

LNPV

Laboratoire

National de la

Protection des

Végétaux

Végétal : camélia (*Camellia* spp.),

détection de *Ciborinia camelliae*

sur fleurs par observation

macroscopique ou observation

microscopique ou mise en chambre

humide et observation microscopique

Réf.: Méthode ML/05/19 version a

Laboratoire de référence :

LNPV Unité de Mycologie agricole et forestière
Domaine de Pixérécourt – BP 90059
54220 MALZEVILLE

VEGETAL : CAMELIA (*CAMELLIA SPP.*)

DETECTION DE *Ciborinia camelliae* SUR FLEURS PAR OBSERVATION MACROSCOPIQUE OU OBSERVATION MICROSCOPIQUE OU MISE EN CHAMBRE HUMIDE ET OBSERVATION MICROSCOPIQUE

SOMMAIRE

Avertissement et précautions de sécurité	3
1. Objet.....	3
2. Domaine d'application.....	3
3. Définitions.....	3
4. Principe	4
5. Réactifs et Produits	4
6. Matériel et Appareillage.....	4
7. Échantillonnage et échantillons.....	4
7.1. Échantillonnage et arrivée au laboratoire.....	4
7.2. Préparation et conservation de l'échantillon pour analyse.....	5
8. Mode opératoire	5
8.1. Prise d'analyse	5
8.2. Observation de l'échantillon	5
8.3. Observation microscopique.....	5
8.4. Mise en chambre humide	6
9. Identification	6
10. Expression des résultats	6
11. Cas particulier	6
12. Références bibliographiques	7
13. Annexes	7

VEGETAL : CAMELIA (*CAMELLIA SPP.*)

DETECTION DE *Ciborinia camelliae* SUR FLEURS PAR OBSERVATION MACROSCOPIQUE OU OBSERVATION MICROSCOPIQUE OU MISE EN CHAMBRE HUMIDE ET OBSERVATION MICROSCOPIQUE

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 pendant 20 minutes à une température minimale de 122°C ou au moyen de tout matériel permettant d'obtenir le même résultat.
- Désinfection du matériel recyclable (notamment verrerie) soit par stérilisation dans les conditions précédentes (si le matériel le supporte) soit par trempage pendant au moins 1 heure dans une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) ou d'eau de Javel, diluée et titrée à au moins 2°C1.

1. Objet

Cette méthode qualitative s'applique à la détection de *Ciborinia camelliae* Kohn (synonyme *Sclerotinia camelliae* Hara) agent du dépérissement des fleurs de camélia (*Camellia* spp.).

Ce champignon, toujours considéré comme absent de l'Union Européenne, est inscrit dans l'annexe IIA1 de la Directive européenne 2000/29/CE (organismes nuisibles dont l'introduction et la dissémination doivent être interdites dans tous les états membres s'ils se trouvent sur certains végétaux ou produits végétaux - organismes nuisibles inexistant dans la Communauté et importants pour toute la Communauté).

Cette méthode s'utilise donc pour les analyses officielles qui interviennent dans le cadre des contrôles phytosanitaires réglementaires réalisés pour la surveillance du territoire et à l'import.

La détention et la manipulation de *Ciborinia camelliae* lors de ces analyses, sont effectuées dans des conditions de précautions appropriées conformément à la directive 95/44/CE (annexe I).

2. Domaine d'application

La méthode permet de détecter *C. camelliae* sur les fleurs de camélia (*Camellia* spp.).

3. Définitions

Sporodochie : amas de microconidies

Microconidie : spore asexuée

Phialide : cellule conidiogène allongée donnant naissance aux microconidies

Sclérote : structure ferme et épaisse formée à la base d'un pétale

4. Principe

Détection et identification de *C. camelliae* par observation visuelle d'éléments macroscopiques (sclérotés), ou observation morphologique microscopique, après passage éventuel en chambre humide pour favoriser la sporulation.

5. Réactifs et produits

5.1. Eau distillée ou osmosée.

5.2. Ethanol 70° [**Produit inflammable**].

5.3. Eau de Javel [**Irritant pour les yeux et la peau**] ou solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) diluée et titrée à au moins 2°Cl [**Corrosif - Au contact d'un acide dégage un gaz toxique – Provoque des brûlures**].

5.4. Acide lactique pur [**Irritant pour la peau - Risques de lésions oculaires graves**] ou solution de bleu de méthyle à 0,5% dans de l'acide lactique.

6. Matériel et appareillage

6.1. Réfrigérateur ou chambre froide permettant de garantir une conservation des échantillons en froid positif ($T = 5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$).

