

本诊断规程于 2016 年 8 月由标准委代表植检委通过。

本附件是 ISPM 27 号标准规定的一部分。

# ISPM 27 号标准

## 限定有害生物诊断规程

### DP 14 : 草莓角斑病菌 ( *Xanthomonas fragariae* )

2016 年通过 , 2018 年出台

#### 目录

1. 有害生物信息 .....	4
2. 分类信息 .....	4
3. 检测 .....	5
3.1 症状 .....	5
3.2 取样 .....	6
3.3 样品制备 .....	6
3.4 快速筛选试验 .....	7
3.5 分离 .....	7
3.5.1 分离方法 1 .....	7
3.5.2 分离方法 2 .....	8
3.5.3 分离结果的解释 .....	8
3.6 离体叶片试验和生物富集 .....	9
3.6.1 离体叶片试验 .....	9
3.6.2 离体叶片试验结果的解释 .....	9
3.6.3 活体分离时的富集 .....	9
3.6.4 离体富集-从离体叶片试验进行的 PCR .....	10
3.7 ELISA .....	10
3.7.1 间接 ELISA .....	10
3.7.2 DAS-ELISA .....	11
3.7.3 ELISA 结果的解释 .....	11
3.8 免疫荧光 .....	11

3.8.1	免疫荧光检测结果的解释	12
3.9	PCR	12
3.9.1	DNA 提取	13
3.9.2	多重 PCR	13
3.9.2.1	Hartung 和 Pooler ( 1997 ) 的规程	13
3.9.3	巢式 PCR	14
3.9.3.1	Moltmann 和 Zimmerman ( 2005 ) 的规程	14
3.9.3.2	Roberts 等 ( 1996 ) 的规程	15
3.9.4	实时 PCR	16
3.9.4.1	Weller 等 ( 2007 ) 的规程	16
3.9.5	PCR 结果的解释	16
3.9.5.1	常规 PCR	16
3.9.5.2	实时 PCR	17
3.9.6	分子检测的对照	17
4.	鉴定	18
4.1	生化与生理检测	18
4.1.1	脂肪酸甲酯分析	22
4.1.1.1	FAME 分析结果的解释	22
4.2	血清学检测	23
4.2.1	荧光免疫	23
4.2.2	ELISA	23
4.3	分子检测	23
4.3.1	PCR	23
4.3.2	REP-PCR	23
4.3.2.1	REP-PCR 结果的解释	24
4.3.3	多位点序列分析	24
4.4	致病性试验	24
4.4.1	一般接种程序	24
4.4.1.1	致病性试验结果的解释	25
4.4.2	过敏性坏死反应	25

---

4.4.2.1 HR 结果的解释 .....	25
5. 记录 .....	25
6. 获取进一步信息的联系点 .....	26
7. 致谢 .....	26
8. 参考文献 .....	26
9. 图 .....	31

## 1. 有害生物信息

草莓角斑病菌 (*Xanthomonas fragariae* Kennedy 和 King, 1962) 是草莓细菌性角斑病的致病因子。该病害主要在北美洲流行, 1961 年首次在美国报道 (Kennedy 和 King, 1962; Hildebrand 等, 1967; Maas 等, 1995), 但随后在世界很多草莓种植地区均有报道, 包括南美洲和欧洲 (CABI)。主要的优势栽培品种凤梨草莓 (*Fragaria × ananassa*) 是草莓角斑病菌的首要宿主。商业栽培品种感病性各不相同, 草莓属其他种类也容易感病, 包括智利草莓 (*F. chiloensis*)、弗吉尼亚草莓 (*F. virginiana*)、野草莓 (*F. vesca*) 以及金露梅 (*Potentilla fruticosa*) 和 *P. glandulosa*。草莓属各种类中, 仅麝香草莓 (*F. moschata*) 对该病害免疫 (Kennedy 和 King, 1962; Kennedy, 1965; Maas, 1998)。

草莓角斑病菌易于通过潜伏侵染的无症状繁殖材料传播。初侵染源为受侵染草莓苗匍匐茎上发育成的, 用于水果生产田种植的受侵染但观察不到症状的子代植株。虽然草莓角斑病菌不能在土壤中独立存活, 但是它可以和之前侵染的植物材料一起在土壤中越冬, 并存活很长一段时间 (Maas, 1998)。受侵染叶片的残留物和用于栽培的匍匐茎冠部侵染也是初侵染源。

对世界上不同时间不同地点分离到的草莓角斑病菌菌株进行分析发现, 这些菌株之间存在着遗传和表型差异 (Opgenorth 等, 1996; Pooler 等, 1996; Roberts 等, 1996)。此外, 已报道草莓角斑病菌菌株之间在致病性方面也有一定差异 (Maas 等, 2000)。然而, 该植物病原不同的致病菌株之间具有高度相似性, 且菌株的基因型或表型与其地理起源之间无相关性。因此, 目前已知的全球各地的草莓角斑病菌菌株可能代表着一个无性系种群。早期在受侵染但未显症的草莓繁殖材料上检测出草莓角斑病菌对于避免病原传播和病害发展至关重要。

## 2. 分类信息

**学名:** *Xanthomonas fragariae* Kennedy 和 King, 1962

**异名:** 无

**分类地位:** 细菌界 (Bacteria)、变形菌门 (Proteobacteria)、 $\gamma$  变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、黄色单胞菌目 (Xanthomonadales)、黄色单胞菌科 (Xanthomonadaceae)

**通用名:** 细菌性角斑病

**注:** 草莓角斑病菌是变形菌门  $\gamma$  亚群 (Stackebrandt 等, 1988)、Van den Mooter 和 Swings (1990) 的表观群 3、Rademaker 等 (2000) 的 DNA-DNA 同源群 1 和 Rademaker 等 (2005) 的 DNA 群 1 的成员之一。

### 3. 检测

草莓细菌性角斑病是由草莓角斑病菌引起，该病害的诊断基于植株症状的诊断、病原的直接或间接分离、血清学检测（例如间接免疫荧光法、酶联免疫吸附试验）和分子方法。已开发了以草莓角斑病菌基因组不同位点为目标的几种聚合酶链反应（PCR）检测方法（Roberts 等，1996；Zimmerman 等，2004；Weller 等，2007；Vandroemme 等，2008；Turechek 等，2008；Vermunt 和 van Beuningen，2008）。这些方法可用于确认显症植物材料中有草莓角斑病菌存在，其中有几种方法也用于检测潜伏侵染的草莓角斑病菌（Mahuku 和 Goodwin，1997；Zimmerman 等，2004；Moltman 和 Zimmerman，2005）。在直接分离很慢或受到抑制时，有一种离体叶片检测法（Civerolo 等，1997a）可用于草莓角斑病菌的初步诊断。除巢式 PCR 外，本诊断规程描述的各种方法均已在欧盟资助的检测效果研究项目（SMT-4-CT98-2252）中进行过验证（López 等，2005）。

因为草莓角斑病菌在人工营养培养基上生长非常缓慢，而且很容易被腐生细菌淹没，即使有特征性症状和溢出菌脓，也很难直接分离到该病菌（Hazel 和 Civerolo 1980；López 等，1985；Schaad 等，2001；Saddler 和 Bradbury，2005）。López 等（2005 年）介绍了直接分离草莓角斑病菌的具体程序。使用发病或疑似受侵染组织的水提取物接种摘下的草莓叶片，对病原菌进行选择活体富集，可以促进草莓角斑病菌的离体分离（Civerolo 等，1997a）。

下文将介绍在显症和未显症植物中检测草莓角斑病菌的程序。

在本诊断规程中，各种方法（包括引用的商品名）的描述和发表时一样，因为它们决定了最初获得的灵敏度、特异性和/或重现性水平。本诊断规程对试剂、化学品或设备名称的使用，并不意味着对它们的认可，而排斥可能同样适用的其他品牌。只要经过充分验证，本规程提供的实验室程序可根据各个实验室的标准进行调整。

#### 3.1 症状

受最小叶脉限制的小型（直径 1-4mm）角状水浸斑点（病斑）最初出现在叶片背面。侵染初期，这些斑点在田间很难发现，在阳光透射下观察时，呈半透明黄色。病斑扩大并相互结合，最终在叶片正面出现角状水浸斑点，呈红褐色（图 1）。在湿润条件下或相对湿度高时，病斑处出现白色、乳白色、奶油白或黄色的黏性溢出菌脓（图 2）。菌脓最初变为干燥的鳞片状物质，呈不透明的白色或银白色，然后变为褐色（Janse，2005）。随着病害的发展，相互结合的红褐色病斑开始坏死。坏死的病斑组织可能开裂或者从叶片上脱落，病叶可能枯萎或皱褶不平。叶片侵染通常会不断发展，沿主脉形成长病斑。在病害发展后期，老的红褐色结合病斑周围的叶片组织一起枯萎变黄（Kennedy 和 King，1962；EPPO，1997；Rat，1993；Maas，1998）。

与草莓角斑病相比，由草莓细菌性叶斑病菌 (*X. arboricola* pv. *fragariae*) 引起的草莓细菌性叶枯病的特征为叶片背面有小的红褐色病斑，既不呈水浸状，也不透明；叶片正面有红色斑点；病斑相互结合形成大片、干燥的褐色斑块，周围有褪绿晕圈；沿叶片边缘、中脉和主脉形成较大的褐色 V 型病斑 (Janse 等, 2001)。另外，细菌性叶枯病也没有菌脓溢出 (Janse 等, 2001)。在后期，细菌性角斑病和一些真菌性叶斑病很难区分，例如蛇眼病 (*Mycosphaerella fragariae*) 和焦斑病 (*Diplocarpon earliana*) (Janse 等, 2001)。

草莓角斑病菌严重侵染时，可能从叶片蔓延到冠部，出现离散型水浸状区域 (Hildebrand 等, 1967)。严重的冠部侵染可导致植物活力下降，倒伏并最终死亡。从受侵染的冠部发育形成的叶片通常被系统性侵染，在叶片基部沿叶脉出现病斑。横切冠部时，维管束中可能有菌脓溢出。

