本诊断规程由标准委员会代表植物检疫措施委员会于 2014 年 8 月通过。
本附件是 ISPM 27：2006 标准规定的一部分。

ISPM 27
附件 6

# 国际植物检疫措施标准

# 第 27 号标准：诊断规程

# DP 6：
# 柑橘溃疡病菌（*Xanthomonas citri* subsp. *citri*）

# （2014 年）

目录

1. 有害生物信息 ..... 2
2. 分类信息 ..... 2
3. 检测 ..... 3
3.1 有症状植株的检测 ..... 3
3.1.1 症状 ..... 3
3.1.2 分离 ..... 4
3.1.3 血清学检测：间接免疫荧光法 ..... 4
3.1.4 分子检测 ..... 5
3.1.4.1 分子检测的对照 ..... 5
3.1.4.2 从受侵染的柑橘组织中提取 DNA ..... 6
3.1.4.3 常规 PCR ..... 6
3.1.4.4 实时 PCR ..... 7
3.1.5 常规与实时 PCR 结果的解读 ..... 8
3.1.6 通过生测进行检测 ..... 9
3.1.6.1 叶牒接种检测 ..... 9
3.1.6.2 离体叶片富集 ..... 9
3.2 无症状植物的检测 ..... 9
4. 鉴定 ..... 10
4.1 PCR 法 ..... 10
4.2 血清学检测 ..... 12
4.2.1 双抗体夹心法 ELISA ..... 12

4.2.2 间接 ELISA ..... 13
4.3 致病性检测 ..... 13
4.4 描述与生化特征 ..... 13
4.5 分子鉴定 ..... 14
4.5.1 多位点序列分析 ..... 14
4.5.2 Rep-PCR 指纹分析 ..... 14
5. 记录 ..... 15
6. 获取进一步信息的联系点 ..... 15
7. 致谢 ..... 16
8. 参考文献 ..... 16
9. 图 ..... 20

## 1. 有害生物信息

柑橘溃疡病菌（*Xanthomonas citri* subsp. *Citri*）是柑橘细菌性溃疡病的主要致病因子。它对在亚洲、南美洲、大洋洲和非洲很多国家，以及美国佛罗里达州广泛存在的热带和亚热带条件下种植的（CABI，2006：EPPO，2006），以柑橘属（*Citrus* spp.）、金橘属（*Fortunella* spp.）和枳属（*Poncirus* spp.）为主的很多芸香科（Rutaceae）栽培种造成危害（EPPO，1979）。一些寄主范围有限的非典型柑橘溃疡病菌菌株已被鉴定并命名为菌株 A*和 $A^w$（Sun 等，2004；Vernière 等，1998）。菌株 A*自然条件下在亚洲危害墨西哥莱檬（*Citrus aurantiifolia*）。菌株 $A^w$ 自然条件下在美国佛罗里达引起墨西哥莱檬和大叶莱檬（*Citrus macrophylla*）溃疡（Cubero 和 Graham，2002，2004）。均有报道称这两个菌株在实验条件下会在其他柑橘种类上引起非典型病变（Escalon 等，2013）。

在多数柑橘种植区，柑橘细菌性溃疡病一般发生在感病寄主的苗木、幼树和成年树上，这些寄主从夏末到秋天都有大量旺盛生长的嫩枝和叶片。感病寄主的叶片、嫩梢、细枝和果实上形成溃疡病斑。风、刺、昆虫，以及物理或机械伤害造成的伤口会加重成熟组织的侵染。柑橘潜叶蛾（*Phyllocnistis citrella*）的为害会提高叶片对柑橘溃疡病的感病性（Hall 等，2010）。

柑橘溃疡病菌可以作为寄主或非寄主植物的表生菌在病变组织中存活，也可以作为腐生菌在稻草覆盖物或土壤中生存。然而，越冬病斑，尤其是在嫩梢上形成的病斑是下一季最重要的侵染源。近距离扩散的主要机制是风雨和植株内、植株间的飞溅的水花：细菌随流经病斑表面的雨水传播，并飞溅到健康枝梢上（CABI，2006）。染病植物材料，包括接穗、砧木苗和带梢植株的运输与远距离扩散密切相关。没有证据显示该病菌能种传（CABI，2006）。

## 2. 分类信息

**学名：** *Xanthomonas citri* subsp. *citri* （Gabriel 等，1989） Schaad 等，2007

**异名：** *Xanthomonas smithii* subsp. *citri* Gabriel 等，1989，Schaad 等， 2007

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

Xanthomonas citri （ex Hasse， 1915) Gabriel 等，1989

*Xanthomonas campestris* pv. *aurantifolii* Gabriel 等，1989

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

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

*Pseudomonas citri* Hasse，1915

**分类地位:** 细菌域，变形菌门，γ-变形菌纲，黄单胞菌目、黄单胞菌科

**通用名:** 柑橘溃疡病，柑橘细菌性溃疡病、亚洲溃疡病

**注:** 柑橘溃疡病菌是最近从地毯草黄单胞菌柑橘致病变种（*X. axonopodis* pv. *citri*）（野油菜黄单胞菌柑橘致病变种 A 菌系(*X. campestris* pv. *citri* group A strains)）重新分类确定的。Gabriel 等（1989）的命名法被再次提起，现在柑橘细菌性溃疡病病原的接受名是柑橘黄单胞菌柑橘亚种（*X. citri* subsp. *Citri*）（Bull 等，2010；Schaad 等，2006）。野油菜黄单胞菌柑橘变种另一菌系已被重新分类为褐色黄单胞菌莱檬亚种（*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*）（B、C、D 组）和苜蓿黄单胞菌枳柚亚种（*Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*）（E 组）（Schaad 等，2006）。

## 3. 检测

### 3.1 有症状植株的检测

柑橘溃疡病可通过观察营养培养基上菌落的形态特征、血清学检测（通过免疫荧光法（IF））、分子检测（通过聚合酶链式反应（PCR））和对叶碟或离体叶片进行生测来诊断。所有检测必须包含阳性和阴性对照（参考对照见 4 节）。

#### 3.1.1 症状

该病害一般在果皮、叶片、枝干和嫩梢上引起病痂或火山口状病变。柑橘溃疡病症状全年可在苗木上发生，夏末至秋天嫩梢大量抽出的时候在幼树上发生（CABI，2006）（图 1-4）。在橘树长至盛果期时，该病零星发生，因为其时很少有新梢抽出，而老叶片组织和成熟果实在自然条件下对柑橘溃疡病具有较强的抗性。病害的严重程度还取决于寄主植物种类和栽培品种的感病性（Goto，1992）。

*果实上的症状*。果实表面形成火山口状病变；可能单个散布在果实上，或几个病变一起发生，具不规则形状。在被侵染的幼果上可以见到树脂状溢出物。病变不会深透外果皮。

*枝条上的症状*。在干燥条件下，溃疡病斑木栓化或呈海绵状，隆起，表面开裂。在潮湿条件下，病斑快速扩大，表面不开裂，边缘油渍状。在不太感病的品种上，病健组织之可能形成一层病痂。溃疡病斑可用小刀片刮除粗糙表面，去掉表面木栓化层，用光线投射到健康绿色树皮组织中深褐色病变来确认。取决于寄主植物的感病程度，褪色区域形状可能不同，大小介于 5 至 10 mm 之间。

