

不适温度条件诱导西瓜嗜酸菌进入 VBNC 状态的研究

王梦雨, 蒋娜, 阚玉敏, 李健强, 罗来鑫*

(中国农业大学植物保护学院植物病理学系, 种子病害检验与防控北京市重点实验室,
农业农村部作物有害生物监测与绿色防控重点实验室, 北京 100193)

摘要:由西瓜嗜酸菌(*Acidovorax citrulli*)引起的瓜类果斑病,是危害西瓜和甜瓜等葫芦科作物的一种典型的种传细菌性病害。已有文章报道西瓜嗜酸菌在铜离子诱导下可进入“有活力但不可培养”(viable but non-culturable, VBNC)状态,并在适当条件下复苏,成为生产中潜在的危害初侵染来源。本文结合实际生产中的种子汤浸种和低温储藏等条件,分别设定了50℃、55℃高温和4℃低温对西瓜嗜酸菌 AAC00-1 进行处理,通过流式细胞术(flow cytometry, FCM)和平板培养法分别检测菌体活性和可培养性。结果显示,不适宜的温度条件能够诱导西瓜嗜酸菌 AAC00-1 进入 VBNC 状态,其中55℃高温20和30 min 的两个处理,所有活菌均进入 VBNC 状态。将处理后的 AAC00-1 接种西瓜子叶,接种植株未表现出果斑病症状,且不能从接种部位分离得到可培养菌体。表明本诱导条件下的 VBNC 状态 *A. citrulli* 菌体不能通过短时间活体接种复苏。本研究分析了西瓜嗜酸菌在不适宜温度条件下进入 VBNC 状态的能力,为解析病害可能的初侵染来源提供了理论依据,对葫芦科作物果斑病防控具有重要的生产实践意义。

关键词:西瓜嗜酸菌;温度处理;流式细胞术;VBNC

Study on induction of VBNC state in *Acidovorax citrulli* by unfavorable temperatures

WANG Meng-yu, JIANG Na, KAN Yu-min, LI Jian-qiang, LUO Lai-xin* (Department of Plant Pathology, College of Plant Protection, China Agricultural University; Beijing Key laboratory of Seed Disease Testing and Control; MARA Key Lab of Pest Monitoring and Green Management, Beijing 100193, China)

Abstract: Bacterial Fruit Blotch (BFB), caused by *Acidovorax citrulli*, is a typical seed-borne bacterial disease on cucurbitaceae crops, including watermelon and melon. It has been reported that *A. citrulli* can enter into the viable but non-culturable (VBNC) state induced by copper and resuscitate under appropriate conditions, which acted as a potential primary inoculum source in the field. In this study, bacterial cells of *A. citrulli* strain AAC00-1 was treated at 50℃, 55℃ and 4℃, respectively, which artificially stimulated the temperatures of hot water treatment and seed storage in production. The viability and culturability of *A. citrulli* cells were determined by flow cytometry (FCM) and agar plating, respectively. It showed that AAC00-1 can enter into VBNC state by unfavorable temperatures. All viable cells of AAC00-1 entered into the VBNC state after treated at 55℃ for 20 min and 30 min. The treated bacterial suspensions of AAC00-1 were injected into the cotyledon of watermelon seedlings for pathogenicity test. The inoculated plants showed no symptoms of BFB, and no culturable cells can be isolated from the inoculated seedlings. This indicates that VBNC cells of AAC00-1 can not be resuscitated *in vivo* in watermelon seedling. This study analyzed the ability of *A. citrulli* to enter into the VBNC state under unfavorable temperature conditions, and provided a theoretical basis for primary inoculum of BFB in the field, which has important significance for controlling of BFB in cucurbits production.

收稿日期: 2020-02-24; 修回日期: 2020-04-14; 网络首发时间: 2020-04-15

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20200414.1709.004.html>

基金项目: 国家重点研发计划“西甜瓜化肥农药减施增效基础及关键技术研发”(2018YFD0201302)

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

第一作者: 王梦雨, 硕士, 主要从事种传细菌病害研究; E-mail: wangmengyu@cau.edu.cn.

Key words: *Acidovorax citrulli*; temperature treatment; flow cytometry; VBNC

中图分类号: S432.42

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2021)01-0104-11

细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB)是葫芦科作物上极具毁灭性的细菌性病害,种子带菌是病害最主要的初侵染来源之一^[1],也是病害远距离传播的重要途径^[2]。病原菌可经伤口或气孔等途径侵染植株,叶片病斑初期呈水浸状,随后变褐^[3];果实表面病斑后期呈现褐色开裂状^[4]。细菌性果斑病的病原菌为西瓜嗜酸菌(*Acidovorax citrulli*),革兰氏染色阴性^[5],不产芽胞,该菌最适生长温度 24℃~28℃,可耐受的最高生长温度 41℃,最低生长温度 4℃^[6],在 1%~9%的盐度范围内均能生长^[7]。

目前国内外已报道的西瓜细菌性果斑病防治方法主要包括种植抗病品种^[8]、进行植物检疫^[9]、种子处理^[10]、药剂防治^[11]和农业防治^[12]等,其中种子处理常使用 55℃左右温汤浸种、70℃恒温干热灭菌^[12]等方法。种子采收后,通常在低温低湿的条件下储藏^[13, 14]。有研究表明,在不利的环境条件下,病原菌依旧能够存活较长时间。例如,引起菜豆细菌性萎蔫病的病原菌(*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*)和细菌性疫病的病原菌(*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*),在 10℃且低湿的环境中,能在种子外表皮组织中分别存活 8 年和 15 年^[15]。*A. citrulli* 可以在低温条件下随种子存活长达 30 年以上^[16]。在 -20℃冻存的西瓜果皮中至少能够存活 210 天,且冻存处理后仍具有致病性^[17]。在田间,*A. citrulli* 在水体中和种子表面分别存活 2 个月和 4~5 个月,在田间土壤和病残体上分别存活 8 和 12 个月^[18]。种子处理使种子携带的病原菌处于不良环境条件,可大大降低细菌性果斑病的发生率及危害程度,但并不能彻底清除病害,表明 *A. citrulli* 具有抵抗并度过不利环境条件的能力^[19, 20]。

