



Organisation des Nations Unies
pour l'alimentation
et l'agriculture



Convention internationale pour la protection des végétaux
Protéger les ressources végétales contre les organismes nuisibles

NORMES INTERNATIONALES POUR LES MESURES PHYTOSANITAIRES 27

PROTOCOLES DE DIAGNOSTIC

NIMP 27
ANNEXE 12

FRE

PD 12: Phytoplasmes

Produit par le Secrétariat de la Convention internationale
pour la protection des végétaux (CIPV)

Cette page est intentionnellement laissée vierge

NIMP 27

Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés

PD 12: Phytoplasmes

Adoptée en 2016; publiée en 2016

TABLE DES MATIÈRES

1.	Informations relatives à l'organisme nuisible.....	2
2.	Données taxonomiques.....	3
3.	Détection et identification.....	3
3.1	PCR nichée classique.....	5
3.2	PCR en temps réel.....	5
3.3	Témoins des analyses moléculaires.....	7
3.4	Interprétation des résultats de la PCR.....	8
3.4.1	PCR nichée classique.....	8
3.4.2	PCR en temps réel.....	8
3.5	Analyse séquentielle.....	8
4.	Données à conserver.....	8
5.	Points de contact pour tout complément d'informations.....	9
6.	Remerciements.....	9
7.	Références.....	9

1. Informations relatives à l'organisme nuisible

Les phytoplasmes ont été découverts par Doi *et al.* (1967), qui cherchaient l'agent responsable du jaunissement des asters. On désigne ces organismes unicellulaires par l'expression «organismes de type mycoplasme» (ou MLO, abréviation de *mycoplasma-like organisms*) en raison de leur ressemblance morphologique avec les mycoplasmes affectant les animaux et de leur sensibilité aux antibiotiques de la famille des tétracyclines (Ishii *et al.*, 1967). Les phytoplasmes sont des pathogènes procaryotes dépourvus de paroi cellulaire, de type pléomorphique, dont le diamètre moyen mesure 200 à 800 nm. Il s'agit de parasites obligatoires des végétaux, qui vivent dans les cellules criblées du phloème des plantes hôtes. Le génome des phytoplasmes compte entre 550 et 1 500 kb environ, ce qui est relativement peu par rapport à d'autres procaryotes. Plusieurs fonctions biosynthétiques font défaut aux phytoplasmes (Marcone *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2006; Oshima *et al.*, 2013).

Les phytoplasmes sont associés à des symptômes très divers touchant un large éventail de plantes hôtes (Lee *et al.*, 2000). Voici quelques-uns des symptômes caractéristiques des infections par des phytoplasmes: virescence (les fleurs perdent leur pigmentation normale et deviennent vertes); phyllodie (les parties florales développent des structures foliaires); syndrome du balai de sorcière (prolifération de rameaux auxiliaires ou axillaires) et autres proliférations anormales des parties aériennes et des racines; jaunissement, rougissement ou autre décoloration des feuilles; diminution de la taille des feuilles et des fruits; nécrose du phloème; atrophie et dépérissement global (Davis et Sinclair, 1998) Certaines espèces végétales sont tolérantes ou résistantes aux infections par des phytoplasmes: une fois infectées, ces plantes peuvent ne présenter que des symptômes légers, voire aucun (Lee *et al.*, 2000).

Seemüller *et al.* (2002) évaluent à environ un millier le nombre d'espèces végétales touchées par les phytoplasmes. La plupart des plantes hôtes des phytoplasmes sont dicotylédones. On observe, moins fréquemment, des phytoplasmes sur des plantes monocotylédones; il s'agit principalement, le cas échéant, de végétaux appartenant aux familles des palmacées (Palmae) ou des poacées (Poaceae) (Seemüller *et al.*, 2002).

Les phytoplasmes sont présents dans le monde entier. La répartition géographique et l'incidence des maladies dues aux phytoplasmes dépendent de la gamme de plantes hôtes du phytoplasme considéré ainsi que de la présence et du comportement alimentaire de l'insecte vecteur. Certains phytoplasmes touchent beaucoup d'hôtes différents et sont transmis par des vecteurs polyphages, ce qui leur assure une large présence. D'autres, en revanche, n'infectent qu'une gamme de plantes restreinte et sont transmis par des insectes oligophages ou monophages; leur répartition géographique est donc plus limitée. La question de la répartition géographique des principaux groupes taxonomiques de phytoplasmes a été étudiée par Foissac et Wilson (2010).

Les phytoplasmes peuvent être transmis par des insectes vecteurs, des cuscutes et des greffons. Ils peuvent aussi se transmettre par propagation végétative à partir de parties infectées d'une plante. Les insectes vecteurs des phytoplasmes, responsables dans une large mesure de la dissémination naturelle de ceux-ci, se limitent aux fulgures, psyllidés et cicadelles qui se nourrissent du phloème (Hemiptera, Auchenorrhyncha). Ils transmettent les pathogènes sur un mode persistant. Weintraub et Beanland (2006) recensent plus de 90 espèces dont le rôle de vecteur est avéré, dont certaines peuvent transmettre plusieurs phytoplasmes. Les phytoplasmes peuvent aussi être transmis par les cuscutes et des greffons, entre autres modes de propagation. Les cuscutes (*Cuscuta* et *Cassytha* spp.) sont des végétaux grimpants parasites qui se greffent au réseau vasculaire de leurs hôtes au moyen d'haustoriums (ou suçoirs). Une fois qu'une jonction est établie entre une plante saine et une plante infectée par un phytoplasme, ce dernier contamine l'individu sain via les éléments connectés au phloème. En pratique, on peut recourir à des transmissions par greffe et des micropropagations de plantes dans des cultures tissulaires pour entretenir des phytoplasmes à des fins de référence (IPWG, sans date).

