



МЕЖДУНАРОДНЫЕ СТАНДАРТЫ ПО ФИТОСАНИТАРНЫМ МЕРАМ

МСФМ 27 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРОТОКОЛЫ

ДП 5: Phyllosticta citricarpa (McAlpine) Aa на плодах (2014 год)

СОДЕРЖАНИЕ

1. Информация о вредном организме	ДП 5-2
2. Таксономическая информация	ДП 5-4
3. Выявление	ДП 5-4
3.1 Симптомы на плодах	ДП 5-4
3.2 Симптомы на листьях и ветвях	ДП 5-5
3.3 Сравнение симптомов черной пятнистости цитрусовых с симптомами, вызванными другими организмами или абиотическими факторами	ДП 5-5
4. Идентификация	ДП 5-6
4.1 Метод А: Выделение и культивирование <i>P. citricarpa</i>	ДП 5-7
4.1.1 Культурная среда	ДП 5-7
4.1.2 Признаки культуры	ДП 5-8
4.1.3 Морфология	ДП 5-8
4.1.4 Сравнение признаков культур и морфологических признаков <i>P. citricarpa</i> с признаками аналогичных видов <i>Phyllosticta</i>	ДП 5-9
4.2 Метод В: Молекулярные анализы	ДП 5-9
4.2.1 Идентификация <i>P. citricarpa</i> с помощью обычного ПЦР	ДП 5-10
4.2.1.1 Общая информация	ДП 5-10
4.2.1.2 Методы	ДП 5-10
4.2.1.3 Значимая информация о процедуре	ДП 5-11
4.2.2 Идентификация <i>P. citricarpa</i> на ПЦР в реальном времени	ДП 5-12

4.2.2.1	Общая информация	ДП 5-12
4.2.2.2	Методы	ДП 5-12
4.2.2.3	Значимая информация о процедуре	ДП 5-14
4.2.3	Идентификация <i>P. citricarpa</i> ВТС секвенированием	ДП 5-14
4.2.3.1	Общая информация	ДП 5-14
4.2.3.2	Методы	ДП 5-14
4.2.3.3	Значимая информация о процедуре	ДП 5-15
5.	Данные	ДП 5-15
6.	Контактные адреса для дополнительной информации	ДП 5-15
7.	Благодарность	ДП 5-16
8.	Справочные материалы	ДП 5-16
9.	Рисунки	ДП 5-20

1. Информация о вредном организме

Phyllosticta citricarpa (McAlpine) Aa, возбудитель "черной пятнистости цитрусовых", является грибом, вызывающим пятна на листьях и поверхностное повреждение плодов *Citrus*, *Poncirus* и *Fortunella* и их гибридов. Кроме *Citrus aurantium* и его гибридов, а также *Citrus latifolia*, все коммерчески выращиваемые виды *Citrus* восприимчивы к этой болезни (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002; Kotzé, 2000). *Citrus limon* является особо восприимчивым и, таким образом, как правило, это первый вид *Citrus*, на котором проявляются симптомы болезни после того, как патоген интродуцируется в новую зону (Kotzé, 2000).

Черная пятнистость цитрусовых впервые была отмечена в Австралии в 1895 году на *Citrus sinensis* (Benson, 1895). В настоящее время она присутствует в некоторых зонах Африки, Азии, Австралии и Северной и Южной Америки, производящих цитрусовые (CABI, 2011; NAPPO, 2010; Schubert *et al.*, 2012). Не было оповещений о выявлении организма в Европе, Центральной Америке и Карибском регионе (CABI, 2011; CABI/EPPO, 1998; EPPO/CABI, 1997; NAPPO, 2010).

P. citricarpa влечет за собой экономические последствия, связанные главным образом с внешними дефектами, которые он вызывает, что делает плоды цитрусовых непригодными для потребления в свежем виде (Spósito, 2003). Тяжелые заражения могут привести к преждевременному падению плодов (Kotzé, 2000). Некоторые потери, связанные с падением плодов, происходят в годы, благоприятные для развития вредного организма, и когда плоды оставляют на деревьях после пика созревания (CABI, 2011). Кроме того, на латентно инфицированных (бессимптомных) в период сбора урожая плодах симптомы могут развиваться во время транспортировки или хранения (Kotzé, 1996).

На эпидемиологию черной пятнистости цитрусовых влияет наличие инокулята, наличие условий окружающей среды, благоприятных для заражения (то есть тепло, осадки и влажная среда), цикл роста цитрусовых деревьев, а также возраст плодов и листьев в связи с их восприимчивостью к заражению (Kotzé, 1981, 2000). В зонах, где дожди идут в течение только одного сезона, псевдотеции с аскоспорами, развивающиеся исключительно на опавших листьях, являются основным источником инокулята. Там, где дожди не ограничиваются одним сезоном и в межсезонное время пораженные плоды остаются на деревьях после цветения и завязывания плодов, или там, где происходит следующее одно за другим и нерегулярное цветение культивируемых видов и сортов цитрусовых, пикниды с конидиями *P. citricarpa* также значимы как источники инокулята (Kotzé, 1981; Spósito *et al.*, 2008, 2011).

Псевдотеции развиваются 40-180 дней после опадения листьев, в зависимости от частоты выпадения осадков и высыхания листьев, а также от преобладающих температур (Kotzé, 1981). Листья цитрусовых опадают круглый год в некоторых странах и сезонно – в других, что влияет на наличие инокулята. Оптимальная температура для образования псевдотеций – 21-28°C; псевдотеции не образуются при температуре ниже 7°C или выше 35°C (Lee and Huang, 1973). Высвобождение аскоспор происходит во время дождя, а также иногда во время орошения или обильной росы (Kiely, 1949a; Kotzé, 2000). Выброс аскоспор тесно связан с характером распределения осадков (Kotzé, 1981). Аскоспоры с усилением выбрасываются на высоту 1,2 см над псевдотециями и переносятся воздушными потоками по всему пространству под кроной дерева, а также на большие расстояния (Kiely, 1949a). Критический период заражения начинается во время завязывания плодов и длится 4-6 месяцев, но первые симптомы на плодах не появляются ранее, чем через 6 месяцев после завязывания плодов (Baldassari *et al.*, 2006). В Бразилии, плоды *C. sinensis* сортов "Valencia" и "Natal" сортов восприимчивы к заражению по крайней мере до истечения 24 недель после опадания лепестков на 75%, когда диаметр плодов - 5-6 см (Baldassari *et al.*, 2006).

После заражения гриб остается в состоянии покоя, пока плод полностью не вырастет или созреет, симптомы становятся очевидными спустя много месяцев после заражения (Kotzé, 2000). Листья остаются восприимчивыми к заражению с момента формирования до 10-месячного возраста (Truter *et al.*, 2007).

Пикниды с конидиями образуются на плодах, листьях, мертвых ветвях, плодовых цветоножках и, в изобилии, на опавших листьях (Kotzé, 2000). Они могут быть занесены под крону дерева воздушным путем или при попадании воды с зараженных оставленных на деревьях плодов на молодые плоды и листья, которые все еще восприимчивы к заражению (Agostini *et al.*, 2006; Spósito *et al.*, 2008). *P. citricarpa* также имеет микроконидиальное бесполое состояние, описанное для рода *Leptodothiorella* (Kiely, 1949a). Это микроконидиальное состояние, также известное как "спермагонидиальное" состояние (Kiely, 1949a), обычно проявляется на опавших листьях до развития псевдотеций. Тем не менее, роль микроконидий в биологии *P. citricarpa* до сих пор не ясна.

Развитие симптомов на созревших плодах происходит быстрее при повышении температуры, высокой интенсивности света, засухе и если дерево слабое. Старые деревья, как правило, сильнее заражены черной пятнистостью цитрусовых, чем молодые деревья (Kotzé, 2000). Распространение *P. citricarpa* в новые зоны, как предполагается, произошло посредством зараженного сеянца или другого посадочного материала, а не через плоды цитрусовых (Kotzé, 2000; Timmer, 2004).

Следует отметить, что в бессимптомных плодах цитрусовых или плодах с очень маленькими пятнами (<2 мм в диаметре) без пикнид, может присутствовать непатогенный эндофит *Phyllosticta capitalensis* Henn (ранее неправильно называемый *Guignardia mangiferae* A.J. Roy) (Glienke *et al.*, 2011), выявляемый на многих семействах растений. Культурные, морфологические и молекулярные признаки, которые отличают *P. capitalensis* от *P. citricarpa* были описаны Баайеном и др. (Baayen *et al.*, 2002). Кроме того, симптомы *P. citricarpa* можно спутать с вызванными *Phyllosticta citriasiatica* Wulandari, Crous & Gruyter, недавно описанным патогеном, который до сих пор был выявлен только на *Citrus maxima* (Wang *et al.*, 2012; Wulandari *et al.*, 2009). Патогенность *P. citriasiatica* в отношении других видов *Citrus* неизвестна. Культурные, морфологические и молекулярные признаки, которые отличают *P. citriasiatica* от *P. citricarpa*, вида, патогенного для цитрусовых, были описаны Вуландри и др. (Wulandari *et al.*, 2009). Недавно были описаны два вида *Phyllosticta*, связанные с *Citrus* spp. *Phyllosticta citrichinaensis* вызывает небольшие впадные серо-коричневые пятна с темно-коричневой каймой и оливково-зеленым ореолом на листьях помело. Патоген также вызывает небольшие коричневые или черные пятна, похожие на меланоз, на плодах мандарина и апельсина (Wang *et al.*, 2012). *P. citribraziliensis* был выявлен как эндофит в здоровых листьях *Citrus* spp. в Бразилии (Glienke *et al.*, 2011).

2. Таксономическая информация

Название:	<i>Phyllosticta citricarpa</i> (McAlpine) Aa, 1973
Синонимы:	<i>Phoma citricarpa</i> McAlpine, 1899 <i>Guignardia citricarpa</i> Kiely, 1948 <i>Phyllostictina citricarpa</i> (McAlpine) Petr., 1953 <i>Leptodothiorella</i> sp. (spermatial state)
Таксономическая позиция:	Eukaryota, Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Botryosphaeriales, Botryosphaeriaceae
Обычные названия:	Черная пятнистость цитрусовых (обычные названия на других языках см. CABI (2011))
Референтный материал:	Mycobank 320327

3. Выявление

Плоды, плодоножки, листья и ветви *Citrus*, *Poncirus* и *Fortunella* и их гибридов потенциально могут быть хозяевами *P. citricarpa* (CABI, 2011).

