

实验方法与技术

Experimental Method & Technology

PMA-PCR 方法快速检测 VBNC 状态青枯菌

于小龙^{1,2}, 徐进², 张昊², 许景升²,
黄雯², 胡晓梅², 冯洁^{2*}, 王学利^{1*}

(1. 天津农学院园艺园林学院, 天津 300384; 2. 中国农业科学院植物保护研究所,
植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 青枯菌为应对逆境胁迫, 可进入活的但非可培养状态(viable but non-culturable, VBNC)。本文利用叠氮溴化丙锭(PMA)与 PCR 技术相结合, 建立了一种快速有效区分青枯菌死活细胞的分子检测方法。基于 *hrcS* 基因序列, 设计了一对青枯菌种特异性检测引物 *hrcSf/hrcSr*; 利用 PMA 对青枯菌 Po82 菌株的细胞悬浮液样品进行预处理, 随后进行常规 PCR 扩增。结果表明, 当样品中 PMA 质量浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、曝光时间大于 5 min 时, PMA 可有效抑制死亡菌体细胞中的 DNA 扩增; 且对可培养和 VBNC 状态细胞中的 DNA 扩增没有影响; 本试验建立的 PMA-PCR 方法能有效对包括 VBNC 状态在内的青枯菌活菌进行检测, 避免了假阳性与假阴性结果的产生。

关键词 青枯菌; 叠氮溴化丙锭; 活的非可培养状态

中图分类号: S 436.411 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.01.026

Rapid detection of viable but non-culturable (VBNC)

Ralstonia solanacearum by PMA-PCR method

Yu Xiaolong^{1,2}, Xu Jin², Zhang Hao², Xu Jingsheng², Huang Wen²,
Hu Xiaomei², Feng Jie², Wang Xueli¹

(1. College of Horticulture and Landscape, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;
2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory for
Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Beijing 100193, China)

Abstract *Ralstonia solanacearum* can enter into the VBNC state (viable but non-culturable) in response to adverse environmental conditions. A novel method to differentiate viable/dead cells of *R. solanacearum* was established by using a DNA dye of propidium monoazide (PMA) in combination with the polymerase chain reaction (PMA-PCR). On the basis of *hrcS* gene sequence, a species-specific primer set *hrcSf/hrcSr* was designed for detection of *R. solanacearum*. Samples were pre-treated with PMA which bound DNA from dead cells so that only viable cells can be amplified by PCR. A final concentration of 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMA and 5-min exposure time was found to completely inhibit PCR amplification from DNA of dead cells, and had no inhibition effect on viable and viable but non-culturable (VBNC) cells. The PMA-PCR method established in this work can detect viable and viable but non-culturable (VBNC) cells and avoid false positive and false negation result of *R. solanacearum*.

Key words *Ralstonia solanacearum*; propidium monoazide; viable but non-culturable

茄科雷尔氏菌 [*Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi et al. 1996] 简称青枯菌, 引起植物细菌性青枯病。青枯菌可以侵染 54 个科, 超过 450 种

寄主植物, 包括马铃薯、香蕉、番茄、烟草、豇豆、花生、腰果、木瓜、油橄榄和生姜等诸多重要粮食及经济作物^[1]。在我国, 青枯病自 20 世纪 30 年代首次于长

江中下游地区被报道以来,目前已向南扩散至 20°N 的海南省、向北扩散至 42°N 河北坝上地区^[2],成为我国农业生产上的重要限制因子。

作为研究寄主植物与病原细菌互作的模式系统之一,青枯菌毒力调控网络及致病分子机理等方面的研究已取得了长足的进展。但作为土壤习居菌,青枯菌于土壤及水体环境中生态流行病学研究领域的工作则相对滞后。一种观点认为青枯菌利用植物残体降解后产生的芳香族化合物作为营养代谢底物,从而得以在土壤中长期存活^[3];另一种观点则认为青枯菌,特别是 3 号小种,在土壤环境中可进入活的非可培养状态(viable but non-culturable VBNC),并于该状态下长期存活^[4]。VBNC 状态是细菌为应对极端温度、渗透压、寡营养和重金属等逆境胁迫而普遍采用的一种生存策略。1982 年,VBNC 状态细菌首次被报道。目前已知 85 种细菌存在 VBNC 状态,其中仅有 5 种植物相关细菌,分别为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescense*)、地毯草黄单胞菌柑橘致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)、大豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)^[5]、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)和茄科雷尔氏菌(*R. solanacearum*)^[6-8]。