Les sites web suivants proposent de plus amples informations sur les phytoplasmes, notamment des photographies illustrant les symptômes des maladies, une liste des insectes vecteurs et une base de données présentant la classification des phytoplasmes: COST Action FA0807 Integrated Management of Phytoplasma Epidemics in Different Crop Systems (<http://www.costphytoplasma.ipwgnet.org/>) et Phytoplasma Resource Center (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/phytoplasma.html>).

2. Données taxonomiques

Nom: Phytoplasme

Synonymes: Organisme de type mycoplasme (Mycoplasma-like organism, MLO), mycoplasme

Classement taxonomique: Bacteria, Firmicutes, Mollicutes, Acholeplasmatales, Acholeplasmataceae, «*Candidatus* Phytoplasma»

Le Phytoplasma Taxonomy Group de l'IRPCM (International Research Programme on Comparative Mycoplasmology) Phytoplasma/Spiroplasma Working Team a publié des directives visant la description des espèces «*Candidatus* (*Ca.*) Phytoplasma» (IRPCM, 2004). La démarcation des espèces de «*Ca.* Phytoplasma» se fonde sur des séquences du gène qui code l'ARN ribosomique (ARNr) 16S ainsi que sur des caractéristiques biologiques. De manière générale, les phytoplasmes d'une même espèce sont identiques à $\geq 97,5$ pour cent sur $\geq 1\ 200$ nucléotides du gène de l'ARNr 16S. Quand une espèce de «*Ca.*» englobe des phytoplasmes qui présentent différentes caractéristiques biologiques (au regard des vecteurs et des plantes hôtes), il est possible d'y distinguer différents taxons en appliquant les règles spécifiques énoncées par IRPCM (2004). Les descriptions des espèces de «*Ca.* Phytoplasma» sont publiées dans l'*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; en mars 2015, 37 d'entre elles avaient été décrites.

3. Détection et identification

La méthode à privilégier pour détecter les phytoplasmes est l'amplification en chaîne par polymérase (PCR). La détection moléculaire des phytoplasmes n'est possible qu'avec un échantillonnage approprié des tissus végétaux et des méthodes d'extraction de l'acide nucléique fiables (Palmano, 2001; Firrao *et al.*, 2007). Les phytoplasmes peuvent être présents de manière hétérogène et en concentration variable dans les diverses parties d'une plante, en particulier chez les hôtes ligneux. Les tissus qui présentent des symptômes sont ainsi les mieux indiqués pour détecter ces organismes (Constable *et al.*, 2003; Garcia-Chapa *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2004; Necas et Krska, 2006). Chez certains hôtes, l'infection peut être asymptomatique; si on soupçonne que c'est le cas, il importe de prélever des échantillons sur différents tissus de la plante.

La concentration de phytoplasmes chez les plantes hôtes nuit à la fiabilité de l'essai PCR (Marzachi, 2004). Cette concentration peut dépendre de l'espèce ou de la souche de phytoplasme, de l'espèce à laquelle appartient l'hôte, du moment de l'infection et des conditions climatiques. Le moment de l'échantillonnage des tissus végétaux est important dans la mesure où la localisation et la concentration des phytoplasmes dans leur hôte peuvent varier en fonction des saisons (Seemüller *et al.*, 1984; Jarausch *et al.*, 1999; Berges *et al.*, 2000; Constable *et al.*, 2003; Garcia-Chapa *et al.*, 2003; Prezelj *et al.*, 2012).

Dans la plupart des maladies à phytoplasmes, les feuilles qui présentent des symptômes constituent la meilleure source d'échantillons pour le diagnostic. Les phytoplasmes résident dans les éléments criblés du phloème des plantes infectées, c'est pourquoi on extrait souvent l'ADN du pétiole ou de la nervure médiane des feuilles, des tiges ou encore de l'écorce interne. Dans certains cas (par exemple: phytoplasme responsable de la maladie X [X-disease phytoplasma]), c'est dans le pédoncule des fruits que la concentration de phytoplasmes est la plus élevée (Kirkpatrick, 1991). Bien que les phytoplasmes puissent être détectés dans des échantillons prélevés en raclant les racines ou l'écorce d'arbres dormants, il est généralement préférable d'effectuer l'analyse à la fin de l'été. Les échantillons végétaux collectés peuvent être stockés à $-20\ ^\circ\text{C}$ jusqu'à six mois avant d'être testés.

Pour un stockage plus long, la température doit être abaissée à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; le matériel végétal peut aussi être stocké à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ après lyophilisation ou après dessiccation au moyen de chlorure de calcium.

Diverses méthodes d'extraction de l'acide nucléique en vue de détecter les phytoplasmes par amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été décrites dans la littérature. Plusieurs d'entre elles prévoient une étape d'enrichissement visant à concentrer les phytoplasmes avant d'extraire l'acide nucléique (Kirkpatrick *et al.*, 1987; Ahrens et Seemüller, 1992; Prince *et al.*, 1993). Ces techniques peuvent être utiles lorsque les phytoplasmes sont présents en faible concentration, comme chez les plantes ligneuses pérennes, ou dans le cas d'hôtes «difficiles» chez lesquels de fortes quantités de composés tels que les polysaccharides et les polyphénols, qui peuvent inhiber la PCR, sont souvent extraites en même temps que l'acide nucléique. Dans certaines méthodes simplifiées, le tissu végétal est directement broyé dans un tampon de lyse commercial ou dans un tampon à base de CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium). On emploie typiquement un tampon de CTAB à 2 % (il est attesté qu'une solution à 3 % est plus fiable pour les vignes) (Daire *et al.*, 1997; Angelini *et al.*, 2001). L'ADN est ensuite extrait directement à partir du lysat à l'aide de colonnes de silice du commerce (Green *et al.*, 1999; Palmano, 2001), de billes magnétiques (Mehle *et al.*, 2013) ou de solvants organiques (Daire *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998). On emploie généralement les billes magnétiques sur un extracteur automatique d'acide nucléique, par exemple le KingFisher de Thermo Scientific¹. La majorité des méthodes d'extraction ont fait l'objet d'une validation satisfaisante pour diverses espèces végétales hôtes. La méthode appliquée est choisie en fonction de l'hôte à étudier ainsi que des installations et de l'équipement disponibles. Il peut être pratique de suivre une méthode comportant une étape d'enrichissement des phytoplasmes quand l'hôte est une plante ligneuse pérenne, mais une méthode simplifiée pour les hôtes herbacés. S'agissant de diagnostics de routine, il est important de valider une méthode d'extraction pour un hôte donné afin d'en garantir la fiabilité.