3.1 Симптомы на плодах

Некоторые симптомы (например уплотнения, пятнистые участки, ложный меланоз, вирулентные пятна) появляются на плодах в зависимости от температуры и созревания плодов (Kotzé, 2000). Наличие *P. citricarpa* на плодах вряд ли будет точно подтверждено на основании исключительно визуальной проверки, так как внешне симптомы изменчивы, и их легко можно спутать с симптомами, вызванными другими патогенами цитрусовых или возникающими при механическом повреждении, во время охлаждения или при повреждении насекомыми (Kotzé, 2000; Snowdon, 1990; L. Diaz, личная переписка). Хорошо известны следующие четыре симптома, как описывается Кили (Kiely, 1949a, 1949b, 1960).

Уплотнения. Наиболее типичный симптом черной пятнистости цитрусовых представляет собой небольшие пораженные участки, 3-10 мм в диаметре, с центром от серого до желтовато-коричневого цвета и каймой от темно-коричневого до черного цвета (рис. 1A). На поздних стадиях развития симптомов центральная часть пораженных участков становится кратерообразной. Отдельные уплотнения в очагах поражения могут либо оставаться маленькими, либо сливаться в более крупные очаги поражения. Вокруг этих очагов поражения может появиться желтый ореол, когда плод зеленый, или зеленый ореол, когда плод желтый или оранжевый. Довольно часто, в центре этих пятен образуются пикниды (рис. 1a), их можно выявить с помощью ручной или препаровальной лупы. Уплотнения обычно появляются, когда плод начинает созревать, еще до изменения цвета, на той части плода, которая больше подвержена воздействию солнечного света (Kotzé, 1981, 2000). Во многих случаях, черную пятнистость цитрусовых можно легко идентифицировать по уплотненным пораженным местам с пикнидами.

Веснушчатые пятна. Серые, коричневые, красноватые или бесцветные пятна, 1-3 мм в диаметре, слегка продавленные в центре и без ореола вокруг них (рис. 1B). Пятна становятся коричневыми с возрастом и почти всегда свободны от пикнид (рис. 1b). Веснушчатые пятна в основном развиваются после того, как плод изменил цвет, и могут также проявиться в виде второстепенных пятен вокруг уплотненных пораженных очагов (Bonants *et al.*, 2003) (рис. 1C). Отдельные веснушчатые пятна могут сливаться в более крупные очаги поражения, которые превращаются в вирулентные пятна (рис. 2C), особенно во время хранения плодов (Kotzé, 1981, 2000).

Ложный меланоз, или крапчатая пятнистость. Обычно появляется на зеленых плодах в виде малых приподнятых пораженных очагов, от темно-коричневого до черного цвета, часто окруженных темными пятнышками (FUNDECITRUS, 2005) (рис. 2A, 2A, 2B). Очаги поражения свободны от пикнид и могут сливаться по мере созревания плода (CABI, 2011). Этот симптом

наблюдается в зонах выращивания цитрусовых, где *P. citricarpa* присутствует в течение длительного времени (FUNDECITRUS, 2005).

Вирулентные пятна, распространяющиеся пятна или быстро прогрессирующие пятна. Вдавленные неравномерные пораженные участки, от красного до коричневого цвета, или бесцветные, появляются на сильно зараженных зрелых плодах в конце сезона (рис. 2С). В условиях высокой влажности на этих пораженных участках со временем развиваются многочисленные пикниды (Kotzé, 2000). Вирулентные пятна быстро растут, охватывая две трети поверхности плода в течение четырех-пяти дней. Это наиболее разрушительный симптом, потому что в отличие от других симптомов он распространяется глубоко в мезокарпий (альbedo), иногда охватывая всю толщину кожуры, вызывая преждевременное падение плодов и серьезные потери после сбора урожая (Kotzé, 1981).

Два дополнительных симптома, приведенных ниже, также были выявлены на плодах цитрусовых, хотя нечасто.

Кружевные пятна. Поверхностные желтые пораженные участки с центром от темно-желтого до коричневого цвета, гладкой текстурой и неопределенными границами (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002) (рис. 2D). Этот симптом появляется на зеленом плоде и может охватывать большую часть его поверхности (Goes, 2001). Пораженные участки свободны от пикнид и часто проявляются в виде коричневой сетки на желтом фоне. Плоды, имеющие кружевные пятна, обычно скучены в кроне деревьев (M. Spósito, личная переписка).

Пятна с трещинами. Поверхностные пораженные участки, слегка выступающие, от темно-коричневого до черного цвета, различной величины, с трещинами на поверхности и нечеткими границами (Goes *et al.*, 2000) (рис. 2E). Пораженные участки свободны от пикнид и появляются на плодах старше шести месяцев. Этот симптом был связан с присутствием *Phyllocoptruta oleivora* Ashmead (FUNDECITRUS, 2005; Spósito, 2003).

Следует отметить, что на одном и том же плоде можно наблюдать одновременно несколько симптомов из описанных выше или промежуточные стадии между симптомами (рис. 1в, 1с).

В некоторых зонах с высоким давлением инокулята, симптомы могут появиться и на маленьких плодах, чашечках и цветоножках. Симптомы на чашечках представляют собой пятна от красного до темно-коричневого цвета, похожие на веснушчатые пятна. На маленьких плодах и цветоножках симптомы проявляются в виде небольших черных пятен (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002). Такие симптомы на маленьких плодах, чашечках и цветоножках были зарегистрированы только в Бразилии.

3.2 Симптомы на листьях и ветвях

Черная пятнистость цитрусовых, как правило, возникает на листьях в виде латентной инфекции без видимых симптомов (Sutton and Waterston, 1966). Если симптомы проявляются, они возникают в виде точечных пятен, видимых на обеих поверхностях листьев. Круглые пятна, размер которых может увеличиваться до 3 мм в диаметре, их центры становятся серыми или светло-коричневыми, имеют кайму от темно-коричневого до черного цвета и желтый ореол (Kotzé, 2000) (рис. 3А). Иногда в центре пораженных участков на адаксиальной поверхности листьев могут быть пикниды.

Пораженные участки, похожие на возникающие на листьях, могут возникнуть и на небольших ветвях, чаще на *C. limon*, чем на других видах цитрусовых (M. Truter, личная переписка). Симптомы представляют собой небольшие (0,5-2 мм в диаметре), круглые, слегка вдавленные пораженные участки с каймой от коричневого до черного цвета и центром от серого до светло-коричневого цвета (рис. 3Б). В центре очагов поражения иногда могут быть пикниды.

3.3 Сравнение симптомов черной пятнистости цитрусовых с симптомами, вызванными другими организмами или абиотическими факторами

Симптомы на плодах имеют различные внешние проявления и часто напоминают симптомы, вызванные другими патогенами цитрусовых (например, *P. citriasiana*, *P. citrichinaensis*, *Diaporthe citri*, *Mycosphaerella citri*, *Alternaria alternata* pv. *citri*, *Septoria* spp., *Colletotrichum*

spp.) или насекомыми, а также механические повреждения или последствия охлаждения, особенно в случае веснушчатых пятен (Bonants *et al.*, 2003; Snowdon, 1990; Wang *et al.*, 2012; Wulandari *et al.*, 2009; L. Diaz, личная переписка).

Так как симптомы, вызванные *P. citricarpa* на плодах citrusовых, похожи на симптомы, вызванные другими патогенами, достоверный диагноз может быть поставлен только с помощью методов, описанных ниже.

4. Идентификация

Настоящий протокол описывает выявление и идентификацию *P. citricarpa* на имеющих симптомы плодах citrusовых. Плоды citrusовых следует досматривать на предмет наличия каких-либо симптомов, характерных для черной пятнистости citrusовых (см. раздел 3). Если есть подозрительные симптомы в виде точек или пораженных участков, их изучают с помощью увеличительной или препаровальной лупы для обнаружения пикнид. Если пикнидии есть на уплотненных пораженных местах, как описано в разделе 3.1, и морфологические характеристики пикнид и конидий схожи с описанными в разделе 4.1.3, *P. citricarpa* может присутствовать. Тем не менее, так как пикниды и конидии *P. citricarpa* очень похожи на пикниды и конидии *P. citriasiana*, недавно описанного патогена на *C. maxima* (Wulandari *et al.*, 2009), идентификация *P. citricarpa* может быть с точностью подтверждена путем применения диагностических методов, описанных ниже (рис. 4). Диагностический метод А (выделение и культивирование) используется для идентификации *P. citricarpa* на плодах citrusовых, но может быть использован и для листьев, ветвей и плодоножек, в то время как метод В (молекулярный анализ) применяется только для плодов citrusовых.

Если после применения метода А культурные признаки колоний, выращенных на среде агара с вытяжкой из вишни (АВВ) и овсяного агара (ОА), не соответствуют признакам *P. citricarpa* (см. раздел 4.1.4, требования i), ii), iii) и iv)), то растительный материал считается свободным от *P. citricarpa*. Для культур, похожих на *P. citricarpa*, которые не образуют зрелые пикниды в течение 14 дней, рекомендуется применение обычной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирование внутренним транскрибируемым спейсером (ВТС) (см. раздел 4.2.1) или ПЦР в реальном времени (см. раздел 4.2.2). Тем не менее, выделение и культивирование организма на соответствующих средах с последующим непосредственным проведением молекулярного теста является процедурой, требующей много времени, и, таким образом, нежелательной для диагностики грузов, строго ограниченной во времени.

Есть два метода ПЦР (обычный и в реальном времени), доступных для выявления и идентификации *P. citricarpa* на плодах citrusовых (см. разделы 4.2.1, 4.2.2). Однако недавно во время рутинного анализа плодов *C. maxima*, имеющих типичные симптомы, было отмечено, что метод ПЦР в реальном времени, разработанный Гент-Пельцером и др. (Gent-Pelzer *et al.* 2007), не дает амплификации (J.P. Meffert, личная переписка). Причина в том, что симптомы *C. maxima*, похожие на черную пятнистость citrusовых, вызваны *P. citriasiana*, недавно описанным видом, тесно связанным с *P. citricarpa* (Wulandari *et al.*, 2009). Так как не ясно, может ли *P. citricarpa* вызвать типичные симптомы на *C. maxima*, плоды этого вида citrusовых, имеющие симптомы, похожие на черную пятнистость citrusовых, также должны быть проверены на наличие *P. citricarpa*.

Метод ПЦР в реальном времени, разработанный Гент-Пельцером и др. (Gent-Pelzer *et al.* 2007) (см. раздел 4.2.2), может быть использован для диагностики *P. citricarpa* с положительным контролем, так как он даст положительный сигнал только тогда, когда присутствует *P. citricarpa*, а не *P. citriasiana* или *P. capitalensis*. Обычный метод ПЦР (как описано в разделе 4.2.1) даст амплификацию, когда присутствует либо *P. citricarpa*, либо *P. citriasiana*. В этом случае после положительного сигнала следует выполнить выделение и культивирование (см. раздел 4.1), ПЦР в реальном времени (см. раздел 4.2.2) или ВТС секвенирование (см. раздел 4.2.1), чтобы различить два вида. Нет доступных данных о реакциях в ходе этих молекулярных анализов недавно описанного *P. citrichinaensis* из Китая.

