

AGENCE FEDERALE POUR LA SECURITE DE LA CHAINE ALIMENTAIRE

**26 JANVIER 2014. - Arrêté royal relatif à la lutte contre la pourriture brune de la pomme de terre (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.)**

PHILIPPE, Roi des Belges,

A tous, présents et à venir, Salut.

Vu la Constitution, l'article 108;

Vu la loi du 2 avril 1971 relative à la lutte contre les organismes nuisibles aux végétaux et aux produits végétaux, l'article 2, § 1er, 1, 4, 5 et 8 modifié par la loi du 5 février 1999 et par l'arrêté royal du 22 février 2001 et § 2, modifié par la loi du 27 décembre 2004;

Vu la loi du 4 février 2000 relative à la création de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, l'article 4, §§ 1er et 2, § 3, modifié par la loi du 22 décembre 2003, et l'article 5, alinéa 2, 7°, modifié par la loi du 22 décembre 2003;

Vu l'arrêté ministériel du 30 août 1999 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.;

Vu l'arrêté ministériel du 14 février 2000 déterminant des mesures afin d'éviter la propagation de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.;

Vu la concertation entre les gouvernements régionaux et l'autorité fédérale du 23 mai 2013;

Vu l'examen préalable de la nécessité de réaliser une évaluation d'incidence des décisions sur le développement durable, comme prévu à l'article 19/1 de la loi du 5 mai 1997 relative à la coordination de la politique fédérale de développement durable, dont il ressort qu'une évaluation d'incidence n'est pas nécessaire dans le cas présent, étant donné que cet arrêté constitue la transposition d'une directive de l'Union européenne visée à l'article 2, 3° de l'arrêté royal du 20 septembre 2012 portant exécution de l'article 19/1, § 1er;

Vu l'avis 54.368/1 du Conseil d'Etat, donné le 25 novembre 2013, en application de l'article 84, § 1er, alinéa 1er, 1°, des lois sur le Conseil d'Etat, coordonnées le 12 janvier 1973,

Sur la proposition de la Ministre de l'Agriculture,

Nous avons arrêté et arrêtons :

CHAPITRE 1er. - Transposition

Article 1er. Le présent arrêté transpose partiellement la Directive 98/57/CE du Conseil du 20 juillet 1998 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

CHAPITRE 2. - Définitions

Art. 2. Pour l'application du présent arrêté, on entend par :

- a) « l'Agence » : l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire;
- b) « l'organisme » : l'agent pathogène responsable de la pourriture brune de la pomme de terre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., auparavant connu sous la dénomination *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith;
- c) « matériel végétal énuméré » : les plantes hôtes de l'organisme énumérées à l'annexe Ire, section Ire, du présent arrêté;
- d) « l'arrêté royal du 10 août 2005 » : l'arrêté royal du 10 août 2005 relatif à la lutte contre les organismes nuisibles aux végétaux et produits végétaux.

### CHAPITRE 3. - Surveillance

Art. 3. § 1er. L'Agence procède chaque année à des recherches officielles systématiques visant à détecter l'organisme sur le matériel végétal énuméré provenant du territoire belge. Afin de déterminer les autres sources éventuelles de contamination menaçant la production du matériel végétal énuméré, l'Agence procède à une évaluation des risques et, à moins qu'aucun risque de propagation de l'organisme n'ait été constaté à l'issue de l'évaluation, elle procède, dans les zones de production du matériel végétal énuméré, à des recherches officielles ciblées visant à détecter l'organisme sur des végétaux n'appartenant pas au matériel végétal énuméré, y compris sur les plantes sauvages hôtes de la famille des solanacées, de même que dans les eaux de surface utilisées pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation du matériel végétal énuméré et dans les eaux usées rejetées par les entreprises de transformation industrielle ou de conditionnement traitant du matériel végétal énuméré et utilisées pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation du matériel végétal énuméré. L'ampleur de ces recherches ciblées est déterminée en fonction du risque décelé.

L'Agence peut également procéder à des recherches officielles visant à détecter l'organisme sur d'autres matériels, tels que le milieu de culture, le sol et les déchets solides provenant d'entreprises de transformation industrielle ou de conditionnement.

§ 2. Les recherches officielles visées au paragraphe 1er sont effectuées :

- a) pour le matériel végétal énuméré, selon les critères prévus à l'annexe Ire, section II;
- b) pour les plantes hôtes autres que le matériel végétal énuméré et pour les eaux, y compris les eaux usées, selon des méthodes appropriées; le cas échéant des échantillons sont prélevés et soumis à des tests en laboratoire officiels ou effectués sous contrôle officiel;
- c) si nécessaire, pour d'autres matériels, selon des méthodes appropriées.

Sur la base de principes scientifiques et statistiques fondés et des caractéristiques biologiques de l'organisme, et compte tenu des systèmes particuliers de production du matériel végétal énuméré et, le cas échéant, d'autres plantes hôtes de l'organisme, l'Agence arrête les procédures d'inspection à suivre, ainsi que l'origine, le calendrier et le nombre d'échantillons à prélever et la stratification du prélèvement des échantillons.

### CHAPITRE 4. - Suspicion de contamination

Art. 4. § 1er. Pour toute apparition suspectée de l'organisme, l'Agence veille à ce que des tests en laboratoire officiels ou officiellement contrôlés soient effectués pour le matériel végétal énuméré, selon la méthode pertinente décrite à l'annexe II et conformément aux conditions énumérées à l'annexe

III, point 1, ou, dans tous les autres cas, selon toute autre méthode officiellement agréée, afin de confirmer ou d'infirmar ladite apparition. Si la présence de l'organisme est confirmée, les dispositions de l'annexe III, point 2, s'appliquent.

§ 2. Dans l'attente de la confirmation ou de l'infirmation de l'apparition suspectée visée au paragraphe 1er :

- a) la circulation de végétaux et de tubercules issus de toutes les cultures, lots ou envois sur lesquels les échantillons ont été prélevés est interdite, sauf sous contrôle de l'Agence et à condition qu'il ait été établi qu'il n'y a aucun risque identifiable de propagation de l'organisme;
- b) l'Agence prend les mesures nécessaires pour remonter à l'origine de l'apparition suspectée;
- c) l'Agence introduit notamment pour la production du matériel végétal énuméré et la circulation de lots de plants de pommes de terre autres que ceux visés au a), produits sur le lieu de production sur lequel les échantillons visés au a) ont été prélevés, des mesures de précaution supplémentaires appropriées, fondées sur le degré de risque estimé, en vue de prévenir toute propagation de l'organisme.

L'alinéa précédent ne s'applique que dans chaque cas où on a constaté

- a) des symptômes visuels diagnostiques suggérant la présence de la maladie causée par l'organisme et une réaction positive au(x) test(s) de dépistage rapide précisé(s) à l'annexe II, section Ire, point 1, et section II, ou
- b) une réaction positive au(x) test(s) de dépistage précisé(s) à l'annexe II, section Ire, point 2, et section III,

§ 3. Dans le cas d'apparition suspectée où il y a un risque de contamination du matériel végétal énuméré ou des eaux de surface à partir d'un autre Etat membre ou vers un autre Etat membre, l'Agence notifie immédiatement, en fonction du risque identifié, les informations relatives à ladite apparition suspectée à l'autre Etat membre ou aux autres Etats membres concernés.

## CHAPITRE 5. - Confirmation de la contamination

Art. 5. § 1er. Si les tests officiels ou officiellement contrôlés, effectués en laboratoire selon la méthode pertinente décrite à l'annexe II, pour le matériel végétal énuméré, ou, dans tous les autres cas, selon toute autre méthode officiellement agréée, confirment la présence de l'organisme dans un échantillon prélevé conformément au présent arrêté :

a) s'agissant du matériel végétal énuméré, l'Agence :

i) procède à une enquête afin de déterminer l'étendue et la ou les sources primaires de la contamination, conformément aux dispositions de l'annexe IV et en effectuant des tests complémentaires conformément à l'article 4, § 1er, sur, au moins, tous les stocks de plants de pommes de terre liés par clonage, et

ii) déclare contaminés

1° le matériel végétal énuméré, l'envoi et/ou le lot d'où l'échantillon a été prélevé, ainsi que le matériel, le véhicule, le récipient, l'entrepôt ou des parties de ceux-ci et tout autre objet, y compris les emballages qui ont été en contact avec le matériel végétal énuméré d'où l'échantillon a été prélevé;

2° le cas échéant, le(s) champ(s), unité(s) de production de cultures protégées et lieu(x) de production où le matériel végétal a été récolté et d'où l'échantillon a été prélevé;

3° et, pour les échantillons prélevés en cours de végétation, le(s) champ(s), lieu(x) de production et, le cas échéant, unité(s) de production de cultures protégées d'où l'échantillon a été prélevé, et

iii) détermine, conformément aux dispositions de l'annexe V, point 1, l'étendue de la contamination probable, soit par contact avant ou après la récolte avec des éléments déclarés contaminés, soit par des liens avec ceux-ci au travers du système de production, d'irrigation ou de pulvérisation, soit par une relation clonale, et

iv) délimite une zone sur la base de la déclaration de contamination visée au ii), de la détermination de l'étendue de la contamination probable visée au iii) et de la propagation possible de l'organisme, conformément aux dispositions de l'annexe V, point 2, sous i);

b) s'agissant des cultures de plantes hôtes autres que celles mentionnées au a) et lorsque la production du matériel végétal énuméré est identifiée comme soumise à un risque, l'Agence :

i) effectue une enquête conformément au a), i), et

ii) déclare contaminées les plantes hôtes de l'organisme d'où l'échantillon a été prélevé, et

iii) détermine l'étendue de la contamination probable et délimite une zone conformément aux a), iii) et a), iv), respectivement, en ce qui concerne la production du matériel végétal énuméré;

c) s'agissant des eaux de surface (y compris les effluents liquides d'entreprises de transformation industrielle ou de conditionnement traitant du matériel végétal énuméré) et des plantes hôtes sauvages associées appartenant à la famille des solanacées, lorsque la production du matériel végétal énuméré est identifiée comme soumise à un risque, que ce soit par irrigation, par pulvérisation ou par submersion par les eaux de surface, l'Agence :

i) effectue une enquête, y compris des recherches officielles à des moments opportuns sur des échantillons d'eaux de surface et de plantes hôtes sauvages de la famille des solanacées éventuellement présentes, afin d'établir l'étendue de la contamination, et

ii) déclare contaminées les eaux de surface d'où le ou les échantillons ont été prélevés, dans la mesure appropriée et sur la base de l'enquête visée au i), et

iii) détermine l'étendue de la contamination probable sur la base de la déclaration de contamination visée au ii) et de la propagation possible de l'organisme, en tenant compte des dispositions de l'annexe V, point 1 et point 2, ii).

Pour l'application des a), b) et c), l'Agence tient compte de principes scientifiques fondés, des caractéristiques biologiques de l'organisme et des systèmes particuliers de production, de commercialisation et de transformation des plantes hôtes de l'organisme en usage.

§ 2. Le Ministre délimite les zones sur la base de la détermination de l'étendue de la contamination prévue au paragraphe 1er, c)

§ 3. A la suite de la notification par un autre Etat membre, conformément aux dispositions de l'article 5, paragraphe 2, de la Directive précitée 98/57/CE du Conseil du 20 juillet 1998, d'une contamination visant la Belgique, l'Agence procède à une enquête conformément au paragraphe 1er, a), i) et, s'il y a

lieu, au paragraphe 1er, c), i) et mène toute action complémentaire appropriée conformément au paragraphe 1er.

