

· 技术方法 ·

## 利用iPBS技术克隆牡丹反转录转座子LTR序列

张曦<sup>1</sup>, 侯小改<sup>1,3\*</sup>, 郭大龙<sup>2,3\*</sup>, 宋程威<sup>1</sup>, 段亚宾<sup>1</sup>

<sup>1</sup>河南科技大学农学院, 洛阳 471003; <sup>2</sup>河南科技大学林学院, 洛阳 471003

<sup>3</sup>河南省高校牡丹工程技术中心, 洛阳 471003

**摘要** 利用iPBS方法从西北牡丹(*Paeonia suffruticosa*)品种红绣球和中原牡丹品种洛阳红中扩增出相应片段, 经回收、克隆及测序, 获得了12条来自牡丹LTR类反转录转座子的LTR序列, 并用相关生物信息学软件对序列进行分析。结果表明, 这些核苷酸序列表现出较高的异质性, 主要表现为缺失突变, 序列长度变化范围为313–894 bp, 同源性从31.1%–65.8%不等。将其氨基酸序列与已登录的不同植物LTR类反转录转座子LTR氨基酸序列进行聚类分析, 结果显示与某些植物相应序列具有较高的同源性, 表明可能存在LTR类反转录转座子的横向传递关系。根据克隆出的LTR序列设计SSAP引物, 对牡丹29个品种进行了SSAP分子标记分析, 结果显示具丰富的多态性。实验验证了用iPBS技术分离牡丹LTR序列的适用性, 并为牡丹种质资源评价提供了新的技术手段。

**关键词** iPBS, LTR类反转录转座子, 序列分析, SSAP分子标记

张曦, 侯小改, 郭大龙, 宋程威, 段亚宾 (2014). 利用iPBS技术克隆牡丹反转录转座子LTR序列. 植物学报 49, 322–330.

反转录转座子是存在于真核生物中最为广泛的转录因子, 尤其在植物基因组中占有极高的比例(王石平和张启发, 1998; 徐玲等, 2012)。自1984年被Shepherd等(1984)发现后, 反转录转座子已在大部分植物中被发现。因其独特的性质, 反转录转座子现已成为植物基因功能分析和种质资源评价的有效研究工具(郭玉双等, 2012)。

反转录转座子分为LTR(long terminal repeat)类反转录转座子和非LTR类反转录转座子。LTR类反转录转座子又分为Ty1-*cop*和Ty3-*gypsy*两类(侯小改等, 2012)。LTR类反转录转座子是自然界中分布最为广泛的一类反转录转座子, 由于每经过一次复制-粘贴模式的转座, 都会造成基因组序列的增加, 因此LTR类反转录转座子往往是基因组重复区域的主要成分(王子成等, 2003)。LTR序列是存在于LTR类反转录转座子两端的末端反向重复, 通常以反向重复序列5'-TG-3'和5'-CA-3'结束, 其不编码任何已知的蛋白, 但含有对转录起作用的启动子和终止子以及调控序列(Wei et al., 2012)。分子标记是植物育种和生物多样性分析的普遍方法, 可显示植物个体或种群间基因

组中某种差异的特异性DNA片段(Sarwat et al., 2012)。要对某植物进行基于LTR类反转录转座子的分子标记研究, 必须事先知道其反转录转座子LTR序列。随着基于LTR类反转录转座子分子标记研究的日趋增多, LTR序列的克隆对植物遗传多样性、遗传育种、物种亲缘关系和基因克隆等方面的研究具有重要的理论和实际意义(邢少辰和朱立煌, 2000; 肖卫民等, 2004; Schulman et al., 2004)。

iPBS技术是一种可以从植物基因组中分离LTR类反转录转座子LTR序列的有效方法, 实验成本低廉且操作较为简单(Kalendar et al., 2010)。使用该方法时首先从公共数据库(NCBI、TREP等)中收集注释过的LTR类反转录转座子; 再利用FastPCR软件进行排列比对, 得到PBS序列; 最后根据每一组比对的PBS保守区域设计引物, 并利用设计好的PBS引物对动植物基因组DNA进行扩增, 从而达到特异性扩增目的片段LTR序列的富集。与早期方法不同, iPBS技术不仅适用于内源性和非内源性反转录病毒, 而且也适合*Copia*和*Gypsy*类LTR类反转录转座子。

本研究利用iPBS方法从牡丹(*Paeonia suffruti-*

收稿日期: 2013-04-01; 接受日期: 2013-07-18

基金项目: 国家自然科学基金(No.31070620)、河南省高校科技创新人才支持计划(No.13HASTIT004)和河南省重点科技攻关项目(No.132102110029)

\* 通讯作者。E-mail: hkdhxg@126.com; guodalong@haust.edu.cn

*cosa*)基因组DNA中克隆得到LTR序列,并对获得的序列进行分析。根据克隆出的LTR序列设计引物,利用SSAP分子标记技术对29个牡丹品种进行分析,以验证iPBS技术用于分离牡丹LTR的有效性。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

