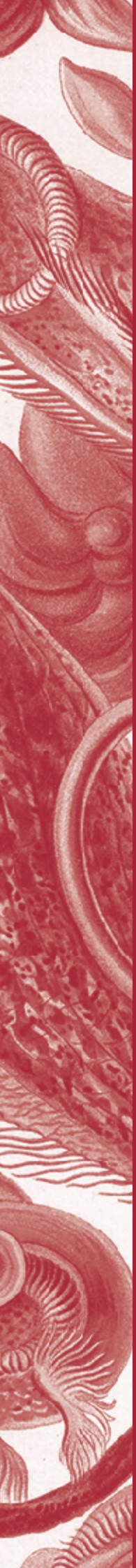

PROTOCOLES DE DIAGNOSTIC NORMES INTERNATIONALES POUR LES MESURES PHYTOSANITAIRES 27

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

NIMP 27
ANNEXE 7

FRE

PD 7: *Viroïde des tubercules fusiformes de la pomme de terre*

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Le présent protocole de diagnostic a été adopté par le Comité des normes
au nom de la Commission des mesures phytosanitaires en janvier 2015. Le protocole de diagnostic a été revisé en 2016.

Cette annexe constitue une partie prescriptive de la NIMP 27.

NIMP 27
Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés

PD 7: *Viroïde des tubercules fusiformes de la pomme de terre*

Adopté en 2016; publié en 2020

TABLE DES MATIÈRES

1. Information sur les organismes nuisibles 2
2. Données taxonomiques 3
3. Détection 3
3.1 Échantillonnage 5
3.2 Détection biologique 5
3.3 Détection moléculaire 6
3.3.1 Préparation de l'échantillon 6
3.3.2 Extraction de l'acide nucléique 7
3.3.3 Méthodes moléculaires génériques pour la détection des pospiviroïdes 9
3.3.3.1 R-PAGE 9
3.3.3.2 Hybridation avec sonde ARNc marquée à la DIG 9
3.3.3.3 Méthode RT-PCR classique avec amorces de Verhoeven *et al.* (2004) 10
3.3.3.4 Méthode RT-PCR en temps réel avec analyse GenPospi (Botermans *et al.*, 2013) 10
3.3.4 Méthodes moléculaires à spécificité accrue pour la détection de PSTVd 12
3.3.4.1 Méthode RT-PCR classique avec amorces de Shamloul *et al.* (1997) 12
3.3.4.2 Méthode RT-PCR en temps réel avec amorces de Boonham *et al.* (2004) 12
3.3.4.3 Méthode RT-PCR en temps réel (trousse PLANT PRINT Diagnòstics) 13
3.4 Témoins des analyses moléculaires 14
3.5 Interprétation des résultats des RT-PCR classique et en temps réel 15
3.5.1 Amplification par RT-PCR classique 15
3.5.2 Amplification par RT-PCR en temps réel 15
4. Identification 16
4.1 Séquençage et analyse des séquences 16
5. Données à conserver 17
6. Points de contact pour obtenir des renseignements complémentaires 18
7. Remerciements 18
8. Références 18

1. Information sur les organismes nuisibles

Les viroïdes sont des molécules d'ARN monocaténaires non encapsidées qui comportent entre 239 et 401 nucléotides formant un cercle clos constitué de liaisons covalentes; ces viroïdes sont répliqués par des enzymes de l'organisme hôte (Hammond et Owens, 2006). *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd; genre *Pospiviroid*) comporte typiquement 359 nucléotides mais la littérature fait état d'isolats de PSTVd constitués de 341–364 nucléotides (Wassenegger *et al*., 1994; Shamloul *et al*., 1997; Jeffries, 1998). Des souches virulentes et bénignes ont été décrites à partir de symptômes induits chez des cultivars de tomates sensibles; par exemple, *Solanum lycopersicum* L. (tomate) cv. *Rutgers* (Fernow, 1967).

La gamme de plantes hôtes naturelles de PSTVd est relativement limitée. Les principaux hôtes naturels sont les espèces stolonifères et tubéreuses du genre *Solanum*; par exemple *Solanum tuberosum* L. (pomme de terre) et *S. lycopersicum* (tomate). PSTVd a également été identifié dans *Capsicum annuum*, *Persea americana* et *S. muricatum*. C'est principalement dans les espèces de plantes ornementales à multiplication végétative de la famille des Solanacées que PSTVd a été détecté, plus précisément *Brugmansia* spp., *Cestrum* spp., *Datura* sp., *Lycianthes rantonetti*, *Petunia* spp., *Physalis peruviana*, *Solanum* spp. et *Streptosolen jamesonii*; mais on le retrouve aussi chez Chrysanthemum *sp. et Dahlia × hybrida* dans la famille des Asteraceae (pour en savoir plus sur les plantes hôtes naturelles, voir CABI (sans date)). En conditions expérimentales, la gamme de plantes hôtes de PSTVd est large et comprend des espèces de la famille des Solanacées, mais aussi certaines espèces appartenant à au moins neuf autres familles. La majorité des hôtes présentent peu de symptômes de maladie, voire aucun (Singh, 1973; Singh *et al*., 2003).

Des infections de *S. tuberosum* par PSTVd ont été constatées dans certains pays ou États en Afrique, Asie, Europe orientale, Amérique du Nord (OEPP/CABI, 1997), Amérique centrale (Badilla *et al*., 1999), Amérique du Sud et Moyen-Orient (Hadidi *et al*., 2003). Toutefois, il est présent dans d'autres zones encore chez des espèces végétales ornementales et d'autres hôtes (voir sa répartition géographique dans CABI (sans date)).

Chez *Solanum tuberosum*, la principale voie de dissémination de PSTVd est la multiplication végétative. Le viroïde se dissémine également par contact, surtout par les machines agricoles dans les champs et lorsque les tubercules-semences de pomme de terre sont coupés (Hammond et Owens, 2006). PSTVd se transmet dans les semences véritables de pomme de terre, jusqu'à 100 pour cent des semences pouvant être infectées (Fernow *et al*., 1970; Singh, 1970), mais aussi dans le pollen (Grasmick et Slack, 1985; Singh *et al*., 1992). De Bokx et Pirone (1981) font état d'un faible taux de transmission de PSTVd par le puceron *Macrosiphum euphorbiae*, tandis que les pucerons *Myzus persicae* ou *Aulacorthum solani* ne transmettent pas le viroïde. Cependant, l'acquisition et la transmission de PSTVd par *M. persicae* à partir de plantes co-infectées par PSTVd et par *Potato leafroll virus* (PLRV) ont été observées en conditions expérimentales (Salazar *et al*., 1995; Singh et Kurz, 1997). Une étude ultérieure a mis en évidence l'encapsidation hétérologue de PSTVd dans des particules de PLRV (Querci *et al*., 1997), phénomène qui peut avoir des implications importantes concernant l'épidémiologie et la dissémination de PSTVd en conditions naturelles.

Chez *Solanum lycopersicum*, PSTVd se dissémine facilement par contact et sa transmission par le pollen et les semences est également avérée (Kryczynski *et al.*, 1988; Singh, 1970). Il est démontré que la transmission dans les semences de tomates contribue à la dissémination mondiale de PSTVd (van Brunschot *et al*., 2014). D'autre part, il est possible que les semences de piment infectées soient également un vecteur de dissémination de PSTVd (Lebas *et al*., 2005).

Les espèces de plantes ornementales infectées peuvent avoir un effet d'inoculum si elles sont traitées avant d'entrer en contact avec d'autres plantes sensibles; des études montrent qu'elles sont des vecteurs de la dissémination internationale de PSTVd (Navarro *et al*., 2009; Verhoeven *et al.*, 2010). Aucune transmission de PSTVd n'a été démontrée avec *Apis mellifera*, *Bombus terrestris*, *Frankliniella occidentalis* ni *Thrips tabaci* (Nielsen *et al*., 2012).

En l'état actuel des connaissances, PSTVd est le seul viroïde qui infecte naturellement des espèces cultivées de *Solanum*. Cependant, *Mexican papita viroid* (MPVd) infecte les espèces sauvages de *S. cardiophyllum* (Martinez-Soriano *et al*., 1996). En conditions expérimentales, d'autres espèces de viroïdes du genre *Pospiviroid* infectent *S. tuberosum* (Verhoeven *et al*., 2004).

Il a été observé que, outre PSTVd, des pospiviroïdes infectent *S. lycopersicum* en conditions naturelles, notamment *Citrus exocortis viroid* (CEVd; Mishra *et al*., 1991), *Columnea latent viroid* (CLVd; Verhoeven *et al*., 2004), *Mexican papita viroid* (MPVd; Ling et Bledsoe, 2009), *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd; Reanwarakorn *et al*., 2011) *Tomato apical stunt viroid* (TASVd; Walter, 1987), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd; Singh *et al*., 1999) et *Tomato planta macho viroid* (TPMVd; Galindo *et al*., 1982).

2. Données taxonomiques

Nom: *Potato spindle tuber viroid* (abréviation: PSTVd)

Synonymes: *Potato spindle tuber virus*, *Potato gothic virus*, *Tomato bunchy top virus*

Classement taxonomique: Pospiviroïdés, pospiviroïdes

Noms communs: viroïde des tubercules fusoïdes, viroïde de la maladie des tubercules en fuseau, viroïde de la fillodie de la pomme de terre, viroïde de la filosité des pommes de terre, viroïde des tubercules fusiformes de la pomme de terre, viroïde des tubercules en fuseau de la pomme de terre

3. Détection

La manifestation et la sévérité des symptômes dépendent de la souche de PSTVd, du cultivar et de l'environnement. Chez *S. tuberosum*, l'infection peut être asymptomatique ou produire des symptômes légers à sévères (croissance insuffisante de la plante, défaut de verticalité, phyllotaxie du feuillage dans le sens des aiguilles d'une montre lorsque les plantes sont observées du dessus, feuilles vert foncé et rugueuses). Les tubercules peuvent être petits, difformes, fusiformes ou en forme d'haltères, avec des yeux proéminents, très visibles et répartis régulièrement (OEPP, 2004). Chez *S. lycopersicum*, les symptômes sont notamment le rabougrissement, l'épinastie, la rugosité et l'enroulement latéral des nouvelles folioles, la chlorose foliaire, les rougissures, la friabilité, la nécrose, l'hypotrophie des fruits et le mûrissement incomplet des fruits (Mackie *et al*., 2002; Hailstones *et al*., 2003; Lebas *et al*., 2005). Chez *C. annuum*, les symptômes sont légers, les feuilles terminales au sommet de la plante présentant des bordures ondulées (Lebas *et al*., 2005). Aucune des espèces de plantes ornementales étudiées jusqu'à présent ne présentent de symptôme (Verhoeven, 2010).

Étant donné que les infections par PSTVd peuvent demeurer asymptomatiques, il est nécessaire de procéder à des analyses pour détecter et identifier le viroïde. La détection de PSTVd peut se faire grâce aux analyses biologiques et moléculaires présentées à titre d'options dans la Figure 1, mais pour ce qui est de l'identification, le produit de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) doit être séquencé car ces analyses ne sont pas spécifiques à PSTVd et détectent d'autres viroïdes. Le séquençage contribue en outre à éviter de signaler de faux positifs. Si l'on estime que la pathogénicité est importante, une indexation biologique peut être effectuée. Si PSTVd est identifié pour la première fois dans un pays, le laboratoire peut faire confirmer la diagnose par un autre laboratoire.

Des témoins appropriés devraient être intégrés à toutes les analyses afin de minimiser le risque de faux positifs ou de faux négatifs.