在病情严重的情况下，草莓角斑病菌可能危害花，导致花朵枯萎，但并不直接影响果实 (Gubler 等, 1999)。受侵染的花萼组织上的水浸状病斑看起来和叶片上的病斑类似 (图 3)。严重受侵染的花萼组织附近的果实组织也可能呈水浸状。

草莓角斑病菌可系统性侵入根部、冠部和匍匐茎，而不表现明显症状 (Stefani 等, 1989; Milholland 等, 1996; Mahuku 和 Goodwin, 1997)。这样的侵染可导致新生叶片基部出现水浸状区域，随后植物很快会突然倒伏并死亡。此类侵染并不常见。

### 3.2 取样

对于显症植物，有初始水浸状斑点的叶片是诊断细菌性角斑病的首选样品，因为它们有助于对草莓角斑病菌的成功分离。另外，也可使用有干燥斑点，以及有或没有菌溢的叶片。还应检查冠部组织。

草莓角斑病菌是一种生长非常缓慢的细菌，涂板和血清学检测不适用于检测无症状植物中的少量细菌。对于无症状植物，建议选取几株完整的植株，并从其叶片、叶柄和冠部剪取少量组织 (EPPO, 2006)。如 3.9 节所述，这些组织可直接用于基于 PCR 的分析。

样品采集后不宜在潮湿条件下放置。样品最好应部分干燥，用纸包裹，然后放进塑料袋内并保持凉爽。样品运输时应置于隔热条件良好的容器中，到达目的地后在 4°C 下保存并尽快处理。

### 3.3 样品制备

对于显症植物，可用 70% 的乙醇擦拭叶片和茎组织表面进行消毒。如果植物出现维管束症状，建议去除其根和叶片，保留冠部和叶柄。用自来水冲洗样品，去除附带的土壤，然后在 70% 的乙醇中浸泡 1 min 进行消毒，再用无菌蒸馏水清洗三次。每份样品取大约 0.1 g 叶片或冠部和叶柄组织，加入到 9 ml 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中 (8 g

NaCl、0.2 g KCl、2.9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，加蒸馏水至 1 l；PH 为 7.2)。对植物组织进行匀浆，然后在室温下培养 15 分钟。

对于无症状植物，随机采集 30 g 样品，置于 150 ml PBS 中，震荡 30 min。清洗液直接用于检测，或 10000 g 离心 10 min，然后将沉淀物重新悬浮在无菌蒸馏水中，使最终体积达到 5 ml。沉淀 15 min，然后收集上部澄清液，用无菌蒸馏水制备稀释液（1:10 和 1:100）（EPP0，2006）。这些样品浸出液随后可用于 ELISA，免疫荧光和 PCR。

### 3.4 快速筛选试验

快速筛选试验有助于对草莓角斑病菌的检测。由于该细菌很难分离，为确认检测到草莓角斑病菌，三种试验（ELISA、免疫荧光和 PCR）都应呈阳性。离体叶片试验是确认有成活草莓角斑病菌存在的补充试验。ELISA、PCR 和离体叶片试验之间的相关性通常很高（Civerolo 等，1997b）。

### 3.5 分离

即使有症状和菌溢，直接分离草莓角斑病菌也很困难，因为该细菌在人工培养基上生长非常缓慢，而且很快会被腐生细菌淹没覆盖。有两种培养基被推荐用于分离。使用含有硝酸盐的 Wilbrink 培养基（Wilbrink-N）（10 g 蔗糖、5g 示蛋白胨（L85；Oxoid<sup>1</sup>）、0.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.25 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.25 g NaNO<sub>3</sub>、15 g 高纯度琼脂，加蒸馏水至 1 l；pH 7.0-7.2）进行分离更易成功（Koike, 1965）。使用 YPGA 培养基（5 g 酵母提取物、5 g 细菌蛋白胨、10 g 葡萄糖、15 g 高纯度琼脂，加蒸馏水至 1 l；调整 pH 至 7.0-7.2；高压灭菌后加入 5 ml 经过过滤除菌的放线菌酮（母液：每 100 ml 无水乙醇 5 g 放线菌酮）的成功概率要低一些，但仍被推荐使用。还有第三种培养基，SPA（20 g 蔗糖、5 g 细菌蛋白胨、0.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.25 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、15 g 高纯度琼脂，加蒸馏水至 1 l；pH 7.2-7.4）可用于难养细菌（Hayward, 1960）。建议所有培养基都使用高纯度琼脂（Oxoid1 或 Difco1），因为其他商业琼脂中的杂质可能会抑制草莓角斑病菌的生长。

#### 3.5.1 分离方法 1

对于显症植物，选取有初始病斑的叶片，用 70%乙醇擦拭表面进行消毒。用消毒刀片从初始水渍状病斑或老病斑边缘，切取小块组织（0.5-1.0 cm<sup>2</sup>）进行分离。

在病组织中加少量无菌蒸馏水或 PBS 进行匀浆，在室温（20-25°C）下培养 10-15 min。取少量（50-100 μl）病变组织浸出液和其稀释液（1:10、1:100、1:1 000 和 1:10

<sup>1</sup> 在本诊断规程中，各种方法（包括引用的商品名）的描述和发表时一样，因为它们决定了最初获得的灵敏度、特异性和/或重现性水平。本诊断规程对试剂、化学品或设备名称的使用，并不意味着对它们的认可，而排斥可能同样适用的其他品牌。只要经过充分验证，本规程提供的实验室程序可根据各个实验室的标准进行调整。

000) 在 Wilbrink-N、YPGA 和/或 SPA 培养基上涂板。应同时用相似浓度的草莓角斑病菌细胞悬浮液 ( $10^4$ 、 $10^5$  和  $10^6$  个菌落形成单位 (cfu) /ml) 涂板, 以验证培养基的质量, 并对形成的细菌菌落的培养特征进行比较。平板在 25-27 °C 下培养 7 天, 但要对 2-3 天后出现的菌落进行标记, 因为它们不会是草莓角斑病菌。25-27 °C 下培养 7-10 天后进行最终读数。

Wilbrink-N 培养基上的草莓角斑病菌菌落最初为白色, 4-6 天后变为浅黄色、圆形、稍凸、光滑且呈黏质状。在 YPGA 和 SPA 培养基上, 菌落形态与在 Wilbrink-N 培养基上的相似, 但带有更深的黄色。

### 3.5.2 分离方法 2

切下带有明显水浸状角斑的叶片组织, 用 50 ml 自来水和几滴 Tween 20 清洗。叶片在室温下培养 10 min, 用蒸馏水冲洗, 吸干。用 70%乙醇对叶片表面消毒 5 s, 吸干。将叶片切成更小的切片 (1-4 mm<sup>2</sup>), 置于 5 ml 0.1 M PBS 中。混合并在室温下培养 30 min, 使草莓角斑病菌释放到上清液中。用 0.1 M PBS 制备上清液的 1:100 稀释液, 取 20  $\mu$ l 未经稀释的样品和上清液的 1:100 稀释液加入多孔显微镜载玻片上不同的小孔中。通过燃烧使细菌细胞固定在玻片上, 用于后续免疫荧光分析 (3.8 节)。取 200  $\mu$ l 未经稀释的上清液, 加入微型管中, 用于后续 PCR 分析 (3.9 节), 另取 1 ml 未经稀释的上清液加入另一个微型管中, 加入甘油使最终浓度至少达到 20%, 在 -20 °C 或 -80 °C 下保存, 用于参考目的。剩余上清液可通过上文所述的稀释涂板法用于分离, 或用于对离体草莓叶片进行接种 (3.6 节)。

除了上述分离方法 1 和 2 外, 也可从病斑处取少量新鲜菌溢直接涂抹在 Wilbrink-N、YPGA、SPA 或其他常用培养基上, 进而从组织中分离出草莓角斑病菌。

### 3.5.3 分离结果的解释

如果 7 天后在三种培养基中任何一种上面都未观察到有草莓角斑病菌菌落群特征性形态的细菌菌落 (前提是没有因为竞争或拮抗而引起的生长抑制), 但在阳性对照中发现了典型的草莓角斑病菌菌落, 则分离结果为阴性。

如果至少在一种使用的培养基上分离到了草莓角斑病菌菌落, 则分离结果为阳性。

鉴于该细菌的分离经常失败, 如果 ELISA、免疫荧光和 PCR 试验结果都是阳性, 则应初步认为样品为草莓角斑病菌阳性, 留待最终鉴定 (4 节)。当使用从新病斑处新制备的样品提取物时, 预期可以得到最好的分离结果。如 3.6 节所述, 也可以通过活体富集在培养基上进行分离。



### 3.6 离体叶片试验和生物富集

#### 3.6.1 离体叶片试验

用提取缓冲液或蒸馏水制备组织样品（3.3 节）后，可尽快用于接种离体的草莓叶片（Civerolo 等，1997a）。要使用在温室中生长的无草莓角斑病菌，但易感草莓角斑病菌的栽培品种（如 Camarosa、Pajaro、Seascape、Selva 和 Korona）的幼嫩（长出 7-14 天）叶片。叶片的质量和生长时间是实验成功的关键因素。

在无菌条件下从温室生长的植物上切下三片叶片（每片含三片小叶），切除叶柄基部后立即将叶柄放入装有无菌水的玻璃试管中。

用 PBS 或蒸馏水制备含量为  $10^5$ - $10^6$  cfu/ml 的草莓角斑病菌参考菌株（表 3）的细胞悬浮液作为阳性对照。用 PBS 或蒸馏水作为阴性对照。使用无针注射器（3 cc 塑料处理 BD1，2 mm 孔）在每片小叶背轴面四个位置（主脉每边各两个）进行渗透接种。

接种 1 h 后使用无菌水冲洗掉多余的接种物。将带有叶柄的叶片放入试管，置于湿度箱中（相对湿度 95-100%），在 18-20 °C 下以 12 h 光周期培养 21 天。培养期间的特定的温度和光照条件对于避免产生假阴性结果至关重要。接种过的叶片不得有可见的伤痕，渗透接种引起的水浸状应在 24 h 内消失。

