

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 7/16



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**

***Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis***

**Specific scope**

This standard describes a diagnostic protocol for *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

**Specific approval and amendment**

First approved in 2002-09.

**Champ d'application spécifique**

Cette norme décrit un protocole de diagnostic pour *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

**Approbation et amendements spécifiques**

Première approbation en 2000-09.

**Introduction**

The vascular wilt of date palm (*Phoenix dactylifera*) known as Bayoudh disease is caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (CMI, 1978, 1992; EPPO/CABI, 1997). The disease is usually fatal, but plants often take 6 months to 2 years to die. The most important means of carry-over is spores and mycelium in the soil. Infection mainly occurs through the roots and spreads internally through the vascular system. Dispersal of the pathogen occurs by means of infected offshoots, soil, symptomless hosts, infected date tissues and irrigation water. Invasion of flower stalks and fruits has never been reported. There are no reports of seed transmission.

**Identity**

**Name:** *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl:Fr. f. sp. *albedinis* (Killian & Maire) W. L. Gordon

**Synonyms:** *Cylindrophora albedinis* Killian & Maire  
*Fusarium albedinis* (Killian & Maire) Malençon

**Teleomorph:** None known

**Taxonomic position:** Fungi; Ascomycota; anamorphic Hypocreales

**Bayer computer code:** FUSAAL

**Phytosanitary categorization:** EPPO A2 list: no. 70, EC Annex designation: II/A1.

**Detection**

**Disease symptoms**

The first external symptoms appear on one or more leaves of the middle crown. The affected leaf takes a lead or ash-grey colour and withers in a characteristic way. Some pinnae situated on one side of the leaf become white and then the withering progresses from the base to the apex. After one side has been affected, the withering starts at the other side and progresses from the top to the base until the whole leaf dies.

**Introduction**

Le champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* est l'agent d'un flétrissement vasculaire du palmier-dattier (*Phoenix dactylifera*), appelé maladie du Bayoudh (CMI, 1978, 1992; EPPO/CABI, 1997). La maladie est généralement fatale, et les arbres meurent souvent au bout de 6 mois à 2 ans. Les principaux moyens de transmission sont les spores et le mycélium dans le sol. La contamination a lieu principalement par les racines et s'étend dans les plantes par le système vasculaire. Le pathogène se dissémine par les rejets, le sol, les hôtes ne présentant pas de symptômes, les tissus de palmier-dattier ou l'eau d'irrigation infectés. Aucune invasion des hampes florales ou des fruits n'a jamais été signalée. Il n'existe aucune indication de transmission par les semences.

**Identité**

**Nom:** *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl:Fr. f. sp. *albedinis* (Killian & Maire) W. L. Gordon

**Synonymes:** *Cylindrophora albedinis* Killian & Maire  
*Fusarium albedinis* (Killian & Maire) Malençon

**Téléomorphe:** Aucun connu

**Classement taxonomique:** Fungi; Ascomycota; Hypocreales anamorphiques

**Code informatique Bayer:** FUSAAL

**Catégorisation phytosanitaire:** Liste A2 de l'OEPP no. 70; Désignation Annexe UE II/A1

**Détection**

**Symptômes de maladie**

Les premiers symptômes externes apparaissent sur une ou plusieurs feuilles du milieu de la couronne. La feuille atteinte prend une coloration gris cendré ou gris plomb, et flétrit d'une manière caractéristique. Certaines pennes situées d'un côté de la feuille blanchissent, et le flétrissement progresse ensuite de la base vers l'extrémité. Lorsque tout ce côté a été atteint, le flétrissement commence de l'autre

However, other symptoms (brown longitudinal stains on the rachis, general yellowing) may also develop. A diseased tree shows relatively few affected (reddish) roots. When cut, palm fronds manifesting external symptoms exhibit a reddish-brown discoloration with distinctly coloured vascular bundles. Finally, offshoots at the base of the palm are attacked.

## Identification

The symptoms of Bayouhdh disease are classical symptoms of vascular wilt, and identification solely on the basis of external and internal symptoms is not therefore reliable. Identification should be based on isolation of the fungus, and further identification of the pure culture through molecular genetic methods or pathogenicity testing. Negative pathogenicity tests do not exclude the presence of the pathogen, and in such cases suspect isolates of *F. oxysporum* should be sent to a specialist for PCR testing.

