



## 国际植物检疫措施标准

### 第 27 号诊断规程

#### DP 5:

#### 水果上的柑橘叶点霉菌

(*Phyllosticta citricarpa* (Carcagne) Aa)

(1414)

#### 目录

1. 有害生物信息 .....	2
2. 分类信息 .....	4
3. 检测 .....	4
3.1 果实上的症状 .....	4
3.2 叶片和嫩枝上的症状 .....	5
3.3 柑橘黑斑病症状和由其他微生物或非生物因素引起的症状的比较 .....	6
4. 鉴定 .....	6
4.1 方法 A: 柑橘叶点霉菌的分离培养 .....	7
4.1.1 培养基 .....	8
4.1.2 培养特点 .....	8
4.1.3 形态学 .....	8
4.1.4 柑橘叶点霉菌与几种类似的叶点霉属真菌的培养与形态学特征比较 .....	9
4.2 方法 B: 分子检测 .....	10
4.2.1 通过常规 PCR 鉴定柑橘叶点霉菌 .....	10
4.2.1.1 一般信息 .....	10
4.2.1.2 方法 .....	11
4.2.1.3 基本程序信息 .....	12
4.2.2 通过实时 PCR 鉴定柑橘叶点霉菌 .....	12
4.2.2.1 一般信息 .....	13
4.2.2.2 方法 .....	13

4.2.2.3	基本程序信息 .....	14
4.2.3	通过 ITS 测序鉴定柑橘叶点霉菌 .....	15
4.2.3.1	一般信息 .....	15
4.2.3.2	方法 .....	15
4.2.3.3	基本程序信息 .....	16
5.	记录 .....	16
6.	获取进一步信息的联系点 .....	16
7.	致谢 .....	17
8.	参考文献 .....	17
9.	图 .....	21

## 1. 有害生物信息

柑橘叶点霉菌 (*Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Loh), 即柑橘黑斑病的病原, 是危害柑橘属 (*Citrus*)、枳属 (*Poncirus*)、金桔属 (*Fortunella*) 及其杂交种, 形成叶斑和水果损伤的一种真菌。除了酸橙 (*Citrus aurantium*) 及其杂交种, 以及波斯青柠 (*Citrus latifolia*) 外, 所有商业化种植的柑橘属植物都感病 (Aguilar-Vildoso 等, 2002; Kotzé, 2000)。柠檬 (*Citrus limon*) 尤其容易感病, 因此它往往是该病原传入一个新地区后最先表现出病害症状的植物。

柑橘黑斑病最早的记录是 1895 年在意大利柠檬子上发生 (Benson, 1895)。目前, 它在非洲、亚洲、澳洲, 以及北美和南美一些柑橘产区发生 (CABI, 2011; NAPPO, 2010; Schubert 等, 2012)。欧洲、中美洲和加勒比地区尚未报道有该病害 (CABI, 2011; CABI/EPPD, 1998; EPPO/CABI, 1997; NAPPO, 2010)。

柑橘叶点霉菌的经济影响主要缘于它引起外部损伤, 使柑橘果实不适于在鲜果市场销售 (Spósito, 2003)。严重的侵染可导致未成熟果实脱落 (Kotzé, 2000)。落果造成的损失多见于有利于病害发生的年份, 或在成熟高峰期后果实仍留在树上时 (CABI, 2011)。另外, 收获时潜伏侵染 (无症状) 的果实在运输和储藏期间仍可能表现出症状 (Kotzé, 1996)。

柑橘黑斑病的流行受是否有侵染源、是否有利于侵染的环境条件 (即温度、水分和湿度条件)、柑橘树生长周期, 以及果实和叶片是否处于易受侵染的阶段影响 (Kotzé, 1981、2000)。在降雨集中在某一个季节的地区, 只在落叶上产生的假囊壳子囊孢子是主要侵染源。在降雨不是集中在某一个季节的情况下, 如花期和挂果后树上仍留有带有病变的反季节果实, 或在种植的柑橘种或品种陆续且不规律开花时, 柑橘叶点霉菌产生分生孢子的分生孢子器也是重要的侵染源 (Kotzé, 1981; Spósito 等, 2008, 2011)。

假囊壳在落叶后发育 40—180 天，时间长短取决于雨天和晴天的频率，以及当时的温度（Kotzé, 1981）。在一些国家，柑橘叶片终年都会脱落，而在另一些国家则季节性脱落，这对菌源的产生具有影响。最适于假囊壳形成的温度是 21—28℃；低于 7℃或高于 35℃时都不会形成假囊壳（Lee and Huang, 1973）。子囊孢子在降雨时释放，有时也会在灌溉或露水很大时释放（Kiely, 1949a; Kotzé, 2000）。子囊孢子释放深受降雨模式的影响（Kotzé, 1981）。子囊孢子被强制释放到假囊壳上方 1.2cm 处，由气流携带穿过树冠，直至很远的地方（Kiely, 1949a）。侵染的关键时期始于挂果，持续 4—6 个月，但直至挂果 6 个多月后，果实上才会显出初步症状（Baldassari *et al.*, 2006）。在巴西，橙子“Valencia”和“Natal”品种的果实至少在 75%的花瓣脱落 24 周后还会感病，那时果实的直径已经达到 5—6 厘米（Baldassari 等, 2006）。

侵染后，真菌处于休眠状态，直至果实完全长大成熟。侵染发生多个月后才会出现明显的症状（Kotzé, 2000）。叶片从发育直至 10 个月小都会感病（Truter 等, 2007）。

长有分生孢子的分生孢子器产生于叶片、枯枝、果柄上，在落叶上更多（Kotzé, 2000）。它们可能被溅撒到幼果上，从受侵染的上年陈果上冲洗到仍处于感病阶段的幼果和叶片上（Agosti 等, 2006; Agosti 等, 2008）。柑橘叶点霉菌也有小分生孢子无性阶段，被称为 *Leptodactylopora* 属（Kiely, 1949a）。小分生孢子阶段也被称为“性孢子器”阶段（Kiely, 1949a），通常在假囊壳产生前见于落叶上。然而，小分生孢子在柑橘叶点霉菌生物学中的作用尚不清楚。

受温度升高、光照增强、干旱和树势减弱的影响，成熟果实上的症状会更加明显。老树通常比幼树更多地发生柑橘黑斑病（Kotzé, 2000）。一般认为，柑橘叶点霉菌向新区域的扩散是通过受侵染苗木或其他繁殖材料而非柑橘果实（Kotzé, 2000; Timmer, 2004）。

值得注意的是，在无症状的柑橘果实，或仅有很小病斑（直径<2 mm）而无分生孢子器的果实上，可能存在很多植物科中均有报道的，无致病性的内生菌首都叶点霉菌（*Phyllosticta capitalensis* Henn.）（以前误称为芒果球座菌（*Guignardia mangiferae* A.J. Roy））（Glienke 等, 2011）。Baayen 等（2002）描述了将首都叶点霉菌和柑橘叶点霉菌区分开的培养、形态学和分子生物学特征。另外，柑橘叶点霉菌引起的症状可能和亚洲柑橘叶点霉菌（*Phyllosticta citriasiana* Wulandari, Crous & Gruyter）引起的症状混淆，后者是一种新近描述的病原，目前只在柚子（*Citrus maxima*）上有发现（Wang 等, 2012; Wulandari 等, 2009）。亚洲柑橘叶点霉菌对其他柑橘种类的致病性尚不清楚。Wulandari 等（2009）描述了将亚洲柑橘叶点霉菌

和对柑橘属有致病力的柑橘叶点霉菌区分开来的培养、形态学和分子生物学特征。最近报道了两种和柑橘属有关的叶点霉属真菌。中国柑橘叶点霉菌 (*Phyllosticta citrichinaensis*) 在柚子叶片上引起带有黑褐色边缘和橄榄绿晕圈的小型灰褐色凹陷病斑。该病原在橘子和橙子果实上也引起与黑色素沉着相似的褐色至黑色小型病斑 (Wang 等, 2012)。巴西柑橘叶点霉菌 (*P. citribraziliensis*) 是在巴西柑橘属植物健康叶片中发现的一种内生菌 (Glienke 等, 2011)。

## 2. 分类信息

**学名:** *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa, 1973

**异名:** *Phoma citricarpa* McAlpine, 1899

*Guignardia citricarpa* Kiely, 1948

*Phyllostictina citricarpa* (McAlpine) Peck, 1953

*Leptodothiorella* sp. (spermatial state)

**分类地位:** 真核域, 真菌界, 子囊菌门, 盘菌亚门, 座囊菌纲, 葡萄座腔菌目, 葡萄座腔菌科

**通用名:** 柑橘黑斑病 (其他语言的通用名, 见 CABI (2011))

**序列号:** MycoBank 320327

## 3. 检测

橘属、枳属、金桔属及其杂交种果实、果柄、叶片、嫩枝可能携带柑橘叶点霉菌 (CABI, 2011)。

### 3.1 果实上的症状

取决于温度和果实成熟程度。果实上会表现出若干症状 (例如硬斑、黑星、假黑点、黑斑)。由于症状可能会变化, 而且易于和其他柑橘病原菌或机械、冻害或昆虫为害引起的症状相混淆, 仅仅依靠目检难以准确判断果实上有柑橘叶点霉菌 (Kotzé, 2000; Snowdon, 1990; L. Diaz, 个人通讯)。如 Kiely (1949a、1949b、1960) 描述, 以下四种症状广为人知:

**硬斑。**柑橘黑斑病最典型的症状, 包括直径 3–10mm 很浅的病变, 带有灰色至棕褐色中心, 以及深褐色至黑色边缘 (图 1A)。在症状形成的晚期, 病变中心变成火山口状。单个硬斑病变可能一直很小, 也可能连结形成较大的病变。在果实是绿色时有一个黄色晕圈, 或者在果实是黄色或橘色时有一个绿色晕圈出现在这些病变周围。通常, 这些病斑的中央会产生分生孢子器 (图 1a), 可使用手持放大镜或解剖显微镜进行观察。硬斑常常在果实开始成熟时, 甚至在颜色变化前出现, 发生在果实最向阳的一侧 (Kotzé, 1981、2000))。柑橘黑斑病往往很容易通过带有分生孢子器的硬斑病变鉴定。

黑星。为灰白、棕褐色、浅红或无色病斑，直径 1—3mm，中部略微凹陷，四周没有晕圈（图 1B）。病斑随时间推移变为褐色，而且几乎总是没有分生孢子器（图 1b）。黑星多数情况下在果实改变颜色后形成，也可能在硬斑病变周围呈卫星状斑点（Bonants 等，2003）（图 1C）。单个黑星可连结形成较大病斑，并变成黑斑（图 2C），在果实储存期间尤其如此（Kotzé，1981、2000）。