Следует отметить, что иногда может присутствовать ложе (палисадный слой конидиеносцев) обыкновенного эндофитного гриба *Colletotrichum* spp. и выглядеть похоже на пикниды *P. citricarpa*. Однако *Colletotrichum* spp. могут быть отличены по наличию щетинок в их ложе, образованию во влажных условиях розовых или оранжево-розоватых масс конидий на поверхности пораженных участков, а также по морфологии их конидий (Kotzé, 2000).

В настоящем диагностическом протоколе методы (включая ссылки на названия брендов) описываются в порядке их опубликования, поскольку они определили изначальный полученный уровень специфичности. Представленные лабораторные процедуры могут быть скорректированы применительно к стандарту отдельных лабораторий в том случае, если они являются компетентно аккредитованными.

4.1 Метод А: Выделение и культивирование *P. citricarpa*

Пораженные участки плода вырезают с помощью пробочного сверла или скальпеля, погружают в 70%-й этиловый спирт на 30 с, поверхность дезинфицируют 1%-м раствором гипохлорита натрия (NaOCl) в течение 2 мин, ополаскивают дважды в стерильной дистиллированной воде и высушивают (Peres *et al.*, 2007). Для увеличения частоты выделения, пораженные участки должны быть вырезаны аккуратно, при этом все ткани без симптомов удаляются до посева (N.A. Peres, личная переписка). Затем пораженные участки помещают в стерильных условиях в чашки Петри (диаметром 9 см) с АВВ или картофельным агаром с декстрозой (КАД) (см. раздел 4.1.1) или КАД с добавлением 50 мкг/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ОЕРР/ЕРРО, 2003). Если используется КАД и медленно растущие темные культуры, похожие на *P. citricarpa*, развиваются на нем, их впоследствии переносят и на чашки с АВВ для тестирования скорости роста колоний и на чашки с ОА (см. раздел 4.1.1) для оценки производства желтого пигмента. В то же время культуры, выращенные на среде КАД, должны быть размещены под ближним ультрафиолетовым (БУФ) светом при 22°C для содействия индукции при формировании пикнид. Культуры, которые i) медленно растут на АВВ (см. раздел 4.1.2); ii) образуют характерные пикниды и конидии *P. citricarpa* (см. раздел 4.1.2); и iii) производят желтый пигмент на ОА – хотя не все изоляты *P. citricarpa* производят такой пигмент на ОА (Ваауен *et al.*, 2002) – идентифицируются как принадлежащие к *P. citricarpa*.

Метод имеет следующие недостатки: а) *P. citricarpa* является довольно медленно растущим грибом и часто зарастает другими грибами в культурной среде (например, *S. gloeosporioides*) (Peres *et al.*, 2007), так как ни одна используемая культурная среда не является селективной для *P. citricarpa*, и б) это способ, занимающий много времени, поскольку для образования пикнид требуется 7-14 дней.

4.1.1 Культурная среда

Агар с вытяжкой из вишни (АВВ). Вишневый сок производится путем кипячения 1 кг вишни без косточек и черешков, в 1 л водопроводной воды в течение примерно 2 часов. Полученный экстракт фильтруют через марлю, выливают в бутылки, стерилизуют в течение 30 мин при температуре 110°C (рН 4,5) и хранят до использования. В бутылку с 0,8 литра дистиллированной воды добавляют 20 г технического агара №3, смесь стерилизуют в течение 15 мин при температуре 121°C. Сразу же после стерилизации добавляют 0,2 л стерилизованного вишневого экстракта, хорошо перемешивают и стерилизуют в течение 5 мин при температуре 102°C (Gams *et al.*, 1998).

Овсяной агар (ОА). ОА коммерчески доступен. Кроме того, его можно приготовить следующим способом: 30 г овсяных хлопьев заворачивают в марлю и опускают в выпарной аппарат, наполненный водопроводной водой. После кипения в течение приблизительно 2 ч хлопья отжимают, фильтруют через марлю, и стерилизуют экстракт в течение 15 мин при температуре 121°C. В бутылку, содержащую 1 литр овсяного экстракта добавляют 20 г технического агара № 3, и стерилизуют смесь в течение 15 мин при температуре 121°C (Gams *et al.*, 1998).

Картофельный агар с декстрозой (КАД). КАД коммерчески доступен. Кроме того, его можно приготовить методом, описанным Хоуксворсом и др. (Hawksworth *et al.*, 1995).

4.1.2 Признаки культуры

Колонии *P. citricarpa* медленно растут на АВВ; их средний диаметр через 7 дней при температуре 22°C в темноте – 25-30 мм (Ваауен *et al.*, 2002). На КАД колонии имеют нечеткую границу, отделенную гораздо более широкой полупрозрачной зоной бесцветного глубинного мицелия (рис. 5А). Центр колонии темный с аэральным мицелием от серого до сизого цвета, часто с многочисленными мелкими пучками. Обратная сторона колонии очень темная в центре и окружена областями серого, красновато-коричневого и темно-желтого цвета (Ваауен *et al.*, 2002). Строма начинает развиваться через 7-8 дней, в то время как зрелые пикниды с конидиями, как правило, образуются в течение 10-14 дней (рис. 5В). На ОА через 14 дней при температуре 250°C в темноте колонии плоские, распространяющиеся, оливково-серые, приобретающие бледно-оливково-серый цвет ближе к кайме, с редким или умеренным аэральным мицелием (Glienke *et al.*, 2011). На ОА часто образуется особый желтый пигмент, который проникает в среду вокруг колонии (рис. 6D, верхний ряд), хотя не все изоляты *P. citricarpa* образуют желтый пигмент (Ваауен *et al.*, 2002). Этот желтый пигмент плохо образуется на АВВ и КАД.

4.1.3 Морфология

Опубликованные данные по морфологии *P. citricarpa* во многом различаются, частично из-за путаницы в идентификации различных видов *Phyllosticta*, связанных с *Citrus* (Ваауен *et al.*, 2002; Glienke *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Wulandari *et al.*, 2009). Следующие морфологические и морфометрические признаки относятся к плодообразованиям и спорам *P. citricarpa*, в основном на культуре; они основаны на данных Саттона и Уотерстона (Sutton & Waterston, 1966) и ван дер Аа (van der Aa, 1973), с изменениями и дополнениями Бааена и др. (Ваауен *et al.*, 2002).

Аскокарты. Псевдотеции формируются на опавших листьях и на культуре (De Holanda Nozaki, 2007), но не формируются на каком-либо другом растительном материале (например, на прилегающих листьях, плодах). Они одиночные или слившиеся, шаровидные или грушевидные, вдавленные, от темно-коричневого до черного цвета, 125-360 мкм, с одной порой в виде сосочка или клюва, а их поверхность часто покрыта имеющими гифы наростами неправильной формы. Наружный слой состоит из угловых клеток с утолщенными коричневыми стенками, тогда как внутренний слой состоит из угловых или шаровидных клеток с более тонкими бесцветными стенками.

Сумки. Расположены пучком, двухоболочковые, булавовидные, с восьмью спорами с закругленной вершиной. Их размер – 40-65 мкм × 12-15 мкм до разрыва наружной стенки, затем они становятся цилиндрически булавовидными и увеличиваются в длину до 120-150 мкм до раскрытия.

Аскоспоры. Короткие, без перегородок, гиалиновые, цилиндрические, вздутые в середине, слегка изогнутые, 12-16 мкм × 4,5-6,5 мкм, гетерополярные, с неравными тупыми краями. Меньший верхний край имеет усеченный, непористый, слизистый придаток, похожий на шляпку, длиной 1-2 мкм, нижний край имеет острый гофрированный придаток 3-6 мкм в длину.

Пикниды. Образуются на плодах, прилегающих листьях, отмерших ветвях и опавших листьях, а также на культуре. Они одиночные или иногда скученные, шаровидные, углубленные, от средне-коричневого до темно-коричневого цвета, 70-330 мкм в диаметре. Пикнидиальная стенка имеет толщину до четырех клеток, склеротиоидная снаружи, псевдопаренхиматозная внутри, с более темной порой, с небольшими сосочками, круговая, диаметр – 10-15 мкм.

Конидии. Яйцевидной формы с утолщением к верхушке, иногда эллиптической формы, гиалиновые, без перегородок, с многочисленными крапинками, 9,4-12,7 мкм × (5,0-8,5) мкм, с бесцветным шиловидным придатком и едва заметной, бесцветной, желатиновой оболочкой <1,5 мкм (рис. 5С, 5D, 6А). Они образуются в бластоспоры на бесцветных, одноклеточных, цилиндрических конидиеносцах до 9 мкм в длину.

Состояние спермаций. Описанные в форме рода *Leptodothiorella*, формируются как на растениях-хозяевах, так и на чистой культуре. Спермации в форме гантели, редко цилиндрические, прямые или слегка изогнутые, 5-8 мкм × 0,5-1 мкм.

4.1.4 Сравнение признаков культур и морфологических признаков *P. citricarpa* с признаками аналогичных видов *Phyllosticta*

Признаки культуры *P. citricarpa* очень похожи на признаки *P. citriasiana* (Wulandari *et al.*, 2009) и эндофитного, не патогенного для цитрусовых *P. capitalensis* (Baayen *et al.*, 2002; Glienke *et al.*, 2011).

Идентификация колоний *P. citricarpa* возможна путем сопоставления:

- 1) выращивания колоний на АВВ (хотя диапазоны могут пересекаться);
- 2) толщины слизистой оболочки, окружающей конидии (рис. 5С, 5D, 6А, 6В, 6С);
- 3) длины конидиального придатка;
- 4) наличия желтого пигмента на ОА, хотя не все изоляты *P. citricarpa* производят желтый пигмент (Baayen *et al.*, 2002; Wulandari *et al.*, 2009).

Подробная информация об отличительных признаках *P. citricarpa* и связанных с ней видов приведена в таблице 1. Кроме того, *P. citrichinaensis* можно отличить от *P. citricarpa* по его более длинному конидиальному придатку, 14-26 мкм в длину (Wang *et al.*, 2012).

