植物病理学报
ACTA PHYTOPATHOLOGICA SINICA 48(2): 263-270(2018)

doi:10.13926/j.cnki.apps.000130

Bio-PCR 方法检测葫芦科作物种子携带西瓜嗜酸菌的特异性引物筛选

阚玉敏[1#], 云晓敏[2#], 李玉文[1], 李健强[1], 罗来鑫[1*]

([1]中国农业大学植物病理学系/种子病害检验与防控北京市重点实验室,北京 100193; [2]北京市种子管理站,北京 100088)

摘要:由西瓜嗜酸菌(*Acidovorax citrulli*)引起的细菌性果斑病是一种毁灭性的种传病害,可为害多种葫芦科作物并造成重大经济损失。该病原菌为检疫性有害生物,种子带菌是田间病害发生的最重要初侵染来源,因此,种子健康检测成为病害综合防控过程中的重要环节。Bio-PCR 是当前种子携带细菌检测的常用方法,而特异性引物的选择和使用是检测的关键。本研究使用已报道的 7 对引物对 17 株西瓜嗜酸菌、10 株嗜酸菌属其它种的菌株和 6 株其它属的植物病原细菌进行了 Bio-PCR 检测,筛选出对西瓜嗜酸菌特异性最好的引物为 SEQID4^{m}/SEQID5。研究表明:使用该引物对西瓜嗜酸菌 MH21 纯菌菌悬液的检测限度为 10^2 CFU · mL^{-1};在人工添加菌悬液的模拟带菌西瓜种子中,使用 ASCM 和 EBBA 两种半选择性培养基结合引物 SEQID4^{m}/SEQID5 进行 Bio-PCR 检测,ASCM 对种子中带菌量的检测限度可达到 0.01 CFU · g^{-1},EBBA 对种子中带菌量的检测限度为 0.1 CFU · g^{-1}。

关键词:西瓜嗜酸菌;Bio-PCR;引物;特异性;灵敏度

Screening of specific primers for detection of *Acidovorax citrulli* from cucurbits seed by Bio-PCR

KAN Yu-min[1], YUN Xiao-Min[2], LI Yu-wen[1], LI Jian-Qiang[1], LUO Lai-xin[1]

([1]Department of Plant Pathology, China Agricultural University and Beijing Key Laboratory of Seed Disease Testing and Control (BKL-SDTC), Beijing 100193, China; [2]Beijing Seed Administration Station, Beijing 100088, China)

Abstract: Bacterial fruit blotch (BFB), caused by *Acidovorax citrulli*, is one of the most destructive seed-borne diseases of watermelon and other cucurbits. This seed-borne quarantine disease has been reported in most watermelon and melon producing regions worldwide. Since the infected seeds are the most important primary inoculum source of BFB, seed health testing (SHT) and subsequent elimination of the contaminated seeds is one of the most effective methods to control the disease. Bio-PCR is widely used in SHT for the detection of *A. citrulli*. As *A. citrulli* has abundant genetic diversity and many other closely related species, specific and sensitive primers are very important for the success of the seed health testing. To screen the best primers for detection of *A. citrulli* by Bio-PCR, 33 bacterial strains including 17 strains of *A. citrulli*, 10 strains of other *Acidovorax* species and 6 strains of other genera of plant pathogenic bacteria were chosen to evaluate 7 pairs of primers reported so far. Results indicated that the primer pair SEQID4^{m}/SEQID5 had the best specificity that could distinguish all the tested strains of *A. citrulli* from those of other species and genera. The sensitivity of this primer pair was further tested with the Bio-PCR assay of *A. citrulli*. Results showed that the detection limit of the assay was 10^2 CFU · mL^{-1} for the pure bacterial culture, while for watermelon seeds the detection limit were 0.01 CFU · g^{-1} and

收稿日期: 2017-08-10; **修回日期**: 2017-09-20; **网络出版时间**: 2017-09-21
网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2184.S.20170921.1333.001.html
基金项目: 北京市农作物种子专项资金(京农种专(2016)-6)
通讯作者: 罗来鑫,博士,副教授,主要从事种子病理学和种传细菌病害研究;E-mail:luolaixin@cau.edu.cn
共同第一作者: 阚玉敏,女,博士研究生,主要从事种子病理学研究;E-mail:kkanyumin@163.com
云晓敏,男,高级农艺师,主要从事种子健康检测及种子质量管理工作;E-mail:yun124@sina.com。

