



## **NORMES INTERNATIONALES POUR LES MESURES PHYTOSANITAIRES**

### **NIMP 27 PROTOCOLES DE DIAGNOSTIC**

#### **PD 5:**

#### ***Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa sur les fruits**

**(2014)**

#### **TABLE DES MATIÈRES**

|         |   |                         |
|---------|---|-------------------------|
| 1.      | Informations relatives à l'organisme nuisible.....  | PD 5-2                  |
| 2.      | Données taxonomiques.....   | PD 5-4                  |
| 3.      | Détection.....  | PD 5-4                  |
| 3.1     | Symptômes observés sur les fruits .....   | PD 5-4                  |
| 3.2     | Symptômes sur les feuilles et rameaux .....   | PD 5-5                  |
| 3.3     | Comparaison entre les symptômes de la maladie des taches noires<br>des agrumes et ceux que provoquent d'autres organismes ou<br>facteurs abiotiques.....                            | PD 5-5                  |
| 4.      | Identification.....   | PD 5-6                  |
| 4.1     | Méthode A: Isolement et mise en culture de <i>P. citricarpa</i> .....   | PD 5-7                  |
| 4.1.1   | Milieux de culture .....  | PD 5-7                  |
| 4.1.2   | Caractéristiques des cultures .....   | PD 5- <del>887</del>    |
| 4.1.3   | Morphologie.....  | PD 5-8                  |
| 4.1.4   | Comparaison entre les caractéristiques des cultures et<br>les caractéristiques morphologiques de <i>P. citricarpa</i> et celles d'espèces<br>analogues de <i>Phyllosticta</i> ..... | PD 5- <del>998</del>    |
| 4.2     | Méthode B: analyses moléculaires.....   | PD 5-9                  |
| 4.2.1   | Identification de <i>P. citricarpa</i> par PCR classique.....   | PD 5-9                  |
| 4.2.1.1 | Informations générales .....  | PD 5-10                 |
| 4.2.1.2 | Méthodes.....   | PD 5-10                 |
| 4.2.1.3 | Informations essentielles concernant la procédure.....  | PD 5-11                 |
| 4.2.2   | Identification de <i>P. citricarpa</i> par PCR en temps réel .....  | PD 5-11                 |
| 4.2.2.1 | Informations générales .....  | PD 5- <del>121211</del> |

|         |  |         |
|---------|--|---------|
| 4.2.2.2 | Méthodes .....   | PD 5-12 |
| 4.2.2.3 | Informations essentielles sur la procédure .....                           | PD 5-13 |
| 4.2.3   | Identification de <i>P. citricarpa</i> par séquençage des régions ITS..... | PD 5-14 |
| 4.2.3.1 | Informations générales .....   | PD 5-14 |
| 4.2.3.2 | Méthodes .....   | PD 5-14 |
| 4.2.3.3 | Informations essentielles sur la procédure .....                           | PD 5-15 |
| 5.      | Données à conserver.....   | PD 5-15 |
| 6.      | Points de contact pour tout complément d'informations .....                | PD 5-15 |
| 7.      | Auteurs et collaborateurs .....  | PD 5-15 |
| 8.      | Références .....   | PD 5-16 |
| 9.      | Figures .....  | PD 5-19 |

## 1. Informations relatives à l'organisme nuisible

*Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa, ~~qui est~~ l'agent causal de la «maladie des taches noires des agrumes», est un champignon qui provoque des taches sur les feuilles et des lésions sur les fruits ~~et qui~~ ~~Il~~ s'attaque aux *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella* et à leurs hybrides. À l'exception de ~~Citrus-Citrus aurantium~~ et de ses hybrides et de ~~Citrus-Citrus latifolia~~, toutes les espèces de *Citrus* faisant l'objet de cultures commerciales sont sensibles (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002; Kotzé, 2000). ~~Citrus-Citrus limon~~ étant particulièrement sensible, c'est habituellement la première espèce de *Citrus* à présenter les symptômes de la maladie une fois que l'agent pathogène est introduit dans une nouvelle zone (Kotzé, 2000).

La maladie des taches noires des agrumes a été pour la première fois observée en Australie en 1895 sur ~~Citrus-Citrus sinensis~~ (Benson, 1895). Elle est maintenant présente dans certaines zones agrumicoles de l'Afrique, de l'Asie, de l'Australie, ~~et de l'Amérique du Nord et de l'Amérique du Sud~~ (CAB International, 2011; NAPPO, 2010; Schubert *et al.*, 2012). L'organisme n'a pas été signalé en Europe, en Amérique centrale ni dans la région des Caraïbes (CAB International, 2011; CAB International/OEPP, 1998; OEPP/CAB International, 1997; NAPPO, 2010).

L'incidence économique de *P. citricarpa* tient essentiellement aux imperfections externes qu'il provoque et qui rendent le fruit invendable ~~à l'état~~ ~~pour sur le marché du~~ frais (Spósito, 2003). Les infections sévères peuvent entraîner la chute prématurée des fruits (Kotzé, 2000). Des pertes dues à la chute des fruits surviennent les années où les conditions sont favorables au développement de l'organisme nuisible et lorsque les fruits sont laissés sur les arbres après le pic de maturité (CAB International, 2011). En outre, les fruits ~~atteints par une infection~~ ~~infectés de manière~~ latente (asymptomatiques) au moment de la récolte peuvent par la suite commencer à présenter des symptômes pendant le transport ou l'entreposage (Kotzé, ~~1996~~).

L'épidémiologie de la maladie des taches noires des agrumes est fonction de l'existence d'inoculum, de la présence de conditions ambiantes favorables à l'infection (c'est-à-dire chaleur et humidité), du cycle de croissance de l'arbre fruitier, et de l'âge du fruit et des feuilles qui les rend plus ou moins sensibles à l'infection (Kotzé, 1981, 2000). Dans les zones où les pluies sont limitées à une seule saison, les pseudothèces qui contiennent les ascospores et qui ne se développent que sur ~~la litière de feuilles~~ ~~les feuilles mortes tombées au sol en décomposition~~, sont la principale source d'inoculum. En revanche, lorsque les pluies ne sont pas limitées à une seule saison, que des fruits porteurs de lésions de la campagne précédente sont laissés sur les arbres après la floraison et la fructification, ~~ou qu'il y a une que la~~ floraison ~~ultérieure et irrégulière~~ des espèces et variétés d'agrumes cultivées ~~est échelonnée dans le temps et irrégulière~~, les pycnides qui contiennent les conidies de ~~P. citricarpa~~ sont aussi d'importantes sources d'inoculum (Kotzé, 1981; Spósito *et al.*, 2008, 2011).

Les pseudothèces se développent 40 à 180 jours après la chute des feuilles, en fonction de la fréquence à laquelle le substrat de feuilles est mouillé et séché ~~et ainsi que~~ des températures ~~habituelles~~ (Kotzé, 1981). Selon les pays, la chute des feuilles des agrumes peut être saisonnière ou répartie sur toute l'année, ce qui a une incidence sur la présence d'inoculum. Les températures les plus favorables à la formation de pseudothèces se situent dans la fourchette 21–28 °C; les pseudothèces ne se forment pas au-dessous de 7 °C ni au-dessus de 35 °C (Lee et Huang, 1973). Les ascospores sont libérées pendant les pluies, parfois pendant l'irrigation ou ~~si lorsque~~ la rosée est abondante (Kiely, 1949a; Kotzé, 2000). Les libérations d'ascospores sont étroitement liées à la répartition des pluies (Kotzé, 1981). Les ascospores sont projetées avec force jusqu'à une hauteur de 1,2 cm au-dessus des pseudothèces et sont transportées par le vent dans l'ensemble ~~des hautes branches du houppier~~ et sur de grandes distances (Kiely, 1949a). La période critique pour l'infection commence ~~à la fructification au stade phénologique de~~ ~~la nouaison (début du développement des fruits)~~ et ~~a une durée de~~ 4 à 6 mois, mais les premiers symptômes sur les fruits n'apparaissent que plus de six mois après la ~~fructification nouaison~~ (Baldassari *et al.*, 2006). Au Brésil, les fruits des variétés «Valencia» et «Natal» de *C. sinensis* sont sensibles pendant au moins 24 semaines après la chute de 75 pour cent des pétales, lorsqu'ils ont un diamètre de 5 à 6 cm (Baldassari ~~et et~~ *et al.*, 2006).

Après l'infection, le champignon demeure ~~à l'état de quiescence dans un état de quiescence~~ jusqu'à ce que le fruit soit ~~complètement~~ ~~complètement~~ développé ou mûr, les symptômes devenant visibles de nombreux mois après l'infection (Kotzé, 2000). Les feuilles restent sensibles à l'infection ~~à partir~~ du stade du développement ~~et~~ jusqu'à l'âge de 10 mois (Truter *et al.*, 2007).

Les pycnides qui renferment les conidies se forment sur les fruits, les feuilles, les rameaux morts, les pédoncules des fruits et en abondance sur ~~les la litière de feuilles feuilles mortes tombées à terre au sol en décomposition~~ (Kotzé, 2000). Elles peuvent être projetées dans ~~la canopée~~ ~~le houppier hautes branches~~ par les gouttes d'eau ou emportées par celles-ci des fruits infectés laissés sur l'arbre après la récolte et déposées sur des fruits plus jeunes et des feuilles ~~au stade où ils qui~~ sont encore ~~au stade sensibles~~ (Agostini *et al.*, 2006; Spósito *et al.*, 2008). *P. citricarpa* a également un stade asexué micronidien, décrit dans le genre *Leptodothiorella* (Kiely, 1949a). Ce stade micronidien, également dénommé «stade spermagonien» (Kiely, 1949a), ~~est apparaît~~ généralement ~~présent~~ sur les feuilles ~~mortes~~ tombées au sol avant que les pseudothèces ne se développent. Cependant, le rôle des microconidies dans la biologie de *P. citricarpa* reste à élucider.

L'apparition de symptômes sur les fruits mûrs est intensifiée par ~~les hausses des~~ températures ~~élevées~~, la forte luminosité, la sécheresse et le manque de vigueur de l'arbre. Les arbres âgés sont davantage atteints par la maladie des taches noires des agrumes que les arbres jeunes (Kotzé, 2000). On suppose que *P. citricarpa* a été disséminé vers de nouvelles zones par du matériel de pépinière ou autre matériel ~~végétal de plantation~~ infecté, plutôt que par les fruits. (Kotzé, 2000; Timmer, 2004).

~~Il est à~~ ~~convient de~~ noter que l'endophyte non pathogène *Phyllosticta capitalensis* Henn (anciennement dénommé, à tort, *Guignardia mangiferae* A.J. Roy) (Glienke *et al.*, 2011), associé à de nombreuses familles de végétaux, peut être présent dans les fruits d'agrumes asymptomatiques ou dans les fruits présentant des taches très petites (<2 mm de diamètre). Les caractéristiques des cultures ~~et d'ordre~~ ~~les caractéristiques~~ morphologiques ~~et~~ moléculaires ~~s~~ qui différencient *P. capitalensis* de *P. citricarpa* ont été décrites par Baayen *et al.* (2002). De plus, les symptômes de *P. citricarpa* peuvent être confondus avec ceux qui sont provoqués par *Phyllosticta citriasiana* Wulandari, Crous et Gruyter, un pathogène décrit depuis peu qui n'a jusqu'ici été observé que sur *Citrus maxima* (Wang *et al.*, 2012; Wulandari *et al.*, 2009). Le pouvoir pathogène de *P. citriasiana* pour d'autres espèces de *Citrus* n'est pas connu. Les caractéristiques des cultures ~~et d'ordre~~ ~~les caractéristiques~~ morphologiques ~~et~~ moléculaires ~~s~~ qui différencient *P. citriasiana* de *P. citricarpa*, l'espèce qui est pathogène pour les agrumes, ont été décrites par Wulandari *et al.* (2009). Deux espèces de *Phyllosticta* ~~réemment~~ ~~décrites qui~~ sont associées ~~à aux~~ *Citrus* spp. ~~ont été récemment décrites~~. *Phyllosticta citrichinaensis* provoque de petites dépressions gris-brun avec une bordure marron foncé et des halos vert olive sur les feuilles des pomelos. Le pathogène est aussi la cause de petites taches brunes à noires sur les mandarines et les oranges semblables à la mélanose (Wang *et al.*, 2012). *P. citribraziliensis* a été observé en tant qu'endophyte sur des feuilles saines de *Citrus* spp. au Brésil (Glienke *et al.*, 2011).

