



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



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

NORMES INTERNATIONALES POUR LES MESURES PHYTOSANITAIRES 27

PROTOCOLES DE DIAGNOSTIC

NIMP 27
ANNEXE 14

FRE

PD 14: *Xanthomonas* *fragariae*

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

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 août 2016.

Cette annexe constitue une partie prescriptive de la NIMP 27.

NIMP 27

Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés

PD 14: *Xanthomonas fragariae*

Adopté en 2016; publié en 2017

TABLE DES MATIÈRES

1.	Informations relatives à l'organisme nuisible	3
2.	Données taxinomiques	3
3.	Détection	3
3.1	Symptômes	4
3.2	Échantillonnage	5
3.3	Préparation des échantillons	5
3.4	Tests de dépistage rapide	6
3.5	Isolement.....	6
3.5.1	Méthode d'isolement n° 1	6
3.5.2	Méthode d'isolement n° 2	6
3.5.3	Interprétation des résultats de l'isolement	7
3.6	Essai sur feuilles détachées et enrichissement biologique	7
3.6.1	Essai sur feuilles détachées.....	7
3.6.2	Interprétation des résultats de l'essai sur feuilles détachées	8
3.6.3	Enrichissement <i>in planta</i> et isolement	8
3.6.4	PCR <i>in vitro</i> après enrichissement à partir de l'essai sur feuilles détachées	8
3.7	ELISA.....	8
3.7.1	ELISA indirect.....	9
3.7.2	DAS-ELISA.....	9
3.7.3	Interprétation des résultats du test ELISA	9
3.8	Immunofluorescence.....	10
3.8.1	Interprétation des résultats de l'analyse par immunofluorescence	10
3.9	PCR.....	11
3.9.1	Extraction de l'ADN.....	11
3.9.2	PCR multiplex	12
3.9.2.1	Protocole de Hartung et Pooler (1997)	12
3.9.3	PCR nichée	12
3.9.3.1	Protocole de Moltmann et Zimmerman (2005)	13
3.9.3.2	Protocole de Roberts <i>et al.</i> (1996)	13

3.9.4	PCR en temps réel.....	14
3.9.4.1	Protocole de Weller <i>et al.</i> (2007).....	14
3.9.5	Interprétation des résultats de la PCR.....	14
3.9.5.1	PCR classique	14
3.9.5.2	PCR en temps réel.....	15
3.9.6	Témoins des analyses moléculaires	15
4.	Identification	16
4.1	Analyses biochimiques et physiologiques	16
4.1.1	Profil des esters méthyliques d'acides gras	19
4.1.1.1	Interprétation des résultats du profil des EMAG	19
4.2	Analyses sérologiques.....	19
4.2.1	Immunofluorescence.....	19
4.2.2	ELISA	20
4.3	Analyses moléculaires	20
4.3.1	PCR.....	20
4.3.2	PCR.....	20
4.3.2.1	Interprétation des résultats de la rep-PCR	20
4.3.3	Méthode MLSA	21
4.4	Analyses de la pathogénicité.....	21
4.4.1	Procédure d'inoculation générale	21
4.4.1.1	Interprétation des résultats d'analyse de la pathogénicité.....	21
4.4.2	Réaction d'hypersensibilité.....	22
4.4.2.1	Interprétation des résultats de l'essai de réaction d'hypersensibilité	22
5.	Données à conserver.....	22
6.	Points de contact pour tout complément d'informations.....	22
7.	Remerciements	23
8.	Références	23
9	Figures.....	27

1. Informations relatives à l'organisme nuisible

Xanthomonas fragariae Kennedy et King, 1962 est le pathogène responsable des taches angulaires, maladie bactérienne qui touche les feuilles du fraisier. Cette maladie est surtout présente en Amérique du Nord et a été signalée pour la première fois aux États-Unis en 1962 (Kennedy et King, 1962; Hildebrand *et al.*, 1967; Maas *et al.*, 1995), avant d'être observée dans de nombreuses zones de culture du fraisier dans d'autres régions du monde, notamment en Amérique du Sud et en Europe (CAB International). *Fragaria* × *ananassa* est le fraisier le plus cultivé et l'hôte principal de *X. fragariae*. Les cultivars commerciaux sont susceptibles à des degrés divers d'être hôtes, et d'autres espèces du genre *Fragaria*, notamment *F. chiloensis*, *F. virginiana* et *F. vesca*, ainsi que *Potentilla fruticosa* et *P. glandulosa*, peuvent aussi être infectées. Parmi les espèces de *Fragaria*, seule *F. moschata* est immune (Kennedy et King, 1962; Kennedy, 1965; Maas, 1998).

X. fragariae se propage rapidement par le biais de matériel végétal de plantation ne présentant pas de symptômes mais porteur d'une infection latente. Les sources d'inoculum pour les infections primaires sont des plantes filles infectées sans symptômes visibles issues de stolons de plantes de pépinière infectées, qui sont utilisées pour la production de fraises en champ. *X. fragariae* ne survit pas librement dans le sol, mais peut y hiverner dans du matériel végétal déjà infecté et s'y maintenir pendant longtemps (Maas, 1998). Les résidus de feuilles infectées et les infections de la couronne sur les stolons utilisés pour la plantation constituent aussi des sources d'inoculum pour les infections primaires.

Des analyses de souches de *X. fragariae* isolées à divers moments et dans différentes régions du monde ont mis en évidence une certaine diversité génétique et phénotypique au sein de l'espèce (Opgenorth *et al.*, 1996; Pooler *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 1996). De plus, Maas *et al.* (2000) ont relevé des différences de pathogénicité d'une souche de *X. fragariae* à l'autre. Cela étant, les souches phytopathogènes de cette bactérie sont très similaires, et aucune corrélation n'a été établie entre origine géographique et géotypes ou phénotypes. Les souches de *X. fragariae* actuellement connues à l'échelle internationale constituent donc probablement une population clonale. La détection précoce de *X. fragariae* dans des fraisiers de plantation infectés mais ne présentant pas de symptômes est cruciale pour empêcher la dissémination du pathogène et le développement de la maladie.

2. Données taxinomiques

Nom:	<i>Xanthomonas fragariae</i> Kennedy et King, 1962
Synonymes:	Aucun
Classement taxinomique:	Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Xanthomonadales, Xanthomonadaceae
Noms communs:	Tache(s) angulaire(s) du fraisier, <i>bacterial angular leaf spot</i>

Remarque: *Xanthomonas fragariae* Kennedy et King, 1962 appartient à la subdivision gamma du groupe des protéobactéries (Stackebrandt *et al.*, 1988), au phénon 3 établi par Van den Mooter et Swings (1990), au 1^{er} groupe d'homologie ADN-ADN de Rademaker *et al.* (2000) et au 1^{er} groupe génétique de Rademaker *et al.* (2005).

3. Détection

La diagnose de la maladie bactérienne des taches angulaires du fraisier causée par *X. fragariae* repose sur la recherche des symptômes diagnostiques, l'isolement direct ou indirect du pathogène, des analyses sérologiques (par exemple immunofluorescence indirecte ou dosage immunoenzymatique ELISA) et des méthodes moléculaires. Plusieurs essais de détection fondés sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) visant divers loci du génome de *X. fragariae* ont été mis au point (Roberts *et al.*, 1996; Zimmerman

et al., 2004; Weller *et al.*, 2007; Vandroemme *et al.*, 2008; Turechek *et al.*, 2008; Vermunt et van Beuningen, 2008). Ces essais peuvent servir à confirmer la présence de *X. fragariae* dans du matériel végétal symptomatique, et plusieurs d'entre eux ont également été employés pour détecter les infections latentes dues à cette bactérie (Mahuku et Goodwin, 1997; Zimmerman *et al.*, 2004; Moltman et Zimmerman, 2005). L'essai sur feuilles détachées élaboré par Civerolo *et al.* (1997a) permet d'établir un diagnostic présomptif de *X. fragariae* lorsque l'isolement direct est très lent ou inhibé. Les méthodes décrites dans le présent protocole de diagnostic ont été validées par une étude de performance financée par l'Union européenne (projet SMT-4-CT98-2252), à l'exception de la PCR nichée (López *et al.*, 2005).

Il est difficile d'isoler directement *X. fragariae*, même quand on observe des symptômes typiques et des exsudats bactériens, car la bactérie croît très lentement sur les milieux nutritifs artificiels et qu'elle est facilement supplantée par des bactéries saprophytes (Hazel et Civerolo 1980; López, *et al.*, 1985; Schaad *et al.*, 2001; Saddler et Bradbury, 2005). Des procédures spécifiques d'isolement direct de *X. fragariae* sont indiquées dans López *et al.* (2005). L'isolement *in vitro* de *X. fragariae* peut être favorisé par un enrichissement sélectif du pathogène réalisé *in planta* en inoculant des extraits aqueux de tissus malades ou soupçonnés d'être infectés à des feuilles de fraisier détachées (Civerolo *et al.*, 1997a).

Les procédures de détection de *X. fragariae* dans les plantes symptomatiques et asymptomatiques sont présentées ci-dessous.

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

3.1 Symptômes

En premier lieu, de petites taches angulaires (lésions) de 1 à 4 mm, saturées d'eau et entourées par les plus petites nervures apparaissent sur la face inférieure des feuilles. Dans les stades primaires de l'infection, ces taches sont à peine visibles sur le terrain et paraissent jaune translucide lorsqu'elles sont observées à travers un dispositif à lumière transmise. Ces lésions s'agrandissent, fusionnent et deviennent visibles sur la face supérieure des feuilles, où elles ont l'apparence de taches angulaires humides qui virent à l'ocre rouge (Figure 1). Elles produisent un exsudat bactérien visqueux allant du blanc au jaune en passant par des teintes laiteuses ou crémeuses, lorsque le temps est humide ou quand l'humidité relative est élevée (Figure 2). Cet exsudat évolue ensuite en amas d'écailles sèches opaques d'abord d'aspect blanchâtre ou argenté puis virant au brun (Janse, 2005). Quand la maladie progresse, les lésions de couleur ocre rouge fusionnées deviennent nécrotiques. Le tissu des lésions nécrotiques peut déchirer ou briser la feuille, et les feuilles malades peuvent sembler brûlées ou mitées. Les infections des feuilles provoquent et forment souvent des lésions le long des principales nervures. Dans les stades avancés de la maladie, le tissu foliaire qui entoure les lésions fusionnées anciennes de couleur ocre rouge est généralement chlorosé (Kennedy et King, 1962; OEPP, 1997; Rat, 1993; Maas, 1998).

Contrairement à la maladie des taches angulaires, la maladie bactérienne des feuilles de fraisier causée par *X. arboricola* pv. *fragariae* se manifeste par de petites lésions ocre rouge sur la face inférieure de la feuille qui ne sont ni saturées d'eau, ni translucides, des taches rougeâtres sur la face supérieure des feuilles, une fusion des lésions, lesquelles viennent à former de larges taches brunes sèches entourées d'un halo chlorosé, et de grandes lésions en forme de V sur les bords des feuilles et les nervures principales, dont la nervure centrale (Janse *et al.*, 2001). En outre, les lésions de la maladie bactérienne des feuilles ne produisent pas d'exsudat bactérien (Janse *et al.*, 2001). Lorsque la maladie des taches angulaires est à un stade avancé, elle

est difficile à distinguer des taches foliaires d'origine fongique telles que la tache commune (*Mycosphaerella fragariae*) et la tache pourpre (*Diplocarpon earliana*) (Janse *et al.*, 2001).