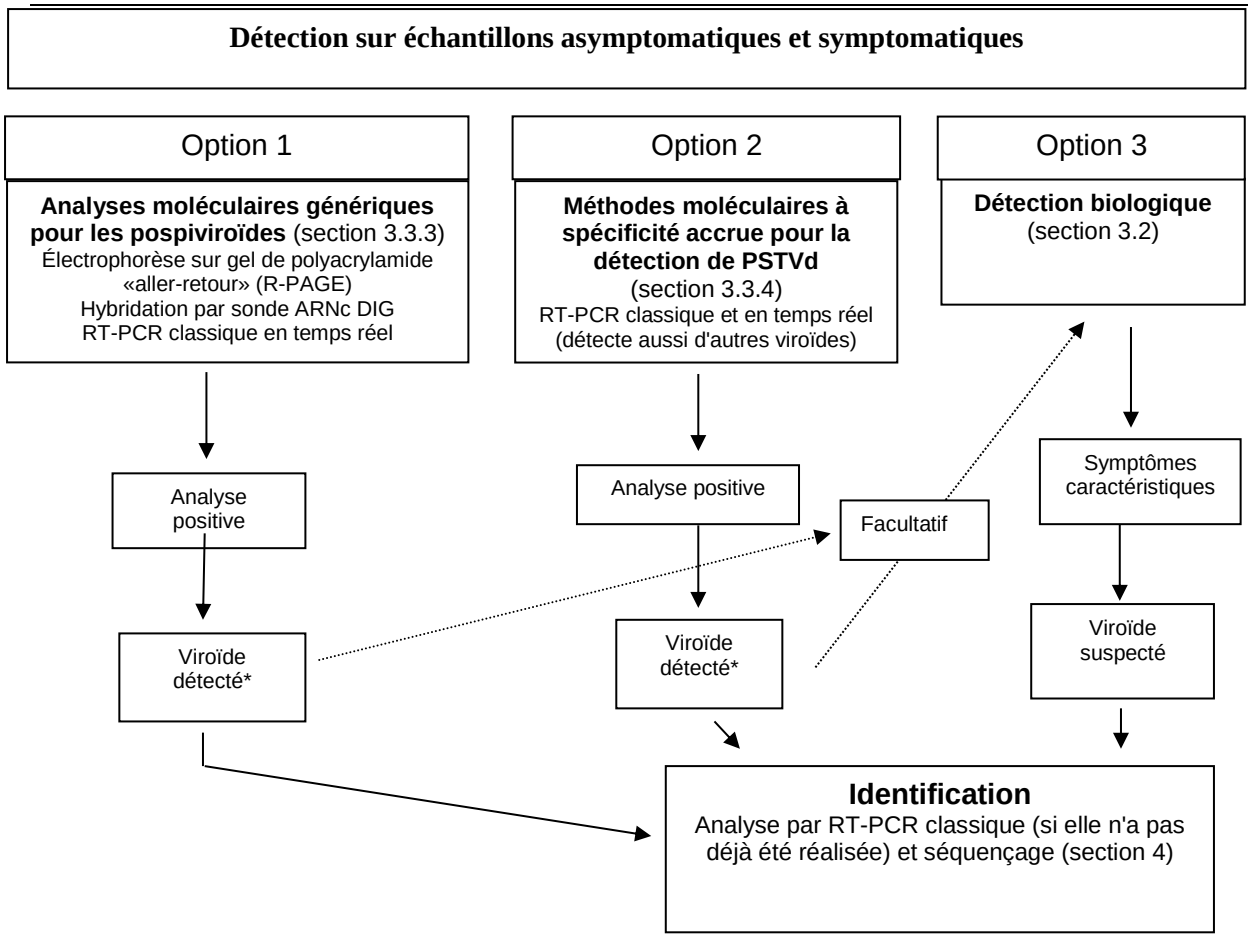

Figure 1. Exigences minimales relatives à la détection et à l'identification de *Potato spindle tuber viroid (PSTVd)*

* Dans certains cas, on peut ne pas avoir à identifier le viroïde présent dans chaque échantillon positif; par exemple lors de l'apparition d'un foyer de PSTVd.

Remarque: Lorsqu'on soupçonne qu'un échantillon est infecté par un viroïde (présence des symptômes caractéristiques) mais que l'analyse est négative, d'autres analyses devraient être réalisées pour confirmer le résultat.

La présente annexe porte sur la détection de PSTVd; elle n'a pas été mise au point pour la détection et l'identification d'autres espèces de pospiviroïdes. Néanmoins, il convient de tenir compte de la présence potentielle d'autres viroïdes pour choisir la méthode de détection et d'identification. C'est la raison pour laquelle cette annexe présente des méthodes de détection non spécifiques qui détectent tous les viroïdes connus, y compris les pospiviroïdes comme PSTVd. Pour identifier le viroïde, il est ensuite nécessaire de séquencer le produit de la PCR.

Des protocoles de détection de PSTVd dans les tissus des feuilles, des tubercules et des semences (véritables) botaniques sont détaillés, mais il est particulièrement difficile de détecter le viroïde dans le tissu des semences de manière fiable.

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 niveau de sensibilité, la spécificité et/ou la reproductibilité d'origine y sont définis. La mention de noms de réactifs, de produits chimiques ou d'équipements dans ces protocoles de diagnostic n'implique pas qu'ils sont approuvés à l'exclusion d'autres substances ou équipements qui peuvent également convenir. Les procédures en laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être adaptées aux normes de chaque laboratoire à condition de faire l'objet d'une validation adéquate. Des recommandations quant à la validation des méthodes phytodiagnostiques sont proposées dans OEPP (2014).

La réalisation d'une analyse moléculaire dépend à la fois de la matrice à analyser et du choix des méthodes mises en œuvre ultérieurement pour préparer l'échantillon, extraire l'acide nucléique puis détecter et identifier le viroïde. Le Tableau 1 présente un aperçu des données de validation disponibles pour différentes matrices ainsi que les combinaisons de méthodes adéquates. Les détails sur ces méthodes sont fournis dans les paragraphes correspondants ou dans les références indiquées.

3.1 Échantillonnage

La NIMP 31 (*Méthodes d'échantillonnage des envois*) fournit des orientations générales sur les méthodes d'échantillonnage.

Microplants de *S. tuberosum* et plants de *S. tuberosum* cultivés sous serre S'agissant de microplants, l'échantillon devrait être le plant entier, ou bien les deux tiers supérieurs du plant prélevés en conditions aseptiques de façon à permettre au reste du plant de continuer à pousser. Les microplants devraient avoir quatre à six semaines et présenter des tiges d'environ 5 cm de long avec des feuilles bien formées. S'agissant de plants cultivés sous serre, l'échantillon devrait être une foliole complètement développée de chaque plant. Sachant que la concentration de viroïde est plus faible à basse température et dans des conditions de faible luminosité, les plants devraient être cultivés à une température supérieure ou égale à 18 °C avec une photopériode d'au moins 14 heures. On peut éventuellement grouper les microplants ou les feuilles; le taux de groupage dépend de la méthode d'analyse utilisée et doit être validé.

Plants de *S. tuberosum* cultivés en champ On devrait prélever une foliole terminale non sénescente complètement développée au sommet de chaque plant. On peut grouper les feuilles pour l'analyse; le taux de groupage dépend de la méthode d'analyse utilisée et doit être validé.

Tubercules de *S. tuberosum* PSTVd est distribué de façon méthodique dans les tubercules de *S. tuberosum* (Shamloul *et al*., 1997). Le viroïde est également présent en quantités presque égales dans différentes parties des tubercules infectés primaires et secondaires (Roenhorst *et al*., 2006). La concentration est à son niveau maximal immédiatement après la récolte. Dans les tubercules entreposés à 4 °C, il n'y a pas de baisse notable de la concentration pendant une durée allant jusqu'à trois mois, mais au-delà de six mois la concentration peut être divisée par plus de 10^4. L'échantillon peut être un prélèvement unique au cœur de n'importe quelle partie du tubercule; ces prélèvements peuvent être groupés; le taux de groupage dépend de la méthode d'analyse utilisée et doit être validé.

Feuilles d'autres espèces de végétaux cultivés et de plantes ornementales. L'analyse porte sur de jeunes feuilles complètement développées. On peut grouper les feuilles pour l'analyse; le taux de groupage dépend de la méthode d'analyse utilisée et doit être validé. Il convient de noter que l'âge et la maturité des plants a une incidence sur la concentration de viroïde et qu'il existe souvent des fluctuations saisonnières. En outre, certaines espèces contiennent des composés biochimiques qui peuvent inhiber la transmission aux plantes à analyser (par exemple *Brugmansia* spp.) ou la RT-PCR (par exemple *Calibrachoa* spp., *Solanum jasminoides* et *S. jamesonii*).

Semences La concentration de viroïde peut varier considérablement d'une semence à l'autre et le taux d'infection peut fluctuer entre moins de 1 et 100 pour cent. Du fait de ces variations, il est très difficile de formuler des recommandations sur la taille des échantillons et le taux de groupage (EUPHRESCO, 2010). Pour *S. lycopersicum*, des taux de groupage de 100–1 000 ont été mis en œuvre dans une même analyse. Le taux de groupage dépend de la méthode d'analyse utilisée et doit être validé.

Les semences de pomme de terre peuvent être semées dans un milieu de culture (par exemple du compost) dans des plateaux et les pousses/plants peuvent être analysés de façon non destructive en suivant la même procédure que celle qui a été décrite pour les plants cultivés sous serre (OEPP, 2006).

3.2 Détection biologique

L'inoculation de plants de *S. lycopersicum* (cultivars Rutgers, Moneymaker ou Sheyenne) permet de détecter une bonne partie des viroïdes, mais pas la totalité (par exemple, la tomate n'est pas hôte du pospiviroïde *Iresine viroid 1* (IrVd-1) (Spieker, 1996; Verhoeven *et al.*, 2010), et apporte une preuve

visuelle de la pathogénicité. Certains isolats peuvent toutefois ne pas être détectés en raison de l'absence de symptômes. Par ailleurs, les symptômes peuvent ne pas permettre de diagnostiquer la présence de PSTVd. L'indexation biologique exige beaucoup de travail; elle peut nécessiter une vaste superficie sous serre et prendre plusieurs semaines, voire davantage, avant que l'analyse ne soit achevée. Aucune recherche n'a été menée pour comparer la sensibilité de cette méthode et celle des autres méthodes décrites dans le présent protocole. Si elle est moins sensible que les méthodes moléculaires, elle pourrait s'avérer moins adaptée à l'analyse des semences. Cependant l'amplification du viroïde par indexation biologique peut éventuellement aboutir à un niveau permettant de le détecter par d'autres méthodes.

Environ 200 à 500 mg de tissu de feuilles, de racines ou de tubercules sont broyés dans une faible quantité de solution d'inoculation tamponnée au phosphate à 0,1 M (une dilution 1:1 convient) contenant du carbure de silicium (400 mesh). Le tampon phosphate (pH 7,4) est préparé en mélangeant 80,2 ml de K_2HPO_4 à 1 M et 19,8 ml de KH_2PO_4 à 1 M puis en amenant le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.

L'inoculation se fait sur de jeunes plants de tomate qui comptent une ou deux feuilles complètement développées. La surface de la feuille est frottée délicatement avec un doigt ganté, un bâtonnet ouaté ou un tampon de coton trempé dans l'inoculum, puis immédiatement rincée à l'eau jusqu'à l'élimination du carbure de silicium. Les plants sont cultivés avec une température diurne variant entre 24 et 39 °C et une photopériode de 14 h supplémentée d'un éclairage aux lampes à vapeur de sodium à hauteur d'environ 650 $\mu E/m^2/s$ (Grassmick et Slack, 1985). Des températures et un éclairage inférieurs peuvent abaisser la sensibilité de l'essai. Les plants sont inspectés toutes les semaines à la recherche de symptômes, jusqu'à six semaines après l'inoculation. Parmi les symptômes d'une infection par PSTVd figurent le rabougrissement, l'épinastie, la rugosité et l'enroulement latéral des nouvelles folioles, la chlorose foliaire, les rougissures, la friabilité et la nécrose.

Les essais biologiques sur la tomate permettent de détecter de nombreux pospiviroïdes (à l'exception de IrVd-1, voir ci-dessus); par conséquent pour l'identification, on devrait réaliser une RT-PCR sur l'acide nucléique extrait de plants indicateurs symptomatiques et séquencer le produit de la PCR.

3.3 Détection moléculaire

3.3.1 Préparation de l'échantillon

Microplants, matériel foliaire et racines Le matériel végétal a été broyé de manière satisfaisante soit à l'aide de mortiers et pilons, soit de dispositifs d'homogénéisation (par exemple Homex 6 (Bioreba)) dotés de sachets d'extraction (Bioreba). L'ajout d'une petite quantité d'eau ou de tampon de lyse (dont la composition dépend de la méthode utilisée pour extraire l'acide nucléique) ou la congélation de l'échantillon (par exemple dans l'azote liquide) peuvent faciliter l'homogénéisation.

La procédure suivante a été validée (voir Tableau 1) en association avec la méthode d'extraction de l'acide nucléique par billes magnétique n° 2 ainsi qu'avec la méthode RT-PCR GenPospi en temps réel décrite dans la présente annexe. À l'aide du Homex 6 ou d'un dispositif manuel (Bioreba), homogénéiser environ 1 g de tissu dans un sachet d'extraction avec 3,5 ml (dilution entre 1:2 et 1:5 (m/v)) d'hormone de croissance plus tampon de lyse (chlorhydrate de guanidine à 6 M; acétate de sodium à 0,2 M, pH 5,2; acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) à 25 mM; polyvinylpyrrolidone (PVP)-10 à 2,5 pour cent). Incuber ensuite les échantillons pendant 10 min à 65 °C à 850 tours par minute dans un thermo-mélangeur (ou par agitation (retourner le tube 3 fois) et centrifugation supplémentaire pendant 2 min à 16 000 *g*) avant l'extraction de l'acide nucléique.

Tubercules de *S. tuberosum* Homogénéiser complètement les cœurs des tubercules dans de l'eau ou dans le tampon de lyse (dont la composition dépend de la méthode utilisée pour extraire l'acide nucléique; 1 ml par gramme de cœur de tubercule). Un broyeur comme le Homex 6 doté de sachets d'extraction donne des résultats satisfaisants. La congélation des cœurs (par exemple à − 20 °C) avant d'ajouter l'eau ou le tampon de lyse facilite l'homogénéisation.