1982 年, Xu 等^[21]在研究河口和海洋环境中大肠杆菌(*Escherichia coli*)和霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)的存活规律时,发现细胞总数保持不变,但可培养细胞数量快速下降,而活菌数量只下降了一个数量级的现象,首次提出细菌进入了一种新的状态,即有活力但不可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态^[22]。该状态是指某些不产芽胞

的细菌在不适宜的条件下,发生形态和生理上的变化,用常规的培养方法不能使其分裂生长,但菌体保持膜结构完整且仍具有一定的代谢活性^[23]。多数学者认为,VBNC 是一种细菌的休眠状态,是一种特殊的抵抗逆境的方式,推测其作用与芽胞类似^[24]。目前常使用 LIVE/DEAD[®] *BacLight*[™] Bacterial Viability Kit(Life technologies 公司)结合流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测有活力的细菌数量,通过平板培养法计算可培养细菌数量,二者作差间接计算 VBNC 状态菌体数量^[19, 20]。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及培养基

A. citrulli 菌株 AAC00-1,由美国佐治亚大学 Ron Walcott 教授课题组馈赠。

LB 液体培养基:酵母粉 5 g·L⁻¹,氯化钠 5 g·L⁻¹,胰蛋白胨 10 g·L⁻¹。LB 固体培养基:在 LB 液体培养基中加入琼脂 16 g·L⁻¹。EBBA 选择性培养基:NH₄H₂PO₄ 0.1 g·L⁻¹,MgSO₄·7H₂O 0.2 g·L⁻¹,氯化钾 0.2 g·L⁻¹,酵母粉 0.3 g·L⁻¹,硼酸 0.1 g·L⁻¹,琼脂 16 g·L⁻¹,溴甲酚紫 9 mg·L⁻¹,考马斯亮蓝 10 mg·L⁻¹,加入 0.05 mol·L⁻¹ NaOH 调节 pH 值至 5.3~5.5,95%乙醇 10 mL·L⁻¹,灭菌后冷却至 55℃左右,加入氨苄青霉素至终浓度为 15 mg·L⁻¹,加入放线菌酮至终浓度为 25 mg·L⁻¹,轻摇混匀。

1.2 供试材料及仪器

西瓜种子:购自中国农业科学院蔬菜花卉研究所,品种为瑞宏。引物 SEQID4^m和 SEQID5:由生工生物工程(上海)有限公司合成。LIVE/DEAD[®] *BacLight*[™] Bacterial Viability Kit:购自 Life technologies 公司,内含 SYTO 9 染料和 PI 染料,货号分别为 S-34854 和 P3566。绝对计数管:购自 BD biosciences 公司,管内含有数量已知的内参微球(bead),货号为 340334。

流式细胞仪:购自美国 BD biosciences 公司,型号为 BD FACARIA Special Order Research Product(简称 BD FACARIA SORP)。荧光定量 PCR 仪:购自 Applied Biosystems 公司,型号为 7500 Fast。

1.3 不同温度处理西瓜嗜酸菌及检测

1.3.1 制备菌悬液 从-80℃冰箱中取出保存的 *A. citrulli* 菌株 AAC00-1, 在 LB 固体培养基上划线活化, 在 28℃ 培养箱中黑暗培养 48 h, 挑取 2~3 个单菌落接种至 10 mL 的 LB 液体培养基中, 28℃、120 r·min⁻¹ 振荡培养 12 h, 至细菌对数生长期。12 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 收集菌体, 使用 0.85% NaCl 溶液 (w/v) 洗涤 2 次, 使用紫外分光光度计测定 OD₆₀₀ 值, 当 OD₆₀₀ 值为 0.5 时, 菌液浓度为 10⁷ CFU·mL⁻¹。

1.3.2 高温处理 在 0.85% NaCl 溶液中按照 200:1 的比例接种 AAC00-1, 使菌悬液初始浓度为 10⁶ CFU·mL⁻¹; 分别静置于 28℃、50℃ 和 55℃ 水浴锅中, 于处理的第 0、10、20 和 30 min 取样, 检测高温条件下 AAC00-1 的存活情况。其中 28℃ 处理作为对照组。

1.3.3 低温处理 在 0.85% NaCl 溶液中按照 200:1 的比例接种 AAC00-1, 使菌悬液初始浓度为 10⁶ CFU·mL⁻¹; 分别静置于 28℃ 培养箱和 4℃ 冰箱中, 于处理的第 0、5、10、15、20、25、30、35 和 40 d 取样, 检测低温条件下 AAC00-1 的存活情况。其中 28℃ 处理作为对照组。

1.3.4 可培养性检测 将菌悬液梯度稀释 0~10⁴ 倍, 取不同浓度的菌悬液 100 μL, 均匀涂布在 LB 固体培养基平板上, 在 28℃ 培养箱中黑暗培养 2 d, 选取菌落数量为 30~300 的平板进行计数, 并按下方公式计算原液浓度。每个梯度 3 次重复。

平板计数法: 菌液中可培养菌体浓度 (CFU·mL⁻¹) = 菌落数 × 稀释倍数 / 0.1

1.3.5 流式细胞仪检测 将 SYTO 9 染料和 PI 染料分别溶于 5 mL ddH₂O 中, 制备浓度为 12 μmol·L⁻¹ 和 60 μmol·L⁻¹ 的溶液备用。AAC00-1 经不同温度诱导后, 每个处理取样 4 mL, 分别放置于 4 个 1.5 mL 离心管中, 每管 1.0 mL。1 管用于平板计数。其余 3 管用于流式细胞仪的检测, 其中 1 管用于计细胞总数; 1 管用于 SYTO 9 染色 (菌悬液: 染料, 体积比 2:1), 终浓度为 4 μmol·L⁻¹; 1 管用于 PI 染色 (菌悬液: 染料, 体积比 1:1), 终浓度为 30 μmol·L⁻¹。避光孵育 30 min 后, 12 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 收集菌体, 使用 0.85% NaCl 溶液洗涤 1 次, 每管吸取 800 μL 至上样管进行检测。每个处

