

植物逆转座子引物开发应用中的逆转座子序列分离方法

杜晓云^{1,2}, 张青林², 黄建民¹, 罗正荣^{2,*}

¹江西省农业科学院园艺研究所, 南昌 330200; ²华中农业大学园艺植物学教育部重点实验室, 武汉 430070

Methods for Isolating Retrotransposon Sequences Utilized for Development of Retrotransposon Primers in Plant

DU Xiao-Yun^{1,2}, ZHANG Qing-Lin², HUANG Jian-Min¹, LUO Zheng-Rong^{2,*}

¹Institute of Horticultural Sciences, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China; ²Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

摘要: 文章介绍了作为植物逆转座子引物开发前提序列的逆转座子序列获得的几种方法: (1)通过同源克隆法获取逆转座子的基因序列以设计逆转座子基因序列特异引物; (2)通过筛选文库、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、搜寻核酸数据库、大片段重叠群测序分离全长逆转座子序列以开发逆转座子长末端重复(long terminal repeat, LTR)引物; 以及利用(3)磁珠富集、(4)抑制 PCR 和(5) SiteFinding PCR 等方法直接获得逆转座子的 LTR 序列以开发逆转座子 LTR 引物。

关键词: 逆转座子; 引物; 开发; 植物; 分子标记

逆转座子以 RNA 为媒介, 通过复制模式进行转座, 是植物基因组的组成成分之一。逆转座子包括长末端重复(long terminal repeat, LTR)逆转座子和非长末端重复(non-long terminal repeat, non-LTR)逆转座子。前者又可分为 Ty1-copia 和 Ty3-gypsy 两类, 其结构中的 LTR 序列不编码蛋白质, 但包含

有对转座起作用的启动子和终止子以及调控序列(Casacuberta 和 Grandbastien 1993)。LTR 逆转座子中的基因序列主要有 3 个, 即 *gag* (group-specific antigen)、*pol* (polymerase) 和 *int* (integrase), 分别编码种属特异抗原、聚合酶和整合酶。Ty1-copia 类逆转座子结构见图 1。

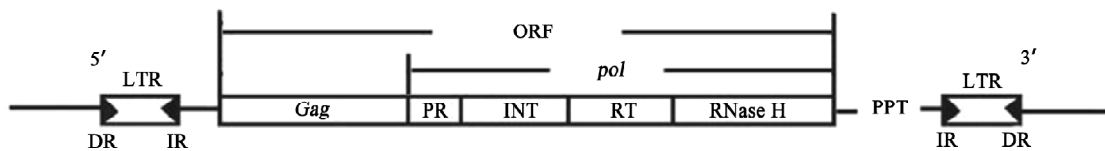


图 1 Ty1-copia 逆转座子的结构[参照 Kumar 和 Bennetzen (1999)并作修改]

图中符号意义如下。DR: direct repeat, 正向重复; IR: inverted terminal repeat, 末端倒转重复; LTR: long terminal repeat, 长末端重复序列; ORF: open reading frame, 开放读码框; Gag: group-specific antigen, 种属特异抗原; pol: polymerase, 聚合酶; PR: protease, 蛋白酶; INT: integrase, 整合酶; RT: reverse transcriptase, 反转录酶; RNase H: ribonuclease H, 核糖核酸酶 H; PPT: polypurine tract, 多聚腺苷酸链。

逆转座子以分散的高度异质的重复序列群体遍布于整个植物基因组, 通常处于静止状态, 但生物(如真菌提取物, 病毒、细菌或真菌等病原体接种等)及非生物因素(如原生质体分离、机械创伤、冷害、组织培养、水杨酸或茉莉酮酸诱导等)的胁迫可激活其转录(Kumar 和 Bennetzen 1999)。转录后的逆转座子可插入基因附近、基因编码区或内含子区, 通过增加或消除基因的转录、改变基因转录的时空表达模式或其相应蛋白

