

槟榔黄化植原体 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

林兆威, 孟秀丽, 唐庆华, 牛晓庆, 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: 槟榔是海南省重要的热带经济作物, 由植原体侵染引起的槟榔黄化病 (areca palm yellow leaf disease, YLD) 是当前我国槟榔生产上的一种毁灭性病害。为了建立精准高效的槟榔黄化植原体检测方法, 本研究基于槟榔黄化植原体 16S rDNA 基因, 设计并合成特异性引物 AMf/AMr 和探针 AM-Probe, 使用该方法进行准确性、敏感性、特异性及重复性测试, 并在其他植物的植原体病害进行检测。结果显示: 本检测方法能够准确的检测出阳性样品, 健康样品无扩增曲线; 在敏感性测试中, 该检测方法能检测到 1.16×10^1 copies/ μ L 样本浓度水平, 其标准曲线方程为 $y = -3.4185x + 43.624$, 扩增效率为 96.12%, 相关系数 $R^2 = 0.9833$; 在特异性测试中, 该检测方法对 YLD 的检测具有较好的特异性, 槟榔、槟榔其他病害病原及其内生菌的基因组对本方法未造成干扰; 在重复性测试中, 该检测方法对槟榔黄化病的检测具有较好的重复性; 并且该检测方法可对苦楝黄化病、细圆藤丛枝病及辣椒黄化病等 8 种植原体病害进行检测, 对植原体的检测具有一定的通用性。本检测方法的建立, 有利于为槟榔黄化病的精准诊断、病原监测及媒介昆虫的检测等研究提供可靠的技术手段。

关键词: 槟榔; 槟榔黄化病; 植原体; TaqMan 实时荧光定量 PCR; 病害检测

中图分类号: S763.7 文献标志码: A

Establishment of TaqMan Probe Real-time Fluorescent Quantitative PCR Detection Method for Areca Palm Yellow Leaf Phytoplasma

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

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

Abstract: Areca palm is an important tropical economic crop in Hainan Province. Areca palm yellow leaf disease (YLD) caused by phytoplasma infection is a devastating disease in the production of areca in China. In order to establish an accurate and efficient detection method for areca palm yellow leaf phytoplasma, this study designed and synthesized specific primers AMf/AMr and AM-Probe based on the 16S rDNA gene of areca palm yellow leaf phytoplasma. The method was used to test the accuracy, sensitivity, specificity and repeatability, and to detect phytoplasma diseases in other plants. The method could accurately detect the positive samples, and the healthy samples had no amplification curve. In the sensitivity test, the method could detect the sample concentration level of 1.16×10^1 copies/ μ L, and the standard curve equation was $y = -3.4185x + 43.624$, the amplification efficiency was 96.12%, and the correlation coefficient $R^2 = 0.9833$. In the specificity test, the method had good specificity for the detection of YLD, and the genomes of areca, other disease pathogens and the endophytes did not interfere with the method. In the repeatability test, the method had good repeatability for the detection of YLD. The detection method could be used to detect 8 phytoplasma diseases such as chinaberry yellow leaf disease, '*Pericampylus glaucus*' witches' broom disease and pepper yellow leaf disease and the detection of phytoplasma has certain universality. The establishment of detection method is

收稿日期 2023-05-19; 修回日期 2023-06-25

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

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。

conducive to providing reliable technical means for the accurate diagnosis of YLD, pathogen monitoring and vector insect detection.