En cas d'infection sévère, *X. fragariae* peut se propager des feuilles à la couronne, où apparaissent alors nettement des régions saturées d'eau (Hildebrand *et al.*, 1967). Si la couronne est gravement infectée, la plante peut s'étioler, voire dépérir et finir par mourir. Les feuilles qui naissent sur des couronnes infectées sont souvent infectées par voie systémique, et des lésions s'y forment le long des nervures basales. Les amas vasculaires peuvent sécréter un exsudat bactérien quand la couronne est coupée transversalement.

Dans les cas graves, *X. fragariae* peut attaquer les fleurs et les «brûler», mais elle n'infecte jamais directement les fruits (Gubler *et al.*, 1999). Sur les tissus infectés du calice apparaissent des lésions saturées d'eau qui ressemblent aux lésions foliaires (Figure 3). Quand le calice est gravement infecté, les tissus des fruits situés à proximité peuvent aussi devenir humides.

X. fragariae peut se propager par voie systémique dans les racines, les couronnes et les stolons sans y causer de symptômes manifestes (Stefani *et al.*, 1989; Milholland *et al.*, 1996; Mahuku et Goodwin, 1997). Cette propagation de l'infection peut être trahie par un aspect humide à la base des nouvelles pousses de feuilles et entraîner très vite un rabougrissement soudain, puis la mort de la plante. Ce type d'infection est rare.

3.2 Échantillonnage

Quand les plantes accusent des symptômes, on utilise idéalement les feuilles qui présentent des taches saturées d'eau au premier stade pour diagnostiquer la maladie des taches angulaires, car ce matériel végétal permet d'isoler *X. fragariae*. On peut aussi analyser des feuilles dont les taches ont séché, avec ou sans exsudat. Les tissus de la couronne devraient également être examinés.

X. fragariae est une bactérie à croissance très lente, c'est pourquoi les essais sérologiques et les cultures par ensemencement de plaques ne permettent pas de détecter les populations infectieuses limitées sur des plantes asymptomatiques. Quand les plantes ne présentent pas de symptômes, il est recommandé de sélectionner plusieurs plantes entières et d'exciser de petites quantités de tissu sur les feuilles, les pétioles et les couronnes (OEPP, 2006). On peut analyser ces tissus directement par PCR, comme indiqué à la section 3.9.

Une fois prélevés, les échantillons ne devraient pas être conservés dans un environnement humide. Ils devraient de préférence être séchés partiellement, emballés dans du papier, placés dans des sacs en polyéthylène et conservés au frais. Les échantillons devraient être transportés dans des récipients bien isolés, stockés à 4 °C une fois à destination et analysés dès que possible.

3.3 Préparation des échantillons

Quand les plantes sont symptomatiques, on peut désinfecter la surface des feuilles et de la tige en l'essuyant avec de l'éthanol à 70 %. Si les plantes présentent des symptômes vasculaires, il est recommandé de retirer les racines et les feuilles et de conserver la couronne et les pétioles. Rincer l'échantillon à l'eau du robinet afin d'éliminer les restes de terre, désinfecter par immersion dans de l'éthanol à 70 % pendant 1 min, puis rincer trois fois à l'eau distillée stérile. Pour chaque échantillon, placer environ 0,1 g de tissu issu des feuilles ou de la couronne et des pétioles dans 9 ml de tampon phosphate salin (PBS) (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 2,9 g de Na₂HPO₄·12H₂O, 0,2 g de KH₂PO₄, compléter par de l'eau distillée jusqu'à obtention de 1 litre; pH 7,2). Homogénéiser cette suspension de tissus végétaux et incuber à température ambiante pendant 15 min.

Quand les plantes sont asymptomatiques, prélever un échantillon de 30 g de manière aléatoire, le placer dans 150 ml de PBS et agiter pendant 30 min. On peut soit utiliser directement le liquide de lavage pour la détection, soit le centrifuger à 10 000 g pendant 10 min puis disperser à nouveau le culot dans de l'eau distillée de manière à obtenir un volume final de 5 ml. Laisser décanter la suspension pendant 15 min,

prélever la phase supérieure limpide et la diluer à 1:10 et 1:100 dans de l'eau distillée stérile (OEPP, 2006). Ces macérats de tissus des échantillons sont ensuite analysés par ELISA, immunofluorescence et PCR.

3.4 Tests de dépistage rapide

Les tests de dépistage rapide facilitent la détection de *X. fragariae*. Étant donné que la bactérie est très difficile à isoler, sa présence devrait être confirmée par des résultats positifs à trois tests (ELISA, immunofluorescence et PCR). L'essai sur feuilles détachées est un test supplémentaire permettant de confirmer la présence d'une population viable de *X. fragariae*. En règle générale, on obtient une forte corrélation entre les tests ELISA, PCR et l'essai sur feuilles détachées (Civerolo *et al.*, 1997b).

3.5 Isolement

Il est difficile d'isoler directement *X. fragariae*, même en présence de symptômes et d'exsudats; en effet, en milieu artificiel, sa croissance est très lente et la bactérie est rapidement supplantée par des organismes saprophytes. Il est recommandé d'employer deux milieux de culture pour l'isolement. Pour l'isolement, on obtient de meilleurs résultats avec le milieu de Wilbrink nitraté (Wilbrink-N) (10 g de sucrose, 5 g de protéose peptone (L85; Oxoid¹), 0,5 g de K₂HPO₄, 0,25 g de MgSO₄·7H₂O, 0,25 g de NaNO₃, 15 g de gélose purifiée, eau distillée jusqu'à 1 litre; pH: 7,0-7,2) (Koike, 1965). Le milieu YPGA (5 g d'extrait de levure, 5 g de peptone Bacto, 10 g de glucose, 15 g de gélose purifiée, eau distillée jusqu'à 1 litre; ajuster le pH entre 7,0 et 7,2; passer à l'autoclave, puis ajouter 5 ml de cycloheximide stérilisée par filtration (solution mère: 5 g de cycloheximide pour 100 ml d'éthanol absolu)) est moins efficace, mais reste toutefois recommandé. Il peut être utile de faire appel à un troisième milieu, SPA (20 g de sucrose, 5 g de peptone Bacto1, 0,5 g de K₂HPO₄, 0,25 g de MgSO₄·7H₂O, 15 g de gélose purifiée, eau distillée jusqu'à 1 litre; pH 7,2-7,4), quand les bactéries se révèlent particulièrement difficiles à isoler (Hayward, 1960). Il est conseillé d'avoir recours à une gélose purifiée (Oxoid¹ ou Difco¹) dans tous les milieux, car les impuretés contenues dans les autres géloses commerciales peuvent inhiber la croissance de *X. fragariae*.

3.5.1 Méthode d'isolement n° 1

Quand les plantes sont symptomatiques, prélever des feuilles qui présentent des lésions aux stades précoces et en désinfecter la surface en l'essuyant avec de l'éthanol à 70 %. Les isollements devraient être réalisés à partir de petits échantillons de tissu (0,5-1,0 cm²) prélevés à l'aide d'un scalpel tranchant stérile sur des lésions aux premiers stades (saturées d'eau) ou sur les bords de lésions anciennes.

Homogénéiser les tissus dans quelques millilitres de PBS ou d'eau distillée stérile puis incubé à température ambiante (20-25 °C) pendant 10 à 15 min. Ensemencer des plaques contenant respectivement les milieux Wilbrink-N, YPGA et/ou SPA avec des aliquotes (50-100 µl) de macérat de tissus des lésions et quatre de ses dilutions (1:10, 1:100, 1:1 000 et 1:10 000). On devrait parallèlement ensemencer des plaques avec des aliquotes identiques de suspensions cellulaires de *X. fragariae* (10⁴, 10⁵ et 10⁶ unités formant colonie (UFC)/ml) afin de vérifier la qualité du milieu et de comparer les caractéristiques culturelles des colonies bactériennes qui se développent. Incuber les plaques à 25-27 °C pendant sept jours, mais repérer les colonies qui apparaissent dès deux ou trois jours, car il ne peut pas s'agir de *X. fragariae*. Déterminer le résultat final après sept à dix jours d'incubation à 25-27 °C.

Les colonies de *X. fragariae* cultivées sur le milieu Wilbrink-N ont d'abord un aspect blanc cassé qui vire au jaune pâle et sont circulaires, légèrement convexes, lisses et mucoïdes après quatre à six jours. Sur les milieux YPGA et SPA, les colonies sont morphologiquement similaires aux populations cultivées sur Wilbrink-N, avec toutefois une teinte jaune plus prononcée.

3.5.2 Méthode d'isolement n° 2

Exciser des échantillons de tissu foliaire présentant des lésions angulaires saturées d'eau nettement dessinées, et les laver dans 50 ml d'eau du robinet contenant quelques gouttes de Tween 20. Incuber ces

morceaux de feuilles à température ambiante pendant 10 min, rincer à l'eau distillée et sécher avec un tissu absorbant. On peut désinfecter la surface des échantillons de feuilles en les plongeant pendant 5 s dans de l'éthanol à 70 % avant de les sécher avec un tissu absorbant. Découper les échantillons de feuilles en morceaux plus petits (1-4 mm²) et placer le tout dans 5 ml de PBS à 0,1 M. Mélanger et incubé à température ambiante pendant 30 min afin de libérer dans le surnageant les cellules de *X. fragariae* éventuellement présentes. Diluer le surnageant au centième dans du PBS à 0,1 M et ajouter des aliquotes de 20 µl d'échantillon non dilué et de dilution au centième dans les différentes cupules d'une lame pour microscope. Fixer les cellules bactériennes à la lame par flambage en vue de l'analyse par immunofluorescence ultérieure (section 3.8). Placer 200 µl de surnageant non dilué dans un microtube pour la PCR qui sera ensuite réalisée (section 3.9) ainsi que 1 ml de surnageant non dilué dans un second microtube auquel est ajouté du glycérol (jusqu'à 20 % en concentration), puis stocker à -20 °C ou -80 °C à titre de référence. Le surnageant restant peut servir à isoler l'organisme par ensemencement de dilutions, conformément à la description précédente, ou à inoculer des feuilles de fraisier détachées (section 3.6).

Outre les méthodes n° 1 et 2 qui viennent d'être présentées, on peut isoler *X. fragariae* en déposant directement des aliquotes d'exsudat frais produit par les lésions des tissus sur les milieux Wilbrink-N, YPGA et SPA ou sur un autre milieu couramment employé.

3.5.3 Interprétation des résultats de l'isolement

L'isolement est négatif si, après sept jours, aucun des trois milieux d'essai ne présente de colonie bactérienne de morphologie caractéristique de *X. fragariae* (sous réserve que la croissance n'ait pas été inhibée par un organisme concurrent ou antagoniste) alors que les témoins positifs présentent des colonies de *X. fragariae* typiques.

L'isolement est positif si des colonies présumées de *X. fragariae* apparaissent sur au moins l'un des milieux ensemencés.

Dans la mesure où l'isolement de la bactérie échoue souvent, on devrait présumer que l'échantillon est positif à *X. fragariae* si les tests ELISA, immunofluorescence et PCR sont positifs, sous réserve d'une identification définitive (section 4). Les résultats sont optimaux quand l'isolement est effectué à partir d'extraits fraîchement préparés d'échantillons de lésions aux stades précoces. L'isolement sur milieu de culture peut aussi être favorisé par un enrichissement *in planta*, comme indiqué à la section 3.6.

