

Настоящий диагностический протокол был принят Комитетом по стандартам от лица Комиссии по фитосанитарным мерам в августе 2014 года.

Настоящее приложение является предписывающей частью МСФМ 27:2006.



МСФМ 27
Приложение 6

МЕЖДУНАРОДНЫЕ СТАНДАРТЫ ПО ФИТОСАНИТАРНЫМ МЕРАМ

МСФМ 27 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРОТОКОЛЫ

ДП 6: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

(2014 год)

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Информация о вредном организме	2
2.	Таксономическая информация	3
3.	Выявление	3
3.1	Выявление на симптоматических растениях	3
3.1.1	Симптомы	3
3.1.2	Выделение	4
3.1.3	Серологическое выявление: Непрямая иммунофлуоресценция	5
3.1.4	Молекулярное выявление	6
3.1.4.1	Контроли для молекулярного тестирования	6
3.1.4.2	Выделение ДНК из зараженной ткани цитрусовых	7
3.1.4.3	Обычный ПЦР	7
3.1.4.4	ПЦР в реальном времени	8
3.1.5	Интерпретация результатов обычного ПЦР и ПЦР в реальном времени	9
3.1.6	Выявление в ходе биопроб	10
3.1.6.1	Анализ путем заражения листовых дисков	10
3.1.6.2	Обогащение отдельного листа	10
3.2	Выявление на бессимптомных растениях	11
4.	Идентификация	11
4.1	Методы ПЦР	12
4.2	Серологическое выявление	13

4.2.1	ИФА метод двойных антител.....	13
4.2.2	Непрямой ИФА	14
4.3	Анализ на патогенность	14
4.4	Описание и биохимические характеристики	15
4.5	Молекулярная идентификация	15
4.5.1	Анализ мультилокусного секвенирования.....	15
4.5.2	Дактилоскопия гер-ПЦР.....	15
5.	Данные.....	16
6.	Контактные адреса для дополнительной информации	16
7.	Выражение признательности.....	17
8.	Справочные материалы.....	17
9.	Рисунки.....	21

1. Информация о вредном организме

Xanthomonas citri subsp. *citri* является основным возбудителем бактериального рака цитрусовых. Он вызывает повреждения многих культивируемых видов Rutaceae (ЕОКЗР, 1979) – в первую очередь, *Citrus* spp., *Fortunella* spp. и *Poncirus* spp. – выращиваемых в тропических и субтропических условиях, которые широко распространены во многих странах Азии, Южной Америки, Океании и Африки, а также в штате Флорида, США (САВИ 2006; ЕОКЗР, 2006). Нетипичные штаммы *X. citri* subsp. *citri* с ограниченным диапазоном растений-хозяев были выявлены и обозначены как штаммы А* и А^W (Sun *et al.*, 2004; Vernière *et al.*, 1998). Штамм А* повреждает *Citrus aurantiifolia* (мексиканский лайм) в естественных условиях в Азии. Штамм А^W вызывает рак *Citrus aurantiifolia* (мексиканский лайм) и *Citrus Macrophylla* во Флориде, США в естественных условиях (Cubero and Graham, 2002, 2004). В ходе экспериментов было зарегистрировано, что оба штамма вызывают атипичные очаги на других видах цитрусовых (Escalon *et al.*, 2013).

Бактериальный рак цитрусовых, как правило, возникает на сеянцах и на молодых и взрослых деревьях восприимчивых растений-хозяев, на которых активно растут побеги и листья, с конца лета до осени в большинстве областей, где выращиваются цитрусовые. Пораженные раком участки формируются на листьях, побегах, ветвях и плодах восприимчивых растений-хозяев. Повреждения, вызванные ветром, шипами, насекомыми, а также физические или механические повреждения способствуют заражению зрелых тканей. Атаки *Phyllocnistis citrella*, листогрыза цитрусовых, могут повысить восприимчивость листьев к раку цитрусовых (Hall *et al.*, 2010).

X. citri subsp. *citri* может выжить в пораженных тканях растений, как эпифит на растениях-хозяевах и растениях, не являющихся хозяевами, а также как сапрофит на соломенной мульче или в почве. Тем не менее, зимующие поражения, особенно те, которые образуются на угловых побегах, являются наиболее важным источником инокулята для следующего сезона. Основные механизмы распространения на короткие расстояния – дождь с ветром и разбрызгивание воды внутри и между растениями: бактерии распространяются с потоками дождевой воды с поверхности пораженных участков, а затем вместе с брызгами попадают на здоровые побеги (САВИ, 2006). Перемещение зараженного растительного материала, в том числе черенков, рассады с корневищами и расцветших деревьев повлияло на распространение на дальние расстояния. Нет никаких доказательств, что этот патоген переносится с семенами (САВИ, 2006).

2. Таксономическая информация

Название: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Gabriel *et al.* 1989) Schaad *et al.* 2007

Синонимы: *Xanthomonas smithii* subsp. *citri* Gabriel *et al.*, 1989, Schaad *et al.*, 2007

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Hasse) Vauterin *et al.*, 1995

Xanthomonas citri (ex Hasse, 1915) Gabriel *et al.*, 1989

Xanthomonas campestris pv. *aurantifoliae* Gabriel *et al.*, 1989

Xanthomonas campestris pv. *citri* (Hasse) Dye, 1978

Xanthomonas citri f.sp. *aurantifoliae* Namekata and Oliveira, 1972

Pseudomonas citri Hasse, 1915

Таксономическая позиция: Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Xanthomonadales, Xanthomonadaceae

Общие названия: рак citrusовых, бактериальный рак citrusовых, азиатский рак

Примечание: *X. citri* subsp. *citri* недавно был переклассифицирован из *X. axonopodis* pv. *citri* (*X. campestris* pv. *citri* группа штамм А). Терминология Gabriel *et al.* (1989) была восстановлена, и в настоящее время общепринятое имя для патогена бактериального рака citrusовых – *X. citri* subsp. *citri* (Bull *et al.*, 2010; Schaad *et al.*, 2006). Другая группа штаммов *X. campestris* pv. *citri* была классифицирована как *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifoliae* (группы В, С и D) и *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (группа E) (Schaad *et al.*, 2006).

3. Выявление

3.1 Выявление на симптоматических растениях

Диагностика рака citrusовых может проводиться путем наблюдения морфологических характеристик колоний на питательных средах и серологического тестирования (по иммунофлуоресценции (ИФ)), молекулярного тестирования (с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)) и биотестирования листовых дисков или отдельных листьев. Положительные и отрицательные контрольные панели должны быть включены во все тесты (см. раздел 4 по справочным контрольным панелям).

3.1.1 Симптомы

Болезнь характерно вызывает паршу или кратерообразные поражения на кожуре плодов и на листьях, ветвях и побегах. Симптомы рака citrusовых могут появляться на сеянцах в любое время года, а также на молодых деревьях с конца лета до осени, когда происходит активный рост угловатых побегов (САВИ, 2006) (рисунки 1-4). Болезнь становится sporadic, когда деревья достигают стадии плодоношения, так как образуется меньше угловых побегов, и более старые листья и зрелые плоды устойчивее к инфекции рака citrusовых в естественных условиях. Тяжесть заболевания зависит также от восприимчивости видов и сортов растений-хозяев (Goto, 1992).

Симптомы на плодах. Кратерообразные пораженные участки образуются на поверхности плода; они могут быть разбросаны поодиночке на плоде, или несколько поражений могут быть соединены и образовывать нечеткий рисунок. На молодых зараженных плодах можно наблюдать выделение через поры смолистых веществ. Поражения никогда не проникают внутрь через кожуру.

Симптомы на ветках. В сухих условиях пятна рака пробковые или губчатые, приподнятые и образуют трещины на поверхности. В условиях повышенной влажности пораженные участки быстро увеличиваются, и поверхность остается без трещин и маслянистая по краям. На менее восприимчивых сортах между пораженными и здоровыми тканями может формироваться бугорчатый слой. Шрамы язвы можно идентифицировать путем соскоба шероховатой поверхности ножом, чтобы снять внешний пробковый слой, под которым находятся поражения от светлого до темно-коричневого цвета в здоровых зеленых тканях коры. Обесцвеченные области могут различаться по форме и размеру от 5 до 10 мм, в зависимости от восприимчивости растения-хозяина.

Симптомы на листьях. Сначала различают ярко-желтые пятна на нижней стороне листьев, а затем на обеих сторонах листьев пробиваются коричневатые повреждения, листья становятся грубыми, трескаются и покрываются паршой. Язва может быть окружена бледно-желтым или хлоротичным ореолом по краям.

Можно спутать симптомы рака цитрусовых на ветвях, листьях и плодах с симптомами парши или пятнистости листьев, вызванными другими бактериями или грибами, которые заражают цитрусовые, а также с физиологическими повреждениями. Другие бактерии, которые могут вызвать симптомы, похожие на рак цитрусовых, – это *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* и *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*. Обе бактерии имеют ограниченный диапазон растений-хозяев, вызывают менее агрессивные симптомы и редко влияют на появление пораженных участков на плодах (Schaad *et al.*, 2005, 2006). Было зарегистрировано, что парша цитрусовых, вызываемая грибом *Elsinoë fawcettii*, имеет симптомы, похожие на рак цитрусовых, особенно на сортах растений-хозяев, которые проявляют устойчивость к парше цитрусовых (Taylor *et al.*, 2002), но в целом поражения паршой более сухие и более нерегулярные, чем поражения от рака цитрусовых, и иногда вокруг них нет характерного желтого ореола. Паршу цитрусовых можно отличить от рака цитрусовых по отсутствию бактериальной слизи.