接种数天后开始出现与自然侵染叶片观察到的症状类似的特异性症状（即深色角状水浸病斑）。每两天记录症状，持续 14-21 天。

#### 3.6.2 离体叶片试验结果的解释

如果 21 天后任一接种处均未出现草莓角斑病菌引起的典型的角状叶斑（即在反射光下观察时呈深色水浸状；在透射光下观察时呈半透明黄色）和/或褪绿晕圈，则离体叶片试验结果为阴性。阴性对照渗透接种处在透射光下观察，不应出现半透明黄色的水浸斑点（Civerolo 等，1997a）。

如果 10-21 天内在渗透接种处形成了草莓角斑病菌典型的角状叶斑（即在反射光下观察时呈深色水浸状；在透射光下观察时呈半透明黄色），则离体叶片试验结果为阳性。观察到的情况应与阳性对照悬浮液渗透接种处形成的症状相似。在透射光下观察时，阴性对照渗透接种处不应出现半透明黄色的水浸斑点（Civerolo 等，1997a）。

#### 3.6.3 活体分离时的富集

接种 48 h 后，从离体叶片试验中接过种的每份样品中选取一片叶片，用于营养培养基分离。每片接过种的离体叶片从各接种处切下 10-12 个直径为 0.5 cm 的小叶盘，在 4.5 ml PBS 中粉碎。和直接分离（3.5 节）一样，用 PBS 制备稀释液，每种稀释液各取 50  $\mu$ l，在 Wilbrink-N 培养基表面上进行三区划线。将平板置于 25-27 °C 下培养，并在 5-7 天后检查有无类似的草莓角斑病菌菌落。

### 3.6.4 离体富集-从离体叶片试验进行的 PCR

用按照 3.6.3 节描述的活体富集程序制备的用于分离的提取物在 Wilbrink-N 培养基平板上划线，在 25-27 °C 下培养 4 天后可供使用。用 3-5 ml PBS 从培养基表面洗脱细菌菌落，将其用于 PCR 分析（3.9 节）。此系 Schaad 等（1995）所描述的生物富集 PCR 规程的修订。

## 3.7 ELISA

已对用两种商业化购得的多克隆抗草莓角斑病菌血清所做的 ELISA 检测的特异性进行过验证（López 等，2005）。Rowhani 等（1994）指出使用多克隆抗体进行 ELISA，可特异性检测出草莓角斑病菌的 34 个菌株，而且抗体不会与其他密切相关的致病变种或从草莓植株上分离到的其他细菌发生交叉反应。据报道草莓角斑病菌 ELISA 检测的灵敏度可以达到  $10^5$  cfu/ml（Rowhani 等，1994；Civerolo 等，1997b）。

可使用从草莓角斑病菌纯培养物和非草莓角斑病菌菌株制备的细胞悬浮液作为每块微量滴定板中的阳性和阴性对照。建议确定每种多克隆抗血清的适宜的工作稀释倍率。

### 3.7.1 间接 ELISA

将 210  $\mu$ l 各试验样品、阳性草莓角斑病菌细胞悬浮液（约  $10^9$  cfu/ml）、阴性非草莓角斑病菌细胞悬浮液（约  $10^9$  cfu/ml）和阴性对照（健康草莓材料的悬浮液，见下文）与 210  $\mu$ l 包被缓冲液（1.59 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、2.93 g  $\text{NaHCO}_3$ ，加蒸馏水至 1 l）混合，并向微量滴定板（PolySorp（Nunc1）或相当产品）两个孔中分别加入 200  $\mu$ l 样品和缓冲液的混合液。对于阴性植物材料对照，在 0.9 ml PBS 中将约 0.1 g 健康草莓叶片、叶柄或冠部组织碾碎，然后加入 0.9 ml 包被缓冲液。

平板在 4°C 下培养过夜。用含有 0.05% Tween 20 的 PBS（PBS-T）（8 g NaCl、0.2 g KCl、0.2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、2.9 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、500  $\mu$ l Tween 20、加蒸馏水至 1 l）清洗平板三次。清洗后，向各测试孔中加入 200  $\mu$ l 封闭缓冲液（含 1% 牛血清白蛋白（BSA）或脱脂奶粉的 PBS），在 37 °C 下培养 1 h。用 PBS-T 清洗平板三次。

根据生产商的说明，用 PBS 制备抗草莓角斑病菌血清的适宜的工作稀释液，并向各测试孔中分别加入 200  $\mu$ l 该稀释液。在 37 °C 下孵育 2 h，随后用 PBS-T 清洗平板三次。向每个孔中加入 200  $\mu$ l 用含 0.2% BSA 的 PBS 按适宜倍率稀释的抗体-酶共轭物。37 °C 下孵育 1 h，随后用 PBS-T 清洗平板四次。向每个测试孔中分别加入 200  $\mu$ l 新鲜制备的底物（1 mg 对硝基苯磷酸盐/ml 底物缓冲液，pH 9.8）。在黑暗和室温条件下孵育 15 min、30 min 和 60 min，然后读取 405 nm 下的吸光度。

### 3.7.2 DAS-ELISA

对于双抗体夹心（DAS）-ELISA，向两块微量滴定板（PolySorp（Nunc1）或相当产品）上的每个孔中各加入 200 $\mu$ l 用包被缓冲液按适宜倍率稀释的抗草莓角斑病菌血清。在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 4 h，然后用 PBS-T 清洗各孔三次。按照描述用于间接 ELISA 的步骤（3.7.1 节），向各滴定板的两个孔中分别加入 200  $\mu$ l 各组织样品浸出液、阳性对照和阴性对照，然后在 4 $^{\circ}$ C 下培养过夜。用 PBS-T 清洗滴定板三次后，向每个孔中加入 200  $\mu$ l 用含 0.2% BSA 的 PBS 按适宜倍率稀释的抗体-酶共轭物。37 $^{\circ}$ C 下培养 3 h。用 PBS-T 清洗滴定板四次后，向每个测试孔中分别加入 200  $\mu$ l 新鲜制备的底物（1 mg 对硝基苯磷酸盐/ml 底物缓冲液，pH 9.8）。在黑暗和室温条件下孵育 15min、30min 和 60 min，然后读取 405 nm 下的吸光度。

### 3.7.3 ELISA 结果的解释

如果含组织浸出液的重复孔的平均吸光度读数<含健康草莓组织浸出液的阴性对照孔的平均吸光度读数的 2 $\times$ ，则 ELISA 结果为阴性。

如果（1）重复样品孔的平均吸光度读数>含健康草莓组织浸出液的阴性对照孔的平均吸光度读数的 2 $\times$ ，且（2）阳性对照孔的平均吸光度读数>阴性对照孔的平均吸光度读数的 2 $\times$ ，则 ELISA 结果为阳性。

阳性对照孔出现阴性 ELISA 结果表明没有正确地进行检测，和/或试剂已经降解或过期。

阴性对照孔出现阳性 ELISA 结果表明发生了交叉污染或非特异性抗体结合。应使用新鲜组织重新进行检测或应基于不同的原理进行其他的检测。

## 3.8 免疫荧光

De Boer（1990）和 EPPO（2009）提供了用于鉴定植物致病细菌的免疫荧光检测程序。已使用异硫氰酸荧光素（FITC）共轭的抗兔免疫球蛋白对三种商业化购得的多克隆抗草莓角斑病菌血清（表 1）进行过验证（López 等，2005）。使用这些抗体进行免疫荧光检测可检测出草莓组织中浓度为 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> cfu/ml 的草莓角斑病菌（Calzolari 和 Mazzucchi，1989）。

检测样品包含用 PBS 或蒸馏水制备的组织浸出液的稀释液（1:10、1:100 和 1:1000），以及阳性草莓角斑病菌和阴性非草莓角斑病菌菌株的细胞悬浮液（10<sup>6</sup> cfu/ml）。阴性对照包含健康植物组织提取物。

取少量（20  $\mu$ l）检测样品和阳性、阴性对照悬浮液加入多孔显微镜载玻片的不同孔中。风干制备液，通过燃烧或将载玻片置于丙酮中浸泡 10 分钟并随后风干对其进行固定。载玻片可保存在 -20 $^{\circ}$ C 下备用。用含 10%脱脂奶粉的 PBS 稀释草莓角斑病菌的初级抗体。选择最低抗体浓度，使每个显微镜视野中有 100 个阳性细胞，从而获得

良好的染色效果。建议使用抗体的两种稀释液，以检测与其他细菌的交叉反应。取 20  $\mu\text{l}$  初级抗体分别加入各个孔中，室温或 37 °C 下在湿度箱中对载玻片培养 30-60 min。使用 PBS 冲洗载玻片，然后将其在同样的缓冲液中浸泡 10 min 进行清洗。用 PBS 稀释 FITC 共轭的二级抗体（最佳稀释倍率通常介于 1:20-1:200 之间）。用二级抗体包被载玻片各孔，室温或 37 °C 下在湿度箱中培养 30-60 min。重复清洗步骤，然后风干载玻片。用含 1mg/ml 对苯二胺的封装液（90 ml 甘油、10 ml PBS）在载玻片上封装盖玻片，以 500-1 000 $\times$ 放大率在的油镜下进行观察。对发出荧光且与草莓角斑病菌参考菌株细胞大小相似的细胞进行计数（López 等，2005）。

### 3.8.1 免疫荧光检测结果的解释

如果在阳性对照孔中观察到有草莓角斑病菌特征性形态的绿色荧光细胞，但在检测样品和阴性对照孔中未观察到，则免疫荧光检测结果为阴性。

如果在阳性对照和检测样品孔中观察到有草莓角斑病菌特征性形态的绿色荧光细胞，但在阴性对照孔中未观察到，则免疫荧光检测结果为阳性。

由于一般认为 10<sup>3</sup> 细胞/ml 的菌群是通过免疫荧光检测法进行可靠检测的下限，>10<sup>3</sup> 细胞/ml 的样品可认为是阳性（De Boer，1990）。对<10<sup>3</sup> 细胞/ml 的样品而言，免疫荧光检测的结果可能要判为不确定。在此情况下，应做进一步检测甚至重新取样。和阳性对照相比，样品含有大量不完全发出荧光或仅微弱发出荧光的细胞时，需要使用不同稀释倍率的抗体或另一来源的抗体做进一步检测。