*叶片上的症状*。叶片背面最先出现亮黄色斑点，随后叶片两面出现大量浅棕色病变，并逐渐变粗糙、开裂和木栓化。溃疡周围可能有水浸状黄色或褪绿晕圈。

柑橘溃疡病在枝条、叶片和果实上形成的症状可能与侵染柑橘的其他细菌、真菌或生理病害造成的病痂或叶斑类症状混淆。其他可引起与柑橘溃疡病类似症状的

细菌有苜蓿黄单胞菌枳柚亚种和褐色黄单胞菌莱檬亚种。这两种细菌寄主范围都很有限，引起的症状发展较慢，且很少在果实上产生病变（Schaad 等，2005，2006）。据报道，柑橘疮痂病菌（*Elsinoë fawcettii*）引起的柑橘疮痂与柑橘溃疡病症状相似，特别是在对柑橘疮痂病具有抗性的寄主种类上（Taylor 等，2002），但一般而言，疮痂病斑比柑橘溃疡病的病斑更加干燥，也更不规则，而且有时候没有特异性的黄色晕圈。柑橘疮痂病没有菌脓，可与柑橘溃疡病相区别。

### 3.1.2 分离

新鲜制备的样品提取物对从有症状的植物材料中成功分离出柑橘溃疡病菌至关重要。植物材料应在采集后尽快分析；也可在 4–8 ºC 下储存待处理。当症状已经非常明显或环境条件不利时，可培养的柑橘溃疡病菌细胞的数量可能很少，分离过程中平板可能布满大量的腐生或拮抗细菌。应特别注意不要混淆柑橘溃疡病菌和成团泛菌（*Pantoea agglomerans*）的菌落，后者也经常可以从溃疡病斑上分离到，并在标准细菌培养基上产生形态相似的菌落。成团泛菌通常生长更快，菌落比柑橘溃疡病菌的浅黄色/柠檬色菌落更显亮黄。

对致病生物进行分离时，可用病斑提取物在适宜的培养基平板上划线培养，柑橘溃疡病菌菌落在此类平板上具有典型的特征。目前还没有柑橘溃疡病菌专一的选择性培养基。

将病斑在 0.5–1.0 ml 盐液（0.85% NaCl 无菌蒸馏水溶液，pH 7.0）中浸软，必要时可事先用 1% NaClO 消毒 1 min，用无菌蒸馏水冲洗三次并粉碎。取少量提取物在营养培养基上划线。适宜的分离培养基是加入 0.1% 葡萄糖的营养琼脂（NGA）、酵母蛋白胨葡萄糖琼脂（YPGA）（酵母提取液，5g；Bacto 蛋白胨，5g；葡萄糖，10g；琼脂，20g；蒸馏水，1 l；pH7.0）和 Wakimoto 培养基（马铃薯肉汤，250ml；蔗糖，15g；蛋白胨，5g；$Na_2HPO_4.12H_2O$，0.8 g；$Ca(NO_3)_2 \cdot 7H_2O$，0.5 g；Bacto™琼脂，20g；蒸馏水，1 l；pH7.2）。必要时，可在培养基高压灭菌后加入过滤灭菌后的放线菌酮（100 mg/l）作为杀菌剂。

菌落在三种培养基上都呈圆形、凸出且边缘光滑，粘质，乳黄色。在 25–28 ºC 下培养 3 至 5 天后对生长进行评估。在商品果样品中，细菌可能因受挤压而不易培养；因此，可能需要更长的培养时间，或者按照 3.1.6.2.节所述，用生测方法从样品中提取细菌。在培养基中加入春雷霉素和头孢菌素（半选择性 KC 或 KCB 培养基）会抑制几种腐生细菌，从而有利于病原菌的分离（Graham 等，1989；Pruvost 等，2005）。

在本诊断规程中，各种方法（包括引用的商品名）的描述和发表时一样，因为它们决定了最初所获得的灵敏度、特异性和可重复性。化学药品名称（例如商标名）的使用并不意味着对它们的认可，而排斥可能同样适用的其他产品。本规程提供的实验室程序可根据各个实验室的标准进行调整，只要它们经过了充分的验证。

### 3.1.3 血清学检测：间接免疫荧光法

对血清学检测（IF 和酶联免疫吸附分析）而言，适当的对照对确保检测结果可靠至关重要。每个检测都应包括一个阳性和阴性对照。阳性对照可包括将一个柑橘

溃疡病菌参考菌株重新悬浮到健康寄主植物提取物中（用于植物材料的检测）或磷酸缓冲液（PBS）中（用于细菌培养物的鉴定）。阴性对照应包括健康寄主植物提取物（用于植物材料的检测）或非目标细菌种类的悬浮物（用于细菌培养物的鉴定）。

对细菌细胞的血清学检测而言，从平板上取一菌环新鲜培养物，重新悬浮在 1 ml PBS（NaCl，8 g；KCl，0.2 g；$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$，2.9 g；$KH_2PO_4$，0.2 g；加蒸馏水至 1 l；pH 7.2），制备约 $10^8$ 克隆形成单位（cfu)/ml （EPPO，2009）。

对植物组织的血清学检测而言，应选择有症状的样品 – 带有坏死病变的嫩梢、幼枝、叶片和果实，或幼枝、枝条、树干上溃疡部位的组织。样品应按照建议用于所采用的特定血清学检测方法的通用程序处理。一般而言，植物组织在用于血清学检测前应在新制备的抗氧化剂浸软缓冲液（聚乙烯吡咯烷酮（PVP)-10，20 g；甘露醇，10 g；抗坏血酸，1.76 g；还原型谷胱甘肽，3 g；PBS，10 mM，1 l；pH 7.2）或 PBS（NaCl，8 g；KCl，0.2 g；$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$，2.9 g；$KH_2PO_4$，0.2 g；加蒸馏水至 1 l；pH 7.2）中研磨。两种溶液都使用无菌的 0.22 µm 薄膜进行过滤灭菌。

用移液管取待检测的每种细菌制备液或植物样品 25 µl，加入用塑料膜包被的多窗口显微镜载玻片上，在空气中干燥后在火苗上稍微加热固定。每一种待检测的细菌或样品使用单独的玻片，用于 ELISA 检测的阳性和阴性对照同样如此。用 PBS（pH 7.2）稀释购买到的抗血清或单克隆抗体，取 25 µl 适当的稀释液，加入每片玻片的各个窗口中。阴性对照可包含同样稀释倍数的正常（未免疫）血清和 PBS。玻片室温下在保湿箱中培养 30 min。甩掉玻片上的液滴，用 PBS 冲洗，然后在 PBS 中清洗 3 次，每次 5 min。轻轻吸干玻片，然后用移液管取 25 µl 适宜的抗性 r 球蛋白荧光异硫氰酸盐共轭物（FITC）的适当倍数稀释液，加到每个窗口。室温下将玻片置于黑暗中培养 30 min，冲洗，洗涤并吸干。最后，在每个窗口中添加 10 µl 0.1 mmol/l 加有抗变色剂的甘油磷酸缓冲液（pH 7.6），然后盖上盖玻片。

用荧光显微镜放大 600×或 1 000×检查放在浸镜油下的玻片。FITC 在显微镜紫外光下发出亮绿色荧光。如果带有已知细菌的阳性对照显示出发荧光的棒状细菌细胞，而普通血清和 PBS 的阴性对照没有荧光，则可以检测样品窗口是否存在符合柑橘溃疡病菌大小和形状的发荧光的细菌细胞。本方法可以检测约 $10^3$ cfu./ml。

### 3.1.4 分子检测

#### 3.1.4.1 分子检测的对照

为了保证获得可靠的检测结果，取决于所采用的检测类型和所要求的确定性水平，适当的对照至关重要。对 PCR 而言，最少应使用一份阳性核酸对照、一份内对照和一份阴性扩增对照（无模板对照）。针对来自检测样品的每组核酸提取物都应考虑到的此类及其他对照描述如下。

