

黄化病槟榔园中 8 种植物植原体分子检测及其遗传变异分析

朱安娜^{1,2}, 于少帅^{2*}, 苏莉惠³, 刘丽², 宋薇薇², 阎伟^{2*}

1. 海南大学林学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院椰子研究所, 海南文昌 571339; 3. 云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 665099

摘要: 由植原体引起的槟榔黄化病是槟榔的一种毁灭性病害, 明确发病槟榔园中植原体遗传多样性及其自然寄主种类, 对于全面揭示该病害循环途径及流行规律具有重要意义。本研究对海南不同地区发病槟榔园中表现典型植原体病害症状的植物样品进行调查、采样, 利用植原体通用引物进行扩增测序, 揭示相关植原体株系的遗传变异规律与系统发育关系。结果表明: 从 6 个山黄麻丛枝样品中扩增到植原体 16S rRNA 和 *secA* 基因片段, 不同样品的 2 个基因序列均一致, 从 1 个苦楝丛枝样品中扩增到 16S rRNA 基因片段。基于 16S rRNA 基因序列比对分析表明, 山黄麻植原体与已报道山黄麻丛枝植原体序列相似性为 100%, 苦楝植原体与已报道苦楝丛枝植原体序列相似性为 100%。系统发育分析表明: 山黄麻丛枝植原体与 16Sr X X X II 组植原体株系聚于一个进化分支, 苦楝丛枝植原体与 16Sr I 组植原体株系聚于一个进化分支; 苦楝丛枝植原体与海南已报道槟榔黄化植原体 16S rDNA 序列相似性为 100%。及时清理发病槟榔园中苦楝等植原体自然寄主, 消除病源, 切断植原体的传播途径, 对于槟榔黄化病的有效防控至关重要。

关键词: 植原体; 槟榔黄化病; 自然寄主; 分子检测; 遗传多样性

中图分类号: S763.7 文献标识码: A

Molecular Detection and Genetic Variation of Phytoplasmas from Eight Plants in Garden of Areca Palm with Yellow Leaf Disease in China

ZHU Anna^{1,2}, YU Shaoshuai^{2*}, SU Lihui³, LIU Li², SONG Weiwei², YAN Wei^{2*}

1. College of Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Coconut Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wenchang, Hainan 571339, China; 3. College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er, Yunnan 665099, China

Abstract: Areca palm yellow leaf (AYL) disease caused by phytoplasma is a devastating disease of areca palm plantation. It is of great significance to clarify the genetic variation of phytoplasmas and the natural hosts in the garden of areca with yellow leaf diseases for the purpose of fully reveal the circulation path and epidemic law of the disease. In this study, the plant samples showing typical disease symptoms associated with phytoplasma were investigated and sampled from the diseased areca garden distributed in different areas of Hainan provinve, China. The target sequences of phytoplasma were amplified and sequenced with universal primers, revealing genetic variation and phylogeny of the phytoplasma. The results showed that 16S rRNA and *secA* gene fragments specific for phytoplasma was amplified from six plant sample of *Trema tomentosa*, which were all identical. The 16S rRNA gene fragment of phytoplasma was obtained from one plant sample of Chinaberry. Sequence analysis based on the 16S rRNA gene sequences indicated that the *T. tomentosa* witches'-broom phytoplasma (TtWB) strains identified in the study were in 100% similarity with TtWB phytoplasma reported previously. Chinaberry witches'-broom (CWB) phytoplasma strains identified in the study were in 100% similarity with CWB phytoplasma strains reported previously. Phylogenetic analysis indicated that TtWB phyto

收稿日期 2022-09-20; 修回日期 2022-10-31

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630152022007, No. 1630152022004); 海南省自然科学基金高层次人才项目 (No. 320RC743)。

作者简介 朱安娜 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 风景园林植物与应用。*通信作者 (Corresponding author): 阎伟 (YAN Wei), E-mail: andy206@126.com; 于少帅 (YU Shaoshuai), E-mail: hzuys@163.com。

plasma strains identified in the study were clustered into one evolutionary branch with the phytoplasmas belonging to 16Sr X X X II group, CWB phytoplasma strain identified in the study were clustered into one evolutionary branch with the phytoplasmas belonging to 16Sr I group. 16S rDNA sequence similarity of phytoplasma was 100% among the strains of CWB and AYL. It is perfectly important for effective prevention and control of areca palm yellow leaf disease to timely clean up the natural hosts of phytoplasma such as chinaberry in areca diseased garden, eliminating the infection source and cutting off the transmission routes of the phytoplasma.

Keywords: phytoplasma; areca palm yellow leaf disease; natural hosts; molecular detection; genetic variation

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.06.013

植原体 (phytoplasma) 是一类无细胞壁、寄生于植物韧皮部、难分离培养的原核致病菌^[1], 该致病菌于 1967 年由日本学者 DOI 等首次发现^[2]。由植原体引起的植物病害是一种毁灭性病害, 其引起的植物病害典型症状包括花变叶、黄化、丛枝、皱缩、小叶等^[3-4]。海南植原体病害种类较为丰富, 约占我国植原体病害的 1/4, 给海南当地农林产业和生态环境造成严重影响。植原体在海南危害的植物包括槟榔、橡胶、花生等, 其中由植原体引起的槟榔黄化病 (areca palm yellow leaf disease, AYL) 在海南发生范围广且危害严重^[5]。

槟榔 (*Areca cathecu* L.) 是一种极具观赏、药用价值的棕榈植物, 其特点是高大挺拔、容易栽植, 具有绿化、美化、净化、优化环境的作用^[6]。由植原体引起的槟榔黄化病是一种传染性极强, 导致产量降低的植物病害。我国槟榔黄化病首次发现于海南屯昌, 目前已经蔓延至琼海、万宁、定安等众多市 (县), 该病扩散速度快, 发病范围逐年扩大^[5]。早期金开璇等^[7]通过电镜和 DAPI 染色方法在感病组织中观察到植原体。此后, 其他学者相继通过 PCR 扩增、四环素注射等方法证实了植原体为引起槟榔黄化病的病原^[8-9]。

植原体病害以防为主, 明确植原体自然寄主、传播媒介等病害循环途径和病原传播载体, 找出其病害循环的薄弱环节, 对于精准制定该类病害的防控措施具有重要意义。目前海南槟榔黄化植原体及其病害传播媒介和扩散途径不清, 严重制约该病害的防控管理, 也给园林景观带来了严重影响。因此, 本研究开展槟榔黄化植原体自然寄主的分子检测及其遗传变异规律与系统发育关系分析。根据植原体病害典型症状特征, 对海南黄化病槟榔园中疑似植原体自然寄主进行调查、采样, 明确不同植物携带植原体情况及植原体遗传变异规律, 确定发病槟榔园中槟榔黄化植原体的自然寄主情况, 为制订切实可行、精准有效的槟