Il existe plusieurs amorces PCR universelles conçues pour amplifier le gène qui code l'ARNr 16S chez tous les phytoplasmes connus. Les amorces les plus couramment utilisées sont les paires P1/P7 (Deng et Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) et R16F2n/R16R2 (Lee *et al.*, 1993; Gundersen et Lee, 1996), utilisables dans le cadre d'une PCR nichée. La paire d'amorces P1/P7 amplifie un produit de PCR qui contient l'intégralité du gène de l'ARNr 16S ainsi que la région de l'espaceur de l'ARNr 16S-23S. La littérature indique que la PCR en temps réel est aussi sensible, voire plus sensible, que la PCR nichée, en fonction de la combinaison hôte-phytoplasme (Christensen *et al.*, 2004); comme elle n'exige pas de traitement post-amplification, c'est la méthode la plus indiquée pour les analyses à haut débit. De surcroît, la PCR en temps réel faisant appel aux sondes TaqMan est plus spécifique et comporte moins de risques de contamination croisée que la PCR classique, en particulier la PCR nichée. Les PCR recommandées dans le présent protocole peuvent donner lieu à de faux positifs, dans le cas de bactéries très similaires: la définition d'un essai universel a ses inconvénients (Fránová, 2011; Pilotti *et al.*, 2014). Il est possible d'effectuer des PCR plus spécifiques. Par ailleurs, si le résultat est critique (par exemple en cas d'échantillon prélevé sur un envoi de quarantaine post-entrée, de signalement d'un nouvel hôte ou de nouvelle distribution), le produit de la PCR classique devrait être séquencé.

Outre l'amplification du gène de l'ARNr 16S, les méthodes PCR servent aussi à amplifier d'autres régions du génome afin de détecter et classer les phytoplasmes, notamment les gènes des protéines ribosomiques (Lim et Sears, 1992; Jomantiene *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; Martini *et al.*, 2007), le gène *tuf* (Schneider *et al.*, 1997; Makarova *et al.*, 2012), le gène de l'ARNr 23S (Guo *et al.*, 2003) et le gène *secY* (Lee *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2013; Quaglino *et al.*, 2013). Ces amorces peuvent se révéler utiles quand il est nécessaire d'étudier une seconde région indépendante du génome des phytoplasmes.

¹ Dans le présent protocole de diagnostic, les méthodes (y compris les références à des marques commerciales) sont décrites telles qu'elles ont été publiées, puisque le degré de sensibilité, la spécificité et/ou la reproductibilité d'origine y sont définis. L'emploi de noms de réactifs, de produits chimiques ou d'équipements dans ces protocoles de diagnostic n'implique donc pas qu'ils sont approuvés à l'exclusion d'autres substances ou équipements qui peuvent également convenir. Les procédures de laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être adaptées aux normes de chaque laboratoire à condition de faire l'objet d'une validation adéquate.

Les échantillons peuvent contenir des composés qui inhibent la PCR, selon l'espèce à laquelle appartient l'hôte ainsi que le type et l'âge du tissu. Il importe donc de vérifier que les extractions d'ADN sont détectables par PCR en incluant des amorces témoins internes qui amplifient un gène de la plante hôte. Pour compenser les éventuels effets inhibiteurs de l'hôte, il est possible d'améliorer la purification de l'ADN au moyen d'une colonne Séphacryl ou d'ajouter de l'albumine sérique bovine (BSA) au mélange PCR jusqu'à obtention d'une concentration de 0,5 mg/ml (Kreader, 1996).

Dans le présent protocole de diagnostic, les méthodes (y compris les références à des marques commerciales) sont décrites telles qu'elles ont été publiées, puisque le degré de sensibilité, la spécificité et/ou la reproductibilité d'origine y sont définis. L'emploi de noms de réactifs, de produits chimiques ou d'équipements dans ces protocoles de diagnostic n'implique donc pas qu'ils sont approuvés à l'exclusion d'autres substances ou équipements qui peuvent également convenir. Les procédures de laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être adaptées aux normes de chaque laboratoire à condition de faire l'objet d'une validation adéquate.

