

叶下珠黄化植原体和丛枝植原体的分子鉴定

林兆威, 牛晓庆, 唐庆华, 王晔楠, 孟秀利, 宋薇薇*

中国热带农业科学院椰子研究所/海南省院士团队创新中心, 海南文昌 571339

摘要: 2022年8月在海南省文昌市一个槟榔黄化病园内, 分别发现叶片黄化和丛枝症状的叶下珠, 前期检测均为植原体感染。为了明确叶下珠黄化植原体和丛枝植原体的分类鉴定, 本研究通过克隆 16S rDNA 基因和核糖体蛋白 (*rp*) 基因, 并进行基因序列一致性、系统发育树及虚拟 RFLP 等分析。结果显示: 克隆获得叶下珠黄化植原体 16S rDNA 片段 1246 bp, *rp* 基因 1212 bp; 叶下珠丛枝植原体 16S rDNA 片段 1827 bp, *rp* 基因 1240 bp。基因序列一致性显示, 叶下珠黄化植原体与丛枝植原体的 16S rDNA 基因序列均与 16Sr I 组的植原体一致性高达 98% 以上, 与槟榔黄化植原体海南株系的 16S rDNA 序列一致性达 100%; 而二者的 *rp* 基因序列均与 *rp* I 组的植原体一致性高达 99% 以上。系统发育树分析显示, 叶下珠黄化植原体和丛枝植原体 16S rDNA 基因均与翠菊黄化组 (16Sr I) 植原体聚于一个大分支, 且与 16Sr I -B 亚组的槟榔黄化植原体聚于同一个小分支, 亲缘关系接近; 而 *rp* 基因均与翠菊黄化组 (*rp* I) 植原体集聚于一个大分支, 且与 *rp* I -B 亚组的翠菊黄化植原体聚于同一个小分支, 亲缘关系接近。虚拟 RFLP 分析显示, 叶下珠黄化植原体和丛枝植原体的 16S rDNA 基因序列虚拟 RFLP 图谱与 16Sr I -B 的洋葱黄化植原体的参考图谱相同, 且相似系数为 1.00。综上表明, 叶下珠黄化植原体和丛枝植原体均属于 16Sr I -B 亚组成员。研究结果可对采用铲除槟榔黄化病中间寄主的防控手段提供理论依据。

关键词: 叶下珠; 黄化; 丛枝; 植原体; 分子鉴定

中图分类号: S763.7 **文献标志码:** A

Molecular Identification of *Phyllanthus urinaria* Yellows Phytoplasma and Witches'-broom Phytoplasma

LIN Zhaowei, NIU Xiaoqing, TANG Qinghua, WANG Yenan, MENG Xiuli, SONG Weiwei*

Coconut Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Innovation Center of Academician Team, Wenchang, Hainan 571339, China

Abstract: In August 2022, we found *Phyllanthus urinaria* with yellows and witches'-broom symptoms, respectively, in areca yellows disease garden in Wenchang city, Hainan province, which were phytoplasma infection. In order to clarify the taxonomic status of the phytoplasma strain in the yellows leaves and witches'-broom of *P. urinaria*. In this study, we cloned the 16S rDNA gene and ribosomal protein (*rp*) gene, and analyzed the gene sequence consistency, phylogenetic tree and virtual RFLP. The results showed that the 16S rDNA fragment 1246 bp and *rp* gene 1212 bp were cloned of *P. urinaria* yellows phytoplasma, the 16S rDNA fragment 1827 bp and *rp* gene 1240 bp were cloned of *P. urinaria* witches'-broom phytoplasma. The gene sequence consistency showed that the 16S rDNA gene sequence of the *P. urinaria* yellows phytoplasma and the *P. urinaria* witches'-broom phytoplasma was more than 98% consistent with the phytoplasma of 16Sr I group, and 100% consistent with the 16S rDNA sequence of areca yellows phytoplasma Hainan strain; the consistency of them in *rp* gene sequences was more than 99% to those of the *rp* I group. The phylogenetic tree analysis showed that the 16S rDNA genes of *P. urinaria* yellows phytoplasma and *P. urinaria* witches'-broom phytoplasma were clustered in a large branch with those of aster yellows phytoplasma group (16Sr I), and clustered in the

收稿日期 2022-12-12; 修回日期 2023-01-04

基金项目 海南省院士创新平台科研专项 (No. YSPTZX202138, No. YSPTZX202151); 海南省自然科学基金项目 (No. 321QN345)。

