召开了首次会议, 参会 62 人; 2007 年 9 月在合肥召开了第二次年会, 参会 123 人。经研究, 决定于今年 10 月 30 日至 11 月 1 日在广东省珠海市召开中国园艺学会番茄分会 2008 年年会。

1. 会议时间和地点

10 月 30 日 (星期四) 全天报到, 31 日全天会议交流, 1 日上午离会。会议地点暂定珠海市石景山大酒店。请计划参加会议的人员务必在 8 月 31 日前与会议联系人联系, 以便安排食宿和告知最后选定的酒店信息。

2. 会议内容

(1) 围绕番茄遗传资源与育种、栽培生理与栽培技术、采后处理与流通、种子生产与经营等内容进行研讨和交流。会议采用多媒体形式大会交流, 每人发言 10—15 分钟。

(2) 召开分会理事会, 商定 2009 年年会的举办地点。

3. 参会人员

科研院所、大专院校、生产管理和技术推广部门以及企业中从事番茄科研、生产、流通的有关科研与技术人员 (包括研究生)、管理与经营人员。特别欢迎企业的人员参加。

4. 会议费用

参会人员每人会务费 500 元, 住宿统一安排, 费用自理。

5. 会议组织

组织单位: 中国园艺学会番茄分会; 承办单位: 广东省农业科学院蔬菜研究所。

6. 会议联系单位及联系人:

广州市五山广东省农业科学院蔬菜研究所, 邮编: 510640;

黎振兴: 020-38469456; 13922793784; E-mail: lizhngaas@163.com;

李庆怀: 020-38469427; 13503093659; E-mail: vrigaas@163.com; 传真: 020-38469605, 020-38469591。

北京市中关村南大街 12 号, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 邮编: 100081;

王孝宣, 010-68919538, E-mail: wxlhy@yahoo.com.cn;

国艳梅, 010-68919538, E-mail: yanmeiguo@163.com; 传真: 010-62174123; 010-62146160。

中国园艺学会番茄分会
广东省农业科学院蔬菜研究所
2008 年 6 月 25 日