Keywords: areca; areca palm yellow leaf disease; phytoplasma; TaqMan qPCR; disease detection

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.06.004

槟榔 (*Areca catechu* L.) 是棕榈科槟榔属多年生热带经济作物, 中国的“四大南药”之首。在我国, 槟榔栽培于海南、台湾及云南等地, 其中海南省槟榔种植面积占全国总面积的 95% 以上, 产量位居世界第二位^[1]。目前, 槟榔作为海南省重要的热带经济作物, 是海南省政府重点发展的“六棵树”之一, 也是海南省中东部地区 230 万农民收入的主要经济来源^[2]。

由植原体侵染引起的槟榔黄化病 (areca palm yellow leaf disease, YLD) 是当前我国槟榔生产上的一种毁灭性病害。该病于 1981 年在我国的海南省屯昌县发生为害^[3], 目前已蔓延至海南省各市县。槟榔黄化病在槟榔生产上的为害逐年加重, 轻者减产 10%~20%, 重者减产 50%~60%, 局部地区甚至毁种绝收。据不完全统计, 每年因黄化病造成的经济损失高达 20 亿元以上, 严重影响海南省农民脱贫致富和农村经济增长^[5]。

精准的病原检测有利于对病害的诊断。TaqMan 荧光定量 PCR 技术目前广泛应用于临床疾病诊断和动植物检验检疫上。为了建立精准高效的槟榔黄化植原体检测方法, 本研究基于槟榔黄化植原体的 16S rDNA 基因序列设计特异性引物和探针, 并对该方法的准确性、敏感性、特异性及重复性进行了验证, 以期 YLD 精准诊断、病原监测及媒介昆虫检测的研究提供可靠的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试样品 槟榔黄化植原体 DNA 通过通用引物 P1/P7^[6]与 R16F2n/R16R2^[7]巢氏 PCR 检测为阳性, 槟榔长线形病毒 1 (*Areca palm velarivirus* 1, APV1) cDNA、槟榔坏死环斑病毒 (*Areca palm necrotic ringspot virus*, ANRSV) cDNA 分别通过 RT-qPCR、RT-PCR 检测为阳性^[8-9], 上述样品由中国热带农业科学院椰子研究所提供; 槟榔炭疽菌 (*C. gloeosporioides*)、槟榔叶片分离的内生或致病细菌: *Burkholderia andropogonis*、*Pantoea*

ananatis、*Sphingomonas yantingensis*、*Curtobacterium albidum*、*Bacillus cereus*、*Frontrahabians australicus* 基因组 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 (16Sr II -A 亚组)、长春花小叶植原体 (16Sr I -B 亚组) DNA 由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所馈赠; 竹丛枝植原体 (16Sr I -B 亚组)、苦楝黄化植原体 (16Sr I -B 亚组)、细圆藤丛枝植原体 (16Sr I -B 亚组)、辣椒黄化植原体 (16Sr I -B 亚组)、山黄麻丛枝植原体 (16Sr XXX II -D 亚组)、花生丛枝植原体 (16Sr II -A 亚组) DNA 及上述对应的健康样品 DNA 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 主要试剂: 植物总 DNA 提取试剂盒、2×Taq PCR mix、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒及实时荧光定量 PCR (探针法) 试剂盒购自天根生物科技 (北京) 有限公司; pMDTM18-T Vector 购自 TaKaRa 公司; DH5α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司; 其他试剂为国产分析纯。

主要仪器: 5810R 型台式冷冻离心机, Bio-Rad T100 PCR 仪器, QuantStudio 3 Real-time 定量 PCR 仪, 微量分光光度计 Thermo ND2000。

1.2 方法

1.2.1 引物与探针设计及合成 根据槟榔黄化植原体 16S rDNA 基因序列 (GenBank 登录号: KF728948.1), 利用 Primer Express 3.0 软件在该基因保守的区域设计荧光定量 PCR 特异性引物 AMf/AMr 和 AM-Probe 探针 (表 1)。合成植原体 16S rDNA 基因巢氏 PCR 通用引物 P1/P7^[6]与 R16F2n/R16R2^[7]用于构建阳性质粒标准品。引物与探针由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物采用 PAGE 纯化, 探针采用 HPLC 纯化。

