

# 海南槟榔黄化病病原物的分子鉴定

车海彦<sup>1</sup>, 吴翠婷<sup>2</sup>, 符瑞益<sup>1</sup>, 温衍生<sup>1</sup>, 叶莎冰<sup>1</sup>, 罗大全<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所 海南儋州 571737  
<sup>2</sup> 海南省热带农业有害生物检测监控重点实验室

<sup>2</sup> 海南大学环境与植物保护学院, 海南儋州 571737

**摘要** 槟榔黄化病是槟榔上的一种重要病害, 如何快速检测该病原菌是防治该病的重要基础。利用植原体 16S rDNA 通用引物对海南感染黄化病的槟榔花苞总 DNA 进行巢式 PCR 扩增, 获得约 1.2 kb 的特异片段, 并对扩增产物进行核苷酸序列测定。通过 BLAST 程序比较、系统进化树构建及 iPhyClassifier 分析表明, 引起海南槟榔黄化病病原植原体属于翠菊黄化植原体组(16Sr I 组), 且为该组中一个新的亚组, 即 G 亚组, 现将其暂命名槟榔黄化植原体(Arecanut yellow leaf phytoplasma, AYL)。

**关键词** 槟榔黄化病; 植原体; 16S rDNA; 分子鉴定

**doi** 10.3969/j.issn.1000-2561.2010.01.016

**中图分类号** S432.1

槟榔(*Areca catechu* L.)是中国四大南药(槟榔、砂仁、益智、巴戟)之首, 药用价值很高。槟榔产业是海南省热带作物产业中仅次于天然橡胶的第二大支柱产业。自 1981 年, 在屯昌发现槟榔黄化病以来, 琼海、陵水、万宁、三亚等地的槟榔种植区相继开始发现黄化病的危害, 发生情况逐年严重, 发生地点和面积也不断扩大, 大量槟榔植株黄化死亡, 严重影响了海南槟榔产业的健康发展<sup>[1-5]</sup>。俞浩等<sup>[2]</sup>调查认为万宁、屯昌的槟榔黄化病是由缺钾引起。金开璇等<sup>[9]</sup>通过电镜观察发现海南槟榔黄化病病株的输导组织内存在类细菌(Bacteria-like Organisms, 简称 BLO)与类菌原体(Mycoplasma like organisms, MLO)菌体, 初步认为海南槟榔黄化病是由 BLO 与 MLO 复合侵染引起的。在此之后, 罗大全等<sup>[7-8]</sup>通过电镜观察、抗菌素注射诊断、PCR 技术检测, 证实海南槟榔黄化病是由植原体(原称类菌原体)引起, 但未见从分子水平等方面对其分类地位研究的报道。笔者采用分子生物学方法对田间采集到的表现黄化症状的槟榔植株进行植原体 16S rDNA 的克隆、测序, 明确其分类地位。以期对槟榔黄化病快速检测技术体系的建立提供理论依据, 为探索该病害的防治奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

表现典型黄化症状的感病样品采自海南屯昌(3 株): Dc1、Dc2、Dc5; 定安(3 株): Da2、Da3、Da5; 琼海(3 株): Qh21、Qh22、Qh23; 万宁(3 株): Wn1、Wn2、Wn3; 三亚(3 株): Sy15、Sy21、Sy22; 健康样品采自海南儋州。

### 1.2 方法

1.2.1 槟榔花苞总 DNA 的提取 参照 Lee 等<sup>[9]</sup>的提取方法, 提取的 DNA 于 -20 °C 冰箱保存备用。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30660103), 中央科研院所基本科研业务费专项(No. 2009hzs1J012), 国家支撑计划课题(No. 2007BAD48B06)资助。

第一作者简介: 车海彦, 女, 1976 年生, 助理研究员, 在职博士, 研究方向: 植物病毒/植原体病害研究。Tel: 0898-23300265; E-mail: chehaiyan2002@yahoo.com.cn。