实验材料牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andrew.)洛阳红和红绣球等品种均取自中国洛阳国家牡丹基因库。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA提取及LTR序列扩增

牡丹基因组DNA的提取方法参照改良的CTAB法(Zhao et al., 2012)。iPBS技术分离牡丹LTR的2395号引物为Kalendar等(2010)设计。引物序列见表1。

PCR反应体系为: DNA 50 ng, 1×PCR Buffer (TaKaRa), 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>Mg<sup>2+</sup>, 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>dNTPs, 0.6 μmol·L<sup>-1</sup>引物(2395号iPBS引物), 1.0 U *Taq*酶, 灭菌双蒸水补足至25 μL。PCR扩增程序为: 95°C3分钟; 95°C15秒, 52.8°C1分钟, 68°C1分钟, 30个循环; 最后72°C5分钟。

#### 1.2.2 PCR产物纯化、克隆及转化

用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。PCR扩增产物直接使用pMD18-T载体试剂盒进行克隆,转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,涂板并摇菌培养后,挑取经PCR鉴定为阳性克隆的菌落送北京三博远志生物

技术有限公司测序。获得的LTR序列均使用DNASTar和DNAMAN等软件进行分析。

#### 1.2.3 SSAP分子标记

反转录转座子引物是根据本实验通过iPBS技术分离出的PALTR12序列自主开发设计。引物序列见表1。

SSAP分子标记技术的具体操作程序分为5步。

(1) 酶切: 采用*Eco*RI和*Mse*I双酶切。20 μL酶切反应液的成分为: 50 ng·μL<sup>-1</sup>基因组DNA 5–10 μL, 稀释10倍的NEB Buffer4 2 μL, 稀释100倍的BSA 0.2 μL, *Mse*I酶0.5 μL, *Eco*RI酶0.5 μL, 余量为双蒸水。37°C条件下水浴1–3小时,之后放入温度为4°C的冰箱内备用。(2) 连接: 采用*Eco*RI和*Mse*I的接头进行连接。利用TaKaRa T4 DNA Ligase连接试剂盒在微量PCR离心管内配制25 μLPCR反应液。其成分为: 基因组DNA酶切产物8 μL, *Mse*I接头引物和*Eco*RI接头引物各2.5 μL, T4 DNA连接酶1 μL, 稀释10倍的Ligation Buffer 2.5 μL, 余量用双蒸水补齐至25 μL。在16°C下保存备用。(3) 预扩增: 在微量PCR离心管中配制25 μLPCR反应液。其成分为连接产物2.5 μL, 稀释10倍的Buffer 2.5 μL, Mg<sup>2+</sup>1.87 μL, dNTP 0.5 μL, Mzx00和Ezx00两种预扩增引物各0.5 μL, *Taq*酶0.2 μL, 余量用双蒸水补齐至25 μL。PCR反应程序为: 94°C变性1分钟, 50°C退火90秒, 72°C延伸90秒, 36个循环; 72°C延伸10分钟。扩增产物稀释20–40倍, 备用。(4) 选择性扩增: 在20 μLPCR离心管内配制25 μLPCR反应液。其成分为: 预扩增PCR产物稀释液5–10 μL, 稀释10倍的Buffer 2.5 μL, Mg<sup>2+</sup> 1.87 μL,

表1 引物信息

Table 1 Information of primers

Name	Primer	Primer name	Sequence (5'–3')
iPBS	iPBS primer	2395	TCCCCAGCGGAGTCGCCA
	<i>Mse</i> I oligo	M5	GACGATGAGTCCTGAG
		M3	TACTCAGGACTCAT
		E5	CTCGTAGACTGCGTACC
	<i>Eco</i> RI oligo	E3	AATTGGTACGCAGTCTAC
SSAP		M0	GATGAGTCCTGAGTAAC
		E0	GACTGCGTACCAATTCA
	Pre-selective primer	M1 (CCC)	GATGAGTCCTGAGTAACCC
	Selective primer	L1	CCTTCTAATCATTGGGTAT
	Retrotransposon primer		

dNTP 0.5  $\mu\text{L}$ , 选择性扩增引物和逆转座子引物各0.5  $\mu\text{L}$ , *Taq*酶0.2  $\mu\text{L}$ , 余量用双蒸水补齐至25  $\mu\text{L}$ 。PCR反应程序为: 94°C预变性5分钟; 94°C变性30秒, 68°C退火30秒(此步采用touchdown方法, 每个循环降低0.7°C), 72°C延伸1分钟; 12个循环; 94°C变性30秒, 56°C退火30秒, 72°C延伸1分钟; 23个循环; 72°C延伸5分钟。(5) 电泳: PCR产物经6%聚丙烯酰胺非变性胶(80  $\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$ 恒功率)电泳分离, 银染显色。PCR试剂均为TaKaRa公司产品。