Other methods, such as vegetative compatibility of nitrate mutants (Djerbi, 1990) and RFLP analysis (Tantaoui *et al.*, 1996), have been used in the past, and have demonstrated the homogeneity of *F. o. albedinis*. These methods are no longer in use for diagnosis.

## Isolation

For isolation, the standard procedure is to surface-sterilize pieces of discoloured vascular tissue from roots, leaves or stems in 50% ethanol for 1 min, rinse with water and incubate at 20–25 °C on agar media (Djerbi, 1990). *Fusarium* spp. are very unstable in culture, especially on rich media such as potato dextrose agar (PDA), and may quickly degenerate and (in the longer term) even lose pathogenicity. Therefore, it is necessary to isolate and culture *Fusarium* isolates on low nutrient media such as synthetic nutrient-poor agar (SNA). Other media such as Czapek Dox agar (CDA) and PDA should be used only for observing macroscopic cultural characteristics such as colour. For preservation, the fungus should only be taken from SNA.

## Culture media

- potato dextrose agar (PDA, Difco)
- synthetic nutrient-poor agar (SNA; 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g  $\text{KNO}_3$ , 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g KCl, 0.2 g glucose, 0.2 g sucrose per L of distilled water, to which autoclaved pieces of filter paper are added to the plates as an additional carbon source)
- Czapek Dox agar (3 g  $\text{NaNO}_3$ , 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g KCl, 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.01 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 30 g sucrose, 15 g agar, 1000 mL distilled water).

## Growth characteristics in culture

Aerial mycelium on PDA and CDA is delicately floccose, sparse, cultures with a slimy appearance due to abundant production of conidia, pink (seen from the reverse side of the plate, especially on PDA) and slow-growing (6.0–8.5 cm diameter after 8 days at 25 °C on PDA).

## Morphology

*Conidia* (on SNA): Microconidia borne on short, simple monophialides (8–14  $\mu\text{m}$  long) arising laterally on the hyphae or from short sparsely

côté et progresse de l'extrémité vers la base jusqu'à la mort de la feuille. D'autres symptômes (taches brunes longitudinales sur le rachis, jaunisse généralisée) peuvent également apparaître. Les arbres malades présentent relativement peu de racines atteintes (rougeâtres). Les frondes qui manifestent des symptômes externes ont une coloration brun-rougeâtre avec des faisceaux vasculaires très colorés lorsqu'on les coupe. Enfin, les rejets à la base de l'arbre sont attaqués.

## Identification

Les symptômes de la maladie du Bayouhdh sont typiques d'un flétrissement vasculaire. L'identification uniquement à partir des symptômes externes et internes n'est donc pas fiable. L'identification du champignon doit reposer sur son isolement et sur l'identification de la culture pure par des méthodes moléculaires ou des tests de pouvoir pathogène. Des résultats négatifs aux tests de pouvoir pathogène ne permettent pas d'exclure la présence du pathogène, et dans ce cas les isolats de *F. oxysporum* suspects doivent être envoyés à un spécialiste pour un test de PCR.

D'autres méthodes, comme la compatibilité végétative des mutants nit (Djerbi, 1990) et l'analyse RFLP (Tantaoui *et al.*, 1996) ont jadis été utilisées, et ont servi à démontrer l'homogénéité de *F. o. albedinis*. Ces méthodes ne sont plus actuellement utilisées pour le diagnostic.

## Isolément

Pour l'isolement, la procédure normalisée consiste à stériliser en surface des morceaux de tissu vasculaire décoloré provenant de racines, de frondes ou de tiges dans de l'éthanol à 50% pendant une minute. Les rincer ensuite dans de l'eau et les incubent à 20–25 °C sur milieu gélosé (Djerbi, 1990). Les *Fusarium* spp. sont très instables en culture, en particulier sur les milieux riches comme la gélose pomme de terre-dextrose (PDA). Ils peuvent dégénérer rapidement et (à long-terme) perdre leur pouvoir pathogène. Il est donc nécessaire d'isoler et de cultiver les isolats de *Fusarium* sur des milieux peu nutritifs, comme le milieu SNA (synthetic nutrient-poor agar). Les autres milieux, comme la gélose Czapek Dox (CDA) et le milieu PDA doivent être utilisés uniquement pour l'observation des caractéristiques macroscopiques en culture, telles que la couleur. Pour la conservation, le champignon doit être prélevé seulement sur du milieu SNA.

