

European and Mediterranean Plant Protection Organization
Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes

Normes OEPP EPPO Standards

Diagnostic protocols for regulated pests
Protocoles de diagnostic pour les organismes
réglementés

PM 7/15



European and Mediterranean Plant Protection Organization
1, rue Le Nôtre, 75016 Paris, France

Approval

EPPO Standards are approved by EPPO Council. The date of approval appears in each individual standard. In the terms of Article II of the IPPC, EPPO Standards are Regional Standards for the members of EPPO.

Review

EPPO Standards are subject to periodic review and amendment. The next review date for this EPPO Standard is decided by the EPPO Working Party on Phytosanitary Regulations.

Amendment record

Amendments will be issued as necessary, numbered and dated. The dates of amendment appear in each individual standard (as appropriate).

Distribution

EPPO Standards are distributed by the EPPO Secretariat to all EPPO member governments. Copies are available to any interested person under particular conditions upon request to the EPPO Secretariat.

Scope

EPPO Diagnostic Protocols for Regulated Pests are intended to be used by National Plant Protection Organizations, in their capacity as bodies responsible for the application of phytosanitary measures to detect and identify the regulated pests of the EPPO and/or European Union lists.

In 1998, EPPO started a new programme to prepare diagnostic protocols for the regulated pests of the EPPO region (including the EU). The work is conducted by the EPPO Panel on Diagnostics and other specialist Panels. The objective of the programme is to develop an internationally agreed diagnostic protocol for each regulated pest. The protocols are based on the many years of experience of EPPO experts. The first drafts are prepared by an assigned expert author(s). They are written according to a 'common format and content of a diagnostic protocol' agreed by the Panel on Diagnostics, modified as necessary to fit individual pests. As a general rule, the protocol recommends a particular means of detection or identification which is considered to have advantages (of reliability, ease of use, etc.) over other methods. Other methods may also be mentioned, giving their advantages/disadvantages. If a method not mentioned in the protocol is used, it should be justified.

Many protocols include laboratory tests involving the use of chemicals or apparatus which may present a certain hazard. In all cases, local safety procedures should be strictly followed.

The use of names of chemicals or equipment in these EPPO Standards implies no approval of them to the exclusion of others that may also be suitable.

References

EPPO/CABI (1996) *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn. CAB International, Wallingford (GB).

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.

Révision

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.

Ces protocoles font souvent appel à des analyses de laboratoire basées sur l'utilisation de produits chimiques ou d'appareils qui peuvent présenter un certain danger. Il est important, dans tous les cas, de suivre rigoureusement les procédures locales de sécurité.

L'utilisation de noms de produits chimiques ou de matériel dans ces Normes OEPP n'implique aucune approbation particulière et n'exclut pas l'utilisation d'autres produits chimiques ou matériel adéquats.

Références

EPPO/CABI (1996) *Organismes de Quarantaine pour l'Europe* (2ème edn). CAB International, Wallingford (GB).

- EU (2000) Council Directive 2000/29/EC of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community. *Official Journal of the European Communities* L169, 1–112.
- FAO (1997) *International Plant Protection Convention* (new revised text). FAO, Rome (IT).
- IPPC (1993) *Principles of Plant Quarantine as related to International Trade*. ISPM no. 1. ISPM Secretariat, Rome (IT).
- IPPC (1999) *Glossary of Phytosanitary Terms*. ISPM no. 5. IPPC Secretariat, FAO, Rome (IT).
- OEPP/EPPO (1999) EPPO Standards PM 1/2(8) EPPO A1 and A2 lists of quarantine pests. In: *EPPO Standards PM1 General Phytosanitary Measures*, pp. 5–17. OEPP/EPPO, Paris (FR).

Definitions

Regulated pest: a quarantine pest or regulated non-quarantine pest.

Quarantine pest: a pest of potential economic importance to the area endangered thereby and not yet present there, or present but not widely distributed and being officially controlled.

Outline of requirements

EPPO Diagnostic Protocols for Regulated Pests provide all the information necessary for a named pest to be detected and positively identified by a general expert (i.e. an entomologist, mycologist, virologist, bacteriologist, etc.) but not necessarily a specialist on the organism or its taxonomic group. Each protocol begins with some short general information on the pest (its appearance, relationship with other organisms, host range, effects on host, geographical distribution and its identity) and then gives details on the detection, identification, comparison with similar species, requirements for a positive diagnosis, list of institutes or individuals where further information on that organism can be obtained, references (on the diagnosis, detection/extraction method, test methods).