质的结构等产生突变(Henikoff 和 Comai 1998); 也可诱发基因组发生同源重组或非法重组(illegitimate recombination), 导致基因组序列发生缺失、扩增、

收稿 2009-11-27 修定 2009-12-28

资助 国家自然科学基金(30871686)、华中农业大学科研启动基金(20070504011)和江西省农业科学院创新基金博士启动项目(2009 博-8)。

* 通讯作者(E-mail: luozhr@mail.hzau.edu.cn; Tel: 027-87282677)。

倒位、移位、断裂等重排,促进基因组的流动,产生丰富的遗传变异(Devos等2002)。因此,逆转座子是影响植物基因组结构、组成、大小及进化的主要因素之一(Kumar和Bennetzen1999)。近年来,作为一种有效的遗传分析工具和理想的遗传标记,逆转座子日益受到人们的重视,一系列逆转座子分子标记已被成功开发,在遗传多样性检测、种质鉴定及系谱分析、遗传连锁图谱构建、基因定位与标记辅助育种等领域中得到广泛应用(Schulman2007)。逆转座子分子标记较传统的分子标记具有诸多优势,如检测的多态性信息含量明显高于扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLR)和简单序列重复(simple sequence repeat, SSR);特异性及重复性优于随机扩增多态性DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)和简单序列重复区间扩增多态性(inter-simple sequence repeat, ISSR);灵敏性强于传统分子标记,尤其适用于遗传背景高度同源的基因型的鉴别。但逆转座子分子标记分析中引物的获得需要预先获知核酸序列,从特定的物种中分离逆转座子全长或部分片段的难度较高、花费较大,从而限制其广泛应用。国内外对用于植物逆转座子引物开发的逆转座子序列的分离方法的综述鲜有报道。我们根据有关文献资料及其最新研究进展进行扼要总结。

需要分离的逆转座子序列的种类取决于将要开发的逆转座子引物类别。迄今报道的逆转座子引物主要有两类,一类为逆转座子基因序列引物,此类引物基于逆转座子序列的几个保守结构基因,如 *gag*、*rt* 和 *int* 等序列设计。另一类为 LTR 引物或 PPT 引物,基于逆转座子长末端重复或其它非编码序列设计。

1 同源克隆法对逆转座子基因序列的分离

检索核酸数据库中已公布的同一类群的逆转座子序列,进行多序列比对并提炼各结构基因的保守结构域,然后针对保守结构域设计简并引物,采用 PCR 扩增获得特异目的片段,即为逆转座子的基因序列。此方法操作流程简单、花费较少,对待研究物种特定的某个逆转座子序列信息的依赖性较弱,因此推广和应用比较方便,已用于多个物种中逆转座子基因序列的分离以获得逆转座子引物。如, Bretó 等(2001)用此方法从‘克里曼丁桔’和甜

橙中分离 Ty1-*copia* 类逆转座子的 4 个 *rt* 基因序列获得逆转座子引物; Bernet 和 Asíns (2003)从‘克里曼丁桔’中应用该方法分离 *int* 和 *gag* 基因序列,共开发了 8 对逆转座子引物; Guo 等(2006)利用逆转座子间扩增多态性(inter-retrotransposon amplified polymorphism, IRAP)和逆转座子-微卫星扩增多态性(retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism, REMAP)进行柿种质遗传关系分析,使用的逆转座子引物来自采用该方法从柿品种‘西条’中分离的 Ty1-*copia* 类逆转座子的 *rt* 基因序列; Díez 等(2003)在担子菌 *Laccaria bicolor* 上也用此方法分离了 *rt* 基因序列,然后开发引物;此外,在豌豆 (Vershinin 和 Ellis 1999)、香蕉(Nair 等 2005)等物种中也有相关的应用报道。