假黑点或斑点斑。通常发生在绿色果实上，呈小型凸起的深褐色至黑色病变，周围常有深色小斑点（FUNDECITRUS，2005）（图 2A、1a、2B）。病变没有分生孢子器，可随着时间推移相互连结（CABI，2011）。该症状可见于柑橘叶点霉菌已长期存在的柑橘栽培地区（FUNDECITRUS，2005）。

黑斑、扩散斑或跑马斑。在生长期末被严重侵染的果实上表现为凹陷不规则的红色至褐色，或无色病变（图 2C）。在高湿度条件下，这些病变最终会产生大量分生孢子器（Kotzé，2000）。黑斑发展很快，4—5 天内可侵染果实表皮的三分之二。这是最具危害性的症状，因为和其他症状不同，它侵入到中心柱（内果皮），有时深透整个果皮，导致未成熟果实脱落和严重的采后损失（Kotzé，1981）。

尽管很少见，据报道以下两种症状在柑橘果实上也有发生。

花边斑。具有黄色至褐色中心，放射状，无边缘的黄色表层病变（Aguilar-Vildoso 等，2002）（图 2D）。该病变发生在绿色果实上，可覆盖其大部分表皮（Goes，2001）。病变没有分生孢子器，通常表现为黄色背景下的褐色网状结构。带有花边斑的果实通常集中出现在树冠中（M. Spósito，私人通讯）。

破裂斑。略凸的深褐色至黑色的表层病变，大小不一，表皮破裂且边缘不规则（Goes 等，2000）（图 2E）。该病变没有分生孢子器，发生在 6 个月以上的果实上。该症状和柑橘锈壁虱（*Phyllocoptruta oleivora* Ashmead）的存在有关（FUNDECITRUS，2005；Spósito，2003）。

应注意的是，以上描述的多种症状，或不同症状的过度阶段可在同一果实上发生（图 1C、1c）。

在一些侵染源多的地区，症状也可能在幼果、花萼和花梗上出现。花萼上的症状是与黑星类似的红色至深褐色病变。在幼果和花梗上，症状表现为小型黑色斑点（Aguilar-Vildoso 等，2002）。幼果、花萼和花梗上的此类症状只在巴西有过报道。

### 3.2 叶片和嫩枝上的症状

柑橘黑斑病在叶片上通常表现为没有明显症状的潜伏侵染（Sutton 和 Waterston，1966）。如果确实表现出症状，它们最初是在叶片正反两面都可以见到的针尖状斑点。这些可扩大到直径 3mm 的斑点，呈圆形，中部变成灰白或浅褐色，周围是深褐色至

黑色边缘，以及黄色晕圈（Kotzé, 2000）（图 3A）。在近轴叶片表面病变的中央偶尔会产生分生孢子器。

与叶片上病斑类似的病变也可能出现在小嫩枝上，在柠檬上比在柑橘属其他种类上更为常见（M. Truter, 个人通讯）。症状是小型（直径 0.5–2mm）圆形略凹的病变，带有褐色至黑色边缘、灰白至浅褐色中心（图 3B）。在病变中心偶尔可见分生孢子器。

### 3.3 柑橘黑斑病症状和由其他微生物或非生物因素引起的症状的比较

果实上的症状表现多变，常和其他柑橘病原（例如亚洲柑橘叶点霉菌、中国柑橘叶点霉菌、柑橘间座壳（*Diaporthe citri*）、柑桔球腔菌（*Mycosphaerella citri*）、链格孢菌柑橘小种（*Alternaria alternata* pv. *Citri*）、壳针孢属（*Septoria* spp.）、炭疽菌属（*Colletotrichum* spp.）或昆虫、机械伤或冻害造成的类似，黑星症状尤其如此（Bonants 等, 2003; Snowdon, 1990; Ward 等, 2011; Wulandari 等, 2009; L. Diaz, 个人通讯）。

由于柑橘果实上由柑橘叶点霉菌引起的症状和其他病原引起的症状类似，只有采用下文描述的方法才能作出可靠诊断。

## 4. 鉴定

本诊断规程描述了在显症的柑橘果实上对柑橘叶点霉菌的检测和鉴定。应检验带有任何柑橘黑斑病典型症状（见 3 节）的柑橘果实。如果发现以病斑或病变形式存在的疑似症状，要使用放大镜或解剖显微镜检查它们是否有分生孢子器。若发现如 3.1 节所述带有分生孢子器的硬斑病变且分生孢子器和分生孢子的形态测定特征与 4.1.3 节所述特征一致，则可能有柑橘叶点霉菌。然而，由于柑橘叶点霉菌的分生孢子器和分生孢子与最近在橘子上报道的亚洲柑橘叶点霉菌的非常相似（Wulandari 等, 2009），柑橘叶点霉菌的鉴定只有通过下文描述的诊断方法才能确认（图 4）。诊断方法 A（分离培养）不仅可用于鉴定柑橘果实上的柑橘叶点霉菌，而且可用于叶片、嫩枝和花柄，然而方法 B（分子检测）只适用于柑橘果实。

如果应用方法 A 后，在樱桃汁琼脂（CHA）和燕麦琼脂（OA）培养基上生长的菌落的培养特征与柑橘叶点霉菌的不一致（见 4.1.4 节，要求(i)、(ii)、(iii)和(iv)），则可认为植物材料不带柑橘叶点霉菌。针对 14 天内未产生成熟分生孢子器的疑似柑橘叶点霉菌培养物，建议采用常规多聚酶链式反应（PCR）和内转录间隔区（ITS）测序（见 4.2.1 节），或实时 PCR（见 4.2.2 节）。然而，在适宜的培养基上对微生物进行分离培养，继而对培养物进行直接的分子检测，是一个耗费时间的过程，因此不适用于对货物进行的有严格时间要求的检测。

有两种 PCR 方法（常规和实时）可用于检测和鉴定柑橘果实上的柑橘叶点霉菌（见 4.2.1、4.2.2 节）。然而，最近发现在对带有典型症状的柚子果实进行常规检测时，Gent-Pelzer 等（2007）建立的实时 PCR 方法不能进行扩增（J.P. Meffert, 个人通讯）。其原因在于柚子上与柑橘黑斑病类似的症状系由亚洲柑橘叶点霉菌引起，是与柑橘叶点霉菌密切相关的新描述的种（Wulandari 等，2009）。由于尚不清楚柑橘叶点霉菌是否能在柚子上引起典型症状，带有与柑橘黑斑病类似症状的这类柑橘果实也应检测是否有柑橘叶点霉菌。

Gent-Pelzer 等（2007）建立的实时 PCR 方法（见 4.2.2 节）可用于柑橘叶点霉菌的阳性诊断，由于它只在有柑橘叶点霉菌时产生阳性反应，对亚洲柑橘叶点霉菌或首都叶点霉菌则不然。常规 PCR 方法（如 4.2.1 节描述）在柑橘叶点霉菌或亚洲柑橘叶点霉菌存在时都会产生扩增。在此情况下，出现阳性反应后，应通过分离培养（见 4.1 节）、实时 PCR（见 4.2.2 节）或内转录间隔区测序（见 4.2.1）来区分两种病菌。在这些分子检测中，尚无有关最近在中国报道的中国柑橘叶点霉菌的反应资料。

应注意的是，常见的炭疽菌属内生菌偶尔会产生分生孢子，可能与柑橘叶点霉菌分生孢子器看起来相似。然而，炭疽菌属真菌可通过其分生孢子盘上的刚毛、潮湿条件下在病变表面产生的粉红色霉层、分生孢子盘，以及分生孢子的形态加以区分（Kotzé, 2000）。

在本规程中，各种方法（包括菌株鉴定方法）的描述均和发表时一样，因为它们决定了最初获得的特异性水平。只要经过充分验证，所提供的实验室程序可根据各个实验室的标准进行调整。

#### 4.1 方法 A：柑橘叶点霉菌的分离培养

使用木塞钻孔器或手术刀切下果实病变，在 70% 酒精中浸泡 30s，使用 1% 次氯酸钠（NaOCl）表面消毒 2min，用无菌蒸馏水冲洗两次，用吸纸吸干（Peres 等，2007）。为提高分离的概率，必须小心切下病变，在涂抹前去掉所有不带症状的组织（N.A. Peres, 个人通讯）。随后，在无菌条件下将病变置于装有 CHA，或马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）（见 4.1.1 节），或加有 50μg/ml 青霉素和 50μg/ml 链霉素的 PDA 培养基的培养皿（直径 9cm）中（OEPP/EPPO, 2003）。如果使用的是 PDA，而且其上产生类似柑橘叶点霉菌的缓慢生长的深色培养物，随后要将其转移到 CHA 培养皿检测菌落的生长速度，以及 OA（见 4.1.1 节）培养皿评估是否有黄色素产生。与此同时，应在 22℃ 下将 PDA 培养基上生长的培养物置于近紫外光（NUV）下，以促进分生孢子器的形成。如培养物(i) 在 CHA 上生长缓慢（见 4.1.2 节）、(ii) 产生具有柑橘叶点霉菌特点的分生孢子器和分生孢子（见 4.1.2 节），以及(iii) 在 OA 上产生黄色素 – 尽管并非所有柑橘叶点霉菌分离物在 OA 上产生此类色素（Baayen 等，2002） – 则其被鉴定为柑橘叶点霉菌。

此方法具有以下不足：(a) 柑橘叶点霉菌是一种生长非常缓慢的真菌，由于没有一种培养基对柑橘叶点霉菌具有选择性，其培养过程中常被其他真菌（例如胶孢炭疽菌（*C. gloeosporioides*））埋没（Peres 等，2007），(b) 由于产生分生孢子器需要 7—14 天时间，这是一种耗费时间的方法。

#### 4.1.1 培养基

樱桃汁琼脂（CHA）。将 1 公斤不带果核和果柄的樱桃放入 1 升自来水中，煮约 2 小时制备樱桃汁。提取物用粗棉布过滤后，倒入瓶中，在 110℃（pH 4.5）下消毒 30 分钟后，存放待用。在装有 0.8 升蒸馏水的瓶中加入 3 号技术型琼脂 20g，将混合物在 121℃下消毒 15 分钟。消毒后立即加入 0.2 升消过毒的樱桃提取物，充分混合并在 102℃下消毒 5 分钟（Gams 等，1998）。

燕麦琼脂（OA）。OA 可以购买。或者可使用以下方法制备：将 30 克燕麦片放入粗棉布中，悬浮在装有自来水的平底锅中。慢煮约 1 小时后，挤压燕麦片，通过粗棉布过滤，提取物在 121℃下消毒 15 分钟。在装有 1 升燕麦提取物的瓶中，加入 3 号技术型琼脂 20 克，将混合物在 121℃下消毒 15 分钟（Gams 等，1998）。

