

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 7/14



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/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 pospiviroid*. *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) *Cacysus 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

Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani

Specific scope

This standard describes a diagnostic protocol for *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*.

Specific approval and amendment

First approved in 2002-09.

Champ d'application spécifique

Cette norme décrit un protocole de diagnostic pour *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*.

Approbation et amendement spécifiques

Première approbation en 2002-09.

Introduction

Ceratocystis fimbriata f. sp. *platani* causes a destructive tracheomycosis in *Platanus* spp., particularly in the EPPO region *Platanus* × *hispanica*, with infected trees dying within 3–7 years (EPPO/CABI, 1997). The disease is present in the USA, Armenia, Italy, France and Switzerland. The fungus is transmitted by contaminated pruning tools and terracing machinery which causes damage to the roots. It may be transmitted also by root contact (anastomosis), and from infected dead plant tissue which may be present for up to 5 years in soil. Sawdust and wood chips from diseased trees are highly infective. Apart from phytosanitary measures which prevent the spread of the disease to new areas, no control method is available.

Identity

Name: *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted f. sp. *platani* Walter
Synonyms: *Endoconidiophora fimbriata* (Ellis & Halsted) Davidson f. sp. *platani* Walter
Anamorph: *Chalara* sp.
Taxonomic position: Fungi; Ascomycota; Ophiostomatales
Bayer computer code: CERAFP
Phytosanitary categorization: EPPO A2 list no. 136; EC Annex designation II/A2

Detection

Platanus spp. are the only hosts of this *forma specialis*. The pathogen can be present in growing plants, wood, wood chips and sawdust. Plants may be affected singly or in groups. A single branch with sparse chlorotic foliage is usually seen first. On the side bearing this branch, the bark becomes necrotic, pale brown and cracked, and adheres to the tree. The edges of the lesions show no wood callus formation, but extend as bluish-black filaments or veins which are more evident when

Introduction

Ceratocystis fimbriata f. sp. *platani* est l'agent d'une trachéomycose destructrice des platanes (*Platanus* spp.), et notamment dans la région OEPP de *Platanus* × *hispanica*. Les arbres infectés meurent en trois à sept ans (EPPO/CABI, 1997). La maladie est présente aux Etats-Unis, en Arménie, en Italie, en France et en Suisse. Le champignon est transmis par les outils de taille contaminés et les machines de terrassement qui endommagent les racines. Il peut aussi être transmis par contacts racinaires (anastomose), et à partir de tissus végétaux infectés morts qui peuvent persister pendant 5 ans dans le sol. La sciure et les copeaux de bois provenant des arbres malades sont très infectieux. Mis à part les mesures phytosanitaires visant à empêcher la dissémination de la maladie vers de nouvelles zones, aucune méthode de lutte n'est disponible.

Identité

Nom: *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted f. sp. *platani* Walter
Synonymes: *Endoconidiophora fimbriata* (Ellis & Halsted) Davidson f. sp. *platani* Walter
Anamorphe: *Chalara* sp.
Classement taxonomique: Fungi; Ascomycota; Ophiostomatales
Code informatique Bayer: CERAFP
Catégorisation phytosanitaire: liste A2 de l'OEPP no. 136; Désignation Annexes UE II/A2

Détection

Les platanes sont les seuls hôtes de cette *forma specialis*. Le pathogène peut être présent dans les plantes en croissance, les grumes, les copeaux et la sciure. Les plantes peuvent être attaquées individuellement ou en groupe. On observe d'abord en général une seule branche portant un feuillage chlorotique clairsemé. Sur le côté de l'arbre portant cette branche, l'écorce devient nécrotique, brun pâle, fissurée et adhère à l'arbre. Les bords des lésions ne montrent pas de formation de cal, mais s'étendent



Fig. 1 Typical discoloration areas of a cut trunk of *Platanus* infected by *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* / Zones de décoloration caractéristique d'une section de tronc de platane infecté par *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*.

the bark is peeled off (Fig. 1). On the surface of timber and in chips, the only detectable symptom is a dark colour.

Detection when the host is alive

C. f. platani can be detected in samples collected on the edge of lesions by means of an increment borer. Thin hand-made sections are then directly prepared from cores, and the presence of the fungus can be ascertained by light microscope observation of dark diagnostic chlamydospores inside xylem vessels (200–400×) (Fig. 2).