## CHAPITRE 6. - Mesures de lutte spécifiques

Art. 6. § 1er. Le matériel végétal énuméré déclaré contaminé conformément à l'article 5, § 1er, a), ii), ne peut pas être planté et est soumis, sous le contrôle de l'Agence, à l'une des dispositions de l'annexe VI, point 1, de telle sorte qu'il soit établi qu'il n'existe aucun risque identifiable de propagation de l'organisme.

§ 2. Le matériel végétal énuméré déclaré probablement contaminé conformément à l'article 5 § 1er, a), iii) et c), iii), comprenant le matériel végétal énuméré pour lequel un risque a été identifié, produit sur les lieux de production déclarés probablement contaminés conformément à l'article 5, § 1er, a), iii), ne peut pas être planté et est, sous le contrôle de l'Agence, utilisé ou éliminé de la manière appropriée précisée à l'annexe VI, point 2, de telle sorte qu'il soit établi qu'il n'existe aucun risque identifiable de propagation de l'organisme.

§ 3. Le matériel, les véhicules, les récipients, les entrepôts ou des parties de ceux-ci, et tout autre objet, y compris les emballages, déclarés contaminés conformément à l'article 5, § 1er, a), ii), ou déclarés probablement contaminés conformément à l'article 5, § 1er, a), iii) et c), iii), doivent être détruits ou décontaminés selon des méthodes appropriées précisées à l'annexe VI, point 3. Après décontamination, ces objets ne sont plus considérés comme contaminés.

§ 4. Sans préjudice des mesures mises en oeuvre en application des paragraphes 1er, 2 et 3, diverses mesures, définies à l'annexe VI, points 4.1 et 4.2, et à l'annexe VII sont mises en oeuvre dans la zone délimitée conformément à l'article 5, § 1er, a), iv).

§ 5. Sans préjudice des mesures mises en oeuvre en application des paragraphes 1er, 2 et 3, les mesures, détaillées à l'annexe VI, point 4.2. et à l'annexe VII, sont mises en oeuvre dans la zone délimitée conformément à l'article 5, § 2 .

§ 6. Afin de prévenir tout risque identifiable de propagation de l'organisme, l'élimination des déchets respecte les conditions fixées dans l'annexe VII de la Directive précitée 98/57/CE du Conseil du 20 juillet 1998.

## CHAPITRE 7. - Matériel de reproduction

Art. 7. § 1er Sans préjudice des dispositions de l'arrêté royal du 10 août 2005, les plants de pommes de terre doivent provenir en ligne directe de matériel qui a été obtenu dans le cadre d'un programme officiellement approuvé et qui a été déclaré indemne de l'organisme à la suite de tests effectués officiellement ou sous contrôle officiel, selon la méthode décrite à l'annexe II.

§ 2. Les tests visés au paragraphe 1er sont effectués :

a) lorsque la découverte de l'organisme a été confirmée dans la production belge de plants de pommes de terre :

i) par des tests portant sur les générations antérieures, y compris la sélection clonale initiale, et par des tests systématiques sur les clones de pommes de plants de terre de base, ou

ii) lorsque l'absence de relation clonale a été établie, par des tests sur tous les clones de plants de pommes de terre de base ou sur les générations antérieures, y compris la sélection clonale initiale,

b) dans les autres cas, soit sur chaque plante de la sélection clonale initiale, soit sur des échantillons représentatifs des plants de pommes de terre de base ou des générations antérieures.

#### CHAPITRE 8. - Mesures complémentaires

Art. 8. Le Ministre peut adopter des mesures complémentaires ou plus rigoureuses requises pour la lutte contre l'organisme ou la prévention de sa propagation, pour autant qu'elles respectent les dispositions de l'arrêté royal du 10 août 2005.

#### CHAPITRE 9. - Dispositions abrogatoires

Art. 9. § 1er . Sont abrogés :

a) l'arrêté ministériel du 30 août 1999 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

b) les articles 2 et 3 de l'arrêté ministériel du 14 février 2000 déterminant des mesures afin d'éviter la propagation de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

#### CHAPITRE 10. - Disposition d'exécution

Art. 10. Le ministre qui a la Sécurité de la Chaîne alimentaire dans ses attributions est chargé de l'exécution du présent arrêté.

Donné à Bruxelles le 26 janvier 2014.

PHILIPPE

Par le Roi :

La Ministre de l'Agriculture,

Mme S. LARUELLE

#### Annexe Ire

SECTION Ire. - Liste des plantes hôtes de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. visées à l'article 2

Végétaux (y compris les tubercules), à l'exception des semences Pomme de terre proprement dites de l'espèce *Solanum tuberosum* L.

Végétaux, à l'exception des semences et des fruits de l'espèce Tomate *Lycopersicon lycopersicum* L. Karsten ex Farw.

#### SECTION II. - Recherches

Les recherches officielles visées à l'article 3, § 2, a), sont fondées sur les caractéristiques biologiques de l'organisme et des systèmes particuliers de production et comprennent:

i) dans le cas de la pomme de terre:

a) à des moments opportuns, une inspection visuelle de la culture en phase de croissance et/ou un prélèvement d'échantillons de plants de pommes de terre et d'autres pommes de terre, en cours de végétation ou stockées; ces échantillons sont soumis à une inspection visuelle, officielle ou officiellement contrôlée, sur tubercules coupés, et

b) dans le cas des plants de pommes de terre et, le cas échéant, des autres pommes de terre, des tests en laboratoire officiels ou officiellement contrôlés, suivant la méthode décrite à l'annexe II;

ii) dans le cas de la tomate:

a) une inspection visuelle, à des moments opportuns, au moins de la culture en phase de croissance de plants destinés à être replantés pour un usage professionnel.

Vu pour être annexé à notre arrêté du 26 janvier 2014 relatif à la lutte contre la pourriture brune de la pomme de terre (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.)

PHILIPPE

Par le Roi :

La Ministre de l'Agriculture

Mme S. LARUELLE

## Annexe II

Procédure de test pour diagnostiquer, détecter et identifier *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

### DOMAINE D'APPLICATION DE LA PROCEDURE

La procédure présentée ci-dessous décrit les différentes étapes à suivre pour:

i) diagnostiquer le flétrissement bactérien sur les tubercules de pomme de terre et sur les plantes de pomme de terre et de tomate et quelques autres plantes hôtes;

ii) détecter *Ralstonia solanacearum* dans des échantillons de tubercules de pomme de terre, de plants de pommes de terre, de tomates et d'autres hôtes, dans l'eau ou dans le sol;

iii) identifier *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

### PRINCIPES GENERAUX

Les protocoles optimisés pour les différentes méthodes, les réactifs validés et les détails de la préparation du matériel nécessaire aux tests et aux contrôles figurent dans les appendices. Une liste des laboratoires retenus pour l'optimisation et la validation des protocoles est fournie à l'appendice 1.

Etant donné que les protocoles impliquent la détection d'un organisme nuisible à mettre en quarantaine et incluent l'utilisation de cultures viables de *R. solanacearum* en tant que matériels de contrôle, il sera nécessaire de mettre en oeuvre les procédures dans des conditions de quarantaine appropriées prévoyant des installations adéquates d'élimination des déchets et dans les conditions des licences appropriées délivrées par les autorités officielles de quarantaine.

Les paramètres des tests doivent garantir une détection cohérente et reproductible des niveaux de *R. solanacearum* aux seuils fixés par les méthodes sélectionnées.

La préparation précise de témoins positifs est impérative.

La réalisation des tests selon les seuils requis implique également l'établissement de paramètres corrects, la maintenance et l'étalonnage des équipements, la manipulation et la conservation soigneuses des réactifs et toutes les mesures visant à empêcher la contamination entre échantillons, par exemple la séparation des témoins positifs et des échantillons des tests. Des normes de contrôle de la qualité doivent être appliquées pour éviter des erreurs administratives et autres, notamment en ce qui concerne l'étiquetage et la documentation.

L'apparition suspectée au sens de l'article 4, paragraphe 2, de la Directive 98/57/CE implique un résultat positif des tests de diagnostic ou de dépistage réalisés sur un échantillon comme précisé dans les diagrammes fonctionnels ci-après. Un premier test de dépistage positif (test IF, PCR/FISH, isolement sélectif) doit être confirmé par un deuxième test de dépistage fondé sur un autre principe biologique.

Si le premier test de dépistage est positif, la contamination par *R. solanacearum* est suspectée et un deuxième test de dépistage doit être réalisé. Si le deuxième test de dépistage est positif, la suspicion est confirmée (apparition suspectée) et les tests suivant la procédure doivent être poursuivis. Si le deuxième test de dépistage est négatif, l'échantillon est considéré comme non contaminé par *R. solanacearum*.

La présence confirmée visée à l'article 5, paragraphe 1er, de la Directive 98/57/CE implique l'isolement et l'identification d'une culture pure de *R. solanacearum* avec confirmation de la pathogénicité.

#### SECTION Ire. - Application de la procédure de test

1. Procédure de détection pour diagnostiquer le flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*) sur les tubercules de pomme de terre et sur les plantes de pomme de terre et de tomate ou d'autres plantes hôtes présentant des symptômes de flétrissement bactérien

La procédure de test concerne les tubercules de pomme de terre et les plantes présentant des symptômes typiques du flétrissement bactérien ou permettant de soupçonner sa présence. Elle comporte un test rapide de dépistage, l'isolement de l'agent pathogène à partir du tissu vasculaire infecté sur un milieu (sélectif) et, en cas de résultat positif, l'identification de la culture comme étant *Ralstonia solanacearum*.

Pour la consultation du tableau, voir image

2. Procédure pour détecter et identifier *Ralstonia solanacearum* sur des échantillons de tubercules de pomme de terre asymptomatiques

#### Principe

La procédure de test vise à détecter des infections latentes de tubercules de pomme de terre. Un résultat positif d'au moins deux tests de dépistage (3) fondés sur des principes biologiques différents doit être complété par l'isolement de l'agent pathogène, suivi, en cas d'isolement de colonies



caractéristiques, de la confirmation d'une culture pure comme étant *R. solanacearum*. Un résultat positif d'un seul test de dépistage n'est pas suffisant pour considérer l'échantillon comme suspect.

Les tests de dépistage et les tests d'isolement doivent permettre de détecter 10<sup>3</sup> à 10<sup>4</sup> cellules/ml d'extrait concentré remis en suspension, inclus comme témoins positifs dans chaque série de tests.

Pour la consultation du tableau, voir image

SECTION II. - Méthodes détaillées pour détecter *ralstonia solanacearum* sur des tubercules de pomme de terre et des plantes de pomme de terre et de tomate ou d'autres plantes hôtes présentant des symptômes de flétrissement bactérien

## 1. Symptômes

### 1.1. Symptômes sur les pommes de terre

Plante de pomme de terre. Le premier stade de l'infection dans le champ se traduit par un flétrissement des feuilles du haut de la plante à température élevée pendant la journée et un retour à l'aspect normal pendant la nuit. Au cours des premiers stades du flétrissement, les feuilles restent vertes, mais plus tard, un jaunissement et une nécrose brune se développent. L'épinastie apparaît également. Le flétrissement d'une pousse ou de plants entiers devient rapidement irréversible et se termine par l'effondrement et la mort de la plante. On peut observer un brunissement du tissu vasculaire des tiges de plantes flétries coupées transversalement, et un exsudat bactérien laiteux apparaît à la surface de la coupe ou peut en être extrait en pinçant la tige. Lorsqu'une tige coupée est placée dans l'eau verticalement, des filets de productions bactériennes s'écoulent des faisceaux vasculaires.