Existing EPPO Standards in this series

Thirteen EPPO Standards on Diagnostic Protocols have already been approved and published. Each standard is numbered in the style PM 7/4 (1), meaning an EPPO Standard on Phytosanitary Measures (PM), in series no. 7 (Diagnostic Protocols), in this case standard no. 4, first version. The existing standards are:

- PP 7/1 (1) *Ceratocystis fagacearum*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 41–44
- PP 7/2 (1) Tobacco ringspot nepovirus. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 45–51
- PP 7/3 (1) *Thrips palmi*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 53–60
- PP 7/4 (1) *Bursaphelenchus xylophilus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 61–69
- PP 7/5 (1) *Nacobbus aberrans*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 71–77
- PP 7/6 (1) *Chrysanthemum stunt poxvirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 245–253
- PP 7/7 (1) *Aleurocanthus spiniferus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 255–259
- PP 7/8 (1) *Aleurocanthus woglumi*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 261–265
- PP 7/9 (1) *Cacoecimorpha pronubana*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 267–275
- PP 7/10 (1) *Cacysyus marshalli*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 277–279
- PP 7/11 (1) *Frankliniella occidentalis*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 281–292
- PP 7/12 (1) *Parasaissetia nigra*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 293–298
- PP 7/13 (1) *Trogoderma granarium*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **32**, 299–310

- 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.

Définitions

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.), et 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 déjà existantes dans cette série

Treize protocoles de diagnostic OEPP ont déjà été approuvées et publiées. Chaque norme est individuellement numérotée: par exemple la norme PM 7/4 (1) est une Norme OEPP sur les mesures phytosanitaires (PM), appartenant à la série 7 (protocoles de diagnostic); il s'agit dans ce cas de la Norme 4, 1ère version. Les normes existantes sont:

Diagnostic protocols for regulated pests Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés

Ciborinia camelliae

Specific scope

This standard describes a diagnostic protocol for *Ciborinia camelliae*.

Specific approval and amendment

First approved in 2002-09.

Champ d'application spécifique

Cette norme décrit un protocole de diagnostic pour *Ciborinia camelliae*.

Approbation et amendement spécifiques

Première approbation en 2002-09.

Introduction

Camellia flower blight (EPPO/CABI, 1997) is one of the most serious diseases of *Camellia* spp. in the USA (Brooks, 1979), Japan (Kohn & Nagasawa, 1984) and New Zealand (Stewart & Neilson, 1993). It reached Europe in the late 1990s where it is now present in several countries. The disease is specific to camellias. The flowers are normally the only part of the plant affected. Infected by ascospores in the spring, they become blighted and fall prematurely. The fungus develops sclerotia in the fallen flower remains that overwinter, producing apothecia and releasing ascospores during wet weather in the spring. These infect the petals of opening flower buds at temperatures of 15–21 °C. The teleomorph was first detected in Europe (Italy) in 2001. Microscopic details of fungal structures cited here follow the description provided by Kohn & Nagasawa (1984) and copies of illustrations from this paper are included as figures in the Appendix.

Identity

Name: *Ciborinia camelliae* (Hara) Kohn

Synonym: *Sclerotinia camelliae* Hara

Taxonomic position: Fungi; Ascomycota; Helotiales

Bayer computer code: SCLECA

Phytosanitary categorization: EPPO A2 list no. 190, EU Annex designation II/A1

Detection

Small brown spots scattered over the petals develop into an aggressive, spreading brown rot that rapidly reaches the base of one of the petals. From there it spreads upwards in all the petals (about 1 cm per day), the margins being the last to rot. If the flower is inverted and the sepals removed at this stage, a white to whitish-grey ring of felt-like, sterile mycelium is seen around the bases of the petals. This is very diagnostic, but the fungal growth is very fine and, at first sight, resembles host tissue. See under 'Comparison with similar species' for comparison with *Botryotinia fuckeliana*.

Introduction

Ciborinia camelliae (EPPO/CABI, 1997) est l'agent d'une des maladies les plus sévères des *Camellia* spp. (camélias) aux Etats-Unis (Brooks, 1979), au Japon (Kohn & Nagasawa, 1984) et en Nouvelle-Zélande (Stewart & Neilson, 1993). Il a atteint l'Europe à la fin des années 1990 et est maintenant présent dans plusieurs pays. La maladie est spécifique aux camélias. Elle attaque en principe uniquement les fleurs. Celles-ci sont infectées par des ascospores au printemps, flétrissent et tombent prématurément. Le champignon développe pendant l'hiver des scléroties dans les restes de fleurs tombées. Ces scléroties produisent des apothécies qui libèrent des ascospores au printemps en conditions climatiques humides. Les ascospores infectent les pétales des bourgeons floraux en train de s'ouvrir, à des températures de 15–21 °C. Le téléomorphe a été détecté pour la première fois en Europe (Italie) en 2001. Les détails microscopiques des structures fongiques cités ici proviennent de la description de Kohn & Nagasawa (1984) et des copies d'illustrations de leur article figurent en annexe.

Identité

Nom: *Ciborinia camelliae* (Hara) Kohn

Synonyme: *Sclerotinia camelliae* Hara

Classement taxonomique: Fungi; Ascomycota; Helotiales

Code informatique Bayer: SCLECA

Catégorisation phytosanitaire: Liste A2 de l'OEPP no. 190; Désignation annexe UE II/A1

Détection

De petites taches brunes dispersées sur les pétales se développent pour former une pourriture brune agressive qui s'étend et atteint rapidement la base de l'un des pétales. Le brunissement se développe ensuite dans tous les pétales, à partir de la base de la fleur (environ 1 cm par jour), les bords étant les derniers à pourrir. En retournant la fleur et en enlevant les sépales, on peut observer à ce stade un anneau blanc à blanc-gris de mycélium feutré et stérile au point d'insertion des pétales. Ceci constitue un diagnostic fiable, mais le mycélium est très fin et ressemble au premier abord aux tissus de l'hôte (voir 'Comparaison avec des espèces similaires' pour une comparaison avec *Botryotinia fuckeliana*).