榔黄化病防控管理策略提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 根据植原体病害典型的症状特征, 对海南定安 (110°8'59.57"E, 19°34'33.56"N)、琼海 (110°23'3.06"E, 19°7'56.29"N) 黄化病槟榔园中疑似植原体病害植物进行调查、采样, 调查采样时间为 2021—2022 年, 采样部位为植物叶片组织, 同时采集健康植株样品作为阴性对照, 所有样品保存于 -20 °C, 备用。

1.1.2 主要试剂和仪器 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型)、2×PCR Master Mix 预混液购于天根生化科技公司 (北京) 有限公司, PCR 扩增引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 其他试剂均为国产分析纯。KZ-III-F 高速低温组织研磨仪购自武汉赛维尔生物科技有限公司, Biometra 070-851 型 PCR 仪购自德国耶拿公司, DYY-6C 型电泳仪购自北京六一仪器厂, Universal 320R 型高速冷冻离心机购自广州深华公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 称取 0.1 g 植物样品, 利用 CTAB 法提取样品总 DNA, 方法参照天根植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书, 并保存于 -20 °C 备用^[10]。

1.2.2 PCR 扩增 利用植原体通用引物 P1/P7 和 R16mF2/R16mR1 进行植原体 16S rRNA 基因 PCR 扩增, 利用 SecAFor1/SecARev3 进行植原体 *secA* 基因扩增, 引物扩增信息如表 1 所示。PCR 扩增模板为样品总 DNA。16S rRNA 基因第 1 轮 PCR 扩增条件: 94.0 °C 预变性 5 min; 94.0 °C 变性 30 s, 50.0 °C 退火 40 s, 72.0 °C 延伸 2 min, 72 °C 10 min, 共 35 个循环。第 1 轮 PCR 扩增产物稀释 50 倍后用作第 2 轮 PCR 扩模板, 16S rRNA 基因第 2 轮扩增条件: 94.0 °C 预变性 5 min; 94.0 °C 变性 30 s, 50.0 °C 退火 40 s, 72.0 °C 延伸 1 min

30 s, 72 °C 10 min, 共 35 个循环。*secA* 基因的 PCR 扩增反应条件为: 94.0 °C 预变性 5 min; 94.0 °C 变性 30 s, 53.0 °C 退火 40 s, 72.0 °C 延伸 1 min, 72 °C 10 min, 共 35 个循环。PCR 反应体系均为 50 μ L, 所得 PCR 扩增产物经过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测确定目的条带, 将 PCR 扩增产物送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

表 1 植原体扩增引物信息
Tab. 1 Information of primers used for phytoplasma amplification

引物 Prime	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火 温度 T _m /°C	参考 文献 Reference
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	50	[11]
P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	50	
R16mF2	CATGCAAGTCGAACGGA	50	[12]
R16mR1	CTTAACCCCAATCATCGAC	50	
SecAFor1	GARATGAAAACCTGGRGAAGG	53	[13]
SecARev3	GTTTTRGCAGTTCCTGTATNCC	53	

1.2.3 16S rRNA 与 *secA* 基因序列比对 将测序所获得的核苷酸序列用 DNAMAN 6.0 软件校正

编辑, 进行多重序列比对分析, 通过 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行比对分析, 与 GenBank 数据库中已知的植原体核苷酸序列进行比对分析。通过多重序列比对与 BLAST 比对明确不同植原体植株之间的相似性, 以山杜英衰退植原体 (登录号: OL689207) 为参考序列进行变异位点分析, 该序列长度为 1503 bp。

1.2.4 系统发育分析 利用 MEGA 7.0 软件基于 N-J 法 (neighbor-joining) 构建不同植原体株系的系统进化树。将自展值设为 1000, 揭示所获得的植原体与 GenBank 数据库中已收录植原体株系间的系统发育关系。将洋葱黄化植原体 (onion yellows phytoplasma, OY-M, AP006628)、翠菊黄化植原体 (aster yellow phytoplasma, CP000061)、苹果簇生植原体 (apple proliferation phytoplasma, CU469464)、葡萄黄化植原体 (*Ca. phytoplasma australiense*, AM422018)、草莓致死性黄化植原体 (strawberry lethal yellows phytoplasma, CP002548) 等植原体株系作为系统发育树的外类群, 其他植原体株系相关序列信息见表 2。

表 2 本研究采用的植原体相关序列
Tab. 2 Related sequences of phytoplasma used in the study

编号 Code	植原体株系 Phytoplasma strain	采集地 Collected site	16Sr 组 16Sr group	序列号 Accession No.	
				16S rDNA	<i>secA</i>
1	TtWB-DA18	中国海南定安	16Sr X X X II	OP237525	OP251138
2	TtWB-DA19	中国海南定安	16Sr X X X II	OP238459	OP251139
3	TtWB-DA20	中国海南定安	16Sr X X X II	OP256574	OP251140
4	TtWB-DA21	中国海南定安	16Sr X X X II	OP265745	OP267552
5	TtWB-DA22	中国海南定安	16Sr X X X II	OP265746	OP267553
6	TtWB-DA23	中国海南定安	16Sr X X X II	OP265747	OP267554
7	CWB-DA55	中国海南定安	16Sr I	OP257153	
8	chinaberry witches'-broom hnsy1	中国海南三亚	16Sr I	KP662119	
9	chinaberry witches'-broom hnsy2	中国海南三亚	16Sr I	KP662120	
10	<i>Brassica oleracea</i> phyllody	波兰	16Sr I	MK440287	
11	<i>Pisum sativum</i> yellows	波兰	16Sr I	MK440284	
12	<i>Lupinus angustifolius</i> phytoplasma	波兰	16Sr I	MK440282	
13	Chinese periwinkle phyllody	中国海南儋州	16Sr I	GU113146	
14	<i>Waltheria indica</i> virescence	中国海南定安	16Sr I	MW353909	
15	<i>Melochia corchorifolia</i> phyllody	中国海南	16Sr I	KX150461	
16	<i>Eryngium foetidum</i> witches'-broom	中国海南	16Sr I	GU113156	
17	<i>Beta vulgaris</i> phytoplasma	波兰	16Sr I	KU720554	
18	<i>Gynura crepidioides</i> phyllody	中国海南儋州	16Sr II	GU113158	
19	<i>Podocarpus nagi</i> fasciation	中国海南	16Sr II	KP027298	
20	<i>Capsicum chinense</i> little leaf	中国海南	16Sr II	JQ957928	
21	<i>Desmodium ovalifolium</i> witches'-broom	中国海南澄迈	16Sr II	MK956144	

续表 2 本研究采用的植原体相关序列
Tab. 2 Related sequences of phytoplasma used in the study (continued)