## Milieux de culture

- gélose pomme de terre-dextrose (PDA, Difco).
- SNA (synthetic nutrient-poor agar; 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g  $\text{KNO}_3$ , 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g KCl, 0.2 g glucose, 0.2 g sucrose par litre d'eau distillée. Ajouter dans les boîtes de Pétri, comme source supplémentaire de carbone, des morceaux de papier-filtre passés à l'autoclave).
- gélose Czapek Dox (3 g  $\text{NaNO}_3$ , 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g KCl, 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.01 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 30 g sucrose, 15 g de gélose, 1000 mL d'eau distillée).

## Caractéristiques de croissance en culture

Le mycélium aérien sur PDA et CDA est délicatement floconneux et clairsemé. Les cultures ont une apparence visqueuse due à la production abondante de conidies, et sont roses (sur l'envers de la boîte, surtout sur milieu PDA) et à croissance lente (6,0–8,5 cm de diamètre en 8 jours à 25 °C sur milieu PDA).

## Morphologie

*Conidies* (sur milieu SNA): microconidies portées par des monophialides courtes et non ramifiées (mesurant 8–14  $\mu\text{m}$  de longueur)

branched conidiophores; generally abundant, variable, oval-ellipsoid, straight to slightly curved,  $5-12 \times 2.2-3.5 \mu\text{m}$ , produced in mucilaginous slime. Macroconidia, sparse in some strains, are borne on more elaborately branched conidiophores or on the surface of *Tubercularia*-like sporodochia. They are thin-walled, generally 3–5-septate, fusoid-subulate and pointed at both ends, occasionally fusoid-falcate, some with a somewhat hooked apex and a pedicellate base. They range in size from 3-septate,  $27-46 \times 3-5 \mu\text{m}$  to 6–7-septate,  $50-66 \times 3.5-5 \mu\text{m}$ . The 3-septate spores are the most commonly found (Fig. 1).

*Chlamydospores* (on SNA): smooth to rough walled, 7–11  $\mu\text{m}$ , generally abundant, terminal or intercalary, generally solitary but occasionally in pairs or chains.

Morphology of spores on PDA or from the host is usually very variable and not reliable.

### Molecular genetic identification of pure cultures

A primer pair (TL3–FOA28) has been developed by Fernández *et al.* (1998) for unambiguous diagnosis of pure cultures of *F. o. albedinis* by the polymerase chain reaction (PCR). This test differentiates the date palm pathogen from other *formae speciales* in *F. oxysporum* and also from saprophytic strains. The primer sequences are 3'-GGTCGT-CCGCAGAGTATACCGGC-5' (TL3) and 3'-ATCCCCGTAAAGCC-CTGAAGC-5' (FOA28). Fungal DNA should be extracted from an *F. oxysporum* culture according to Fernández *et al.* (1998) or using standard methods for DNA extraction from fungi. The reaction mixture should contain 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 100  $\mu\text{M}$  (each) dATP, dCTP, dGTP, and dTTP; 0.5  $\mu\text{M}$  (each) of both primers; 25 ng of genomic DNA; 1.25  $\mu\text{L}$  of 10 $\times$  concentrated reaction buffer; and 0.25 units of DNA polymerase. A negative control (no DNA target) should be included in every experiment to test for contamination as well as a positive control (DNA from a reference strain of the pathogen). Amplification should be performed in a DNA thermal cycler programmed as follows: 1 cycle for 4 min at 95 °C followed by 30 cycles for 30 s at 92 °C, 30 s at 62 °C, and 45 s at 72 °C. One cycle for 15 min at 72 °C should be conducted after the 30 cycles. After amplification, 8  $\mu\text{L}$  of the reaction mixture is loaded onto a 1.4% agarose gel, separated by electrophoresis, stained with ethidium bromide, and viewed and photographed under UV light. DNA from the reference strain of the fungus (positive control), but not the negative control, should yield an amplicon of 400 bp. Isolates of *F. oxysporum* yielding an amplicon of this size should be identified as *f. sp. albedinis*.