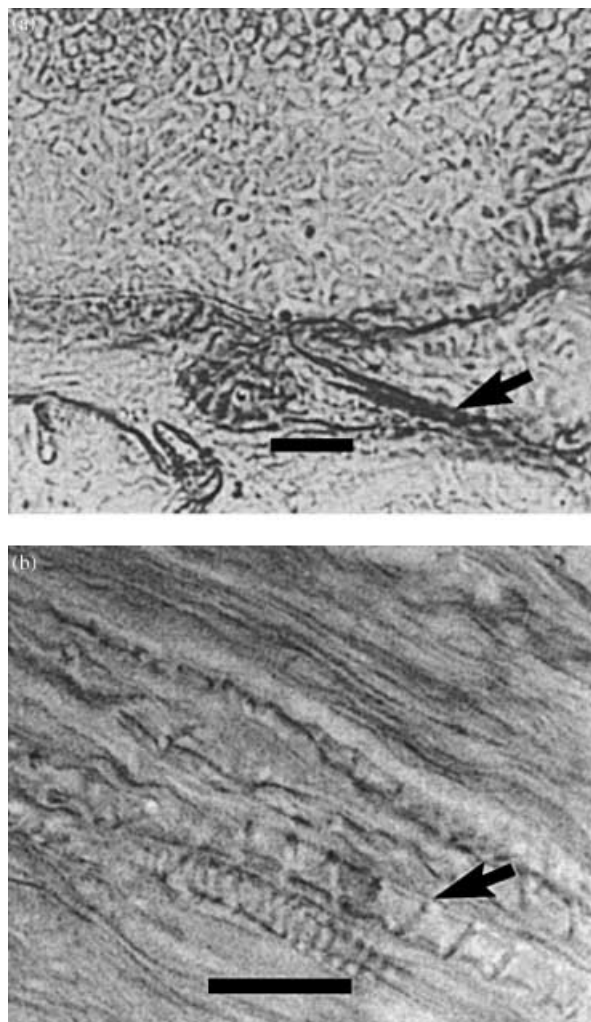


Fig. 1 Longitudinal sections through centres of sclerotia of *Ciborinia camelliae* formed *in vivo*. Arrows indicate host tissue: (a) wall of a polygonal cell; (b) spiral thickening of a vessel. Sections longitudinales au centre de sclérotés de *C. camelliae* formés *in vivo*.

Les flèches indiquent le tissu de hôte: (a) paroi d'une cellule polygonale; (b) épaississement en spirale d'un vaisseau. Bars/trait = 20 µm. This figure (and all following figures) courtesy of Kohn & Nagasawa (1984).

During periods of wet weather, spermodochia (or stromata) bearing conidiophores and chains of microconidia are formed as small black droplets at the base or in the centre of one or two petals. On older infections, spermodochia are aggregated and form slimy black patches. The presence of spermodochia, seen with a microscope, can be used as a confirmatory diagnostic feature (see 'Morphological identification – *in vitro*' for the microscopic details). Characteristically, the flower structure remains well preserved. Indeed, the whole blighted flower can be squeezed in the hand yet remain intact (unlike rots due to *Botrytis* and *Penicillium*, which shatter the flower, causing premature petal fall). After 2–3 weeks, sclerotia appear at the bases of the petals reflecting the positions of the sepals. The sclerotia can be detected as firm flattened structures when the petal bases are rubbed between the fingers. With the remains of the flower parts still embedded in them, the sclerotia persist within the leaf litter, often still joined together in a ring reflecting the previous position of the sepals. (The incorporation of host plant tissue can be confirmed microscopically, see Fig. 1a and b). With young infections showing only brown spotting on non-rotted petals, spermodochia

Lors de périodes humides, des spermodochies (ou stromas) portant des conidiophores et des chaînes de microconidies sont produits. Elles prennent la forme de petites gouttelettes noires situées à la base ou au centre d'un ou deux pétales. Dans le cas d'infections plus âgées, les spermodochies agrégées entre-elles forment des plaques noires d'aspect visqueux. L'observation des spermodochies au microscope permet de confirmer le diagnostic (voir 'identification morphologique – *in vitro*' pour les détails microscopiques). La structure de la fleur reste typiquement bien préservée. La fleur flétrie serrée dans la main reste intacte (contrairement aux pourritures dues à *Botrytis* et *Penicillium* qui décomposent la fleur et entraînent une chute prématurée des pétales). 2–3 semaines après la contamination des fleurs, des sclérotés se développent à la base des pétales reflétant la position des sépales. Les sclérotés sont des structures fermes et aplaties lorsqu'on presse la base des pétales entre les doigts. Ils contiennent encore des restes de tissus floraux et persistent dans la litière de feuilles. Ils restent souvent adhérents entre eux pour former une couronne rappelant la position initiale des sépales (l'incorporation de tissus de l'hôte peut être