作者简介 林兆威 (1993—), 男, 硕士, 研究实习生, 研究方向: 热带经济作物主要病害综合防治。*通信作者 (Corresponding author): 宋薇薇 (SONG Weiwei), E-mail: songweiwei426@aliyun.com。

same small branch with those of areca yellows phytoplasma of 16Sr I -B subgroup, with the close genetic relationship; in the phylogenetic tree of *rp* gene, they were clustered in a large branch with the aster yellows phytoplasma group (*rp* I), and clustered in the same small branch with those of aster yellows phytoplasma of *rp* I -B subgroup, with the close genetic relationship. The virtual RFLP analysis showed that the RFLP map obtained by the 16S rDNA gene of the *P. urinaria* yellows phytoplasma and *P. urinaria* witches'-broom phytoplasma was the same as the reference map of the onion yellows phytoplasma of 16Sr I -B, and the similarity coefficient was 1.00. In summary, the *P. urinaria* yellows phytoplasma and the *P. urinaria* witches'-broom phytoplasma belong to 16Sr I -B subgroup in classification. The results of this study could provide a theoretical basis for the prevention and control of areca palm yellow disease by eradicating its intermediate host.

Keywords: *Phyllanthus urinaria*; yellows; witches'-broom; phytoplasma; molecular identification

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.04.022

叶下珠 (*Phyllanthus urinaria* L.), 又名珍珠草、夜合草, 是大戟科 (Euphorbiaceae Juss) 叶下珠属 (*Phyllanthus*) 一年生草本植物。在我国主要分布于广西、广东及海南等南方地区。带根全草可入药, 具有很高的药用价值。研究发现, 叶下珠在抗乙肝病毒 (HBV)、抗肿瘤、抗菌、抗内毒素、抗血栓形成及免疫调剂等方面具有较好的药理作用^[1]。近年来, 叶下珠常用于临床上抗 HBV 的研究, 对乙型肝炎的治疗有巨大的开发潜力。

植原体 (phytoplasma) 是存在于植物韧皮部的筛管细胞及介体昆虫的肠道、淋巴及唾液腺等组织内的一类专性菌, 主要通过刺吸式介体昆虫进行植物间传播。被植原体侵染的植物常引起丛枝、叶片黄化、花变叶及矮化等症状^[2]。至今已有 1000 余种植物被植原体侵染, 我国已报道 100 多种植原体病害^[3-4], 其中枣疯病 (jujube witches'-broom, JWB)^[5]、小麦蓝矮病 (wheat blue dwarf disease, WBD)^[6]、甘蔗白叶病 (sugarcane white leaf, SCWL)^[7]及泡桐丛枝病 (paulownia witches'-broom, PaWB)^[8]等危害严重, 对相关产业造成严重的经济损失。在海南, 植原体侵染引起的槟榔黄化病 (areca palm yellow leaf disease, YLD) 是一种毁灭性病害^[9], 每年因该病造成的经济损失高达 20 亿元以上^[10]。

2022 年 8 月, 本研究团队在海南省文昌市文城镇的 1 个槟榔园内进行黄化病调查, 发现该园有叶片表现黄化的叶下珠和 1 株表现丛枝的叶下珠, 为典型的植原体侵染引起的症状。前期采用荧光定量 PCR 检测技术 (专利申请号: 202210933142.8), 对叶下珠黄化和丛枝 2 种症状进行植原体检测, 结果发现 2 种症状均显示植原体阳性, 且病原含

量分别为 6.8×10^3 、 4.6×10^8 copies/ μ L。目前国内尚无叶下珠黄化植原体和丛枝植原体分类鉴定的相关报道, 因此, 本研究分别对叶下珠黄化、丛枝植原体 16S rDNA 基因和核糖体蛋白基因 (*rp*) 进行克隆, 通过分子鉴定的手段明确叶下珠黄化植原体和丛枝植原体的分类地位, 并与槟榔黄化植原体 16S rDNA 进行分析, 为槟榔黄化病中间寄主的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 待测叶下珠黄化、丛枝样品采自海南省文昌市文城镇 (19°33'13"N, 110°47'14"E)。叶下珠黄化症状表现为整株黄化, 主要为叶肉黄化, 叶肉叶脉黄绿相间明显, 后期发展为叶肉叶脉黄化 (图 1A~图 1D), 该样品编号为 HN-Pu2; 叶下珠丛枝症状表现为整株丛枝, 叶片变小 (图 1E~图 1F), 该样品编号为 HN-Pu1; 健康样品 (图 1G) 采自海南省文昌市文城镇 (19°33'14"N, 110°47'15"E)。

1.1.2 主要试剂与仪器 pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司; 2×Taq PCR Mix、植物基因组 DNA 提取试剂盒及琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 TIANGEN 公司; DH5 α 感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司。主要仪器: 1~1000 μ L 移液器、GD120 恒温水浴锅、5810R 离心机及 Biometra TOne 96G 梯度 PCR 等。

1.2 方法

1.2.1 叶下珠叶片总 DNA 提取 剪取叶片样品 0.1 g, 参照植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书, 进行样品 DNA 提取, 并将提取的 DNA 置于 -20 °C 中保存, 备用。



A~D: 叶下珠黄化症状, B 为 A 图的放大细节, D 为 C 图的放大细节; E、F: 叶下珠丛枝症状; G: 健康叶下珠。
A~D: Yellows symptoms of *P. urinaria*, B is an enlarged detail of Fig. A, D is an enlarged detail of Fig. C; E, F: Witches'- broom symptoms of *P. urinaria*; G: Healthy *P. urinaria*.