编号 Code	植原体株系 Phytoplasma strain	采集地 Collected site	16Sr 组 16Sr group	序列号 Accession No.	
				16S rDNA	secA
22	periwinkle yellows	中国海南	16Sr V	EU375835	
23	<i>Ca. Phytoplasma mali</i>		16Sr X	X68375	
24	Malaysian periwinkle virescence	马来西亚	16Sr X X X II	EU371934	
25	<i>Elaeocarpus sylvestris</i> ' decline ESDP-JS2		16Sr X X X II	OL689207	
26	<i>E. sylvestris</i> decline ESDP-JS1		16Sr X X X II	OL689206	
27	<i>E. sylvestris</i> decline ESDP-JJ3		16Sr X X X II	OL689205	
28	<i>E. sylvestris</i> decline ESDP-JJ2		16Sr X X X II	OL689204	
29	<i>E. sylvestris</i> decline ESDP-001		16Sr X X X II	MW553140	
30	onion yellows OY-M	日本	16Sr I	AP006628	AP006628
31	aster yellow phytoplasma	美国	16Sr I	CP000061	CP000061
32	apple proliferation phytoplasma	德国	16Sr X	CU469464	CU469464
33	<i>Ca. Phytoplasma australiense</i>	澳大利亚	16Sr X II	AM422018	AM422018
34	strawberry lethal yellows phytoplasma	新西兰	16Sr X II	CP002548	CP002548
35	sesame phyllody	泰国	16Sr II		JN977039
36	<i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i>	印度	16Sr II		MH816939
37	<i>Ca. Phytoplasma vitis</i>	塞尔维亚	16Sr V		KJ462037
38	<i>Ca. Phytoplasma vitis</i> strain FD-C	法国	16Sr V		KJ462039
39	<i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> MKS 06	印度	16Sr VI		KY228385
40	<i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> MKS 07	印度	16Sr VI		KY073129
41	<i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> MKS 04	印度	16Sr VI		KY064175
42	<i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> VP-03	印度	16Sr VI		KX784498
43	<i>Fraxinus americana</i> ash yellows	美国	16Sr VII		KJ462046
44	<i>Trema tomentosa</i> witches'-broom	中国	16Sr X X X II		MW139904
45	<i>E. sylvestris</i> decline		16Sr X X X II		OL689202
46	<i>E. sylvestris</i> decline phytoplasma strain ESDP-JS1		16Sr X X X II		OL689201
47	<i>E. zollingeri</i> yellows phytoplasma		16Sr X X X II		LC257973

2 结果与分析

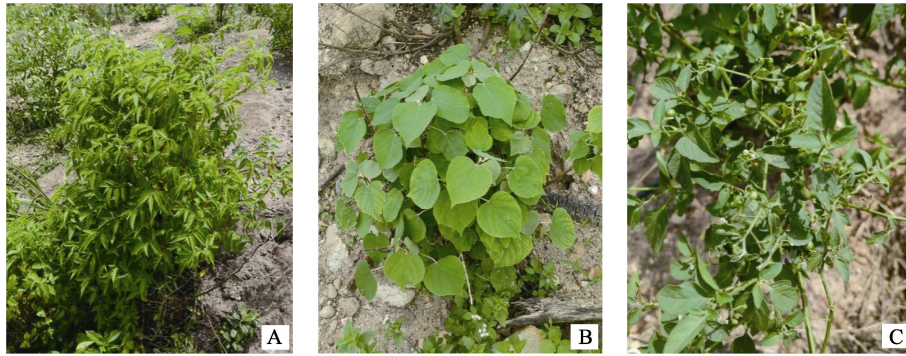
2.1 疑似植原体病害植物调查

对海南定安、琼海的黄化病槟榔园中疑似植原体病害植物进行调查、采样，共采集 8 种植物 45 份疑似植原体病害植物样品，样品包括苦楝、

龙葵、山黄麻、藿香蓟、野苘蒿、黄皮、白背叶、鬼针草；样品表现的疑似植原体病害典型症状包括丛枝、黄化、小叶及叶片皱缩等。采集的疑似植物植原体病害样品信息见表 3，疑似植物植原体病害症状如图 1 所示。

表 3 疑似植原体病害植物样品信息
Tab. 3 Sample information of suspected phytoplasma diseases

植物寄主 Plant host	拉丁学名 Latin name	采样量 Sampling amount	症状 Symptom	采集地 Sampling site
苦楝	<i>Melia azedarach</i> L.	9	丛枝	定安
龙葵	<i>Solanum nigrum</i> L.	4	小叶、叶片皱缩	定安
山黄麻	<i>Trema tomentosa</i> (Roxb.) Hara	9	丛枝	定安
藿香蓟	<i>Ageratum conyzoides</i> L.	6	丛枝	定安
野苘蒿	<i>Crassocephalum crepidioides</i>	3	丛枝	定安
黄皮	<i>Clausena lansium</i>	3	叶片皱缩	定安
白背叶	<i>Mallotus apelta</i>	8	黄化	定安
鬼针草	<i>Bidens pilosa</i> L.	3	黄化	琼海



A: 山黄麻 (丛枝); B: 白背叶 (黄化); C: 龙葵 (小叶、叶片皱缩)。60 mm×50 mm (300×300 DPI)。

A: *Trema tomentosa* (witches'-broom); B: *Mallotus apelta* (yellows); C: *Solanum nigrum* (leaflet, leaf crinkle). 60 mm×50 mm (300×300 DPI).

图 1 黄化病槟榔园中疑似植物植原体病害症状

Fig. 1 Suspected plant disease symptoms associated with phytoplasmas in garden of areca with yellow leaf disease

2.2 PCR 扩增及病原检测

利用通用引物 P1/P7、SecAFor1/SecARev3 分别进行 PCR 扩增, 在 6 个山黄麻样品中分别扩增到约 1.8、0.6 kb 的目的条带, 其他样品中未扩增到。利用通用引物 R16mF2/R16mR1 进行巢氏 PCR 扩增, 在 1 个苦楝样品检测到约 1.4 kb 的目的条带, 其余样品均未扩增到。通过目的条带测序, 在 6 个山黄麻丛枝样品中均获得植原体 16S rDNA 序列和 *secA* 基因序列。6 个山黄麻植原体株系的 16S rDNA 序列一致, 经测序所得序列长度均为 1425 bp; *secA* 基因序列也一致, 测序所得序列长度均为 595 bp。基于 16S rDNA 序列多重比对分析表明: 所得山黄麻植原体与已报道的山黄麻丛枝植原体株系 (MW138004) 序列相似性为 100%。这 6 个山黄麻丛枝植原体株系分别为 TtWB-DA18、TtWB-DA19、TtWB-DA20、TtWB-DA21、TtWB-DA22 和 TtWB-DA23。在 1 个苦楝丛枝样品中扩增到植原体 16S rDNA 序列, 测序所得序列长度为 1122 bp。基于该序列比对分析表明: 所得苦楝植原体与海南三亚已报道苦楝丛枝植原体 (KP662119; KP662120) 序列相似性为 100%, 该苦楝丛枝植原体株系为 CWB-DA55。