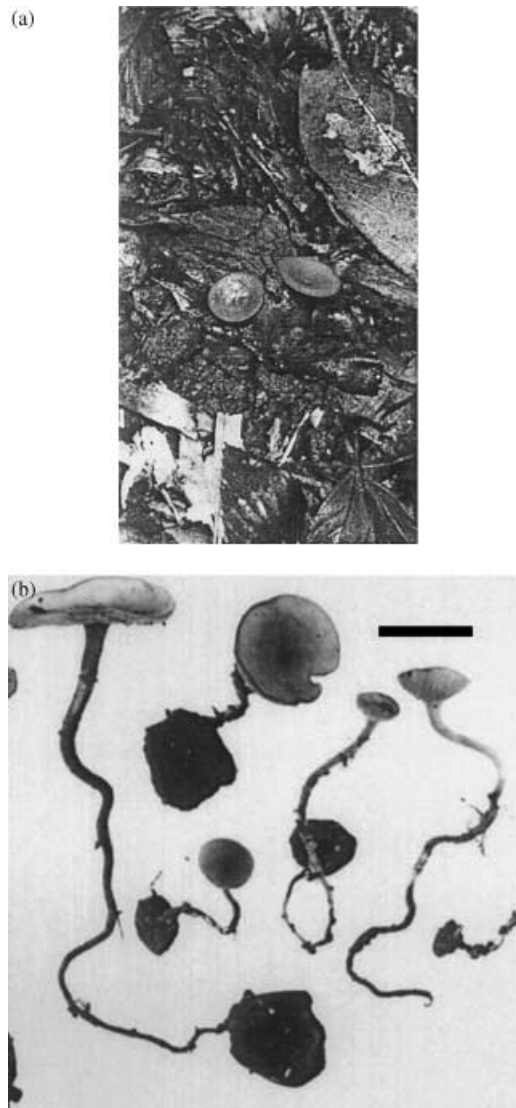


Fig. 2 Apothecia of *Ciborinia camelliae*: (a) *in situ* in leaf litter; (b) showing attachment by stipes to sclerotia.

Apothécies de *C. camelliae*: (a) *in situ* dans la litière de feuilles; (b) montrant l'attachement aux sclérotés par le stipe. Bar/trait = 1 cm.

and sclerotia may be induced to develop by incubation of affected flowers in a damp chamber on the laboratory bench.

In the spring, light brown apothecia (Fig. 2a) emerge from the leaf litter from overwintered sclerotia, but evidence of these is not essential for a positive identification.

Morphological identification – *in vivo*

The white to whitish-grey ring of felt-like sterile mycelium around the bases of the petals is a characteristic sign of the disease. Also characteristic are the slimy black patches in the centre of one or two petals on older infections. These consist of massed spermodochia or stromata bearing conidiophores (phialides) and chains of brown microconidia. Their presence, when confirmed microscopically, is very diagnostic. The flattened sclerotia developing later at the bases

confirmée au microscope, voir Fig. 1a et b). Pour les infections jeunes montrant seulement des taches brunes sur des pétales non atteints, noter que le développement de spermodochies et de sclérotés peut être induit en incubant les fleurs dans une chambre humide au laboratoire.

Au printemps, des apothécies marron clair (Fig. 2a) émergent de la litière de feuilles à partir des sclérotés qui ont hiverné, mais leur existence n'est pas essentielle pour une identification positive.

Identification morphologique – *in vivo*

L'anneau blanc à blanc-gris de mycélium feutré et stérile à la base des pétales est un symptôme caractéristique de la maladie. Les plaques noires visqueuses au centre d'un ou de deux pétales sur les infections plus anciennes sont également caractéristiques. Elles consistent en des masses de spermodochies ou stromas portant des conidiophores (phialides) et des chaînes de microconidies brunes. Leur présence, confirmée au microscope, constitue un bon élément de diagnostic. Les

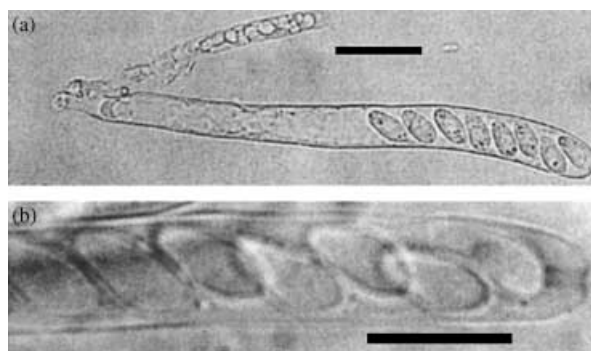


Fig. 3 Ascus and ascospores of *Ciborinia camelliae*: (a) young asci and ascospores; (b) staining (bluing) of ascus pore with Melzer's reagent.
Asque et ascospores de *C. camelliae*: (a) asque jeune et ascospores; (b) coloration (bleue) des pores des asques avec le réactif de Melzer.
Bars/trails = 10 µm.

of the petals are initially covered by a layer of dense, whitish-grey, felt-like mycelium. Finally, they become hard and black, reaching the size and shape of dried grapes, often adhering together in a ring after decomposition of the remaining flower parts.