3.6 Essai sur feuilles détachées et enrichissement biologique

3.6.1 Essai sur feuilles détachées

Dès que les préparations d'échantillons de tissu sont réalisées avec le tampon d'extraction ou l'eau distillée (section 3.3), on peut les inoculer à des feuilles de fraisier détachées (Civerolo *et al.*, 1997a). Utiliser des feuilles jeunes (7-14 jours) détachées d'un plant cultivé en serre non infecté dont le cultivar est sensible à *X. fragariae* (par exemple Camarosa, Pajaro, Seascape, Selva ou Korona). La qualité et l'âge des feuilles sont des facteurs essentiels à la réussite de l'essai.

En conditions aseptiques, détacher trois feuilles (comprenant trois folioles chacune) de plants cultivés en serre, sectionner la partie basale des pétioles et placer immédiatement la partie restante dans des tubes en verre contenant de l'eau stérile.

Préparer une suspension cellulaire d'une souche de référence de *X. fragariae* (tableau 3) contenant 10⁵-10⁶ UFC/ml dans du PBS ou de l'eau distillée: c'est le témoin positif. Le PBS ou l'eau distillée servent de témoin négatif. Injecter les préparations et les témoins dans quatre points de la face abaxiale de chaque foliole (deux sites de chaque côté de la nervure principale) à l'aide d'une seringue sans aiguille (modèle jetable en plastique 3 cc de BD¹ avec orifice de 2 mm).

Une heure après l'inoculation, rincer l'excès d'inoculum avec de l'eau stérile. Placer les feuilles et leurs pétioles dans les tubes dans une chambre humide (humidité relative de 95-100 %) et incuber à 18-20 °C avec une photopériode de 12 h pour une durée pouvant aller jusqu'à 21 jours. Il est primordial de respecter la température et la photopériode indiquées pendant l'incubation afin d'éviter les faux négatifs. Les feuilles inoculées ne devraient pas être visiblement endommagées, et la saturation d'eau occasionnée par l'injection d'inoculum devrait disparaître en 24 h.

Les symptômes typiques, c'est-à-dire des lésions angulaires sombres saturées d'eau similaires à celles des feuilles infectées naturellement, commencent à apparaître quelques jours après l'inoculation. Prendre note des symptômes observés tous les deux jours pendant 14 à 21 jours.

3.6.2 Interprétation des résultats de l'essai sur feuilles détachées

L'essai sur feuilles détachées est négatif quand aucun des sites inoculés ne présente de taches angulaires caractéristiques de *X. fragariae* (aspect sombre et saturé d'eau à la lumière réfléchie; jaune translucide à la lumière transmise) ni de halo chlorosé après 21 jours. Aucune tache saturée d'eau jaune translucide à la lumière transmise ne devrait apparaître au niveau des sites où les témoins négatifs ont été inoculés (Civerolo *et al.*, 1997a).

L'essai sur feuilles détachées est positif quand les sites inoculés présentent des taches angulaires caractéristiques de *X. fragariae* (aspect sombre et saturé d'eau à la lumière réfléchie; jaune translucide à la lumière transmise) 10 à 21 jours après l'injection. Ces taches devraient avoir un aspect similaire aux lésions qui se développent au niveau des sites où les suspensions de témoin positif ont été inoculées. Aucune tache saturée d'eau jaune translucide à la lumière transmise ne devrait apparaître au niveau des sites où les témoins négatifs ont été inoculés (Civerolo *et al.*, 1997a).

3.6.3 Enrichissement *in planta* et isolement

Quarante-huit heures après l'inoculation dans le cadre de l'essai sur feuilles détachées, sélectionner une feuille sur chacun des échantillons inoculés afin de procéder à un isolement sur milieu nutritif. Exciser 10-12 petits disques de 0,5 cm de diamètre sur chaque site inoculé des feuilles détachées et broyer ces disques dans 4,5 ml de PBS. Diluer dans du PBS comme pour l'isolement direct (section 3.5), et ensemercer un milieu Wilbrink-N avec 50 µl de chaque dilution, en stries et en triplicata. Incuber les plaques à 25-27 °C et surveiller l'apparition de colonies ressemblant à *X. fragariae* après cinq à sept jours.

3.6.4 PCR *in vitro* après enrichissement à partir de l'essai sur feuilles détachées

L'analyse utilise les plaques de milieu Wilbrink-N ensemercées en stries avec les extraits préparés pour l'isolement après l'enrichissement *in planta* décrit à la section 3.6.3, après quatre jours d'incubation à 25-27 °C. Rincer les colonies bactériennes à la surface du milieu à l'aide de 3-5 ml de PBS et analyser ces colonies par PCR (section 3.9). Cette méthode s'inspire du protocole combinant bio-enrichissement et PCR décrit par Schaad *et al.* (1995).

3.7 ELISA

La spécificité de la méthode ELISA faisant appel à deux sérums anti-*X. fragariae* polyclonaux du commerce a été validée (López *et al.*, 2005). Rowhani *et al.* (1994) ont montré que l'essai ELISA fondé sur les anticorps polyclonaux pouvait détecter spécifiquement 34 souches de *X. fragariae*, et que les anticorps ne réagissaient pas avec d'autres pathovars voisins ou avec d'autres bactéries isolées à partir des fraisiers. La sensibilité de la détection de *X. fragariae* par ELISA a été établie à 10⁵ UFC/ml (Rowhani *et al.*, 1994; Civerolo *et al.*, 1997b).

Dans chaque plaque microtitre, inclure des suspensions de cellules provenant de cultures pures d'une souche de *X. fragariae* comme témoin positif, et d'une souche autre que *X. fragariae* comme témoin

négatif. Il est recommandé de déterminer la dilution de travail qui convient pour chaque antisérum polyclonal.

3.7.1 ELISA indirect

Mélanger 210 µl de chaque échantillon d'essai, de suspension cellulaire de *X. fragariae* servant de témoin positif (environ 10^9 UFC/ml), de suspension cellulaire d'une autre bactérie (environ 10^9 UFC/ml) servant de témoin négatif à *X. fragariae* et de témoin négatif sain (suspension de matériel végétal de fraisiers sains, voir ci-dessous) avec 210 µl de tampon de revêtement (1,59 g de Na_2CO_3 , 2,93 g de NaHCO_3 , eau distillée jusqu'à 1 litre), puis ajouter 200 µl du mélange échantillon-tampon dans un puits sur deux d'une plaque microtitre (PolySorp (Nunc¹) ou équivalent). Préparer le matériel végétal servant de témoin négatif en broyant environ 0,1 g de tissus provenant des feuilles, des pétioles ou de la couronne des fraisiers sains dans 0,9 ml de PBS, et en ajoutant 0,9 ml de tampon de revêtement.

Incuber la plaque à 4 °C jusqu'au lendemain. Laver la plaque trois fois avec du PBS contenant 0,05 % de Tween 20 (PBS-T) (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,2 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2,9 g de KH_2PO_4 , 500 µl de Tween 20, eau distillée jusqu'à 1 litre). Après le lavage, ajouter 200 µl de tampon bloquant (PBS contenant 1 % d'albumine sérique bovine (BSA) ou de poudre de lait dégraissé) dans chaque puits d'essai et incuber à 37 °C pendant 1 h. Laver la plaque trois fois avec du PBS-T.

En suivant les instructions du fabricant, préparer la dilution de travail appropriée du sérum anti-*X. fragariae* dans du PBS, et ajouter 200 µl de cette dilution dans chaque puits. Incuber à 37 °C pendant 2 h et laver la plaque trois fois avec du PBS-T. Ajouter 200 µl de conjugué anticorps-enzyme dilué comme il convient dans du PBS contenant 0,2 % de BSA dans chaque puits. Incuber à 37 °C pendant 1 h et laver la plaque trois fois avec du PBS-T. Ajouter 200 µl de substrat frais (1 mg de p-nitrophénylphosphate par millilitre de tampon substrat, pH 9,8) dans chaque puits. Incuber dans l'obscurité à température ambiante pendant 15, 30 et 60 min, et déterminer l'absorbance à 405 nm.

3.7.2 DAS-ELISA

Pour la méthode ELISA à deux anticorps en sandwich (DAS-ELISA), ajouter 200 µl de la dilution appropriée de sérum anti-*X. fragariae* dans le tampon de revêtement à chaque puits de deux plaques microtitres (PolySorp (Nunc¹) ou équivalent). Incuber à 37 °C pendant 4 h et laver les puits trois fois avec du PBS-T. Ajouter 200 µl de chaque macérat de tissus des échantillons, ainsi que des témoins positifs et négatifs, comme indiqué pour l'ELISA indirect (section 3.7.1), dans un puits sur deux de chaque plaque et incuber à 4 °C jusqu'au lendemain. Laver les plaques trois fois avec du PBS-T, puis ajouter 200 µl de conjugué anticorps-enzyme dilué comme il convient dans du PBS contenant 0,2 % de BSA dans chaque puits. Incuber à 37 °C pendant 3 h et laver la plaque quatre fois avec du PBS-T. Ajouter 200 µl de substrat frais (1 mg de p-nitrophénylphosphate par millilitre de tampon substrat, pH 9,8) dans chaque puits. Incuber dans l'obscurité à température ambiante pendant 15, 30 et 60 min, et déterminer l'absorbance à 405 nm.

3.7.3 Interprétation des résultats du test ELISA

Le test ELISA est négatif si l'absorbance moyenne obtenue pour les puits en duplicata contenant le macérat de tissus de l'échantillon est inférieure au double de l'absorbance moyenne des puits du témoin négatif constitué de macérat de tissus de fraisiers sains.

Le test ELISA est positif si 1) l'absorbance moyenne des puits de l'échantillon en duplicata est plus de deux fois supérieure à l'absorbance moyenne des puits du témoin négatif contenant le macérat de tissus de fraisiers sains, et si 2) l'absorbance moyenne des puits du témoin positif est plus de deux fois supérieure à l'absorbance moyenne des puits du témoin négatif.

Des résultats négatifs pour des puits contenant le témoin positif indiquent que le test n'a pas été réalisé correctement et/ou que les réactifs sont détériorés ou périmés.

Des résultats positifs pour des puits contenant un témoin négatif sont le signe d'une contamination croisée ou de la liaison d'anticorps non spécifiques. Le cas échéant, il convient de répéter l'analyse avec du tissu frais ou d'effectuer un autre essai fondé sur un principe biologique différent.

3.8 Immunofluorescence

Des procédures d'analyse par immunofluorescence pour l'identification de bactéries phytopathogènes sont fournies par De Boer (1990) et OEPP (2009). Trois sérums polyclonaux anti-*X. fragariae* du commerce (Tableau 1) ont été validés avec des immunoglobulines anti-lapin conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF) (López *et al.*, 2005). Avec ces anticorps, cette méthode d'immunofluorescence permet de détecter jusqu'à 10^3 - 10^4 UFC/ml de *X. fragariae* dans les tissus de fraisier (Calzolari et Mazzucchi, 1989).

L'analyse porte sur des dilutions de macérats de tissus (1:10, 1:100 et 1:1 000) et des suspensions cellulaires (10^6 UFC/ml) d'une souche de *X. fragariae* (témoin positif) et d'une autre bactérie (témoin négatif) dans du PBS ou de l'eau distillée. Les témoins négatifs devraient être constitués d'extraits de tissus végétaux sains.

