

doi:10.11937/bfyy.20172738

## 大兴安岭野生笃斯越桔逆转座子 逆转录酶的多样性分析

张文波, 白 杨, 余利敏, 伏鸿峰, 闫 伟

(内蒙古农业大学 林学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

**摘 要:**以大兴安岭野生笃斯越桔为试材,采用同源克隆技术分离了 Ty3-Gypsy 类逆转座子逆转录酶序列,研究了其同源性及系统进化关系,以期分析笃斯越桔的遗传多样性,开发可靠的分子标记提供依据。结果表明:分离的 19 条序列(分别命名为 *VuGRE1*~19)长度范围为 376~418 bp,同源性范围为 23.3%~97.8%,显示出较高的异质性。氨基酸序列分析结果显示,分离的 19 条序列中有 8 条序列发生了不同程度的变异,其中终止密码子突变的频率最高;因此推测终止密码子突变可能是导致笃斯越桔逆转座子异质性的主要原因。系统进化分析结果显示,*VuGRE1*~19 隶属于 2 个不同的基因家族。Family I 仅包含 3 条序列,序列间的同源性较低,且与其它物种逆转录酶的遗传距离较远;说明 Family I 的起源较为古老,种的特异性较强。Family II 包含 16 条序列,由 3 个 Subfamily 组成;各亚家族成员间的同源性较高,亲缘关系较近;说明该基因家族的活性较高。另外,Family II 基因家族成员与其它物种的 Ty3-Gypsy 类逆转座子逆转录酶序列具有较高的同源性,特别是 Subfamily 3 与兴安落叶松、苹果、银杏、绿豆、荸荠等植物的逆转录酶具有较近的亲缘关系;说明这些成员在物种间存在广泛的横向交流。以上结果说明,Family II 是笃斯越桔中广泛存在的逆转座子基因家族,并在笃斯越桔适应性遗传进化中发挥了重要作用。

**关键词:**笃斯越桔;逆转座子;逆转录酶;遗传多样性

**中图分类号:**S 663.901 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2018)04-0041-08

笃斯越桔(*Vaccinium uliginosum* L.)属杜鹃花科(Ericaceae)越桔属(*Vaccinium*)落叶小灌木,主要分布在我国大小兴安岭及长白山地区,常与油桦(*Betula ovalifolia*)、红果越桔(*Vaccinium hirtum*)、落叶松(*Larix* spp.)、苔草(*Carex* spp.)、蔓越桔(*Vaccinium macrocarpon*)、细叶杜香(*Ledum palustre*)等组成混交林<sup>[1]</sup>。作为大兴

安岭天然林的主要伴生树种,笃斯越桔在保持水土,维持森林生态平衡中发挥重要作用。同时,由于其蓝色的小浆果(即蓝莓,blueberry)色泽艳丽、营养丰富、香爽宜人,是极具开发利用价值的林下资源。野生笃斯越桔是濒危珍稀药用植物,其茎、叶、果均可入药<sup>[2-3]</sup>,特别是其果实富含花青素、超氧化物歧化酶(SOD)、多种维生素和微量元素,具有较强的抗氧化能力,可清除和抑制体内的自由基,增强人体免疫力,软化血管,延缓衰老<sup>[4]</sup>。由于蓝莓独特的营养和保健功效,使得蓝莓的开发具有广泛的前景和重要意义。蓝莓的开发培育已有近 100 年的历史,全球蓝莓的种植面积和产量均已达到了相当的规模。在我国,蓝莓的引种、驯化、种植和扩繁技术不断被突破<sup>[5-7]</sup>,一些栽培

**第一作者简介:**张文波(1971-),男,博士,副教授,研究方向为林木遗传育种。E-mail:wenbo20090101@163.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31660213, 31560065, 31160143, 31260168, 31060106);内蒙古自然科学基金资助项目(2015MS0354);内蒙古农业大学博士基金资助项目(BJ08-27)。

**收稿日期:**2017-10-30

品种例如“兔眼”蓝莓、矮丛蓝莓、半高丛蓝莓、高丛蓝莓等被广泛种植。与栽培品种相比,大兴安岭野生蓝莓更具营养保健和药用功效,因此,进行大兴安岭野生笃斯越桔种质资源的开发和保护势在必行。开发可靠的分子标记用于笃斯越桔品种的快速鉴定、遗传多样性分析及种质资源研究具有重要意义。

