•研究报告•

植原体 tuf 基因与其上游部分基因结构和相关基因启动子保守区域特征及活性分析

于少帅 林彩丽 王圣洁 张文鑫 田国忠*

(中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091)

摘要: 植原体寄主种类多, 危害范围广, 开展其遗传多样性、关键基因调控等方面研究有助于提高该病害综合防治水平。通过长片段PCR引物扩增我国PaWB-sdyz、PaWB-fjz和LY-fjya1植原体株系 tuf 基因及其上游6个基因的片段, 进行植原体基因启动子保守区域序列特征和多位点序列分析。利用启动子探针载体pSUPV4检测植原体 tuf 基因上游序列的启动子活性。扩增获得PaWB-sdyz、PaWB-fjz、LY-fjya1株系 tuf 基因上游12,745–12,748 bp序列, 比较分析发现PaWB-sdyz、PaWB-fjz、LY-fjya1、OY-M、AYWB、PAa、SLY、AT植原体株系 tuf 与其上游6个基因的结构顺序皆为5'- $rplL-rpoB-rpoC-rps12-rps7-fusA-tuf-3'$ 。推测出可能的植原体启动子保守区域模式序列: T₉₀T₁₀₀G₉₂T₇₅G₆₇A₈₅ (–35区); T₉₀A₉₆T₉₂A₉₈T₇₃T₉₀ (–10区)。基于8个植原体株系的 $rplL-tuf$ 核苷酸序列编码基因、非编码序列、氨基酸序列的多位点序列分析可将不同植原体株系以较高的支持率清晰地区分, 不同植原体株系 $rplL-tuf$ 核苷酸非编码区变异水平更高。16SrI组植原体 tuf 基因上游序列存在3种变异类型, 其代表株系PaWB-fjz、LY-fjya1 tuf 基因上游130 bp片段和CWB-hnsy1 tuf 基因上游129 bp片段皆具有启动子活性。

关键词: 植原体; 启动子; 基因结构; 遗传多样性; 多位点序列分析

Structures of the tuf gene and its upstream part genes and characteristic analysis of conserved regions and activity from related gene promoters of a phytoplasma

Shaoshuai Yu, Caili Lin, Shengjie Wang, Wenxin Zhang, Guozhong Tian *

Key Laboratory of Forest Protection of State Forestry Administration, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091

Abstract: Studies on the genetic diversity, key gene regulation and control of phytoplasma, which cause many diseases with various host plants and have a wide geographical distribution, will be conducive to facilitating integrated disease control. The large DNA fragments including tuf gene sequences and upstream six genes from PaWB-sdyz, PaWB-fjz and LY-fjya1 strains were amplified using long fragment PCR primers. Sequence characteristic of conserved regions of the phytoplasma gene promoter and MLSA were performed. Upstream sequences adjoining the tuf gene was recombined with promoter-probe vector pSUPV4 to analyze their promoter activity. The sequences, 12,745–12,748 bp in length, of upstream tuf genes were amplified from the three strains. Comparative analysis showed that the gene structure order of the tuf gene and its upstream six gene sequences of PaWB-sdyz, PaWB-fjz, LY-fjya1, OY-M, AYWB, PAa, SLY, AT phytoplasma strains were identical in the arrangement of 5'- $rplL-rpoB-rpoC-rps12-rps7-fusA-tuf-3'$. The potential sequence pattern of conserved region of the phytoplasma promoter was deduced: T₉₀T₁₀₀G₉₂T₇₅G₆₇A₈₅ (–35 region); T₉₀A₉₆T₉₂A₉₈T₇₃T₉₀ (–10 region). The different phytoplasma strains were clearly divided with comparatively high bootstrap values based on MLSA of coding genes, non-coding sequences, and deduced amino acid sequences of $rplL-tuf$ nucleotide sequences. Genetic variation was comparatively high in the non-coding nucleotide sequences. A 130-bp upstream sequence of the tuf gene in PaWB-fjz, LY-fjya1 strains and a

收稿日期: 2018-01-16; 接受日期: 2018-03-26

基金项目: 国家自然科学基金(31370644)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: tian3691@163.com

129-bp upstream sequence of the *tuf* gene in CWB-hnsy1 strain, and three representative strains of three variation types of upstream sequences adjoining the *tuf* gene from 16SrI group, were tested for promoter activity.

Key words: phytoplasma; promoter; gene structure; genetic diversity; multilocus sequence analysis

植原体(phytoplasma)是一类寄生于植物韧皮部、无细胞壁的植物致病细菌,其植物寄主的种类多、地理分布范围广,造成的危害严重。植原体基因组大小在530–1,350 kb之间,目前完成全基因组测序的植原体株系有5个,分别为16SrI组的洋葱黄化植原体(onion yellows phytoplasma, OY-M) (GenBank 登录号 AP006628)和翠菊黄化丛枝植原体(aster yellows witches'-broom phytoplasma, AYWB) (CP000061), 16SrXII组的澳大利亚葡萄黄化植原体(*Candidatus* phytoplasma australiense, PAa) (AM42-2018)和草莓致死黄化植原体(strawberry lethal yellows phytoplasma, SLV) (CP002548), 还有16SrX组的苹果簇生植原体(*Ca. P. mali*, AT) (CU469464) (Oshima et al, 2004; Bai et al, 2006; Tran-Nguyen et al, 2008; Kube et al, 2008; Andersen et al, 2013)。不同植原体株系寄主种类、引起病害症状、相关病害地理分布等都有差异。从基因组水平分析发现不同植原体株系基因组大小、染色体形态、G + C含量、质粒数量、开放阅读框(open reading frame, ORF)数量、基因结构和功能等均有明显差异(于少帅等, 2016a)。

已知原核生物操纵子的基因结构和其调控序列的变化都会影响到操纵子的表达。研究发现大肠杆菌*rps12*、*rps7*、*fusA*、*tuf*共同组成了一个*str*操纵子,*rps12*前和*tuf*后分别存在启动子结构和转录终止结构(Post & Nomura, 1980; 朱玉贤和李毅, 2002)。大肠杆菌中*rpS10*基因在*str*操纵子下游15 kb处,与核糖体蛋白编码基因*rpl3*、*rpl4*等组成*S10*操纵子,在*S10*操纵子3'端发现转录终止结构(Post & Nomura, 1980; Zurawski & Zurawski, 1985)。Sanangelantoni等(1993)研究发现甲烷叶菌(*Methanococcus vannielii*)的核糖体蛋白编码基因*rpS10*与*tuf*基因连在一起与*str*操纵子一起转录。*spc*操纵子和*S10*操纵子在大肠杆菌基因组中均有发现(Post & Nomura, 1980; Zurawski & Zurawski, 1985)。Miyata等(2002a)在植原体*S10*操纵子和*spc*操纵子之间没有找到与转