Таблица 1. Главные культурные и морфологические признаки *Phyllosticta citricarpa*, *Phyllosticta citriasiana* и *Phyllosticta capitalensis* (Baayen *et al.*, 2002; Wulandari *et al.*, 2009)

Признак	<i>P. citricarpa</i>	<i>P. citriasiana</i>	<i>P. capitalensis</i>
Средний размер конидий (мкм)	10-12 × 6-7,5	12-14 × 6-7	11-12 × 6,5-7,5
Ширина слизистой оболочки (мкм)	<1,5	1	1,5-2,5 (-3)
Длина апикального придатка (мкм)	4-6 (-10)	7-10 (-14)	4-6 (-10)
Средний размер аскоспор (мкм)	12-16 × 4,5-6,5	Неизвестно	15-17,5 × 6,5-7,5
Средний размер спермации (мкм)	5-8 × 0,5-1	3-5 × 1-2	7-10 × 1,8-2,5
Средний диаметр колонии (мм)*	25-30	18-20	>40
Максимальная температура выращивания (°C)	30-36	30-33	30-36
Образование желтого пигмента на среде из овсяного агара (ОА)	Да [†]	Нет	Нет

* На среде агара с вытяжкой из вишни (АВВ) после 7 дней при температуре 22°C в темноте.

[†] Следует отметить, что не все изоляты *P. citricarpa* производят желтый пигмент.

4.2 Метод В: Молекулярные анализы

Различные молекулярные методы были разработаны для идентификации *P. citricarpa* непосредственно на чистых культурах и пораженных участках плодов (Bonants *et al.*, 2003; Gent-Pelzer *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2006, 2012; Peres *et al.*, 2007; Stringari *et al.*, 2009). Два метода: обычный ПЦР-анализ, разработанный Пересом и др. (Peres *et al.*, 2007), и ПЦР-анализ в реальном времени, разработанный Гент-Пельцером и др. (Gent-Pelzer *et al.*, (2007), – описаны для идентификации *P. citricarpa*. Следует отметить, что метод ПЦР в реальном времени будет генерировать положительный сигнал в случае пораженного черной пятнистостью цитрусовых участка на плоде, тогда как в некоторых случаях обычный ПЦР может дать неоднозначные результаты. Также отмечается, что нет доступных данных о положительных реакциях в ходе молекулярных анализов *P. citrichinaensis*, недавно описанного на плодах в Китае.

4.2.1 Идентификация *P. citricarpa* с помощью обычного ПЦР

Специфичность (аналитическую специфичность) оценивали в исследовании с 36 изолятами *P. citricarpa*, 13 изолятами *P. capitalensis* и изолятами общих вредных организмов цитрусовых, в том числе *Alternaria alternata*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe Citri*, *Mycosphaerella Citri* и *Penicillium digitatum*. Только *P. citricarpa* дал положительную реакцию. Чувствительность (аналитическая чувствительность; предел обнаружения) - 1 пг ДНК/мкл (Peres *et al.*, 2007). Метод будет амплифицировать ДНК либо *P. citricarpa*, либо *P. citriasiana*. Есть три доступных метода для различия двух видов после обычной ПЦР: выделение и культивирование (см. раздел 4.1), ПЦР в реальном времени (см. раздел 4.2.2) и ВТС секвенирование (см. раздел 4.2.3).

4.2.1.1 Общая информация

Настоящий протокол был разработан Пересом и др. (Peres *et al.*, 2007). Источником нуклеиновой кислоты является мицелий или рассеченные пораженные участки плодов. Анализ предназначен для амплификации части зоны ВТС, производящей ампликон 300 пар оснований (п.о.). Используемые олигонуклеотидные праймеры:

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

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

Для ПЦР-амплификации используются 2,5 × Eppendorf®¹ Mastermix, содержащий Taq-полимеразы ДНК, и реакционный буфер, содержащий Mg²⁺ и нуклеотиды. Для приготовления реакционных смесей используется вода для молекулярной биологии (MGW): вода должна быть очищенной (деионизированной или дистиллированной), стерильной (после автоклавирования или отфильтрованной через 0,45 мкм) и свободной от нуклеаз. Амплификацию проводили в амплификаторе типа Peltier с нагреваемой крышкой.

4.2.1.2 Методы

Выделение и очистка нуклеиновых кислот

ДНК выделяли либо из грибковых культур, выращенных в течение 7 дней на картофельно-декстрозной закваске, либо из одиночных пораженных участков плодов. Во втором случае, симптоматические ткани вырезали, стараясь, по мере возможности, исключить мясистую часть плода (альбедо) и внешнюю кожуру.

Выделение ДНК из мицелия осуществляется с помощью коммерчески доступных наборов для выделения ДНК (например, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), QuickPick SML Plant DNA (Bio-Nobile), KingFisher® isolation robot (Thermo)) в соответствии с инструкциями изготовителя. Для выделения ДНК из отдельных пораженных участков плодов может быть использован следующий протокол выделения ДНК посредством щелочного лизиса (Klimyuk *et al.*, 1993) с последующей очисткой методом хроматографии, так как было доказано, что он наиболее эффективный (Peres *et al.*, 2007).

Выделение ДНК методом щелочного лизиса. Ткани плода, имеющего симптомы, помещают в стерильные микропробирки объемом 2 мл, содержащие 40 мкл 0,25 М NaOH, и выдерживают на кипящей (100 °С) водяной бане в течение 30 с (критический период). Содержимое пробирок нейтрализуют добавлением 40 мкл 0,25 М HCl, 20 мкл 0,5 М Трис-HCl, pH 8,0 и 0,25% (объем / объем) Nonidet P-40, затем пробирки снова помещают на кипящую водяную баню на 2 мин. Полученный материал может быть использован либо непосредственно для очистки при использовании метода хроматографии (см. ниже), либо может храниться при температуре 4°С в

¹ Использование в этом диагностическом протоколе бренда Eppendorf® для ПЦР-амплификации не требует его утверждения и не исключает применения других брендов, которые также могут быть подходящими. Эта информация приводится для удобства пользователей этого протокола и не представляет собой утверждение КФМ названных веществ, реагентов и/или оборудования. Эквивалентные продукты могут использоваться, если будет доказано, что они дают такой же результат.

течение нескольких недель. До очистки после хранения образцы инкубируют на кипящей водяной бане в течение 2 мин.

Очистка ДНК методом хроматографии. 150 мкл 100%-го этилового спирта и маленькую хроматографическую пластинку, покрытую тонким слоем целлюлозы, после щелочного лизиса (см. выше) добавляют в микропробирки объемом 2 мл. Пробирки размещают на боку на льду и встряхивают в течение 30 мин. Жидкость отсасывают, и добавляют 500 мкл промывочного буфера (10x (Трис, Na₂ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) и гипохлоритом натрия NaClO, рН 7,0) и 95%-й этиловый спирт), разбавленного до 25%, затем пробирки опрокидывают вверх дном для перемешивания содержимого. Промывку повторяют дважды. Пластинки помещают в новые пробирки и высушивают в вакууме. Затем пробирки кладут на бок и добавляют 50 мкл буферного раствора Трис-EDTA в каждую пробирку. После инкубации в течение 5 мин, пробирки центрифугируют в течение 10 с, пластинки удаляют и выбрасывают, ДНК восстанавливают. Очищенную ДНК можно использовать немедленно или хранить при температуре 4°C в течение ночи или при температуре -20 °C в течение более длительного периода времени.

Кроме того, ДНК может быть выделена из поражений на плодах с использованием коммерчески доступных наборов для выделения ДНК в соответствии с инструкциями изготовителя.

Полимерная цепная реакция (ПЦР).

Мастер-микс (концентрация на 20 мкл одной реакции) состоит из следующих реагентов:

Реагент	Рабочая концентрация	Объем на реакцию (мкл)	Финальная концентрация
Молекулярный уровень воды	Не применяется	0,4	Не применяется
2,5x Eppendorf®1 MasterMix (Taq ДНК полимеразы при 0,06 ед/мкл)	2,5x	8,0	1x (Taq 0,024 ед/мкл)
2,5 × Taq реакционного буфера (4 mM Mg ²⁺ , 500 мкМ каждого dNTP)	2,5x	8,0	1x (1,6 mM Mg ²⁺ , 200 мкМ каждого dNTP)
Праймер GCN	10 мкМ	0,8	0,4 мкМ
Праймер GCMR	10 мкМ	0,8	0,4 мкМ
Всего	-	18,0	-
ДНК	-	2,0	-
Итого	-	20,0	-

Параметры циклов ПЦР: денатурация при температуре 94°C в течение 2 мин; 39 циклов при температуре 94°C в течение 30 с, при температуре 64°C в течение 30 с и при температуре 72°C в течение 1 мин, а также элонгация при температуре 72°C в течение 10 мин. Продукт ПЦР из 300 п.о. указывает на присутствие ДНК *P. citricarpa*.

4.2.1.3 Значимая информация о процедуре

После амплификации 10 мкл реакционной смеси смешивают с 2 мкл 6x загрузочного буфера ДНК (Promega) и загружают вместе с маркером молекулярной массы (100 п.о. "лестницы" ДНК) в 1,5%-й агарозный гель, отделяют электрофорезом, окрашивают бромистым этидием или альтернативными реагентами, рассматривают и фотографируют в ультрафиолетовом свете (Sambrook *et al.*, 1989).

Для обеспечения успешной амплификации следует добавить ДНК из эталонного штамма *P. citricarpa* (положительный контроль) в качестве дополнительного образца. ПЦР-амплификацию также следует выполнять на образце, в котором экстракт ДНК *P. citricarpa* был заменен на экстракт ДНК других родственных видов или на образце здорового экзокарпия (отрицательный контроль). Для контроля возможного загрязнения реагента и ложных срабатываний, образец должен быть заменен водой (контроль реакции). Рекомендуется включать внутренний контроль амплификации (IAC) для контроля ингибирования.

4.2.2 Идентификация *P. citricarpa* на ПЦР в реальном времени

Специфичность (аналитическую специфичность) оценивали на эталонном штамме *P. citricarpa* CBS 111.20 (представитель для 10 изолятов *P. citricarpa* в группе I ВТС секвенирования (Ваауен *et al.*, 2002)), эталонном штамме *P. citricarpa* GC14 (представитель для 22 изолятов *P. capitalensis* в группе II ВТС секвенирования (Ваауен *et al.*, 2002)) и 12 других вредных организмов цитрусовых (*Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Colletotrichum* spp.), *Phyllosticta artocarpina* и *Guignardia bidwellii*. Только *P. citricarpa* дал положительную реакцию. Чувствительность (аналитическая чувствительность; предел обнаружения) составляет 10 фг ДНК на реакцию, диагностическая чувствительность - 100% (Gent-Pelzer *et al.*, 2007).

4.2.2.1 Общая информация

Протокол был разработан Пересом и др. (Peres *et al.*, 2007). Источником нуклеиновой кислоты является мицелий или рассеченные пораженные участки плодов. Анализ предназначен для амплификации части зоны ВТС, производящей ампликон 69 п.о. Используемые олигонуклеотидные праймеры:

Прямой праймер: GcF1 (5'-GGT GAT GGA AGG GAG GCC T-3')

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

Зонд гидролиза (5'-AAA AAG CCG CCC GAC СТА CCT TCA-3') отмечается на 5' конце флуоресцентным репортерным красителем FAM (6-карбоксильный флуоресцин) и изменяется на 3' конце красителем TAMRA (6-карбоксильный тетраметилродамин) или Eclipse® Dark Quencher (Eurogentec).

