Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE

Direction Générale de l'Alimentation Sous-direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux **LNPV** **7, rue jean Dixméras** **49044 Angers cedex 01** Suivi par : Hélène SOUBELET Tél (/ Fax / Mail) : 02.41.36.83.38 (Réf. Interne / Classement)	**CIRCULAIRE** **DGAL/SDQPV/C2007-8014** **Date: 12 juillet 2007**

Date de mise en application : immédiate

Date limite de réponse:

Nombre d'annexes : 2

Confidentialité : tout public

Objet : Méthode officielle de détection de Phytophthora ramorum sur feuilles, rameaux, bourgeons et troncs par isolement pour publication au B.O.

Résumé : Cette méthode qualitative s'applique à la détection par isolement de *Phytophthora ramorum* sur divers végétaux.

Mots-clés : Mycologie - Méthode de détection – *Phytophtora ramorum* - Isolement

Destinataires	
Pour exécution : Toutes DRAF Tous Laboratoires	Pour information :

Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
Direction Générale de l'Alimentation
Sous-Direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux

LNPV

Laboratoire

National de la

Protection des

Végétaux

Végétal : divers,

Détection de

Phytophthora ramorum

sur feuilles, rameaux, bourgeons et troncs

par isolement

Réf. : MF/07/22 version a

<u>Laboratoire de référence</u> :
LNPV Unité de Mycologie Agricole et Forestière de Nancy
Domaine de Pixérécourt
54220 MALZEVILLE

Juillet 2007

VEGETAL : DIVERS

DETECTION DE *Phytophthora ramorum*

SUR FEUILLES, RAMEAUX, BOURGEONS ET TRONCS PAR ISOLEMENT

Avertissements et précautions de sécurité……... 3

Introduction…….…… 3

1. Objet…….. 3

2. Domaine d'application…….. 3

3. Définitions……. 3

4. Principe……. 4

5. Réactifs et produits…… 4

6. Matériel et appareillage……. 5

7. Echantillonnage et échantillons……. 6
   7.1. Echantillonnage et transport……... 6
   7.2. Préparation et conservation de l'échantillon……... 6

8. Mode opératoire…… 7
   8.1. Prise d'analyse…… 7
   8.2. Isolement……. 8
      8.2.1. Désinfection de l'échantillon……. 8
      8.2.2. Isolement…… 8
      8.2.3. Incubation et lecture……... 8

9. Identification…… 9

10. Expression des résultats…… 9

11. Références bibliographiques……. 10

12. Annexes……. 11
   Annexe 1…… 12
   Annexe 2……

VEGETAL : DIVERS

DETECTION DE *Phytophthora ramorum*

SUR FEUILLES, RAMEAUX, BOURGEONS ET TRONCS PAR ISOLEMENT

Avertissements et précautions de sécurité

• Décontamination de tout le matériel jetable utilisé ainsi que des restes de l'échantillon après analyse, par stérilisation en chaleur humide au moins 20 minutes à 121°C environ ou par tout autre traitement permettant un résultat équivalent.

• Désinfection du matériel recyclable (notamment verrerie) soit par stérilisation dans les conditions précédentes (si le matériel le supporte) soit par trempage pendant au moins 20 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium ou d'eau de Javel diluée et titrée à au moins à 1 degré chlorométrique, préparée extemporanément.

0. Introduction

L'agent phytopathogène concerné est ***Phytophthora ramorum***, Oomycète agent de la mort brutale du chêne (sudden oak death).

1. Objet

Cette méthode qualitative s'applique à la détection de ***Phytophthora ramorum*** sur divers végétaux.

2. Domaine d'application

La méthode permet de détecter ***Phytophthora ramorum*** sur les feuilles, rameaux et troncs de diverses espèces végétales*.

* Une liste officielle d'espèces végétales sensibles à ***Phytophthora ramorum*** a été établie par la Commission européenne (Décision communautaire 2002/757/CE du 19 septembre 2002, modifiée par la Décision 2004/426/CE du 29 avril 2004). Une liste nationale de végétaux à surveiller en priorité est régulièrement publiée par le biais d'une Note de service (DGAL-SDQPV). Ces listes sont très évolutives et non exhaustives, les espèces végétales susceptibles d'être analysées sont donc nombreuses et variées (arbres, arbustes, feuillus, conifères…).
Les essences les plus fréquemment contaminées par ***Phytophthora ramorum*** en Europe sont *Rhododendron* spp., *Viburnum* spp. et, dans une moindre mesure, *Camellia* spp.