理设置 3 次生物学重复。测定的细菌浓度值转化成以 10 为底的对数值; 比较不同温度和处理时间对 AAC00-1 可培养性和 VBNC 状态诱导的影响, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件处理数据, 制成折线图。

细胞总数 (CFU·mL⁻¹) = Bead 总数 (已知) × 检测到的细胞数 / 1000 / 0.8;

活菌数量 (CFU·mL⁻¹) = 细胞总数 × (SYTO 9 菌体数量比例 - PI 菌体数量比例);

死菌数量 (CFU·mL⁻¹) = 细胞总数 × PI 菌体数量比例;

VBNC 菌体数量 (CFU·mL⁻¹) = 活菌数量 - 可培养菌体数量。

1.4 不同温度处理对西瓜嗜酸菌致病力的影响

将高温诱导 4 个时间点以及低温诱导第 40 d 的样品, 在 28℃ 的环境中静置 30 min, 使样品恢复至室温, 使用 1 mL 注射器吸取 25 μL 菌悬液, 注射接种在生长 15 d 的西瓜幼苗子叶背面, 每个处理接种 6 片子叶, 以对数生长期后期的 AAC00-1 纯培养物作为阳性对照, 以清水作为阴性对照; 接种并保湿 5 d 后采集接种叶片, 用清水冲洗掉叶片表面的泥沙, 调查并统计病情指数。按下方的病情分级标准, 划分 0 级、1 级、3 级、5 级、7 级和 9 级进行记录。

叶片发病情况分级标准如下^[25]:

0 级: 无病;

1 级: 叶片病斑较少, 病斑面积占整片叶面积的 5% 以下;

3 级: 病斑较多, 病斑面积占整片叶面积的 5% ~ 30%;

5 级: 病斑较多, 病斑面积占整片叶面积的 30% ~ 50%;

7 级: 病斑很多或融合成大斑, 病斑面积占整片叶面积的 50% 以上, 叶片未焦枯死亡;

9 级: 病斑很多或融合成大斑, 病斑面积占整片叶面积的 50% 以上, 常使叶片焦枯死亡。

病情指数的计算公式如下:

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{各级病叶数} \times \text{各级代表值})}{\text{调查总叶数} \times \text{最高一级代表值}} \times 100$$

1.5 西瓜嗜酸菌 VBNC 状态的活体复苏检验

将采集的叶片样品用 2% 次氯酸钠进行表面

消毒 2 min,随后清水冲洗 2 遍。接种后已发病的叶片,选取 3 块 0.5 cm×0.5 cm 大小的病健交界处的叶片组织;接种后未发病的叶片,以接种部位为中心向外取 3 块 0.5 cm×0.5 cm 大小的叶片组织。将上述叶片组织分别置于 2 mL 离心管中,放入直径为 5 mm 的灭菌小钢珠,经液氮速冻后使用混合型球磨仪进行处理,球磨仪程序设置如下:Memory:P2;Frequency1/s:30.0;Time (min):1.00。随后加入 1 mL 0.85% NaCl 溶液混匀,梯度稀释 0~10⁴倍后,取 100 μL 菌悬液均匀涂布在 EBBA 选择性培养基上进行分离培养,以对数生长后期的 AAC00-1 纯培养物作为阳性对照,以清水作为阴性对照,通过形态和生长速率辨别靶细菌。28℃ 黑暗培养 5 d 后,观察菌落形态。在平板上加入 2 mL 0.85% NaCl 溶液,洗下培养基表面所有菌落制成混合菌液,作为 PCR 模板。使用 *A. citrulli* 的特异性引物 SEQID4^m (5'-GTATTACTGAATTTCAACA-3') 和 SEQID5 (5'-CCTCCACCAACCAAT-ACGCT-3') (产物片段大小 246 bp) 对上述混合菌液进行 PCR,鉴定其中是否有 *A. citrulli*。PCR 采用如下 25 μL 的反应体系:10×*Taq* reaction buffer 2.5 μL,dNTPs 2.4 μL,*Taq* DNA 聚合酶 0.25 μL,SEQID4^m引物 (10 μmol·L⁻¹) 1 μL,SEQID5 引物 (10 μM) 1 μL,DNA 模板 (混合菌液) 2 μL,ddH₂O 15.85 μL。反应条件:95℃ 10 min;95℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物

在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 不同温度诱导西瓜嗜酸菌进入 VBNC 状态

50℃、55℃ 高温处理组与 28℃ 对照组比较 (图 1),在 50℃ 处理 30 min 的过程中,AAC00-1 细菌总数、活菌和死菌数量基本保持不变;可培养菌体数量变化显著,由初始 1.7×10⁶ CFU·mL⁻¹ 下降至 1.5×10¹ CFU·mL⁻¹;在处理 30 min 时,菌体并未全部进入 VBNC 状态,VBNC 菌体数量为 1.7×10⁶ CFU·mL⁻¹,占活菌比例约为 99.9%。在 55℃ 处理 30 min 的过程中,细菌总数基本维持不变;活菌数量有所下降;可培养菌体数量变化显著,在处理 20 min 时下降至 0 CFU·mL⁻¹;死菌数量呈现上升趋势;在处理 30 min 时,VBNC 状态菌体数量为 1.1×10⁶ CFU·mL⁻¹,占活菌比例为 100.0%。