**表 1.** 目前建议用于血清学检测的草莓角斑病菌多克隆抗体

来源	建议用途†
Neogen Europe1	使用免疫荧光或双抗体夹心酶联免疫吸附试验进行检测
瓦赫宁根大学暨研究中心国际植物研究所	使用免疫荧光法进行检测
Bioreba AG1	使用双抗体夹心酶联免疫吸附试验进行检测

† 已在欧盟资助项目（SMT-4-CT98-2252）的一项检测效果研究中进行过验证（López 等，2005）。

## 3.9 PCR

本诊断规程中描述的 PCR 方法，除了 Zimmerman 等（2004）建立的巢式 PCR 外，均已在欧盟资助的一项试验效果研究（SMT-4-CT98-2252）中进行过验证（López 等，2005）。据报道，和常规 PCR 规程相比，巢式 PCR 规程可以将灵敏度提高 100 倍（Roberts 等，1996；Zimmerman 等，2004）。

Pooler 等（1996）和 Hartung 和 Pooler（1997）描述的从植物样品中提取 DNA 和实施 PCR 的规程已经经过验证（López 等，2005）。已报道有一种使用

REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma1) 的经过修订的规程适用于在扩增前提取 DNA, 用于检测大量不显症的叶片样品 (Stöger 和 Ruppitsch, 2004)。还有用于 DNA 提取和使用其他引物的巢式 PCR 及 PCR (Roberts 等, 1996) 的商业化试剂盒可供使用; 但是此类试剂盒尚未经过验证 (López 等, 2005)。

已报道有两种灵敏的实时 PCR 检测方法可用于检测草莓组织中的草莓角斑病菌 (Weller 等, 2007; Vandroemme 等, 2008)。Weller 等 (2007) 建立的实时 PCR 检测方法也能区分草莓角斑病菌和草莓细菌性叶斑病菌。Weller 等 (2007) 描述的实时 PCR 采用的是针对草莓角斑病菌独有的 *gyrB* 基因和草莓细菌性叶斑病菌独有的 *pep* 基因区域设计的引物。Vandroemme 等 (2008) 建立的实时 PCR 可产生含 41 个碱基对 (bp) 的扩增产物, 采用的是针对 Pooler 等 (1996 年) 描述的 PCR 所产生的 550 bp 扩增产物设计的引物。这些方法对于在无症状或潜伏侵染样品中检测低水平的草莓角斑病菌可能有用。

### 3.9.1 DNA 提取

在欧盟环形试验 (SMT-4-CT98-2252) 中, 经过调整的用于支原体类生物 (MLO) DNA 提取 (Lopez 等, 2005) 的 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen1) 取得了最好的结果。

为提取 DNA, 使用 250  $\mu$ l 检测样品的组织浸出液; 以用相似方法制备的健康草莓植物材料和无菌 PBS 或超纯水作为阴性对照; 以草莓角斑病菌纯培养物的细胞悬浮液作为阳性对照。加入 250  $\mu$ l 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 提取缓冲液 (50 ml 1 M Tris-HCl、50 ml 5 M 乙二胺四乙酸 (EDTA)、40.9 g NaCl、5 g 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) -40, 12.5 g CTAB, 加蒸馏水至 500 ml) 和 4 $\mu$ l 核糖核酸酶 A (100 mg/ml), 轻轻倒置 5 次进行混合, 在 65  $^{\circ}$ C 下培养 10 min, 间或倒置进行混合。然后按照生产商的说明进行操作, 直至 DNA 洗脱步骤。

为了洗脱 DNA, 向柱中加入 100  $\mu$ l 的 10 mM Tris-HCl, pH 9 (预热至 65  $^{\circ}$ C), 并以  $\geq 6\ 000$  g 离心 1 min。再加入 100  $\mu$ l 的 Tris-HCl, 重复离心步骤。用 Tris-EDTA (TE) 缓冲液将 DNA 溶液定容至总体积 300  $\mu$ l, 加入 200  $\mu$ l 的 5 M 乙酸铵和 1 ml 无水乙醇。充分混合并在 -20  $^{\circ}$ C 下培养 1 小时至过夜。培养后, 以 17 000 g 离心 10 min。弃上清液, 用 1 ml 无水乙醇洗涤 DNA 沉淀物, 并以 16 000 g 离心 5 min。弃上清液, 用 500  $\mu$ l 80% 乙醇洗涤 DNA 沉淀物, 并以 16 000 g 离心 5 min。弃上清液。在沉淀物干燥后, 将其重新悬浮在 50  $\mu$ l 无菌蒸馏水中。

### 3.9.2 多重 PCR

#### 3.9.2.1 Hartung 和 Pooler (1997) 的规程

本规程的特异性在一项使用 30 个草莓角斑病菌分离物、36 个野油菜黄单胞菌 (*X. campestris*) 分离物 (代表 19 个致病变种) 和经常从草莓中分离到的 62 个附生细菌分离物所做的研究中得到了确认。(在所有分离物中) 仅检测到草莓角斑病菌。这种多

重 PCR 能够在植物组织中检测出  $10^3$  cfu/ml (Pooler 等, 1996; Hartung 和 Pooler, 1997)。

Pooler 等 (1996) 描述的一组引物包括:

241A: 5' -GCCCGACGCGAGTTGAATC-3'

241B: 5' -GCCCGACGCGCTACAGAC TC-3'

245A: 5' -CGCGTGCCAGTGGAGATCC-3'

245B: 5' -CGCGTGCCAGAACTAGCAG-3'

295A: 5' -CGT TCC TGGCCGATT AATAG-3'

295B: 5' -CGCGTTCCT GCG TTTTTT CG-3'

PCR 的反应体系为 25  $\mu$ l, 其中含: 2.5  $\mu$ l 缓冲液 (PerkinElmer1) (含 15 mM  $MgCl_2$ )、5.0  $\mu$ l 脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP) (1 mM)、六种引物各 2.0  $\mu$ l (0.4  $\mu$ M), 以及 0.5  $\mu$ l Taq DNA 聚合酶和 5.0  $\mu$ l 样品 DNA。循环参数为: 95  $^{\circ}C$  15 min 的预变性步骤; 35 个循环的 95  $^{\circ}C$  1 min、57  $^{\circ}C$  1 min 和 72  $^{\circ}C$  1 min; 以及 72  $^{\circ}C$  7 min 的最后延伸步骤。在 0.5 $\times$  Tris-acetate-EDTA (TAE) 缓冲液中通过 1.5%琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析 (EPPO, 2006)。

如前所述, 草莓角斑病菌的特异性 PCR 扩增产物为 300、550 和 615 bp (Pooler 等, 1996; Hartung 和 Pooler, 1997)。当提取物来自被草莓角斑病菌侵染的植物时, 通常会有 300 bp 的条带, 其他条带 (550 和 615 bp) 偶尔会出现。

采用前述程序, 引物 245A 和 245B 可用于常规 PCR, 并产生 300 bp 的扩增产物。

### 3.9.3 巢式 PCR

建议使用 Moltmann 和 Zimmerman (2005) 描述的巢式 PCR 来诊断显症草莓植株中的草莓角斑病菌和检测未显症的草莓植株 (冻结和绿色植物), 该方法使用 Pooler 等 (1996) 和 Zimmerman 等 (2004) 开发的引物。Roberts 等 (1996) 描述的巢式 PCR 提供了另一种用于确认的方法。

#### 3.9.3.1 Moltmann 和 Zimmerman (2005) 的规程

本规程的特异性在一项使用 14 个草莓角斑病菌分离物、30 个野油菜黄单胞菌分离物 (代表 14 个致病变种) 和 17 个与草莓叶片相关的尚未鉴定的细菌分离物所做的研究中得到了确认。此外, Hartung 和 Pooler (1997) 已对外引物组的特异性进行过验证 (3.9.2.1 节)。未观察到和受检分离物的交叉反应。本 PCR 方法已成功用于检测在草莓植物和进口植物调查期间采集到的样品 (Moltmann 和 Zimmerman, 2005)。它能够检测出 200 fg DNA 每反应, 灵敏度比常规 PCR 高 100 倍 (Zimmerman 等, 2004)。

按照每克组织加入 10–20 ml 0.01 M 磷酸钠缓冲液的比例处理叶片、叶柄和冠部组织 (30–70g)，在室温下隔夜培养。如 Zimmerman 等 (2004) 所述，提取 DNA 并通过单一和巢式 PCR 进行分析。

引物包括：

245A: 5' -CGCGTGCCAGTGGAGATCC-3'

245B: 5' -CGCGTGCCAGAACTAGCAG-3'

245.5: 5' -GGTCCAGTGGAGATCCTGTG-3'

245.267: 5' -GTTTTTCGTTACGCTGAGTACTG-3'

PCR 的反应体系为 25  $\mu$ l，其中含：PCR 缓冲液 (10 mM Tris-HCl、50 mM KCl、0.08% Nonidet P-40、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>)、每种 dNTP 各 0.2mM、每种引物各 0.2  $\mu$ M，以及 0.5  $\mu$ l Taq DNA 聚合酶。循环参数为：94 $^{\circ}$ C 4 min 的预变性步骤；35 个循环的 94  $^{\circ}$ C 1 min、68  $^{\circ}$ C 1 min 和 72  $^{\circ}$ C 1 min；以及 72  $^{\circ}$ C 7 min 的最终延伸步骤。对于巢式 PCR，在使用第一轮引物 (245A 和 245B) 进行 DNA 扩增后，取 1  $\mu$ l 第一轮 PCR 产物作为模板，用内引物 245.5 和 245.267 进行第二轮 PCR。使用相同的循环参数，除了内引物 245.5 和 245.267 的退火温度为 62  $^{\circ}$ C 以外。在 0.5 $\times$  TAE 缓冲液中通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析。

在使用 245A 和 245B 引物的第一轮 PCR 中，草莓角斑病菌的特异性 PCR 扩增产物为 300 bp，在使用内引物 245.5 和 245.267 的巢式 PCR 中则为 286 bp。在高模板浓度下，有时候会扩增出约为 650 bp 的第二个片段。