A definitive identification could be made by an experienced mycologist based on the above observations. However, a person seeing the disease for the first time is advised to confirm the identity of the colony morphology of the pathogen *in vitro* as described below, because the fungal growth forming the felt-like ring is very fine and, at first sight, resembles host tissue. Also, a positive identification of colony details would be needed if only a culture were available for diagnosis. The fungus is easily isolated by excising and surface-sterilizing small pieces of petal tissue from a leading edge, plating on potato dextrose agar (PDA) and incubating on the laboratory bench. If a leading edge is no longer available, the fungus may be isolated from other areas such as the petal bases bearing the white mycelium ring.

Teleomorph

Although not essential for diagnosis, the details of the apothecium are described here for completeness. It consists of a disc, 5–20 mm in diameter, produced on the end of a stipe, 1–2 mm wide and 2–100 mm long depending on the depth of the sclerotium in soil (Fig. 2b). The surface of the stipe and disc has a powdery bloom, and the colour is buff to dull cinnamon when young but darkening with age. The disc, initially cup-shaped, flattens with age. The asci are eight-spored and cylindrical, measuring 120–145 × 6–10.5 µm (Fig. 3a). They have a pore channel which stains strongly (J+) with iodine (Melzer's reagent) following pretreatment with KOH (Fig. 3b). The ascospores are obliquely serrate, hyaline, one-celled, ovate to obovate, guttulate and measure 7.5–12.5 × 4–6 µm (Fig. 3a and b). The paraphyses are filiform, not exceeding the asci, 1–1.5 µm wide at base, but slightly inflated at the apex.

Morphological identification – *in vitro*

The fungus should be cultured on PDA (Oxoid). The following criteria are used to identify the diagnostic spermodochia and microconidia and, if formed, the sclerotia:

Colonies of *C. camelliae* have a white, felt-like, surface mycelium with a radial growth rate of up to 42 mm per week on PDA at 18 °C

sclérotés aplatis qui se développent par la suite à la base des pétales sont initialement recouverts d'une couche de mycélium dense, gris-blanchâtre et feutré. Ils deviennent ensuite durs et noirs, atteignent la taille et la forme de raisins secs, et restent souvent adhérents entre eux en un anneau après la décomposition des parties florales restantes.

Une identification définitive peut être faite par un mycologue expérimenté d'après les observations ci-dessus. Cependant, il est conseillé à une personne qui voit la maladie pour la première fois de confirmer la morphologie de la colonie du pathogène *in vitro* comme décrit ci-dessous, car le mycélium constituant l'anneau feutré est très fin, et ressemble à première vue aux tissus de l'hôte. Une identification positive des détails de la colonie est aussi nécessaire si une seule culture est disponible pour le diagnostic. Le champignon est facilement isolé en excisant et en stérilisant en surface des petits morceaux de pétale d'un bord de lésion, en les mettant en culture sur gélose pomme de terre-dextrose (PDA) et en les incubant au laboratoire. S'il n'y a plus de bord net, le champignon peut être isolé à partir d'autres zones, par ex. la base des pétales portant l'anneau de mycélium blanc.

Téléomorphe

Même si ce n'est pas essentiel pour le diagnostic, les détails des apothécies sont donnés ici pour que la description soit complète. Elles consistent en un disque de 5–20 mm de diamètre, produit à l'extrémité d'un stipe de 1–2 mm de large et 2–100 mm de long selon la profondeur des sclérotés dans le sol (Fig. 2b). La surface du stipe et du disque ont un aspect poudreux, de couleur chamois à cannelle terne lorsqu'ils sont jeunes, mais plus sombres avec l'âge. Le disque, initialement cupulé, s'aplatit avec l'âge. Les asques sont cylindriques, contiennent huit spores, mesurent 120–145 × 6–10.5 µm (Fig. 3a). Elles possèdent un conduit de pore qui se colore fortement (J+) à la teinture d'iode (réactif de Melzer) après un traitement préliminaire au KOH (Fig. 3b). Les ascospores sont arrangées de façon oblique dans l'asque, sont hyalines, unicellulaires, ovales à obovales, guttulées et mesurent 7,5–12,5 × 4–6 µm (Fig. 3a et b). Les paraphyses sont filiformes, ne dépassent pas les asques, mesurent 1–1,5 µm de largeur à leur base, mais sont légèrement renflées à leur extrémité.

Identification morphologique – *in vitro*

Le champignon doit être mis en culture sur gélose PDA (Oxoid). Utiliser les critères ci-dessous pour identifier les spermodochies et les microconidies, et, s'ils sont formés, les sclérotés.