逆转座子是真核生物转座元件中最为丰富的一类,它能够以 RNA 为媒介将 DNA 经过转录和反转录插入到染色体中<sup>[8-9]</sup>。由于逆转座子的插入影响植物基因组的大小、结构及一些基因的表达,导致植物遗传变异,进而为适应性进化提供源泉<sup>[10-12]</sup>。根据逆转座子基因两端是否含有长末端重复序列将其分为 Long terminal repeat (LTR)类逆转座子和 non-Long terminal repeat (non-LTR)类逆转座子<sup>[8-9,13-14]</sup>。根据基因结构中所包含功能元件的种类和排列顺序不同,LTR 类逆转座子又被分为 Ty1/copia 和 Ty3/gypsy 2 种类型,均广泛存在于真核植物的基因组中<sup>[15-17]</sup>。逆转座子像其它基因一样,不仅可以传递给子代,即纵向传递,也可以借助媒介和载体进行物种间的传递,即横向传递。这 2 种传递方式导致植物的逆转座子具有高度的异质性。根据逆转座子分布广、高异质性等特点开发的逆转座子分子标记技术,为遗传图谱构建、基因组功能分析和种质资源研究提供了新方法<sup>[18]</sup>。

分子标记技术是目前最为有效和理想的标记手段,它克服了传统遗传学研究方法的繁琐程序和容易受外界因素干扰等弊端,在遗传图谱构建、基因定位以及分子标记辅助育种等方面都得到广泛的应用。其中,基于转座子显示的分子标记技术具有良好的重复性、准确性和可靠性而得到广泛关注<sup>[18]</sup>。该研究利用同源克隆技术分离了笃斯越桔的逆转录酶序列并对其进行生物信息学分析,以期开发笃斯越桔的逆转座子分子标记,用于品种鉴定和遗传多样性分析奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

野生笃斯越桔植株于 2011 年 8 月采自内蒙古农业大学大兴安岭生态定位站(位于根河林业局境内)。取长势较好的笃斯越桔枝条上 2~

3 cm 的嫩叶,保存于 CTAB 液中用于提取 DNA。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 DNA 提取

采用改良的 CTAB 法<sup>[19]</sup>提取笃斯越桔的基因组 DNA,并利用紫外分光光度计法和琼脂糖凝胶电泳法进行 DNA 的检测和定量。

#### 1.2.2 逆转座子逆转录酶序列的分离

根据植物 Ty3-Gypsy 类逆转座子逆转录酶氨基酸序列,在其保守区设计兼并引物:上游引物 RT1: 5'-MGNATGTGYGTNGAYTAYMG-3',下游引物 RT2: 5'-RCAYTTNGTNARYT-TIGCRTA-3';利用兼并 PCR 技术扩增笃斯越桔的逆转录酶序列。PCR 反应体系:基因组 DNA 200 ng, 2.5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer (TaKaRa), 2.0  $\mu$ L 2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTPs (TaKaRa), 1 U Taq 聚合酶 (TaKaRa), 1  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 引物 RT1, 1  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 引物 RT2, 加双蒸水将反应体系调整至 25  $\mu$ L。PCR 反应程序:94  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 42  $^{\circ}$ C 50 s, 72  $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 5 min。反应在美国伯乐 Biorad C-1000 PCR 仪上完成。

PCR 产物通过凝胶成像系统检测后,利用天根生化科技有限公司的离心柱型普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行目的产物的回收和纯化;连接 pMD19-T (TaKaRa) 克隆载体并转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞。经蓝白斑筛选及菌落 PCR 检测的重组菌扩增后提取质粒 DNA,送英潍捷基 (Invitrogen) 贸易有限公司测序。

### 1.3 数据分析

运用 DDBJ 数据库的 BLAST 在线软件进行序列的同源性分析,利用 ClustalW 在线软件 (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) 进行序列的多重比对;利用 DNAMAN (DNAMAN 6.0.3.99 简体中文版) 软件进行氨基酸序列预测;利用 MEGA 6.0 软件进行聚类分析,并使用 Neighbor-joining tree 法构建系统发育进化树<sup>[20]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 逆转录酶序列的分离

用 Ty3-Gypsy 类逆转座子逆转录酶保守序列设计兼并引物,以笃斯越桔基因组 DNA 为模板,扩增得到 420 bp 左右的目的产物。将扩增产

物回收、经克隆测序后获得了 19 条序列,分别将它们命名为 *VuGRE1*~19。经 Blast 检索发现, *VuGRE1*~19 均与数据库中已登录的植物 Ty3-Gypsy 类逆转座子逆转录酶序列具有较高的同源性,说明它们是笃斯越桔的 Ty3-Gypsy 类逆转座子逆转录酶序列。所分离的 19 条 Ty3-Gypsy 类逆转座子逆转录酶的核苷酸序列长度范围为 376~418 bp,其序列均富含 AT 碱基,AT 与 GC 的比值为 1.27~1.73,与 STERGIOU 等<sup>[21]</sup>的试验结果一致(表 1)。