图 1 叶下珠叶片黄化和丛枝症状

Fig. 1 Yellows and witches'-broom symptoms of *P. urinaria*

1.2.2 16S rDNA 和 *rp* 基因的 PCR 扩增 以待测样品叶片总 DNA 为模板, 健康样品为阴性对照, H₂O 为空白对照进行 PCR 扩增。采用巢氏 PCR 技术检测叶下珠黄化的植原体, 采用一步 PCR 检测叶下珠丛枝的植原体。16S rDNA 和 *rp* 基因扩增引物序列见表 1, 16S rDNA 基因的巢氏 PCR 扩增的第 1 步反应引物为 P1/P7, 第 2 步反应引物为 R16F2n/R16R2; *rp* 基因的巢氏 PCR 扩增的第 1 步反应引物为 rpF1/rpR1, 第 2 步反应引物为 rpF2/rpR2; 其中, 巢氏 PCR 第 1 步反应结束后, 需将 PCR 产物稀释 50 倍作为模板进行第 2 步反

应。所需引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。扩增反应体系: 2×Taq PCR Mix 12.5 μL, DNA 模板为 2.0 μL, ddH₂O 为 8.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL。引物 P1/P7 扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 1 min, 48 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。引物 R16F2n/R16R2 扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。*rp* 基因的引物 rpF1/rpR1 和 rpF2/rpR2 扩增程序参照林兆威等^[11]的方法。

表 1 本研究中所用引物信息
Tab. 1 Information of primers used in this study

基因 Gene	引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	片段长度 Fragment size/bp	参考文献 Reference
16S rDNA	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	1800	BERND 等 ^[12]
	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT		
	R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACT	1200	LEE 等 ^[13]
	R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG		
<i>rp</i>	rpF1	GGACATAAGTTAGGTGAATTT	1240	LEE 等 ^[14]
	rpR1	ACGATATTTAGTTCTTTTGG		
	rpF2	TTTTCCCCTACACGTACTTA	1200	MARTINI 等 ^[15]
	rpR2	GTTCTTTTGGCATTAAACAT		

1.2.3 PCR 产物纯化、克隆及序列测定 经琼脂糖凝胶回收试剂盒对 PCR 产物的目标条带进行回收纯化, 并将目的片段与 pMD18-T 载体连接后转至 DH5α 感受态细胞中, 在抗生素平板中进行涂板于 37 °C 培养, 通过菌落 PCR 进行阳性验证, 将阳性转化子送深圳华大基因股份有限公司测序。

1.2.4 16S rDNA 和 *rp* 基因序列一致性及系统发育树分析 经测序获得的 16S rDNA 和 *rp* 基因通过 NCBI 在线 blastn 程序 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行同源性检索分析, 在 GenBank 数据

库中下载不同组或亚组的代表性植原体 16 rDNA 基因序列和 *rp* 基因序列, 利用 MEGA 7.0 软件, 采用邻接法 (neighbor joining), bootstrap 复数设置为 1000, 分别构建 16S rDNA 和 *rp* 基因的系统发育进化树, 分析叶下珠黄化植原体和丛枝植原体分类地位, 并将 16S rDNA 和 *rp* 基因序列提交至 GenBank 数据库。

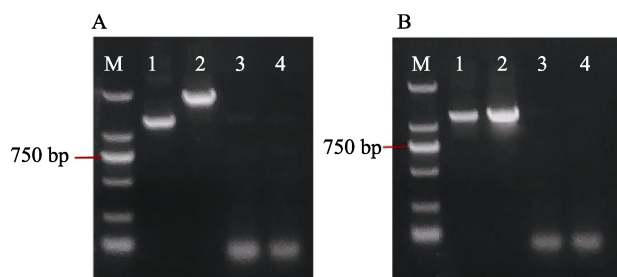
1.2.5 植原体 16S rDNA 序列虚拟 RFLP 分析 叶下珠黄化植原体和丛枝植原体的 16S rDNA 基因通过植原体在线分类鉴定软件 iPhyClassifier (<https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/re->

source/iphyclassifier.cgi) 进行相似性分析和虚拟 RFLP 分析, 确定植原体的分类地位^[16]。

2 结果与分析

2.1 植原体 16S rDNA 和 *rp* 基因片段的获得

从叶下珠黄化样品中扩增植原体 16S rDNA 基因, 获得约 1.2 kb 的片段; 扩增 *rp* 基因, 获得约 1.2 kb 的片段。从叶下珠丛枝样品中扩增植原体 16S rDNA 基因, 获得约 1.8 kb 的片段; 扩增 *rp* 基因, 获得约 1.2 kb 的片段(图 2)。获得的片段大小均与预期目的片段大小基本一致, 且健康样品和 ddH₂O 中未扩增出相应片段。将以上片段进行测序比对, 结果为植原体, 因此将该叶下珠黄化和丛枝植原体分别暂命名为叶下珠黄化植原体海南株系(PuY-HN-2022)、叶下珠丛枝植原体海南株系(PuWB-HN-2022)。