2 逆转座子全长序列的分离

2.1 基于杂交筛选基因组或 cDNA 文库 探针主要有两类:一类依据逆转座子结构中相对保守的序列设计探针,如,引物结合位点(primer binding site, PBS)、酶基因或部分 LTR 序列等。水稻逆转座子 *Tos1-3* (Hirochika 等 1992)和 *Tos17* (Hirochika 等 1996)、燕麦 *OARE-1* (Kimura 等 2001)、拟南芥 *AtRE1-2* (Kuwahara 等 2000)、大豆 *SIRE-1* (Laten 等 1998)、大麦 *BARE-1* (Manninen 和 Schulman 1993)及木豆 *Panzee* (Lall 等 2002)等逆转座子全长的分离采用类似方法。另一类探针源于感兴趣的基因序列。通过逆转座子插入导致的表型变异,找出发生突变的基因,再制备探针筛选文库。如烟草 *Tnt1* (Grandbastien 等 1989)、玉米 *Bs1* (Johns 等 1985)、葡萄 *Vine-1* (Verriès 等 2000)和 *Gret-1* (Kobayashi 等 2004)、苹果 *dem1* (Yao 等 2001)及水稻 *Hopscotch* (White 等 1994)等逆转座子全长的分离。

2.2 基于 PCR 方法 Pelsy 和 Merdinoglu (2002)用特异于逆转座子逆转录酶基因的一对简并引物扩增基因组 DNA,得到大小约 280 bp 的特异的片段,之后又通过多步 PCR 反应的染色体步移,获得葡萄 *Tvv1* 全长逆转座子。Tahara 等(2004)用特异序列扩增多态性(specific-sequence amplified polymorphism, SSAP)分子标记,结合 3' RACE 及特异引物的 PCR 扩增获得甘薯逆转座子 *Rtsp-1*。Garber 等(1999)用特异于逆转座子逆酶基因的引物进行 RT-PCR,

然后用3' RACE获得大豆*Tpv2*逆转座子长约1.4 kb的3'端,再以该片段设计探针筛选基因组杂交文库,得到全长*Tpv2*逆转座子。此外,克隆某些感兴趣基因时,也可能偶然获得全长逆转座子或其部分序列,再通过进一步筛选文库后得到全长。如,矮牵牛逆转座子*rTph1* (Matsubara等2005)和水稻逆转座子*RIRE-3* (Kumekawa等1999)的获得最初都源于对细胞色素P450基因的扩增。

2.3 基于核酸数据库的计算机辅助检索 生物信息的剧烈膨胀形成了巨量的生物信息库,利用现成的数据资源是一种经济快速的策略。White等(1994)用从玉米*wx-k*突变体中分离的*Hopscotch*逆转座子序列和其它植物中的逆转座子,检索DNA数据库,在正常植物基因的5'和3'区域发现20多种逆转座子序列。Hirochika(1997)在水稻表达序列(expressed sequence tags, EST)标签中也发现2个逆转座子序列。Gao等(2004)以McCarthy和McDonald(2003)搜索到的38个家族为query sequence,检索核酸数据库,共鉴定1 219个逆转座子序列,其中217个为全长逆转座子。除此之外,专业、快速、精确的对数据库中LTR型逆转座子序列直接检索的软件,如CENSOR (Jurka等1996)和LTR_STRUC (McCarthy等2003)相继得到开发,进一步方便了数据库中逆转座子的筛选。McCarthy和McDonald(2003)用LTR_STRUC软件,从GenBank和Monsanto水稻核酸数据库共搜索到59个水稻LTR逆转座子家族。Acquadro等(2005)用CENSOR软件筛选获得1个含有逆转座子序列的克隆。近年来,新开发的类似软件还有LTR_par (Kalyanaraman和Aluru 2006)、LTR_Rho (Rho等2007)、LTR_FINDER (Xu和Wang 2007)和LTR_harvest (Ellinghaus等2008)。