## 2. Données taxonomiques

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>Nom:</b>                    | <i>Phyllosticta citricarpa</i> (McAlpine) Aa, 1973  |
| <b>Synonymes:</b>              | <i>Phoma citricarpa</i> McAlpine, 1899<br><i>Guignardia citricarpa</i> Kiely, 1948<br><i>Phyllostictina citricarpa</i> (McAlpine) Petr., 1953<br><i>Leptodothiorella</i> sp. (stade <del>s</del> permatie <del>n</del> f) |
| <b>Classement taxonomique:</b> | Eukaryota, Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Botryosphaeriales, Botryosphaeriaceae  |
| <b>Noms communs:</b>           | <a href="#">Maladie des taches noires des agrumes</a> , Citrus black spot (pour les noms communs dans les autres langues, voir CAB International [2011])  |
| <b>Référence:</b>              | MycoBank 320327   |

## 3. Détection

Les fruits, pédoncules, feuilles et rameaux de *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella* et de leurs hybrides sont susceptibles d'héberger *P. citricarpa* (CAB International, 2011).

### 3.1 Symptômes observés sur les fruits

Différents symptômes (par exemple taches ~~s~~ dures, taches de rousseur, fausse mélanose, tache ~~s~~ virulente~~s~~) apparaissent sur le fruit, en fonction de la température et de la maturité du fruit (Kotzé, 2000). L'examen visuel, à lui seul, n'est guère susceptible de [permettre de](#) confirmer avec certitude la présence de *P. citricarpa* sur les fruits car les symptômes présentent un aspect variable et peuvent aisément être confondus avec ceux qui sont provoqués par d'autres pathogènes des agrumes ou par des lésions mécaniques ou causées par le froid ou les insectes (Kotzé, 2000; Snowdon, 1990; L. Diaz, communication personnelle). Les quatre symptômes ci-après, décrits par Kiely (1949a, 1949b, 1960), sont généralement admis.

**Taches ~~s~~ dure~~s~~.** Symptôme le plus caractéristique de la maladie des taches noires des agrumes, constitué de lésions superficielles d'un diamètre de 3 à 10 mm dont le centre gris à marron est délimité par une bordure brun foncé à noir (figure 1A). Aux stades avancés d'évolution du symptôme, le centre des lésions devient semblable à un cratère. Les ~~diverses~~ lésions [individuelles de type](#) taches ~~s~~ dures peuvent soit ~~r~~ rester petites, soit s'étendre jusqu'à se rejoindre et former des lésions plus étendues. Un halo jaune, lorsque le fruit est vert, ou un halo vert, lorsque le fruit est jaune ou orangeé, peut apparaître autour de ces lésions. Très souvent, le centre de ces lésions contient des pycnides (figure 1a) qui peuvent être détectées à la loupe ou au microscope à dissection. La tache dure apparaît en général lorsque le fruit commence à mûrir, avant même qu'il change de couleur, et sur la moitié du fruit qui est le plus exposée au soleil (Kotzé, 1981, 2000). Dans de nombreux cas, les lésions de tache dure avec présence de pycnides permettent de diagnostiquer aisément la maladie des taches noires des agrumes.

**Taches de rousseur.** Taches grises, marron, rougeâtres ou incolores, d'un diamètre de 1 à 3 mm, légèrement concaves au centre et non entourées par un halo (figure 1B). Elles évoluent en brunissant et sont presque toujours dépourvues de pycnides (figure 1b). Elles apparaissent le plus souvent après que le fruit a changé de couleur et peuvent aussi apparaître autour des lésions de [type](#) taches ~~s~~ dures (Bonants *et al.*, 2003) (figure 1C). Les ~~diverses~~ taches de rousseur [individuelles](#) peuvent s'étendre jusqu'à se rejoindre et former des lésions plus étendues qui deviennent des taches virulentes (figure 2C), en particulier pendant l'entreposage des fruits (Kotzé, 1981, 2000).

**Fausse mélanose ou taches ~~s~~ mouchetées.** Apparaît généralement sur les fruits verts sous forme de petites lésions [convexes-en relief](#), brun foncé à noir, souvent entourées de [taches-points](#) sombres (FUNDECITRUS, 2005) (figures 2A, 2a, 2B). Les lésions sont dépourvues de pycnides et peuvent évoluer en s'étendant et en se rejoignant [quand la saison avance](#) (CABI, 2011). Ce symptôme est observé dans les zones d'agrumiculture où *P. citricarpa* est présent depuis longtemps (FUNDECITRUS, 2005).

*Taches virulentes*, *taches en expansion* ou *taches galopantes*. Lésions profondes irrégulières, rouge à brun ou incolores apparaissant vers la fin de la campagne sur les fruits mûrs massivement infectés (figure 2C). De nombreuses pycnides finissent par apparaître dans ces lésions dans des conditions de forte humidité (Kotzé, 2000). Les taches virulentes évoluent rapidement, gagnant les deux tiers de la surface du fruit ~~de~~en quatre à cinq jours. C'est le symptôme qui fait le plus de dégâts car, contrairement aux autres types de symptômes, il atteint en profondeur le mésocarpe (albedo), parfois ~~sur~~dans toute l'épaisseur de l'écorce, entraînant la chute prématurée du fruit et de graves pertes après récolte (Kotzé, 1981).

Deux autres symptômes, décrits ci-après, ont également été observés sur des agrumes, quoique rarement.

*Taches réticulées*. Lésions jaunes superficielles ayant un centre jaune foncé à brun, une texture ~~non~~rugueuse lisse et dépourvues de bordures nettes (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002) (figure 2D). Ce symptôme apparaît sur les fruits verts et peut occuper une grande partie de leur surface (Goes, 2001). Les lésions sont dépourvues de pycnides et se présentent souvent comme un réseau brun sur fond jaune. Les fruits présentant ces taches réticulées sont généralement rassemblés en groupe compact agrégés dans la canopéele houppier les hautes branches (M. Spósito, communication personnelle).

*Taches craquelées*. Lésions superficielles légèrement surélevées, brun foncé à noir, de dimensions variables, à surface craquelée et à bordures irrégulières (Goes *et al.*, 2000) (figure 2E). Elles sont dépourvues de pycnides et apparaissent sur des fruits de plus de six mois. Ce symptôme a été associé à la présence de *Phyllocoptruta oleivora* Ashmead (FUNDECITRUS, 2005; Spósito, 2003).

~~Il est à~~convient de noter que l'on peut observer sur un même fruit plusieurs des symptômes décrits plus haut ou des stades intermédiaires entre ceux-ci (figures 1C, 1c).

Dans certaines zones à forte présence d'inoculum, des symptômes peuvent aussi apparaître sur les petits fruits, les calices et les pédoncules. Les symptômes présents sur les calices sont des lésions de couleur rouge à brun foncé semblables à des taches de rousseur. Sur les petits fruits et les pédoncules, les symptômes prennent la forme de petites taches noires (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002). Ces symptômes sur les petits fruits, les calices et les pédoncules n'ont été signalés qu'au Brésil.

### 3.2 Symptômes sur les feuilles et rameaux

Sur les feuilles, la maladie des taches noires des agrumes est en général une infection latente dépourvue de symptômes visibles (Sutton et Waterston, 1966). S'il y a cependant apparition de symptômes, ce sont initialement des taches punctiformes visibles sur les deux faces de la feuille. Les taches, qui peuvent s'étendre jusqu'à atteindre 3 mm de diamètre, sont circulaires, ~~et leur~~leur centre, entouré d'une bordure brun foncé à noir et d'un halo jaune, ~~devenant~~devient gris ou marron clair (Kotzé, 2000) (figure 3A). Des pycnides sont parfois présentes au centre des lésions sur la face ~~adaxiale~~ventrale des feuilles.

Des lésions semblables à celles des feuilles peuvent aussi être présentes sur les petits rameaux, phénomène plus courant sur *C. limon* que sur les autres espèces d'agrumes (M. Truter, communication personnelle). Ce sont des lésions circulaires, de petites dimensions (0,5 à 2 mm de diamètre), légèrement concaves, dont les bordures sont de couleur brun à noir et le centre ~~gris~~gris à marron clair (figure 3B). Des pycnides peuvent parfois être présentes au centre des lésions.

### 3.3 Comparaison entre les symptômes de la maladie des taches noires des agrumes et ceux que provoquent d'autres organismes ou facteurs abiotiques

Les symptômes que l'on observe sur les fruits ont un aspect variable et ressemblent souvent à ceux que provoquent ~~sur les agrumes~~des agrumes d'autres pathogènes des agrumes (notamment *P. citriasiana*, *P. citrichinaensis*, *Diaporthe citri*, *Mycosphaerella citri*, *Alternaria alternata* pv. *citri*, *Septoria* spp., *Colletotrichum* spp.) ou ~~des~~des insectes, ~~des~~des dégâts mécaniques ou ~~eux que cause le~~qui sont dus au froid, en particulier en ce qui concerne les taches de rousseur (Bonants *et al.*, 2003; Snowdon, 1990; Wang *et al.*, 2012; Wulandari *et al.*, 2009; L. Diaz, communication personnelle).



Étant donné que les symptômes provoqués par *P. citricarpa* sur les fruits d'agrumes sont analogues à ceux qui sont causés par d'autres pathogènes, seules les méthodes décrites ci-après permettent de parvenir à une ~~diagnose~~ ~~diagnostic~~ ~~une diagnose~~ fiable.

#### 4. Identification

Le présent protocole décrit la détection et l'identification de *P. citricarpa* sur les fruits d'agrumes symptomatiques. On devrait inspecter ces fruits pour rechercher tout symptôme caractéristique de la maladie des taches noires des agrumes (voir section 3). Si les symptômes suspects se présentent sous forme de taches ou de lésions, on procède à un examen à la loupe ou au microscope à dissection pour rechercher la présence de pycnides. Si des pycnides sont présentes dans des lésions de ~~type~~ ~~taches~~ ~~dures~~ ~~telles~~ que décrites dans la section 3.1 et que les caractéristiques morphologiques des pycnides et des conidies coïncident avec celles décrites dans la section 4.1.3, on peut être en présence de *P. citricarpa*. Cependant, étant donné que les pycnides et les conidies de *P. citricarpa* sont très semblables à celles de *P. citriasiana*, pathogène récemment décrit de *C. maxima* (Wulandari *et al.*, 2009), l'identité de *P. citricarpa* ne peut être confirmée avec certitude que par l'application des méthodes de diagnostic décrites plus loin (figure 4). La méthode de diagnostic A (isolement et mise en culture) est employée pour l'identification de *P. citricarpa* sur les fruits d'agrumes, mais peut aussi être utilisée sur les feuilles, rameaux et pédoncules, tandis que la méthode B (analyse moléculaire) ne s'applique qu'aux fruits d'agrumes.

Si après avoir appliqué la méthode A, on constate que les caractéristiques des colonies obtenues par culture sur gélose de cerise (CHA) et sur gélose d'avoine (OA) ne coïncident pas avec celles de *P. citricarpa* (voir section 4.1.4, conditions i), ii), iii) et iv)) alors, le matériel végétal est considéré comme exempt de *P. citricarpa*. Pour les colonies ayant des caractéristiques semblables à celles de *P. citricarpa* qui ne produisent pas de pycnides ~~mûres~~ dans les 14 jours, il est recommandé de procéder à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) classique et au séquençage ~~des espaces intergéniques transcrits (de l'ITS (Internal Transcribed Spacer))~~ (voir la section 4.2.1) ou à une PCR en temps réel (voir la section 4.2.2). Cependant, l'isolement et la culture de l'organisme sur des milieux appropriés, suivis d'une analyse moléculaire directe des cultures, constituent une procédure longue, qui n'est donc pas souhaitable pour un diagnostic des envois, pour ~~lequel~~ ~~laquelle~~ la rapidité est une exigence essentielle.

On dispose de deux méthodes de PCR (classique et en temps réel) pour la détection et l'identification de *P. citricarpa* sur les fruits d'agrumes (voir les sections 4.2.1 et 4.2.2). Cependant, on a observé récemment, lors des analyses habituelles d'un fruit de *C. maxima* présentant ~~des~~ symptômes caractéristiques, que la méthode de PCR en temps réel mise au point par Gent-Pelzer *et al.* (2007) ne donnait aucune amplification (J.P. Meffert, communication personnelle). La raison en est que les symptômes semblables à ceux de la maladie des taches noires des agrumes observés sur *C. maxima* sont causés par *P. citriasiana*, une espèce étroitement apparentée à *P. citricarpa*, décrite depuis peu (Wulandari *et al.*, 2009). Comme on ne sait pas si *P. citricarpa* est capable de provoquer les symptômes caractéristiques sur *C. maxima*, on devrait également soumettre les fruits de cette espèce présentant des symptômes analogues à ceux de la maladie des taches noires à des analyses visant à établir l'éventuelle présence de *P. citricarpa*.