4℃ 低温处理组与 28℃ 对照组比较 (图 2),在 4℃ 处理 40 d 的过程中,细菌总数基本保持不变;活菌数量呈缓慢下降趋势,由初始 2.0×10⁶ CFU·mL⁻¹ 下降至 1.0×10⁵ CFU·mL⁻¹;可培养菌体数量变化显著,由初始 1.7×10⁶ CFU·mL⁻¹ 下降至 10 CFU·mL⁻¹;死菌数量逐渐上升至 9.7×10⁵ CFU·mL⁻¹;在该温度条件下,VBNC 状态菌体数量逐渐下降,处理 40 d 时 VBNC 菌体数量为 1.0×10⁵ CFU·mL⁻¹,活菌并未全部进入 VBNC 状态,VBNC 状态菌体数量占活菌数量比例约为 99.9%。

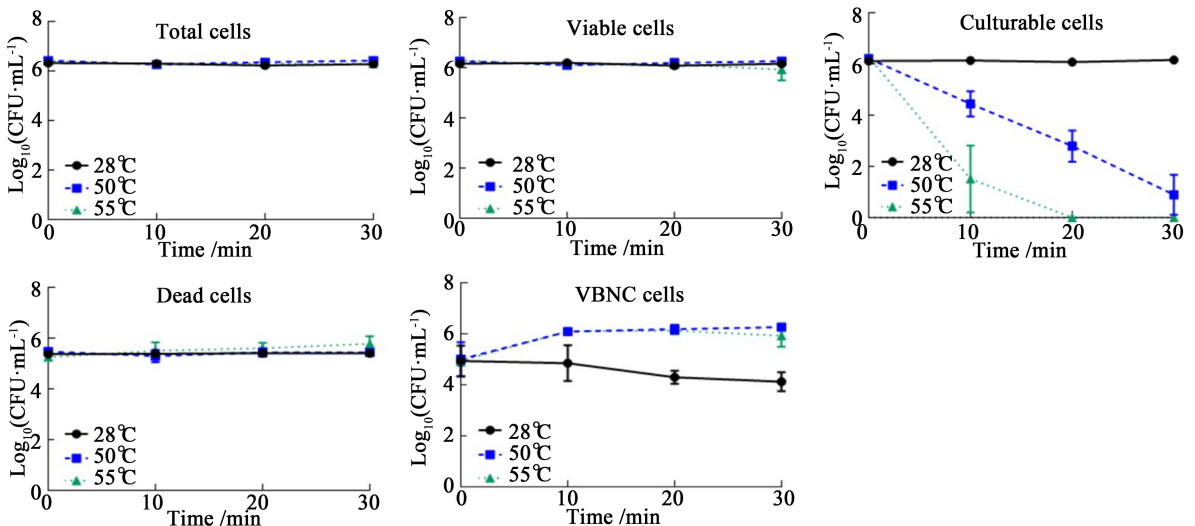


Fig. 1 Survival curves of *Acidovorax citrulli* AAC00-1 treated at 50℃ and 55℃

试验结果表明,55℃高温处理 20 min 和 30 min 能够诱导全部 AAC00-1 活菌进入 VBNC 状态;50℃高温处理 30 min 和 4℃低温处理 40 d 进入 VBNC 状态的活菌比例为 99.9%。

2.2 温度诱导对西瓜嗜酸菌致病力的影响

50℃、55℃高温处理组与 28℃对照组比较(图

3 和表 1),28℃的 4 个样品接种后均可以导致叶片发病(图 3-A1~A4)。50℃和 55℃的处理,随着处理时间的推移,叶片发病面积逐渐变小,病情指数也呈下降趋势;其中在 50℃处理 30 min 时,以及在 55℃处理 20 和 30 min 时,叶片上未见发病症状(图 3-C4、D3、D4),病情指数为 0。

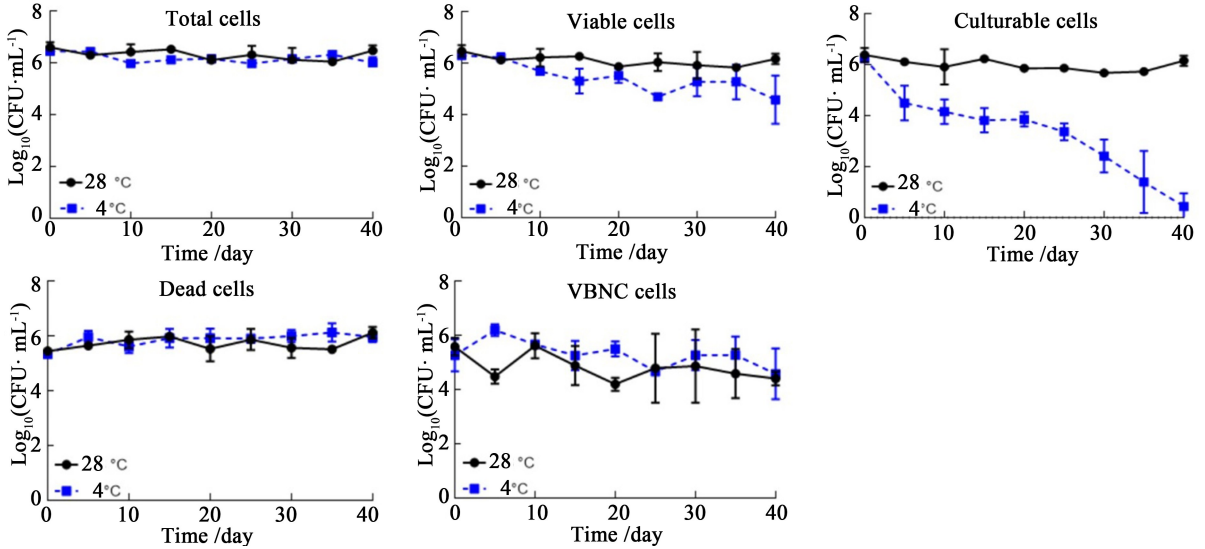


Fig. 2 Survival curves of *Acidovorax citrulli* AAC00-1 treated at 4°C



Fig. 3 Disease symptoms of watermelon cotyledons inoculated with *Acidovorax citrulli* AAC00-1 cells with different treatments at 5 DPI(5 days post-inoculation, DPI)

A1-A4: 28℃ treated for 0, 10, 20 and 30 min; B: Negative control;

C1-C4: 50℃ treated for 0, 10, 20 and 30 min; D1-D4: 55℃ treated for 0, 10, 20 and 30 min.

