

16SrII 组槟榔黄化植原体巢式 PCR 检测方法的建立

林兆威, 唐庆华, 于少帅, 龙仕达, 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: 在中国, 引起槟榔黄化病 (areca palm yellow leaf disease, AYLD) 的植原体主要有 16SrI 组、16SrII 组及 16SrXXXII 组 3 个种群, 但目前的检测技术主要针对 16SrI 组或 3 个种群的共同检测, 缺乏对 16SrII 组植原体的特异性识别手段。为了对 16SrII 组槟榔黄化植原体进行特异性检测, 本研究基于 16SrII 组植原体核糖体蛋白 (*rp*) 基因序列, 设计并筛选特异性巢式 PCR 引物, 并对该方法的特性及其应用效果进行评估。结果显示, 在准确性方面, 该方法能准确区分出阳性和阴性样品; 在敏感性比较中, 该方法敏感性高于 16S rRNA 和 *tuf* 基因的通用巢式 PCR 检测; 在特异性评估中, 16SrI 组和 16SrXXXII 组植原体、供试的槟榔病原及内生菌均对本方法未造成干扰; 在应用中, 从海南文昌采集的 22 份槟榔样品检测出 4 份阳性样品, 并且可检测出属于 16SrII 组的银胶菊丛枝植原体、皱子鸟足菜丛枝植原体及花生丛枝植原体, 表现出较好的适用性。综上, 本研究建立的基于 *rp* 基因的巢式 PCR 方法对 16SrII 组槟榔黄化植原体检测具有较好的特异性, 可为 16SrII 组槟榔黄化植原体的田间诊断、病情监测提供技术参考。

关键词: 槟榔; 槟榔黄化病; 植原体检测; 巢式 PCR

中图分类号: S763.7

文献标志码: A

Establishment of a Nested PCR Detection Method for 16SrII Phytoplasma Associated with Areca Palm Yellow Leaf Disease

LIN Zhaowei, TANG Qinghua, YU Shaoshuai, LONG Shida, SONG Weiwei*

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

Abstract: In China, areca palm yellow leaf disease (AYLD) is primarily attributed to infection with phytoplasmas from the 16SrI, 16SrII and 16SrXXXII groups. Currently, detection methods predominantly target the 16SrI group or non-specifically detect all three groups, lacking specific identification methods for the 16SrII group phytoplasmas. To achieve specific detection of 16SrII group phytoplasmas, specific nested PCR primers were designed and screened in this study based on the ribosomal protein (*rp*) gene sequence of 16SrII group phytoplasmas, and the characteristics and application efficacy of this method were subsequently evaluated. Results showed that the method could accurately distinguish positive samples from healthy ones. In the sensitivity comparison, the sensitivity of the method was higher than that of the universal nested PCR targeting the 16S rRNA and *tuf* genes. In the specificity evaluation, it showed no cross-reactivity with phytoplasmas from the 16SrI or 16SrXXXII groups, or with other tested areca palm pathogens and endophytic bacteria. In practical application, among 22 areca palm samples collected from Wenchang, Hainan Province, 4 samples were detected as positive; additionally, the method could detect 16SrII group phytoplasmas including *Parthenium hysterophorus* witches'-broom phytoplasma, *Cleome rutidosperma* witches'-broom phytoplasma, and peanut witches'-broom phytoplasma, demonstrating good applicability. In conclusion, the nested PCR method established in this study based on the *rp* gene has good specificity for the 16SrII group areca palm yellow leaf phytoplasmas, and could provide technical reference for field diagnosis and disease monitoring of the 16SrII group areca palm yellow

收稿日期 2025-10-16; 接受日期 2025-12-06

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630152024006); 农业农村部农作物病虫害疫情监测与防治经费项目 (No. 102125211630150009005)。

作者简介 林兆威 (1993—), 男, 硕士研究生, 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。

leaf phytoplasmas.

Keywords: areca; areca palm yellow leaf disease; phytoplasmas detection; nested PCR

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.03.014

槟榔(*Areca catechu* L.)是棕榈科(*Arecaceae*) 槟榔属(*Areca*) 多年生木本作物, 广泛种植在亚洲热带地区。槟榔在我国作为重要的热带经济作物, 主要分布于海南省、台湾省及云南省等地。它不仅具有经济价值, 还是一味传统中药, 现代研究揭示其具有抗寄生虫、抗抑郁、抗氧化及抗高血压等作用^[1]。在栽培过程中, 槟榔常面临多种病原的威胁, 包括细菌^[2]、真菌^[3]、病毒^[4]及植原体^[5]等。其中, 由植原体侵染引起的槟榔黄化病(areca palm yellow leaf disease, AYLD)是最具破坏性的病害之一, 其症状表现为下层叶片叶边缘黄化、树冠缩小、束顶至死亡^[6]。该病在海南省槟榔种植区普遍发生, 发病率一般为 10%~30%, 重病区发病率可达 90%, 造成减产 70%~80%, 甚至绝产^[7]。