Tubercule de pomme de terre. Les tubercules de pomme de terre doivent être coupés transversalement, près du talon (stolon) ou longitudinalement jusqu'au stolon. Le premier stade de l'infection se traduit par une coloration jaune vitreux à brun clair de l'anneau vasculaire, d'où émerge un suintement bactérien crémeux pâle spontanément après quelques minutes. Par la suite, la décoloration vasculaire devient plus nettement brune, et la nécrose s'étend parfois au tissu parenchymateux. Aux stades avancés, l'infection se propage à partir du talon et des yeux, et un liquide bactérien peut suinter, provoquant l'adhérence des particules de sol. L'épiderme des tubercules peut alors présenter des lésions brun rougeâtre légèrement concaves en raison de l'effondrement interne du tissu vasculaire. Le développement secondaire de pourritures fongiques et bactériennes est commun aux stades avancés de la maladie.

### 1.2. Symptômes sur les tomates

Plante de tomate. Le premier symptôme visible est la flaccidité des plus jeunes feuilles. Dans des conditions favorables à l'agent pathogène (température du sol d'environ 25 ° C, humidité saturée), l'épinastie et le flétrissement d'un côté de la plante ou de l'ensemble de la plante surviennent en quelques jours et provoquent l'effondrement complet de la plante. Dans des conditions moins favorables (température du sol inférieure à 21 ° C), le flétrissement est moindre, mais un grand nombre de racines adventices peuvent se développer sur la tige. On peut observer le long de la tige des stries imbibées d'eau partant de la base de la tige, qui témoignent de la nécrose du système vasculaire. Lorsque la tige est coupée transversalement, un exsudat bactérien blanc ou jaunâtre s'écoule du tissu vasculaire brun décoloré de celle-ci.

### 1.3. Symptômes sur d'autres hôtes

*Solanum dulcamara* et *S. nigrum*. Dans des conditions naturelles, des symptômes de flétrissement sont rarement observés sur ces hôtes adventices, sauf si les températures du sol sont supérieures à 25 ° C ou si les niveaux d'inoculum sont extrêmement élevés (par exemple : pour *S. nigrum* se développant dans le voisinage de plantes de pomme de terre ou de tomate malades). Lorsque le flétrissement apparaît, les symptômes sont pareils à ceux décrits pour la tomate. Les plants de *S. dulcamara* qui ne se flétrissent pas et se développent avec des tiges et des racines dans l'eau peuvent révéler une légère décoloration brune du tissu vasculaire sur la partie transversale de la base de la tige ou les parties sous eau de la tige. Des bactéries peuvent suinter du tissu vasculaire coupé ou constituer des filets de productions bactériennes si la tige coupée est placée verticalement dans l'eau, même en l'absence de symptômes de flétrissement.

### 2. Tests rapides de dépistage

Des tests rapides de dépistage peuvent faciliter le diagnostic supposé, mais ne sont pas essentiels. Utiliser un ou plusieurs des tests validés suivants :

#### 2.1. Test d'exsudation destiges

(voir section VI.A.1).

#### 2.2. Mise en évidence des granules de poly-β-hydroxybutyrate (PHB)

La coloration au bleu du Nil A ou au noir du Soudan B (voir section VI.A.2) de frottis fixés à la chaleur d'exsudat bactérien de tissu infecté sur une lame de microscope permet de visualiser les granules caractéristiques de PHB présents dans les cellules de *R. solanacearum*.

#### 2.3. Tests de séro-agglutination

(voir section VI.A.3).

#### 2.4. Autres tests

Parmi les autres tests rapides de dépistage, on peut citer le test IF (voir section VI.A.5), le test FISH (voir section VI.A.7), les tests ELISA (voir section VI.A.8) et les tests PCR (voir section VI.A.6).

### 3. Procédure d'isolement

a) Prélever de l'exsudat ou des morceaux de tissu décoloré, soit à partir de l'anneau vasculaire du tubercule de pomme de terre, soit à partir des vaisseaux de la tige de pomme de terre, de tomate ou d'autres plantes hôtes flétries. Mettre en suspension dans un petit volume d'eau distillée stérile ou dans un tampon au phosphate 50 mM (appendice 4). Laisser reposer cinq à dix minutes.

b) Préparer une série de dilutions au dixième de la suspension.

c) Transférer 50-100 µl de la suspension et des dilutions sur un milieu de culture général (NA, YPGA ou SPA; voir appendice 2) et/ou sur le milieu tétrazolium de Kelman (appendice 2), et/ou sur un milieu sélectif validé (par exemple : SMSA; voir appendice 2). Étaler à l'aide d'une technique appropriée par dilution et étalement. Si cela est jugé utile, préparer des boîtes de Petri séparées avec une suspension de cellules diluées appartenant au biovar 2 de *R. solanacearum* comme témoin positif.

d) Incuber les boîtes pendant deux à six jours à 28 ° C.

- Sur le milieu nutritif général, les isolats virulents de *R. solanacearum* forment des colonies fluides, à bord irrégulier, plates, blanchâtres et présentant fréquemment des verticilles caractéristiques au centre. Les formes non virulentes de *R. solanacearum* forment de petites colonies arrondies non fluides, butyreuses, de couleur uniforme blanchâtre.

- Sur le milieu tétrazolium de Kelman et sur le milieu SMSA, les verticilles sont de couleur rouge sang. Les formes non virulentes de *R. solanacearum* forment de petites colonies arrondies non fluides, butyreuses, de couleur uniforme rouge sombre.

#### 4. Tests d'identification de *R. solanacearum*

Les tests permettant de confirmer l'identification d'isolats supposés de *R. solanacearum* sont indiqués dans la section VI.B.

### SECTION III

#### 1. Méthodes détaillées pour détecter et identifier *Ralstonia solanacearum* sur des échantillons de tubercules de pomme de terre asymptomatiques

##### 1.1. Préparation de l'échantillon

Remarques :

- La taille de l'échantillon standard est de deux cents tubercules par test. Un échantillonnage plus intensif implique davantage de tests sur des échantillons de cette taille. Un nombre plus important de tubercules dans l'échantillon entraînera une inhibition ou une interprétation difficile des résultats. Cependant, la procédure peut être appliquée facilement à des échantillons de moins de deux cents tubercules lorsqu'un nombre moins élevé de tubercules est disponible.

- La validation de toutes les méthodes de détection décrites ci-après est fondée sur la réalisation de tests sur des échantillons de deux cents tubercules.

- L'extrait de pomme de terre décrit ci-dessous peut également être utilisé pour détecter la présence de la bactérie responsable du flétrissement bactérien de la pomme de terre, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Prétraitement facultatif préalable à la préparation de l'échantillon :

a) Incuber les échantillons à 25-30 ° C pendant une période pouvant aller jusqu'à deux semaines avant de réaliser les tests afin d'encourager la multiplication de populations éventuelles de *R. solanacearum*.

b) Laver les tubercules en utilisant des désinfectants (composés chlorés lorsque le test PCR doit être utilisé pour éliminer l'ADN pathogène) et des détergents appropriés entre chaque échantillon. Sécher les tubercules à l'air. Cette procédure de lavage est particulièrement utile (mais pas obligatoire) pour les échantillons comportant des particules de sol en excédent et si un test PCR ou une procédure d'isolement direct doivent être mis en oeuvre.

1.1.1. Enlever la peau de chaque tubercule au niveau du talon (stolon) au moyen d'un scalpel ou d'un couteau à légumes propre et désinfecté, de façon à faire apparaître le tissu vasculaire. Découper soigneusement un petit noyau de tissu vasculaire au niveau du talon et prélever aussi peu que possible de tissu non vasculaire.

NB : Mettre de côté les tubercules (en voie de pourrissement) présentant des symptômes de "pourriture brune" suspects et les tester séparément.

Si, au cours du prélèvement du noyau de talon, des symptômes suspects de flétrissement bactérien sont observés, il convient de procéder à une inspection visuelle de ce tubercule et de le couper à proximité du talon. Tout tubercule coupé présentant des symptômes suspects doit être conservé pendant au minimum deux jours à température ambiante afin de permettre une subérisation, et être entreposé réfrigéré (entre 4 et 10 ° C) dans des conditions de quarantaine appropriées. Tous les tubercules, y compris ceux qui présentent des symptômes suspects, doivent être conservés conformément à l'annexe III.

1.1.2. Rassembler les noyaux de talons dans des récipients jetables inutilisés qui peuvent être fermés et/ou scellés (s'il s'agit de récipients réutilisés, ils doivent être nettoyés et désinfectés complètement à l'aide de composés chlorés). Il est préférable de traiter immédiatement les noyaux de talons. Sinon, il convient de les entreposer dans le récipient, sans addition de tampon, pour une période de moins de 72 heures réfrigérés ou de moins de 24 heures à température ambiante.

Traiter les noyaux de talons en suivant l'une des procédures ci-dessous :

a) soit recouvrir les talons avec un volume suffisant (environ 40 ml) de tampon d'extraction (appendice 4) et les placer sur un agitateur rotatif (50-100 tours/minute) pendant 4 heures à une température inférieure à 24 ° C ou réfrigérés pendant 16 à 24 heures;

ou

b) homogénéiser les talons avec un volume suffisant (environ 40 ml) de tampon d'extraction (appendice 4) dans un mixeur (par exemple : Waring ou Ultra Thurax) ou en les broyant dans un sac de macération jetable scellé (par exemple, sac Stomacher ou de type « Bioreba strong gauge polythene » de 150 mm x 250 mm stérilisé par radiations) en utilisant un maillet en caoutchouc ou un dispositif de broyage approprié (par exemple : Homex).

NB : Le risque de contaminations croisées d'échantillons est élevé lorsque les échantillons sont homogénéisés en utilisant un mixeur. Prendre des précautions pour éviter la production d'aérosol ou des débordements pendant le processus d'extraction. Veiller à utiliser des lames de mixeur et des récipients fraîchement stérilisés pour chaque échantillon. En cas d'utilisation du test PCR, éviter le transfert d'ADN sur les récipients ou le dispositif de broyage. Le broyage dans des sacs jetables et l'utilisation de tubes jetables sont recommandés en cas de recours au test PCR

1.1.3. Décanter le liquide surnageant. S'il est excessivement trouble, le clarifier par une centrifugation à basse vitesse (à 180 g au maximum pendant dix minutes, à une température de 4 à 10 ° C) ou par une filtration sous vide (40-100 µm), en lavant le filtre avec un tampon d'extraction supplémentaire (10 ml).

1.1.4. Concentrer la fraction bactérienne par centrifugation à 7 000 g pendant quinze minutes (ou à 10 000 g pendant dix minutes) à une température de 4 à 10 ° C et jeter le surnageant sans déranger l'extrait concentré.

1.1.5. Remettre en suspension l'extrait concentré dans un tampon concentré de 1,5 ml (appendice 4). Utiliser 500 µl pour tester *R. solanacearum*, 500 µl pour *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* et 500 µl à des fins de référence. Ajouter du glycérol stérile à la concentration finale de 10 à 25 % (en volume) aux 500 µl de l'aliquote de référence et à l'aliquote de test restant, homogénéiser au vortex et

stocker à une température de - 16 à - 24 ° C (semaines) ou de - 68 à - 86 ° C (mois). Maintenir les aliquotes de test à une température de 4 à 10 ° C pendant les tests.

Une congélation et un dégel répétés ne sont pas recommandés.

Si le transport de l'extrait est requis, veiller à effectuer la livraison dans une glacière dans un délai de vingt-quatre heures.

1.1.6. Il est impératif que tous les témoins positifs et les échantillons de *R. solanacearum* soient traités séparément afin d'éviter toute contamination, aussi bien pour les lames d'immunofluorescence que pour tous les tests.