3. Définitions

Caduque : Qui se détache facilement.
Chlamydospore : Spore de conservation, unicellulaire et asexuée, à la paroi souvent épaissie et

colorée.

Coralloïde : Dont l'aspect tortueux rappelle le corail .

Hétérothalisme : Condition où la reproduction sexuée n'est possible qu'entre différents thalles.

Homothallisme : Condition où la reproduction sexuée peut avoir lieu sans interaction entre différents thalles.

Hyphe : Filament du mycélium.

Mycélium : Organe végétatif.

Oogone : Cellule mère du gamète femelle.

Papille : Protubérance située au niveau de l'ouverture du sporange.

Pédicelle : Fragment d'hyphe restant attachée au sporange après que celui-ci se soit détaché du mycélium.

Sporange : Organe produisant des spores asexuées de façon endogène (= sporocyste).

Swelling Renflement mycélien plus ou moins globuleux.

4. Principe

Détection et identification de ***Phytophthora ramorum*** par isolement du micro-organisme sur milieu gélosé sélectif à partir d'un échantillon de feuilles, rameaux ou bois présentant des symptômes.

5. Réactifs et produits

5.1. Eau distillée ou osmosée, eau du robinet.

5.2. Ethanol 70° **[Produit inflammable, à tenir éloigné des sources de chaleur et des flammes nues].**

5.3. Acide lactique pur ou solution de bleu de méthyle à 0,5% dans de l'acide lactique ou solution de fuchsine à 0,12% dans de l'acide lactique.

5.4. Eau de Javel ou solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl), 1°Cl minimum **[Produits corrosifs à manipuler avec précautions].**

Pour l'isolement :

5.5. Alcool à brûler **[Produit inflammable, à tenir éloigné des sources de chaleur et des flammes nues].**

5.6. Milieux gélosés (composition pour 1l de milieu) :

Milieu spécifique ***Phytophthora*** : 17 g de Corn meal agar (DIFCO ou équivalent)
Eau distillée ou osmosée qsp 1000 ml.

Stérilisation à 122°C pendant 20 mn, quand la température est descendue à 45°C, ajouter :

10 mg de Pimaricine **[Nocif par inhalation, contact avec la peau et par ingestion. Porter un vêtement de protection approprié]**

10 mg de Rifampicine **[toxique. Peut altérer la fertilité. Risques pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant. Nocif par inhalation,**

contact avec la peau et par ingestion. Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. Eviter l'exposition, se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette). Porter un vêtement de protection, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage appropriés. Ne pas respirer les poussières]

250 mg d'Ampicilline **[Nocif, peut entraîner une sensibilisation par inhalation et par contact avec la peau. Ne pas respirer les vapeurs et aérosols. Porter un vêtement de protection approprié]**

15 mg de benomyl **[Nocif, peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau. Facilement inflammable. Dangereux pour les organismes aquatiques]**

50 mg d'hymexazole **[Irritant pour les yeux]**

Corn meal agar (CMA) : 17 g de Corn meal agar
Eau distillée ou osmosée qsp 1000 ml
Stérilisation 20 min. à 122°C

V8 agar 200 ml de jus de légumes V8 clarifié (4g de $CaCO_3$ sont mélangés à 350 ml de jus V8 puis le mélange est centrifugé 15 mn à 5000 trs/mn. Le surnageant est utilisé comme jus « clarifié »)
15 g d'Agar-agar
Eau distillée ou osmosée qsp 1000 ml
Stérilisation 20 min. à 122°C

***Conservation des milieux de culture préparés au laboratoire* :**
Phytophthora, V8 agar et CMA : 3 mois au maximum au réfrigérateur, ou 1 mois au maximum entre 18 et 23°C dans des conditions évitant toute modification de leur composition (à l'abri de la lumière et de la dessication).