In the absence of chlamydospores, the following methods are used for detection and positive identification of the pathogen:

- cores collected on the edge of lesions by means of an increment borer are cut into discs (2–3 mm thick), rapidly flamed and incubated in a moist chamber at 20–25 °C. *C. fimbriata*, if present, produces endoconidia after 3–8 days (Vigouroux, 1979);
- the pathogen can be isolated from pieces of wood taken from the edge of a lesion on a freshly diseased plant. These are rapidly flamed and incubated on potato dextrose agar (PDA, Oxoid) or malt agar (Oxoid, 20 g L⁻¹) at 20–25 °C for 3–6 days.

Detection when the host is dead

From dead material, successful isolation on agar media is highly unlikely, as many saprophytic fungi colonize dead wood. To detect *C. f. platani* in wood samples or soil, a trap technique has been described by Grosclaude *et al.* (1988). A small healthy branch of *Platanus* sp. is stripped of its bark and placed in a sterile beaker (so that two-thirds of the branch is immersed) containing continuously aerated water and the wood or soil sample. After 1–3 weeks of incubation at room temperature, the fungus develops on the emergent portion of the branch.

Identification

Growth characteristics in culture

Growth rate is 0.3–0.5 cm day⁻¹ on average on PDA at 24 °C. The mycelium is at first hyaline and more or less dense. The colonies are

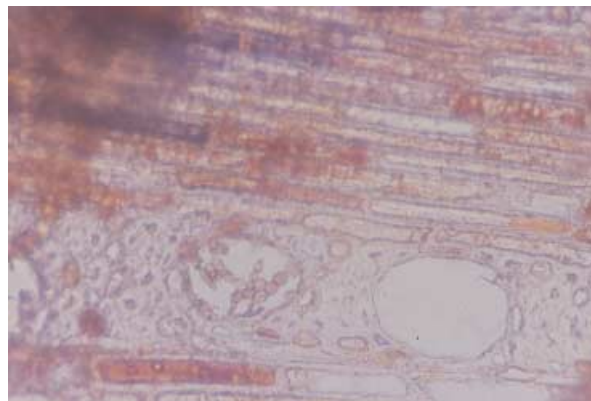


Fig. 2 Presence of chlamydospores of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* inside xylem vessels / Présence de chlamydospores de *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* dans les vaisseaux du xylème.

sous forme de filaments bleu-noir ou de nervures qui sont plus clairement visibles lorsque l'écorce est enlevée (Fig. 1). A la surface du bois et dans les copeaux, le seul symptôme observable est une couleur sombre.

Détection lorsque l'hôte est vivant

C. f. platani peut être détecté dans des échantillons collectés en bordure des lésions au moyen d'une tarière. De fines sections sont ensuite préparées manuellement à partir des carottes et la présence du champignon est confirmée par observation au microscope de chlamydospores dans les vaisseaux du xylème (200–400×) (Fig. 2).

En l'absence de chlamydospores, les méthodes suivantes de détection et d'identification positive du pathogène sont requises:

- des carottes, prélevées en bordure des lésions au moyen d'une tarière sont débitées en disques (2–3 mm d'épaisseur), rapidement passées à la flamme et incubées dans une chambre humide à 20–25 °C. Si *C. fimbriata* est présent, il produit des endoconidies après 3–8 jours (Vigouroux, 1979);
- le pathogène peut être isolé à partir de morceaux de bois prélevés en bordure des lésions sur une plante nouvellement malade. Ces morceaux de bois sont rapidement passés à la flamme et incubés sur de la gélose de pomme de terre-dextrose (PDA, Oxoid) ou de la gélose de malt (Oxoid 20 g L⁻¹) à 20–25 °C pendant 3–6 jours.

Détection lorsque l'hôte est mort

Sur du matériel mort, la réussite de l'isolement sur milieu gélosé est très improbable, car de nombreux champignons saprophytes colonisent le bois mort. Pour détecter *C. f. platani* dans des échantillons de bois ou dans le sol, une technique de piégeage a été décrite par Grosclaude *et al.* (1988). Une petite branche saine de platane est écorcée et placée dans un béccher stérile (de manière à ce que les deux-tiers de la branche soient immergés) contenant de l'eau continuellement aérée et l'échantillon de bois ou de sol. Après 1–3 semaines d'incubation à température ambiante, le champignon se développe sur la partie non immergée de la branche.

