การตรวจหาเชื้อ *Acidovorax citrulli* ด้วยเทคนิค Co-operational polymerase chain reaction เพื่อตรวจรับรองสุขอนามัยของเมล็ดพันธุ์แตงโม

Detection of *Acidovorax citrulli* by Co-operational Polymerase Chain Reaction for Seed Health Testing of Watermelon Seed

ชัญญานุช กอรักงาม[1/, 3/] จุฑาเทพ วัชระไชยคุปต์[1/, 3/] สุจินต์ ภัทรภูวดล[1/, 2/, 3/] วิชัย โฆสิตรัตน[1/, 2/, 3*]

Chanyanut Korakngam[1/, 3/] Jutatape Watcharachaiyakup[1/, 3/], Sujin Patarapuwadol[1/, 2/, 3/]

Wichai Kositratana[1/, 2/, 3*]

ABSTRACT

The bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax citrulli* is a serious pathogen for cucurbits seed production. This bacterium is a seed-borne and seed-transmitted pathogen with long-term survival in seeds. Contaminated seeds are an important source of primary inoculum for the spreading of BFB disease in seed beds. Detection technique for the pathogen which is reliable, effective, sensitive and specic is an important tool for controlling seed quality in both local and international seed trade. The Co-PCR was shown to be effective in detecting *A. citrulli* in the artificially inoculated watermelon seeds by seed soaking. The samples were prepared by filtering the seed soaking liquid using bacterial filtration system then extracted the bacterium DNA from the filtered remain and used as the target DNA. Results indicated that this procedure could detect *A. citrulli* presented at the level of 10^3 CFU/seed in an artificially inoculated watermelon seed stocks which had 0.05% and 0.01% infestation rates. It could also detect the bacterium in naturally infected watermelon seeds.

Key words: *Acidovorax citrulli*, bacterial fruit blotch, Co-PCR, seed detection

[1/] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand.

[2/] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Department of Plant Pathology, Faculty sof Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand.

[3/] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
Center of Excellence on Agriculture Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand.

* Corresponding author : agrwck@ku.ac.th

บทคัดย่อ

โรคผลเน่าของแตงที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial fruit blotch of cucurbits) มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax citrulli* เป็นเชื้อโรคที่สำคัญต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตง เนื่องจากเชื้อสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ (seed borne) และถ่ายทอดโรคผ่านเมล็ดได้ เป็นต้นเหตุการแพร่ระบาดโรคไปยังแหล่งปลูกอื่น ๆ เทคนิคที่มีมาตรฐาน มีความจำเพาะ และความไวในการตรวจหาเชื้อนี้ จึงมีความสำคัญในการใช้เป็นเครื่องมือในระบบรับรองสุขอนามัยของเมล็ดพันธุ์ เพื่อลดแหล่งปฐมภูมิของเชื้อ *A. citrulli* ที่จะไปแพร่กระจายในแหล่งปลูก และให้เป็นไปตามมาตรฐานการส่งออก การศึกษานี้เพื่อประเมินถึงประสิทธิภาพของเทคนิค Co-operational polymerase chain reaction (Co-PCR) ในการตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* ในเมล็ดพันธุ์แตงโม โดยนำน้ำแช่เมล็ดมากรองด้วยแผ่นกรองแบคทีเรียร่วมกับการสกัดดีเอ็นเอ และตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค Co-PCR พบว่า สามารถตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* ในเมล็ดพันธุ์ที่มีการปลูกเชื้อไว้ในอัตราเมล็ดติดเชื้อ 0.05% และ 0.01% ที่มีการปลูกเชื้อในเมล็ดด้วยอัตราต่ำสุดที่ประมาณ 10^3 CFU/เมล็ด และวิธีนี้สามารถใช้ตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* จากเมล็ดแตงโมที่ติดเชื้อในสภาพธรรมชาติได้

คำสำคัญ: *Acidovorax citrulli*, bacterial fruit blotch, Co-PCR, โรคผลเน่าในแตงโม

บทนำ

โรคผลเน่าของแตงโม (bacterial fruit blotch of watermelon) สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax citrulli* (ชื่อเดิม *A. avenae* subsp. *citrulli*) (Schaad *et al.,* 2008) ทำความเสียหายที่รุนแรงต่อการผลิตแตงโมและพืชตระกูลแตงทั่วโลก ทำให้ผลผลิตลดลงถึง 80-100% (CABI, 2018) และมีความสำคัญต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์แตงโม เนื่องจากเชื้อนี้ถ่ายทอดไปกับเมล็ดพันธุ์ มีชีวิตในเมล็ดพันธุ์ได้ยาวนาน (Walcott *et al*., 2003) ในสภาพแวดล้อมที่มีฝนตกหนักและอุณหภูมิสูงจะทำให้เชื้อนี้พัฒนาและแพร่กระจายได้ดี (Schaad *et al.,* 2008) เมล็ดพันธุ์ที่ปนเปื้อนเชื้อเป็นแหล่งเชื้อปฐมภูมิ (primary inoculum) ในการแพร่กระจายเชื้อโรค ปัจจุบันยังไม่มีกรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพในการจัดการกับเชื้อนี้ในเมล็ด (seed treatment) และไม่พบสายพันธุ์แตงโมที่ต้านทานต่อเชื้อ *A. citrulli* ด้วย (Giovanarid *et al*., 2018) ดังนั้น การตรวจรับรองสุขอนามัยของเมล็ดพันธุ์ (seed health testing) เพื่อรับรองว่าเมล็ดพันธุ์ปราศจากเชื้อสาเหตุโรค จึงมีความสำคัญในขั้นต้น ที่จะลดความเสียหายและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อนี้ออกไปในวงกว้าง