\* 通讯作者, 罗大全, 1968 年生, 研究员。Tel: 0898-23300396; E-mail: luodaquan@163.com。

收稿日期: 2009-10-12 修回日期: 2010-01-05

1.2.2 16S rDNA 巢式 PCR 扩增(Nested-PCR)和克隆 根据 Gundersen 等<sup>[10]</sup>和 Lee 等<sup>[11]</sup>报道的引物对扩增植原体 16S rDNA 基因片段序列。R16mF2/R16mR1 作为第一引物对, R16F2n/R16R2 作为第二引物对, 进行巢式 PCR 扩增。引物对序列如下:

R16mF2: 5'-CATGCAAGTCCAACGGA-3';

R16mR1: 5'-CTTAACCCCAATCATCGAC-3';

R16F2n: 5'-ACGACTGCTAAGACTGG-3';

R16R2: 5'-GCCGTGTGTACAAACCCCG-3'。

引物 R16mF2/R16mR1 和 R16F2/R16R2 均由上海英俊生物技术有限公司合成。

PCR 反应模板: 直接 PCR 以提取的总 DNA 为模板, 巢式 PCR 以直接 PCR 产物稀释 50 倍后为模板。

PCR 反应均以健康槟榔花苞总 DNA 为阴性对照和无菌双蒸水为空白对照。反应体系为 25  $\mu$ L, 含有 10 $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L 引物各 1  $\mu$ L、10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L、0.125  $\mu$ L Taq DNA 聚合酶 5 U/ $\mu$ L (大连 TaKaRa 公司), 1  $\mu$ L 模板 DNA, 无菌水 18.375  $\mu$ L。PCR 反应条件为 94  $^{\circ}$ C, 2 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 45  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环, 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 经溴化乙锭染色后, 用 UVI 凝胶成像系统观察。PCR 扩增出的目标产物由 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 纯化回收, 将目标产物与 pMD18-T Simple 载体连接, 转化至 *Eco*l DH5 $\alpha$  中, 利用 PCR 反应筛选阳性克隆。

1.2.3 核苷酸序列测定与分析 序列测定委托上海英俊生物技术有限公司。

序列拼接用 DNASTar 软件包中的 SeqMan 进行; 序列相似性比较及分析用 MegAlign 的 Clustal V 方法进行。

序列相似性查找通过 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)程序进行。

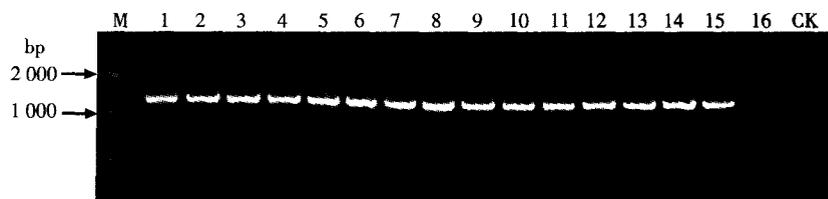
进化树构建用 MEG4.0 软件, 最小进化(Minimum Evolution)分析用近邻交换算法(Close-Neighbor-Interchange, CNI)完成, 起始树用邻近相邻法(Neighbour-Joining, NJ)建立, 以 1 000 为重复值进行 Bootstrap 效验。选择 *Acholeplasma laidlawii*(M23932)为外群。