录起始或终止相关的序列,而在*S10*操纵子上游邻接序列发现了可能的启动子结构,推测*S10*操纵子和*spc*操纵子在植原体中是一个转录单位,构成*S10-spc*操纵子。Miyata等(2002b)推断洋葱黄化植原体OY的*str*操纵子的结构与大肠杆菌的*str*操纵子结构排布一致,为5'-*rps12-rps7-fusA-tuf*-3'。与支原体相比,洋葱黄化植原体OY的*str*操纵子基因结构排布与芽孢杆菌更接近(Miyata et al, 2002b),但研究未通过实验验证预测启动子的功能活性。

启动子(promoter)是RNA聚合酶结合到模板完成转录起始步骤所需的DNA序列,转录起始是基因表达的关键阶段(朱玉贤和李毅, 2002; 李明刚等, 2004)。病原菌基因结构变化和启动子序列的有无及变异会改变相关基因的表达及代谢效率,并对病原菌与其寄主的互作关系产生重要影响(Ishii et al, 2009; Du et al, 2014; Zhang et al, 2014)。Du等(2014)发现猪乳糖酶基因启动子和增强子中存在较丰富的单核苷酸多态性,这些调控序列的碱基变异导致基因表达水平发生显著差异。Zhang等(2014)研究发现,人类的T-box转录因子基因TBX1调控序列碱基发生变异将改变TBX1基因的表达水平,而TBX1基因表达水平的改变与人类疾病腹股沟疝的产生有一定关系。Ishii等(2009)对洋葱黄化植原体非虫传株系OY-NIM质粒EcOYM和野生株系OY-M质粒EcOYNIM上编码膜蛋白基因*orf3*的启动子ORF3-pro1和ORF3-pro2的保守结构进行了分析,并与16S rRNA和Amp基因的启动子结构进行了软件预测与比较分析,发现OY-NIM株系ORF3-pro2启动子缺失,从而推断膜蛋白ORF3在洋葱黄化植原体与昆虫互作过程中起到重要作用,但研究尚缺乏启动子功能验证实验的直接证据。

我们对我国16SrI组的泡桐丛枝植原体PaWB-sdyz株系*tuf*基因及其邻接上游序列分析发现其上游序列存在明显的启动子结构,经pSUPV4启动子探针检测具有启动子活性,由此推测泡桐丛枝植原体的*tuf*基因可能单独表达(于少帅等, 2016b)。已有

研究发现:除PaWB-sdyz株系*tuf*基因启动子外,16SrI组植原体*fusA-tuf*基因间区序列还存在其他3种变异类型,均预测有完整的启动子结构(于少帅等,2016b),但启动子活性未做验证。而启动子序列的变异对启动子活性的有无影响较大(Ishii et al, 2009; Du et al, 2014; Zhang et al, 2014),因此,本研究对其他3种变异类型的启动子活性进行了分析。在此基础上,本研究进一步通过长片段PCR扩增我国泡桐丛枝植原体山东兖州株系PaWB-sdyz、福建福州株系PaWB-fjz和莒莒黄化植原体福建永安株系LY-fjya1基因*tuf*及其上游6个基因*rplL*、*rpoB*、*rpoC*、*rps12*、*rps7*、*fusA*序列,结合全基因组测序已完成的5个植原体株系和非固醇甾原体(*Acholeplasma laidlawii*) PG-8A株系的*tuf*及其上游基因序列进行比较分析,试图揭示不同植原体*tuf*基因与其上游部分基因结构排布及序列间的差异,阐明植原体基因启动子的保守区域序列特征,从基因水平上认识不同植原体株系间的差异,深入揭示植原体与植物寄主和介体昆虫间的互作关系、致病机制、生境多样性和适应性等问题,从而达到防治相关病害的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品:泡桐丛枝病植原体PaWB-sdyz和PaWB-fjz来自实验室组培苗和福建福州,莒莒黄化植原体LY-fjya1和苦楝丛枝植原体CWB-hnsy1来自福建永安和海南三亚,样品采于2013–2014年间。每个采样地采集植物健康枝叶作为对照。

试剂及仪器:限制性内切酶Hind III和BamH I、T4 DNA连接酶、大肠杆菌感受态细胞DH5 α 、高保真LA Taq DNA聚合酶等购自日本TaKaRa公司,2 $\times$ PCR Mix购自北京博迈德公司,植物基因组提取试剂盒、Marker试剂、SYBR Green I染料购自北京艾德莱公司,pSUPV4质粒由四川大学王海燕副教授提供,其他试剂均为国产分析纯。LongGene A200型基因扩增仪,北京市六一仪器厂DYY-6C型电泳仪。引物由北京赛百盛公司合成,DNA测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 植原体总DNA的提取和检测

通过CTAB法提取植物中植原体总DNA,参照艾德莱植物基因组提取试剂盒提供方法。用引物对

R16mF2/R16mR1 (Lee et al, 1993) PCR扩增测序检测植原体。PCR反应设阳性对照(实验室组培的感染植原体植物)和阴性对照(健康植物)。

1.2.2 植原体*tuf*及其上游部分基因长片段扩增

根据OY-M基因组序列设计4对引物,采用高保真LA Taq DNA聚合酶扩增PaWB-sdyz、PaWB-fjz、LY-fjya1植原体株系*tuf*基因及其上游6个基因及间区约13 kb的序列,7个基因的结构顺序为5'-*rplL-rpoB-rpoC-rps12-rps7-fusA-tuf*-3'。编码蛋白分别为*rplL*:核糖体蛋白L7/L12 (ribosomal protein L7/L12);*rpoB*:RNA聚合酶beta亚基(DNA-directed RNA polymerase beta subunit);*rpoC*:RNA聚合酶beta'亚基(DNA-directed RNA polymerase beta' subunit);*rps12*:核糖体蛋白S12 (ribosomal protein S12);*rps7*:核糖体蛋白S7 (ribosomal protein S7);*fusA*:蛋白延伸因子EF-G (translation elongation factor G);*tuf*:蛋白延伸因子EF-Tu (translation elongation factor Tu)。