由于进入 VBNC 状态的细菌无法采用常规平板划线技术培养,故而造成 VBNC 状态细菌的假阴性检测结果,致使以该状态存在的细菌成为隐性初侵染源,进而对公共卫生安全、粮食安全以及食品安全构成潜在的威胁。目前常用于 VBNC 状态细菌检测的方法分别基于显微光学、免疫学以及分子检测技术^[8]。PMA-PCR 和 EMA-PCR 是近年来基于常规 PCR 技术发展起来用于 VBNC 状态细菌的检测方法。这两种方法克服了常规 PCR 无法区分活体细菌与死亡菌体释放出的游离 DNA 的缺陷,可有效避免假阳性检测结果。

叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)与溴化乙锭单叠氮溴(ethidium monoazide bromide, EMA)是光敏 DNA 染料,无法透过拥有完整结构的细胞膜,只能修饰细胞死亡后暴露出来的 DNA,并与之形成稳定的共价氮碳键,从而阻断 DNA 分子的聚合酶链式反应,在强光照射下剩余的 PMA 和 EMA 与水分子反应生成没有活性的羟胺^[9]。PMA 与 EMA 较其他方法更快捷,并且能与 PCR 结合,达到快速检测的目的,但由于溴化乙锭单叠氮溴(EMA)具有细胞毒

性^[10]并且其检测上限为 10⁸ cfu/mL^[11],故本试验选用 PMA 为光敏 DNA 染料。

本研究以用常规方法难以检测的 VBNC 状态青枯菌为切入点,旨在建立 VBNC 状态青枯菌的快速分子检测技术体系,藉此为植物繁殖材料的带菌检测与防控策略的效果评价提供技术支持,并为进一步深入解析青枯菌生态流行病学规律奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及培养方法:本研究使用的青枯菌菌株与环境菌株材料均来自本实验室,详见表 1。

表 1 特异性验证所用青枯菌菌株

Table 1 *Ralstonia solanacearum* strains used in this study

编号 No.	菌株 Strain	小种编号 Race	编号 No.	菌株 Strain	小种编号 Race
1	Sn1	1	29	Tm1	3
2	4-2-1	1	30	Tm2	3
3	桂苦	1	31	Tm3	3
4	Bd1	1	32	Tm4	3
5	4-2-2	1	33	Tm5	3
6	2-2-1	1	34	Tm6	3
7	5-2-1	1	35	Tm10	3
8	R92	1	36	PoYN3-2-2	3
9	梭青	1	37	PoYN4-2-1	3
10	5-2-2	1	38	PoYN5-4-1	3
11	±1-1-1	1	39	Tb23	3
12	SP11	1	40	Tb43	3
13	3-2-2	1	41	重 1-1	4
14	桂	1	42	重 2-1	4
15	GMI1000	1	43	重 3-1	4
16	Po82	2	44	重 5-1	4
17	R74	2	45	Z-Aq-2	4
18	R291	2	46	桐永 16	5
19	R9	2	47	桐永 7b	5
20	R419	2	48	临 3e	5
21	R236	2	49	临 2b	5
22	R304	2	50	临安 4e	5
23	17	2	51	临安桑	5
24	R286	2	52	Z14	5
25	R457	2	53	甘露醇雷尔氏菌 (<i>Ralstonia mannitolilytica</i>)	环境 菌株
26	R264	2	54	肠杆菌 (<i>Enterobacter</i> sp.)	环境 菌株
27	R454	2	55	金黄杆菌 (<i>Chryseobacterium</i> sp.)	环境 菌株
28	R96	2			