6. Matériel et appareillage

Matériel courant de laboratoire et notamment :

Petit matériel

6.1. Boîtes de Petri stériles.
6.2. Parafilm.

6.3. Aiguilles, scalpels avec lames neuves.
6.4. Lames et lamelles.
6.5 Coton, papier absorbant, papier filtre.

↟Appareillage

6.6. Microscope photonique avec micromètre (grossissement jusqu'à 1000 fois).
6.7. Loupe binoculaire (minimum X10).
6.8. Balance analytique de portée et de précisions adaptées.
6.9. Hotte permettant un environnement stérile avec bec Bunsen.
6.10. Réfrigérateur (T° = 5°C ± 3°C).
6.11. Enceinte climatisée ou salle climatisée pouvant assurer une température de 22°C ± 3°C
6.12. Appareil pour la stérilisation en chaleur humide (autoclave pouvant atteindre une température minimale de 121°C pendant 20 minutes) ou tout autre matériel permettant d'obtenir le même résultat
6.13. Appareil permettant une stérilisation des milieux de culture à 122°C.

7. Echantillonnage et échantillons

7.1. Echantillonnage et transport

Les symptômes **(ANNEXE 1):**

Sur arbustes, ce sont des nécroses et/ou colorations de tiges et rameaux, des taches foliaires, des brunissements ou noircissements de bourgeons et des flétrissements de tiges ou de pousses.

Sur arbres (fagacées essentiellement), la maladie se caractérise par l'apparition de chancres parfois suintants le plus souvent à la base des troncs, de couleur brun foncé à noir goudronneux. Les parties atteintes peuvent être ensuite colonisées par des insectes. Le flétrissement puis la mort de l'arbre surviennent lorsque les chancres sont ceinturants.

Tableau 1 : symptomatologie sur les principales espèces végétales contaminées en Europe

NB : les hôtes principaux figurent en caractères gras

Rhododendron **spp.**	**Taches/nécroses brunes à noires sur feuilles, rameaux, extrémités de pousses, bourgeons et boutons floraux. Chancres sur rameaux pouvant entraîner leur flétrissement**
Viburnum **spp.**	**Taches/nécroses sur rameaux entraînant leur flétrissement puis leur mort. Taches brunes à noires sur feuilles (surtout sur les espèces à feuilles persistantes). Des symptômes sur fleurs sont également possibles**
Camellia **spp.**	**Taches/nécroses sur feuilles et pousses**
Pieris spp.	Taches/nécroses foliaires, lésions sur tiges et rameaux conduisant à des flétrissements
Kalmia latifolia	Taches/nécroses foliaires
Arbutus unedo	Taches/nécroses foliaires
Leucothoe fontanesiana	Taches/nécroses foliaires
Vaccinium vitis-idaea	Taches/nécroses foliaires, lésions sur tiges et rameaux conduisant à des flétrissements
Syringa vulgaris	Taches/nécroses foliaires
Hamamelis virginiana	Taches/nécroses sur feuilles (ces nécroses sont souvent délimitées par les nervures), rameaux, extrémités de pousses, bourgeons et boutons floraux.
Taxus baccata	Nécroses de jeunes aiguilles et de pousses

Aesculus hippocastanum	Chancres pouvant être suintants
Castanea sativa	Taches/nécroses foliaires, chancres pouvant être suintants*
Fagus sylvatica	Chancres pouvant être suintants
Quercus cerris	Chancres pouvant être suintants
Quercus falcata	Chancres pouvant être suintants
Quercus ilex	Taches/nécroses sur feuilles et rameaux, flétrissements de pousses
Quercus rubra	Chancres pouvant être suintants

*Sur châtaignier, seuls des symptômes foliaires ont été observés en Europe. L'état des troncs et branches est néanmoins à surveiller.

Le prélèvement :

Symptômes sur rameaux et feuilles : couper au sécateur la partie atteinte en incluant les limites de nécrose. Désinfecter les outils après chaque prélèvement.

Symptômes sur tronc et branches : prélever au ciseau à bois un morceau d'écorce et le bois attenant incluant la limite de la nécrose sous corticale ; taille de l'échantillon 10 X 10 X 3 cm minimum.

Envelopper l'échantillon dans du papier journal puis dans un sac plastique fermé hermétiquement. Désinfecter les outils après chaque prélèvement.