2.2 序列的同源性及系统进化分析

*VuGRE1*~19 序列间同源性范围为 19.8%~97.8%(表 2),其在序列长度、碱基变化上所呈现出的多态性表明,笃斯越桔 Ty3-Gypsy 类逆转座子存在高度的异质性。为阐明笃斯越桔 Ty3-Gypsy 类逆转座子间的系统进化关系,利用 MEGA 6.0 软件对所分离的 19 条逆转录酶序列进行聚类分析(图 1)。系统发育进化树的结果显示,所分离的 19 条序列由 2 个基因家族组成,其中 Family I 有 3 条序列(*VuGRE17*~19),各成员间的同源性较低; Family II 有 16 条序列(*VuGRE1*~16),由 3 个 Subfamily 组成,各 Subfamily 成员间的同源性较高,亲源关系较近。

表 1 笃斯越桔逆转录酶序列  
*VuGRE1*~19 的基本信息

Table 1 Basic information of reverse  
transcriptases *VuGRE1*—19 of *V. uliginosum*

基因 Gene	A	T	G	C	总数 SUM	AT/GC
<i>VuGRE1</i>	122	134	87	75	418	1.58
<i>VuGRE2</i>	125	135	83	75	418	1.65
<i>VuGRE3</i>	101	126	94	74	395	1.35
<i>VuGRE4</i>	127	122	84	84	417	1.48
<i>VuGRE5</i>	121	128	85	83	417	1.48
<i>VuGRE6</i>	126	115	83	92	416	1.38
<i>VuGRE7</i>	119	127	87	85	418	1.43
<i>VuGRE8</i>	127	131	98	60	416	1.63
<i>VuGRE9</i>	126	137	97	58	418	1.70
<i>VuGRE10</i>	137	122	58	101	418	1.63
<i>VuGRE11</i>	123	135	96	61	415	1.64
<i>VuGRE12</i>	131	123	65	99	418	1.54
<i>VuGRE13</i>	135	89	84	76	384	1.40
<i>VuGRE14</i>	134	100	94	90	418	1.27
<i>VuGRE15</i>	129	109	95	85	418	1.32
<i>VuGRE16</i>	125	92	82	77	376	1.36
<i>VuGRE17</i>	122	119	84	89	414	1.39
<i>VuGRE18</i>	132	133	79	74	418	1.73
<i>VuGRE19</i>	115	133	85	85	418	1.46

表 2 笃斯越桔逆转录酶序列 *VuGRE1*~19 的同源性分析

Table 2 Homologous analysis of reverse transcriptases *VuGRE1*—19 of *V. uliginosum*

%

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
2	95.0																	
3	82.4	80.9																
4	70.3	68.8	76.3															
5	70.6	70.6	75.6	95.6														
6	81.9	81.2	81.7	81.2	82.4													
7	79.9	78.4	80.2	83.3	83.8	97.1												
8	49.6	47.4	51.1	48.1	47.4	50.4	49.6											
9	61.2	61.9	59.5	52.9	54.4	61.6	59.7	69.2										
10	64.7	64.0	60.3	55.8	55.9	63.8	62.6	72.9	89.9									
11	66.7	63.8	61.1	55.8	56.6	67.4	65.2	63.9	74.6	79.0								
12	66.2	64.0	61.8	55.1	55.1	66.7	64.7	65.4	76.3	81.3	97.8							
13	60.3	58.7	57.1	56.3	55.6	60.3	59.5	64.3	66.7	73.0	74.6	76.2						
14	64.7	63.3	61.8	52.9	52.9	63.0	61.9	60.2	69.1	75.5	78.3	79.1	89.7					
15	62.6	61.2	58.0	54.3	54.4	64.5	64.0	60.2	69.8	75.5	76.8	77.7	77.8	77.0				
16	41.0	41.8	35.2	32.8	32.8	43.4	41.8	32.0	45.9	48.4	47.5	47.5	43.4	56.6	45.1			
17	40.9	40.2	43.5	56.1	52.3	47.7	44.7	29.5	28.0	31.1	31.8	30.3	31.7	31.0	30.3	35.2		
18	39.7	39.7	33.6	32.1	30.5	42.0	40.5	19.8	27.5	30.5	29.0	29.8	25.4	29.8	30.5	32.0	30.5	
19	26.3	25.6	26.7	24.1	22.6	24.1	23.3	23.3	22.6	24.1	24.1	23.3	23.8	21.8	24.0	23.8	29.5	26.0

