

利用巢式PCR对海南槟榔(*Areca catechu* L.) 黄化病的初步检测

周亚奎^{1,2}, 甘炳春^{1,2}, 张 争³, 隋 春³, 魏建和^{1,2,3}, 杨 云^{1,2}, 杨新全^{1,2}

⁽¹⁾中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所海南分所, 海南兴隆 571533;

⁽²⁾海南省南药资源保护与开发重点实验室, 海南兴隆 571533;

⁽³⁾中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘 要:通过对海南槟榔黄化病病原的研究,初步确定其病原物,对开展后续研究及防治策略提供依据。利用巢式PCR方法,对在海南3个市县采集的28个黄化病植株的不同组织进行了植原体检测,结果表明:在2个市县9个槟榔黄化病病株叶片中检测到了植原体,而在根和茎中没有发现植原体。将扩增片段克隆后测序得到1249 bp的完整植原体序列。利用MEGA3软件构建了系统发育进化树,同源性聚类发现其属于翠菊黄花组B亚组。初步判断发生在海南的槟榔黄化病是由于植原体引起。

关键词: 槟榔; 黄化病; 植原体; 巢式PCR

中图分类号: S43

文献标志码: A

论文编号: 2010-1133

Detection of the Phytoplasmas Associated with Yellow Leaf Disease of *Areca catechu* L. in Hainan Province of China by Nested PCR

Zhou Yakui^{1,2}, Gan Bingchun^{1,2}, Zhang Zheng³, Sui Chun³, Wei Jianhe^{1,2,3}, Yang Yun^{1,2}, Yang Xinquan^{1,2}

⁽¹⁾Hainan Branch Institute of Medicinal Plant,

Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Xinglong Hainan 571533;

⁽²⁾Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine, Xinglong Hainan 571533;

⁽³⁾Institute of Medicinal Plant Development,

Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193)

Abstract: Yellow leaf disease (YLD) of the areca nut palm was a severe disease that occurred mainly in Southeast Asia. Although YLD has similar symptoms in different regions, it has been proven to be induced by different pathogens. In this work, 28 samples of diseased palms were collected from three different counties of Hainan Province, China. Their 16S rDNA was studied by the nested PCR to detect the phytoplasma associated with YLD. The results showed that amplification was observed only in leaf samples, but not in stem or root samples, and phytoplasmas were detected only in 9 samples collected from 2 counties of Hainan province. High bootstrap values suggested that arecanut YLD phytoplasma is most closely related to *Paulownia Witches' Broom* Phytoplasma and is a member of the Aster yellows group (group 16Sr I -B).

Key words: *Areca catechu* L.; yellow leaf disease; phytoplasma; nested PCR

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划课题“重点道地南药良种选育及规范化生产关键技术研究”(2007BAI27B03)。

第一作者简介:周亚奎,男,1981年出生,硕士,主要从事药用植物病理学研究,通信地址:571533 海南省万宁市兴隆中国医学科学院药用植物研究所海南分所, Tel: 0898-62554558, E-mail: zhouyakui163@163.com。

通讯作者:魏建和,男,1970年出生,研究员,博士,主要从事药用植物基因资源和分子育种研究,已发表论文和著作近80篇(部)。参与中国南药种质资源引种保存,海南南药种质保存和利用取得显著社会和经济效益,获海南省科技进步一等奖;中药材野生抚育与中药材产地适宜性等方面的研究成果获国家科技进步二等奖;培育推广国内外第一个北柴胡新品种“中柴1号”,获中华中医药科学进步三等奖;与清华大学合作,设计完成了“中药材GAP认证管理信息系统”,获北京市科技进步三等奖等。 Tel: 010-62818841, E-mail: wjianh@263.net, jhwei@implad.ac.cn。

收稿日期:2010-04-19, **修回日期:**2010-06-30。

0 引言

槟榔(*Areca catechu* L.)是中国四大南药之一,海南第二大经济作物,年产值达20亿元左右。槟榔在印度等国也大面积种植,全世界种植约56万hm²[1]。槟榔果不仅是咀嚼嗜好品,而且还有很好的药用价值。