1.2.2 DNA 提取 取样品叶片 0.1 g, 参照植物总 DNA 提取试剂盒说明书进行 DNA 提取, 并于 -20 °C 保存。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 验证引物和探针的准确性 使用引物 AMf/AMr 和探针 AM-Probe 对 5

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

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	片段长度 Fragment size/bp	用途 Purpose
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG GATT	约 1800	巢氏 PCR 产物制作 阳性质粒
P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT		
R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACT	约 1200	标准品
R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAA CCCCG		
AMf	CCCAATGTGGCCGTTCAAC	173	TaqMan qPCR
AMr	GAAACGACTGCTAAGACTGG ATAGGA		
AM-Prode	CCTACCAAGACTATGATGTG		

注：探针序列 5'端和 3'端分别用 FAM 和 MGB 标记。
Note: The 5' and 3' end of the probe sequence were labeled with FAM and MGB, respectively.

份经巢氏 PCR 扩增测序的阳性样品进行实时荧光定量 PCR，健康槟榔样品作为阴性对照，无菌无酶 ddH₂O 作为空白对照。反应体系：2×SuperReal PreMix (Probe) 10 μL，正、反向引物 (10 μmol/L) 各 0.6 μL，荧光探针 (10 μmol/L) 0.4 μL，DNA 模板 2 μL，50×ROX Reference Dye*3 0.2 μL，加 ddH₂O 至 20 μL。反应程序：95 ℃ 预变性 15 min；95 ℃ 变性 3 s，60 ℃ 退火/延伸 30 s，45 个循环。

1.2.4 阳性质粒标准品的制备 使用第一步引物 P1/P7 与第二步引物 R16F2n/R16R2，以阳性槟榔黄化病样品的 DNA 为模板，健康槟榔样品 DNA 阴性对照，ddH₂O 为空白对照进行巢式 PCR，PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，切下目的条带，利用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行目的条带纯化，纯化后产物连接到 pMDTM18-T Vector，转化 DH5α 感受态细胞中，筛选并提取阳性克隆子的质粒，送生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。将测序正确的质粒使用微量分光光度计测定浓度，置于-20 ℃ 保存备用。运用 SHIRIMA 等^[10]的方法计算重组质粒中的拷贝数，重组质粒拷贝数 (copies/μL) = (NA×C)/(10⁹×重组质粒碱基对数×660 dalton/bp)。其中 NA 为阿伏伽德罗常数，6.02×10²³；C 为重组质粒的浓度 (ng/μL)。最终计算得到重组质粒的拷贝数为 1.16×10¹⁰ copies/μL。荧光定量 PCR 反应体系及程序参照 1.2.3，巢式 PCR 反应体系及程序参照林兆威等^[11]的方法。

1.2.5 敏感性测试与标准曲线的建立 以阳性质粒标准品为初始模板，梯度稀释出浓度依次为

1.16×10⁷、1.16×10⁶、1.16×10⁵、1.16×10⁴、1.16×10³、1.16×10²、1.16×10¹、1.16×10⁰ copies/μL。以此 8 个梯度浓度阳性质粒标准品为模板，健康槟榔样品为阴性对照，进行实时荧光定量 PCR，反应体系及程序参照 1.2.3。得到动力学扩增曲线和 PCR 扩增循环阈值 (Ct)。运用 Excel 2020 软件，以 Ct 值为纵坐标，10 为底质粒拷贝数的对数值为横坐标绘制标准曲线，获得回归直线方程，并计算该组体系的扩增效率：扩增效率 (%) = 10^(-1/斜率) - 1。

1.2.6 特异性测试 以槟榔黄化植原体的 DNA 为阳性对照 (CK⁺)，健康槟榔 DNA 为阴性对照 (CK⁻)，ANRSV、APV1 的 cDNA，槟榔炭疽菌、*Burkholderia andropogonis*、*Pantoea ananatis*、*Sphingomonas yantingensis*、*Curtobacterium albidum*、*Bacillus cereus*、*Frontrhabitans australicus* 的 DNA 为模板进行实时荧光定量 PCR，检测其特异性，反应体系和程序参照 1.2.3。