2.3 序列变异分析

基于 16S rDNA 序列比对分析表明, 本研究中苦楝丛枝植原体与 16Sr I 组的苦楝丛枝植原体 hnsy1 (KP662119)、苦楝丛枝植原体 hnsy2 (KP662120)、马松子绿变植原体 (KX150461) 等序列相似性均为 100%, 与其他组植原体株系的序列相似性均低于 99.8% (表 4)。基于 *secA* 基因序列比对分析表明, 本研究中山黄麻丛枝植原体与 16Sr X X X II 组的山黄麻丛枝植原体 (MW

139904)、山杜英衰退植原体 (OL689202) 序列相似性分别为 100%、99.1%, 与其他组植原体株系的相似性均低于 86% (表 5)。基于 *SecA* 氨基酸序列比对分析表明, 本研究中山黄麻丛枝植原体与 16Sr X X X II 组的山黄麻丛枝植原体 (MW 139904)、山杜英衰退植原体 (OL689202) 序列相似性分别为 100%、98.5% (表 6)。由此可知, 不同植原体株系间氨基酸序列的变异水平较高。基于 16S rDNA 序列的遗传变异分析表明, 本研究中山黄麻丛枝植原体与山杜英衰退植原体 (OL689207) 共存在 5 个变异位点, 分别在 67 位、102 位、1088 位、1277 位、1446 位 (表 7)。

2.4 系统发育分析

基于 16S rRNA 基因的系统发育分析表明 (图 2), 山黄麻丛枝植原体与马来西亚长春花绿变 (EU371934)、山杜英衰退植原体 (OL689207) 等 16Sr X X X II 组植原体聚于同一个进化分支, 支持率为 90%。苦楝丛枝植原体与海南长春花绿变植原体株系 (GU113146)、蛇婆子绿变植原体株系 (MW353909)、马松子绿变植原体 (KX150461)、刺芫荽丛枝植原体 (GU113156) 等 16Sr I 组植原体聚于同一个进化分支, 支持率为 95%。基于 *secA* 基因序列系统发育分析表明 (图 3), 本研究所得山黄麻丛枝植原体与已报道的山黄麻丛枝植原体 (MW139904)、山杜英衰退植原体 (OL689202) 等 16Sr X X X II 组植原体聚于同一个进化分支, 支持率为 100%。基于 *SecA* 氨基酸系统发育分析表明 (图 4), 山黄麻丛枝植原体与已报道的山黄麻丛枝植原体 (MW139904)、山杜英黄化植原体 (LC257973) 等 16Sr X X X II 组植原体聚于同一个进化分支, 支持率为 100%。

表 5 不同植原体 *secA* 基因序列相似性
Tab. 5 Similarity of *secA* gene sequences different phytoplasmas

编号 Code	1	2	3	4	5	6	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	30	31	32	33	34	
1	100.0																								
2	100.0	100.0																							
3	100.0	100.0	100.0																						
4	100.0	100.0	100.0	100.0																					
5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0																				
6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0																			
35	79.5	79.5	79.5	79.5	79.5	79.5	100.0																		
36	79.3	79.3	79.3	79.3	79.3	79.3	99.8	100.0																	
37	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	80.0	79.9	100.0																
38	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2	80.2	80.0	98.9	100.0															
39	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9	81.1	81.0	87.2	86.6	100.0														
40	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9	81.1	81.0	87.2	86.6	100.0	100.0													
41	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9	81.1	81.0	87.2	86.6	100.0	100.0	100.0												
42	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9	85.9	81.1	81.0	87.2	86.6	100.0	100.0	100.0	100.0											
43	82.8	82.8	82.8	82.8	82.8	82.8	78.6	78.4	86.4	86.4	85.9	85.9	85.9	85.9	100.0										
44	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	79.5	79.3	82.1	82.2	85.9	85.9	85.9	85.9	82.8	100.0									
45	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	79.7	79.5	82.1	82.2	86.3	86.3	86.3	86.3	83.0	99.1	100.0								
46	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	79.7	79.5	82.1	82.2	86.3	86.3	86.3	86.3	83.0	99.1	100.0	100.0							
47	98.7	98.7	98.7	98.7	98.7	98.7	79.3	79.1	81.3	81.5	85.5	85.5	85.5	85.5	82.2	98.7	99.3	99.3	100.0						
30	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.0	69.0	71.8	71.2	70.7	70.7	70.7	70.7	69.4	69.4	69.4	69.4	69.0	100.0					
31	70.1	70.1	70.1	70.1	70.1	70.1	68.5	68.5	70.7	70.3	70.9	70.9	70.9	70.9	70.0	70.1	70.0	70.0	69.6	96.2	100.0				
32	77.1	77.1	77.1	77.1	77.1	77.1	75.5	75.5	78.4	78.6	80.2	80.2	80.2	80.2	78.6	77.1	76.9	76.9	76.6	71.1	71.4	100.0			
33	73.1	73.1	73.1	73.1	73.1	73.1	72.0	72.0	75.1	74.9	74.5	74.5	74.5	74.5	72.5	73.1	73.1	73.1	72.7	78.9	78.6	74.4	100.0		
34	73.1	73.1	73.1	73.1	73.1	73.1	72.0	72.0	75.1	74.9	74.5	74.5	74.5	74.5	72.5	73.1	73.1	73.1	72.7	78.9	78.6	74.2	99.6	100.0	

注：本表中的编号信息见表 2。
Note: Information of codes in the table was indicated in Tab. 2.

表 6 不同植原体 SecA 氨基酸序列相似性
Tab. 6 Similarity of SecA amino acids sequences of different phytoplasmas

编号 Code	1	2	3	4	5	6	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	30	31	32	33	34	%
1	100.0																								
2	100.0	100.0																							
3	100.0	100.0	100.0																						
4	100.0	100.0	100.0	100.0																					
5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0																				
6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0																			
35	72.1	72.1	72.1	72.1	72.1	72.1	100.0																		
36	72.1	72.1	72.1	72.1	72.1	72.1	99.5	100.0																	
37	77.2	77.2	77.2	77.2	77.2	77.2	72.8	72.8	100.0																
38	77.3	77.3	77.3	77.3	77.3	77.3	73.2	73.2	98.4	100.0															
39	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2	74.1	74.1	83.2	83.5	100.0														
40	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2	74.1	74.1	83.2	83.5	100.0	100.0													
41	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2	74.1	74.1	83.2	83.5	100.0	100.0	100.0												
42	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2	74.1	74.1	83.2	83.5	100.0	100.0	100.0	100.0											
43	74.7	74.7	74.7	74.7	74.7	74.7	68.3	68.3	80.4	79.6	77.4	77.4	77.4	77.4	100.0										
44	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	71.8	71.8	77.2	77.3	82.1	82.1	82.1	82.1	74.7	100.0									
45	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	72.6	72.6	77.7	77.8	82.7	82.7	82.7	82.7	75.8	98.5	100.0								
46	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	72.6	72.6	77.7	77.8	82.7	82.7	82.7	82.7	75.8	98.5	100.0	100.0							
47	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0	72.1	72.1	76.1	76.3	81.2	81.2	81.2	81.2	74.2	97.9	98.5	98.5	100.0						
30	66.5	66.5	66.5	66.5	66.5	66.5	65.5	65.5	66.3	67.0	69.0	69.0	69.0	69.0	64.0	66.2	66.5	66.5	66.5	100.0					
31	67.0	67.0	67.0	67.0	67.0	67.0	65.0	65.0	65.8	66.5	68.5	68.5	68.5	68.5	63.4	66.7	67.0	67.0	66.0	97.5	100.0				
32	67.0	67.0	67.0	67.0	67.0	67.0	67.5	67.5	67.4	68.0	70.6	70.6	70.6	70.6	67.2	66.7	67.0	67.0	66.0	72.6	71.6	100.0			
33	68.0	68.0	68.0	68.0	68.0	68.0	68.0	68.0	71.2	71.6	70.6	70.6	70.6	70.6	65.6	67.7	68.5	68.5	68.0	81.2	81.2	71.6	100.0		
34	68.5	68.5	68.5	68.5	68.5	68.5	68.5	68.5	71.7	72.2	71.1	71.1	71.1	71.1	66.1	68.2	69.0	69.0	68.5	81.2	81.2	71.6	99.0	100.0	