**阳性核酸对照。**提前制备（储存）的核酸，全基因组 DNA 或合成对照（例如一种 PCR 克隆产品）可用作对照，以监测 PCR 扩增效率。

**内对照。**对常规和实时 PCR 而言，PCR 操作方法应包含诸如 COX（Weller 等，2000)、16S 核糖体（r）DNA（Weisberg 等，1991）或 GADPH（Mafra 等，2012）的一种植物管家基因（HKG）作为对照，以排除核酸提取失败或降解，或存在 PCR 抑制剂导致的假阴性。

**阴性扩增对照（无模板对照）。**对常规和实时 PCR 而言，在扩增阶段加入用于制备反应混合液的 PCR 级水，以排除反应混合液制备过程中污染导致的假阳性。

**阳性提取物对照。**本对照用于确保来自目标物的核酸质量足够好，可用于 PCR 扩增。考虑到 PCR 操作方法的检测极限，核酸要从受侵染寄主组织，或接种一定浓度目标物的健康植物组织中提取。

阳性对照应是用于 DNA 提取的每株植物的叶片组织量的十分之一左右。对 PCR 而言，应注意避免阳性对照或阳性样品中雾滴扩散引起的交叉污染。如有必要，应对实验室内使用的阳性对照进行测序，以便与具有正确大小的 PCR 扩增子中获得的序列进行对比。或者，可制备具有已知序列的合成阳性对照，此对照也可与具有正确大小的 PCR 扩增子进行比较。

**阴性提取物对照。**本对照用于监测核酸提取过程中的污染，以及与寄主组织的交叉反应。本对照包括自未受侵染的寄主组织中提取并扩增的核酸。检测大量阳性样品时，建议使用多重对照。

### 3.1.4.2 从受侵染的柑橘组织中提取 DNA

从受侵染柑橘组织中提取 DNA 最初由 Hartung 等（1993）用溴化十六烷基三甲铵（CTAB）方法完成，但还有很多商业化方法和一种异丙醇方法（不需要苯酚）已被广泛评估（Llop 等，1999）。已使用商业化 DNA 提取试剂盒（例如 Promega Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒）从柑橘组织中成功提取出 DNA（Coletta-Filho 等，2006）。

在异丙醇方法中，将病斑或疑似受侵染的植物材料切成小片，用 PBS 浸泡并在室温下放入旋转式摇床上震荡 20 min。过滤上清液（去除植物材料），然后以 10 000 *g* 离心 20 min。将沉淀物重新悬浮在 1 ml PBS 中： 500 µl 保存供进一步分析或用于在琼脂平板上直接分离，另 500 µl 以 10 000 *g* 离心 10 min。将沉淀物重新悬浮在 500 µl 提取缓冲液（200 mM Tris-HCl， pH 7.5： 250 mM NaCl： 25 mM 乙二胺四乙酸（EDTA）： 0.5%十二烷基硫酸钠（SDS）： 2% PVP）中，在室温下持续震荡搅拌 1 h。悬浮液以 5 000 *g* 离心 5 min，随后将 450 µl 上清液转移到一个新试管中，混入 450 µl 异丙醇。轻轻混合悬浮液，在室温下保存 1 h。可使用 Pellet Paint 沉淀剂加快沉淀（Cubero 等，2001）。悬浮液以 13 000 *g* 离心 10 min，倒掉上清液，干燥沉淀物。将沉淀物重新悬浮在 100 µl 水中。取 5 µl 样品用于 50 µl PCR。

### 3.1.4.3 常规 PCR

有几个引物对可用于对柑橘溃疡病菌的诊断。Hartung 等（1993）的引物 2 和 3 以柑橘溃疡病菌特异性的 *Bam*HI 限制性片段长度多态性 DNA 片段的为目标，因其良好的特异性和灵敏度（约 $10^2$ c.f.u/ml），它们是植物材料分析中最常用的引物。引物 *J-pth1* 和 *J-pth2* 以引起柑橘溃疡症状的黄单胞菌系致病基因 *pthA* 中含 197 个碱基对（bp）的核定位信号片段作为目标。这些菌系包括柑橘溃疡病菌、褐色黄单胞菌莱檬亚种和在佛罗里达发现的非典型柑橘溃疡病菌 $A^*$和 $A^w$ 菌系（Cubero 和 Graham，2002）。这些引物是通用的，但它们比 Hartung 等（1993）的引物灵敏度低（植物材料中 $10^4$ cfu/ml）。然而，Hartung 的引物不能检测柑橘溃疡病菌 $A^w$ 和所有 $A^*$菌系或褐色黄单胞菌莱檬亚种。在疑似存在柑橘溃疡病菌 $A^*$和 $A^w$ 菌系的

情况下 – 例如在墨西哥莱檬（*C. aurantiifolia*）和大叶莱檬（*C. macrophylla*）上发现柑橘溃疡病症状时 – 两种引物组合都应使用。

**Hartung 等（1993）的 PCR 法**

引物为：

2（反向）：5′-CAC GGG TGC AAA AAA TCT-3′

3（正向）：5′-TGG TGT CGT CGC TTG TAT-3′.

PCR 混合液在无菌试管中制备，含 PCR 缓冲液（50 mM Tris-HCl，pH 9；20 mM NaCl；1% Triton X-100；0.1%凝胶；3 mM $MgCl_2$）、引物 2 和 3 各 1 µM、每种脱氧核糖核苷酸（dNTP）各 0.2 mM，以及 Taq DNA 聚合酶 1.25 U。将 5 µl 提取到的 DNA 样品加入 45 µl PCR 混合液中，获取每份反应液 50 µl。反应条件为： 95 ºC 下 2 min 变性开始，继以 35 个循环的 95 ºC 下 60 s、58 ºC 下 70 s 和 72 ºC 下 75 s，以及最后 72 ºC 下 10 min 的延伸。扩增子的大小为 222bp。

**Cubero 和 Graham（2002）的 PCR 法**

引物为：

*J-pth1*（正向）：5′-CTT CAA CTC AAA CGCC GGA C-3′

*J-pth2*（反向）：5′-CAT CGC GCT GTT CGG GAG-3′.

PCR 混合液在无菌试管中制备，含 1× Taq 缓冲液、3 mM $MgCl_2$、*J-pth1* 和 *J-pth2* 引物各 1 µM、每种脱氧核糖核苷酸各 0.2 mM，以及 Taq DNA 聚合酶 1 U。将 2.5 µl 提取到的 DNA 样品加入 22.5 µl PCR 混合液中，获取每份反应液 25 µl。反应条件为：94 ºC 下 5 min 变性开始，继以 40 个循环的 93 ºC 下 30 s、58 ºC 下 30 s 和 72 ºC 下 45 s，以及最后 72 ºC 下 10 min 的延伸。扩增子大小为 198 bp。

已开发出对植物上柑橘溃疡病菌进行直接和灵敏检测的巢式 PCR、免疫捕捉，以及对巢式 PCR 产品进行比色检测的方法（Hartung 等，1993）。已发表了有关不同方法与引物对检测纯培养物和果实提取物的相对灵敏度的综述（Golmohammadi 等，2007）。