3.1.2 Выделение

Экстракты свежеприготовленных образцов значимы для успешного выделения *X. citri* subsp. *citri* из симптоматического растительного материала. Растительный материал следует анализировать как можно раньше после сбора; его можно хранить при 4-8 °C до обработки. Когда симптомы очень распространены или когда условия окружающей среды не являются благоприятными, количество культивируемых клеток *X. citri* subsp. *citri* может быть очень низким, и выделение может привести к тому, что панели будут переполнены конкурирующими сапрофитами или антагонистическими бактериями. Особое внимание следует уделять тому, чтобы не спутать колонии *X. citri* subsp. *citri* с *Pantoea agglomerans*, который также обычно выделяется из поражений рака и производит морфологически подобные колонии на стандартной бактериологической среде. *P. agglomerans* обычно быстрее растут, и колонии имеют ярко-желтый цвет по сравнению с бледно-желтыми/лимонными колониями *X. citri* subsp. *citri*.

Выделение организма-возбудителя может осуществляться путем нанесения штрихом экстрактов из пораженного участка на чашки с подходящей средой, на которой колонии *X. citri* subsp. *citri* имеют характерное проявление. Пока еще нет доступных исключительно селективных сред для *X. citri* subsp. *citri*.

Поврежденные участки измельчаются в 0,5-1,0 мл физиологического раствора (дистиллированная стерильная вода с NaCl до 0,85%, pH 7,0), и в случае необходимости могут быть продезинфицированы заранее в 1% NaClO в течение 1 мин, трижды промыты стерильной дистиллированной водой и измельчены. Аликвоту экстракта наносят штрихом на питательную среду. Подходящая общая среда для выделения – это питательный агар с добавлением 0,1% раствора глюкозы (NGA), пептонного агара глюкозы дрожжей (YPGA) (дрожжевой экстракт, 5 г; Бакто пептон 5 г; глюкоза, 10 г; агар, 20 г; дистиллированная вода, 1 л, pH 7,0) и среды Wakimoto: (картофельный бульон 250 мл;

сахарозы, 15 г; пептон, 5 г; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,8 г; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 г; Бакто™ Агар, 20 г; дистиллированная вода, 1 л, pH 7,2). Стерилизованный через фильтр циклогексимид (100 мг/л) можно добавить в случае необходимости в качестве фунгицида после автоклавирования среды.

Морфология колонии на всех трех средах – круглая, выпуклая и цельнокрайняя, колония слизистая, сливочно-желтая. Рост оценивается после инкубации при 25-28 °С в течение трех-пяти дней. В промышленных образцах плодов бактерии могут подвергнуться стрессу, их сложно культивировать; поэтому может потребоваться более длинный период инкубации, также можно использовать биопробы для восстановления бактерии из образцов, как описано в разделе 3.1.6.2. Интеграция касугамицина и цефалексина в среде (полуселективная среда КС или КСВ) ингибирует некоторые сапрофитные бактерии и способствует выделению патогена (Graham *et al.*, 1989 год; Pruvost *et al.*, 2005).

В этом диагностическом протоколе методы (включая ссылки на названия брендов) описываются в порядке их опубликования, поскольку они определили изначальный полученный уровень чувствительности, специфичности и воспроизводимости. Использование наименований химических реактивов (например, названия брендов) не требует утверждения их перечня и не исключает применения других реактивов, которые также могут быть подходящими. Лабораторные процедуры, представленные в протоколах, могут быть скорректированы применительно к стандартам отдельных лабораторий, в том случае, если они являются компетентно аккредитованными.

3.1.3 Серологическое выявление: Непрямая иммунофлуоресценция

Для серологического выявления (ИФ и твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)) значимы соответствующие контрольные панели, чтобы обеспечить надежность результатов тестирования. Положительные и отрицательные контрольные панели должны быть включены в каждое тестирование. Положительные контрольные панели могут состоять из справочного штамма *X. citri* subsp. *citri*, суспендированного в экстракте здорового растения-хозяина (для выявления на растительном материале) или в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР) (для идентификации бактериальных культур). Отрицательные контрольные панели должны состоять из экстракта здорового растения-хозяина (для выявления на растительном материале) или суспензии видов бактерий, не являющихся мишенями (для идентификации бактериальных культур).

Для серологического выявления бактериальных клеток, петлю свежей культуры для посева собирают с пластины и ресуспендируют в 1 мл ФСБР (NaCl , 8 г; KCl , 0,2 г; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2,9 г; KH_2PO_4 , 0,2 г; дистиллированная вода до 1 л; pH 7,2) для формирования приблизительно 10^8 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл (ЕОКЗР, 2009 год).

Для серологического выявления в тканях растений, должны быть отобраны образцы с симптомами – побеги, ветви, листья и плоды с некротическими пораженными участками; или ткань из язв на ветвях, ветках, стволе или устье ствола. Образцы должны быть обработаны в соответствии с общей процедурой, рекомендуемой для использования в ходе конкретного серологического теста, которые будут использоваться. Как правило, растительную ткань измельчают в свежеприготовленном антиоксидантном мацерационном буферном растворе (поливинилпирролидон (ПВП)-10, 20 г; манит, 10 г; аскорбиновая кислота, 1,76 г; восстановленный глутатион, 3 г; ФСБР, 10 мМ, 1 л, pH 7,2), или в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР) (NaCl , 8 г; KCl , 0,2 г; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2,9 г; KH_2PO_4 , 0,2 г; дистиллированная вода до 1 л, pH 7,2) перед использованием в серологических тестах. Оба раствора стерилизуются фильтрованием с использованием стерильной мембраны размером 0,22 мкм.

Аликвоты объемом 25 мкл каждого бактериального препарата или растительного образца, предназначенного для тестирования, помещаются пипеткой на покрытое пластиком предметное стекло микроскопа с несколькими отверстиями, оставляют для просушивания на воздухе, а затем осторожно нагревают, зафиксировав над пламенем. Отдельные предметные стекла

подготавливаются для каждой бактерии или образца, подлежащего тестированию, а также для положительных и отрицательных контрольных панелей, которые используются для теста ИФА. Коммерчески доступную антисыворотку или моноклональные антитела разбавляют ФСБР (рН 7,2) и 25 мкл соответствующего разведенного раствора добавляют в отверстия каждого предметного стекла. Отрицательные контрольные панели могут состоять из нормальной (преимунной) сыворотки в одном разведении и ФСБР. Слайды инкубируют во влажной камере при комнатной температуре в течение 30 мин. Капли стряхивают с предметных стекол, их ополаскивают ФСБР, а затем каждое промывают три раза в течение 5 мин в ФСБР. Предметные стекла аккуратно промокают досуха до того, как добавляют пипеткой в каждое отверстие 25 мкл соответствующую конъюгацию антивидовых антител гамма-глобулин-изотиоцианат флуоресцеина в соответствующем разведении. Предметные стекла инкубируют в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин, ополаскивают, промывают и промокают досуха. Наконец, добавляют 10 мкл фосфатно-глицеринового буферного раствора 0,1 ммоль/л (рН 7,6) с антифединговым агентом в каждое отверстие, которое затем покрывают покровным стеклом.

Предметные стекла рассматривают под иммерсионным маслом флуоресцентным микроскопом при 600 × или 1 000-кратном увеличении. Конъюгация флуоресцирует ярко-зеленым цветом под ультрафиолетовым светом микроскопа. Если положительная контрольная панель с известной бактерией показывает флуоресцентные палочковидные бактериальные клетки и отрицательные контрольные панели нормальной сыворотки и ФСБР не показывают флуоресценцию, выборочные отверстия изучаются для выявления люминесцентных бактериальных клеток с размером и формой *X. citri* subsp. *citri*. Этот метод позволяет выявить примерно 10³ КОЕ/мл.

3.1.4 Молекулярное выявление

3.1.4.1 Контроли для молекулярного тестирования

Для того, чтобы результат полученного при тестировании считался надежным, необходимы соответствующие контрольные панели, которые будут зависеть от типа использованного теста и требуемого уровня достоверности. Для ПЦР положительная контрольная панель нуклеиновой кислоты, внутренний контроль и отрицательный контроль амплификации (без шаблонной контрольной панели) являются минимально требуемыми контрольными панелями. Эти и другие контрольные панели, которые следует учитывать для каждой серии экстракции нуклеиновых кислот из ваших тестовых образцов, как описано ниже.

Положительный контроль нуклеиновой кислотой. Предварительно подготовленная (сохраненная) нуклеиновая кислота, весь геном ДНК или синтетическая контрольная панель (например, клонированный продукт ПЦР) может быть использована в качестве контроля для отслеживания эффективности ПЦР-амплификации.

Внутренний контроль. Для обычного ПЦР и ПЦР в реальном времени конститутивный ген растения (КГ), такие как ЦОГ (Weller *et al.*, 2000 год), 16S рибосомальная (р)ДНК (Weisberg *et al.*, 1991) или глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГЗФ) (Mafera *et al.*, 2012), должен быть включен в протокол ПЦР в качестве контроля, чтобы исключить возможность ложно отрицательных результатов в связи с неудачей при экстракции нуклеиновой кислоты или из-за деградации или наличия ингибиторов ПЦР.

Отрицательный контроль амплификации (без шаблонной контрольной панели). При обычном ПЦР и ПЦР в реальном времени воду для ПЦР, которую использовали для подготовки реакционной смеси, добавляют на стадии амплификации, чтобы исключить ложные срабатывания вследствие загрязнения во время подготовки реакционной смеси.