Les colonies de *C. camelliae* ont un mycélium de surface blanc feutré dont la croissance radiale peut atteindre 42 mm par semaine sur

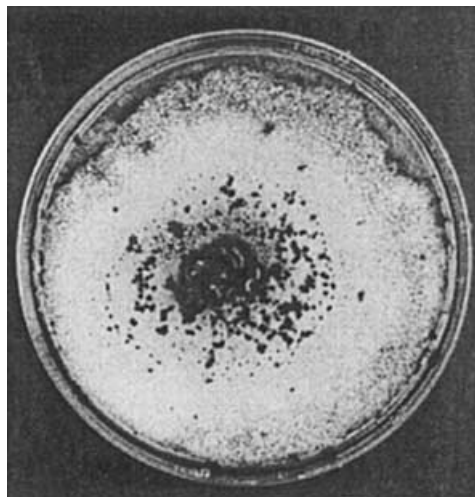


Fig. 4 Colony of *Ciborinia camelliae* on potato dextrose agar (PDA).
Colonie de *C. camelliae* sur gélose pomme de terre-dextrose (PDA).

(Fig. 4). They all produce spermodochia, diagnostic for *C. camelliae*, after about a week. Macroconidia are never produced.

The spermodochia are small, wet, black, microconidial stromata, 1 mm in diameter, produced in concentrically zoned sectors after 1 week (Fig. 5). They become confluent after 4 weeks and are immersed in a water-soluble, black mucilage. They consist of branching clusters of dark-brown, barrel-shaped cells bearing phialides in whorls on an inflated central cell (Fig. 6).

The phialides are hyaline to brown-walled, about 6 µm long, 2–2.5 µm broad, each with a prominent, deeply cupulate collarette where the microconidia are borne (Fig. 6). The microconidia are brown-walled, globose to obovate, 2.5–4 µm in diameter, uninucleate, containing a large guttule. Some spores hang together in short chains but, when separated, a small basal appendage can be seen, often bearing two fringes of wall material where the appendage was previously attached to the subtending microconidium. As they age, and when still in chains, both microconidia and appendages become elongated and expanded (Fig. 7).

After 4 weeks, some isolates form discoid convex sclerotia, 5–8 mm in diameter, often in a ring on the agar surface beneath an adpressed hyaline hyphal mat (Fig. 8).

Comparison with similar species

Botryotinia fuckeliana (anamorph *Botrytis cinerea*) commonly causes a rot of camellia flowers, especially following frost damage. Its mycelium is coarse, whitish, but often appearing grey when bearing conidiophores with grey heads of macroconidia. It usually spreads widely and patchily over the petals. The flower easily shatters. By contrast, the ring of white, felt-like, compact fungal growth around petal bases affected by *C. camelliae* is lacking any spores and holds the petals together even when squeezed. *B. fuckeliana* may produce sclerotia *in vivo*, but these are usually smaller, more superficial and, unlike *C. camelliae*, are not confined to the petal bases and do not incorporate any flower tissue. All these fungal structures show corresponding differences *in vitro*. *B. fuckeliana* occasionally produces

PDA à 18 °C (Fig. 4). Elles produisent des spermodochies, élément de diagnostic pour *C. camelliae*, après environ une semaine. Elles ne produisent jamais de macroconidies.

Les spermodochies sont de petits stromas microconidiens aqueux et noirs, de 1 mm de diamètre, produits en zones concentriques après une semaine (Fig. 5). Elles fusionnent après 4 semaines et sont immergées dans un mucilage noir soluble dans l'eau. Elles consistent en des structures ramifiées de cellules brun foncé en forme de tonneau portant des verticilles de phialides portés par une cellule centrale renflée (Fig. 6).

Les phialides ont des parois hyalines à brunes, mesurent environ 6 µm de longueur, 2–2,5 µm de largeur, chacune portant une collerette proéminente, fortement cupulée d'où naissent les microconidies (Fig. 6). Celles-ci ont des parois brunes, sont globuleuses à obovales, mesurent 2,5–4 µm de diamètre, sont uninucléées et contiennent une large guttule. Certaines spores forment des chaînes courtes. Lorsqu'on les sépare, on peut observer un petit appendice basal qui porte souvent deux franges de matériel de paroi sur lesquelles l'appendice était auparavant attaché à la microconidie suivante. Au fur et à mesure qu'elles vieillissent et si elles forment toujours des chaînes, les microconidies et leurs appendices sont allongés et dilatés (Fig. 7).

Après 4 semaines, certains isolats forment des sclérotés convexes discoïdes, de 5–8 mm de diamètre, souvent disposés selon un anneau à la surface de la gélose, sous quelques filaments de mycélium aérien (Fig. 8).