4℃低温处理组与 28℃对照组和阳性对照组比较(图 4 和表 2),28℃处理 40 d 时的样品接种后仍可以导致叶片发病(图 4-B),病情指数低于阳性对照组;4℃处理 40 d 的样品接种后,叶片上未见发病症状(图 4-C),病情指数为 0。

结合上述试验结果可知,当接种的菌悬液中 AAC00-1 可培养菌体的数量较少时,即大部分活菌为不可培养的 VBNC 状态,接种西瓜子叶 5 d 后没有发现发病症状,推测 VBNC 状态的 AAC00-1 无致病性。

Table 1 Disease indexes of watermelon cotyledons inoculated with *Acidovorax citrulli* AAC00-1 cells with different treatments at 5 DPI

Treatment	Time /min	Ratio of disease leaf/%	Leaf number of each grade						Disease index	VBNC proportion /%
			0	1	3	5	7	9		
Water	0	0.00	6	0	0	0	0	0	0.00	—
28℃	0	100.00	0	0	2	4	0	0	48.15	9.48
	10	100.00	0	0	5	1	0	0	37.04	10.59
	20	100.00	0	1	4	1	0	0	33.33	1.79
	30	100.00	0	0	3	2	0	0	42.22	1.13
50℃	0	100.00	0	0	2	3	1	0	51.85	10.80
	10	100.00	0	1	3	2	0	0	37.04	97.01
	20	83.33	1	4	1	0	0	0	12.96	99.94
	30	0.00	6	0	0	0	0	0	0.00	99.99
55℃	0	100.00	0	0	3	1	2	0	51.85	4.55
	10	83.33	1	5	0	0	0	0	9.26	99.99
	20	0.00	6	0	0	0	0	0	0.00	100.00
	30	0.00	6	0	0	0	0	0	0.00	100.00

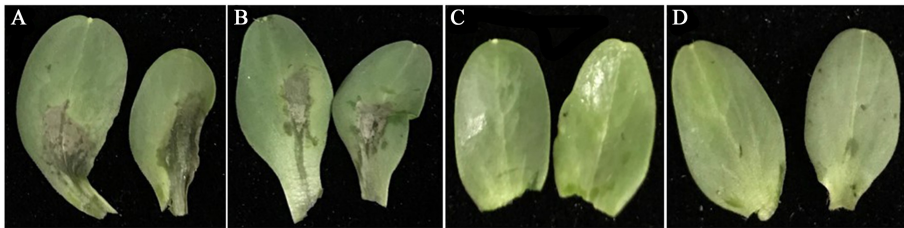


Fig. 4 Disease symptoms of watermelon cotyledons inoculated with *Acidovorax citrulli* AAC00-1 cells with different treatments at 5 DPI

A: Positive control; B: 28℃ treated for 40 d; C: 4℃ treated for 40 d; D: Negative control.

Table 2 Disease indexes of watermelon cotyledons inoculated with *Acidovorax citrulli* AAC00-1 cells with different treatments at 5 DPI

Treatment	Time /day	Ratio of disease leaf/%	Leaf number of each grade						Disease index	VBNC proportion /%
			0	1	3	5	7	9		
Water	0	0.00	6	0	0	0	0	0	0.00	—
Positive	0	100.00	0	0	1	4	1	0	55.56	14.02
28℃	40	100.00	0	0	3	3	0	0	44.44	11.82
4℃	40	0.00	0	0	0	0	0	0	0.00	99.99

2.3 西瓜嗜酸菌 VBNC 状态活体复苏的结果与分析

AAC00-1 经高温处理后,将菌悬液注射接种在西瓜子叶背面,保湿 5 d 后进行病原菌分离。50℃、55℃高温处理组与 28℃对照组比较(图 5 和图 6),28℃处理 0、10、20 和 30 min 的 4 个样品(图 5-B1~B4),50℃处理 0、10、20 和 30 min 的 4 个样品(图 5-D1~D4),以及 55℃处理 0 min 和 10 min 的 2 个样品(图 5-E1、E2),均可在平板上检测到菌落。50℃处理 30 min 的样品中含有可培养菌体,接种后叶片并未发病,但在平板上可以分离检测到少量菌落

(图 5-D4)。55℃处理 20 min 和 30 min 时的 2 个样品,全部活菌丧失可培养性进入 VBNC 状态,所以未能在平板上检测到菌落(图 5-E3、E4)。除清水对照组外,PCR 验证所有样品均呈阳性。

AAC00-1 经低温处理后,将菌悬液接种在西瓜子叶背面,保湿 5 d 后进行病原菌分离。4℃低温处理组与阳性对照组和 28℃处理组比较(图 7 和图 8),28℃处理 40 d 的样品,可以在平板上检测到菌落(图 7-B)。4℃处理 40 d 的样品,接种后叶片并未发病,但在平板上可以分离检测到菌落(图 7-C)。除清水对照组外,PCR 验证所有样品均呈阳性。

