

## 实验方法与技术

## Experimental Method &amp; Technology

## 应用微滴数字 PCR 同时检测瓜类种子携带果斑病菌和角斑病菌

赵子婧<sup>1</sup>, 芦钰<sup>2</sup>, 田文<sup>1</sup>, 王玉玺<sup>1</sup>, 温常龙<sup>2</sup>,  
李健强<sup>1</sup>, 徐秀兰<sup>2\*</sup>, 罗来鑫<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学植物保护学院, 种子病害检验与防控北京市重点实验室, 北京 100193;

2. 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 农业农村部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100097)

**摘要** 细菌性果斑病和角斑病是葫芦科作物两大重要细菌病害, 病原菌分别为西瓜嗜酸菌 *Acidovorax citrulli* 和丁香假单胞菌黄瓜致病变种 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*。两种菌均可通过种子、种苗带菌进行远距离传播。种子检测是预防和控制这两种病害发生的首要环节。本研究应用微滴数字 PCR 技术 (droplet digital PCR, ddPCR) 建立了同时检测种子携带西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌的方法。结果显示: 两种细菌菌悬液和 DNA 样品等浓度混合时, ddPCR 能同时检测到两种靶标菌的最低混合菌悬液浓度和最低 DNA 浓度分别为  $10^3$  cfu/mL 和  $10^{-3}$  ng/ $\mu$ L, 其检测灵敏度是平行测试的 real-time PCR 方法的 10 倍; 对于非等浓度混合的菌悬液和 DNA 样品, 两种靶标菌菌悬液按浓度比 1:1 000 ( $10^3$ : $10^6$  cfu/mL) 混合或其 DNA 浓度比为 1:10 000 ( $2.28 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L: 22.8 ng/ $\mu$ L) 条件下, ddPCR 可检测到低浓度的靶标菌, 检测灵敏度同样是 real-time PCR 的 10 倍。此外, 在人工接种种子测试中, 西瓜、甜瓜单粒种子平均带菌量  $10^5 \sim 10^6$  cfu/粒时, ddPCR 方法可检测到带菌率 0.2% ( $n=500$ ) 的西瓜、甜瓜种子样品。将分别携带两种菌的种子按比例 1:10 混合时 ddPCR 方法可以准确检出浓度相对低的靶标菌; 而使用相同检测引物的 real-time PCR 检测方法则只能检出西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌带菌率分别为 0.2% 和 2% ( $n=500$ ) 的甜瓜种子混合样品中的西瓜嗜酸菌, 未能稳定检出丁香假单胞菌。综上所述, 本研究基于 ddPCR 技术建立了可同时检测两种重要葫芦科种传细菌的方法, 检测结果稳定可靠, 丰富了当前种传病原细菌的检测技术体系。

**关键词** 微滴数字 PCR; real-time PCR; 种子带菌检测; 西瓜嗜酸菌; 丁香假单胞菌黄瓜致病变种

**中图分类号:** S 436.5 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019687

## Detection of *Acidovorax citrulli* and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* from cucurbit seeds by multiplex droplet digital PCR

ZHAO Zijing<sup>1</sup>, LU Yu<sup>2</sup>, TIAN Wen<sup>1</sup>, WANG Yuxi<sup>1</sup>, WEN Changlong<sup>2</sup>,  
LI Jianqiang<sup>1</sup>, XU Xiulan<sup>2\*</sup>, LUO Laixin<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Key Laboratory of Seed Disease Testing and Control, College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

**Abstract** Bacterial fruit blotch (BFB) and bacterial angular leaf spot are two major bacterial diseases of Cucurbitaceae crops, caused by *Acidovorax citrulli* (Ac) and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Psl), respectively. These two pathogens can achieve long-distance transmission through contaminated seeds or seedlings, therefore, seed detection plays the first key role in disease management. In this study, we adopted a new

收稿日期: 2019-12-12 修订日期: 2020-03-25

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201602);北京市科技计划(Z191100004019010);北京市农林科学院创新专项(KJCX20180203)

\* 通信作者 E-mail: 徐秀兰 xuxiulan@nrcv.org; 罗来鑫 luolaixin@cau.edu.cn

technique of droplet digital PCR (ddPCR) to establish a method for simultaneous detection of seeds carrying both Ac and Psl. The results showed that ddPCR could simultaneously detect Ac and Psl mixed in equal ratio, with the limits of  $10^3$  cfu/mL of two bacterial suspensions and  $10^{-3}$  ng/ $\mu$ L of two DNA samples respectively. The detection sensitivity of ddPCR was 10 times higher than that of real-time PCR tested in parallel. For two bacterial suspensions and DNA samples mixed in unequal ratio, ddPCR can detect the low concentration of target bacteria at a ratio of 1 : 1 000 ( $10^3$  :  $10^6$  cfu/mL) for bacterial suspension and 1 : 10 000 ( $2.28 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L : 22.8 ng/ $\mu$ L) for DNA. Meanwhile, the detection sensitivity was 10 times higher than that of real-time PCR. In addition, when testing with artificially infested watermelon and melon seed (inoculated bacterial amount =  $10^5$  –  $10^6$  cfu/seed), the seed sample with an infestation level of 0.2% ( $n = 500$ ) was detectable by using ddPCR. When the ratio of the two contaminated seeds was 1 : 10, ddPCR still detected the target bacteria at low concentrations. However, using real-time PCR could only detect Ac in the melon seed at a level of 0.2% ( $n = 500$ ), and Psl was not consistently detected in replicates. In summary, this study established a seed detection method based on ddPCR that could simultaneously detect two important seed-transmitted pathogens in the Cucurbitaceae. The ddPCR-based method was stable and reliable, which enriches the current detection technology system for seed-borne pathogens.