植原体是一类无细胞壁、难以人工培养的原核生物, 专性寄生于植物韧皮部。基于 16S rRNA 的分子鉴定显示, 槟榔黄化植原体(areca palm yellow leaf phytoplasma, AYLP)在不同地区的类群分布存在差异:印度已报道 3 个组, 分别为 16SrI 组、16SrXI 组和 16SrXIV 组^[8~10]; 在斯里兰卡仅发现 16SrXIV 组^[11]; 在中国海南则鉴定出 3 个组, 即 16SrI 组、16SrII 组和 16SrXXXII 组^[12~14]。本研究组在前期的病害调查与病原鉴定中发现, 16SrII 组植原体在海南文昌、儋州等槟榔种植区具有一定的感染率。CHE 等^[15]研究发现, 在海南岛 16SrII 组植原体宿主范围广、遗传变异更丰富、致病类型多样, 成为海南省植原体病害中的优势类群, 与其他在海南发现的植原体类群相比, 16SrII 组植原体对海南热带农业安全威胁更大。

鉴于 16SrII 组植原体在海南的重要地位, 其在槟榔上进行准确监测是评估其流行风险、制定有效防控策略的重要前提。目前, 分子检测技术已成为 AYLD 诊断的主要手段。尽管传统的巢式 PCR(基于 16S rRNA)^[16~17]及后续开发的环介导等温扩增技术^[18]、微滴式数字 PCR 技术^[19]、荧光定量 PCR 技术^[20]已应用于 AYLD 检测, 但仍存在一定的局限性, 即这些检测方法主要针对 16SrI 组或多个 AYLP 类群的共同检测, 对 16SrII

组植原体的检测特异性不足, 无法精准量化 16SrII 组的田间流行态势, 导致难以针对性开展该类群的防控研究。

植原体核糖体蛋白(ribosomal protein, *rp*)基因在植原体类群内高度保守、类群间差异显著, 已广泛用于植原体的检测、鉴定以及遗传变异的靶标^[21~24]。因此, 为填补 16SrII 组槟榔黄化植原体特异性检测的技术空白, 本研究以 16SrII 组植原体的 *rp* 基因为靶标, 设计特异性巢式 PCR 引物, 并评估该方法的特异性、敏感性及田间样品应用效果, 旨在建立精准的 16SrII 组槟榔黄化植原体检测技术, 为槟榔黄化病的科学防控提供关键技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 槟榔阳性样品采集自海南文昌(19°33'9"N, 110°48'5"E), 对应菌株编号为 HNDZ1、HNDZ3、HNDZ6、HNWC5, 这些样品均测序验证为 16SrII 组槟榔黄化植原体阳性^[13]。槟榔病原包括: 槟榔长线形病毒 1(areca palm velarivirus 1, APV1) QZ255 株系和 QZ256 株系、槟榔坏死环斑病毒(areca palm necrotic ringspot virus, ANRSV) WC1 株系和 WC2 株系、槟榔炭疽菌(*Colletotrichum* sp.) DZ1 菌株和 DZ2 菌株、奇异根串珠霉菌(*Thielaviopsis paradoxa*)、须芒草伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia andropogonis*) DNA(或 cDNA), 均由中国热带农业科学院椰子研究所提供。槟榔内生菌包括: 槟榔内生菌有菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*)、盐亭鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas yantingensis*)、白色短小杆菌(*Curtobacterium albidum*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)及叶居菌(*Frondihabits australicus*), 其样品 DNA 由中国热带农业科学院椰子研究所提供。健康槟榔叶片样品采自中国热带农业科学院椰子研究所槟榔苗圃。银胶菊丛枝植原体(16SrII-A 亚组)DNA 由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所惠赠; 竹子丛枝植原体(16SrI-B 亚组)、苦楝黄化植原体(16SrI-B 亚组)、细圆藤丛枝植原体(16SrI-B 亚组)、山黄

麻丛枝植原体（16SrXXXII-D 亚组）、花生丛枝植原体（16SrII-A 亚组）、皱子鸟足菜丛枝植原体（16SrII-A 亚组）的样品 DNA，以及其对应的健康样品 DNA，均由中国热带农业科学院椰子研究所提供。

1.1.2 主要试剂与仪器 植物基因组 DNA 提取试剂盒、2×Hot Master Taq PCR 预混试剂购自天根生化科技（北京）有限公司。实验仪器包括 DYCP-31DN 型琼脂糖凝胶电泳仪、Thermo ND2000 型超微量分光光度计、耶拿 Biometra Tone 96G 型 PCR 仪、KZ-III-F 型高速低温组织研磨仪、AP20R-30-ARY 型水浴锅、Universal 320R 型离心机。

1.2 方法

1.2.1 巢式 PCR 引物设计 利用 DNAMAN 软件比对 16SrII-A 亚组的 peanut witches'-broom phytoplasma 的 *rp* 基因（EF193375）与 16SrII-E 亚组（EF193380）、16SrII-D 亚组（EF193371）、16SrII-B 亚组（EF186815）、16SrII-C 亚组（EF186818）、16SrI-B 亚组（AY264855）、16SrIII 亚组（JQ360962）、16SrV 组（EU651838）、16SrV 组（AY197678）、16SrVII 组（EF183492）、16SrVI 组（AY197683）、16SrIV 组（DQ318239）中的 *rp* 基因，选择在 16SrII 组内保守而在其他组间存在差异的区域设计引物（图 1、表 1）。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