Identification

Caractéristiques de croissance en culture

Le taux de croissance est de 0,3–0,5 cm par jour en moyenne sur PDA à 24 °C. Le mycélium est dans un premier temps hyalin et plus ou

thicker on PDA than on malt agar. Later, the colonies can produce three kinds of conidia and, very often, perithecia. With age, the colonies become brownish-green on the underside because of the presence of chlamydospores, and are grey-whitish on the surface due to the presence of hyaline endoconidia, with dark spots due to perithecia. Each isolate takes a different time for the production of conidia and perithecia.

Morphology

Conidia of the first kind are generally produced within 5 days. They are hyaline, truncate, cylindrical endoconidia ($5-40 \times 3-6 \mu\text{m}$). More rarely, light brown doliform endoconidia ($7-12 \times 6-9 \mu\text{m}$) are formed in short chains. The asexual spores of the third type produced by the fungus are thick-walled chlamydospores which are bulbous and brownish-green ($11-19 \times 9-15 \mu\text{m}$). These are very numerous in infected wood and can be useful for direct diagnosis. When perithecia (approx. $200 \mu\text{m}$) are produced, they have a very long neck ($400-800 \mu\text{m}$) but some strains produce no perithecia and others produce only aborted ones. The ascospores are characteristically shaped like bowler hats ($4-8 \mu\text{m}$) (see Fig. 3b).

Comparison with similar species

Other species have similar anamorphs (e.g. *Ceratocystis paradoxa*, *Ceratocystis moniliformis*), but none has been reported on *Platanus*. The morphological diagnostic characteristics are:

- *C. f. platani* produces perithecia on which appendages are absent (Fig. 3), unlike the similar species (*C. paradoxa* Fig. 4 and *C. moniliformis* Fig. 5).

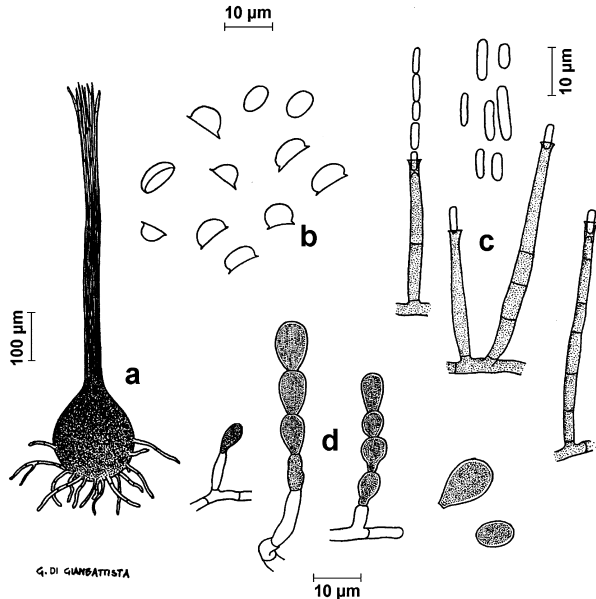


Fig. 3 *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. (a) perithecium/périthèce; (b) ascospores; (c) conidia/conidies; (d) chlamydospores. Original drawings by G. Di Giambattista (Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Via C.G. Bertero 22, I-00156 Rome, Italy).

Fig. 4 *Ceratocystis moniliformis*. (a) perithecium/périthèce; (b) perithecial appendages appendices du périthèce (schematic/schématique). Redrawn from Luc (1952).

moins dense. Les colonies sont plus épaisses sur gélose de pomme de terre-dextrose que sur gélose de malt. Par la suite, les colonies produisent trois sortes de conidies et, très souvent, des périthèces. En vieillissant, les colonies deviennent vert-brunâtre à leur face inférieure en raison de la présence de chlamydospores, et sont gris-blanchâtre en surface à cause de la présence d'endoconidies hyalines, avec des taches noires dues aux périthèces. Le temps nécessaire à la production de conidies et de périthèces varie selon les isolats.