**Key words** droplet digital PCR; real-time PCR; seed-transmitted pathogen detection; *Acidovorax citrulli*; *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

我国是世界蔬菜种植大国,种植面积、总产量和出口量等均居世界第一<sup>[1-2]</sup>。葫芦科植物共有 118 属 825 种<sup>[3]</sup>,广泛分布于热带和亚热带地区,其中不乏多种重要的蔬菜作物。我国葫芦科植物共有 32 属 154 种 35 变种,常见的有西瓜、甜瓜、黄瓜、南瓜、西葫芦等<sup>[3-4]</sup>。根据世界粮农组织 (FAO) 统计结果,近十年我国西瓜、甜瓜和黄瓜的种植面积和产量逐年增加,种植面积和产量均居世界第一<sup>[5-6]</sup>。然而瓜类细菌性病害尤其是果斑病和角斑病的频频发生严重影响了我国葫芦科作物的生产<sup>[7-8]</sup>。

西瓜嗜酸菌 *Acidovorax citrulli* (Ac), 是引起果斑病的病原细菌,为重要的世界检疫性有害生物<sup>[9]</sup>。西瓜嗜酸菌为革兰氏阴性菌,主要分为两个组群,其中 Group II 群主要侵染西瓜, Group I 群主要侵染除西瓜外的其他作物,如甜瓜、黄瓜、葫芦等<sup>[10]</sup>。果斑病发病初期在子叶和果实上都表现为水浸状的斑点,在发病后期,真叶上有黄色晕圈的褐色小斑,在果实上会导致果皮龟裂,果肉腐烂<sup>[11]</sup>。

丁香假单胞菌黄瓜致病变种 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Psl), 是引起角斑病的病原细菌,革兰氏阴性,主要寄主为黄瓜,也可侵染甜瓜、西瓜等葫芦科作物,以及部分茄科作物和豆科作物<sup>[12]</sup>。角斑病发病初期为水浸状病斑,随后会受到叶脉的限制呈多角形或者不规则形病斑,果实上为水浸状病斑,可导致果实溃烂,溢出白色菌脓<sup>[13]</sup>。

两种病原菌侵染甜瓜初期,叶片症状较为相似,

难以区分,而果斑病造成西瓜、甜瓜等果实水浸状腐烂的损失更大<sup>[14]</sup>。由于两种病原细菌均可通过种子传播,对种子进行带菌检测,减少因带菌种子引起病害流行是种传病害防控的首要环节。

微滴数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 是可以实现准确定量的一种新的核酸扩增技术,被称为第三代 PCR 技术<sup>[15]</sup>。该技术将含有 DNA 或 RNA 的 PCR 体系分成数万个油包水的纳米级微滴,每个微滴里可能不含或含 1 个甚至多个核酸分子,每个微滴都作为一个独立的 PCR 体系,经 PCR 扩增后,对每个微滴反应进行检测,有荧光信号的微滴判读为 1,没有荧光信号的微滴判读为 0,根据泊松分布原理及阳性微滴的个数与比例即可得出靶分子的起始拷贝数<sup>[16]</sup>。即利用有限稀释,PCR 反应和泊松分布实现核酸浓度的绝对定量,也可高度灵敏和准确地对低浓度的核酸进行绝对定量。与荧光定量 PCR 相比,ddPCR 技术具有更高的灵敏度和特异性,可实现无需外部标准的绝对定量,简化了计算。目前 ddPCR 技术广泛用于生物医学、基因表达分析、拷贝数变异分析、转基因食品检测等<sup>[17]</sup>,在植物病害的检测方面应用很少。最早在 2014 年, Dreo 等利用 ddPCR 首次检测了两种检疫性植物病原菌——梨火疫病菌 *Erwinia amylovora* 和马铃薯青枯病菌 *Ralstonia solanacearum*<sup>[18]</sup>,随后 Zhao 等利用 ddPCR 技术对柑橘溃疡病进行检测,发现与 real-time PCR 相比,ddPCR 的灵敏性、重复性均高

于 real-time PCR,并降低了铜离子对反应的干扰<sup>[19]</sup>。此外,Wang 等利用 ddPCR 通过收集双通路荧光信号实现了对转基因水稻的两个靶标基因的检测<sup>[20]</sup>。

本研究建立了应用 ddPCR 技术同时检测瓜类细菌性果斑病和角斑病的技术方法,并与荧光定量 PCR 技术进行平行测试,比较分析了两种方法对种子带菌检测的灵敏性与稳定性。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株及培养条件

丁香假单胞菌黄瓜致病变种 *P. syringae* pv. *lachrymans* 菌株 NCPPB543(后文简称丁香假单胞菌)分离自黄瓜,由中国农业大学种子病理学实验室提供;西瓜嗜酸菌 *A. citrulli* 由北京市农林科学院蔬菜研究中心提供,其中,菌株 Xu17-15 分离自西瓜种子,分型为 II 型;菌株 Xu201807,分离自甜瓜发病

果实,分型为 I 型。两个菌株分别用于制备带菌的西瓜和甜瓜种子。菌株 Xu17-15 用于混合菌悬液和混合 DNA 的制备。菌株悬浮于 15% 甘油,保存在 -80℃ 冰箱中。菌株活化采用 PF 培养基(蛋白胨 20 g/L,琼脂 15 g/L,甘油 10 mL/L,1 mol/L 磷酸氢二钾 14 mL/L,1 mol/L 硫酸镁 14 mL/L)于 28℃ 培养 2 d。

分别将浓度为 10<sup>8</sup> cfu/mL 的西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌进行 10 倍梯度稀释,得到 10、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup> cfu/mL 系列浓度菌悬液,将制备好的菌悬液冻存于 -20℃。

### 1.2 ddPCR 引物探针组合

参考相关文献,前期测试了 2 组西瓜嗜酸菌引物探针与 1 组丁香假单胞菌引物探针不同组合,选择 A-1 为检测西瓜嗜酸菌的引物探针,P-0 为检测丁香假单胞菌的引物探针(表 1)。所有引物探针均由北京六合华大基因科技有限公司合成。