Semences Pour les quantités de semences limitées (< 100), on peut avoir recours à un broyeur de tissu (par exemple Retsch TissueLyser (Qiagen)). Pour les quantités de semences plus importantes, on peut utiliser un mélangeur à pales (par exemple MiniMix (Interscience)) ou un homogénéiseur (par exemple Homex 6) avec une quantité minimale de tampon de lyse (dont la composition dépend de la méthode employée pour extraire l'acide nucléique). Les semences peuvent aussi être écrasées à l'aide d'un marteau (Bertolini *et al*., 2014b) ou d'un mortier et d'un pilon. Cette dernière option peut s'avérer peu pratique pour une utilisation courante, car maîtriser la contamination croisée peut alors être difficile. Autre solution: on peut utiliser de l'azote liquide pour congeler l'échantillon, qui est ensuite broyé dans un broyeur cellulaire (méthode qui peut aussi servir pour d'autres types de tissus).

La procédure suivante a été validée (voir Tableau 1) en association avec la méthode d'extraction de l'acide nucléique par billes magnétique n° 2 ainsi qu'avec la méthode RT-PCR en temps réel de Boonham *et al*. (2004) décrite dans la présente annexe. L'échantillon est réparti en trois lots de 1 000 semences; faire tremper chaque lot dans 20 ml d'hormone de croissance plus tampon de lyse dans un sachet BagPage (Interscience) de 100 ml pendant 30 à 60 min à température ambiante, puis homogénéiser pendant 90 s à l'aide d'un BagMixer (Interscience) et incuber (ou agiter et centrifuger comme dans la méthode décrite pour les microplants, le matériel foliaire et les racines) avant d'extraire l'acide nucléique.

Frottis et/ou empreintes de tissu Presser les pédicelles foliaires ou les pousses détachées sur des membranes en nylon. On peut effectuer plusieurs frottis ou empreintes qui se chevauchent partiellement à partir de différentes feuilles et/ou pousses détachées sur une membrane en nylon d'environ 0,5 cm^2, d'après Bertolini *et al*. (2008, 2014a). La membrane contenant l'échantillon immobilisé est découpée et insérée dans un microtube. L'échantillon immobilisé devrait être manipulé avec des pinces propres. Les échantillons constitués d'empreintes de tissu ou de frottis peuvent être entreposés à température ambiante dans un environnement sombre et sec pendant au moins trois mois. Pour extraire l'ARN cible des membranes, ajouter 100 µl de tampon glycine à chaque microtube contenant l'échantillon immobilisé, puis agiter sur vortex et placer sur la glace jusqu'à l'amplification par PCR.

3.3.2 Extraction de l'acide nucléique

On peut faire appel à un large éventail de méthodes d'extraction de l'acide nucléique pratiquées à l'aide de trousses commerciales ou fondées sur des procédures publiées dans la presse scientifique. Les trousses, tampons et procédures d'extraction de l'acide nucléique présentés ci-dessous ont permis de détecter correctement PSTVd.

Trousses commerciales Les trousses d'extraction commerciales comme RNeasy (Qiagen), MasterPure (Epicentre) et Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics) peuvent être utilisées en suivant les instructions du fabricant. La capacité de la trousse RNeasy d'extraire l'ARN de PSTVd à partir de différentes matrices a été évaluée dans le cadre du projet «Detection and Epidemiology of Pospiviroids» (DEP) de l'EUPHRESCO (EUPHRESCO, 2010).

Méthode décrite dans Mackenzie *et al*. (1997) Homogénéiser le tissu de la plante (à 1:10 (m/v)) dans le tampon de lyse (isothiocyanate de guanidine à 4 M, acétate de sodium à 0,2 M, EDTA à 25 mM, PVP-40 à 2,5 pour cent (m/v), et 2-mercaptoéthanol à 1 pour cent (v/v) ajouté juste avant l'utilisation). Mélanger un millilitre d'homogénat avec 100 µl de sarkosyl à 20 pour cent (m/v) puis incuber à 70 °C pendant 10 min dans un thermo-mélangeur en agitant à 1 200 tours par minute. Cette méthode peut servir à extraire un ARN de qualité à partir d'une large gamme d'espèces végétales.

Méthode avec tampon EDTA Le tissu de la plante peut être homogénéisé (à 1:4 (m/v)) dans un tampon de lyse simple (NaOH à 50 mM, EDTA à 2,5 mM) puis incubé (à approximativement 25 °C pendant 15 min) ou centrifugé (à 12 000 *g* et 4 °C pendant 15 min). Le surnageant peut alors, en fonction du niveau de sensibilité requis, servir soit directement à la RT-PCR (sensibilité moindre), soit être déposé sur une membrane en nitrocellulose et élué dans de l'eau distillée stérile (sensibilité supérieure) (Singh *et al*., 2006). Bien que la concentration de viroïde soit plus faible en suivant la méthode avec tampon EDTA qu'avec les autres méthodes d'extraction décrites, cela ne devrait pas constituer un facteur

limitant lorsque cette méthode est associée à une RT-PCR ou à une hybridation par sonde marquée à la dioxygénine (DIG). Cette méthode a été mise en œuvre sur *S. lycopersicum* et *S. tuberosum* ainsi que diverses espèces de plantes ornementales.

Extraction au phénol–chloroforme et au PEG en deux étapes Homogénéiser le tissu du plant et extraire l'acide nucléique conformément aux instructions fournies dans OEPP (2004). Cette procédure a été associée aux méthodes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide «aller-retour» (R-PAGE), de sonde ARNc marquée à la DIG ainsi que de RT-PCR classique décrites dans le présent protocole de diagnostic et appliquée à un large éventail d'espèces végétales et types de tissus (par exemple feuilles et tubercules de pomme de terre).

Extraction au CTAB Homogénéiser le tissu du plant et extraire l'acide nucléique conformément aux instructions fournies dans OEPP (2004). La méthode fondée sur le bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) a été mise en œuvre en association avec une RT-PCR en temps réel pour un large éventail d'espèces végétales ou de types de tissus (par exemple feuilles et semences de tomate; EUPHRESCO, 2010).

Méthode d'extraction par billes magnétiques nº 1 La procédure automatisée qui suit fait appel au KingFisher mL Magnetic Particle Processor (Thermo Scientific). D'autres modèles KingFisher peuvent être employés à condition d'ajuster les volumes comme il convient.

Pour chaque échantillon, faire macérer au minimum 200 mg de feuilles ou de tissu de tubercule, ou jusqu'à 100 semences puis ajouter immédiatement le tampon d'extraction à hauteur de 10 ml par gramme de feuilles ou de tissu de tubercule, ou de 20 ml par gramme de semences. Laisser macérer jusqu'à obtention d'un lysat cellulaire limpide présentant le moins de débris tissulaires intacts possible. Le tampon d'extraction est composé de 200 µl de solution de pyrophosphate tétrasodique (TNaPP) à 8,39 pour cent (m/v) (pH 10,0–10,9) et de 100 µl d'Antifoam B Emulsion (Sigma) ajoutés à 9,8 ml de tampon de lyse à la guanidine (GLB). Le GLB est composé de: 764,2 g de chlorhydrate de guanidine, 7,4 g de sel disodique dihydraté d'EDTA, 30,0 g de PVP-10, 5,25 g d'acide citrique monohydraté, 0,3 g de citrate trisodique, 5 ml de Triton X-100, 250 ml d'éthanol absolu et 750 ml d'eau.

Faire décanter 2 ml environ de lysat dans un tube de microcentrifugeuse neuf, puis centrifuger à 5 000 *g* approximativement pendant 1 min. Prélever un millilitre de surnageant et le placer dans le premier tube (A) du râtelier du KingFisher mL, puis y ajouter 50 µl d'une solution de billes magnétiques MAP Solution A (Invitek) agitée sur vortex. Le tube B reçoit 1 ml de GLB; les tubes C et D, 1 ml d'éthanol à 70 pour cent; et le tube E, 200 µl d'eau ou de tampon 1× Tris-EDTA.

Placer le râtelier de tubes dans le KingFisher mL puis exécuter le programme (voir Figure 2). Après 20 min, l'appareil fait une pause pour une étape de chauffage: placer alors le râtelier de tubes dans une étuve à 65–70 °C pendant 5 min avant de le replacer dans le KingFisher mL pour la reprise du programme. D'autres modèles peuvent intégrer les étapes de chauffage ou de rétention de l'évaporation. Lorsque le programme est terminé, transférer les acides nucléiques élués dans un tube à microcentrifugeuse neuf.

Cette méthode a été employée pour une vaste gamme d'espèces végétales ainsi que sur des semences de tomates et des tubercules de pomme de terre. Elle a été mise en œuvre en association avec deux des méthodes de RT-PCR en temps réel décrites dans la présente annexe (voir sections 3.3.3.4 et 3.3.4.2). La méthode d'extraction par billes magnétiques nº 1 peut donner des valeurs seuils des cycles (Ct) supérieures de plusieurs cycles à celles des autres méthodes d'extraction décrites dans cette annexe, mais comme elle offre un meilleur débit d'analyse des échantillons, il s'agit d'une méthode d'extraction précieuse (Roenhorst *et al.*, 2005).

Plate layout Default: Plate type = KingFisher tubestrip 1000 µl; Plate change message = Change Default
A: volume = 1000, name = Cell lysate or tissue homogenate; volume = 50, name = Magnetic particles;
B: volume = 1000, name = Washing buffer 1 (Various); **C**: volume = 1000, name = Washing buffer 2 (Various);
D: volume = 1000, name = Washing buffer 3 (Various); **E**: volume = 200, name = Elution buffer (Various)
STEPS COLLECT BEADS Step parameters: Name = Collect Beads; Well = A, Default; Beginning of step: Premix = No; Collect parameters: Collect count = 1. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix Bind; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = Yes, count = 4. WASH Step parameters: Name = Washing, Well = B, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. WASH Step parameters: Name = Washing, Well = C, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. WASH Step parameters; Name = Washing, Well = D, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. ELUTION Step parameters; Name = Elution, Well = E, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 10s, speed = Fast; Elution parameters: Elution time = 20s, speed = Bottom very fast; Pause parameters: Pause for manual handling = Yes, message = Heating, Post mix time = 30s, speed = Bottom very fast; Remove beads: Remove beads = Yes, collect count = 4, disposal well = D

Figure 2. Programmation du KingFisher mL Magnetic Particle Processor (Thermo Scientific)

Méthode d'extraction par billes magnétiques nº 2 Cette procédure automatisée fait appel à la trousse Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics) associée au dispositif KingFisher 96 (Thermo Scientific). La procédure devrait suivre les instructions du fabricant sauf en ce qui concerne le tampon de lyse PN fourni avec la trousse, qui est remplacé par un tampon de lyse supplémenté à l'hormone de croissance.

3.3.3 Méthodes moléculaires génériques pour la détection des pospiviroïdes

3.3.3.1 R-PAGE

La méthode R-PAGE a été recommandée pour détecter l'infection des feuilles de *S. tuberosum* par PSTVd (OEPP, 2004), mais s'est avérée moins sensible (limite de détection (LD) égale à 87 893 pg de PSTVd) que les autres méthodes moléculaires évaluées (LD d'au moins 17 pg de PSTVd) lors d'une analyse circulaire pratiquée avec une sonde ARNc marquée à la DIG et une RT-PCR classique en deux étapes faisant appel aux amorces de Shamloul *et al*. (1997) ainsi que sur la méthode en temps réel de Boonham *et al*. (2004) (Jeffries et James, 2005; voir aussi Tableau 1).

Cette procédure a été mise en œuvre de façon satisfaisante avec d'autres plantes hôtes, par exemple *C. annuum, S. tuberosum* (tubercules) et *S. lycopersicum*. En raison de la faible sensibilité de cette méthode, il faudrait que le groupage des échantillons fasse l'objet d'une validation.

La méthode R-PAGE détecte l'ensemble des pospiviroïdes connus, c'est pourquoi on doit réaliser une amplification par RT-PCR de l'acide nucléique suivie d'un séquençage du produit de la PCR pour identifier PSTVd.

3.3.3.2 Hybridation avec sonde ARNc marquée à la DIG

Cette méthode a été recommandée pour détecter l'infection des feuilles de *S. tuberosum* par PSTVd (OEPP, 2004). La sensibilité pour la détection de PSTVd dans les feuilles de *S. tuberosum* atteint au moins 17 pg de PSTVd (Jeffries et James, 2005). La méthode s'est également efficace avec d'autres hôtes, notamment *Petunia* spp., *S. jasminoides, S. lycopersicum* et *S. tuberosum* (tubercules).

La sonde utilisée se fonde sur un monomère complet de PSTVd produit par Agdia Inc.[9] (référence DLP 08000/0001). L'utilisation de cette sonde devrait se conformer aux instructions du fabricant; cf. OEPP (2004) pour les détails de la méthode. En plus du tampon Ames (OEPP, 2004), on peut avoir

recours à du polyéthylène glycol (PEG) et à d'autres tampons d'extraction pour extraire l'acide nucléique.