La méthode de PCR en temps réel mise au point par Gent-Pelzer *et al.* (2007) (voir section 4.2.2) peut être utilisée pour établir un diagnostic positif de *P. citricarpa*, car elle ne va donner de signal positif qu'en présence de *P. citricarpa*, et non pas en présence de *P. citriasiana* ou de *P. capitalensis*. En revanche, la méthode de la PCR classique (décrite dans la section 4.2.1) va donner une amplification en présence de *P. citricarpa* ou de *P. citriasiana*. En pareil cas, après obtention d'un signal positif, il faudrait procéder à l'isolement et à la mise en culture, (voir section 4.1), à la PCR en temps réel (voir section 4.2.2) ou au séquençage de ~~la portion~~ ~~l'ITS~~ (voir section 4.2.1) pour faire la distinction entre les deux espèces. On ne dispose pas de données sur les réactions de *P. citrichinaensis*, récemment décrite en Chine, à ces analyses moléculaires.

~~Il est à~~ ~~convient de~~ noter que des acervules du champignon commun endophyte *Colletotrichum* spp. peuvent parfois être présents et avoir un aspect semblable à celui des pycnides de *P. citricarpa*.

Cependant, *Colletotrichum* spp. peut être différencié par la présence de soies dans les acervules, la production, dans des conditions d'humidité ambiante, de masses de conidies de couleur rose ou saumon à la surface des lésions et la morphologie de leurs conidies (Kotzé, 2000).

Dans le présent protocole, les méthodes (y compris les références à des noms de marques) sont décrites comme elles ont été publiées, car les données qu'elles contiennent définissent le degré de spécificité initialement obtenu. Les procédures de laboratoire présentées peuvent être mises aux normes des divers laboratoires, sous réserve qu'elles soient validées de façon appropriée.

#### 4.1 Méthode A: Isolement et mise en culture de *P. citricarpa*

Les lésions des fruits sont prélevées à l'aide d'un perce-bouchon ou d'un scalpel, plongées dans de l'éthanol à 70% pendant 30 secondes, leur surface est désinfectée à l'hypochlorite de sodium à 1% (NaOCl) pendant 2 minutes, rincée deux fois à l'eau distillée stérile et séchée au papier absorbant (Peres *et al.*, 2007). Les lésions doivent, dans l'optique d'un accroissement de la fréquence des isollements, être prélevées avec soin et tout tissu asymptomatique doit être enlevé avant que les échantillons ne soient déposés sur plaque (N.A. Peres, communication personnelle). Ensuite, les lésions sont placées en conditions aseptiques dans des boîtes de Petri (9 cm de diamètre) avec de la CHA ou sur Potato Dextrose Agar (PDA: de la gélose dextrosée de pomme de terre-dextrose (PDA)) (voir section 4.1.1) ou de la PDA à laquelle ont été ajoutés 50 µg/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine (OEPP/EPPO, 2003). Si de la PDA est employée et que des cultures sombres à croissance lente semblables à *P. citricarpa* s'y développent, elles sont ensuite transférées à la fois dans des boîtes contenant de la CHA pour l'évaluation de la vitesse de croissance des colonies et dans des boîtes contenant de la gélose d'avoine (OA) (voir section 4.1.1) pour l'évaluation de la production de pigment jaune. Simultanément, les cultures devraient être placées sur milieu PDA devraient être placées sous éclairage ultraviolet proche à 22 °C afin de favoriser l'induction de la formation de pycnides. Les cultures qui: i) ont une croissance lente sur CHA (voir section 4.1.2); ii) produisent les pycnides et les conidies caractéristiques de *P. citricarpa* (voir section 4.1.2); et iii) produisent un pigment jaune sur OA – bien que tous les isolats de *P. citricarpa* ne produisent pas ce pigment sur OA (Baayen *et al.*, 2002) – sont identifiées comme appartenant à *P. citricarpa*.

La méthode présente les inconvénients suivants: a) *P. citricarpa* est un champignon à croissance relativement lente et qui est souvent supplanté par d'autres champignons dans la culture (par exemple *C. gloeosporioides*) (Peres *et al.*, 2007) car aucun des milieux de culture employés n'est sélectif pour *P. citricarpa*, et b) c'est une méthode qui demande du temps – 7 à 14 jours pour la production de pycnides.

##### 4.1.1 Milieux de culture

*Gélose de cerise (CHA)*. Pour obtenir du jus de cerise, il faut faire bouillir 1 kg de cerises équeutées et dénoyautées dans 1 litre d'eau du robinet pendant environ 2 heures. Filtrer l'extrait sur étamine, mettre en bouteille, stériliser pendant 30 minutes à 110 °C (pH 4.5) et conserver jusqu'à utilisation. Dans une bouteille contenant 0,8 litre d'eau distillée, ajouter 20 grammes de gélose technique n° 3 et stériliser le mélange pendant 15 minutes à 121 °C. Immédiatement après la stérilisation, ajouter 0,2 litre de l'extrait de cerise stérilisé, bien mélanger et stériliser pendant 5 minutes à 102 °C (Gams *et al.*, 1998).

*Gélose d'avoine (OA)*. L'OA est commercialisée. On peut aussi la préparer selon la méthode suivante: placer 30 grammes de flocons d'avoine dans une étamine et suspendre le tout dans un récipient contenant de l'eau du robinet. Après avoir fait bouillir à petit feu pendant environ 2 heures, presser les flocons, les filtrer sur l'étamine et stériliser l'extrait pendant 15 minutes à 121 °C. Dans une bouteille contenant 1 litre d'extrait d'avoine, ajouter 20 grammes de gélose technique n° 3 et stériliser le mélange pendant 15 minutes à 121 °C (Gams *et al.*, 1998).

*Potato Dextrose Agar (PDA: Gélose dextrosée de pomme de terre-dextrose (PDA))*. La PDA est commercialisée. On peut aussi la préparer selon la méthode décrite par Hawksworth *et al.* (1995).

### 4.1.2 Caractéristiques des cultures

Les colonies de *P. citricarpa* se développent lentement sur la CHA; elles ont un diamètre moyen de 25 à 30 mm au bout de 7 jours à 22 °C dans l'obscurité (Baayen *et al.*, 2002). Sur la PDA, les colonies ont des bordures irrégulières, elles-mêmes entourées d'une zone translucide beaucoup plus large de mycélium immergé incolore (figure 5A). Le centre de la colonie est foncé et comporte du mycélium aérien gris à glauque, souvent sous la forme de nombreuses petites touffes. L'envers de la colonie est très sombre au centre et entouré de zones sépia gris et beige (Baayen *et al.*, 2002). Les stromas commencent à se développer au bout de 7 à 8 jours, tandis que des pycnides mûres contenant des conidies sont généralement produites en 10 à 14 jours (figure 5B). Sur l'OA, au bout de 14 jours à 25 °C dans l'obscurité, les colonies sont plates, en expansion, gris-olivâtre, devenant gris-olivâtre clair vers la bordure, avec du mycélium aérien épars à modéré (Glienke *et al.*, 2011). Sur l'OA, un pigment jaune caractéristique qui diffuse dans le milieu de culture autour de la colonie (figure 6D, rangée supérieure) est souvent produit, cependant, les isolats de *P. citricarpa* ne produisent pas tous un pigment jaune (Baayen *et al.*, 2002). Ce pigment jaune n'est produit qu'en faibles quantités sur la CHA et la PDA.

### 4.1.3 Morphologie

Les données publiées au sujet de la morphologie de *P. citricarpa* sont très discordantes, en partie en raison de la confusion qui règne sur l'identité des diverses espèces de *Phyllosticta* associées aux *Citrus* (Baayen *et al.*, 2002; Glienke *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Wulandari *et al.*, 2009). Les caractéristiques morphologiques et morphométriques suivantes s'appliquent aux fructifications et aux spores de *P. citricarpa* produites principalement en culture; elles sont issues des données de Sutton et Waterston (1966) et de van der Aa (1973), révisées et modifiées par Baayen *et al.* (2002).

*Ascocarpes*. Les pseudothèces se forment sur ~~la litière de feuilles~~ ~~les feuilles mortes~~ tombées au sol ~~en décomposition~~ et dans les cultures (De Holanda Nozaki, 2007) à l'exclusion de tout autre matériel végétal (par exemple les feuilles en place, les fruits). Ils sont solitaires ou agrégés, globuleux à piriformes, immergés, brun sombre à noir, mesurent 125 à 360 µm, sont pourvus d'un seul ostiole papillé à rostré et leur surface est souvent couverte d'excroissances hyphales irrégulières. La ~~couche~~ ~~constituant la~~ paroi externe est composée de cellules anguleuses à parois brunes épaissies, tandis que la couche intérieure est composée de cellules anguleuses à globuleuses à parois plus fines incolores.

*Asques*. Fasciculés, bituniqués, claviformes, à huit spores, avec un apex arrondi. Ils mesurent 40 à 65 µm × 12 à 15 µm avant la rupture de la paroi externe, ~~et~~ deviennent cylindriques-claviformes et s'étendent sur une longueur de 120 à 150 µm avant la déhiscence.

*Ascospores*. Courtes, sans cloison, hyalines, cylindriques, renflées au centre, légèrement incurvées, 12- ~~à~~ 16 µm × 4,5 à 6,5 µm, hétéropolaires, avec des extrémités obtuses inégales. L'extrémité supérieure, plus petite, a un appendice mucoïde tronqué, non cellulaire, en forme de capuchon de 1 à 2 µm de long, et l'extrémité inférieure a un appendice pointu ou hérissé de 3 à 6 µm de long.

*Pycnides*. Formées sur les fruits, les feuilles en place, les rameaux morts et ~~les feuilles mortes tombées au sol~~ ~~la litière de feuilles~~ ~~en décomposition~~, ainsi que dans les cultures. Elles sont solitaires ou parfois agrégées, globuleuses, immergées, brun moyen à foncé, et mesurent 70 à 330 µm de diamètre. La paroi ~~pycniennne~~ ~~de la pycnide~~ a une épaisseur de quatre cellules au maximum, ~~est~~ sclérotioïde à l'extérieur, pseudoparenchymateuse à l'intérieur, ~~avec~~ ostiole plus foncé, légèrement papillé, circulaire et de 10 à 15 µm de diamètre.

*Conidies*. ~~Obovoïdes~~ ~~Obovales~~ à elliptiques, hyalines, sans cloison, à plusieurs guttules, 9,4 à 12,7 µm × (5,0- ~~à~~ 8,5) µm, pourvues d'un appendice subulé incolore, ~~et~~ entourées d'une couche incolore et gélatineuse à peine visible (~~← de moins d'1,5 µm d'épaisseur~~) (figures 5C, 5D, 6A). Elles sont formées ~~comme de~~ blastospores sur des conidiophores hyalins, unicellulaires, ~~et~~ cylindriques mesurant jusqu'à 9 µm de longueur.

*Stade spermatien*. Décrit sous la forme du genre *Leptodothiorella*, formé sur des hôtes et en culture pure. Spermaties en formes d'haltère, rarement cylindriques, droites ou légèrement incurvées, ~~de~~ 5 à 8 µm × 0,5- ~~à~~ 1 µm.



#### 4.1.4 Comparaison entre les caractéristiques des cultures et les caractéristiques morphologiques de *P. citricarpa* et celles d'espèces analogues de *Phyllosticta*

Les cultures de *P. citricarpa* sont très semblables à celles de *P. citriasiana* (Wulandari *et al.*, 2009) et de *P. capitalensis* qui est un endophyte non pathogène pour les agrumes (Baayen *et al.*, 2002; Glienke *et al.*, 2011).

Il est possible d'identifier les colonies de *P. citricarpa* en associant les éléments suivants:

- 1) la croissance de la colonie sur CHA (mais il peut y avoir un chevauchement entre les taux de croissance)
- 2) l'épaisseur de la couche mucoïde qui entoure les conidies (figures 5C, 5D, 6A, 6B, 6C)
- 3) la longueur de l'appendice conidien
- 4) la présence de pigment jaune sur OA, sachant que les isolats de *P. citricarpa* ne produisent pas tous de pigment jaune (Baayen *et al.*, 2002; Wulandari *et al.*, 2009).

On trouvera au tableau 1 des informations détaillées sur les caractéristiques distinctives de *P. citricarpa* et des espèces apparentées. En outre, *P. citrichinaensis* peut être différenciée de *P. citricarpa* par la plus grande longueur de son appendice conidien (qui est de 14 à 26 µm) (Wang *et al.*, 2012).

**Tableau 1.** Principales caractéristiques des cultures et principales caractéristiques morphologiques de *Phyllosticta citricarpa*, *Phyllosticta citriasiana* et *Phyllosticta capitalensis* (Baayen *et al.*, 2002; Wulandari *et al.*, 2009)

| Caractéristique  | <i>P. citricarpa</i> | <i>P. citriasiana</i> | <i>P. capitalensis</i> |
|--|----------------------|-----------------------|------------------------|
| Dimensions moyennes des conidies (µm)                  | 10 à 12 × 6 à 7,5    | 12 à 14 × 6 à 7       | 11 à 12 × 6,5 à 7,5    |
| Épaisseur de la couche mucoïde (µm)                    | <1,5                 | 1                     | 1,5 à 2,5 (à 3)        |
| Longueur de l'appendice apical (µm)                    | 4 à 6 (à 10)         | 7 à 10 (à 14)         | 4 à 6 (à 10)           |
| Dimensions moyennes des ascospores (µm)                | 12 à 16 × 4,5 à 6,5  | Non connue            | 15 à 17,5 × 6,5 à 7,5  |
| Dimensions moyennes des spermaties (µm)                | 5 à 8 × 0,5 à 1      | 3 à 5 × 1 à 2         | 7 à 10 × 1,8 à 2,5     |
| Diamètre moyen des colonies (mm)*                      | 25 à 30              | 18 à 20               | >40                    |
| Température maximale de croissance (°C)                | 30 à 36              | 30 à 33               | 30 à 36                |
| Production d'un pigment jaune sur gélose d'avoine (OA) | Oui†                 | Non                   | Non                    |

\* Sur gélose de cerise (CHA) au bout de 7 jours à 22 °C dans l'obscurité.