Placer des aliquotes (20 µl) des dilutions de l'échantillon et des suspensions témoins (négatifs et positifs) dans différentes cupules d'une lame pour microscope. Sécher les préparations à l'air, fixer par flambage ou en plongeant les lames dans l'acétone pendant 10 min puis en les séchant à l'air. Les lames peuvent être conservées à -20 °C avant leur utilisation. Diluer l'anticorps primaire de *X. fragariae* dans du PBS contenant 10 % de lait écrémé en poudre. Choisir la concentration d'anticorps la plus basse permettant d'obtenir une coloration satisfaisante quand il y a jusqu'à 100 cellules positives par cupule de la lame pour microscope. Il est conseillé d'employer deux dilutions d'anticorps afin de mettre au jour d'éventuelles réactions croisées avec d'autres bactéries. Ajouter 20 µl d'anticorps primaire dans chaque cupule et incuber les lames dans une chambre humide à température ambiante ou à 37 °C pendant 30-60 min. Rincer les lames dans du PBS et les laver en les immergeant dans le même tampon pendant 10 min. Diluer l'anticorps secondaire conjugué à l'ITCF dans du PBS (les dilutions optimales sont habituellement situées dans une fourchette entre 1:20 et 1:200). Recouvrir les cupules des lames avec l'anticorps secondaire conjugué et incuber dans une chambre humide à température ambiante ou à 37 °C pendant 30-60 min. Répéter l'étape de lavage à trois reprises puis sécher les lames à l'air. Fixer des lamelles sur les lames avec une solution de montage (90 ml de glycérol, 10 ml de PBS) contenant 1 mg de p-phénylènediamine/ml et examiner les lames avec un grossissement de $\times 500$ à $\times 1000$ avec de l'huile à immersion. Compter les cellules fluorescentes de taille similaire aux cellules de la souche de référence de *X. fragariae* (López *et al.*, 2005).

3.8.1 Interprétation des résultats de l'analyse par immunofluorescence

L'analyse par immunofluorescence est négative quand des cellules fluorescentes vertes dont la morphologie est caractéristique de *X. fragariae* apparaissent dans les cupules du témoin positif mais pas dans les cupules de l'échantillon ni des témoins négatifs.

L'analyse par immunofluorescence est positive quand des cellules fluorescentes vertes dont la morphologie est caractéristique de *X. fragariae* apparaissent dans les cupules du témoin positif et de l'échantillon mais pas dans les cupules des témoins négatifs.

On estime que le test est positif pour les échantillons qui comportent plus de 10^3 cellules/ml, car ce chiffre est considéré comme la limite de fiabilité de cette méthode de détection (De Boer, 1990). Quand on compte moins de 10^3 cellules/ml, on peut juger que l'analyse par immunofluorescence n'est pas probante. Le cas échéant, on devrait réaliser un nouvel échantillonnage ou d'autres essais. Les échantillons qui contiennent une grande quantité de cellules dont la fluorescence est faible ou incomplète par rapport aux cellules du témoin positif nécessitent des analyses supplémentaires à des dilutions différentes ou avec une autre source d'anticorps.

Tableau 1. Anticorps polyclonaux de *Xanthomonas fragariae* actuellement recommandés pour les analyses sérologiques

Sources	Applications recommandées [†]
Neogen Europe1	Détection par immunofluorescence ou DAS-ELISA
Plant Research International, Wageningen UR (Univ. Wageningue)	Détection par immunofluorescence
Bioreba AG1	Détection par DAS-ELISA

[†] Validées lors d'une évaluation de la performance dans le cadre d'un projet financé par l'Union européenne (SMT-4-CT98-2252) (López *et al.*, 2005).

3.9 PCR

Toutes les méthodes PCR décrites dans le présent protocole de diagnostic, sauf la PCR nichée conçue par Zimmerman *et al.* (2004), ont été validées par une étude d'évaluation de la performance financée par l'Union européenne (SMT-4-CT98-2252) (López *et al.*, 2005). La littérature indique que les protocoles de PCR nichée sont jusqu'à 100 fois plus sensibles que les PCR classiques (Roberts *et al.*, 1996; Zimmerman *et al.*, 2004).

Les protocoles d'extraction d'ADN à partir d'échantillons végétaux suivie d'une PCR décrits par Pooler *et al.* (1996) ainsi que Hartung et Pooler (1997) ont été validés (López *et al.*, 2005). Stöger et Ruppitsch (2004) ont vérifié qu'un protocole modifié faisant appel au REDEExtract-N-Amp Plant PCR Kit commercialisé par Sigma¹ convenait pour l'extraction d'ADN préalable à l'amplification pour le criblage d'un grand nombre d'échantillons de feuilles asymptomatiques. D'autres kits commerciaux sont disponibles dans le commerce pour extraire l'ADN ou réaliser des PCR nichées ou fondées sur d'autres amorces (Roberts *et al.*, 1996), mais ils n'ont pas encore été validés (López *et al.*, 2005).

Deux PCR en temps réel sensibles ont été décrites pour la détection de *X. fragariae* (Weller *et al.*, 2007; Vandroemme *et al.*, 2008) dans les tissus de fraisier. La PCR en temps réel mise au point par Weller *et al.* (2007) permet en outre de distinguer *X. fragariae* et *X. arboricola* pv. *fragariae*. La PCR en temps réel présentée par Weller *et al.* (2007) utilise des amorces qui ciblent des régions du gène *gyrB* propre à *X. fragariae* et du gène *pep* propre à *X. arboricola* pv. *fragariae*. La PCR en temps réel élaborée par Vandroemme *et al.* (2008) produit un amplicon de 41 paires de bases (pb) en employant des amorces conçues à partir de l'amplicon de 550 pb obtenu avec le protocole PCR de Pooler *et al.* (1996). Ces méthodes pourraient servir à détecter les populations faibles de *X. fragariae* des infections asymptomatiques ou latentes.

3.9.1 Extraction de l'ADN

C'est le DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen¹ adapté pour extraire l'ADN des organismes de type mycoplasme (MLO) (López *et al.*, 2005) qui a donné les meilleurs résultats à l'issue de l'essai circulaire de l'Union européenne (SMT-4-CT98-2252).

L'extraction d'ADN s'effectue à partir de 250 µl de macérat(s) de tissus de l'échantillon d'essai, du matériel végétal de fraisier sain (témoin négatif), de l'eau ultrapure ou du PBS stérile (témoin négatif) et une suspension cellulaire à partir d'une culture pure de *X. fragariae* (témoin positif). Mettre en présence 250 µl de tampon d'extraction à base de bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB) (50 ml de Tris-HCl 1 M, 50 ml d'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) 5 M, 40,9 g de NaCl, 5 g de polyvinylpyrrolidone (PVP)-40, 12,5 g de CTAB, eau distillée jusqu'à 500 ml) et 4 µl de ribonucléase A (100 mg/ml), mélanger en retournant délicatement cinq fois, puis incubé à 65 °C pendant 10 min en retournant parfois la solution pour la mélanger. Suivre les instructions du fabricant jusqu'à l'étape d'élution de l'ADN.

Pour éluer l'ADN, ajouter 100 µl de Tris-HCl 10 mM à pH 9 (préchauffé à 65 °C) dans la colonne, puis centrifuger à au moins 6 000 g pendant 1 min. Ajouter 100 µl de Tris-HCl supplémentaires et répéter l'étape de centrifugation. Amener le volume total de la solution d'ADN à 300 µl avec le tampon Tris-EDTA (TE) et ajouter 200 µl d'acétate d'ammonium 5 M et 1 ml d'éthanol absolu. Bien mélanger et incubé à -20 °C pendant au moins 1 h, éventuellement jusqu'au lendemain. Après l'incubation, centrifuger à 17 000 g pendant 10 min. Éliminer le surnageant et laver le culot d'ADN dans 1 ml d'éthanol absolu, puis centrifuger à 16 000 g pendant 5 min. Éliminer le surnageant et laver le culot d'ADN dans 500 µl d'éthanol à 80 %, puis centrifuger à 16 000 g pendant 5 min. Éliminer le surnageant. Une fois qu'il est sec, disperser à nouveau le culot dans 50 µl d'eau distillée stérile.

3.9.2 PCR multiplex

3.9.2.1 Protocole de Hartung et Pooler (1997)

La spécificité de ce protocole a été confirmée dans une étude portant sur 30 isolats de *X. fragariae*, 36 isolats de *X. campestris* (représentant 19 pathovars) et 62 isolats de bactéries épiphytes que l'on trouve couramment chez le fraisier. Parmi tous ces isolats, seule *X. fragariae* a été dépistée avec succès. Cette PCR multiplex a ainsi permis de détecter jusqu'à 10³ UFC/ml dans le tissu végétal (Pooler *et al.*, 1996; Hartung et Pooler 1997).

Les trois paires d'amorces décrites par Pooler *et al.* (1996) sont les suivantes:

241A: 5'-GCCCCGACGCGAGTTGAATC-3'

241B: 5'-GCCCCGACGCGCTACAGAC TC-3'

245A: 5'-CGCGTGCCAGTGGAGATCC-3'

245B: 5'-CGCGTGCCAGAACTAGCAG-3'

295A: 5'-CGT TCC TGGCCGATT AATAG-3'

295B: 5'-CGCGTTCCT GCG TTTTTT CG-3'

Le mélange réactionnel de la PCR contient 25 µl composés comme suit: 2,5 µl de tampon (PerkinElmer¹) (contenant du MgCl₂ à 15 mM), 5,0 µl de désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP) (1 mM), 2,0 µl (0,4 µM) de chacune des six amorces, 0,5 µl d'ADN polymérase Taq et 5,0 µl d'échantillon d'ADN. Les paramètres de thermocyclage sont: une première étape d'activation de 15 min à 95 °C; 35 cycles de 1 min à 95 °C, 1 min à 57 °C et 1 min à 72 °C; une étape d'extension finale de 7 min à 72 °C. Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5 %) dans un tampon Tris-acétate-EDTA (TAE) 0,5× (OEPP, 2006).

Les amplicons spécifiques à *X. fragariae* mesurent 300, 550 et 615 pb, d'après la littérature (Pooler *et al.*, 1996; Hartung et Pooler, 1997). Les extraits de plantes infectées par *X. fragariae* donnent généralement le segment de 300 pb, mais les autres amplicons (550 et 615 pb) peuvent quelquefois être produits.

Il est possible d'utiliser les amorces 245A et 245B pour les PCR classiques en suivant la procédure précédente; l'amplicon produit mesure alors 300 pb.

3.9.3 PCR nichée

La PCR nichée décrite par Moltmann et Zimmerman (2005) à partir des amorces conçues par Pooler *et al.* (1996) et Zimmerman *et al.* (2004) est recommandée pour diagnostiquer *X. fragariae* chez les fraisiers symptomatiques ainsi que pour analyser les fraisiers asymptomatiques (plantes réfrigérées ou encore vertes). Roberts *et al.* (1996) décrivent une autre méthode PCR nichée pouvant servir à confirmer le résultat.

3.9.3.1 Protocole de Moltmann et Zimmerman (2005)

La spécificité de ce protocole a été confirmée dans une étude portant sur 14 isolats de *X. fragariae*, 30 isolats de *X. campestris* (représentant 14 pathovars) et 17 isolats de bactéries non identifiées associées aux feuilles de fraisier. La spécificité de la paire d'amorces externes a par ailleurs été vérifiée par Hartung et Pooler (1997) (section 3.9.2.1). Aucune réaction croisée n'a été observée lors de l'analyse des isolats. Cette PCR a été mise en œuvre avec succès pour analyser les échantillons collectés durant la prospection de plants de fraisiers et de plants importés (Moltmann et Zimmerman, 2005). Elle a permis de détecter jusqu'à 200 fg d'ADN par réaction et s'est révélée 100 fois plus sensible que la PCR classique (Zimmerman *et al.*, 2004).