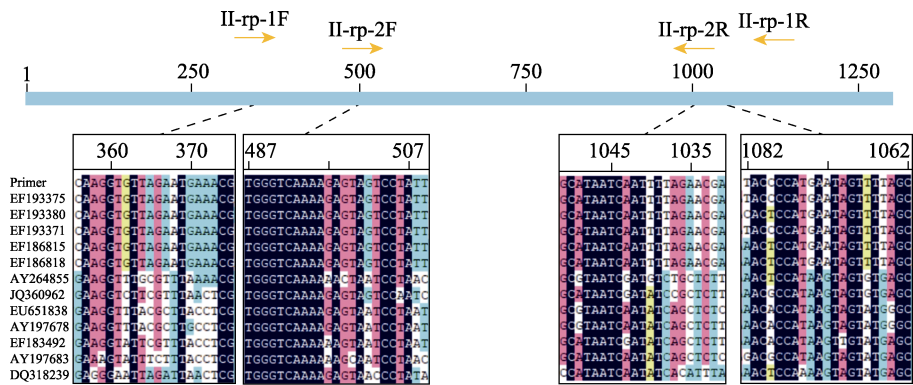


图 1 16SrII 组植原体特异性引物设计
Fig. 1 Design of specific primers for 16SrII group phytoplasmas

表 1 本研究巢式 PCR 检测方法的引物信息		
Tab. 1 Primer information of nested PCR detection method in this study		
引物名称 Primer Name	序列（5'-3'） Sequence（5'-3'）	扩增片段大小 Amplified frag- ment size/bp
II-rp-1F	CAAGGTGTTAGAATGAAACG	727
II-rp-1R	TACCCATGAATAGTTTACG	
II-rp-2F	TGGGTCAAAAGAGTAGTCCTATT	565
II-rp-2R	GCATAATCAATTTAGAACGA	

1.2.2 DNA 提取 使用植物基因组 DNA 提取试剂盒，参照制造商提供的说明书提取样品总 DNA。采用琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计对提取的总 DNA 质量进行检测，合格的样品 DNA 于-20℃条件下保存备用。

1.2.3 准确性验证 以 3 份 16SrII 组槟榔黄化植原体样品为阳性对照，健康槟榔样品作为阴性对照，无菌无酶 ddH₂O 作为空白对照，进行巢式 PCR。第一轮 PCR 反应体系（25μL）为：2×Hot Master Taq

PCR 预混液 10 μL，上/下游引物（10 μmol/L）各 1 μL，基因组 DNA 2 μL，无菌无酶 ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 循环条件：95℃预变性 5 min；95℃变性 45 s，48.5℃退火 45 s，72℃延伸 1 min，共 35 个循环。将第一轮扩增产物按 1：20（体积比）稀释后作为第二轮 PCR 的模板（循环参数调整为：退火温度 46℃，延伸时间 1 min，其余参照同第一轮）。PCR 扩增产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳并在紫外光下观察分析，条带大小符合的产物由生工生物工程（上海）股份有限公司进行双向测序，测序结果采用软件拼接。经测序获得的目的基因通过 NCBI（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>）数据库的在线 blastn 程序进行同源性检索分析；使用 DNAMAN 软件和 NCBI ORF Finder 程序分析目的片段核苷酸序列，将序列信息提交至 GenBank 数据库。

1.2.4 敏感性比较 将阳性样品 HNDZ6 基因组 DNA 按梯度稀释，分别稀释 2.5 倍、5 倍、7.5 倍、

10 倍、12.5 倍、15 倍浓度作为 PCR 模板。利用本研究引物、16S rRNA 通用引物 (P1/P7^[16]与 R16F2n/R16R2^[17])、*tuf* 基因的通用引物 (fTuf1/rTuf1 和 fTufu/rTufu^[25]) 进行巢式 PCR。PCR 扩增体系与程序参照 1.2.3 节, 16S rRNA 巢式 PCR 体系与程序参照 SCHNEIDER 等^[16]和 GUNDERSEN 等^[17]的方法, *tuf* 基因巢式 PCR 体系与程序参照 SCHNEIDER 等^[25]。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析, 并在紫外光下观察条带, 比较 3 组巢式 PCR 的检测敏感性。为避免条带可能为假阳性, PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

1.2.5 特异性验证 以 16SrII 组槟榔黄化植原体 HNWC5 菌株 DNA 为阳性对照, 健康槟榔叶片 DNA 为阴性对照, 无酶无菌 ddH₂O 为空白对照; APV1 病毒 QZ255 株系、APV1 病毒 QZ256 株系、槟榔坏死环斑病毒 WC1 株系、槟榔坏死环斑病毒 WC2 株系的 cDNA, 槟榔黄化植原体 16SrI 组、山黄麻丛枝植原体 16SrXXXII 组、*Colletotrichum* sp. DZ1、*Colletotrichum* sp. DZ2、*T. paradoxa*、*B. andropogonis*、*P. ananatis*、*S. yantingensis*、*C. albidum*、*B. cereus*、*F. australicus* 的 DNA 为模板进行巢式 PCR。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析, 并在紫外光下观察条带大小。评估引物特异性, 反应体系及检测程序参照 1.2.3 节。