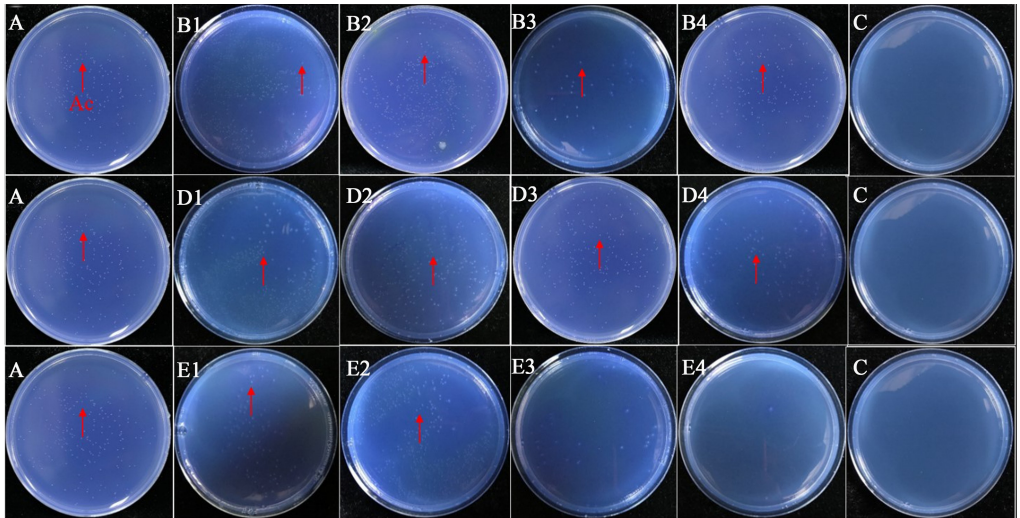


Fig. 5 Isolation of *Acidovorax citrulli* AAC00-1 cells from inoculated watermelon cotyledons on EBBA plates

A: Positive control; B1-B4: 28℃ treated for 0, 10, 20 and 30 min; C: Negative control; D1-D4: 50℃ treated for 0, 10, 20 and 30 min; E1-E4: 55℃ treated for 0, 10, 20 and 30 min.

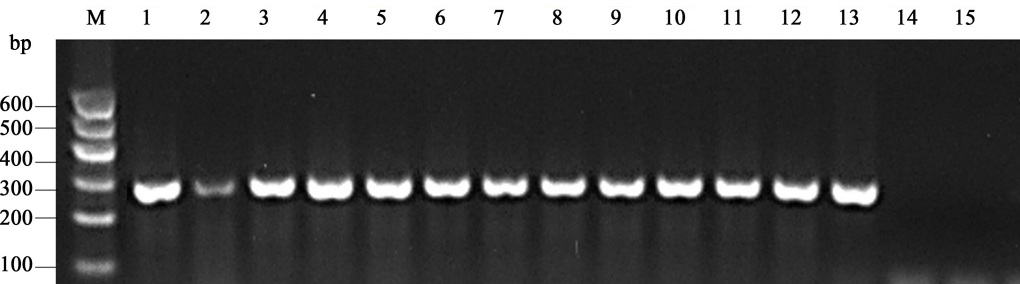


Fig. 6 Identification of suspicious colonies by PCR with *Acidovorax citrulli* AAC00-1 specific primers SEQID4^m/SEQID5

M: Marker; Lane 1: Positive control; Lane 2-5: 28℃ treated for 0, 10, 20 and 30 min; Lane 6-9: 50℃ treated for 0, 10, 20 and 30 min; Lane 10-13: 55℃ treated for 0, 10, 20 and 30 min; Lane 14: Negative control; Lane 15: ddH₂O.

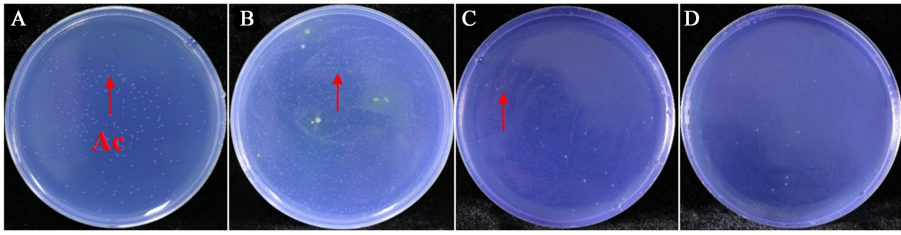


Fig. 7 Isolation of *Acidovorax citrulli* cells from inoculated watermelon cotyledons on EBBA plates

A: Positive control; B: 28°C treated for 40 d; C: 4°C treated for 40 d; D: Negative control.

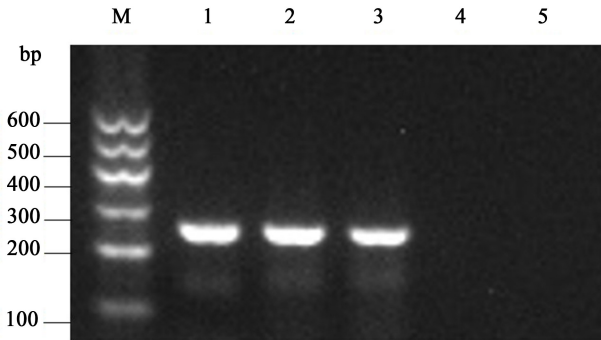


Fig. 8 Identification of suspicious colonies by PCR with *Acidovorax citrulli* specific primers SEQID4^m/SEQID5

M: Marker; Lane 1: Positive control; Lane 2: 28°C treated for 40 d; Lane 3: 4°C treated for 40 d; Lane 4: Negative control; Lane 5: ddH₂O.

上述试验结果表明,通过短时间的活体接种并未能使 VBNC 状态的 AAC00-1 恢复可培养性,即 VBNC 状态的 AAC00-1 未能在寄主体内复苏。结合致病力测定结果分析,除清水对照组外,对接种菌悬液后发病的叶片进行病原菌分离,在 EBBA 平板上可以检测到 AAC00-1 菌落,且 PCR 验证结果呈阳性,这是因为接种液中可培养菌体具有致病性,导致叶片发病;对接种菌悬液后未发病的叶片进行病原菌分离,即 50°C 处理 30 min 和 4°C 处理 40 d 的样品,在 EBBA 平板上能够检测到 AAC00-1 菌落,且 PCR 验证结果呈阳性,这是因为接种的可培养菌体数量并未达到致病量,所以叶片未发病,但存在于接种部位,可以分离检测到病菌;对接种菌悬液后未发病的叶片进行病原菌分离,即 55°C 处理 20 和 30 min 的样品,在 EBBA 平板上检测不到 AAC00-1 菌落,但 PCR 验证结果呈阳性,这是因为接种液中 AAC00-1 处于 VBNC 状态,该