Для ПЦР-амплификации используется мастер-микс 2× Premix Ex Taq Master Mix (Takara)², содержащий Taq-полимеразы, и реакционный буфер, содержащий MgCl₂ и нуклеотиды. Референсный краситель ROX (50× концентрированный, Takara) добавляется к предварительно приготовленной смеси Ex Taq Master Mix. Для приготовления реакционных смесей используется вода для молекулярной биологии (MGW): вода должна быть очищенной (деионизированной или дистиллированной), стерильной (после автоклавирования или отфильтрованной через 0,45 мкм) и свободной от нуклеаз. Амплификация выполняется с использованием термоциклера ПЦР в реальном времени.

4.2.2.2 Методы

Выделение и очистка нуклеиновых кислот

ДНК выделяют либо из пробы мицелия (0,5 см в диаметре), взятой с краев колонии, выращенной на АВВ (см. раздел 4.1.1) при температуре 22°C в темноте, или из очагов поражения на плодах. Очаги поражения отсекают от кожуры, удаляют как можно больше окружающего альбеда и отслаивают ткани. Пробы мицелия или очаги поражения разрезают на маленькие кусочки и помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с безопасно закрывающимся плоским верхним колпачком, в которых находится шарик из нержавеющей стали (3,2 мм в диаметре) и 125 мкл буфера для экстракции (0,02 М фосфатный забуференный

² Использование в этом диагностическом протоколе бренда Takara для 2× Premix Ex Taq Master Mix не требует его утверждения и не исключает применения других брендов, которые также могут быть подходящими. Эта информация приводится для удобства пользователей этого протокола и не представляет собой утверждение КФМ названных веществ, реагентов и/или оборудования. Эквивалентные продукты могут использоваться, если будет доказано, что они дают такой же результат.

раствор (PBS), 0,5% Tween 20, 2% поливинилпирролидон (ПВП), 0,2% бычий сывороточный альбумин). Пробирку встряхивают в гомогенизаторе в течение 80 с при 5 000 оборотов в минуту. Смесь центрифугируют в течение 5 с при максимальной скорости (16 100 g) в микроцентрифуге и 75 мкл полученного супернатанта используют для выделения ДНК. ДНК может быть выделена с использованием коммерчески доступных наборов для выделения ДНК в соответствии с инструкциями изготовителя. Конечный объем раствора ДНК – 50 мкл. ДНК дополнительно очищают над центрифужными колонками, заполненными ПВП. Колонки подготавливают, заполняя разделительные колонки Axygen Multi-Spin (Dispolab) 0,5 см поливинилполипирролидоном (ПВПП), помещая его в пустую реакционную пробирку и дважды промывая 250 мкл воды MGW путем центрифугирования колонки в течение 5 мин при 4 000 g. Суспензию ДНК наносят на колонку ПВП и центрифугируют в течение 5 мин при 4 000 g. Проточную фракцию используют в качестве входных данных для анализа ПЦР. Очищенную ДНК можно использовать немедленно или хранить при температуре 4 °С в течение ночи или при температуре -20 °С в течение более длительного периода времени. ПВП используется в качестве растворимого соединения в экстракционном буфере. ПВПП – это ПВП с поперечной межмолекулярной связью и используется в качестве нерастворимого фильтрационного материала.

Полимеразная цепная реакция.

Мастер-микс (концентрация на 30 мкл одной реакции) состоит из следующих реагентов:

Реагент	Рабочая концентрация	Объем на реакцию (мкл)	Финальная концентрация
MGW	Не применяется	13,1	Не применяется
2× Premix Ex Taq мастер-микс (Takara) ²	2x	15,0	1x
Праймер GcF1	50 мкМ	0,15	0,25 мкМ
Праймер GcR1	50 мкМ	0,15	0,25 мкМ
Зонд GcP1	5 мкМ	0,6	0,10 мкМ
Всего	-	29,0	-
ДНК	-	1,0	-
Итого	-	30,0	-

При необходимости можно добавить 0,6 мкл 50× ROX референсного красителя, в этом случае используется 12,5 мкл высокочистой воды для ПЦР.

Параметры циклов ПЦР: при температуре 95°С в течение 10 мин, 40 циклов при температуре 95°С в течение 15 с и при температуре 60°С в течение 1 мин. Количество циклов – 40 – было получено с использованием систем выявления ABI PRISM® 7700 или 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) и материалов и реагентов, использованных, как описано выше. Следует отметить, что:

- кривая амплификации должна быть экспоненциальной;
- образец будет считаться положительным, если он производит значение Ct <40, при условии, что контроль загрязнения отрицателен;
- образец будет считаться положительным, если он производит значение Ct ≥40, при условии, что проба и выделенные путем ингибирования контроли положительны.

Количество циклов следует проверить в каждой лаборатории при проведении теста в первый раз.

4.2.2.3 Значимая информация о процедуре

Должен быть добавлен ДНК из эталонного штамма *P. citricarpa* (положительный контроль) в качестве дополнительного образца для обеспечения успешной амплификации. ПЦР-амплификацию также следует выполнять на образце, в котором экстракт ДНК *P. citricarpa* был заменен на экстракт ДНК других родственных видов или на образце здорового экзокарпия (отрицательный контроль). Для контроля возможного загрязнения реагента и ложных срабатываний, образец должен быть заменен водой (контроль реакции).

Для того чтобы проверить наличие ложных негативных реакций, вызванных ингибированием реакции амплификации, в реакционные смеси 12,5 фг IAC, 75 нМ IAC прямой праймер FIAC (5'-TGG CCC TGT CCT TTT ACC AG-3'), 75 нМ IAC обратный праймер RIAC (5'-TTT TCG TTG GGA TCT TTC GAA-3'), и 50 нМ IAC MGB зонд гидролиза (5'-ACA CAA TCT GCC-3'), обозначенный флуоресцентным репортерным красителем VIC™ (Eurogentec), и гаситель люминисценции краситель Eclipse® Dark Quencher (Eurogentec).

4.2.3 Идентификация *P. citricarpa* ВТС секвенированием

4.2.3.1 Общая информация

Идентификация положительных образцов, полученных при обычной ПЦР, может быть подтверждена путем секвенирования (Ваауен *et al.*, 2002). Метод секвенирования 1 и 2 зон ВТС грибкового гена рибосомной РНК описан ниже.

Используемые олигонуклеотидные праймеры:

Прямой праймер: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')

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

4.2.3.2 Методы

Выделение и очистка нуклеиновых кислот

ДНК следует выделять из пробы размером 1 см², взятой из чистой культуры изолята для анализа. Используется подходящий набор для выделения ДНК, или ДНК выделяется, следуя более традиционному методу, например, методу, описанному Хьюджес и др. (Hughes *et al.* 2000). Выделенную ДНК следует хранить при температуре 4 °С для непосредственного использования или при температуре –20 °С, если анализ не выполняется в тот же день.

Полиразмерная цепная реакция (ПЦР).

Общий объем реакции одной ПЦР составляет 50 мкм, и в нее входят следующие реагенты:

Реагент	Рабочая концентрация	Объем на реакцию (мкл)	Финальная концентрация
MGW	Не применяется	37,5	Не применяется
10× реакционный буфер ПЦР (+15 мМ MgCl ₂) (Roche) ³	2×	5,0	1× (Тақ 0,024 ед / мкл)
dNTPs	10 мМ (каждый)	4,0	0,8 мМ (каждый)
Праймер ITS1	10 мкм	0,6	0,12 мкм

³ Использование в этом диагностическом протоколе бренда Roche для реакционного буфера ПЦР и полимеразы ДНК Тақ не требует их утверждения и не исключает применения других брендов, которые также могут быть подходящими. Эта информация приводится для удобства пользователей этого протокола и не представляет собой утверждение КФМ названных веществ, реагентов и/или оборудования. Эквивалентные продукты могут использоваться, если будет доказано, что они дают такой же результат.

Праймер ITS4	10 мкм	0,6	0,12 мкм
Taq полимеразы ДНК (Roche)3	5 ед/мкл	0,3	0,03 ед/мкл
Всего	-	48,0	-
ДНК	-	2,0	-
Итого	-	50,0	-

Параметры циклов ПЦР: при температуре 94 °С в течение 30 с; 40 циклов при температуре 94 °С в течение 15 с, при температуре 55 °С в течение 60 с и при температуре 72 °С в течение 30 с; а также при температуре 72 °С в течение 5 мин. Размер ампликона 550 п.о. (Ваауен *et al.*, 2002).

Секвенирование ампликонов

Аmplифицированную смесь (5 мкл смеси) запускают на 1,5%-м агарозном геле, чтобы проверить на положительные реакции при анализе. Оставшиеся 45 мкл смеси, давшей положительную реакцию при анализе, очищают при помощи подходящего набора ПЦР для, очищения, следуя инструкциям изготовителя. Секвенирование выполняется с прямым праймером ITS1 и обратным праймером ITS4.

4.2.3.3 Значимая информация о процедуре

Аmplификация и анализ

Выделенную ДНК, при необходимости, следует разморозить. Для проведения анализа должно быть подготовлено достаточно реакционной смеси, по крайней мере, один образец неизвестного изолята, положительный контроль, содержащий амплифицируемую ДНК, и отрицательный контроль, наполненный водой, а не ДНК. Образцы анализируют на 1,5%-м агарозном геле. Согласованные последовательности для образцов (за исключением последовательностей праймеров) сравниваются с подтвержденным штаммом для экс-эпитипа *P. citricarpa* CBS 127454 (GenBank регистрационный номер, JF343583) в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Уровень идентичности должен быть между 99% и 100%.

5. Данные

Регистрация и хранение данных и фактов должны производиться, как описано в разделе 2.5 МСФМ 27:2006.

В случаях если результат диагностики может отрицательно отразиться на других договаривающихся сторонах, данные и факты о результатах (особенно, культуры, слайды, фотографии грибковых структур, фотографии симптомов и признаков, фотографии экстрактов ДНК и гелей) должны храниться не менее одного года.

6. Контактные адреса для дополнительной информации

Дополнительную информацию о *P. citricarpa* и методах его выявления и идентификации можно получить в (в алфавитном порядке):

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: truterm@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).

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).

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; факс: +1 863 9564631; e-mail: lwtimmer@ufl.edu).