Положительный контроль выделения. Этот контроль используется для того, чтобы обеспечить достаточное для ПЦР-амплификации качество нуклеиновой кислоты, полученной от мишени. Нуклеиновая кислота выделяется из зараженной ткани растения-хозяина или

здоровой растительной ткани, которая была добавлена в образец целевого препарата в концентрации, считающейся пределом выявления по протоколу.

Положительный контроль должен составлять примерно одну десятую от количества ткани листьев, используемой для каждого растения при выделении ДНК. В ходе ПЦР следует принять меры во избежание перекрестного засорения, вызванного аэрозолями от положительного контроля или от положительных образцов. При необходимости положительный контроль, используемый в лаборатории, должен быть упорядочен так, чтобы последовательность можно было легко сравнить с последовательностью, полученной из ПЦР-ампликонов правильного размера. С другой стороны, синтетические положительные контроли могут быть сделаны с известной последовательностью, которую, опять же, можно сравнить с ПЦР-ампликонами правильного размера.

Отрицательный контроль выделения. Этот контроль используется для отслеживания засорения во время выделения нуклеиновых кислот и перекрестного взаимодействия с тканью растения-хозяина. Контроль состоит из нуклеиновой кислоты, которая выделяется из незараженной ткани растения-хозяина, а затем амплифицируется. Рекомендуется использовать несколько контролей, когда тестируется большое количество положительных образцов.

3.1.4.2 Выделение ДНК из зараженной ткани цитрусовых

Выделение ДНК из зараженной ткани цитрусовых было первоначально выполнено Hartung *et al.* (1993) с протоколом гексадецилтриметиламмония бромидом (ЦТАБ), но существуют коммерческие методы и протокол изопропанола (не требующий фенола), который был тщательно изучен (Llor *et al.*, 1999). ДНК также успешно выделяли из ткани цитрусовых с помощью коммерческих наборов выделения ДНК (например, Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit) (Coletta-Filho *et al.*, 2006).

Согласно протоколу изопропанола, поврежденные участки или растительный материал с подозрением на заражение нарезают на мелкие кусочки, заливают ФСБР и встряхивают в ротационном шейкере в течение 20 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость фильтруют (для удаления растительного материала), а затем центрифугируют при 10 000 Гс в течение 20 мин. Осадок ресуспендируют в 1 мл ФСБР: 500 мкл сохраняется для последующего анализа или для непосредственного выделения на чашках с агаром, и 500 мкл центрифугируют при 10 000 Гс в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 500 мкл экстракционного буферного раствора (200 мМ Трис-НСl, рН 7,5; 250 мМ NaCl, 25 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК); 0,5% додецилсульфат натрия (ДСН); 2% ПВП), перемешивают и оставляют на 1 час при комнатной температуре, непрерывно встряхивая. Затем суспензию центрифугируют при 5 000 Гс в течение 5 мин, после чего 450 мкл надосадочной жидкости переносят в новую пробирку и смешивают с 450 мкл изопропанола. Суспензию осторожно перемешивают и оставляют на 1 час при комнатной температуре. Выпадение осадка можно улучшить, используя соосадитель Pellet Paint (Cubero *et al.*, 2001). Суспензию центрифугируют при 13 000 Гс в течение 10 мин, надосадочную жидкость отбрасывают, а осадок высушивают. Осадок ресуспендируют в 100 мкл воды. Образец 5 мкл используется в 50 мкл ПЦР.

3.1.4.3 Обычный ПЦР

Несколько пар праймеров доступны для диагностики *X. citri* subsp. *citri*. Hartung *et al.* (1993): праймеры 2 и 3 направлены на длину фрагмента *Bam*HI ограничения полиморфного фрагмента ДНК, характерного для *X. citri* subsp. *citri*, и наиболее часто используются в анализах на растительном материале из-за их высокой специфичности и чувствительности (примерно 10² КОЕ/мл). Праймеры *J-ptl1* и *J-ptl2* направлены на фрагмент 197 пары оснований (п.о.) сигнала ядерной локализации в гене вирулентности *pthA* в штаммах *Xanthomonas*, которые вызывают симптомы рака цитрусовых. Эти штаммы включают *X. citri* subsp. *citri*, *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* и атипичные штаммы А* и А^w *X. citri* subsp. *citri*, выявленные во Флориде (Cubero and Graham, 2002). Праймеры универсальны, но они имеют более низкую чувствительность (10⁴ КОЕ/мл в растительном материале), чем праймеры Hartung *et al.* (1993).

Тем не менее, праймеры Хартунга не выявляют штамм А^w и все штаммы А* *X. citri* subsp. *Citri* или *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*. В ситуациях, когда подозревается наличие атипичных штаммов А* и А^w *X. citri* subsp. *citri* – например, когда симптомы рака цитрусовых наблюдаются на растениях-хозяевах *C. aurantiifolia* (мексиканский лайм) и *C. macrophylla* – следует использовать оба набора праймеров.

ПЦР протокол Hartung et al. (1993)

Праймеры:

2 (Обратный): 5'-CAC GGG TGC AAA AAA TCT-3'

3 (Прямой): 5'-TGG TGT CGT CGC TTG TAT-3'.

Смесь ПЦР подготавливают в стерильной пробирке, она состоит из буферного раствора для ПЦР (50 мМ Трис-НСl, рН 9; 20 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% желатина; 3 мМ MgCl₂), 1 мкМ каждого праймера 2 и 3, 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата (дНТФ) и 1,25 единиц Taq-полимеразы ДНК. Извлеченный ДНК-образец объемом 5 мкл добавляют в 45 мкл смеси ПЦР, чтобы получить в общей сложности 50 мкл на реакцию. Реакционные условия: начальная стадия денатурации при 95 °С в течение 2 мин с последующими 35 циклами при 95 °С в течение 60 с, при 58 °С в течение 70 секунд и при 72 °С в течение 75 с, конечная стадия элонгации при 72 °С в течение 10 мин. Размер ампликона составляет 222 п.о.

ПЦР протокол Cubero and Graham (2002)

Праймеры:

J-pth1 (Прямой): 5'-CTT CAA CTC AAA CGCC GGA C-3'

J-pth2 (Обратный): 5'-CAT CGC GCT GTT CGG GAG-3'.

Смесь ПЦР подготавливают в стерильной пробирке, она состоит из 1 × Taq-буферного раствора, 3 мМ MgCl₂, 1 мкМ каждого праймера *J-pth1* и *J-pth2*, 0,2 мМ каждого дНТФ и 1 единицы Taq-полимеразы ДНК. Извлеченный ДНК-образец объемом 2,5 мкл добавляют в 22,5 мкл смеси ПЦР, чтобы получить в общей сложности 25 мкл на реакцию. Реакционные условия: начальная стадия денатурации при 94 °С в течение 5 мин с последующими 40 циклами при 93 °С в течение 30 с, при 58 °С в течение 30 с и при 72 °С в течение 45 с, конечная стадия элонгации при 72 °С в течение 10 мин. Размер ампликона 198 п.о.

Также была разработана "вложенная" ПЦР, захват антигена или антитела и колориметрическое выявление вложенных продуктов ПЦР для непосредственного и чувствительного выявления *X. citri* subsp. *citri* на растениях (Hartung et al., 1993). Был проведен обзор сравнительной чувствительности различных протоколов и праймеров на чистой культуре и экстрактах плодов (Golmohammadi et al., 2007).

3.1.4.4 ПЦР в реальном времени

После получения ДНК из растительного материала с использованием протокола, описанного ранее Llor et al. (1999), осадок ресуспендируют в 100 мкл стерильной сверхчистой водой и хранят при температуре –20 °С до использования.

Набор праймеров, *J-pth3* (5'-ACC GTC CCC TAC TTC AAC TCA A-3') и *J-pth4* (5'-CGC ACC TCG AAC GAT TGC-3'), и соответствующий зонд TaqMan (*J-Taqpht2*) (5'-ATG CGC CCA GCC CAA CGC-3'), помеченные на 5'-конце 6-карбоксифлуоресцеином (FAM) и на 3'-конце тетраметилпроламином, были разработаны на основе последовательности гена *pth*, главного вирулентного гена, используемого в других исследованиях специально для выявления штаммов *X. citri* subsp. *citri* (Cubero and Graham, 2005). Эти штаммы включают *X. citri* subsp. *citri*, *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* и атипичные штаммы А* и А^w *X. citri* subsp. *citri*, выявленные во Флориде.

ПЦР в реальном времени осуществляется путем добавления 2 мкл матричной ДНК в реакционную смесь, содержащую 12,5 мкл QuantiMix Easy Kit, который включает QuantiMix

Easy Master Mix и MgCl₂ (50 мМ), 1 мкл 10 мкМ праймера (*J-RTpth3*), 1 мкл 10 мкМ обратного праймера (*J-RTpth4*) и 0,5 мкл 10 мкМ зонда TaqMan (*J-Taqpth2*), для получения итогового объема реакционной смеси 25 мкл добавляют стерильную дистиллированную воду. Протокол ПЦР в реальном времени была разработан с использованием системы выявления ABI PRISM 7000 Sequence. Другое оборудование обеспечило аналогичные результаты (María Lopez, pers. comm., 2013). Условия амплификации праймеров и зондов: первоначальный этап активации 15 мин при 95 °С с последующими 40 циклами по 15 с при 95 °С и 1 мин при 60 °С. Полный набор для ПЦР в реальном времени на основе этого протокола включает мастер-микс и фермент, доступный у Plant Print Diagnostics (<http://www.plantprint.net>).