### 3.9.3.2 Roberts 等 (1996) 的规程

本规程的特异性在一项使用 30 个草莓角斑病菌分离物，17 个野油菜黄单胞菌分离物 (代表 16 个致病变种) 和从草莓中分离到的 9 个非致病性黄单胞菌分离物所做的研究中得到了确认。未观察到和受检分离物的交叉反应。这种巢式 PCR 能够检测出植物组织中的大约 18 个草莓角斑病菌细胞 (Roberts 等, 1996)。

如 Roberts 等 (1996) 所述，半巢式引物包括：

XF9: 5' -TGGGCCATGCCGGTGGAACTGTGTGG-3'

XF11: 5' -TACCCAGCCGTCGCAGACGACCGG-3'

XF12: 5' -TCCCAGCAACCCAGATCCG-3'

PCR 的反应体系为 25  $\mu$ l，其中含：PCR 缓冲液 (10 mM Tris-HCl、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>)、每种 dNTP 各 0.2 mM、每种引物各 0.2  $\mu$ M，以及 0.5  $\mu$ l Taq DNA 聚合酶。循环参数为：95  $^{\circ}$ C 2 min 的预变性步骤；30 个循环的 95  $^{\circ}$ C 30 s、65  $^{\circ}$ C 30 s 和

72 °C 45 s; 以及 72 °C 5 min 的最终延伸步骤。对于半巢式 PCR, 在使用第一轮引物 (XF9 和 XF11) 进行 DNA 扩增后, 取 3 µl 第一轮 PCR 产物作为模板, 用引物 XF9 和 XF12 进行第二轮 PCR。使用与描述用于第一轮的循环参数相同的参数, 除了退火温度为 58 °C 以外。在 0.5× TAE 缓冲液中通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析。

在使用 XF9 和 XF11 引物的第一轮 PCR 中, 草莓角斑病菌的特异性 PCR 扩增引物为 537 bp, 在使用 XF9 和 XF12 引物的半巢式 PCR 中则为 458 bp。

### 3.9.4 实时 PCR

#### 3.9.4.1 Weller 等 (2007) 的规程

本规程的特异性在一项使用 10 个草莓角斑病菌分离物和 24 个黄单胞菌分离物 (代表 12 个种和 17 个致病变种) 所做的研究中得到了确认。(在所有分离物中) 仅检测到草莓角斑病菌。这种实时 PCR 能够检测出每个叶盘中  $10^3$  cfu (Weller 等, 2007)。本规程已经由荷兰的一个实验室做过进一步验证; 验证数据可从 EPPO 有关诊断专业知识的数据库 (<http://dc.eppo.int/validationlist.php>) 中获取。

和荧光报告基团 JOE 共价标记在 5'端, 和荧光淬灭基团 TAMRA 共价标记在 3'端的基于 *gyrB* 基因和 TaqMan 探针序列的引物为:

Xf *gyrB*-F: 5'-CCG CAG CGA CGC TGA TC -3'

Xf *gyrB*-R: 5'-ACG CCC ATT GGC AAC ACT TGA-3'

Xf *gyrB*-P: 5'-TCC GCA GGC ACA TGG GCG AAG AAT TC-3'

进行 PCR 时取 4 µl 模板加入反应混合液, 其中含: 1× TaqMan 缓冲液 A (Applied Biosystems1)、5.5 mM MgCl<sub>2</sub>、200 µM dNTPs (Promega1)、每种引物各 300 nM, 以及 100 nM 探针和 0.63 U AmpliTaq Gold DNA 聚合酶 (Applied Biosystems1)。循环参数为: 50 °C 2 min 的预变性步骤, 随后 95 °C 15 min, 继以 40 个循环的 95 °C 10 s 和 60 °C 1 min。

### 3.9.5 PCR 结果的解释

#### 3.9.5.1 常规 PCR

如果样品和阴性对照没有检测到任何预期大小的草莓角斑病菌特异性扩增产物, 但所有阳性对照均检测到了扩增产物, 则 PCR 检测结果为阴性。

如果检测到至少一种预期大小的草莓角斑病菌特异性扩增产物, 而它在阴性对照中没有扩增, 则 PCR 检测结果为阳性。



如果从用作阳性对照的含草莓角斑病菌的水中获得了预期大小的扩增产物，但从用作阳性对照的加有草莓角斑病菌的植物提取物中获得了阴性结果，则可以怀疑 PCR 受到了抑制。建议用提取物的 1:10, 1:100 和 1:1 000 稀释液重新进行 PCR 或者重新提取 DNA。

### 3.9.5.2 实时 PCR

实时 PCR 检测可判为有效，如果：

- 阳性对照使用病原特异性引物产生一条扩增曲线
- 使用阴性提取对照和阴性扩增对照未见扩增曲线（即循环阈（Ct）值为 40）。

如果使用了 *COX* 内对照引物，则阴性对照（如有使用）、阳性对照和每个检测样品都必须产生一条扩增曲线。样品使用内对照引物不能产生一条扩增曲线则说明，例如，DNA 提取失败、反应混合液不含 DNA、DNA 提取物中有抑制 PCR 的化合物存在，或核酸已经降解。

一个样品可判为阳性，如果它产生一条典型的扩增曲线。每个实验室首次实施检测时，需要对 Ct 值进行验证。

### 3.9.6 分子检测的对照

为了获得可靠的检测结果，取决于所使用的检测类型和所要求的确定性水平，应考虑为每一组核酸分离物、目标有害生物或目标核酸扩增物设置适宜的对照。就 PCR 而言，至少应使用一个阳性核酸对照、一个内对照，以及一个阴性扩增对照（无模板对照）。

阳性对照应在不同于样品检测区域的另一个区域中制备。

**阳性核酸对照。本对照用于监测** PCR 扩增的效率。可使用预先制备（储存）的核酸、全基因组 DNA 或一种合成对照（例如克隆的 PCR 产物）。就本规程而言，建议使用纯培养的草莓角斑病菌细胞的悬浮液（ $10^4$ – $10^6$  cfu/ml）作为阳性核酸对照。

**内对照。对常规和实时** PCR 而言，规程应包含诸如 *COX*（Weller 等，2000）、16S 核糖体（r）DNA（Weisberg 等，1991）或 *GADPH*（Mafra 等，2012）的一个植物管家基因（HKG），以排除因核酸提取失败或者解，或存在 PCR 抑制剂而可能引起的 PCR 假阴性。

**阴性扩增对照（无模板对照）。常规和实时** PCR 有必要设置本对照，以排除反应混合液制备过程中污染引起的假阳性。在扩增阶段加入制备反应混合液所使用的 PCR 级水或无菌 PBS。

**阳性提取对照。**本对照用于确保源自目标细菌的核酸的质量足以满足 PCR 扩增的需要。核酸提取自受侵染的寄主组织，或用接近规程检测极限浓度的目标细菌接种的健康植物组织。

阳性对照应约为每株植物用于 DNA 提取的叶片组织数量的 1/10。就本规程而言，建议以用  $10^6$  cfu/ml 草莓角斑病菌参考菌株接种的草莓角斑病菌组织浸出液作为阳性提取对照。

就 PCR 而言，需要注意避免由阳性对照或阳性样品的气雾引起的交叉污染（巢式 PCR 尤其如此）。如有必要，应对实验室所用的阳性对照进行测序，以便对该序列和从大小正确的 PCR 扩增产物获取的序列作出比较。或者，可以合成已知序列的阳性对照，该对照同样可以与大小正确的 PCR 扩增产物进行比较。

**阴性提取对照。**本对照用于监测核酸提取过程中的污染和/或与寄主组织的交叉反应。本对照包括提取自未受侵染的寄主组织，并随后进行扩增的核酸，或以前检测为草莓角斑病菌阴性的样品组织浸出液。预期有大量阳性样品时，建议引入多重对照。

#### 4. 鉴定

鉴定的最低要求是分离出细菌和三种检测技术之一产生阳性结果：（1）使用多克隆抗体的间接 ELISA、DAS-ELISA(3.7 节)或免疫荧光(3.8 节)；（2）PCR（3.9 节）；以及（3）致病性检测，通过接种草莓寄主以满足柯赫氏假设的要求（4.4 节和 3.6 节）。可能需要开展其他的检测（4 节）来进一步确定存在的菌株。所有检测都必须设置阳性和阴性对照。

就潜伏侵染或无症状性植物而言，在完成最初的筛选试验后，应分离出病原菌并对其进行鉴定，具体包括使用纯培养并遵循柯赫氏假设的致病性检测。

##### 4.1 生化与生理检测

草莓角斑病菌具有所有黄单胞菌常见的培养特征。细胞为革兰氏阴性、好氧杆菌，具有一根极生鞭毛。不还原硝酸盐，接触酶阳性，不能利用天冬酰胺作为唯一碳源和氮源（Bradbury, 1977; Bradbury, 1984; Schaad 等, 2001）。从碳水化合物弱产酸。在 YPGA 和 Wilbrink-N 培养基上，菌落黏质、呈凸起状且有光泽（Dye, 1962; van den Mooter 和 Swings, 1990; Swings 等, 1993; Schaad 等, 2001）。通过表 2 中 Schaad 等（2001）描述的特征，可以很容易地将黄单胞菌属中的种类与其他属的好氧性、革兰氏阴性杆状细菌，以及其他具有黄色色素的细菌区分开来。

**表 2.** 用于区分黄单胞菌属和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)，以及具有黄色色素的黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 与泛菌属 (*Pantoea*) 的表型特征 (Schaad 等, 2001)

特征	黄单胞菌属	假单胞菌属	黄杆菌属	泛菌属
鞭毛	1 根, 极生	>1 根, 极生	无	周生
菌黄素	是	否	否	否
荧光性	否	否	否	否
从蔗糖产果聚糖	是	有变化	否	否
从半胱氨酸产硫化氢 (H <sub>2</sub> S)	是	有变化	否	否
氧化酶	阴性或弱	否	阳性	阴性
发酵	否	有变化	否	是
在 0.1% 氯化三苯基四氮唑 (TTC) 上生长	否	否	是	是