† Il est à convenir de noter que les isolats de *P. citricarpa* ne produisent pas tous un pigment jaune.

## 4.2 Méthode B: analyses moléculaires

Différentes méthodes moléculaires ont été élaborées pour l'identification de *P. citricarpa* directement sur des cultures pures et des lésions de fruits (Bonants *et al.*, 2003; Gent-Pelzer *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2006, 2012; Peres *et al.*, 2007; Stringari *et al.*, 2009). Deux méthodes, une analyse par PCR classique, mise au point par Peres *et al.* (2007), et une analyse par PCR en temps réel, élaborée par Gent-Pelzer *et al.* (2007), sont décrites pour l'identification de *P. citricarpa*. Il est à convenir de noter que la méthode de PCR en temps réel va générer un signal positif pour chaque lésion de la maladie des taches noires des agrumes sur fruits, alors que la méthode de PCR classique peut parfois donner des résultats non probants. Il est également à convenir de noter que l'on ne dispose pas de données sur des réactions positives lors d'analyses moléculaires de *P. citrichinaensis*, récemment décrite sur des fruits en Chine.

### 4.2.1 Identification de *P. citricarpa* par PCR classique

La spécificité (spécificité analytique) a été évaluée dans une étude portant sur 36 isolats de *P. citricarpa*, 13 isolats de *P. capitalensis* et des isolats d'organismes nuisibles courants des agrumes, notamment *Alternaria alternata*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe citri*, *Mycosphaerella citri* et *Penicillium digitatum*. Seule *P. citricarpa* a donné une réaction positive.

La sensibilité (sensibilité analytique; limite de détection) est de 1 pg d'ADN/μl (Peres *et al.*, 2007). Cette méthode va amplifier l'ADN soit de *P. citricarpa*, soit de *P. citriasiana*. On dispose de trois méthodes pour faire la distinction entre les deux espèces après la PCR classique: isolement et mise en culture (voir la section 4.1), ~~test de essai~~ PCR en temps réel (voir la section 4.2.2) et séquençage ~~des régions de l'ITS~~ (voir la section 4.2.3).

#### 4.2.1.1 Informations générales

Ce protocole a été mis au point par Peres *et al.* (2007). Le mycélium ou les lésions ~~des fruits~~ prélevées ~~sur fruits~~ constituent la source d'acide nucléique. L'analyse est conçue pour amplifier une partie de la région ITS afin de produire un amplicon de 300 paires de base (pb). Les ~~oligonucléotides~~ amorces ~~d'oligonucléotides~~ employées sont les suivantes:

Amorce directe: GCN (5'-CTG AAA GGT GAT GGA AGG GAG G -3')

Amorce inverse: GCMR (5'-CAT TAC TTA TCG CAT TTC GCT GC -3').

Pour l'amplification par la PCR, on utilise du MasterMix Eppendorf®<sup>1</sup> à 2,5× contenant de la Taq DNA polymerase et un tampon de réaction contenant du Mg<sup>2+</sup> et des nucléotides. On utilise de l'eau de qualité «biologie moléculaire» pour préparer les mélanges de réaction: cette eau devrait être purifiée (déionisée ou distillée), stérile (passée à l'autoclave ou filtrée à 0,45 μm) et exempte de nucléases. L'amplification est effectuée sur un thermocycleur de type Peltier à couvercle chauffant.

#### 4.2.1.2 Méthodes

##### *Extraction et purification de l'acide nucléique*

L'ADN est extrait soit des cultures de 7 jours du champignon sur bouillon de pomme de terre-dextrose, soit ~~d'une de~~ lésions du fruit. Dans le second cas, on prélève le tissu symptomatique en le débarrassant au maximum du mésocarpe (albedo) et de l'écorce externe.

On extrait l'ADN du mycélium en utilisant les trousse d'extraction de l'ADN commercialisées (par exemple DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), QuickPick SML Plant DNA (Bio-Nobile), KingFisher® isolation robot [Thermo]) et en suivant les instructions du fabricant. Pour l'extraction de l'ADN ~~d'une de~~ lésions ~~de du~~ fruit, on peut suivre le protocole ci-après d'extraction de l'ADN par lyse alcaline (Klimyuk *et al.*, 1993) suivi d'une purification à l'aide d'une languette, car c'est la méthode qui s'est avérée être la plus efficace (Peres *et al.*, 2007).

*Méthode d'extraction de l'ADN par lyse alcaline.* Placer du tissu symptomatique de fruit dans des microtubes stériles de 2 ml contenant 40 μl de NaOH 0,25 M et incubé dans un bain d'eau bouillante (100 °C) pendant 30 ~~secondes~~ (période critique). Neutraliser le contenu des tubes en ajoutant 40 μl de HCl 0,25 M, 20 μl de Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0 et 0,25% (v/v) de Nonidet P-40, et remettre les tubes dans le bain d'eau bouillante pendant 2 ~~minutes~~. Le matériel obtenu peut être soit utilisé directement pour la purification par la méthode de la languette (voir ci-après), soit stocké à 4 °C pendant plusieurs semaines. Avant de procéder à la purification après stockage, incubé les échantillons dans un bain d'eau bouillante pendant 2 ~~minutes~~.

*Méthode de la languette pour la purification de l'ADN.* Ajouter 150 μl d'éthanol à 100% et un petit morceau (languette) de plaque de cellulose pour chromatographie sur couche mince au microtube de 2 ml après la lyse alcaline (voir plus haut). Coucher les tubes, les mettre sur glace et agiter pendant 30 ~~minutes~~. Aspirer le liquide et ajouter 500 μl de tampon de lavage (10× (Tris, acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) Na<sub>2</sub> et NaClO, pH 7,0) et éthanol à 95%) dilué à 25% et retourner les tubes pour en mélanger le contenu. Procéder deux fois au lavage. Placer les languettes dans de nouveaux tubes et les sécher sous vide. Coucher ensuite les tubes et ajouter à chacun d'entre eux 50 μl de tampon Tris-EDTA. Après incubation pendant 5 ~~minutes~~, centrifuger les tubes pendant

<sup>1</sup> L'emploi de la marque Eppendorf® pour l'amplification par la PCR dans ce protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de celle-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs du présent protocole et ne constitue pas une approbation par la CMP du produit chimique, du réactif ni du matériel cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

10 **secondes**, enlever et jeter les languettes et récupérer l'ADN. L'ADN purifié peut être utilisé immédiatement ou stocké à 4 °C jusqu'au lendemain ou à -20 °C pendant plus longtemps.

Il est également possible d'extraire l'ADN des lésions des fruits en utilisant les trousse d'extraction de l'ADN qui sont commercialisées, en suivant les instructions du fabricant.

### **Amplification en chaîne par polymérase (PCR)**

Le mélange principal (concentration ~~par~~ pour une seule réaction, 20 µl) est composé des réactifs suivants:

| Réactif  | Concentration de travail | Volume par réaction (µl) | Concentration finale                                    |
|--|--------------------------|--------------------------|---|
| Eau de qualité «-biologie moléculaire-»                                  | s.o.                     | 0,4                      | s.o.  |
| Eppendorf®1 MasterMix 2,5× (Taq DNA polymerase à 0,06 U/µl)              | 2,5×                     | 8,0                      | 1×<br>(Taq 0,024 U/µl)                                  |
| Taq reaction buffer 2,5× (4 mM Mg <sup>2+</sup> , 500 µM de chaque dNTP) | 2,5×                     | 8,0                      | 1×<br>(1,6 mM Mg <sup>2+</sup> , 200 µM de chaque dNTP) |
| Amorce GCN   | 10 µM                    | 0,8                      | 0,4 µM  |
| Amorce GCMR  | 10 µM                    | 0,8                      | 0,4 µM  |
| Total partiel  | -                        | 18,0                     | -   |
| ADN  | -                        | 2,0                      | -   |
| Total  | -                        | 20,0                     | -   |

Les paramètres de ~~eyelage~~ cycles de la PCR sont les suivants: dénaturation à 94 °C pendant 2 **minutes**; 39 cycles à 94 °C pendant 30 **secondes**, 64 °C pendant 30 **secondes** et 72 °C pendant 1 **minute**; puis 10 **minutes** supplémentaires à 72 °C. Un produit de la PCR de 300 pb indique la présence d'ADN de *P. citricarpa*.

#### **4.2.1.3 Informations essentielles concernant la procédure**

Après amplification, mélanger 10 µl du mélange réactif et 2 µl de tampon de charge ADN 6× (Promega) et charger avec un marqueur de poids moléculaire (100 bp DNA Ladder) sur gel d'agarose à 1,5%, séparer par électrophorèse, colorer au bromure d'éthidium ou avec d'autres réactifs, et observer et photographier sous lumière UV (Sambrook *et al.*, 1989).

De l'ADN d'une souche de référence de *P. citricarpa* (témoin positif) doit être inclus en tant qu'échantillon supplémentaire, ce qui permet de s'assurer que l'amplification a bien eu lieu. L'amplification par PCR doit aussi être effectuée sur un échantillon dans lequel l'extrait d'ADN de *P. citricarpa* a été remplacé par un extrait d'ADN d'autres espèces apparentées ou sur un échantillon d'exocarpe sain (témoin négatif). Le remplacement d'un échantillon par de l'eau (témoin de réaction) permet de détecter une éventuelle contamination des réactifs et d'éventuels faux positifs. ~~Pour permettre de détecter une éventuelle contamination des réactifs et les d'éventuels faux positifs, il faut remplacer un échantillon doit être remplacé par de l'eau (témoin de réaction).~~ Il est conseillé de prévoir un témoin interne d'amplification afin de suivre l'inhibition.

#### **4.2.2 Identification de *P. citricarpa* par PCR en temps réel**

La spécificité (spécificité analytique) a été évaluée avec la souche de référence CBS 111.20 de *P. citricarpa* (représentative de 10 isolats de *P. citricarpa* (groupe I de séquences ITS); Baayen *et al.*, 2002), la souche de référence GC14 de *P. capitalensis* (représentative de 22 isolats de *P. capitalensis* (groupe II de séquences ITS); Baayen *et al.*, 2002), 12 autres organismes nuisibles aux agrumes (*Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Colletotrichum* spp.), *Phyllosticta artocarpina* et *Guignardia bidwellii*. Seule *P. citricarpa* a généré une réaction positive. La sensibilité (sensibilité analytique;

limite de détection) est de 10 fg d'ADN par réaction et la sensibilité du diagnostic est de 100 pour cent (Gent-Pelzer *et al.*, 2007).

#### 4.2.2.1 Informations générales

Le protocole a été mis au point par Gent-Pelzer *et al.* (2007). La source d'acide nucléique est constituée par le mycélium ou par les lésions prélevées de sur les fruits. L'essai vise à amplifier une partie de la région ITS générant afin de produire un amplicon de 69 pb. Les oligonucléotides amorces d'oligonucléotides utilisées sont les suivantes:

Amorce directe: GcF1 (5'-GGT GAT GGA AGG GAG GCC T-3')

Amorce inverse: GcR1 (5'-GCA ACA TGG TAG ATA CAC AAG GGT-3').

La sonde d'hydrolyse GcP1 (5'-AAA AAG CCG CCC GAC CTA CCT TCA-3') est marquée à l'extrémité 5' au colorant fluorescent émetteur FAM (6-carboxy fluorescéine) et modifiée à l'extrémité 3' par le colorant extincteur TAMRA (6-carboxytétraméthylrhodamine) ou Eclipse® Dark Quencher (Eurogentec).

Pour l'amplification par PCR, on utilise du Premix Ex Taq Master Mix (Takara)<sup>2</sup> 2× contenant de la Taq polymérase et un tampon de réaction contenant du MgCl<sub>2</sub> et des nucléotides. On ajoute du colorant de référence ROX Reference Dye (~~50×~~ concentré 50×, Takara) au Premix Ex Taq Master Mix. On utilise de l'eau de qualité «biologie moléculaire» pour préparer les mélanges de réaction: cette eau devrait être purifiée (déionisée ou distillée), stérile (passée à l'autoclave ou filtrée à 0,45 µm) et exempte de nucléases. Pour procéder à l'amplification, on utilise un thermocycleur pour PCR en temps réel.