0.1 CFU · g^{-1} when seed extracts were cultured on semi-selective media ASCM and EBBA, respectively.

Key words: *Acidorvorax citrulli*; Bio-PCR; primer; specificity; sensitivity

中图分类号: S432.42 文献标识码: A 文章编号: 0412-0914(2018)02-0263-08

西瓜嗜酸菌(*Acidovorax citrulli*,简称 Ac)是瓜类作物上最具毁灭性的病原之一,可引起西瓜、甜瓜等多种瓜类作物的细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB)[1~3]。在适宜的条件下,该病害可在育苗床和定植田迅速传播扩展,造成苗期病害及后期的果实病害[4]。由于危害严重及防治手段有限,西瓜嗜酸菌已被多个国家及地区列为检疫性有害生物,我国于 1997 和 2007 年先后将其列入《中国进境植物检疫潜在的危险性病、虫、杂草》(三类有害生物)和《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》。

瓜类细菌性果斑病是一种典型的种传细菌病害[5],带菌的种子是瓜类作物生产及制种过程中病害发生的最重要初侵染来源[6~8]。由于病原菌遗传多样性复杂[9],现有的方法如田间喷施铜制剂及农用链霉素等均不能有效地控制该病害的发生[10],因此进行种子健康检测并对带菌种子进行适当处理成为控制该病害的重要手段。传统的检测方法有:利用半选择性培养基分离培养、致病性测定、出苗检测和血清学方法等,这些方法存在灵敏度低、特异性差、耗费时间长等缺点,不能满足实际检测的要求,因此需要建立快速、灵敏、特异的种子检测技术[5]。

将选择性培养基分离培养与聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术相结合的 Bio-PCR 方法[11]具有检测灵敏度高、能够排除样品中死菌干扰等优点,目前已在瓜类种子携带果斑病菌的检测中广泛使用。该方法主要分为半选择性培养基分离培养和 PCR 验证两个关键性阶段。首先从种子中提取病原菌,在半选择性培养基上进行富集,然后用特异性引物对培养物进行 PCR 检测,同时将疑似菌落进行纯化后再次 PCR 验证,确定种子样品是否携带靶标菌。检测中通常使用两种半选择性培养基进行分离培养,提高了检测的准确性。

目前已报道的用于检测 Ac 的引物共有 7 对。由于 Ac 遗传多样性复杂且存在多个近缘种,使用不同引物进行检测很可能得到不同的结果导致对检测样品的误判,因此很有必要对已报道的检测 Ac 引物的特异性及灵敏度进行比较研究,从中筛选出用于瓜类种子携带 Ac 检测的最佳引物,服务于生产。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及引物

试验选取菌株共 33 株,其中西瓜嗜酸菌 17 株,嗜酸菌属下其它种的菌株 10 株(作为属内不同种间的对照菌株),另外选取番茄溃疡病菌、十字花科黑腐病菌、辣椒疮痂病菌、烟草青枯病菌各 1 株,丁香假单胞菌 2 株作为不同属植物病原细菌的对照。菌株分别来自国内外同行馈赠或本研究室菌株库,具体信息见表 1。

查阅相关文献,选取已报道的嗜酸菌通用引物 WFB1/WFB2[7]及西瓜嗜酸菌特异性引物 HB_2F_2/HB_2R_2[5]、SEQID4^m/SEQID5[12]、BX-L1/BX-S-R2[13]、ERC-L2/ERC-R1[13]、BFB64/BFB65[14]、TIF2/TIF3[15]共 7 对进行试验。所有引物均由博迈德公司合成,引物信息详见表 2。

PCR 扩增体系:10× PCR 反应缓冲液 2.5 μL,2.5 mM dNTPs 2.4 μL,上下游引物(10 μM)各 1 μL,5 U · μL^{-1} *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μL,DNA 模板 1 μL,超纯水补足至 25 μL。

各引物的反应条件设置见文献[5, 7, 12~15]。PCR 产物通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2 方法

1.2.1 引物特异性检验 将-80℃条件下保存的供试菌株室温解冻,在 LB 固体平板上划线,置于 28℃恒温培养箱中培养。2 d 后挑取单菌落于 200 μL无菌水中,涡旋震荡混合均匀,100℃金属浴 10 min 后置于-20℃条件下保存,作为引物特异性检测的 PCR 反应模板。