### Pathogenicity testing

Pathogenicity testing of pure cultures may be used as an alternative to PCR testing. The method is technologically simple but very time-consuming (Djerbi, 1990). Seedlings of *P. dactylifera* are grown under disease-free conditions in transparent polythene bags. The fungus should not have been stored on PDA or on other rich media. The fungus should be transferred from SNA to PDA (solid or liquid) at 25 °C and a spore suspension of  $10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$  prepared after 1 week. The spore suspension is pipetted onto the roots of seedlings in the 2-leaf stage (approximately 3 months old). The first symptoms become visible after 3 weeks. The mortality rate is recorded at regular intervals for 2 months after inoculation. In addition to the test inoculation, two standard control inoculations are included: one with a pathogenic isolate of *F. oxysporum f. sp. albedinis* and one with a non-pathogenic isolate of

issus latéralement des hyphes ou de conidiophores peu ramifiés; généralement abondantes, variables, ovales à ellipsoïdes, droites à légèrement courbées, mesurant  $5-12 \times 2,2-3,5 \mu\text{m}$ , produites dans une substance mucilagineuse. Macroconidies clairsemées chez certaines souches, portées sur des conidiophores plus ramifiés ou à la surface de sporodochies ressemblant à celles de *Tubercularia*, à parois fines, ayant généralement trois à cinq cloisons, fusoides à subulées et pointues aux deux extrémités, occasionnellement fusoides à falciformes, certaines ayant une extrémité crochue et une base pédicellée, mesurant  $27-46 \times 3-5 \mu\text{m}$  (3 cloisons) à  $50-66 \times 3,5-5 \mu\text{m}$  (6–7 cloisons). Les spores à trois cloisons sont les plus courantes (Fig. 1).

*Chlamydospores* (sur milieu SNA): parois lisses à rugueuses, 7–11  $\mu\text{m}$ , généralement abondantes, terminales ou intercalaires, généralement solitaires mais occasionnellement en paires ou en chaînes. La morphologies des spores sur milieu PDA ou sur l'hôte est généralement très variable et n'est donc pas fiable.

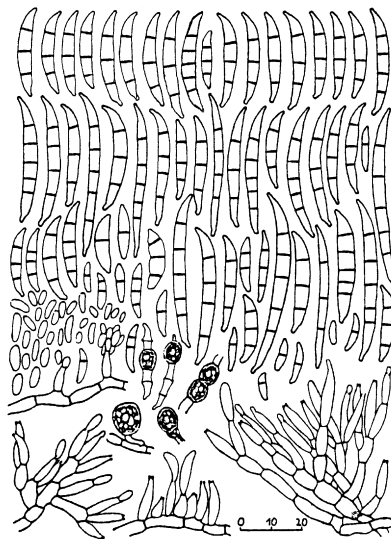
### Identification de cultures pures par des méthodes moléculaires

Une paire d'amorces (TL3–FOA28) a été mise au point par Fernández *et al.* (1998) pour le diagnostic de cultures pures de *F. o. albedinis* par PCR. Ce test permet de différencier le pathogène du palmier-dattier des autres *formae speciales* de *F. oxysporum*, ainsi que des souches saprophytes. Les séquences d'amorces sont 3'-GGTCGTCCGCAGAGTATACCGGC-5' (TL3) et 3'-ATCCCCGTAAAGCCCTGAAGC-5' (FOA28). L'ADN fongique doit être extrait d'une culture de *F. oxysporum* selon Fernández *et al.* (1998) ou par une méthode standard d'extraction de l'ADN des champignons. Le mélange de réaction doit contenir 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 100  $\mu\text{M}$  (de chaque) de dATP, dCTP, dGTP et dTTP; 0,5  $\mu\text{M}$  (de chaque) des deux amorces; 25 ng d'ADN génomique; 1,25  $\mu\text{L}$  de tampon de réaction concentré 10 fois; et 0,25 unités de polymérase ADN. Un témoin négatif (sans ADN cible) doit être inclus dans chaque expérimentation pour tester la contamination, ainsi qu'un témoin positif (ADN d'une souche de référence du pathogène). L'amplification doit être conduite dans un thermocycleur programmé comme suit: 1 cycle de 4 min à 95 °C suivi de 30 cycles de 30 s à 92 °C, 30 s à 62 °C, 45 s à 72 °C. Après ces 30 cycles, conduire un cycle de 15 min à 72 °C. Après l'amplification, 8  $\mu\text{L}$  du mélange de réaction sont chargés sur un gel d'agarose à 1,4%, séparés par électrophorèse, colorés au bromure d'éthidium, et observés et photographiés en lumière UV. L'ADN de la souche de référence du champignon (témoin positif), mais pas le témoin négatif, doivent produire un amplicon de 400 pb. Les isolats de *F. oxysporum* produisant un amplicon de cette taille doivent être identifiés comme étant *f. sp. albedinis*.