1.2.6 槟榔样品的检测应用 样品采集地为文昌市文城镇槟榔黄化病原监测点 (19°33'14"N, 110°47'15"E), 该槟榔园黄化率约为 5%, 属于轻病园。随机采集叶片表现黄化的样品 22 份, 提取样品总 DNA 作为模板, 健康样品为阴性对照, 无酶无菌 ddH₂O 为空白对照, 进行巢式 PCR。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 在紫外光下观察条带结果, 评估引物的田间应用效果, 反应体系及检测程序参照 1.2.3 节。将扩增出目的片段的 PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行双向测序, 并将序列信息提交至 GenBank 数据库。

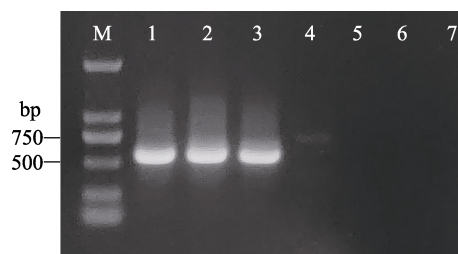
1.2.7 不同寄主植物植原体病害检测 以银胶菊丛枝植原体 (16SrII-A 亚组)、皱子鸟足菜丛枝植原体 (16SrII-A 亚组)、花生丛枝植原体 (16SrII-A 亚组)、竹子丛枝植原体 (16SrI-B 亚组)、苦楝黄化植原体 (16SrI-B 亚组)、细圆藤丛枝植原体 (16SrI-B 亚组)、山黄麻丛枝植原体 (16SrXXXII-D 亚组) 样品 DNA 为模板, 以对

应的健康样品 DNA 为阴性对照, 无酶无菌 ddH₂O 为空白对照, 进行巢式 PCR。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析, 并在紫外光下观察条带结果。评估引物在不同植物上的适用性, 反应体系及检测程序参照 1.2.3 节。PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行双向测序, 并将序列信息提交至 GenBank 数据库。

2 结果与分析

2.1 准确性评估

由图 2 可知, 3 份 16SrII 组槟榔黄化植原体阳性样品均扩增出与靶标片段大小一致的条带, 而 3 份健康槟榔样品 (阴性对照) 及空白对照均未扩增出条带。将阳性样品的目的片段经过测序与序列组装后, 获得目的片段序列。结果显示, 从样品 HNDZ1、HNDZ3、HNWC5 的 DNA 中扩增获得植原体相关序列 (GenBank 登录号: PX406222, PX406221, PX406223), 长度均为 565 bp, 3 条序列的碱基一致, G+C 含量为 27.43%, 双链分子质量为 348.19 kDa, 该片段中 3~563 nt 共编码 187 个氨基酸, 序列比对其编码产物为植原体核糖体蛋白 S3 (ribosomal protein S3)。经 NCBI blastn 同源性检索显示, 样品 HNDZ1、HNDZ3、HNWC5 的 *rp* 基因序列与 16SrII 组植原体的 Peanut witches'-broom phytoplasma (登录号: JQ900570)、Pigeon pea witches'-broom phytoplasma (登录号: FJ560598)、*Cajanus scarabaeoides* witches'-broom phytoplasma (登录号: MF488706) 等 30 个株系的 *rp* 基因序列相似性为 100%, 说明扩增片段为 16SrII 组植原体的 *rp* 基因片段。



M: DL2000 DNA marker; 1~3 分别为阳性对照 (HNDZ1 菌株、HNDZ3 菌株、HNWC5 菌株); 4~6 为阴性对照; 7 为空白对照。

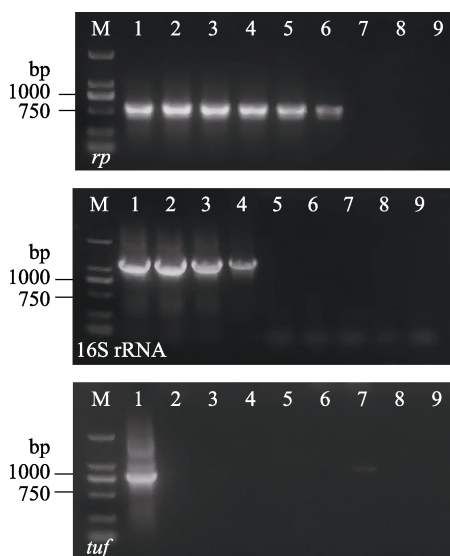
M: DL2000 DNA marker; Lanes 1~3 correspond to positive controls (strains HNDZ1, HNDZ3, and HNWC5, respectively); Lanes 4~6 represent negative controls; Lane 7 indicates the blank control.