注:1~19. *VuGRE1*~19。

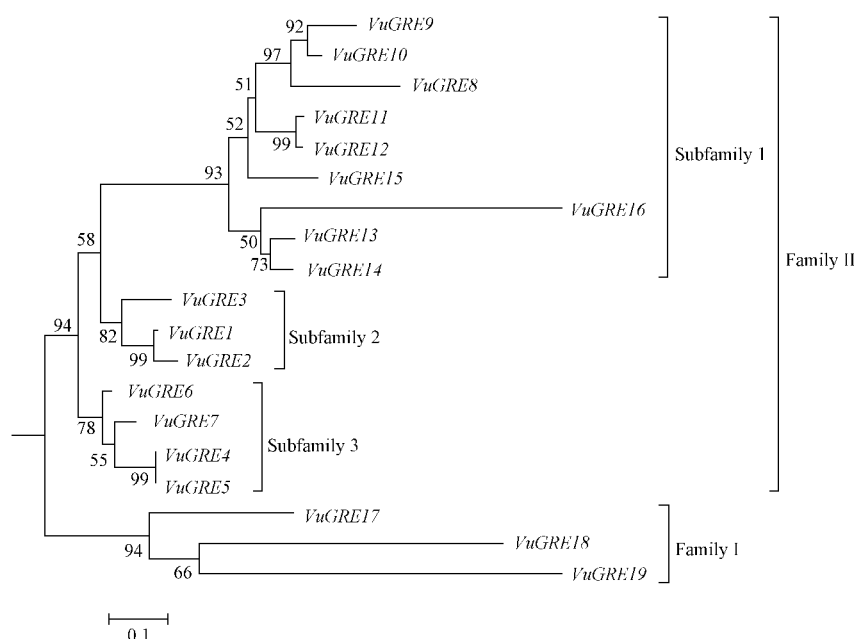


图1 笃斯越桔逆转录酶序列系统发育分析(重复数 1 000)

Fig. 1 Phylogenetic analysis of sequences of reverse transcriptases of *V. uliginosum* (1 000 replicates)