ПЦР в реальном времени предоставляет специфичность праймеров гена *pth*, аналогичную используемым в обычном методе ПЦР (Cubero and Graham, 2002, 2005) и обеспечивает надежное выявление примерно 10 КОЕ *X. citri* subsp. *citri* на пораженных участках с больных листьев и при разведении культивируемых клеток (Mavrodieva *et al.*, 2004). Этот метод был недавно сравнен со стандартной и "вложенной" ПЦР (Golmohammadi *et al.*, 2007) и чувствительность выявления *X. citri* subsp. *citri* в пораженных участках на плодах была зарегистрирована на уровне 10 КОЕ/мл.

3.1.5 Интерпретация результатов обычного ПЦР и ПЦР в реальном времени

Обычный ПЦР

Специфичная по патогенам ПЦР будет считаться действительной только тогда, когда выполнены приведенные ниже критерии:

- положительный контроль производит правильный размер ампликона для бактерии;
- ампликоны нужного размера для бактерии не производятся в отрицательном контроле выделения и отрицательном контроле амплификации.

Если также используются 16S праймеры внутреннего контроля рДНК, то отрицательный (здоровая растительная ткань) контроль (если используется), положительный контроль и каждый из тестируемых образцов будет производить группу около 1,6 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) (размер ампликона будет зависеть от того, какие 16S праймеры рДНК были использованы (Weisberg *et al.*, 1991)). Обратите внимание, что синтетические положительные контроли и положительные контроли плазмиды не будут производить группу 1,6 т.п.н. Неудача образцов при амплификации с праймерами внутреннего контроля предполагает, что, например, экстракция ДНК не удалась, нуклеиновая кислота не была включена в реакционную смесь, соединения, замедляющие ПЦР, присутствуют в экстракте ДНК или ДНК деградировала.

Образец будет считаться положительным, если он производит ампликон нужного размера.

ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени будет считаться действительной только тогда, когда выполнены приведенные ниже критерии:

- положительный контроль производит кривую амплификации со специфичными для патогенов праймерами;
- кривая амплификации не видна (т.е. значение порогового цикла (Ct) – 40) с отрицательным контролем экстракции и отрицательным контролем амплификации.

Если также используются ГФЗ праймеры внутреннего контроля, то отрицательный контроль (если используется), положительный контроль и каждый из тестируемых образцов должны производить кривую амплификации. Неудача образцов произвести кривую амплификации с праймерами внутреннего контроля предполагает, что, например, экстракция ДНК не удалась, ДНК не была включена в реакционную смесь, соединения, замедляющие ПЦР, присутствуют в экстракте ДНК или ДНК деградировала.

Образец будет считаться положительным, если он производит типичную кривую амплификации. Количество циклов следует проверить в каждой лаборатории при проведении теста в первый раз.

3.1.6 Выявление в ходе биопроб

3.1.6.1 Анализ путем заражения листовых дисков

В этом анализе листовую ткань цитрусовых, восприимчивую к *X. citri* subsp. *citri*, инокулируют экстрактом больных образцов и инкубируют при соответствующих условиях для размножения бактерий и развития появляющихся пустул болезни.

Процедура для этой биопробы начинается со стерилизации планшетов ИФА в течение 15 мин в микроволновой печи и добавление в их лунки 200 мкл 1,5% агара в стерильной воде в камере с ламинарным потоком при комнатной температуре. Поверхность молодых листьев цитрусовых *Citrus paradisi* var. *Duncan* (грейпфрут) или других восприимчивых растений-хозяев, например, *Citrus aurantifolia* (мексиканский лайм) или *Poncirus trifoliata* (понцирус трёхлисточковый), дезинфицируют в течение 1 мин 1%-м NaClO. Листья должны быть полностью раскрывшимися, но не перезревшими и не твердыми. Листья трижды промывают стерильной дистиллированной водой, а затем высушивают поверхность в камере с ламинарным потоком при комнатной температуре. Листовые диски, полученные при пробивании отверстий, (дезинфицированные 95%-м этанолом), помещают верхней поверхностью вниз на водный агар в каждую лунку. Добавляют пятьдесят микролитров измельченных пораженных раком цитрусовых участков (четыре повторные лунки для образца каждого растения).

Суспензия *X. citri* subsp. *citri* 10^5 КОЕ/мл используется в качестве положительного контроля и стерильный физиологический раствор – в качестве отрицательного контроля (четыре репликата каждого). Планшеты герметизируют (например, парафильмом), чтобы относительная влажность достигала почти 100%, и инкубируют при температуре 28°C в течение 12 дней при постоянном свете, регулярно проверяя прогресс. Формирование зарождающихся белесых пустул в каждом из листовых дисков оценивается, начиная с третьего дня, используя стереоскопические микроскопы и методы выделения для *X. citri* subsp. *citri*, как описано в разделе 3.1.2. Бессимптомные диски могут быть дополнительно проанализированы на наличие живых бактерий методом выделения на полуселективной среде (Verdier *et al.*, 2008). Через 12 дней, если *X. citri* subsp. *citri* присутствует, бактериальные клетки размножаются на растительной ткани и могут быть выделены на среде в более высоких количествах. Эта биопроба является очень специфичным и чувствительным (10^2 КОЕ/мл) методом диагностики (Verdier *et al.*, 2008).

3.1.6.2 Обогащение отдельного листа

Раненые листья *C. paradisi* var. *Duncan* (грейпфрут) или других очень восприимчивых растений-хозяев, например, *C. aurantifolia* (мексиканский лайм) или *P. trifoliata* (понцирус трёхлисточковый) также могут быть выборочно обогащены *X. citri* subsp. *citri*. Молодые верхушечные листья растений, выращенных в тепличных условиях, промывают в течение 10 мин проточной водопроводной водой, поверхностно дезинфицируют 1%-м NaClO в течение 1 мин, и в стерильных условиях тщательно промывают стерильной дистиллированной водой. На нижнюю поверхность каждого листа в стерильных условиях наносится рана путем прокалывания иглой или путем небольших порезов скальпелем, и весь лист помещают на 1%-й агар в стерильную воду в лунках планшетов ИФА, нижней поверхностью вверх. В рану добавляют капли 10-20 мкл измельченных пораженных раком цитрусовых участков. Используют такие же положительные и отрицательные контроли, как для листовых дисков при биопробе. После 4-12 дней при температуре 25°C в освещенном инкубаторе, развитие пустулы оценивается и *X. citri* subsp. *citri* можно выделить либо из пустул, либо из бессимптомной поврежденной ткани листьев, как описано выше (ЕОКЗР, 1998).

3.2 Выявление на бессимптомных растениях

Можно выявить *X. citri* subsp. *citri* на бессимптомных растениях при помощи выделения и обогащения на полуселективных средах (см ниже), серологических методов (ИФ (раздел 3.1.3)) и молекулярного тестирования (раздел 3.1.4).

Выделение *X. citri* subsp. *citri* из бессимптомных растений на полуселективных средах может быть достигнуто путем промывания образцов листьев или плодов в пептонном буфере, концентрирования надосадочной жидкости, а затем размещения на среде (Verdier *et al.*, 2008). Десять листьев или один плод составляют образец.

Образцы перемешивают в течение 20 мин при комнатной температуре в 50 мл пептонного буфера (NaCl, 8,5 г, пептон, 1 г; Tween 20, 250 мкл; дистиллированная вода, 1 л, pH 7,2). Для насыпных образцов можно использовать 100 листьев в 200 мл пептонного буфера. Отдельные плоды встряхивают в течение 20 мин при комнатной температуре в стерильных мешках, содержащих 50 мл пептонного буфера.

Затем суспензию центрифугируют при 6 000 Гс в течение 20 мин. Осадочную жидкость декантируют, а осадок ресуспендируют в 10 мл 0,85%-го физиологического раствора. Аликвоты (100 мкл) каждой суспензии, разведенные 1:100 и 1:1000, наносят штрихами на XOS полуселективную среду (сахароза, 20 г; пептон, 2 г; глутамат натрия, 5 г; Ca(NO₃)₂, 0,3 г; K₂HPO₄, 2 г; ЭДТА-Fe, 1 мг; циклогексимид, 100 мг; цефалексин, 20 мг; касугамицин, 20 мг; метил-фиолет 2В, 0,3 мг; Бакто-агар, 17 г; дистиллированная вода, 1 л, pH 7,0) (Monier, 1992). После инкубации при температуре 28°C в течение 5-6 дней оценивают рост, а также тип колоний и морфологию (раздел 3.1.2).

4. Идентификация

Идентификация предполагаемой колонии *X. citri* subsp. *citri* должна быть проверена несколькими методами, поскольку другие виды *Xanthomonas*, такие как *X. fuscans* subsp. *aurantifolia* и *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, могут быть выделены из цитрусовых. Методы в дополнение к наблюдению морфологических характеристик на питательных средах, включают серологические тесты, молекулярное тестирование, биопробы листовых дисков или отдельных листьев, а также тестирование патогенности.