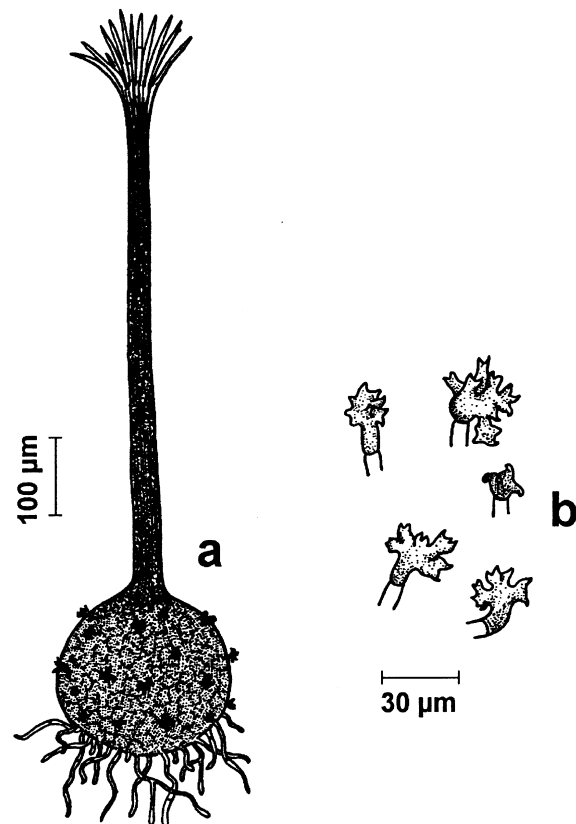
Morphologie

Le premier type de conidies est généralement produit en 5 jours. Il s'agit d'endoconidies hyalines, tronquées et cylindriques ($5-40 \times 3-6 \mu\text{m}$). Plus rarement, des endoconidies doliformes brun pâle ($7-12 \times 6-9 \mu\text{m}$) sont formées en chaînes courtes. Le champignon produit un troisième type de spores asexuées, sous forme de chlamydospores à parois épaisses, bulbeuses et vert brunâtre ($11-19 \times 9-15 \mu\text{m}$), qui sont très nombreuses dans le bois infecté et peuvent être utiles pour le diagnostic direct. Lorsque les périthèces (environ $200 \mu\text{m}$) sont produits, ils ont un col très long ($400-800 \mu\text{m}$) mais certaines souches ne produisent pas de périthèces et d'autres produisent seulement des périthèces avortés. Les ascospores ont une forme caractéristique de chapeau-melon ($4-8 \mu\text{m}$).

Comparaison avec des espèces similaires

D'autres espèces ont des anamorphes similaires (par ex. *Ceratocystis paradoxa*, *Ceratocystis moniliformis*), mais ils ne sont pas signalés sur platane. Les caractéristiques morphologiques du diagnostic sont:

- *C. f. platani* produit des périthèces sans appendices (Fig. 3), contrairement aux espèces similaires (*C. paradoxa* Fig. 4 et *C. moniliformis* Fig. 5).



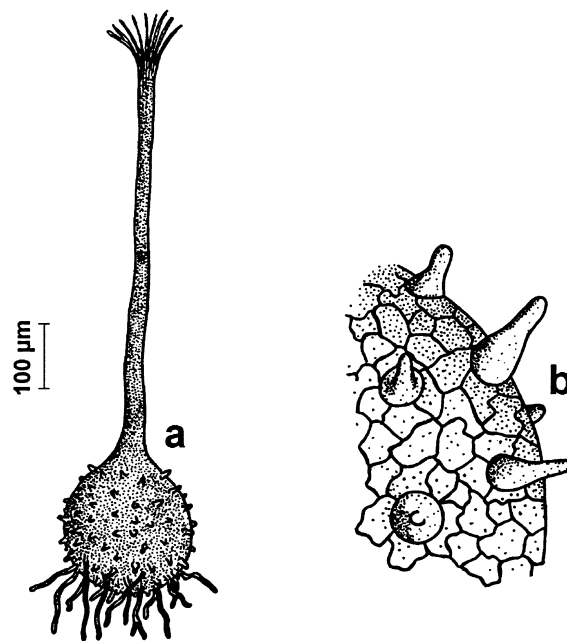


Fig. 5 *Ceratocystis paradoxa*. (a) perithecium/périthèce; (b) perithecial appendages/appendices du périthèce. Redrawn from Dade (1928).