图 2 准确性评估

Fig. 2 Accuracy evaluation

2.2 敏感性比较

利用本研究设计的特异性引物组与 16S rRNA、*tuf* 基因通用引物组分别进行巢式 PCR, 比较 3 组引物的敏感性。结果显示, 本研究引物组的敏感性最高, 可检测稀释 12.5 倍的阳性模板; 其次是 16S rRNA 通用引物组, 可检测稀释 7.5 倍阳性模板; 最后是 *tuf* 基因通用引物组, 仅能检测到未稀释原液 (图 3)。以上扩增产物经测序, 均为植原体目的条带, 无假阳性扩增。说明本研究引物组检测在敏感性上显著优于 16S rRNA 和 *tuf* 基因通用引物组, 更适用于田间样本的检测。



M: DL2000 DNA marker; 1~7: 阳性样品梯度稀释液 (依次为稀释 0 倍、2.5 倍、5 倍、7.5 倍、10 倍、12.5 倍、15 倍); 8~9: ddH₂O。

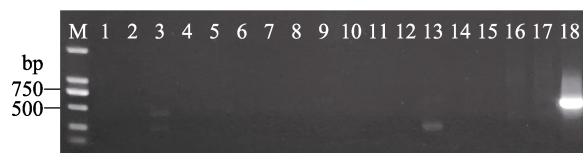
M: DL2000 DNA marker; Lanes 1~7: serial dilutions of positive sample (undiluted, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15); Lane 8~9: ddH₂O.

图 3 巢式 PCR 方法与 16S rRNA、*tuf* 通用巢式 PCR 的敏感性比较

Fig. 3 Sensitivity comparison between nested PCR method and universal nested PCR targeting 16S rRNA and *tuf* genes

2.3 特异性评估

利用本研究设计的特异性引物组, 对槟榔相关微生物 (包括病原微生物和内生菌) 及槟榔黄化植原体 16SrI 组和 16SrXXXII 组菌株进行巢式 PCR 检测, 分析该引物组对 16SrII 组槟榔黄化植原体检测的特异性。结果显示, 仅 16SrII 组槟榔黄化植原体菌株扩增出与靶标片段大小一致的条带, 其余样品未扩增出条带, 或仅扩增出非靶标大小的杂带 (图 4)。上述结果说明本研究引物组对 16SrII 组槟榔黄化植原体具有较好的检测特异性。



M: DL2000 DNA marker; 1: 16SrI 组槟榔黄化植原体; 2: 16SrXXXII 组山黄麻丛枝植原体; 3: APV1 病毒 QZ255 株系; 4: APV1 病毒 QZ256 株系; 5: 槟榔坏死环斑病毒 WC1 株系; 6: 槟榔坏死环斑病毒 WC2 株系; 7: 槟榔炭疽菌 DZ1 菌株; 8: 槟榔炭疽菌 DZ2 菌株; 9: 奇异根串珠霉菌; 10: 须芒草伯克霍尔德氏菌; 11: 菠萝泛菌; 12: 盐亨鞘氨醇单胞菌; 13: 白色短小杆菌; 14: 蜡样芽孢杆菌; 15: 叶居菌; 16: 阴性对照; 17: 空白对照; 18: 阳性对照。

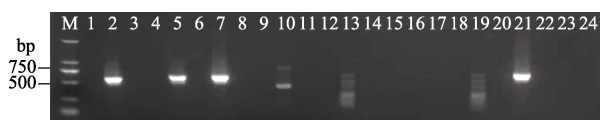
M: DL2000 DNA marker; Lane 1: 16SrI group Areca palm yellow leaf phytoplasma; Lane 2: 16SrXXXII group *Trema tomentosa* witches'-broom phytoplasma; Lane 3: APV1 QZ255 strain; Lane 4: APV1 QZ256 strain; Lane 5: ANRSV WC1 strain; Lane 6: ANRSV WC2 strain; Lane 7: *Colletotrichum* sp. DZ1 strain; Lane 8: *Colletotrichum* DZ2 strain; Lane 9: *T. paradoxa*; Lane 10: *B. andropogonis*; Lane 11: *P. ananatis*; Lane 12: *S. yantingensis*; Lane 13: *C. albidum*; Lane 14: *B. cereus*; Lane 15: *F. australicus*; Lane 16: Negative control; Lane 17: Blank control; Lane 18: Positive control.

图 4 特异性评估

Fig. 4 Specificity evaluation

2.4 槟榔黄化样品的应用检测

采用本研究巢式 PCR 引物, 对采自海南文昌槟榔园的 22 份槟榔样品进行检测。结果显示, 其中 4 份槟榔样品的 PCR 扩增产物均出现与靶标片段大小一致的条带, 其余样品未扩增出条带, 或仅扩增出非靶标大小的杂带 (图 5)。将这 4 份阳性样品的扩增条带进行测序, 结果显示: 所有含目的条带的样品均检测到 16SrII 组植原体的 *rp* 基因 (登录号: PX406224~PX406227)。进一步序列比对分析表明, 这 4 份样品的 *rp* 基因核苷酸序列相似性为 99.87%, 其编码的氨基酸序列相似性达 100%。



M: DL2000 DNA marker; 1~22: 槟榔样品; 23: 阴性对照; 24: 空白对照。

M: DL2000 DNA marker; Lanes 1~22: Areca palm samples; Lane 23: Negative control; Lane 24: Blank control.