2.4 基于大片段重叠群(contig)的测序分析 序列资料表明,逆转座子基因组插入位点具有偏好性,集中于基因临近区或富基因区的侧翼(Sandhu和Gill 2002)。因此,从涵盖某些基因的大片段重叠群的测序分析中,挖掘逆转座子的序列信息,也是获得逆转座子引物的一种便捷的方法。SanMiguel等(1996)测得玉米约280 kb,并包含*Adh1-F*和*u22*两个基因的克隆,从中分离到10个逆转座子家族。Shirasu等(2000)在大麦66 kb的重叠群中鉴定出4

个逆转座子家族以及*BARE-1*家族的几个单元。Tarchini等(2000)在位于水稻11号染色体的乙醇脱氢酶基因*Adh1*和*Adh2*位点周围340 kb长的重叠群中发现7个逆转座子。Yang等(2003)从柑橘速衰病(*Citrus tristeza virus*, CTV)抗性基因*Ctv*所在的长282 kb的BAC克隆中测序,鉴定出8个逆转座子。近年来,类似的报道还很多。

3 逆转座子LTR序列的直接分离

3.1 磁珠富集法 通过获得全长逆转座子序列开发逆转座子LTR引物极为方便,然而分子生物学在不同物种间发展的不平衡决定了上述分离全长的方法在很多物种上难以真正得到应用,尤其对公共核酸数据库中已知基因组序列信息贫乏的物种。鉴于此,Pearce等(1999)开发出一种快速分离Ty1-*copia*类逆转座子LTR序列的方法——磁珠富集法。此方法在特异引物一端预先增加了便于选择产物的生物素标记,用链霉亲和素包被的磁珠捕捉分离带有生物素标记的目的产物。详细流程见图2。具体步骤为:(1)提取基因组总DNA;(2)用限制性内切酶部分酶切基因组DNA;(3)接头连接;(4)生物素酰化标记特异于RNase H酶(紧邻5'-LTR上游的)

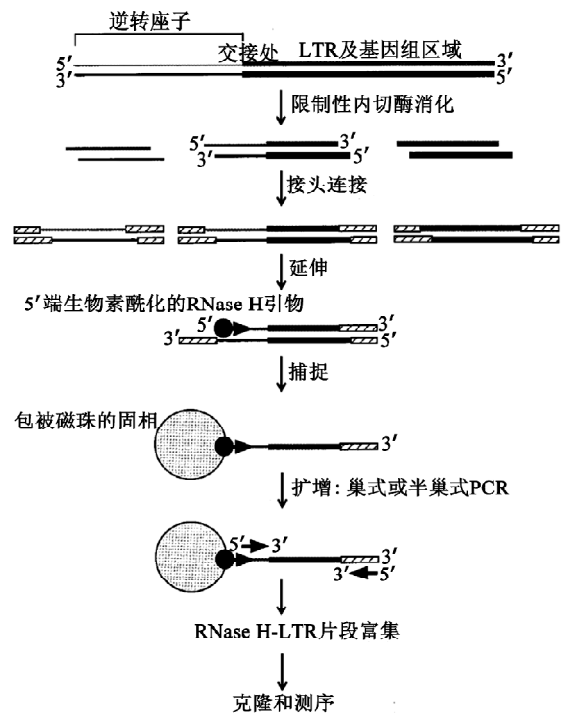


图2 磁珠富集法分离逆转座子LTR序列
[参照 Hui 等(1998)并作修改]

简并引物; (5)巢式 PCR 扩增; (6)扩增产物通过以链亲合素包被的磁珠为填充物的磁力装置, 在磁珠表面的链酶亲和素与标记于RNase H酶基因序列上的生物素之间形成稳定的共价结合; (7)洗涤; (8)产物回收、纯化、克隆; (9)测序并序列分析; (10)设计引物。此方法经济、高效, 已用于豌豆、松属、挪威云杉(Pearce 等 1999)、甘薯(Berenyi 等 2002)、菜豆(Galindo 等 2004)、腰果(Syed 等 2005)和龙舌兰(Bousios 等 2007)等植物的逆转座子引物的开发。