มีการศึกษาพบว่า เมล็ดพันธุ์แตงโมที่มีอัตราติดเชื้อ 0.01% จากหนึ่งเมล็ดที่มีเชื้อเพียง 10 หน่วยโคโลนีที่เจริญบนอาหาร (colony forming unit, CFU) สามารถถ่ายทอดโรคจากเมล็ดสู่ต้นกล้าที่ปลูกภายใต้สภาวะโรงเรือนได้ถึง 16.7% ดังนั้น แนวทางในการจัดการโรคที่มีประสิทธิภาพ คือ การใช้เมล็ดพันธุ์ที่ปลอดจากเชื้อ *A. citrulli* (zero tolerance) (Dutta *et al*., 2012) ปัจจุบันวิธีตรวจหาเชื้อโดยการเพาะกล้า (Sweat box grow-out test, SGO) (Koenraadt *et al*., 2005) เป็นวิธีการที่ใช้อย่างแพร่หลาย และใช้เป็นวิธีมาตรฐานโดยหน่วยงาน United State Department of Agriculture, National Seed Health System (USDA-NSHS) ในการตรวจหาเชื้อนี้ (Walcott

et al., 2006) โดยมาตรฐานของ The International Seed Federation (ISHI-Veg, ISF) ให้สุ่มจากกองเมล็ดพันธุ์ (seed lot) อย่างน้อย 10,000 เมล็ดต่อกองเมล็ดพันธุ์ สำหรับการตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* ต่อมา Gitaitis and Walcott (2007) เสนอให้ใช้การสุ่มตรวจเมล็ดถึง 30,000 เมล็ด/ตัวอย่าง จึงจะให้ผลที่เชื่อมั่นทางสถิติที่ 95% ($P = 0.05$) แม้ว่า SGO เป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก แต่ต้องเพาะเมล็ดที่อุณหภูมิ 28 °ซ. ในสภาพที่ให้แสง 16 ชม./วัน เป็นเวลานาน 14-21 วัน ในการตรวจ ซึ่งต้องใช้แรงงานและผู้ประเมินที่มีประสบการณ์ในการตรวจ จึงเป็นข้อจำกัดของวิธีการ SGO นอกจากนี้ ได้มีการพัฒนาวิธีตรวจบนพื้นฐานเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) อีกหลายวิธี เพื่อใช้ตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* แต่ประสิทธิภาพของการตรวจยังไม่เป็นที่ยอมรับของอุตสาหกรรมผลิตเมล็ดพันธุ์ (Walcott *et al*., 2006) เนื่องจากพบว่า ในเมล็ดมีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR (inhibitor) ส่งผลให้การตรวจเมล็ดที่ติดเชื้อให้ปฏิกิริยาเป็นลบ (false negative) (Walcott and Gitaitis, 2000) จึงมีการพัฒนาวิธีการต่าง ๆ เพื่อก้าวข้ามข้อจำกัดดังกล่าว เช่น เทคนิค immunomagnetic separation and PCR (IMS-PCR) ที่สามารถตรวจสอบเมล็ดพันธุ์จากการชักตัวอย่าง (sampling) ขนาด 1,000 เมล็ด ที่มีความไว (sensitive) กว่าเทคนิค PCR ปกติถึง 100 เท่า (Walcott and Gitaitis, 2000) และนอกจากนี้ประสิทธิภาพของการตรวจสุขอนามัยเมล็ดพันธุ์ยังได้รับผลกระทบจากปัจจัยอื่น ๆ เช่น ขนาดของตัวอย่าง (sample size) วิธีการสุ่มตัวอย่าง (sampling method) และประสิทธิภาพการสกัดเชื้อสาเหตุโรคออกจากเมล็ด (Dutta *et al*., 2012) พบว่า การตรวจหาเชื้อที่สกัดออกจากเมล็ดด้วยวิธีการแช่เมล็ดในสารละลาย (seed soaking) มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการสกัดเชื้อโดยบดเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากการแช่เมล็ดจะมีปริมาณสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR ที่ปลดปล่อยออกมาน้อยกว่าจากการบดเมล็ด (Giovanaridi *et at*., 2018)

เทคนิค Co-operational PCR (Co-PCR) พัฒนาเป็นครั้งแรก โดย Olmos *et al*. (2002) ในการตรวจเชื้อไวรัส ปฏิกิริยาเกิดจากไพร์เมอร์สามเส้น โดยไพร์เมอร์หลักสองเส้นทำหน้าที่เหมือนไพร์เมอร์ของ PCR ทั่วไปในการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์เส้นที่ยาว จากนั้นใช้ไพร์เมอร์เสริมอีกหนึ่งเส้น ที่จะใช้ผลิตภัณฑ์เส้นยาวเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์เส้นที่สั้นกว่าเดิม ซึ่งทั้งหมดเกิดในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน ทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีปริมาณมากกว่า PCR ปกติ ต่อมา Caruso *et al*., (2003) นำเทคนิคนี้มาพัฒนาในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และพบว่า มีความไวและจำเพาะในการตรวจสูง โดยตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ที่มีปริมาณต่ำกว่า 1 CFU/ml ที่เติมลงในน้ำ โดยที่มีเชื้ออื่น ๆ ปะปนอยู่ในระดับถึง 10^5 CFU/ml ได้ นอกจากนี้ Capote *et al*. (2009) พบว่า เทคนิค Co-PCR ยังสามารถให้ปฏิกิริยาได้แม้จะมีสารยับยั้งปฏิกิริยา (inhibitor) ปะปนอยู่บ้าง โดยการเจือจางตัวอย่างก่อนการทำปฏิกิริยา การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการใช้เทคนิค Co-PCR ร่วมกับวิธีการสกัดเชื้อ *A. citrulli* ออกจากเมล็ดโดยการแช่เมล็ดในสารละลายเพื่อตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* ในเมล็ดพันธุ์แตงโม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *A. citrulli* สายพันธุ์ Ac-1228 และ Ac-1246 ที่แยกเชื้อได้จากแตงโมที่แสดงอาการ

ของโรคในปี พ.ศ. 2539 จากแปลงปลูก จ.นครราชสีมา และ จ.สกลนคร ตามลำดับ ใช้เป็นเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร และ เชื้อ *A. citrulli* สายพันธุ์อื่น ๆ ได้ จากการเก็บรวบรวมในปี พ.ศ. 2550 และ พ.ศ. 2559 จำนวน 36 สายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นกรรมวิธีควบคุมลบ (negative control) จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียแซบโปร์ไฟต์ (saprophytic bacteria) ที่แยกเชื้อจากส่วนต่าง ๆ ของแตงโม 5 ชนิด เชื้อ *A. cattleyae*, *Burkholderia gladioli* และ *Pseudomonas* sp. ดังแสดงใน Table 1