A: 16S rDNA 基因; B: *rp* 基因; M: DL2000 DNA marker。
1: 叶下珠黄化; 2: 叶下珠丛枝; 3: 健康样品; 4: ddH₂O。
A: 16S rDNA gene; B: *rp* gene; M: DL2000 DNA marker; 1: Yellowing symptoms of *P. urinaria*; 2: Witches'-broom symptoms of *P. urinaria*; 3: Health samples; 4: ddH₂O.

图 2 16S rDNA 和 *rp* 基因的 PCR 扩增产物凝胶电泳图
Fig. 2 16S rDNA and *rp* gene PCR amplification product gel electrophoresis

2.2 16S rDNA、*rp* 基因序列一致性及系统发育树分析

通过克隆基因目的片段, 获得叶下珠黄化植原体 16S rDNA 片段 1246 bp (登录号: OP851691), *rp* 基因片段 1212 bp (登录号: OP918672); 叶下珠丛枝植原体 16S rDNA 片段 1827 bp (登录号: OP850851), *rp* 基因片段 1240 bp (登录号: OP918671)。经基因序列一致性分析, 叶下珠黄化植原体和丛枝植原体与 16Sr I 组植原体的 16S rDNA 序列一致性高达 98% 以上。其中, 叶下珠黄化植原体与欧洲油菜矮缩植原体 (登录号: MG599470.1) 的 16S rDNA 序列一致性达 100%; 叶下珠丛枝植原体与多毡毛苧麻丛枝植原体 (登

录号: MT708485.1)、柳叶菜花变叶植原体 (登录号: AY101386.1) 的 16S rDNA 序列一致性达 99.84%; 二者均与槟榔黄化植原体海南株系 (登录号: MZ971180.1) 的 16S rDNA 序列一致性达 100%。叶下珠黄化植原体、丛枝植原体的 *rp* 基因序列均与 *rp* I 组的植原体一致性高达 99% 以上, 且与洋葱簇生植原体 (登录号: GU228514.1) 一致性达 100%。经系统发育树分析, 叶下珠黄化植原体和丛枝植原体 16S rDNA 基因均与翠菊黄化组 (16Sr I) 植原体聚于一个大分支, 且与 16Sr I -B 亚组的槟榔黄化植原体 (登录号: MZ971180.1) 聚于同一个小分支, 亲缘关系接近; 与其他组植原体亲缘关系较远 (图 3)。叶下珠黄化植原体和丛枝植原体 *rp* 基因均与翠菊黄化组 (*rp* I) 植原体聚于一个大分支, 且与 *rp* I -B 亚组的翠菊黄化植原体 (登录号: AY183708.1) 聚于同一个小分支, 亲缘关系接近; 与其他组植原体亲缘关系较远 (图 4)。根据 2004 年比较支原体学国际研究规划 (International Research Project for Comparative Mycoplasma, IRPCM) 对植原体暂定种的划分规则^[17], 叶下珠黄化植原体和丛枝植原体划为 16Sr I 组。

2.3 虚拟 RFLP 分析

将叶下珠黄化植原体和丛枝植原体的 16S rDNA 基因序列进行虚拟限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析, 获得的图谱与 16Sr I -B 的洋葱黄化植原体 (登录号: AP006628) 的参考图谱相同 (图 5), 且相似系数为 1.00。综上, 该叶下珠黄化植原体海南株系和叶下珠丛枝植原体海南株系均属于 16Sr I -B 亚组成员。

3 讨论

由于植原体极难人工分离培养, 在植原体的分类鉴定上难以通过形态观察、生理生化指标进行分类鉴定, 通常采用 16S rDNA 基因、*rp* 基因及 *tuf* 基因等植原体保守序列进行一致性比较, 且植原体的组/亚组的划分标准依据为引物 R16F2n/R16R2 扩增 16S rDNA 基因序列的 17 种限制性内切酶的 RFLP 分析^[18-19]。本研究通过克隆植原体 16S rDNA 和 *rp* 基因, 并对基因序列进行一致性分析、系统发育树分析及 16S rDNA 虚拟 RFLP 分析, 将叶下珠黄化植原体海南株系和