状态的菌体有活性且核酸完整但丧失可培养性,所以通过平板检测并不能观测到菌落。

3 结论与讨论

自 1982 年 Xu 等^[21]发现 VBNC 状态后,研究人员在动植物病原菌、环境微生物等多个领域均发现了该状态病原菌的存在^[26-29],从形态^[30]、结构^[31]、诱导^[32, 33]、检测^[34, 35]、复苏^[34, 36]和基因功能^[37, 38]等多个方面进行了研究。本研究以 *A. citrulli* 菌株 AAC00-1 为材料,结合田间实际生产情况,通过设置不同温度条件处理,基于流式细胞术的方法,证实了温汤浸种和低温储藏环境,在杀死部分菌体的同时,也有可能使 *A. citrulli* 进入 VBNC 状态。该状态下的 *A. citrulli* 可能一直存在于种子和环境当中,或许会持续存在于植株的整个生长期。当西瓜种子收获后,如果种子携带 VBNC 状态的病原菌,使用传统的种子检测方法,可能造成假阴性结果,存在潜在威胁。VBNC 状态的 *A. citrulli* 在短时间活体接种后,不具有致病性,并且也未能复苏。然而,VBNC 状态的 *A. citrulli* 能在植株体内存在多长时间,去除不利因子后再添加营养物质等适宜的条件下是否使其复苏,尚需进一步研究。本研究室前期结果表明,VBNC 状态的 *A. citrulli* 在体外多种条件下可以复苏,复苏后菌体的致病性与对数期菌体无显著差异^[20]。同时,本研究在调查中发现,接种西瓜子叶病情指数的高低,与对数期菌体和 VBNC 状态菌体的含量有直接关系。若全为 VBNC 状态的 *A. citrulli*,那么其引发病害的风险就较低。因此,VBNC 状态的 *A. citrulli* 具有一定的潜在风险,可能会对其寄主葫芦科作物产生较大的威胁,必须引起重视。

本研究已证实不适的温度条件能够诱导

A. citrulli 进入 VBNC 状态,那么是否可以大胆推测,生产中常使用的其他防治措施,如干热、盐酸、过氧乙酸浸种等种子处理,硫酸链霉素、春雷霉素、中生菌素等药剂防治手段,均有可能导致 *A. citrulli* 进入 VBNC 状态来躲避或者抵御逆境。本研究模拟生产中温汤浸种的条件,使用 55℃ 高温处理 *A. citrulli*,致使所有活菌都进入 VBNC 状态后接种植株幼苗子叶,接种部位未表现出果斑病症状。表明在生产实践中,温汤浸种只要方法和时间得当,可以用于果斑病的防控。然而,对于种子干热处理,理论上需要更高的温度和时长,才能达到相应条件下湿热处理的杀菌效果。该方法对 *A. citrulli* 的杀灭效果及能否诱导其进入 VBNC 状态,限于实验条件尚未涉及,需要在后续研究中继续探索。

此外,有些处理方法会在很大程度上杀灭病原菌,但仍然可能导致极少量可培养菌的存在。例如,本研究中 50℃ 高温和 4℃ 低温处理,虽然植株接种部位没有症状出现,但由于能够分离得到可培养菌体,随着时间的增加和可培养菌量的上升,极有可能会引起症状的显现以及病害在田间的进一步扩展。因此,在实际生产中,进行种子病原菌检测和病害诊断时,需要多种检测方法共用,避免由于可培养菌量极低或 *A. citrulli* 进入 VBNC 状态,而导致基于细菌可培养性的检测中出现假阴性结果,防止造成潜在风险和重大经济损失。

细菌性果斑病是一种典型的种传细菌性病害,在病残体或土壤中越冬的病原菌和带菌种子是病害最主要的初侵染来源,从源头杜绝带菌种子的传播,是控制该病害传播和流行的重要手段。结合生产实践,解析 *A. citrulli* 在不适温度条件下的存活状态以及进入 VBNC 状态的难易程度,以及明确经不同温度处理后的 *A. citrulli* 在西瓜幼苗上的定殖能力及致病性,可以为解析病害初侵染源及再侵染提供理论依据,对细菌性病害的防控具有重要的生产实践意义。

参考文献

- [1] Dutta B, Scherm H, Gitaitis R D, *et al.* *Acidovorax citrulli* seed inoculum load affects seedling transmission and spread of bacterial fruit blotch of watermelon under greenhouse conditions [J]. *Plant Disease*, 2012, 96(5): 705-711.
- [2] Wang X, Zhang L, Xu F SH, *et al.* Immuno-capture PCR method for detecting *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from watermelon (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 2007, 4(2): 173-179.
- [3] Frankle W G, Hopkins D L, Stall R E. Ingress of the watermelon fruit blotch bacterium into fruit [J]. *Plant Disease*, 1993, 77(11): 1090-1092.
- [4] Lin P D. Study on the control of bacterial fruit rot spot (BFB) in melon crops (in Chinese) [J]. *China Cucurbits and Vegetables* (中国瓜菜), 2005, 14(4): 35-37.
- [5] Burdman S, Walcott R O N. *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.
- [6] Zhao T C, Sun F P, Wang B W. Research progress of bacterial fruit spot (in Chinese) [J]. *Plant Protection Technology and Extension* (植保技术与推广), 2001, 21(3): 36-38.
- [7] Burdman S, Kots N, Kritzman G, *et al.* Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel [J]. *Plant Disease*, 2005, 89(12): 1339-1347.
- [8] Hu J, Huang J X, Liu S P, *et al.* Characteristics of occurrence and control technique of bacterial fruit spot of cantaloupe in Inner Mongolia (in Chinese) [J]. *China Plant Protection* (中国植保导刊), 2006, 26(12): 19-20.
- [9] Xu Y, Zhang X P, Gong G Y, *et al.* Bacterial fruit rot and healthy seed production and detection of melon crops (part ii) (in Chinese) [J]. *Chinese Watermelon and Melon* (中国西瓜甜瓜), 2004, 17(1): 33-35.
- [10] Yan S S, Wang T L, Zhao T C. Research progress of bacterial fruit spot of melon (in Chinese) [J]. *Plant Quarantine* (植物检疫), 2011, 25(3): 71-76.
- [11] Hopkins D L. Chemical control of bacterial fruit blotch of watermelon [J]. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 1991, 104: 270-272.