- *C. paradoxa* produces very abundant dark conidia that confer a black powdery appearance to the colonies. Growth is rapid (more than 1 cm day⁻¹ on PDA at 24 °C).
 - *C. moniliformis* does not produce chlamydoconidia.
- Any doubt about the identification can be resolved by testing fungal mycelium by a PCR-based RFLP method (see Appendix I).

Reference cultures

ATCC (1984) no. 38160 (from *Platanus orientalis*), S. Accordi Mutto, Istituto Patologia Vegetale – Università degli Studi di Padova, Agripolis, Legnaro, I-35020 (IT)
no. 44186 (from *Platanus × hispanica*), A. Vigouroux, INRA, Unité de Formation et de Recherche de Biologie et Pathologie Végétales, 34060 Montpellier (FR).

Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, 22 Via C.G. Bertero, I-00145 Roma (IT) has a collection of about 20 Italian isolates.

Requirements for positive identification

The procedures for detection and identification described in this protocol should have been followed. Microscopic examination of sections from live wood should show chlamydoconidia. If no chlamydoconidia are found, then discs incubated for 3–8 days at 20–25 °C should show typical endoconidia; or a culture produced on PDA should show the correct growth characteristics and morphology (as described in this protocol). If there is any doubt about the culture characteristics, then a PCR-RFLP (as described in this protocol) can distinguish *Ceratocystis* spp. from other fungi, and *C. fimbriata* f. sp. *platani* from other species.

Samples from dead wood or soil should cause fungal growth on a branch of *Platanus* in the trap technique described in this protocol,

- *C. paradoxa* produit des conidies sombres très abondantes qui donnent une apparence poudreuse noire aux colonies. La croissance est rapide (plus d'1 cm par jour sur PDA à 24 °C).
 - *C. moniliformis* ne produit pas de chlamydoconidia.
- Les doutes relatifs à l'identification peuvent être résolus en testant le mycélium par une méthode de polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) après PCR (voir Annexe I).

Cultures de référence

ATCC (1984) – n. 38160 (de *Platanus orientalis*), S. Accordi Mutto, Istituto Patologia Vegetale – Università degli Studi di Padova, Agripolis, Legnaro, I-35020 (IT)
n. 44186 (de *P. × hispanica*), A. Vigouroux, INRA, Unité de Formation et de Recherche de Biologie et Pathologie Végétales, 34060 Montpellier (FR).

L'Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, 22 Via C.G. Bertero, I-00145 Roma (IT) possède une collection d'environ 20 isolats italiens.

Exigences pour une identification positive

Les procédures de détection et d'identification décrites dans ce protocole doivent avoir été suivies. L'examen au microscope de sections de bois vivant doivent mettre en évidence des chlamydoconidia. Dans le cas contraire, des disques incubés pendant 3–8 jours à 20–25 °C doivent présenter des endoconidies caractéristiques, ou une culture produite sur PDA doit présenter les caractéristiques de croissance et morphologiques correctes (décrites dans ce protocole). Si des doutes subsistent sur les caractéristiques de la culture, une méthode de PCR-RFLP (comme décrite dans ce protocole) peut permettre de distinguer *Ceratocystis* spp. des autres champignons, et *C. f. platani* des autres espèces.

Les échantillons de bois mort ou de sol doivent avoir entraîné la croissance du champignon sur une branche de platane par la technique

and the fungus should then be isolated and positively identified as above.

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 (including if possible photographs);
- measurements and drawings or photographs (as relevant) of the morphological features;
- an indication of the magnitude of the infection (how much damaged tissue);
- comments on the certainty or uncertainty of the identification.

Storage of the pathogen isolate in culture may also be required. The pathogen can be maintained on an agar slant (PDA, malt agar) at 5–6 °C. Periodical inoculation (12–18 months) on detached host material and re-isolation will prevent alterations of morphological and physiological characteristics.