Запрос на пересмотр диагностического протокола может быть направлен национальными организациями по карантину и защите растений (НОКЗР), региональными организациями по карантину и защите растений (РОКЗР) или вспомогательными органами Комиссии по фитосанитарным мерам (КФМ) через Секретариат МККЗР (ippc@fao.org), который, в свою очередь, направит его в Техническую группу экспертов для разработки диагностических протоколов (ТГЭДП).

7. Благодарность

Первый проект настоящего протокола был составлен:

Dr Irene Vloutoglou, Benaki Phytopathological Institute, 8, St Delta St, GR-145 61 Kifissia, Athens, Greece (tel.: +30 210 8180231; факс: +30 210 8077506; e-mail: i.vloutoglou@bpi.gr).

Dr Johan Meffert, Plant Protection Service, 15, Geertjesweg, 6706 EA Wageningen, The Netherlands (tel.: +31 417 496837; fax +31 317 421701; e-mail: j.p.meffert@minlnv.nl).

Dr Luis E. Diaz, Ministry of Husbandry, Agriculture and Fisheries, General Directorate of Agricultural Services, Mycology Department, Av. Millán 4703, CP 12900, Montevideo, Uruguay (tel.: +598 2 3043992; факс: +598 2 3043992; e-mail: ldiaz@mgap.gub.uy).

8. Справочные материалы

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. & 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. & 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. & 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. & 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. & 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.

CABI. 2011. *Guignardia citricarpa*. *Crop Protection Compendium*, 2011 edn. Wallingford, UK, CAB International. Доступно на <http://www.cabi.org/isc/?compid=5&dsid=26154&loadmodule=datasheet&page=481&site=144> (последний доступ 19.08.2014).

- CABI/EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 1998. *Guignardia citricarpa*. *Distribution maps of quarantine pests for Europe*, no. 204. Wallingford, UK, 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, Brazil. 85 pp.
- EPPO/CABI.** 1997. *Guignardia citricarpa*. In I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott & M. Holderness, eds. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn, pp. 773–781. Wallingford, UK, CAB International. 1440 pp.
- FUNDECITRUS.** 2005. Manual de Pinta Preta. Brazil, Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Citricultura. 10 pp. (Boletim Técnico).
- Gams, W., Hoekstra, E.S. & Aptroot, A.** 1998. *CBS course of mycology*, 4th edn. Baarn/Delft, The Netherlands, Centraal Bureau voor Schimmelcultures. 165 pp.
- Gent-Pelzer, M.P.E. van, van Brouwershaven, I.R., Kox, L.F.F. & 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. & 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. & 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, FL, USA, 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. & Pegler, D.N.** 1995. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*, 8th edn. Wallingford, UK, CAB International. 650 pp.
- Hughes, K.J.D., Inman, A.J. & 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. & 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, FL, USA, ISC.
- Kotzé, J.M.** 2000. Black spot. In L.W. Timmer, S.M. Garnsey & J.H. Graham, eds. *Compendium of Citrus Diseases*, 2nd edn, pp. 23–25. Saint Paul, MN, USA, APS Press. 128 pp.

- Lee, Y.S. & 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. & 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. & Korsten, L.** 2012. Detection and molecular identification protocols for *Phyllosticta citricarpa* from citrus matter. *South African Journal of Science*, 108.
- NAPPO** (North American Plant Protection Organization). 2010. Phytosanitary Alert System: Confirmation of citrus black spot (*Guignardia citricarpa*) in Florida, United States. NAPPO. Доступно на <http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=421> (последний доступ 26.09.2011).
- OEPP/EPPO.** 2003. Diagnostic protocols for regulated pests: *Guignardia citricarpa*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 33: 271–280.
- Peres, N.A., Harakava, R., Caroll, G.C., Adaskaveg, J.E. & 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. & Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY, USA, 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. & 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, ed. *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables, Vol. I. General Introduction and fruits*, pp. 62–63. London, UK, 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, Brazil. 112 pp.
- Spósito, M.B., Amorim, L., Bassanezi, R.B., Bergamin Filho, A. & 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. & 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. & 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. & Waterston, J.M.** 1966. *Guignardia citricarpa*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 85. Wallingford, UK, 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, CA, USA, California Citrus Research Board.
- Truter, M., Labuschagne, P.M., Kotzé, J.M., Meyer, L. & 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. & 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. & 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. *PCR protocols: A guide to methods and applications*, pp. 315–322. San Diego, CA, 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. & Crous, P.W.** 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Diversity*, 34: 23–39. Доступно на <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD34-2.pdf> (последний доступ 19.08.2014).

9. Рисунки

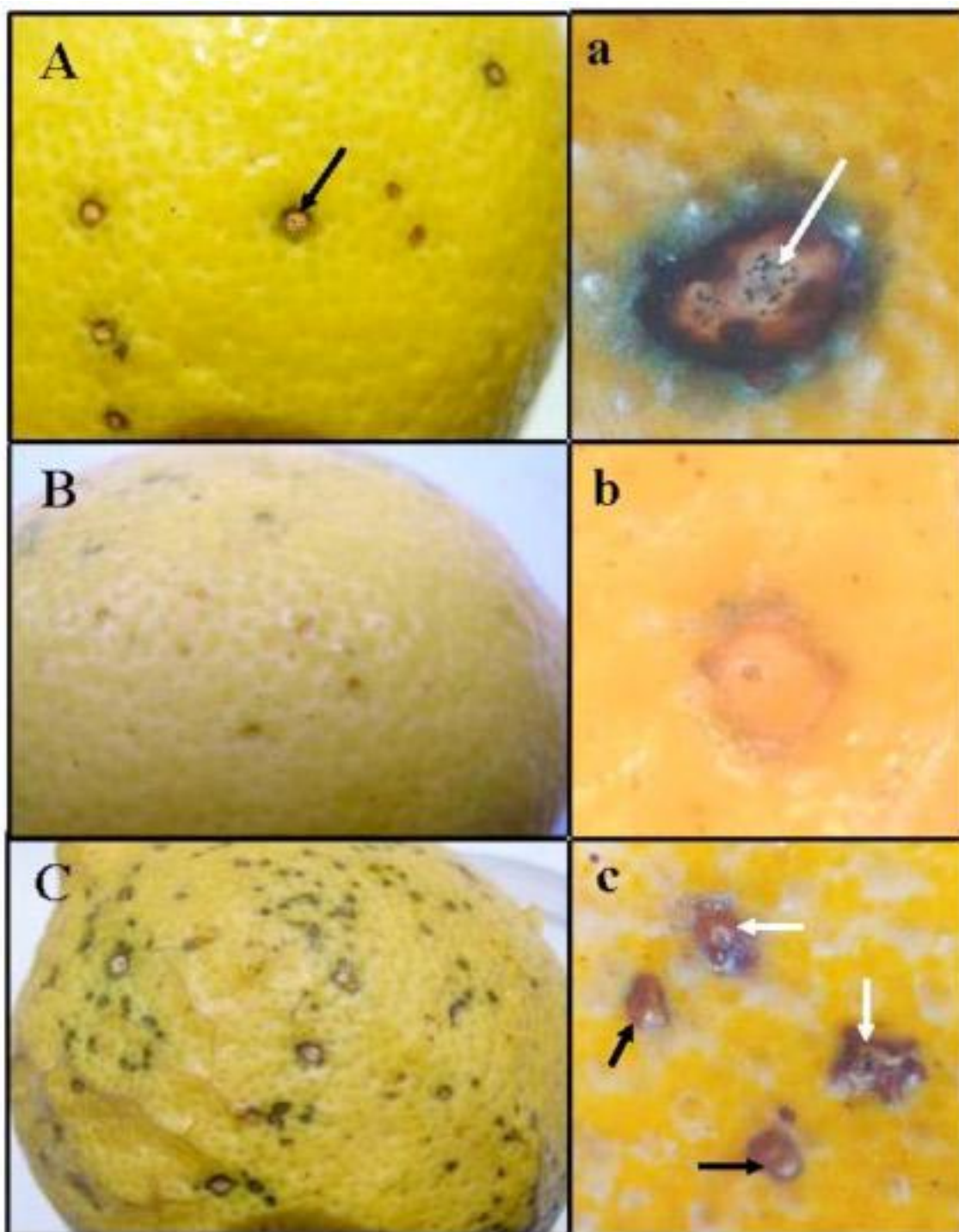


Рисунок 1: Симптомы уплотнения и веснушчатых пятен, вызванные *Phyllosticta citricarpa* на плодах сладкого апельсина (*Citrus sinensis*) и лимона (*Citrus limon*): (A, a) уплотненные пораженные участки на сладком апельсине и более сильные поражения, содержащие пикниды из анаморфа *Phyllosticta citricarpa* (стрелочки); (B) пораженные участки с веснушчатыми пятнами на лимоне; (b) пораженные участки с веснушчатыми пятнами на сладком апельсине (пораженные участки немного вдавлены в центре, пикниды отсутствуют); (C) уплотненные участки поражения и веснушчатые пятна на лимоне; (c) пораженные участки с веснушчатыми пятнами (черные стрелочки) и промежуточная стадия между веснушчатыми пятнами и уплотненными пораженными участками с пикнидиями (белые стрелочки) на сладком апельсине.

Фотографии любезно предоставлены E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brazil.