图 5 槟榔黄化样品的应用检测

Fig. 5 Applied detection of areca palm yellowing samples

2.5 不同寄主植物植原体病害检测

16SrI 组、16SrII 组及 16SrXXXII 组植原体样品与对应健康寄主样品的巢式 PCR 检测结果 (图 6) 显示, 16SrII 组的银胶菊丛枝植原体、皱子鸟足菜丛枝植原体及花生丛枝植原体均扩增出与靶

标片段大小一致的条带, 均为 16SrII 组植原体 *rp* 基因(登录号: PX523482、PX523483、PX523481); 而其对应健康寄主样品未扩增出目的条带; 16Sr I 组竹子丛枝植原体、苦楝黄化植原体、细圆藤丛枝植原体, 16SrXXXII 组山黄麻丛枝植原体, 及各相应的健康寄主样品均未扩增出目的条带。表明本研究引物对不同植物的 16Sr II 组植原体检测具有一定的适用性。



M: DL2000 DNA marker; 1、3、5: 16SrII 组植原体 (分别为银胶菊丛枝植原体、皱子鸟足菜丛枝植原体、花生丛枝植原体); 2、4、6: 对应健康对照 (分别为银胶菊、皱子鸟足菜、花生); 7、9、11: 16SrI 组植原体 (分别为竹子丛枝植原体、苦楝黄化植原体、细圆藤丛枝植原体); 8、10、12: 对应健康对照 (分别为竹子、苦楝、细圆藤); 13、14: 分别为 16SrXXXII 组山黄麻丛枝植原体、其健康对照; 15: 空白对照。

M: DL2000 DNA marker; Lanes 1, 3, 5: 16SrII group phytoplasmas (*Parthenium hysterophorus* witches'-broom, *Cleome rutidosperma* witches'-broom, peanut witches'-broom); Lanes 2, 4, 6: Corresponding healthy controls (*Parthenium hysterophorus*, *Cleome rutidosperma*, *Arachis hypogaea*); Lanes 7, 9, 11: 16SrI group phytoplasmas (bamboo witches'-broom, *Melia azedarach* yellows, *Pericampylus glaucus* witches'-broom); Lanes 8, 10, 12: Corresponding healthy controls (bamboo, *Melia azedarach*, *Pericampylus glaucus*); Lanes 13–14: 16SrXXXII group *Trema tomentosa* witches'-broom phytoplasma and its healthy control; Lane 15: Blank control.

图 6 不同寄主植物植原体病害的检测

Fig. 6 Detection of phytoplasma diseases in various host plant species

3 讨论

植原体是寄主广泛的植物病原微生物, 目前已感染了 1000 多种植物及未知数量的昆虫^[26]。中国海南岛作为一个热带岛屿, 拥有病害发展与传播的得天独厚条件。CHE 等^[15]在海南岛的调查中发现 18 种寄主感染了植原体, 而 16SrII 组植原体可感染重要的热带经济作物, 如木薯、椰枣及甘蔗等。16SrII 组植原体寄主范围广泛, 感染可造成花生丛枝^[27]、番木瓜小叶^[28]、槟榔叶片黄化^[13]、柑橘黄化^[29]、辣椒小叶^[30]等多种经济作物病害。另外, 不同组植原体之间伴随着复合侵染的情况^[31–33]。本研究基于 *rp* 基因, 建立了针对 16SrII 组植原体的特异性巢式 PCR 检测方法, 该方法具有较好的特异性和敏感性, 且可应

用于其他寄主植物的 16SrII 组植原体检测。因此, 本研究建立的检测方法可为 16SrII 组槟榔黄化植原体及其他寄主植物植原体病害的诊断提供技术支持。

自 2022 年首次发现 16SrII 组成员相关植原体侵染槟榔^[13]以来, 本课题组曾使用多种巢式 PCR 引物组进行检测, 如采用通用巢式 PCR 引物组 L15F1/MapR1 和 SecYF2 (II) /SecYR1 (II)^[34]及 rpF1C/rp (I) R1A 和 rp (II) F1/rp (II) R1^[22], 但均未获得目的条带。尽管巢式 PCR 引物组 fTuf1/rTuf1 和 fTufu/rTufu^[25]可扩增出目的条带, 但其在槟榔植原体检测中的敏感性低于本研究建立的引物组, 这可能是该引物组在槟榔检测中受槟榔基因组等背景影响, 导致 PCR 扩增效率降低所致。本研究建立的检测方法在应用中发现个别样本出现非特异性扩增, 推测可能受未知背景干扰, 但因非特异性扩增条带与靶标条带大小差异明显, 未影响琼脂糖凝胶电泳结果。另外, 采集的 22 份黄化样品中, 仅 4 份检测出植原体。对于未检出植原体的样品, 原因可能包括 3 类情况: 一是部分样品中植原体含量低于本方法检出限, 导致未被捕获; 二是可能存在 I 组或 XXXII 组植原体, 尤其是 I 组在槟榔黄化病中为优势类群^[5]; 三是可能存在槟榔隐症病毒 1 (*areca palm velarivirus* 1, APV1) 等其他致黄因子^[35]。