Incuber du tissu provenant des feuilles, des pétioles et de la couronne (30-70 g) dans 10-20 ml de tampon au phosphate de sodium à 0,01 M (pH 7,2) par gramme de tissus à température ambiante jusqu'au lendemain. Extraire l'ADN et analyser en suivant le protocole de PCR unique nichée décrit par Zimmerman *et al.* (2004).

Les amorces sont les suivantes:

245A: 5'-CGCGTGCCAGTGGAGATCC-3'

245B: 5'-CGCGTGCCAGAACTAGCAG-3'

245.5: 5'-GGTCCAGTGGAGATCCTGTG-3'

245.267: 5'-GTTTTTCGTTACGCTGAGTACTG-3'

La PCR est réalisée dans 25 µl de mélange réactionnel composé de tampon PCR (Tris-HCl à 10 mM, KCl à 50 mM, Nonidet P-40 à 0,08 %, MgCl₂ 2,5 à mM), dNTP (0,2 mM respectivement), les quatre amorces (0,2 µM respectivement) et 0,5 µl d'ADN polymérase Taq. Les paramètres de thermocyclage sont les suivants: étape de dénaturation initiale de 4 min à 94 °C; 35 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min à 68 °C et 1 min à 72 °C; étape d'extension finale de 7 min à 72 °C. Pour la PCR nichée, l'amplification de l'ADN avec la première paire d'amorces (245A et 245B) est suivie d'une seconde PCR avec les amorces internes 245.5 et 245.267 dont la matrice est 1 µl du produit de la première PCR. On conserve les mêmes paramètres de thermocyclage, à l'exception de la température d'hybridation, qui vaut 62 °C pour les amorces internes 245.5 et 245.267. Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,2 %) dans le tampon TAE 0,5×.

Les amplicons caractéristiques de *X. fragariae* mesurent 300 pb après la première amplification (amorces 245A et 245B) et 286 pb après la seconde PCR nichée (amorces internes 245.5 et 245.267). Quand la matrice est fortement concentrée, un fragment supplémentaire d'environ 650 pb est parfois amplifié.

3.9.3.2 Protocole de Roberts *et al.* (1996)

La spécificité de ce protocole a été confirmée dans une étude portant sur 30 isolats de *X. fragariae*, 17 isolats de *X. campestris* (représentant 16 pathovars) et 9 isolats de bactéries xanthomonades non pathogènes isolées chez le fraisier. Aucune réaction croisée n'a été observée lors de l'analyse des isolats. Cette PCR nichée permet de détecter jusqu'à 18 cellules de *X. fragariae* environ dans les tissus végétaux (Roberts *et al.*, 1996).

Voici les amorces semi-nichées décrites par Roberts *et al.* (1996):

XF9: 5'-TGGGCCATGCCGGTGGAACTGTGTGG-3'

XF11: 5'-TACCCAGCCGTCGCAGACGACCGG-3'

XF12: 5'-TCCCAGCAACCCAGATCCG-3'

La PCR est réalisée dans 25 µl de mélange réactionnel composé de tampon PCR (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM), dNTP (0,2 mM respectivement), les trois amorces (0,2 µM respectivement) et 0,5 µl d'ADN polymérase Taq. Les paramètres de thermocyclage sont les suivants: étape de dénaturation initiale de 2 min à 95 °C; 30 cycles de 30 s à 95 °C, 30 s à 65 °C et 45 s à 72 °C; étape d'extension finale de 5 min à 72 °C. Pour la PCR semi-nichée, l'amplification de l'ADN avec la première paire d'amorces (XF9 et XF11) est suivie d'une seconde PCR avec les amorces XF9 et XF12 dont la matrice est 3 µl du produit de la première PCR. Les paramètres du thermocyclage restent les mêmes que pour la première PCR à l'exception de la température d'hybridation, égale à 58 °C. Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % dans le tampon TAE 0,5×

Les amplicons caractéristiques de *X. fragariae* mesurent 537 pb après la première amplification (amorces XF9 et XF11) et 458 pb après la seconde PCR semi-nichée (amorces XF9 et XF12).

3.9.4 PCR en temps réel

3.9.4.1 Protocole de Weller *et al.* (2007)

La spécificité de ce protocole a été confirmée par une étude portant sur 10 isolats de *X. fragariae* et 24 isolats appartenant au genre *Xanthomonas* (regroupant 12 espèces et 17 pathovars). Parmi tous ces isolats, seule *X. fragariae* a été dépistée avec succès. Cette PCR en temps réel est parvenue à détecter jusqu'à 10³ UFC par disque d'échantillon de feuille (Weller *et al.*, 2007). Ce protocole a également été validé par un laboratoire néerlandais; les informations à cet égard sont disponibles dans la base de données de l'OEPP sur l'expertise en matière de diagnostic (<http://dc.eppo.int/validationlist.php>).

L'essai s'appuie sur des amorces qui ciblent des séquences du gène *gyrB* ainsi qu'une sonde TaqMan marquée par liaison covalente avec un colorant rapporteur JOE à l'extrémité 5' et un colorant désactivateur TAMRA à l'extrémité 3':

Xf *gyrB*-F: 5'-CCG CAG CGA CGC TGA TC -3'

Xf *gyrB*-R: 5'-ACG CCC ATT GGC AAC ACT TGA-3'

Xf *gyrB*-P: 5'-TCC GCA GGC ACA TGG GCG AAG AAT TC-3'

La PCR s'effectue en ajoutant 4 µl d'ADN matrice au mélange réactionnel constitué comme suit: tampon TaqMan A 1× (Applied Biosystems¹), MgCl₂ 5,5 mM, dNTP (Promega¹) 200 µM, les deux amorces (300 nM respectivement), la sonde 100 nM et 0,63 U d'ADN polymérase AmpliTaq Gold (Applied Biosystems¹). Le thermocycleur est paramétré ainsi: étape d'activation initiale de 2 min à 50 °C, 15 min à 95 °C puis 40 cycles de 10 s à 95 °C, 1 min à 60 °C.

3.9.5 Interprétation des résultats de la PCR

3.9.5.1 PCR classique

La PCR est négative quand les amplicons de taille caractéristique de *X. fragariae* ne sont pas produits par les échantillons et les témoins négatifs, mais apparaissent pour tous les témoins positifs.

La PCR est positive quand au moins un des amplicons de taille caractéristique de *X. fragariae* est produit par les échantillons, à condition qu'aucun témoin négatif ne soit amplifié.

On peut suspecter une inhibition de la PCR si les amplicons de la taille correcte sont produits par le témoin positif contenant *X. fragariae* dans l'eau, mais pas par les témoins positifs constitués d'extraits végétaux infectés par la bactérie. Le cas échéant, il est recommandé de répéter la PCR avec l'extrait dilué à 1:10, 1:100 et 1:1 000, ou de répéter l'extraction d'ADN.

3.9.5.2 PCR en temps réel

Une analyse PCR en temps réel ne sera considérée comme valide que si les conditions suivantes sont satisfaites:

- le témoin positif donne une courbe d'amplification avec les amorces caractéristiques du pathogène;
- les témoins négatifs de l'extraction et de l'amplification ne donnent lieu à aucune courbe d'amplification (soit une valeur du cycle seuil (Ct) de 40).

Si l'analyse inclut les amorces internes COX, le témoin négatif (le cas échéant), le témoin positif et chacun des échantillons d'essai doivent produire une courbe d'amplification. Si les amorces témoins internes n'induisent pas de courbe d'amplification avec les échantillons, cela peut indiquer par exemple que l'extraction de l'ADN n'a pas fonctionné, que l'ADN n'a pas été incorporé au mélange réactionnel, que l'extrait d'ADN contient des composés inhibant la PCR ou que l'acide nucléique est détérioré.

Le résultat est considéré comme positif pour un échantillon si ce dernier produit une courbe d'amplification typique. La Ct doit être vérifiée dans chaque laboratoire lors de la première mise en œuvre de l'essai.

3.9.6 Témoins des analyses moléculaires

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

Les témoins positifs devraient être préparés dans un autre emplacement que la zone d'analyse des échantillons.

Acide nucléique témoin positif. Ce témoin sert à contrôler l'efficacité de l'amplification en chaîne par polymérase. À cet effet, on peut faire appel à un acide nucléique préparé (et conservé) au préalable, à l'intégralité du génome ou à un témoin de synthèse, par exemple un produit de PCR cloné. Pour le présent protocole, l'acide nucléique témoin positif recommandé est une suspension de culture pure de cellules de *X. fragariae* (10^4 - 10^6 UFC/ml).

Témoin interne. Pour les PCR classique et en temps réel, le protocole devrait inclure un gène domestique végétal comme les gènes qui codent la COX (Weller *et al.*, 2000), l'ARN ribosomique (ARNr) 16S (Weisberg *et al.*, 1991) ou la *GADPH* (Mafra *et al.*, 2012) afin d'éliminer l'éventualité d'obtenir des faux négatifs dus à une mauvaise extraction ou à la dégradation de l'acide nucléique, ou encore à la présence d'inhibiteurs de PCR.

Témoin négatif de l'amplification (témoin exempt de matrice). Ce témoin est nécessaire pour les méthodes de 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 essaie d'amplifier l'eau de qualité PCR ou le PBS stérile qui a servi à préparer ce mélange.

Témoin positif de l'extraction. Ce témoin permet de s'assurer que la qualité de l'acide nucléique de la cible est suffisante pour l'amplification en chaîne par polymérase. L'acide nucléique est extrait des tissus infectés de l'hôte ou de tissus végétaux sains auxquels l'organisme cible a été inoculé à une concentration proche de la limite de détection estimée du protocole.

Ce témoin positif devrait correspondre approximativement à un dixième de la quantité de tissu foliaire utilisée par plante pour extraire l'ADN. Pour ce protocole, les témoins positifs recommandés sont des macérats de tissus inoculés avec 10^6 UFC/ml d'une souche de référence de *X. fragariae*.

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

Témoin négatif de l'extraction. Ce témoin sert à contrôler la contamination pendant l'extraction de l'acide nucléique et/ou une réaction croisée avec le tissu hôte. Il est constitué d'acide nucléique extrait à partir de tissus sains de l'hôte puis amplifié, ou d'un extrait de macérat de tissus de l'échantillon déjà testé négativement à *X. fragariae*. Il est recommandé d'employer de multiples témoins quand on s'attend à ce qu'un grand nombre d'échantillons soient positifs.

4. Identification

Les conditions minimales pour que la bactérie soit identifiée sont la réussite de l'isolement de l'organisme et un résultat positif à chacune des trois techniques de détection suivantes: 1) ELISA indirect, DAS-ELISA (section 3.7) ou immunofluorescence (section 3.8) avec anticorps polyclonaux; 2) PCR (section 3.9); et 3) analyse de la pathogénicité par inoculation de fraisiers pour vérifier les postulats de Koch (sections 4.4 et 3.6). On peut réaliser des analyses supplémentaires (section 4) pour caractériser en détail la souche qui infecte l'hôte. Toutes les analyses doivent intégrer des témoins positifs et négatifs.

En cas d'infections latentes ou de plantes asymptomatiques, le test de dépistage initial devrait être complété par l'isolement et la confirmation de l'identité du pathogène, au moyen notamment d'une analyse de la pathogénicité faisant appel à une culture pure afin de vérifier les postulats de Koch.