PCR反应体系为50 μ L,包括2.0 μ L DNA提取物,0.5 μ L 上游引物和下游引物(10 μ M),0.5 μ L LA Taq DNA聚合酶(5 U/ μ L),5 μ L 10 $\times$ LA Taq DNA聚合酶buffer II (Mg²⁺ Plus),8 μ L dNTP (2.5 mM each),用ddH₂O补至50 μ L。引物信息如表1所示。

1.2.3 植原体启动子保守结构特征序列

利用DNASar和DNAMAN 5.0软件拼接所得序列,并将所得序列与植原体参考株系OY-M、AYWB、PAa、SLY、AT和非固醇甾原体PG-8A相关DNA序列进行多重序列比对,通过Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)在线分析工具并参考相关资料(朱玉贤和李毅,2002; Turner, 2010)推测不同植原体株系*tuf*基因及上游基因间区序列可能存在的启动子及其结构。对植原体基因启动子保守区域不同位置核苷酸种类及出现频率进行统计分析,推测植原体基因启动子保守区域可能的序列模式。

1.2.4 MLSA分析

利用MEGA7.0软件的邻接法构建系统发育树(Kumar et al, 2016)。自展值设为1,000,用以评估软件生成的系统进化树的稳定性和支持率 (Felsenstein, 1985)。OY-M、AYWB、PAa、SLY、AT和非固醇甾原体PG-8A相关DNA序列作为构建系统发育树的外类群。采用*rplL*、*rpoB*、*rpoC*、*rps12*、*rps7*、*fusA*、*tuf*共7个基因和其对应的氨基酸序列RpIL、

表1 长片段DNA扩增引物信息
Table 1 Information of the primers used to amplify the large DNA fragments

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	长度 Length (nt)	T _m (°C)	G+C (%)	扩增长度 Length amplified (bp)
op1	5'-GATTGACATGGCTAAGTTAACG-3'	22	54.9	40.9	3,676
op2	5'-TACACCTTTGTTTCCGTGGC-3'	20	58.4	50.0	
op3	5'-AGGTAGCGGTCAAGAAGAAAT-3'	21	55.4	42.9	6,965
op4	5'-GAACCGCAAAGAACTGGG-3'	18	56.0	55.6	
op5	5'-AATATTATTGACACTCCCGGAC-3'	22	55.5	40.9	2,661
op6	5'-ACTCTACCAGTAACAACAGTTCCTC-3'	25	56.1	44.0	
op7	5'-CACATTTTATTAGCGCGCC-3'	19	57.2	47.4	1,519
op8	5'-AAAACCTAACGCAATCATGG-3'	20	55.5	40.0	

RpoB、RpoC、Rps12、Rps7、FusA、TUF及其6个基因间区 $rplL$ - $rpoB$ 、 $rpoB$ - $rpoC$ 、 $rpoC$ - $rps12$ 、 $rps12$ - $rps7$ 、 $rps7$ - $fusA$ 、 $fusA$ - tuf 核苷酸序列对PaWB-sdyz、PaWB-fjz、LY-fjya1、OY-M、AYWB、PAa、SLY、AT等8个植原体和1个非固醇甾原体PG-8A进行MLSA分析。

1.2.5 *tuf*基因上游序列启动子活性验证

用引物对TPf/TPr (于少帅等, 2016b)扩增CWB-hnsy1、LY-fjya1植原体株系 tuf 上游129–130 bp序列, 用引物对TP4f/TPr扩增PaWB-fjz上游130 bp序列。将各PCR产物和pSUPV4质粒用Hind III和BamH I双酶切后用T4 DNA连接酶连接, 连接产物通过热激法转化大肠杆菌感受态细胞DH5 α , 涂布于含有卡那霉素(Kan)(Kan浓度分别为30和50 mg/L)的LB平板上, 37℃培养24 h后观察。通过双酶切和DNA测序验证转化子中是否存在目的片段, 引物信息见表2。

2 结果

2.1 植原体*tuf*与其上游基因序列扩增

通过引物op1/op2、op3/op4、op5/op6、op7/op8对PaWB-sdyz、PaWB-fjz、LY-fjya1植原体株系 tuf 基因及其上游6个基因进行PCR扩增测序。本研究所得核苷酸序列已上传至GenBank数据库, 3个植原体株系PaWB-sdyz、PaWB-fjz和LY-fjya1的 $rplL$ - tuf 核苷酸序列的GenBank序列号分别为MG744258、MG744259和MG744260。对所得植原体序列的持家基因及其编码的氨基酸序列和基因间区序列进行分析。PaWB-sdyz、PaWB-fjz、LY-fjya1植原体株系及OY-M、AYWB、PAa、SLY、AT等8个植原体株系和1个非固醇甾原体株PG-8A的7个基因和其对应的氨基酸序列及其6个基因间区的核苷酸序列信

息如表3所示。 tuf 基因上游6个基因分别为 $rplL$ 、 $rpoB$ 、 $rpoC$ 、 $rps12$ 、 $rps7$ 、 $fusA$, 7个基因的结构顺序均为5'- $rplL$ - $rpoB$ - $rpoC$ - $rps12$ - $rps7$ - $fusA$ - tuf -3'。将各植原体株系及非固醇甾原体PG-8A的此段基因结构进行比较分析, 表明植原体间及植原体与非固醇甾原体间基因结构存在一定的相似性和多样性。