2. ความจำเพาะของเทคนิค Co-PCR ในการตรวจหาเซลล์แขวนลอยเชื้อ *A. citrulli*

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Table 1) ในอาหาร nutrient broth ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 48 ชม. เตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 (ความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^7CFU/ml) เจือจางเซลล์แขวนลอยเป็นลำดับขั้น 10 เท่า แล้วนำเซลล์แขวนลอยเชื้อที่ลำดับขั้น 10^{-1} ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที และใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Co-PCR ด้วยไพร์เมอร์ Ac-ORF12F (5'-GCATCTTGTTCAG-CCACGAC-3'), Ac-ORF13R (5'-ATTGG-CAATCACCAAGACGC-3') และ Ac-ORF21R (5'-TTATTCTGGGCGTCACCGTC-3') (Kim *et al*., 2015) โดยเตรียมสารสำหรับปฏิกิริยาดังนี้ 1x Phire plant direct PCR master mix (Thermo Scientic, USA) 5 µl, ไพร์เมอร์ Ac-ORF12F 0.2 µM , Ac-ORF13R และ Ac-ORF21R อย่างละ 0.1 µM และดีเอ็นเอ 2 µl ปริมาตรรวมเป็น 10 µl ต่อปฏิกิริยา โปรแกรมทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 98°ซ. เป็นเวลา 5 นาที ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 98°ซ. เป็นเวลา 10 วินาที และอุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และขั้นที่ 3 ที่ อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ Co-PCR ด้วยเทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟริซิส และย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบร์ไมด์ความเข้มข้น 0.5 µg/ml ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ยืนยันความถูกต้องโดยส่งแถบดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ Co-PCR (First BaseLaboratories Sdn.Bhd.,Selangor, Malaysia) และวิเคราะห์ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่ได้กับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST ผ่านเครือข่ายทางอินเตอร์เน็ต (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

Table 1 Bacterial strains used in this study

No.	Bacterial strain		Host	Location	Year
1.	*Acidovorax citrulli*	Ac-1228	Watermelon	Nakhon Ratchasima Province	1996
2.	*Acidovorax citrulli*	Ac-1246	Watermelon	Nakon Nakhon Province	1996
3.	*Acidovorax citrulli*	Ac-BF1-1	Watermelon	Khon Kaen Province	2007
4.	*Acidovorax citrulli*	Ac-BF2-1	Watermelon	Khon Kaen Province	2007
5.	*Acidovorax citrulli*	Ac-BF4-2	Watermelon	Khon Kaen Province	2007
6.	*Acidovorax citrulli*	Ac-BF7-1	Watermelon	Khon Kaen Province	2007

Table 1 : (continue)

No.	Bacterial strain		Host	Location	Year
7.	*Acidovorax citrulli*	Ac-NKK1	Watermelon	Khon Kaen Province	2007
8.	*Acidovorax citrulli*	Ac-NKK3	Watermelon	Khon Kaen Province	2007
9.	*Acidovorax citrulli*	Ac-NKK4	Watermelon	Khon Kaen Province	2007
10.	*Acidovorax citrulli*	Ac-NKK6	Watermelon	Khon Kaen Province	2007
11.	*Acidovorax citrulli*	Ac-NKK9	Watermelon	Khon Kaen Province	2007
12.	*Acidovorax citrulli*	Ac-NKK13	Watermelon	Khon Kaen Province	2007
13.	*Acidovorax citrulli*	Ac-LA	Watermelon	Nakhon Pathom Province	2007
14.	*Acidovorax citrulli*	Ac-LAA-k	Watermelon	Nakhon Pathom Province	2007
15.	*Acidovorax citrulli*	Ac-LAA-S	Watermelon	Nakhon Pathom Province	2007
16.	*Acidovorax citrulli*	Ac-CA	Watermelon	Ratchaburi Province	2007
17.	*Acidovorax citrulli*	Ac-CU	Watermelon	Ratchaburi Province	2007
18.	*Acidovorax citrulli*	Ac-WA	Watermelon	Unrecorded	2007
19.	*Acidovorax citrulli*	Ac-WR	Watermelon	Unrecorded	2007
20.	*Acidovorax citrulli*	Ac-WS	Watermelon	Unrecorded	2007
21.	*Acidovorax citrulli*	Ac-KB3-2	Watermelon	Kanchanaburi Province	2016
22.	*Acidovorax citrulli*	Ac-KB6-1	Watermelon	Kanchanaburi Province	2016
23.	*Acidovorax citrulli*	Ac-KB6-2	Watermelon	Kanchanaburi Province	2016
24.	*Acidovorax citrulli*	Ac-KB7	Watermelon	Kanchanaburi Province	2016
25.	*Acidovorax citrulli*	Ac-AT1/1-1	Watermelon	Ang Thong Province	2016
26.	*Acidovorax citrulli*	Ac-AT4/2-1	Watermelon	Ang Thong Province	2016
27.	*Acidovorax citrulli*	Ac-AT5/2	Watermelon	Ang Thong Province	2016
28.	*Acidovorax citrulli*	Ac-AT4/1-2	Watermelon	Ang Thong Province	2016
29.	*Acidovorax citrulli*	Ac-AT5/1	Watermelon	Ang Thong Province	2016
30.	*Acidovorax citrulli*	Ac-AT2/1	Watermelon	Ang Thong Province	2016
31.	*Acidovorax citrulli*	Ac-AT4/1-1	Watermelon	Ang Thong Province	2016
32.	*Acidovorax citrulli*	Ac- KKML1/2	Watermelon	Khon Kaen Province	2016
33.	*Acidovorax citrulli*	Ac-KKML3/1	Watermelon	Khon Kaen Province	2016
34.	*Acidovorax citrulli*	Ac-KKML3/2	Watermelon	Khon Kaen Province	2016
35.	*Acidovorax citrulli*	Ac-KKMF5/1	Watermelon	Khon Kaen Province	2016
36.	*Acidovorax citrulli*	Ac-KKMF5/2	Watermelon	Khon Kaen Province	2016
37.	SAP1 (saprophyte)		Watermelon	Nakhon Pathom Province	2016
38.	SAP2 (saprophyte)		Watermelon	Nakhon Pathom Province	2016
39.	SAP3 (saprophyte)		Watermelon	Nakhon Pathom Province	2016
40.	SAP4 (saprophyte)		Watermelon	Nakhon Pathom Province	2016
41.	SAP5 (saprophyte)		Watermelon	Nakhon Pathom Province	2016
42.	Acidovorax cattleyae		Orchid	Department of Agriculture	2016
43.	Burkholderia gladioli		Rice	Wanwisa(2559)	2016
44.	Pseudomonas sp.		Sugarcane soils	Ofce of Cane and Sugar, Ministry of Industry Sugar, Ministry of□S□ Industry	2016