La méthode par sonde ARNc marquée à la DIG détecte l'ensemble des pospiviroïdes connus, c'est pourquoi on doit réaliser une amplification par RT-PCR de l'acide nucléique suivie d'un séquençage du produit de la PCR pour identifier PSTVd

3.3.3.3 Méthode RT-PCR classique avec amorces de Verhoeven *et al.* (2004)

Cette analyse s'appuie sur les amorces Pospi1 et Vid de Verhoeven *et al.* (2004). Les amorces Pospi1 détectent CEVd, *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), IrVd-1, MPVd, PCFVd, PSTVd, TASVd, TCDVd et TPMVd. Les amorces Vid détectent PSTVd, TCDVd ainsi que CLVd. Le recours aux amorces Pospi1 et Vid dans deux réactions distinctes permet donc de détecter la totalité des pospiviroïdes. Cela étant, un mésappariement sur des positions critiques du site cible de l'amorce peut empêcher la détection de certains isolats de pospiviroïdes (un isolat de CLVd n'a par exemple pas été détecté par ces amorces; Steyer *et al*., 2010), pour lesquels il faut alors utiliser des amorces supplémentaires. Des études *in silico* montrent que les isolats de PSTVd suivants peuvent ne pas être détectés à cause d'un mésappariement de l'amorce sur des positions critiques: amorces Pospi1: EU879925, EU273604, EF459697, AJ007489, AY372398, AY372394, FM998551, DQ308555, E00278; amorces Vid: EU273604[2]. Les amorces Pospi1 sont nettement plus sensibles que les Vid pour détecter PSTVd.

Amorces

Pospi1 (directe): 5´-GGG ATC CCC GGG GAA AC-3´ (nucléotide (nt) 86–102)

Pospi1 (inverse): 5´-AGC TTC AGT TGT (T/A)TC CAC CGG GT-3´ (nt 283–261)

Vid (directe): 5´-TTC CTC GGA ACT AAA CTC GTG-3´ (nt 355–16)

Vid (inverse): 5´-CCA ACT GCG GTT CCA AGG G-3´ (nt 354–336)

Conditions réactionnelles

Il est attesté que la trousse One-Step RT-PCR Kit (Qiagen) est fiable pour détecter PSTVd, CEVd, CLVd, CSVd, TASVd et TCDVd dans différents échantillons (EUPHRESCO, 2010) et pour les autres pospiviroïdes énumérés au début de la présente section. Il n'est pas nécessaire de recourir à la Q-solution décrite dans EUPHRESCO (2010). On peut utiliser plusieurs trousses de RT-PCR et diverses conditions réactionnelles, mais on devrait les valider pour s'assurer qu'elles conviennent à l'usage souhaité et détectent tous les pospiviroïdes d'intérêt.

On ajoute deux microlitres de matrice à 23 µl de mélange principal (master mix), lequel est composé de 1,0 µl respectivement des amorces directe et inverse (10 µM), 5 µl de tampon 5× One-Step RT-PCR, 1,0 µl de mélange d'enzymes One-Step RT-PCR, 1,0 µl de dNTP (10 mM pour chaque dNTP) et 14 µl d'eau. Le programme du thermocycleur se déroule comme suit: 50 °C pendant 30 min; 95 °C pendant 15 min; 35 cycles à 94 °C pendant 30 s, 62 °C pendant 60 s et 72 °C pendant 60 s; étape d'extension finale à 72 °C pendant 7 min.

Électrophorèse sur gel

Après l'amplification par RT-PCR, les produits de la PCR (environ 197 pb (paires de bases) et 359 pb pour les amorces Pospi1 et Vid, respectivement) devraient être analysés par électrophorèse sur gel (gel d'agarose à 2 pour cent) et les amplicons de PCR qui présentent la taille correcte devraient être séquencés pour identifier les espèces de viroïdes. En pratique, le séquençage du produit à 197 pb a toujours abouti à la même identification que le séquençage du génome complet du viroïde.

3.3.3.4 Méthode RT-PCR en temps réel avec analyse GenPospi (Botermans *et al.*, 2013)

L'analyse GenPospi repose sur une RT-PCR en temps réel TaqMan pour détecter l'ensemble des espèces connues appartenant au genre *Pospiviroid*. Cette procédure repose sur deux réactions parallèles: la première (mélange réactionnel 1) cible tous les pospiviroïdes sauf CLVd (Botermans *et al.*, 2013); la seconde (mélange réactionnel 2) cible spécifiquement CLVd (Monger *et al.*, 2010). L'ajout d'un témoin

interne *nad5* fondé sur des amorces mises au point par Menzel *et al.* (2002) pour amplifier l'ARNm de mitochondries végétales (gène mitochondrial NADH-déshydrogénase) permet de contrôler l'extraction de l'ARN. Les procédures de validation de la méthode (voir Tableau 1) sur feuilles de tomates montrent que l'analyse GenPospi détecte les isolats de toutes les espèces de pospiviroïdes connues jusqu'au taux d'infection relatif de 0,13 pour cent (ce qui équivaut à une dilution de 1:770). Il s'agit d'une analyse spécifique, car aucune réactivité croisée n'a été observée avec d'autres viroïdes, virus ou acides nucléiques des plantes hôtes. La répétabilité et la reproductibilité obtenues valent 100 pour cent, et une comparaison inter-laboratoires a révélé la solidité de cette procédure. Il est démontré que l'analyse GenPospi constitue un outil adapté pour le dépistage à grande échelle des espèces de pospiviroïdes. Cet essai devra être validé pour les matrices autres que les feuilles de tomates.

Amorces

TCR-F 1-1: 5´-TTC CTG TGG TTC ACA CCT GAC C-3´ (Botermans *et al*., 2013)

TCR-F 1-3: 5´-CCT GTG GTG CTC ACC TGA CC-3´ (Botermans *et al*., 2013)

TCR-F 1-4: 5´-CCT GTG GTG CAC TCC TGA CC-3´ (Botermans *et al*., 2013)

TCR-F PCFVd: 5´-TGG TGC CTC CCC CGA A-3´ (Botermans *et al*., 2013)

TCR-F IrVd: 5´-AAT GGT TGC ACC CCT GAC C-3´ (Botermans *et al*., 2013)

TR-R1: 5´-GGA AGG GTG AAA ACC CTG TTT-3´ (Botermans *et al*., 2013)

TR-R CEVd: 5´-AGG AAG GAG ACG AGC TCC TGT T-3´ (Botermans *et al*., 2013)

TR-R6: 5´-GAA AGG AAG GAT GAA AAT CCT GTT TC-3´ (Botermans *et al*., 2013)

CLVd-F: 5´-GGT TCA CAC CTG ACC CTG CAG-3´ (Monger *et al*., 2010)

CLVd-F2: 5´-AAA CTC GTG GTT CCT GTG GTT-3´ (Monger *et al*., 2010)

CLVd-R: 5´-CGC TCG GTC TGA GTT GCC-3´ (Monger *et al*., 2010)

nad5-F: 5´-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3´ (Menzel *et al*., 2002)

nad5-R: 5´-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3´ (Menzel *et al*., 2002)

Sondes

pUCCR: 6FAM-5´-CCG GGG AAA CCT GGA-3´-MGB (Botermans *et al*., 2013)

CLVd-P: 6FAM-5´-AGC GGT CTC AGG AGC CCC GG-3´-BHQ1 (Monger *et al*., 2010)

nad5-P: VICr-5´-AGG ATC CGC ATA GCC CTC GAT TTA TGT G-3´-BHQ1 (Botermans *et al*., 2013)

Les deux mélanges réactionnels sont obtenus à l'aide de la trousse TaqMan RNA-to-Ct 1-Step Kit (Applied Biosystems).

Mélange réactionnel 1 (tous les pospiviroïdes sauf CLVd + nad5)

Le mélange réactionnel est composé de 12,5 µl de mélange 2× TaqMan RT-PCR, 0,6 µl de mélange d'enzymes 1× TaqMan RT, 0,75 µl (10 µM) d'amorces directes (TCR-F 1-1, TCR-F 1-3, TCR-F 1-4, TCR-F IrVd, TCR-F PCFVd et *nad5*-F) et inverses (TR-R1, TR-R CEVd, TR-R6 et *nad5*-R) (concentration finale de 0,3 µM pour chacune), 0,25 µl (10 µM) de sonde TaqMan pUCCR (concentration finale de 0,1 µM) et 0,5 µl (10 µM) de sonde TaqMan *nad5*-P (concentration finale de 0,2 µM). On ajoute de l'eau de qualité «biologie moléculaire» ainsi que 2 µl de d'ARN matrice jusqu'au volume final de 25 µl.

Mélange réactionnel 2 (CLVd + nad5)

Le mélange réactionnel est composé de 12,5 µl de mélange 2× TaqMan RT-PCR, 0,6 µl de mélange d'enzymes 1× TaqMan RT, 0,75 µl (10 µM) d'amorces directes (CLVd-F, CLVd-F2 et *nad5*-F) et inverses (CLVd-R et *nad5*-R) (concentration finale de 0,3 µM pour chacune), 0,25 µl (10 µM) de sonde TaqMan CLVd-P (concentration finale de 0,1 µM) et 0,5 µl (10 µM) de sonde TaqMan *nad5*-P (concentration finale de 0,2 µM). On ajoute de l'eau de qualité «biologie moléculaire» ainsi que 2 µl d'ARN matrice jusqu'à obtention d'un volume final de 25 µl.

Pour les deux mélanges réactionnels, les conditions de thermocyclage sont: 48 °C pendant 15 min, 95 °C pendant 10 min, puis 40 cycles à 95 °C pendant 15 s et 60 °C pendant 1 min.

Pour cette méthode, Botermans *et al*. (2013) a interprété les Ct < 32 comme un résultat positif, les Ct entre 32 et 37 comme non probantes et nécessitant confirmation, et les Ct ≥ 37 comme un résultat négatif. Ces valeurs seuils peuvent néanmoins exclure les niveaux d'infection faibles dans certains tissus, si bien qu'il revient à chaque laboratoire de les définir.

3.3.4 Méthodes moléculaires à spécificité accrue pour la détection de PSTVd

3.3.4.1 Méthode RT-PCR classique avec amorces de Shamloul *et al*. (1997)

Les amorces de RT-PCR utilisées dans cette analyse sont celles de Shamloul *et al*. (1997), également décrites dans Weidemann and Buchta (1998). Elles détectent MPVd, PSTVd, TCDVd et TPMVd. Des études *in silico* montrent que les isolats de PSTVd suivants peuvent ne pas être détectés à cause d'un mésappariement de l'amorce sur des positions critiques: AY372394, DQ308555, EF459698 pour l'amorce inverse. Si ces amorces ne permettent pas d'amplifier l'ARN, on peut recourir aux amorces Vid.

Amorces

3H1-F: 5´-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGC GAA C-3´ (nt 89–113)

2H1-R: 5´-CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG-3´ (nt 88–69)

Méthode 1 *(SuperScript One-Step RT-PCR avec Platinum Taq (Invitrogen))*

Pour chaque réaction, ajouter 1 µl de matrice d'ARN à 24 µl du mélange principal, qui est composé de 1,7 µl respectivement des amorces directe et inverse (15 µM), 12,5 µl de 2× Reaction Buffer, 0,5 µl de RT/Platinum Taq et 7,6 µl d'eau. Le programme du thermocycleur est le suivant: 43 °C pendant 30 min, 94 °C pendant 2 min, puis 10 cycles à 94 °C pendant 30 s, 68 °C pendant 90 s et 72 °C pendant 45 s, suivis de 20 cycles à 94 °C pendant 30 s, 64 °C pendant 90 s et 72 °C pendant 45 s, avec une extension finale à 72 °C pendant 10 min et à 20 °C pendant 1 min.

Méthode 2 *(RT-PCR en deux étapes)*

Avec la RT-PCR en deux étapes, la sensibilité de détection de PSTVd dans *S. tuberosum* atteint au moins 17 pg de PSTVd, soit la concentration la plus faible analysée, bien que cette sensibilité varie en fonction des laboratoires, la majorité d'entre eux détectant au moins 89 pg de PSTVd (Jeffries et James, 2005). Voir OEPP (2004) pour une description de la méthode 2.

Après l'amplification, les produits de la PCR (environ 360 pb) sont analysés par électrophorèse sur gel conformément à la description, et les amplicons de la PCR qui ont la taille correcte sont séquencés pour identifier les espèces de viroïdes.

Une analyse témoin interne fondée sur des amorces *nad5* (Menzel et al., 2002) a été mise en œuvre en association avec cette méthode dans une réaction séparée (simplex) (Seigner *et al*., 2008). Les amorces sont utilisées à une concentration finale de 0,2 µM. L'amplicon mesure 181 pb.

nad5 (directe): 5´-GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT-3´ (nt 968–987 et 1836–1838)

nad5 (inverse): 5´-CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA-3´ (nt 1973–1995)

3.3.4.2 Méthode RT-PCR en temps réel avec amorces de Boonham *et al*. (2004)

Les amorces et la sonde utilisées dans cette analyse sont celles décrites dans Boonham *et al*. (2004). Cependant, ni cette méthode ni aucune autre analyse en temps réel de la littérature ne permet d'identifier spécifiquement PSTVd. Si cette procédure de RT-PCR en temps réel donne un résultat positif, il convient d'identifier le viroïde à l'aide d'une RT-PCR classique suivie d'un séquençage.