**3.1.4.4 实时 PCR**

使用 Llop 等（1999）此前描述的方法从植物材料中提取 DNA 后，将沉淀物重新悬浮在 100 µl 无菌超纯水中，在–20 °C 下保存备用。

已经基于其他研究用于特异性检测柑橘溃疡病菌系的一个主要致病基因 *pth* 的序列设计出一套引物，*J-pth3*（5'-ACC GTC CCC TAC TTC AAC TCA A-3'）和 *J-pth4*（5'-CGC ACC TCG AAC GAT TGC-3'），以及相应的 5′端用 6 - 羧基荧光素（FAM）和 3′端用四甲基罗丹明标记的 TaqMan 探针（*J-Taqpth2*）（5'-ATG CGC CCA GCC CAA CGC-3'）（Cubero 和 Graham，2005）。这些菌系包括柑橘溃疡病菌、褐色黄单胞菌莱檬亚种，以及在佛罗里达发现的非典型的柑橘溃疡病菌 A*和 Aw 菌系。

实施实时 PCR 时，将 2 µl 模板 DNA 加入含有 12.5 µl QuantiMix Easy Kit 试剂盒的反应混合液中，试剂盒含有 QuantiMix Easy Master Mix 混合液和

$MgCl_2$（50 mM），1 µl 10 µM 正向引物（*J-RTpth3*），1 µl 10 µM 反向引物（*J-RTpth4*），以及 0.5 µl 10 µM TaqMan 探针（*J-Taqpth2*），并加入无菌蒸馏水制备成 25µl 最终反应容量。本实时 PCR 方法使用 ABI PRISM 7000 序列测定系统建立。其他设备也产生了相似结果（María Lopez，pers. comm.，2013）。引物和探针的扩增条件为最初 95 °C 下 15 min 的激活，继以 40 个循环的 95 °C 下 15 s 和 60 °C 下 1 min。可从 Plant Print Diagnostics （http://www.plantprint.net）获取基于本方法的一整套实时 PCR 试剂盒，包括反应混合液和酶。

实时 PCR 提供了与常规 PCR 方法所用的 *pth* 基因引物相似的特异性（Cubero 和 Graham，2002，2005），可确保准确检测出染病叶片病斑和培养细胞稀释液中约 10 cfu 的柑橘溃疡病菌（Mavrodieva 等，2004）。本方法最近与标准和巢式 PCR 进行过比较（Golmohammadi 等，2007），据报道其在果实病斑中检测柑橘溃疡病菌的灵敏度为 10 cfu/ml。

### 3.1.5 常规与实时 PCR 结果的解读

**常规 PCR**

只有满足以下条件时，病原菌特异性 PCR 才可视为有效：

- 阳性对照产生细菌的大小正确的扩增子
- 阴性提取物对照与阴性扩增对照不产生细菌的大小正确的扩增子。

如果还使用了 16S rDNA 内参引物，阴性（健康植物组织）对照（如果有使用）、阳性对照，以及每一份检测样品将产生约 1.6 千碱基对（kb）的片段（扩增子大小取决于使用了何种 16S rDNA 引物(Weisberg 等，1991)）。要注意到，合成和质体阳性对照不会产生 1.6 kb 片段。使用内参引物不能对样品进行扩增表明，例如，DNA 提取失败，反应液中没有核酸，DNA 提取物中含有抑制 PCR 的化合物，或 DNA 已降解。

一个样品可被视为阳性，如果它能产生大小正确的扩增子。

**实时 PCR**

只有满足以下条件时，实时 PCR 才能被视为有效：

- 阳性对照使用病原菌特异性引物产生扩增曲线
- 使用阴性提取物对照和阴性扩增对照看不见扩增曲线（即循环阈值（Ct）为 40）。

如果同时使用了 COX 内参引物，则阴性对照（如有使用）、阳性对照和每一检测样品都应产生扩增曲线。如样品使用内参引物不能产生扩增曲线，则表明 DNA 提取失败，反应液中没有核酸，DNA 提取物中含有抑制 PCR 的化合物，或 DNA 已降解。

一个样品可被视为阳性，如果它能产生典型的扩增曲线。第一次进行检测时，每个实验室都需要验证循环临界值。

### 3.1.6 通过生测进行检测

#### 3.1.6.1 叶碟接种检测

在本检测中，用染病样品提取物接种对柑橘溃疡病菌感病的柑橘叶片组织，在适宜条件下进行培养以便细菌繁殖，产生病害的初始溃疡。

本生测程序开始时，先在微波炉中对酶标板进行 15 min 消毒，室温下在层流室中往每个孔中加入 200 µl 1.5%琼脂无菌水溶液。用 1% NAClO 对葡萄柚 Duncan 品种（*Citrus paradisi* var. Duncan），或墨西哥莱檬（*Citrus aurantifolia*）和枳壳（*Poncirus trifoliata*）等其他感病寄主的嫩叶表面消毒 1 min。叶片应已经充分展开，但未成熟和变硬。叶片用无菌蒸馏水冲洗 3 次，室温下放入层流室中进行表面干燥。叶碟用打孔器（用 95%乙醇消毒）打出，正面向下放置在每个孔内水琼脂上。加入 50 µl 柑橘溃疡病病斑浸软液（每一植物样品重复 4 个孔）。

使用 $10^5$ cfu/ml 柑橘溃疡病菌悬浮液作为阳性对照，使用无菌盐水作为阴性对照（各 4 个重复）。密封酶标板（例如 Parafilm）以获取近 100%的相对湿度，28 ºC 下在持续光照中培养 12 天，定期检查变化情况。从第三天开始，用立体显微镜和 3.1.2 节所描述的柑橘溃疡病菌分离技术检查每个叶碟上浅白色初始溃疡的形成情况。无症状叶碟可用半选择性培养基进行分离，以进一步分析是否有成活的细菌（Verdier 等，2008）。12 天后，如果发现有柑橘溃疡病菌，则细菌细胞已在植物组织上大量繁殖，可用培养基进行分离。本生测方法是具有高度特异性和灵敏度（$10^2$ cfu/ml）的诊断方法（Verdier 等，2008）。

#### 3.1.6.2 离体叶片富集

柑橘溃疡病菌也可以在葡萄柚 Duncan 品种或墨西哥莱檬、枳壳等其他高度感病的寄主受伤的离体叶片上进行选择性富集。将温室栽培的植物的顶端嫩叶在自来水下冲洗 10 min，用 1% NAClO 表面消毒 1 min，在无菌操作条件下用无菌蒸馏水充分清洗。在无菌操作条件下用解剖针轻刺或用解剖刀轻划，使每片叶片的下表面受伤，将整片叶背面向上放置在酶标板孔中 1%琼脂无菌水溶液上。取 10–20 µl 柑橘溃疡病病斑浸软液加到伤口上。同时使用叶碟生测法所采用的阳性和阴性对照。25 ºC 下在光照培养箱中培养 4 – 12 天后，对溃疡的形成进行评估，并如上所述，从溃疡部位或无症状的受伤叶片组织中分离柑橘溃疡病菌（EPPO，1998）。

### 3.2 无症状植株的检测

无症状植株上的柑橘溃疡病菌可通过半选择性培养基（见下文）分离富集、血清学技术（IF（3.1.3 节））与分子检测（3.1.4 节）来进行检测。

用半选择培养基从无症状植株分离柑橘溃疡病菌时，可以在蛋白胨缓冲液中清洗叶片或果实样品，离心上清液，然后将其涂抹在培养基上（Verdier 等，2008）。10 片叶片或 1 个果实构成 1 个样品。

室温下将样品加入 50 ml 蛋白胨缓冲液（NaCl，8.5 g；蛋白胨，1 g；Tween 20，250 µl：蒸馏水，1 l；pH 7.2）中震荡 20 min。对大量样品而言，可以将 100 片叶加入 200 ml 蛋白胨缓冲液中。单个果实可放入装有 50 ml 蛋白胨缓冲液的无菌袋中，在室温下震荡 20 min。