3. การเตรียมเมล็ดแตงโมที่ปลูกเชื้อ *A. citrulli* เพื่อใช้ในการทดสอบ

แช่เมล็ดแตงโม 1 กก. ในสารละลาย 20% HCl ปริมาณ 1.5 ล. ร่วมกับการใช้ปั๊มดูดอากาศเป็นเวลา 1 ชม. จากนั้น นำมาล้างน้ำสะอาดจนกระทั่งน้ำล้างเมล็ดมีค่า pH 7.0 แล้วจึงนำเมล็ดมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตรวจสอบเมล็ดปลอดเชื้อโดยการสุ่มเมล็ดเป็นกองขนาดกองละ 1,000 เมล็ด (~28 กรัม), 2,000 เมล็ด (~56 กรัม) และ 3,000 เมล็ด (~84 กรัม) แช่เมล็ดในสารละลาย 1X PBST อัตราเมล็ด 25 กรัม/100 มล. เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชม. แยกเมล็ดออกโดยกรองผ่านตะแกรง นำน้ำที่กรองผ่านตะแกรงไปเขย่าต่อเป็นเวลา 5 ชม. จากนั้น กรองน้ำแช่เมล็ดด้วยกระดาษกรอง (Whatman®, USA) ที่มีรูกรอง (pore size) ขนาด 11 μm, 6 μm และ 2.5 μm ตามลำดับ สุดท้ายกรองด้วยแผ่นกรองแบคทีเรีย Supor® PES Membrane Disc Filters (Pall Life Science, USA) ที่มีขนาดรูกรอง 0.45 μm และล้างแผ่นกรองแบคทีเรียด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 2 มล. นำน้ำล้างที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Presto Mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid, Taiwan) ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ และใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Co-PCR ตามวิธีการข้างต้น นำเมล็ดที่ผ่านกรรมวิธีที่ได้ตรวจแล้วว่าปราศจากเชื้อมาใช้ปลูกเชื้อ *A. citrulli* โดยฉีดเชื้อปริมาณ 10-10^4 CFU/เมล็ด ด้วยการใช้ pipet tip หยอดเชื้อเข้าไปในเมล็ดที่ตัดปลายเล็กน้อยและเจาะรูด้วยเข็มผึ่งแห้งจากนั้นสุ่มเมล็ดมาตรวจสอบปริมาณเชื้อที่ติดอยู่ในเมล็ดด้วยเทคนิค plate count ก่อนนำเมล็ดไปใช้ในการประเมินการตรวจหาเชื้อ

4. ประสิทธิภาพของเทคนิค Co-PCR ในการตรวจหาเชื้อในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์

เตรียมตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ติดเชื้อโดยผสมเมล็ดพันธุ์ที่ปนเปื้อนเชื้อ 1 เมล็ด ลงในกองเมล็ดพันธุ์ปลอดเชื้อเพื่อจำลองตัวอย่างกองเมล็ดที่ติดเชื้อในอัตรา 0.05% (1/2,000) และ 0.01% (1/10,000) โดยแต่ละตัวอย่างของอัตราการติดเชื้อจะทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ (replicate) การตรวจหาเชื้อในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จำนวน 10,000 เมล็ด จะแบ่งตัวอย่างเมล็ดเป็นกองย่อยกองละ 2,000 เมล็ด จำนวน 5 กองย่อย นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ติดเชื้อไปแช่ใน nutrient broth (NB) ที่ผสมสาร benomyl 1.5 มก./มล. และ ampicillin 15 ไมโครกรัม/มล. เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชม. กรองเมล็ดออกและนำน้ำกรองเมล็ดไปเขย่าต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชม. เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ กรองน้ำแช่เมล็ดด้วยกระดาษกรอง และสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการในข้อ 3 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยการทำปฏิกิริยา PCR ต่อส่วนยีน 16s rDNA ด้วยไพร์เมอร์ fd2 (5'CCGAATTCGT CGACAACA GAGTTTGATCATGGCTCAG 3') และ rp1 (5'CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACC TTGTTACG ACTT3') (Weisburg *et al*., 1991) โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้ 1x Phire Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Scientic, USA) ไพร์เมอร์ fd2 และ rp1 ชนิดละ 0.2 μM, ดีเอ็นเอ 2 μl (10-50 ng) ปริมาตรรวมเป็น 10 μl ต่อปฏิกิริยา และทำปฏิกิริยาด้วยโปรแกรมการทำปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 98 °ซ. เป็นเวลา 5 นาที ขั้นที่ 2-4 ที่อุณหภูมิ 98 °ซ. เป็นเวลา 10 วินาที, อุณหภูมิ 58 °ซ. เป็นเวลา 10 วินาที และที่อุณหภูมิ 72 °ซ. เป็นเวลา 30 วินาที

จำนวน 25 รอบ และ ขั้นที่ 5 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 72 °ซ. เป็นเวลา 1 นาที และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้อีกส่วนหนึ่งไปตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* ด้วยเทคนิค Co-PCR ตามวิธีการในข้อ 2 ตรวจผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟริซิส ย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบร์ไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มล. และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

5. การตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ *A. citrulli* ของเมล็ดแตงโมที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ

ใช้เมล็ดพันธุ์แตงโมผสมเปิด (open pollinated seeds) ที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *A. citrulli* จากสภาพแปลงปลูกในธรรมชาติซึ่งมีอัตราการติดเชื้อ 5% (ประเมินโดยสุ่มตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* ด้วยเทคนิค Co-PCR มาก่อน) นำมาทดสอบการตรวจหาเชื้อ สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามมาตรฐานการสุ่มตรวจเพื่อการรับรองสุขอนามัยเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวข้างต้น ตัวอย่างละ 10,000 เมล็ด จำนวน 3 ซ้ำ ตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* จากแต่ละตัวอย่างโดยแบ่งเมล็ดออกเป็น 5 กองย่อย (sub-sample) กองละ 2,000 เมล็ด และตรวจหาเชื้อตามวิธีการข้อ 4.

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ความจำเพาะของเทคนิค Co-PCR ในการตรวจเซลล์แขวนลอยเชื้อ *A. citrulli*

การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Co-PCR ต่อเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ (Table 1) ด้วยไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. citrulli* พบว่าเชื้อ *A. citrulli* ทั้ง 36 สายพันธุ์ ให้ผลปฏิกิริยา Co-PCR เป็นบวก และให้ผลเป็นลบ เมื่อตรวจเชื้อ *A. cattleyae*, *Burkholderia gladioli*, *Pseudomonas sp.* และเชื้อแบคทีเรียแซบโปร์ไฟต์ที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของแตงโมอีก 5 ชนิด