Минимальные требования для идентификации чистой культуры включают положительный результат при каждом из следующих трех методов: (1) ПЦР с использованием двух наборов праймеров (раздел 4.1); (2) серологический метод (ИФ, ИФА метод двойных антител (DAS-ELISA) или непрямой ИФА – разделы 4.2 и 4.2.1 и 4.2.2), использующие специфические моноклональные антитела; и (3) тестирование патогенности путем заражения цитрусовых растений-хозяев для выполнения требований постулатов Коха (разделы 4.3 и 3.1.6). Дополнительные тесты (разделы 4.4 и 4.5) могут быть проведены для дополнительной характеристики присутствующего штамма. Во всех тестах должны использоваться положительные и отрицательные контроли. Рекомендуемые методы описаны в следующих разделах.

Следующие коллекции, среди прочих, могут предоставить справочные штаммы *X. citri* subsp. *citri* (предоставляются изоляты *X. citri* subsp. *citri*, рекомендуемые для использования в качестве положительных контролей):

- NCPPB 3234 из Национальной коллекции патогенных бактерий растений, Центральная научная лаборатория, Йорк, Великобритания
- CFPB 2911 из Французской коллекции фитопатогенных бактерий, INRA Station Phytobactériologie, Angers, France (это штамм А* *X. citri* subsp. *citri*)
- ICMP 24 из Международной коллекции микроорганизмов растений, Landcare Research (Manaaki Whenua) New Zealand Ltd, Окленд, Новая Зеландия
- ATTC 49118 из Американской коллекции типовых культур, Манассас, Вирджиния, США

- IBSBF 1594 из Коллекции культур фитопатогенных бактерий Биологического института, Centro Experimental Central do Instituto Biológico - Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Campinas, Brazil.

Подлинность штаммов может быть гарантирована, только если они получены непосредственно из коллекций культур.

4.1 Методы ПЦР

Рекомендуется, чтобы в дополнение к протоколу ПЦР, описанному в разделе 3.1.4.3, была подтверждена идентификация чистых культур подозреваемых штаммов с помощью двух различных наборов праймеров. Один набор должен состоять из праймеров *J-ptb1/J-ptb2* или *J-Rxg/J-Rxc2* (Cubero and Graham, 2002), а другой набор из праймеров Xac01/Xac02 (Coletto-Filho *et al.*, 2005) или XACF/XACR (Park *et al.*, 2006) (таблица 1). Это связано с обнаружением, что большей части опубликованных пар праймеров не хватает специфичности (Delcourt *et al.*, 2013). Идентификация может быть дополнительно подтверждена путем секвенирования полученных при ПЦР ампликонов и сравнения их последовательности с ампликонами штаммов *X. citri* subsp. *citri*, хранящихся в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI).

В ПЦР протоколе Cubero и Graham (2002) разработаны праймеры ПЦР для районов внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) ядерной рибосомальной (р)ДНК 16S и 23S, специфичных для *X. citri* subsp. *citri*. Изменение в ITS последовательностях позволили создать специфичные праймеры для *X. citri* subsp. *citri*, и эти праймеры выявляют атипичные штаммы A* и A^w (Cubero and Graham, 2002). Праймеры:

J-Rxg: 5'-GCGTTGAGGCTGAGACATG-3'

J-RXc2: 5'-CAAGTTCCTCGGAGCTATC-3'.

ПЦР проводят в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1× Taq буфер, 1,5 mM MgCl₂, 0,04 мкМ праймера *J-RXg*, 0,04 мкМ праймера *J-RXc2*, 0,2 mM каждого дНТФ и 1 единицу Taq DNA полимеразы. Условия ПЦР-амплификации сходны с условиями при использовании праймеров *pthA*, описанными в разделе 3.1.4.3.

В ПЦР протоколе Coletta-Fiho *et al.* (2006) разработаны праймеры на основе кластера генов *rpf*. Праймеры:

Xac01: 5'-CGCCATCCCCACCACCACGAC-3'

Xac02: 5'-AACCGCTCAATGCCATCCACTTCA-3'.

ПЦР проводят в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1 × Taq буфер, 2,0 mM MgCl₂, 0,36 мкМ каждого праймера, 0,25 mM каждого дНТФ и 1 ед Taq DNA полимеразы. Условия ПЦР-амплификации: начальная стадия денатурации при температуре 94°C в течение 3 мин с последующими 36 циклами при температуре 94°C в течение 45 с, 60°C в течение 45 секунд и 72°C в течение 45 с, а также конечная стадия элонгации при температуре 72°C в течение 5 мин. Размер ампликона 582 п.о.

В ПЦР протоколе Park *et al.* (2006) разработаны праймеры на основе последовательностей генов *hrpW*. Праймеры:

XACF: 5'- CGTCGCAATACGATTGGAAC-3'

XACR: 5'- CGGAGGCATTGTCTGAAGGAA-3'.

ПЦР проводят в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1×Taq буфер, 1,5 mM MgCl₂, 0,10 мкМ каждого праймера, 0,25 mM каждого дНТФ, 0,01% желатина и 2 ед Taq ДНК полимеразы. Условия ПЦР-амплификации: начальная стадия денатурации при температуре 94°C в течение 5 мин, затем 30 циклов при температуре 94°C в течение 15 с, 60°C в течение

30 с и 72°C в течение 30 с, а также конечная стадия элонгации при температуре 72°C в течение 7 мин. Размер ампликона 561 п.о.

Таблица 1. Краткое резюме методов ПЦР, описанных в данном диагностическом протоколе.

Данные по специфичности взяты из работы Delcourt *et al.* (2013). *Неспецифичное выявление относится к проценту патогенных ксантомонад и сапрофитов, которые дали положительный результат. **Не дали положительный результат с сапрофитными штаммами.

Пара праймеров	Ссылка	Размер ампликона (п.о.)	Выявление штамма <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	Неспецифичное выявление (%)*	Пределы выявления в растительном материале
2/3	Hartung <i>et al.</i> (1993)	224	Не выявлены штаммы A ^v и все штаммы A *	17	10 ² КОЕ / мл
<i>J-pth1/J-pth2</i>	Cubero and Graham (2002)	198	Все штаммы	51	10 ⁴ КОЕ / мл
<i>J-Rxg/J-Rxc2</i>	Cubero and Graham (2002)	179	Все штаммы	30	10 ⁴ КОЕ / мл
<i>Xac01/Xac02</i>	Coletto-Filho <i>et al.</i> (2005)	582	Все штаммы	16	10 ⁴ КОЕ / мл
<i>XACF/XACR</i>	Park <i>et al.</i> (2006)	561	Все штаммы	6**	Не сообщалось

4.2 Серологическое выявление

Рекомендуется, чтобы в дополнение к протоколу ИФ, описанному в разделе 3.1.3, использовались различные антитела для идентификации чистых культур. В качестве альтернативных серологических тестов для идентификации чистых культур также могут быть использованы метод двойных антител ИФА или непрямой ИФА.

4.2.1 ИФА метод двойных антител

Для ИФА метода двойных антител (DAS-ELISA), планшеты для микротитрования покрываются карбонатным буфером для сенсibilизации поверхностей из расчета 100 мкл на лунку (Na₂CO₃, 1,59 г; NaHCO₃, 2,93 г; NaN₃, 0,2 г; дистиллированная вода, 1 л, pH 9,6), содержащим соответствующим образом разведенные иммуноглобулины анти-*X. citri* subsp. *citri*, затем планшеты инкубируют в течение ночи при температуре 4°C. После трехкратного промывания планшетов с помощью PBS-Tween (NaCl 8 г; KН₂PO₄, 0,2 г; Na₂HPO₄·12H₂O, 2,9 г, KCl, 0,2 г; NaN₃, 0,2 г; Tween 20, 0,25 мл; дистиллированная вода, 1 л; pH 7,4) добавляют анализируемый образец, отрицательный контроль (здоровый растительный материал) или положительный контроль (справочный штамм *X. citri* subsp. *citri*) (200 мкл на лунку). Планшеты инкубируют в течение 2 ч при температуре 37°C. После промывания добавляют иммуноглобулины анти-*X. citri* subsp. *citri*, конъюгированные с щелочной фосфатазой в соответствующем разведении в PBS-Tween, (200 мкл на лунку), затем планшеты инкубируют в течение 2 ч при температуре 37°C. После промывания добавляют п-нитрофенил-фосфатный субстратный буфер (1 мг/мл) (200 мкл на лунку), затем планшеты инкубируют в течение 30-60 мин при комнатной температуре. Поглощение измеряется с помощью спектрофотометра, оснащенного фильтром 405 нм. Критерием для определения образца как положительного является значение оптической плотности (ОП) в два раза выше значения контроля здорового растительного материала. Предел обнаружения DAS-ELISA – 10⁴-10⁵ КОЕ/мл (Civerolo and Fan, 1982). Этот метод не рекомендуется для непосредственного выявления в тканях растений.

Для ИФА доступны моноклональные антитела, но рекомендуется их использовать только для идентификации чистых культур ввиду их низкой чувствительности при выявлении в тканях

растений. Доступны коммерческие наборы для выявления *X. citri* subsp. *citri* посредством ИФА (например, Agdia, Inc). Для уточнения данных по специфичности смотрите техническую информацию, предоставляемую производителем. Сообщалось, что некоторые моноклональные антитела перекрестно реагируют с *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. campestris* pv. *zinnea*, *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* и *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*; однако эти патовары вряд ли присутствуют на цитрусовых.

4.2.2 Непрямой ИФА

Непрямой ИФА с использованием моноклональных антител, описанный Alvarez *et al.* (1991), может быть использован для идентификации культуры. Доступны коммерческие наборы ИФА, содержащие все необходимые компоненты для идентификации *X. citri* subsp. *citri* (например, Agdia, Inc). В теории, все штаммы *X. citri* subsp. *citri* могут быть идентифицированы, но сообщалось, что некоторые штаммы, отличающиеся по фенотипам, выделенные в Юго-Западной Азии, не реагируют с доступными моноклональными антителами (Vernière др., 1998).