表 1 本研究所用引物探针列表

Table 1 List of primers and TaqMan probes used in this study

引物组 Primer group	引物探针 Primer and probe	序列(5'-3') Sequence	参考文献 Reference
A-1	Ac-FP	CTGATAATCCTCGGCTCAACAA	[21]
	Ac-RP	TGAGCGCATTCTGACGAG	
	Ac-P	FAM-AAGAAATACGCCCTCGCCAATCTCC-BHQ1b	
P-0	Psl-F	GTTGCGGACGCAATCAATG	[22]
	Psl-R	GTTGACTTCTTCGGCGGTGG	
	Psl-PB1	HEX-CCGGAGCTGGCAGGCAAACCTCAC-BHQ1b	

### 1.3 ddPCR 检测体系与反应程序

ddPCR 采用 QX200 全自动微滴式数字 PCR 系统(北京汇力宏业生物科技有限公司),包含 QX200 微滴自动生成仪、QX200 微滴读取仪以及 QuantaSoft 数据分析软件。反应总体积 24 μL,其中 2× ddPCR supermix for probes 12 μL,4 条引物(900 nmol/L)各 1 μL,2 条探针(250 nmol/L)各 0.3 μL,模板 1 μL,超纯水 6.4 μL。反应程序为 95℃ 10 min;94℃ 30 s,68℃ 60 s,40 个循环;98℃ 10 min;4℃ 保存。

### 1.4 real-time PCR 检测体系与反应程序

real-time PCR 采用 LightCycler® 480 实时荧光定量 PCR 系统。反应总体积为 25 μL,其中 2× real-time PCR master mix 12.5 μL,4 条引物(20 μmol/L)各 0.5 μL,2 条探针(20 μmol/L)各 0.3 μL,模板 1 μL,超纯水 8.9 μL。反应程序为 95℃ 5 min;95℃ 15 s,58℃ 45 s,40 个循环;12℃ 保存。

### 1.5 西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌菌悬液样品制备

#### 1.5.1 等浓度混合菌悬液

将浓度分别为 10<sup>6</sup> cfu/mL 的西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌菌悬液等体积混合,得到菌浓度为 10<sup>6</sup> cfu/mL 的等浓度混合菌悬液,按同样的方法制备菌浓度为 10~10<sup>5</sup> cfu/mL 的等浓度混合菌悬液。以混合菌悬液为模板,分别用 real-time PCR 和 ddPCR 进行检测。

#### 1.5.2 非等浓度混合菌悬液

在 10<sup>6</sup> cfu/mL 西瓜嗜酸菌菌悬液中分别加入等体积的 10~10<sup>5</sup> cfu/mL 的丁香假单胞菌菌悬液,得到高浓度西瓜嗜酸菌和低浓度丁香假单胞菌的非等浓度混合菌悬液;同样地,制备高浓度丁香假单胞菌和低浓度西瓜嗜酸菌的非等浓度混合菌悬液。以非等浓度混合的菌悬液为模板,分别用 real-time PCR 和 ddPCR 进行检测。

## 1.6 西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌 DNA 样品制备

### 1.6.1 DNA 提取

从 PF 培养基上分别刮取西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌,用无菌水制备成菌悬液。用 DNA 提取试剂盒(北京全式金 EasyPure Bacteria Genomic DNA Kit)分别提取西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌的 DNA,测定 DNA 浓度并稀释至  $22.8 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

### 1.6.2 两种细菌等浓度 DNA 混合样品制备

将两个靶标的 DNA 分别梯度稀释,各得到  $22.8 \sim 2.28 \times 10^{-6} \text{ ng}/\mu\text{L}$  的 8 个 DNA 样品,冻存于  $-20^\circ\text{C}$ 。取等体积等浓度两种菌的 DNA 样品混合均匀,得到混合 DNA 浓度为  $22.8 \sim 2.28 \times 10^{-6} \text{ ng}/\mu\text{L}$  的混合样品。以混合 DNA 为模板,分别用 real-time PCR 和 ddPCR 进行检测。

### 1.6.3 两种细菌非等浓度 DNA 混合样品制备

在  $22.8 \text{ ng}/\mu\text{L}$  西瓜嗜酸菌 DNA 样品中分别加入等体积的  $2.28 \sim 2.28 \times 10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$  的丁香假单胞菌 DNA 样品,得到高浓度西瓜嗜酸菌和低浓度丁香假单胞菌的非等浓度混合 DNA 样品;同样地,制备高浓度丁香假单胞菌和低浓度西瓜嗜酸菌的非等浓度混合 DNA 样品。以非等浓度混合的 DNA 为模板,分别用 real-time PCR 和 ddPCR 进行检测。

## 1.7 带菌西瓜和甜瓜种子样品制备及检测

### 1.7.1 西瓜带菌种子制备

以经检测确认未携带西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌的西瓜种子(‘国蜜 101’)作为样品制备的供试材料。取两份西瓜种子(各 50 g)分别完全浸泡在  $10^8 \text{ cfu}/\text{mL}$  的西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌菌悬液中,  $28^\circ\text{C}$ ,  $120 \text{ r}/\text{min}$  培养 2 h,取出种子,自然晾干 2~3 d,获得分别携带西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌的西瓜种子。将分别携带西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌

的西瓜种子按照粒数比 0:0、1:0、1:1、1:5、1:10、5:1、10:1、0:1(均为实际混入的粒数)混入健康种子中,得到样本总量为 100 粒/份与 500 粒/份的种子样品各 8 份。试验设置 3 次重复,共准备 100 粒/份与 500 粒/份的样品各 24 份。