L'analyse détecte PSTVd, MPVd, TCDVd et TPMVd. La sensibilité de détection de PSTVd dans les feuilles de *S. tuberosum* avec la méthode d'extraction au CTAB est d'au moins 17 pg de PSTVd, ce qui est la concentration la plus basse analysée (Jeffries et James, 2005). L'analyse de variantes de PSTVd et d'oligonucléotides de synthèse a montré que cette procédure détecte toutes les variantes séquentielles connues. Elles avaient été identifiées lors d'études *in silico* comme des mésappariements amorce-séquence susceptibles d'empêcher la détection (Boonham *et al.*, 2005). En revanche, il se peut que les isolats divergents VIR-06/7L et VIR-06/10L décrits récemment par Owens *et al.* (2009) ne soient pas détectés en raison de l'insertion d'une ou plusieurs bases supplémentaires sur le site de liaison de la sonde (W. Monger, communication personnelle, 2011)[1].

Amorces

PSTV-231-F: 5´-GCC CCC TTT GCGCTG T-3´ (nt 232–247)

PSTV-296-R: 5´-AAG CGG TTC TCG GGA GCT T-3´ (nt 297–279)

PSTV-251T: FAM-5´-CAG TTG TTT CCA CCG GGT AGTAGC CGA-3´ TAMRA (nt 278–252)

Les amorces COX ajoutées pour servir de témoins internes amplifient le gène *cytochrome oxidase* 1 présent dans les mitochondries des plantes (Weller *et al*., 2000).

COX-F: 5´-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3´

COX-R: 5´-CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR ACC TG-3´

COXsol-1511T: VIC-5´-AGG GCA TTC CAT CCA GCG TAA GCA-3´ TAMRA

Le mélange réactionnel est conçu pour une plaque 96 puits. Il s'agit d'une version modifiée de la méthode de l'OEPP (OEPP, 2004) qui incorpore une réaction multiplex (simultanée) pour détecter PSTVd et de COX ainsi qu'une réaction simplex pour détecter PSTVD (Roenhorst *et al.*, 2005).

Le mélange réactionnel est composé de 13,75 µl d'eau, 25 µl de 2× Master Mix (Applied Biosystems), 1,25 µl de 40× MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems), 1,5 µl respectivement des amorces PSTV-231-F et PSTV-296-R (10 µM) ainsi que 1,0 µl de sonde PSTV-251T (5 µM). Ce mélange est partagé équitablement en deux volumes de 22 µl, nommés A et B. On ajoute deux microlitres d'eau dans A, tandis que B reçoit 0,75 µl respectivement de chaque amorce COX (10 µM) ainsi que 0,5 µl de sonde COXsol-1511T (5 µM). A et B reçoivent chacun un microlitre d'ARN cible, amenant le volume du mélange réactionnel final à 25 µl dans chaque puits de la plaque. Le mélange réactionnel A détecte PSTVd tandis que le mélange réactionnel B détecte PSTVd et COX en mutiplex.

Les conditions de thermocyclage sont 48 °C pendant 30 min, 95 °C pendant 2 min et 40 cycles à 95 °C pendant 15 s et 60 °C pendant 1 min.

3.3.4.3 Méthode RT-PCR en temps réel (trousse PLANT PRINT Diagnòstics)

Les amorces et la sonde utilisées dans cette analyse sont celles décrites dans Bertolini *et al*. (2010) et sont disponibles sous forme de trousse auprès de PLANT PRINT Diagnòstics (référence PSTVd/100). Cette méthode permet de détecter CLVd, PSTVd et TCDVd. La totalité des 327 isolats de PSTVd présents dans la bibliothèque GenBank devraient être détectés dans la mesure où des études *in silico* montrent que l'ensemble des mésappariements amorce-séquence ont eu lieu sur des positions non critiques (N. Duran-Vila, communication personnelle, 2014).

Les données de validation sont présentées dans le Tableau 1.

Amorces

PSTVd-F: 5'-CCT TGG AAC CGC AGT TGG T-3' (nt 339–357)

PSTVd-R: 5'-TTT CCC CGG GGA TCC C-3' (nt 87–102)

PSTVdP: FAM-5'-TCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGA-3' TAMRA (nt 19–45)

[1] Au 1er mars 2010 (W. Monger, communication personnelle, 2011).

Le mélange PCR contient des amorces et la sonde sous forme lyophilisée (fournies dans la trousse) dans lesquelles on peut ajouter n'importe quel mélange principal pour RT-PCR du commerce. Pour chaque réaction, ajouter 3 µl d'ARN matrice à 9 µl du mélange PCR composé de 6 µl de tampon commercial 2× RT-PCR, 0,6 µl respectivement des amorces directe et inverse (10 µM), 0,36 µl de sonde TaqMan (5 µM), 0,5 µl de mélange d'enzymes 25× RT-PCR et 0,94 µl d'eau pour atteindre un volume de réaction final de 12 µl.

Les conditions de thermocyclage sont 45 °C pendant 10 min, 95 °C pendant 10 min et 40 cycles à 95 °C pendant 15 s et 60 °C pendant 1 min.

Pour cette méthode, on considère qu'un échantillon donne un résultat positif lorsqu'il produit une Ct < 40 et que les témoins négatifs aboutissent effectivement à un résultat négatif (pas d'amplification). Le résultat d'un échantillon est estimé négatif quand il produit une Ct ≥ 40 alors que les témoins positifs sont amplifiés.

3.4 Témoins des analyses moléculaires

Pour que les résultats de l'analyse soient jugés fiables, on devrait examiner des témoins appropriés – déterminés en fonction du type d'analyse et du niveau de certitude souhaité – pour chaque série d'isolement de l'acide nucléique et d'amplification de l'acide nucléique cible ou de l'organisme nuisible cible. Pour la RT-PCR, les témoins qui devraient être employés sont au minimum un acide nucléique servant de témoin positif, un témoin interne et un témoin négatif de l'amplification (témoin exempt de matrice «no template control»).

Acide nucléique témoin positif Ce témoin sert à surveiller l'efficacité de l'analyse (sauf pour ce qui touche à l'extraction). On peut faire appel à un acide nucléique du viroïde déjà préparé (entreposé), à l'ADN amplifié de tout le génome ou encore à un témoin de synthèse (par exemple un clone de produit de PCR) obtenu avec la même paire d'amorces que celle qui sert à la détection. On peut également inclure un témoin de la limite de détection (facultatif).

Témoin interne Pour les amplifications RT-PCR classique et en temps réel, un gène domestique végétal (housekeeping gene, HKG) comme COX ou NAD devrait être inclus dans le protocole de RT-PCR 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. Les amorces témoins internes devraient idéalement être mises en œuvre en multiplex avec les amorces pospiviroïdes/PSTVd. Il peut néanmoins s'avérer difficile d'y parvenir sans réduire la sensibilité de l'analyse du viroïde, c'est pourquoi il est recommandé, lorsque c'est faisable, d'effectuer d'une part une réaction multiplex incluant les amorces pospiviroïdes/PSTVd et les amorces HKG, d'autre part une réaction simplex avec uniquement les amorces pospiviroïdes/PSTVd.

Le *nad5* est un fragment du gène mitochondrial *NADH-déshydrogénase* 5 dont la fiabilité est attestée pour indiquer la performance de la procédure d'extraction et de l'étape de transcription inverse de la RT-PCR classique (Menzel *et al*., 2002). Il a été utilisé pour analyser de nombreuses espèces végétales, y compris *S. tuberosum* et d'autres espèces de *Solanum* (*S. bonariensis*, *S. dulcamara*, *S. jasminoides*, *S. nigrum*, *S. pseudocapsicum*, *S. rantonnetii* et *S. sisymbrifolium*), *Acnistus arborescens*, *Atropa belladonna*, *Brugmansia* spp., *Capsicum* spp., *Cestrum* spp., *Lochroma cyanea*, *Nicotiana* spp. et *Physalis* spp. (Seigner *et al*., 2008). Les amorces *nad5* contiennent un intron, si bien qu'elles n'amplifient pas l'ADN. L'ARN est amplifié après élimination de l'intron.

Même si COX a été employé comme témoin interne dans ce protocole, les amorces COX amplifient l'ARN et l'ADN. COX ne fournit donc qu'une indication de la qualité de l'ADN amplifiable et non de l'ARN seul, et ne sert pas de témoin de l'étape de transcription inverse.

Quand le protocole de PCR ne précise pas d'employer un témoin interne COX ou *nad5*, le laboratoire devrait choisir son témoin interne et le valider.

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 s'assurer que la quantité et la qualité de l'acide nucléique du viroïde cible extrait sont suffisantes pour la RT-PCR et que le viroïde cible est détectable. L'acide nucléique du viroïde est extrait à partir de tissu hôte infecté ou de tissu végétal sain dans lequel le viroïde a été inoculé.

Le témoin positif devrait correspondre approximativement à un dixième de la quantité de tissu foliaire utilisée par plant pour extraire l'ARN. 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'ARN, 2 mg de feuilles infectées + 198 mg de tissu de pomme de terre sain). S'il n'y a pas de détection, alors l'analyse devrait être répétée, ou le taux de groupage revu à la baisse jusqu'à l'obtention d'une détection fiable.

Pour l'amplification par RT-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 manière que cette séquence puisse être directement comparée à la séquence obtenue 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 comporte un acide nucléique extrait d'un tissu hôte sain puis amplifié. Il est recommandé d'avoir recours à plusieurs témoins lorsqu'on s'attend à un grand nombre d'échantillons positifs.

3.5 Interprétation des résultats des RT-PCR classique et en temps réel

3.5.1 Amplification par RT-PCR classique

La PCR spécifique au viroïde sera considérée comme valide si et seulement si:

- l'acide nucléique témoin positif génère un produit de la taille correcte correspondant au viroïde; et
- aucun amplicon de la taille correcte correspondant au viroïde n'a été produit dans les analyses du témoin négatif de l'extraction et du témoin négatif de l'amplification.

En cas d'emploi des amorces témoins internes COX et/ou *nad5*, le témoin négatif (tissu végétal sain) (le cas échéant), l'acide nucléique témoin positif et chacun des échantillons analysés doivent produire une bande de 181 pb (*nad5*). 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'étape de transcription inverse a échoué, que l'acide nucléique extrait contient des composés inhibant la PCR ou que l'acide nucléique est détérioré.

On estime qu'un échantillon est positif s'il produit un amplicon de la taille correcte. Pour l'identification des espèces de viroïdes, le produit de la PCR doit être séquencé.

3.5.2 Amplification par RT-PCR en temps réel

La RT-PCR en temps réel sera considérée valide si et seulement si:

- l'acide nucléique témoin positif génère une courbe d'amplification quand il réagit avec les amorces spécifiques au viroïde; et
- il n'y a aucune courbe d'amplification (soit une Ct égale à 40 ou une autre valeur seuil des cycles définie par le laboratoire après validation) pour le témoin négatif de l'extraction et le témoin négatif de l'amplification.

En cas d'emploi des amorces témoins internes COX et *nad5*, alors le témoin négatif (le cas échéant), l'acide nucléique témoin positif et chacun des échantillons analysés doivent produire une courbe d'amplification. Si les amorces témoins internes ne produisent pas de courbe d'amplification, 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'acide nucléique extrait contient des composés inhibant la PCR ou que l'acide nucléique est détérioré.

On estime qu'un échantillon est positif s'il produit une courbe d'amplification caractéristique. Des renseignements spécifiques sur les valeurs limites de Ct relatives aux deux méthodes sont fournis dans les sections 3.3.3.4 et 3.3.4.3.

4. Identification

PSTVd devrait être identifié par séquençage du produit des méthodes de RT-PCR classiques faisant appel aux amorces Shamloul ou Vid décrites dans les sections 3.3.4.1 et 3.3.3.3, respectivement, puis en recherchant une séquence concordante dans les bases de données publiques de séquences génétiques. Des experts dans l'analyse des séquences peuvent s'avérer nécessaires pour aider à l'identification. Si le produit de la PCR est peu amplifié ou si l'échantillon est infecté par plus d'un pospiviroïde, il peut être efficace de cloner ce produit pour obtenir une séquence.

Si une confirmation s'impose, l'échantillon positif détecté par RT-PCR en temps réel devrait être analysé à nouveau par RT-PCR classique en vue de permettre le séquençage et l'identification du produit. En effet, le séquençage direct du produit de la PCR en temps réel fournit des renseignements qui ne permettent pas de l'identifier avec fiabilité. Il permet de reconnaître le produit de la PCR comme viroïde, mais pas d'identifier son espèce ni de le différencier du témoin positif utilisé. Néanmoins, en raison de la sensibilité accrue de la RT-PCR en temps réel, la RT-PCR classique peut ne pas fournir de produit. Si les échantillons sont groupés, le fait d'analyser à nouveau les sous-échantillons de taille moindre pourrait accroître la fiabilité de l'amplification par RT-PCR classique. Autre solution: les échantillons peuvent être inoculés dans des plants de tomate afin d'amener la concentration du viroïde à des niveaux qu'une RT-PCR classique peut détecter. Cette approche n'a toutefois pas été évaluée et, si les résultats ne sont pas probants, il peut s'avérer nécessaire de renouveler l'échantillonnage et l'analyse.