Суспензии чистой культуры центрифугируют при приблизительно 10 000 Гс в течение 2 мин, надосадочную жидкость отбрасывают. Добавляют один мл 1×ФСБР, затем клетки ресуспендируют встряхиванием. Операция повторяется еще два раза. После третьего промывания клетки ресуспендируют в покрывающем буфере. Концентрация бактерий регулируется спектрофотометрически до ОП₆₀₀ 0,01 (приблизительно $2,5 \times 10^7$ КОЕ/мл). Аликвоты образцов загружаются на планшеты для микротитрования (две лунки на образец, 100 мкл на лунку). Должны быть включены положительный контроль (справочная культура или образец, предоставляемый производителем) и отрицательный буферный контроль с другой бактерией. Планшеты инкубируют в течение ночи при температуре 37°C, пока они не высохнут. Добавляют блокирующий раствор (порошок 5%-го обезжиренного сухого молока в ФСБР) (200 мкл на лунку). Планшеты инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем дважды промывают 1×PBS-Tween. Добавляют первичное антитело в соответствующем разведении 2,5%-го сухого обезжиренного молока в PBS-Tween (100 мкл на лунку). Планшеты инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре и затем промывают пять раз в 1×PBS-Tween. Добавляют ферментный конъюгат в соответствующем разведении 2,5%-го сухого обезжиренного молока в PBS-Tween (100 мкл на лунку). Планшеты инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре и затем промывают пять раз в 1×PBS-Tween. Добавляют свежеприготовленный раствор субстрата, содержащий 1 мг/мл р-нитрофенил фосфата в буфере диэтаноламина (рН 9,8) (100 мкл на лунку). Планшеты инкубируют в течение 30-60 минут при комнатной температуре. ОП измеряют с помощью спектрофотометра с фильтром 405 нм. Положительные образцы определяются таким же образом, как и при использовании метода ИФА двойного антитела.

4.3 Анализ на патогенность

X. citri subsp. *citri* следует выявлять по патогенности на панели индикаторов растений-хозяев, таких как *C. paradisi* var. *Duncan* (грейпфрут), *Citrus sinensis* (сладкие апельсины Валенсии) или *C. aurantiifolia* (мексиканский лайм) для подтверждения диагноза.

Анализы листьев путем инфильтрации с помощью шприца с иглой или без нее на восприимчивых сортах растений-хозяев цитрусовых позволяют продемонстрировать патогенность бактериальных колоний. Незрелые листья, которым осталось 50-70% до полного раскрытия, предпочтительны в связи с их более высоким уровнем чувствительности. Пораженные участки развиваются спустя 7-14 дней после прививания цельных листьев или отдельных листьев (Francis *et al.*, 2010; Koizumi, 1971), после инкубации при температуре 25°C в условиях повышенной влажности. В ходе этих анализов можно легко отличить проявляющуюся сыпь, каллусовидную реакцию *X. citri* subsp. *citri*. Бактерии, выращенные в жидкой среде, или колонии, только что нанесенные на чашку с агаром, ресуспендируют в стерильной дистиллированной воде, концентрацию доводят до 10^6 - 10^8 КОЕ/мл для инокуляции

в растения-хозяева. Всегда должны быть включены отрицательный и положительный контроли. Растения, привитые положительным контрольным штаммом, должны храниться отдельно от тестируемых растений.

4.4 Описание и биохимические характеристики

X. citri subsp. *citri* – грамотрицательная, прямая, палочковидная бактерия, размером 1,5-2,0 × 0,5-0,75 мкм. Она способна передвигаться посредством одного полярного жгутика. Она разделяет многие физиологические и биохимические свойства других членов рода *Xanthomonas*. Это хемоорганотрофная и обязательно аэробная бактерия с окислительным метаболизмом глюкозы. Желтый пигмент – ксантомматин. Некоторые из биохимических характеристик, которые определяют *X. citri* subsp. *citri*, приведены в таблице 2.

Таблица 2. Основные биохимические характеристики *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Тест	Результат
Каталаза	+
Оксидаза	– или слабый
Нитратная проба	–
Гидролиз:	
крахмала	+
казеина	+
Tween 80	+
эскулина	+
Разжижение желатина	+
Разжижение пектат геля	+
Использование аспарагина	–
Рост требует:	
метионина	+
цистеина	+
0,02% хлорида трифенил тетразолия (ХТТ) (вес / объем)	–

4.5 Молекулярная идентификация

Особенности атакующих цитрусовые ксантомонад, включая *X. citri* subsp. *citri* и род *Xanthomonas* в целом были охарактеризованы на молекулярном уровне для разработки быстрых и точных методов для реклассификации и идентификации. Процедуры включают гибридизацию ДНК-ДНК (Vauterin *et al.*, 1995), геномную дактилоскопию (Hartung *et al.*, 1987; Lazo *et al.*, 1987), анализ мультилокусного секвенирования (Young *et al.*, 2008) и REP-ПЦР (Cubero and Graham, 2002, 2004).

4.5.1 Анализ мультилокусного секвенирования

Анализ мультилокусного секвенирования (АМЛС) использовался для видовой идентификации *X. citri* subsp. *citri*. (Almeida *et al.*, 2010; Bui Thi Ngoc *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2008). Конститутивные гены амплифицируют, используя праймеры и условия ПЦР, описанные Almeida *et al.* (2010), Bui Thi Ngoc *et al.* (2010) and Young *et al.*, (2008). АМЛС состоит из секвенирования множественных локусов (обычно 4-7 конститутивных генов) и сравнения этих последовательностей со справочными последовательностями вида *Xanthomonas*, хранящимися в базе данных нуклеотидов; например, База данных связанных с растениями микробов (PAMDB) (<http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>) (Almeida *et al.*, 2010) и MLVAbank для генотипирования микробов (https://bioinfo-prod.mpl.ird.fr/MLVA_bank/Genotyping/).

4.5.2 Дактилоскопия гер-ПЦР

Дактилоскопия REP-ПЦР с использованием праймеров, созданных из повторяющихся экстрагенетических палиндромных (REP) элементов – последовательности энтеробактериального повторяющегося межгенного консенсуса (ERIC) и элемента BOX (Louws *et al.*, 1994) – может использоваться для идентификации и характеристики штаммов при конкретных условиях ПЦР (Cubero and Graham, 2002).

ДНК может быть извлечена из бактериальных суспензий (поглощение при 600 нм от 0,2 до 0,5) в одну стадию с фенол-хлороформ-изоамиловым спиртом, затем она осаждается в этаноле и ресуспендируется в сверхчистой воде. ДНК хранят при температуре –20°C до использования. Также можно использовать описанную в разделе 3.1.4.2 процедуру выделения ДНК.

BOX-ПЦР проводят в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1×Taq буфер, 6 mM MgCl₂, 2,4 мкМ праймера BOX1R (5'-CTACG-GCAAGGCGACGCTGCAG-3') (Louws *et al.*, 1994), 0,2 mM каждого дНТФ, 2 ед Taq ДНК-полимеразы и 5 мкл ДНК, выделенной из штаммов ксантомонад. Реакционные условия: первоначальный этап при температуре 94°C в течение 5 мин с последующими 40 циклами при температуре 94°C в течение 30 с, 48°C в течение 30 с и при 72°C в течение 1 мин, а также финальный этап при температуре 72°C в течение 10 мин. ПЦР-продукты анализируют в 3%-м агарозном геле в 1×Трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ) буфере (40 ммоль/л Трис-ацетата, 1 ммоль/л ЭДТА, pH 8,0) в течение 2 ч при 110 В и окрашивают этидий бромидом.

ERIC-ПЦР проводят в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1×Taq буфер, 3 mM MgCl₂, 1,2 мкМ праймера ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCT-GGGGATTCAC-3') и ERIC2 (5'-AAGTAAGTGA CT-GGGGTGAGCG-3') (Louws *et al.*, 1994), 0,2 mM каждого дНТФ, 2 ед Taq ДНК-полимеразы и 5 мкл ДНК, выделенной из штаммов ксантомонад. Реакционные условия такие же, как для BOX-ПЦР. Визуализация продуктов ПЦР такая же, как и для BOX-ПЦР.

Отпечатки (ленточные узоры) можно сравнивать и анализировать на схожесть на глаз, но узоры также могут быть преобразованы в пиковые узоры, а штаммы можно сравнивать, используя компьютерную программу, например BioNumerics (Applied Maths). Идентификация должна быть основана на схожести с узорами контрольных (справочных) штаммов (раздел 4).

Схемы для выявления и идентификации *Xanthomonas citri* subsp. *citri* на симптоматическом и бессимптомном растительном материале приведены на рисунках 5 и 6, соответственно.

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, рекомендуется хранить исходный образец (помеченные для отслеживания) культуры вредного организма, консервированные или закрепленные препараты или материалы анализа (например, фотографии гелей, распечатки результатов ИФА, ПЦР ампликоны), по крайней мере, в течение одного года, особенно в случаях несоответствия (МСФМ 13: 2001, *Руководство по нотификации о несоответствии и экстренном действии*), а также если вредные организмы впервые выявлены в стране или области.

6. Контактные адреса для дополнительной информации

General Direction of Agricultural Services, Biological Laboratories Department, Av. Millán 4703, CP 12900, Montevideo, Uruguay (Enrique F. Verdier; e-mail: emvermar@adinet.com.uy; tel.: +598 23043992).