Table 1　Bacterial strains used in this study

Strain	Taxonomy	Origin	Host
BJ-A	*Acidovorax citrulli*	This lab	Watermelon
BJ-B	*A. citrulli*	This lab	Watermelon
BJ-C	*A. citrulli*	This lab	Watermelon
FC183	*A. citrulli*	Dr. Norm. W. Scchaad, USDA	Melon
FC248	*A. citrulli*	Dr. Norm. W. Scchaad, USDA	Unknown
FC520	*A. citrulli*	Dr. Norm. W. Scchaad, USDA	Unknown
LS-1	*A. citrulli*	This lab	Watermelon
LS-3	*A. citrulli*	This lab	Watermelon
MH21	*A. citrulli*	Dr. Zhang Liqun, CAU	Melon
PSLB-25	*A. citrulli*	Dr. Zhao Tingchang, CAAS	Melon
PSLB-29	*A. citrulli*	Dr. Zhao Tingchang, CAAS	Melon
SY-1	*A. citrulli*	This lab	Watermelon
SY-3	*A. citrulli*	This lab	Watermelon
XJ-1	*A. citrulli*	Dr. Ren Yuzhong, Shihezi University	Melon
XJ-3	*A. citrulli*	Dr. Ren Yuzhong, Shihezi University	Melon
XJHD	*A. citrulli*	Prof. Zhao Tingchang, CAAS	Melon
ZZ-1	*A. citrulli*	This lab	Watermelon
FC369	*A. avenae*	Dr. Norm. W. Scchaad, USDA	Corn
FC963	*A. avenae*	Dr. Norm. W. Scchaad, USDA	Corn
470101	*A. avenae*	This lab	Unknown
470102	*A. avenae*	This lab	Unknown
470103	*A. avenae*	This lab	Unknown
470104	*A. avenae*	This lab	Unknown
470161	*A. cattleyae*	This lab	Unknown
470162	*A.cattleyae*	This lab	Unknown
470171	*A. konjaci*	This lab	Unknown
470181	*A. facilis*	This lab	Unknown
BT0505	*Clavibater michiganensis* subsp. *michiganensis*	This lab	Tomato
DC3000	*Pseudomonas syringae*	This lab	Tomato
Ps03	*P. syringae*	This lab	Unknown
Xcc8004	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	This lab	Crucifer
Xcv09	*X. vesicatoria*	This lab	Tomato
SHT-Ps01	*Ralstonia solanacearum*	This lab	Tomato

1.2.2　*引物灵敏度验证*　将-80℃条件下保存的西瓜果斑病菌菌株 MH21 室温解冻,在 LB 固体平板上划线,置于 28℃恒温培养箱中培养。2 d 后挑取单菌落接种于 10 mL LB 液体培养基中,置于 120 r·min^{-1}摇床上摇培 12 h,用 0.85%(w/v) NaCl 溶液洗涤 2 次后进行 10 倍系列稀释。取原液和 10^1~10^8倍稀释液于 LB 平板上计数,每个浓度 3 次重复,置于 28℃恒温箱中培养,2 d 后统计平板上的菌落数,计算每个浓度的菌悬液实际浓度。每个浓度的菌悬液 100℃金属浴 10 min,作为引物灵敏度验证的 PCR 反应模板。

1.2.3　*模拟种子带菌的 PCR 检测*　称取不携带西瓜嗜酸菌的西瓜种子 96 g(约 1 000 粒),充分研碎,置于 500 mL 三角瓶中,按照种子质量(g):缓冲液体积(mL)=1:4 加入灭菌后的 MOPS 缓冲液,随后按照体积比 1:100 分别添加 10^6、10^5、10^4、10^3和 10^2 CFU·mL^{-1}的 MH21 菌悬液,使种子提取液中携带的细菌终浓度分别为 10^4、10^3、10^2、