Appendix I

Procedure for identification of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* by PCR assay

Specific primers are available for the identification of the genus *Ceratocystis* by polymerase chain reaction (PCR). Distinguishing *C. f. platani* from the other *Ceratocystis* spp. is then possible by performing restriction fragment length polymorphisms (RFLP) after PCR. The following protocol is adapted from the paper by Witthuhn *et al.* (1999) for a PCR-based RFLP identification method. See the paper of Witthuhn *et al.* (1998) for PCR conditions and that of Harrington & Wingfield (1995) for preparation of crude template.

Genus-specific ITS-PCR

Preparation of the sample

1 Inoculate MYEA plates (2% malt extract, 0.2% yeast extract, 1.5% agar) with the fungal isolates to be tested and incubate at room temperature (approximately 20 °C) to obtain actively growing cultures.

Preparation of template DNA

2 Perform PCR amplification directly from fungal mycelium, as follows: scrape a pipette tip approximately 1 cm across the actively growing mycelium at the edge of the colony. Dip the tip of the pipette into the PCR tube containing the reaction mixture and mineral oil, then stir the mixture vigorously with the tip. This is done in order adequately to suspend the fungal material attached to the tip in the reaction mixture. Controls should also be set up, including mycelium from a known culture of *C. f. platani* (positive control) and a PCR tube containing the reaction mixture without any template (negative control).

PCR amplification

3 Prepare a standard volume of the PCR mixture (50 µL for each PCR tube) for each test sample according to the following indications:

<i>Taq</i> polymerase	2.5 units
10× PCR buffer	5 µL
MgCl ₂	6.25 mM
dNTPs	250 µM

de piégeage décrite dans ce protocole, et le champignon doit ensuite être cultivé et identifié comme ci-dessus.

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 (de préférence avec des photographies);
- des mesures ou des dessins ou photographies (le cas échéant) des caractères morphologiques;
- une indication de l'étendue de l'infection (quantité de tissus endommagés);
- des commentaires sur les certitudes ou les doutes liés à l'identification.

La conservation du pathogène en culture peut aussi être demandée. Le pathogène peut être maintenu sur gélose inclinée (de PDA ou de malt) à 5–6 °C. Une inoculation périodique (12–18 mois) sur du matériel hôte détaché et le ré-isolément empêchent les altérations des caractères morphologiques et physiologiques.

Annexe I

Procédure d'identification de *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* par PCR

Des amorces spécifiques sont disponibles pour l'identification du genre *Ceratocystis* par PCR. Distinguer *C. f. platani* des autres *Ceratocystis* spp. est alors possible en effectuant une RFLP après PCR. Le protocole suivant est adapté de l'article de Witthuhn *et al.* (1998) sur une méthode d'identification par RFLP après PCR; voir l'article de Witthuhn *et al.* (1998) pour les conditions de la PCR et celui de Harrington & Wingfield (1995) pour la préparation de l'ADN cible.

ITS-PCR spécifique au genre

Préparation de l'échantillon

1 Inoculer des boîtes MYEA (extrait de malt 2%, extrait de levure 0,2%, gélose 1,5%) avec les isolats du champignon à tester et incubé à température ambiante (environ 20 °C) pour obtenir des cultures à croissance active.

Préparation de l'ADN cible

2 L'amplification par PCR est réalisée directement à partir du mycélium fongique, comme suit: gratter le mycélium en croissance active du bord de la colonie sur environ 1 cm avec l'extrémité d'une pipette. Tremper l'extrémité de la pipette dans un tube de PCR contenant le mélange de réaction et de l'huile minérale, puis mélanger vigoureusement, pour mettre en suspension le matériel adhérent à l'extrémité de la pipette. Des témoins, y compris du mycélium d'une culture connue de *C. f. platani* (témoin positif) et un tube de PCR contenant un mélange réactionnel sans ADN cible (témoin négatif) doivent également être préparés.

Amplification

3 Préparer un volume standard de mélange réactionnel de PCR (50 µL pour chaque tube de PCR) pour chaque échantillon à tester, selon les indications suivantes:

Polymérase <i>Taq</i>	2,5 unités
Tampon de PCR 10×	5 µL
MgCl ₂	6,25 mM
dNTPs	250 µM

Primer ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 0.5 µM
 Primer LR6: 5'-CGCCAGTTCTGCTTACC-3' 0.5 µM

Add sterile distilled water to make total volume to 50 µL. Overlay each master mix with sterile mineral oil, if a thermocycler without heated lid is to be used.