3.1 PCR nichée classique

Cet essai repose sur les amorces P1 (Deng et Hiruki, 1991) et P7 (Schneider *et al.*, 1995) pour la PCR primaire:

P1 (directe): 5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3'

P7 (inverse): 5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'

Pour la PCR secondaire, les amorces sont R16F2n (Gundersen et Lee, 1996) et R16R2 (Lee *et al.*, 1993):

R16F2n (directe): 5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'

R16R2 (inverse): 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'

Le mélange réactionnel de 20 µl est composé de tampon d'ADN polymérase Taq 1× contenant 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de chaque amorce, 200 µM de dNTPs, 1 U d'ADN polymérase Taq et 2 µl d'ADN matrice. Les conditions d'amplification successives sont les suivantes: étape initiale de dénaturation à 94 °C pendant 2 min; 40 cycles de 30 s à 94 °C, 30 s à 53 °C (amorces P1/P7) ou 50 °C (amorces R16F2n/R16R2) et 1 min à 72 °C; étape d'extension finale de 10 min à 72 °C. Pour une PCR nichée, on utilise 1 µl des produits de la PCR primaire comme matrice de la PCR secondaire, dilué (maximum 1:30) ou non. Les produits de la PCR sont analysés par électrophorèse sur gel. Les amorces P1/P7 et R16F2n/R16R2 produisent respectivement des amplicons de 1 800 et 1 250 bp (paires de bases).

La présence d'ADN détectable par PCR dans les extraits est confirmée par les amorces universelles qui amplifient le gène codant l'ARNr 28S des eucaryotes décrites dans Werren *et al.* (1995):

28Sf (directe): 5'-CCC TGT TGA GCT TGA CTC TAG TCT GGC-3'

28Sr (inverse): 5'-AAG AGC CGA CAT CGA AGG ATC-3'

Le mélange réactionnel de l'essai visant l'ARNr 28S a la même composition et suit les mêmes cycles que l'essai de détection des phytoplasmes, en conditions identiques, si bien que les deux essais peuvent être réalisés simultanément dans des tubes séparés. La paire d'amorces 28Sf/28Sr produit un amplicon de 500 à 600 bp.

On peut recourir à d'autres paires d'amorces pour vérifier que l'ADN est détectable par la PCR.

3.2 PCR en temps réel

La PCR en temps réel est mise en œuvre selon le modèle de l'essai TaqMan conçu pour le gène de l'ARNr 16S par Christensen *et al.* (2004):

Amorce directe: 5'-CGT ACG CAA GTA TGA AAC TTA AAG GA-3'

Amorce inverse: 5'-TCT TCG AAT TAA ACA ACA TGA TCC A-3'

Sonde TaqMan: 5'-FAM-TGA CGG GAC TCC GCA CAA GCG-BHQ-3'

Une autre option consiste à appliquer la méthode de PCR en temps réel mise au point par Hodgetts *et al.* (2009) pour le gène codant l'ARNr 23S:

JH-F 1 (amorce directe): 5'-GGT CTC CGA ATG GGA AAA CC-3'

JH-F all (amorce directe): 5'-ATT TCC GAA TGG GGC AAC C-3'

JH-R (amorce inverse): 5'-CTC GTC ACT ACT ACC RGA ATC GTT ATT AC-3'

JH-P uni (sonde TaqMan): 5'-FAM-MGB-AAC TGA AAT ATC TAA GTA AC-BHQ-3'

Les 25 µl de mélange réactionnel sont composés de mélange principal (master mix) TaqMan RT-PCR 1×, 300 nM respectivement des amorces directe et inverse, 100 nM de sonde FAM et 2 µl d'ADN matrice. Tous les échantillons sont analysés en duplicats. Les conditions d'amplification sont les suivantes: étape de dénaturation initiale de 3 min à 95 °C; 40 cycles de 15 s à 95 °C, 1 min à 60 °C. Ces conditions de thermocyclage peuvent dépendre du type de mélange principal utilisé (par exemple certains mélanges nécessitent une étape d'activation de la polymérase de 10 min à 95 °C, tandis que les mélanges qui contiennent de l'UDG (uracile-ADN glycosylase) exigent un maintien initial à 50 °C pendant 2 min). Les résultats de la PCR en temps réel sont analysés au moyen du logiciel fourni par le fabricant avec l'appareil.

L'essai de PCR en temps réel de Christensen *et al.* (2004) fixait initialement la quantité d'amorce inverse à 900 nM, valeur abaissée à 300 nM dans une publication ultérieure (Christensen *et al.*, 2013); l'essai est aussi efficace pour l'une que pour l'autre de ces deux concentrations.

La méthode de PCR en temps réel fondée sur l'ARNr 16S a fait l'objet d'une évaluation reposant sur l'analyse de 18 sous-groupes de phytoplasmes: il en ressort qu'elle est aussi sensible que la PCR nichée classique, voire jusqu'à dix fois plus sensible, selon la combinaison hôte-phytoplasme (Christensen *et al.*, 2004). Une analyse circulaire de détection des phytoplasmes des arbres fruitiers à laquelle ont participé 22 laboratoires suggère que les essais de Christensen *et al.* (2004) et Hodgetts *et al.* (2009) sont similaires en termes de sensibilité et de spécificité (EUPHRESO FruitPhytoInterlab Group, 2011).

La présence d'ADN détectable par PCR dans les extraits est confirmée par l'essai COX de Weller *et al.* (2000), qui amplifie le gène codant la cytochrome oxydase:

COX-F (amorce directe): 5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'

COX-R (amorce inverse): 5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG AGC CAA AAC TG-3'

COX-P (sonde TaqMan): 5'-FAM-TGC TTA CGC TGG ATG GAA TGC CCT-BHQ-3'

Une autre solution consiste à mettre en œuvre l'essai visant l'ARNr 18S de Christensen *et al.* (2004) pour confirmer que l'ADN peut être détecté par PCR; elle est conseillée pour les plantes monocotylédones, pour lesquelles l'essai COX est moins efficient:

Amorce directe: 5'-GAC TAC GTC CCT GCC CTT TG-3'

Amorce inverse: 5'-AAC ACT TCA CCG GAC CAT TCA-3'

Sonde TaqMan: 5'-FAM-ACA CAC CGC CCG TCG CTC C-BHQ-3'

Les mélanges réactionnels des essais COX et ARNr 18S sont composés des mêmes éléments et suivent les mêmes cycles que l'essai de détection des phytoplasmes en temps réel, en conditions identiques, si bien que ces essais peuvent être réalisés simultanément dans des tubes séparés. Il est aussi possible de réaliser l'essai témoin interne en multiplex dans le même tube que l'essai de détection des phytoplasmes si la sonde a été marquée avec un colorant rapporteur différent et si les

concentrations des amorces et de la sonde ont été optimisées de manière à éviter que les faibles teneurs en phytoplasmes ne soient dissimulées par les concentrations élevées d'ADN végétal faisant office de témoin interne.