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Amplified gene	Primer sequences (5′-3′)	Amplicon length/bp	Tm/℃	Description
SEQID4^{m}/SEQID5	16S-23S ITS	GTCATTACTGAATTTCAACA; CCTCCACCAACCAATACGCT	246	53.0	Ac specific
WFB1/WFB2	16S rDNA	GACCAGCCACACTGGGAC; CTGCCGTACTCCAGCGAT	360	65.0	Specific for *Acidovorax*
BX-L1/BX-S-R2	Specific Box-PCR product	CAGCTGGGAGCGATCTTCAT; GCGTCAGGAGGGTGAGTAGCA	279	68.1	Ac specific
ERC-L2/ERC-R1	Specific ERIC-PCR product	CGGTCTTCGACCTGAACGCT; CAGCTTCTTTCCCAGCAAAC	342	58.0	Ac specific
HB_2F_2/HB_2R_2	$hrpB_2$	CCTCCAGCTGCCCGTATC; CGGACACCCGGTACATCAGC	290	60.0	Ac specific
BFB64/BFB65	16S rDNA	TCTTCGGATGCTGACGACT; AGGCTTTTCGTTCCGTACA	374	57.0	Ac specific
TIF2/TIR3	ITS	GCTGGATCACCTCCTTTCTG; TGACGCAATCAAATTTTTGTCA	462	65.0	Ac specific

10^{1}和 10^{0} CFU · mL^{-1}。置于 28℃、120 r · min^{-1}摇床上振荡 45 min。过滤得到种子提取液原液,经过 10 倍浓缩和 10 倍系列稀释,选择 3 个合适的浓度各取 100 μL 涂布于 ASCM 和 EBBA 培养基平板,每个浓度 2 次重复,置于 28℃恒温箱中培养。培养 3 d 后,挑取平板中疑似菌落在 LB 固体平板上进行纯化,随后每个平板加入 2 mL 无菌水,将培养基表面的所有细菌菌落轻轻刮洗下来,吸取 1 mL菌液于 1.5 mL 离心管中,涡旋振荡,100℃金属浴 10 min。-20℃条件下保存,作为 bio-PCR 种子检测的涂板样品。3 d 后挑取纯化单菌落溶于 1 mL无菌水中,100℃金属浴 10 min。-20℃条件下保存,作为 Bio-PCR 种子检测的纯化样品。

2 结果与分析

2.1 引物特异性结果

利用表 2 中的 7 对引物对供试菌株进行 PCR 检测,结果显示:所有引物对非嗜酸菌属菌株的 PCR 反应结果均呈阴性。SEQID4^{m}/SEQID5、WFB1/WFB2、BX-L1/BX-S-R2、HB_2F_2/HB_2R_2 和 ERC-L2/ERC-R1 等 5 对引物对所有以 *A. citrulli* 为模板的反应均呈阳性。而针对嗜酸菌属的其它 4 个种 *A. avenae*、*A. cattleyae*、*A. konjaci* 和 *A. facilis*,上述 5 对引物中只有 SEQID4^{m}/SEQID5 能将所有供试的 *A. citrulli* 菌株与上述同属的其它 4 个种区分开来;HB_2F_2/HB_2R_2不能区分 *A. citrulli* 与 *A. avenae*;BX-L1/BX-S-R2 不能区分 *A. citrulli* 与 *A. facilis*;ERC-L2/ERC-R1 不能区分 *A. citrulli*、*A. avenae* 和 *A. facilis*;WFB1/WFB2 对所有嗜酸菌属菌株 PCR 反应结果均呈阳性,在嗜酸菌属所有试验菌株的 PCR 扩增中,均可检测到 360 bp 的条带,不能区分 *A. citrulli* 与 *Acidovorax* 属下的其它 4 个种,不具有种的特异性;另外两对引物 BFB64/BFB65 和 TIF2/TIF3 不能使所有供试的 *A. citrulli* 菌株均检测到目标条带,且对嗜酸菌属其它种也有非特异性扩增(表 3),不适合用于西瓜嗜酸菌的特异性检测。因此,筛选得到特异性最好的引物为 SEQID4^{m}/SEQID5。

2.2 引物灵敏度结果

经平板菌落计数得到 MH21 菌悬液原浓度为 8.2×10^{7}CFU · mL^{-1}(约为 1×10^{8} CFU · mL^{-1},后续表述中写作 10^{8} CFU · mL^{-1})。取浓度为 10^{8}~10^{0} CFU · mL^{-1}的菌悬液,分别吸取 1 μL 作为模板,利用引物 SEQID4^{m}/SEQID5 进行 PCR 扩增。结果如图 1 所示,当菌悬液浓度高于 10^{4} CFU · mL^{-1}时,能够检测到清晰明亮的目标条带,菌悬液浓度为 10^{3} CFU · mL^{-1}及以下时,目标条带较弱,浓度低于 10^{2} CFU · mL^{-1}时检测不到目标条带。由此可知该引物对 *A. citrulli* 纯菌的检测下限为 10^{2} CFU · mL^{-1}。