## 1.2. Tests

Voir le diagramme et la description des tests et des protocoles optimisés dans les appendices concernés :

Isolement sélectif (voir section VI.A.4)

Test IF (voir section VI.A.5)

Tests PCR (voir section VI.A.6)

Test FISH (voir section VI.A.7)

Tests ELISA (voir section VI.A.8)

Test biologique (voir section VI.A.9)

## 2. Méthodes détaillées pour détecter et identifier *R. solanacearum* dans des échantillons de plantes de pomme de terre et de tomate ou d'autres plantes hôtes asymptomatiques

### 2.1. Préparation de l'échantillon

NB : Pour détecter des populations latentes de *R. solanacearum*, il est conseillé de tester des échantillons composites. La procédure peut facilement être appliquée à des échantillons composites comportant jusqu'à deux cents morceaux de tiges. Lorsque des recherches sont réalisées, elles doivent être fondées sur un échantillon statistiquement représentatif de la population végétale considérée.

2.1.1. Collecter des segments de tiges de 1 à 2 cm dans un récipient stérile fermé suivant les procédures de prélèvement suivantes

Plantules de tomate de pépinière : enlever au moyen d'un couteau propre et désinfecté un segment de 1 cm à la base de chaque tige, juste au-dessus du niveau du sol.

Plantes de tomate cultivées en serre ou en plein champ : enlever au moyen d'un couteau propre et désinfecté la pousse latérale la plus basse de chaque plante en coupant juste au-dessus de la jonction avec la tige principale. Enlever le segment de 1 cm le plus bas de chaque pousse latérale.

Autres hôtes : enlever au moyen d'un couteau ou d'un sécateur propre et désinfecté un segment de 1 cm à la base de chaque tige, juste au-dessus du niveau du sol. Dans le cas de *S. dulcamara* ou d'autres plantes hôtes poussant dans l'eau, enlever des morceaux de 1 à 2 cm des tiges se trouvant sous l'eau ou des stolons ayant des racines aquatiques.

En cas de prélèvement dans un lieu particulier, il est recommandé de tester un échantillon statistiquement représentatif d'au moins dix plants par point de prélèvement de chaque adventice hôte potentiel. La détection de l'agent pathogène sera le plus fiable à la fin du printemps, en été et en automne, bien que des infections naturelles puissent être détectées tout au long de l'année dans les *Solanum dulcamara* pérennantes poussant dans les cours d'eau. Parmi les hôtes connus figurent les plants de pommes de terre spontanés (repousses), *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* et d'autres membres de la famille des solanacées. *Pelargonium* spp. et *Portulaca oleracea* sont également des hôtes. Parmi certaines adventices spp. européennes qui peuvent abriter des populations du biovar 2, race 3 de *R. solanacearum* dans les racines et/ou les rhizosphères dans des conditions environnementales spécifiques, on peut citer *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp, *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans.*, *Tussilago farfarra* et *Urtica dioica*.

NB : Un examen visuel des symptômes internes (coloration vasculaire ou exsudat bactérien) peut être effectué à ce stade. Mettre de côté tout segment de tige présentant des symptômes et le tester séparément (voir section II).

2.1.2. Désinfecter brièvement les segments avec de l'éthanol à 70 % et les sécher immédiatement avec du papier absorbant. Ensuite, traiter les segments de tiges en suivant l'une des procédures ci-dessous :

a) soit recouvrir les segments avec un volume suffisant (environ 40 ml) de tampon d'extraction (appendice 4) et les placer sur un agitateur rotatif (50-100 tours/minute) pendant 4 heures à une température inférieure à 24 ° C ou pendant 16 à 24 heures réfrigérés; ou

b) traiter immédiatement les segments en les broyant dans un sac de macération résistant (par exemple : Stomacher ou Bioreba) avec un volume approprié de tampon d'extraction (appendice 4) en utilisant un maillet en caoutchouc ou un dispositif de broyage approprié (par exemple : Homex). Si ce n'est pas possible, stocker les segments, pas plus de 72 heures réfrigérés ou de 24 heures à température ambiante.

2.1.3. Décanter le surnageant après sédimentation pendant quinze minutes.

2.1.4. Une nouvelle clarification de l'extrait ou du concentré de la fraction bactérienne n'est habituellement pas requise, mais peut être réalisée par filtration et/ou centrifugation selon la méthode décrite dans la section III.1.1.3 à 1.1.5.

2.1.5. Diviser l'extrait d'échantillon initial ou concentré en deux parties égales. Maintenir une moitié à une température de 4 à 10 ° C au cours du test et entreposer l'autre moitié avec 10 à 25 % (en volume) de glycérol stérile à une température de - 16 à - 24 ° C (semaines) ou de - 68 à - 86 ° C (mois) si un test supplémentaire est requis.

## 2.2. Tests

Voir le diagramme et la description des tests et les protocoles optimisés dans les appendices concernés :

Isolement sélectif (voir section VI.A.4)

Test IF (voir section VI.A.5)

Tests PCR (voir section VI.A.6)

Test FISH (voir section VI.A.7)

Tests ELISA (voir section VI.A.8)

Test biologique (voir section VI.A.9)

## SECTION IV

### 1. Procédure pour détecter et identifier *R. solanacearum* dans l'eau

Pour la consultation du tableau, voir image

### 2. Méthodes pour détecter et identifier *R. solanacearum* dans l'eau

#### Principe

La procédure de détection validée décrite dans la présente section est applicable pour la détection de l'agent pathogène dans les échantillons d'eaux de surface et peut également être utilisée pour tester les échantillons d'effluents issus de la transformation de pommes de terre ou d'effluents d'eaux usées. Cependant, il importe de noter que la sensibilité prévue de la détection variera avec le substrat. La sensibilité du test d'isolement est perturbée par des populations de bactéries saprophytes concurrentes qui sont généralement beaucoup plus importantes dans les effluents issus de la transformation de pommes de terre et les effluents d'eaux usées que dans les eaux de surface. Alors que la procédure ci-après ne doit détecter que 103 cellules/l dans les eaux de surface, la sensibilité de la détection dans les effluents issus de la transformation de pommes de terre ou les effluents d'eaux usées est susceptible d'être considérablement plus faible. Pour cette raison, il est recommandé de tester les effluents après les traitements de purification éventuels (par exemple : sédimentation ou filtration) au cours desquels les populations de bactéries saprophytes sont réduites. Les limitations de la sensibilité de la procédure de test doivent être envisagées lors de l'évaluation de la fiabilité des résultats négatifs obtenus, le cas échéant. Tandis que cette procédure a été couronnée de succès lors de son utilisation dans des études visant à déterminer la présence ou l'absence de l'agent pathogène dans les eaux de surface, ses limitations doivent être prises en considération lorsqu'elle est utilisée dans des travaux semblables concernant les effluents issus de la transformation de pommes de terre ou les effluents d'eaux usées.

#### 2.1. Préparation de l'échantillon

Remarques :

- La détection de *R. solanacearum* dans les eaux de surface est plus fiable à la fin du printemps, en été et en automne, lorsque la température de l'eau est supérieure à 15 ° C.
- Le fait de recommencer le prélèvement à des moments différents au cours de la période susmentionnée dans des points de prélèvement désignés augmentera la fiabilité de la détection en réduisant les conséquences des variations climatiques.
- Tenir compte des conséquences de pluies abondantes et de la géographie du cours d'eau afin d'éviter des effets de dilution importants qui peuvent occulter la présence de l'agent pathogène.
- Prélever des échantillons d'eaux de surface à proximité de plantes hôtes si ces plantes hôtes sont présentes.

2.1.1. Dans des points de prélèvement sélectionnés, collecter des échantillons d'eau en remplissant des tubes ou des bouteilles stériles jetables à une profondeur si possible supérieure à 30 cm et à une distance maximale de 2 m de la berge. Pour les effluents issus de la transformation de pommes de terre ou les effluents d'eaux usées, collecter des échantillons au point de rejet des effluents. La taille des échantillons recommandée va jusqu'à 500 ml par point de prélèvement. Si la préférence est donnée à des échantillons plus modestes, il est conseillé de prélever des échantillons au moins à trois reprises par point de prélèvement, chaque échantillon consistant en deux sous-échantillons répliqués d'au moins 30 ml. Pour une étude intensive, sélectionner au minimum trois points de prélèvement pour 3 km de cours d'eau et veiller à ce que les affluents du cours d'eau fassent également l'objet d'un prélèvement.

2.1.2. Transporter les échantillons dans des conditions d'obscurité et à basse température (4-10° C) et tester dans un délai de vingt-quatre heures

2.1.3. Au besoin, la fraction bactérienne peut être concentrée par l'une des méthodes suivantes :

a) Centrifuger 30-50 ml de sous-échantillons à 10 000 g pendant dix minutes (ou à 7 000 g pendant quinze minutes), de préférence à une température de 4 à 10 ° C, éliminer le surnageant et remettre en suspension l'extrait concentré dans un tampon concentré de 1 ml (appendice 4).

b) Filtration sur membrane (dimension minimale des pores de 0,45 µm) suivie du lavage du filtre dans 5-10 ml de tampon concentré et rétention des solutions de lavage. Cette méthode convient à de grands volumes d'eau contenant un petit nombre de saprophytes.

La concentration n'est généralement pas recommandée pour les échantillons d'effluents issus de la transformation de pommes de terre ou d'effluents d'eaux usées, étant donné que des populations plus importantes de bactéries saprophytes concurrentes auront un effet inhibiteur sur la détection de *R. solanacearum*.

## 2.2. Tests

Voir le diagramme et la description des tests dans les appendices concernés.

## SECTION V

### 1. Procédure pour détecter et identifier *R. solanacearum* dans le sol

Pour la consultation du tableau, voir image

### 2. Méthodes pour détecter et identifier *R. solanacearum* dans le sol

#### Principes

La procédure de détection validée décrite dans la présente section est applicable pour la détection de l'agent pathogène dans des échantillons de sol, mais peut également être utilisée pour tester les échantillons de déchets solides issus de la transformation de pommes de terre ou de boues d'épuration. Cependant, il convient de noter que ces méthodes ne sont pas assez sensibles pour garantir la détection de populations faibles et/ou inégalement dispersées de *R. solanacearum* pouvant apparaître dans des échantillons naturellement contaminés de ces substrats.



Les limitations de la sensibilité de cette procédure de test doivent être envisagées lors de l'évaluation de la fiabilité de résultats négatifs obtenus et également lors de son utilisation dans des études visant à déterminer la présence ou l'absence de l'agent pathogène dans les sols ou les boues. Le test le plus fiable de détection de la présence de l'agent pathogène dans le sol d'un champ est de planter un hôte sensible et de surveiller son infection éventuelle, mais même avec cette méthode, de faibles degrés de contamination échapperont à la détection.

## 2.1. Préparation de l'échantillon

2.1.1. Le prélèvement de sol du champ doit suivre les normes fondamentales utilisées pour le prélèvement de nématodes. Collecter de 0,5 à 1 kg de sol par échantillon dans soixante sites pour 0,3 ha à une profondeur de 10 à 20 cm (ou dans un tamis de 7 X 7 mètres). Si l'on soupçonne la présence de l'agent pathogène, accroître le nombre de points de collecte à 120 pour 0,3 ha. Maintenir les échantillons à une température de 12 à 15 ° C avant le test. Prélever les boues issues de la transformation de pommes de terre et les boues d'épuration en collectant au total 1 kg dans des sites représentant le volume total de boues à tester. Bien mélanger chaque échantillon avant le test.

2.1.2. Disperser les sous-échantillons de 10 à 25 g de sol ou de boue avec un agitateur rotatif (250 tours/minute) dans un tampon d'extraction de 60 à 150 ml (appendice 4) pendant deux heures au maximum. Au besoin, l'ajout de 0,02 % de Tween-20 stérile et de 10 à 20 g de gravier stérile peut favoriser la dispersion.

2.1.3. Maintenir la suspension à 4 ° C pendant le test.

## 2.2. Tests

Voir le diagramme et la description des tests dans les appendices concernés.