悬浮液随后以 6 000 *g* 离心 20 min。倒掉上清液，将下部沉淀重新悬浮在 10 ml 0.85%盐液中。每种悬浮液按 1：100 和 1：1000 比例稀释后，取少量（100 µl）在 XOS 半选择性培养基（蔗糖，20 g；蛋白胨，2 g；谷氨酸钠，5 g；$Ca(NO_3)_2$，0.3 g；$K_2HPO_4$，2 g；EDTA-Fe，1 mg；放线菌酮，100 mg；头孢菌素，20 mg；春雷霉素，20 mg；甲基紫 2B，0.3 mg；Bacto 琼脂，17 g；蒸馏水，1 l；pH 7.0）上划线 3 次（Monier，1992）。在 28 ºC 下培养 5-6 天后，对菌落生长情况，以及类型与形态进行评估（3.1.2 节）。

## 4. 鉴定

对疑似柑橘溃疡病菌菌落的鉴定应通过几种技术加以验证，因为褐色黄单胞菌莱檬亚种和苜蓿黄单胞菌枳柚亚种等其他种类的黄单胞菌也能从柑橘上分离到。除观察培养基上形态特征外，检测技术还包括血清学检测、分子检测、叶牒或离体叶片生测，以及致病性检测等。

鉴定一个纯培养物的最低要求是以下 3 中技术中每一种都产生阳性结果：（1）使用两套引物的 PCR（4.1 节）；（2）使用特异性单克隆抗体的一种血清学技术（IF，双抗体夹心法（DAS）- ELISA 或间接 ELISA，4.2、4.2.1 与 4.2.2 节）；以及（3）接种柑橘寄主并按照科赫法则的要求对致病性进行检测（4.3 与 3.1.6 节）。可以采用更多的检测方法（4.4 与 4.5 节）来进一步鉴定所发现的菌株。所有检测方法都必须包括阳性和阴性对照。以下几节对推荐的技术进行了描述。

除其他外，以下收藏库可以提供柑橘溃疡病菌参考菌株（提供建议用作阳性对照的柑橘溃疡病菌分离物）：

- 位于英国约克的中央科学实验室的国家植物病原细菌收藏库的 NCPPB 3234
- 位于法国昂热的国家农业技术研究所（INRA）植物细菌学实验站的法国植物病原细菌收藏库的 CFPB 2911（此系柑橘溃疡病菌 A*菌系）
- 位于新西兰奥克兰的新西兰土地保护研究所（Manaaki Whenua）的国际植物微生物收藏库的 ICMP 24
- 位于美国弗吉尼亚马纳萨斯的美国模式培养物收藏库的 ATTC 49118
- 位于巴西坎皮纳斯的生物学研究院中央实验中心生物学研究所的植物病原细菌培养物收藏库的 IBSBF 1594。

只有直接从这些培养物收藏库获取菌株，其真实性才能得到保证。

### 4.1 PCR 法

建议除了 3.1.4.3 节所描述的 PCR 法外，疑似菌株的纯培养物鉴定应使用两套不同的引物加以确认。其中一套应为 *J-pth1*/*J-pth2* 或 *J-Rxg*/*J-Rxc2* 引物（Cubero 和 Graham，2002），另一套为 Xac01/Xac02（Coletto-Filho 等，2005）或 XACF/XACR 引物（Park 等，2006）（表 1）。这是因为发现多数发表的引物对缺少特异性（Delcourt 等，2013）。可通过对获得的 PCR 扩增子进行测序，并和 GenBank 数据库国家生物技术信息中心（NCBI）保存的柑橘溃疡病菌菌株的序列进行比较，来进一步确认鉴定结果。

**Cubero 和 Graham 的 PCR 法（2002）**提供了柑橘溃疡病菌内转录间隔区（ITS）特异性 16S 和 23S 核糖体 DNA 的 PCR 引物。ITS 序列的差异可用于设计柑橘溃疡病的特异性引物，以及检测非典型菌系 A*和 $A^w$ 的引物（Cubero 和 Graham，2002）。引物为：

*J-Rxg*：5′-GCGTTGAGGCTGAGACATG-3′

*J-RXc2*：5′-CAAGTTGCCTCGGAGCTATC-3′。

PCR 在 25 µl 反应混合液中进行，含 1× Taq 缓冲液、1.5 mM $MgCl_2$、0.04 µM 引物 *J-RXg*、0.04 µM 引物 *J-RXc2*、每种脱氧核糖核苷酸各 0.2 mM，以及 Taq DNA 聚合酶 1 U。PCR 扩增条件与 3.1.4.3 节描述的 *pthA* 引物所用的一样。

**Coletta-Filho 等的 PCR 法（2006）**提供了基于 *rpf* 基因簇的引物。引物为：

Xac01：5′-CGCCATCCCCACCACCACCACGAC-3′

Xac02：5′-AACCGCTCAATGCCATCCACTTCA-3′。

PCR 在 25 µl 反应混合液中进行，含：1× Taq 缓冲液、2.0 mM $MgCl_2$、每种引物各 0.36 µM、每种脱氧核糖核苷酸各 0.25 mM，以及 Taq DNA 聚合酶 1 U。PCR 扩增条件为最初 94 ºC 下 3 min 变性，继以 36 个循环的 94 ºC 下 45 s，60 ºC 下 45 s 和 72 ºC 下 45 s，以及最后 72 ºC 下 5 min 延伸。扩增子大小为 582 bp。

**Park 等的 PCR 法（2006）**提供了基于 *hrpW* 基因序列的引物。引物为：

XACF：5′- CGTCGCAATACGATTGGAAC-3′

XACR：5′- CGGAGGCATTGTCGAAGGAA-3′。

PCR 在 25 µl 反应混合液中进行，含 1× Taq 缓冲液、1.5 mM $MgCl_2$，每种引物各 0.10 µM、每种脱氧核糖核苷酸各 0.25 mM、0.01%明胶，以及 Taq DNA 聚合酶 2 U。PCR 扩增条件为最初 94 ºC 下 5 min 变性，继以 30 个循环的 94 ºC 下 15 s，60 ºC 下 30 s 和 72 ºC 下 30 s，以及最后 72 ºC 下 7 min 延伸。扩增子大小为 561 bp。

**表 1.** 本诊断规程中描述的 PCR 法总结

特异性数据取自 Delcourt 等（2013)。*非特异性检测指致病黄单胞菌和检测为阳性的腐生细菌的比例。**腐生菌株未检测出阳性。

| 引物对 | 参考文献 | 扩增子大小（bp） | 柑橘溃疡病菌菌株检测 | 非特异性检测（%）* | 植物材料中的检测极限 |
|---|---|---|---|---|---|
| 2/3 | Hartung 等（1993) | 224 | 未检测 $A^w$ 和所有 A*菌系 | 17 | $10^2$ cfu/ml |
| *J-pth1/J-pth2* | Cubero 和 Graham（2002） | 198 | 所有菌系 | 51 | $10^4$ cfu/ml |
| *J-Rxg/J-Rxc2* | Cubero 和 Graham（2002） | 179 | 所有菌系 | 30 | $10^4$ cfu/ml |
| *Xac01/Xac02* | Coletto-Filho 等（2005） | 582 | 所有菌系 | 16 | $10^4$ cfu/ml |
| *XACF/XACR* | Park 等（2006） | 561 | 所有菌系 | 6** | 未见报道 |