Table 3　Specificity tests of PCR primers for *Acidovorax citrulli*

Strain/Taxonomy	SEQID4^{m}/ SEQID5	WFB1/ WFB2	BX-L1/ BX-S-R2	HB_2F_2/ HB_2R_2	ERC-L2/ ERC-R1	BFB64/ BFB65	TIF2/ TIR3
BJ-A / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	+	+
BJ-B / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	+	+
BJ-C / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	−	+
FC183 / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	+	+
FC248 / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	−	−
FC520 / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	+	+
LS-1 / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	−	+
LS-3 / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	+	+
MH21 / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	+	+
PSLB-25 / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	+	+
PSLB-29 / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	+	+
SY-1 / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	+	+
SY-3 / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	+	+
XJ-1 / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	+	+
XJ-3 / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	+	+
XJHD / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	−	−
ZZ-1 / *A. citrulli*	+	+	+	+	+	+	+
FC369 / *A. avenae*	−	+	−	+	−	−	−
FC963 / *A. avenae*	−	+	−	+	+	+	−
470101 / *A. avenae*	−	+	−	+	−	+	−
470102 / *A. avenae*	−	+	−	+	−	+	−
470103 / *A. avenae*	−	+	−	−	−	+	−
470104 / *A. avenae*	−	+	−	+	−	+	−
470161 / *A. cattlevae*	−	+	−	−	−	+	−
470162 / *A. cattlevae*	−	+	−	−	−	+	−
470171/ *A. conjaci*	−	+	−	−	−	+	−
470181 / *A. facilis*	−	+	+	−	+	+	+
BT0505 / Cmm	−	−	−	−	−	−	−
DC3000 / PST	−	−	−	−	−	−	−
Ps03 / *P. syringae*	−	−	−	−	−	−	−
Xcc8004 / Xcc	−	−	−	−	−	−	−
Xcv09 / *X. vecicatoria*	−	−	−	−	−	−	−
SHT-Ps01 / *R. solanacearum*	−	−	−	−	−	−	−

"+": Positive result tested by PCR;"−": Negative result tested by PCR.

2.3　种子带菌检测结果

模拟种子带菌检测结果如表 4 所示。结果显示,将种子提取液涂布在 ASCM 和 EBBA 培养基上分别培养 3 d 和 5 d 后,利用引物 SEQID4^{m}/SEQID5 进行 PCR 检测。当种子提取液中细菌终浓度为 10^4、10^3、10^2、10^1 CFU · mL^{-1}时,以平板上刮洗下来的样品为模板均能够检测到目标条带,种子提取液中细菌终浓度为 10^0 CFU · mL^{-1}时均不能检测到目标条带(ASCM 培养基检测结果见图 2);ASCM 培养基上,所有浓度中挑取的疑似菌落经纯化后均能检测到目标条带(图 3);EBBA 培养基上,种子提取液中细菌终浓度为 10^0CFU · mL^{-1}时挑取的疑似菌落经纯化后未能检测到目标条带,其余浓度的疑似菌落经纯化后能够检测到目标条带。种子带菌检测时称取西瓜种子的质量为 96 g,因此 ASCM 和 EBBA 两种选择性培养基对于西瓜种子携带 *A. citrulli* 的检测限分别为 0.01 CFU · g^{-1}和 0.1 CFU · g^{-1}。

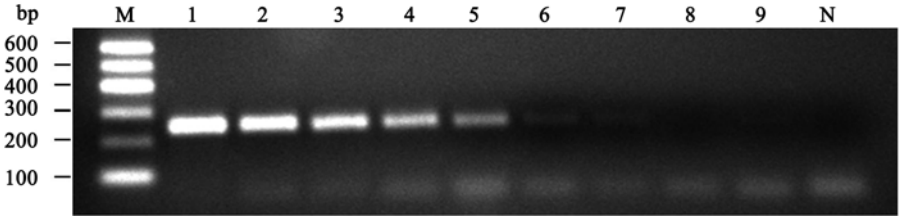

Fig. 1 Sensitivity of the PCR detection of *Acidovorax citrulli* MH21 in pure culture with primers SEQID4^{m}/SEQID5