马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）。PDA 可以购买。或者可根据 Hawksworth 等（1995）描述的方法制备。

#### 4.1.2 培养特点

柑橘叶点霉菌菌落在 CHA 上生长缓慢；22℃下在黑暗中培养 7 天后平均直径 25–30mm（Baayen 等，2002）。在 PDA 上，菌落有不规则边缘，衬有由无色埋生菌丝体构成的半透明较宽区域（图 5A）。菌落中心深色，有灰色至灰绿色气生菌丝体，通常带有大量小毛刺。菌落表面中心颜色很深，周围是灰黑色和黄褐色区域（Baayen 等，2002）。7—10 天后开始产生子座，而带有分生孢子的成熟分生孢子器一般在 10—14 天内产生（图 5B）。在 OA 上，25℃下在黑暗中培养 14 天后，菌落扁平，变大，呈橄榄灰色，边缘变成浅橄榄灰色，有稀疏至中等数量气生菌丝（Glienke 等，2011）。在 OA 上，常产生鉴别性的黄色素，并扩散至菌落周围的培养基中（图 6D，顶行），但并非所有柑橘叶点霉菌分离物都产生黄色素（Baayen 等，2002）。此类黄色素在 CHA 和 PDA 中很少产生。

#### 4.1.3 形态学

已发表的有关柑橘叶点霉菌形态学的资料差别很大，部分原因是由于混淆了和柑橘属有关的不同种类的叶点霉属真菌（Baayen 等，2002；Glienke 等，2011；Wang 等，2012；Wulandari 等，2009）。以下形态学和形态测定特征针对的是主要在培养过程中产生的柑橘叶点霉菌子实体和孢子；它们以 Sutton 和 Waterston（1966）以及 van der Aa（1973）的资料为基础，并由 Baayen 等（2002）做了修改。



子囊果。假囊壳在落叶层和培养过程中形成 (De Holanda Nozaki, 2007), 在任何其他植物材料 (例如未脱落的叶片、果实) 上不会产生。它们单生或聚生, 球形至梨形, 埋生, 深褐色至黑色,  $125-360\ \mu\text{m}$ , 具单一乳状突或具喙小孔, 表面常覆有不规则的菌丝外长物。外壁层由具有褐色加厚细胞壁的角状细胞构成, 但其内层则由具有无色较薄细胞壁的角状至球形细胞构成。

子囊。丛生, 双囊壁, 纺锤形, 顶端圆形, 具 8 个孢子。外壁破裂前, 其大小为  $40-65\ \mu\text{m} \times 12-15\ \mu\text{m}$ , 开裂前变成圆柱形至纺锤形, 长度扩大至  $120-150\ \mu\text{m}$ 。

子囊孢子。短、无隔膜、透明、圆柱形、中部凸起、略呈弧形,  $12-16\ \mu\text{m} \times 4.5-6.5\ \mu\text{m}$ , 异极, 具不等钝形末端。上端较小, 具  $1-2\ \mu\text{m}$  长的截形、非细胞的黏性帽状附属物, 下端具一个  $3-6\ \mu\text{m}$  长的尖锐或带褶皱的附属物。

分生孢子器。在果实、尚未脱落的叶片、枯死的枝、落叶层, 以及培养基上产生。单生或偶尔聚生、球形、埋生、中至深褐色、直径  $20-330\ \mu\text{m}$ 。分生孢子器壁最多有四层细胞, 外部菌核状, 内部为拟薄壁组织, 具颜色较深、略呈乳突状、圆形、直径  $10-15\ \mu\text{m}$  的小孔。

分生孢子。倒卵形至椭圆形, 透明、无隔膜、复极、 $9-12.7\ \mu\text{m} \times (5.0-8.5)\ \mu\text{m}$ , 具无色锥形附属物, 和  $<1.5\ \mu\text{m}$  厚的无色胶质鞘 (图 5C、5D、6A)。它们是  $9\ \mu\text{m}$  长的透明、无隔膜、倒卵形分生孢子梗上形成的芽生孢子。

性孢子状态。描述为 *Leptodothidea* 属, 在寄主上和纯培养过程中均可产生。性孢子哑铃状, 鲜呈圆柱形, 平或略呈弧形,  $5-8\ \mu\text{m} \times 0.5-1\ \mu\text{m}$ 。

#### 4.1.4 柑橘叶点霉菌与几种类似的叶点霉属真菌的培养与形态学特征比较

柑橘叶点霉菌的培养物与亚洲柑橘叶点霉菌 (Wulandari 等, 2009) 及内生的、对柑橘无致病性的首都叶点霉菌的培养物非常相似 (Baayen 等, 2002; Glienke 等, 2011)。

有可能结合以下几点来确定柑橘叶点霉菌菌落:

- (1) 菌落在 CHA 上的生长 (尽管范围可能相互重叠)
- (2) 包被在分生孢子外的黏质鞘的厚度 (图 5C、5D、6A、6B、6C)
- (3) 分生孢子附属物的长度
- (4) 在 OA 上产生黄色素, 但并非所有柑橘叶点霉菌分离物都产生黄色素 (Baayen 等, 2002; Wulandari 等, 2009)。

有关柑橘叶点霉菌与其相关种鉴别性特征的详细信息见表 1。另外, 中国柑橘叶点霉菌可通过其  $14-26\ \mu\text{m}$  较长的分生孢子附属物与柑橘叶点霉菌加以区分 (Wang 等, 2012)。symptoms on Citrus spp. in China

表 1. 柑橘叶点霉菌、亚洲柑橘叶点霉菌和首都叶点霉菌主要的培养和形态学特征 (Baayen 等, 2002; Wulandari 等, 2009)

特征	柑橘叶点霉菌	亚洲柑橘叶点霉菌	首都叶点霉菌
分生孢子平均大小 (μm)	10–12 × 6–7.5	12–14 × 6–7	11–12 × 6.5–7.5
黏质鞘宽度 (μm)	<1.5	1	1.5–2.5 (–3)
顶端附属物长度 (μm)	4–6 (–10)	7–10 (–14)	4–6 (–10)
子囊孢子平均大小 (μm)	12–16 × 4.5–6.5	未知	15–17.5 × 6.5–7.5
性孢子平均大小 (μm)	5–8 × 0.5–1	3–5 × 1–2	7–10 × 1.8–2.5
菌落平均直径 (mm) *	25–30	18–20	>40
最大生长温度 (°C)	30–36	30–33	30–36
在燕麦琼脂 (OA) 培养基上产生黄色素	是 <sup>†</sup>	否	否

\* 22°C 下黑暗中在樱桃汁琼脂 (CHA) 培养基上培养 7 天后。

<sup>†</sup> 应注意到并非所有的柑橘叶点霉菌分离物产生黄色素。

4.2 方法 B: 分子检测

已建立不同的分子检测方法, 用于直接检测纯培养物和果实病变上的柑橘叶点霉菌 (Bonants 等, 2003; Gent-Pelzer 等, 2007; Mey 等, 2006, 2012; Peres 等, 2007; Stringari 等, 2009)。共描述了两种鉴定柑橘叶点霉菌的方法, 即 Peres 等 (2007) 建立的常规 PCR 检测和 Gent-Pelzer 等 (2007) 建立的实时 PCR 检测。需注意的是, 实时 PCR 方法会对某些其他柑橘病害病变产生阳性反应, 而在一些情况下, 常规 PCR 可能产生非确定结果。值得注意的是, 尚无中国柑橘叶点霉菌分子检测阳性反应的相关报告。该病害最近在中国水果上报道。

4.2.1 通过常规 PCR 鉴定柑橘叶点霉菌

一项研究使用 36 份柑橘叶点霉菌分离物、13 份首都叶点霉菌分离物和包括链格孢菌、尖孢炭疽菌 (*Colletotrichum acutatum*)、胶孢炭疽菌、柑桔间座壳、柑桔球腔菌、柑橘绿霉菌 (*Penicillium digitatum*) 在内的一些常见的柑橘病害分离物对特异性 (分析学特异性) 进行了评估。只有柑橘叶点霉菌产生了阳性反应。敏感度 (分析学敏感度; 检测极限) 为 1 pg DNA/μl (Peres 等, 2007)。该方法会扩增柑橘叶点霉菌或亚洲柑橘叶点霉菌 DNA。常规 PCR 后有三种方法可以区分两种病菌: 分离培养 (见 4.1 节)、实时 PCR 检测 (见 4.2.2 节) 和 ITS 测序 (见 4.2.3 节)。

4.2.1.1 一般信息

本规程由 Peres 等 (2007) 建立。核酸取自菌丝体或切下的果实病变。本检测设计为扩增 ITS 部分区域, 产生含 300 个碱基对 (bp) 的扩增子。所使用的低聚核苷酸引物为:

正向引物: GCN (5'-CTG AAA GGT GAT GGA AGG GAG G -3')

反向引物: GCMR (5'-CAT TAC TTA TCG CAT TTC GCT GC -3')。

使用由 Taq DNA 聚合酶与含  $Mg^{2+}$  及核苷酸的反应缓冲液构成的 2.5× Eppendorf®<sup>1</sup> MasterMix 进行 PCR 扩增。用分子级水 (MGW) 配制反应混合物：分子级水应纯化（去离子化或蒸馏），无菌（高压灭菌或通过 0.45 μm 过滤），且无核酸酶。扩增在带有加热盖的 Peltier 式热循环仪中进行。

#### 4.2.1.2 方法

##### 核酸提取和纯化

从在马铃薯葡萄糖肉汤中生长 7 天的真菌培养物或单个果实病变中提取 DNA。在第二种情况下，切下带有症状的组织，尽可能多地去掉中果皮（内果皮）和外表皮。

根据生产商的说明，使用商业化 DNA 提取试剂盒（例如 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)、QuickPick SML Plant DNA (Bio-Nobile)、KingFisher® isolation robot (Thermo)），从菌丝体中提取 DNA。从单个果实病变中提取 DNA，可使用下列碱性裂解 DNA 提取法 (Klimyuk 等, 1999)，然而使用浸渍片法进行纯化，这已被证明最为有效 (Peres 等, 2007)。

**碱性裂解 DNA 提取法。**将带有症状的果实组织放入含有 40 μl 0.25 M NaOH 的无菌的 2 ml 微型管中，在沸水 (100°C) 浴中孵育 30 s（临界期）。加入 40 μl 0.25 M HCl、20 μl 0.5 M Tris-HCl、pH 8.0 和 0.2% (v/v) Triton P-40 中和微型管中的物质，将微型管再次放入沸水浴中 2 min。裂解后的物质可直接用浸渍片法（见下文）进行纯化，或在 4°C 下储存数周。储存后继续前一样品需在沸水浴中培养 2 分钟。