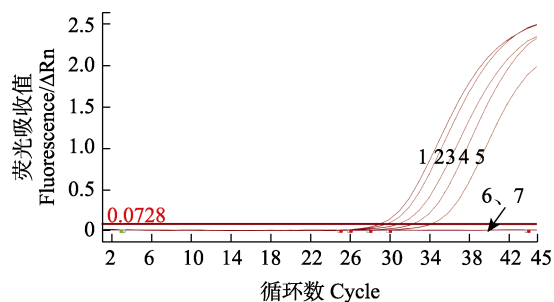
1.2.7 重复性测试 选取 1.16×10⁵、1.16×10⁴、1.16×10³ copies/μL 三个浓度的阳性质粒标准品为模板，进行实时荧光定量 PCR 检测，每个浓度重复 3 次，共检测 3 次，进行组内重复性试验，计算 Ct 值的变异系数。同时，将上述浓度的阳性质粒标准品于-20 ℃ 保存 3、6、9 d，以相同反应条件重复进行组间试验，计算 Ct 值的变异系数，验证该方法的重复性。反应体系和程序参照 1.2.3。

1.2.8 不同植物植原体上的检测 对银胶菊丛枝植原体、竹丛枝植原体、长春花小叶植原体、苦楝黄化植原体、细圆藤丛枝植原体、辣椒黄化植原体、山黄麻丛枝植原体及花生丛枝植原体等 8 种不同植物的植原体 DNA 进行实时荧光定量 PCR 检测，对应的 8 种植物健康样品 DNA 为阴性对照，无酶无菌 ddH₂O 为空白对照，反应体系和程序参照 1.2.3。

2 结果与分析

2.1 实时荧光定量 PCR 验证引物和探针的准确性

使用引物 AMf/AMr 和探针 AM-Prode 对阳性样品、健康槟榔样品进行 TaqMan qPCR。如图 1 所示，阳性样品均出现“S”形扩增曲线，且曲线平滑，而阴性样品和空白对照未出现扩增曲线，说明该荧光定量 PCR 的引物/探针组合能检测到槟榔黄化植原体，可进一步验证该引物/探针组合其他特性。



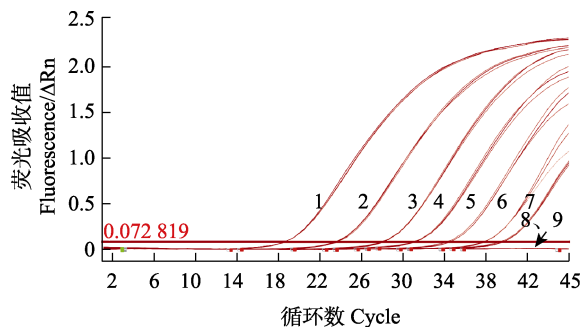
1~5: 槟榔黄化病样品; 6: 阴性对照; 7: 空白对照。
1~5: YLD samples; 6: Negative samples; 7: Blank controls.

图1 TaqMan qPCR 引物和探针的准确性验证

Fig. 1 Accuracy verification of TaqMan qPCR primer and probe

2.2 敏感性测试与标准曲线的建立

将构建好的阳性质粒标准品浓度按 10 的倍数逐级稀释, 以 8 个梯度浓度阳性质粒为模板, 健康槟榔样品为阴性对照, 进行 TaqMan qPCR, 并利用 Ct 值与质粒拷贝数的对数构建标准曲线。结果表明, 该引物/探针组合能检测到 1.16×10^1 copies/ μL 样本浓度水平 (图 2), 标准曲线显示, Ct 值与拷贝数的对数呈线性关系, 其标准曲线方程为 $y = -3.4185x + 43.624$, 扩增效率为 96.12%, 相关系数 $R^2 = 0.9833$ (图 3)。



1~8: 1.16×10^7 , 1.16×10^6 , 1.16×10^5 , 1.16×10^4 , 1.16×10^3 , 1.16×10^2 , 1.16×10^1 , 1.16×10^0 copies/ μL ; 9: Negative control.