### 2.3 笃斯越桔逆转录酶 *VuGRE1~19* 的氨基酸序列分析

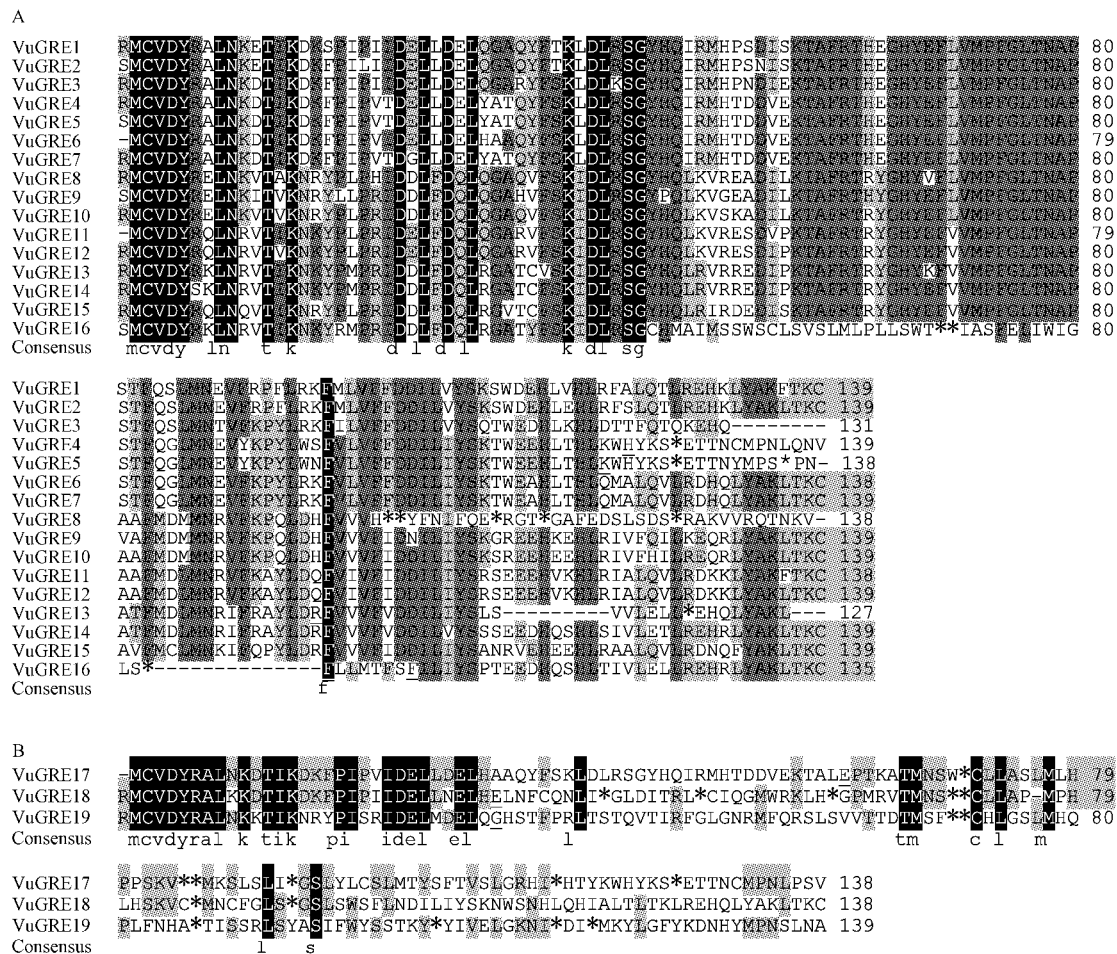
利用 DNAMAN 软件将 19 条逆转录酶序列翻译成氨基酸,利用 ClustalW 在线软件进行多重序列比对发现(图 2),Family II 的 3 条序列均发生了终止密码子突变 *VuGRE17*(第 70、85、86、94、116 和 126 个氨基酸处)、*VuGRE18*(第 41、49、60、70、71、86 和 94 个氨基酸处)、*VuGRE19*(第 70、71、87、107、117 和 120 个氨基酸处)和移框突变 *VuGRE17*(第 60 个氨基酸处)、*VuGRE18*(第 32 和 103 个氨基酸处)、*VuGRE19*(第 32 个氨基酸处);Family II 的 16 条序列中有 11 条序列未发生突变;有 5 条序列在翻译的过程中发生了终止密码子突变,分别是 *VuGRE4*(第 127 个氨基酸处)、*VuGRE5*(第 127 和 136 个氨基酸处)、*VuGRE8*(第 103、104、112、116 和 127 个氨基酸处)、*VuGRE13*(第 119 个氨基酸处)、*VuGRE16*(第 69、70 和 83 个氨基酸处);有 4 条序列存在移框突变,分别是 *VuGRE4*(第 123 个氨基酸处)、*VuGRE5*(第 121 个氨基酸处)、*VuGRE8*(第 101 个氨基酸处)、*VuGRE16*(第 46 和 91 个氨基酸处);另有 2 条序列存在缺失突变,分别是 *VuGRE13*(第 112 个氨基酸处)、

*VuGRE16*(第 83 个氨基酸处)。

将所克隆的 19 条笃斯越桔 Ty3-Gypsy 类逆转录酶子逆转录酶的氨基酸序列与其它植物进行多重比对,利用 MEGA 6.0 软件构建系统发育进化树(图 3)。系统进化分析结果显示,Family I 与其它植物相同类型逆转录酶子逆转录酶的同源性较低,遗传距离较远;Family II 与其它植物逆转录酶的同源性较高,特别是 Subfamily 3 家族成员与苹果(*Malus pumila*)、兴安落叶松(*Larix gmelinii*)、皱叶椒草(*Peperomia caperata*)、绿豆(*Vigna radiata*)、李子(*Prunus salicina*)和荸荠(*Eleocharis dulcis*)等植物逆转录酶的亲缘关系较近。

### 3 结论与讨论

在长期进化过程中逆转录酶子与植物之间相互竞争、相互协调,植物采取各种方式抑制逆转录酶子转座事件的发生,以防止造成致死突变;另一方面,逆转录酶子不断地进行转录与转座为基因组的多样性和遗传变异提供基础,促使植物进化以适应环境的变化<sup>[23-24]</sup>。该研究首次利用在植物 Ty3-Gypsy 逆转录酶子逆转录酶保守区设计的引物,通过兼并 PCR 技术分离了笃斯越桔的



注:A, Family II 逆转录酶氨基酸序列的多重比对, B, Family I 逆转录酶氨基酸序列的多重比对。黑色部分表示氨基酸序列相似性为 100%, 深灰色部分表示氨基酸序列相似性为 75%~100%, 浅灰色部分表示氨基酸序列相似性为 50%~75%, “\*”为终止密码子, “-”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。

Note: A. Amino acid sequence alignment of reverse transcriptases of family II. B. Amino acid sequence alignment of reverse transcriptases of family I. Black regions show highly conserved amino acid sequences with 100% homology, deep grey regions show the amino acids with 75%–100% homology, pale grey regions show the amino acids with 50%–75% homology, asterisks shows stop codes, gaps are introduced to maximize alignment, and amino acids with underline show the sites of shift translation.