参试菌株均采用 NA 平板于 28℃ 条件下培养, 培养基配方如下: 葡萄糖 10 g、多聚蛋白胨 5 g、牛肉膏 3 g、酵母提取物 0.5 g、琼脂 18 g, 调 pH 至 7.0。定容至 1 L, 121℃ 灭菌 20 min。

试剂和耗材: 叠氮溴化丙锭(propidium monoazide)(Biotium Cat. No. 40013)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒(BioTeke Cat. No. DP2002)、Marker I (Bing Da)、PCR 仪(Applied Biosystems)、Advantage 2 Polymerase Mix(Cat. No. 639201); 其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 青枯菌死菌悬浮液的制备

分别挑取室温条件下保存于灭菌去离子水中的各供试菌株, 于红四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TZC)培养平板上画线, 30℃ 条件下培养 48 h 后, 挑取典型的青枯菌野生型菌落, 转至普通 NA 培养平板, 30℃ 条件下培养 48 h。采用比浊法, 挑取各纯培养物, 分别于灭菌去离子水中配制成浓度为 3×10^8 cfu/mL 的细菌悬浮液, 100℃ 水浴处理 10 min, 获得青枯菌死菌细胞悬浮液。并于 NA 平板上画线, 验证致死效果后备用。

1.2.2 PCR 引物设计

根据 GenBank 中登录的青枯菌 Po82 菌株的 *hrcS* 基因核苷酸序列(NC_017575.1 1330556-1330816), 利用 NCBI 在线引物设计软件 PrimerBLAST 进行青枯菌种特异性引物设计, 交由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.3 PCR 扩增条件

根据预试验, 确立反应体系。25 μ L 体系中包括 PCR Mix 10 μ L, *hrcSf* (0.099 nmol/ μ L) 1 μ L, *hrcSr* (0.106 nmol/ μ L) 1 μ L, 样品 1 μ L, ddH₂O 12 μ L。

PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 59℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.2.4 PCR 特异性试验

分别以 52 个青枯菌菌株和 3 个参照环境菌株 DNA 为扩增模板, 用特异性引物 *hrcSf/hrcSr* 进行 PCR 扩增, 扩增体系及程序同 1.2.3, 以灭菌去离子水为阴性对照, 扩增产物用 2.0% 琼脂凝胶电泳检测, 观察结果。

1.2.5 引物扩增灵敏度

用核酸浓度测定仪(Gene 公司, NanoVue plus)测定所提取的 Po82 基因组 DNA 浓度, 并 10 倍梯度依次稀释为 25 ng/ μ L、2.5 ng/ μ L、250 pg/ μ L、25 pg/ μ L、2.5 pg/ μ L; 按 1.2.1 方法制备浓度为 3×10^8 cfu/mL 的 Po82 菌悬液, 10 倍梯度稀释至 3×10^1 cfu/mL。利用特异性引物 *hrcSf/hrcSr*, 按 1.2.3 的反应体系和程序分别对梯度稀释的 Po82 基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 观察结果。

1.2.6 样品的 PMA 处理方法

PMA 溶液于 -20℃ 避光保存。取 500 μ L 制备好的菌悬液置于 1.5 mL 离心管中, 加入 2 μ L 浓度为 1 mg/mL 的 PMA 溶液, 使 PMA 的终浓度为 4 μ g/mL; PMA 与菌悬液混合均匀后在室温条件下避光放置 5 min, 利用 500 W 的卤素灯曝光 5 min, 光照交联时样品置于冰上(避免过热), 且在距光源 50 cm 处; 交联后的悬浮液 1 000 g 离心 5 min, 所得沉淀溶于 500 μ L 无菌水中。

1.2.7 青枯菌 VBNC 状态的诱导

高温处理: 将 1 mL 3×10^8 cfu/mL 的菌悬液分别以 50、52、54、56、58、60、62、64 和 66℃ 处理 30 min 后, 分别取 1 μ L 涂布于 NA 平板, 48 h 后查看菌落数。