#### 1.2.4 数据分析

电泳条带记录方法为: 有带记为1, 无带记为0。将轮廓清晰、重复性强的条带进行数据转换。利用NTSYS Version 2.10(Rohlf, 1992)软件计算相似指数。用UPGMA法进行聚类分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反转录转座子LTR序列的PCR扩增及克隆测序

利用Kalendar等(2010)设计的iPBS引物2395(表1)分别对洛阳红和红绣球2个牡丹品种进行扩增。PCR反应结果表明, 在牡丹中原品种洛阳红和西北品种红绣球中均能扩增出较多条带(图1)。

将扩增产物克隆、转化并测序, 获得40条目的序列。首先除去两端的非目的引物或者相似度较高的重复序列, 再删除初步比对没有LTR特征的序列, 最终得到12条不同的LTR类反转录转座子LTR序列。用DNASTAR软件分析表明, 序列长度范围为313–894 bp。将12条序列依次命名为PALTR1–12, 并提交到GenBank, 登录号分别为JX965002–JX965013。这12条序列富含AT, AT/GC比值范围为1.56–2.72(表2), 与前人研究结果较为相近(杜晓云等, 2008)。

在使用iPBS方法时, 2条LTR类反转录转座子必须是反向相对并且之间的距离足够小, 才能获得有效的扩增。图2显示了LTR类反转录转座子的2个关键结构, 即LTR和PBS(primer binding site), 而中间黑色实线代表LTR内部结构, 包含PBS扩增产物的预期产物则处于图2中最上端两箭头之间的黑色细线。PCR产物既包含LTR和PBS序列, 也包含LTRs之间的基因组DNA, 因此分离出来的LTR序列长度存在较

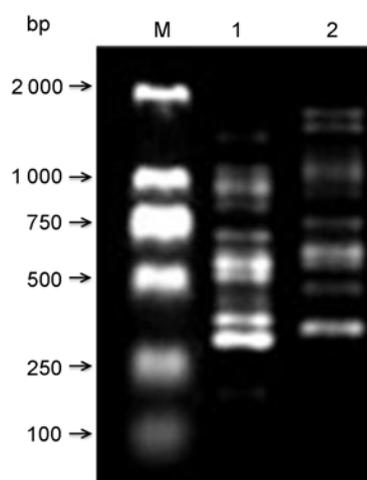


图1 牡丹品种红绣球和洛阳红的PCR扩增  
M: DL2000 marker; 1: 洛阳红; 2: 红绣球

Figure 1 PCR amplification from tree peony of Red Hydrangea and Luoyanghong Plain varieties  
M: DL2000 marker; 1: Luoyanghong; 2: Red Hydrangea

表2 牡丹LTR类反转录转座子LTR序列的组成

Table 2 The nucleotide composition of LTR of LTR retrotransposons in tree peony

Sequence No.	Size (bp)	AT/GC	Accession No.
PALTR1	374	1.56	JX965002
PALTR2	518	1.63	JX965003
PALTR3	491	1.89	JX965004
PALTR4	358	2.72	JX965005
PALTR5	894	1.74	JX965006
PALTR6	313	2.19	JX965007
PALTR7	466	1.81	JX965008
PALTR8	669	2.50	JX965009
PALTR9	414	1.74	JX965010
PALTR10	754	1.73	JX965011
PALTR11	750	1.63	JX965012
PALTR12	694	1.65	JX965013