4 Programme a thermocycler as follows, and insert the reaction mixture: (i) denaturation for 60 s at 96 °C; (ii) 35 cycles of primer annealing for 30 s at 55 °C, elongation for 60 s at 72 °C, denaturation for 60 s at 92 °C; (iii) elongation for 5 min at 72 °C.

Detection of *Ceratocystis* spp. amplicons by agarose gel electrophoresis

5 Prepare a 1.5% agarose gel made with 0.5× TBE standard buffer (4.5 mM Tris, 4.5 mM boric acid and 1 mM EDTA pH 8).

6 On a sheet of parafilm, mix 10 µL of the PCR sample with 2 µL loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF in 30% glycerol in distilled water) at the rate of 5:1.

7 Load separately, in the wells of the gel, the samples and a DNA molecular-weight marker suitable for the migration of 1600-bp DNA fragments (to be detected in case of *Ceratocystis* spp. amplification products).

8 Perform electrophoresis at 80 V in 0.5× TBE buffer and stop the run after the time necessary for correct evaluation of the molecular weight of amplification products appreciated as single bands.

9 Stain the gel for 30 min in an aqueous solutions of ethidium bromide at 0.5 µg mL⁻¹. Place the gel in a tank of fresh distilled water to remove excess ethidium bromide that could create high background fluorescence.

10 Visualize the amplification products using UV light (312 nm).

Sampled fungi which are *Ceratocystis* spp. produce 1.6-kb amplicons.

Identification of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* by ITS-RFLP

In order to distinguish *C. f. platani* from other *Ceratocystis* spp., digest amplification products separately with the restriction enzymes *AluI* and *DraI* according to the manufacturer's instructions. These enzymes have a working temperature of 37 °C. Analyse the restriction pattern in 2% agarose gel made with 0.5× TBE buffer (as previously described). Determine the size of the restriction products against a 50–2000 bp DNA molecular weight marker.

Digestion with *AluI* of the *C. f. platani* amplicon produces a restriction pattern that is different from most *Ceratocystis* spp., including *C. fimbriata* isolates of *Populus* and *Prunus* spp.; this pattern is composed of fragments of the following size: 150, 180, 220 + 720 bp. However, *C. albofundus* (host: *Acacia mearnsii*) shows the same *AluI* restriction pattern.

Distinction can be made between *C. albofundus* and *C. f. platani* by treatment with *DraI*, as the amplification product of *C. albofundus* is cut into three fragments (150, 320 + 1200 bp) and that of *C. f. platani* is left uncut.

Amorce ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 0,5 µM
 Amorce LR6: 5'-CGCCAGTTCTGCTTACC-3' 0,5 µM

Compléter à 50 µL avec de l'eau distillée stérile.

Recouvrir chaque mélange de base avec de l'huile minérale stérile si le thermocycleur n'est pas pourvu de couvercle chauffant.

4 Paramétrer le thermocycleur selon le programme suivant et y placer les échantillons: (i) dénaturation pendant 60 s à 96 °C; (ii) 35 cycles de 30 s à 55 °C, 60 s à 72 °C et 60 s à 92 °C; (iii) élongation pendant 5 min à 72 °C.

Détection des amplicons de *Ceratocystis* spp. par électrophorèse sur gel d'agarose

5 Préparer un gel d'agarose à 1,5% avec un tampon standard TBE 0,5× (4,5 mM Tris, 4,5 mM d'acide borique et 1 mM EDTA pH 8).

6 Sur une feuille de parafilm, mélanger 10 µL de l'échantillon de PCR avec 2 µL de tampon de charge (0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylène cyanol FF dans du glycérol à 30% dans de l'eau distillée) en proportion de 5:1.

7 Charger séparément dans les puits le gel, les échantillons et un marqueur de poids moléculaire adéquat pour évaluer la migration de fragments d'ADN de 1600 pb (devant être détectés dans le cas des produits d'amplification de *Ceratocystis* spp.).

8 Effectuer l'électrophorèse à 80 V dans du tampon TBE 0,5× et arrêter après le temps nécessaire pour évaluer correctement le poids moléculaire des produits d'amplification qui doivent être apparaître sous forme de bandes individuelles.