3.3 Témoins des analyses moléculaires

Pour que les résultats des analyses soient considérés comme fiables, des témoins adaptés – qui dépendront du type d'analyse réalisée et du degré de certitude requis – devraient être intégrés dans chaque série d'isolements d'acide nucléique et d'amplifications d'acide nucléique de l'organisme nuisible ciblé. Pour la PCR, un acide nucléique témoin positif, un témoin négatif de l'amplification et un témoin négatif de l'extraction (témoin exempt de matrice) sont, au minimum, les témoins qui devraient être employés.

Acide nucléique témoin positif. Ce témoin sert à contrôler l'efficacité de la méthode d'essai (sans tenir compte de l'extraction), et plus particulièrement de l'amplification. À cet effet, on peut faire appel à l'ADN des phytoplasmes extrait de la plante infectée, à l'intégralité du génome amplifié ou à un témoin de synthèse, par exemple un produit de PCR cloné.

Témoin interne. Pour les PCR classique et en temps réel, le protocole devrait inclure un gène domestique végétal comme le gène universel des eucaryotes qui code l'ARNr 28S (voir la section 3.1 pour l'emploi de ce gène dans la PCR nichée classique) ou le gène de la COX (voir section 3.2 pour l'emploi de ce gène dans la PCR en temps réel) afin d'éliminer l'éventualité d'obtenir des faux négatifs dus à une mauvaise extraction ou à la dégradation de l'acide nucléique, ou encore à la présence d'inhibiteurs de PCR.

Témoin négatif de l'amplification (témoin exempt de matrice). Ce témoin est nécessaire pour les méthodes de RT-PCR classique et en temps réel, afin d'éliminer l'éventualité de faux positifs dus à une contamination pendant la préparation du mélange réactionnel. Pour ce faire, on ajoute l'eau de qualité PCR qui a servi à préparer ce mélange pour l'étape d'amplification.

Témoin positif de l'extraction. Ce témoin permet de vérifier que la qualité et la quantité de l'acide nucléique du phytoplasme suffisent pour que la PCR permette de détecter le pathogène. L'ADN des phytoplasmes est extrait des tissus infectés de l'hôte ou de tissus végétaux sains auxquels les phytoplasmes ont été inoculés.

Ce témoin positif devrait correspondre approximativement à un dixième de la quantité de tissu foliaire utilisée par plante pour extraire l'ADN. Si les échantillons sont groupés, alors la quantité de témoin positif devrait être adaptée en conséquence (par exemple 10 lots de 20 mg d'échantillons groupés pour l'extraction de l'ADN, 2 mg de feuilles infectées + 198 mg de tissu végétal sain). Si le témoin positif n'est pas détecté, alors l'analyse devrait être répétée, ou le taux de groupage revu à la baisse jusqu'à l'obtention d'une détection fiable.

Pour la PCR, il convient de veiller à éviter toute contamination croisée due aux aérosols issus du témoin positif ou des échantillons positifs. Le témoin positif utilisé par le laboratoire devrait être séquencé de telle manière que cette séquence puisse être directement comparée aux séquences obtenues à partir des amplicons PCR de la taille correcte. Une autre solution consiste à créer des témoins positifs à partir d'une séquence connue qui, là encore, peut être comparée aux amplicons PCR de la taille correcte.

Témoin négatif de l'extraction. Ce témoin sert à contrôler la contamination pendant l'extraction de l'acide nucléique et/ou une réaction croisée avec le tissu hôte. Il peut s'agir du tampon d'extraction, ou d'un témoin comportant un acide nucléique extrait d'un tissu hôte sain puis amplifié. Lorsqu'on s'attend à un grand nombre d'échantillons positifs, il est recommandé d'insérer un témoin négatif de l'extraction entre chaque analyse d'échantillon.

3.4 Interprétation des résultats de la PCR

3.4.1 PCR nichée classique

Une analyse PCR ne sera considérée comme valide pour un pathogène spécifique que si les conditions suivantes sont satisfaites:

- le témoin positif produit un amplicon de la taille correcte, c'est-à-dire correspondant au pathogène ciblé;
- aucun amplicon qui soit de la taille correcte et qui corresponde au pathogène ciblé n'est produit avec le témoin négatif de l'extraction et le témoin négatif de l'amplification.

Pour les témoins internes qui visent l'ADN végétal, le témoin sain (le cas échéant), le témoin positif et chacun des échantillons d'essai doivent produire l'amplicon de la taille attendue. Si les amorces témoins internes n'amplifient pas les échantillons, cela peut indiquer par exemple que l'extraction de l'acide nucléique n'a pas fonctionné, que l'acide nucléique n'a pas été incorporé au mélange réactionnel, que l'extrait d'ADN contient des composés inhibant la PCR ou que l'ADN est détérioré.

On estime qu'un échantillon est positif s'il produit un amplicon de la taille correcte. Pour identifier l'espèce de phytoplasme présente dans les échantillons positifs, il faudra séquencer l'amplicon (voir la section 3.5). Des essais PCR plus spécifiques existent parfois dans certains cas.