3.2 抑制 PCR 法 Du 等(2009)用抑制 PCR 方法从柿属植物中成功获得 16 条多态性高的逆转座子引物。其基本操作步骤为: (1)提取基因组总 DNA; (2)平端限制性内切酶充分酶切基因组 DNA; (3)接头连接; (4)使用RNase H酶简并引物进行巢式PCR 扩增; (5)产物回收、纯化、克隆、测序; (6)逆转座子引物设计。详细流程见图 3。此方法用接头序列的特殊性达到目的序列的特异性扩增。采用的接头是一对互补且不等长的寡核苷酸短链, 3' 端均未磷酸化, 与经平端内切酶酶切的 DNA 片段连接后, 连有短链接头的 3' 端 DNA 在聚合酶作用下以长链为模板自发补齐成平端。此时, 每一个连有双链接头的 DNA 片段就有了互补的、可以自身进

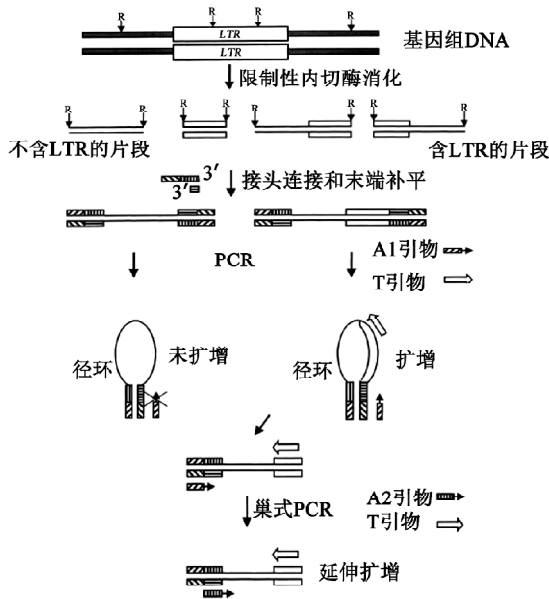


图3 抑制 PCR 方法分离逆转座子 LTR 序列

[参照 Lavrentieva 等(1999)并作修改]

R: 限制性内切酶作用位点。

行链内退火形成茎环结构的反向长末端重复序列。按接头 5' 侧部分约 20 bp 寡聚核苷酸序列设计引物, PCR 扩增退火时, 由于长颠倒末端重复序列的自身退火温度高于引物退火温度, 故前者退火早于后者, 前者退火形成平锅状结构, 屏蔽引物结合位点, 抑制了 PCR 扩增, 而使后者目的序列达到有效富集 (Siebert 等 1995)。抑制 PCR 方法与磁珠富集法思路相同, 但无需特殊的磁力装置和引物酰化处理, 而且免去磁珠富集法必须的多次纯化、杂交和洗脱等步骤, 对中间产物的纯度要求不高, 因此, 相对而言是一种更为便捷、经济的分离方法。此方法用于分离逆转座子 LTR 序列进行逆转座子引物开发, 在其它物种中尚未见报道。

3.3 SiteFinding PCR 法 Zhao 等(2007)用改进后的 SiteFinding PCR 方法从苹果基因组中成功分离逆转座子 LTR 序列, 为进一步开发苹果逆转座子引物提供了前提。SiteFinding PCR 的分离思路与抑制 PCR 类似, 也是通过先基因组酶切后, 连接一段特殊的接头序列, 然后利用基因特异引物和接头引物进行巢式 PCR, 最后通过平锅状径环结构的形成, 抑制非目的片段扩增, 从而使目的片段富集来开发逆转座子引物。该方法与抑制 PCR 最大的不同在于接头序列的设计和初始 PCR 的启动, 其采用了 3' 末端携有 4~6 个碱基的寡核苷酸链在低温下启动 PCR 反应。具体原理和步骤可参阅 Tan 等(2005)和 Zhao 等(2007)的论文。