槟榔黄化病是一种毁灭性病害,在发病初期,植株下层2~3片叶叶尖开始黄化,黄绿部分分界较明显,后逐渐发展至整片叶黄化[2-3]。经调查发现,旱季为症状表现最明显的时期(海南旱季为12月—翌年6月),而雨季来临时,症状有所缓解。发病植株花苞变小或不能展开,提早枯萎,少量结果,但果实变小,品质变差,基本没有商品价值。海南省最早于1981年发现[4-5]槟榔黄化病,现已有超过20%的槟榔受害。迄今没有有效的防治手段来控制病害发生发展,一旦发现只能成片刨除已成株几年甚至几十年的结果株,损失非常严重。

鉴于槟榔黄化病严重影响了槟榔种植生产,从发现槟榔黄化病至今,各国学者即开始其病原鉴定研究。经过研究发现,真菌、细菌、病毒、线虫等病原菌被排除[6],而最有可能导致此病害的病原为植原体。印度通过电镜观察,在槟榔黄化病病株筛管细胞中发现了植原体[7],由于当时病原检测技术限制,没有得到病原植原体的分离物及其基因序列信息,还无法对植原体的分类及致病机理等开展深入研究,进一步的研究

也未见报道。2007年意大利的Charith等[8]针对植原体病原对印度的槟榔黄化病病株进行了PCR检测,结果并未检测到植原体的存在。针对中国的槟榔黄化病,海南的罗大全等[9]研究较早,并于2002年对其进行PCR检测,得到980 bp的植原体序列,于2009年提交1200 bp序列。

笔者拟利用巢式PCR检测海南槟榔黄化病病株中植原体的有无,分析不同产地槟榔黄化病病株中是否均存在植原体,以期为后续深入研究病原与病症之间的因果关系奠定基础。在采样地点和时间的设计上采取了多地点、长时间采样检测,对结果综合评估,避免各种因素的干扰。

1 材料与方法

实验中所用的槟榔黄化病材料分别采自海南省的3个市县:琼海市、万宁市、陵水县(表1)。发病植株的生长年限为8~20年。健康植株对照采自未发生黄化病的槟榔园。

2008年8月—2009年4月,每2个月采样一次。每个病株都分为根、茎、叶3个部分,其中,根部样品取自地面15 cm以下部分,茎取自树干顶端,叶片取黄绿交界部位。

DNA提取方法参考Kollar[10]并进行了改进。

巢式PCR扩增使用植原体通用引物:R16mF2/R16mR1和R16F2/R16R2[11]。其中R16mF2/R16mR1

表1 不同槟榔黄化病组织植原体检测结果

取样时间	取样地点		植株数	PCR 检测结果		
	市县	镇		根	茎	叶
2008-08	万宁市	南林	2	-	-	-
		长青	2	-	-	-
2008-10	万宁市	南林	3	-	-	+(1)
		长青	2	-	-	-
2008-12	万宁市	南林	2	-	-	+(2)
		长青	2	-	-	-
2009-02	万宁市	南林	2	-	-	-
	琼海市	万泉	2	-	-	+(1)
	陵水县	香水湾	2	-	-	-
	万宁市	南林	2	-	-	-
2009-04	琼海市	万泉	3	-	-	+(3)
		石壁	2	-	-	+(2)
	陵水县	香水湾	2	-	-	-
合计	3	5	28	-	-	9
2008-08—2009-02	兴隆	健康对照	2	-	-	-

注:+:PCR结果阳性;-:PCR结果阴性。

为第一次扩增使用引物,退火温度52℃;R16F2/R16R2为第二次扩增引物,模板为第一次扩增产物,退火温度60℃。

扩增得到的产物用 Promega PCR Purification Kit 纯化,经pGEM-T载体连接并转化到大肠杆菌感受态细胞中,重组质粒经酶切及PCR鉴定后测序,序列比对后提交GenBank。

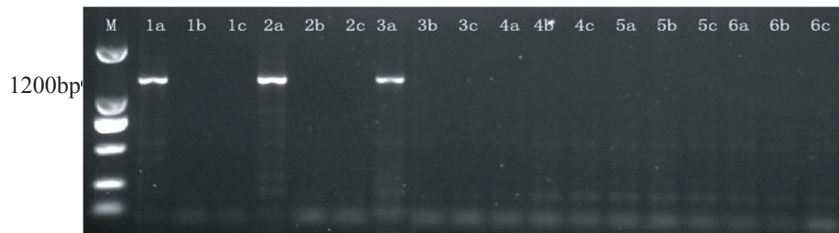
通过BioEdit软件将获得的槟榔植原体序列和20个其他确定亚组的植原体序列比对后,利用分子进化遗传分析软件MEGA3分析进化系统演化,以确定槟榔黄化病植原体所属亚组,演化分析采用最大简约法