M: Marker Ⅰ (100–600 bp); Concentrations of *A. citrulli*: 1, 10^{8} CFU · mL^{-1}; 2, 10^{7} CFU · mL^{-1}; 3, 10^{6} CFU · mL^{-1}; 4, 10^{5} CFU · mL^{-1}; 5, 10^{4} CFU · mL^{-1}; 6, 10^{3} CFU · mL^{-1}; 7, 10^{2} CFU · mL^{-1}; 8, 10^{1} CFU · mL^{-1}; 9, 10^{0}CFU · mL^{-1}; N, ddH_2O.

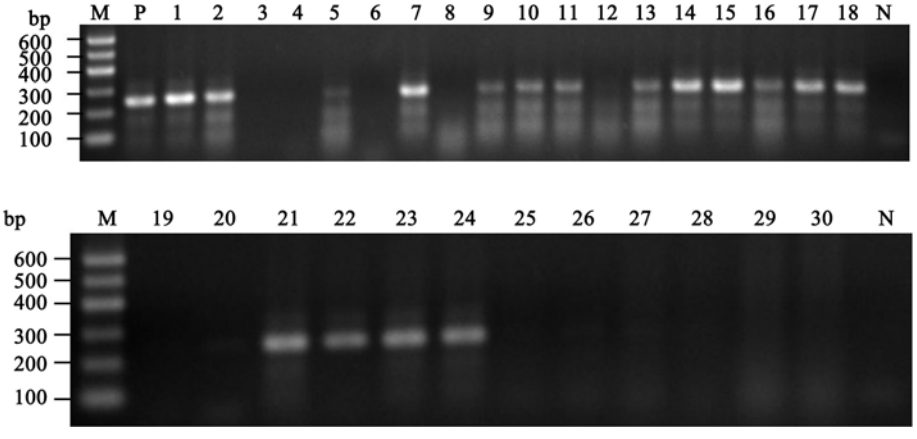

Fig. 2 Bio-PCR sensitivity for detection of *Acidovorax citrulli* from watermelon seeds with primers SEQID4^{m}/SEQID5 and ASCM media

M: Marker Ⅰ (100~600 bp); P: DNA sample of *A. citrulli* MH21; Concentrations of *A.citrulli*: 1–6, 10^{4} CFU · mL^{-1}; 7-12, 10^{3} CFU · mL^{-1}; 13-18, 10^{2} CFU · mL^{-1}; 19–24, 10^{1} CFU · mL^{-1}; 25–30, 10^{0} CFU · mL^{-1}; N: ddH_2O.

Table 4 Sensitivity of Bio-PCR detection of *Acidovorax citrulli* from watermelon seeds with primers SEQID4^{m}/SEQID5 and selective media ASCM and EBBA

Medium	Conc.	Detection of *A. citrulli* in culture	Detection of *A. citrulli* colony
ASCM	4.0×10^{4}	+	+
	4.0×10^{3}	+	+
	4.0×10^{2}	+	+
	4.0×10^{1}	+	+
	4.0×10^{0}	−	+
EBBA	4.0×10^{4}	+	+
	4.0×10^{3}	+	+
	4.0×10^{2}	+	+
	4.0×10^{1}	+	+
	4.0×10^{0}	−	−

"+": Positive result tested by Bio-PCR; "−": Negative result tested by Bio-PCR.

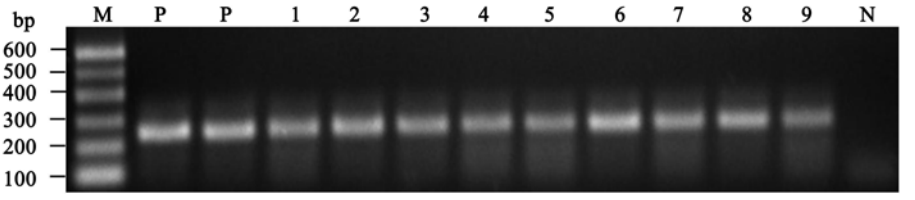

Fig. 3　PCR confirmation of the suspected bacterial colonies with primers SEQID4^{m}/SEQID5

M: Marker Ⅰ (100~600 bp); P: DNA of *A. citrulli* MH21; 1-2: Suspected colonies were picked for PCR assay from seed samples inoculated with diverse concentrations of *A. citrulli*: 1-2, 10^{4} CFU · mL^{-1}; 3-4, 10^{3} CFU · mL^{-1}; 5-6, 10^{2} CFU · mL^{-1}; 7-8, 10^{1} CFU · mL^{-1}; 9, 10^{0} CFU · mL^{-1}; N: ddH_2O.