4 结语

采用同源克隆法分离逆转座子基因序列, 简便易行, 花费较少, 但基于此类序列开发的逆转座子引物可应用的标记种类有限(目前多用于 IRAP 和 REMAP 分析); 逆转座子全长或 LTR 序列直接分离方法步骤繁琐、成本较高, 更多的依靠文库杂交和数据库, 推广较难。但基于此类序列开发的 LTR 引物可供采用的逆转座子分子标记种类选择自由度高, 多态性高, 尤其基于 LTR 引物的 SSAP 分子标记可以获得逆转座子插入位点旁侧宿主基因组的序列信息, 便于追溯由逆转座子所引发的突变机理。故 LTR 引物可能是今后逆转座子引物发展的主流类型。近年来, 应用磁珠富集法、抑制 PCR 及 SiteFinding PCR 等方法快速获得逆转座子 LTR 序列, 方便了 LTR 引物的开发。特别是后两种方法

因为直接瞄准逆转座子 LTR 区, 针对性强, 免去杂交、洗脱、筛选等步骤, 流程简化, 且效率较高, 有望在获得植物 LTR 逆转座子引物开发所需要的逆转座子序列的分离中得到广泛应用。

参考文献

- Acquadro A, Portis E, Moglia A, Comino C, Lanteri S (2005). Retrotransposon diversity in artichoke and cardoon (*Cynara Cardunculus* L.) as revealed by S-SAP profiling. In: The Role of Biotechnology. Villa Gualino, Turin, Italy. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome: 143~144
- Berenyi M, Gichuki ST, Schmidt J, Burg K (2002). Ty1-*copia* retrotransposon-based S-SAP (sequence-specific amplified polymorphism) for genetic analysis of sweetpotato. *Theor Appl Genet*, 105: 862~869
- Bernet GP, Asins MJ (2003). Identification and genomic distribution of gypsy like retrotransposons in *Citrus* and *Poncirus*. *Theor Appl Genet*, 108: 121~130
- Bousios A, Saldana-Oyarzabal I, Valenzuela-Zapata AG, Wood C, Pearce SR (2007). Isolation and characterization of Ty1-*copia* retrotransposon sequences in the blue agave (*Agave tequilana* Weber var. *azul*) and their development as SSAP markers for phylogenetic analysis. *Plant Sci*, 172: 291~298
- Bretó MP, Ruiz C, Pina JA, Asins MJ (2001). The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Mol Phylogen Evol*, 21: 285~293
- Casacuberta JM, Grandbastien MA (1993). Characterisation of LTR sequences involved in the protoplast specific expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon. *Nucleic Acids Res*, 21: 2087~2093
- Devos KM, Brown JKM, Bennetzen JL (2002). Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis*. *Genome Res*, 12: 1075~1069
- Diez J, Béguiristain T, Le Tacon F, Casacuberta JM, Tagu D (2003). Identification of Ty1-*copia* retrotransposons in three ectomycorrhizal basidiomycetes: evolutionary relationships and use as molecular markers. *Curr Genet*, 43: 34~44
- Du X, Zhang Q, Luo Z (2009). Development of retrotransposon primers and their utilization for germplasm identification in *Diospyros* spp. (Ebenaceae). *Tree Genet Genomes*, 5: 235~245
- Ellinghaus D, Kurtz S, Willhoeft U (2008). *LTRharvest*, an efficient and flexible software for *de novo* detection of LTR retrotransposons. *BMC Bioinformatics*, 9: 18
- Galindo LM, Gaitán-Solís E, Baccam P, Tohme J (2004). Isolation and characterization of RNase LTR sequences of Ty1-*copia* retrotransposons in common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Genome*, 47: 84~95
- Gao L, McCarthy EM, Ganko EW, McDonald JF (2004). Evolutionary history of *Oryza sativa* LTR retrotransposons: a preliminary survey of the rice genome sequences. *BMC Genomics*, 5: 18