表 3 列出了可从不同保藏中心获取的, 建议用作生化与生理检测阳性对照的草莓角斑病菌参考菌株。

**表 3.** 草莓角斑病菌的参考菌株

菌株	来源
ATCC 33239	位于美国弗吉尼亚马纳萨斯的美国模式培养物保藏中心
CFBP 2510	位于法国昂热的国家农业研究科学院植物细菌研究所的法国植物病原细菌保藏中心
ICMP 5715	位于新西兰奥克兰的国际植物微生物保藏中心
BCCM/LMG 708	位于比利时根特的比利时微生物联合保藏中心/ Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica
NCPPB 1469	位于英国约克的中央科学实验室的国家植物病原细菌保藏中心; 位于荷兰瓦赫宁根的植物保护局 (PD) 的培养物保藏中心
NCPPB 1822	位于英国约克的中央科学实验室的国家植物病原细菌保藏中心; 位于荷兰瓦赫宁根的植物保护局 (PD) 的培养物保藏中心

表 4 列出了用于区分草莓角斑病菌和黄单胞菌属其他种类的最相关或最有用的特征 (Schaad 等, 2001; Janse 等, 2001; EPPO, 2006)。

**表 4.** 可区分草莓角斑病菌和“野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 组”及“草莓细菌性叶斑病菌”的诊断性检测

检测项目	草莓角斑病菌	野油菜黄单胞菌	草莓细菌性叶斑病菌
35 °C 下生长	-	+	ND
2%氯化钠溶液中生长	-	+	+
七叶苷水解	-	+	+
明胶液化	+	V	+
蛋白质降解	-	+	ND
淀粉水解	+	V	+
脲酶产生	-	-	-
从下列物质产酸:			
阿拉伯糖	-	+	ND
半乳糖	-	+	+
海藻糖	-	+	ND
纤维二糖	-	+	+

ND, 不确定; V, 反应有变化。

来源: Janse 等 (2001) 和 EPPO (2006)。

可使用商业化系统对分离到的菌株进行生化鉴定, 也可以使用 API 20 NE 和 API 50 CH 试纸条 (BioMérieux1) 通过特异性图谱对草莓角斑病菌进行鉴定 (EPPO, 2006)。

就 API 20 NE 试纸条<sup>1</sup>而言, 需根据生产商的说明用 Wilbrink-N 培养基上经 48 小时培养的检测与参考菌株培养物制备悬浮液, 并接种到试纸条上。在 25-26 °C 下培养, 并分别在 48h 和 96 h 后读数。48 h 后的读数结果用于分析酶学反应, 96 h 后的用于分析底物利用, 并与草莓角斑病菌的特征 (表 5) 进行比较。

表 5. 草莓角斑病菌在 API 20 NE 试纸条上的反应

检测项目	反应 ( 48 或 96 h 后 ) †
葡萄糖发酵	-
精氨酸	-
脲酶	-
七叶苷	+
明胶	+ (弱)
对硝基苯基-β-D-吡喃葡 萄糖苷 (PNPG)	+
同化:	
葡萄糖	+
阿拉伯糖	-
甘露糖	+
甘露醇	-
N-乙酰氨基葡萄糖	+
麦芽糖	-
葡萄糖酸	-
癸酸	-
己二酸	-
苹果酸	+
柠檬酸	-
乙酸苯酯	-

† 90%受检草莓角斑病菌菌株的常见反应 ( López 等 , 2005 )。

就 API 50 CH 试纸条<sup>1</sup>而言, 需用 PBS 制备 OD<sub>600nm</sub>= 1.0 的细菌细胞悬浮液。取 1 ml 悬浮液加到 20 ml 改良培养基 C 上 (0.5 g NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.2 g MgSO<sub>4</sub>、5 g NaCl、1 g 酵母提取物、70 ml 溴麝香草酚蓝 (0.2%) , 加蒸馏水至 1 l; pH 6.8) (Dye, 1962)。按照生产商的说明接种到试纸条上。在 25 °C 有氧条件下培养, 并分别在 2、3 和 6 天后读数。培养期后, 测试孔中显示黄色表明可利用不同的碳水化合物 (表 6)。

表 6. 草莓角斑病菌在 API 50 CH 试纸条上的反应

检测项目 <sup>†</sup>	反应 ( 六天后 )
D-阿拉伯糖	有变化
半乳糖	+
D-葡萄糖	
D-果糖	+
D-甘露糖	+
N-乙酰氨基葡萄糖	+
七叶苷	+
蔗糖	+
海藻糖	+
D-Lyxosa	+
L-岩藻糖	+
	+

<sup>†</sup> API 50 CH 试纸条上的其他糖类未被草莓角斑病菌利用 ( López 等 , 2005 ) 。

#### 4.1.1 脂肪酸甲酯分析

与革兰氏阴性细菌的胞质膜和外膜有关的脂肪酸甲酯 (FAMEs) 对细菌鉴定十分有用 (Sasser, 1990)。Dickstein 等 (2001) 提供了可用于推定革兰氏阴性和阳性细菌所属属的特定脂肪酸。通过比较某未知菌株的图谱和数据库 (例如 TSBA40 数据库) 中各类菌株的图谱中的脂肪酸的类型和相对数量来进行鉴定。十分关键的是, 细菌必须在相同的时间、温度和营养培养基等条件下生长, 以取得可复制的结果。草莓角斑病菌菌株包含三种主要的脂肪酸: 16:1 $\omega$ -7 cis、15: 0 anteiso 和 15: 0 iso。虽然有些检测菌株形成的图谱和数据库图谱非常吻合, 但也有一些菌株形成不同的脂肪酸图谱, 与数据库图谱相差甚远。研究表明, 草莓角斑病菌菌株具有较为明显的多样性, 至少可划分为四个不同的脂肪酸组 (Robert 等, 1998)。建议采用 Roberts 等 (1998) 描述的方法绘制草莓角斑病菌的 FAME 图谱。24 °C 下, 检测菌株在胰酪大豆琼脂上生长 48 h, 实施脂肪酸提取程序, 然后通过 Sherlock 微生物鉴定系统 (MIDI) (美国特拉华州纽瓦克市) 对提取物进行分析。

##### 4.1.1.1 FAME 分析结果的解释

如果检测菌株的图谱与草莓角斑病菌阳性对照或参考菌株的完全一致, 则 FAME 检测的结果为阳性。MIDI 和国家植物病原细菌保藏中心 (英国约克食品与环境研究院 (Fera)) 可提供脂肪酸分析。Janse 等 (2001) 报道了草莓角斑病菌和草莓细菌性叶斑病菌中关键 FAMEs 的成分和含量。

## 4.2 血清学检测

### 4.2.1 荧光免疫

荧光免疫检测可用于鉴定可疑的草莓角斑病菌菌株。用 PBS 制备浓度约为  $10^6$  细胞/ml 的悬浮液，然后实施 3.8 节所描述的荧光免疫检测程序。如为快速诊断仅采用了两种鉴定检测方法，则不要在本方法之外再使用其他的血清学检测方法。

### 4.2.2 ELISA

间接 ELISA 或 DAS-ELISA (3.7.1 和 3.7.2 节分别描述) 可用于鉴定从受疑似细菌性角斑病侵染的植物材料中分离到的疑似草莓角斑病菌菌株。如为快速诊断仅采用了两种鉴定检测方法，则不要在本方法之外再使用其他的血清学检测方法。

## 4.3 分子检测

### 4.3.1 PCR

可使用 3.9 节描述的 PCR 规程鉴定疑似的草莓角斑病菌。

### 4.3.2 REP-PCR

Opgenorth 等 (1996) 和 Pooler 等 (1996) 描述了特异性的基因外重复回文序列 (REP) -PCR 规程。这两种规程中的任何一种都可用于对草莓角斑病菌的检测菌株作出可靠鉴定。

下文描述的 PCR 规程以 Opgenorth 等 (1996) 描述的反应混合液和扩增条件为基础。

检测用菌株取自皮尔斯病改良培养基 (5.0 g 蔗糖、2.5 g 植物蛋白胨 (BD BBL1)、10 g 植物凝胶 (BD BBL1) 上的划线或单个菌落，加蒸馏水至 1 l，并在高压蒸汽灭菌前用 2N 的 HCl 将 pH 值调至 7.5) (Opgenorth 等, 1996)。可采用不同的生长培养基；但是在使用之前，需对其进行标准化处理。

两组引物分别为：

REP1R-I: 5' -IIIICGICGICATCIGGC-3'

REP2-I: 5' -ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

ERIC1R: 5' -ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'

ERIC2: 5' -AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGC G-3'

反应缓冲液含: 16.6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、67 mM Tris-HCl (pH 8.8)、6.7  $\mu\text{M}$  EDTA、30 mM 2-巯基乙醇、0.17 mg BSA/ml、10% (v/v) 二甲基亚砷、每种 dNTP 各 1.2 mM、每种引物各 62 pmol，以及 2U Taq DNA 聚合酶。用 10  $\mu\text{l}$  无菌移液吸头 (或其

合适的工具) 将检测菌株代表性菌落上的细菌转移至装有 25  $\mu$ l 反应混合液的 PCR 管中。循环参数为: 95  $^{\circ}$ C 6 min, 随后进行 35 个循环的 94  $^{\circ}$ C 1 min、44  $^{\circ}$ C (REP 引物) 或 52  $^{\circ}$ C (ERIC 引物) 1 min、65  $^{\circ}$ C 8 min。扩增循环后, 继以 68  $^{\circ}$ C 16 min 的最后延伸步骤。扩增产物 (5-10  $\mu$ l) 在 1.5% (w/v) 琼脂糖凝胶中进行电泳。用溴化乙锭染色后, 在紫外线透射下可以看见扩增的 DNA 片段。

#### 4.3.2.1 REP-PCR 结果的解释

在相同 PCR 条件下进行扩增和在同一凝胶中进行电泳, 如果检测菌株的基因组指纹和参考菌株的 REP 与 ERIC 基因型相同, 则检测菌株可鉴定为草莓角斑病菌 (Pooler 等, 1996)。由于基因组变异水平较低, 可能会从草莓角斑病菌不同的菌株中得到少量多态性谱带。