**浸渍片 DNA 纯化法。**碱性裂解后（见上文），将 150 μl 100% 酒精和一小片纤维素薄层层析板（浸渍片）放入 2 ml 微型管中。将微型管侧放在冰上，振荡 30 分钟。液体吸出后，加入 50 μl 稀释至 25% 的清洗缓冲液（10×(Tris,  $Na_2$ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 和次氯酸钠 NaClO, pH 7.0) 和 95% 酒精），倒置微型管以混合其中物质。重复清洗两次。将浸渍片放入新微型管中，在真空条件下干燥。然后将微型管侧放，在每一个微型管中加入 50 μl Tris-EDTA 缓冲液。培养 5 分钟后，微型管甩动 10 s，取出并扔掉浸渍片，回收 DNA。纯化的 DNA 可马上使用，或在 4°C 下保存过夜，也可在 -20°C 下保存更长时间。

另外，也可根据生产商的说明，使用商业化 DNA 提取试剂盒从果实病变中提取 DNA。

<sup>1</sup> 本诊断规程 PCR 扩增使用 Eppendorf® 牌试剂，并非意味着批准这些产品，而将可能也适用的其它产品排除在外。提供这种信息是为了便利本规程的用户，并不表示植检委 (CPM) 认可提到的化学品、试剂和/或设备。可以使用表明能够产生相同结果的等同产品。

聚合酶链式反应（PCR）

反应混合液（每 20 µl 单一反应浓度）由以下反应物构成：

反应物	工作浓度	每反应体积 (µl)	最终浓度
分子级水	n/a	0.4	n/a
2.5×Eppendorf® MasterMix (0.06 U/µl Taq DNA 聚合酶)	2.5×	8.0	1× (Taq 0.024 U/µl)
2.5×Taq 反应缓冲液 (4 mM Mg2+、每种 dNTP 各 500 µM)	2.5×	8.0	1× (1.6 mM Mg2+、每种 dNTP 各 200 µM)
引物 GCN	10 µM	0.8	0.4 µM
引物 GCMR	10 µM	0.8	0.4 µM
小计	-	18.0	-
DNA	-	2.0	-
总计	-	30.0	-

PCR 循环参数是 94℃ 变性 2 分钟；94℃ 30 s、64℃ 30 s、72℃ 1 分钟，39 个循环；72℃ 延伸 10 分钟。300 个碱基对的 PCR 产物表明有柑橘叶点霉菌 DNA 存在。

4.2.1.3 基本程序信息

扩增后，将 10 µl 反应混合物与 10 µl 加样缓冲液（Promega）混合，和分子量标准蛋白（100 bp 标准 DNA）一起加入 1.5% 琼脂凝胶中，通过电泳分离，用溴化乙锭或其他试剂染色，在 UV 光下观察并拍照（Sambrook 等，1989）。

必须使用柑橘叶点霉菌参照菌株的 DNA（阳性对照）作为一个额外的样品，以确保扩增成功。也必须使用柑橘叶点霉菌 DNA 提取物被其他相关病原 DNA 提取物替代的样品，或健康外果皮样品（阴性对照）进行 PCR 扩增。为监测可能发生的反应物污染和假阳性，必须用水替代一个样品（反应对照）。建议增加一个扩增内标（IAC），以监测抑制作用。

4.2.2 通过实时 PCR 鉴定柑橘叶点霉菌

使用柑橘叶点霉菌参照菌株 CBS 111.20（代表 10 个柑橘叶点霉菌分离物 ITS 序列组 I；Baayen 等，2002）、首都叶点霉菌参照菌株 GC14（代表 22 个首都叶点霉菌分离物 ITS 序列组 II；Baayen 等，2002）、12 种其他柑橘病害（链格孢属、青霉属、炭疽菌属）、木菠萝叶点霉菌（*Phyllosticta artocarpina*）和葡萄球座菌（*Guignardia bidwellii*）进行特异性（分析性特异）评估。只有柑橘叶点霉菌产生阳性反应。灵敏度（分析性灵敏度、检测极限）是每一反应 10 fg DNA，诊断灵敏度是 100%（Gent-Pelzer 等，2007）。

#### 4.2.2.1 一般信息

本规程由 Gent-Pelzer 等（2007）建立。核酸来源是菌丝体或切下的果实病变。本检测方法设计为扩增部分 ITS 区域，产生含 69 个 bp 的扩增子。所使用的低聚核苷酸引物为：

正向引物：GcF1（5'-GGT GAT GGA AGG GAG GCC T-3'）

反向引物：GcR1（5'-GCA ACA TGG TAG ATA CAC AAG GGT-3'）。

水解探针 GcP1（5'-AAA AAG CCG CCC GAC CTA CCT TCA-3'）5'端用荧光报告染料 FAM（6-羧基荧光素）标记，3'端用染料 TAMRA（6-羧基四甲基罗丹明）或 Eclipse® Dark Quencher（Eurogentec）修饰。

使用由 Taq 聚合酶与含  $MgCl_2$  及核苷酸的反应缓冲液构成的 2× Premix Ex Taq Master Mix（Takara）<sup>2</sup>进行 PCR 扩增。在 Premix Ex Taq Master Mix 中加入 ROX 参比染料（50×，Takara）。用 MGW 制备反应混合液。MGW 反应应进行纯化（去离子化或蒸馏）、无菌（高压灭菌或通过 0.45  $\mu m$  过滤）、无核酸酶。使用实时 PCR 热循环仪进行扩增。

#### 4.2.2.2 方法

##### 核酸的提取和纯化

从取自 22℃ 下黑暗中有 CHA 上（见 4.2.1 节）的菌落边缘的菌丝体栓（直径 0.5 cm）或果实病变中提取 DNA。从果皮上切下病变，尽可能多地去除周围的内果皮和果皮组织。将菌丝体栓或病变切成小块，加入装有不锈钢珠（直径 3.2 mm）和 125  $\mu l$  提取缓冲液（0.02 M 磷酸盐缓冲盐水（PBS）、0.5% Tween 20、2% 聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、0.2% 牛血清白蛋白）的带有密闭平头盖的 1.5 ml 微型离心管中。离心管以 5 000 r.p.m 的速度在珠磨器中振荡 80 s。混合物在微型离心机中以最大速度（16 100 g）离心 5 s，用 75  $\mu l$  上清液提取 DNA。可按照生产商的说明，用商业化 DNA 提取试剂盒提取 DNA。DNA 溶液量的最终体积是 50  $\mu l$ 。用装有 PVP 的纯化柱进一步纯化 DNA。往 Axygen Multi-Spin 分离柱（Dispolab）中装入 0.5 cm 聚乙烯聚吡咯烷酮（PVPP）制备纯化柱，将其放在空反应管上，用 250  $\mu l$  MGW，通过 4000 g 离心纯化柱 5 分钟进行两次冲洗。将 DNA 悬浮液加入 PVP 柱，以 4000 g 离心 5 分钟。穿柱液用于 PCR 检测。纯化的 DNA 可立即使用，或在 4℃ 下储存过夜，也可在 -20℃ 下储存更长时间。提取缓冲液中的 PVP 用作可溶性化合物。PVPP 是相互交联的 PVP，用作不溶性过滤材料。

<sup>2</sup> 本诊断规程使用 Takara 牌 2×Premix Ex Taq 反应混合液，并非意味着批准这些产品，而将可能也适用的其它产品排除在外。提供这种信息是为了便利本规程的用户，并不表示植检委（CPM）认可提到的化学品、试剂和/或设备。可以使用表明能够产生相同结果的等同产品。

## 聚合酶链式反应

反应混合液（每 30  $\mu\text{l}$  单一反应浓度）由以下反应物构成：

反应物	工作浓度	每反应体积 ( $\mu\text{l}$ )	最终浓度
MGW	n/a	13.1	n/a
2 $\times$ Premix Ex Taq Master Mix (Takara) 2	2 $\times$	15.0	1 $\times$
引物 GcF1	50 $\mu\text{M}$	0.15	0.25 $\mu\text{M}$
引物 GcR1	50 $\mu\text{M}$	0.15	0.25 $\mu\text{M}$
探针 GcP1	5 $\mu\text{M}$	0.6	0.10 $\mu\text{M}$
小计	-	29.0	-
DNA	-	1.0	-
总计	-	30.0	-

如可行，可加入 0.6  $\mu\text{l}$  50 $\times$ ROX 参比染料；在此情况下，要用 12.5  $\mu\text{l}$  PCR 级水。

PCR 循环参数是 95 $^{\circ}\text{C}$  10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 40 个循环。循环终止值 40 系使用 ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 或 7900 序列检测系统 (Applied Biosystems) 和上述材料及反应物获得。应注意的是：

- 扩增曲线应是指数量型
- 在污染对照是阴性的情况下，如产生  $\geq 40$  的 Ct 值，样品会被视为阳性
- 在检测和提取物抑制对照为阳性的情况下，如果产生  $\geq 40$  的 Ct 值，样品会被视为阴性

首次使用本检测方法时，每个实验室需验证循环终止值。

### 4.2.2.3 基本程序信息

必须使用柑橘叶点霉菌参照菌株的 DNA（阳性对照）作为一个额外的样品，以确保扩增成功。也必须使用柑橘叶点霉菌 DNA 提取物被其他相关病原（例如亚洲柑橘叶点霉菌）DNA 提取物替代的样品，或健康外果皮样品（阴性对照）进行 PCR 扩增。为监测可能发生的反应物污染和假阳性，必须用水替代一个样品（反应对照）。

为检测对扩增反应的抑制作用导致的假阴性反应，可在反应混合液中加入 12.5 fg IAC、75 nM IAC 正向引物 FIAC (5'-TGG CCC TGT CCT TTT ACC AG-3')、75 nM IAC 反向引物 RIAC (5'-TTT TCG TTG GGA TCT TTC GAA-3')、以及 50 nM 标有荧光报告染料 VIC<sup>™</sup> (Eurogentec) 和 quencher dye Eclipse<sup>®</sup> Dark Quencher (Eurogentec) 的 IAC MGB 水解探针 (5'-ACA CAA TCT GCC-3')。

4.2.3 通过 ITS 测序鉴定柑橘叶点霉菌

4.2.3.1 一般信息

可以通过测序对常规 PCR 获得的阳性样品予以确认（Baayen 等，2002）。真菌核糖体 RNA 基因 ITS 1 和 2 区域的测序方法如下所述：

所使用的低聚核苷酸引物为：

正向引物：ITS1（5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'）

反向引物：ITS4（5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'）（White 等，1990）。