- Garber K, Bilic I, Pusch O, Tohme J, Bachmair A, Schweizer D, Jantsch V (1999). The Tpv2 family of retrotransposons of *Phaseolus vulgaris*: structure, integration characteristics, and use for genotype classification. *Plant Mol Biol*, 39: 797~807
- Grandbastien MA, Spielmann A, Caboche M (1989). Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature*, 337: 376~380
- Guo D, Zhang H, Luo Z (2006). Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis. *Plant Sci*, 170: 528~533
- Henikoff S, Comai L (1998). *Trans*-sensing effects: the ups and downs of being together. *Cell*, 93: 329~332
- Hirochika H (1997). Retrotransposons of rice: their regulation and use for genome analysis. *Plant Mol Biol*, 35: 231~240
- Hirochika H, Fukuchi A, Kikuchi F (1992). Retrotransposon families in rice. *Mol Gen Genet*, 233: 209~216
- Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, Tsugawa H, Kanda M (1996). Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 7783~7788
- Hui EKW, Wang PC, Lo SJ (1998). Strategies for cloning unknown cellular flanking DNA sequences from foreign integrants. *Cell Mol Life Sci*, 54: 1403~1411
- Johns MA, Mottinger J, Freeling M (1985). A low copy number, *copia*-like transposon in maize. *EMBO J*, 4: 1093~1102
- Jurka J, Klonowski P, Dagman V, Pelton P (1996). CENSOR— a program for identification and elimination of repetitive elements from DNA sequences. *Computers Chem*, 20: 119~121
- Kalyanaraman A, Aluru S (2006). Efficient algorithms and software for detection of full-length LTR retrotransposons. *J Bioinform Comput Biol*, 4: 197~216
- Kimura Y, Tosa Y, Shimada S, Sogo R, Kusaba M, Sunaga T, Betsuyaku S, Eto Y, Nakayashiki H, Mayama S (2001). *OARE-1*, a Ty1-*copia* retrotransposon in oat activated by abiotic and biotic stresses. *Plant Cell Physiol*, 42: 1345~1354
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H (2004). Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science*, 304: 982
- Kumar A, Bennetzen JL (1999). Plant retrotransposons. *Ann Rev Genet*, 33: 479~532
- Kumekawa N, Ohtsubo H, Horiuchi T, Ohtsubo E (1999). Identification and characterization of novel retrotransposons of the *gypsy* type in rice. *Mol Gen Genet*, 260: 593~602
- Kuwahara A, Kato A, Komeda Y (2000). Isolation and characterization of *copia*-type retrotransposons in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 244: 127~136
- Lall IPS, Maneesha, Upadhyaya KC (2002). *Panzee*, a *copia*-like retrotransposon from the grain legume, pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Mol Genet Genomics*, 267: 271~280
- Laten HM, Majumdar A, Gaucher EA (1998). *SIRE-1*, a *copia*/Ty1-like retroelement from soybean, encodes a retroviral envelope-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 6897~6902
- Lavrentieva I, Broude NE, Lebedev Y, Gottesman II, Lukyanov SA, Smith CL, Sverdlov ED (1999). High polymorphism level