2.2 植原体及非固醇甾原体*tuf*与其上游基因结构分析

对 tuf 等7个基因及基因间区序列分析发现, PaWB-sdyz、PaWB-fjz、LY-fjya1、OY-M、AYWB、PAa、SLY植原体 $fusA$ - tuf 基因间区序列长在118–130 bp之间, 有明显的启动子结构特征; 非固醇甾原体PG-8A的 $fusA$ - tuf 基因间区序列长86 bp, 有明显的启动子结构; AT植原体 $fusA$ - tuf 基因间区长65 bp, 未检测到完整启动子结构。PaWB-sdyz、PaWB-fjz、LY-fjya1、OY-M、PAa、SLY、AT植原体 $rps7$ - $fusA$ 基因间区长27–35 bp, 基因间区未预测到完整启动子结构; AYWB株系 $rps7$ 、 $fusA$ 为重叠基因; PG-8A株系 $rps7$ - $fusA$ 基因间区长17 bp, 亦未检测到完整的启动子结构。PaWB-sdyz、PaWB-fjz、LY-fjya1、OY-M植原体株系 $rps12$ - $rps7$ 基因间区序列长为88 bp, 预测有完整的启动子结构; AYWB、PAa、SLY、AT株系 $rps12$ - $rps7$ 基因间区长51–70 bp, 未预测到完整启动子结构; PG-8A株系 $rps12$ - $rps7$ 基因间区长66 bp, 未预测到完整的启动子结构。PaWB-sdyz、PaWB-fjz、LY-fjya1、OY-M、PAa、SLY、AT植原体株系 $rpoC$ - $rps12$ 基因间区序列长20–27 bp, 未预测到完整的启动子结构; 植原体AT株系 $rpoC$ - $rps12$ 基因间区序列长193 bp, PG-8A株系 $rpoC$ - $rps12$ 基因间区长260 bp, 有完整的启动子结构。PaWB-sdyz、PaWB-fjz、LY-fjya1、OY-M、PAa、

表2 *tuf*基因启动子扩增引物
Table 2 Primers used to amplify *tuf* gene promoters

引物 Primer	引物序列 Primer sequences (5'-3')	引物大小 Primer size (bp)	T _m (°C)	引入酶切位点 Restriction site added
TPf	cccaagcttACAACCTTACACTAAAAAAC	29	45	Hind III
TP4f	cccaagcttACAACCTTAAACTAAAAAAC	29	45	Hind III
TPr	cgcggatcCATTTTTCAAAGGCCTC	25	45	BamH I

表3 植原体扩增、编码区、非编码区序列和编码氨基酸序列及参照株系对应片段长度
Table 3 Length of sequence amplified, coding region, non-coding region and amino acid sequence of phytoplasmas as well as reference strains

株系 Strain	级别 Group	扩增序列长度 Sequence amplified length (bp)	编码区长度 Coding region length (bp)	非编码区长度 Non-coding region length (bp)	氨基酸长度/个 Amino acid sequence length
PaWB-sdyz	16SrI-D	12,746	12,307	439	4,096
PaWB-fjz	16SrI-D	12,745	12,307	438	4,096
LY-fjya1	16SrI-B	12,748	12,307	441	4,096
OY-M	16SrI-B	12,745	12,307	438	4,096
AYWB	16SrI-A	12,735	12,343	392	4,107
PAa	16SrXII	12,611	12,211	400	4,063
SLY	16SrXII	12,611	12,211	400	4,063
AT	16SrX	12,835	12,301	534	4,093
PG-8A		4,587	4,158	429	1,382

图1 不同植原体*tuf*基因及其上游基因结构示意图。图中样品代号见正文“1.1”和“1.2.3”；数字代表基因间区序列长度(bp)。
Fig. 1 Gene structure diagram of *tuf* gene and its upstream genes from different phytoplasmas. The codes of samples in the figure were shown in “1.1” and “1.2.3”. Numbers represented the length of intergenic sequences (bp).

SLY植原体*rpoB-rpoC*基因间区序列长2–3 bp，无完整启动子结构；AT株系*rpoB*、*rpoC*基因为重叠基因。PaWB-sdyz、PaWB-fjz、LY-fjya1、OY-M、PAa、SLY、AT植原体*rplL-rpoB*基因间区序列长157–190 bp，预测具有完整的启动子保守区域。与植原体各株系有所差异的是，非固醇甾原体PG-8A株系

*rps12*基因上游的2个基因编码的蛋白产物为假设蛋白，植原体各株系的*rplL-rpoB*和*rpoB-rpoC*这两个基因间区序列未与PG-8A株系进行比较分析(图1)。

2.3 植原体和非固醇甾原体相关基因启动子保守结构特征

已有研究发现：16SrI组植原体*fusA-tuf*基因间区

序列存在4种变异类型, 并预测有完整的启动子结构(于少帅等, 2016b), 相关植原体基因启动子保守区域特征序列如表4所示。根据研究中所涉及的52个可能的植原体启动子保守区域序列特征, 对部分植原体部分基因启动子保守区域不同位置核苷酸种类及出现频率进行了统计分析(表5), 根据保守区域不同位置核苷酸种类及出现频率推测出植原体启动子保守区域可能的序列模式为: -35区T₉₀T₁₀₀G₉₂T₇₅G₆₇A₈₅, -10区T₉₀A₉₆T₉₂A₉₈T₇₃T₉₀。

2.4 MLSA分析

基于8个植原体株系 *rplL-tuf* 基因序列进行MLSA分析, 8个植原体株系 *rplL-tuf* 核苷酸编码区整合序列总长为12,301–12,343 bp; 8个植原体株系 *rplL-tuf* 核苷酸编码区整合序列相似性为72.7–

99.9%; 非固醇甾原体PG-8A株系与8个植原体株系 *rplL-tuf* 核苷酸编码区整合序列相似性为70.9–71.4%。基于编码区整合序列的进化树表明: 16SrI-D亚组PaWB-sdyz、PaWB-fjtz株系以95%的支持率聚于一支, 16SrI-B亚组的洋葱黄化植原体OY-M、茼蒿黄化植原体LY-fjya1和16SrI-A亚组的AYWB分别单独聚于一支, 支持率均为99%, 16SrXII组的两个株系PAa、SLY以100%的支持率单独聚于一支(表6、图2)。

基于8个植原体株系 *rplL-tuf* 基因间区非编码序列进行MLSA分析, 8个植原体株系 *rplL-tuf* 核苷酸非编码区整合序列总长为392–534 bp; 8株植原体株系 *rplL-tuf* 核苷酸非编码区整合序列相似性为50.7–100%; PG-8A株系与8个植原体株系 *rplL-tuf* 核苷酸

表4 植原体 *rplL-tuf* 基因间区序列相关基因启动子保守区域特征
Table 4 Characteristics of conserved region of relevant gene promoter of phytoplasma *rplL-tuf* intergenic sequences