巢式 PCR 检测技术存在一定的局限性, 即操作耗时较长、交叉污染风险高、无法准确定量及依赖专业设备等。后续可采用荧光定量 PCR 技术、环介导等温扩增技术、重组酶聚合酶扩增技术等操作便捷、特异性强、灵敏度高的技术进行优化改进。此外, 本研究经氨基酸序列比对发现, 目的片段的氨基酸序列相似性达 100%。由于本研究采集样品仅来自 1 个监测点, 检测获得的阳性样品数量较少, 且 *rp* 基因本身具有较高的保守性, 因此无法基于基因序列差异开展遗传多样性分析。后续研究将进一步扩大样本采集范围, 探究 16SrII 组植原体在槟榔主产区的发生情况与遗传多样性。

参考文献

- [1] PENG W, LIU Y J, WU N, SUN T, HE X Y, GAO Y X, WU C J. *Areca catechu* L. (Arecaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and

- toxicology[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 164: 340-356.
- [2] SUN J Y, LI Y L, ZHENG L, CHEN D P, ZHOU X F, LI P. The first complete genome of *Robbsia andropogonis* reveals its arsenal of virulence system causing leaf spot disease of areca palm[J]. Phytopathology Research, 2024, 6(51): 1-15.
 - [3] GAO X R, XU X M, CHE H Y, WEST J S, LUO D Q. Eight *Colletotrichum* species, including a novel species, are associated with areca palm anthracnose in Hainan, China[J]. Plant Disease, 2020, 104(5): 1369-1377.
 - [4] YU H M, QI S S, CHANG Z X, RONG Q Q, AKINYEMI I A, WU Q F. Complete genome sequence of a novel velarivirus infecting areca palm in China[J]. Archives of Virology, 2015, 160(9): 2367-2370.
 - [5] SONG S W, WANG Q, HUO L Q, XIE L Q, CHEN J Q, CUI H G, DAI Z J, KANG J R, LI Y, GAO W, CHEN J F, KANG L, ZHANG X M. The phytoplasma (*Candidatus Phytoplasma arecae*) is the crucial pathogen to cause areca palm yellow leaf disease[J]. Science Bulletin, 2024, 70(6): 847-851.
 - [6] PREMALATHE K, NAIK G, NAIK M K, HEGDE V, DHANANJAYA B C, SATISH K M. Exploring yellow leaf disease patterns in areca plantations in Chikkamagaluru district of Karnataka[J]. Saudi Journal of Pathology and Microbiology, 2024, 9(3): 63-70.
 - [7] 车海彦, 曹学仁, 禡哲, 罗大全. 槟榔黄化病“该防”还是“该治”[J]. 中国热带农业, 2018(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(5): 46-48. (in Chinese)
 - [8] CHAITHRA M, PRIYA M, KUMAR S, MANIMEKALAI R. Detection and characterization of 16SrI-B phytoplasmas associated with yellow leaf disease of arecanut palm in India[J]. Phytopathogenic Mollicutes, 2014, 4(2): 77-82.
 - [9] MANIMEKALAI R, KUMAR R SATHISH, SOUMYA V P, THOMAS G V. Molecular detection of phytoplasma associated with yellow leaf disease in areca palms (*Areca catechu*) in India[J]. Plant Disease, 2010, 94(11): 1376.
 - [10] SUMI K, MADHUPRIYA, KUMAR S, RAO G, RAO K S. Molecular confirmation and interrelationship of phytoplasmas associated with diseases of palms in South India[J]. Phytopathogenic Mollicutes, 2014, 4(2): 41-52.
 - [11] KANATIWELE-DE SILVA C, DAMAYANTHI M D, DE SILVA R, DICKINSON M, DE SILVA N, UDAGAMA P. Molecular and scanning electron microscopic proof of phytoplasma associated with areca palms yellow leaf disease in Sri Lanka[J]. Plant Disease, 2015, 99(11): 1641.
 - [12] 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)
 - [13] LIN Z W, SONG W W, TANG Q H, MENG X L. First report of 16SrII group related phytoplasma associated with areca palm yellow leaf disease on *Areca catechu* in China[J]. Plant Disease, 2023, 107(10): 3275.
 - [14] YU S S, ZHU A N, CHE H Y, SONG W W. Molecular identification of *Candidatus Phytoplasma malaysianum*-related strains associated with *Areca catechu* palm yellow leaf disease and phylogenetic diversity of the phytoplasmas within 16SrXXXII Group[J]. Plant Disease, 2024, 108(5): 1331-1343.
 - [15] CHE H Y, YU S S, CHEN W, ZHENG W H, CAO X R, LUO D Q. Molecular identification and characterization of novel taxonomic subgroups and new host plants in 16SrI and 16SrII group phytoplasmas and their evolutionary diversity on Hainan Island, China[J]. Plant Disease, 2024, 108(6): 1703-1718.
 - [16] SCHNEIDER B, SEEMÜELLER E, SMART C D, KIRKPATRICK B C. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas[J]. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology, 1995, 1: 369-380.
 - [17] 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.
 - [18] 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.
 - [19] YU S S, ZHANG X C, SONG W W, QIN W Q. Accurate and sensitive detection of areca palm yellow leaf phytoplasma in China by droplet digital PCR targeting *tuf* gene sequence[J]. Annals of Applied Biology, 2022, 181(2): 152-159.
 - [20] 林兆威, 孟秀丽, 唐庆华, 牛晓庆, 宋薇薇. 槟榔黄化植原体 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 热带作物学报, 2024, 45(6): 1120-1126.
LIN Z W, MENG X L, TANG Q H, NIU X Q, SONG W W. Establishment of TaqMan probe real-time fluorescent quantitative PCR detection method for *Areca palm* yellow leaf phytoplasma[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(6): 1120-1126. (in Chinese)