#### 4.2.2.2 Méthodes

##### *Extraction et purification de l'acide nucléique*

L'ADN est extrait soit de bouchons de mycélium (0,5 cm de diamètre) prélevés sur les bords d'une colonie obtenue par culture sur CHA (voir section 4.1.1) à 22 °C dans l'obscurité, soit de lésions de prélevées sur fruits. Les lésions sont prélevées sur la peau et débarrassées autant que possible de l'albedo et des tissus de la peau qui les entourent. Les bouchons de mycélium ou les lésions sont coupés en petits morceaux et placés dans un tube de microcentrifugeuse de 1,5 ml à bouchon plat fixé contenant une bille d'acier inoxydable (3,2 mm de diamètre) et 125 µl de tampon d'extraction (0,02 M de tampon phosphate salin (PBS), Tween 20 à 0,5%, polyvinylpyrrolidone (PVP) à 2%, albumine de sérum bovin à 0,2 %). Le tube est secoué dans un amalgamateur à billes pendant 80 secondes à 5 000 tours par minutes (r.p.m). Le mélange est centrifugé pendant 5 secondes à la vitesse maximale (16 100 g) dans une microcentrifugeuse et 75 µl du surnageant obtenu sont utilisés pour l'extraction de l'ADN. Il est possible d'extraire l'ADN en utilisant les trousseaux d'extraction de l'ADN qui sont commercialisés, en suivant les instructions du fabricant. Le volume final de la solution d'ADN est de 50 µl. L'ADN est encore purifié dans des colonnes de centrifugation remplies de PVP. On prépare les colonnes en remplissant des colonnes de séparation Axygen Multi-Spin (Dispolab) avec 0,5 cm de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), en plaçant l'ADN dans un tube de réaction ~~et~~ vide, en procédant à un double lavage avec 250 µl d'eau de qualité «biologie moléculaire» et en centrifugeant la colonne pendant 5 minutes à 4 000 g. La suspension d'ADN est appliquée à une colonne remplie de PVP et centrifugée pendant 5 minutes à 4 000 g. La fraction qui s'écoule est utilisée pour la PCR. L'ADN purifié peut être utilisé immédiatement ou stocké à 4 °C jusqu'au lendemain ou à -20 °C pendant plus longtemps. Le-La PVP est utilisé e comme composé soluble dans le tampon d'extraction. La PVPP est de la PVP réticulée et elle est utilisée comme matériau de filtration insoluble.

<sup>2</sup> L'emploi de la marque Takara pour le Premix Ex Taq Master Mix 2x dans ce protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de celle-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs du présent protocole et ne constitue pas une approbation par la CMP du produit chimique, du réactif ni du matériel cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.



**Amplification en chaîne par polymérase**

Le mélange principal (concentration ~~par~~ pour une seule réaction, 30 µl) est composé des réactifs suivants:

| Réactif   | Concentration de travail | Volume par réaction (µl) | Concentration finale |
|---|--------------------------|--------------------------|----------------------|
| Eau de qualité «-biologie moléculaire-»                                   | s.o.                     | 13,1                     | s.o.                 |
| Premix Ex Taq Master Mix <del>2x</del> (Takara) <sup>2</sup><br><u>2x</u> | 2x                       | 15,0                     | 1x                   |
| Amorce GcF1   | 50 µM                    | 0,15                     | 0,25 µM              |
| Amorce GcR1   | 50 µM                    | 0,15                     | 0,25 µM              |
| Sonde GcP1  | 5 µM                     | 0,6                      | 0,10 µM              |
| Total partiel   | -                        | 29,0                     | -                    |
| ADN   | -                        | 1,0                      | -                    |
| Total   | -                        | 30,0                     | -                    |

On peut ajouter le cas échéant 0,6 µl de colorant de référence ROX 50x. On utilise alors 12,5 µl d'eau de qualité PCR.

Les paramètres des ~~eyelage cycles pour de~~ la PCR sont les suivants: 95 °C pendant 10 minutes, 40 cycles ~~de à~~ 95 °C pendant 15 secondes et 60 °C pendant 1 minute. La valeur seuil de 40 pour les cycles a été obtenue avec l'ABI PRISM® 7700 or 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) et les matériaux et réactifs utilisés comme indiqué plus haut. Il ~~est à~~ convient de noter que:

- La courbe d'amplification devrait être exponentielle.
- Un échantillon sera considéré comme positif s'il produit une valeur de Ct <40, sous réserve que les témoins de contamination soient négatifs.
- Un échantillon sera considéré comme négatif s'il produit une valeur de Ct ≥ 40, sous réserve que les témoins d'inhibition de test et d'extraction soient positifs.

La valeur seuil des cycles doit être vérifiée dans chaque laboratoire lorsque l'on procède au test pour la première fois.

**4.2.2.3 Informations essentielles sur la procédure**

De l'ADN d'une souche de référence de *P. citricarpa* (témoin positif) doit être ajouté en tant qu'échantillon supplémentaire, ce qui permet de s'assurer que l'amplification a bien eu lieu. L'amplification par PCR doit aussi être effectuée sur un échantillon dans lequel l'extrait d'ADN de *P. citricarpa* a été remplacé par l'extrait d'ADN d'une autre espèce apparentée (par exemple *P. citriasiana*) ou sur un échantillon d'exocarpe sain (témoin négatif Le remplacement d'un échantillon par de l'eau (témoin de réaction) permet de détecter une éventuelle contamination des réactifs et d'éventuels faux positifs.). ~~Un échantillon doit être remplacé par de l'eau, ce qui permet de suivre~~ Pour permettre de détecter une éventuelle contamination des réactifs et de d'éventuels faux positifs éventuels, un échantillon doit être remplacé par de l'eau (témoin de réaction).

Pour vérifier les fausses réactions négatives provoquées par l'inhibition de la réaction d'amplification, on peut ajouter aux mélanges de réaction 12,5 fg d'un témoin interne d'amplification (IAC), 75 nM d'amorce directe en tant que témoin interne d'amplification (FIAC) (5'-TGG CCC TGT CCT TTT ACC AG-3'), 75 nM d'amorce inverse en tant que témoin interne d'amplification (RIAC) (5'-TTT TCG TTG GGA TCT TTC GAA-3'), et 50 nM de sonde d'hydrolyse MGB en tant que témoin interne d'amplification (5'-ACA CAA TCT GCC-3') marqués au colorant fluorescent émetteur VIC™ (Eurogentec) et au colorant extincteur Eclipse® Dark Quencher (Eurogentec).

## 4.2.3 Identification de *P. citricarpa* par séquençage des régions ITS

### 4.2.3.1 Informations générales

L'identité des échantillons positifs obtenus par PCR classique peut être confirmée par séquençage (Baayen *et al.*, 2002). La méthode de séquençage des régions ITS 1 et 2 du gène de l'ARN ribosomique du champignon est décrite ci-après.

Les oligonucléotides amorces ~~oligonucléotidiques~~ sont les suivantes:

Amorce directe: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')

Amorce inverse: ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White *et al.*, 1990)

### 4.2.3.2 Méthodes

#### *Extraction et purification de l'acide nucléique*

L'ADN devrait être extrait d'un bouchon d'1 cm<sup>2</sup> prélevé sur une culture pure de l'isolat à analyser. ~~Une trousse~~ Un kit appropriée d'extraction de l'ADN est utilisée ou bien l'ADN est extrait selon une méthode plus classique, par exemple celle décrite dans Hughes *et al.* (2000). L'ADN extrait devrait être stocké à 4 °C s'il est destiné à une utilisation immédiate ou à -20 °C si l'analyse ne doit pas être pratiquée le jour même.

#### *Amplification en chaîne par polymérase (PCR)*

Le volume total par réaction pour une PCR unique est de 50 µl; et se compose des réactifs suivants:

| Réactif  | Concentration de travail | Volume par réaction (µl) | Concentration finale |
|--|--------------------------|--------------------------|----------------------|
| Eau de qualité «-biologie moléculaire-»                                  | s.o.                     | 37,5                     | s.o.                 |
| PCR reaction buffer 10× (+15 mM MgCl <sub>2</sub> ) (Roche) <sup>3</sup> | 2×                       | 5,0                      | (Taq 0,024 U/µl) 1×  |
| dNTPs  | 10 mM (chaque)           | 4,0                      | 0,8 mM (chaque)      |
| Amorce ITS1  | 10 µM                    | 0,6                      | 0,12 µM              |
| Amorce ITS4  | 10 µM                    | 0,6                      | 0,12 µM              |
| DNA Taq polymerase (Roche) <sup>3</sup>                                  | 5 U/µl                   | 0,3                      | 0,03 U/µl            |
| Total partiel  | -                        | 48,0                     | -                    |
| ADN  | -                        | 2,0                      | -                    |
| Total  | -                        | 50,0                     | -                    |

Les paramètres de ~~eyelage cycles pour de~~ la PCR sont les suivants: 94 °C pendant 30 secondes; 40 cycles ~~de à~~ 94 °C pendant 15 secondes, 55 °C pendant 60 secondes, ~~et~~ 72 °C pendant 30 secondes; ~~et enfin,~~ 72 °C ~~for pendant~~ 5 minutes. La taille de l'amplicon est de 550 pb (Baayen *et al.*, 2002).

#### *Séquençage des amplicons*

5 µl du mélange amplifié sont placés sur gel d'agarose à 1,5%, pour la vérification des réactions positives au test. Les 45 µl restants des réactions positives au test sont purifiés à l'aide d'un kit approprié ~~d'une trousse appropriée~~ de purification pour la PCR, conformément aux instructions du fabricant. Le séquençage est effectué avec une amorce directe ITS1 et une amorce inverse ITS4.

<sup>3</sup> L'emploi de la marque Roche pour le PCR reaction buffer et la DNA Taq Polymerase dans ce protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs du présent protocole et ne constitue pas une approbation par la CMP du produit chimique, du réactif ni du matériel cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

### 4.2.3.3 Informations essentielles sur la procédure

#### *Amplification et analyse*

L'ADN extrait devrait être décongelé si nécessaire. Le mélange réactif devrait être préparé en quantité suffisante pour tester au moins un échantillon de l'isolat inconnu, un témoin positif contenant de l'ADN amplifiable et un témoin négatif rempli d'eau au lieu d'ADN. Les échantillons sont séparés sur un gel d'agarose à 1,5%. Les séquences consensus pour les échantillons de l'essai (à l'exclusion des séquences des amorces) sont comparées à une souche confirmée issue de l'épitype de *P. citricarpa* CBS 127454 (entrée GenBank numéro JF343583) de la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Le degré d'identité devrait se situer entre 99 pour cent ~~and~~ et 100 pour cent.

## 5. Données à conserver

Les données et preuves décrites en détail dans la section 2.5 de la NIMP 27:2006 devraient être conservées.

Dans le cas où d'autres parties contractantes peuvent subir les conséquences négatives des résultats ~~de la diagnose du diagnostic~~, des données et preuves des résultats ~~de la diagnose du diagnostic~~ (en particulier les cultures, lames, photos de structures fongiques, photos de symptômes et signes, photos d'extraits d'ADN et de gels de séparation) devraient être conservées pendant au moins un an.

## 6. Points de contact pour tout complément d'informations

Un complément d'informations sur *P. citricarpa* et les méthodes permettant de la détecter et de l'identifier peut être obtenu auprès de (par ordre alphabétique):

ARC-Plant Protection Research Institute, Biosystematics Division: Mycology, Private Bag x134, Queenswood 0121, South Africa (Dr Mariette Truter; tel.: +27 12 8088281; fax: +27 12 8088297; e-mail: [truter@arc.agric.za](mailto:truter@arc.agric.za)).

Plant Research International, PO Box 26, 6700 AA Wageningen, The Netherlands (Dr Peter J.M. Bonants; tel.: +31 31 7480648; fax +31 31 7418094; e-mail: [peter.bonants@wur.nl](mailto:peter.bonants@wur.nl)).

Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz-ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, Brazil (Dr Marcel B. Spósito; tel.: +55 19 34294190 ext. 4190; fax +55 19 34294414; e-mail: [mbsposito@usp.br](mailto:mbsposito@usp.br)).

University of Florida, Citrus Research and Education Center (CREC), 700 Experiment Station Rd, Lake Alfred, FL 33850, USA (Dr Lavern W. Timmer; tel.: +1 863 9561151; fax: +1 863 9564631; e-mail: [lwtimmer@ufl.edu](mailto:lwtimmer@ufl.edu)).

Une demande de révision d'un protocole de diagnostic peut être présentée par les organisations nationales de la protection des végétaux (ONPV), les organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV), ou les organes subsidiaires de la Commission des mesures phytosanitaires (CMP) au Secrétariat de la CIPV ([ippc@fao.org](mailto:ippc@fao.org)), qui la transmettra au Groupe technique sur l'élaboration des protocoles de diagnostic (GTPD).