图2 TaqMan qPCR 敏感性检测

Fig. 2 TaqMan qPCR sensitivity tests

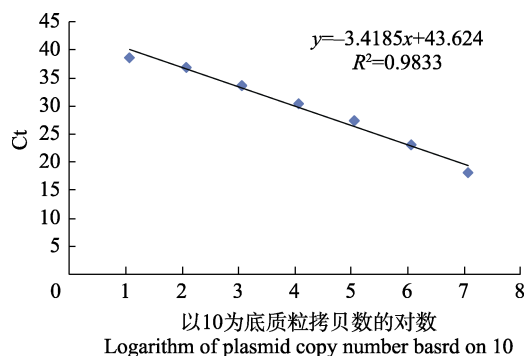
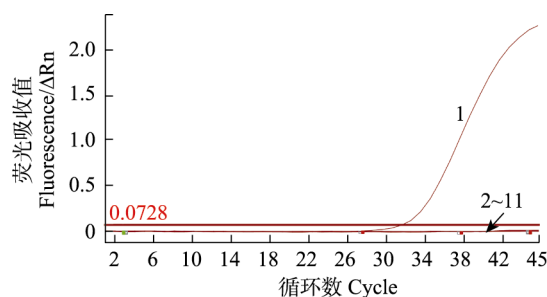


图3 TaqMan qPCR 标准曲线

Fig. 3 TaqMan qPCR standard curve

2.3 特异性测试

使用槟榔黄化植原体和槟榔中主要的病害病原及内生菌进行 TaqMan qPCR 特异性验证, 结果如图 4 所示, 仅 YLD 出现扩增曲线, 健康槟榔、APV1、ANRSV、槟榔炭疽菌、*B. andropogonis*、*P. ananatis*、*S. yantingensis*、*C. albidum*、*B. cereus*、*F. australicus* 均未出现扩增曲线, 说明该检测方法对 YLD 的检测具有较好的特异性, 槟榔、槟榔其他病害病原及其内生菌的基因组对本方法未造成干扰。



1: CK⁺; 2~10: APV1, ANRSV, *C. gloeosporioides*, *B. andropogonis*, *P. ananatis*, *S. yantingensis*, *C. albidum*, *B. cereus*, *F. australicus*; 11: CK⁻.

图4 TaqMan qPCR 特异性测试

Fig. 4 TaqMan qPCR specific test

2.4 重复性测试

选取浓度为 1.16×10^5 、 1.16×10^4 、 1.16×10^3 copies/ μL 的阳性标准品为模板, 进行 TaqMan qPCR 检测, 分别验证该方法的组内和组间的重复性, 结果如表 2 所示, 组内变异系数小于 1%, 组间变异系数小于 2%, 该方法对 YLD 的检测具有较好的重复性。