注：本表中的编号信息见表 2。
Note: Information of codes in the table was indicated in Tab. 2.

表 7 山黄麻丛枝植原体的 16S rRNA 及基因间区片段中的变异位点分析
 Tab. 7 Polymorphic nucleotide sites in 16S rRNA gene and intergenic region fragment of *T. tomentosa* witches'-broom phytoplasma

植原体株系 Phytoplasma strain	组别 Group	变异位点 Polymorphic site				
		16S rDNA				16S~23S rDNA 基因间区 16S~23S rDNA intergenic region
		67	102	1088	1277	1446
山杜英衰退植原体 ESDP-JS2	16Sr X X X II	G	G	C	C	T
山黄麻丛枝植原体 TtWB-DA18	16Sr X X X II	A	A	T	T	C

注：以山杜英衰退植原体株系 ESDP-JS2 (OL689207) 为参考序列，该序列长度为 1503 bp，显示与参考序列中的核苷酸差异。
 Note: The *Elaeocarpus sylvestris* decline phytoplasma strain (OL689207) with the length of 1303 bp was used as a consensus sequence. The length of the sequence is 1503 bp, which is different from the nucleotide in the reference sequence.

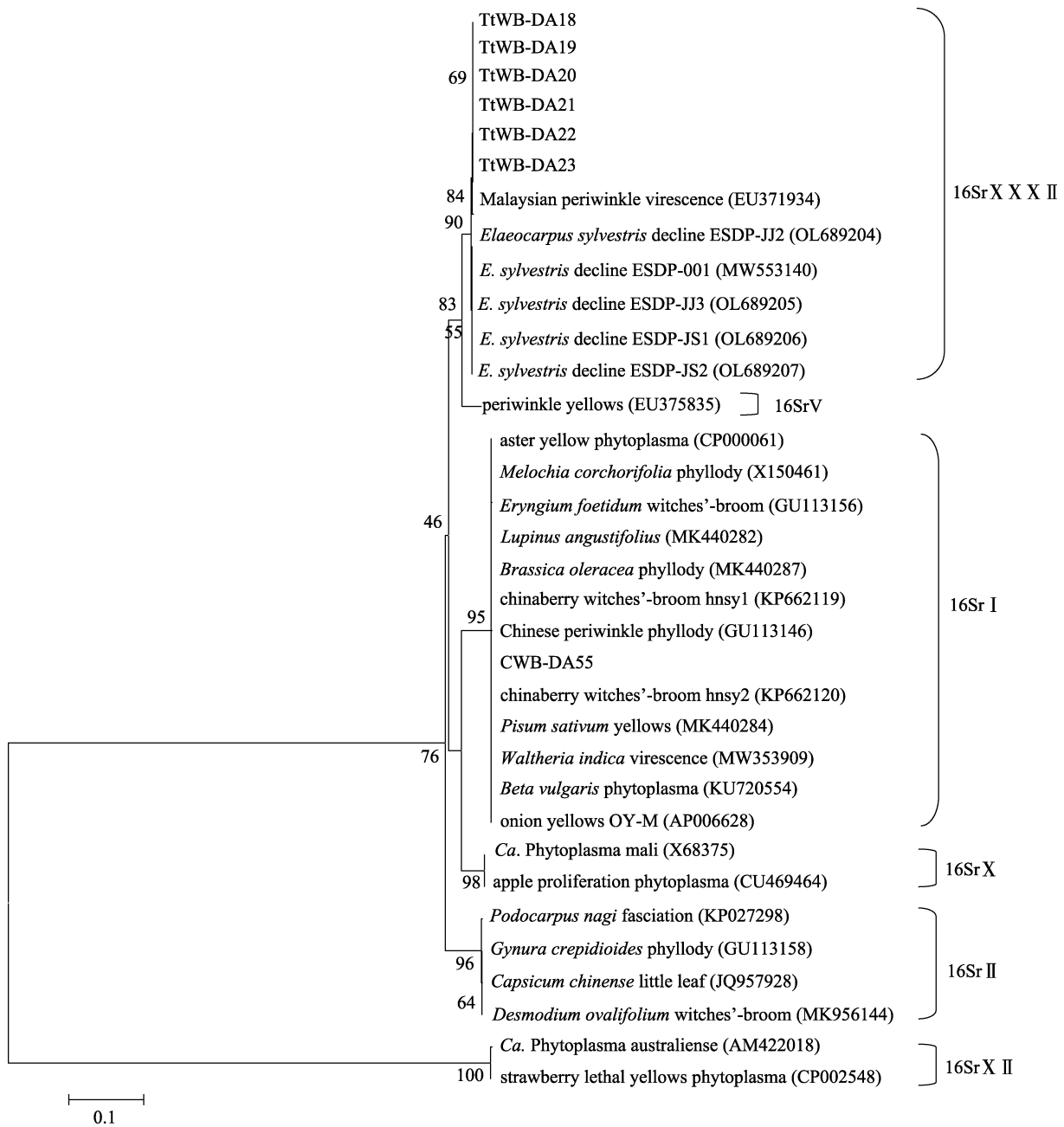


图 2 不同植原体株系基于 16S rRNA 基因序列系统发育树
 Fig. 2 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequences of different phytoplasma strains