- of genomic sequences flanking insertion sites of human endogenous retroviral long terminal repeats. *FEBS Lett*, 443: 341~347
- Manninen I, Schulman AH (1993). *BARE-1*, a *copia*-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol Biol*, 22: 829~846
- Matsubara K, Kodama H, Kokubun H, Watanabe H, Ando T (2005). Two novel transposable elements in a cytochrome P450 gene govern anthocyanin biosynthesis of commercial petunias. *Gene*, 358: 121~126
- McCarthy EM, McDonald JF (2003). LTR_STRUC: a novel search and identification program for LTR retrotransposons. *Bioinformatics*, 19: 362~367
- Nair AS, Teo CH, Schwarzacher T, Harrison PH (2005). Genome classification of banana cultivars from South India using IRAP markers. *Euphytica*, 144: 285~290
- Pearce SR, Stuart-Rogers C, Knox MR, Kumar A, Ellis THN, Flavell AJ (1999). Rapid isolation of plant Ty1-*copia* group retrotransposon LTR sequences for molecular marker studies. *Plant J*, 19: 711~717
- Pelsy F, Merdinoglu D (2002). Complete sequence of *Tvv1*, a family of Ty1 *copia*-like retrotransposons of *Vitis vinifera* L., reconstituted by chromosome walking. *Theor Appl Genet*, 105: 614~621
- Rho M, Choi JH, Kim S, Lynch M, Tang H (2007). *De novo* identification of LTR retrotransposons in eukaryotic genomes. *BMC Genomics*, 8: 90
- Sandhu D, Gill KS (2002). Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes. *Plant Physiol*, 128: 803~811
- SanMiguel P, Tikhonov A, Jin Y-K, Motchoulskaia N, Zakharov D, Melake-Berhan A, Springer PS, Edwards KJ, Lee M, Avramova Z, Bennetzen JL (1996). Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science*, 274: 765~768
- Schulman AH (2007). Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica*, 158: 313~321
- Shirasu K, Schulman AH, Lahaye T, Schulze-Lefert P (2000). A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. *Genome Res*, 10: 908~915
- Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res*, 23: 1087~1088
- Syed NH, Sureshsundar S, Wilkinson MJ, Bhau BS, Cavalcanti JJV, Flavell AJ (2005). Ty1-*copia* retrotransposon-based SSAP marker development in cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Theor Appl Genet*, 110: 1195~1202
- Tahara M, Aoki T, Suzuka S, Yamashita H, Tanaka M, Matsunaga S, Kokumai S (2004). Isolation of an active element from a high-copy-number family of retrotransposons in the sweetpotato genome. *Mol Gen Genomics*, 272: 116~127
- Tan G, Gao Y, Shi M, Zhang X, He S, Chen Z, An C (2005). SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucleic Acids Res*, 33: e122
- Tarchini R, Biddle P, Wineland R, Tingey S, Rafalski A (2000). The complete sequence of 340 kb of DNA around the rice *adh1-adh2* region reveals interrupted colinearity with maize chromosome 4. *Plant Cell*, 12: 381~391
- Verriès C, Bès C, This P, Tesnière C (2000). Cloning and characterization of *Vine-1*, a LTR-retrotransposon-like element in *Vitis vinifera* L., and other *Vitis* species. *Genome*, 43: 366~376
- Vershinin AV, Ellis THN (1999). Heterogeneity of the internal structure of *PDR1*, a family of Ty1/*copia*-like retrotransposons in pea. *Mol Gen Genet*, 262: 703~713
- White SE, Habera LF, Wessler SR (1994). Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: a role for *copia*-like elements in the evolution of gene structure and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 11792~11796
- Xu Z, Wang H (2007). LTR_FINDER: an efficient tool for the prediction of full-length LTR retrotransposons. *Nucleic Acids Res*, 35: W265~W268
- Yang ZN, Ye XR, Molina J, Roose ML, Mirkov TE (2003). Sequence analysis of a 282-kilobase region surrounding the citrus tristeza virus resistance gene (*Ctv*) locus in *Poncirus trifoliata* L.Raf.. *Plant Physiol*, 131: 482~492
- Yao JL, Dong YH, Morris BAM (2001). Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 1306~1311
- Zhao G, Zhang Z, Sun H, Li H, Dai H (2007). Isolation of Ty1-*copia*-like retrotransposon sequences from the apple genome by chromosome walking based on modified sitefinding-polymerase chain reaction. *Acta Biochim Biophys Sin*, 39: 675~683