株系 Strains	<i>rplL-rpoB</i>		<i>rpoC-rps12</i>		<i>rps12-rps7</i>		<i>fusA-tuf</i>	
	-35	-10	-35	-10	-35	-10	-35	-10
PaWB-sdyz	TTGCAT	TATACC	–	–	ATAAAA	AAAAAAT	TTGTGA	TATATT
PaWB-fjtz	TTGCAT	TATACC	–	–	ATAAAA	AAAAAAT	TTGTGA	TATATT
LY-fjya1	TTGCAT	TATACC	–	–	ATAAAA	AAAAAAT	TTGTAA	TATATT
OY-M	TTGAAT	TATAAC	–	–	ATAAAA	AAAAAAT	TTGTGA	TATATT
AYWB	TTGCAT	TATACC	–	–	–	–	TTGTGA	TATTAT
PAa	TTGTAT	TTTAAT	–	–	–	–	TTGATA	TATATT
SLY	TTGTAT	TTTAAT	–	–	–	–	TTGATA	TATATT
AT	ATGATA	AATAAT	TTGACT	TATAAT	–	–	–	–
PG-8A	–	–	TTGACA	TATAAT	–	–	ATGATA	TATTGT

31个植原体株系 *fusA-tuf* 基因间区启动子保守区域特征序列与PaWB-sdyz株系一致, 分别为泡桐丛枝植原体株系PaWB-jsnj、-jssz1、-jssz2、-bjhr、-hnzz、-hnpy、-hnly、-hnsc、-ahhf、-jxnc、-hbdb、-lnd11、-lnd12、-sxt1、-sxt2、-sxxa1、-sxxa2、-sxwn (18个株系); 长春花绿变植原体株系PeV-hnhk (1个株系); 苦楝丛枝植原体株系CWB-hnsy1、-hnsy2、-fjtz1、-fjtz2、-fjtz3、-fjya、-jsnj、-hnsc、-jxnc、-gdgz (10个株系); 桑萎缩植原体株系MD-ahhf和-zjca (2个株系)。茼蒿黄化植原体株系LY-fjya2株系 *fusA-tuf* 基因间区启动子保守区域特征序列与LY-fjya1株系一致(于少帅等, 2016b)。

Characteristic sequences of conserved regions of *fusA-tuf* intergenic sequence of 31 phytoplasma strains are as same as PaWB-sdyz, including PaWB-jsnj, -jssz1, -jssz2, -bjhr, -hnzz, -hnpy, -hnly, -hnsc, -ahhf, -jxnc, -hbdb, -lnd11, -lnd12, -sxt1, -sxt2, -sxxa1, -sxxa2 and -sxwn (18 strains); PeV-hnhk (1 strains); CWB-hnsy1, -hnsy2, -fjtz1, -fjtz2, -fjtz3, -fjya, -jsnj, -hnsc, -jxnc, -gdgz (10 strains); MD-ahhf and -zjca (2 strains). Characteristic sequences of conserved regions of *fusA-tuf* intergenic sequence of LY-fjya2 strain are as same as LY-fjya1 strain (Yu et al, 2016b).

表5 部分植原体基因启动子保守区域不同位置核苷酸种类及出现频率
Table 5 Nucleotide and its frequency in different sites of conserved regions of some phytoplasma gene promoters

保守区域 Conserved region	-35区 -35 region						-10区 -10 region					
	A(10)	A(0)	A(8)	A(17)	A(25)	A(85)	A(10)	A(96)	A(8)	A(98)	A(19)	A(0)
序列特征 Sequence characteristic	T(90)	T(100)	T(0)	T(75)	T(6)	T(15)	T(90)	T(4)	T(92)	T(2)	T(73)	T(90)
	G(0)	G(0)	G(92)	G(0)	G(67)	G(0)	G(0)	G(0)	G(0)	G(0)	G(0)	G(0)
	C(0)	C(0)	C(0)	C(8)	C(2)	C(0)	C(0)	C(0)	C(0)	C(0)	C(8)	C(10)

-35区、-10区序列不同位置出现的核苷酸频率在碱基后括号中标出(%); 统计的植原体基因启动子个数n = 52。
Frequencies of nucleotide in different sites of -35 and -10 regions are listed in parentheses (%). Statistic numbers of phytoplasma gene promoters are n = 52.

表6 MLSA分析*rplL-tuf*核苷酸序列编码区同源比对Table 6 Homology matrix of *rplL-tuf* nucleotide sequence coding region in MLSA analysis

株系 Strain	PaWB-sdyz	PaWB-fjz	LY-fjya1	OY-M	AYWB	PAa	SLY	AT	PG-8A
PaWB-sdyz	100								
PaWB-fjz	99.7	100							
LY-fjya1	99.3	99.3	100						
OY-M	99.6	99.6	99.4	100					
AYWB	95.9	95.9	95.9	96.0	100				
PAa	81.1	81.1	81.2	81.1	81.1	100			
SLY	81.1	81.1	81.2	81.1	81.1	99.9	100		
AT	72.7	72.8	72.9	72.8	73.3	73.6	73.6	100	
PG-8A	71.2	71.3	71.4	71.3	71.4	71.3	71.3	70.9	100

图2 基于*rplL-tuf*核苷酸序列编码区整合序列构建的植原体系统发育树。图中代号见“1.1”和“1.2.3”。

Fig. 2 Phylogenetic tree of the phytoplasma strains reconstructed based on the concatenated gene sequences data set of *rplL-tuf* nucleotide sequence coding region. The codes in the figure were shown in “1.1” and “1.2.3”.

非编码区整合序列相似性为40.2–44.8%。基于植原体*rplL-tuf*基因间区非编码序列的多位点序列分析表明：16SrI-D亚组PaWB-fjz植原体株系以79%的

支持率单独聚于一支，16SrI-B亚组PaWB-sdyz、16SrI-B亚组OY-M、LY-fjya1共3个株系以86%的支持率单独聚于一个大的进化分支，与编码区的分析结果有出入；16SrXII组的两个株系PAa、SLY以99%的支持率单独聚于一支，与编码区的分析结果一致（表7，图3）。

基于8个植原体株系*rplL-tuf*基因编码的氨基酸序列RplL、RpoB、RpoC、Rps12、Rps7、FusA、TUF进行MLSA分析发现，8个植原体株系RplL-TUF氨基酸整合序列总长为4,063–4,107个氨基酸，相似性为69.0–99.8%；PG-8A株系与8株植原体株系RplL-TUF氨基酸整合序列相似性为70.4–75.1%。基于8个植原体株系RplL-TUF氨基酸整合序列构建的系统发育树表明：16SrI-D亚组PaWB-sdyz、PaWB-fjz株系以58%的支持率单独聚于一进化支，16SrI-B亚组的OY-M、LY-fjya1和16SrI-A亚组的AYWB分别单独聚于一支，支持率分别为96%、80%、100%，16SrXII组的两个株系PAa、