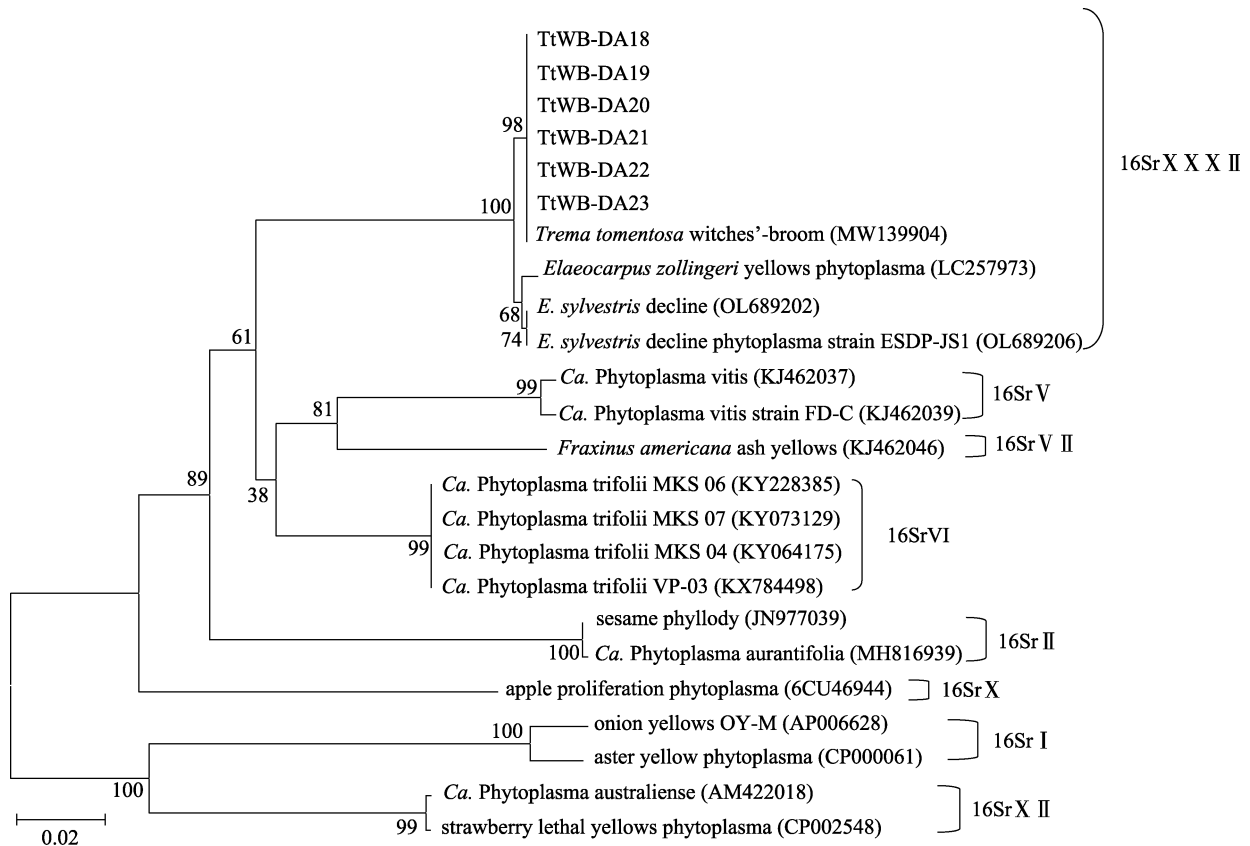


图 3 不同植原体株系基于 *SecA* 基因序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on *secA* gene sequences of different phytoplasma strains

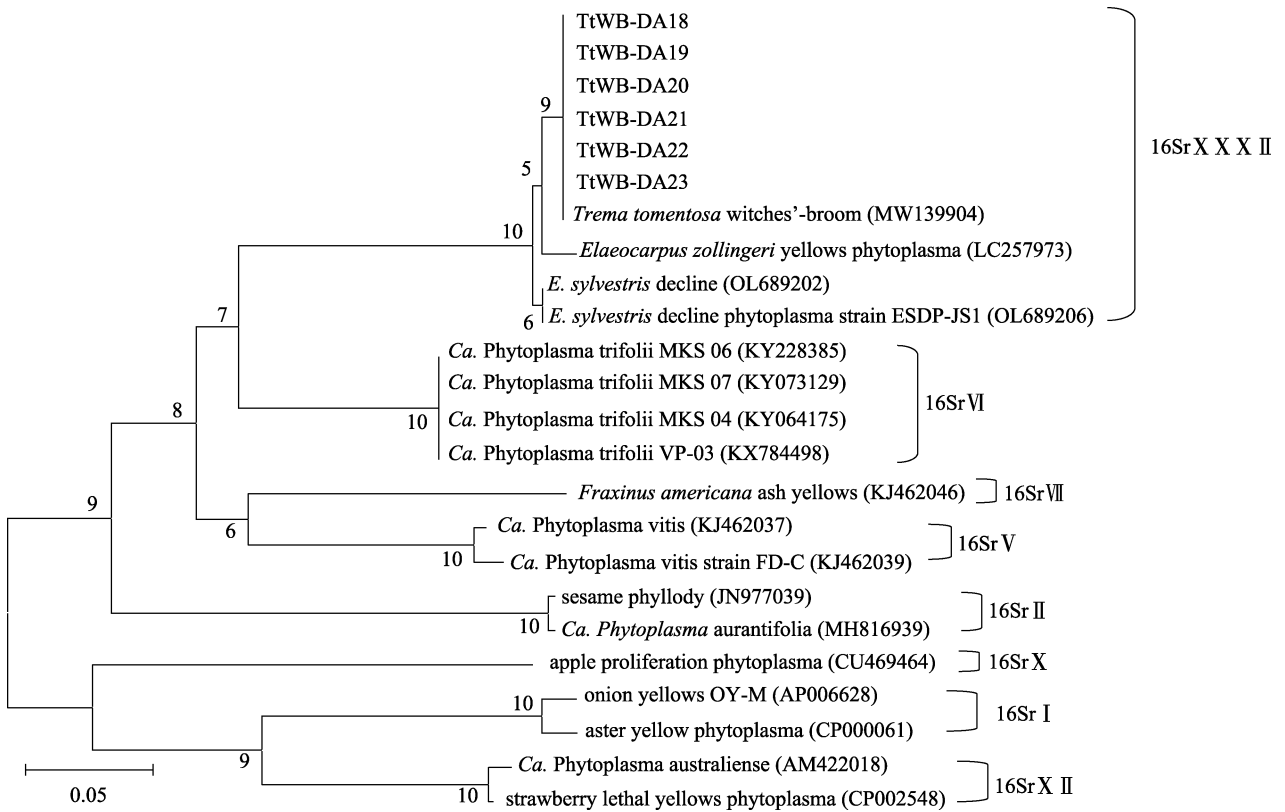


图 4 不同植原体株系基于 *SecA* 氨基酸序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed based on *SecA* amino acids sequences of different phytoplasma strains