6.2. Loupe binoculaire à grossissements différents (minimum 10 X).

6.3. Microscope photonique à différents grossissements (de 40 à environ 800 X) et équipé d'un micromètre oculaire ou de tout autre matériel permettant la réalisation de mesures (exemple : système vidéo d'acquisition et de traitement d'image).

6.4. aiguilles montées, pinces, brûleur à alcool.

6.5. Boîtes de Petri en verre ou boîtes en plastique selon le nombre de fleurs par échantillon.

6.6. Papier absorbant ou papier filtre.

6.7. Lames et lamelles.

6.8. Pulvérisateur manuel.

6.9. Enceinte thermostatique pourvue d'un éclairage de type lumière blanche, pouvant assurer une température de $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ et éventuellement une photopériode de 12 heures.

6.10. Appareil pour la stérilisation en pression de vapeur (autoclave permettant d'obtenir une température minimale de 122°C pendant 20 minutes). Tout autre matériel permettant d'obtenir les mêmes résultats est admis.

7. Échantillonnage et échantillons

7.1. Échantillonnage et arrivée au laboratoire

Seules les inflorescences de *Camellia* spp. étant atteintes, les prélèvements seront constitués si possible de plusieurs fleurs (au moins 5) en voie de brunissement, desséchées ou présentant tout symptôme suspect (cf. annexe 2).

7.2. Préparation et conservation de l'échantillon pour analyse

Si le lot ne peut pas être analysé immédiatement, il doit être placé au réfrigérateur ou en chambre froide (cf. § 6.1) pendant une durée ne dépassant pas 4 jours.

8. Mode opératoire

8.1. Prise d'analyse

Observer chaque fleur constituant l'échantillon et noter la présence d'éléments macroscopiques caractéristiques du champignon.

8.2. Observation de l'échantillon (cf. annexe 2)

8.2.1. Observation de sclérote

Examiner la présence de sclérote, structure ferme et noire pouvant atteindre 12x10x2 mm, formée, ou en formation, à la base d'un ou de plusieurs pétales. Leur forme caractéristique pétaloïde ou discoïde les faisant ressembler à des « raisins secs aplatis », permet un diagnostic immédiat (cf. annexe 2).

Si la forme des sclérotas n'est pas caractéristique ou si le moindre doute persiste concernant leur identification, l'échantillon sera placé en chambre humide en vue d'une observation microscopique.

8.2.2. Observation des sporodochies (= amas de microconidies)

Rechercher de petites « gouttelettes » brunes à noires de 1 mm de diamètre et souvent luisantes. Localisées à la base ou au centre des pétales, elles s'agglomèrent et avec le temps, prennent l'aspect de plaques noires. Utiliser la loupe binoculaire si nécessaire.

Prélever ces amas, en vue d'une observation microscopique. Pour cela, utiliser une aiguille montée, préalablement flambée.

Stériliser l'outil de prélèvement après chaque utilisation en passant la pointe à la flamme.

Faire le montage entre lame et lamelle dans de l'acide lactique (additionné ou non de bleu de méthyle).

8.2.3. Observation d'un anneau mycélien

Un anneau mycélien blanchâtre est parfois visible à la base de la fleur, après avoir enlevé les sépales. Noter simplement sa présence sans l'observer au microscope.

8.3. Observation microscopique

Les lames préparées précédemment (§ 8.2.2.) sont observées au microscope photonique.

Faire des observations à plusieurs grossissements (allant de 40 à 800 X environ).

Noter la présence de **phialides en bouquets et de microconidies ovoïdes, guttulées, légèrement colorées et de taille comprise entre 2,5 et 4µm de diamètre** (cf. annexe 2).

8.4. Mise en chambre humide

Tout échantillon ne présentant pas de sclérote ou de fructification mature permettant une identification immédiate est placé en chambre humide afin d'induire la formation de microconidies.

Sélectionner des fleurs (si possible, un minimum de 5) présentant ou non des brunissements de pétales. Les disposer sur du papier filtre ou papier absorbant dans une boîte de Petri en verre ou dans une boîte en plastique, selon la taille de l'échantillon. Après humidification avec de l'eau distillée ou osmosée, disposer cette chambre humide dans une enceinte thermostatique pouvant assurer une température de $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ et pourvue d'un éclairage de type lumière blanche avec, éventuellement, une photopériode de 12 heures.

Après environ 3-4 jours d'incubation, observer à nouveau les échantillons en chambre humide à la loupe binoculaire. Prélever les éventuelles fructifications et les observer au microscope (voir § 8.2. et 8.3.). Si aucune fructification ne s'est développée, replacer la chambre humide dans les conditions d'incubation et faire de nouvelles observations régulièrement. Passé un délai de 3 semaines, si aucune évolution n'est constatée, arrêter l'analyse et détruire le matériel végétal par autoclavage.