表7 MLSA分析*rplL-tuf*核苷酸序列非编码区同源比对Table 7 Homology matrix of *rplL-tuf* nucleotide sequence non-coding region in MLSA analysis

株系 Strain	PaWB-sdyz	PaWB-fjz	LY-fjya1	OY-M	AYWB	PAa	SLY	AT	PG-8A
PaWB-sdyz	100								
PaWB-fjz	99.3	100							
LY-fjya1	99.3	98.6	100						
OY-M	99.3	98.6	98.6	100					
AYWB	94.6	94.3	94.1	94.1	100				
PAa	71.9	71.8	71.3	72.3	73.2	100			
SLY	71.9	71.8	71.3	72.3	73.2	100	100		
AT	50.7	51.3	51.4	51.3	51.1	51.4	51.4	100	
PG-8A	41.8	41.3	41.5	41.8	41.3	40.2	40.2	44.8	100

图3 基于 *rplL-tuf* 核苷酸序列非编码区整合序列构建的植原体系统发育树。图中株系代号见正文“1.1”和“1.2.3”。
Fig. 3 Phylogenetic tree of the phytoplasma strains reconstructed based on the concatenated gene sequences data set of *rplL-tuf* nucleotide sequence non-coding region. The codes in the figure are shown in “1.1” and “1.2.3”.

SLY以100%的支持率单独聚于一支(表8, 图4)。

2.5 16SrI组植原体 *tuf* 基因上游序列启动子活性验证

研究发现16SrI组植原体 *fusA-tuf* 基因间区存在4种启动子变异类型, 实验验证表明PaWB-sdyz株系代表的变异类型TP1 (GenBank序列号: KU563013) 具有启动子活性(于少帅等, 2016b)。植原体株系CWB-hnsy1、LY-fjya1和PaWB-fjz分别代表16SrI组植原体 *fusA-tuf* 基因间区序列变异类型TP2、TP3和TP4 (于少帅等, 2016b)。用引物对TPf/TPr获取CWB-hnsy1、LY-fjya1植原体株系 *fusA-tuf* 基因间区序列129 bp、130 bp; 用引物对TP4f/TPr获取PaWB-fjz株系 *fusA-tuf* 基因间区序列130 bp。利用启动子探

针载体pSUPV4构建的融合表达体系检测表明: 在含30和50 mg/L Kan的LB平板上培养24 h后, 利用植原体CWB-hnsy1、LY-fjya1和PaWB-fjz株系 *fusA-tuf* 基因间区序列构建的融合表达体系在LB平板上均有明显的转化子产生, 挑取单菌落测序发现转化子中含有目的片段。因而判断3株植原体株系 *fusA-tuf* 基因间区具有启动子活性。

3 讨论

本研究扩增获取了我国3个植原体株系 *tuf* 基因上游近13 kb的序列, 不同植原体株系 *tuf* 与其上游6个基因的结构顺序一致(Oshima et al, 2004; Bai et al, 2006; Kube et al, 2008; Tran-Nguyen et al, 2008; Andersen et al, 2013)。PaWB-sdyz、PaWB-fjz、LY-fjya1、OY-M、AYWB、PAa、SLY等7个植原体株系 *fusA-tuf* 基因间区长为118–134 bp, 预测有完整的启动子结构, 启动子探针检测表明PaWB-sdyz(于少帅等, 2016b)、PaWB-fjz、LY-fjya1、CWB-hnsy1等16SrI组植原体 *fusA-tuf* 基因间区4种序列变异类型均具有启动子活性。由此推测, *tuf* 基因在16SrI组植原体中可以单独启动表达, 而不必与上游 *rps12*、*rps7*、*fusA* 基因一起构成操纵子。然而, Miyata等的研究推测表明洋葱黄化植原体OY株系 *tuf* 基因是与上游的 *rps12*、*rps7* 和 *fusA* 等3个基因一起构成了植原体的 *str* 操纵子(Miyata et al, 2002b), 但这一推断并未通过实验进行验证。因而我们推测由于植原体基因结构及其表达调控本身的复杂性(Salehi et al, 2017; Liu et al, 2017), 不同植原体 *tuf* 基因的转录表达调控存在不同的方式。在某些情况下,

表8 MLSA分析RplL-TUF蛋白氨基酸序列同源比对
Table 8 Homology matrix of RplL-TUF amino acid sequence in MLSA analysis

株系 Strain	PaWB-sdyz	PaWB-fjz	LY-fjya1	OY-M	AYWB	PAa	SLY	AT	PG-8A
PaWB-sdyz	100								
PaWB-fjz	99.6	100							
LY-fjya1	98.9	99.0	100						
OY-M	99.4	99.5	99.2	100					
AYWB	97.8	97.9	98.0	98.0	100				
PAa	83.8	83.9	84.1	83.9	83.7	100			
SLY	83.8	83.9	84.1	83.9	83.7	99.8	100		
AT	69.8	69.9	70.0	69.9	69.8	69.0	69.0	100	
PG-8A	74.9	75.1	74.9	75.0	74.8	74.1	73.9	70.4	100

图4 基于RplL-TUF氨基酸整合序列构建的植原体系统发育树。图中代号见正文“1.1”和“1.2.3”。

Fig. 4 Phylogenetic tree of the phytoplasma strains reconstructed based on the concatenated sequences data set of RplL-TUF amino acid sequence. The codes in the figure are shown in “1.1” and “1.2.3”.