4.1 Analyses biochimiques et physiologiques

En culture, *X. fragariae* présente les mêmes caractéristiques que les autres xanthomonades. Ses cellules sont des bâtonnets aérobies à Gram négatif dotés d'un flagelle polaire unique. Cette bactérie ne réduit pas les nitrates, est positive à la catalase et n'utilise pas l'asparagine comme source unique de carbone et d'azote (Bradbury, 1977; Bradbury, 1984; Schaad *et al.*, 2001). Elle produit peu d'acides à partir des glucides. Ses colonies sont mucoïdes, convexes et brillantes sur les milieux YPGA et Wilbrink-N (Dye, 1962; van den Mooter et Swings 1990; Swings *et al.*, 1993; Schaad *et al.*, 2001). Les espèces du genre *Xanthomonas* sont faciles à distinguer des autres genres de bactéries aérobies à Gram négatif en bâtonnet ou pigmentées de jaune grâce aux caractéristiques présentées au Tableau 2 et tirées de Schaad *et al.* (2001).

Tableau 2. Caractéristiques phénotypiques distinctives des *Xanthomonas* par rapport à *Pseudomonas* et aux bactéries pigmentées de jaune des genres *Flavobacterium* et *Pantoea* (Schaad *et al.*, 2001)

Caractéristique	<i>Xanthomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Pantoea</i>
Ciliature	1 flagelle polaire	Plusieurs flagelles polaires	Aucune	Péritriche
Xanthomonadine	Oui	Non	Non	Non
Fluorescence	Non	Non	Non	Non
Levane à partir du sucrose	Oui	Variable	Non	Non
H ₂ S à partir de cystéine	Oui	Variable	Non	Non
Oxydase	Négatif ou faible	Non	Positif	Négatif
Fermentation	Non	Variable	Non	Oui
Croissance sur chlorure de triphényltétrazolium (TTC) 0,1 %	Non	Non	Oui	Oui
		Oui		

Les souches de référence de *X. fragariae* disponibles auprès des différentes collections récapitulées dans le Tableau 3 sont recommandées comme témoins positifs des analyses biochimiques et physiologiques.

Tableau 3. Souches de référence de *Xanthomonas fragariae*

Souche	Source
ATCC 33239	American Type Culture Collection, Manassas (Virginie, États-Unis)
CFBP 2510	Collection française de bactéries phytopathogènes, Station Phytobactériologie de l'INRA, Angers (France)
ICMP 5715	International Collection of Microorganisms from Plants, Auckland (Nouvelle-Zélande)
BCCM/LMG 708	Collections Coordonnées Belges de Micro-organismes / Collection du Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica, Gand (Belgique)
NCPPB 1469	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Central Science Laboratory, York (Royaume-Uni); Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen (Pays-Bas)
NCPPB 1822	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Central Science Laboratory, York (Royaume-Uni); Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen (Pays-Bas)

Les caractéristiques les plus utiles ou pertinentes pour distinguer *X. fragariae* des autres espèces de *Xanthomonas* (Schaad *et al.*, 2001; Janse *et al.*, 2001; OEPP, 2006) sont présentées au Tableau 4.

Tableau 4. Tests diagnostiques pour distinguer *Xanthomonas fragariae* du «groupe *Xanthomonas campestris*» et de *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*

Test	<i>X. fragariae</i>	<i>X. campestris</i>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>fragariae</i>
Croissance à 35 °C	-	+	ND
Croissance sur NaCl 2 %	-	+	+
Hydrolyse de l'esculine	-	+	+
Liquéfaction de la gélatine	+	V	+
Digestion de protéines	-	+	ND
Hydrolyse de l'amidon	+	V	+
Production d'uréase	-	-	-
Production d'acides à partir de glucides:			
Arabinose	-	+	ND
Galactose	-	+	+
Tréhalose	-	+	ND
Cellulose	-	+	+

ND: non déterminé; V: réaction variable.

Source: Janse *et al.* (2001) et OEPP (2006).

Il est possible de caractériser des souches isolées par voie biochimique à l'aide de systèmes commerciaux, et *X. fragariae* peut ainsi être identifiée en examinant le profil spécifique d'un échantillon avec les galeries API 20 NE et API 50 CH de BioMérieux¹ (OEPP, 2006).

Pour utiliser les galeries API 20 NE¹, suivre les instructions du fabricant pour préparer les suspensions des cultures d'essai et des cultures de la souche de référence sur le milieu Wilbrink-N (48 h après ensemencement) ainsi que pour inoculer les galeries. Incuber à 25-26 °C et déterminer les résultats après 48 h (pour l'activité enzymatique) et 96 h (utilisation des substrats). Tous ces résultats sont alors comparés au profil caractéristique de *X. fragariae* (Tableau 5).

Tableau 5. Profil caractéristique de *Xanthomonas fragariae* dans les galeries API 20 NE

Test	Réaction (après 48 ou 96 h) [†]
Fermentation du glucose	-
Arginine	-
Uréase	-
Esculine	+
Gélatine	+ (faible)
p-Nitrophényl-β-D-galactopyranosidase (PNPG)	+
Assimilation de glucides:	
Glucose	+
Arabinose	-
Mannose	+
Mannitol	-
N-Acétyleglucosamine	+
Maltose	-
Gluconate	-
Caprate	-
Adipate	-
Malate	+
Citrate	-
Acétate de phényle	-

[†] Réactions courantes de 90 % des souches de *X. fragariae* analysées (López *et al.*, 2005).

Pour les galeries API 50 CH¹, préparer des suspensions cellulaires bactériennes de DO_{600 nm} = 1,0 dans du PBS. Ajouter 1 ml de suspension dans 20 ml de milieu modifié C (0,5 g de NH₄H₂PO₄, 0,5 g de K₂HPO₄, 0,2 g de MgSO₄, 5 g de NaCl, 1 g d'extrait de levure, 70 ml de bleu de bromothymol (0,2 %), eau distillée jusqu'à 1 litre; pH 6,8) (Dye, 1962). Suivre les instructions du fabricant pour inoculer les galeries. Incuber à 25 °C en conditions aérobies et déterminer les résultats après deux, trois et six jours. Quand un puits vire au jaune à l'issue de la période d'incubation, cela signifie que le glucide qu'il contenait a été utilisé (Tableau 6).

Tableau 6. Réactions de *Xanthomonas fragariae* dans les galeries API 50 CH

Test†	Réaction (après six jours)
D-Arabinose	Variable
Galactose	+
D-Glucose	+
D-Fructose	+
D-Mannose	+
N-Acétyleglucosamine	+
Esculine	+
Sucrose	+
Tréhalose	+
D-Lyxose	+
L-Fucose	+

† Les glucides restants dans la galerie API 50 CH ne sont pas consommés par *X. fragariae* (López *et al.*, 2005).

4.1.1 Profil des esters méthyliques d'acides gras

Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) associés aux membranes cytoplasmiques ou aux membranes externes des bactéries à Gram négatif permettent d'identifier les bactéries (Sasser, 1990). Les acides gras spécifiques qui peuvent indiquer le genre des bactéries à Gram positif et négatif sont indiqués par Dickstein *et al.* (2001). L'identification repose sur la comparaison du profil (types et quantité relative des acides gras) d'une souche inconnue avec celui d'une large gamme de souches répertoriées dans une bibliothèque de données (par exemple la bibliothèque TSBA40). Pour obtenir des résultats reproductibles, il est primordial que les bactéries croissent dans des conditions uniformes en termes de temps, de température et de milieu nutritif. Les souches de *X. fragariae* contiennent trois grands acides gras: 16:1 ω -7 *cis*, 15:0 *anteiso* et 15:0 *iso*. Certaines souches analysées concordent nettement avec un des profils de la bibliothèque, mais d'autres présentent des profils d'acides gras divergents sans concordance claire. Diverses études montrent que les souches de *X. fragariae* sont très diversifiées et correspondent à au moins quatre groupes d'acides gras distincts (Roberts *et al.*, 1998). C'est la méthode décrite par Roberts *et al.* (1998) qui est recommandée pour établir le profil des EMAG de *X. fragariae*. Cultiver les souches à tester sur gélose trypticase soja à 24 °C pendant 48 h, extraire les acides gras et analyser l'extrait à l'aide du Sherlock Microbial Identification System (MIDI) (Newark, Delaware, États-Unis).

4.1.1.1 Interprétation des résultats du profil des EMAG

L'analyse est positive quand le profil des EMAG de la souche de l'échantillon est identique au profil du témoin positif de *X. fragariae* ou au profil de la souche ou des souches de référence. Cette analyse peut être réalisée grâce au MIDI et à la National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBB) (Fera, York, Royaume-Uni). La composition et la quantité respective des EMAG clés de *X. fragariae* et *X. arboricola* pv. *fragariae* sont indiquées par Janse *et al.* (2001).

4.2 Analyses sérologiques

4.2.1 Immunofluorescence

L'immunofluorescence peut servir à identifier les souches présumées de *X. fragariae*. Préparer une suspension d'environ 10⁶ cellules/ml dans du PBS et mettre en œuvre la procédure d'analyse par immunofluorescence décrite à la section 3.8. Si, pour obtenir un diagnostic rapide, on se limite à deux essais d'identification seulement, il convient d'opter pour un second principe d'analyse non sérologique pour compléter l'immunofluorescence.

4.2.2 ELISA

Il est possible de faire appel à des tests ELISA indirect ou DAS-ELISA (décrits respectivement aux sections 3.7.1 et 3.7.2) pour identifier les souches présumées de *X. fragariae* isolées à partir de matériel végétal suspecté d'être touché par la maladie des taches angulaires. Si, pour obtenir un diagnostic rapide, on se limite à deux essais d'identification seulement, il convient d'opter pour un second principe d'analyse non sérologique pour compléter le test ELISA.

4.3 Analyses moléculaires

4.3.1 PCR

On peut identifier les cultures présumées de *X. fragariae* en appliquant les protocoles PCR décrits à la section 3.9.

4.3.2 PCR

Des protocoles rep-PCR fondés sur des éléments répétitifs extragéniques palindromiques (REP) spécifiquement conçus pour identifier les souches de *X. fragariae* ont été décrits par Opgenorth *et al.* (1996) ainsi que Pooler *et al.* (1996). Chacun de ces protocoles permet d'identifier avec fiabilité les souches d'essai de *X. fragariae*.

Le protocole PCR décrit ci-dessous reprend le mélange réactionnel et les conditions d'amplification présentés par Opgenorth *et al.* (1996).

Les souches bactériennes à analyser proviennent de stries ou de colonies individuelles cultivées sur le milieu de la maladie de Pierce modifié (5,0 g de sucrose, 2,5 g de Phytone (BD BBL¹), 10 g de Phytigel (BD BBL¹); eau distillée jusqu'à 1 litre, pH ajusté à 7,5 avec HCl 2 N avant autoclavage) (Opgenorth *et al.*, 1996). Divers milieux de culture peuvent être employés, mais ils devraient avoir été normalisés au préalable.