确定青枯菌进入 VBNC 状态后, 采用 PMA-PCR 进行检测, 对照组为同浓度的青枯菌死菌和可培养状态的活菌。

2 结果与分析

2.1 特异性引物设计

基于我们早期发表的 Po82 全基因组序列中 *hrcS* 基因, 设计了 12 对引物, 从中筛选获得了一对特异性引物(*hrcSf/hrcSr*) (表 2), 可扩增获得大小为 246 bp 的目的片段。

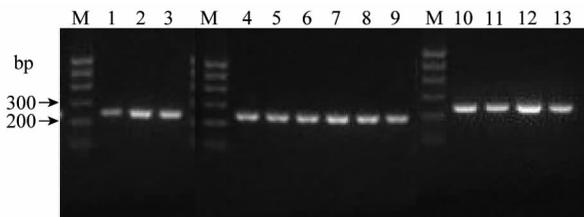
表 2 青枯菌 *hrcS* 基因 PCR 扩增引物序列

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequence
<i>hrcSf</i>	GGACTACGACAACATCAGCG
<i>hrcSr</i>	GTCTGCATGATCGAGTTGGC

2.2 PCR 条件的确立

在反应体系中分别加入 7.5、10、12.5 μ L PCR Mix, 扩增条带无明显差异; 不同退火温度: 56、57、

58、59、60、61 °C 所产生的扩增条带无明显差异;引物含量分别为 0.6、0.8、1.0、1.2 μL 所得到的扩增条带也无明显差异(图 1);由此拟定 25 μL 反应体系组成为: PCR Mix 10 μL 、上下游引物各 1 μL 、样品 1 μL 、dd H₂O 12 μL 、退火温度 59 °C。



M: DNA marker I; 1-3: PCR mix 添加量为 7.5、10、12.5 μL ; 4-9: 退火温度为 56、57、58、59、60、61 °C; 10-13: hrcSf/hrcSr 添加量为 0.6、0.8、1.0、1.2 μL

M: DNA marker I; 1-3: PCR mix content: 7.5, 10, 12.5 μL ; 4-9: Annealing temperature: 56, 57, 58, 59, 60, 61 °C; 10-13: hrcSf/hrcSr content: 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 μL

图 1 引物 hrcSf/hrcSr PCR 条件验证结果

Fig. 1 PCR conditions validation with primers hrcSf/hrcSr

2.3 PCR 特异性与灵敏度验证

2.3.1 特异性验证

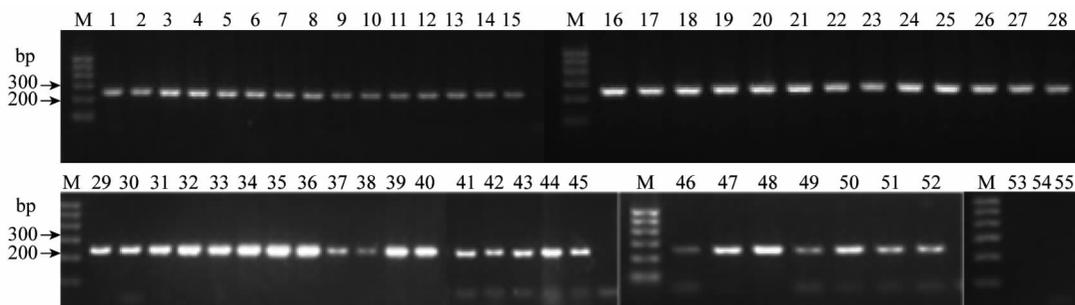
以 55 个参试菌株的 DNA 为模板(表 1),采用特异性引物 hrcSf/hrcSr 进行 PCR 扩增。结果显示,所有青枯菌 DNA 均能扩增出 246 bp 左右的单一特异性条带,与预期结果一致。而甘露醇雷尔氏菌、肠杆菌和金黄杆菌等对照细菌则未产生扩增条带(图 2)。