植原体 tuf 基因可以不与 $rps12$ 、 $rps7$ 、 $fusA$ 等上游基因一起转录,而是单独转录表达。关于植原体 tuf 基因及其与上游 $rplL$ 、 $rpoB$ 、 $rpoC$ 、 $rps12$ 、 $rps7$ 、 $fusA$ 基因的具体转录表达的详细调控过程,有待于相关研究进一步验证。

研究表明不同植原体质粒上和染色体DNA上不同基因的启动子在-35和-10位的特征序列核苷酸都有差异(Ishii et al, 2009)。在对PaWB-sdyz、PaWB-fjz、LY-fjya1、OY-M、AYWB、PAa、SLY、AT等8个植原体株系 $rplL-tuf$ 基因结构分析过程中,对具有完整启动子结构的启动子保守区域的-10区和-35区的特征序列进行了分析,同时结合之前已测序的我国不同地区、不同寄主的16SrI组植原体株系的 $fusA-tuf$ 基因间区序列进行统计分析,推测植原体基因启动子保守区域可能的序列模式为:-35区 $T_{90}T_{100}G_{92}T_{75}G_{67}A_{85}$, -10区 $T_{90}A_{96}T_{92}A_{98}T_{73}T_{90}$ 。已知-35区序列的功能是为RNA聚合酶的识别提供信号,为识别域;而-10区序列允许复合体由闭合转变为开放,为解旋域。由于破坏A-T碱基对使双链分离需要的能量小于G-C碱基对,故-10区的共有序列对主要为AT(李明刚, 2004)。Ishii等(2009)对洋葱黄化植原体野生株系OY-M和其变异株系非虫传株系OY-NIM质粒ORF1、ORF2基因启动子保守区域的-10区和-35区的特异序列进行了预测分析,并与OY-M株系16S rRNA、 Amp 基因启动子保守区域的-10区和-35区的特异序列对比分析,各启动子保守

区域特征序列为OY-M ORF1:-35区TTCAAT, -10区TATTGA; OY-M ORF2:-35区TTTATA, -10区TTAATT; OY-NIM ORF1:-35区CTTAAT, -10区TATTGA; OY-M 16S rDNA:-35区TTGAAA, -10区TATAAT; OY-M Amp :-35区TTGTTA, -10区TATAAT。由此发现植原体不同株系、不同功能基因启动子保守区域-35区和-10区的特征序列有所差异。但是,由于统计分析研究中所涉及的已验证确切功能的启动子数量有限,难以较为系统、全面地揭示植原体启动子保守区域的序列特征,因此,本研究所得到的植原体启动子保守区域可能的序列模式在植原体不同基因启动子中是否具有普遍性和代表性,还有待于后期通过生物信息学方法对大量植原体不同基因或操纵子启动子保守区域进行预测和功能验证分析。

充分的研究已揭示大肠杆菌基因启动子-35区、-10区序列模式为:-35区 $T_{85}T_{83}G_{81}A_{61}C_{69}A_{52}$, -10区 $T_{89}A_{89}T_{50}A_{65}A_{100}$ (朱玉贤和李毅, 2002)。由此可见植原体与大肠杆菌的启动子保守区域结构保守序列碱基既有共同的特征,也存在一定的差异。模式序列的-35区存在两个碱基差异,碱基T颠换为A,碱基G颠换为C;-10区有一个碱基的差异,碱基T颠换为A。由于原核细胞中只有一种RNA聚合酶参与转录过程,细菌基因的转录起始频率直接与启动子序列的结构差异有关;可能这种差异反映到某个启动子序列与共有序列的同源程度方面,如果同源程度低则起始频率会低(杨业华, 2008)。植原体不同株系不同功能基因启动子保守区域序列及其与大肠杆菌启动子保守区域序列模式、非固醇甾原体部分相同基因启动子保守区域序列存在的碱基差异,必定影响不同细菌、不同基因在细菌不同生活阶段、不同环境下的表达及其表达效率,从而达到适应各自不同生态环境的目的(朱玉贤和李毅, 2002; Du et al, 2014; Zhang et al, 2014)。

基于 $rplL-tuf$ 共7个基因、其对应的氨基酸序列RplL、RpoB、RpoC、Rps12、Rps7、FusA、TUF及其6个基因间区序列 $rplL-rpoB$ 、 $rpoB-rpoC$ 、 $rpoC-rps12$ 、 $rps12-rps7$ 、 $rps7-fusA$ 、 $fusA-tuf$ 的MLSA分析可准确、清晰地PaWB-sdyz等8个植原体株系和1个非固醇甾原体株系区分。根据序列相似性、系统发育树拓扑结构和支持率可知,与 $rplL-tuf$ 核苷酸编码区相比,不同植原体株系 $rplL-tuf$ 核苷酸非编码

区变异水平较高, 相似性范围幅度较大。不同植原体株系 *rplL-tuf* 核苷酸编码区和 *RplL-TUF* 氨基酸序列相似性略有差异, *RplL-TUF* 氨基酸序列变异水平相对较高。除了基于 *RplL-TUF* 氨基酸序列构建的系统发育树的 AT 株系外, 不同类型序列构建的系统发育树遗传距离有所差异, 拓扑结构基本一致。已有研究证据显示, 以山东兖州株系 PaWB-sdyz 为代表的泡桐丛枝植原体优势株系与福建福州株系 PaWB-fjz 间有显著的遗传分化现象, 后者引起的症状、16SrDNA、许多持家基因及质粒 DNA 序列都发生了明显的变异(任争光, 2014; 王圣洁, 2017)。基于 *rplL-tuf* 编码区序列 MLSA 山东兖州株系 PaWB-sdyz 为代表的泡桐丛枝植原体优势株系与福建福州株系 PaWB-fjz 的亲缘关系仍最相近, 然而基于非编码序列的 MLSA 福建福州株系 PaWB-fjz 却以较高的支持率聚为单独的一支, 相反 PaWB-sdyz 株系却与 LY-fjya1、OY-M 聚为一支。因而推断仅用有限非编码序列可能难以准确反映植原体株系间的系统进化和亲缘关系远近; 非编码区的更高的变异频率, 更可能与地理、生态隔离导致的中性突变有关。所以根据目前的研究结果来看, 基于 *rplL-tuf* 基因簇核苷酸编码区构建的系统发育树可将不同组别、不同亚组的植原体株系以较高的支持率清晰地区分, 并且可将同为 16SrI-B 亚组不同寄主的植原体株系清晰地分开。由此可知, 基于 *rplL-tuf* 基因簇核苷酸编码区序列的 MLSA 分析可在 16S rRNA、*rp* 等基因分类鉴定的基础上, 作为一种可能的手段用于不同地区不同寄主植原体株系遗传分化研究中, 以揭示植原体更为丰富、细腻的遗传变异规律和系统进化关系, 为植原体鉴定、分类及其相关病害的流行监控、防治管理等提供一种较为有效的参考手段。