4.1 Séquençage et analyse des séquences

L'analyse des séquences devrait être effectuée par une personne expérimentée. En cas d'absence d'installations permettant de réaliser le séquençage en interne, on devrait faire appel à une entreprise commerciale. Cette dernière devra spécifier ses exigences en matière de séquençage de produits de PCR. Le produit purifié (ainsi que les amorces directe et inverse, le cas échéant) est envoyé à l'entreprise pour effectuer le séquençage. Certaines entreprises peuvent également purifier le produit elles-mêmes, sur demande.

Si le séquençage a lieu en interne, des méthodes devraient être mises au point et respectées. Chacun brin du produit de la PCR devrait être séquencé, en faisant appel aux amorces ayant servi à la PCR. Les deux brins d'ADN séquencés séparément (grâce aux amorces directe et inverse) devraient être reliés dans un même contig, confirmant quelle base azotée (identité) se trouve sur chaque nucléotide. Il est préférable d'utiliser des assembleurs (par exemple Geneious, CLC Genomics Workbench ou le logiciel Lasergene) qui effectuent l'analyse à l'aide d'électrophérogrammes (fichiers de trace). Les mésappariements entre les deux brins devraient être codés en tant que bases équivoques dans la séquence obtenue. La séquence consensuelle ainsi établie (par comparaison des deux brins) peut alors être comparée aux séquences des pospiviroïdes conservées dans une base de données pertinente. En cas d'infection multiple, il se peut que le chromatogramme ne soit pas interprétable. Le produit de la PCR devrait alors être cloné et séquencé.

Il convient d'examiner l'alignement minutieusement pour les pospiviroïdes qui ne diffèrent que par quelques nucléotides, nuance qui peut se révéler critique pour identifier le viroïde comme un organisme nuisible réglementé ou non réglementé. Pour l'identification initiale de PSTVd, on peut conserver les

séquences des amorces (Shamloul ou Vid) dans la séquence consensuelle car ces amorces sont situées dans les parties les plus conservées du génome des viroïdes et il est peu probable qu'elles jouent sur l'identification. Les extrémités A produites par la polymérase pendant l'allongement doivent être éliminées, le cas échéant. Pour ce qui touche à l'identification, il est conseillé de faire appel à une séquence consensuelle qui débute à la première position du génome du viroïde à des fins de comparaison avec l'une des plus vastes bases de données de nucléotides. Cette recherche devrait être effectuée dans GenBank, base de données de nucléotides non redondante accessible sur le site web du National Centre for Biotechnology Information (NCBI), ou dans la European Nucleotide Archive sur le site web du Laboratoire européen de biologie moléculaire (LEBM) grâce à l'outil d'alignement BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). L'identification devrait par ailleurs s'appuyer sur l'outil d'association spécifique des concordances de BLAST (liens de parenté), présentées sous forme d'arborescence.

D'après l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), le principal critère d'identification des espèces est une concordance des séquences supérieure à 90 pour cent (Owens *et al*., 2011). Cependant, si la séquence obtenue concorde à près de 90 pour cent, on devrait tenir compte de paramètres supplémentaires, par exemple les propriétés biologiques. Le groupe de travail sur les viroïdes de l'ICTV (ICTV Viroid Study Group) débat actuellement de la classification des viroïdes et des critères de distinction des espèces.

Si une exactitude des séquences de 100 pour cent est requise, par exemple quand une séquence doit être comparée à une base de données ou quand on pense avoir affaire à une nouvelle espèce de viroïde, il est nécessaire d'effectuer une seconde PCR. Cette dernière porte sur la région des séquences d'amorce employées pour la première PCR ainsi que sur les bases équivoques à l'issue de cette première amplification. À cette fin, il peut s'avérer nécessaire de concevoir une nouvelle série d'amorces inspirées de la séquence de départ, mais les paires d'amorces Shamloul et Vid peuvent suffire.

5. Données à conserver

Les preuves et les données devraient être conservées 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 de la diagnose, en particulier dans les cas de non-conformité et lorsque PSTVd est identifié pour la première fois dans une zone, on devrait conserver les documents suivants de manière à assurer une traçabilité complète:

- l'échantillon original (s'il est encore disponible) devrait être conservé à − 80 °C ou être lyophilisé et conservé à température ambiante;
- le cas échéant, les extractions d'ARN devraient être conservées à − 80 °C;
- le cas échéant, les produits d'amplification par RT-PCR devraient être conservés entre − 20 °C et − 80 °C;
- les fichiers de trace des séquences d'ADN utilisés pour obtenir la séquence consensuelle permettant d'identifier les échantillons.

S'il est démontré que l'isolat possède des caractéristiques moléculaires ou biologiques différentes de celles des isolats conservés précédemment, il devrait être donné à une archive ou à une collection d'organismes nuisibles pour les végétaux reconnue (par exemple Q-bank [Comprehensive Database on Quarantine Plant Pests and Diseases] ou DSMZ [Leibniz Institute-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures]).

S'il existe des preuves indiquant qu'une des analyses décrites échoue à détecter un isolat de PSTVd, les détails concernant cet isolat (idéalement le numéro d'entrée GenBank) devraient être envoyés au Secrétariat de la CIPV.

6. Points de contact pour obtenir des renseignements complémentaires

Vous pouvez obtenir des renseignements complémentaires sur ce protocole en vous adressant à:

Science and Advice for Scottish Agriculture (SASA), Roddinglaw Road, Edinburgh EH12 9FJ, Écosse, Royaume-Uni (Dr C. J. Jeffries, courriel: colin.jeffries@sasa.gsi.gov.uk).

National Plant Protection Organization, PO Box 9102, 6700 HC Wageningen, Pays-Bas (Dr J.W. Roenhorst, courriel: j.w.roenhorst@nvwa.nl; Dr J. Th. J. Verhoeven, courriel: j.th.j.verhoeven@nvwa.nl).

Department of Environment and Primary Industries, Biosciences Research Division, AgriBio, 5 Ring Road, La Trobe University, Bundoora, Victoria 3083, Australie (Dr B. Rodoni, courriel: brendan.rodoni@depi.vic.gov.au).

Canadian Food Inspection Agency (CFIA), Charlottetown Laboratory, 93 Mt Edward Road, Charlottetown (Île-du-Prince-Édouard), C1A 5T1, Canada (Dr H. Xu, courriel: huimin.xu@inspection.gc.ca).

Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana, Centro de Proteccion Vegetal y Biotecnologia (IVIA), 46113 Moncada (Valence), Espagne (Dr N. Duran-Vila, courriel: duran_nur@gva.es).

USDA-APHIS, Plant Germplasm Quarantine Program BARC-E, BLD 580, Powder Mill Road, Beltsville (Maryland) 20705, États-Unis (Dr J. A. Abad, courriel: jorge.a.abad@aphis.usda.gov).

Laboratorios Biológicos, Dirección General de Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Millán 4703, Montevideo, Uruguay (Dr A. Etchevers, courriel: anitaetchevers@hotmail.com).

Une demande de révision d'un protocole de diagnostic peut aussi être présentée par les organisations nationales de protection des végétaux (ONPV), les organisations régionales de protection des végétaux (ORPV) ou les organes subsidiaires de la Commission des mesures sanitaires (CPM) au Secrétariat de la CIPV (ippc@fao.org) qui la renverra au Groupe technique sur les traitements phytosanitaires (TPPT).

7. Remerciements

La première ébauche de ce protocole a été rédigée par C. J. Jeffries (SASA, Royaume-Uni), J. W. Roenhorst (National Plant Protection Organization, Pays-Bas), B. Rodoni (Department of Environment and Primary Industries, Australie), H. Xu (CFIA, Canada), N. Duran-Vila (IVIA, Espagne), A. Etchevers (Laboratorios Biológicos, Uruguay) et J. A. Abad (USDA-APHIS, États-Unis) (voir section 6 pour les coordonnées). Par ailleurs, J. Th. J. Verhoeven (National Plant Protection Organization, Pays-Bas) a joué un rôle important dans l'élaboration du présent protocole.

Nous adressons nos remerciements à S. L. Nielsen (Danemark); L. Seigner, S. Winter et M. Wassenegger (Allemagne); H. Koenraadt (Pays-Bas); et A. Fox, T. James, W. Monger et V. Mulholland (Royaume-Uni) pour les commentaires utiles qu'ils ont formulés pendant l'élaboration de ce protocole.

8. Références

Le présent protocole de diagnostic fait également référence aux normes internationales pour les mesures phytosanitaires (NIMP). Les NIMP sont publiées sur le Portailinternational phytosanitaire, sur la page https://www.ippc.int/fr/core-activities/standards-setting/ispms/.

Badilla, R., Hammond, R., et Rivera, C. 1999. First report of Potato spindle tuber viroid in Costa Rica. *Plant Disease*, 83: 1072.

Bertolini, E., Cambra, M., Serra, P., López, M. M., Lopes, S., Durán-Vila, N., Ayres, J., et Bové, J. 2010. Procedimiento directo de detección específica de los viroides *Potato spindle tuber viroid* y *Citrus exocortis viroid* mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real y kit para su detección. Spanish Patent Nº 2,387.172.

Bertolini, E., Felipe, R. T. A., Sauer, A. V., Lopes, S., Arilla, A., Vidal, E., Mourão-Filho, F. A. A., Nunes, W. M. C., Bové, J. M., López, M. M., et Cambra, M. 2014a. Tissue-print and squash real-time polymerase chain reaction for direct detection of '*Candidatus* Liberibacter' species in citrus plants and psyllid vectors. *Plant Pathology*, doi:10,1111/ppa.12197.

Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., De Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J., et Cambra, M. 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 177-188.

Bertolini, E., Teresani, G. R., Loiseau, M., Tanaka, F. A. O., Barbé, S., Martínez, C., Gentit, P., López, M. M., et Cambra, M. 2014b. Transmission of '*Candidatus* Liberibacter solanacearum' in carrot seeds. *Plant Pathology*, doi:10,1111/ppa.12245.

Boonham, N., Fisher, T., et Mumford R. A. 2005. Investigating the specificity of real-time PCR assays using synthetic oligonucleotides. *Journal of Virological Methods*, 130: 30-35.

Boonham, N., González, L., Lilia Peralta, E., Blockley, A., Walsh, K., Barker, I., et Mumford, R. A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). *Journal of Virological Methods*, 116: 139-146.

Botermans, M., van de Vossenberg, B. T. L. H., Verhoeven, J. Th. J., Roenhorst, J. W., Hooftman, M., Dekter, R., et Meekes, E. T. M. 2013. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 187: 43-50.

CABI. (sans date). Invasive species compendium. Datasheet for Potato spindle tuber viroid. Walingford (Royaume-Uni), CABI. Document consultable à l'adresse suivante: http://www.cabi.org/isc/datasheet/43659 (dernière consultation: 18 août 2014).

De Bokx, J. A., et Pirone, P. G. 1981. Transmission of Potato spindle tuber viroid by aphids. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 87: 31-34.

EUPHRESCO. 2010. *Detection and epidemiology of pospiviroids (DEP)*. EUPHRESCO Final Report. York (Royaume-Uni), EUPHRESCO. Document consultable à l'adresse suivante: http://www.euphresco.org/downloadFile.cfm?id=536 (dernière consultation: 15 mai 2013).

Fernow, K. H. 1967. Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology*, 57: 1347-1352.

Fernow, K. H., Peterson, L. C., et Plaisted, R. L. 1970. Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected plants. *American Potato Journal*, 47: 75-80.

Galindo, J., Smith, D. R., et Diener, T. O. 1982. Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopathology*, 72: 49-54.

Grasmick, M. E., et Slack, S. A. 1985. Symptom expression enhanced and low concentrations of potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature. *Plant Disease*, 69: 49-51.

Hadidi, A., Mazyad, H. M., Madkour, M. A., et Bar-Joseph, M. 2003. Viroids in the Middle East. *In* A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles et J. Semancik (sous la direction de). *Viroids*, pp. 275-278. Melbourne (Australie), CSIRO Publishing. 392 pp.

Hailstones, D. L., Tesoriero, L. A., Terras, M. A., et Dephoff, C. 2003. Detection and eradication of *Potato spindle tuber viroid* in tomatoes in commercial production in New South Wales, Australia. *Australasian Plant Pathology*, 32: 317-318.

Hammond, R. W., et Owens, R. A. 2006. Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops. APSnet. St Paul, MN, American Phytopathological Society (APS). Document consultable à l'adresse suivante: http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Viroids.aspx (dernière consultation: 20 décembre 2012).

Jeffries, C. 1998. *Technical guidelines for the safe movement of germplasm.* No.19. Potato. Rome, FAO/IPGRI. 177 pp.

Jeffries, C., et James, C. 2005. Development of an EU protocol for the detection and diagnosis of *Potato spindle tuber pospiviroid. EPPO Bulletin (Bulletin OEPP)*, 35: 125-132.

Kryczynski, S., Paduch-cichal, E., et Skrzeczkowski, L. J. 1988. Transmission of three viroids by seed and pollen of tomato plants. *Journal of Phytopathology*, 121: 51-57.

Lebas, B. S. M., Clover, G. R. G., Ochoa-Corona, F. M., Elliott, D. R., Tang, Z., et Alexander, B. J. R. 2005. Distribution of *Potato spindle tuber viroid* in New Zealand glasshouse crops of capsicum and tomato. *Australian Plant Pathology*, 34: 129-133.