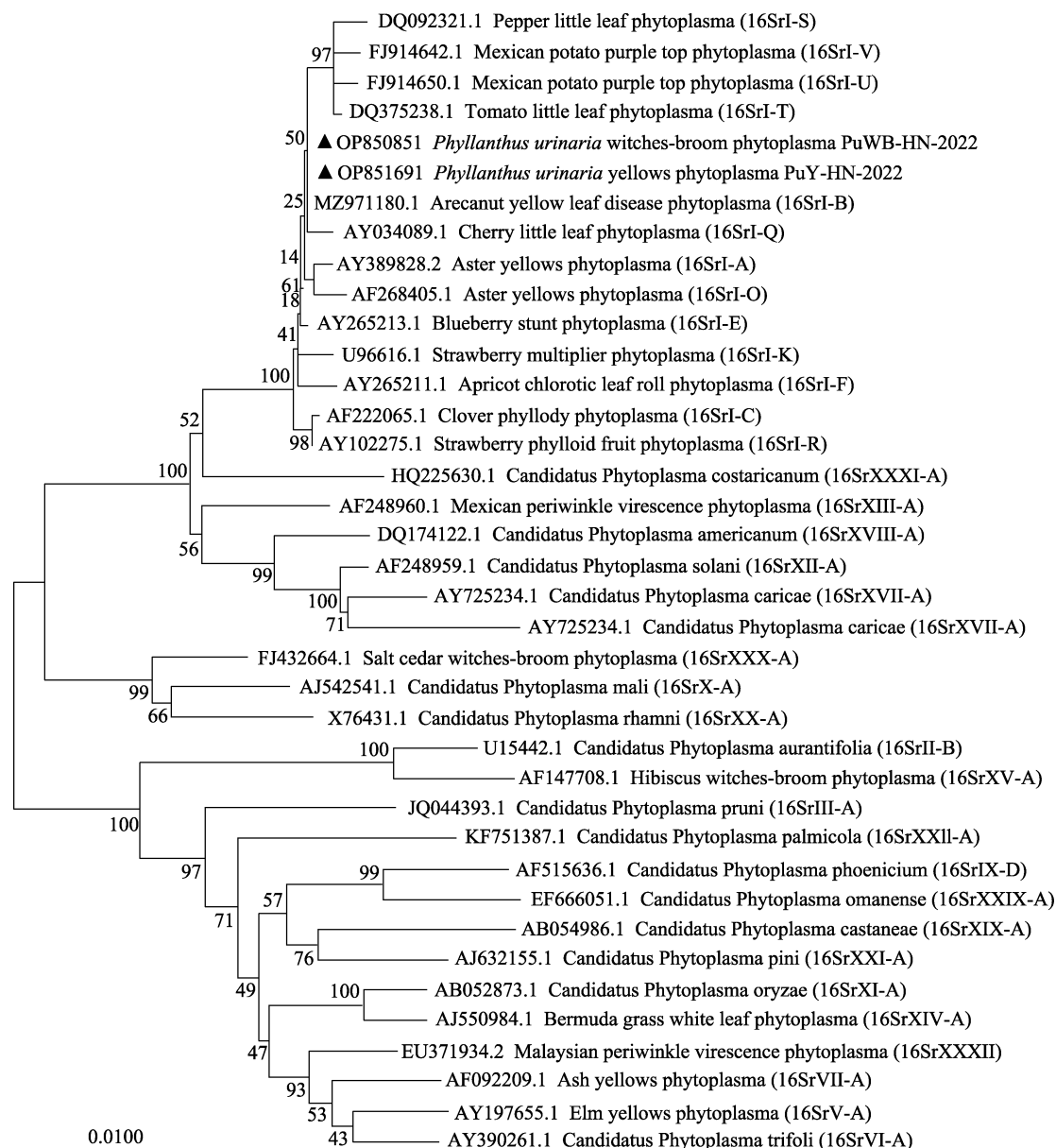


图 3 基于植原体 16S rDNA 基因序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of based on phytoplasma 16S rDNA gene sequence