### 1.7.2 西瓜种子样品带菌检测

以 1:4 ( $m/V$ ) 的比例在检测样品中加入 PBST 洗涤缓冲液,用均质器激烈拍打 1 min 后,  $28^\circ\text{C}$   $120 \text{ r}/\text{min}$  培养 4 h,之后放置冰箱  $4^\circ\text{C}$  培养过夜,第 2 天再次拍打 1 min,用双层纱布过滤,收集洗涤液于 50 mL 离心管中。以  $4000 \text{ r}/\text{min}$  低速离心 10 min,收集上清液,再以  $10000 \text{ r}/\text{min}$  高速离心 10 min,弃上清液,用 1 mL 无菌水重悬底部沉淀,得到种子洗涤液原液,分别用 real-time PCR 和 ddPCR 进行检测。

### 1.7.3 带菌甜瓜种子样品制备及检测

甜瓜种子(‘京玉 6 号’)接菌方法、种子样品制备、检测方法与西瓜种子相同。

## 2 结果与分析

### 2.1 ddPCR 和 real-time PCR 检测两种病原菌混合菌悬液样品

用 ddPCR 和 real-time PCR 对西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌等浓度混合菌悬液进行检测,结果如表 2 所示。混合菌悬液浓度为  $10^4 \text{ cfu}/\text{mL}$  时,real-time PCR 可以同时检测到两个靶标菌,浓度为  $10^3 \text{ cfu}/\text{mL}$  时可检测到混合菌悬液中的西瓜嗜酸菌,但未检测到等浓度的丁香假单胞菌;而 ddPCR 可以同时检测两个靶标菌的混合菌悬液浓度为  $10^3 \text{ cfu}/\text{mL}$ ,可检测到  $10^2 \text{ cfu}/\text{mL}$  混合菌悬液中的西瓜嗜酸菌,但未检测到等浓度的丁香假单胞菌。对于等浓度混合菌悬液,ddPCR 的检测灵敏度比 real-time PCR 高 1 个数量级。

表 2 Real-time PCR 和 ddPCR 检测两种病原菌等浓度混合菌悬液的结果<sup>1)</sup>

Table 2 Result of real-time PCR and ddPCR for detection of the mixture of two bacterial suspensions at equal concentrations

Ac 和 Psl 的混合浓度/ $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ Starting concentration of Ac and Psl	$C_t$		拷贝数/拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ Number of copies	
	Ac	Psl	Ac	Psl
$10^6$	27.33	27.52	105.2	76.3
$10^5$	30.39	29.96	11.9	4.8
$10^4$	32.39	32.79	1.6	0.9
$10^3$	33.03	—	0.77	0.5
$10^2$	—	—	0.09	—
10	—	—	—	—

1) Ac: 西瓜嗜酸菌; Psl: 丁香假单胞菌黄瓜致病变种。— 表示未检测到。 $C_t$  值为 real-time PCR 的结果;拷贝数为 ddPCR 结果。下同。  
Ac: *Acidovorax citrulli*; Psl: *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. — means no results were obtained.  $C_t$  value was the result of real-time PCR and copy number was the result of ddPCR. The same applies below.

非等浓度混合菌悬液的检测结果如表 3 所示。当西瓜嗜酸菌菌悬液浓度恒定为  $10^6$  cfu/mL 时,real-time PCR 能检测到的丁香假单胞菌的最低浓度为  $10^5$  cfu/mL,而 ddPCR 为  $10^3$  cfu/mL;当丁香假单胞菌悬液浓度恒定为  $10^6$  cfu/mL 时,real-time PCR 能检

测到的西瓜嗜酸菌的最低浓度为  $10^4$  cfu/mL,而 ddPCR 为  $10^3$  cfu/mL。采用 real-time PCR 检测,当某种菌含量高时,另一种低浓度病原菌的检测灵敏度受到抑制,而 ddPCR 不受高浓度靶标的干扰,提高了对低浓度靶标的检测灵敏度。

表 3 Real-time PCR 和 ddPCR 检测两种病原菌非等浓度混合菌悬液的结果

**Table 3 Result of real-time PCR and ddPCR for detection of the mixture of two bacterial suspensions at unequal concentrations**

起始浓度/cfu·mL <sup>-1</sup> Starting concentration		C <sub>t</sub>		拷贝数/拷贝·μL <sup>-1</sup> Number of copies	
Ac	Psl	Ac	Psl	Ac	Psl
10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	28.01	29.63	90.30	4.60
10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	28.19	—	83.00	0.72
10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup>	28.08	—	121.70	0.49
10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	27.76	—	137.00	—
10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	29.55	27.58	18.50	66.10
10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	31.75	27.76	3.20	64.50
10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>	—	27.88	1.60	77.60
10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	—	27.02	—	160.50

**2.2 ddPCR 和 real-time PCR 检测两种病原菌混合 DNA 样品**

以西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌等浓度混合 DNA 为模板的检测结果如表 4 所示。Real-time

PCR 可以同时检测到两种靶标菌的最低 DNA 浓度为  $10^{-2}$  ng/μL;ddPCR 可检测的最低 DNA 浓度为  $10^{-3}$  ng/μL, ddPCR 的检测灵敏度比 real-time PCR 高 1 个数量级。

表 4 Real-time PCR 和 ddPCR 检测两种靶标细菌等浓度混合 DNA 的结果

**Table 4 Result of real-time PCR and ddPCR for detection of the mixture of two bacterial DNAs at equal concentrations**

Ac 和 Psl 起始浓度/ng·μL <sup>-1</sup> Starting concentration of Ac and Psl	C <sub>t</sub>		拷贝数/拷贝·μL <sup>-1</sup> Number of copies	
	Ac	Psl	Ac	Psl
22.8	20.26	18.62	9 800	7 900
2.28	23.39	22.95	4 220	1 867
$2.28 \times 10^{-1}$	27.28	27.02	271	158
$2.28 \times 10^{-2}$	30.47	29.61	24.8	16.6
$2.28 \times 10^{-3}$	—	—	2.3	1.2
$2.28 \times 10^{-4}$	—	—	—	—
$2.28 \times 10^{-5}$	—	—	—	—
$2.28 \times 10^{-6}$	—	—	—	—