ไพร์เมอร์ที่ใช้ศึกษานี้คัดเลือกจากชุดไพร์เมอร์ที่รายงานโดย Kim *et al.* (2015) ในการตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* ด้วยเทคนิค nested-PCR ซึ่งออกแบบจากข้อมูลจีโนมของเชื้อ *A. citrulli* KACC10651 โดยเลือกไพร์เมอร์ 3 เส้นที่เหมาะสมจากไพร์เมอร์ทั้งหมด 4 เส้น ไพร์เมอร์ทั้งสามเส้น (Ac-OFR12F, Ac-ORF13R และ Ac-ORF21R) จะทำปฏิกิริยาร่วมกันในการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ที่เฉพาะเจาะจง 2 ขนาด จากไพร์เมอร์ Ac-OFR12F และ Ac-ORF13R (569 bp) และผลิตภัณฑ์ จากไพร์เมอร์ Ac-ORF12F และ Ac-ORF21R ที่เป็นไพร์เมอร์เสริม (additional primer) ที่มีขนาดสั้นกว่า (357 bp) ตามที่กำหนดไว้ (Figure 1 and 2) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้ง 2 ผลิตภัณฑ์ มีความเหมือนกัน (100%) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *A. citrulli* accession CP00512.1 ที่รายงานในฐานข้อมูล NCBI โดยผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 357 bp และ 569 bp ตรงกับตำแหน่งที่ 3609332-3609689 และตำแหน่งที่ 3609121-3609689 ของฐานข้อมูลดังกล่าว เป็นการยืนยันความถูกต้องของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา Co-PCR ว่าไพร์เมอร์ชุดนี้มีความจำเพาะกับเชื้อ *A. citrulli* ที่เป็นเป้าหมายในการตรวจ

การตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* ในการศึกษานี้ใช้อุณหภูมิของปฏิกิริยา Co-PCR โดยใช้อุณหภูมิ 98 °ซ. นาน 5 นาที ในการเริ่มปฏิกิริยา(hot start) ตามด้วยขั้นตอน denaturing step ที่ 98 °ซ. นาน 10 วินาที และใช้ annealing และ extension step ที่อุณหภูมิเดียวกัน คือ 72°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ final extension

step ทีอุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งหากใช้อุณหภูมิ annealing ตามข้อแนะนำของผู้ผลิต โดยใช้ที่อุณหภูมิ melting temperature, Tm + 3°ซ. (ในกรณีนี้ 63-65°ซ.) ในการตรวจหาเชื้อนี้ในเมล็ดพันธุ์ พบว่า จะให้ผลิตภัณฑ์ PCR มากกว่า 2 แถบ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ไปตรวจด้วยโปรแกรม BLAST กับฐานข้อมูลจีโนมของ *A. citrulli* accession CP00512.1 ไม่พบบริเวณอื่นบนจีโนมที่ไพร์เมอร์นี้จะจับคู่ได้ แต่หากนำไปใช้ตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* บริสุทธิ์ในสารแขวนลอยเชื้อ ยังคงให้ผลเป็นไปตามที่กำหนดไว้ อาจเป็นผลจากสารยับยั้งปฏิกิริยา (inhibitor) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดอื่น ๆ ที่สั้นกว่าที่กำหนดไว้ (ไม่ได้แสดงผล) แต่เมื่อยกระดับอุณหภูมิ annealing เพิ่มขึ้นไปจากค่า Tm + 3°ซ. เป็นที่อุณหภูมิ 72°ซ. เท่ากับอุณหภูมิที่เหมาะสมของ extension step คาดว่าอาจทำให้สารยับยั้งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ Taq polymerase เสียคุณสมบัติไป เป็นผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 2 แถบ เป็นไปตามที่กำหนดไว้ ดังนั้น ในการศึกษาตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* จึงใช้ขั้นตอนในปฏิกิริยา Co-PCR ดังกำหนดข้างต้นตลอดการศึกษานี้

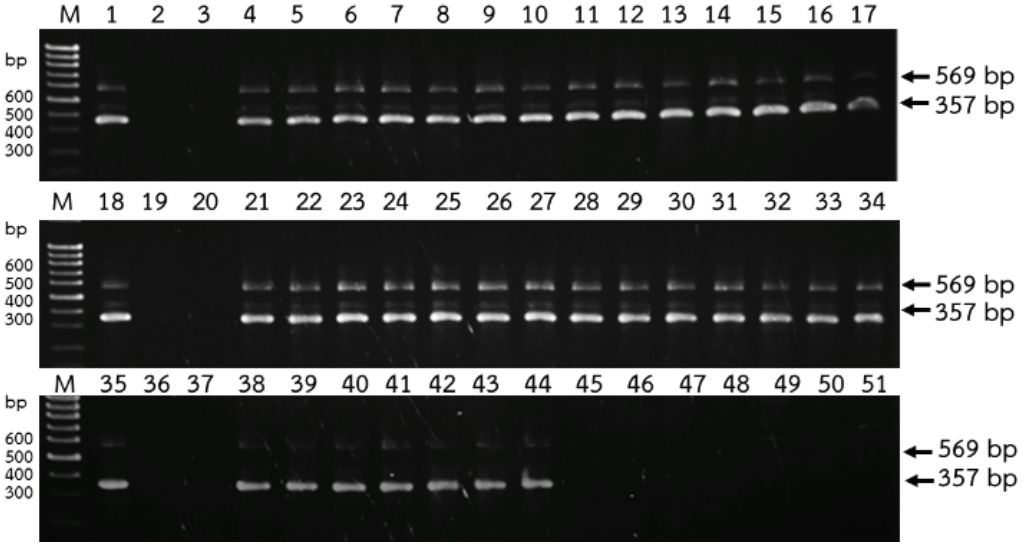

Figure 1 Co-PCR technique for specificity detection evaluation of *Acidovorax citrulli* cell suspension. M: 100 bp DNA size ladder (New England Biolabs); lane 1,18 and 35: positive control (*A. citrulli* Ac-1228); lane 2,19 and 36: negative control (*A. cattleyae*); lane 3, 20 and 37: water as negative control; lane 4-17, 21 -34 and 38-44: strains of *A. citrulli*; lane 45: *Burkholderia gladioli*; lane 46: *Pseudomonas* sp.; and lane 47-51: saprophytic bacteria

