

◆ Normes OEPP ◆

PROTOCOLES DE DIAGNOSTIC POUR LES ORGANISMES REGLEMENTES

CERATOCYSTIS FAGACEARUM

PM 7/1(1) Français



Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes
1, rue Le Nôtre, 75016 Paris, France

APPROBATION

Les Normes OEPP sont approuvées par le Conseil de l'OEPP. La date d'approbation figure dans chaque norme. Selon les termes de l'Article II de la CIPV, il s'agit de Normes régionales pour les membres de l'OEPP.

REVISION

Les Normes OEPP sont sujettes à des révisions et des amendements périodiques. La prochaine date de révision de cette Norme OEPP est décidée par le Groupe de travail pour l'étude de la réglementation phytosanitaire.

ENREGISTREMENT DES AMENDEMENTS

Des amendements seront préparés si nécessaire, numérotés et datés. Les dates de révision figurent (si nécessaire) dans chaque norme individuelle.

DISTRIBUTION

Les Normes OEPP sont distribuées par le Secrétariat de l'OEPP à tous les Etats membres de l'OEPP. Des copies sont disponibles, sous certaines conditions, auprès du Secrétariat de l'OEPP pour toute personne intéressée.

CHAMP D'APPLICATION

Les protocoles de diagnostic de l'OEPP pour les organismes réglementés sont destinés aux Organisations Nationales de Protection des Végétaux, en leur qualité d'autorités responsables de l'application de mesures phytosanitaires pour la détection et l'identification des organismes nuisibles réglementés des listes de l'OEPP et/ou de l'Union européenne.

L'OEPP a initié en 1998 un nouveau programme de préparation de protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés de la région OEPP (y compris l'UE). Le travail est réalisé par le Groupe d'experts OEPP sur le diagnostic et d'autres Groupes d'experts spécialisés. L'objectif du programme est de développer, pour chaque organisme nuisible réglementé, un protocole de diagnostic approuvé internationalement. Les protocoles reposent sur les nombreuses années d'expérience des experts de l'OEPP. La première version d'un protocole est préparée par un expert. Elle est rédigée suivant le "format et contenu communs d'un protocole de diagnostic" approuvé par le Groupe d'experts sur le diagnostic, modifié, le cas échéant, dans les cas individuels. En règle générale, un protocole recommande un moyen de détection ou d'identification particulier considéré avoir des avantages sur les autres (du point de vue de la fiabilité, la facilité d'utilisation, etc.). D'autres méthodes sont parfois mentionnées, en précisant leurs avantages/inconvénients. Des justifications doivent être fournies si on utilise une méthode qui n'est pas mentionnée dans le protocole.

REFERENCES

- EPPO/CABI (1996) *Organismes de quarantaine pour l'Europe*, 2ème edn. CAB International, Wallingford (GB).
- CIPV (1993) *Principes de quarantaine végétale liés au commerce international*. NIMP no. 1. Secrétariat de la CIPV, FAO, Rome (IT).
- CIPV (1999) *Glossaire des termes phytosanitaires*. NIMP no. 5. Secrétariat de la CIPV, FAO, Rome (IT).
- FAO (1997) *Convention internationale pour la protection des végétaux* (nouveau texte révisé). FAO, Rome (IT).
- OEPP/EPPO (1999) Normes OEPP PM 1/2(8) Listes A1 et A2 d'organismes de quarantaine de l'OEPP. In *Normes OEPP PM1 Mesures phytosanitaires générales*, pp. 5-17. OEPP/EPPO, Paris (FR).
- UE (2000) Directive du Conseil 2000/29/EC du 8 mai 2000 concernant les mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre leur propagation à l'intérieur de la Communauté. *Journal Officiel des Communautés Européennes* **L169**, 1- 112.

DEFINITIONS

Organisme nuisible réglementé

Organisme de quarantaine ou organisme réglementé non de quarantaine.

Organisme de quarantaine

Organisme nuisible qui a une importance potentielle pour l'économie de la zone menacée et qui n'est pas encore présent dans cette zone ou bien qui y est présent mais n'y est pas largement disséminé et fait l'objet d'une lutte officielle.

VUE D'ENSEMBLE

Les protocoles de diagnostic de l'OEPP pour les organismes réglementés donnent toutes les informations nécessaires à la détection et l'identification d'un organisme nuisible donné par un expert généraliste (c'est à dire un entomologiste,

mycologue, virologue, bactériologiste, etc.), qui n'est pas nécessairement par un spécialiste de l'organisme ou du groupe taxonomique. Chaque protocole débute avec de brèves informations générales sur l'organisme nuisible (aspect, relations avec d'autres organismes, gamme d'hôte, effets sur l'hôte, répartition géographique et identité), puis donne des détails sur la détection, l'identification la comparaison avec des espèces similaires, les exigences pour un diagnostic positif, une liste d'instituts ou d'individus susceptibles de fournir des informations supplémentaires sur cet organisme, des références (sur le diagnostic, la méthode de détection/extraction, les méthodes de test).

NORMES OEPP DEJA EXISTANTES DANS CETTE SERIE

Cette série est nouvelle.

Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés

CERATOCYSTIS FAGACEARUM

Champ d'application spécifique

Approbation et amendement spécifiques

Cette norme décrit un protocole de diagnostic pour *Ceratocystis fagacearum*. Approbation initiale en 2000-09.

Introduction

Ceratocystis fagacearum est l'agent du flétrissement du chêne en Amérique du nord et ne s'est pas encore disséminé à d'autres continents. Il s'agit d'un pathogène classique de flétrissement vasculaire; il reste confiné dans les vaisseaux les plus externes du xylème jusqu'à ce que l'arbre soit moribond. Les greffes naturelles de racines constituent le moyen de dispersion le plus important. La maladie peut également être disséminée au dessus du sol par des coléoptères tels que *Colopterus truncatus* et *C. sayi* (Nitidulidae) ou, dans certaines régions, *Pseudopityophthorus minutissimus* et *P. pruinosus* (Scolytidae).

Identité

Nom: *Ceratocystis fagacearum* (Bretz) Hunt

Anamorphe: *Chalara quercina* Henry

Synonyme: *Endoconidiophora fagacearum* Bretz

Classement taxonomique: Fungi: Ascomycota: Microascales

Code informatique Bayer: CERAFA

Organisme de quarantaine: no. 6 de la Liste A1 de l'OEPP; Annexe UE I/A1

Détection

Symptômes de maladie

En été, l'ensemble de l'arbre présente un flétrissement soudain du feuillage, suivi de sa mort. Les feuilles brunissent occasionnellement à partir de leur extrémité, leur base restant verte. L'anneau le plus externe du xylème présente parfois des stries longitudinales noires. Ces symptômes sont similaires à ceux causés par d'autres organismes responsables de flétrissement. En revanche, contrairement à d'autres maladies, le flétrissement du chêne se manifeste parfois par la formation de masses sporulantes sous l'écorce quelques mois après la mort de l'arbre. Elles se caractérisent par un "coussin-pression" central entouré d'une masse mycélienne grisâtre et de structures sporulantes. Ces masses mycéliennes dégagent une forte odeur fruitée. Le bois de chêne portant ces masses sporulantes constitue la filière la plus probable de dissémination internationale du champignon. L'expression des symptômes varie selon l'espèce de *Quercus*. La présence de masses sporulantes est caractéristique de *C. fagacearum*, mais ces amas ne sont souvent pas formés sur les arbres malades. L'isolement et l'identification du champignon *in vitro* restent donc nécessaires.

Isolement

Les échantillons doivent de préférence être prélevés sur des branches atteintes de 2 cm de diamètre dont l'écorce interne est encore fraîche et verte. Plusieurs branches doivent être échantillonnées car toutes ne portent pas le champignon. Plusieurs éclats de bois (1 mm³ à 1 cm³) doivent être prélevés dans les deux ou trois anneaux de l'année, puis stérilisés en les trempant dans de l'alcool à 70% et en les flambant. Les lambeaux sont ensuite enfoncés dans du MEA Difco à 2% (le type de milieu n'a pas une importance critique) dans des boîtes de Petri de 9 cm qui sont ensuite scellées (fig. 1). Les isolats peuvent être examinés après 8-10 jours, à la lumière ou à l'obscurité, à 20-25°C.

Identification

Caractéristiques de croissance en culture

Le mycélium apparaît généralement autour des éclats au bout de 3-5 jours. Les conidiophores sont généralement formés en groupes diffus et sont fréquemment produits uniquement sur certaines portions du mycélium. De fines branches mycéliennes fréquemment courbées ou enroulées peuvent être observées. La culture est grisâtre et dégage une odeur fruitée sur MEA (dans la mesure où les conditions de confinement et de sécurité du laboratoire sont respectées). Les endoconidiophores et les endospores de l'anamorphe sont produits. Il est recommandé de comparer la culture à un isolat de référence connu.

Si les deux types reproductifs du champignon sont présents, les périthèces apparaissent après 7-10 jours et exsudent une masse blanc-crème d'ascospores. Toutefois, dans la pratique, les isolats du xylème n'appartiennent qu'à un seul type reproductif. Afin d'observer des périthèces, il faut cultiver le champignon étudié en présence d'isolats de référence connus appartenant aux deux types reproductifs de *C. fagacearum*.

Morphologie en culture

Hyphes: subhyalins à bruns, ramifiés, 2,5-6 µm de diamètre.

Conidiophores: subhyalins à bruns, cloisonnés, simples ou ramifiés, 2,5-5 µm de diamètre, et souvent légèrement effilés à leurs extrémités.

Conidies: hyalines, continues, cylindriques, tronquées à chaque extrémité, 2-4,5 × 4-22 µm (moyenne 3 × 6,5 µm), endogènes et en chapelets.

Sclérotés: parfois présents, bruns à noirs, à mailles lâches, de forme irrégulière, d'un diamètre pouvant atteindre 2,5 cm.

Périthèces: en forme de gourde, noires, à base sphéroïdale, de diamètre 240-380 µm et avec un bec érigé de 250-450 µm de longueur.