2.5 不同植物植原体上的检测

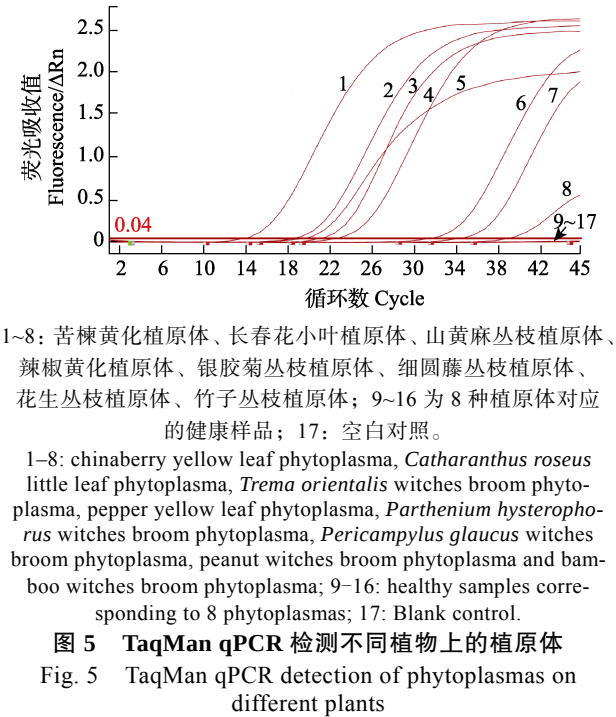
如图 5 所示, 供试的银胶菊丛枝植原体、竹丛枝植原体、长春花小叶植原体、苦楝黄化植原体、细圆藤丛枝植原体、辣椒黄化植原体、山黄麻丛枝植原体及花生丛枝植原体通过该 TaqMan qPCR 方法检测均为植原体阳性, 而对应的健康样品无扩增曲线, 说明本方法对植原体的检测具有一定的通用性, 可用于检测上述植原体病害。

3 讨论

在大多数植原体病害的检测中, 常用巢氏 PCR 通用引物 P1/P7^[6]与 R16F2n/R16R2^[7], 并将 R16F2n/R16R2 扩增的全长序列进行虚拟限制性片段长度多态性 (restriction fragment length

表 2 TaqMan 荧光定量 PCR 重复测试
Tab. 2 TaqMan fluorescence quantitative PCR repeated test

标准品浓度 Plasmid standard concentration/ (copies·μL ⁻¹)	组内重复性试验 Intra batch repeat test		组间重复性试验 Inter batch repeat test	
	平均值±标准差 Mean±SD	变异系数 Coefficient of variation/%	平均值±标准差 Mean±SD	变异系数 Coefficient of variation/%
1.16×10 ⁵	27.53±0.16	0.58	27.89±0.45	1.60
1.16×10 ⁴	30.62±0.28	0.93	30.96±0.46	1.49
1.16×10 ³	33.69±0.26	0.79	33.98±0.64	1.90



polymorphism, RFLP) 分析作为植原体鉴定的重要依据之一。由于上述巢氏 PCR 通用引物的敏感性较低, 不利于低浓度病原的检测, 因此, 在植原体检测中常建立适用于该作物、该病害的检测技术。鹿鹏鹏等^[12]基于 16S rDNA 基因建立了剑麻紫色卷叶病相关植原体单管巢式 PCR 检测方法, 该检测技术最低检测限浓度为 $\geq 1 \text{ fg}/\mu\text{L}$; 韩剑等^[13]基于 16S rDNA 基因建立了枣疯病植原体 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测方法, 该方法敏感性达 $60 \text{ copies}/\mu\text{L}$; 张荣跃等^[14]基于 *Sec A* 基因建立了甘蔗白叶病植原体 PCR 检测方法, 该方法敏感性达 $50 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 。不同的病原检测方法均具有优缺点, 考虑方法的敏感性、特异性及重复性等问题的同时, 也应考虑检测成本。如巢氏 PCR 检测成本低, 但敏感性相对较低, 荧光定量 PCR 检测所需设备昂贵, 但敏感性较高。因此, 针对不同作物、不同种类病原及其病害发病特点采取适宜的检测技术。如病原浓度高的植原体病害,