2.3.2 灵敏度验证

以特异性引物 hrcSf/hrcSr 分别对不同浓度梯度的 Po82 基因组 DNA 与菌悬液进行扩增,设置无菌水为模板的阴性对照,结果显示:最低 DNA 和菌体悬浮液的检测浓度分别为 25 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 和 3×10^3 cfu/mL(图 3)。

2.4 高温胁迫诱导青枯菌进入 VBNC 状态

如表 3 所示,菌悬液经 52 °C 以上的高温处理 30 min 后,按常规方法涂板培养,其菌落计数为 0。表明处理后的青枯病菌进入了 VBNC 状态,将样品室温静置 35 d 后,所有样品恢复可培养状态。

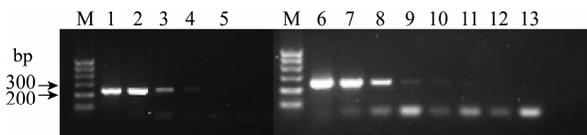


M: DNA marker I; 1-55: 与表 1 菌株编号一致

M: DNA marker I; 1-55: Strains as indicated in table 1

图 2 引物 hrcSf/hrcSr 特异性验证结果

Fig. 2 Specificity of the primer set hrcSf/hrcSr for detection of *Ralstonia solanacearum*



M: DNA marker I; 1-5: DNA 浓度为 25 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、2.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、250 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 、25 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 、2.5 $\text{pg}/\mu\text{L}$; 6-13: 菌液浓度为 3×10^8 、 3×10^7 、 3×10^6 、 3×10^5 、 3×10^4 、 3×10^3 、 3×10^2 、 3×10 cfu/mL

M: DNA marker I; 1-5: DNA concentration: 25 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、2.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、250 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 、25 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 、2.5 $\text{pg}/\mu\text{L}$; 6-13: Bacteria concentration: 3×10^8 、 3×10^7 、 3×10^6 、 3×10^5 、 3×10^4 、 3×10^3 、 3×10^2 、 3×10 cfu/mL

图 3 引物 hrcSf/hrcSr 灵敏度验证结果

Fig. 3 Sensitivity of the primer set hrcSf/hrcSr for detection of cell suspension and total DNA of *Ralstonia solanacearum*

2.5 处于 VBNC 状态青枯菌的 PMA-PCR 检测

对进入 VBNC 状态的菌悬液进行 PMA-PCR

检测,结果显示(图 4),经过 PMA 预处理的样品 1~9 产生特异性扩增条带,而灭活组 11 则无特异性条带,表明 PMA-PCR 能检测处于 VBNC 状态的青枯病菌,并有效避免了常规平板计数法检测出现的假阴性结果。

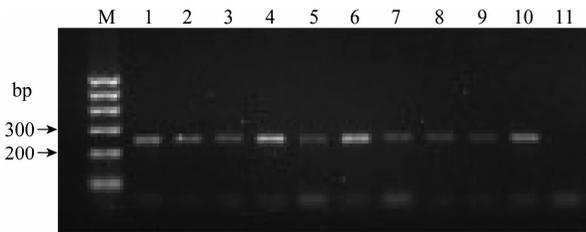
2.6 PMA-PCR 检测方法的假阳性验证

为验证 PMA-PCR 是否产生假阳性检测结果,分别采用常规平板计数、PCR 与 PMA-PCR 对 3 组死菌样品进行检测。结果(表 4)表明,常规 PCR 能以死菌 DNA 作为模板正常扩增,检测结果均为阳性;而 PMA-PCR 仅以活菌为检测靶标,未出现假阳性检测结果(图 5),平板计数进一步验证了 PMA-PCR 的可靠性。

表 3 不同温度处理后青枯菌 Po82 涂板计数结果

Table 3 Colony number of bacterial suspensions of *Ralstonia solanacearum* strain Po82 treated by different temperatures