4.2.3.2 方法

核酸的提取和纯化

应从取自待检测分离物的纯培养物的 1 cm<sup>2</sup> 菌丝体栓中提取 DNA。使用适当的 DNA 提取试剂盒，或采用更传统的方法提取 DNA，例如 L. Jones 等（2000）所描述的方法。提取出的 DNA 应储存在 4℃ 下供立即使用，或在检测不是同一天进行时储存在 -20℃ 下。

聚合酶链式反应（PCR）

单一 PCR 反应物的总体积是 50 µl，由下列反应物组成：

反应物	浓度	每反应体积（µl）	最终浓度
MGW	n/a	37.5	n/a
10×PCR 反应缓冲液（+15 mM MgCl <sub>2</sub> ） （Roche） <sup>3</sup>	2×	5.0	1× （Taq 0.024 U/µl）
dNTPs	0.8 mM（每种）	4.0	0.8 mM（每种）
引物 ITS1	10 µM	0.6	0.12 µM
引物 ITS4	10 µM	0.6	0.12 µM
DNA Taq 聚合酶（Roche） <sup>3</sup>	5 U/µl	0.3	0.03 U/µl
小计	-	48.0	-
DNA	-	2.0	-
总计	-	50.0	-

PCR 循环参数是 94℃ 30 s；94℃ 15 s，55℃ 60 s，72℃ 30 s，40 个循环；以及 72℃ 5 min。扩增子大小是 550 个 bp（Baayen 等，2002）。

<sup>3</sup> 本诊断规程使用 Roche 牌 PCR 反应缓冲液和 DNA Taq 聚合酶，并非意味着批准这些产品，而将可能也适用的其它产品排除在外。提供这种信息是为了便利本规程的用户，并不表示植检委（CPM）认可提到的化学品、试剂和/或设备。可以使用表明能够产生相同结果的等同产品。

## 扩增子测序

扩增混合物 (5 µl) 在 1.5% 琼脂凝胶上电泳, 检测是否有阳性反应。按照生产商的说明, 用适当的 PCR 纯化试剂盒对检测出的阳性反应剩余的 45 µl 反应液进行纯化。使用正向引物 ITS1 和反向引物 ITS4 测序。

### 4.2.3.3 基本程序信息

#### 扩增和分析

如有必要, 提取的 DNA 应解冻。应制备足够多的反应混合液, 至少检测一个未知分离物样品、一个含可扩增 DNA 的阳性对照, 以及一个装有水而非 DNA 的阴性对照。样品用 1.5% 琼脂凝胶溶解。将检测样品的共有序列 (引物序列除外) 与国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中业经确认的柑橘叶点霉菌模式菌株 CBS 127454 (GenBank 序列号 JF343583) 进行比较。一致性应在 99% 和 100% 之间。

## 5. 记录

应保存好 ISPM27: 2006 版 2.5 节记录明确的记录和证据。

在其他缔约方可能受到诊断结果影响的情况下, 该结果的记录和证据 (特别是培养物, 玻片、真菌结构照片、病状照片、DNA 提取物照片和分离胶) 应保存至少 1 年。

## 6. 获取进一步信息的联系点

有关柑橘叶点霉菌及其检测和鉴定方法的进一步信息可从以下渠道 (按字母顺序) 获得:

ARC—植物保护研究所生物系统学部真菌学室, 南非昆斯伍德市 0121 号私人信箱 x134 (Mariette Truter 博士; 电话: +27 12 8088281; 传真: +27 12 8088297; 电子邮箱: [truterm@arc.agric.za](mailto:truterm@arc.agric.za))。

国际植物研究所, 荷兰瓦格宁根市 6700 AA 号邮政信箱 26 (Peter J.M. Bonants 博士; 电话: +31 31 7480648; 传真: +31 31 7418094; 电子邮箱: [peter.bonants@wur.nl](mailto:peter.bonants@wur.nl))。

圣保罗大学 Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz-ESALQ/USP, 巴西圣保罗皮拉西卡巴市 (Marcel B. Spósito 博士; 电话: +55 19 34294190 转 4190; 传真: +55 19 34294414; 电子邮箱: [mbsposito@usp.br](mailto:mbsposito@usp.br))。

佛罗里达大学柑橘研究与教育中心 (CREC), 美国, FL 33850, 莱克艾尔弗雷德市试验站路 700 号 (Lavern W. Timmer 博士; 电话: +1 863 9561151; 传真: +1 863 9564631; 电子邮箱: [lwtimmer@ufl.edu](mailto:lwtimmer@ufl.edu))



关于对诊断规程进行修订的申请，可由国家植物保护机构（国家植保机构）、区域植物保护组织（区域植保组织）或植物检疫措施委员会（植检委）附属机构通过国际植保公约秘书处（[ippc@fao.org](mailto:ippc@fao.org)）提交，再由该秘书处转交制定诊断规程的技术小组。

## 7. 致谢

本规程最初由以下人员起草：

Irene Vloutoglou 博士，贝纳基植物病理学研究所，希腊雅典市 GR-145 61 Kifissia, St Delta 街 8 号（电话：+31 417 496837；传真：+30 210 8077506；电子邮箱：[i.vloutoglou@bpi.gr](mailto:i.vloutoglou@bpi.gr)）

Johan Meffert 博士，植物保护局，荷兰瓦格宁根市 6706 EA Geertjesweg 15 号（电话：+31 417 496837；传真：+31 317 421701；电子邮箱：[j.p.meffert@minlnv.nl](mailto:j.p.meffert@minlnv.nl)）

Luis E. Diaz 博士，牧业、农业与渔业部，拉圭蒙得维的亚市，CP 12900, Millán 街 4703 号（电话：+598 2 3043992；传真：+598 2 3043992；电子邮箱：[ldiaz@mgap.gub.uy](mailto:ldiaz@mgap.gub.uy)）。

## 8. 参考文献

- Aa, H.A. van der. 1973. Studies in phytophthora. *Studies in Mycology*, 5: 1–110.
- Agostini, J.P., Peres, N.A., Mackenzie, S.J., Askaveg, J.E. & Timmer, L.W. 2006. Effect of fungicides and storage conditions on postharvest development of citrus black spot and survival of *Guignardia citricarpa* in fruit tissues. *Plant Disease*, 90: 1419–1424.
- Aguilar-Vildoso, C., Barilini, J., Weichtenberger, E., de Goes, A. & Spósito, M. 2002. *Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos Citros*. Brasília, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal. Projeto CE-MERCOSUL ALA 93/143. 59 pp.
- Baayen, R.P., Bonants, P.J.M., Verkley, G., Carroll, G.C., van der Aa, H.A., de Weerd, M., van Brouwershaven, I.R., Schutte, G.C., Maccheroni Jr, W., Glienke de Blanco, C. & Azevedo, J.L. 2002. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology*, 92: 464–477.
- Baldassari, R.B., Reis, R.F. & de Goes, A. 2006. Susceptibility of fruits of the ‘Valência’ and ‘Natal’ sweet orange varieties to *Guignardia citricarpa* and the influence of the coexistence of healthy and symptomatic fruits. *Fitopatologia Brasileira*, 31: 337–341.
- Benson, A.H. 1895. Some fruit pests: Black spot of the orange. *Agricultural Gazette of New South Wales*, 6: 249–251.

- Bonants, P.J.M., Carroll, G.C., de Weerd, M., van Brouwershaven, I.R. & Baayen, R.P.** 2003. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the Citrus Black Spot fungus, *Guignardia citricarpa*. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 503–513.
- CABI.** 2011. *Guignardia citricarpa*. *Crop Protection Compendium*, 2011 edn. Wallingford, UK, CAB International. Available at <http://www.cabi.org/isc/?compid=5&dsid=26154&loadmodule=datasheet&page=481&site=144> (last accessed 2014-08-19)
- CABI/EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 1998. *Guignardia citricarpa*. *Distribution maps of quarantine pests for Europe*, no. 204. Wallingford, UK, CAB International.
- De Holanda Nozaki, M.** 2007. Produção de estruturas reprodutivas e efeito do ambiente nos tipos de sintomas produzidos por *Guignardia citricarpa* EM *Citrus* spp. PhD Thesis, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brazil. 85 pp.
- EPPO/CABI.** 1997. *Guignardia citricarpa*. In I.M. Smith & D.E. McNamara, P.R. Scott & M. Holderness, eds. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn, pp. 773–781. Wallingford, UK, CAB International. 1446 pp.
- FUNDECITRUS.** 2005. Manual de Pinta Preta. Brazil. Araquara: Fundo Paulista de Defesa da Citricultura. 10 pp. (Boletim Técnico).
- Gams, W., Hoekstra, E.S. & Antonijevic, P.** 1993. *CBS course of mycology*, 4th edn. Baarn/Delft, The Netherlands: Centraal Bureau voor Schimmelcultures. 165 pp.
- Gent-Pelzer, M.P.E. van, van Brouwershaven, I.R., Kox, L.F.F. & Bonants, P.J.M.** 2007. A TaqMan PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa* on citrus fruit. *Journal of Phytopathology*, 155: 357–363.
- Glienke, C., Pereira, O.J., Stringari, D., Fabris, J., Kava-Cordeiro, V., Galliterasawa, L., Cunningham, J., Shivas, R.G., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W.** 2011. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. *Persoonia*, 26: 47–56.
- Goes, A. de, Baldassari, R.B., Feichtenberger, E., Aguilar-Vildoso, C.I. & Spósito, M.B.** 2000. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot in Brazil. In *Abstracts of the 9th Congress of the International Society of Citriculture*, p. 145. Orlando, FL, USA, University of Florida.
- Goes, A. de.** 2001. Mancha preta dos Citros: Situação atual e perspectivas futuras. *Ciência e Prática, Bebedouro*, 20 December 2001, pp. 5–7.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. & Pegler, D.N.** 1995. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*, 8th edn. Wallingford, UK, CAB International. 650 pp.
- Hughes, K.J.D., Inman, A.J. & Cooke, D.E.L.** 2000. Comparative testing of nested PCR-based methods with bait-plant tests for detecting *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* in infected strawberry roots from fruit crops in the UK. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 30: 533–538.