#### 4.3.3 多位点序列分析

多位点序列分析 (MLSA) 方法已广泛用于黄单胞菌的特异性鉴定 (Parkinson 等, 2007; Almeida 等, 2010; Hamza 等, 2012), 也可用于草莓角斑病菌的鉴定, 特别是现在已有基因组序列草图可供使用 (Vandroemme 等, 2013)。然而, 应注意的是, 该方法对草莓角斑病菌的鉴定尚未做过验证。管家基因 (例如 *gyrB*、*rpoD*) 可用 Almeida 等 (2010) 和 Hamza 等 (2012) 所描述的引物和条件进行扩增。MLSA 包含对多位点 (通常为 4-8 个管家基因) 测序, 并用这些序列与存于核苷酸数据库的黄单胞菌属的各种类的参考序列进行比对; 例如, 植物与环境微生物数据库 (PAMDB) (<http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>) (Almeida 等, 2010)、微生物基因型 MLVA 数据库 (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>), 以及 Q-bank 细菌数据库 (<http://www.q-bank.eu/Bacteria/>)。

### 4.4 致病性试验

必要时, 应通过致病性试验对疑似草莓角斑病菌的菌株的鉴定予以确认。应将从分离或富集平板上挑取的菌株接种到感病草莓植株的叶片上 (或按 3.6 节所述接种到离体叶片上)。有多种程序可供使用: Hazel 和 Civerolo (1980)、Civerolo 等 (1997a) 和 Hildebrand 等 (2005)。

#### 4.4.1 一般接种程序

建议的接种程序是采用未受草莓角斑病菌侵染的感病品种 (例如, 卡麦罗莎、海景、赛尔娃、Korona、瓜佳) 的草莓植株。如有可能, 接种前应将植物置于 20-25  $^{\circ}$ C 相对湿度高 (>90%) 的环境箱中过夜, 并光照 4 个小时, 以诱导气孔张开。

用无菌蒸馏水或 10 mM PBS 制备细菌细胞悬液 (10<sup>6</sup> cfu/ml)。用低压喷枪、毛刷或类似工具 (例如 DeVilbiss1) 将每一菌株的接种物接种到 2-3 株植物每株上的 3 片三出叶片的背轴面上, 从而避免引起水浸状损伤。接种前可在叶片上造成伤口 (例如,



用针在叶片背轴面上扎孔），从而促进侵染，但是并非必须要如此处理。接种后，将植株置于 20–25 °C 湿度高 (>90%) 的培养箱中以 12-14 h 的光周期进行培养。分别用草莓角斑病菌参考菌株的细胞悬浮液（用与检测菌株相同的方法制备）和无菌蒸馏水或 10 mM PBS 作为阳性对照和阴性对照，并在不同的托盘内进行接种。接种后三周内（21 天），需每周对植株病斑发展情况进行评估。如 3.5 节所述，再次从病斑中分离出病原物，并通过 ELISA、荧光免疫或 PCR 进行鉴定。

#### 4.4.1.1 致病性试验结果的解释

如果细菌细胞悬浮液含有草莓角斑病菌，则初期症状表现为叶片背面出现暗色水浸状病斑（反射光下观察）。在透射光下观察，这些病斑呈半透明黄色。随后，这些病斑会发展为坏死斑点，周围伴有黄色晕圈或边缘坏死。用草莓角斑病菌参考菌株（阳性对照）接种的叶片应表现出相同的症状。

用无菌蒸馏水或 10 mM PBS（阴性对照）接种的叶片不应出现类似症状。

#### 4.4.2 过敏性坏死反应

烟草叶片的过敏性坏死反应（HR）表明存在 *hrp* 基因，很多植物病原细菌都可以引起阳性反应。可使用丁香假单胞菌丁香致病变种（*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*）等菌株作为阳性对照。采用烟草栽培品种萨姆森（Samsun）或 Xanthi 的五叶以上的植株。用无菌蒸馏水或 10 mM PBS 制备 10<sup>9</sup> cfu/ml（OD<sub>600nm</sub> = 1.0）的细菌悬浮液，并用装有 25 号针头的注射器将悬浮液注入成年叶片背轴面的细胞间隙中。

##### 4.4.2.1 HR 结果的解释

接种后 24-48 h 内被注射组织完全倒伏和坏死应记录为检测结果阳性。多数草莓角斑病菌菌株都是 HR 阳性。但是，有些草莓角斑病菌菌株也可能是 HR 阴性，保存一段时间后尤其如此。用无菌蒸馏水或 10 mM PBS 作为阴性对照接种的叶片不应出现类似反应。

## 5. 记录

应按照 ISPM 27（限定有害生物诊断规程）2.5 节的要求保存记录和证据。

在其他缔约方可能受到诊断结果影响的情况下，特别是在违规（ISPM 13 违规和紧急行动通知准则）或在一个地区首次发现该有害生物时，应将以下记录、证据和其他材料至少妥善保存一年，以保持可追溯性：原始样品、有害生物培养物、经过防腐处理或用玻片封装的标本，或检测材料（例如，凝胶照片、ELISA 结果照片和 PCR 扩增产物）。

## 6. 获取进一步信息的联系点

有关本诊断规程的进一步信息可获自：

美国农业部（USDA）农业研究院（ARS）（旧称）（Edwin L. Civerolo；电子邮箱：emciv@comcast.net）。

粮食与环境研究院植物与环境细菌学部，英国，YO41 1LZ，约克 Sand Hutton（John Elphinstone；电子邮箱：john.elphinstone@fera.gsi.gov.uk）。

瓦伦西亚农业研究所（IVIA）植物保护和生物技术中心，西班牙，46113，蒙卡达（瓦伦西亚），距蒙卡达-纳克拉中心 4.5 公里（María M. López；电子邮箱：mlopez@ivia.es；电话：+34 963 424000；传真：+34 963 424001）。

国家植物保护组织（NPPOs），区域植物保护组织（RPPOs）或植物检疫措施委员会（CPM）附属机构可通过国际植物保护公约秘书处（ippc@fao.org）提出对诊断规程进行修订的申请，此类申请会被转交给诊断规程技术小组（TPDP）。

## 7. 致谢

本规程初稿由 E.L. Civerolo（美国农业部农业研究院（旧称），参看前节）起草，由 J. Elphinstone（英国粮食与环境研究院，参看前节）和 M.M. López（西班牙瓦伦西亚农业研究所（IVIA））修改。

## 8. 参考文献

本附件同时引用了国际植物检疫措施标准（ISPMs）。ISPMs 可从国际植物检疫门户网站（IPP）上获取：<https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>。

**Almeida, N.F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C.R., Morris, C.E., Schaad, N.W., Schuenzel, E.L., Lacy, G.H., Sun, X., Jones, J.B., Castillo, J.A., Bull, C.T., Leman, S., Guttman, D.S., Setubal, J.C. & Vinatzer, B.A.** 2010. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, 100(3): 208–215.

**Bradbury, J.F.** 1977. *Xanthomonas fragariae*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 558. Wallingford, UK, CABI.

**Bradbury, J.F.** 1984. *Xanthomonas*. In N.R. Krieg & J.G. Holt, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Baltimore, MD, Williams & Wilkins.

**CABI.** n.d. *Crop protection compendium*. Wallingford, UK, CABI. Available at <http://www.cabi.org/cpc/> (last accessed 16 April 2016).

**Calzolari, A. & Mazzucchi, U.** 1989. Attempts to detect *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants. *Acta Horticulturae*, 265: 601–604.

**Civerolo, E.L., Feliciano, A.J., Melvin, J.A. & Gubler, W.D.** 1997a. A detached leaf bioassay for *Xanthomonas fragariae*. In A. Mahadevin, ed. *Proceedings of the 9th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 89–94. University of Madras, Madras, India.

- Civerolo, E.L., Roberts, P., Feliciano, A.J., Melvin, J.A., Buchner, R.P., Jones, J.B. & Gubler, W.D.** 1997b. Comparative detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants by detached leaf inoculation, ELISA and PCR. In A. Mahadevin, ed. *Proceedings of the 9th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 95–99. University of Madras, Madras, India.
- De Boer, S.H.** 1990. Immunofluorescence for bacteria. In R. Hampton, E. Ball & S. De Boer, eds. *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: A laboratory manual*, pp. 295–298. St Paul, MN, APS Press.
- Dickstein, E.R., Jones, J.B. & Stead, D.E.** 2001. Automated techniques. In N.W. Schaad, J.B. Jones & W. Chun, eds. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, pp. 343–358. St Paul, MN, APS Press.
- Dye, D.W.** 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. *New Zealand Journal of Science*, 5(4): 393–416.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 1997. Data sheet on *Xanthomonas fragariae*. In EPPO/CABI (I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott, & M. Holderness, eds), ed. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn, pp. 1124–1128. Wallingford, UK, CABI.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2006. Diagnostic protocol for *Xanthomonas fragariae*. EPPO Standards PM 7/65. *EPPO Bulletin*, 36: 135–144.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2009. Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria. EPPO Standards PM 7/97 (1). *EPPO Bulletin*, 39: 413–416.
- Gubler, W.D., Feliciano, A.J., Bordas, A., Civerolo, E.L., Melvin, J. & Welch, N.** 1999. *X. fragariae* and *C. cladosporioides* cause strawberry blossom blight. *California Agriculture*, 53: 26–28.
- Hamza, A.A., Robene-Soustrade, I., Jouen, E., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Fisher-Le Saux, M., Gagnevin, L. & Pruvost, O.** 2012. Multilocus sequence analysis- and amplified fragment length polymorphism-based characterization of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper and their relatedness to *Xanthomonas* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(3): 183–190.
- Hartung, J.S. & Pooler, M.R.** 1997. Immunocapture and multiplexed-PCR assay for *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leafspot disease. *Acta Horticulturae*, 439: 821–828.
- Hayward, C.** 1960. A method for characterizing *Pseudomonas solanacearum*. *Nature*, 186: 405–406.
- Hazel, W.J. & Civerolo, E.L.** 1980. Procedures for growth and inoculation of *Xanthomonas fragariae*, causal organism of angular leaf spot of strawberry. *Plant Disease*, 64: 178–181.
- Hildebrand, P.D., Braun, P.G., Renderos, W.E., Jamieson, A.R., McRae, K.B. & Binns, M.R.** 2005. A quantitative method for inoculating strawberry leaves with *Xanthomonas fragariae*, factors affecting infection, and cultivar reactions. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27: 16–24.
- Hildebrand, D.C., Schroth, M.N. & Wilhelm, S.** 1967. Systemic invasion of strawberry by *Xanthomonas fragariae* causing vascular collapse. *Phytopathology*, 57: 1260–1261.
- Janse, J.D.** 2005. Examples of bacterial diseases of cultivated and wild plants – *Xanthomonas fragariae*. In: *Phytopathology: principles and practice*. Chapter 7. Wallingford, UK, CABI Publishing. Pp. 224–225.