西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌非等浓度 DNA 混合样品的检测结果如表 5 所示。在 22.8 ng/μL 西瓜嗜酸菌 DNA 中混入等体积不同浓度的丁香假单胞菌的 DNA 时,real-time PCR 可在 1 000:1 比例下检测到低浓度的丁香假单胞菌 DNA,而 ddPCR 检测限达到

10 000:1;在 22.8 ng/μL 丁香假单胞菌 DNA 中混入等体积不同浓度的西瓜嗜酸菌的 DNA 时,real-time PCR 和 ddPCR 对低浓度的西瓜嗜酸菌 DNA 的检测限也分别为 1 000:1 和 10 000:1。ddPCR 对低浓度靶标的检测灵敏度是 real-time PCR 的 10 倍。

表 5 Real-time PCR 和 ddPCR 检测两种靶标细菌非等浓度混合 DNA 的结果<sup>1)</sup>

**Table 5 Result of real-time PCR and ddPCR for detection of the mixture of two bacterial DNAs at unequal concentrations**

起始浓度/ng·μL <sup>-1</sup> Starting concentration		C <sub>t</sub>		拷贝数/拷贝·μL <sup>-1</sup> Number of copies	
Ac	Psl	Ac	Psl	Ac	Psl
22.8	2.28	20.88	22.31	>10 000	1 819
22.8	$2.28 \times 10^{-1}$	20.81	24.72	>10 000	182
22.8	$2.28 \times 10^{-2}$	21.50	28.30	>10 000	19.4
22.8	$2.28 \times 10^{-3}$	21.48	—	>10 000	2.5
22.8	$2.28 \times 10^{-4}$	21.34	—	>10 000	—
22.8	$2.28 \times 10^{-5}$	21.47	—	>10 000	—

续表 5 Table 5(Continued)

起始浓度/ng·μL <sup>-1</sup> Starting concentration		C <sub>t</sub>		拷贝数/拷贝·μL <sup>-1</sup> Number of copies	
Ac	Psl	Ac	Psl	Ac	Psl
2.28	22.8	24.51	20.05	3 730	>10 000
2.28×10 <sup>-1</sup>	22.8	27.69	20.34	407	>10 000
2.28×10 <sup>-2</sup>	22.8	31.17	19.99	35.5	>10 000
2.28×10 <sup>-3</sup>	22.8	—	20.30	3.8	>10 000
2.28×10 <sup>-4</sup>	22.8	—	20.31	—	8 800
2.28×10 <sup>-5</sup>	22.8	—	19.82	—	9 600

1) >10 000 表示样品浓度超出 ddPCR 检测限;—表示为未检测到。

>10 000 indicates the concentration of samples exceeds the detection limits of ddPCR. — means no results were obtained.

### 2.3 ddPCR 和 real-time PCR 检测携带两种病原菌的种子样品

人工接菌的西瓜、甜瓜种子经浸提、平板培养检测,获得西瓜、甜瓜带菌种子,带菌量稳定在 10<sup>5</sup>

~10<sup>6</sup> cfu/粒。当检测样本容量为 100 粒或 500 粒未添加人工接菌种子的健康对照时,real-time PCR 和 ddPCR 对西瓜、甜瓜种子的检测结果均为阴性(表 6)。

表 6 Real-time PCR 和 ddPCR 检测人工接种西瓜/甜瓜种子结果<sup>1)</sup>

Table 6 Comparison of real-time PCR and ddPCR in detecting artificially infested watermelon and melon seeds

样品量/粒 Sample size	携带 Ac 种子/粒 Ac-infested seed	携带 Psl 种子/粒 Psl-infested seed	西瓜样品 Watermelon seed sample				甜瓜样品 Melon seed sample			
			C <sub>t</sub>		拷贝数/拷贝·μL <sup>-1</sup> Number of copies		C <sub>t</sub>		拷贝数/拷贝·μL <sup>-1</sup> Number of copies	
			Ac	Psl	Ac	Psl	Ac	Psl	Ac	Psl
1	1	0	28.64	—	1 709	—	29.17	—	656	—
	0	1	—	30.86	—	1 446	—	31.76	—	225
100	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	1	0	28.90(2/3)	—	262	—	30.27	—	70.2	—
	0	1	—	31.90	—	109	—	32.15	—	6.5
	1	1	27.92	28.67(1/3)	278	168	29.76	28.41	63.4	28.1
	1	5	28.10(1/3)	23.52(1/3)	251	680	31.71	30.35	60.6	166
	1	10	30.28(1/3)	—	268	775	32.13	28.68	28	411
	5	1	30.25(2/3)	—	1 062	76	28.54	28.55(2/3)	150	10
	10	1	29.08(1/3)	—	1 313	8.5	27.05	27.18(2/3)	569	10.4
500	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	1	0	27.10(1/3)	—	1 184	—	29.67(2/3)	—	73.5	—
	0	1	—	32.22(2/3)	—	53.8	—	25.23(2/3)	—	15
	1	1	27.68	28.83	338	127	30.11	28.66	103.5	15.2
	1	5	28.33(2/3)	28.10(2/3)	215	466	30.31	27.21	65.4	63.1
	1	10	27.64(2/3)	26.81(2/3)	277	1561	29.57	25.49	64.9	176
	5	1	26.25	—	1 647	11.6	28.08	25.91(2/3)	187	14.6
	10	1	24.51	—	3 970	124	25.21	24.33(1/3)	823	22.4

1) 表中数值均为 3 次重复平均值。括号内表示 3 次重复中阳性结果的比例;未标明的表示 3 次结果一致;—表示 3 次重复结果都为阴性。  
The values listed are mean of three replications. Values in parentheses are the ratios of positives in three replicates; values without parentheses indicate consistent results in three replications. — indicates that all replications are negative.