3.4.2 PCR en temps réel

La PCR en temps réel déterminera si un échantillon est positif ou négatif aux phytoplasmes. Pour identifier les phytoplasmes présents dans les échantillons positifs, il est nécessaire d'effectuer une PCR classique afin d'obtenir un amplicon d'au moins 1 250 bp correspondant au gène de l'ARNr 16S à partir de la paire d'amorces R16F2n/R16R2; cet amplicon est alors soumis à une analyse séquentielle (voir la section 3.5). Avec certains phytoplasmes, on peut aussi recourir à des protocoles spécifiques de PCR en temps réel, par exemple pour le groupe 16SrX (prolifération du pommier) (Torres *et al.*, 2005) et pour la flavescence dorée (Pelletier *et al.*, 2009).

3.5 Analyse séquentielle

Les produits de la PCR devraient être séquencés soit directement, soit après un clonage préalable en vecteur de clonage PCR. Les données séquentielles peuvent être analysées à l'aide de BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool), outil disponible sur le site web du National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Si la séquence est identique à moins de 97,5 pour cent à celle de l'espèce la plus proche, le phytoplasme étudié est considéré comme membre d'une nouvelle espèce appartenant à «*Ca. Phytoplasma*». Le cas échéant, on devrait séquencer l'intégralité du gène de l'ARNr 16S et procéder à une analyse phylogénétique. Il est également souhaitable de séquencer une région séparée du génome, par exemple la région de l'espaceur de l'ARNr 16S-23S, le gène *secY*, les gènes codant les protéines ribosomiques et le gène *tuf*.

4. Données à conserver

Les éléments de preuve et les données devraient être conservés conformément à la description de la NIMP 27 (*Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés*).

Dans les cas où d'autres parties contractantes peuvent être concernées par les résultats du diagnostic, en particulier dans les cas de non-conformité et lorsque le phytoplasme est identifié pour la première fois dans une zone, on devrait conserver les données, preuves et matériels suivants de manière à assurer une traçabilité complète:

- L'échantillon d'origine congelé à -80°C ou stocké à 4°C après lyophilisation ou dessiccation au moyen de chlorure de calcium.
- S'il y a lieu, les extraits d'ADN devraient être conservés à -20°C ou à -80°C . Les extraits végétaux déposés sur membranes devraient être conservés à température ambiante.

- Le cas échéant, les produits de l'amplification PCR devraient être conservés à -20 °C ou à -80 °C .

5. Points de contact pour tout complément d'informations

Des informations complémentaires sur le présent protocole peuvent être obtenues auprès des organismes suivants:

Plant Health and Environment Laboratory (Laboratoire de santé végétale et environnement), Ministry for Primary Industries, PO Box 2095, Auckland 1140, Nouvelle-Zélande (Lia W. Liefting; courriel: lia.liefting@mpi.govt.nz; tél.: +64 9 9095726; télécopie: +64 9 9095739).

Department of Economic Development, Jobs, Transport and Resources (Département du développement économique – emploi, transport et ressources), Victoria, AgriBio, 5 Ring Road, Bundoora, VIC 3083, Australie (Fiona Constable; courriel: fiona.constable@ecodev.vic.gov.au; tél.: +61 3 9032 7326; télécopie: + 61 3 9032 7604).

Departamento de Territorio y Sostenibilidad (Département du territoire et de la gestion durable), Av. Diagonal 525, 08029 Barcelone, Espagne (Ester Torres; courriel: ester.torres@gencat.net).

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Centre fédéral de recherche biologique pour l'agriculture et la foresterie), Institut für Pflanzenschutz im Obstbau (Institut pour la protection phytosanitaire des arbres fruitiers), Schwabenheimer Str. 101, D-69221 Dossenheim, Allemagne (Wilhelm Jelkmann; courriel: wilhelm.jelkmann@jki.bund.de).

Les demandes de révision d'un protocole de diagnostic peuvent être présentées par des organisations nationales de la protection des végétaux (ONPV), des organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV) ou des organes subsidiaires de la Commission des mesures phytosanitaires (CMP), par l'intermédiaire du Secrétariat de la CIPV (ippc@fao.org), qui la renverra au Groupe technique sur les protocoles de diagnostic (GTPD).

6. Remerciements

Le présent protocole de diagnostic a été rédigé par L. W. Liefting (Plant Health and Environment Laboratory, Ministry for Primary Industries, Nouvelle-Zélande (voir section précédente)), P. Jones (Plant Pathogen Interactions Division, Rothamsted Research, Royaume-Uni), F. Constable (Department of Economic Development, Jobs, Transport and Resources, Victoria, Australie (voir section précédente)), E. Torres (Departamento de Territorio y Sostenibilidad, Barcelone, Espagne (voir section précédente)), W. Jelkmann (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, Allemagne (voir section précédente)) et J. Verhoeven (Plantenziektenkundige Dienst, Afdeling diagnostiek (Service de protection des plantes, Département diagnostic), Wageningen, Pays-Bas).

7. Références

La présente annexe renvoie aux normes internationales pour les mesures phytosanitaires (NIMP). Les NIMP sont disponibles sur le Portail phytosanitaire international (PPI): <https://www.ippc.int/fr/core-activities/standards-setting/ispms>.

Ahrens, U., et Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828-832.

Angelini, E., Clair, D., Borgo, M., Bertaccini, A., et Boudon-Padieu, E. 2001. Flavescence dorée in France and Italy: Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40: 79-86.

Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D. V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W., et Hogenhout, S. A. 2006. Living with genome instability: The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188: 3682-3696.