7.2. Préparation et conservation de l'échantillon

Exploiter l'échantillon dès son arrivée au laboratoire. Cependant son analyse peut être reportée de quelques jours (7 maximum) s'il est conservé au réfrigérateur à 5°C±3°C.

Si l'échantillon est sale (terre, mousse…) le nettoyer par rinçage ou éventuellement brossage dans de l'eau, en prenant soin de ne pas endommager les parties intéressantes (l'eau sera récupérée et stérilisée en même temps que la verrerie ; voir AVERTISSEMENTS). Laisser sécher ensuite à l'air libre sur du papier absorbant.

8. Mode opératoire

Avertissements et précautions

Phytophthora ramorum a un statut de parasite réglementé, c'est à dire qu'il doit être manipulé dans de strictes conditions de quarantaine. Bien qu'il ne figure pas sur les listes de la directive 2000/29/CE, l'exigence pour le confinement de cet agent pathogène à dissémination aérienne doit être de type NS3. En outre, il faut prendre les précautions suivantes pour la manipulation des échantillons pendant l'analyse :

- bien séparer les échantillons,
- désinfecter mains et matériel à l'éthanol à 70° après chaque manipulation.

8.1. Prise d'analyse

Un examen visuel rapide permet de découper l'échantillon et de conserver les parties présentant les symptômes les plus typiques (taches foliaires, nécroses sur rameaux, suintements noirs sur troncs etc – **ANNEXE I**). Détruire les zones sans intérêt.

8.2. Isolement

Toutes les opérations (sauf incubation et lecture) ont lieu en conditions stériles (sous hotte).

8.2.1. Désinfection de l'échantillon

Avant d'isoler il est nécessaire de désinfecter l'échantillon en passant sur toute sa surface un coton hydrophile imbibé d'éthanol à 70°. Sur les parties ligneuses, l'excès d'alcool peut être éliminé par un passage rapide à la flamme. Eviter de trop imbiber l'échantillon d'alcool afin de ne pas endommager la partie active de la lésion (limite de nécrose).

8.2.2. Isolement

Avec un scalpel stérilisé (trempé dans l'alcool à brûler puis passé à la flamme et refroidi) prélever des petits fragments (2 mm^2 environ) de tissu en limite de la zone nécrotique ou colorée. Sur parties ligneuses, ces fragments peuvent être prélevés après avoir enlevé au scalpel la couche superficielle de l'écorce.
Déposer les fragments directement sur milieu ***Phytophthora*** à raison d'environ 8 implants par boîte. Il est souhaitable d'avoir au moins 3 boîtes par échantillon, avec si possible des isolements sur symptômes variés (taches foliaires, nécroses de bourgeons…). Stériliser le scalpel entre chaque prélèvement.

8.2.3. Incubation et lecture

Conditions d'incubation : dans une enceinte à température contrôlée (T= 22° ± 3°C) ou à défaut dans une pièce tempérée (T°= 22 ± 3 °C). L'éclairage est indifférent.

Au bout de 4 à 6 jours jours, faire une première observation au microscope à travers le fond de la boîte (grossissement X 100), puis régulièrement (deux fois par semaine environ).

Pour des observations plus précises (pour effectuer des mesures par exemple), prélever à l'aide d'une aiguille désinfectée (trempée dans l'alcool à brûler puis passée à la flamme et refroidie) du mycélium et le monter dans de l'acide lactique ou une solution de bleu de méthyle ou de fuchsine, entre lame et lamelle.

Repiquages éventuels : si plusieurs types de mycélium apparaissent dans la même boîte, effectuer sans attendre le repiquage de ceux dont l'aspect peut faire penser à ***P. ramorum*** (voir paragraphe 9) sur milieux CMA et V8, afin d'éviter des mélanges. Effectuer également des repiquages en cas de doute sur l'identification de l'organisme.