做系统进化树,在构建过程中选择 *Acholeplasma laidlawii* 作为外群。

2 结果与分析

在第二次PCR扩增时有9个叶片样品得到1200 bp左右的片段(图1),分别来自万宁的南林和琼海的万泉、石壁。将片段克隆后测序得到1249 bp的完整序列,并提交GenBank,登录号为FJ998269。

将得到的槟榔黄化病植原体序列和其他20个已确定亚组的植原体序列比对,通过MEGA3软件构建了系统发育进化树(图2)。从图中可以看出槟榔黄化病植原体和泡桐丛枝病植原体同归一组,同属于翠菊



样品1~5为采自海南不同地区样品,其中1:万泉,2:石壁,3:南林,4:常青,5:香水湾;样品6为健康对照,泳道1a, 1a, 2a, 3a, 4a, 5a和6a为叶片DNA;泳道1b, 2b, 3b, 4b, 5b和6b为茎组织DNA;泳道1c, 2c, 3c, 4c, 5c和6c为根组织DNA;M:DL2000 DNA分子标记,泳道1a, 2a, 3a均扩增出1200 bp条带。

图1 巢式PCR检测黄化病植原体电泳结果

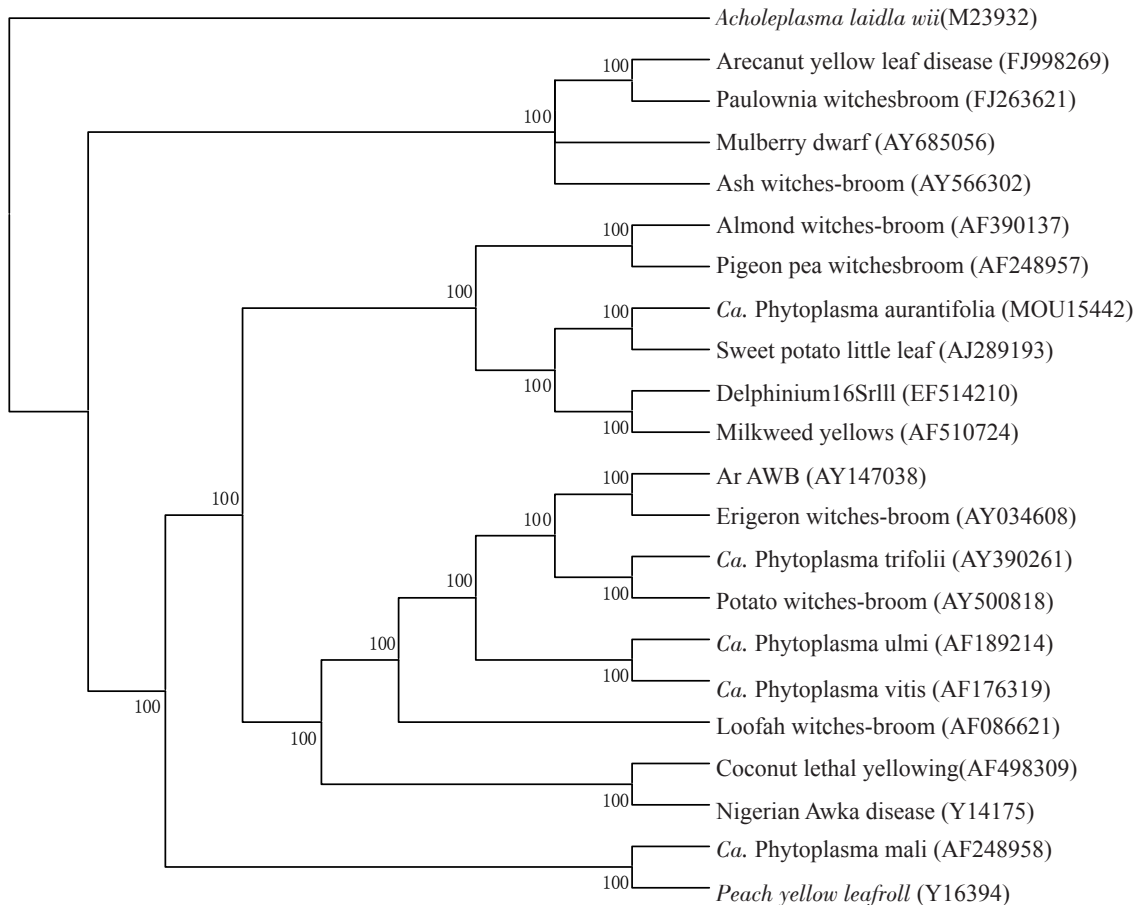


图2 采用最大简约法构建黄化病植原体及其相关的20个植原体株系的系统进化树

黄花组 B 亚组(16Sr I -B)。

3 讨论

槟榔黄化病已成为制约槟榔生产最严重的病害,但导致这一病害的病原鉴定研究还相当滞后。Nampoothiri^[6]曾报道印度槟榔黄化病的病原为植原体,还曾有人怀疑槟榔黄化病和椰子致死黄化病由一种病原即植原体引起。但 2007 年 Charith^[8]却报道在印度和意大利发生槟榔黄化病植株上未检测到任何植原体。目前,椰子致死黄化病还没有在中国发现,而且椰子致死黄化病和笔者检测到的植原体不属同一亚组。罗大全等^[9]对海南槟榔黄化病的检测中也发现植原体,但是还没有通过科赫氏法则验证是否为其病原。笔者在与之提交的序列比对中发现同源性达到 99.7%,而且序列延长 12 个碱基。笔者采用的 PCR 引物不同于罗大全的,但均在海南槟榔黄化病组织中检测到了相似的植原体。

2008 年 8 月—2009 年 4 月中,笔者在 3 个地区,每 2 个月采样一次,共采集了 28 个样品,避免了单次采样造成的偶然性。在这 28 个样品中,仅在 9 个样品的叶片中发现了植原体。这表明,PCR 检测手段及相应的取样策略还需通过其他病原检测技术的应用得以佐证和完善。最终要确定植原体侵染是导致槟榔黄化病的真正原因尚需更多的证据。目前笔者正增加样品采集地以及样品数量,使用更加灵敏的检测方法进行检测;对刺吸式昆虫的检测也在进行中,以确定了槟榔黄化病植原体的传播载体。

4 结论

通过对海南地区采集的 28 个槟榔黄化病样品进行巢式 PCR 检测,9 个样品中发现植原体,在对序列进行克隆测序后比对确认为植原体序列,可以初步确认

此病是由植原体引起。利用 MEGA3 软件对得到的植原体序列及 20 个相近植原体序列进行系统进化研究,最终确定该植原体属于翠菊黄花组 B 亚组(16Sr I -B),为后期深入研究该病害的致病机理和传播方式提供了依据。