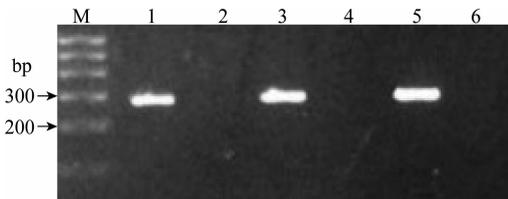
水浴温度/℃ Temperature of water bath	菌落数/cfu Number of colony
CK	1 000+
50	32
52	0
54	0
56	0
58	0
60	0
62	0
64	0
66	0



M: DNA marker I; 1~11: 50、52、54、56、58、60、62、64、66 °C、活菌对照、死菌对照
M: DNA marker I; 1~11: 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66 °C, live bacteria, dead bacteria

图 4 不同温度处理样品 PMA-PCR 扩增结果

Fig. 4 PMA-PCR products of bacterial suspensions of *Ralstonia solanacearum* strain Po82 treated by different temperatures



M: DNA marker I; 1~6: PCR (3×10^6 cfu/mL), PMA-PCR (3×10^6 cfu/mL), PCR (3×10^7 cfu/mL), PMA-PCR (3×10^7 cfu/mL), PCR (3×10^8 cfu/mL), PMA-PCR (3×10^8 cfu/mL)

图 5 死菌样品 PCR 与 PMA-PCR 扩增结果

Fig. 5 Comparison of PCR and PMA-PCR for detection of dilution series of dead *Ralstonia solanacearum* cells

表 4 常规平板培养计数法、常规 PCR 法、PMA-PCR 测定灭活青枯菌的比较

Table 4 Comparison of plate counting, PCR and PMA-PCR for detection of dead *Ralstonia solanacearum* cells

菌液浓度/ cfu · mL ⁻¹ Concentration	平板计数/cfu Plate counting	常规 PCR Polymerase chain reaction	PMA-PCR PMA-polymerase chain reaction
3×10^6	0	阳性	阴性
3×10^7	0	阳性	阴性
3×10^8	0	阳性	阴性

3 讨论

VBNC 状态是细菌特有的逆境生理生态响应机制,该状态下的细菌具有完整细胞结构、维持低水平呼吸与代谢速率、保持高 ATP 等级,且基因转录表达以及蛋白翻译合成均发生了相应改变,并可于适当条件下恢复可培养状态。VBNC 状态的细菌与环境监测,食品加工和检测技术以及疾病控制等诸多领域均密切相关,且目前对细菌可培养与 VBNC 两者状态之间相互转换的分子调控机理尚不清楚,因此研究 VBNC 状态的细菌对于了解细菌的致病机理及生态适应性至关重要^[12-14]。

Grey 等 2001 年首次报道了采用铜制剂诱导青枯菌进入 VBNC 状态^[8]。本研究尝试了采用高温胁迫诱导青枯菌 2 号小种 Po82 菌株快速进入 VBNC 状态,并使用常规平板培养与 PMA-PCR 结合验证其是否被成功诱导进入 VBNC 状态。初步试验结果显示 52 °C 及以上温度可成功诱导 Po82 进入 VBNC 状态,68 °C 为青枯菌的致死温度。去除胁迫后,进入 VBNC 状态的 Po82 菌株可复苏至可培养状态。但随着胁迫温度的升高,复苏时间相应延长:52~56 °C 处理,室温下静置数小时后即可复苏;58~62 °C 处理,2 d 后可复苏;64~66 °C,复苏时间则延长至 35 d。该结果与 Oliver and Bockian 等描述的通过简单温度变化可引起 VBNC 状态细菌复苏基本吻合^[15-16],本研究结果同时提示我们应重新审视澳大利亚政府生物安全官方文件报道的青枯菌致死温度为 52 °C 的结论,以及闷棚、生物熏蒸和 50 °C 温汤浸种等高温物理防治措施能否达到预期的青枯病防治效果^[17-19]。