大差异。图2中间区域显示出5'LTR和3'LTR的起始序列TG和CA, 最下方的N则代表PBS与LTR起始序列TG或CA之间存在0–9 bp的间隔。

### 2.2 LTR核苷酸序列分析

12条LTR核苷酸序列碱基数差异很大, 长度为313–894 bp不等, 可能与iPBS分离的LTR扩增产物中包

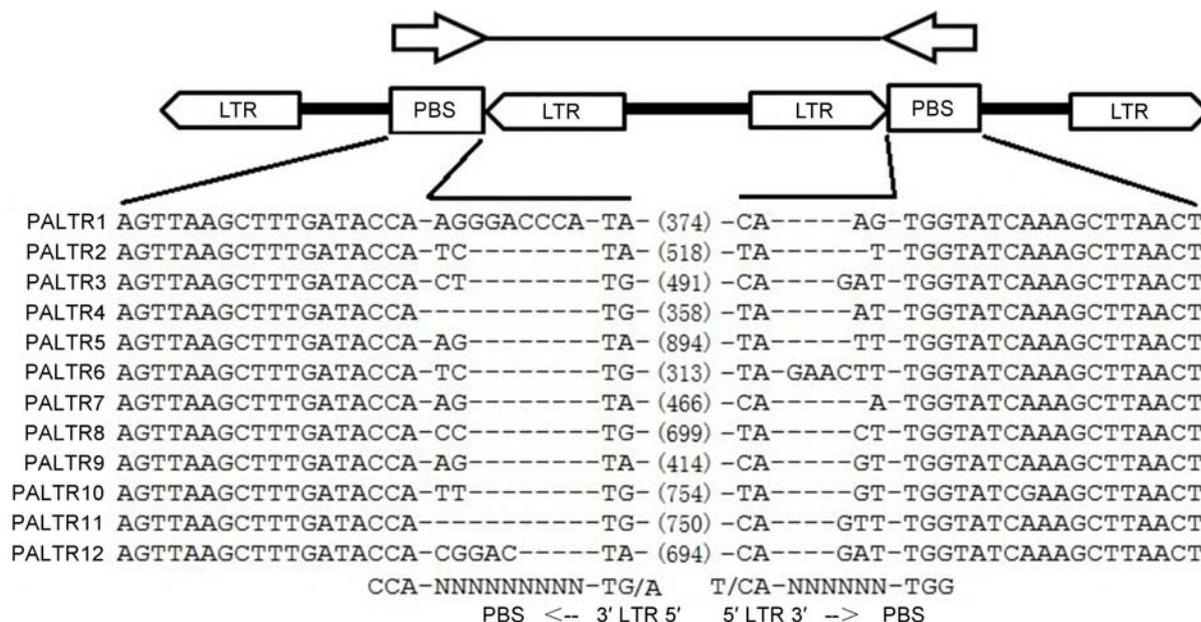


图2 牡丹LTR类反转录转座子LTR序列比较

第1行两箭头中间黑色实线为实验分离的LTR序列; 括号中代表省略的序列长度

Figure 2 The sequence alignment of LTR in tree peony

The sequences of LTR is shown above as a thick line between two arrows; the length of elliptical sequences is shown in parenthesis

含2条LTR序列之间的基因组有关。利用MegAlign 7.1软件对上述12条序列进行同源性比较, 显示同源性为31.1%–65.8%。其中序列PALTR3和PALTR12的同源性最高, 为65.8%。序列PALTR1和PALTR2的同源性最低, 仅为31.1%(表3)。由此可见, 同一引物扩增获得的LTR序列在长度和碱基变化上并不相同, 存在高度的异质性。

### 2.3 与其它物种LTR类反转录转座子序列的聚类分析

利用DNAMAN和DNASTAR软件对本实验获得的12条牡丹LTR序列以及4条其它物种LTR序列进行聚类分析, 构建发育进化树(图3), 用以说明牡丹和其它物种中LTR类反转录转座子之间的进化关系。PALTR为牡丹LTR序列; 4条其它物种的LTR序列均使用iPBS方法获得, 登录号分别为AF538603、DQ094839、EF191000和EU009616。其中TIMOTHY\_68F为猫尾草(*Phleum pratense*)LTR序列; S0579为二穗短柄草

(*Brachypodium distachyon*)LTR序列; s565\_21为春侧金盏花(*Adonis vernalis*)LTR序列; V2为葡萄(*Vitis vinifera*)LTR序列。根据进化树分支长度可将上述16条序列分为4组(Group1–4)。其中Group1和Group3中9条序列(占总数的56%)均为牡丹LTR序列且遗传距离相近, 说明这2组序列是构成牡丹LTR类反转录转座子的主要成分。不同组中所含LTR类反转录转座子数目不等, 表明每组LTR类反转录转座子在反转录过程中有差异, 历史越久远的组含有的序列也越多。

由图3可知, PALTR6与V2两个LTR类反转录转座子分在第4组且遗传距离相近, 说明牡丹的LTR序列与葡萄LTR序列亲缘关系较近。另外3个物种则共同聚类在第2组中, 同在第2组中的还有牡丹LTR类反转录转座子LTR序列PALTR2和PALTR11, 但遗传距离较其它3个序列远。这说明牡丹LTR类反转录转座子与猫尾草、二穗短柄草和春侧金盏花的亲缘关系较葡萄远。