1.2.4 计算机模拟 16S rDNA 限制性内切酶酶切及相似性分析 利用植原体分类鉴定的在线工具-*iPhyClassifier* 进行序列分析<sup>[12-14]</sup>, 任意 2 个植原体株系间相似系数(similarity coefficient, F)根据公式  $F=2N_{xy}/(N_x+N_y)$  进行计算, 其中  $x$ 、 $y$  为酶切的 2 个植原体株系,  $N_x$  和  $N_y$  分别代表 2 个株系用 17 种限制性内切酶(*Alu* I, *Bam*H I, *Bfa* I, *Bst*U I, *Dra* I, *Eco*R I, *Hae* III, *Hha* I, *Hinf* I, *Hpa* I, *Hpa* II, *Kpn* I, *Sau*3A I, *Mse* I, *Rsa* I, *Ssp* I, *Taq* I)酶切产生的 RFLP 条带数,  $N_{xy}$  为  $x$  和  $y$  2 个株系共有的 RFLP 条带数。相似系数  $F \leq 0.85$ , 被划分为不同的组, 相似系数  $F \leq 0.97$ , 被划分为不同的亚组; 待分析序列和亚组中代表性株系的相似系数为 0.99 或 0.98 时, 该序列为该亚组的变种, 用 1 个或 2 个星号表示(\* 或 \*\*), 如, 16Sr I -A\*( $F=0.99$ ), 16Sr I -A\*\*( $F=0.98$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 检测结果

从表现黄化症状的槟榔花苞样品总 DNA 中扩增出约 1.2 kb 的特异片段, 片段大小与 Lee 等<sup>[11]</sup>报道的相符, 而健康植株和双蒸水对照均未出现特异扩增片段(见图 1)。



M. DL2000 Marker; 1. De1; 2. De2; 3. De5; 4. Da2; 5. Da3; 6. Da5; 7. Qh21; 8. Qh22; 9. Qh23; 10. Wn1; 11. Wn2; 12. Wn3; 13. Sy15; 14. Sy21; 15. Sy22; 16. 健康槟榔样品; CK. 空白对照。

图 1 槟榔黄化病样品 16S rDNA 的 PCR 扩增产物凝胶电泳

## 2.2 植原体 16S rDNA 基因片段的序列分析

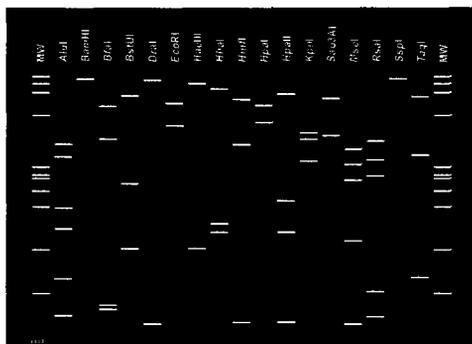
将 Dc1、Da3、Qh22、Wn2 和 Sy15 样品扩增到的特异片断进行纯化、克隆、测序。结果表明，5 个样品的测序结果相同，16S rDNA 基因扩增片段含有 1 237 个核苷酸(GenBank 登录号为 FJ694685)，G+C 的含量为 47.0%。利用国际基因数据库 GenBank 中的 BLAST 程序对测序结果进行同源性检索发现，与该序列有同源关系的序列均为植原体序列，与 16Sr I 组中植原体的同源性最高，在 98.3% 以上。将此植原体株系暂命名槟榔黄化植原体(Arecanut yellow leaf, AYL)。

## 2.3 计算机模拟 16SrDNA-RFLP 电子酶切图谱及相似系数分析

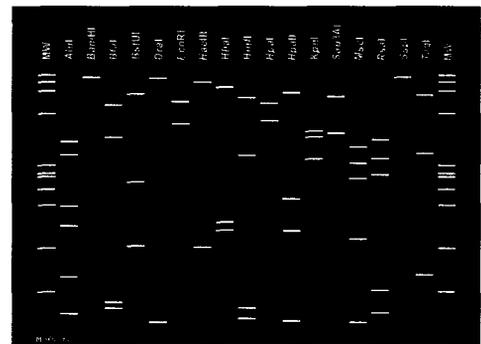
利用植原体分类鉴定的在线工具 iPhyClassifier 进行分析，结果表明：与 16Sr I -B 亚组中的 M30790 相似系数最高，但 AYL 与 16Sr I -B 组中 M30790 的 *Hinf* I 限制性内切酶的酶切图谱不同(图 2)，相似系数为  $F=2Nx/(Nx+Ny)=2 \times 50 / (52+51)=0.97$ 。其中， $x$  为 M30790； $y$  为 AYL(表 1)。