在健康西瓜种子中混入接菌种子的样品检测结果如表 6 所示:在 100 粒西瓜种子样品中 ddPCR 可以稳定地检测到 1% 的带菌种子,且 3 次重复结果一致;而对于同一个样品 real-time PCR 未能得到 3 次重复一致的阳性结果。当保持西瓜嗜酸菌带菌率

为 1%,增加携带丁香假单胞菌的种子数到 5 粒或者 10 粒时,ddPCR 均可检测到带菌率低的西瓜嗜酸菌及带菌率高的丁香假单胞菌(5%~10%),同样地,丁香假单胞菌带菌率为 1%,而西瓜嗜酸菌带菌率为 5%~10%,采用 ddPCR 仍可同时检测到两种

菌。但是 real-time PCR 对带菌率差异大的样品检测结果并不稳定,未能每次都检测到带菌率为 1% 的西瓜种子,尤其是对丁香假单胞菌的检测重复性较差,当检测样品中携带西瓜嗜酸菌与丁香假单胞菌的种子粒数比大于 5:1 时,real-time PCR 3 次重复都未能检出丁香假单胞菌。

当西瓜种子检测样本为 500 粒时,ddPCR 可稳定地检测到 0.2% 的带菌种子,且 3 次重复结果一致;而对于同一个样品 real-time PCR 未能得到 3 次重复一致的阳性结果。但对不同粒数比的带菌种子,real-time PCR 对样本量为 500 粒的检出效果明显好于样本量为 100 粒的检测结果,尤其是可稳定检测样品中 5 粒以上的携带西瓜嗜酸菌的西瓜种子。

甜瓜样品与西瓜样品的检测结果不同,样本量为 100 粒和 500 粒时,real-time PCR 可以稳定检测出带菌率为 1% 或 0.2% 西瓜嗜酸菌或丁香假单胞菌带菌种子,检出率明显高于西瓜样品。当检测样品中携带丁香假单胞菌与西瓜嗜酸菌种子粒数比大于 5:1 时,也可稳定检测到人工添加 1 粒携带西瓜嗜酸菌种子的靶标信号;但当携带西瓜嗜酸菌与丁香假单胞菌种子粒数比例大于 5:1 时,real-time PCR 未能每次都检测到人工添加 1 粒携带丁香假单胞菌种子的靶标信号,但 ddPCR 可以稳定检测到靶标信号。

两种方法在检出浓度上也有明显差异,ddPCR 检测的阳性微滴数量会随着添加的带菌种子数量增加而增加,但是 real-time PCR 的扩增效果会受到其他因素的干扰,检出浓度明显低于预期,例如 real-time PCR 检测 100 粒西瓜种子含 1 粒和 10 粒携带西瓜嗜酸菌种子时,含 10 粒的  $C_t$  值大于含 1 粒的  $C_t$  值,而 ddPCR 的定量检测的拷贝数随着样品中添加带菌种子量不同而呈现相对应的增减变化。

### 3 讨论

本研究首次应用 ddPCR 技术同时检测瓜类种子上携带的西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌两种重要种传病原菌。ddPCR 可同时检测到两种病原菌的 DNA 浓度和菌悬液浓度分别为  $10^{-3}$  ng/ $\mu$ L 和  $10^3$  cfu/mL,是 real-time PCR 最低检测限的 10 倍,并可从带菌率为 0.2% 的种子样品中检测到靶标菌。

细菌性果斑病和角斑病在瓜类作物上常常伴随发生,且危害严重。已有报道在新疆发病哈密瓜上同时分离到细菌性角斑病菌与西瓜嗜酸菌<sup>[23]</sup>。对新疆哈密瓜病瓜种子进行出苗检测表明,种子发病率最高达到 80%,其中果斑病菌占 70%,角斑病菌占 30%;种子分离检测结果显示,种皮的带菌率远远高于种仁带菌率<sup>[24]</sup>。2016 年李亚利等从甘肃、新疆两地收集的具有细菌性果斑病症状的西、甜瓜病样中分离鉴定得到了细菌性角斑病菌<sup>[25]</sup>。两种病害发病症状相似,不能仅通过症状进行判断,而且两种病原菌都可以通过种子带菌进行远距离传播,并成为初侵染源,所以从源头上对这两种病原菌进行检测是病害防控的关键环节。目前国内外针对这两种病原菌有多种检测方法的相关报道。徐瑞等<sup>[26]</sup>应用锁式探针结合斑点杂交技术对甜瓜果斑病菌进行检测,并且通过提取人工接菌种子的 DNA,检测限可达到 0.1% (1/1 000)。宋蕤等<sup>[27]</sup>利用免疫吸附富集结合 PCR 方法对西瓜果斑病进行检测,可提高种子浸提液检测限至 600 cfu/mL。但以上技术操作过程繁琐,耗时长。而应用 ddPCR 检测技术可直接对种子浸提液进行检测,是一种快速、精确的检测方法。

利用一种检测技术同时检测多个靶标,既可节省检测成本和时间,也可更加全面防控病害的发生。应用多重 PCR 扩增结合可视芯片技术,可同时检测包含瓜类果斑病菌和角斑病菌在内的 6 种瓜类种传细菌,检测灵敏度平均可达到  $10^3 \sim 10^4$  cfu/mL,同时对人工接菌种子浸提液的 DNA 的检测灵敏度达到  $10^4$  cfu<sup>[28]</sup>。本文中应用 ddPCR 技术同时检测两个靶标,理论上 ddPCR 也可实现同时对 5 个靶标的检测,多个靶标的同步检测是种子健康检测的发展趋势。

实际生产中,两种菌种子携带比例可能会相差比较大。本研究发现:当种子带菌携带两种细菌比例为 1:10 时,ddPCR 仍可准确检出两个靶标菌;而 real-time PCR 技术对种子样品中低浓度靶标的检出率不稳定,其中甜瓜样品的检出率明显高于西瓜样品,500 粒的西瓜样品检出率高于 100 粒西瓜样品。主要原因可能为甜瓜种子表面光滑,不易携带杂质,而西瓜种子多为黑色种皮且表面粗糙,易夹带杂质。检测过程中西瓜种子浸提液为黑棕色,以杂