9. Identification (ANNEXE 2)

Tableau 1 : caractéristiques culturales de ***Phytophthora ramorum***. Illustrations en **Annexe 2**

Colonie	Sur milieux ***Phytophthora*** et CMA : mycélium blanc non aérien, peu dense, à croissance lente (environ 2 mm par jour), bord de la colonie irrégulier Sur milieu V8 -agar: croissance moyenne (3 mm par jour voire plus), mycélium assez dense et aérien, aspect homogène avec parfois de légers cercles concentriques ou des rosettes peu marquées

Mycélium	Coralloïde sur milieux ***Phytophthora*** et CMA, moins caractéristique sur V8-agar. Pas de swellings.
Chlamydospores	Produites après 7 à 10 jours de culture, souvent dans les parties anciennes du mycélium. Diamètre important: jusqu'à 80 µm , hyalines à brun foncé. La rapidité d'apparition ainsi que la quantité de chlamydospores peuvent varier d'un isolat à l'autre. Une incubation des cultures 3 jours à l'obscurité peut favoriser leur production
Sporanges	Produits en abondance à la surface du mycélium, particulièrement sur V8-agar, semi-papillés, caduques, à pédicelles courts (moins de 5 µm) ou absents. Taille : 40-80 µm x 20-32µm (moyenne 52 µm x 25 µm). Ratio longueur/largeur souvent supérieur à 2. Ellipsoïdes, ovoïdes allongés, fusoïdes. Souvent en petits groupes.
Organes sexuels	Non observables en culture simple (espèce hétérothallique). Oogones, anthéridies et oospores peuvent être obtenus par appariement avec le type sexuel opposé, de ***Phytophthora cryptogea*** par exemple (Werres et Zielke, 2003)

Pour être identifié en tant que ***Phytophthora ramorum*** , un isolat doit présenter **l'ensemble des caractéristiques suivantes** :

- Sur milieu ***Phytophthora*** ou CMA : mycélium blanc à croissance lente, légèrement à fortement coralloïde.
- Présence de chlamydospores de grandes tailles (plus de 40 µm de diamètre et jusqu'à 80 µm) hyalines à brun foncé
- Présence de sporanges allongés (40-80µm x 20-32 µm) ellipsoïdes, ovoïdes ou fusoïdes, semi-papillés, caduques à pédicelles courts ou absents.
- Pas d'organes sexuels (oogones, anthéridies, oospores) en culture simple.

Si après 10 jours aucun mycélium susceptible d'être ***Phytophthora ramorum*** n'a été observé dans les boîtes d'isolement, abandonner les recherches. Ce délai peut être porté jusqu'à trois semaines en cas de repiquage(s).

10. Expression des résultats

Exprimer le résultat de l'analyse par un tableau ou par une phrase du type :

↑ lorsqu'il est négatif :
Phytophthora ramorum non détecté sur l'échantillon analysé par isolement mycologique.

↑ lorsqu'il est positif :
Phytophthora ramorum détecté dans l'échantillon analysé par isolement mycologique.

Dans le cas où ***Phytophthora ramorum*** a été identifié dans un laboratoire autre que le laboratoire de référence (lors d'une analyse de routine type diagnostic général par exemple), une analyse de confirmation doit être demandée auprès du laboratoire de référence. Dans ce cas, le demandeur transmettra à ce dernier les différents éléments en sa possession (boîtes de culture, lames fixées, et éventuellement échantillon) accompagnés d'une fiche de renseignements dont l'imprimé est à demander au laboratoire de référence.

11. Références bibliographiques

DELATOUR, C. ; SAURAT, C. ; HUSSON, C. ; IOOS, R. ; SCHENCK, N. ; ROSE, S., 2002 : Discovery of ***Phytophthora ramorum*** in France on *Rhododendron* and experimental symptoms on *Quercus robur*. *Sudden Oak Death Symposium, Monterey, California*, 15-18 décembre 2002 (poster).

EPPO/OEPP, 2004 : Diagnostic protocols for regulated pests/ Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés : ***Phytophthora ramorum***. (brouillon novembre 2004).

RIZZO, D.M. ; GARBELOTTO, M. ; DAVIDSON, J.M. ; SLAUGHTE, G.W. ; KOIKE S.T., 2002 : ***Phytophthora ramorum*** as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease* **86**, 205-214.

WERRES, S. ; MARWITZ, R. ; MAN IN 'T VELD, W.A. ; DE COCK, A.W.A.M. ; BONANTS P.J.M. ; DE WEERDT M. ; THEMAN K. ; ILIEVA E. ; BAAYEN R.P., 2001 : ***Phytophthora ramorum*** sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological Research* **105**, 1155-1165.