表 1 M30790 和 AYL 的模拟 RFLP 图的详细比较结果

限制性内切酶	$N_x$	$N_y$	$N_{xy}$	限制性内切酶	$N_x$	$N_y$	$N_{xy}$
<i>Alu</i> I (AGCT)	6	6	6	<i>Hpa</i> I (GTTAAC)	2	2	2
<i>Bam</i> HI (GGATCC)	1	1	1	<i>Hpa</i> II (CCGG)	4	4	4
<i>Bfa</i> I (CTAG)	4	4	4	<i>Kpn</i> I (GGTACC)	3	3	3
<i>Bst</i> UI (CGCG)	3	3	3	<i>Mse</i> I (TTAA)	5	5	5
<i>Dra</i> I (TTTAAA)	2	2	2	<i>Rsa</i> I (GTAC)	5	5	5
<i>Eco</i> RI (GAATTC)	2	2	2	<i>Sau</i> 3A I (GATC)	2	2	2
<i>Hae</i> III (GGCC)	2	2	2	<i>Ssp</i> I (AATATT)	1	1	1
<i>Hha</i> I (CGGC)	3	3	3	<i>Taq</i> I (TCGA)	3	3	3
<i>Hinf</i> I (GANTC)	4	3	2	总数	52	51	50



A. 槟榔黄化病植原体



B. 'Ca. Phytoplasma asteris' (M30790)

图 2 16S rDNA 的模拟 RFLP 酶切图谱

## 2.4 系统进化树构建及分析

用 MEGA 4.0 软件构建了槟榔黄化病植原体和植原体组/亚组中代表性株系的进化树，槟榔黄化病植原体与 16Sr I 组的关系最近，但在同一大的进化分支上，明显不同于 16Sr I 组中的其他亚组，而在独立的小分支上(图 3)。

## 3 讨论

罗大全等<sup>[7]</sup>通过电子显微镜观察，在槟榔病株叶脉、叶鞘基部呈水渍状的幼嫩花苞中观察到了植原体，大小为 180~550 nm，单位膜的厚度为 9~13 nm，而健康植株中未观察到植原体的存在；用二种四环素族抗菌素注射感病海南槟榔黄化病植株后，植株的新叶能正常抽出，黄化症状减轻，而对照病株不抽叶，全株黄化，植株长不大，不能开花，这也符合植原体能被四环素族抗生素所抑制的特点。利用植原体通用引物对槟榔黄化病样品进行巢式 PCR 扩增得到约 1.2 kb 的特异片段，而健康植株未扩增到该特异片段，经序列测定得到长为 1 237 个核苷酸片段，G+C 的含量为 47.0%。利用国际基因数据库 GenBank 中的 BLAST 程序对测序结果进行同源性检索发现，与该序列有同源关系的序列均为植原体序列，与 16Sr I 组中植原体的同源性最高，在 98.3% 以上。通过植原体分类鉴定的在线工具-iPhyClassifier 分析，AYL 与 16Sr