9. Identification

Le diagramme de décision illustré en annexe 1, résume les différentes étapes de la méthode de détection de *Ciborinia camelliae*.

L'identification de *Ciborinia camelliae* est basée sur l'observation de sclérotés ou de phialides et microconidies dont les caractères correspondent à ceux décrits dans l'annexe 2 jointe.

10. Expression des résultats

Exprimer le résultat dans un **tableau** ou par une phrase du type :

- lorsque le résultat de l'analyse est négatif :

"Absence de *Ciborinia camelliae* sur l'échantillon analysé par caractérisation morphologique."

- lorsque le résultat de l'analyse est positif :

"*Ciborinia camelliae* détecté sur l'échantillon analysé par caractérisation morphologique."

11. Cas particulier

En cas de doute sur la présence ou l'absence du champignon dans un lot, une analyse de confirmation pourra être demandée au laboratoire de référence. Dans ce cas, l'échantillon, éventuellement accompagné d'une lame fixée, pourra être expédié à ce même laboratoire. Une fiche de renseignements (dont l'imprimé est à demander à ce laboratoire) y sera jointe.

12. Références bibliographiques

KOHN L.M. and NAGASAWA E., 1984. A taxonomic reassessment of *Sclerotinia camelliae* Hara (= *Ciborinia camelliae* Kohn), with observations on flower blight of camellia in Japan. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, **25** : pp. 149-161.

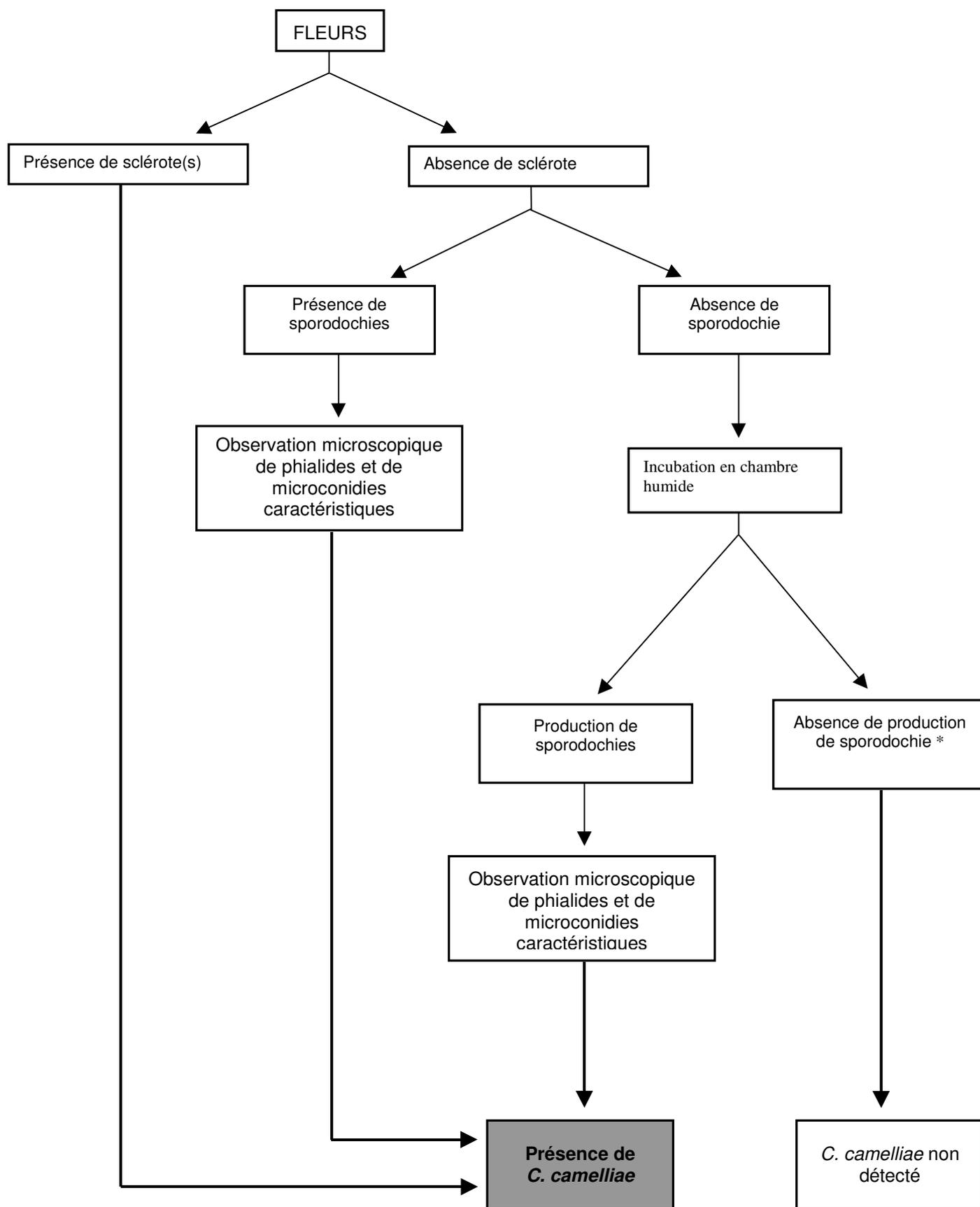
OEPP-CABI, 1997. *Ciborinia camelliae* in Organismes de Quarantaine pour l'Europe. pp. 725-728.