## 4.2 血清学检测

建议除 3.1.3 节所描述的 IF 法外，应使用不同抗体来鉴定纯培养物。也可以使用 DAS - ELISA 或间接 ELISA 作为纯培养物鉴定的替代血清学检测方法。

### 4.2.1 双抗体夹心法（DAS）- ELISA

对 DAS-ELISA 而言，微滴定板用 100 µl/孔含适当稀释的抗柑橘溃疡病菌的免疫球蛋白（IgG）的碳酸盐包被缓冲液（$Na_2CO_3$，1.59 g；$NaHCO_3$，2.93 g；$NaN_3$，0.2 g；蒸馏水，1 l；pH 9.6）包被，在 4 ºC 下培养过夜。微滴定板用 PBS-Tween（NaCl，8 g；$KH_2PO_4$，0.2 g；$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$，2.9 g；KCl，0.2 g；$NaN_3$，0.2 g；Tween 20，0.25 ml；蒸馏水，1 l；pH 7.4）冲洗 3 次后，加入检测样品、阴性对照（健康植物材料）或阳性对照（柑橘溃疡病菌参考菌株）（200 µl/孔）。微滴定板在 37 °C 下培养 2 h。冲洗后，加入用 PBS-Tween 适当稀释的抗柑橘溃疡病菌免疫球蛋白与碱性磷酸酶共轭物（200 µl/孔），微滴定板在 37 °C 下培养 2 h。清洗后，加入对硝基苯磷酸盐底物缓冲液（1 mg/ml）（200 µl/孔），微滴定板在室温下培养 30 – 60 分钟。使用装有 405 nm 滤光片的分光光度计测定吸光度。确定样品为阳性的标准是，其光密度（OD）值为健康植物材料对照的 2 倍。DAS-ELISA 的检测极限是 $10^4$–$10^5$ cfu/ml（Civerolo 和 Fan，1982）。本方法不建议用于植物组织的直接检测。

有单克隆抗体可供 ELISA 使用，但建议只用于纯培养物鉴定，因为它们在检测植物组织时灵敏度很低。可以获取对柑橘溃疡病菌进行 ELISA 检测的商品试剂盒（如从 Agdia 公司）。关于特异性数据，可查阅生产商提供的技术信息。有报道称一些单克隆抗体会和地毯草黄单胞菌菜豆变种（X. axonopodis pv. phaseoli）、X. campestris pv. zinnea、苜蓿黄单胞菌枳柚亚种和野油菜黄单胞菌天竺葵致病型（Xanthomonas hortorum pv. pelargonii）交叉反应；然而，这些致病变种不太可能在柑橘上发生。

### 4.2.2 间接 ELISA

Alvarez 等（1991）所描述的使用单克隆抗体的间接 ELISA 可用于培养物鉴定。用于鉴定柑橘溃疡病菌的含所有必要成分的 ELISA 试剂盒可以购买（如从 Agdia 公司）。理论上，所有柑橘溃疡病菌菌系都可以鉴定，但有报道称西南亚分离到的一些具有显著表型差异的菌系不会与现有的单克隆抗体起反应（Vernière 等，1998）。

纯培养物悬浮液以约 10 000 *g* 离心 2 min，倒掉上清液。加入 1 ml1× PBS，细胞通过搅拌重新悬浮。该步骤重复 2 次。清洗 3 次后，将细胞重新悬浮在包被缓冲液中。在分光光度计下将细胞浓度调整到 $OD_{600}$ 0.01（约 $2.5 \times 10^7$ cfu/ml）。取少量样品加入微滴定板中（每样品 2 孔，100 µl/孔）。还应包括一个阳性对照（生产商提供的参考培养物或样品）和带有另一种细菌的阴性缓冲液对照。微滴定板在 37 °C 培养过夜，直至干燥为止。加入封闭液（5%脱脂奶粉 PBS 溶液）（200 µl/孔）。微滴定板在室温下培养 30 min，然后用 1× PBS-Tween 清洗 2 次。加入用 2.5%奶粉 PBS-Tween 溶液适当稀释的第一抗体（100 µl/孔）。微滴定板在室温下培养 1 h，然后用 1× PBS-Tween 清洗 5 次。加入用 2.5%奶粉 PBS-Tween 溶液适当稀释的酶共轭物（100 µl/孔）。微滴定板在室温下培养 1 h，然后用 1× PBS-Tween 清洗 5 次。加入用含 1 mg/ml 对硝基苯磷酸盐的二乙醇胺缓冲液新制备的底物溶液（pH 9.8）（100 µl/孔）。微滴定板在室温下培养 30 – 60 分钟。用装有 405 nm 滤光片的分光光度计测定 OD 值。阳性样本的确定方法同 DAS-ELISA。

## 4.3 致病性检测

为确认诊断结果，应使用葡萄柚 Duncan 品种，Valencia 甜橙（*Citrus sinensis*）或墨西哥莱檬等一组指示寄主来鉴定柑橘溃疡病菌的致病性。

通过使用或不使用针注射进行渗透，对柑橘寄主感病品种进行叶片检测可以显示细菌菌落的致病性。最好选用 50 - 70%伸展的未成熟叶片，因其具有高度感病性。在 25 ºC 高湿条件下培养，接种 7 - 14 天后病斑在挂树或离体叶片上形成（Francis 等，2010：Koizumi，1971）。通过此类检测，柑橘溃疡病菌引起的大量性茧状反应很容易被识别。将液态培养基中生长的细菌或新划线琼脂平板上产生的菌落重新悬浮在无菌蒸馏水中，将浓度调节到 $10^6$–$10^8$ cfu/ml，供接种寄主使用。总需要包含一个阴性和一个阳性对照。接种了阳性对照菌株的植株应与检测植株分开放置。

## 4.4 描述与生化特征

柑橘溃疡病菌是革兰氏阴性、直杆状细菌，大小为 1.5–2.0 × 0.5–0.75 µm。极生单鞭毛，能运动。它和黄单孢菌属中其他成员有很多共同的生理生化特性。它营有机化能营养，专性好氧，对葡萄糖进行氧化代谢。黄色色素为黄单胞菌色素。表 2 列出了一些可用于柑橘溃疡病菌鉴定的生化特征。

**表 2.** 柑橘溃疡病菌的主要生化特征

| 检测 | 结果 |
|---|---|
| 过氧化氢酶 | + |
| 过氧化酶 | – 或弱 |
| 硝酸盐还原 | – |
| 水解： | |
| 淀粉 | + |
| 酪蛋白 | + |
| Tween 80 | + |
| 七叶苷 | + |
| 明胶液化 | + |
| 果胶凝胶液化 | + |
| 天门冬素利用 | – |
| 生长要求： | |
| 蛋氨酸 | + |
| 半胱氨酸 | + |
| 0.02%氯化三苯四唑（TTC）（w/v） | – |

## 4.5 分子鉴定

侵染柑橘的包括柑橘溃疡病菌和整个黄单胞菌属在内的黄单胞菌分子水平的特征均已确定，并建立了可用于重新分类和鉴定的快速准确的方法。这些方法包括 DNA–DNA 杂交（Vauterin 等，1995），基因组指纹分析（Hartung 等，1987；Lazo 等，1987）；多位点序列分析（Young 等，2008）和重复序列 PCR（rep-PCR）（Cubero 和 Graham，2002，2004）。