反转录转座子在植物界广泛分布。作为基因组的

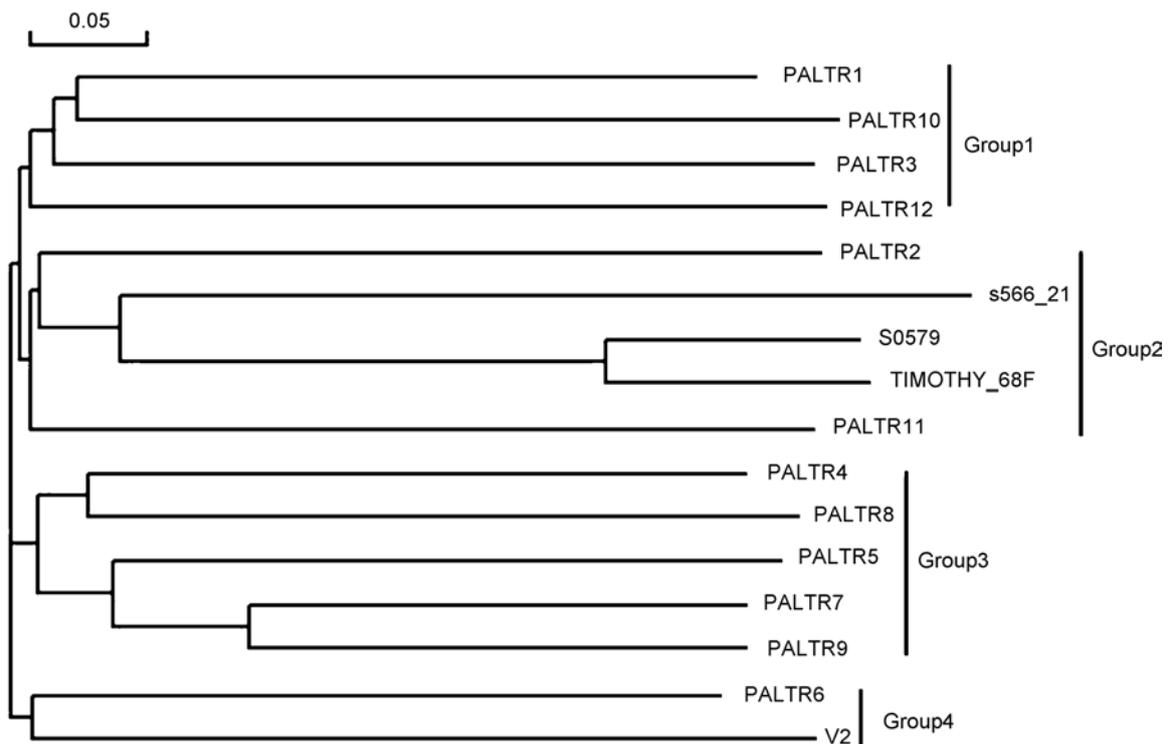
**表3** 牡丹LTR类反转录转座子LTR序列的同源性

**Table 3** Percent identity of LTR sequences in tree peony

No.	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	31.1	37.1	40.1	37.6	37.8	34.7	38.1	36.3	38.2	34.2	31.8
2		40.1	37.0	34.5	39.9	38.0	32.7	34.8	32.2	32.4	36.6
3			40.1	40.1	41.6	40.1	34.0	37.9	39.5	38.0	65.8
4				43.3	41.2	40.5	46.7	41.7	36.1	39.2	36.5
5					37.3	51.6	39.8	49.4	32.7	28.6	38.0
6						38.5	36.0	39.8	36.9	37.4	35.2
7							44.6	36.0	35.0	34.1	36.3
8								44.6	38.3	34.8	35.4
9									35.0	33.7	35.3
10										32.3	37.7
11											35.2

编号1-12为序列PALTR1-12。

No. 1-12 represent sequences PALTR 1-12.



**图3** 牡丹LTR类反转录转座子LTR序列及其它物种LTR序列进化树

**Figure 3** Phylogenetic tree of LTR sequences in tree peony and other species

重要组成部分，不仅可以纵向传递，而且可以横向传递(Doolittle et al., 1989)。图3也说明了不同物种中存在着起源相同或者相近的反转录转座子。另外，在不同物种间有时也存在比种内同源性更高的反转录转