3 讨论

本研究在表现黄化病的槟榔园中检测到 16Sr X X X II 组山黄麻丛枝植原体和 16Sr I 组苦楝丛枝植原体。因植原体难分离培养, 导致其检测较为困难。随着分子生物学技术的不断发展, 植原体病害的诊断与检测也在不断进步。在植原体的检测中, 16S rDNA 序列分析可以很好地说明植原体间的遗传变异规律和系统发育关系。目前, 学者将植原体分为 49 个组^[14]。经比较发现本研究中苦楝丛枝植原体与陈健鑫等^[15]报道的滇朴丛芽植原体云南株系、车海彦等^[16]报道的海南长春花绿变植原体株系均属于 16Sr I 组植原体, 且变异程度较小。进一步深入研究苦楝丛枝植原体和滇朴丛芽植原体、长春花绿变植原体之间的遗传变异规律还需从多个基因进行探究。本研究中的山黄麻丛枝植原体与墨西哥长春花绿变植原体、前期研究^[10]报道的海南山黄麻海南株系同属于 16Sr X X X II 组植原体, 变异程度不大。万琼莲等^[17]报道的云南羽脉山黄麻丛枝植原体属于 16Sr I - X 亚组。本研究与前期研究^[10]报道采用的引物不同, 本研究扩增出来的序列片段除了 16S rDNA, 还包括 16S-23S rDNA 基因间区序列, 揭示了本组植原体相对更多的序列信息, 为后续研究这类植原体提供参考。

植原体不同 DNA 序列的扩增效率存在差异。本研究从苦楝丛枝植原体中扩增获得 1122 bp 的 16S rDNA 基因片段, 但 *secA* 基因未扩增出, 可能是植原体总 DNA 浓度低, 扩增效率较低导致。郑文虎^[18]报道了海南长春花小叶病植原体 *secA* 和 *secY* 基因, 苏帆等^[19]报道了云南芝麻丛枝和花变叶植原体 16S rRNA 和 *rp* 基因, 杨静宇^[20]报道了海南竹柏扁枝植原体 16S rRNA、*tuf* 基因。相同植物寄主植原体种类也存在多样性。国外研究的苦楝植原体也有相关报道, 如 GALDEANO 等^[21]和 ARNEODO 等^[22]通过研究阿根廷的苦楝丛枝植原体株系, 发现二者均属于 16Sr VIII 组, 症状类型表现为黄化和衰退, 与本研究检测的苦楝丛枝症状有相同之处, 但 16Sr 组存在差异。本研究发现白背叶、藿香蓟、野苘蒿等样品也表现典型植原体病害症状, PCR 反应也扩增到特异性条带, 但测序后经过 BLAST 发现并不是植原体而是植物的叶绿体。由此可见, 植原体的检测受多种因素影响。为更方便快捷开展此类难培养微生物的检测

诊断工作, 需要专研出一种高效、快速、灵敏度高的检测技术以满足不同寄主的需求, 目前已有槟榔黄化植原体等相关快速可视化检测技术的报道^[23]。

植原体自然寄主的多样性有助于其相关病害的传播扩散。海南地处热带, 自然资源丰富, 由于夏冬季节温度较高, 一些介体昆虫也会传播植原体病害^[24]。近年来, 人们对植原体的研究广泛, 其种类也日益增加, 不同的寄主也有利于传播植原体, 同组的变异水平不高, 由此推测植原体可能是通过同一种昆虫或者是同一中间寄主在不同环境下进行传播。如莴苣退绿植原体可被叶蝉传播^[25], 泡桐丛枝植原体可通过牛筋草、辣椒、花生等 7 种自然寄主传播^[26]。由于自然寄主引起的相关植物黄化、小叶、丛枝等症状, 喷洒农药、施肥、采取建造水肥调节一体化等措施及时清理植原体传染的源头, 有利于减少中间寄主^[27]。由于目前槟榔黄化病病害传播媒介昆虫和扩散途径尚不明确, 对园林景观也造成了一定的影响。海南槟榔黄化植原体属于 16Sr I 组, 本研究的苦楝丛枝植原体也为 16Sr I 组, 进一步明确了槟榔园中植原体的自然寄主范围。由此可知, 及时清理苦楝等寄主植物, 可有效清除病源, 切断病原传播途径。海南作为我国槟榔主产地, 更需要有效防控该类病害, 减少中间寄主, 清除传染源头, 从而有效地减少或防止相关植原体传播。本研究利用分子生物学检测方法对该病害的带病自然寄主及其病原多样性进行检测分析, 基于检测结果, 及时清理槟榔病园内病树病草, 对于防止槟榔黄化病的大面积扩散起到重要作用。研究结果对于制订切实可行的海南槟榔黄化病防控管理策略具有重要意义。

参考文献

- [1] 于少帅, 徐启聪, 林彩丽, 王圣洁, 田国忠. 植原体遗传多样性研究现状与展望[J]. 生物多样性, 2016, 24(2): 205-215.
YU S S, XU Q C, LIN C L, WANG S J, TIAN G Z. Genetic diversity of phytoplasma: research status and prospects[J]. Biodiversity Science, 2016, 24(2): 205-215. (in Chinese)
- [2] DOI Y, TERANAKA M, YORA K, ASUYAMA H. Mycoplasma or PLT group like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches'-broom, aster yellows or paulownia witches'-