可采取低成本的巢氏 PCR 检测技术即可完成绝大多数的检测需求。槟榔黄化病植原体具有分布不均匀^[15]、浓度含量低的特点, 因此所需敏感性较高的检测方法。目前, 国内槟榔黄化植原体检测主要有巢氏 PCR^[16]、环介导等温扩增 (loop mediated isothermal amplification, LAMP)^[17]、实时荧光定量 PCR^[15]及微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)^[18]等方法。巢氏 PCR 检测方法受限于敏感性的原因, 因此未能在 YLD 检测中大量使用。国内槟榔黄化病 LAMP 检测技术的敏感性为 $200 \text{ ag}/\mu\text{L}$ ^[17], 实时荧光定量 PCR 检测方法的敏感性为 $1.16 \times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ^[15], 而本研究建立的 TaqMan qPCR 敏感性达 $1.16 \times 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$ (换算为 $50 \text{ ag}/\mu\text{L}$), 敏感性高于上述 2 个检测方法。微滴式数字 PCR 敏感性达 $0.07 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ^[18], 且样本含量可绝对定量, 但成本高、仪器设备昂贵, 由于条件受限, 目前尚未大量使用。

本检测方法所需的引物和探针对槟榔黄化植原体具有高度特异性, 才能避免非特异性扩增, 而槟榔黄化植原体 16S rDNA 基因与部分槟榔叶绿体基因组序列同源性较高。因此, 本试验在槟榔黄化植原体 16S rDNA 基因保守区域, 且与槟榔叶绿体基因组特异的位置设计引物和探针, 经大量筛选, 获得特异性引物 AMf/AMr 和探针 AM-Probe。经测试, 该检测方法具有较好的敏感性、特异性及重复性, 满足于日常的槟榔黄化植原体检测。并且将该方法应用于苦楝黄化病、细圆藤丛枝病及辣椒黄化病等其他 8 种植原体病害中, 能够区别健康和感病材料, 说明本方法适用于其他植物植原体的检测, 具有一定的通用性, 可用于对其他植物植原体病害或疑似槟榔黄化病中间寄主进行初步诊断。

在应用方面, 该方法实现了海南省 17 个市县的 926 分样品的黄化病检测, 研究结果明确了植原体为海南省槟榔病理性黄化的主要病原之一^[4]; 并对槟榔种苗和槟榔采摘工具进行了检测, 实现了

一直以来由于种苗植原体含量较低造成检测难的问题^[19]; 在其他植物植原体病害的应用方面, 对叶下珠黄化和丛枝症状样本进行初步的诊断, 并发现叶下珠为植原体侵染的新寄主^[11]。目前, 该技术在本科课题组已应用于植原体含量较低的疑似槟榔黄化病媒介昆虫的检测。