- Kiely, T.B.** 1949a. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp., the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp., and its relation to black spot of citrus. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 73: 249–292.
- Kiely, T.B.** 1949b. Black spot of citrus. *The Agricultural Gazette of New South Wales*, 60: 17–20.
- Kiely, T.B.** 1960. Speckled blotch of citrus. *The Agricultural Gazette of New South Wales*, 71: 474–476.
- Klimyuk, V.I., Carroll, B.J., Thomas, C.M. & Jones, J.D.** 1993. Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis: technical advance. *Plant Journal*, 3: 493–494.
- Kotzé, J.M.** 1981. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease*, 65: 945–950.
- Kotzé, J.M.** 1996. History and epidemiology of citrus black spot in South Africa. In International Society of Citriculture. *Proceedings of the 8th International Citrus Congress* (Sun City, South Africa, 1966), pp. 1296–1299. Orlando, FL, USA, ISC.
- Kotzé, J.M.** 2000. Black spot. In L.W. Timmer, S.M. Garnsey & J.H. Graham, eds. *Compendium of Citrus Diseases*, 2nd edn, pp. 13–21. Saint Paul, MN, USA, APS Press. 128 pp.
- Lee, Y.S. & Huang, C.S.** 1973. Environmental factors on the development and discharge of ascospores of the citrus black spot fungus. *Journal of Taiwan Agricultural Research*, 22: 137–144.
- Meyer, L., Sanders, G.M., Jacobs, R. & Korsten, L.** 2006. A one-day sensitive method to detect and distinguish between the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* and the endophyte *Guignardia mangiferae*. *Plant Disease*, 90: 97–101.
- Meyer, L., Jacobs, R., Kotzé, J.M., Truter, M. & Korsten, L.** 2012. Detection and molecular identification protocols for *Phyllosticta citricarpa* from citrus matter. *South African Journal of Science*, 108.
- NAPPO** (North American Plant Protection Organization). 2010. Phytosanitary Alert System: Confirmation of citrus black spot (*Guignardia citricarpa*) in Florida, United States. NAPPO. Available at <http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=421> (last accessed on 2011-09-26).
- OEPP/EPPO.** 2003. Diagnostic protocols for regulated pests: *Guignardia citricarpa*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 33: 271–280.
- Peres, N.A., Harakava, R., Carroll, G.C., Adaskaveg, J.E. & Timmer, L.W.** 2007. Comparison of molecular procedures for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. *Plant Disease*, 91: 525–531.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Schubert, T.S., Dewdney, M.M., Peres, N.A., Palm, M.E., Jeyaprakash, A., Sutton, B., Mondal, S.N., Wang, N.-Y., Rascoe, J. & Picton, D.D. 2012. First report of *Guignardia citricarpa* associated with citrus black spot on sweet orange (*Citrus sinensis*) in North America. *Plant Disease*, 96: 1225.
- Snowdon, A.L. 1990. Black spot. In A.L. Snowdon, ed. *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables, Vol. I. General Introduction and fruits*, pp. 62–63. London, UK, Wolfe Scientific Ltd. 302 pp.
- Spósito, M.B. 2003. Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros. PhD Thesis, Universidade de São Paulo, Brazil. 112 pp.
- Spósito, M.B., Amorim, L., Bassanezi, R.B., Bergamin Filho, A. & Hau, B. 2008. Spatial pattern of black spot incidence within citrus trees related to disease severity and pathogen dispersal. *Plant Pathology*, 57: 103–108.
- Spósito, M.B., Amorim, L., Bassanezi, R.B., Yamamoto, P.T., Felipe, M.R. & Czermainski, A.B.C. 2011. Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the citrus black spot epidemic in Brazil. *Crop Protection*, 30: 1546–1552.
- Stringari, D., Glienke, C., Christo, D., Marcheroni Jr, W. & Azevedo, J.L. 2009. High molecular diversity of the fungi *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and new primers for molecular diagnosis of the citrus black spot. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52: 1061–1073.
- Sutton, B.C. & Waterston, J.M. 1991. *Guignardia citricarpa*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 10. Wallingford, UK, CAB International.
- Timmer, L.W. 2004. Evaluating the risks of introduction of citrus black spot into the U.S. In 2004 Annual report, pp. 36–38. Visalia, CA, USA, California Citrus Research Board.
- Truter, M., Labuschagne, M., Lotz, J.M., Meyer, L. & Korsten, L. 2007. Failure of *Phyllosticta citricarpa* pycnidiospores to infect Eureka lemon leaf litter. *Australasian Plant Pathology*, 36: 87–93.
- Wang, X., Chen, G., Huang, F., Zhang, J., Hyde, K.D. & Li, H. 2012. *Phyllosticta* species associated with citrus diseases in China. *Fungal Diversity*, 52: 209–224.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. & Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White, eds. *PCR protocols: A guide to methods and applications*, pp. 315–322. San Diego, CA, Academic Press. 482 pp.
- Wulandari, N.F., To-anun, C., Hyde, K.D., Duong, L.M., de Gruyter, J., Meffert, J.P., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Diversity*, 34: 23–39. Available at <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD34-2.pdf> (last accessed 2014-08-19).

## 9. 图

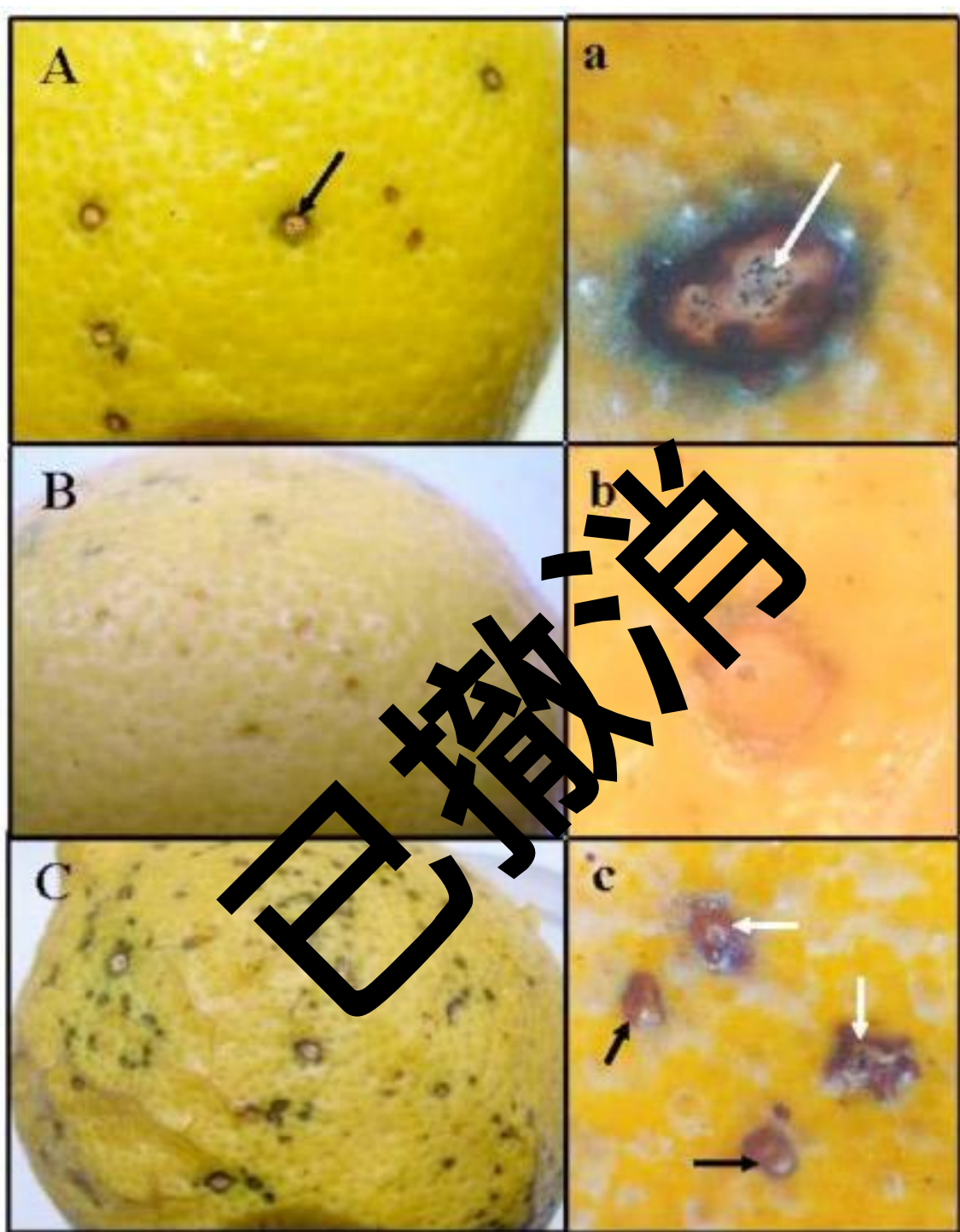
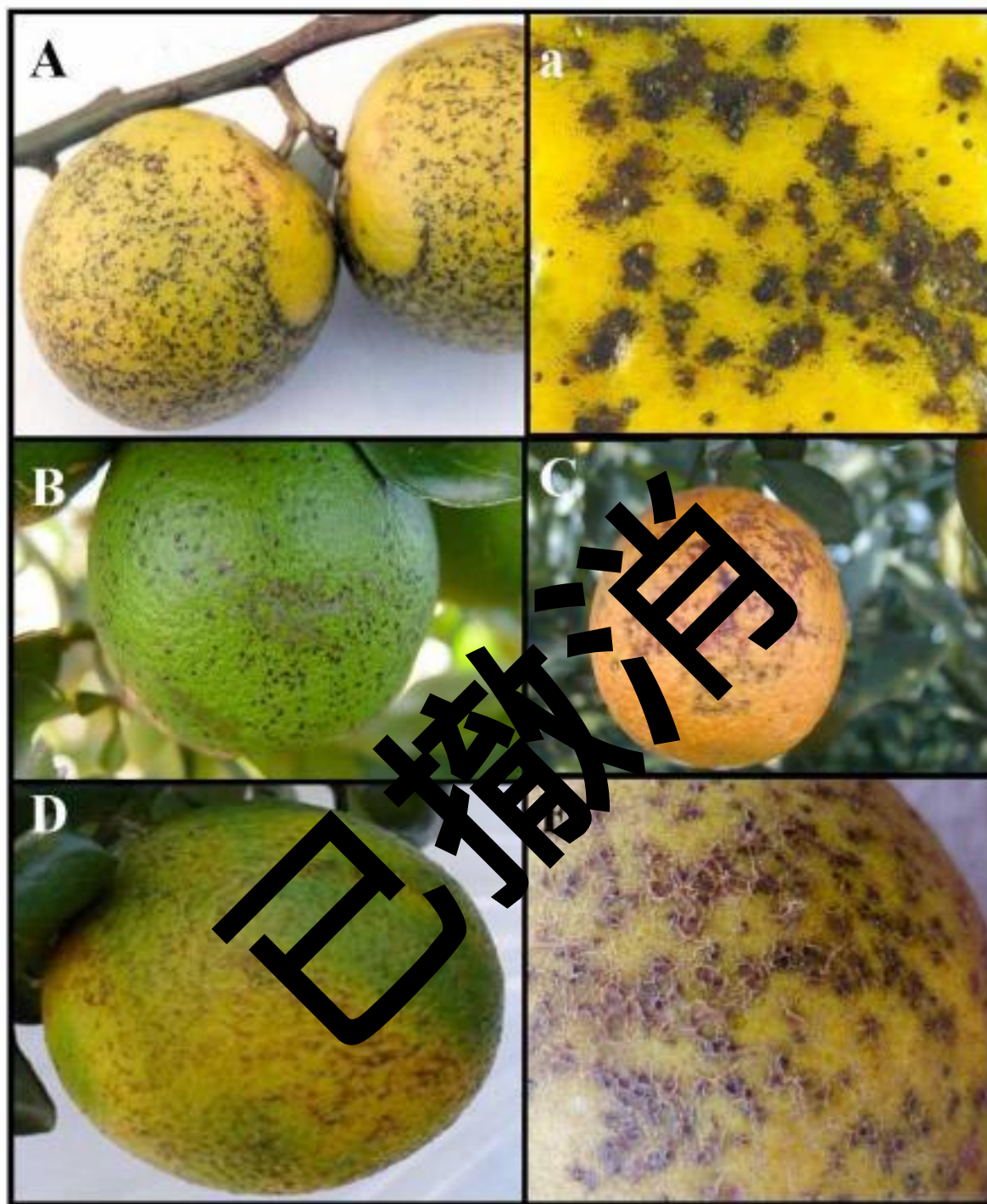