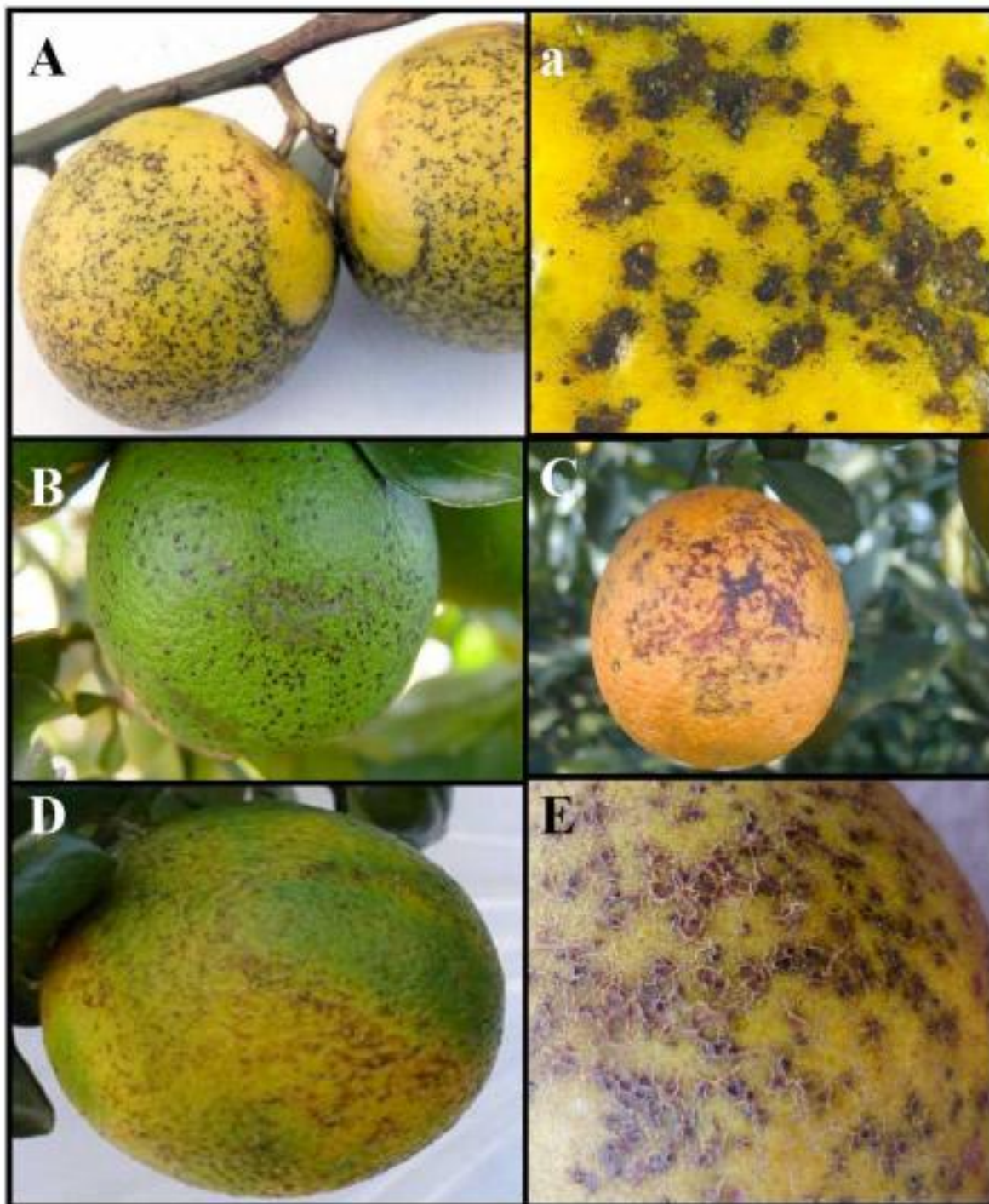


Рисунок 2: Симптомы ложного меланоза, вирулентные пятна, кружевные пятна и пятна с трещинами, вызванные *Phyllosticta citricarpa* на плодах сладкого апельсина (*Citrus sinensis*) и лимона (*Citrus limon*): (A) поражения ложным меланозом на зрелом сладком апельсине; (a) поражения ложным меланозом, окруженные черными пятнышками, на зрелом сладком апельсине; (B) поражения ложным меланозом на зеленом сладком апельсине; (C) пораженные участки с вирулентными пятнами на сладком апельсине (пораженные участки вдавлены и распространяются глубоко в альбедо); (D) симптомы кружевных пятен на зеленом сладком апельсине; (E) пятна с трещинами на сладком апельсине (пораженные участки слегка выступающие, с трещинами и нечеткими границами, свободны от пикнид).

Фотографии любезно предоставлены FUNDECITRUS (A, B, C, D, E) и E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brazil (a).

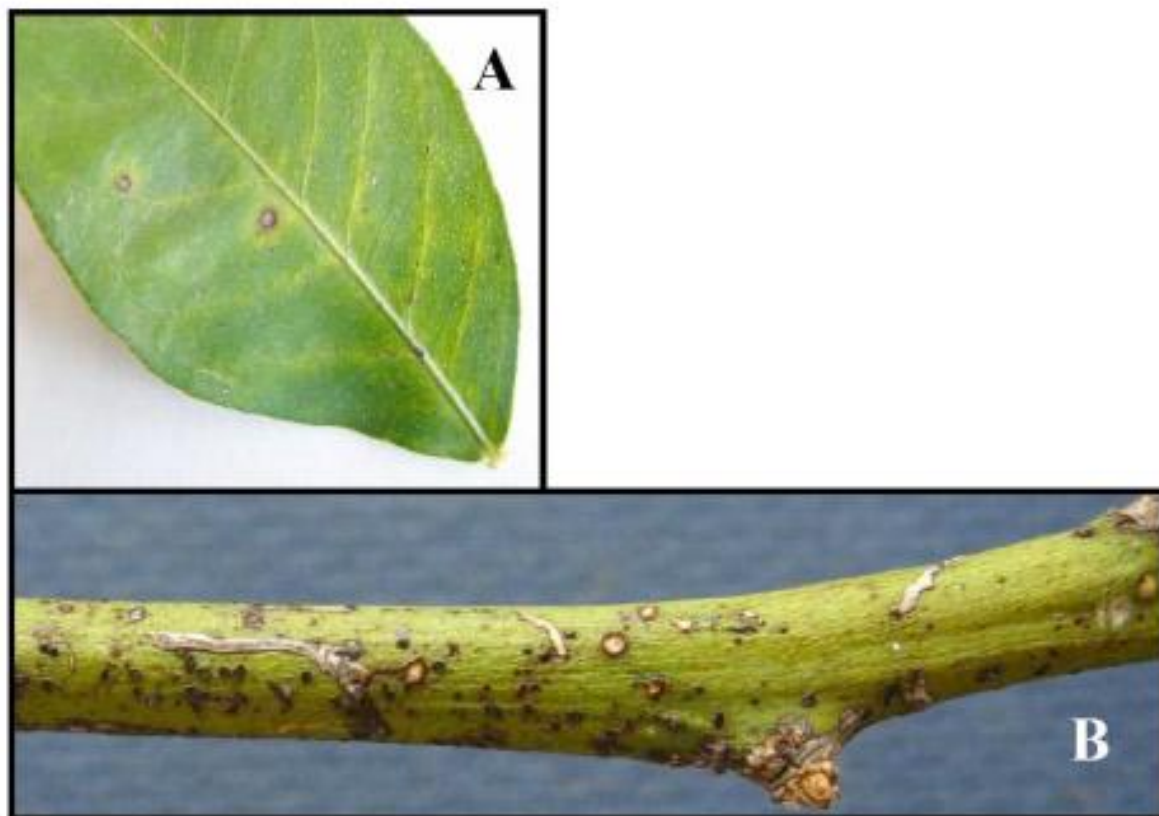


Рисунок 3: Симптомы черной пятнистости цитрусовых, вызванных *Phyllosticta citricarpa* на листьях (А) и ветвях (В) лимона (*Citrus limon*)

Фотографии любезно предоставлены E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brazil (А) и M. Truter, Plant Protection Research Institute, Agricultural Research Council, Pretoria, South Africa (В).

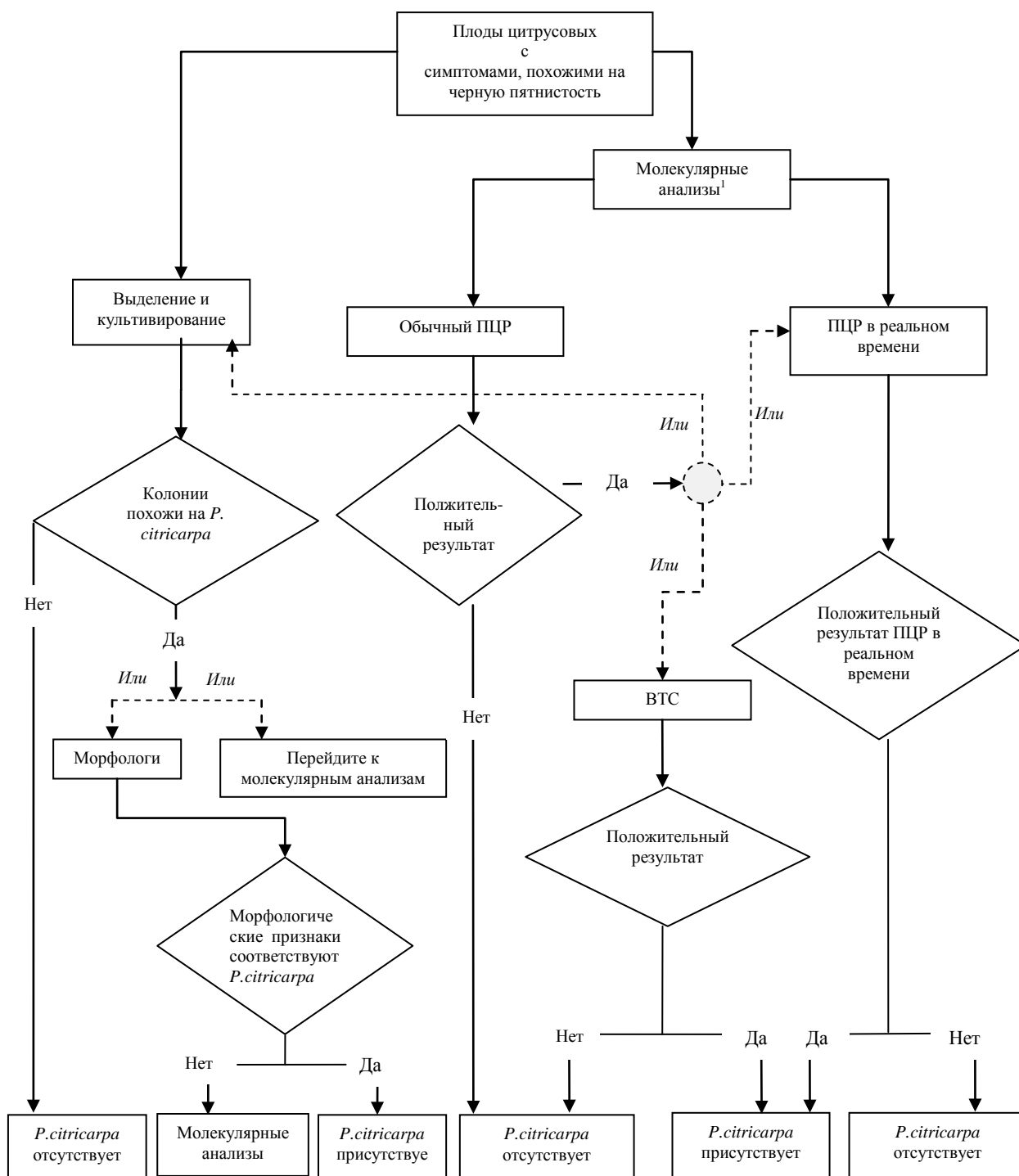


Рисунок 4. Блок-схема для идентификации *Phyllosticta citricarpa* на плодах citrusовых

¹Молекулярные методы были утверждены для идентификации организма на чистой культуре и пораженных участках плодов, но не на каком-либо другом растительном материале (например листьях, ветвях). VTC, внутренний транскрибируемый спейсер; ПЦР, полиразмерная цепная реакция.