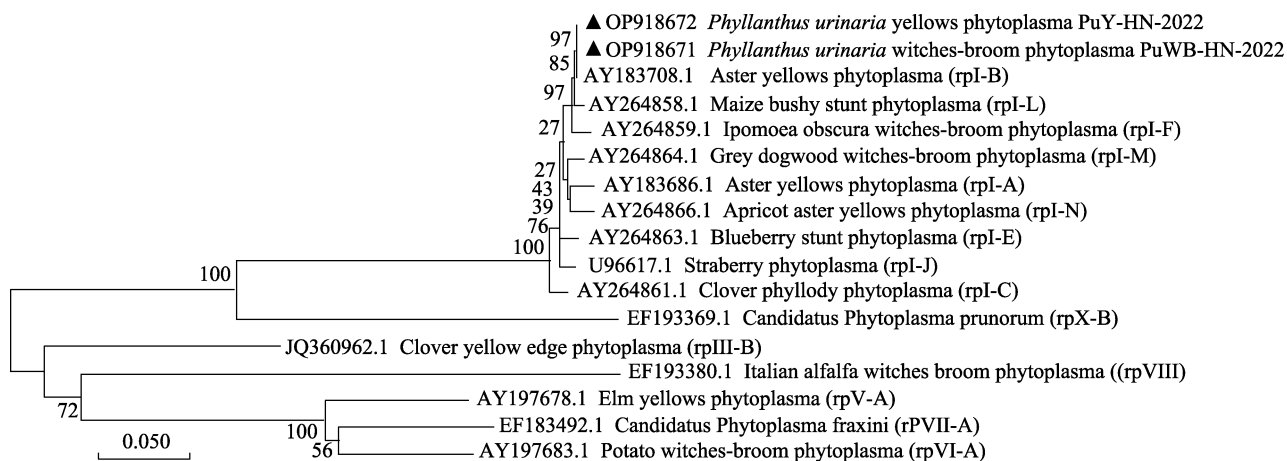
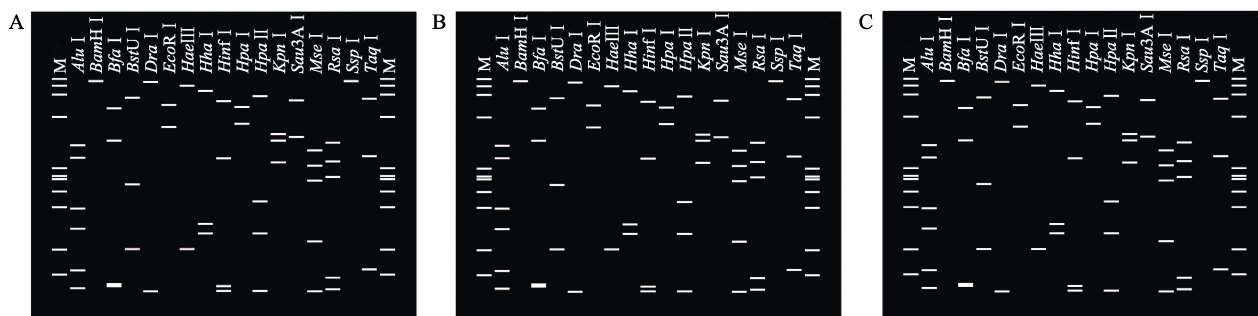


图 4 基于植原体 rp 基因序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of based on phytoplasma rp gene sequence



A: 叶下珠黄化植原体; B: 叶下珠丛枝植原体; C: 洋葱黄化植原体。

A: *P. urinaria* yellows phytoplasma; B: *P. urinaria* witches'-broom phytoplasma; C: Onion yellows phytoplasma.

图5 植原体 16S rDNA 基因序列虚拟 RFLP 比较

Fig. 5 Comparison of virtual RFLP of phytoplasma 16S rDNA gene sequences

叶下珠丛枝植原体海南株系鉴定为 16Sr I-B 亚组成员。目前关于叶下珠属植物受植原体侵染为害的报道较少, 本文为首次报道植原体侵染为害叶下珠。本研究发现, 叶下珠均受 16Sr I-B 亚组的植原体侵染, 但表现出不同的症状, 在前期的植原体检测中发现这 2 种症状的植原体含量有数量级的差异。因此推测, 导致叶下珠表现不同症状的原因与植原体侵染的含量差异有关。

在植原体的各组中, 16Sr I 组成员最多, 为 29 个亚组^[20], 16Sr I-B 亚组是翠菊黄化组植原体中寄主范围最广的亚组之一。其中, 16Sr I-B 亚组的植原体侵染引起的槟榔黄化病在海南省发生面积占 27.89%, 对海南槟榔产量造成严重损失^[21]。YU 等^[22-23]研究发现, 槟榔黄化植原体株系与细圆藤丛枝植原体、辣椒黄化皱缩植原体的亲缘关系很近, 同源性可达 100%, 并推测细圆藤 [*Pericampylus glaucus* (Lam.) Merr.] 和辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 可能是槟榔黄化植原体的中间寄主。本研究发现, 叶下珠黄化植原体和丛枝植原体的 16S rDNA 基因序列与槟榔黄化病植原体海南株系 16S rDNA 基因序列 (登录号: MZ971180.1) 的一致性达 100%; 在系统发育树中, 与槟榔黄化植原体的亲缘关系接近; 本研究团队前期对该槟榔园进行槟榔黄化病检测时, 发现该园的黄化病发生率高, 叶下珠黄化和丛枝的发生也在该槟榔园内, 因此, 是否由感染黄化病槟榔作为传染源引起叶下珠感染将作进一步研究。另外, 植原体通常通过刺吸式介体昆虫传播^[24-25], 目前发现槟榔园中椰子坚蚜、长尾粉蚧、黑刺粉虱、蓟马、棘缘蝽、白盾蚧 6 种昆虫携带植原体^[26], 因此, 叶下珠是否会成为槟榔黄化病通过媒介昆虫传播的中间寄主也将作进一步研究。