- [12] Wang H S, Hu J, Zhao T C. Comprehensive prevention and control of seed-borne bacterial fruit spot of melon (in Chinese) [J]. China Vegetables (中国蔬菜), 2013, 1(5): 29-30.
- [13] Guo F M. Precautions for seed storage (in Chinese) [J]. Modern Agriculture (现代化农业), 2017, (9): 23.
- [14] Zhang X F. Processing and storage of seeds (in Chinese) [J]. Modern Agricultural Science and Technology (现代农业科技), 2017, (24): 47-48.
- [15] Schuster M L, Coyne D P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria [J]. Annual Reviews of Phytopathology, 1974, 12(1): 199-221.
- [16] Block C C, Shepherd L M. Long-term survival and seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon and watermelon seed [J]. Plant Health Progress, 2008, 9(1): 36.
- [17] Huang Y L, Wang X Q, Wu J Y, et al. Study on survival time of *Acidovorax citrulli* in diseased fruit rind (in Chinese) [C]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press (北京:中国农业科学技术出版社), 2012: 308-309.
- [18] Li Y C, Kong J Y, Wu J L, et al. Detection survival time of *Acidovorax citrulli* in different places (in Chinese) [J]. Journal of Huazhong Agricultural University (华中农业大学学报), 2012, 31(3): 332-336.
- [19] Jiang N, Lv Q Y, Xu X, et al. Induction of the viable but nonculturable state in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *in planta* resuscitation of cells on tomato seedlings [J]. Plant Pathology, 2016, 65(5): 826-836.
- [20] Kan Y M, Jiang N, Xu X, et al. Induction and resuscitation of the viable but non-culturable (VBNC) state in *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbitaceous crops [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1081.
- [21] Xu H S, Roberts N, Singleton F L, et al. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholera* in the estuarine and marine environment [J]. Microbial Ecology, 1982, 8(4): 313-323.
- [22] Xu H S, Huang B, Qi Z Z, et al. Study on the cell morphology of *Vibrio cholera*--viable but non-culturable cells (in Chinese) [J]. Journal of Ocean University of Qingdao (青岛海洋大学学报), 1997, 27(2): 187-190.
- [23] Xu H S, Colwello R R. The wintering mode of *Vibrio cholera*-viable but non-culturable state and detection method (in Chinese) [J]. Journal of Ocean University of Qingdao (青岛海洋大学学报), 1989, 19(2): 77-83.
- [24] Ji F, Liang Y. Advances in the study of bud structure (in Chinese) [J]. Journal of Jiangnan University Natural Science Edition [江汉大学学报(自然科学版)], 2013, 41(2): 81-85.
- [25] Hopkins D L, Thompson C M. Evaluation of *Citrullus* sp. germ plasm for resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [J]. Plant Disease, 2002, 86(1): 61-64.
- [26] Zhao X H, Zhong J L, Wei C J, et al. Current perspectives on viable but non-culturable state in food-borne pathogens [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 580.
- [27] Mustapha P, Epalle T, Allegra S, et al. Monitoring of *Legionella pneumophila* viability after chlorine dioxide treatment using flow cytometry [J]. Research in Microbiology, 2015, 166(3): 215-219.
- [28] Imamura D, Mizuno T, Miyoshi S, et al. Stepwise changes in viable but nonculturable *Vibrio cholerae* cells [J]. Microbiology and Immunology, 2015, 59(5): 305-310.
- [29] Alfa M J, Ribeiro M M, da Costa Luciano C, et al. A novel polytetrafluoroethylene-channel model, which simulates low levels of culturable bacteria in build-up biofilm after repeated endoscope reprocessing [J]. Gastrointestinal Endoscopy, 2017, 86(3): 442-451.
- [30] Trevors J T, Bej A K, Mojib N, et al. Bacterial gene expression at low temperatures [J]. Extremophiles, 2012, 16(2): 167-176.
- [31] Serpaggi V, Remize F, Recorbet G, et al. Characterization of the "viable but nonculturable" (VBNC)

- state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces* [J]. Food Microbiology, 2012, 30(2): 438-447.
- [32] Kibbee R J, Örmeci B. Development of a sensitive and false-positive free PMA-qPCR viability assay to quantify VBNC *Escherichia coli* and evaluate disinfection performance in wastewater effluent [J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 132(1): 139-147.
- [33] Yan M, Xu L, Jiang H, *et al.* PMA-LAMP for rapid detection of *Escherichia coli* and shiga toxins from viable but non-culturable state [J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 105: 245-250.
- [34] Fida T T, Moreno-Forero S K, Breugelmans P, *et al.* Physiological and transcriptome response of the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Novosphingobium* sp. LH128 after inoculation in soil [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(3): 1570-1579.
- [35] Mariam S H, Zegeye N, Aseffa A, *et al.* Diffusile substances from lactic acid bacterial cultures exert strong inhibitory effects on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar enteritidis in a co-culture model [J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 35.
- [36] Shafiei R, Zarmehrkorshid R, Mounir M, *et al.* Influence of carbon sources on the viability and resuscitation of *Acetobacter senegalensis* during high-temperature gluconic acid fermentation [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2017, 40(5): 769-780.
- [37] Rodrigues R C, Martins E, Vanetti M C D, *et al.* Induction of the viable but nonculturable state of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis deficient in (p) ppGpp synthesis [J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(4): 2171-2178.
- [38] Meng L, Alter T, Aho T, *et al.* Gene expression profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but non-culturable state [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2015, 91(5).

责任编辑:曾晓葳