参考文献

- [1] 陈良秋.印度发展槟榔产业的成功经验[J].中国热带农业,2006,5: 32.
- [2] NAYER R, SELISKAR C E. Mycoplasma like organisms associated with yellow leaf disease of *Areca catechu* L.[J]. European J. Forest Path,1978,8:125-128.
- [3] RAWTHER T S S. Yellow leaf disease of arecanut: Symptomatology, bacterial and pathological studies[J]. Arecanut and Spices Bulletin,1976,9:22-24.
- [4] 赵健生.槟榔黄化病的调查报告[J].热带作物科技,1985(1):64-65.
- [5] 金开璇,孙福生,陈慕容,等.槟榔黄化病的病原的研究初报[J].林业科学,1995,31(6):556-558.
- [6] Nampoothiri KUK. Arecanut yellow leaf disease. Kasaragod[M]. India: CPCRI. 2000:15-19.
- [7] Selsikar C E, Wilson C I. Yellows diseases of trees//Mycoplasma diseases of trees and shrubs[J]. Academic Press,1981:43-44.
- [8] Charith R A P, Janardhana G R, Teruo S, et al. Are phytoplasmas the etiological agent of yellow leaf disease of *Areca catechu* in India [J]. Bulletin of Insectology,2007,60:161-162.
- [9] 罗大全,陈慕容,叶沙冰,等.多聚酶链式反应检测海南槟榔黄化病 [J].热带农业科学,2002,22(6):13-16.
- [10] Kollar A, Seemuller E, Bonnet F, et al. Isolation of the DNA of various plant pathogenic mycoplasma like organisms from infected plants[J]. Phytopathology,1990, 80, 233.
- [11] Lee I M, Hammond W, Davis R E, et al. Universal application and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma like organisms[J]. Phytopathology,1993,83:834-842.