图2 笃斯越桔逆转录酶氨基酸序列的多重比较

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of reverse transcriptases of *V. uliginosum*

Ty3-Gypsy 类逆转座子逆转录酶序列。所克隆的 19 条序列与已报道的其它物种的逆转座子逆转录酶具有较高的同源性(图 1、3), 说明 Ty3-Gypsy 类逆转座子广泛存在于笃斯越桔的基因组中, 对笃斯越桔的基因组大小和结构具有重大影响。序列分析发现, 该研究所得到的 19 条序列中, 有 8 条序列表现出较大的变异, 其中终止密码子突变及移框突变的频率较高(图 2), 因此推测,

终止密码子突变和移框突变是导致笃斯越桔逆转座子异质的主要原因<sup>[21-22]</sup>。Family I 家族的 3 个成员均发生了高频率的变异, 说明它们可能早已失去了活性, 在笃斯越桔的基因组中处于静止状态。Family II 家族的发生突变的成员数量较少, 其中 Subfamily 2 的 11 个成员未发生任何突变, 说明该基因家族的转录活性较高, 目前仍存在具有转座活性逆转座子的可能性较大。

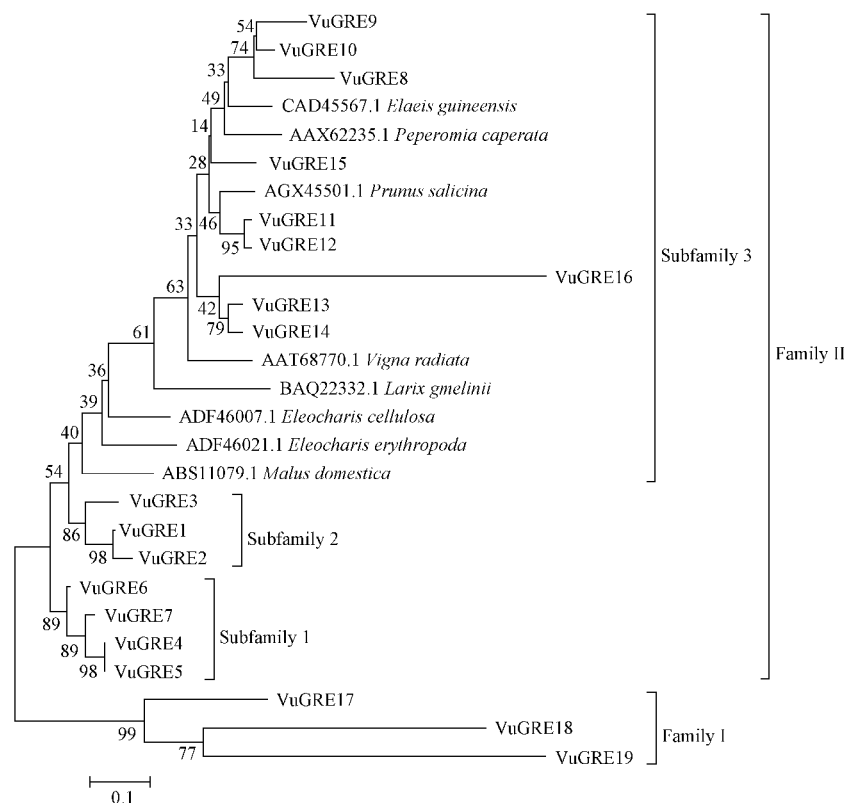


图3 根据笃斯越桔与其它植物 Ty3-Gypsy 类逆转录酶氨基酸序列构建的系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of reverse transcriptases from *V. uliginosum* and the other plants

作为基因组的主要成分, 逆转座子像其它基因一样既可以进行纵向传递, 也可借助媒介和载体进行横向传递<sup>[21,25]</sup>。对 19 条序列的同源性分析结果显示, 它们可被分为 2 个不同的基因家族, 这 2 个基因家族所含有成员数量不同, 说明这 2 个家族的转座过程存在差异。Family I 的成员数量较少, 且与其它植物逆转座子的同源性较低, 亲缘关系较远, 说明其起源可能较为古老, 转座活性较低, 极有可能为该物种所特有。Family II 含有的序列数量较多, 发生变异的频率较低; 说明其家族成员的转座活性较高, 而且转座复制是导致笃斯越桔遗传多样性的基础, 在笃斯越桔适应性进化过程中发挥了重要作用。Subfamily 3 家族成员与其它植物 Ty3-Gypsy 类逆转座子的同源性较高, 亲缘关系较近, 表明它们在不同物种中亦存在广泛的横向传递。