## 7. Auteurs et collaborateurs

Le présent protocole a été initialement rédigé par:

Mme Irene Vloutoglou, Benaki Phytopathological Institute, 8, St Delta St, GR-145 61 Kifissia, Athènes, Grèce (tél.: +30 210 8180231; télécopie: +30 210 8077506; courriel: [i.vloutoglou@bpi.gr](mailto:i.vloutoglou@bpi.gr)).

M. Johan Meffert, Plant Protection Service, 15, Geertjesweg, 6706 EA Wageningen, Pays-Bas (tél.: +31 417 496837; télécopie +31 317 421701; courriel: [j.p.meffert@minlnv.nl](mailto:j.p.meffert@minlnv.nl)).

M. Luis E. Diaz, Ministry of Husbandry, Agriculture and Fisheries, General Directorate of Agricultural Services, Mycology Department, Av. Millán 4703, CP 12900, Montevideo, Uruguay (tél.: +598 2 3043992; télécopie: +598 2 3043992; courriel: [ldiaz@mgap.gub.uy](mailto:ldiaz@mgap.gub.uy)).

## 8. Références

- Aa, H.A. van der.** 1973. Studies in *Phyllosticta* I. *Studies in Mycology*, 5: 1–110.
- Agostini, J.P., Peres, N.A., Mackenzie, S.J., Adaskaveg, J.E. et Timmer, L.W.** 2006. Effect of fungicides and storage conditions on postharvest development of citrus black spot and survival of *Guignardia citricarpa* in fruit tissues. *Plant Disease*, 90: 1419–1424.
- Aguilar-Vildoso, C., Baldini, J., Feichtenberger, E., de Goes, A. et Spósito, M.** 2002. *Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos Citros*. Brasília, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal. Projeto CE-MERCOSUL ALA 93/143. 59 pp.
- Baayen, R.P., Bonants, P.J.M., Verkley, G., Carroll, G.C., van der Aa, H.A., de Weerd, M., van Brouwershaven, I.R., Schutte, G.C., Maccheroni Jr, W., Glienke de Blanco, C. et Azevedo, J.L.** 2002. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology*, 92: 464–477.
- Baldassari, R.B., Reis, R.F. et de Goes, A.** 2006. Susceptibility of fruits of the ‘Valência’ and ‘Natal’ sweet orange varieties to *Guignardia citricarpa* and the influence of the coexistence of healthy and symptomatic fruits. *Fitopatologia Brasileira*, 31: 337–341.
- Benson, A.H.** 1895. Some fruit pests: Black spot of the orange. *Agricultural Gazette of New South Wales*, 6: 249–251.
- Bonants, P.J.M., Carroll, G.C., de Weerd, M., van Brouwershaven, I.R. et Baayen, R.P.** 2003. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the Citrus Black Spot fungus, *Guignardia citricarpa*. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 503–513.
- CAB International** 2011. *Guignardia citricarpa*. *Crop Protection Compendium*, édition 2011. Wallingford, UK, CAB International. Disponible à l’adresse: <http://www.cabi.org/isc/?compid=5&dsid=26154&loadmodule=datasheet&page=481&site=144> (dernier accès le 19-08-2014).
- CAB International/OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 1998. *Guignardia citricarpa*. *Distribution maps of quarantine pests for Europe*, no. 204. Wallingford, Royaume-Uni, CAB International.
- De Holanda Nozaki, M.** 2007. Produção de estruturas reprodutivas e efeito do ambiente nos tipos de sintomas produzidos por *Guignardia citricarpa* EM *Citrus* spp. PhD Thesis, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brésil. 85 pp.
- FUNDECITRUS.** 2005. Manual de Pinta Preta. Brazil, Araraquara: Fundo de Defesa da Citricultura. 10 pp. (Boletim Técnico).
- Gams, W., Hoekstra, E.S. et Aptroot, A.** 1998. *CBS course of mycology*, quatrième édition. Baarn/Delft, Pays-Bas, Centraal Bureau voor Schimmelcultures. 165 pp.
- Gent-Pelzer, M.P.E. van, van Brouwershaven, I.R., Kox, L.F.F. et Bonants, P.J.M.** 2007. A TaqMan PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa* on citrus fruit. *Journal of Phytopathology*, 155: 357–363.
- Glienke, C., Pereira, O.L., Stringari, D., Fabris, J., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L., Cunnington, J., Shivas, R.G., Groenewald, J.Z. et Crous, P.W.** 2011. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. *Persoonia*, 26: 47–56.
- Goes, A. de, Baldassari, R.B., Feichtenberger, E., Aguilar-Vildoso, C.I. et Spósito, M.B.** 2000. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot in Brazil. In *Abstracts of the 9th Congress of the International Society of Citriculture*, p. 145. Orlando, Floride, États-Unis, University of Florida.

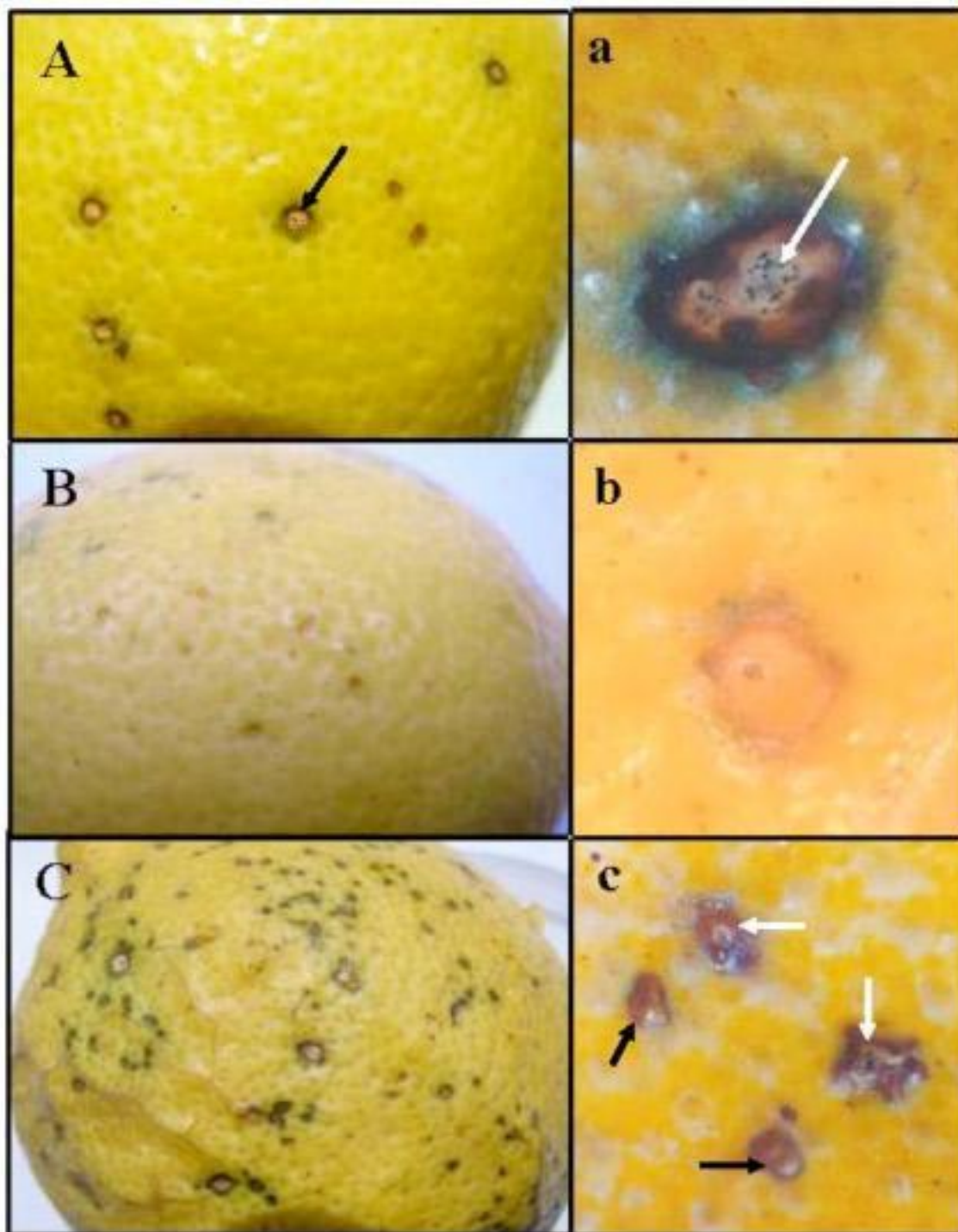


- Goes, A. de.** 2001. Mancha preta dos Citros: Situação atual e perspectivas futuras. *Ciência e Prática, Bebedouro, 20 December 2001*, pp. 5–7.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. et Pegler, D.N.** 1995. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*, huitième édition. Wallingford, Royaume-Uni, CAB International. 650 pp.
- Hughes, K.J.D., Inman, A.J. et Cooke, D.E.L.** 2000. Comparative testing of nested PCR-based methods with bait-plant tests for detecting *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* in infected strawberry roots from fruit crops in the UK. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 30: 533–538.
- Kiely, T.B.** 1949a. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp., the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp., and its relation to black spot of citrus. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 73: 249–292.
- Kiely, T.B.** 1949b. Black spot of citrus. *The Agricultural Gazette of New South Wales*, 60: 17–20.
- Kiely, T.B.** 1960. Speckled blotch of citrus. *The Agricultural Gazette of New South Wales*, 71: 474–476.
- Klimyuk, V.I., Carroll, B.J., Thomas, C.M. et Jones, J.D.** 1993. Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis: technical advance. *Plant Journal*, 3: 493–494.
- Kotzé, J.M.** 1981. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease*, 65: 945–950.
- Kotzé, J.M.** 1996. History and epidemiology of citrus black spot in South Africa. In International Society of Citriculture. *Proceedings of the 8th International Citrus Congress* (Sun City, South Africa, 1966), pp. 1296–1299. Orlando, Floride, États-Unis, ISC.
- Kotzé, J.M.** 2000. Black spot. In L.W. Timmer, S.M. Garnsey et J.H. Graham, sous la direction de. *Compendium of Citrus Diseases*, deuxième édition, pp. 23–25. Saint Paul, Minnesota, États-Unis, APS Press. 128 pp.
- Lee, Y.S. et Huang, C.S.** 1973. Effect of climatic factors on the development and discharge of ascospores of the citrus black spot fungus. *Journal of Taiwan Agricultural Research*, 22: 135–144.
- Meyer, L., Sanders, G.M., Jacobs, R. et Korsten, L.** 2006. A one-day sensitive method to detect and distinguish between the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* and the endophyte *Guignardia mangiferae*. *Plant Disease*, 90: 97–101.
- Meyer, L., Jacobs, R., Kotzé, J.M., Truter, M. et Korsten, L.** 2012. Detection and molecular identification protocols for *Phyllosticta citricarpa* from citrus matter. *South African Journal of Science*, 108.
- NAPPO** (Organisation nord-américaine pour la protection des plantes). 2010. Phytosanitary Alert System: Confirmation of citrus black spot (*Guignardia citricarpa*) in Florida, United States. NAPPO. Disponible à l'adresse: <http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=421> (dernier accès le 26-09-2011).
- OEPP (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes)/CAB International.** 1997. *Guignardia citricarpa*. In I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott & M. Holderness, sous la direction de. *Quarantine pests for Europe*, deuxième édition, pp. 773–781. Wallingford, Royaume-Uni, CAB International. 1440 pp.
- OEPP/EPPO.** 2003. Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés: *Guignardia citricarpa*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 33: 271–280.
- Peres, N.A., Harakava, R., Carroll, G.C., Adaskaveg, J.E. et Timmer, L.W.** 2007. Comparison of molecular procedures for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. *Plant Disease*, 91: 525–531.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. et Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, deuxième édition. Cold Spring Harbor, New York, États-Unis, Cold Spring Harbor Laboratory

Press.