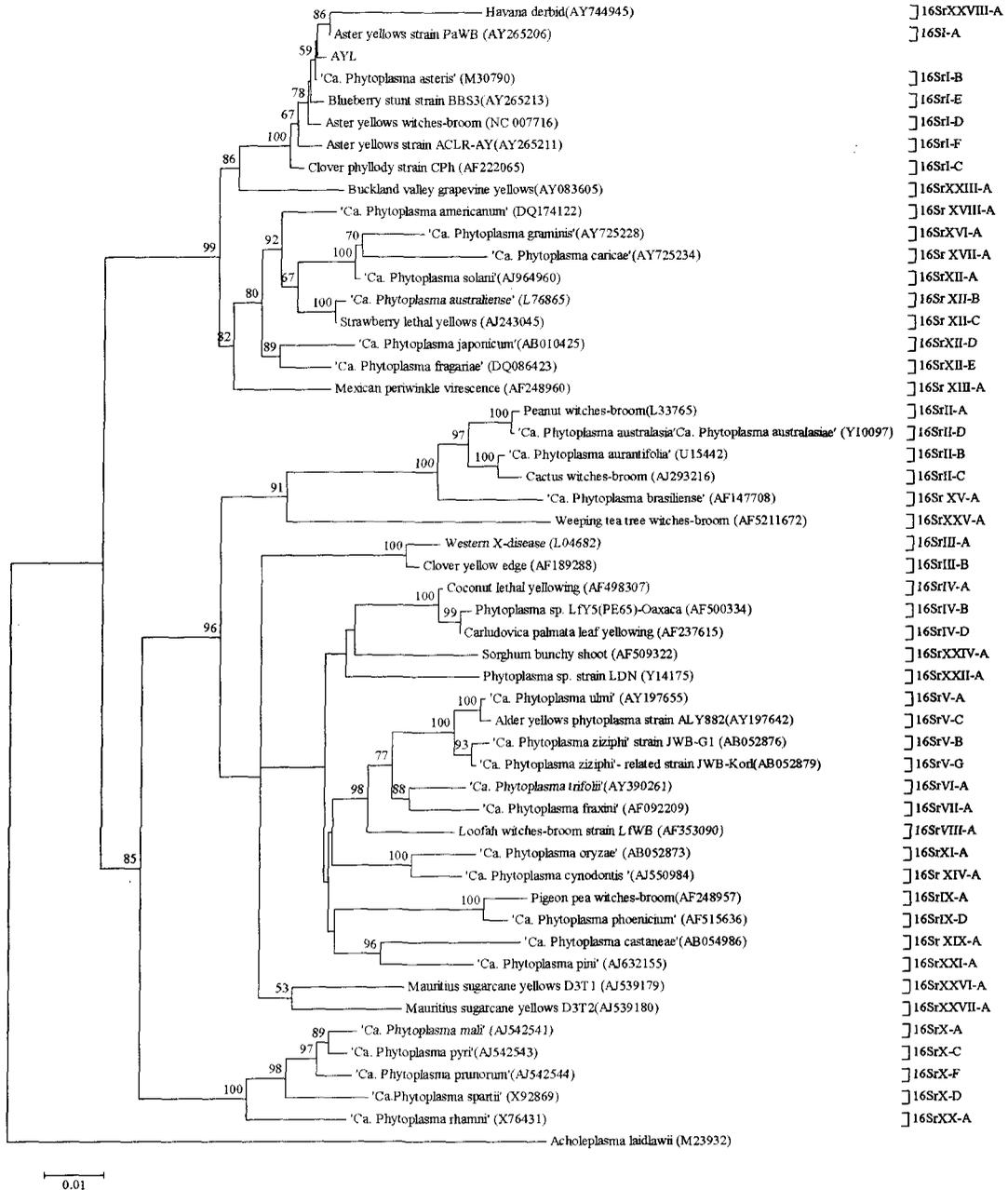


图 3 基于 16S rDNA 序列构建的槟榔黄化病植原体和 16Sr 组/亚组中代表性的植原体株系的进化树

I-B 组中 M30790 的相似系数最高, 为 0.97, Wei<sup>[12-13]</sup>和 Zhao 等<sup>[14]</sup>将植原体 16S rDNA-F2n/R2 片段进行模拟 RFLP, 将形态相似系数 ≤ 0.97 的划分为不同的亚组, 说明 AYL 代表 16Sr I 组中的 1 个新的亚组; 系统进化树分析也表明 AYL 明显不同于 16Sr I 组中的其他亚组, 在独立的小分支上, 建议将 AYL 所在的亚组命名为 16Sr I-G 亚组。