逆转座子通常以静止状态存在于植物体基因组中, 但在生物和非生物胁迫条件下有些逆转座子会被激活, 发生转座行为<sup>[25-28]</sup>。具有转座活性

的逆转座子在遗传育种、系统分类和遗传多样性分析等领域具有非常重要的应用。该研究为进一步分离具有活性的逆转座子基因, 研究其转录及和转座机制, 并利用它们进行笃斯越桔种质资源鉴定、遗传多样性分析及分子育种奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 马毓泉. 内蒙古植物志[M]. 内蒙古: 内蒙古人民出版社, 1992: 12.
- [2] 周繇. 长白山区野生珍稀濒危药用植物资源评价体系的初步研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(3): 599-605.
- [3] 周繇. 长白山区珍稀濒危植物优先保护序列的研究[J]. 林业科学研究, 2006, 19(6): 740-749.
- [4] 刘庆忠, 赵红军, 郑亚芹, 等. 高灌蓝莓微体繁殖技术研究初报[J]. 落叶果树, 2001(5): 1-3.
- [5] 刘庆忠, 赵红军. 高灌蓝莓的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(3): 253.
- [6] 刘世彪, 陈功锡. 武陵山地区野生果树种质资源及其开发利用[J]. 果树学报, 2002(19): 399-405.
- [7] 王辉, 王鹏云, 王蜀, 等. 我国蓝莓的发展现状及前景[J]. 农业现代化研究, 2008, 29(2): 389-392.

- [8] KUMAR A, BENNETZEN J L. Plant retrotransposons[J]. Annual Review of Genetics, 1999, 33(1): 479-532.
- [9] 路铁刚, 孙敬三. 植物逆转座子及其在基因功能和基因组分析中的应用[J]. 遗传, 1997, 19(4): 39-44.
- [10] DEVOS K M, BROWN J K M, BENNETZEN J L. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis* [J]. Genome Res, 2002(12): 1069-1075.
- [11] TANG Y, MA Y. Characteristics of plant retrotransposons and their application in functional genomics [J]. Plant Genetic Res, 2005(2): 221-225.
- [12] BENNETZEN J L. The contributions of retroelements to plant genome organization, function and evolution [J]. Trends Microbiol, 1996(4): 347-353.
- [13] KUMAR A. The adventures of the Ty1-copia group of retrotransposons in plants [J]. Trends Genet, 1996, 12(2): 41-43.
- [14] GRANDBASTIEN M A, SPIELMANN A, CABOCHE M. Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics [J]. Nature, 1989, 337(6205): 377-380.
- [15] VOYTAS D F, CUMMINGS M P, KONICZNY A, et al. Copia-like retrotransposon are ubiquitous among plants [J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89(15): 7124-7128.
- [16] SUONIEMI A, TANSKANEN J, SCHULMAN A H. Gypsy-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom [J]. Plant, 1998(13): 699-705.
- [17] CHANG S, PURYEAR T, CAIMEY I. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. Plant Mol Bio Rep, 1993(11): 113-116.
- [18] SCHULMAN A H. Molecular markers to assess genetic diversity [J]. Euphytica, 2007, 158: 313-321.
- [19] DOOLITTLE R F, FENG D F, JOHNSON M S, et al. Origins and evolutionary relationships of retroviruses [J]. Q Rev Biol, 1989, 64: 1-30.
- [20] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Mol Biol Evol, 1987(4): 406-425.
- [21] 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]. Theor Appl Genet, 2002, 104(6-7): 926-933.
- [22] APT K E, GROSSMAN A R. Characterization and transcript analysis of the major phycobiliprote in subunit genes from *Aglaothamnion neglectum* (Rhodophyta) [J]. Plant Mol Biol, 1993(21): 27-38.
- [23] SUONIEMI A, TANSKANEN J, SCHULMAN A H. Gypsy-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom [J]. Plant, 1998(13): 699-705.
- [24] STEINHAEUER D A, HOLLAND J J. Direct method for quantitation of extreme polymerase error frequencies at selected single base sites in viral RNA [J]. J Virol, 1986, 57(1): 219-228.
- [25] GRANDBASTIEN M A. The expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon is linked to the plant defense responses [J]. Genetica, 1997, 100(1-3): 241-252.
- [26] KUMAR A. The evolution of plant retroviruses: Moving to green pasture [J]. Trends Plant Sci, 1998(3): 371-374.
- [27] 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.
- [28] ROGERS S A, PAULS K P. Ty1-copia-like retrotransposons of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [J]. Genome, 2000, 43: 887-894.