### 4.5.1 多位点序列分析

多位点序列分析（MLSA）法已用于对柑橘溃疡病菌进行特异性鉴定（Almeida 等，2010；Bui Thi Ngoc 等，2010；Young 等，2008）。使用 Almeida 等（2010）、Bui Thi Ngoc 等（2010）和 Young 等（2008）描述的引物及 PCR 条件可以对管家基因进行扩增。MLSA 包括对多位点进行测序（一般 4 至 8 个管家基因），并将这些序列与核酸数据库中保存的黄单胞菌属各个种类的参考序列进行比较；例如植物联合微生物数据库（PAMDB）（http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl）（Almeida 等，2010）和微生物基因分型 MLVA 库（https://bioinfo-prod.mpl.ird.fr/MLVA_bank/Genotyping/）。

### 4.5.2 Rep-PCR 指纹分析

通过基于基因外重复回文系列（REP）片段，即肠杆菌基因间的重复共有序列（ERIC）和 BOX 片段设计的引物（Louws 等，1994），可在特定 PCR 条件下使用 Rep-PCR 指纹分析对菌系进行鉴定和区分（Cubero 和 Graham，2002）。

使用苯酚-氯仿-异戊醇法，可一步从细菌悬浮液中提取 DNA（600 nm 吸光度从 0.2 到 0.5），将其在乙醇中沉淀，并重新悬浮在超纯水中。DNA 储存在−20 °C 下备用。也可使用 3.1.4.2 节描述的 DNA 提取程序。

BOX PCR 在 25 µl 反应混合液中进行，含 1× Taq 缓冲液、6 mM $MgCl_2$、2.4 µM BOX1R 引物（5′-CTACG-GCAAGGCGACGCTGCAG-3′）（Louws 等，1994）、每种脱氧核糖核苷酸各 0.2 mM、Taq DNA 聚合酶 2 U，以及从黄单胞菌菌株中提取的 DNA 5 µl。反应条件为最初 94 °C 下 5 min，继以 40 个循环的 94 °C 下 30 s、48 °C 下 30 s 和 72 °C 下 1 min，以及最后 72 °C 下 10 min。PCR 产品在 3%琼脂糖凝胶 1× Tris-acetate-EDTA（TAE）缓冲液（40 mmol/l Tris-acetate；1 mmol/l EDTA；pH 8.0）中进行分析，110V 电泳 2 h，用溴化乙锭染色。

ERIC PCR 在 25 µl 反应混合液中进行，含 1× Taq 缓冲液、3 mM $MgCl_2$、1.2 µM ERIC1R 引物（5′-ATGTAAGCTCCT-GGGGATTCAC-3′）和 ERIC2 引物（5′-AAGTAAGTGACT-GGGGTGAGCG-3′）（Louws 等，1994）、各种脱氧核糖核苷酸各 0.2 mM、Taq DNA 聚合酶 2 U，以及从黄单胞菌菌株提取的 DNA 5 µl。反应条件同 BOX PCR。对 PCR 产品的检查也与 BOX PCR 相同。

指纹（带型）可通过目测来比较和分析相似性，也可使用 BioNumerics（Applied Maths）等计算机软件将带型转化为峰型，并对菌株进行比较。鉴定应基于与对照（参考）菌株带型的相似性（4 节）。

在有症状和无症状植物材料中检测和鉴定柑橘溃疡病菌的方案分别见图 5 和 6。

## 5. 记录

应按照 ISPM 27：2006 中 2.5 节描述的方法保存记录和证据。

在其他缔约方可能受诊断结果影响的情况下，建议将有害生物最初的样品培养物（标识供追溯）、保存或封装的标本，或检测材料（例如凝胶照片、ELISA 结果的打印输出、PCR 扩增子）至少保存 1 年，当违规（ISPM 13：2001，违规和紧急行动通知准则）和有害生物在一个国家或地区首次发现时尤要如此。

## 6. 获取进一步信息的联系点

生物实验室部农业指导总局，乌拉圭蒙得维的亚市 Millán 路 4703 号，CP 12900（Enrique F. Verdier；电子邮箱：emvermar@adinet.com.uy；电话：+598 23043992）。

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias（IVIA）植物保护与生物技术中心，西班牙 Moncada（Valencia）市 Carretera Moncada-Nάquera km 4.5，46113（María M. López：电子邮箱：mlopez@ivia.es；电话：+34 963424000；传真：+34 963424001)。

Instituto Nacional de Investigación Agraria y Tecnologia Alimentaria，INIA，西班牙马德里市 Ctra de La Coruña km 6（Jaime Cubero；电子邮箱：cubero@inia.es；电话：+34 913473900；传真：+34 913572293）。

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

## 7. 致谢

本规程第一稿由乌拉圭生物实验室部农业指导总局的 E.F. Verdier 先生起草（详见 6 节），后由位于布宜诺斯艾利斯 Ing. Huergo 路 1001 号的阿根廷国家农业食品健康与质量局植物病虫害实验室的 R. Lanfranchi 女士（Rita Lanfranchi；电子邮箱：ritalanfranchi@hotmail.com；电话：+5411 43621177 内线 118）、美国农业部 Ed Civerolo 先生（电子邮箱：emciv@comcast.net），以及西班牙 IVIA 的 M.M. López 女士（详见 6 节）修改。另外，西班牙 INIA 的 J. Cubero 先生（详见 6 节）大量参与了本规程的制订工作。