### Test de pouvoir pathogène

Le test de pouvoir pathogène des cultures pures peut être utilisé comme alternative au test de PCR. La méthode est simple du point de vue technologique mais nécessite beaucoup de temps (Djerbi, 1990). Des plantules de *P. dactylifera* issues de semis sont cultivées dans des conditions exemptes de maladie dans des sacs en polyéthylène transparent. Le champignon ne doit pas avoir été stocké sur milieu PDA ou autre milieu riche. Le champignon doit être transféré du SNA au PDA (solide ou liquide) à 25 °C et une suspension de  $10^6$  spores par mL doit être préparée après une semaine. La suspension de spores est pipetée sur les racines des plantules au stade deux feuilles (âgées d'environ trois mois). Les premiers symptômes sont visibles après 3 semaines. Le taux de mortalité est noté à intervalle régulier pendant 2 mois après l'inoculation. Outre cette inoculation, deux inoculations témoins sont





**Fig. 1** Conidia, conidiophores and chlamydospores of *Fusarium oxysporum* (Courtesy Gerlach & Nirenberg, 1982).

*F. oxysporum* (to be obtained from the sources given below). The pathogenicity test is valid if the final mortality rates obtained with both the known pathogenic isolate and the test isolate are higher than 20%, with no disease occurring with the non-pathogenic isolate. Date palm is genetically variable due to its dioecious nature, so a minimum of 50 seedlings should be used in the pathogenicity test.

### Comparison with similar species

On *Phoenix canariensis*, a wilt occurs which is caused by a different *forma specialis* of *F. oxysporum*, f. sp. *canariensis*. Yet another *forma specialis*, f. sp. *elaëidis*, is found on oil palm (*Elaëis guineensis*). The three *formae speciales* may be distinguished by pathogenicity testing or, preferably, by PCR. The primer pair TL3–FOA28 developed by Fernández *et al.* (1998) produces an amplicon only with *F. o. albedinis*, and not with the two other *formae speciales* from *Arecaceae*, with *formae speciales* from other hosts, or with non-pathogenic (saprophytic) strains of *F. oxysporum* from *P. dactylifera*.

### Reference cultures

ATCC 12301 Parklane Drive, Rockville, MD 20852-1776, USA. Fax +1 301 231 5826.

Reference cultures of *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* from D. Fernández can be obtained from IRD – Institut de Recherche pour le Développement, 911 avenue Agropolis, BP5045, 34032 Montpellier (FR).

### Requirements for a positive identification

The procedures for detection of Bayouhd disease and identification of the pathogen described in this protocol should have been followed.

The disease symptoms, growth characteristics and morphology of the pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, should be in accordance with the descriptions in the protocol.

inclusés, l'une avec un isolat pathogène de *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* et l'autre avec un isolat non pathogène de *F. oxysporum* (devant être obtenu auprès des sources indiquées ci-dessous). Le test de pouvoir pathogène est valide si la mortalité finale dépasse 20% pour l'isolat pathogène connu et aussi pour l'isolat étudié, et que les plantules inoculées avec l'isolat non pathogène ne présentent pas de signe de maladie. Le palmier-dattier est génétiquement variable à cause de sa nature dioïque, et il faut donc utiliser au moins 50 plantules dans le test de pouvoir pathogène.

### Comparaison avec des espèces similaires

Sur *Phoenix canariensis*, un flétrissement est causé par une autre *forma specialis* de *F. oxysporum*, f. sp. *canariensis*. Une troisième *forma specialis*, f. sp. *elaëidis*, est trouvée sur palmier à huile (*Elaëis guineensis*). Les trois *formae speciales* peuvent être différenciées par des tests de pouvoir pathogène ou, de préférence, par PCR. La paire d'amorces TL3–FOA28 développée par Fernández *et al.* (1998) produit un amplicon seulement avec *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, mais pas avec les deux autres *formae speciales* sur *Arecaceae*, ou les *formae speciales* sur d'autres hôtes, ou les souches non pathogènes (saprophytes) de *F. oxysporum* isolées à partir de *P. dactylifera*.

### Cultures de référence

ATCC 12301 Parklane Drive, Rockville, MD 20852-1776, USA. Fax +1 301 231 5826.

Les cultures de référence de *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* de D. Fernández peuvent être obtenues auprès de l'Institut de Recherche pour le Développement, 911 avenue Agropolis, BP5045, 34032 Montpellier (FR).