- Berges, R., Rott, M., et Seemüller, E.** 2000. Range of phytoplasma concentration in various hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90: 1145-1152.
- Christensen, N. M., Nicolaisen, M., Hansen, M., et Schulz, A.** 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17: 1175-1184.
- Christensen, N. M., Nyskjold, H., et Nicolaisen, M.** 2013. Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quantification. In: M. Dickinson et J. Hodgetts (sous la direction de). *Phytoplasma: Methods and protocols*. Methods in molecular biology series, Vol. 938, pp. 245-252. New York, NY (États-Unis), Humana Press. 421 pp.
- Constable, F. E., Gibb, K. S., et Symons, R. H.** 2003. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology*, 52: 267-276.
- Daire, X. D., Clair, D., Reinert, W., et Boudon-Padiou, E.** 1997. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of nonribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 507-514.
- Davis, R. E., Jomantiene, R., et Zhao, Y.** 2005. Lineage-specific decay of folate biosynthesis genes suggests ongoing host adaptation in phytoplasmas. *DNA Cell Biology*, 24: 832-840.
- Davis, R. E., et Sinclair, W. A.** 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88: 1372-1376.
- Davis, R. E., Zhao, Y., Dally, E. L., Lee, I. M., Jomantiene, R., et Douglas S. M.** 2013. 'Candidatus Phytoplasma pruni', a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on 16S rRNA, *secY*, and ribosomal protein genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 766-776.
- Deng, S., et Hiruki, C.** 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14: 53-61.
- Doi, Y. M., Teranaka, M., Yora, K., et Asuyama, H.** 1967. Mycoplasma or PLT-group like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows and paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33: 259-266.
- EUPHRESKO FruitPhytoInterlab Group.** 2011. European interlaboratory comparison and validation of detection methods for 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma prunorum' and 'Candidatus Phytoplasma pyri': Preliminary results. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S281-S284.
- Firrao, G., Garcia-Chapa, M., et Marzachi, C.** 2007. Phytoplasmas: Genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers in Bioscience*, 12: 1353-1375.
- Foissac, X., et Wilson, M. R.** 2010. Current and possible future distributions of phytoplasma diseases and their vectors. In P. G. Weintraub et P. Jones (sous la direction de). *Phytoplasmas: Genomes, plant hosts, and vectors*, pp. 309-324. Wallingford (Royaume-Uni), CABI. 331 pp.
- Fránová, J.** 2011. Difficulties with conventional phytoplasma diagnostic using PCR/RFLP analyses. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S287-S288.
- Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M. A., Lavina, A., et Batlle, A.** 2003. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology*, 52: 513-520.
- Green, M. J., Thompson, D. A., et MacKenzie, D. J.** 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 83: 482-485.
- Gundersen, D. E., et Lee, I.-M.** 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 144-151.
- Guo, Y. H., Cheng, Z. M., et Walla, J. A.** 2003. Rapid PCR based detection of phytoplasmas from infected plants. *HortScience*, 38: 1134-1136.

- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., et Dickenson, M.** 2009. Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2945-2950.
- IPWG** (International Phytoplasma Working Group). non daté. Phytoplasma collection web page. document consultable à l'adresse suivante: http://www.ipwgnet.org/index.php?option=com_content&view=article&id=29&Itemid=5 (dernière consultation: 17 avril 2015).
- IRPCM** (International Research Programme on Comparative Mycoplasma Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group). 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1243-1255.
- Ishii, T., Doi, Y., Yora, K., et Asuyama, H.** 1967. Suppressive effects of antibiotics of the tetracycline group on symptom development in mulberry dwarf disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33: 267-275.
- Jarausch, W., Lancas, M., et Dosba, F.** 1999. Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. *Journal of Phytopathology*, 147: 47-54.
- Jomantiene, R., Davis, R.E., Maas, J., et Dally, E.** 1998. Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S ribosomal-RNA and ribosomal-protein gene operon sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 269-277.
- Kirkpatrick, B. C.** 1991. Mycoplasma-like organisms: Plant and invertebrate pathogens. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder et K.-S. Schleifer (sous la direction de). *The prokaryotes*, Vol. III, pp. 4050-4067. New York, NY (États-Unis), Springer Verlag.
- Kirkpatrick, B. C., Stenger, D. C., Morris, T. J., et Purcell, A. H.** 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science*, 238: 197-199.
- Kreder, C. A.** 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1102-1106.
- Lee, I.-M., Bottner-Parker, K. D., Zhao, Y., Davis, R. E., et Harrison, N. A.** 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 2887-2897.
- Lee, I.-M., Davis, R. E., et Gundersen-Rindal, D. E.** 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221-255.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., et Bartoszyk, I. M.** 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153-1169.
- Lee, I.-M., Hammond, R. W., Davis, R. E., et Gundersen, D. E.** 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83: 834-842.
- Lim, P.-O., et Sears, B. B.** 1992. Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *Journal of Bacteriology*, 174: 2606-2611.
- Makarova, O., Contaldo, N., Paltrinieri, S., Kawube, G., Bertaccini, A., et Nicolaisen, M.** 2012. DNA barcoding for identification of 'Candidatus Phytoplasmas' using a fragment of the elongation factor Tu gene. *PLoS ONE*, 7: e52092.
- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U., et Seemüller, E.** 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas comparing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*, 89: 805-810.
- Martini, M., Lee, I.-M., Bottner, K. D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N. A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, A. J., et Osler, R.** 2007. Ribosomal protein gene-based

- phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2037-2051.
- Marzachi, C.** 2004. Molecular diagnosis of phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 228-231.
- Mehle, N., Nikolić, P., Rugar, M., Boben, J., Ravnikar, M., et Dermastia, M.** 2013. Automated DNA extraction for large numbers of plant samples. In: M. Dickinson et J. Hodgetts (sous la direction de). *Phytoplasma: Methods and protocols*. Methods in molecular biology series, Vol. 938, pp. 139-145. New York, NY (États-Unis), Humana Press. 421 pp.
- Necas, T., et Krska, B.** 2006. Selection of woody indicators and the optimum plant material and sampling time for phytoplasma ESFY detection. *Acta Horticulturae*, 717: 101-105.
- Oshima, K., Maejima, K., et Namba, S.** 2013. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*, doi: 103389/fmicb.2013.00230.
- Palmano, S.** 2001. A comparison of different phytoplasma DNA extraction methods using competitive PCR. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 99-107.
- Pelletier, C., Salar, P., Gillet, J., Cloquemin, G., Very, P., Foissac, X., et Malembic-Maher, S.** 2009. Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endogenous analytical control. *Vitis*, 48: 87-95.
- Pilotti, C. A., Saul, J., Liefing, L. W., Kembu, A., et Kokoa, P.** 2014. Occurrence of a phytoplasma associated with bogia coconut syndrome in Papua New Guinea. *Agricultural Science*, 26: 32-40.
- Prezelj, N., Nikolić, P., Gruden, K., Ravnikar, M., et Dermastia, M.** 2012. Spatiotemporal distribution of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, 62: 760-766.
- Prince, J. P., Davis, R. E., Wolf, T. K., Lee, I.-M., Mogen, B. D., Dally, E. L., Bertaccini, A., Credi, R., et Barba, M.** 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology*, 83: 1130-1137.
- Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P. A., Wei, W., et Davis, R. E.** 2013. 'Candidatus Phytoplasma solani', a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 2879-2894.
- Schneider, B., Gibb, K. S., et Seemüller, E.** 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143: 3381-3389.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D., et Kirkpatrick, B. C.** 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas. In S. Razin et J. G. Tully (sous la direction de). *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, Vol. 1, pp. 369-380. San Diego, CA (États-Unis), Academic Press. 483 pp.
- Seemüller, E., Garnier, M., et Schneider, B.** 2002. Mycoplasmas of plants and insects. In S. Razin et R. Herrmann (sous la direction de). *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*, pp. 91-115. New York, NY (États-Unis), Kluwer Academic Publishers/Plenum Publishers. 572 pp.
- Seemüller, E., Schaper, U., et Zimbelmann, F.** 1984. Seasonal variation in the colonization pattern of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 91: 371-382 (article intégral en anglais, résumé en allemand).
- Torres, E., Bertolini, E., Cambra, M., Montón, C., et Martin, M. P.** 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16 SrX) group. *Molecular and Cellular Probes*, 19: 334-340.
- Weintraub, P., et Beanland, L.** 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51: 91-111.

- Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N., et Stead, D. E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853-2858.
- Werren, J. H., Windsor, D., et Guo, L.** 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 262: 197-204.
- Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K., et Kirkpatrick, B. C.** 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71: 45-50.

Étapes de la publication

Ce récapitulatif ne fait pas officiellement partie de la norme.

- 2004-11 Le Comité des normes (CN) ajoute le sujet: Virus et phytoplasmes (2004-018).
- 2006-004 À sa première session, la Commission des mesures phytosanitaires (CMP) ajoute le thème.
- 2013-04 Consultation d'experts.
- 2013-06 Le projet de texte est présenté au Groupe technique sur les protocoles de diagnostic (GTPD) lors de la réunion de celui-ci.
- 2014-05 Le CN approuve le projet de texte en vue de la consultation des membres (2014_eSC_May_07).
- 2014-07 Consultation des membres.
- 2015-03 Le GTPD approuve le projet de texte et le soumet au CN pour approbation, en vue de son adoption (2015_eTPDP_May_01).
- 2015-06 Le CN approuve le passage du projet de texte à l'étape de notification des protocoles de diagnostic (2015_eSC_Nov_04).
- 2015-08 Période de notification pour les protocoles de diagnostic.
- 2015-08 Une objection formelle est reçue.
- 2015-09 Réunion virtuelle du GTPD.
- 2015-10 Le GTPD analyse et révisé l'objection formelle (2015_eTPDP_Oct_03).
- 2015-11 Le CN approuve le projet de texte pour la période de notification des protocoles de diagnostic et pour l'approbation de la réponse à l'objection formelle (2015_eTPDP_Nov_10).
- 2016-01 Le CN adopte le protocole de diagnostic au nom de la CMP (aucune objection formelle soulevée).

NIMP 27. Annexe 12. Phytoplasmes (2016). Rome, CIPV, FAO.

Dernière mise à jour des étapes de la publication: 2016-04

CIPV

La Convention Internationale pour la Protection des Végétaux (CIPV) est un accord international sur la santé des végétaux qui vise à protéger les plantes cultivées et sauvages en prévenant l'introduction et la dissémination d'organismes nuisibles. Les voyages et les échanges internationaux n'ont jamais été aussi développés qu'aujourd'hui. Cette circulation des personnes et des biens à travers le monde s'accompagne d'une dissémination des organismes nuisibles qui constituent une menace pour les végétaux.

Organization

- ◆ La CIPV compte plus de 180 parties contractantes.
- ◆ Chaque partie contractante est rattachée à une Organisation nationale de la protection des végétaux (ONPV) et dispose d'un Point de contact officiel de la CIPV.
- ◆ Neuf organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV) agissent pour faciliter la mise en œuvre de la CIPV dans les pays.
- ◆ La CIPV assure la liaison avec les organisations internationales compétentes pour aider au renforcement des capacités régionales et nationales.
- ◆ Le Secrétariat est fourni par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).



Convention Internationale pour la Protection des Végétaux (CIPV)

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome (Italie)

Tél: +39 06 5705 4812 - Télécopie: +39 06 5705 4819

Courriel: ippc@fao.org - Site Internet: www.ippc.int