座子。

## 2.4 SSAP多态性分析

利用选择性扩增引物M1与反转录转座子引物L1对29

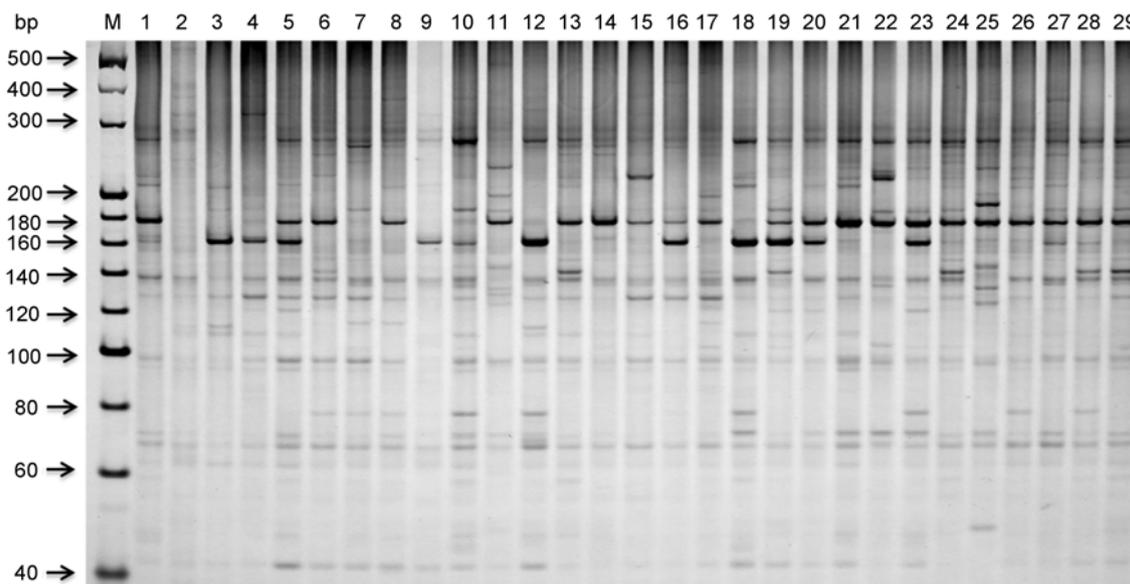


图4 SSAP扩增图谱

1: 佛门袈裟; 2: 冰山翡翠; 3: 首案红; 4: 状元红; 5: 玫瑰紫; 6: 岛锦; 7: 平湖秋月; 8: 户川寒; 9: 彩蝶; 10: 百花度; 11: 公主; 12: 藏枝红; 13: 西瓜瓢; 14: 四旋; 15: 墨海金龙; 16: 玉楼点翠; 17: 锦袍红; 18: 罍粟红; 19: 粉荷飘江; 20: 秀丽红; 21: 寒樱狮子; 22: 卵叶牡丹; 23: 红霞映日; 24: 十八号; 25: 佛潜水; 26: 罗马金; 27: 黑海金龙; 28: 蓝芙蓉; 29: 春红娇艳

Figure 4 SSAP profiles

1: Fuomenjiasha; 2: Bingshanfeicui; 3: Shouanhong; 4: Zhuangyuanhong; 5: Meiguizi; 6: Daojin; 7: Pinghuqiuyue; 8: Huchuanhan; 9: Caidie; 10: Baihuadu; 11: Gongzhu; 12: Cangzhihong; 13: Xiguarang; 14: Sixuan; 15: Mohaijinlong; 16: Yuloudiancui; 17: Jinpaohong; 18: Yingsuhong; 19: Fenhepiaojiang; 20: Xiulihong; 21: Hanyingshizi; 22: Luanyemudan; 23: Hongxiayingri; 24: Shibahao; 25: Foqianshui; 26: Luomajin; 27: Heihaijinlong; 28: Lanfurong; 29: Chunhongjiaoyan

个不同牡丹品种进行扩增。本实验共扩增出29个位点, 其中多态性位点24个, 占总数的82.8%。扩增片段长度介于40–400 bp之间。本引物在不同牡丹品种中扩增出9–32个位点, 平均为16个位点。每条泳道均产生数量和位置各异的指纹图谱, 牡丹种间扩增谱带差异明显(图4)。

## 2.5 SSAP相似指数及聚类分析

利用NTSYS软件分析29个牡丹品种间的相似性指数。结果表明, 材料相似性指数变化范围为0.38(首案红和佛潜水)–0.93(寒樱狮子和佛门袈裟), 平均为67.8%。如图5所示, 相似性指数约为0.63时, 29个牡丹品种聚为3组。第1组包括13个牡丹品种, 除日本品种寒樱狮子、岛锦和美国品种罗马金外, 大部分中原品种聚类于此, 十八号、春红娇艳、玫瑰紫和秀丽红

直接相聚, 表现出较近的亲缘关系。第2组包含9个牡丹品种, 除西北品种冰山翡翠和日本品种户川寒外, 其它均为中原品种, 其中藏枝红、罍粟红、百花度和黑海金龙直接相聚, 可见其亲缘关系较近。另外中原品种可分为两大组, 推测这是因为地域或光照气候等因素, 使其未聚类为一组。第3组则含有7个品种, 其中彩蝶和玉楼点翠2个中原品种相聚, 四旋和卵叶牡丹2个非中原品种相聚, 2个国外品种公主和佛潜水相聚。

综上所述, 利用UPGMA方法绘制出来的聚类图谱较好地显示了聚类结果与地理起源的相关性, 即牡丹中原品种和国外品种(来自日本和美国)均较好地根据地理起源的不同而聚类于不同组。这与前人使用SSAP技术在柿属植物的地理分布与聚类分析时所得结果较为一致(杜晓云等, 2010)。