Voici les deux paires d'amorces:

REP1R-I: 5'-IIIICGICGICATCIGGC-3'

REP2-I: 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

ERIC1R: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'

ERIC2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC G-3'

Le tampon réactionnel a la composition suivante: (NH₄)₂SO₄ 16,6 mM, Tris-HCl 67 mM (pH 8,8), EDTA 6,7 μM, 2-mercaptoéthanol 30 mM, 0,17 mg de BSA/ml, 10 % (v/v) de diméthylsulfoxyde, chaque dNTP (1,2 mM respectivement), 62 pmol de chaque amorce et 2 U d'ADN polymérase Taq. Transférer les bactéries d'une colonie représentative de la souche d'essai à l'aide d'un embout de pipette stérile de 10 μl (ou autre équipement adapté) dans un tube de PCR contenant 25 μl de mélange réactionnel. Les paramètres de thermocyclage sont: 6 min à 95 °C, 35 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min à 44 °C (amorces REP) ou 52 °C (amorces ERIC) et 8 min à 65 °C. Les cycles d'amplification sont suivis d'une étape d'extension finale de 16 min à 68 °C. Analyser les produits amplifiés (5-10 μl) par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % (m/v). Visualiser les fragments d'ADN amplifiés par transillumination UV après coloration au bromure d'éthidium.

4.3.2.1 Interprétation des résultats de la rep-PCR

Les souches bactériennes testées sont identifiées comme *X. fragariae* si elles présentent la même empreinte génomique que les souches de référence soumises au même protocole PCR (génotype REP et ERIC) (Pooler *et al.*, 1996) et analysées sur le même gel. On peut obtenir un petit nombre de bandes polymorphiques pour différentes souches de *X. fragariae* en raison de la faible variabilité génomique.

4.3.3 Méthode MLSA

L'analyse par séquençage de plusieurs loci (MLSA) est largement employée pour identifier des espèces de xanthomonades (Parkinson *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2010; Hamza *et al.*, 2012) et pourrait permettre d'identifier *X. fragariae*, d'autant plus qu'une ébauche de la séquence génomique de la bactérie est aujourd'hui disponible (Vandroemme *et al.*, 2013). Il convient toutefois de garder à l'esprit que cette méthodologie n'a pas encore été validée pour l'identification de *X. fragariae*. La méthode MLSA s'appuie sur l'amplification de gènes domestiques (par exemple *gyrB*, *rpoD*) à l'aide des amorces et dans les conditions décrites par Almeida *et al.* (2010) ainsi que Hamza *et al.* (2012). Cette analyse repose sur le séquençage de plusieurs loci (typiquement entre quatre et huit gènes domestiques) et la comparaison des séquences obtenues avec les données de référence pour les espèces de *Xanthomonas* contenues dans des banques de séquences nucléotidiques, comme la Plant Associated and Environmental Microbes Database (PAMDB) (<http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>) (Almeida *et al.*, 2010), la MLVAbank for microbe genotyping <http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/> et la Q-bank Bacteria database (<http://www.q-bank.eu/Bacteria/>).

4.4 Analyses de la pathogénicité

On devrait confirmer l'identité des souches présumées de *X. fragariae* au moyen d'un test de pathogénicité, s'il y a lieu. Des souches obtenues sur les plaques d'isolement ou d'enrichissement devraient être inoculées à des feuilles attachées de fraisier sensible (ou à des feuilles détachées, comme indiqué à la section 3.6). Plusieurs procédures existent: Hazel et Civerolo (1980), Civerolo *et al.* (1997a) ainsi que Hildebrand *et al.* (2005).

4.4.1 Procédure d'inoculation générale

Pour l'inoculation, il est recommandé de faire appel à des plants de fraisier non infectés par *X. fragariae*, en choisissant un cultivar sensible, comme Camarosa, Seascape, Selva, Korona ou Pajaro. Dans la mesure du possible, les plants devraient être maintenus une nuit dans une chambre environnementale à 20-25 °C avec une humidité relative élevée (> 90 %), et exposés à la lumière pendant 4 h avant l'inoculation afin d'induire l'ouverture des stomates.

Préparer des suspensions de cellules bactériennes (10^6 UFC/ml) dans du PBS à 10 mM ou de l'eau distillée stérile. Appliquer l'inoculum de chaque souche sur la face abaxiale de feuilles pourvues de trois folioles sur deux ou trois fraisiers en utilisant un pulvérisateur à faible pression, un aérographe ou un dispositif similaire (par exemple celui de DeVilbiss¹) afin de ne pas saturer les plantes d'eau. On peut favoriser l'infection en lésant les feuilles (par exemple par perforation de la face abaxiale avec une aiguille) avant d'y déposer l'inoculum, mais cette étape n'est pas obligatoire. Après l'inoculation, incuber les plantes dans une chambre maintenue à 20-25 °C avec une humidité élevée (> 90 %) et une photopériode de 12-14 h. Des suspensions cellulaires d'une souche de référence de *X. fragariae* (préparées dans les mêmes conditions que la souche d'essai) servent de témoin positif, tandis que le solvant pur (PBS 10 mM ou eau distillée stérile) fait office de témoin négatif. Les suspensions et les témoins devraient être inoculés aux plantes de bacs différents. Évaluer l'apparition de lésions de manière hebdomadaire pendant les trois semaines (21 jours) qui suivent l'inoculation. Isoler à nouveau le pathogène de ces lésions, comme indiqué à la section 3.5, et identifier par test ELISA, immunofluorescence ou PCR.

4.4.1.1 Interprétation des résultats d'analyse de la pathogénicité

Si les suspensions de cellules bactériennes testées contiennent *X. fragariae*, les premiers symptômes sont des lésions sombres et saturées d'eau (à la lumière réfléchie) sur la face inférieure des feuilles. Les lésions ont une coloration jaune translucide quand on les observe à la lumière transmise. Elles forment ensuite des taches nécrotiques cernées d'un halo jaune ou de bords nécrosés. Des symptômes identiques devraient se manifester sur les feuilles inoculées avec la souche de référence de *X. fragariae* (témoin positif).

Ces symptômes ne devraient pas apparaître sur les feuilles qui ont été inoculées avec du PBS 10 mM ou de l'eau distillée stérile (témoin négatif).

4.4.2 Réaction d'hypersensibilité

Une réaction d'hypersensibilité des feuilles de tabac peut indiquer la présence de gènes *hrp*, et beaucoup de bactéries phytopathogènes peuvent induire une réaction positive de ce type. On peut employer un témoin positif, par exemple une souche de *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. Cet essai fait appel à des plantes des cultivars Samsun ou Xanthi comptant plus de cinq feuilles. Préparer des suspensions bactériennes de 10^9 UFC/ml ($DO_{600\text{ nm}} = 1,0$) dans du PBS 10 mM ou de l'eau distillée stérile et les injecter dans les espaces intercellulaires des faces abaxiales de feuilles adultes à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille de calibre 25.

4.4.2.1 Interprétation des résultats de l'essai de réaction d'hypersensibilité

Le résultat est positif quand les tissus inoculés se ratatinent complètement et sont nécrosés 24 à 48 h après l'inoculation. La majorité des souches de *X. fragariae* provoquent une réaction d'hypersensibilité. Cela étant, certaines d'entre elles peuvent donner des résultats négatifs, en particulier après avoir été stockées quelque temps. On ne devrait pas observer de réactions similaires sur les feuilles inoculées avec le témoin négatif (PBS à 10 mM ou eau distillée stérile).

5. Données à conserver

Les données et les éléments probants à consigner et à conserver sont énumérés à la section 2.5 de la NIMP 27 (*Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés*).

Lorsque les résultats du diagnostic peuvent concerner d'autres parties contractantes, en particulier en cas de non-conformité (NIMP 13: *Directives pour la notification de non-conformité et d'action d'urgence*) et lorsque l'organisme nuisible est identifié pour la première fois dans une zone, on devrait conserver les données, preuves et matériels suivants de manière à assurer une traçabilité complète: échantillon d'origine, culture(s) de l'organisme nuisible, spécimens conservés ou montés sur lames ou matériel d'analyse (par exemple photographies de gels, résultats imprimés de tests ELISA et amplicons PCR).

6. Points de contact pour tout complément d'informations

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

Ministère de l'agriculture des États-Unis (USDA), Agricultural Research Service (ARS) (ancienne appellation), (Edwin L. Civerolo; courriel: emciv@comcast.net).

Plant and Environmental Bacteriology, Fera, Sand Hutton, York YO41 1LZ, Royaume-Uni (John Elphinstone; courriel: john.elphinstone@fera.gsi.gov.uk).

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada (Valence), Espagne (María M. López; courriel: mlopez@ivia.es; tél.: +34 963 424000; télécopie: +34 963 424001).

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

7. Remerciements

La première version du présent protocole a été rédigée par E. L. Civerolo (USDA ARS (anciennement), États-Unis (voir section précédente)) puis révisée par J. Elphinstone (Fera, Royaume-Uni (voir section précédente)) et M. M. López (IVIA, Espagne (voir section précédente)).

8. Références

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

- Almeida, N. F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaad, N. W., Schuenzel, E. L., Lacy, G. H., Sun, X., Jones, J. B., Castillo, J. A., Bull, C. T., Leman, S., Guttman, D. S., Setubal, J. C., et Vinatzer, B. A.** 2010. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, 100(3): 208-215.
- Bradbury, J. F.** 1977. *Xanthomonas fragariae*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 558. Wallingford (Royaume-Uni), CAB International (CABI).
- Bradbury, J. F.** 1984. *Xanthomonas*. In N. R. Krieg et J. G. Holt (sous la direction de). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Baltimore, MD (États-Unis), Williams & Wilkins.
- CAB International.** non daté. *Crop protection compendium*. Wallingford (Royaume-Uni), CAB International (CABI). document consultable à l'adresse suivante: <http://www.cabi.org/cpc/> (dernière consultation: 16 avril 2016).
- Calzolari, A., et Mazzucchi, U.** 1989. Attempts to detect *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants. *Acta Horticulturae*, 265: 601-604.
- Civerolo, E. L., Feliciano, A. J., Melvin, J. A., et Gubler, W. D.** 1997a. A detached leaf bioassay for *Xanthomonas fragariae*. In A. Mahadevin (sous la direction de). *Proceedings of the 9th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 89-94. University of Madras, Madras (Inde).
- Civerolo, E. L., Roberts, P., Feliciano, A. J., Melvin, J. A., Buchner, R. P., Jones, J. B., et Gubler, W. D.** 1997b. Comparative detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants by detached leaf inoculation, ELISA and PCR. In A. Mahadevin (sous la direction de). *Proceedings of the 9th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 95-99. University of Madras, Madras (Inde).
- De Boer, S. H.** 1990. Immunofluorescence for bacteria. In R. Hampton, E. Ball et S. De Boer (sous la direction de). *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: A laboratory manual*, pp. 295-298. St Paul, MN (États-Unis), APS Press.
- Dickstein, E. R., Jones, J. B., et Stead, D. E.** 2001. Automated techniques. In N. W. Schaad, J. B. Jones et W. Chun (sous la direction de). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, pp. 343-358. St Paul, MN (États-Unis), APS Press.
- Dye, D. W.** 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. *New Zealand Journal of Science*, 5(4): 393-416.
- Gubler, W. D., Feliciano, A. J., Bordas, A., Civerolo, E. L., Melvin, J., et Welch, N.** 1999. *X. fragariae* and *C. cladosporioides* cause strawberry blossom blight. *California Agriculture*, 53: 26-28.
- Hamza, A. A., Robene-Soustrade, I., Jouen, E., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Fisher-Le Saux, M., Gagnevin, L., et Pruvost, O.** 2012. Multilocus sequence analysis- and amplified fragment length polymorphism-based characterization of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper and their relatedness to *Xanthomonas* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(3): 183-190.