## SECTION VI. - Protocoles optimisés pour détecter et identifier *R. solanacearum*

### A. DIAGNOSTIC ET TESTS DE DETECTION

#### 1. Test d'exsudation des tiges

La présence de *R. solanacearum* dans des tiges de pommes de terre, de tomates ou d'autres plantes hôtes flétries peut être mise en évidence en procédant au simple test de présomption suivant : sectionner la tige juste au-dessus du sol. Suspendre l'extrémité sectionnée dans un tube d'eau propre. Observer l'écoulement spontané et caractéristique de filets de productions bactériennes des faisceaux vasculaires coupés après quelques minutes.

#### 2. Mise en évidence des granules de poly-B-hydroxybutyrate

1. Préparer, sur une lame de microscope, un frottis à partir de l'exsudat bactérien du tissu infecté ou préparer un frottis à partir d'une culture de 48 heures sur gélose au levure-peptone-glucose (YPGA) ou à la peptone (SPA) (appendice 2).

2. Préparer des frottis témoins positifs obtenus avec une souche du biovar 2 de *R. solanacearum* et, si cela est jugé utile, un frottis témoin négatif d'un PHB négatif connu.

3. Laisser sécher et passer rapidement le côté inférieur de chaque lame dans une flamme jusqu'à ce que le frottis soit fixé.

4. Colorer la préparation au bleu du Nil ou au noir du Soudan et observer au microscope de la manière décrite ci-après.

#### Test au bleu du Nil

- a) Recouvrir chaque lame d'une solution aqueuse à 1 % de bleu du Nil A. Incuber dix minutes à 55 ° C.
- b) Egoutter la solution colorante. Laver rapidement sous un filet d'eau courante. Enlever l'eau excédentaire avec du papier absorbant.
- c) Recouvrir le frottis dans une solution aqueuse d'acide acétique à 8 % et incuber une minute à température ambiante.
- d) Laver rapidement sous un filet d'eau courante. Enlever l'eau excédentaire avec du papier absorbant.
- e) Réhumecter en déposant une goutte d'eau et recouvrir d'une lamelle.
- f) Examiner le frottis coloré au microscope à épifluorescence sous un film d'huile de 450 nm, à un grossissement de 600 à 1 000, en utilisant un objectif à immersion dans l'huile ou dans l'eau.
- g) Observer la fluorescence orange vif des granules de PHB. Faire également des observations en lumière normale afin de vérifier le caractère intracellulaire des granules; vérifier que la morphologie des cellules est caractéristique de *R. solanacearum*.

#### Test au noir du Soudan

- a) Recouvrir chaque lame avec une solution de noir du Soudan B à 0,3 % dans de l'éthanol à 70 % et incuber dix minutes à température ambiante.
- b) Egoutter la solution colorante et laver rapidement à l'eau courante, enlever l'eau excédentaire avec du papier absorbant.
- c) Plonger rapidement les lames dans du xylol et sécher avec du papier absorbant. Attention, le xylol est un produit dangereux; prendre les précautions nécessaires et travailler sous une hotte de chimiste.
- d) Recouvrir les lames dans une solution aqueuse de safranine à 0,5 % et laisser dix secondes à température ambiante. Attention, la safranine est un produit dangereux; prendre les précautions nécessaires et travailler sous une hotte de chimiste.
- e) Laver sous un filet d'eau courante, sécher avec du papier absorbant et recouvrir d'une lamelle.
- f) Examiner le frottis coloré au microscope à immersion sous un film d'huile, à un grossissement de 1 000, sous lumière transmise normale en utilisant un objectif à immersion dans l'huile.
- g) Observer la coloration bleu noir des granules de PHB dans les cellules de *R. solanacearum*; les parois des cellules sont colorées en rose.

### 3. Tests de séro-agglutination

L'agglutination des cellules de *R. solanacearum* sur l'exsudat bactérien ou les extraits de tissus symptomatiques s'observe le mieux en utilisant des anticorps validés (voir appendice 3) étiquetés par des marqueurs colorés appropriés tels que les cellules de *Staphylococcus aureus* rouge ou des

particules de latex colorées. En cas d'utilisation d'un matériel disponible dans le commerce (voir appendice 3), suivre les instructions des producteurs. Sinon, suivre la procédure suivante :

- a) Mélanger les gouttes d'une suspension d'anticorps et d'exsudat bactérien marqués (environ 5 E l dans chaque cas) sur les fenêtres de lames de test multipuits.
- b) Préparer des témoins positifs et négatifs en utilisant des suspensions de biovar 2 de *R. solanacearum* et une souche hétérologue.
- c) Observer l'agglutination dans les échantillons positifs après avoir mélangé doucement pendant quinze secondes.

#### 4. Isolement sélectif

##### 4.1. Etalement sur milieu sélectif

NB : Avant d'utiliser cette méthode pour la première fois, réaliser des tests préliminaires pour garantir une détection reproductible des 10<sup>3</sup> à 10<sup>4</sup> unités formant des colonies de *R. solanacearum* par ml ajouté aux extraits des échantillons dont les tests antérieurs étaient négatifs.

Utiliser un milieu sélectif validé approprié, par exemple : SMSA (modifié par Elphinstone et al., 1996; voir appendice 2).

Il faut veiller également à différencier *R. solanacearum* des autres bactéries susceptibles de développer des colonies sur le milieu. En outre, les colonies de *R. solanacearum* peuvent présenter une morphologie atypique si les boîtes sont surpeuplées ou si des bactéries antagonistes sont également présentes. Lorsque l'on suspecte des effets de concurrence ou d'antagonisme, l'échantillon doit faire l'objet d'un nouveau test en utilisant un test différent.

La plus grande sensibilité de détection par cette méthode peut être attendue lorsqu'on utilise des extraits d'échantillons fraîchement préparés. Cependant, la méthode est également applicable pour une utilisation avec des extraits qui ont été stockés sous du glycérol entre - 68 et - 86 ° C.

Comme témoins positifs, préparer des dilutions au dixième d'une suspension de 10<sup>6</sup> ufc/ml d'une souche virulente de biovar 2 de *R. solanacearum* (par exemple : NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Pour éviter toute possibilité de contamination, préparer des témoins positifs de manière totalement séparée des échantillons à tester.

Pour chaque lot nouvellement préparé de milieu sélectif, il y a lieu de tester s'il convient pour la croissance de l'agent pathogène avant de l'utiliser pour tester des échantillons de routine.

Tester le matériel de contrôle de la même façon que les échantillons.

4.1.1. Effectuer le test avec une technique appropriée par dilution et étalement visant à garantir la dilution de toute population formant des colonies de saprophytes. Etaler 50-100 NE l par boîte d'extrait d'échantillon et chaque dilution.

4.1.2. Incuber les boîtes à 28 ° C. Relever les observations après 48 heures et ensuite quotidiennement pendant une durée allant jusqu'à six jours. Les colonies caractéristiques de *R. solanacearum* sur le milieu nutritif SMSA sont de couleur blanc laiteux, plates, irrégulières et fluides, et après trois jours d'incubation prennent une coloration rose à rouge sang au centre, présentant des stries internes ou des verticilles .

NB : Des colonies atypiques de *R. solanacearum* se constituent parfois sur ce milieu. Elles peuvent être petites, entièrement rouges et non fluides ou seulement partiellement fluides et donc difficiles à distinguer des bactéries saprophytes formant des colonies.

4.1.3. Purifier les colonies supposées de *R. solanacearum* après étalement ou dilution et étalement sur un milieu nutritif général pour obtenir des colonies isolées (voir appendice 2).

4.1.4. Les cultures peuvent être stockées à court terme dans de l'eau stérile (pH 6-8, sans chlore) à température ambiante et dans l'obscurité ou à long terme dans un milieu cryoprotecteur approprié entre - 68 et - 86 ° C ou lyophilisées.

4.1.5. Identifier les cultures supposées (voir section VI.B) et réaliser un test de pathogénicité (voir section VI.C).

#### Interprétation des résultats du test de dilution-étalement

Le test de dilution-étalement est négatif si aucune colonie bactérienne n'est apparue au bout de six jours ou si aucune colonie caractéristique de *R. solanacearum* n'est isolée, sous réserve qu'aucune inhibition ne soit soupçonnée en raison de la concurrence ou de l'antagonisme d'autres bactéries et que des colonies caractéristiques de *R. solanacearum* soient isolées à partir des témoins positifs.

Le test de dilution-étalement est positif si l'on peut isoler des colonies supposées de *R. solanacearum*.

#### 4.2. Procédure d'enrichissement

Utiliser un milieu d'enrichissement validé tel que le bouillon nutritif modifié de Wilbrink (voir appendice 2).

Cette procédure peut être utilisée pour accroître sélectivement les populations de *R. solanacearum* dans des extraits d'échantillons et améliorer la sensibilité de détection. La procédure permet également la dilution des inhibiteurs de la réaction PCR (1:100). Il convient cependant de noter que l'enrichissement de *R. solanacearum* peut échouer en raison de la concurrence ou de l'antagonisme d'organismes saprophytes qui sont souvent enrichis simultanément. Par conséquent, l'isolement de *R. solanacearum* dans des bouillons de culture enrichis peut se révéler difficile. En outre, comme les populations de saprophytes sérologiquement proches peuvent être augmentées, l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques en lieu et place d'anticorps polyclonaux est recommandée en cas d'utilisation du test ELISA.

4.2.1. Pour l'enrichissement PCR, verser 100 NE l d'extrait d'échantillon dans 10 ml de milieu nutritif liquide d'enrichissement (appendice 2) précédemment aliquoté dans des tubes ou des flacons exempts d'ADN. Pour l'enrichissement ELISA, des proportions plus importantes de milieu nutritif liquide peuvent être utilisées (par exemple : 100 NE l dans 1,0 ml de milieu nutritif liquide d'enrichissement).

4.2.2. Incuber pendant soixante-douze heures entre 27 et 30 ° C dans une culture agitée ou statique sans refermer hermétiquement les bouchons pour permettre l'aération.

4.2.3. Bien mélanger avant d'utiliser pour des tests ELISA ou PCR.

4.2.4. Traiter le milieu nutritif liquide d'enrichissement de la même manière que les échantillons dans les tests ci-dessus.

NB : Si une inhibition ou un enrichissement de *R. solanacearum* est prévu en raison de populations importantes de certaines bactéries saprophytes concurrentes, l'enrichissement d'extraits d'échantillons avant toute centrifugation ou autres actions de concentration peut donner de meilleurs résultats.

## 5. Test d'immunofluorescence

### Principe

Compte tenu de sa capacité reconnue à atteindre les seuils requis, il est recommandé d'utiliser le test d'immunofluorescence comme principal test de dépistage.

Si le test d'immunofluorescence est utilisé comme principal test de dépistage et qu'il produit un résultat positif, il y a lieu de pratiquer un test d'isolement, un test PCR ou un test FISH à titre de test secondaire. Si le test d'immunofluorescence est utilisé comme test secondaire et qu'il produit un résultat positif, l'analyse doit être complétée par des tests supplémentaires comme indiqué dans le diagramme fonctionnel.

NB : Utiliser une source validée d'anticorps de *R. solanacearum*. Il est recommandé de déterminer le titre pour chaque nouveau lot d'anticorps. Le titre est défini comme la plus haute dilution à laquelle on obtient une réaction optimale lorsqu'on teste une suspension contenant entre 10<sup>5</sup> et 10<sup>6</sup> cellules/ml d'une souche homologue de *R. solanacearum* en utilisant un conjugué approprié d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), conformément aux recommandations du fabricant. Les antisérums polyclonaux validés ont tous un titre d'immunofluorescence d'au moins 1:2 000. Lors du test, les dilutions de travail des anticorps doivent être approximativement égales ou égales à celles du titre.