WERRES, S. ; ZIEHLKE, B., 2003 : First studies on the pairing of ***Phytophthora ramorum***. *Journal of Plant Disease and Protection* **110**, 129-130.

12. Annexes

ANNEXE 1 : « Symptômes de ***Phytophthora ramorum*** sur divers végétaux».
ANNEXE 2 : « Caractéristiques culturales de ***Phytophthora ramorum*** ».

Le Sous Directeur de la Qualité
Et de la Protection des Végétaux

Joël MATHURIN

ANNEXE 1: Symptômes de *Phytophthora ramorum* sur divers végétaux

Sur *Rhododendron* sp. :



Photo: S. Werres, BBA Braunschweig

Nécrose sur rameau



Photo : INRA Nancy-Champenoux

Taches foliaires (face supérieure)



Photo: INRA Nancy-Champenoux

Nécroses de boutons floraux

Sur *Viburnum* sp.



Photo : C. Lane, CSL, UK

Nécroses de pousses



Photo : C. Lane, CSL, UK

Taches foliaires



Photo : CSL (UK)

Nécroses à la base des tiges

Sur *Camellia* sp.



Photo : DEFRA (UK)



Photo : DEFRA (UK)

Taches foliaires

Sur *Pieris* sp.



Photo : DEFRA (UK)



Photo : C. Lane, CSL (UK)

Sur *Hamamelis virginiana*



Photo : DEFRA (UK)

Taches foliaires (délimitées souvent par les nervures)

Sur *Kalmia* sp.



Photo : C. Lane, CSL (UK)

Taches foliaires

Sur *Quercus falcata*



Photo: DEFRA (UK)

Sur *Fagus sylvatica*



Photo: DEFRA (UK)

Chancres parfois suintants

ANNEXE 2: Caractéristiques culturales de *Phytophthora ramorum*

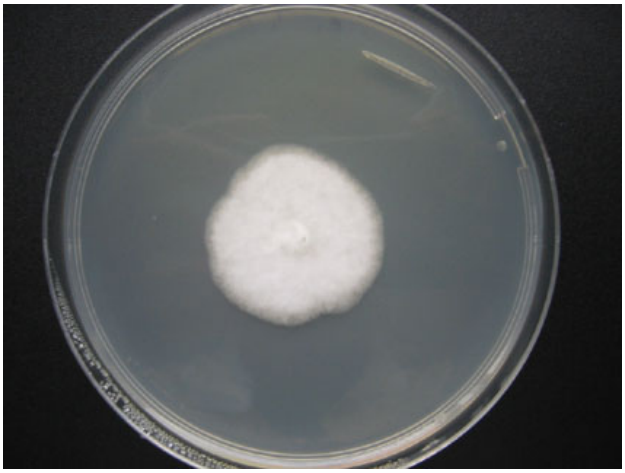


Photo LNPV-UMAF

Culture sur V8 agar (4 jours)

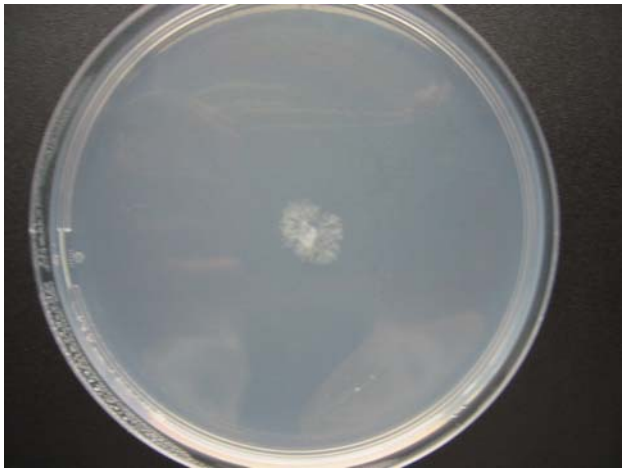


Photo LNPV-UMAF

Culture sur Corn meal agar (4 jours)