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada (Valencia), Spain (María M. López; e-mail: mlopez@ivia.es; tel.: +34 963424000; fax: +34 963424001).

Instituto Nacional de Investigación Agraria y Tecnología Alimentaria, INIA, Ctra de La Coruña km 6, Madrid, Spain (Jaime Cubero; e-mail: cubero@inia.es; tel.: +34 913473900; fax: +34 913572293).

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 направит его в Техническую группу экспертов по диагностическим протоколам (ТГЭДП).

7. Выражение признательности

Первый проект настоящего протокола был написан г-ном Е.Ф. Вердые, Генеральным директором Сельскохозяйственной службы, Отдел биологических лабораторий, Уругвай (см подробную информацию в разделе 6), и пересмотрен г-жой Р. Ланфранчи, Лаборатория по вредным организмам и болезням растений, Национальная служба здоровья и качества сельхозпродукции, SENASA, адрес: Av. Ing. Huergo 1001 CP 1107, Buenos Aires, Argentina (Rita Lanfranchi; e-mail: ritalanfranchi@hotmail.com; tel.: +5411 43621177 int. 118); г-ном Эдом Сивероло, Департамент по сельскому хозяйству США (e-mail: emciv@comcast.net) и г-жой М.М. Лопез, IVIA, Испания (см. подробную информацию в разделе 6). Кроме того, г-н Куберо, INIA, Испания (см подробную информацию в разделе 6) принял активное участие в разработке данного протокола.

8. Справочные материалы

- 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.
- Álvarez, A.M., Benedict, A.A., Mizumoto, C.Y., Pollard, L.W. & Civerolo, E.L. 1991. Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X.c.* pv. *citrumelo* with monoclonal antibodies. *Phytopathology*, 81: 857–865.
- Bui Thi Ngoc, L., Vernière, C., Jouen, E., Ah-You, N., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Gagnevin, L. & Pruvost, O. 2010. Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(3): 515–525.
- Bull, C.T., De Boer, S.H., Denny, T.P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G.S., Scortichini, M., Stead, D.E. & Takikawa, Y. 2010. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980–2007. *Journal of Plant Pathology*, 92(3): 551–592.
- CABI. 2006. *Crop protection compendium*. Wallingford, UK, CABI.
- Civerolo, E.L. & Fan, F. 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease*, 66: 231–236.
- Coletta-Filho, H.D., Takita, M.A., Souza, A.A., Neto, J.R., Destefano, S.A.L., Hartung, J.S. & Machado, M.A. 2006. Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2): 279–285.
- Cubero, J. & Graham, J.H. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1257–1264.

- Cubero, J. & Graham, J.H.** 2004. The leucine-responsive regulatory protein (lrp) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 429–437.
- Cubero, J. & Graham, J.H.** 2005. Quantitative real time polymerase chain reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate *Xanthomonas* strains on citrus. *Phytopathology*, 95: 1333–1340.
- Cubero, J., Graham, J.H. & Gottwald, T.R.** 2001. Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2849–2852.
- Delcourt, S., Vernière, C., Boyer, C., Pruvost, O., Hostachy, B. & Robène-Soustrade, I.** 2013. Revisiting the specificity of PCR primers for diagnostics of *Xanthomonas citri* pv. *citri* by experimental and in silico analyses. *Plant Disease*, 97(3): 373–378.
- Dye, D.W.** 1978. Genus IX. *Xanthomonas* Dowson 1939. In: Young, J. M., Dye, D. W., Bradbury, J. F., Panagopoulos, C. G., & Robbs, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 21(1): 153–177.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 1979. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Data Sheets on Quarantine Pests. EPPO A1 list No. 1. Paris, EPPO.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 1998. *Phytosanitary procedure Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Inspection, test and survey methods*. EPPO Standard PM 3/27(1). Paris, EPPO.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2006. PQR database (version 4.5). Paris, EPPO.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2009. *Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria*. EPPO Standard PM 7/97(1). Paris, EPPO.
- Escalon, A., Javegny, S., Vernière, C., Noël, L.D., Vital, K., Poussier, S., Hajri, A., Boureau, T., Pruvost, O., Arlat, M. & Gagnevin, L.** 2013. Variations in type III effector repertoires, pathological phenotypes and host range of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. *Molecular Plant Pathology*, 14(5): 483–496.
- Francis, M.I., Pena, A. & Graham, J.H.** 2010. Detached leaf inoculation of germplasm for rapid screening of resistance to citrus canker and citrus bacterial spot. *European Journal of Plant Pathology*, 127(4): 571–578.
- Gabriel, D.W., Kingsley, M.T., Hunter, J.E. & Gottwald, T.** 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(1): 14–22.
- Golmohammadi, M., Cubero, J., Peñalver, J., Quesada, J.M., López, M.M. & Llop P.** 2007. Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker in commercial fruits by isolation and PCR based methods. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6): 2309–2315.
- Goto, M.** 1992. Citrus canker. In J. Kumer, H.S. Chaube, U.S. Singh and A.N. Mukhopadhyay, eds. *Plant diseases of international importance*, Vol. III, *Diseases of fruit crops*, pp. 170–208. Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall.
- Graham, J., Gottwald, T.R., Civerolo, E.L. & McGuire, R.G.** 1989. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. *Plant Disease*, 43(5): 423–427.
- Hall, D.G., Gottwald, T.R. & Bock, C.H.** 2010. Exacerbation of citrus canker by citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* in Florida. *Florida Entomologist*, 93(4): 558–566.
- Hartung, J.S. & Civerolo, E.L.** 1987. Genomic fingerprinting of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains from Asia, South America and Florida. *Phytopathology*, 77: 282–285.

- Hartung, J.S., Daniel, J.F., Pruvost, O.P. & Civerolo, E.L.** 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4): 1143–1148.
- Hasse, CH.** 1915. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. A preliminary report. *Journal of Agricultural Research* 4, 97-100.
- МСФМ 13.** 2001. *Руководство по нотификации о несоответствии и экстренном действии*. Рим, МККЗР, ФАО.
- МСФМ 27.** 2006. *Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов*. Рим, МККЗР, ФАО.
- Koizumi, M.** 1971. A quantitative determination method for *Xanthomonas citri* by inoculation into detached citrus leaves. *Bulletin of the Horticultural Research Station (Japan), Series B*, 11: 167–182.
- Lazo, G.R., Roffey, R. & Gabriel, D.W.** 1987. Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 214–221.
- Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C. & López, M.M.** 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiology Methods*, 37: 23–31.
- Louws, F.J., Fulbright, D.W., Taylor Stephens, C. & Bruijn, F.J.** 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2286–2295.
- 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.
- Mavrodieva, V., Levy, L. & Gabriel, D.W.** 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. *Phytopathology*, 94: 61–68.
- Monier, L.** 1992. *Contribution à la mise au point d'un milieu de culture semi-sélectif pour la détection de Xanthomonas campestris pv. citri, agent du chancre bactérien des agrumes*. Angers, France, École Nationale d'Ingénieurs des Travaux de l'Horticulture et du Paysage d'Angers, Institut de Recherches sur les Fruits et Agrumes (IRFA). 62 pp [in French].
- Namekata, T. de Oliveira, AR.** Comparative serological studies between *Xanthomonas citri* and a bacterium causing canker on Mexican lime. In *Proceedings of International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Wageningen, The Netherlands, 1972, pp.151-152
- Park, D., Hyun, J., Park, Y., Kim, J., Kang, H., Hahn, J. & Go, S.** 2006. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpW* gene sequences. *Microbiological Research*, 161(2): 145–149.
- Pruvost, O., Roumagnac, P., Gaube, C., Chiroleu, F. & Gagnevin, L.** 2005. New media for the semiselective isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, the causal agent of mango bacterial black spot. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4): 803–815.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K. & Vidaver, A.K.** 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel et al., 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. rev.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var.

- fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 494–518.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K. & Vidaver, A.K.** 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 690–695.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K. & Vidaver, A. K.** (2007). *Xanthomonas alfalfae* sp. nov., *Xanthomonas citri* sp. nov. and *Xanthomonas fuscans* sp. nov. In List of New Names and New Combinations Previously Effectively, but not Validly, Published, Validation List no. 115. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 893–897.
- Sun, X., Stall, R.E., Jones, J.B., Cubero, J., Gottwald, T.R., Graham, J.H., Dixon, W.D., Schubert, T.S., Chaloux, P.H., Stromberg, V.K., Lacy, G.H. & Sutton, B.D.** 2004. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. *Plant Disease*, 88(11): 1179–1188.
- Taylor, R.K., Tyson, J.L., Fullerton, R.A. & Hale, C.N.** 2002. Molecular detection of exotic phytopathogenic bacteria: A case study involving canker-like symptoms on citrus. *New Zealand Plant Protection*, 55: 53–57.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. & Swings, J.** 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 472–489.
- Verdier, E., Zefferino, E. & Méndez, S.** 2008. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* on the surface of citrus fruit after postharvest treatment *Fitopatologia*, 43: 24–31.
- Vernière, C., Hartung, J.S., Pruvost, O.P., Civerolo, E.L., Álvarez, A.M., Maestri, P. & Luisetti, J.** 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 477–487.
- 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., 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.
- Young, J.M., Park, D.C., Shearman, H.M. & Fargier, E.** 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(5): 366–377.

9. Рисунки



Рисунок 1: Типичные симптомы рака цитрусовых на листьях, стеблях и плоде грейпфрута (*Citrus Paradisi*).