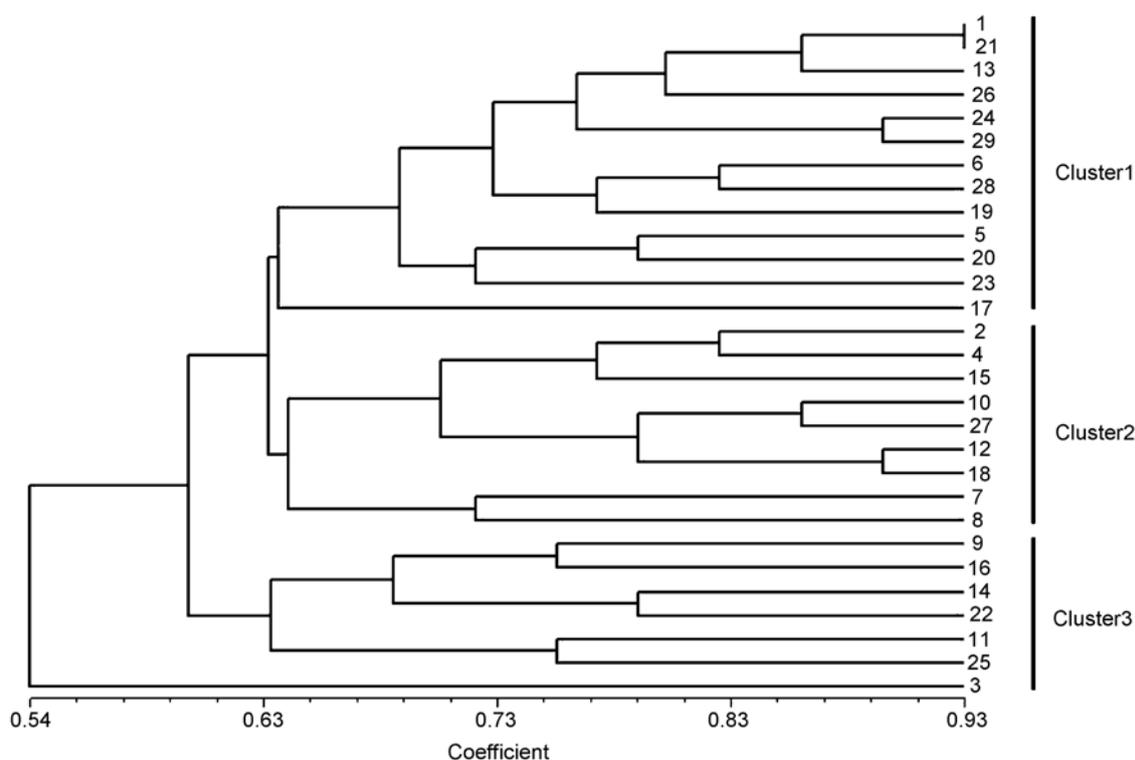


图5 引物组合M1(CCC)/L1 SSAP扩增图谱(编号1-29同图4)

Figure 5 SSAP profiles of 29 accessions using the M1(CCC)/L1 retrotransposon primer combination (The number of 1-29 see Figure 4)

## 2.6 讨论

本研究利用iPBS技术对牡丹2个品种的LTR类反转录转座子LTR序列进行分离,并获得了预期目的片段。前人利用抑制PCR(Lavrentieva et al., 1999)方法获得的LTR类反转录转座子LTR序列长度为200-250 bp且变幅较小(杜晓云等, 2008)。而有研究显示利用iPBS技术分离的LTR序列变幅较大,序列长度范围较广(Kalendar et al., 2010)。由此表明不同分离方法分离出的LTR序列存在一定的差异。造成差异的原因可能为iPBS分离方法中的PCR产物既包含LTRs和PBS序列,也包含LTRs之间的基因组DNA。又由于LTR类反转录转座子本身具有高度的异质性,因此序列变幅较大。此外,LTR类反转录转座子在反转录过程中发生缺失突变也是造成LTR类反转录转座子LTR序列长度变化的可能原因。

反转录转座子是植物基因组的重要组成,在基因

组结构和进化中起着重要作用。但由于其转录的方式,导致LTR类反转录转座子在长期进化过程中形成了高度的异质性。本文中PALTR1和PALTR2序列同源性最低(仅为31.1%)也验证了LTR类反转录转座子的高度异质性确实存在于相同品种之间。而在牡丹属与其它种属之间的聚类分析中,葡萄属LTR基因V2与牡丹属PALTR6基因表现出高度一致性,这在一定程度上说明LTR类反转录转座子不仅能在同一物种内世代纵向传递,也可在物种间进行横向传递(Kumar and Chambon, 1988)。

本研究根据分离出的LTR类反转录转座子LTR序列设计SSAP引物,并在29个牡丹品种中进行SSAP分子标记扩增,检测到丰富的SSAP扩增位点,且通过UPGMA聚类分析方法将中国不同地区牡丹品种和国外品种明显分开,不仅验证了所分离的LTR序列的可靠性,也表明反转录转座子在牡丹属植物中频繁转座,参与其进化过程。利用iPBS技术对牡丹LTR类反

转录转座子LTR序列进行分离,为今后从牡丹其它品种中分离LTR类反转录转座子LTR基因奠定了基础,也为进一步开发基于LTR类反转录转座子的分子标记提供了理论依据。