- Schubert, T.S., Dewdney, M.M., Peres, N.A., Palm, M.E., Jeyaprakash, A., Sutton, B., Mondal, S.N., Wang, N.-Y., Rascoe, J. et Picton, D.D.** 2012. First report of *Guignardia citricarpa* associated with citrus black spot on sweet orange (*Citrus sinensis*) in North America. *Plant Disease*, 96: 1225.
- Snowdon, A.L.** 1990. Black spot. In A.L. Snowdon, sous la direction de. *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables, Vol. I. General Introduction and fruits*, pp. 62–63. Londres, Royaume-Uni, Wolfe Scientific Ltd. 302 pp.
- Spósito, M.B.** 2003. Dinâmica temporal e especial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros. PhD Thesis, Universidade de São Paulo, Brésil. 112 pp.
- Spósito, M.B., Amorim, L., Bassanezi, R.B., Bergamin Filho, A. et Hau, B.** 2008. Spatial pattern of black spot incidence within citrus trees related to disease severity and pathogen dispersal. *Plant Pathology*, 57: 103–108.
- Spósito, M.B., Amorim, L., Bassanezi, R.B., Yamamoto, P.T., Felipe, M.R. et Czermainski, A.B.C.** 2011. Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the citrus black spot epidemic in Brazil. *Crop Protection*, 30: 1546–1552.
- Stringari, D., Glienke, C., Christo, D., Maccheroni Jr, W. et Azevedo, J.L.** 2009. High molecular diversity of the fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and new primers for the diagnosis of the citrus black spot. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52: 1063–1073.
- Sutton, B.C. et Waterston, J.M.** 1966. *Guignardia citricarpa*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 85. Wallingford, Royaume-Uni, CAB International.
- Timmer, L.W.** 2004. Evaluating the risks of introduction of citrus black spot into the U.S. In 2004 Annual Report, pp. 36–38. Visalia, Californie, États-Unis, California Citrus Research Board.
- Truter, M., Labuschagne, P.M., Kotzé, J.M., Meyer, L. et Korsten, L.** 2007. Failure of *Phyllosticta citricarpa* pycnidiospores to infect Eureka lemon leaf litter. *Australasian Plant Pathology*, 36: 87–93.
- Wang, X., Chen, G., Huang, F., Zhang, J., Hyde, K.D. et Li, H.** 2012. *Phyllosticta* species associated with citrus diseases in China. *Fungal Diversity*, 52: 209–224.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. et Taylor, J.W.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White, eds. Sous la direction de. *PCR protocols: A guide to methods and applications*, pp. 315–322. San Diego, Californie, Academic Press. 482 pp.
- Wulandari, N.F., To-anun, C., Hyde, K.D., Duong, L.M., de Gruyter, J., Meffert, J.P., Groenewald, J.Z. et Crous, P.W.** 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Diversity*, 34: 23–39. Disponible à l'adresse <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD34-2.pdf> (dernier accès le 19-08-2014).

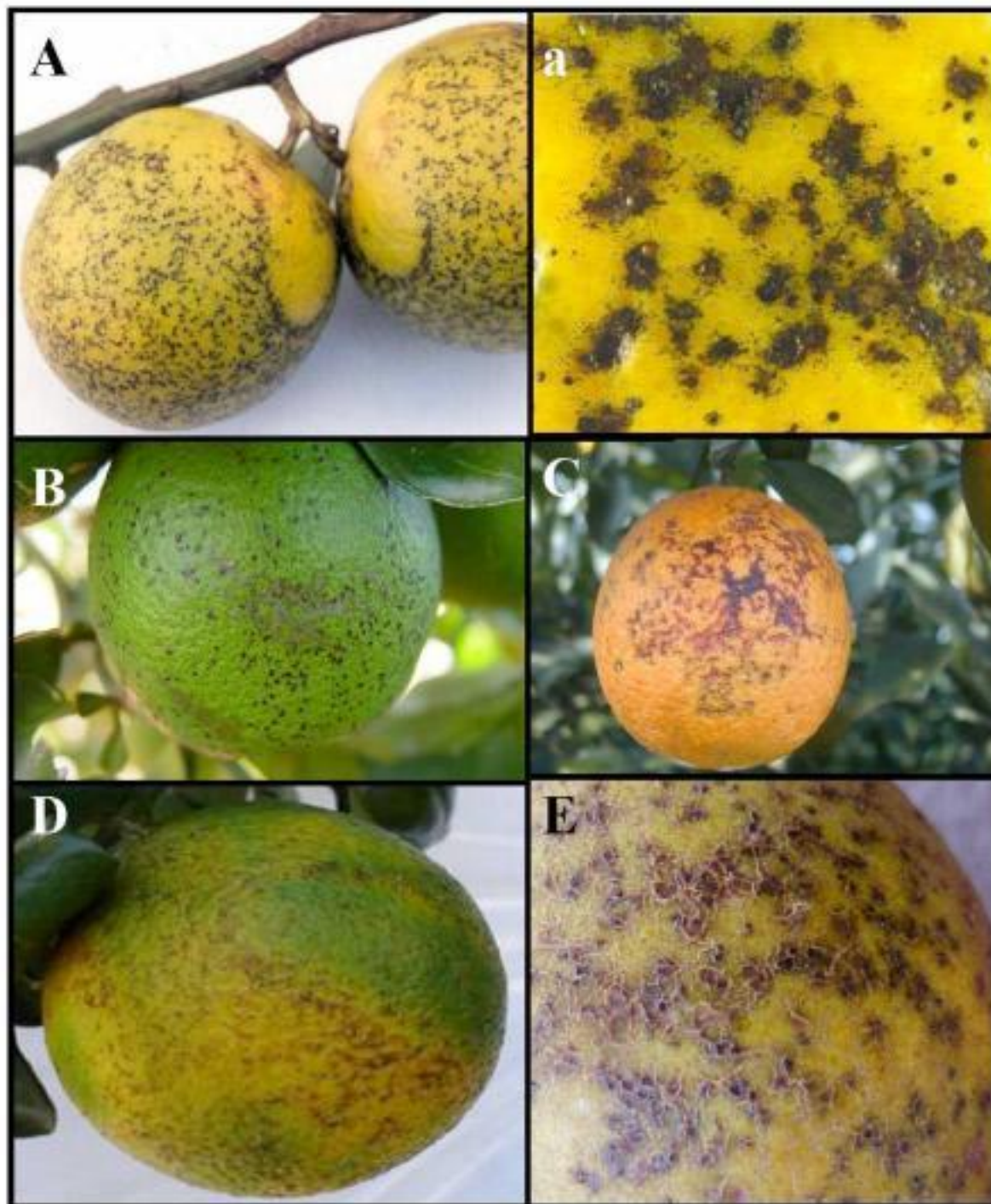
## 9. Figures



**Figure 1.** Symptômes de type taches dures et de type taches de roussure provoqués par *Phyllosticta citricarpa* sur les fruits de l'oranger doux (*Citrus sinensis*) et du citronnier (*Citrus limon*)-fruits: (A), a) lésions de type taches dures sur une orange douce dont les plus étendues contiennent des pycnides de l'anamorphe *Phyllosticta citricarpa* (flèches); B) lésions de type taches de roussure sur un citron; b) lésions de type taches de roussure sur une orange douce (les lésions sont légèrement concaves au centre et dépourvues de pycnides); C) lésions de type taches dures et de type taches de roussure sur un citron; c) lésions de type taches de roussure (flèches noires) et stade intermédiaire entre les lésions de type taches de roussure et de type taches dures avec pycnides (flèches blanches) sur une orange douce.

Photos reproduites avec l'aimable autorisation de E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brésil.

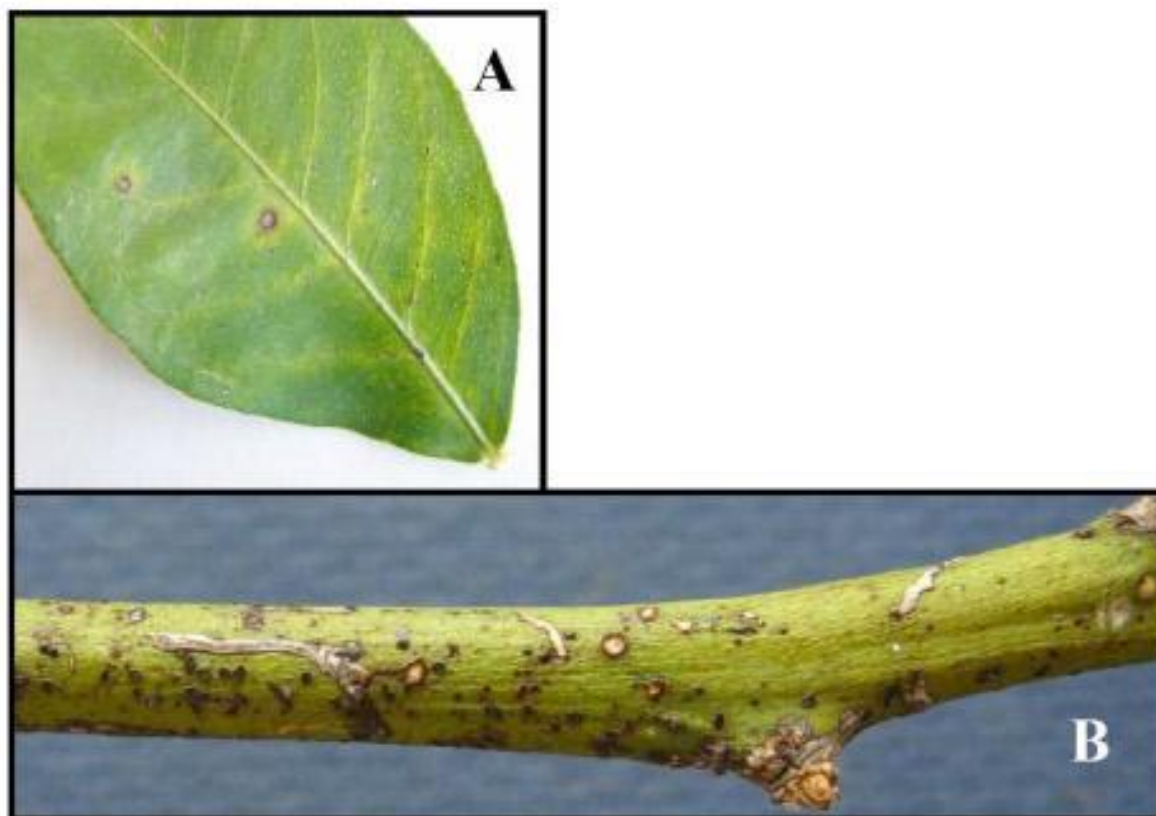




**Figure 2.** Symptômes de types fausse mélanose, taches virulentes, taches réticulées et taches craquelées provoqués par *Phyllosticta citricarpa* sur les fruits de l'oranger doux (*Citrus sinensis*) et du citronnier (*Citrus limon*) ~~fruits~~: A) lésions de ~~fausse-type fausse~~ mélanose sur une orange douce mûre; a) lésions de type fausse mélanose entourées de mouchetures sombres sur une orange douce mûre; B) lésions de type fausse mélanose sur une orange douce verte; C) lésions de type taches virulentes sur une orange douce (les lésions sont concaves et pénètrent en profondeur dans l'albedo); D) symptômes de type taches réticulées sur une orange douce verte; E) lésions de type taches craquelées sur une orange douce (les lésions sont légèrement surélevées, craquelées, ont une bordure irrégulière et sont dépourvues de pycnides).

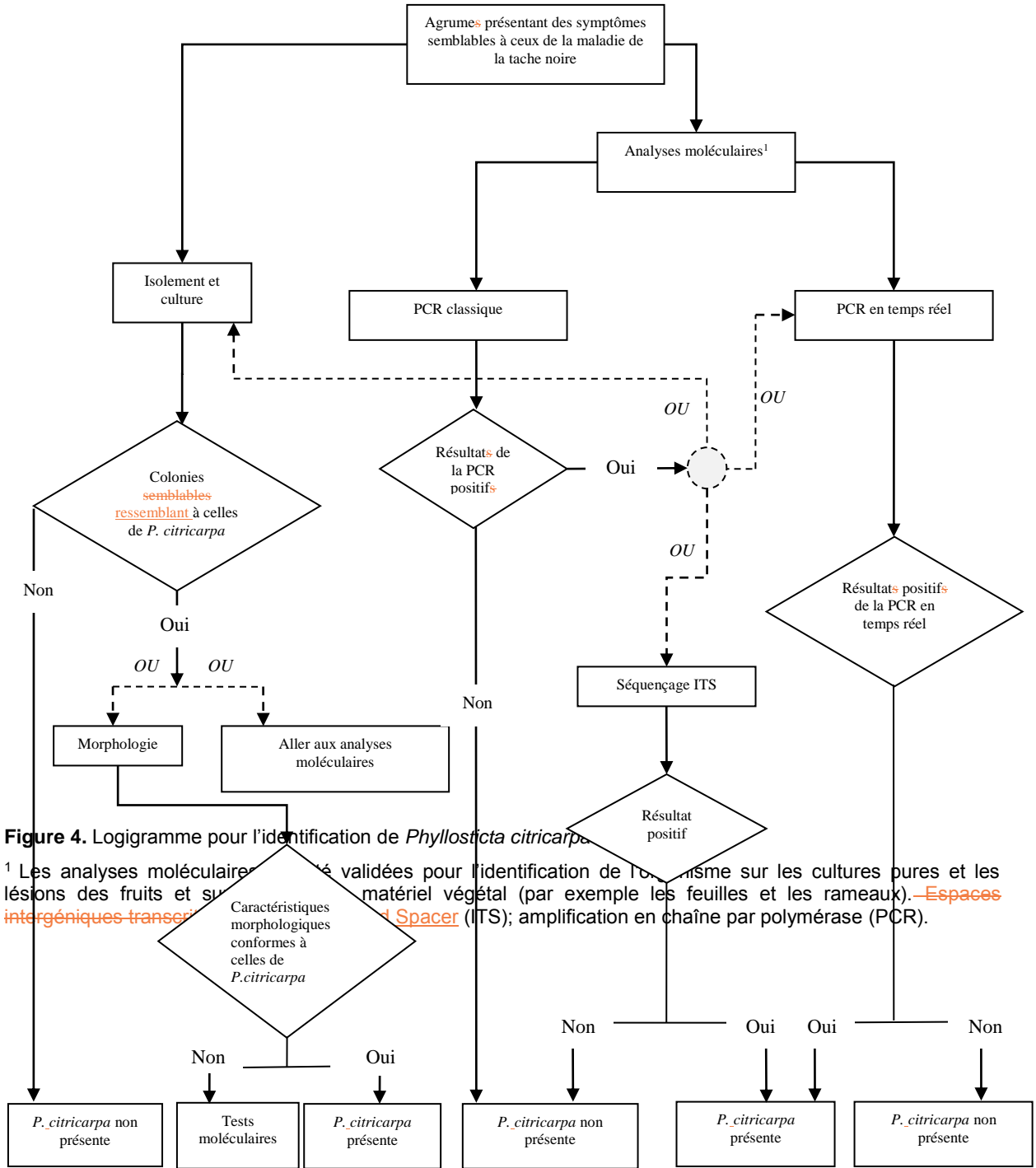
Photos reproduites avec l'aimable autorisation de FUNDECITRUS (A, B, C, D, E) et E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brésil (a).