## 8. 参考文献

**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. c*itri.* 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.

**ISPM 13.** 2001. Guidelines for the notification of non-compliance and emergency action. Rome， IPPC， FAO.

**ISPM 27.** 2006. Diagnostic protocols for regulated pests. Rome， IPPC， FAO.

**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. nov.：*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. 图

**图 1.** 柚子（*Citrus paradisi*）叶片、枝条和果实上典型的柑橘溃疡病症状。

**图 2.** 柑橘溃疡病在嫩枝上的症状：柚子（*Citrus paradisi*）上早期病斑。

**图 3.** 甜橙（*Citrus sinensis*）（左）和柚子（*Citrus paradisi*）（中和右）果实上柑橘溃疡病症状。

**图 4.** 柑橘潜叶蛾为害加重后的柠檬（*Citrus limon*）叶片上的柑橘溃疡病症状。

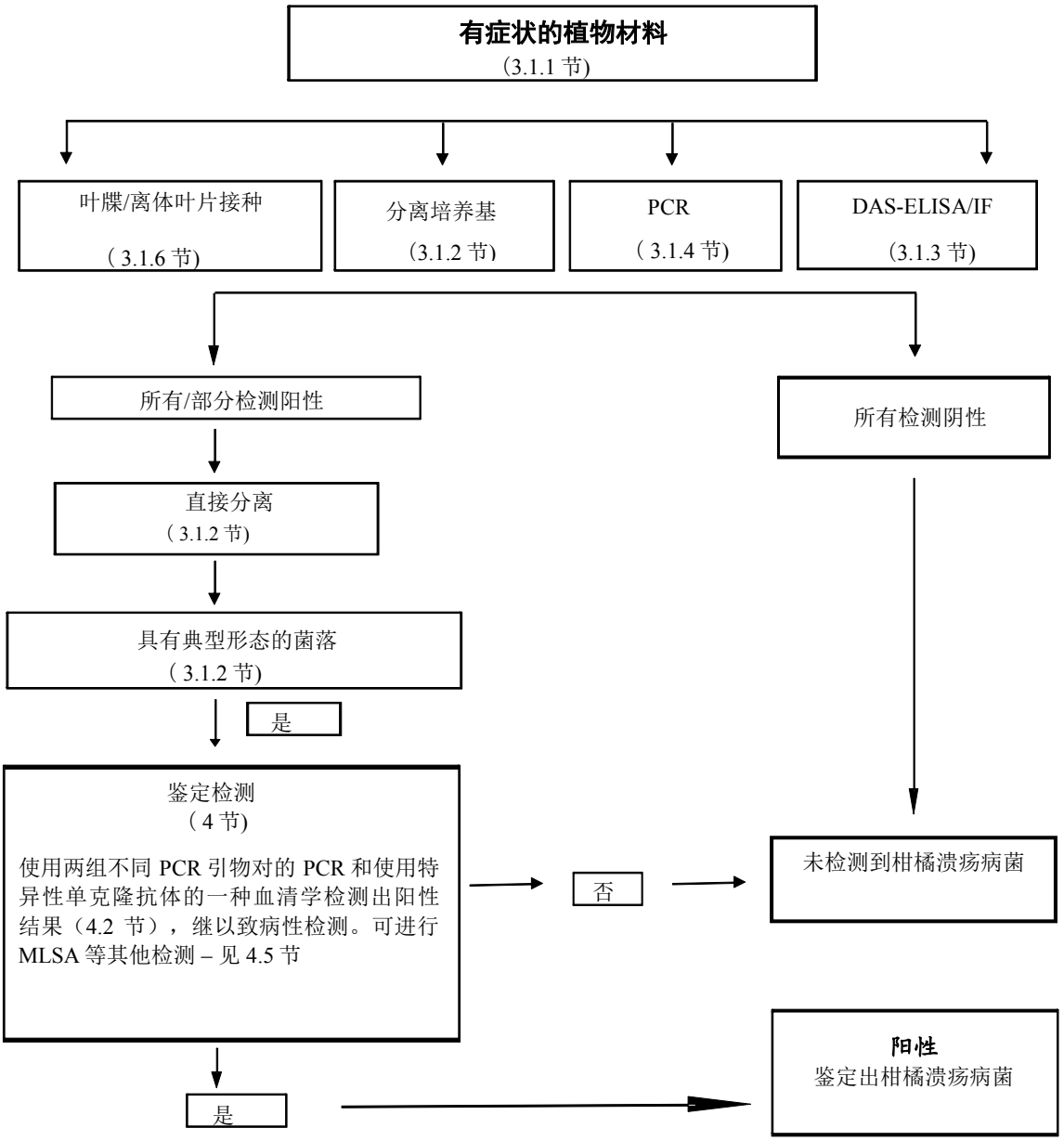


**图 5.** 在有症状的植物材料上检测和鉴定柑橘溃疡病菌的方案。

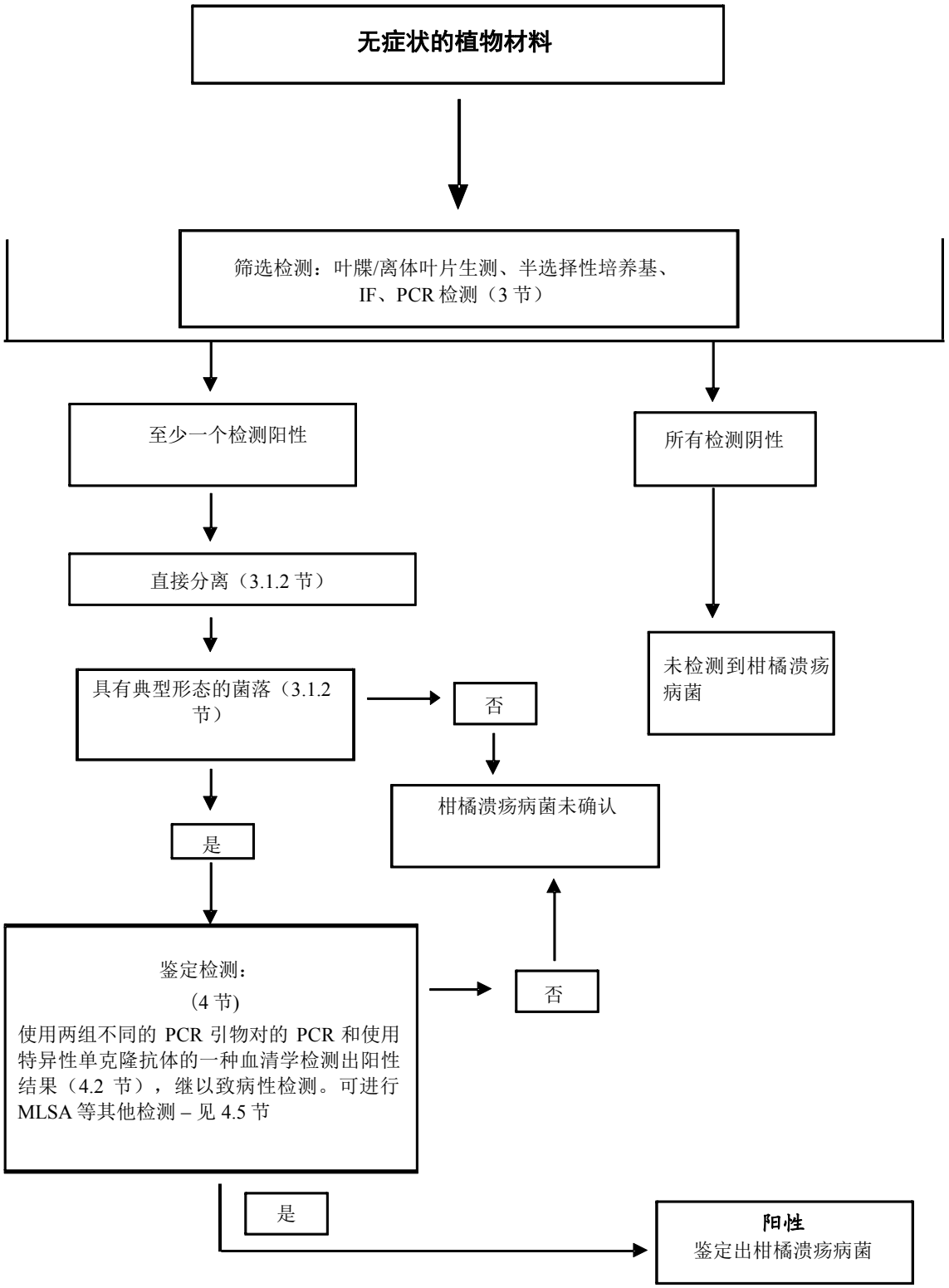


**图 6.** 在无症状的植物材料上检测和鉴定柑橘溃疡病菌的方案。

## 出台背景说明

2004 年 11 月，标准委在工作计划中增列柑橘溃疡病菌专题（2004-011）

2006 年，植检委第一届会议在细菌主题（2006-005）下增列柑橘溃疡病菌专题（2004-011）

2012 年 11 月，诊断规程技术小组修改了规程草案

2013 年 4 月，标准委通过电子表决程序批准草案提交成员磋商（2013_eSC_May_12）

2013 年 7 月，成员磋商

2014 年 2 月，诊断规程技术小组进行修改，并提交标准委审议（2014_eTPDP_Feb_02）

2014 年 4 月，通过电子表决程序提交给标准委审议通过（2014_eSC_May_16）

2014 年 6 月，标准委通过电子表决程序批准进入 45 天通报期（2014_eSC_Nov_03）

2014 年 7 月，标准委代表植检委批准诊断规程（未收到正式反对意见）

2014 年 10 月，秘书处更正编辑性失误

**ISPM 27.** 2006：附录 6 柑橘溃疡病菌（2014）。罗马，国际植物保护公约，粮农组织.

出台背景最后更新：2014 年 8 月 29 日