图 1. 柑橘叶点霉菌在橙子 (*Citrus sinensis*) 和柠檬 (*Citrus limon*) 果实上引起的硬斑和黑星症状：  
 (A、a) 橙子上硬斑病变，其中较大病变有无性态柑橘叶点霉菌的分生孢子器（箭头）；(B) 柠檬上的黑星病变；(b) 橙子上的黑星病变（病变中部略凹，无分生孢子器）；(C) 柠檬上的硬斑和黑星病变；  
 (c) 橙子上的黑星病变（黑箭头）以及黑星与生有分生孢子器的硬斑（白箭头）病变的中间阶段。

照片由巴西生物研究所（索罗卡巴市）的 E. Feichtenberger 提供。





**图 2.** 柑橘叶点霉菌在橙子 (*Citrus sinensis*) 和柠檬 (*Citrus limon*) 果实上引起的假黑点、黑斑、花边斑和破裂斑症状: (A) 成熟橙子上的假黑点病变; (a) 成熟橙子上周围是深色小斑的假黑点病变; (B) 绿橙上的假黑点病变; (C) 橙子上的黑斑病变 (病变凹陷, 并深及内果皮); (D) 绿橙上的花边斑症状; (E) 橙子上的破裂斑症状 (病变略凸, 破裂具不规则边缘, 无分生孢子器)。

照片由巴西柑橘植物保护基金 (FUNDECITRUS) (A、B、C、D、E) 和巴西生物研究所 (索罗卡巴市) 的 E. Feichtenberger (a) 提供。

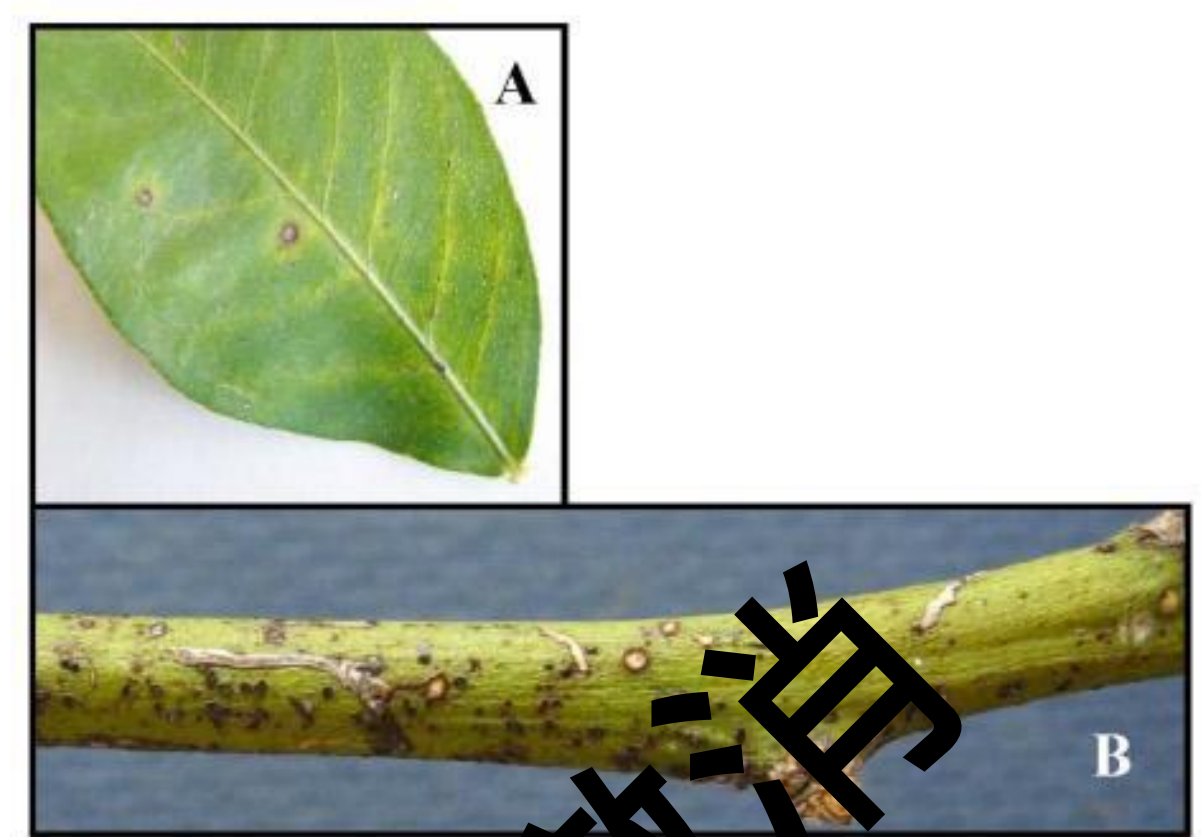


图 3. 柑橘叶点霉菌在柠檬 (*Citrus limon*) 叶片 (A) 和嫩枝 (B) 上引起的黑斑症状

照片由巴西生物研究所 (索罗卡巴市) 的 J. F. P. de Oliveira (A) 和南非农业研究理事会植物保护研究所 (比勒陀利亚市) 的 M. J. de Vries (B) 提供。

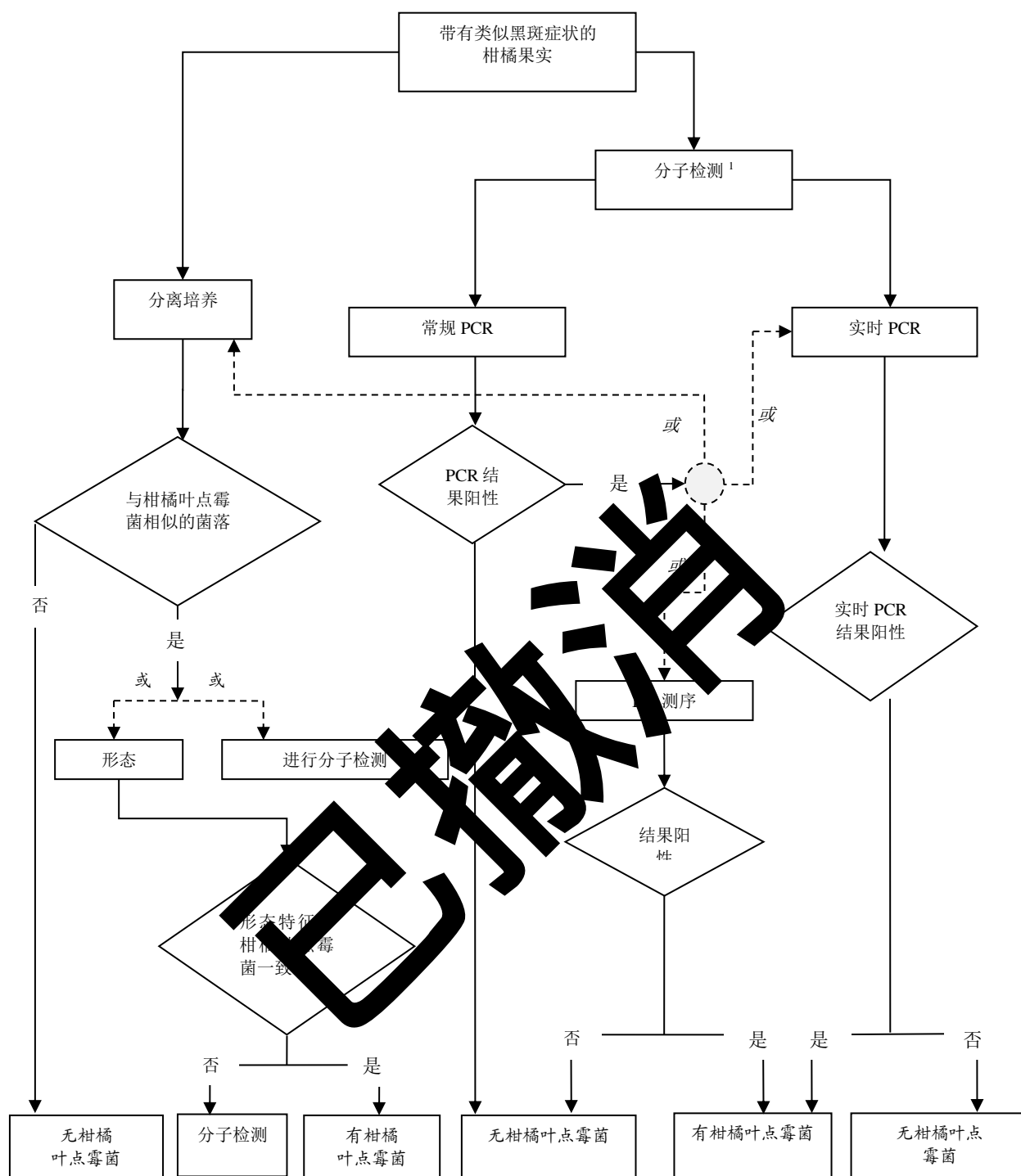


图 4. 柑橘果实上柑橘叶点霉菌检测流程图

<sup>1</sup> 已验证分子检测可用于鉴定纯培养物和果实病变，而非其他植物材料（例如叶片、嫩枝）上的微生物。  
ITS，内转录隔离区；PCR：聚合酶链式反应。