Le test doit être effectué sur des extraits d'échantillon fraîchement préparés. Le cas échéant, il peut être valablement pratiqué sur des extraits conservés en solution de glycérol à une température de - 68 ° C à - 86 ° C Le glycérol peut être séparé de l'échantillon par l'ajout de 1 ml de tampon concentré (voir appendice 4), recentrifugation pendant quinze minutes à 7 000 g et remise en suspension dans le même volume de tampon concentré. Cela est rarement nécessaire, particulièrement si les échantillons sont fixés aux lames par flambage.

Préparer des lames témoins positives distinctes d'une souche homologue ou de toute autre souche de référence de *R. solanacearum*, en suspension dans l'extrait de pomme de terre, comme indiqué à l'appendice 3B et, à titre facultatif, dans le tampon.

Du tissu naturellement infecté (conservé par lyophilisation ou congélation entre - 16 et - 24 ° C) devrait, dans la mesure du possible, être utilisé à titre de témoin similaire sur la même lame.

Comme témoins négatifs, des aliquotes d'extraits d'échantillons qui ont donné précédemment des résultats négatifs aux tests de détection de *R. solanacearum* peuvent être utilisés.

Les matériels de contrôle normalisés positifs et négatifs disponibles pour une utilisation avec ce test sont énumérés à l'appendice 3.

Utiliser des lames pour microscope multipuits comportant de préférence dix fenêtres d'au moins 6 mm de diamètre.

Tester le matériel de contrôle de la même façon que les échantillons.

### 5.1. Préparer les lames de teste nutilisant l'une des méthodes suivantes

i) Extraits concentrés contenant relativement peu d'amidon :

Déposer à la pipette un volume standard (15 NE l est une quantité suffisante pour un diamètre de fenêtre de 6 mm - choisir une quantité plus importante pour les fenêtres de plus grand diamètre) d'une dilution au 1/100e d'extrait concentré de pomme de terre remis en suspension sur la première fenêtre. Ensuite, déposer à la pipette un volume similaire d'extrait concentré non dilué (1/1) sur les fenêtres restantes de la rangée. La deuxième rangée peut servir de double ou pour un deuxième échantillon, comme indiqué à la figure 1.

ii) Dans le cas des autres extraits concentrés :

Préparer des dilutions décimales (1/10, 1/100) de l'extrait concentré remis en suspension dans le tampon concentré. Déposer à la pipette sur une rangée de fenêtres un volume standard (15 NE l est une quantité suffisante pour un diamètre de fenêtre de 6 mm - choisir une quantité plus importante pour les fenêtres de plus grand diamètre) de l'extrait concentré remis en suspension et de chaque dilution. La deuxième rangée peut servir de double ou pour un deuxième échantillon, comme indiqué à la figure 2.

5.2. Laisser sécher les gouttelettes à température ambiante ou en chauffant à une température de 40 à 45 ° C. Fixer les cellules bactériennes sur la lame en chauffant (quinze minutes à 60 ° C), en passant à la flamme, avec de l'éthanol à 95 % ou suivant les instructions spécifiques des fournisseurs des anticorps.

Au besoin, les lames fixées peuvent alors être réfrigérées et stockées dans une boîte à dessiccation pendant le temps nécessaire (au maximum trois mois) avant un nouveau test.

### 5.3. Procédure du test d'immunofluorescence

i) Conformément à la méthode de préparation des lames de test indiquée au point 5.1.i) :

Préparer une série de dilutions au demi. Le premier puits devrait avoir 1/2 du titre (T/2), les autres 1/4 du titre (T/4), 1/2 du titre (T/2), le titre (T) et deux fois le titre (2T).

ii) Conformément à la méthode de préparation des lames de test indiquée au point 5.1.ii) :

Préparer la dilution de travail de l'anticorps dans un tampon pour immunofluorescence. La dilution de travail a un effet sur la spécificité.

Pour la consultation du tableau, voir image

5.3.1. Disposer les lames sur du papier absorbant humide. Couvrir complètement chaque fenêtre de test avec une ou des dilutions d'anticorps. La quantité d'anticorps appliquée sur chaque fenêtre doit être au moins équivalente à la quantité d'extrait appliquée.

La procédure suivante devrait être mise en oeuvre en l'absence d'instructions spécifiques des fournisseurs des anticorps :

5.3.2. Incuber les lames sur du papier humide sous un couvercle pendant trente minutes à la température ambiante (18-25 ° C).

5.3.3. Eliminer les gouttelettes de chaque lame et rincer soigneusement dans un tampon pour immunofluorescence. Laver pendant cinq minutes dans un tampon IF-Tween (appendice 4), puis dans

un tampon pour IF. Eviter toute vaporisation ou débordement qui pourrait entraîner une contamination croisée. Eliminer soigneusement l'humidité excédentaire avec un buvard.

5.3.4. Poser les lames sur du papier humide. Couvrir les fenêtres de test avec du conjugué FITC à la dilution utilisée lors du titrage. La quantité de conjugué appliquée sur les fenêtres doit être identique à la quantité d'anticorps.

5.3.5. Incuber les lames sur du papier humide, sous un couvercle, pendant trente minutes à la température ambiante (18-25 ° C).

5.3.6. Eliminer les gouttelettes de conjugué de la lame. Rincer et laver comme indiqué ci-dessus (5.3.3).

Enlever soigneusement l'humidité excédentaire.

5.3.7. Déposer à la pipette 5 à 10 NE l d'un tampon phosphaté 0,1 M au glycérol (appendice 4) ou un support antidécoloration commercial sur chaque fenêtre et recouvrir d'une lamelle.

5.4. Lecture du test d'immunofluorescence

5.4.1. Examiner les lames de test avec un microscope équipé d'une source lumineuse épifluorescente et de filtres adaptés pour travailler avec l'isothiocyanate de fluorescéine, sous l'huile ou l'eau, à un grossissement de 500 à 1 000. Examiner les fenêtres selon deux diamètres perpendiculaires et en suivant le pourtour. Pour les échantillons ne présentant pas ou ne présentant qu'un faible nombre de cellules, observer au moins quarante champs microscopiques.

Commencer par contrôler la lame témoin positif. Les cellules doivent présenter une fluorescence vive et être complètement colorées au titre d'anticorps ou à la dilution de travail déterminés. Le test IF (section VI.A.5) doit être recommencé si la coloration n'est pas bonne.

5.4.2. Rechercher la présence de cellules présentant une fluorescence vive, ayant une morphologie caractéristique de *R. solanacearum* dans les fenêtres de test des lames. L'intensité de fluorescence doit être équivalente à celle de la souche témoin positif pour une dilution d'anticorps identique. Les cellules dont la coloration est incomplète ou dont la fluorescence est faible ne doivent pas être prises en considération.

En cas de soupçon d'une contamination, le test doit être recommencé. Ce peut être le cas si toutes les lames d'un lot montrent des cellules positives en raison de la contamination du tampon ou si des cellules positives sont isolées (hors des fenêtres) sur le milieu de montage de la lame.

5.4.3. Il existe un certain nombre de problèmes inhérents à la spécificité du test d'immunofluorescence. Des populations de cellules fluorescentes morphologiquement atypiques et de bactéries saprophytes provoquant des réactions croisées d'une taille et d'une morphologie similaires à *R. solanacearum* sont susceptibles d'apparaître dans des extraits concentrés de talons de pommes de terre et dans des segments de tiges.

5.4.4. Seules les cellules fluorescentes dont la taille et la morphologie sont caractéristiques au titre ou à la dilution de travail des anticorps visés au point 5.3 doivent être prises en considération

5.4.5. Interprétation du test IF :

i) Si l'échantillon contient des cellules avec une fluorescence vive et une morphologie caractéristique, estimer le nombre moyen de cellules typiques par champ microscopique et calculer le nombre de cellules typiques par ml d'extrait concentré remis en suspension (appendice 5).

La lecture du test d'immunofluorescence est considérée comme positive pour les échantillons contenant au moins  $5 \times 10^3$  cellules typiques par ml d'extrait concentré remis en suspension. L'échantillon est considéré comme potentiellement contaminé, et un nouveau test est requis.

ii) La lecture du test d'immunofluorescence est considérée comme négative pour les échantillons contenant moins de  $5 \times 10^3$  cellules par ml d'extrait concentré remis en suspension, et l'échantillon est considéré comme négatif. De nouveaux tests ne sont pas obligatoires.

## 6. Tests PCR

### Principes

Si le test PCR est utilisé comme principal test de dépistage et produit un résultat positif, il y a lieu de pratiquer un test d'isolement ou un test IF à titre de deuxième test de dépistage obligatoire. Si le test PCR est utilisé comme test secondaire et produit un résultat positif, le diagnostic doit être complété par des tests supplémentaires comme indiqué dans le diagramme fonctionnel.

Une exploitation complète de cette méthode en tant que test de dépistage principal n'est recommandée que quand une expertise spécialisée a été acquise en la matière.

NB : Les tests préliminaires réalisés suivant cette méthode doivent permettre une détection reproductible de 103 à 104 cellules/ml de *R. solanacearum* ajoutées aux extraits d'échantillons ayant donné antérieurement des résultats négatifs. Des expériences d'optimisation peuvent se révéler nécessaires pour obtenir des niveaux maximaux de sensibilité et de spécificité dans tous les laboratoires.

Utiliser des réactifs et des protocoles PCR validés (voir appendice 6). Sélectionner de préférence une méthode avec contrôle interne.

Prendre les précautions nécessaires pour éviter la contamination de l'échantillon avec de l'ADN cible. Le test PCR devrait être réalisé par des techniciens expérimentés dans des laboratoires de biologie moléculaire spécialisés, afin de réduire autant que possible la possibilité de contamination avec de l'ADN cible.

Des témoins négatifs (pour les procédures d'extraction d'ADN et PCR) devraient toujours être traités comme échantillon final dans la procédure, afin de faire apparaître si un transfert d'ADN est intervenu.

Les témoins négatifs suivants devraient être inclus dans le test PCR :

- Extrait d'échantillon ayant produit précédemment des résultats négatifs pour *R. solanacearum*
- Tampons témoins utilisés pour extraire la bactérie et l'ADN de l'échantillon
- Mélange réactif pour la PCR

Les témoins positifs suivants devraient être inclus :

- Des aliquotes d'extraits concentrés remis en suspension auxquels *R. solanacearum* a été ajouté (préparation : voir appendice 3 B).



- Une suspension de 10<sup>6</sup> cellules/ml d'un isolat virulent de *R. solanacearum* dans l'eau (exemple : NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; voir appendice 3B).

- Si possible, utiliser aussi de l'ADN extrait d'échantillons témoins positifs dans le test PCR.

Pour éviter une contamination potentielle, préparer les témoins positifs dans un environnement distinct de celui des échantillons à tester.

Les extraits d'échantillons doivent autant que possible être exempts de terre. Dans certains cas, il pourrait donc être recommandable de préparer des extraits à partir de pommes de terre lavées s'il est prévu d'utiliser des protocoles PCR

Les matériels de contrôle normalisés positifs et négatifs disponibles pour une utilisation avec ce test sont énumérés à l'appendice 3.

### 6.1. Méthodes de purification de l'ADN

Utiliser des échantillons de contrôle positifs et négatifs selon la méthode décrite ci-dessus (voir appendice 3).

Tester le matériel de contrôle de la même façon que les échantillons.

Il existe toute une série de méthodes pour purifier l'ADN cible à partir de substrats d'échantillons complexes, ce qui élimine les inhibiteurs de la PCR et d'autres réactions enzymatiques et concentre l'ADN cible dans l'extrait d'échantillon. La méthode suivante a été optimisée pour une utilisation avec les méthodes PCR validées indiquées à l'appendice 6.