- Hartung, J. S., et Pooler, M. R.** 1997. Immunocapture and multiplexed-PCR assay for *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leafspot disease. *Acta Horticulturae*, 439: 821-828.
- Hayward, C.** 1960. A method for characterizing *Pseudomonas solanacearum*. *Nature*, 186: 405-406.
- Hazel, W. J., et Civerolo, E. L.** 1980. Procedures for growth and inoculation of *Xanthomonas fragariae*, causal organism of angular leaf spot of strawberry. *Plant Disease*, 64: 178-181.
- Hildebrand, D. C., Schroth, M. N., et Wilhelm, S.** 1967. Systemic invasion of strawberry by *Xanthomonas fragariae* causing vascular collapse. In *Phytopathology*, 57: 1260-1261.
- Hildebrand, P. D., Braun, P. G., Renderos, W. E., Jamieson, A. R., McRae, K. B., et Binns, M. R.** 2005. A quantitative method for inoculating strawberry leaves with *Xanthomonas fragariae*, factors affecting infection, and cultivar reactions. *Canadian Journal of Plant Pathology (Revue canadienne de phytopathologie)*, 27: 16-24.
- Janse, J. D.** 2005. Examples of bacterial diseases of cultivated and wild plants – *Xanthomonas fragariae*. In: *Phylobacteriology: principles and practice*. Chapter 7. Wallingford (Royaume-Uni), CABI Publishing. pp. 224-225.
- Janse, J. D., Ross, M. P., Gorkink, R. F. J., Derks, J. H. J., Swings, J. Janssens, D., et Scortichini, M.** 2001. Bacterial leaf blight of strawberry (*Fragaria* (×) *ananassa*) caused by a pathovar of *Xanthomonas arboricola*, not similar to *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King. Description of the causal organism as *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* (pv. nov., comb. nov.). *Plant Pathology*, 50: 653-665.
- Kennedy, B. W.** 1965. Infection of *Potentilla* by *Xanthomonas fragariae*. *Plant Disease Reporter*, 49: 491-492.
- Kennedy, B. W., et King, T. H.** 1962. Angular leaf spot of strawberry caused by *Xanthomonas fragariae* sp. nov. *Phytopathology*, 52: 873-875.
- Koike, H.** 1965. The aluminum-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. *Phytopathology*, 55: 317-319.
- López, M. M., Aramburu, J. M., Cambra, M., et Borrás, V.** 1985. Detección e identificación de *Xanthomonas fragariae* en España. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie Agrícola*, 28: 245-259 (en espagnol).
- López, M. M., Dominguez, F., Morente, C., Salcedo, C. I., Olmos, A., et Civerolo, E.** 2005. *Diagnostic protocols for organisms harmful to plants: Diagnosis Xanthomonas fragariae*. SMT-4-CT98-2252.
- Maas, J. L.** (sous la direction de). 1998. *Compendium of strawberry diseases*, 2^e éd. St Paul, MN (États-Unis), APS Press.
- Maas, J. L., Gouin-Behe, C., Hartung J. S., et Hokanson, S. C.** 2000. Sources of resistance for two differentially pathogenic strains of *Xanthomonas fragariae* in *Fragaria* genotypes. *Horticultural Science*, 35: 128-131.
- Maas, J. L., Pooler, M., et Galletta, G. J.** 1995. Bacterial angular leafspot disease of strawberry: Present status and prospects for control. *Advances in Strawberry Research*, 14: 18-24.
- Mafra, V., Kubo, K. S., Alves-Ferreira, M., Ribeiro-Alves, M., Stuart, R. M., Boava, L. P., Rodrigues, C. M., et Machado, M. A.** 2012. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PLoS One*, 7(2), e31263.
- Mahuku, G. S., et Goodwin, P. H.** 1997. Presence of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry crowns in Ontario detected using a nested polymerase chain reaction (PCR). *Canadian Journal of Plant Pathology (Revue canadienne de phytopathologie)*, 19: 366-370.
- Milholland, R. D., Ritchie, D. F., Dayking, M. E., et Gutierrez, W. A.** 1996. Multiplication and translocation of *Xanthomonas fragariae* in strawberry. *Advances in Strawberry Research*, 15: 13-17.

- Moltmann, E., et Zimmermann, C.** 2005. Detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants by nested PCR. *EPPO Bulletin*, 35: 53-54.
- OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 1997. Data sheet on *Xanthomonas fragariae*. In OEPP/CABI (sous la direction de: I. M. Smith, D. G. McNamara, P. R. Scott et M. Holderness). *Quarantine pests for Europe*, 2^e éd., pp. 1124-1128. Wallingford (Royaume-Uni), CAB International (CABI).
- OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2006. Diagnostic protocol for *Xanthomonas fragariae*. EPPO Standards PM 7/65. *EPPO Bulletin*, 36: 135-144.
- OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2009. Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria. EPPO Standards PM 7/97 (1). *EPPO Bulletin*, 39: 413-416.
- Opgenorth, D. C., Smart, C. D., Louws, F. J., de Bruijn, F. J., et Kirkpatrick, B. C.** 1996. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. *Plant Disease*, 80: 868-873.
- Parkinson, N., Aritua, V., Heeney, J., Cowie, C., Bew, J., et Stead, D.** 2007. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12): 2881-2887.
- Pooler, M. R., Ritchie, D. F., et Hartung, J. S.** 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3121-3127.
- Rademaker, J. L. W., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P., et De Bruijn, F. J.** 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 665-677.
- Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Schultz, M. H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J., et de Bruijn, F. J.** 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 95: 1098-1111.
- Rat, B.** 1993. *Xanthomonas fragariae*: Causal agent of angular leaf spot of strawberry. In J. G. Swings et E. L. Civerolo (sous la direction de). *Xanthomonas*, pp. 69-70. Londres, Chapman and Hall.
- Roberts, P. D., Hodge, N. C., Bouzar, H., Jones, J. B., Stall, R. E., Berger, R. D. et Chase, A. R.** 1998. Relatedness of strains of *Xanthomonas fragariae* by restriction fragment length polymorphism, DNA-DNA reassociation, and fatty acid analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3961-3965.
- Roberts, P. D., Jones, J. B., Chandler, C. K., Stall, R. E. et Berger, R. D.** 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested PCR. *Plant Disease*, 80: 1283-1288.
- Rowhani, A., Feliciano, A. J., Lips, T., et Gubler, W. D.** 1994. Rapid identification of *Xanthomonas fragariae* in infected strawberry leaves by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease*, 78: 248-250.
- Saddler, G. S. et Bradbury, J. F.** 2005. *Xanthomonas*. In G. M. Garrity (responsable de rédaction); D. J. Brenner, N. R. Krieg et J. T. Stanley (sous la direction de) Vol. 2. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2^e éd., Vol. 2, Part B, pp. 63-90. New York (États-Unis), Springer.
- Sasser, M.** 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In Z. Klement, K. Rudolph et D. C. Sands (sous la direction de). *Methods in phytopathology*, pp. 200-204. Budapest, Akademiai Kiado.

- Schaad, N. W., Jones, J. B., et Lacy, G. H.** 2001. *Xanthomonas*. In N. W. Schaad, J. B. Jones et W. Chun (sous la direction de). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, 3^e éd., pp. 175-200. St Paul, MN (États-Unis), APS Press.
- Schaad, N. W., Tamaki, S., Hatziloukas, E., et Panopoulos, N. J.** 1995. A combined biological enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. In *Phytopathology*, 85: 243-248.
- Stackebrandt, E., Murray, R. G. E., et Truper, H. G.** 1988. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38: 321-325.
- Stefani, E., Mazzucchi, U., et Calzolari, A.** 1989. Evidence of endophytic movement of *Xanthomonas fragariae* Kenn. and King in strawberry. *Phytopathologia Mediterranea*, 28: 147-149.
- Stöger, A., et Ruppitsch, W.** 2004. A rapid and sensitive method for the detection of *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leafspot disease in strawberry plants. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 281-284.
- Swings, J., Vauterin, L., et Kersters, K.** 1993. The bacterium *Xanthomonas*. In J. Swings et E. L. Civerolo (sous la direction de). *Xanthomonas*, pp. 138-144. Londres, Chapman and Hall.
- Turechek, W. W., Hartung, J. S., et McCallister, J.** 2008. Development and optimization of a real-time detection assay for *Xanthomonas fragariae* in strawberry crown tissue with receiver operating characteristic curve analysis. *Phytopathology*, 98(3): 359-368.
- Van den Mooter, M., et Swings, J.** 1990. Numerical analyses of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40: 348-369.
- Vandroemme, J., Baeyen, S., Van Vaerenbergh, J., De Vos, P., et Maes, M.** 2008. Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants. *Plant Pathology*, 57(3): 438-444.
- Vandroemme, J., Cottyn, B., Baeyen, S., De Vos, P., et Maes, M.** 2013. Draft genome sequence of *Xanthomonas fragariae* reveals reductive evolution and distinct virulence-related gene content. *BMC Genomics*, 14(1), 829.
- Weisberg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, B. A., et Lane, D. J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697-703.
- Weller, S. A., Beresford-Jones, N. J., Hall, J., Thwaites, R., Parkinson, N., et Elphinstone, J. G.** 2007. Detection of *Xanthomonas fragariae* and presumptive detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*, from strawberry leaves, by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 70: 379-383.
- 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(7): 2853-2858.
- Zimmermann, C., Hinrichs-Gerger, J., Moltmann, E., et Buchenauer, H.** 2004. Nested PCR for detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 111: 39-51.

9 Figures



Figure 1. Symptômes de *Xanthomonas fragariae* sur (A, gauche) la face supérieure et (B, droite) la face inférieure d'une feuille.

Photo publiée avec l'aimable autorisation de A. M. C. Schilder, Michigan State University, East Lansing (Michigan, États-Unis).



Figure 2. Exsudat bactérien d'une infection à *Xanthomonas fragariae* sur la face inférieure d'une feuille.

Photo publiée avec l'aimable autorisation de W. W. Turechek, Ministère de l'agriculture des États-Unis, Service de la recherche agronomique, Washington (États-Unis).



Figure 3. Symptômes de *Xanthomonas fragariae* sur le calice d'un fruit.

Photo publiée avec l'aimable autorisation de A. M. C. Schilder, Michigan State University, East Lansing (Michigan, États-Unis).

Étapes de la publication

Ce récapitulatif ne fait pas officiellement partie de la norme.

2004-11 Le Comité des normes (CN) ajoute le thème au programme de travail.

2006-04 À sa première réunion, la Commission des mesures phytosanitaires (CPM) ajoute *Xanthomonas fragariae* (2004-012) au programme de travail.

2014-01 Consultation d'experts.

2015-06 Par décision électronique, le CN approuve la consultation du projet par les membres (2015_eSC_Nov_03).

2016-03 Par décision électronique, le GTPD approuve la présentation au CN pour adoption (2016_eTPDP_Mar_05).

2016-06 Par décision électronique, le CN approuve la transmission pour les 45 jours de la période de notification des PD (2016_eSC_Nov_01).

2016-08 Le CN adopte le PD au nom de la CMP (aucune objection soulevée).

NIMP 27. Annexe 14. *Xanthomonas fragariae* (2016). Rome, CIPV, FAO.

2017-01 Le Secrétariat de la CIPV corrige une erreur de forme mineure dans la section 8.

2017-02 Le Secrétariat de la CIPV apporte des modifications mineures à la mise en page et corrige la date de publication.

Dernière mise à jour des étapes de la publication: 2017-02

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 - Télécopie: +39 06 5705 4819

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