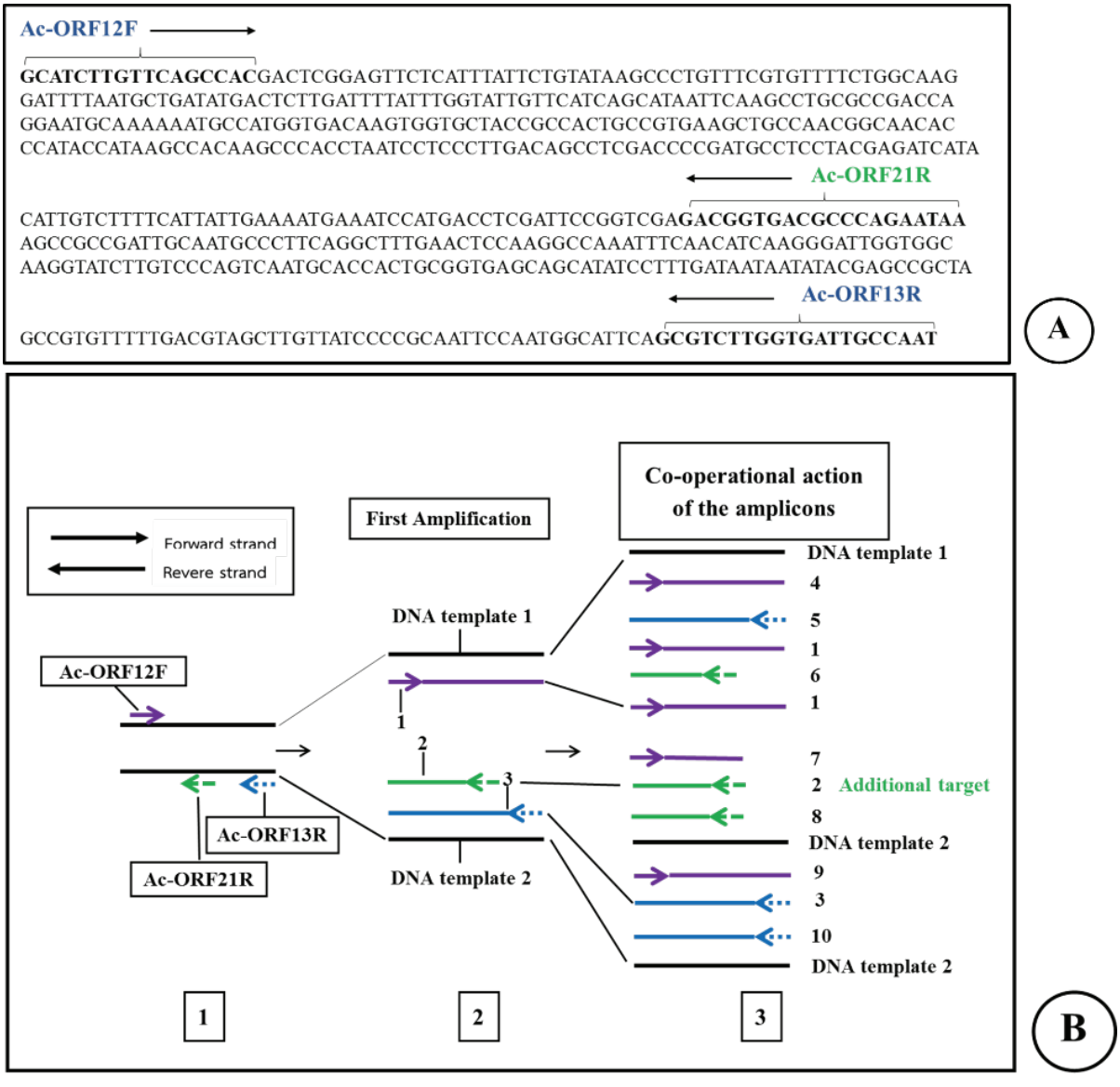

Figure 2 Co-PCR technique for *Acidovorax citrulli* detection. (A) Positions of Co-PCR primers, Ac-ORF12F, Ac-ORF13R and additional primer Ac-ORF21R for *Acidovorax citrulli* detection; (B). Diagram of the Co-operational amplification (Co-PCR), (1) Annealing positions of the three different primers; (2) first cycle of the reaction; (3) synthesis of amplicons by co-operational polymerase chain reaction

2. ประสิทธิภาพของเทคนิค Co-PCR ในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ติดเชื้อ

การตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ปนเปื้อนเชื้อ 0.05% ในตัวอย่างกองเมล็ดพันธุ์ขนาด 2,000 เมล็ด ด้วยเทคนิค Co-PCR โดยการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อส่วน 16s rDNA ของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า ทุกตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ที่นำมาตรวจหาเชื้อ ให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวก โดยปรากฏแถบแบนดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,500 bp (Figure 3A) การตรวจสอบเชื้อ *A. citrulli* ในกองเมล็ดพันธุ์ที่ปนเปื้อนเชื้อ 0.05% ด้วยไพร์เมอร์ Ac-ORF12F, Ac-ORF13R และ Ac-ORF21R ให้ผลตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* ได้ในระดับที่มีการติดเชื้อประมาณ 104 และ 103 CFU/เมล็ด จากตัวอย่างทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง แต่ตรวจไม่พบเชื้อจากตัวอย่างที่มีระดับการติดเชื้อที่ต่ำกว่า 103 CFU/เมล็ด (Figure 3B) การตรวจเมล็ดพันธุ์ที่ปนเปื้อนเชื้อ 0.01% ของกองเมล็ดพันธุ์ขนาด 10,000 เมล็ด ที่แบ่งเป็นตัวอย่างกองย่อย 2,000 เมล็ด จำนวน 5 กอง พบว่า สามารถตรวจหาเชื้อที่ระดับการติดเชื้อ 10^3 CFU ใน 3 ตัวอย่างของการทดลองเช่นกัน (Figure 4B) และให้ผลปฏิกิริยาบวกสำหรับการตรวจสอบปฏิกิริยา PCR และคุณภาพของดีเอ็นของทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบ (Figure 4A)