3　结论与讨论

瓜类细菌性果斑病近年在中国主要瓜类作物产区均有发生,是一种毁灭性的细菌性病害,尤其对新疆、甘肃等地瓜类生产和制种产业造成了极大的威胁[5]。由于该病害主要通过带菌种子进行传播,因此,建立快速、灵敏的种子带菌检测技术是防治该病害的关键。筛选特异性强、灵敏度高的引物则是快速、准确检测技术的核心。

目前,已报道的西瓜嗜酸菌的引物共 7 对,其中 Walcott 等人根据瓜类细菌性果斑病菌的 DNA 16S rRNA 区域的核苷酸序列设计的引物 WFB1/WFB2 曾被国内外广泛用于细菌性果斑病菌的常规 PCR 检测[3],但本研究结果表明该引物不能将 *A. citrulli* 与嗜酸菌属的其他 4 个种区分开,因此不适宜在葫芦科种子携带瓜类果斑病菌的检测中使用;Tian 等[5]根据 *hrpB*$_2$基因作为检测靶标设计的西瓜嗜酸菌特异性引物 HB_2F_2/HB_2R_2能较好地区分 *A. citrulli* 与 *A. cattleyae*、*A. konjaci*、*A. facilis* 三个种,但部分 *A. avenue* 菌株也能检测到 290 bp 的特异性片段,因此使用该引物进行葫芦科种子携带瓜类果斑病菌检测时应该慎重;Qiu[16]在引物筛选试验中,发现引物对 BX-L1/BX-S-R2 呈现出的特异性最好,而在本研究中该引物对 *A. facilis* 也能扩增到 279 bp 的片段,从而可能对 *A. citrulli* 的检测造成干扰;我们的研究表明:引物 SEQID4^{m}/SEQID5 表现出最好的特异性,且纯菌检测及模拟种子带菌检测均表现出较高的灵敏度,因此推荐将该引物对用于葫芦科种子携带 *A. citrulli* 的特异性检测。

通过对引物 SEQID4^{m}/SEQID5 的灵敏度验证,可确定其对纯菌的检测限度为 10^{2} CFU · mL^{-1}。添加不同浓度的果斑病菌悬液人工模拟种子带菌在 ASCM 和 EBBA 两种培养基上检测,结果显示 ASCM 可检测种子中携带的病原菌浓度为 0.01 CFU · g^{-1}(种子浸提液含菌量为 10^{0} CFU · mL^{-1})。但可能由于靶标菌浓度过低且有其他杂菌干扰,以培养基上刮洗下来的菌液为模板未检测到目标条带,挑取疑似菌落检测得到了目标条带;EBBA 可检测种子中携带的病原菌浓度为 0.1 CFU · g^{-1}(种子浸提液含菌量为 10^{1} CFU · mL^{-1})。与对同一浓度的纯菌样品进行直接检测相比,对添加相同浓度 *A. citrulli* 的阳性种子样品进行检测,其灵敏度要高 1~2 个数量级,这是由于在对种子样品检测时,先要使用选择性培养基对靶标菌进行富集,造成 PCR 检测时样品中的 *A. citrulli* 实际浓度大于添加的菌液浓度。本研究对添加 *A. citrulli* 的种子样品进行检测时,使用了种子提取液的 5 个不同系列梯度浓度进行涂板,分别为 10 倍浓缩液、原液、10^{1}~10^{3}倍稀释液,最后从中选择了 3 个合适的浓度进行 Bio-PCR 检测,是为了实际检测中在不明确种子携带 *A. citrulli* 菌量的情况下,保证培养基平板上生长出的总细菌浓度有最适合用于 Bio-PCR 检测的样品。