参考文献

- [1] 杨连珍, 刘小香, 李增平. 世界槟榔生产现状及生产技术研究[J]. 世界农业, 2018(7): 121-128.
YANG L Z, LIU X X, LI Z P. Production and planting techniques of areca nut[J]. World Agriculture, 2018(7): 121-128. (in Chinese)
- [2] 傅琪彦, 符秀娟, 林丽珍, 丁兆建. 海南省槟榔产业发展现状及对策[J]. 乡村科技, 2021, 12(9): 27-28, 32.
FU Q Y, FU X J, LIN L Z, DING Z J. Development status and countermeasures of areca nut industry in Hainan province[J]. Rural Science and Technology, 2021, 12(9): 27-28, 32. (in Chinese)
- [3] 赵健生. 槟榔黄化病调查报告[J]. 热带作物科技, 1985(1): 64-69.
ZHAO J S. Investigation report on areca palm yellow leaf disease[J]. Tropical Crop Technology, 1985(1): 64-69. (in Chinese)
- [4] 林兆威, 唐庆华, 孟秀利, 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)
- [5] 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)
- [6] SCHNEIDER B, SEEMUELLER E, SMART C D, KIRKPATRICK B C. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas[J]. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma, 1995, 1: 369-380.
- [7] 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.
- [8] 林兆威, 牛晓庆, 唐庆华, 宋薇薇, 孟秀利, 覃伟权. 槟榔隐症病毒 1 型 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 热带作物学报, 2021, 42(11): 3087-3092.
LIN Z W, NIU X Q, TANG Q H, SONG W W, MENG X L, QIN W Q. Development of a TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of areca palm veicularivirus 1[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(11): 3087-3092. (in Chinese)
- [9] 崔红光, 杨柯. 槟榔坏死环斑病毒及其检测方法: CN110643579A[P]. 2020-01-03.
CUI H G, YANG K. Areca palm necrotic ringspot virus and its detection method: CN110643579A[P]. 2020-01-03. (in Chinese)
- [10] SHIRIMA R R, MAEDA D G, KANJU E, CEASAR G, TIBAZARWA F I, LEGG J P. Absolute quantification of cassava brown streak virus mRNA by real-time qPCR[J]. Journal of Virological Methods, 2017, 245: 5-13.
- [11] 林兆威, 牛晓庆, 唐庆华, 王晔楠, 孟秀利, 宋薇薇. 叶下珠黄化植原体和丛枝植原体的分子鉴定[J]. 热带作物学报, 2024, 45(4): 864-871.
LIN Z W, NIU X Q, TANG Q H, WANG Y N, MENG X L, SONG W W. Molecular identification of *Phyllanthus urinaria* yellows phytoplasma and witches'-broom Phytoplasma[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(4): 864-871. (in Chinese)
- [12] 鹿鹏鹏, 吴伟怀, 郑金龙, 王桂花, 贺春萍, 林培群, 黄兴, 梁艳琼, 易克贤. 剑麻紫色卷叶病相关植原体单管巢式 PCR 检测技术建立与优化[J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(7): 1426-1434.
LU P P, WU W H, ZHENG J L, WANG G H, HE C P, LIN P Q, HUANG X, LIANG Y Q, YI K X. Establishment and optimization of single-tube nested PCR detection technique for phytoplasma related to sisal purple leafroll disease[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2021, 29(7): 1426-1434. (in Chinese)
- [13] 韩剑, 罗明, 徐金虹, 王同仁, 张祥林. 枣疯病植原体 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 植物保护, 2014, 40(5): 111-116.
HAN J, LUO M, XU J H, WANG T R, ZHANG X L. Establishment of real-time fluorescent quantitative PCR method with TaqMan probe for detection of jujube witches' broom phytoplasma[J]. Plant Protection, 2014, 40(5): 111-116. (in Chinese)
- [14] 张荣跃, 马永德, 李婕, 王晓燕, 单红丽, 李银翔, 黄应昆. 甘蔗白叶病植原体 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 甘蔗糖业, 2023, 52(1): 21-25.
ZHANG R Y, MA Y D, LI J, WANG X Y, SHAN H L, LI Y H, HUANG Y K. The establishment and application of a PCR method for sugarcane white leaf phytoplasma detection[J]. Sugarcane and Canesugar, 2023, 52(1): 21-25. (in Chinese)

- Chinese)
- [15] 车海彦. 海南省植原体病害多样性调查及槟榔黄化病植原体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)
- [16] 孟秀丽, 唐庆华, 林兆威, 牛晓庆, 刘博, 宋薇薇. 开发高效引物检测槟榔黄化病叶片及种果内植原体[J]. 分子植物育种, 2022, 20(14): 4624-4633.
- MENG X L, TANG Q H, LIN Z W, NIU X Q, LIU B, SONG W W. Development of high-efficiency primers to detect phytoplasmas in leaves and OLD fruits of areca palms infected with yellow leaf disease[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(14): 4624-4633. (in Chinese)
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 林兆威, 宋薇薇, 唐庆华, 牛晓庆, 王宇航, 孟秀丽. 槟榔种苗和采摘工具的植原体检测[J]. 热带农业科学, 2022, 42(11): 68-72.
- LIN Z W, SONG W W, TANG Q H, NIU X Q, WANG Y H, MENG X L. Phytoplasma detection of areca palm seedling and picking tool[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2022, 42(11): 68-72. (in Chinese)