- Janse, J.D., Ross, M.P., Gorkink, R.F.J., Derks, J.H.J., Swings, J. Janssens, D. & Scortichini, M.** 2001. Bacterial leaf blight of strawberry (*Fragaria* ( $\times$ ) *ananassa*) caused by a pathovar of *Xanthomonas arboricola*, not similar to *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King. Description of the causal organism as *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* (pv. nov., comb. nov.). *Plant Pathology*, 50: 653–665.
- Kennedy, B.W.** 1965. Infection of Potentilla by *Xanthomonas fragariae*. *Plant Disease Reporter*, 49: 491–492.
- Kennedy, B.W. & King, T.H.** 1962. Angular leaf spot of strawberry caused by *Xanthomonas fragariae* sp. nov. *Phytopathology*, 52: 873–875.
- Koike, H.** 1965. The aluminum-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. *Phytopathology*, 55: 317–319.
- López, M.M., Aramburu, J.M., Cambra, M. & Borrás, V.** 1985. [Detection and identification of *Xanthomonas fragariae* in Spain.] *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie Agricola*, 28: 245–259 (in Spanish).
- López, M.M., Dominguez, F., Morente, C., Salcedo, C.I., Olmos, A. & Civerolo, E.** 2005. *Diagnostic protocols for organisms harmful to plants: Diagnosis Xanthomonas fragariae*. SMT-4-CT98-2252.
- Maas, J.L.**, ed. 1998. *Compendium of strawberry diseases*, 2nd edn. St Paul, MN, APS Press.
- Maas, J.L., Gouin-Behe, C., Hartung J.S. & Hokanson, S.C.** 2000. Sources of resistance for two differentially pathogenic strains of *Xanthomonas fragariae* in *Fragaria* genotypes. *Horticultural Science*, 35: 128–131.
- Maas, J.L., Pooler, M. & Galletta, G.J.** 1995. Bacterial angular leafspot disease of strawberry: Present status and prospects for control. *Advances in Strawberry Research*, 14: 18–24.
- Mafra, V., Kubo, K.S., Alves-Ferreira, M., Ribeiro-Alves, M., Stuart, R.M., Boava, L.P., Rodrigues, C.M. & Machado, M.A.** 2012. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PloS One*, 7(2), e31263.
- Mahuku, G.S. & Goodwin, P.H.** 1997. Presence of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry crowns in Ontario detected using a nested polymerase chain reaction (PCR). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 366–370.
- Milholland, R.D., Ritchie, D.F., Dayking, M.E. & Gutierrez, W.A.** 1996. Multiplication and translocation of *Xanthomonas fragariae* in strawberry. *Advances in Strawberry Research*, 15: 13–17.
- Moltmann, E. & Zimmermann, C.** 2005. Detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants by nested PCR. *EPPO Bulletin*, 35: 53–54.
- Opgenorth, D.C., Smart, C.D., Louws, F.J., de Bruijn, F.J. & Kirkpatrick, B.C.** 1996. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. *Plant Disease*, 80: 868–873.
- Parkinson, N., Aritua, V., Heeney, J., Cowie, C., Bew, J. & Stead, D.** 2007. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12): 2881–2887.
- Pooler, M.R., Ritchie, D.F. & Hartung, J.S.** 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3121–3127.

- Rademaker, J.L.W., Hoste, B., Louws, F.J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P. & De Bruijn, F.J.** 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 665–677.
- Rademaker, J.L.W., Louws, F.J., Schultz, M.H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J. & de Bruijn, F.J.** 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 95: 1098–1111.
- Rat, B.** 1993. *Xanthomonas fragariae*: Causal agent of angular leaf spot of strawberry. In J.G. Swings & E.L. Civerolo, eds. *Xanthomonas*, pp. 69–70. London, Chapman and Hall.
- Roberts, P.D., Hodge, N.C., Bouzar, H., Jones, J.B., Stall, R.E., Berger, R.D. & Chase, A.R.** 1998. Relatedness of strains of *Xanthomonas fragariae* by restriction fragment length polymorphism, DNA-DNA reassociation, and fatty acid analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3961–3965.
- Roberts, P.D., Jones, J.B., Chandler, C.K., Stall, R.E. & Berger, R.D.** 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested PCR. *Plant Disease*, 80: 1283–1288.
- Rowhani, A., Feliciano, A.J., Lips, T. & Gubler, W.D.** 1994. Rapid identification of *Xanthomonas fragariae* in infected strawberry leaves by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease*, 78: 248–250.
- Saddler, G.S. & Bradbury, J.F.** 2005. *Xanthomonas*. In G.M. Garrity, editor-in-chief; D.J. Brenner, N.R. Krieg & J.T. Stanley, eds Vol. 2. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn, Vol. 2, Part B, pp. 63–90. New York, Springer.
- Sasser, M.** 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In Z. Klement, K. Rudolph & D.C. Sands, eds. *Methods in phytopathology*, pp. 200–204. Budapest, Akademiai Kiado.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. & Lacy, G.H.** 2001. *Xanthomonas*. In N.W. Schaad, J.B. Jones & W. Chun, eds. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, 3rd edn, pp. 175–200. St Paul, MN, APS Press.
- Schaad, N.W., Tamaki, S., Hatziloukas, E. & Panopoulos, N.J.** 1995. A combined biological enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology*, 85: 243–248.
- Stackebrandt, E., Murray, R.G.E. & Truper, H.G.** 1988. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38: 321–325.
- Stefani, E., Mazzucchi, U. & Calzolari, A.** 1989. Evidence of endophytic movement of *Xanthomonas fragariae* Kenn. and King in strawberry. *Phytopathologia Mediterranea*, 28: 147–149.
- Stöger, A. & Ruppitsch, W.** 2004. A rapid and sensitive method for the detection of *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leafspot disease in strawberry plants. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 281–284.
- Swings, J., Vauterin, L. & Kersters, K.** 1993. The bacterium *Xanthomonas*. In J. Swings & E.L. Civerolo, eds. *Xanthomonas*, pp. 138–144. London, Chapman and Hall.
- Turechek, W.W., Hartung, J.S. & McCallister, J. 2008. Development and optimization of a real-time detection assay for *Xanthomonas fragariae* in strawberry crown tissue with receiver operating characteristic curve analysis. *Phytopathology*, 98(3): 359–368.

- Van den Mooter, M. & Swings, J.** 1990. Numerical analyses of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40: 348–369.
- Vandroemme, J., Baeyen, S., Van Vaerenbergh, J., De Vos, P. & Maes, M.** 2008. Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants. *Plant Pathology*, 57(3): 438–444.
- Vandroemme, J., Cottyn, B., Baeyen, S., De Vos, P. & Maes, M.** 2013. Draft genome sequence of *Xanthomonas fragariae* reveals reductive evolution and distinct virulence-related gene content. *BMC Genomics*, 14(1), 829.
- Weisberg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, B.A. & Lane, D.J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697–703.
- Weller, S.A., Beresford-Jones, N.J., Hall, J., Thwaites, R., Parkinson, N. & Elphinstone, J.G.** 2007. Detection of *Xanthomonas fragariae* and presumptive detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*, from strawberry leaves, by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 70: 379–383.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. & Stead, D.E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7): 2853–2858.
- Zimmermann, C., Hinrichs-Gerger, J., Moltmann, E. & Buchenauer, H.** 2004. Nested PCR for detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 111: 39–51.

**9. 图**

**图 1.** 叶片正面 (A,左) 和背面 (B,右) 的草莓角斑病症状

照片由美国密歇根州东兰辛密歇根州立大学的 A.M.C. Schilder 提供。



**图 2.** 叶片背面草莓角斑病菌产生的菌脓

照片由美国华盛顿哥伦比亚特区美国农业部农业研究院的 W.W. Turechek 提供。



图 3. 草莓花萼上的草莓角斑病症状

照片由美国密歇根州东兰辛密歇根州立大学的 A.M.C. Schilder 提供。

### 出台背景

这部分不属于本标准的正式内容

2004 年 11 月，标准委在工作计划中增列主题

2006 年 4 月，植检委第一届会议在工作计划中增列草莓角斑病菌（2004-012）

2014 年 1 月，专家磋商

2015 年 6 月，标准委通过电子决策批准提交成员磋商（2015\_eSC\_Nov\_03）

2016 年 3 月，植检诊断技术小组通过电子决策批准提交标准委审议  
（2016\_eTPDP\_Mar\_05）

2016 年 6 月，标准委通过电子决策批准进入为期 45 天的诊断规程通  
报期（2016\_eSC\_Nov\_01）

2016 年 8 月，标准委代表植检委批准诊断规程（未收到反对意见）

**ISPM 27：附件 14. 草莓角斑病菌（*Xanthomonas fragariae*）（2016）。**

罗马，国际植物保护公约，粮农组织。

2017 年 1 月，国际植保秘书处对第 8 节一处编辑性错误拼写进行纠正

2018 年 1 月，中文语言审核小组和联合国粮农组织翻译服务审议了  
这项 DP，国际植物保护公约秘书处合并了相应的修改。

发布背景最后更新：2018 年 1 月。