在对阳性种子样品进行 PCR 检测时发现,种子浸提液含菌量高于 10^{4}CFU · mL^{-1}时,在 ASCM 培养基上涂板的 3 个浓度中,较低浓度下更容易检测到目标片段,而种子浸提液含菌量低于 10^{4} CFU · mL^{-1}时,涂板的较高浓度更易检测到目标片段。而在 EBBA 培养基中则没有类似情况出现,所有试验浓度均是较高浓度更易检测到目标片段。分析原因有以下两点:一是 ASCM 培养基比 EBBA

培养基营养丰富,对靶标菌回收率更高,且靶标菌在 ASCM 上菌落直径比在 EBBA 上大很多,最终导致种子提取液中 *A. citrulli* 浓度过高的样品在 PCR 扩增时模板 DNA 浓度过高,影响了引物的扩增,反而不利于 PCR 检测;二是 ASCM 对杂菌的选择性略差,导致非靶标菌浓度过高,影响了对目标片段的特异性扩增;而相比之下,EBBA 的选择性要更好一些。因此,在种子携带西瓜果斑病菌的检测中,当样品中 *A. citrulli* 浓度较高且杂菌量相对较少时,使用 ASCM 培养基更易获得阳性结果,而当样品中 *A. citrulli* 浓度偏低且杂菌量相对较多时,使用 EBBA 培养基更易获得阳性结果。因此,我们推荐在实际检测中,将 ASCM 和 EBBA 两种培养基结合使用,可以提高检测的准确性。

本研究仅以西瓜种子为供试种子材料,而实际生产中,种子大小有很大差异,不同种类的种子带菌情况也有所差异,因此在后续研究中可添加不同浓度的 *A. citrulli* 至不同种类的葫芦科种子中,进一步对现有检测方法进行改良。

参考文献

[1] Zhao W, Lu J, Ma W, *et al*. Rapid on-site detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* by gold-labeled DNA strip sensor [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(10): 4241-4244.

[2] Bahar O, Burdman S. Bacterial fruit blotch: A threat to the cucurbit industry [J]. Israel Journal of Plant Sciences, 2010, 58(1): 19-31.

[3] Burdman S, Walcott R, *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(8), 805 - 815.

[4] Shavit R, Lebendiker M, Pasternak Z, *et al*. The *vapB-vapC* operon of *Acidovorax citrulli* functions as a bona-fide toxin- antitoxin module [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 6(1): 1-12.

[5] Tian Y L, Xu J, Zhao Y Q, *et al*. Specific detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* by PCR (in Chinese) [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Science (江苏农业学报), 2010, 26(3): 512-516.

[6] Rane K K, Latin R X. Bacterial fruit blotch of watermelon: association of the pathogen with seed [J]. Plant Disease, 1992, 76(1): 509-512.

[7] Walcott R R, Gitaitis R D. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction [J]. Plant Disease, 2000, 84(4): 470-474.

[8] Dutta B, Avci U, Hahn M G, *et al*. Location of *Acidovorax citrulli* in infested watermelon seeds is influenced by the pathway of bacterial invasion [J]. Phytopathology, 2012, 102(5): 461-468.

[9] Yan S S, Yang Y W, Wang T L, *et al*. Genetic diversity analysis of *Acidovorax citrulli* in China [J]. European Journal of Plant Pathology, 2013, 136(1): 171-181.

[10] Hopkins D L. Chemical control of bacteria fruit blotch of watermelon [A]. Proceedings of the Florida State Horticulture Society [C], Florida: Florida State Horticultural Society, Bradenton, 1991, 104(1): 270-272.

[11] Schaad N W, Cheong S S, Tamaki S, *et al*. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts[J]. Phytopathology, 1995, 85(2): 243-248.

[12] Schaad N W, Song W Y, Hatziloukas E. PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax* [P]. 2000.

[13] Bahar O, Efrat M, Hadar E, *et al*. New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [J]. Plant Pathology, 2008, 57(4):754-763.

[14] Zhang X L, Wu Y M, Wang C, *et al*. Sequence analysis of 16S rDNA and specified primers design of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2007, 37(3): 225-231.

[15] Chen X K. Detection the pathogen of bacterial fruit blotch of watermelon by polymerase chain reaction (in Chinese) [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (福州:福建农林大学), 2010.

[16] Qiu X J. Evaluation of PCR-based protocols for the detection of *Acidovorax citrulli* (in Chinese) [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University (南京:南京农业大学), 2012.

责任编辑:李晖