发生在中国海南省和印度的槟榔黄化病在症状表现上非常相似, 印度学者 Nayar 等<sup>[15]</sup>在 1978 年证明了印度槟榔黄化病是由植原体引起的, 但 Purushothama 等<sup>[16]</sup>用植原体通用引物未从印度感病的槟榔叶片中扩增到特异片段。本研究亦无法获得印度槟榔黄化病植原体材料开展比较研究, 仍有待确认中国海南省和印度发生的槟榔黄化病病原的相关性。

## 参 考 文 献

- [1] 赵健生. 槟榔黄化病的调查报告[J]. 热带作物科技, 1985(1): 64-49.
- [2] 俞 浩, 冯淑芬, 郑建华. 海南岛槟榔“黄化病”问题调查报告[J]. 热带农业科学, 1986(3): 45-49.
- [3] 罗大全. 海南槟榔黄化病研究现状[J]. 世界热带农业信息, 2007(6): 24-26.
- [4] 罗大全. 海南槟榔黄化病的发生及防治[J]. 海南农垦科技, 2007(5): 26-29.
- [5] 罗大全. 重视海南槟榔黄化病的发生及防控[J]. 中国热带农业, 2009(3): 11-13.
- [6] 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): 556-559.
- [7] 罗大全, 陈慕容, 叶沙冰, 等. 海南槟榔黄化病的病原鉴定研究[J]. 热带作物学报, 2001, 22(3): 43-46.
- [8] 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, 23(6): 13-16.
- [9] Lee I M, Davis R E, Hiruki C. Genetic relatedness among clover proliferation mycoplasma-like organisms(MLOs) and other MLOs investigated by nucleic acid hybridization and restriction fragment length polymorphism analyses[J]. Appl. environ. Microbiol, 1991, 57: 3 565-3 569.
- [10] Gundersen D E, Lee I M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs[J]. Phytopathol Mediterr, 1996, 35: 144-151.
- [11] Lee I M, Hammond R W, Davis R E, et al. Gundersen D E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms[J]. Phytopathology, 1993, 83: 834-842.
- [12] Wei W, Davis R E, Lee I M, et al. Computer simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 2007, 57: 1 855-1 867.
- [13] Wei W, Lee I M, Davis R E, et al. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 2008, 58: 2 368-2 377.
- [14] Zhao Y, Wei W, Lee I M, et al. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group(16Sr III)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59: 2 582-2 593.
- [15] Nayar R, Selsikar C E. Mycoplasma-like organisms associated with yellow leaf disease of Areca catechu L[J]. European Journal of Forest Pathology, 1978, 8: 125-128.
- [16] Purushothama C R A, Ramanayaka J G, Sano T, et al. Are phytoplasmas the etiological agent of yellow leaf disease of Areca catechu in India[J]. Bulletin of Insectology, 2007, 60(2): 161-162.

## Molecular Identification of Pathogens from Arecanut Yellow Leaf Disease in Hainan

Che Haiyan<sup>1,2</sup>, Wu Cuiting<sup>3</sup>, Fu Ruiyi<sup>2</sup>, Wen Yansheng<sup>1,2</sup>, Luo Daquan<sup>1,2</sup>

- 1 Environment and Plant Protection Institute, CATAS, Danzhou, Hainan 571737; Hainan Key Laboratory for Detection and Monitoring of Tropical Agricultural Pests, Danzhou, Hainan 571737;  
2 College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737

**Abstract** Arecanut yellow leaf disease was an important disease infecting areca nut palm (*Areca catechu* L). A PCR product (about 1.2 kb) was amplified in nested-PCR assay with phytoplasma universal 16S rRNA gene primers, and the total DNA sample extracted from diseased areca nut inflorescence was used as the template. The amplified fragments were sequenced. Sequence comparison in the Blast program of GenBank, construction of phylogenetic tree and iPhyClassifier analysis indicated that the phytoplasma causing areca nut yellow leaf disease in Hainan belonged to a new subgroup, subgroup G, of Aster yellows group (16Sr I group), and was temporarily named areca nut yellow leaf phytoplasma.

**Keywords** areca nut yellow leaf disease; phytoplasma; 16S rDNA; molecular identification.