- [21] MARTINI M, BOTTI S, MARCONE C, MARZACH C, CASATI P, BIANCO P A, BERTACCINI A. Genetic variability among flavescentia dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, 16(3): 197-208.
- [22] MARTINI M, LEE I M, BOTTNER K D, ZHAO Y, BOTTI S, BERTACCINI A, HARRISON N A, CARRARO L, MARCONE C, KHAN A J. 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.
- [23] TAO Y, MAN J, WU Y. Development of a multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of wheat viruses and a phytoplasma in China[J]. *Archives of Virology*, 2012, 157: 1261-1267.
- [24] MONTI M, MARTINI M, TEDESCHI R. EvaGreen real-time PCR protocol for specific *Candidatus Phytoplasma mali* detection and quantification in insects[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2013, 27(3/4): 129-136.
- [25] SCHNEIDER B, KARE S G. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor *Tu* gene used in differentiation and classification of phytoplasmas[J]. *Microbiology*, 1997, 143(10): 3381-3389.
- [26] TRIVELLONE V, WEI W, FILIPPIN L, DIETRICH C H. Screening potential insect vectors in a museum biorepository reveals undiscovered diversity of plant pathogens in natural areas[J]. *Ecology and Evolution*, 2021, 11(11): 6493-6503.
- [27] 汤亚飞, 林祺, 余小漫, 李正刚, 于琳, 蓝国兵, 何自福. 广东花生丛枝病植原体的分子鉴定[J]. *植物保护*, 2022, 48(5): 83-90.
- TANG Y F, LIN Q, SHE X M, LI Z G, YU L, LAN G B, HE Z F. Molecular identification of peanut witches'-broom phytoplasma in Guangdong province[J]. *Plant Protection*, 2022, 48(5): 83-90. (in Chinese)
- [28] YANG Y, JIANG L, CHE H Y, CAO X R, LUO D Q. Identification of a novel subgroup 16SrII-U phytoplasma associated with papaya little leaf disease[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(9): 3485-3491.
- [29] YU S S, ZHU A N, SONG W W, YAN W. Molecular identification and characterization of two groups of phytoplasma and *Candidatus Liberibacter asiaticus* in single or mixed infection of *Citrus maxima* on Hainan Island of China[J]. *Biology*, 2022, 11(869): 1-14.
- [30] 郑文虎, 车海彦, 杨毅, 曹学仁, 罗大全. 海南黄灯笼辣椒小叶病病原物的分子鉴定[J]. *热带作物学报*, 2014, 35(1): 142-146.
- ZHENG W H, CHE H Y, YANG Y, CAO X R, LUO D Q. Molecular identification of the pathogen of *Capsicum chinense* Jacquin little leaf disease in Hainan[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2014, 35(1): 142-146. (in Chinese)
- [31] LEE S, HAN S, CHA B J. Mixed infection of 16S rDNA I and V groups of phytoplasma in a single jujube tree[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2009, 25(1): 21-25.
- [32] SUN X C, MOU H Q, LI T T, TIAN Q, ZHAO W J. Mixed infection of two groups (16SrI & V) of phytoplasmas in a single jujube tree in China[J]. *Journal of Phytopathology*, 2013, 161(9): 661-665.
- [33] LEE G W, HAN S S. Molecular detection of phytoplasmas of the 16SrI and 16SrXXXII groups in *Elaeocarpus sylvestris* trees with decline disease in Jeju Island, South Korea[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2023, 39(1): 149-157.
- [34] LEE I M, BOTTNER-PARKER K D, ZHAO Y, DAVIS R E, HARRISON N A. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(12): 2887-2897.
- [35] 唐庆华, 孟秀利, 林兆威, 黄山春, 覃伟权, 宋薇薇. 海南槟榔致黄关键病害调查及为害特征分析[J]. *热带农业科学*, 2022, 42(3): 62-67.
- TANG Q H, MENG X L, LIN Z W, HUANG S C, QIN W Q, SONG W W. A survey of key areca palm leaf yellowing-related diseases and analysis of their infection characteristics in Hainan province[J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2022, 42(3): 62-67. (in Chinese)