### Exigences pour une identification positive

Les procédures de détection de la maladie du Bayouhd et l'identification du pathogène décrites dans ce protocole doivent avoir été suivies.

Les symptômes de maladie, les caractéristiques de croissance et la morphologie du pathogène, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, doivent correspondre aux descriptions données dans ce protocole.

The test isolate of *Fusarium oxysporum* should have been identified unambiguously as f. sp. *albedinis* through PCR with the primer pair TL3–FOA28. Alternatively, the pathogenicity of the test isolate should have been confirmed on date palm (*Phoenix dactylifera*).

## Report on the diagnosis

A report on the execution of the protocol should include:

- information on the origin of the infected material;
- an indication of the magnitude of the infection (how much damaged tissue);
- a description of the disease symptoms (preferably including photographs);
- a description of the growth characteristics of the fungus on the mentioned media and, if possible, measurements and/or drawings or photographs of fungal organs;
- comments on the certainty or uncertainty of the identification;
- a copy of the PCR test results of the culture along with positive and negative controls showing that the 400 bp amplicon has been obtained for the investigated isolate of *F. oxysporum* and for DNA from a reference isolate of *F. o. albedinis*, but not for the negative control. Alternatively, the outcome of pathogenicity testing (including a table with data for the investigated isolate of *F. oxysporum*, a reference isolate of the pathogen and a non-pathogenic isolate of *F. oxysporum*) may be given.

A pure culture of the pathogen should be available (stored on SNA at 4 °C).

## Further information/Renseignements supplémentaires

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

- Institut National de la Recherche Agronomique, BP 115, Hassen Badi, Belfort, El Harrach-Alger, Algeria.  
D. Fernández, Institut de Recherche pour le Développement, 911 avenue Agropolis, BP5045, 34032 Montpellier, France.

## Acknowledgements/Remerciements

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

- R. P. Baayen, Dutch Plant Protection Service, Wageningen, the Netherlands.  
R. Pieters, Dutch Plant Protection Service, Wageningen, the Netherlands.

L'isolat de *Fusarium oxysporum* étudié doit avoir été identifié sans ambiguïté comme étant f. sp. *albedinis* par PCR avec la paire d'amorces TL3–FOA28. Alternativement, le pouvoir pathogène de l'isolat étudié doit avoir été confirmé sur palmier-dattier (*Phoenix dactylifera*).

## Rapport sur le diagnostic

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

- des informations sur l'origine du matériel infecté;
- une indication de l'étendue de l'infection (quantité de tissus endommagés);
- une description des symptômes de maladie (de préférence accompagnée de photographies);
- une description des caractéristiques de croissance du champignon sur le milieu mentionné et, si possible, des mesures et/ou des dessins ou photographies des organes fongiques;
- des commentaires sur les certitudes ou les doutes relatifs à l'identification;
- une copie des résultats de PCR de la culture, et des témoins positif et négatif, montrant que l'amplicon de 400 pb a été obtenu pour l'isolat de *F. oxysporum* étudié et pour l'ADN d'un isolat de référence de *F. o. albedinis*, mais pas pour le témoin négatif. Alternativement, on peut fournir le résultat des tests de pouvoir pathogène (y compris un tableau présentant les données pour l'isolat de *F. oxysporum* étudié, un isolat de référence du pathogène et un isolat non pathogène de *F. oxysporum*).

Une culture pure du pathogène doit être disponible (stockée sur milieu SNA à 4 °C).

## References/Références

- CMI (1978) *Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, no. 211 *Fusarium oxysporum*. CAB International, Wallingford (GB).  
CMI (1992) *Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, no. 1111 *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*. CAB International, Wallingford (GB).  
Djerbi M (1990) Méthodes de diagnostic du Bayouh du palmier dattier. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **20**, 607–613.  
EPPO/CABI (1997). *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*. In: *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn, pp. 758–763. CAB International, Wallingford (GB).  
Fernández D, Ouinten M, Tantaoui A, Geiger JP, Daboussi MJ & Langin T (1998) *Fot1* insertions in the *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* genome provide diagnostic PCR targets for detection of the date palm pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 633–636.  
Gerlach W & Nirenbery H (1982) *The Genus Fusarium – a Pictorial Atlas*. BBA, Berlin (DE).  
Tantaoui A, Ouinten M, Geiger JP & Fernández F (1996) Characterization of a single clonal lineage of *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* causing Bayouh disease of date palm in Morocco. *Phytopathology* **86**, 787–792.