叶下珠是海南农田、林地常见的草本植物, 经上述分析, 叶下珠可能是槟榔黄化病田间的中间寄主。植原体寄主的多样性可能会有利于同组或亚组的植原体适应不同的环境, 或将不同的寄主植物作为中间介质促进植原体的传播与病害的流行^[27-28]。因此, 在槟榔黄化病的防控中, 不但要切断媒介昆虫的传播, 也应铲除中间寄主作为传播途径的毒源。

参考文献

- [1] 程艳刚, 裴妙荣, 孔祥鹏, 李慧峰, 刘艳, 谭金燕. 叶下珠化学成分和药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(4): 238-242.
CHENG Y G, PEI M R, KONG X P, LI H F, LIU Y, TAN J Y. Advances on chemical constituents and pharmacological effects of *Phyllanthus urinaria* L.[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2016, 18(4): 238-242. (in Chinese)
- [2] 李继东, 陈鹏, 倪静, 顾理媛, 王会鱼, 郑先波, 冯建灿. 植原体致病分子机理研究进展[J]. 园艺学报, 2019, 46(9): 1691-1700.
LI J D, CHEN P, NI J, GU L Y, WANG H Y, ZHENG X B, FENG J C. Review on the molecular pathogenic mechanism of phytoplasma[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2019, 46(9): 1691-1700. (in Chinese)
- [3] NAMBA S. Molecular and biological properties of phytoplasmas[J]. Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences, 2019, 95(7): 401-418
- [4] 王晓燕, 张荣跃, 李婕, 李银焜, 李文凤, 单红丽, 黄应昆. 中国植原体病害研究状况、分布及多样性[C]//植物病理科技创新与绿色防控——中国植物病理学会 2021 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2021: 697.
WANG X Y, ZHANG R Y, LI J, LI Y H, LI W F, SHAN H L, HUANG Y K. Research status, distribution and diversity

- of phytoplasma diseases in China[C]//Scientific and technological innovation and green prevention and control of plant pathology-Collection of papers of 2021 academic annual meeting of Chinese Society of Plant Pathology. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2021: 697. (in Chinese)
- [5] 陈妮, 刘永光, 仇平平, 刘文浩, 苏文敏, 竺晓平. 山东省枣疯病植原体的鉴定及分子变异分析[J]. 植物病理学报, 2015, 45(2): 113-120.
CHEN N, LIU Y G, QIU P P, LIU W H, SU W M, ZHU X P. Molecular identification and sequence polymorphism of phytoplasma associated with jujube witches' broom in Shandong province[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2015, 45(2): 113-120. (in Chinese)
- [6] 顾沛雯, 安凤秋, 吴云锋, 杨栋, 罗朝鹏, 相建业, 杨英. 小麦蓝矮病植原体 16S rDNA 基因片段的比较分析[J]. 植物病理学报, 2005(5): 403-409.
GU P W, AN F Q, WU Y F, YANG D, LUO C P, XIANG J Y, YANG Y. Comparison and analysis of 16S rDNA fragment of phytoplasma of wheat blue dwarf[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005(5): 403-409. (in Chinese)
- [7] LI W F, WANG X Y, HUANG Y K, SHEN K, SHAN H L, LUO Z M, YIN J, JIA Y M, BAI Z G, ZHANG R Y. First report of sugarcane white leaf phytoplasma in Yunnan province, China[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2013, 35(3): 407-410.
- [8] 史英姿. 泡桐丛枝植原体中国株系的分子鉴定及免疫膜蛋白基因表达研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
SHI Y Z. Study on molecular identification and expression of antigenic membrane protein of paulownia witches phytoplasma in Chian[D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry Technology University, 2007. (in Chinese)
- [9] 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 pathogens from arecanut yellow leaf disease in Hainan[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2010, 31(1): 83-87. (in Chinese)
- [10] 车海彦, 曹学仁, 禚哲, 罗大全. 槟榔黄化病“该防”还是“该治”[J]. 中国热带农业, 2018, 84(5): 46-48.
CHE H Y, CAO X R, XUAN Z, LUO D Q. Should areca palm yellow leaf disease “Be Prevented” or “Treated”[J]. China Tropical Agriculture, 2018, 84(5): 46-48. (in Chinese)
- [11] 林兆威, 牛晓庆, 于少帅, 王晔楠, 杨德洁, 余凤玉, 宋薇薇. 苦楝黄化植原体的分子鉴定[J]. 分子植物育种, 2024, 22(1): 117-125.
LIN Z W, NIU X Q, YU S S, WANG Y N, YANG D J, YU F Y, SONG W W. Molecular identification of chinaberry yellows phytoplasma[J]. Molecular Plant Breeding, 2024, 22(1): 117-125. (in Chinese)
- [12] BERND S, ERICH S, CHRISTINE D S, BRUCE C K. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas[J]. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma, 1995, 1: 369-380.
- [13] LEE I M, HAMMOND R W, DAVIS R E, GUNDERSEN D E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms[J]. Phytopathology, 1993, 83(8): 834-842.
- [14] LEE I M, GUNDERSEN D E, DAVIS R E, BARTOSZYK I M. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48(4): 1153-1169.
- [15] MARTINI M, LEE I M, BOTTNER K D, ZHAO Y, BOTTI S, BERTACCINI A, HARRISON N A, CARRARO L, MARCONE C, KHAN A J, OSLER R. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(9): 2037-2051.
- [16] YAN Z, WEI W, LEE I M, SHAO J, SUO X B, DAVIS R E. The iphyclassifier, an interactive online tool for phytoplasma classification and taxonomic assignment[J]. Methods in Molecular Biology, 2013, 938: 329-338.
- [17] FIRRAO G, ANDERSEN M, BERTACCINI A, BOUDON E, BOVE J M, DAIRE X. ‘Candidatus phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(4): 1243-1255.
- [18] WEI W, DAVIS R E, LEE I M, ZHAO Y. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(8): 1855-1867.
- [19] WEI W, LEE I M, DAVIS R E, SUO X, YAN Z. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(10): 2368-2377.
- [20] ZANG L, SUN P P, MA Q, XU X Z, ZHOU H Y, LI Z N. Molecular detection and identification of phytoplasmas in a novel 16Sr I subgroup in sunflowers and cocklebur weeds[J]. Journal of Plant Pathology, 2019, 101: 701-706
- [21] 林兆威, 唐庆华, 孟秀丽, 宋薇薇, 余凤玉, 黄山春, 牛晓庆, 覃伟权. 海南省槟榔病理性黄化发生分布情况及其植