本研究锚定与致病密切相关的 *hrp* 基因簇中保守基因 *hrcS* 作为青枯菌种水平检测靶标。*hrp* 基因簇广泛存在于植物与动物病原细菌中,其编码产物参与组装形成Ⅲ型分泌系统,并通过该系统直接将Ⅲ型效应子注入寄主细胞,以抑制植(动)物的防御反应。与野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 等植物病原细菌不同,青枯菌的 *hrp* 基因簇是与祖先基因共同进化的核心基因组成员,而非通过基因水平转移获得的致病岛^[20]。细菌自然进化过程中核心基因经受了更大的选择压力,因此

在种水平上具有高度保守性,以此类基因作为检测靶标,比利用基因间隔区序列和未知功能片段更为可靠。

综上所述,本研究建立的 PMA-PCR 检测方法能从混合状态下的纯培养菌中特异性检测出 1×10^3 cfu/mL 的青枯菌活菌,并能够有效区分死细胞和 VBNC 状态的菌体,为处于 VBNC 状态的青枯菌检测提供了更为准确、科学的检测方法,具有一定的实用价值和应用前景。

参考文献

- [1] Schell M A. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network [J]. Annual Review of Phytopathology, 2000, 38: 263 - 292.
- [2] 徐进, 冯洁. 植物青枯菌遗传多样性及致病基因组学研究进展 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(14): 2902 - 2909.
- [3] Genin S, Boucher C. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum* [J]. Annual Review of Phytopathology, 2004, 42: 107 - 134.
- [4] Milling A, Meng Fanhong, Denny T P, et al. Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 [J]. The American Phytopathological Society, 2009, 99(10): 1127 - 1134.
- [5] 蒋娜, 李健强, 罗来鑫. 植物病原细菌的 VBNC 状态研究进展 [J]. 植物病理学报, 2013, 43(3): 249 - 257.
- [6] del Campo R, Russi P, Mara P, et al. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence [J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 298(2): 143 - 148.
- [7] Alexander E, Pham D, Steck T R. The viable but nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(8): 3754 - 3756.
- [8] Grey B E, Steck T R. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 3866 - 3872.
- [9] 潘乐, 孟庆峰, 钱爱东, 等. VBNC 状态细菌检测方法的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(5): 32 - 35.
- [10] Nocker A, Cheung C Y, Camper A K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 67(2): 310 - 320.
- [11] Wang Luxin, Mustapha A. EMA-real-time PCR as a reliable method for detection of viable salmonella in chicken and eggs [J]. Journal of Food Science, 2010, 75(3): M134-M139.
- [12] 熊书, 殷幼平, 王芳, 等. 基于 EMA-qPCR 的茄科青枯菌活体检测技术的建立 [J]. 微生物学通报, 2013, 40(9): 1723 - 1732.
- [13] Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani G P, et al. Current perspectives on viable but nonculturable (VBNC) pathogenic bacteria [J]. Frontiers in Public Health, 2014, 2: 103.
- [14] Trevors J T. Viable but nonculturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells [J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 86(2): 266 - 273.
- [15] Oliver J D. The viable but nonculturable state in bacteria [J]. The Journal of Microbiology, 2005, 43: 93 - 100.
- [16] Oliver J D, Bockian R. *In vivo* resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus* [J]. Applied and Environment Microbiology, 1995, 61(7): 2620 - 2623.
- [17] Biosecurity Australia. Revised draft import risk analysis report for the importation of cavendish bananas from the philippines, part C [R]. Canberra: Biosecurity Australia, 2007.
- [18] Zanón M J, Font M I, Jordá C. Use of tomato crop residues into soil for control of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* [J]. Crop Protection, 2011, 30(9): 1138 - 1143.
- [19] Paret M L. Management of bacterial wilt of ginger (*Zingiber officinale* R.) caused by *Ralstonia solanacearum* with plant essential oils [D]. Hawaii: University of Hawaii, 2009.
- [20] Alfano J R, Collmer A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death [J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(18): 5655 - 5662.

(责任编辑: 杨明丽)