TAYLOR C.H. and LONG P.G., 2000. Review of literature on camellia flower blight caused by *Ciborinia camelliae*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, **Vol. 28** : pp. 123-138.

13. Annexes

ANNEXE 1 : « Diagramme de décision pour la détection de *Ciborinia camelliae* Kohn »

ANNEXE 2 : « Symptômes et critères d'identification de *Ciborinia camelliae* Kohn »

Schéma des étapes de la méthode de détection de *Ciborinia camelliae* Kohn

* passé un délai de 3 semaines

Symptômes et critères d'identification de *Ciborinia camelliae* Kohn

(Photos LNPV-UMAF)



Taches brunes sur pétales – L'infection débute par l'apparition de petites taches brunes qui s'étendent progressivement. Le brunissement, d'abord localisé à la base des pétales, se développe pour atteindre la totalité de la fleur.



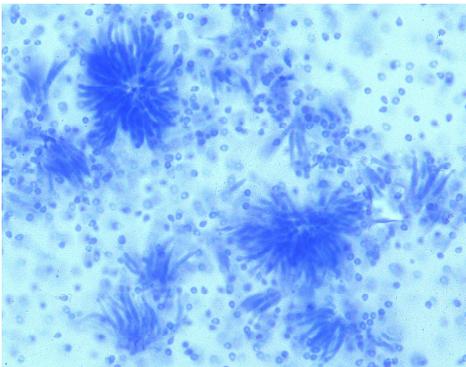
Fleur nécrosée – Celle-ci présente une pourriture sèche avec souvent des nervures plus foncées. Totalement desséchées, les fleurs chutent sur le sol.



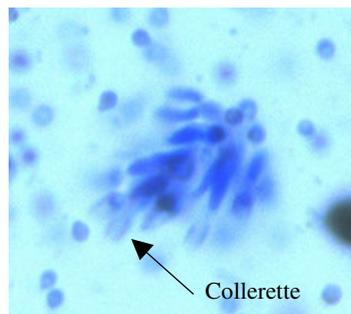
Sporodochies – Lors de périodes humides, de petites « gouttelettes » brunes à noires, luisantes, se forment à la base ou au centre des pétales. Elles correspondent à des amas de microconidies, spores qui ne sont pas infectieuses.



Anneau mycélien blanc-gris à la base de la fleur (caractéristique) – Il est souvent visible après élimination des sépales

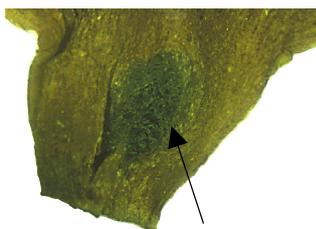


Phialides en bouquets et microconidies

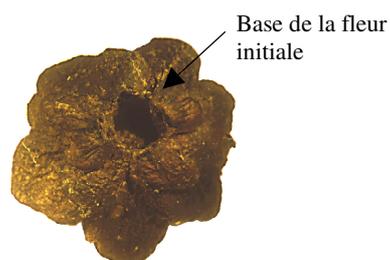


Collerette

Les microconidies sont hyalines à légèrement brunes. De forme globuleuse à obovée, elles se terminent par un appendice basal, devenant plus allongé avec l'âge. Unicellulaires, guttulées, elles sont produites en chaînes et mesurent de 2,5 à 4 µm. Elles naissent à l'apex de phialides hyalines à légèrement brunes. Ces dernières, de forme allongée et avec une large collerette apicale : lieu de formation des microconidies, sont produites en verticilles. Leur taille est de 6 x 2-2,5 µm.



Sclérote en formation à la base d'un pétale



Couronne de sclérotés

2 à 4 semaines après l'infection, les sclérotés commencent à se former à la base des pétales. A maturité, les sclérotés sont des structures discoïdes à pétaloïdes, noires et fermes jusqu'à 12x10x2 mm. Ils peuvent rester adhérents entre eux et former une couronne rappelant la disposition initiale des pétales. Ils produiront des apothécies à la fin de l'hiver suivant. Les ascospores libérées iront contaminer de nouvelles fleurs.