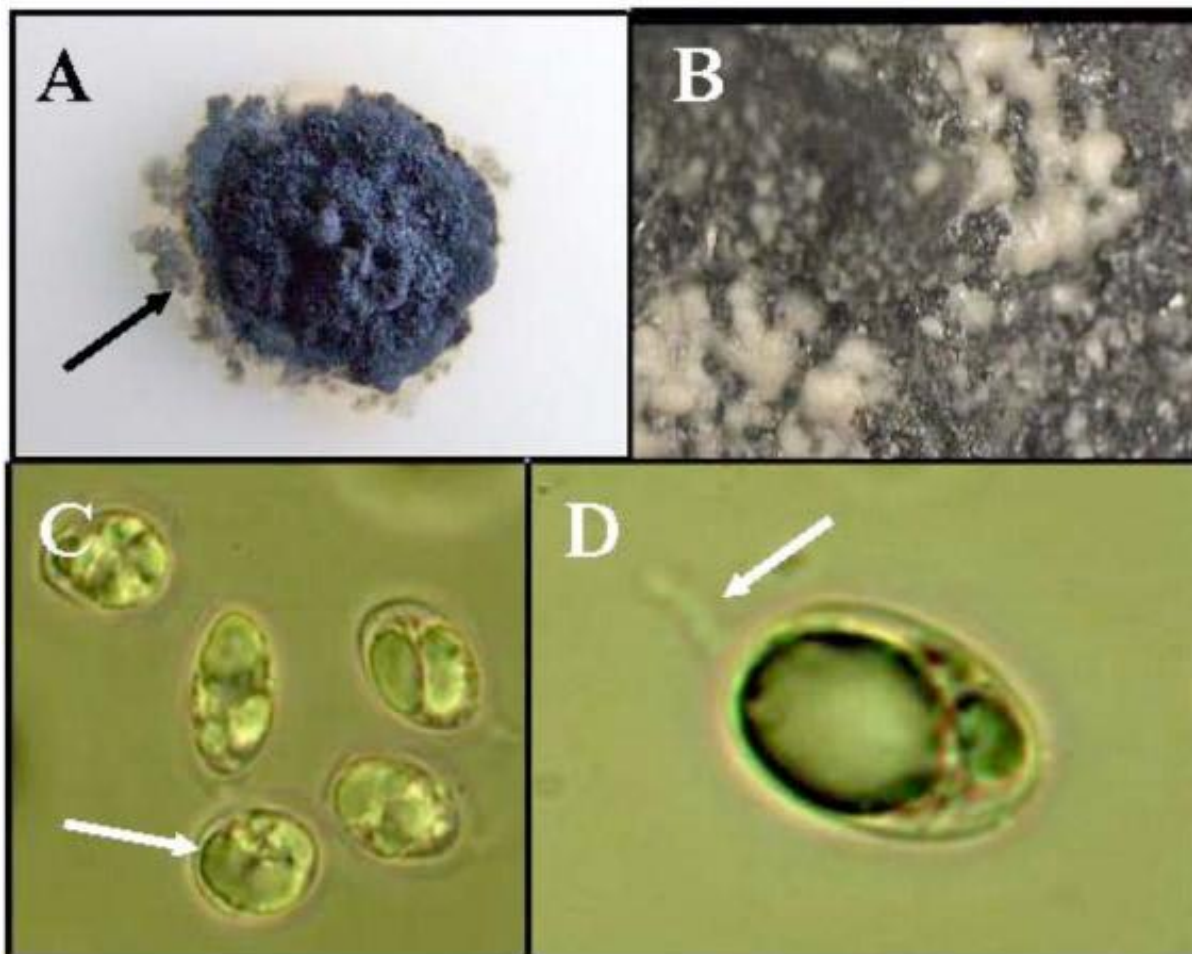


Рисунок 5: Признаки колонии и морфология конидий *Phyllosticta citricarpa*: (A) колония с нечеткой границей, окружена полупрозрачной зоной бесцветного глубинного мицелия (стрелочка) после 30 дней выращивания на картофельном агаре с декстрозой (pH 5,5) при температуре 25 °C и 12-часовым фотопериодом; (B) конидиальная слизь состоит из зрелых пикнид; (C, D) конидия с тонкой слизистой оболочкой (C, стрелочка) и бесцветным шиловидным придатком (D, стрелочка, увеличение 1 000x, погружена в масло).

Фотографии любезно предоставлены L.E. Diaz, Ministry of Husbandry, Agriculture and Fisheries, Montevideo, Uruguay.

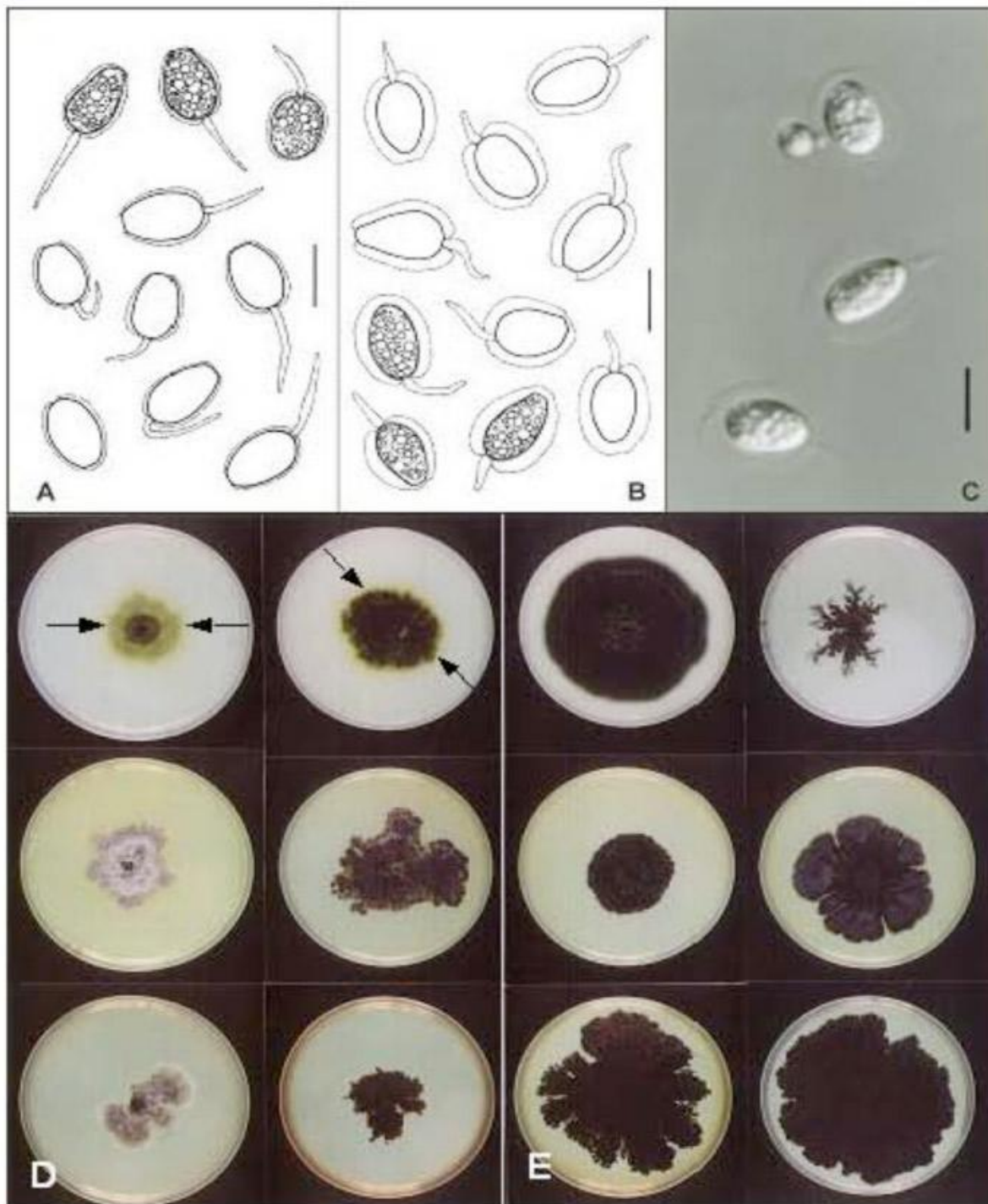


Рисунок 6: Морфология конидий и культурные признаки *Phyllosticta citricarpa* и *Phyllosticta capitalensis*: (A) конидии *P. citricarpa* с тонкой (<1,5 мкм) слизистой оболочкой; (B, C) конидии *P. capitalensis* с толстой (>1,5 мкм) слизистой оболочкой (масштабная полоска = 10 мкм) (фотография C была сделана с помощью оптического микроскопа с дифференциальным интерференционным контрастом); (D, E) колонии *P. citricarpa* (D) и *P. capitalensis* (E) спустя 7 дней выращивания на овсяном агаре (верхний ряд), на агаре из солодового экстракта (средней ряд) и агаре из вытяжки вишни (нижний ряд) (обратите внимание на образование желтого пигмента вокруг колонии *P. citricarpa*, выращенной на овсяном агаре (D, стрелочки) и отсутствие этого пигмента в культурах *P. capitalensis*, выращенных в такой же среде (E)).

Фотографии любезно предоставлены G. Verkley, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands (A, B, C) и W. van Lienden, Plant Protection Service, Wageningen, The Netherlands (D, E).

История публикации.

История публикации не является официальной частью стандарта.

2006-03 КФМ-1 добавил в Рабочую программу тему: Грибы и грибоподобные организмы 2006-006

2004-11 КС добавил тему *Guignardia citricarpa* (2004-023)

2011-11 КС утвердил для консультации членов посредством электронного принятия решений (2011_eSC_Nov_06)

2012-07 консультация членов

2013-03 Название изменено на *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa на плодах (2004-023)

2013-07 ТГЭДП пересмотрела и направила ДП в КС для утверждения на принятие (2013_eTPDP_Jun_01)

2013-10 КС утвердил проект для 45-дневного периода направления нотификаций посредством электронного принятия решений (2013_eSC_Nov_13)

2014-12/01 период направлений нотификаций по ДП - получены официальные возражения

2014-02/03 ТГЭДП пересмотрела на виртуальной встрече

2014 КС утвердил проект для 45-дневного периода направления нотификаций посредством электронного принятия решений (2014_eSC_Nov_01)

2014-07/08 период нотификаций по ДП

2014-08 КС утвердил ДП от лица КФМ

МСФМ 27. 2006: **Приложение 5.** *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa на плодах (2014) Рим, МККЗР, ФАО.

История публикации последний раз обновлена: 29.08.2014