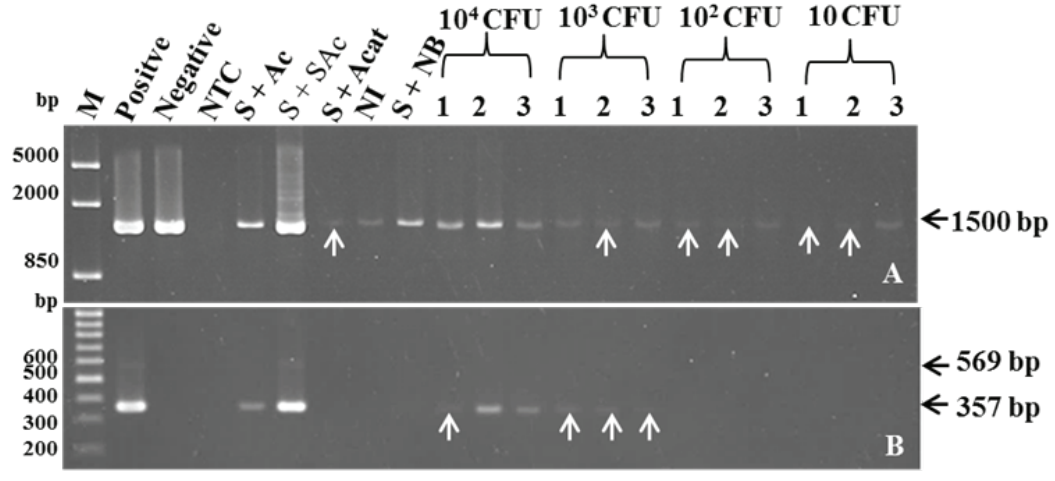

Figure 3 Detection of *A. citrulli* with Co-PCR technique in seed samples (2,000) and spiked with artificially inoculated seeds at the rate of 0.05 % in difference amount of bacterial CFU/seed in 3 replications. (A) Amplification of 16s rDNA and, (B) Amplification with *A. citrulli* primer set. M: 100 bp DNA size ladder; Positive: genomic DNA of *A. citrulli*; Negative: genomic DNA of *A. cattleyae*; NTC: non-template; S+Ac: artificially inoculated seeds with *A. citrulli*; S+SAc: clean seed stock spiked with cell suspension of *A. citrulli*; S+Acat: clean seed stock spiked with cell suspension of *A. cattleyae*; NI: Non template, water; S+NB: clean seed stock spiked with nutrient broth; and white arrow is indicated an ambiguous band of target

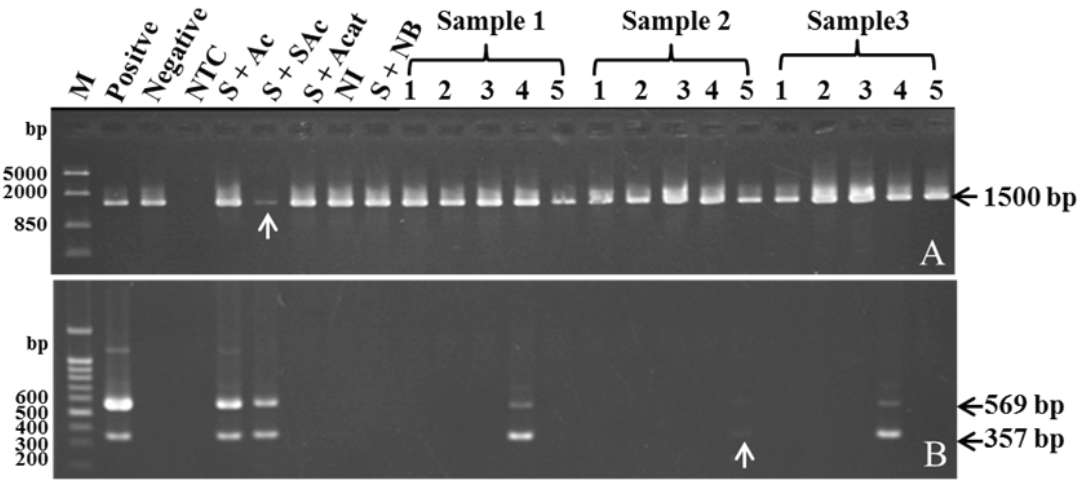

Figure 4 Detection of *A. citrulli* with Co-PCR technique in seed samples (10,000) and spiked with artificially inoculated seeds at the rate of 0.01 % with 10^3 CFU/seed. Sample seeds, contained 1 infected seed in 10,000 seeds, were randomly devised into 5 sub-sample for testing. (A) Amplification of 16s rDNA and, (B) Amplication with *A. citrulli* primer set. M: 100 bp DNA size ladder; Positive: genomic DNA of *A. citrulli*; Negative: genomic DNA of *A. cattleyae*; NTC: non-template; S+Ac: artificially inoculated seeds with *A. citrulli*; S+SAc: clean seed stock spiked with cell suspension of *A. citrulli*; S+Acat: clean seed stock spiked with cell suspension of *A. cattleyae*; NI: Non template, water; S+NB: clean seed stock spiked with nutrient broth; and white arrow is indicated an ambiguous band of target

วิธีการสกัดเชื้อออกจากเมล็ดมีความสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบ ในการศึกษานี้ใช้แช่เมล็ดในอาหาร nutrient broth ร่วมกับการเขย่าเป็นเวลา 1 ชม. กรองเมล็ดออก นำน้ำแช่เมล็ดไปเขย่าต่อเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ เป็นเวลา 5 ชม. ก่อนการกรองด้วยแผ่นกรองแบคทีเรีย และนำไปสกัดดีเอ็นเอ พบว่ามีประสิทธิภาพดีในการตรวจหาเชื้อจากเมล็ด จากผลการทดลองสามารถตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* ในตัวอย่างกองเมล็ดพันธุ์มาตรฐาน (10,000 เมล็ด) ที่มีการติดเชื้อ 0.01% ที่มีปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ 10^3 CFU ในการตรวจ 3 ซ้ำได้ 100% (3/3) (Figure 4B) และเมื่อเทียบกับการตรวจด้วยเทคนิค SGO ที่สามารถตรวจสอบกองเมล็ดพันธุ์ที่ติดเชื้อ 0.01% ได้ต่ำสุด 10^4 CFU โดยสามารถตรวจได้เพียง 15% (1/8) (Walcott *et al*., 2006) แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดเชื้อออกจากเมล็ดที่พัฒนาขึ้นร่วมกับการตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค Co-PCR ให้ประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อ *A. citrulli* ในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มีประสิทธิภาพดีกว่าเทคนิค SGO ในด้านของความรวดเร็ว ใช้แรงงานต่ำ และให้ผลการตรวจหาเชื้อที่เชื่อถือได้ สามารถนำไปใช้คัดกรองเบื้องต้นเพื่อการตรวจสุขอนามัยเมล็ดพันธุ์พืชได้ดีก่อนที่จะตรวจสอบยืนยันด้วยวิธีอื่นเช่น Grow-out testing

3. การตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่ปนเปื้อนเชื้อ *A. citrulli* ในสภาพธรรมชาติ