Ling, K. S., et Bledsoe, M. E. 2009. First report of Mexican papita viroid infecting greenhouse tomato in Canada. *Plant Disease*, 93: 839.

Mackenzie, D. J., McLean, M. A., Mukerji, S., et Green, M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81: 222-226.

Mackie, A. E., McKirdy, S. J., Rodoni, B., et Kumar, S. 2002. Potato spindle tuber viroid eradicated in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 31: 311-312.

Martinez-Soriano, J. P., Galindo-Alonso, J., Maroon, C. J. M., Yucel, I., Smith, D. R., et Diener, T. O. 1996. Mexican papita viroid: Putative ancestor of crop viroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 9397-9401.

Menzel, W., Jelkmann, W., et Maiss, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with co-amplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99: 81-92.

Mishra, M. D., Hammond, R. W., Owens, R. A., Smith, D. R., et Diener, T. O. 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology*, 72: 1781-1785.

Monger, W., Tomlinson, J., Boonham, N., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I., Molinero-Demilly, V., Tassus, X., Meekes, E., Toonen, M., et Papayiannis, L. 2010. Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 169: 207-210.

Murcia, N., Serra, P., Olmos, A., et Duran-Vila, N. 2009. A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*, 23: 95-102.

NAK (Service d'inspection générale des Pays-Bas). 2011. *Pospiviroid: Detection of pospiviroid in potato leaves by real-time RT-PCR.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, OEPP. Document consultable à l'adresse suivante: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (dernière consultation: 18 août 2014).

Naktuinbouw. 2012a. *Pospiviroid: Real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) for pospiviroids in leaves of horticultural crops.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, OEPP. Document consultable à l'adresse suivante: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (dernière consultation: 18 août 2014).

Naktuinbouw. 2012b. Potato spindle tuber viroid: *Real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) for* Potato spindle tuber viroid *(PSTVd) and/or* Tomato chlorotic dwarf viroid *(TCDVd) in leaf material of horticultural crops.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, OEPP. Document consultable à l'adresse suivante: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (dernière consultation: 18 août 2014).

Naktuinbouw. 2012c. Potato spindle tuber viroid: *Detection of* Potato spindle tuber viroid *(PSTVd) and/or* Tomato chlorotic dwarf viroid *(TCDVd) in tomato seed with real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR).* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, OEPP. Document consultable à l'adresse suivante: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (dernière consultation: 18 août 2014).

Navarro B, Silletti M. R, Trisciuzzi, V. N., et Di Serio, F. 2009. Characterization of Potato spindle tuber viroid infecting tomato in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 91: 723-726.

Nielsen, S. L., Enkegaard, A., Nicolaisen, M., Kryger, P., Marn, M. V., Pleško, I. M., Kahrer, A., et Gottsberger, R. A. 2012. No transmission of Potato spindle tuber viroid shown in experiments with thrips (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *European Journal of Plant Pathology*, 133: 505-509.

NPPO-NL (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013a. Pospiviroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and preliminary identification of pospiviroids (expect [sic] CLVd) by Pospi1-FW/Pospi1-RE. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, OEPP. Document consultable à l'adresse suivante: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (dernière consultation: 18 août 2014).

NPPO-NL (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013b. Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and identification of CLVd, PSTVd and TCDVd using primers Vid-FW/RE (Verhoeven *et al.* 2004). European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, OEPP. Document consultable à l'adresse suivante: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (dernière consultation: 18 août 2014).

NPPO-NL (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013c. Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR test for detection and identification of PSTVd, TCDVd, MPVd and TPMVd using primers 2H1/3H1 described by Shamoul *et al.* (1997). European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, OEPP. Document consultable à l'adresse suivante: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (dernière consultation: 18 août 2014).

NPPO-NL (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013d. *Pospiviroid: Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of Pospiviroids.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, OEPP. Document consultable à l'adresse suivante: http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method (dernière consultation: 18 août 2014).

OEPP (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/33. Potato spindle tuber viroid. *EPPO Bulletin (Bulletin OEPP).*

OEPP (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2006. Phytosanitary procedures. PM 3/21 (2). Post-entry quarantine for potato. *EPPO Bulletin (Bulletin OEPP),* 34: 443-454.

OEPP. (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2014. PM 7/98 (2) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin (Bulletin OEPP),* 44: 117-147.

OEPP/CABI (I. M. Smith, D. G. McNamara, P. R. Scott et M. Holderness (sous la direction de)). 1997. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn. Wallingford (Royaume-Uni), CABI. 1425 pp.

Owens, R. A., Flores, R., Di Serio, F., Li, S.-F., Pallas, V., Randles, J. W., Sano, T., et Vidalakis, G. 2011. Viroids. *In* A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens et E. J. Lefkowitz (sous la direction de). Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 1221-1234. London, Elsevier Academic Press. 1259 pp.

Owens, R. A., Girsova, N. V., Kromina, K. A., Lee, I. M., Mozhaeva, K. A., et Kastalyeva, T. B. 2009. Russian isolates of *Potato spindle tuber viroid* exhibit low sequence diversity. *Plant Disease*, 93: 752-759.

Querci, M., Owens, R. A., Bartolini, I., Lazarte, V., et Salazar, L. F. 1997. Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology*, 78: 1207-1211.

Reanwarakorn, K, Klinkong, S., et Porsoongnurn, J. 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. *New Disease Reports*, 24: 6.

Roenhorst, J. W., Jansen, C. C. C., Kox, L. F. F., De Haan, E. G., et Van den Bovenkamp, G. W. 2006. Real-time RT-PCR voor grootschalige toetsing van aardappel op het aardappelspindelknolviroïde. *Gewasbescherming*, 37: 198-203 (document en néerlandais).

Roenhorst, J. W., Jansen, C. C. C., Kox, L. F. F., de Haan, E. G., van den Bovenkamp, G. W., Boonham, N., Fisher, T., et Mumford, R. A. 2005. Application of real-time RT-PCR for large-scale testing of potato for Potato spindle tuber pospiviroid. *EPPO Bulletin (Bulletin OEPP)*, 35: 133-140.

Salazar, L. F., Querci, M., Bartolini, I., et Lazarte, V. 1995. Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia*, 30: 56-58.

Seigner, L., Kappen, M., Huber, C., Kistler, M., et Köhler, D. 2008. First trials for transmission of Potato spindle tuber viroid from ornamental Solanaceae to tomato using RT-PCR and an mRNA based internal positive control for detection. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115: 97-101.

Shamloul, A. M., Hadidi, A., Zhu, S. F., Singh, R. P., et Sagredo, B. 1997. Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 89-96.

Singh, R. P. 1970. Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *American Potato Journal*, 47: 225-227.

Singh, R. P. 1973. Experimental host range of the potato spindle tuber virus. *American Potato Journal*, 50: 111-123.

Singh, R. P., Boucher, A., et Somerville, T. H. 1992. Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease*, 76: 951-953.

Singh, R. P., Dilworth, A. D., Singh, M., et Babcock, K. M. 2006. An alkaline solution simplifies nucleic acid preparation for RT-PCR and infectivity assays of viroids from crude sap and spotted membrane. *Journal of Virological Methods*, 132: 204-211.

Singh, R. P., et Kurz, J. 1997. RT-PCR analysis of PSTVd aphid transmission in association with PLRV. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 418-424.

Singh, R. P., Nie, X., et Singh, M. 1999. Tomato chlorotic dwarf viroid: An evolutionary link in the origin of pospiviroids. *Journal of General Virology*, 80: 2823-2828.

Singh, R. P., Ready, K. F. M., et Nie, X. 2003. Viroids on solanaceous species. *In* A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles et J. Semancik (sous la direction de). *Viroids*, pp. 125-133. Melbourne (Australie), CSIRO Publishing. 392 pp.

Spieker, R. L. 1996. A viroid from *Brunfelsia undulata* closely related to the *Columnea* latent viroid. *Archives of Virology*, 141: 1823-1832.

Steyer, S., Olivier, T., Skelton, A., Nixon, T., et Hobden, E. 2010. *Columnea latent viroid* (CLVd): First report in tomato in France. *Plant Pathology*, 59: 794.

Van Brunschot, S. L., Verhoeven, J. Th. J., Persley, D. M., Geering, A. D. W., Drenth, A. , et Thomas, J. E. 2014. An outbreak of Potato spindle tuber viroid in tomato is linked to imported seed. *European Journal of Plant Pathology*, doi:10,1007/s10658-014-0379-8.

Verhoeven, J. Th. J. 2010. *Identification and epidemiology of pospiviroids.* Wageningen University, Wageningen (Pays-Bas). (Thèse) Document consultable à l'adresse suivante: http://edepot.wur.nl/137571 (dernière consultation: 20 décembre 2012).

Verhoeven, J. Th. J., Hüner, L., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I., et Roenhorst, J. W. 2010. Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveolens*, *Solanum jasminoides*, potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 128: 417-421.

Verhoeven, J. Th. J., Jansen, C. C. C., Willemen, T. M., Kox, L. F. F., Owens, R. A., et Roenhorst, J. W. 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 823-831.

Walter, B. 1987. Tomato apical stunt. *In* T. O. Diener (sous la direction de). *The viroids*, pp. 321-328. New York, Plenum Press. 365 pp.

Wassenegger, M., Heimes, S., et Sänger, H. L. 1994. An infectious viroid RNA replicon evolved from an *in vitro*-generated non-infectious viroid deletion mutant via a complementary deletion in vivo. *EMBO Journal*, 13: 6172-6177.

Weidemann, H. L., et Buchta, U. 1998. A simple and rapid method for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by RT-PCR. *Potato Research*, 41: 1-8.

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.

Tableau 1. Aperçu des protocoles utilisés pour détecter *Potato spindle tuber viroid* chez différents types de matériels hôtes et données de validation correspondantes

Matrice	Taille de l'échantillon	Préparation de l'échantillon	Extraction de l'acide nucléique	Méthode de détection	Remarques sur la validation
Feuilles de tomate	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 (m/v)) de tampon de lyse plus hormone de croissance avec Homex 6 (Bioreba)	RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) ou Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics) sur dispositif KingFisher 96 (Thermo Scientific)	Réaction en chaîne par polymérase et transcription inverse (RT-PCR) en temps réel: analyse GenPospi, Botermans *et al*. (2013)	***Limite de détection*:** détection de toutes les espèces de pospiviroïdes jusqu'au taux d'infection relatif[1] de 0,13 pour cent (soit une dilution de facteur 770) avec une certitude à 99,7 pour cent pour la dilution de feuilles de tomate infectées dans un plant de tomate sain ***Spécificité de l'analyse*:** haute spécificité à l'égard des espèces de pospiviroïdes ***Sélectivité*:** aucune influence des feuilles de tomate ***Répétabilité et reproductibilité*:** 100 pour cent (Naktuinbouw, 2012a; Botermans *et al*., 2013; NPPO-NL, 2013d)
Feuilles de tomate	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 (m/v)) de tampon de lyse plus hormone de croissance avec Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR en temps réel: Boonham *et al*. (2004)	***Limite de détection*:** détection jusqu'à une dilution de facteur 10 000 de feuilles de tomate infectées dans un plant de tomate sain ***Spécificité de l'analyse*:** détection de *Mexican papita viroid* (MPVd), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) et *Tomato planta macho viroid* (TPMVd) (certains isolats) ***Sélectivité*:** aucune influence des feuilles de tomate ***Répétabilité et reproductibilité*:** 100 pour cent (Naktuinbouw, 2012b)
Feuilles de tomate	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 (m/v)) de tampon de lyse plus hormone de croissance avec Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: amorces Pospi1-FW et Pospi1-RE, Verhoeven *et al*. (2004)	***Limite de détection*:** détection de toutes les espèces de pospiviroïdes (sauf *Columnea latent viroid* (CLVd)) jusqu'à un taux d'infection relatif de 2,5 pour cent pour la dilution de feuilles de tomate infectées dans un plant de tomate sain ***Spécificité de l'analyse*:** détection de *Hop latent viroid* (HpLVd, genre *Cocadviroid*) et PSTVd ***Sélectivité*:** aucune influence des feuilles de tomate ***Répétabilité et reproductibilité*:** 100 pour cent (NPPO-NL, 2013a)
Feuilles de tomate	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 (m/v)) de tampon de lyse plus hormone de croissance avec Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: amorces Vid-FW et Vid-RE, Verhoeven *et al*. (2004)	***Limite de détection***: détection de CLVd, *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) et TCDVd jusqu'à un taux d'infection relatif d'au moins 100 pour cent (10 pour cent pour CLVd*) pour la dilution de feuilles de tomate infectées dans un plant de tomate sain * Amorces conçues initialement pour détecter CLVd en complément des amorces de RT-PCR Pospi1-FW/Pospi1-RE (Verhoeven *et al*., 2004) ***Spécificité de l'analyse*:** détection de CLVd, PSTVd et TCDVd ***Sélectivité*:** aucune influence des feuilles de tomate ***Répétabilité et reproductibilité*:** 100 pour cent (NPPO-NL, 2013b)
Feuilles de tomate	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 (m/v)) de tampon de lyse plus hormone de croissance avec Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: Shamloul *et al*. (1997)	***Limite de détection*:** détection jusqu'à un taux d'infection relatif d'au moins 10 pour cent pour la dilution de feuilles de tomate infectées dans un plant de tomate sain ***Spécificité de l'analyse*:** détection de MPVd, PSTVd, TCDVd, TPMVd (certains isolats) ***Sélectivité*:** aucune influence des feuilles de tomate ***Répétabilité et reproductibilité*:** 100 pour cent (NPPO-NL, 2013c)