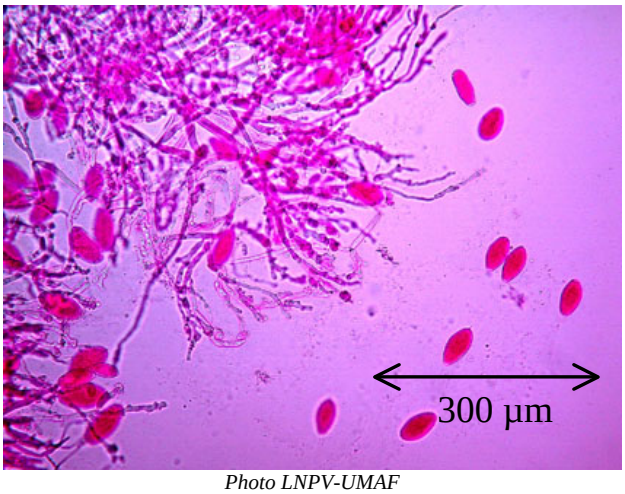


Photo LNPV-UMAF

Mycélium coralloïde et sporanges (colorant : fuchsine)

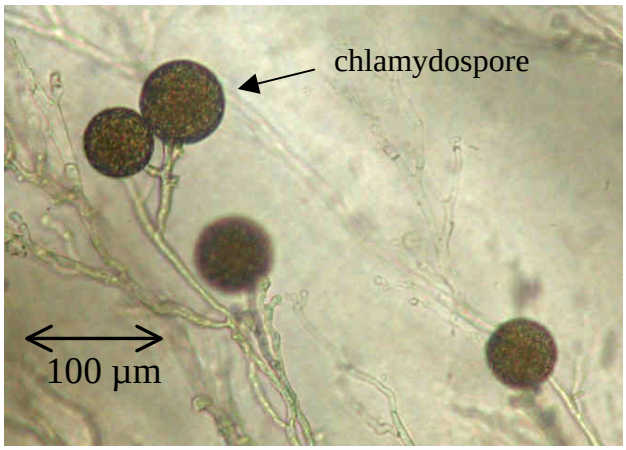


Photo LNPV-UMAF

Chlamydospores (montage dans l'eau)

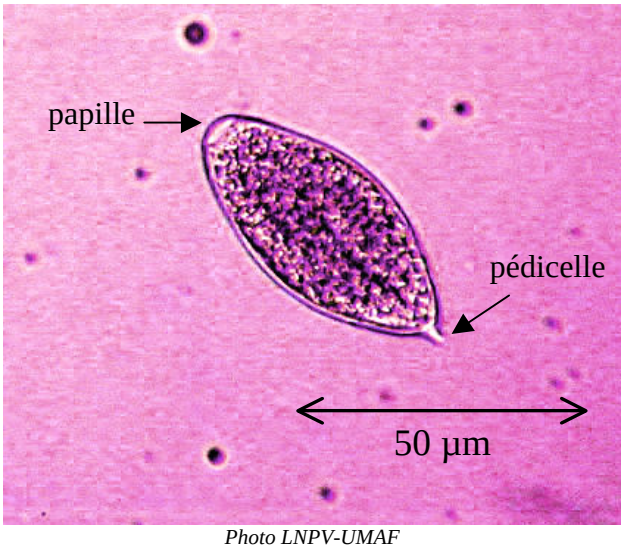


Photo LNPV-UMAF

Sporange semi-papillé, caduque à pédicelle court (colorant : fuchsine)

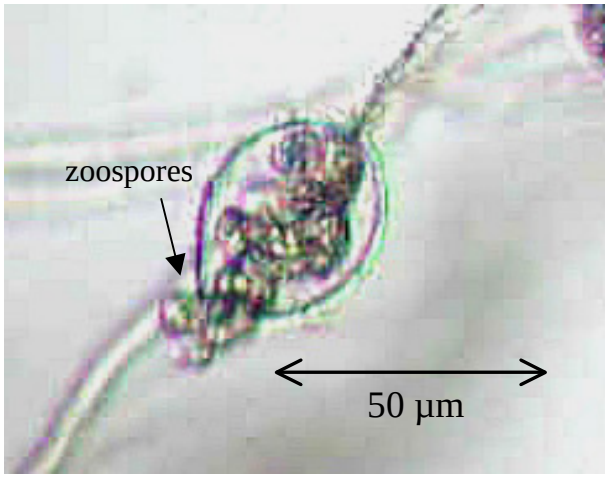


Photo LNPV-UMAF

Sporange libérant ses zoospores (montage dans l'eau)