Comparaison avec des espèces similaires

Botryotinia fuckeliana (anamorphe *Botrytis cinerea*) cause couramment une pourriture des fleurs de camélia, surtout après des dégâts dus au gel. Son mycélium est large, blanchâtre, mais semble souvent gris à cause des têtes grises des macroconidies lorsqu'il porte des conidiophores. Il se dissémine en général largement et en zones dispersées sur les pétales. La fleur se désintègre facilement. Par contraste, l'anneau mycélien compact, blanc et feutré entourant la base des pétales affectés par *C. camelliae* ne porte pas de spores et maintient les pétales ensemble même lorsqu'on les serre. *B. fuckeliana* peut produire des sclérotés *in vivo*, mais ceux-ci sont généralement plus petits, plus superficiels et, contrairement à ceux de *C. camelliae*, ils ne sont pas confinés à la base des pétales et ne contiennent pas de tissus floraux. Toutes ces structures

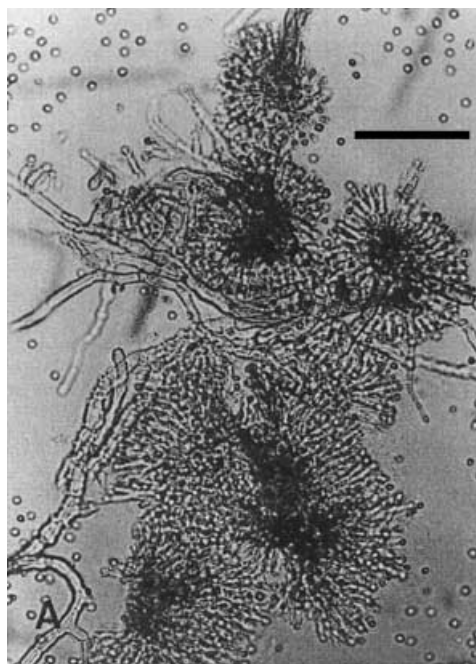


Fig. 5 Spermodochia of *Ciborinia camelliae* on PDA.
Spermodochies de *C. camelliae* sur PDA. Bar/trait = 50 µm.



Fig. 6 Phialides of *Ciborinia camelliae* borne on inflated central cell. Arrow indicates collar.
Phialides de *C. camelliae* sur une cellule centrale renflée. La flèche indique la collerette. Bar/trait = 10 µm.

microconidia *in vitro*, but they are hyaline, unlike those of *C. camelliae*, which are brown.

Sclerotinia sclerotiorum is a related fungus with a similar life cycle and growth characteristics, producing large, black sclerotia *in vivo* and *in vitro*. Although camellia flowers are not a common substrate, this fungus is plurivorous and could conceivably be found here. Its white or slightly grey mycelium is fairly even (sometimes tufted or stranded) and is generally more abundant than the felt-like mycelium of *C. camelliae*. Its sclerotia are more rounded and less flattened, never incorporating host tissue *in vivo*. Its microconidia are hyaline, not brown. The apothecia

fongiques présentent des différences correspondantes *in vitro*. *B. fuckeliana* produit parfois des microconidies *in vitro*, mais elles sont hyalines, contrairement à celles de *C. camelliae* qui sont brunes.

Sclerotinia sclerotiorum est un champignon apparenté à *C. camelliae*, avec un cycle de développement et des caractéristiques de croissance similaires. Il produit de gros sclérotés noirs *in vivo* et *in vitro*. Les fleurs de camélia ne sont pas un substrat courant, mais ce champignon est plurivore et pourrait aussi être trouvé sur camélia. Son mycélium blanc ou légèrement gris est assez régulier (parfois en touffes ou en brins) et est généralement plus abondant que le mycélium feutré de *C. camelliae*. Ses sclérotés sont plus arrondis et moins aplatis, et n'incorporent jamais de

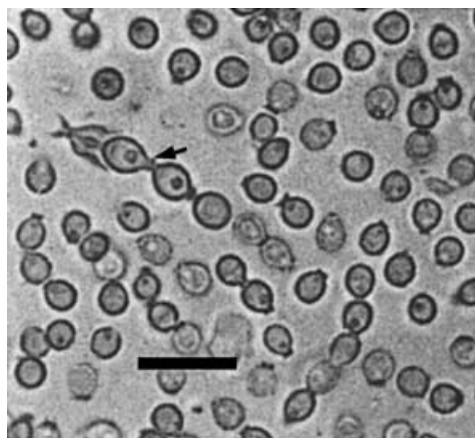


Fig. 7 Microconidia of *Ciborinia camelliae*, some still in chains. Arrow indicates short appendage between two microconidia.

Microconidies de *C. camelliae*, certaines formant encore des chaînes. La flèche indique l'appendice court entre deux microconidies. Bar/trait = 10 µm.



Fig. 8 Sclerotium of *Ciborinia camelliae* colony on PDA. Arrow indicates sclerotium.

Sclérotes d'une colonie de *C. camelliae* sur PDA. La flèche indique le sclérote.

appear similar but are attached to clearly distinct sclerotia, never joined together in a ring.

Penicillium spp. are often present on senescent petals, but they are easily recognized by irregular patches of mycelium bearing greenish spores on easily shattered flowers.

Reference culture

Cultures are available from Plant Disease Diagnosis Team (mycology), Plant Health Group Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ (UK).

Requirements for a positive identification

The key characteristics described under detection should have been observed. The white to whitish-grey, felt-like ring around bases of

tissu de l'hôte *in vivo*. Ses microconidies sont hyalines, et non pas brunes. Ses apothécies ressemblent à celles de *C. camelliae*, mais sont attachées à des sclérotes clairement distincts, qui ne forment jamais un anneau.