#### a) Méthode de Pastrik (2000)

1) Déposer à la pipette 220 N~l de tampon lyse [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] dans un tube Eppendorf de 1,5 ml.

2) Ajouter 100 µl d'extrait d'échantillon et le placer dans un bloc chauffant ou au bain-marie à 95 ° C pendant dix minutes.

3) Déposer le tube sur de la glace pendant cinq minutes.

4) Ajouter 80 N~l de solution concentrée de lysozyme (50 mg de lysozyme par ml dans 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) et incuber à 37 ° C pendant trente minutes.

5) Ajouter 220 N~l de solution A d'Easy DNAR (Invitrogen), bien mélanger en homogénéisant au vortex et incuber à 65 ° C pendant trente minutes.

6) Ajouter 100 µl de solution B d'Easy DNAR (Invitrogen), homogénéiser vigoureusement au vortex jusqu'à ce que le précipité circule librement dans le tube et que l'échantillon soit uniformément visqueux.

7) Ajouter 500 µl de chloroforme et homogénéiser au vortex jusqu'au moment où la viscosité diminue et où le mélange est homogène.

8) Centrifuger à 15 000 g pendant vingt minutes à 4 ° C pour séparer les phases et former l'interphase.

9) Verser la phase supérieure dans un nouveau tube Eppendorf.

10) Ajouter 1 ml d'éthanol à 100 % (- 20 ° C), homogénéiser brièvement au vortex et incuber sur de la glace pendant dix minutes.

11) Centrifuger à 15 000 g pendant vingt minutes à 4 ° C et éliminer l'éthanol de l'extrait concentré.

12) Ajouter 500 µl d'éthanol à 80 % (- 20 ° C) et mélanger en retournant le tube.

13) Centrifuger à 15 000 g pendant dix minutes à 4 ° C, conserver l'extrait concentré et éliminer l'éthanol.

14) Laisser sécher l'extrait concentré à l'air libre ou dans un speedvac ADN.

15) Remettre en suspension l'extrait concentré dans 100 µl d'eau ultrapure stérile et le laisser à température ambiante pendant au moins vingt minutes.

16) Entreposer à - 20 ° C jusqu'au moment où l'extrait est requis pour la PCR.

17) Isoler tout précipité blanc par centrifugation et utiliser 5 µl de liquide surnageant contenant l'ADN pour la PCR.

#### b) Autres méthodes

D'autres méthodes d'extraction de l'ADN, par exemple : Qiagen DNeasy Plant Kit, pourraient être appliquées, à condition qu'elles soient d'une efficacité équivalente pour purifier l'ADN d'échantillons témoins contenant 10<sup>3</sup> à 10<sup>4</sup> cellules pathogènes par ml.

### 6.2. PCR

6.2.1. Préparer les matrices de test et de contrôle pour la PCR suivant les protocoles validés (section VI.A.6). Préparer une dilution au dixième de l'extrait d'échantillon d'ADN (1:10 dans de l'eau ultrapure).

6.2.2. Préparer le mélange réactif approprié destiné à la PCR dans un environnement exempt de contamination suivant les protocoles publiés (appendice 6). Lorsque c'est possible, il est recommandé d'utiliser un protocole PCR multiplex qui intègre également un contrôle interne de la PCR.

6.2.3. Ajouter 2 à 5 µl d'extrait d'ADN par 25 µl de milieu réactif PCR dans des tubes PCR stériles suivant les protocoles PCR (voir appendice 6).

6.2.4. Incorporer un échantillon témoin négatif ne contenant que le mélange réactif pour PCR et ajouter la même source d'eau ultrapure que celle utilisée dans le mélange pour PCR à la place de l'échantillon.

6.2.5. Placer les tubes dans le même thermocycleur que celui utilisé lors du test préliminaire et lancer le programme PCR optimisé comme il convient (appendice 6).

### 6.3. Analyse du produit de la réaction PCR

6.3.1. Décoder les amplimères PCR par électrophorèse sur gel d'agarose. Mettre sous une tension de 5 à 8 V/cm une quantité d'au moins 12 N~l de mélange réactif d'ADN amplifié provenant de chaque échantillon associés à 3 ~l de tampon de lest (appendice 6) sur des gels d'agarose à 2,0 % dans un tampon tris-acétate-EDTA (TAE) (appendice 6). Utiliser un marqueur d'ADN approprié, comme le "100 bp ladder".

6.3.2. Pour révéler les bandes d'ADN, utiliser la coloration au bromure d'éthidium (à 0,5 mg/l) pendant une durée de trente à soixante minutes, en prenant les précautions qui s'imposent pour la manipulation de cet agent mutagène.

6.3.3. Dans le cas des produits PCR amplifiés présentant la taille attendue (appendice 6), visualiser le gel coloré par diaphanoscopie sous lumière ultraviolette ondes courtes  $\lambda = 302 \text{ nm}$  et noter les résultats.

6.3.4. Pour tous les nouveaux cas ou constatations, vérifier l'authenticité de l'amplimère PCR en pratiquant une analyse de restriction enzymatique sur un échantillon de l'ADN amplifié restant. A cet effet, faire incuber à température optimale sur une durée optimale en employant un enzyme et un tampon appropriés (voir appendice 6). Décoder les fragments digérés par électrophorèse sur gel d'agarose selon la méthode indiquée plus haut et visualiser par diaphanoscopie sous UV la disposition caractéristique des fragments après restriction enzymatique et coloration au bromure d'éthidium. Comparer ensuite avec les témoins positifs pré et post-digestion.

#### Interprétation du résultat du test PCR

Le test PCR est négatif si l'amplimère PCR spécifique de *R. solanacearum* de la taille attendue n'est pas détecté pour l'échantillon concerné, mais bien pour l'ensemble des échantillons témoins positifs (dans le cas d'une PCR multiplex avec des amorces de contrôle interne spécifiques à la plante : un second produit PCR de la taille attendue doit être amplifié avec l'échantillon concerné).

Le test PCR est positif si l'amplimère PCR spécifique de *R. solanacearum* de la taille et du type de restriction (lorsqu'il est requis) attendus est détecté, à condition qu'il ne soit pas amplifié par l'un des échantillons témoins négatifs. Une confirmation fiable du résultat positif peut également être obtenue en recommençant le test avec une deuxième série d'amorces PCR (appendice 6).

NB : Une inhibition de la PCR peut être soupçonnée dans le cas où l'amplimère prévu est obtenu de l'échantillon témoin positif contenant *R. solanacearum* dans de l'eau et où des résultats négatifs sont obtenus de témoins positifs avec *R. solanacearum* dans de l'extrait de pomme de terre. Dans les protocoles PCR multiplex avec contrôle interne de la PCR, l'inhibition de la réaction est indiquée quand aucun des deux amplimères n'est obtenu.

La contamination peut être suspectée si l'amplimère attendu est obtenu d'un ou de plusieurs témoins négatifs.

## 7. Test FISH

### Principe

Si le test FISH est utilisé comme principal test de dépistage et produit un résultat positif, il y a lieu de pratiquer un test d'isolement ou un test IF à titre de deuxième test de dépistage obligatoire. Si le test IF est utilisé comme test secondaire et produit un résultat positif, l'analyse doit être complétée par des tests supplémentaires, comme indiqué dans le diagramme fonctionnel.

NB : Utiliser des oligosondes validées spécifiques de *R. solanacearum* (voir appendice 7). Les tests préliminaires réalisés suivant cette méthode doivent permettre une détection reproductible de 103 à 104 cellules/ml de *R. solanacearum* ajoutées aux extraits d'échantillons ayant donné antérieurement des résultats négatifs.

Il est préférable d'appliquer la procédure décrite ci-après à des extraits d'échantillon fraîchement préparés, mais elle peut également fonctionner avec des extraits d'échantillon conservés en solution de glycérol à des températures de - 16 ° C à - 24 ° C ou de - 68 ° C à - 86 ° C.

A titre de témoins négatifs, utiliser des aliquotes d'extraits d'échantillon ayant préalablement produit un résultat négatif lors de tests de recherche de *R. solanacearum*.

A titre de témoins positifs, préparer des suspensions contenant entre 10<sup>5</sup> et 10<sup>6</sup> cellules/ml du biovar 2 de *R. solanacearum* (par exemple : la souche NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, voir appendice 3) dans un tampon phosphaté 0,01 M (PB), à partir d'une culture de trois à cinq jours. Préparer des lames témoins positifs séparées de la souche homologue ou de toute autre souche de référence de *R. solanacearum*, en suspension dans l'extrait de pomme de terre, comme indiqué à l'appendice 3 B.

L'utilisation d'une oligosonde eubactérienne marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) permet de contrôler le processus d'hybridation en colorant toutes les eubactéries présentes dans l'échantillon.

Les matériaux témoins positifs et négatifs normalisés disponibles pour ce test sont énumérés à l'appendice 3, point A.

Tester le matériau témoin de la même façon que les échantillons.

#### 7.1. Fixation de l'extrait de pomme de terre

Le protocole exposé ci-après est fondé sur Wullings et al. (1998).

7.1.1. Préparer la solution de fixation (voir appendice 7).

7.1.2. Introduire à la pipette 100 µl de chaque extrait d'échantillon dans un tube Eppendorf et centrifuger pendant sept minutes à 7 000 g.

7.1.3. Éliminer le surnageant et dissoudre l'extrait concentré dans 200 µl de fixatif préparé moins de vingt-quatre heures auparavant. Homogénéiser au vortex et laisser incuber pendant une heure au réfrigérateur.

7.1.4. Centrifuger pendant sept minutes à 7 000 g, éliminer le surnageant et remettre l'extrait concentré en suspension dans 75 µl de PB 0,01 M (voir appendice 7).

7.1.5. Déposer 16 µl des suspensions fixées sur une lame multitest propre comme indiqué à la figure 7.1. Sur chaque lame, appliquer deux échantillons différents, non dilués, et en diluer 10 µl à 1:100 (dans un tampon phosphaté 0,01 M). Le reste de la solution d'échantillon (49 µl) peut être conservé à - 20 ° C après addition d'un volume d'éthanol à 96 %. S'il y a lieu de réitérer le test FISH, éliminer l'éthanol par centrifugation et ajouter un volume équivalent de tampon phosphaté 0,01 M (mélanger au vortex).

Pour la consultation du tableau, voir image

7.1.6. Sécher les lames à l'air (ou dans un séchoir, à 37 ° C), puis les fixer par flambage.

Il est possible d'interrompre la procédure à ce stade et d'entamer l'hybridation le lendemain. Les lames doivent être entreposées à l'abri de la poussière, dans un lieu sec et à température ambiante.

## 7.2. Hybridation

7.2.1. Déshydrater les cellules par bains successifs d'éthanol à 50 %, 80 % et 96 % d'une minute chacun. Disposer les lames sur un support et les laisser sécher à l'air libre.

7.2.2. Préparer une chambre d'incubation humide en tapissant le fond d'une boîte hermétique de papier absorbant ou de papier filtre imprégné d'hybmix 1X (voir appendice 7). Faire préincuber la boîte pendant au moins dix minutes dans le four à hybridation à une température de 45 ° C.

7.2.3. Verser 10 µl de solution d'hybridation (appendice 7) sur huit fenêtres (fenêtres 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 et 10; voir fig. 7.1) de chaque lame en laissant vides les deux fenêtres du centre (3 et 8).

7.2.4. Couvrir de lamelles (24 x 24 mm) la première et les quatre dernières fenêtres en prenant soin de ne pas emprisonner d'air. Placer les lames dans la chambre humide préchauffée et les laisser pendant cinq heures dans le four à 45 ° C, dans l'obscurité, pour permettre le déroulement de l'hybridation.