质含量高的种子浸提液作为模板,对 real-time PCR 反应可产生抑制作用并对荧光信号检测造成一定干扰。此外,使用均质器对 500 粒西瓜种子样品拍打时幅度和剧烈程度明显低于 100 粒种子样品,500 粒种子浸提液中色素、杂质含量相对 100 粒的样品反而更低,从而造成了 real-time PCR 检测 500 粒的西瓜样品的检出率优于 100 粒西瓜样品。ddPCR 的检出效果未受到以上因素的干扰,且阳性微滴数量与带菌种子添加比例呈正相关。此外,real-time PCR 检测的  $C_t$  值在 35 左右时,很难对样品进行判定,当样品中靶标浓度接近 real-time 检测限时,应用 ddPCR 可以得出准确且稳定的检测结果。

从种子样品制备到浸提液过滤及最终离心收集,每一步操作都可能损失一定量靶标菌,因此检测靶标菌的定量结果与实际添加量有所差异。相比于 real-time PCR,ddPCR 的定量检测结果更接近于实际添加量,即 ddPCR 检测技术的定量结果更加具有可信度。ddPCR 技术利用数万个油包水的微滴将完整的细菌细胞直接包裹,每个微滴进行独立的 PCR 扩增,然后读取单个微滴荧光信号,既加强对微量靶标的检测,又减弱了杂质对 PCR 扩增体系的干扰<sup>[15,19]</sup>。real-time PCR 直接进行 PCR 扩增并读取整体荧光信号,微弱荧光信号不易判定,不能避免其他干扰因子对扩增效率的影响。

综上所述,采用 ddPCR 方法同时检测种子携带的西瓜嗜酸菌和丁香假单胞菌两种致病菌,其应用优势在于提高种子带菌检测灵敏性与稳定性,尤其在两种病菌比例差异较大的情况下,可避免对微量靶标菌的漏检。但是 ddPCR 的检测成本比 real-time PCR 高,需要特定的耗材和仪器,更适合用于对重要种子样品的高灵敏度检测,以及对检疫性病害把控严格的科研机构或口岸检疫部门等。

## 参考文献

[1] 刘勇,李凡,李月月,等. 侵染我国主要蔬菜作物的病毒种类、分布与发生趋势[J]. 中国农业科学, 2019, 52(2): 55-77.

[2] 雷仲仁. 病虫害生物防治是实现蔬菜安全生产的主要途径[J]. 中国农业科学, 2016, 49(15): 2932-2934.

[3] 刘美,刘莉铭,吴会杰,等. VIGS 技术的研究进展及其在葫芦科作物中的应用[J]. 果树学报, 2018, 35(11): 116-123.

[4] 郑棚峻,张宇,张松柏,等. 葫芦科作物重要种传病毒研究进展[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(3): 5-9.

[5] 王吉明,尚建立,李娜,等. 我国西瓜甜瓜种质资源收集、保存与利用研究进展[J]. 中国瓜菜, 2018, 31(2): 1-6.

[6] 庞荣丽,吴斯洋,郭琳琳,等. 我国西瓜甜瓜质量安全标准现状及存在问题和建议[J]. 中国瓜菜, 2019, 32(6): 1-8.

[7] 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.

[8] 孔维文,李云龙,王敬琦,等. 黄瓜细菌性角斑病 PMA-qPCR 检测方法的建立和应用[J]. 生物技术通报, 2016, 32(2): 76-81.

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

[10] WALCOTT R R, FESSEHAIE A, CASTRO A C. Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit hosts [J]. Journal of Phytopathology, 2004, 152(5): 277-285.

[11] 赵廷昌,孙福在,王兵万. 西瓜细菌性果斑病研究进展[J]. 中国植保导刊, 2001, 21(3): 37-38.

[12] 李亚利,贾迎春,蒲崇建,等. 甜瓜细菌性叶斑病菌(*Pseudomonas syringae* Pv. *lachrymans*) 寄主范围测定[J]. 甘肃农业大学学报, 2006, 41(6): 63-66.

[13] 霍亚云,张永江,李为民,等. 黄瓜细菌性角斑病菌交叉引物恒温扩增检测技术[J]. 植物检疫, 2017, 31(5): 44-47.

[14] 张昕,李国英,任毓忠,等. 新疆哈密瓜上两种病原菌比较鉴定及其田间消长动态的研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(7): 888-893.

[15] 詹成,王群,燕丽,等. 数字 PCR 技术的发展和应[J]. 复旦学报(医学版), 2015, 42(6): 786-789.

[16] 原霖,訾占超,亢文华,等. 猪圆环病毒 1 型微滴数字 PCR 定量检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(11): 2043-2047.

[17] 周巍,李月华,孙勇,等. 微滴式数字 PCR 技术定量检测发酵乳中金黄色葡萄球菌[J]. 食品科学, 2017(16): 293-297.

[18] DREO T, PIRC M, RAMŠAK Ž, et al. Optimising droplet digital PCR analysis approaches for detection and quantification of bacteria: a case study of fire blight and potato brown rot [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(26): 6513-6528.

[19] ZHAO Yunun, XIA Qingyan, YIN Youping, et al. Comparison of droplet digital PCR and quantitative PCR assays for quantitative detection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* [J/OL]. PLoS ONE, 2016, 11(7): e0159004. DOI: 10.1371/journal.pone.0159004.

[20] WANG Xiaofu, TANG Ting, MIAO Qingmei, et al. Detection of transgenic rice line TT51-1 in processed foods using conventional PCR, real-time PCR, and droplet digital PCR [J]. Food Control, 2019, 98: 380-388.