Les *Penicillium* spp. sont souvent présents sur les pétales sénescents, mais ils sont facilement reconnaissables aux plaques irrégulières de mycélium portant des spores verdâtres sur les fleurs qui se désintègrent facilement.

Cultures de référence

Des cultures sont disponibles auprès de Mycology Diagnostics, Plant Health Group, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ (UK).

Exigences pour une identification positive

Les caractéristiques décrites dans la section détection doivent avoir été observées. L'anneau feutré blanc à blanc-grisâtre entourant la base des

petals, black patches on petals bearing spermodochia and the development of flattened sclerotia at the bases of the petals are diagnostic features *in vivo*, but microscopic examination of the spermodochia is needed to confirm presence of phialides and chains of brown microconidia.

If an identification has to be done using a pure culture on PDA, colonies should have a white, felt-like surface mycelium producing dark spermodochia with characteristic microconidia after about 1 week with all isolates (and characteristic flattened discoid sclerotia after 4 weeks with some isolates).

Particular attention should be paid to distinguishing *C. camelliae* from *Botryotinia fuckeliana*, using the characteristics described in this protocol.

Report on the diagnosis

A report on the execution of the protocol should include:

- information on the origin of the infected material;
- a description of the disease symptoms (if any), including photographs if possible;
- a description of the major diagnostic features, i.e. the ring of sterile mycelium at the petal bases of a rotted but non-shattered flower, the appearance of spermodochia, phialides, microconidia and sclerotia;
- an indication of the magnitude of the infection;
- if a PDA culture has been examined, a description of the growth rate, the appearance of the mycelium, spermodochia and, if present, the sclerotia;
- comments on the certainty or uncertainty of the identification, especially its distinction from *Botryotinia fuckeliana*.

Dried infected host material, e.g. flowers with a ring of mycelium, spermodochia and sclerotia, should be available. If this is not possible, a pure culture of the pathogen bearing spermodochia and, if available, sclerotia should be provided.

Further information

Further information on this organism can be obtained from: Des renseignements supplémentaires sur cet organisme peuvent être obtenus auprès de Mycology Diagnostics, Plant Health Group, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ (UK).

Acknowledgements/Remerciements

This protocol was originally drafted by: Ce protocole a été initialement préparé par:

R. T. A. Cook, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ (UK)

Dr P. G. Long of Massey University, Palmerston North, New Zealand, kindly provided information and preserved specimens of

pétales, les plaques noires de spermodochies sur les pétales, et la formation de sclérotés aplatis à la base des pétales constituent les éléments du diagnostic *in vivo*, mais l'examen au microscope des spermodochies est nécessaire pour confirmer la présence de phialides et de chaînes de microconidies brunes.

Si une identification doit être réalisée à l'aide d'une culture pure sur PDA, les colonies doivent porter un mycélium de surface blanc et feutré produisant des spermodochies sombres avec des microconidies caractéristiques après environ 1 semaine pour tous les isolats (et des sclérotés présentant un aplatissement caractéristique après 4 semaines pour certains isolats).

Il faut distinguer particulièrement *C. camelliae* de *Botryotinia fuckeliana*, à l'aide des caractéristiques décrites dans ce protocole.

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 la maladie (le cas échéant) de préférence avec des photographies;
- une description des principaux éléments du diagnostic, c'est-à-dire l'anneau de mycélium stérile à la base des pétales d'une fleur atteinte mais non décomposée, l'aspect du mycélium, des spermodochies et, s'ils sont présents, des sclérotés;
- une indication de l'étendue de l'infection
- si une culture sur PDA a été examinée, une description du taux de croissance, de l'aspect du mycélium, des spermodochies et, s'ils existent, des sclérotés;
- des commentaires sur les certitudes ou les doutes sur l'identification, en particulier la distinction avec *B. fuckeliana*.

Du matériel infecté de l'hôte, par exemple des fleurs portant un anneau de mycélium, des spermodochies et des sclérotés, doit être conservé. Si cela n'est pas possible, une culture pure du pathogène portant des spermodochies et, s'ils existent, des sclérotés doit être fournie.

Ciborinia camelliae, and Professor L. Kohn and Dr E. Nagasawa kindly granted permission to reproduce their illustrations.

References/Références

- Brooks A (1979) Camellia flower blight. *The Garden, Journal of the Royal Horticultural Society* **104**, 214–216.
- EPPO/CABI (1997) *Ciborinia camelliae*. In: *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn, pp. 684–687. CAB International, Wallingford (GB).
- Kohn LM & Nagasawa E (1984) A taxonomic reassessment of *Sclerotinia camelliae* Hara (= *Ciborinia camelliae* Kohn), with observations on flower blight of camellia in Japan. *Transactions of the Mycological Society of Japan* **25**, 149–161.
- Stewart TM & Neilson H (1993) Flower blight – a new disease of camellias in New Zealand. *Camellia Bulletin* **116**, 29–33.