## Diversity Analysis of Retrotransposon Reverse Transposases From Wild Blueberry *Vaccinium uliginosum* L. in Greater Khingan

ZHANG Wenbo, BAI Yang, YU Limin, FU Hongfeng, YAN Wei

(College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010019)

**Abstract:** For analyzing genetic diversity and empowering credible molecular marker of wild blueberry, *Vaccinium uliginosum* in Greater Khingan, reverse transposases of Ty3-Gypsy-like retrotransposons were isolated using homology based cloning techniques, and homology and phylogenetic relation were analyzed. The results revealed that the length of the nucleotide sequences of the 19 isolated sequences (named as *VuGRE1-19*) varied from 376 bp to 418 bp with homology ranged from 19.8%—97.8%, showing a high heterogeneity. Sequence analysis for the *VuGRE1-19* showed that the stop code mutation with a high frequency occurred in eight sequences, suggesting terminator mutation was the major reason resulted in heterogeneity of retrotransposons in *V. uliginosum*. Phylogenetic analysis

doi:10.11937/bfyy.20173056

## FTIR 法分析铵盐胁迫对蓝莓组培苗的影响

唐 颖, 安利佳

(大连理工大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024)

**摘 要:**以蓝莓组培苗为试材,采用傅里叶变换红外光谱法,研究了正常生长、铵盐胁迫、钙盐缓解3种条件的蓝莓组培苗代谢产物,以期为进一步探讨铵盐胁迫机理提供参考依据。结果表明:3种处理条件下蓝莓组培苗的红外图谱峰形、峰位大体相似,化学物质大体相同,均以蛋白质、脂类和碳水化合物以及少量无机元素为主。铵盐胁迫的植株与正常生长的植株相比,缺少了 $1\,318\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰,此峰可能与细胞膜脂或细胞壁的甲基化程度以及阳离子交换能力相关。与铵盐胁迫植株相比,加入氯化钙缓解的植株增加一条 $668\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰,此峰可能与钙离子吸收相关。硫酸铵胁迫导致蓝莓组培苗碳水化合物、脂类、蛋白质含量多呈下降趋势,蛋白质含量的下降趋势要大于多糖。钙离子的补充明显缓解铵盐胁迫,并提高了多糖和蛋白质的积累。

**关键词:**傅里叶变换红外光谱;铵盐胁迫;钙盐缓解;蓝莓组培苗

**中图分类号:**S 663.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2018)04-0048-06

蓝莓(*Vaccinium* sp.)属杜鹃花科(Ericaceae)越桔属(*Vaccinium*)多年生落叶灌木果树,其果

**第一作者简介:**唐颖(1974-),女,博士研究生,助理研究员,研究方向为生物化工。E-mail:596648778@qq.com.

**责任作者:**安利佳(1955-),男,博士,教授,研究方向为植物基因工程。E-mail:anlijia\_99@163.com.

**基金项目:**辽宁省农业科技创新团队资助项目(2014204007)。

**收稿日期:**2017-09-25

实具有极高的营养价值和突出的保健作用,被誉为“水果中的皇后”。蓝莓喜酸性土壤,硫酸铵作为酸性肥料是蓝莓上最常用的氮肥<sup>[1]</sup>。但硫酸铵施用过量,往往会对苗木造成胁迫,严重影响产品质量和产量<sup>[2]</sup>。有少量文献报道钙离子对逆境胁迫如铵盐胁迫有缓解作用<sup>[3]</sup>,但钙离子对于缓解蓝莓铵盐胁迫机理仍不清楚,很多工作还是处于假设基础之上<sup>[4]</sup>。进一步探究铵盐胁迫对蓝莓的影响,目前仍具有重大的现实意义。

showed that the 19 of sequences are consisted of two families, Family I contained only 3 sequences which showed low homology between each other, and far relationships with reverse transposases from the other plants, revealing ancient origin and low transcriptional activity. Family II contained 16 sequences, which consisted of 3 Subfamilies, the sequences of the Subfamilies show high similarity and close relationships between each other. The sequences of Subfamily 3 had a closer relationship with reverse transposases from the other plants, such as *Malus pumila*, *Larix gmelinii*, *Peperomia caperata*, *Vigna radiata*, *Prunus salicina* and *Eleocharis dulcis*, indicating extensive transfer of the subfamily members among different plant species. These results suggested that the Family II retrotransposons widely existed in genome and played an important role in adaptive genetic evolution of the *V. uliginosum*.

**Keywords:** *Vaccinium uliginosum*; reverse transposase; retrotransposon; genetic diversity