## 参考文献

- 杜晓云, 张青林, 罗正荣 (2008). 罗田甜柿Ty1-*copia*类逆转座子RNaseH-LTR序列的分离和特性分析. *园艺学报* **35**, 501–508.
- 杜晓云, 张青林, 黄建民, 罗正荣 (2010). SSAP逆转座子分子标记在柿属植物遗传分析中的应用. *农业生物技术学报* **18**, 682–688.
- 郭玉双, 陈静, 张建华, 李祥羽, 胡重怡, 任学良 (2012). 植物LTR类反转录转座子在植物基因组学研究中的应用. *黑龙江农业科学* (11), 139–142.
- 侯小改, 张曦, 郭大龙 (2012). 植物LTR类反转录转座子序列分析识别方法. *遗传* **34**, 1491–1500.
- 王石平, 张启发 (1998). 高等植物基因组中的反转录转座子. *植物学报* **40**, 291–297.
- 王子成, 李忠爱, 邓秀新 (2003). 植物反转录转座子及其分子标记. *植物学通报* **20**, 287–294.
- 肖卫民, 坂本亘, 苏都莫日根 (2004). 绿豆Ty1-*copia*类反转录转座子逆转录酶序列的克隆和分析. *植物学报* **46**, 582–587.
- 邢少辰, 朱立煌 (2000). 水稻双子房突变体中类*copia*逆转座子同源序列的研究. *植物学报* **42**, 43–49.
- 徐玲, 陈自宏, 汪建云, 艾薇 (2012). 植物LTR类反转录转座子的研究概述. *安徽农业科学* **40**, 15129–15130, 15149.
- Doolittle RF, Feng DF, Johnson MS, McClure MA (1989). Origins and evolutionary relationships of retroviruses. *Q Rev Biol* **64**, 1–30.
- Kalendar R, Antonius K, Smýkal P, Schulman AH (2010). iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theor Appl Genet* **121**, 1419–1430.
- Kumar V, Chambon P (1988). The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* **55**, 145–156.
- 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.
- Rohlf FJ (1992). NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. New York: Applied Biostatistics.
- Sarwat M, Nabi G, Das S, Srivastava PS (2012). Molecular markers in medicinal plant biotechnology: past and present. *Crit Rev Biotechnol* **32**, 74–92.
- Schulman AH, Flavell AJ, Ellis TN (2004). The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods Mol Biol* **260**, 145–173.
- Shepherd NS, Schwarz-Sommer Z, Blumberg Vel Spalve J, Gupta M, Wienand U, Saedler H (1984). Similarity of the *Cin1* repetitive family of *Zea mays* to eukaryotic transposable elements. *Nature* **307**, 185–187.
- Wei L, Xiao M, An Z, Ma B, Mason AS, Qian W, Li J, Fu D (2012). New insights into nested long terminal repeat retrotransposons in *Brassica* species. *Mol Plant* **6**, 470–482.
- Zhao L, Ding Q, Zeng J, Wang FR, Zhang J, Fan SJ, He XQ (2012). An improved CTAB—ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. *Phytochem Anal* **23**, 647–650.

## iPBS-PCR Used for Cloning and Analysis of Long Terminal Repeat Transposons in Tree Peony (*Paeonia*)

Xi Zhang<sup>1</sup>, Xiaogai Hou<sup>1,3\*</sup>, Dalong Guo<sup>2,3\*</sup>, Chengwei Song<sup>1</sup>, Yabin Duan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Agriculture, Henan University of Science & Technology, Luoyang 471003, China; <sup>2</sup>College of Forestry, Henan University of Science & Technology, Luoyang 471003, China; <sup>3</sup>Engineering Technology Research Center of Tree Peony of Henan Province University, Luoyang 471003, China

**Abstract** We used inter-primer binding site PCR (iPBS-PCR) to amplify the relevant fragments from the northwest-plain tree peony Red Hydrangea and central-plain variety Luoyanghong, then the polymorphic fragments were cloned, sequenced and analyzed by relevant bioinformatics software; 12 long terminal repeat (LTR) sequences were obtained from peony LTR retrotransposons. The nucleotide sequence had the highest heterogeneity, deletion mutation was the main behavior, the length of the nucleotide sequences ranged from 313 to 894 bp, and homologous sequences ranged from 31.1% to 65.8%. Cluster analysis of the amino acid sequence and the LTR retrotransposons from different plant LTR amino acid sequences revealed high homology between relevant sequences of some other plants, which suggests transverse transfer between the LTR retrotransposons. Furthermore, we designed primers according to the cloned LTR sequence and analyzed 29 different varieties of peonies using the sequence-specific amplification polymorphism molecular marker method, which showed high polymorphism. LTR sequences from peony using iPBS may be useful and provide a new technology for peony germplasm resource evaluation.

**Key words** iPBS, LTR retrotransposons, sequence analysis, SSAP molecular marker

**Zhang X, Hou XG, Guo DL, Song CW, Duan YB** (2014). iPBS-PCR used for cloning and analysis of long terminal repeat transposons in tree peony (*Paeonia*). *Chin Bull Bot* **49**, 322–330.

---

\* Authors for correspondence. E-mail: hkdhxg@126.com; guodalong@haust.edu.cn