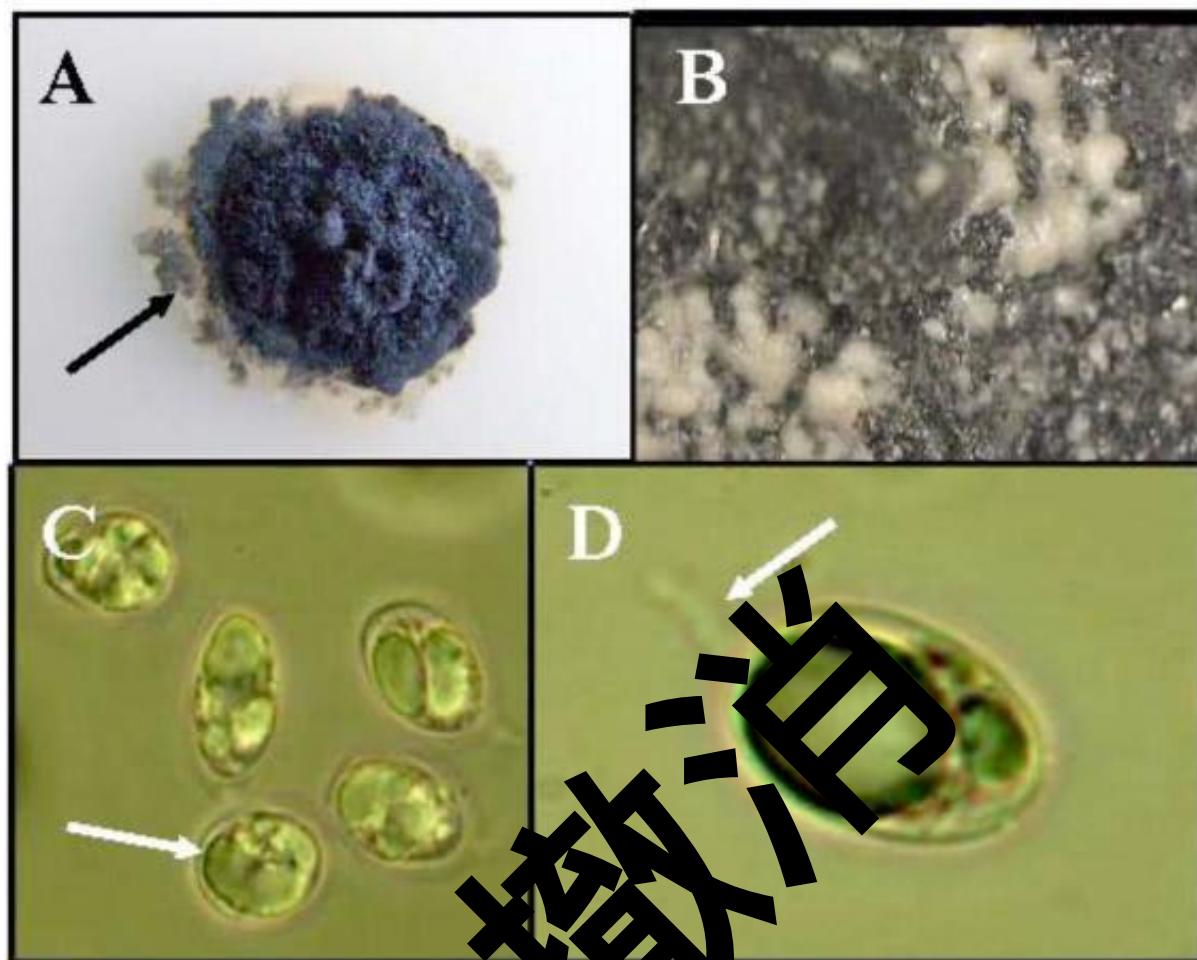


图 5. 柑橘叶点霉菌的菌落特征与分生孢子形态。(A) 25°C下 12 h 光周期在马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (pH 5.5) 上生长 30 天后, 具有以子实层菌丝体 (箭头) 形成的半透明区包围的不规则边界的菌落; (B) 成熟分生孢子器中溢出的分生孢子颈; (C、D) 带有薄黏质鞘 (C、箭头) 和无色锥形附属物的分生孢子 (D, 箭头, 油镜放大 1000 X)。

照片由乌拉圭牧业、农业与渔业部 (蒙得维的亚) 的 L.E. Diaz 提供。

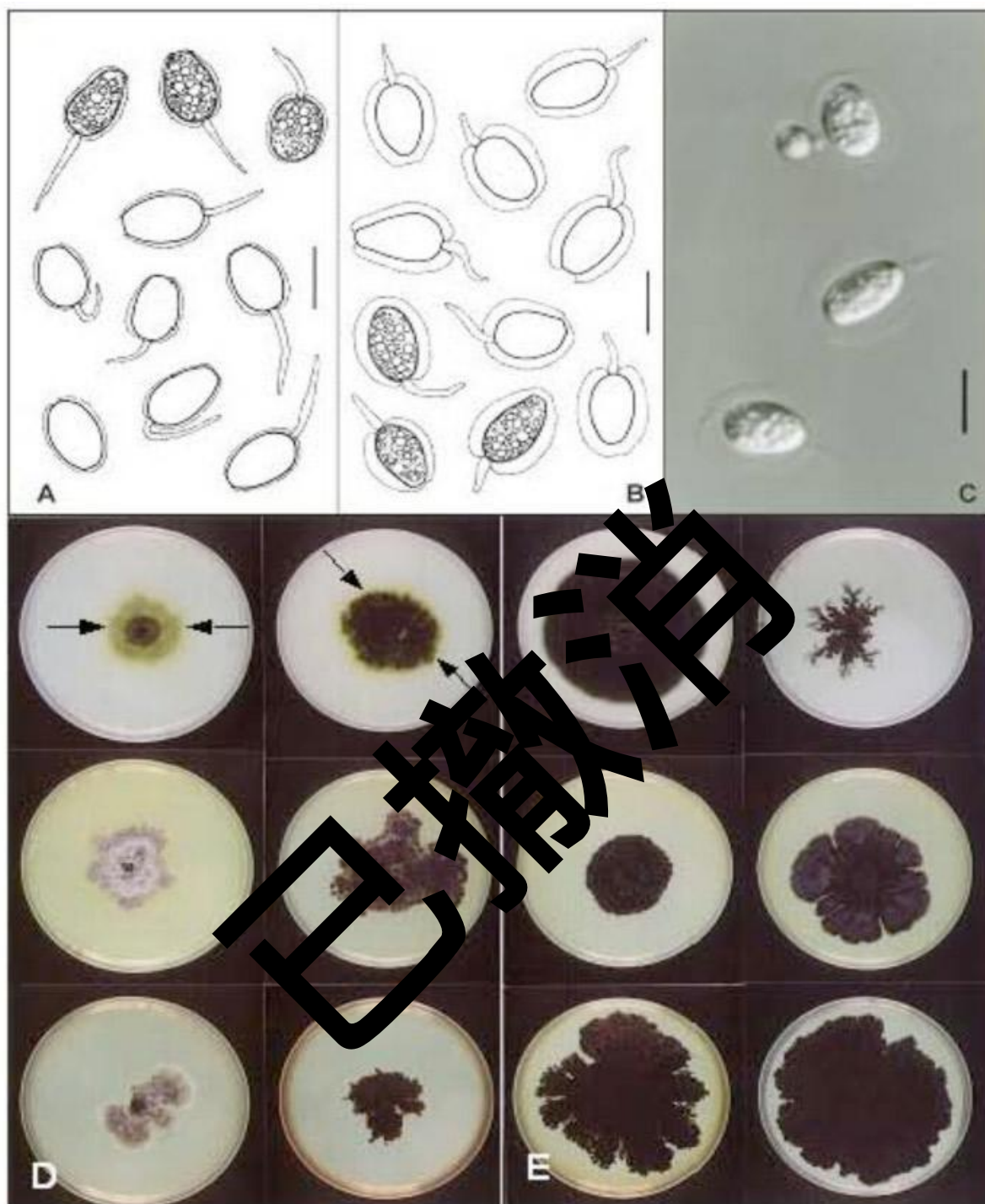


图 6. 柑橘叶点霉菌和首都叶点霉菌的分生孢子形态与培养特征: (A) 带有薄 ( $<1.5 \mu\text{m}$ ) 黏质鞘的柑橘叶点霉菌分生孢子; (B、C) 带有厚 ( $>1.5 \mu\text{m}$ ) 黏质鞘 (比例尺= $10 \mu\text{m}$ ) 的首都叶点霉菌分生孢子 (照片 C 由配有微分干涉差的光学显微镜拍摄); (D、E) 在燕麦琼脂 (顶行)、麦芽浸出液琼脂 (中间行), 以及樱桃汁琼脂 (底行) 培养基上生长 7 天后的柑橘叶点霉菌(D)和首都叶点霉菌(E)菌落 (注意在燕麦琼脂培养基 (D, 箭头) 上柑橘叶点霉菌菌落周围产生的黄色素, 生长在同一培养基上的首都叶点霉菌无此色素(E))。

照片由荷兰微生物菌种保藏中心 (乌德勒支市) 的 G. Verkley (A、B、C) 和荷兰植物保护局 (瓦格宁根市) 的 W. van Lienden (D、E) 提供。

#### 出台背景说明

这部分不属于本标准的正式内容

2006 年 3 月 植检委第一届会议增列“真菌（真菌性生物）”这一工作计划主题（2006-006）

2004 年 11 月 标准委增列“柑橘球座菌（*Sphaeria citricarpa*）”这一主题（2004-023）

2011 年 11 月 标准委以电子决定方式批准该规程供成员磋商（2011 年 11 月 6 日标准委电子决定）

2012 年 7 月 成员磋商

2013 年 3 月 名称改为水果上的柑橘叶点霉菌（*Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa）（2004-023）

2013 年 7 月 诊断规程技术小组进行修订并提交标准委批准供通过（2013 年 6 月 1 日诊断规程技术小组电子论坛）

2013 年 10 月 标准委以电子决定方式批准该规程，使其进入 45 天通知期（2013 年 11 月 13 日标准委电子决定）

2014 年 12 月 1 日 诊断规程通知期一收到正式反对意见

2014 年 2 月 3 日 诊断规程技术小组在虚拟会议上进行修订

2014 年 标准委以电子决定方式批准该规程，使其进入 45 天通知期（2014 年 11 月 1 日标准委电子决定）

2014 年 7 月 8 日 诊断规程通知期

2014 年 8 月 标准委代表食典委通过了诊断规程

**ISPM 27. 2006: 附件 5.** 水果上的柑橘叶点霉菌（*Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa）（2014 年）。

罗马粮农组织《国际植保公约》

出台背景最后修订时间：2014 年 8 月 29 日