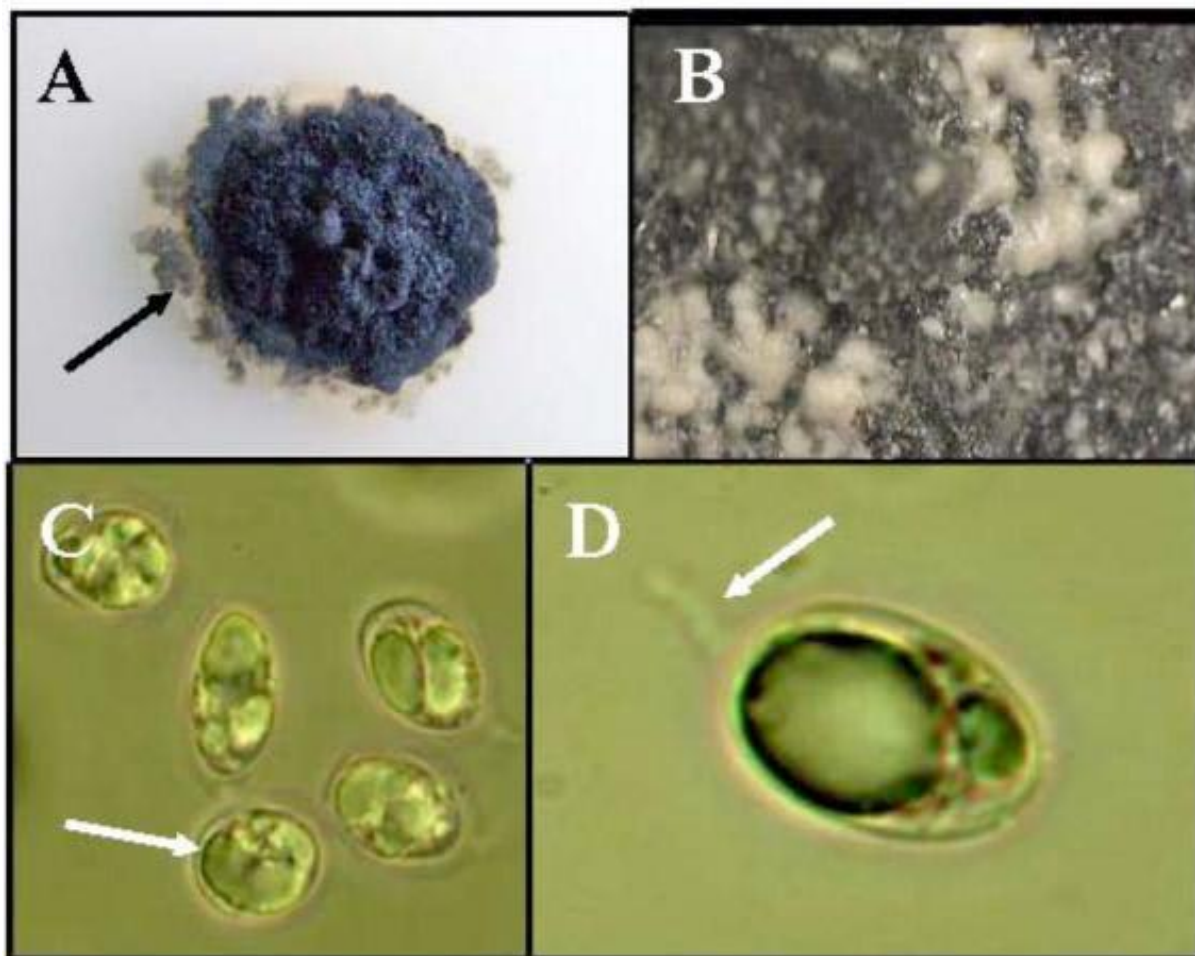




**Figure 3.** Symptômes de la maladie des taches noires des agrumes provoqués par *Phyllosticta citricarpa* sur A) les feuilles A) et B) les rameaux B) d'un citronnier (*Citrus limon*).

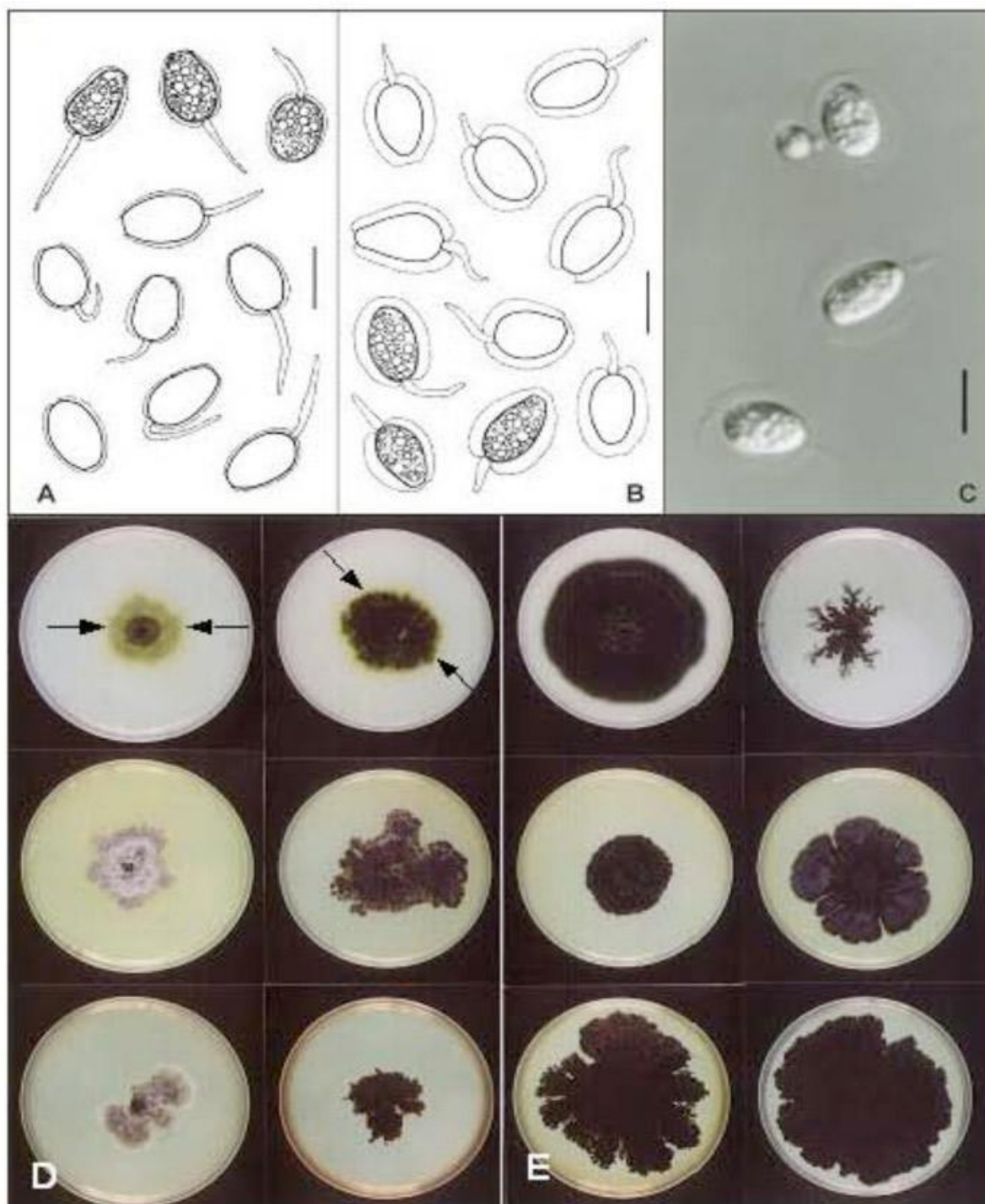
Photos reproduites avec l'aimable autorisation de E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brésil (A) et M. Truter, Plant Protection Research Institute, Agricultural Research Council, Pretoria, Afrique du Sud (B).





**Figure 5.** Caractéristiques des colonies et morphologie des conidies de *Phyllosticta citricarpa*: A) colonie ayant une bordure irrégulière entourée par une zone translucide de mycélium incolore immergé (flèche) au bout de 30 jours de croissance sur gélose de pomme de terre-dextrose (pH 5,5) à 25 °C et avec une photopériode de 12 heures; B) mucus conidien suintant d'une pycnide mûre; (C), D) conidie entourée d'une fine couche mucoïde (C, flèche) et munie d'un appendice subulé incolore (D, flèche, agrandissement 1 000× avec immersion dans l'huile).

Photos reproduites avec l'aimable autorisation de L.E. Diaz, Ministère de l'élevage, de l'agriculture et de la pêche, Montevideo, Uruguay.



**Figure 6.** Morphologie des conidies et caractéristiques des cultures de *Phyllosticta citricarpa* et *Phyllosticta capitalensis*: A) conidie de *P. citricarpa* avec couche mucoïde fine ( $<1.5 \mu\text{m}$ )—conidie; (B), C) conidie de *P. capitalensis* avec couche mucoïde épaisse ( $>1.5 \mu\text{m}$ ) (barre d'échelle =  $10 \mu\text{m}$ ) (la photo C a été prise avec un microscope optique équipé d'un contraste d'interférence différentiel); (D), E) colonies de *P. citricarpa* (D) et de *P. capitalensis* (E) au bout de 7 jours de culture sur gélose d'avoine (rangée supérieure), gélose d'extrait de malt (rangée du milieu) et gélose de cerise (rangée inférieure) (noter la production d'un pigment jaune autour de la colonie de *P. citricarpa* en culture sur gélose d'avoine (D, flèches) et l'absence de ce pigment dans les colonies de *P. capitalensis* en culture sur ce même milieu (E)).

Photos reproduites avec l'aimable autorisation de G. Verkley, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Pays-Bas (A, B, C) et W. van Lienden, Plant Protection Service, Wageningen, Pays-Bas (D, E).



### Étapes de la publication

*Cet encadré ne fait pas officiellement partie de la norme.*

2006-03 la CMP-1 ajoute au programme de travail le thème:  
Champignons et organismes fongiformes 2006-006

2004-11 le CN ajoute le thème *Guignardia citricarpa* (2004-023)

2011-11 le CN approuve [par décision électronique](#) le texte en vue de sa communication aux membres pour consultation ~~par décision électronique~~ (2011\_eSC\_Nov\_06)

2012-07 consultation des membres

2013-03 titre modifié, devient *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa sur les fruits (2004-023)

2013-07 le GTPD révisé le texte et le présente au CN pour approbation en vue de son adoption (2013\_eTPDP\_Jun\_01)

2013-10 le CN approuve [par décision électronique](#) le texte en vue de sa transmission pour la période de notification de 45 jours ~~par décision électronique~~ (2013\_eSC\_Nov\_13)

2014-12/01 période de notification du PD – réception d'une objection formelle

2014-02/03 le GTPD révisé le texte en réunion virtuelle

2014 le CN approuve [par décision électronique](#) le texte pour la période de notification de 45 jours ~~par décision électronique~~ (2014\_eSC\_Nov\_01)

2014-07/08 période de notification du PD

2014-08 le CN adopte le PD au nom de la CMP

**NIMP 27. 2006: Annexe 5. *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa sur les fruits (2014). Rome, CIPV, FAO.**

Dernière mise à jour des étapes de la publication: 29-08-2014