参考文献

- Andersen MT, Liefing LW, Havukkala I, Beever RE (2013) Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of '*Candidatus* phytoplasma australiense' reveals genome plasticity. *BMC Genomics*, 14, 529.
- Bai XD, Zhang JH, Ewing A, Miller SA, Radek AJ, Shevchenko DV, Tsukerman K, Walunas T, Lapidus A, Campbell JW, Hogenhout SA (2006) Living with genome instability: The adaptation of phytoplasma to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188, 3682–3696.
- Du HT, Zhu HY, Wang JM, Zhao W, Tao XL, Ba CF, Tian YM, Su YH (2014) Single-nucleotide polymorphisms and activity analysis of the promoter and enhancer of the pig lactase gene. *Gene*, 545, 56–60.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.
- Ishii Y, Kakizawa S, Hoshi A, Maejima K, Kagiwada S, Yamaji Y, Oshima K, Namba S (2009) In the non-insect-transmissible line of onion yellows phytoplasma (OY-NIM), the plasmid-encoded transmembrane protein ORF3 lacks the major promoter region. *Microbiology*, 155, 2058–2067.
- Kube M, Schneider B, Kuhl H, Dandekar T, Heitmann K, Migdoll AM, Reinhardt R, Seemüller E (2008) The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus* phytoplasma mali'. *BMC Genomics*, 9, 306.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870–1874.
- Lee IM, Hammond RW, Davis RE, Gundersen DE (1993) Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma like organisms. *Phytopathology*, 83, 834–842.
- Li MG (2004) *Advanced Molecular Genetics*. Science Press, Beijing. (in Chinese) [李明刚 (2004) 高级分子遗传学. 科学出版社, 北京.]
- Liu Z, Zhang L, Xue C, Fang H, Zhao J, Liu M (2017) Genome-wide identification and analysis of MAPK and MAPKK gene family in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.). *BMC Genomics*, 18, 855.
- Miyata S, Furuki K, Oshima K, Sawayanagi T, Nishigawa H, Jung HY, Ugaki M, Namba S (2002a) Complete nucleotide sequence of the *S10-spc* operon of phytoplasma: Gene organization and genetic code resemble those of *Bacillus subtilis*. *DNA and Cell Biology*, 21, 527–534.
- Miyata S, Furuki K, Sawayanagi T, Oshima K, Kuboyama T, Tsuchizaki T, Ugaki M, Namba S (2002b) Gene arrangement and sequence of *str* operon of phytoplasma resemble those of *Bacillus* more than those of *Mycoplasma*. *Journal of General Plant Pathology*, 68, 62–67.
- Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung HY, Wei W, Suzuki S, Arashida R, Nakata D, Miyata S, Ugaki M, Namba S (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, 36, 27–29.
- Post LE, Nomura M (1980) DNA sequences from the *str* operon of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 255, 4660–4666.
- Ren ZG (2014) The Qualitative and Quantitative Detection and Identification of Several Important Phytoplasmas in China. Postdoctoral Research Report, Chinese Academy of Forestry, Beijing. (in Chinese with English abstract) [任争光 (2014) 我国几种重要植原体定性和定量检测鉴定研究. 博士后研究报告, 中国林业科学研究院, 北京.]

- Salehi M, Hosseini SAE, Salehi E, Bertaccini A (2017) Genetic diversity and vector transmission of phytoplasmas associated with sesame phyllody in Iran. *Folia Microbiologica*, 62, 99–109.
- Sanangelantoni AM, Tiboni O (1993) The chromosomal location of genes for elongation factor Tu and ribosomal protein *S10* in the cyanobacterium *Spirulina platensis* provides clues to the ancestral organization of the *str* and *S10* operons in prokaryotes. *Journal of General Microbiology*, 139, 2579–2584.
- Tran-Nguyen LTT, Kube M, Schneider B, Reinhardt R, Gibb KS (2008) Comparative genome analysis of ‘*Candidatus* phytoplasma australiense’ (subgroup *tuf*-Australia I; *rp*-A) and ‘*Ca. phytoplasma asteris*’ strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology*, 190, 3979–3991.
- Turner PC (translated by Liu JY, Liu WY) (2010) *Molecular Biology*, 3rd edn. Science Press, Beijing. (in Chinese) [特纳 (著), 刘进元, 刘文颖 (译) (2010) 分子生物学, 第3版. 科学出版社, 北京.]
- Wang SJ (2017) Establishment of Molecular Detection Technology and Genetic Diversity Analysis of Plant Phytoplasma in China. PhD dissertation, Chinese Academy of Forestry, Beijing. (in Chinese with English abstract) [王圣洁 (2017) 重要林木植原体分子检测技术的研发和遗传多样性研究. 博士学位论文, 中国林业科学研究院, 北京.]
- Yang YH (2008) *Molecular Biology of the Gene*. Higher Education Press, Beijing. (in Chinese) [杨业华 (2008) 基因. 分子生物学. 高等教育出版社, 北京.]
- Yu SS, Xu QC, Lin CL, Wang SJ, Tian GZ (2016a) Genetic diversity of phytoplasmas: Research status and prospects. *Biodiversity Science*, 24, 205–215. (in Chinese with English abstract) [于少帅, 徐启聪, 林彩丽, 王圣洁, 田国忠 (2016a) 植原体遗传多样性研究现状与展望. 生物多样性, 24, 205–215.]
- Yu SS, Lin CL, Pan J, Ren ZG, Piao CG, Wang LF, Guo MW, Tian GZ (2016b) Comparative analysis of structure, function and genetic variation of upstream sequences adjoining *tuf* gene in paulownia and jujube witches’-broom phytoplasmas. *Microbiology China*, 43, 1060–1069. (in Chinese with English abstract) [于少帅, 林彩丽, 潘皎, 任争光, 朴春根, 汪来发, 郭民伟, 田国忠 (2016b) 泡桐丛枝和枣疯病植原体 *tuf* 基因上游序列结构、功能和遗传变异比较分析. 微生物学通报, 43, 1060–1069.]
- Zhang Y, Han Q, Li C, Li W, Fan H, Xing Q, Yan B (2014) Genetic analysis of the TBX1 gene promoter in indirect inguinal hernia. *Gene*, 535, 290–293.
- Zhu YX, Li Y (2002) *Modern Molecular Biology*, 2nd edn. Higher Education Press, Beijing. (in Chinese) [朱玉贤, 李毅 (2002) 现代分子生物学, 第2版. 高等教育出版社, 北京.]
- Zurawski G, Zurawski SM (1985) Structure of the *Escherichia coli* *S10* ribosomal protein operon. *Nucleic Acids Research*, 13, 4521–4526.

(责任编辑: 刘杏忠 责任编辑: 时意专)