9 Colorer le gel pendant 30 min dans une solution aqueuse de bromure d'éthidium à 0,5 µg mL⁻¹. Placer le gel dans un récipient d'eau distillée fraîche pour éliminer l'excès de bromure d'éthidium pouvant créer une fluorescence d'arrière plan forte.

10 Visualiser les produits d'amplification sous lumière UV (312 nm).

Les champignons échantillonnés appartenant à *Ceratocystis* spp. produisent des amplicons de 1,6 kb.

Identification de *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* par ITS-RFLP

Pour distinguer *C. f. platani* des autres *Ceratocystis* spp., digérer les produits d'amplification séparément avec les enzymes de restriction *AluI* et *DraI* conformément aux instructions du fabricant. Ces enzymes fonctionnent à 37 °C. Faire migrer les produits de la digestion enzymatique dans un gel d'agarose à 2% dans du tampon TBE 0,5× (comme décrit précédemment). Après coloration et révélation, évaluer la taille des produits de restriction par rapport à un marqueur moléculaire d'ADN de 50–2000 pb.

La digestion avec *AluI* de l'amplicon de *C. f. platani* produit des fragments de restriction différents de ceux de la plupart des *Ceratocystis* spp., y compris des isolats de *C. fimbriata* sur *Populus* et *Prunus* spp.; il s'agit de fragments de taille 150, 180, 220 + 720 pb. En revanche, *C. albofundus* (hôte: *Acacia mearnsii*) présente les mêmes caractéristiques avec *AluI*.

Une distinction peut être faite entre *C. albofundus* et *C. f. platani* par un traitement avec *DraI*, car le produit d'amplification de *C. albofundus* est coupé en trois fragments (150, 320 + 1200 bp) tandis que celui de *C. f. platani* n'est pas fragmenté.

Further information/Renseignements supplémentaires

Further information on this organism can be obtained from:/Des renseignements supplémentaires sur cet organisme peuvent être obtenus auprès de:

T. Annesi, E. Motta & M. Pilotti – Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Via C.G. Bertero 22, 00145 Roma (IT).

S. Accordi Mutto – Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali – Sezione di Patologia Vegetale, Università degli Studi di Padova, Strada Romea 16, 35020 Legnano (IT).

A. Panconesi – CNR, Istituto per la Patologia degli Alberi Forestali, Piazzale delle Cascine 28, 50144 Firenze (IT).

A. Vigouroux – Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétale, INRA, Unité de Formation et de Recherche de Biologie et Pathologie Végétales, 34060 Montpellier (FR).

Acknowledgements/Remerciements

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

T. Annesi, E. Motta & M. Pilotti, Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, 22 Via C.G. Bertero, 00145 Rome (IT).

References/Références

- Dade HA (1928) *Ceratostomella paradoxa*, the perfect stage of *Thielaviopsis paradoxa*. *Transactions of the British Mycological Society* **13**, 184–194.
- EPPO/CABI (1997) *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. In: *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn, pp. 674–677. CAB International, Wallingford (GB).
- Grosclaude C, Olivier R, Pizzuto J-C, Romiti C & Madec S (1988) Détection par piégeage du *Ceratocystis fimbriata* f. *platani*. Application à l'étude de la persistance du parasite dans du bois infecté. *European Journal of Forest Pathology* **18**, 385–390.
- Harrington TC & Wingfield BD (1995) A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia* **87**, 280–288.
- Luc M (1952) *Ophiostoma moniliforme* et ses diverses formes. *Revue de Mycologie* **17** (Suppl. 1), 10–16.
- Vigouroux A (1979) Une méthode simple de recherche de *Ceratocystis fimbriata* f. *platani* sur arbre en place. *European Journal of Forest Pathology* **9**, 316–320.
- Withuhn KC, Wingfield BD, Wingfield MJ & Harrington TC (1999) PCR-based identification and phylogeny of species of *Ceratocystis fimbriata sensu strictu*. *Mycological Research* **103**, 743–749.
- Withuhn RC, Wingfield BD, Wingfield MJ & Wolfaardt M (1998) Monophyly of the species in the *Ceratocystis coeruleascens* complex based on DNA sequence data. *Mycologia* **90**, 96–101.