期为 3.49~4.35 d,不同年份对氟唑菌酰胺消解半衰期无明显影响。

表 3 氟唑菌酰胺在麦穗中的消解动态

Table 3 Digestion dynamics of pydiflumetofen in wheat spikes

年份 Year	施药次 数/次 Application times	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	半衰期/d Half-life
2017	1	$y=0.7415e^{-0.120x}$	0.975 1	3.29
	2	$y=0.7931e^{-0.106x}$	0.954 6	4.35
2018	1	$y=0.8175e^{-0.156x}$	0.946 5	3.22
	2	$y=0.9116e^{-0.172x}$	0.901 3	3.49

收获的麦穗中,2017年和2018年施药1次氟唑菌酰胺含量分别为0.98 μg/g和0.62 μg/g,施药2次分别为2.66 μg/g和0.89 μg/g,而2年试验收获的麦穗脱壳后,麦粒中氟唑菌酰胺含量均约为0.12 μg/g,说明氟唑菌酰胺大部分集中于麦穗表皮,本试验收获的麦粒中氟唑菌酰胺含量均未超过美国规定的最大残留限量。

### 3 结论

本文采用超声提取,对提取溶剂、温度、液固比3个主要提取条件进行优化,建立了氟唑菌酰胺在麦穗中的液相色谱串联质谱分析方法,该方法适合不同时期麦穗中氟唑菌酰胺的提取和检测,方法的灵敏度、准确度和回收率均符合农药残留检测要求。2017年和2018年两年在江苏句容消解动态试验表明,氟唑菌酰胺在麦穗中消解速率较快,属于易降解农药( $T_{1/2} < 30$  d),收获后麦粒残留量约为0.12 μg/g,低于美国规定的氟唑菌酰胺在小麦上的最大残留限量(0.3 μg/g)。

(责任编辑:杨明丽)

(上接 163 页)

[21] TIAN Qian, FENG Jianjun, HU Jie, et al. Selective detection of viable seed-borne *Acidovorax citrulli* by real-time PCR with propidium monoazide [J/OL]. Scientific Reports, 2016, 6: 35457. DOI: 10.1038/srep35457.

[22] 全国植物检疫标准化技术委员会. 黄瓜细菌性角斑病菌检疫鉴定方法: GB/T 36853-2018 [S]. 北京: 北京标准出版社.

[23] 张昕, 李国英, 金潜, 等. 新疆哈密瓜细菌性病害病原菌研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 2002(1): 1-3.

[24] 任毓忠, 李晖, 李国英, 等. 哈密瓜种子带细菌性果斑病菌检测技术的研究[J]. 植物检疫, 2004, 18(2): 3-6.

### 参考文献

[1] HOU Yiping, MAO Xuewei, WANG Jianxin, et al. Sensitivity of *Fusarium asiaticum* to a novel succinate dehydrogenase inhibitor fungicide pydiflumetofen [J]. Crop Protection, 2017, 96: 237-244.

[2] 邓红霞, 钱跃言. 新型杀菌剂氟唑菌酰胺研究进展[J]. 浙江化工, 2017, 48(11): 35-37.

[3] 向礼波, 杨立军, 薛敏峰, 等. 禾谷镰孢菌对氟唑菌酰胺敏感性基线的建立及药剂田间防效[J]. 农药学报, 2018(4): 445-451.

[4] 仇是胜, 柏亚罗. 琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂的研发进展(II)[J]. 现代农药, 2015(1): 1-7.

[5] 陆小成, 杨玲军. 不同药剂防治小麦赤霉病药效试验研究[J]. 现代农村科技, 2014, 61(14): 52-53.

[6] 潘燕, 孔祥英, 秦吉洋, 等. 不同药剂防治小麦赤霉病试验研究[J]. 上海农业科技, 2019(3): 119-122.

[7] 顾林玲. 先正达新杀菌剂 Miravis Top 在阿根廷上市[J]. 现代农药, 2018(1): 36.

[8] 顾林玲. 先正达杀菌剂 Miravis(氟唑菌酰胺)将获得澳大利亚登记[J]. 现代农药, 2018(2): 11.

[9] 中国农药网, 美国修订三环唑和氟唑菌酰胺在多种食品中的残留限量[EB/OL]. (2019-08-14)[2019-12-15]. <http://nongyao.jinnong.cn/n/2019/08/14/5851905476.shtml>.

[10] 智沈伟, 李兴海, 赵尔成, 等. 分散固相萃取-分散液液微萃取/高效液相色谱法测定西瓜中氟唑菌酰胺残留[J]. 分析测试学报, 2017, 36(10): 107-110.

[11] 李景壮, 吴进龙, 郭海霞, 等. 氟唑菌酰胺悬浮剂高效液相色谱分析方法研究[J]. 农药科学与管理, 2015, 36(S1): 20-22.

[12] 邵婷, 刘昕, 黎重阳, 等. 超声波辅助高效提取辣木籽中的蛋白质[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(9): 207-213.

[13] 王辰, 高玲. 超声波辅助提取葛根黄酮的工艺研究[J]. 长江大学学报(自然科学版)农学卷, 2009, 6(4): 61-64.

[14] 常妮妮, 王亚岚, 李玲. 酸木瓜总黄酮提取工艺的优化[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(17): 52-57.

(责任编辑:杨明丽)

[25] 李亚利, 贾迎春, 蒲崇建, 等. 采用 16S rDNA 鉴定甜瓜细菌性叶斑病菌 [J]. 植物保护, 2007, 33(3): 65-68.

[26] 徐瑞, 胡白石, 田艳丽, 等. 应用锁式探针结合斑点杂交技术检测甜瓜细菌性叶斑病[J]. 中国农业科学, 2017, 50(4): 679-688.

[27] 宋蕊, 刘箐, 刘雅莉, 等. 西瓜细菌性果斑病菌快速免疫 PCR 检测[J]. 植物检疫, 2009, 23(2): 9-11.

[28] 张靓, 田茜, 刘凤权, 等. 六种重要瓜类种传细菌可视基因芯片筛查方法研究[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(1): 120-126.

(责任编辑:杨明丽)