- broom[J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1967, 33(4): 259-266.
- [3] BAI X, ZHANG J, EWING A, MILLER S, RADEK A J, SHEVCHENKO D V, TSUKERMAN K, WALUNAS T, LAPIDUS A, CAMPBELL J W, HOGENHOUT S A. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(10): 3682-3696.
- [4] GAO R, WANG J, ZHU T S, JIA X, LI X D. Identification and molecular characterization of a phytoplasma associated with pomegranate fasciation disease[J]. Horticultural Plant Journal, 2018, 4(1): 30-34.
- [5] 车海彦, 吴翠婷, 符瑞益, 温衍生, 叶莎冰, 罗大全. 海南槟榔黄化病病原物的分子鉴定[J]. 热带作物学报, 2010, 31(1): 83-87.
CHE H Y, WU C T, FU R Y, WEN Y S, YE S B, LUO D Q. Molecular identification of from arecanut yellow leaf disease in Hainan[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2010, 31(1): 83-87. (in Chinese)
- [6] 刘敏. 云南省西双版纳棕榈科园林植物造景模式研究[D]. 昆明: 西南林业大学, 2011.
LIU M. The research of the palm plants landscape mode in Xishuangbaima of Yunnan province[D]. Kunming: Southwest Forestry University, 2011. (in Chinese)
- [7] 金开璇, 汪跃. 紫穗槐带化病中发现类菌原体(MLO)[J]. 植物病理学报, 1994, 24(1): 96-96.
JIN K X, WANG Y. A new fasciation disease of *Amorpha fruticosa* associated with mycoplasma-like organisms[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1994, 24(1): 96-96. (in Chinese)
- [8] 车海彦. 海南省植原体病害多样性调查及槟榔黄化病病原物的分子检测技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
CHE H Y. Diversity of phytoplasma disease and molecular detection of phytoplasma associated with arecanut yellow leaf in Hainan province[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2010. (in Chinese)
- [9] 周亚奎, 甘炳春, 张争, 隋春, 魏建和, 杨云, 杨新全. 利用巢式 PCR 对海南槟榔(*Areca catechu* L.)黄化病的初步检测[J]. 中国农学通报, 2010, 26(22): 381-384.
ZHOU Y K, GAN B C, ZHANG Z, SUI C, WEI J H, YANG Y, YANG X Q. Detection of the phytoplasmas associated with yellow leaf disease of *Areca catechu* L. in Hainan province of China by nested PCR[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(22): 381-384. (in Chinese)
- [10] 于少帅, 宋薇薇, 覃伟权. 海南槟榔黄化植原体分子检测及其系统发育关系研究[J]. 热带作物学报, 2021, 42(11): 3066-3072.
YU S S, SONG W W, QIN W Q. Molecular detection and phylogenetic relationship of areca palm yellow leaf phytoplasma in Hainan[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(11): 3066-3072. (in Chinese)
- [11] DENG S J, HIRUKI C. Amplification of 16S ribosomal-RNA genes from culturable and nonculturable mollicutes[J]. Journal of Microbiological Methods, 1991, 14(1): 53-61.
- [12] GUNDERSEN D E, LEE I M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs[J]. Phytopathologia Mediterranea, 1996, 35(3): 144-151.
- [13] HODGETTS J, BOONHAM N, MUMFORD R, HARRISON N, DICKINSON M. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S *rRNA* gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(8): 1826-1837.
- [14] BERTACCINI A, AROCHA-ROSETE Y, CONTALDO N, DUDUK B, FIORE N, MONTANO H G, KUBE M, KUO C H, MARTINI M, OSHIMA K, QUAGLINO F, SCHNEIDER B, WEI W, ZAMORANO A. Revision of the 'Candidatus Phytoplasma' species description guidelines[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2022, 72(4). doi: 10.1099/ijsem.0.005353.
- [15] 陈健鑫, 张宏雁, 魏玉倩, 洪英娣, 马焕成, 伍建榕. 滇朴丛芽病植原体的分子鉴定[J]. 植物保护, 2021, 47(2): 70-77.
CHEN J X, ZHANG H Y, WEI Y Q, HONG Y D, MA H C, WU J R. Molecular identification of *Celtis kunningensis* plexus bud phytoplasma[J]. Plant Protection, 2021, 47(2): 70-77. (in Chinese)
- [16] 车海彦, 郑文虎, 温衍生, 符瑞益, 罗大全. 海南长春花变叶病病原物的分子鉴定[J]. 热带作物学报, 2011, 32(3): 485-489.
CHE H Y, ZHENG W H, WEN Y S, FU R Y, LUO D Q. Molecular identification of the pathogen of periwinkle phyllody disease in Hainan[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(3): 485-489. (in Chinese)
- [17] 万琼莲, 王连春, 王泉, 许杏萍, 苏帆, 赵静, 蔡红. 羽脉山黄麻丛枝植原体的分子鉴定及病害调查[J]. 林业科学, 2021, 57(5): 195-201.
WAN Q L, WANG L C, WANG Q, XU X P, SU F, ZHAO J, CAI H. Molecular identification and disease investigation of *Trema levigata* witches'-broom phytoplasma[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2021, 57(5): 195-201. (in Chinese)
- [18] 郑文虎. 海南四种植原体病害病原的分子鉴定及长春花相关病害植原体质粒、*sec* 基因分析[D]. 海口: 海南大学,

2012.
ZHENG W H. Molecular identification of four phytoplasma diseases in Hainan province and periwinkle phytoplasma disease analysis of related genes[D]. Haikou: Hainan University, 2012. (in Chinese)
- [19] 苏帆, 杨子祥, 王柱华, 万琼莲, 何孟兰, 毛清源, 蔡红. 云南芝麻丛枝和花变叶植原体 16S rRNA 和 *rp* 基因序列分析[J]. 植物病理学报, 2021, 51(6): 888-897.
SU F, YANG Z X, WANG Z H, WAN Q L, HE M L, MAO Q Y, CAI H. Sequence analysis of 16S rRNA and *rp* genes of sesame witches'-broom and phyllody phytoplasma in Yunnan province[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2021, 51(6): 888-897. (in Chinese)
- [20] 杨静宇. 海南竹柏扁枝病病原分子生物学鉴定研究[D]. 海口: 海南大学, 2015.
YANG J Y. Molecular identification of a phytoplasma associated with *Podocarpus nagi* fasciation in Hainan[D]. Haikou: Hainan University, 2015. (in Chinese)
- [21] GALDEANO E, TORRES L E, MENEGUZZI N, GUZMAN F, GOMEZ G G, DOCAMPO D M, CONCI L R. Molecular characterization of 16S ribosomal DNA and phylogenetic analysis of two X-disease group phytoplasmas affecting China-tree (*Melia azedarach* L.) and Garlic (*Allium sativum* L.) in Argentina[J]. Journal of Phytopathology, 2004, 152(3): 174-181.
- [22] ARNEODO J D, MARINI D C, GALDEANO E, MENEGUZZI N, BACCI JR M, DOMECCO C, NOME S F, CONCI L R. Diversity and geographical distribution of phytoplasmas infecting China-tree in Argentina[J]. Journal of Phytopathology, 2007, 155(2): 70-75.
- [23] YU S S, CHE H Y, WANG S J, LIN C L, LIN M X, SONG W W, TANG Q H, YAN W, QIN W Q. Rapid and efficient detection of 16SrI group areca palm yellow leaf phytoplasma in China by loop-mediated isothermal amplification[J]. The Plant Pathology Journal, 2020, 36(5): 459-467.
- [24] 周其良, 万玲, 加木, 邢梦玉, 林宁. 海南热带休闲农业资源开发模式研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(13): 7989-7991.
ZHOU Q L, WAN L, JIA M, XING M Y, LIN N. Study on development mode of tropical leisure agricultural resources in Hainan[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(13): 7989-7991. (in Chinese)
- [25] LIN J X, YANG C Y, LIU J M, YU S S, XING J C, HUANG P Z, CHEN W L, BAO Y Y, HU Q B, CHEN C X, ZHANG M Q. Identification and characterization of the phytoplasma associated with lettuce chlorotic leaf rot disease together with its natural reservoirs and leafhopper vectors in China[J]. Crop Protection, 2020, 138: 105-318.
- [26] 王洁, 田国忠, 徐启聪, 刘永光, 高瑞, 李向东, 竺晓平. 泡桐丛枝病病树周围几种植物上植原体的分子检测[J]. 中国农业科学, 2010, 43(2): 304-312.
WANG J, TIAN G Z, XU Q C, LIU Y G, GAO R, LI X D, ZHU X P. Molecular detection of phytoplasma strains from several plants around diseased paulownia infected with paulownia witches'-broom phytoplasma[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(2): 304-312. (in Chinese)
- [27] 于少帅, 朱辉, 余凤玉, 宋薇薇. 椰子没有致死性黄化病综合防控技术规程[J]. 热带农业科学, 2021, 41(11): 68-71.
YU S S, ZHU H, YU F Y, SONG W W. Technical regulations for integrated management of coconut lethal yellowing disease[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2021, 41(11): 68-71. (in Chinese)