- 原体检测分析[J]. 热带作物学报, 2022, 43(10): 2106-2113.
- LIN Z W, TANG Q H, MENG X L, SONG W W, YU F Y, HUANG S C, NIU X Q, QIN W Q. Occurrence and distribution of areca pathological yellowing in Hainan, China and its phytoplasma detection analysis[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(10): 2106-2113. (in Chinese)
- [22] YU S S, TANG Q H, WU Y, ZHAO R L, SONG W W, QIN W Q. First report of 16Sr I -B subgroup related phytoplasma associated with witches'-broom symptoms in *Pericampylus glaucus* in China[J]. Plant Disease, 2020, 105(3): 695.
- [23] YU S S, TANG Q H, FU D Q, ZHAO R L, QIN W Q. Molecular identification and characterization of 'Candidatus Phytoplasma asteris'-related strain associated with pepper (*Capsicum annuum* L.) yellow crinkle disease in China[J]. Journal of General Plant Pathology, 2021, 87(5): 330-334.
- [24] 孙淑梅, 张凤舞, 田旭东. 枣疯病的媒介昆虫——凹缘菱纹叶蝉生物学和防治研究[J]. 植物保护学报, 1988(3): 173-177.
- SUN S M, ZHANG F W, TIAN X D. Studies on the biology and control of *Hishimonus sellatus* Uhler a vector of jujube witches'-broom disease[J]. Journal of Plant Protection, 1988(3): 173-177. (in Chinese)
- [25] HANBOONSONG Y, RITTHISON W, CHOOSAI C, SIRITHORN P. Transmission of sugarcane white leaf phytoplasma by *Yamatotettix flavovittatus*, a new leafhopper vector[J]. Journal of Economic Entomology, 2006(5): 1531-1537.
- [26] 唐庆华, 黄山春, 马光昌, 宋薇薇, 孟秀利, 林兆威, 牛晓庆, 覃伟权. 中国槟榔黄化病媒介昆虫研究初报[C]//植物病理科技创新与绿色防控——中国植物病理学会 2021 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2021: 683.
- TANG Q H, HUANG S C, MA G C, SONG W W, MENG X L, LIN Z W, NIU X Q, QIN W Q. Preliminary study on vector insects of areca palm yellow leaf disease in China[C]//Scientific and technological innovation and green prevention and control of plant pathology-Collection of papers of 2021 academic annual meeting of Chinese Society of Plant Pathology. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2021: 683. (in Chinese)
- [27] MARCONE C, RAGOZZINO A, SEEMULLER E. Identification and characterization of the phytoplasma associated with elm yellows in southern Italy and its relatedness to other phytoplasmas of the elm yellows group[J]. Forest Pathology, 2010, 27(1): 45-54.
- [28] 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)