การประเมินความสามารถของเทคนิค Co-PCR ในการตรวจสอบเชื้อ *A. citrulli* ในตัวอย่างกองเมล็ดพันธุ์ที่ปนเปื้อนในสภาพธรรมชาติ (naturally infected seed) ที่มีอัตราการติดเชื้อประมาณ 5% พบว่า ทุกตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ที่นำมาตรวจสอบ ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,500 bp ของ 16s rDNA ของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดได้ แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณสมบัติที่ดี และสารที่ใช้ในปฏิกิริยา Co-PCR มีคุณสมบัติที่ดี ถูกต้อง และให้ผลในการตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* ด้วยเทคนิค Co-PCR ด้วยไพร์เมอร์จำเพาะได้ 100% (3/3) โดยตรวจหาเชื้อไม่พบในตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อ 0% (0/3) ดังแสดงใน Table 2 เนื่องจากในประเทศผู้นำเข้าเมล็ดพันธุ์แตงโม หลายประเทศกำหนดให้เชื้อ *A. citrulli* จัดอยู่ในกลุ่มศัตรูพืชควบคุม (regulated pest) และในมาตรฐานการตรวจรับรองสุขอนามัยของเมล็ดพันธุ์แตงโมกำหนดว่าจะต้องปราศจากเชื้อ *A. citrulli* การใช้เทคนิค Co-PCR ในการตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* ในเมล็ดพันธุ์แตงโม พบว่า วิธีการนี้มีความไวในการตรวจหาเชื้อในระดับ 10^3 CFU/เมล็ด และตรวจหาเชื้อได้ในระดับ 1 เมล็ดที่ติดเชื้อในตัวอย่างมาตรฐาน (10,000 เมล็ด) ได้ ไม่มีผลกระทบจากสารยับยั้งต่อปฏิกิริยา Co-PCR ทำให้ผลที่ได้จากการตรวจเชื่อถือได้ ตรวจได้รวดเร็ว จึงเป็นวิธีที่สามารถใช้ตรวจคัดกรองเพื่อกำจัด กองเมล็ดพันธุ์ที่ติดเชื้อออกไป ก่อนนำไปทดสอบอื่น ๆ ซึ่งจะสูญเสียเวลาและทรัพยากร และใช้ร่วมกับวิธีอื่น ๆ ในการตรวจออกใบรับรองสุขอนามัยเมล็ดพันธุ์พืช (phytosanitary certicate) ที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพได้

สรุปผลการทดลอง

เทคนิค Co-PCR มีความเฉพาะเจาะจงต่อการตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* บริสุทธิ์ในสารแขวนลอยเชื้อ และสามารถตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* ที่มีอัตราการติดเชื้อ 0.05% (1 เมล็ดใน 2,000 เมล็ด) และ 0.01% (1 เมล็ดใน 10,000 เมล็ด) ตามลำดับ โดยมีความไวในการตรวจหาเชื้อ *A. citrulli* จากกองเมล็ดพันธุ์ตัวอย่างมาตรฐาน (10,000 เมล็ด) ที่มีการปนเปื้อนเชื้อต่ำสุด คือ 1 เมล็ดที่มีเชื้อจำนวน 10^3 CFU/เมล็ด ได้ วิธีที่พัฒนาขึ้นไม่มีผลกระทบจากสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR และให้ผลดีในการตรวจเมล็ดติดเชื้อจากสภาพธรรมชาติ ที่มีอัตราการถ่ายทอดเชื้อผ่านเมล็ด 5% ได้อย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพสูง ดังนั้น ผู้เกี่ยวข้องสามารถนำวิธีการตรวจหาเชื้อนี้ไปใช้ร่วมกับวิธีการอื่น ๆ เพื่อตรวจรับรองสุขอนามัยเมล็ดพันธุ์พืช (phytosanitary certification) ที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพได้

Table 2 Co-PCR technique results for Acidovorax citrulli detection from naturally infected seed samples. The Co-PCR was carried out with the primer set, Ac-ORF 12F, Ac-ORF13R, and Ac-ORF21R

A. citrulli natural seed infection (%)	Detection frequency (%)[1]	
	16s rDNA detection	*A. citrulli* detection[2]
0	100 (3/3)	0 (0/3)
5	100 (3/3)	100 (3/3)

1 Detection frequency values represent the means of three replicates

2 Each replicate, which sampling according to the International Seed Federation (ISHI-Veg, ISF), 10,000 seeds from seed lot and sub-sampling into 5 sub-samples for testing

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ

เอกสารอ้างอิง

CABI. 2018. *Acidovorax citrulli* (fruit blotch). Available at : https://www.cabi.org/isc/datasheet/2676, Accessed : May 10, 2018.

Caruso, P., E. Bertolini , M. Cambra and M.M. Lpez. 2003. A new and sensitive co-operational polymerase chain reaction (Co-PCR) for rapid detection of *Ralstonia solanacearum* in water. *J. Microbiol. Methods* 55: 257-272.

Capote, N., E. Bertolini, A. Olmos, E. Vidal, M.C. Martnez, and M. Cambra. 2009. Direct sample preparation methods for the detection of plum pox virus by real-time RT-PCR. *Int. Microbiol.* 12(1): 1-6.

Dutta, B., H. Scherm, R. D. Gitaitis and R. R. Walcott. 2012. *Acidovorax citrulli* seed inoculum load affects seedling transmission and spread of bacterial fruit blotch of watermelon under greenhouse conditions. *Plant Dis.* 96(5): 705-711.

Gitaitis R. and R. Walcott. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 371-397.

Giovanardi, D., S. A. Sutton, E. Stefani and R. R. Walcott. 2018. Factors inuencing the detection of *Acidovorax citrulli* in naturally contaminated cucurbitaceous seeds by PCR-based assays. *Seed Sci. Technol.* 46(1): 93-106.

Kim, Y. T., K. S. Park, H. S. Kim, H. I. Lee and J. S. Cha. 2015. Development of nested-PCR assay to detect *Acidovorax citrulli*, a causal agent of bacterial fruit blotch at Cucurbitaceae. *Res. Plant Dis*. 21: 74-81.

Koenraadt H.M.S., R.c. Borst, A. van Vliet, M. Hoekstra, J. van Schie and M. Buimer. 2005. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* with the sweatbox method. *In*: Mededelingenblad van de Koninklijke Nederlandse Plantenziektekundige Vereniging. Supplement Gewasbescherming 36: 86S.

Olmos, A., E. Bertolini and M. Cambra. 2002. Simultaneous and co-operational amplication (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *J. Virol. Methods* 106: 51–59.

Schaad, N. W., E. Postnikova, A. Sechler, L.E. Clain, A.K. Vidaver, J.B. Jones, I. Agarkova, A. Ignatov, E. Dickstein and B.A. Ramundo. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad *et al*., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol*. 31(6): 434-446.

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

Walcott, R. R., A.C. Castro, A. Fessehaie and K. Ling. 2006. Progress towards a commercial PCR based seed assay for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Seed Sci. Technol*. 34: 101-116.

Walcott, R. R., R. D. Gitaitis and A.C. Castro. 2003. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Phytopathology 93(5): 528-534.

Weisburg, W. G., S.M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane. 1991. 16s ribosomal DNA amplication for phylogenetic study. *J. Bacteriol*. 173(2): 697-703.