Рисунок 2: Симптомы рака цитрусовых на ветвях: ранние повреждения на грейпфруте (*Citrus Paradisi*).



Рисунок 3: Симптомы рака цитрусовых на плодах сладкого апельсина (*Citrus sinensis*) (слева) и грейпфрута (*Citrus Paradisi*) (в центре и справа).



Рисунок 4: Симптомы рака цитрусовых на листьях лимона (*Citrus Limon*), усугубленные ранами минера цитрусовых.

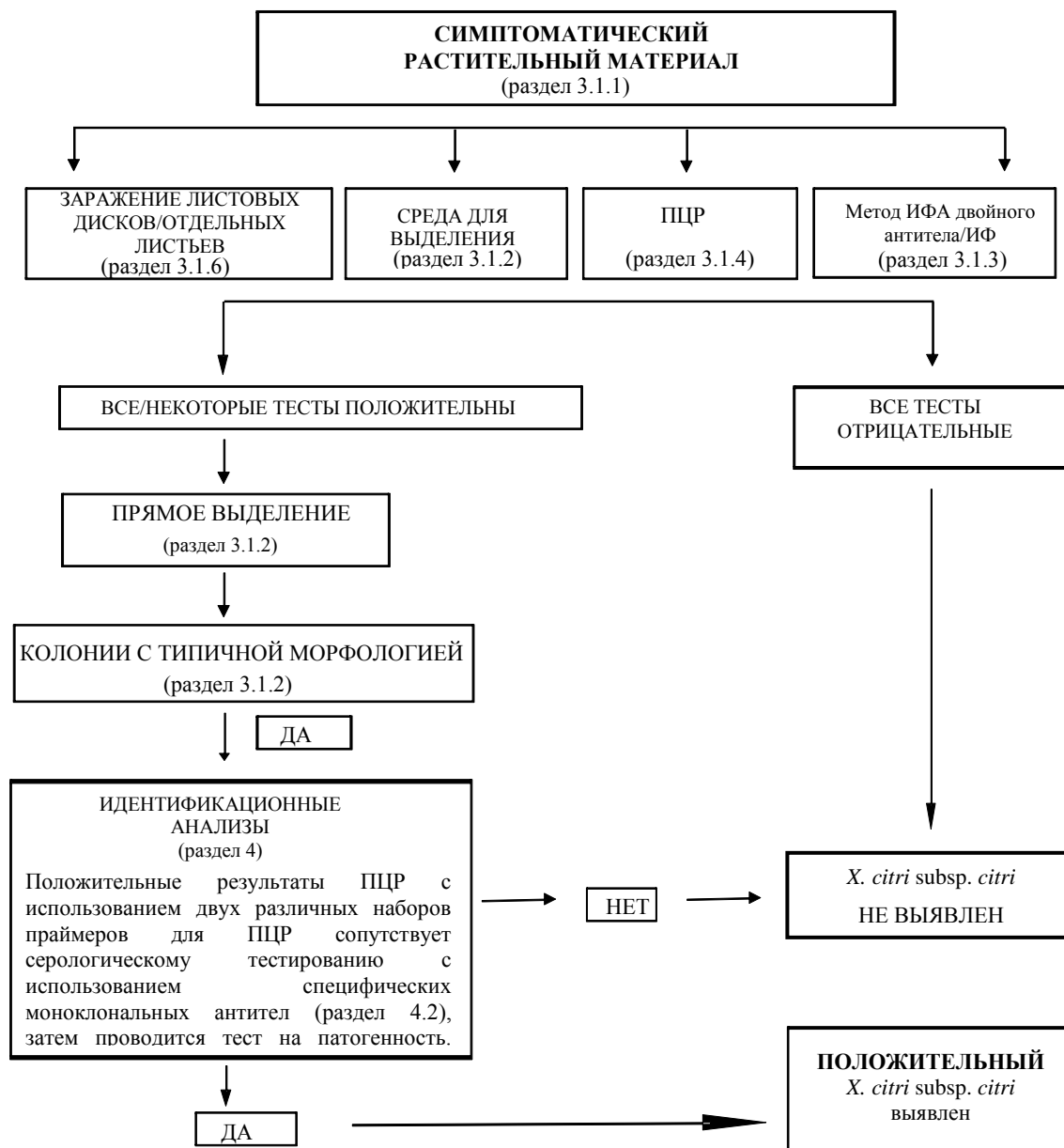


Рисунок 5: Схема для выявления и идентификации *Xanthomonas citri* subsp. *citri* на симптоматическом растительном материале.

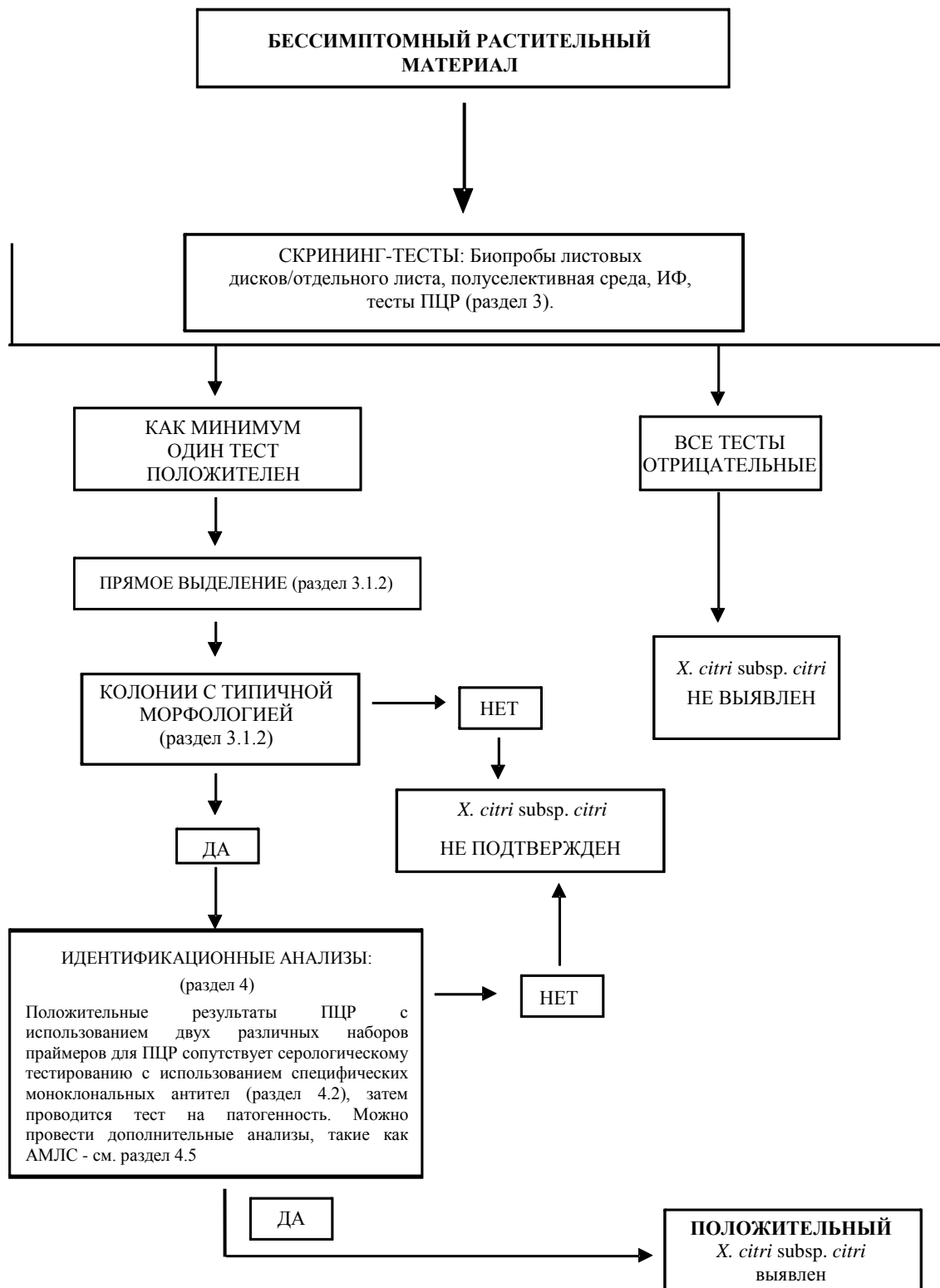


Рисунок 6: Схема для выявления и идентификации *Xanthomonas citri* subsp. *citri* на бессимптомном растительном материале.

История публикации

2004-11 КС добавил тему *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (2004-011) в рабочую программу.

КФМ-1 (2006 год) добавила тему *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (2004-011) в раздел: Bacteria (2006-005).

2012-11 ТГЭДП пересмотрела текст протокола.

2013-04 КС утвердил проект для консультации членов посредством электронного принятия решений (2013_eSC_May_12).

2013-07 консультация членов.

2014-02 ТГЭДП пересмотрела и направила ДП в КС для утверждения на принятие (2014_eTPDP_Feb_02).

2014-04 Направлен в КС для утверждения к принятию посредством электронного принятия решений.

2014-06 КС утвердил проект для 45-дневного периода направления нотификаций посредством электронного принятия решений (2014_eSC_Nov_03).

2014-07 КС утвердил ДП от лица КФМ.

2014-11 Секретариат внес незначительные редакторские поправки.

МСФМ 27. 2006. Приложение 6 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (2014 год). Рим, МККЗР, ФАО.

История публикации последний раз обновлена: 11.11.2014.