Matrice	Taille de l'échantillon	Préparation de l'échantillon	Extraction de l'acide nucléique	Méthode de détection	Remarques sur la validation
Semences de tomate	3 000 semen-ces (analysées en trois lots de 1 000)	20 ml (1:2–1:5 (m/v)) de tampon de lyse plus hormone de croissance avec BagMixer (Interscience)	Sbeadex maxi plant kit sur dispositif KingFisher 96	RT-PCR en temps réel: Boonham *et al* .(2004)	Caractéristiques de performance identiques à celles de l'analyse des feuilles de tomate La probabilité de détection d'une semence infectée dans un échantillon de 1 000 est supérieure à 95 pour cent quand on analyse trois lots de 1 000 semences chacun. Grâce à une rapide contamination croisée par PSTVd entre les fruits infectés et les semences saines pendant le traitement des semences (par fermentation et pectinase), il est très probable que davantage de semences contaminées soient présentes dans un échantillon (Naktuinbouw, 2012c).
Feuilles de pomme de terre (croissance en pépinière) et plants de pomme de terre cultivés *in vitro*	200 mg	20 µL de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 10 pour cent, 180 µL de tampon d'extraction LiCl et 400 µL de phénol–chloroforme avec mortier et pilon	Extraction au phénol-chloroforme et au polyéthylène glycol (PEG) en deux étapes	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide «aller-retour» (R-PAGE)[2]	***Limite de détection:*** 2 465 pg de PSTVd; il s'agit de la méthode la moins sensible de toutes les méthodes moléculaires évaluées lors d'une analyse circulaire internationale ***Spécificité de l'analyse*:** détection de tous les pospiviroïdes connus ***Sélectivité*:** aucune influence de la variété de la pomme de terre, de l'utilisation de feuilles de pomme de terre ou de plants *in vitro* ***Répétabilité et reproductibilité*:** reproductibilité égale à 51 pour cent à 87 893 pg de PSTVd (la plus forte concentration de PSTVd analysée) et 42 pour cent à la limite de détection
Feuilles de pomme de terre (croissance en pépinière) et plants de pomme de terre cultivés *in vitro*	200 mg	de tampon Ames dilué 1:1,5 (m/v) (OEPP, 2004) avec mortier et pilon	Immobilisation sur membrane (Agdia, Inc.) et extraction au phénol-chloroforme et au PEG en deux étapes	Sonde marquée à la dioxygénine (DIG)[2]	***Limite de détection:*** au moins 17 pg de PSTVd (concentration la plus faible analysée) ***Spécificité de l'analyse:*** détection de tous les pospiviroïdes connus ***Sélectivité*:** aucune influence de la variété de la pomme de terre, de l'utilisation de feuilles de pomme de terre ou de plants *in vitro* ***Répétabilité et reproductibilité*:** reproductibilité égale à 100 pour cent à 87 893 pg de PSTVd et 23 pour cent à 17 pg
Feuilles de pomme de terre (croissance en pépinière) et plants de pomme de terre cultivés *in vitro*	50–500 mg	tampon RH (Qiagen) dilué 1:9 (m/v) avec tube à microcentrifugeuse et micropilon ou Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR classique en deux étapes[2] avec amorces de Shamloul *et al*. (1997)	***Limite de détection:*** au moins 17 pg de PSTVd ***Spécificité de l'analyse*:** détection de MPVd, PSTVd, TCDVd et TPMVd ***Sélectivité*:** aucune influence de la variété de la pomme de terre, de l'utilisation de feuilles de pomme de terre ou de plants *in vitro* ***Répétabilité et reproductibilité*:** reproductibilité égale à 78 pour cent à 87 893 pg de PSTVd (la plus forte concentration de PSTVd analysée) et 44 pour cent à 17 pg de PSTVd

Matrice	Taille de l'échantillon	Préparation de l'échantillon	Extraction de l'acide nucléique	Méthode de détection	Remarques sur la validation
Feuilles de pomme de terre (croissance en pépinière) et plants de pomme de terre cultivés *in vitro*	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 (m/v)) de tampon de lyse plus hormone de croissance avec Homex 6	Sbeadex maxi plant kit sur dispositif KingFisher 96	RT-PCR en temps réel: analyse GenPospi, Botermans *et al*. (2013)	Caractéristiques de performance identiques à celles de l'analyse des feuilles de tomate ***Spécificité de l'analyse*:** aucune réaction croisée avec les virus généralement présents chez la pomme de terre ***Sélectivité*:** aucune influence des feuilles de pomme de terre ou des plants *in vitro* Méthode validée pour des taux de groupage allant jusqu'à 100 (100 pour cent de détection dans un échantillon comprenant 1 feuille infectée pour 99 saines; NAK, 2011)
Feuilles de pomme de terre (croissance en pépinière), plants et tubercules de pomme de terre cultivés *in vitro*	1,5 g de feuilles ou 5 g de tubercules	Environ 600 µl de tampon pour les feuilles, ou environ 3 ml de tampon pour les tubercules (choix du tampon en fonction de la méthode retenue pour l'extraction)	RNeasy Plant Mini Kit, extraction au bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) ou Purescript RNA isolation kit (Gentra Systems; cette trousse n'est plus disponible.)	RT-PCR en temps réel: Boonham *et al*. (2004)	***Limite de détection**:* détection jusqu'à une dilution de facteur 10 000 de tissus de tomate infectés dans un tissu sain ***Spécificité de l'analyse*:** détection de MPVd, PSTVd, TCDVd, TPMVd (certains isolats); aucune réaction croisée avec les virus généralement présents chez la pomme de terre ***Sélectivité*:** aucune influence de l'utilisation de feuilles de pomme de terre, de plants ou de tubercules *in vitro* ***Répétabilité et reproductibilité*:** 100 pour cent (analyse circulaire entre quatre laboratoires) Méthode validée pour des taux de groupage allant jusqu'à 100 (100 pour cent de détection dans un échantillon comprenant 1 feuille infectée pour 99 saines; Roenhorst *et al*., 2005, 2006)
Espèces de plantes ornementales (feuilles)	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 (m/v)) de tampon de lyse plus hormone de croissance avec Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit ou Sbeadex maxi plant kit sur dispositif KingFisher 96	RT-PCR en temps réel: analyse GenPospi, Botermans *et al*. (2013)	Caractéristiques de performance identiques à celles de l'analyse des feuilles de tomate ***Sensibilité de l'analyse:*** la concentration de pospiviroïdes et la sélectivité (composés inhibiteurs) dans la sève des feuilles dépendent des espèces végétales Méthode validée pour des taux de groupage allant jusqu'à 25 pour *Brugmansia*, *Calibrachoa*, *Cestrum*, *Dahlia*, *Nematanthus, Petunia, Solanum jasminoides* et *Streptosolen jamesonii*. Il faut noter que chez *Calibrachoa*, *S. jasminoides* et *S. jamesonii,* on a observé une influence de la matrice pour des dilutions supérieures à 100. Chez certains végétaux cultivés, comme *Dahlia*, seule la période estivale semble convenir pour obtenir des résultats d'analyse fiables (Naktuinbouw, 2012a).
Espèces de plantes ornementales (feuilles)	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 (m/v)) de tampon de lyse plus hormone de croissance avec Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit ou Sbeadex maxi plant kit sur dispositif KingFisher 96	RT-PCR en temps réel: Boonham *et al*. (2004)	Caractéristiques de performance identiques à celles de l'analyse des feuilles de tomate ***Sensibilité de l'analyse:*** la concentration de pospiviroïdes et la sélectivité (composés inhibiteurs) dans la sève des feuilles dépendent des espèces végétales Méthode validée pour des taux de groupage allant jusqu'à 25 pour *Brugmansia*, *Calibrachoa*, *Dahlia*, *Petunia, S. jasminoides* et *S. jamesonii*. Il faut noter que chez *Calibrachoa*, *S. jasminoides* et *S. jamesonii,* on a observé une influence de la matrice pour des dilutions supérieures à 100. Chez certains végétaux cultivés, comme *Dahlia*, seule la période estivale semble convenir pour obtenir des résultats d'analyse fiables (Naktuinbouw, 2012b).

Matrice	Taille de l'échantillon	Préparation de l'échantillon	Extraction de l'acide nucléique	Méthode de détection	Remarques sur la validation
Feuilles de tomate, feuilles, tubercules et semences de pomme de terre, et espèces de plantes ornementales (feuilles)	1 g de feuilles, de tubercules de pomme de terre ou d'empreinte de feuilles sur membranes en nylon	10 ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS) (1:1 (m/v)) avec Homex 6	Méthodes directes (empreinte de tissu), RNeasy Plant Mini Kit ou PowerPlant RNA Isolation Kit (Mo Bio)	RT-PCR en temps réel: Bertolini *et al*. (2010)	***Limite de détection:*** détection jusqu'à une dilution de facteur 10 000 de feuilles de *S. jasminoides* infectées dans des feuilles saines de *S. jasminoides* et chez la tomate ***Spécificité de l'analyse*:** détection de CLVd, PSTVd et TCDVd ***Sélectivité*:** aucune influence de l'utilisation de feuilles ou de tubercules de pomme de terre ou de semences de tomate ***Répétabilité et reproductibilité*:** 100 pour cent (analyse circulaire entre trois laboratoires) La sensibilité du diagnostic atteint 100 pour cent, tout comme la spécificité du diagnostic et la précision relative par rapport à la méthode d'hybridation moléculaire (Murcia *et al*., 2009). L'analyse a été validée à partir de 208 échantillons cultivés en champ de *S. jasminoides*, *Brugmansia* spp., *Datura* spp., *Petunia* spp., *Dendrathema* spp., de pomme de terre et de tomate. Sur ces 208 échantillons, les deux techniques ont détecté 43 vrais positifs et 150 vrais négatifs. Des faux positifs ont été détectés sur 15 échantillons du fait d'hybridations avec ce qui s'est avéré être *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) et *Citrus exocortis viroid* (CEVd). Il n'y a eu aucun faux négatif.

[1] La concentration de viroïde dans le matériel d'analyse original n'étant pas connue, pour certaines analyses la limite de détection (sensibilité) est exprimée par une valeur relative. On considère que la sève de feuille infectée non diluée est infectée à 100 pour cent (au ratio 1 g de matériel foliaire pour 3 ml de tampon). La limite de détection relative a été déterminée en analysant huit dilutions successives de sève de feuille infectée dans de la sève de feuille saine. La limite de détection relative est définie comme la moyenne des taux d'infection relatifs les plus bas détectables obtenus respectivement pour chaque isolat (valeur seuil des cycles (Ct) < 32), à laquelle on ajoute trois écarts-types pour obtenir une mesure prudente avec une certitude de 99,7 pour cent (Botermans *et al*., 2013).

[2] Les trois méthodes, R-PAGE, sonde DIG et RT-PCR classique en deux étapes faisant appel aux amorces de Shamloul *et al*. (1997), ont été comparées dans le cadre d'une analyse circulaire internationale (Jeffries et James, 2005).

Étapes de la publication

Ce récapitulatif ne fait pas officiellement partie de la norme.

2007-03 À sa deuxième session, la CPM ajoute le thème au programme de travail (2006-002).

2012-11 Le TPDP révise le projet de protocole.

2013-03 Le CN approuve la consultation des membres par voie électronique (2013_eSC_May_10).

2013-07 Consultation des membres.

2014-07 Le TPDP examine le projet de protocole.

2014-09 Par voie électronique, le TPDP approuve le renvoi du projet au CN pour que celui-ci en approuve la présentation pour adoption (2014_eTPDP_September_01).

2014-11 Le CN approuve la période de notification du PD par voie électronique (2014_eSC_Nov_13).

2014-12 Période de notification.

2015-01 Le CN adopte le PD au nom de la CMP (aucune objection formelle n'est soulevée).

NIMP 27. **Annexe 7** *Viroïde des tubercules fusiformes de la pomme de terre* (2016). Rome, CIPV, FAO.

2015-07 Le Secrétariat de la CIPV apporte des modifications de forme et refait la mise en page des normes conformément à la procédure relative à la révocation de normes approuvée par la CMP à sa dixième session (2015).

2016-05 Le CN adopte la révision technique de ce PD au sujet de la séquence de l'amorce COX-F à usage de témoin interne, conformément à la référence scientifique indiquée (Weller *et al*. 2000) (section «3.3.4.2 Méthode RT-PCR en temps réel avec amorces de Boonham *et al.* (2004)») (2016_eSC_May_15). Le GTPD a pris note de ce que les deux séquences – celle de la précédente version du PD et celle rectifiée selon Weller *et al*. 2000 – fonctionnent.

2020-02 Le Secrétariat de la CIPV remplace le titre en Anglais avec sa correcte version en Français.

Dernière mise à jour des étapes de la publication: 2020-02

Cette page est intentionnellement laissée vierge

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