Ascospores: hyalines, unicellulaires, elliptiques, de dimensions 2-3 × 5-10 µm, et exsudées en masses gluantes de couleur blanc-crème.

Méthodes de biologie moléculaire

Un système d'identification des *Ceratocystis* spp. par PCR a été décrit par Witthuhn *et al.* (1999), mais n'a pas encore fait l'objet d'une évaluation critique pour l'identification de *C. fagacearum*.

Comparaison avec des espèces similaires

Plusieurs champignons similaires ont été signalés sur chêne. Les espèces d'*Ophiostoma* peuvent être distinguées de *C. fagacearum* grâce à leurs anamorphes *Leptographium*, *Graphium* ou *Sporotrix*. Les espèces de *Ceratocystis* ressemblant davantage à *C. fagacearum* s'en distinguent, entre autres, par la taille et la forme de leurs ascospores.

Autres champignons ophiostomatoïdes sur chêne:

- *Ceratocystis coerulescens* (Münch) Bakshi
- *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halstead
- *Ceratocystis moniliformis* (Hedgcock) Moreau
- *Ophiostoma leptographioides* (Davidson) von Arx
- *Ophiostoma megalobrunneum* (Davidson & Toole) de Hoog & Scheffer
- *Ophiostoma plurianulata* (Hedgcock) H. & P. Sydow
- *Ophiostoma quercus* (Georgevitch) Nannfeldt
- *Ophiostoma rostricylindricum* (Davidson) von Arx
- *Ophiostoma stenoceras* (Robak) Melin & Nannfeldt

Cultures de référence

ATCC, 12301 Parklane Drive, Rockville, Maryland 20852-1776 (Etats-Unis). Fax: +1 301 231 5826.

CBS, Oosterstraat 1, P.O. Box 273, 3740 AG Baarn (Pays-Bas). Fax: +31 35 541 6142.

Exigences pour une identification positive

Les procédures de détection et d'identification décrites dans ce protocole doivent avoir été suivies. Le champignon doit avoir été isolé en culture pure. Les caractéristiques de croissance du champignon et la morphologie des organes fongiques en culture doivent être celles de *Chalara quercina*, telles que décrites dans le protocole. Si des périthèces sont formés (en cultivant avec des isolats de référence de *C. fagacearum*), ils doivent correspondre à la description donnée dans le protocole. La présence d'une forte odeur fruitée, comparable à celle de l'isolat de référence, peut confirmer l'identification (dans la mesure où les conditions de confinement et de sécurité du laboratoire concerné sont respectées).

Rapport sur le diagnostic

Le rapport sur la mise en oeuvre du protocole doit comporter:

- des informations sur l'origine du matériel infecté;
- une description des symptômes de maladie (y compris des photographies);
- une description des caractéristiques de croissance du champignon *in vitro*;
- des mesures, ainsi que des dessins ou photographies, des organes fongiques;
- une indication de l'importance de l'infection dans la marchandise;
- des commentaires sur les certitudes ou les doutes relatifs à l'identification.

Une culture pure du pathogène isolé doit être conservée.

Renseignements supplémentaires

Des renseignements supplémentaires sur cet organisme peuvent être obtenus auprès de:

J.N. Gibbs, Forest Research, Alice Holt Lodge, Farnham, Surrey GU10 4LH (UK)

J. Pinon, INRA, Centre de Recherche de Nancy, 54280 Champenoux (France)

W.L. MacDonald, Division of Plant & Soil Science, West Virginia University, Morgantown, WV 26506-6057 (USA)

F.H. Tainter, Department of Forest Resources, Clemson University, Clemson, SC 29634 (USA)

D.N. Appel, Department of Plant Pathology and Microbiology, Texas A&M University, College Station, TX 77843-2132 (USA).

Remerciements

Ce protocole a été initialement préparé par:

R. Pieters, Plantenziektenkundige Dienst, P.O. Box 9102, 6700 HC Wageningen (Netherlands).

J.N. Gibbs, Forest Research, Alice Holt Lodge, Farnham, Surrey GU10 4LH (UK).

Références

Barnett HL (1953) Isolation and identification of the oak wilt fungus. *Bulletin of the West Virginia University Agricultural Experiment Station* no. 359, 5-15.

EPPO/CABI (1997) *Ceratocystis fagacearum* and its vectors. In *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn, pp. 668-673. CAB International, Wallingford (GB).

Henry BW (1944) *Chalara quercina* n.sp., the cause of oak wilt. *Phytopathology* **34**, 631-635.

Hunt J (1956) Taxonomy of the genus *Ceratocystis*. *Lloydia* **19**, 1-58.

Wingfield MJ, Seifert KA & Webber JF (1992) *Ceratocystis and Ophiostoma*, Taxonomy, Ecology and Pathogenicity. APS Press, St Paul (US).

Witthuhn RC, Wingfield BD, Wingfield MJ & Harrington TC (1999) PCR-based identification and phylogeny of species of *Ceratocystis sensu stricto*. *Mycological Research* **103**, 743-749.

Fig. 1 Cultures de *Ceratocystis fagacearum* poussant sur des morceaux de xylème de chêne sur gélose Difco malt extract contenant 100 mg L⁻¹ de streptomycine.