7.2.5. Préparer trois béchers contenant 1 l d'eau Milli Q (biologie moléculaire), 1 l d'hybmix 1X [334 ml d'hybmix 3X et 666 ml d'eau Milli Q (biologie moléculaire)] et 1 l d'hybmix 1/8X [(42 ml d'hybmix 3X et 958 ml d'eau Milli Q (biologie moléculaire))]. Faire préincuber chacun de ces béchers au bain-marie à 45 ° C.

7.2.6. Débarrasser les lames des lamelles et les placer sur un porte-lames.

7.2.7. Eliminer l'excédent d'échantillon en incubant pendant quinze minutes à 45 ° C dans le bécher contenant l'hybmix 1X.

7.2.8. Transférer le porte-lames dans une solution de lavage à l'hybmix 1/8X et laisser incuber pendant quinze minutes supplémentaires.

7.2.9. Plonger brièvement les lames dans un bain d'eau Milli Q et les placer sur un papier filtre. Eliminer l'humidité excédentaire en disposant doucement du papier filtre sur la surface à sécher. Verser à la pipette sur chaque fenêtre entre 5 et 10 µl de solution support anti-décoloration (par exemple : Vectashield de Vecta Laboratories, CA, USA, ou équivalent) et couvrir toute la surface de la lame d'une grande lamelle (24 x 60 mm).

## 7.3. Lecture du test FISH

7.3.1. Procéder immédiatement à l'observation des lames au moyen d'un microscope à épifluorescence, sous un film d'huile et à un grossissement de 630 à 1 000 x. Avec un filtre adapté à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), les cellules eubactériennes (y compris la plupart des cellules gram-négatives) présentes dans l'échantillon prennent une coloration verte fluorescente. Avec un filtre adapté au tétraméthylrhodamine-5-isothiocyanate, les cellules de *R. solanacearum* marquées au Cy3 apparaissent en rouge fluorescent. Comparer la morphologie des cellules avec celle des témoins positifs. Les cellules doivent être entièrement colorées et présenter une fluorescence vive. Le test FISH (section VI.A.7) doit être recommencé si la coloration n'est pas bonne. Examiner les fenêtres selon deux diamètres perpendiculaires et en suivant le pourtour. Pour les échantillons ne présentant pas ou ne présentant qu'un faible nombre de cellules, observer au moins quarante champs microscopiques.

7.3.2. Rechercher la présence de cellules présentant une fluorescence vive, ayant une morphologie caractéristique de *R. solanacearum* dans les fenêtres de test des lames. L'intensité de fluorescence doit être équivalente à celle de la souche témoin positif ou doit être meilleure. Les cellules dont la

coloration est incomplète ou qui présentent une faible fluorescence ne doivent pas être prises en considération.

7.3.3. Au moindre soupçon de contamination, le test doit être recommencé. Ce peut être le cas si toutes les lames d'un lot montrent des cellules positives en raison de la contamination du tampon, ou si des cellules positives sont isolées (hors des fenêtres) sur le milieu de montage de la lame.

7.3.4. Il existe un certain nombre de problèmes inhérents à la spécificité du test FISH. Des populations de cellules fluorescentes morphologiquement atypiques et de bactéries saprophytes provoquant des réactions croisées d'une taille et d'une morphologie similaires à *R. solanacearum* sont susceptibles d'apparaître dans des extraits concentrés de talons de pommes de terre et des segments de tiges, même si cela est beaucoup moins fréquent que dans le test IF.

7.3.5. Seules les cellules fluorescentes dont la taille et la morphologie sont caractéristiques doivent être prises en considération.

#### 7.3.6. Interprétation du résultat du test FISH

i) Des résultats valides du test FISH sont obtenus si des cellules présentant une fluorescence vive de couleur verte de la taille et de la morphologie caractéristiques de *R. solanacearum* sont observées en utilisant le filtre FITC et des cellules présentant une fluorescence vive de couleur rouge en utilisant le filtre rhodamine dans tous les témoins positifs mais dans aucun témoin négatif. Si l'échantillon contient des cellules avec une fluorescence vive et une morphologie caractéristique, estimer le nombre moyen de cellules typiques par champ microscopique et calculer le nombre de cellules typiques par ml d'extrait concentré remis en suspension (appendice 4). Les échantillons contenant au moins  $5 \times 10^3$  cellules typiques par ml d'extrait concentré remis en suspension sont considérés comme potentiellement contaminés. Il convient de poursuivre les tests. Les échantillons contenant moins de  $5 \times 10^3$  cellules typiques par ml d'extrait concentré remis en suspension sont considérés comme négatifs.

ii) Le test FISH est négatif si des cellules présentant une fluorescence vive de couleur rouge, de la taille et de la morphologie caractéristiques de *R. solanacearum*, ne sont pas observées en utilisant le filtre rhodamine, pour autant que des cellules présentant une fluorescence vive de couleur rouge soient observées dans les préparations de témoins positifs lors de l'utilisation du filtre rhodamine.

## 8. Tests ELISA

### Principe

ELISA ne peut être utilisé que comme un test facultatif en plus des tests IF, PCR ou FISH en raison de sa sensibilité relativement faible. Lorsque la méthode DAS-ELISA est employée, l'enrichissement et l'utilisation d'anticorps monoclonaux sont obligatoires. L'enrichissement des échantillons avant l'utilisation d'ELISA peut être utile afin d'accroître la sensibilité du test, mais il peut échouer en raison de la concurrence d'autres organismes dans l'échantillon.

NB : Utiliser une source validée d'anticorps de *R. solanacearum*. Il est recommandé de déterminer le titre pour chaque nouveau lot d'anticorps. Le titre est défini comme la plus haute dilution à laquelle on obtient une réaction optimale lorsqu'on teste une suspension contenant entre  $10^5$  et  $10^6$  cellules/ml de la souche homologue de *R. solanacearum* en utilisant des conjugués d'anticorps secondaires appropriés, conformément aux recommandations du fabricant. Pendant le test, la dilution de travail des anticorps doit être approximativement égale ou égale à celle du titre de la formule commerciale.

Déterminer le titre des anticorps sur une suspension de  $10^5$  à  $10^6$  cellules/ml de la souche homologue de *R. solanacearum*.

Inclure un extrait d'échantillon ayant donné précédemment des résultats négatifs pour *R. solanacearum* et une suspension d'une bactérie ne provoquant pas une réaction croisée dans un tampon au phosphate (PBS) comme témoins négatifs.

Comme témoin positif, utiliser des aliquotes d'extraits d'échantillons qui ont donné précédemment des résultats négatifs, mélangées avec  $10^3$  à  $10^4$  cellules/ml du biovar 2 de *R. solanacearum* (par exemple : la souche NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, voir appendices 2 A et B). Pour comparer les résultats de chaque boîte, utiliser une suspension standard de  $10^5$  à  $10^6$  cellules/ml dans du PBS de *R. solanacearum*. Faire en sorte que les témoins positifs soient bien séparés sur la plaque de microtitrage de l'échantillon ou des échantillons faisant l'objet du test.

Les matériaux témoins positifs et négatifs normalisés disponibles pour une utilisation avec ce test sont énumérés à l'appendice 3, point A.

Tester le matériau témoin de la même façon que les échantillons.

Deux protocoles ELISA ont été validés :

a) ELISA indirect (Robinson-Smith et al., 1995)

- 1) Utiliser des aliquotes de 100-200  $\mu$ l d'extrait d'échantillon. (chauffer à 100 ° C pendant quatre minutes aubain-marie ou dans un bloc chauffant peut réduire des résultats non spécifiques dans certains cas).
- 2) Ajouter un volume identique de tampon concentré deux fois (appendice 4) et homogénéiser au vortex.
- 3) Déposer des aliquotes de 100  $\mu$ l sur au moins deux puits de la plaque de microtitrage (par exemple : Nunc-Polysorp ou équivalent) et incuber une heure à 37 ° C ou une nuit à 4 ° C.
- 4) Eliminer les extraits des puits. Laver les puits à trois reprises au PBS-Tween (appendice 4) en laissant la dernière solution de lavage dans les puits pendant au moins cinq minutes.
- 5) Préparer la dilution appropriée d'anticorps anti-*R. solanacearum* dans le tampon de saturation (appendice 4). Pour les anticorps commerciaux validés, utiliser les dilutions recommandées (habituellement deux fois plus concentrées que le titre).
- 6) Ajouter 100  $\mu$ l à chaque puits et incuber pendant une heure à 37 ° C.
- 7) Eliminer la solution d'anticorps des puits et laver comme indiqué auparavant (point 4).
- 8) Préparer la dilution appropriée de conjugués secondaires d'anticorps et de phosphatase alcaline dans le tampon de saturation. Ajouter 100  $\mu$ l à chaque puits et incuber pendant une heure à 37 ° C.
- 9) Eliminer le conjugué d'anticorps des puits et laver comme indiqué auparavant (point 4).
- 10) Ajouter 100  $\mu$ l de solution du substrat de la phosphatase alcaline (appendice 4) à chaque puits. Incuber dans l'obscurité à température ambiante et mesurer l'absorbance à 405 nm à intervalles réguliers dans un délai de quatre-vingt-dix minutes.

## b) DAS-ELISA

1) Préparer la dilution appropriée d'immunoglobulines polyclonales anti-*R. solanacearum* dans le tampon concentré de pH 9,6 (appendice 4). Ajouter 200 µl à chaque puits. Incuber à 37 ° C pendant quatre à cinq heures ou à 4 °C pendant seize heures.

2) Laver les puits trois fois au PBS-Tween (appendice 4).

Ajouter 190 µl d'extrait d'échantillon à deux puits au moins. Ajouter également des témoins positifs et négatifs à deux puits par boîte. Incuber pendant seize heures à 4 ° C.

3) Laver les puits trois fois au PBS-Tween (appendice 4).

4) Préparer une dilution appropriée d'anticorps monoclonaux spécifiques de *R. solanacearum* dans du PBS (appendice 4) contenant également 0,5 % de séralbumine bovine (BSA) et ajouter 190 µl à chaque puits. Incuber à 37 ° C pendant deux heures.

5) Laver les puits trois fois au PBS-Tween (appendice 4).

6) Préparer une dilution appropriée d'immunoglobulines antisouris conjuguées à de la phosphatase alcaline dans du PBS. Ajouter 190 µl à chaque puits. Incuber à 37 ° C pendant deux heures.

7) Laver les puits trois fois au PBS-Tween (appendice 4).

8) Préparer une solution du substrat de la phosphatase alcaline contenant 1 mg de p-nitrophényl phosphate par ml de substrat tamponné (appendice 4). Ajouter 200 µl à chaque puits. Incuber dans l'obscurité à température ambiante et mesurer l'absorbance à 40 nm à intervalles réguliers dans un délai de quatre-vingt-dix minutes.

### Interprétation des résultats des tests ELISA

Le test ELISA est négatif si la densité optique (DO) moyenne des puits du double de l'échantillon est inférieure au double de celle du puits du témoin de l'extrait d'échantillon négatif, pour autant que la DO pour les témoins positifs soit toujours supérieure à 1,0 (après quatre-vingt-dix minutes d'incubation avec le substrat) et soit supérieure à deux fois la DO obtenue pour les extraits d'échantillons négatifs.

Le test ELISA est positif si la densité optique (DO) moyenne des puits du double de l'échantillon est supérieure au double de celle du puits de l'extrait d'échantillon négatif, pour autant que la DO pour tous les puits des témoins négatifs soit inférieure à deux fois la DO obtenue dans les puits des témoins positifs.

Une lecture ELISA négative dans les puits des témoins positifs indique que le test n'a pas été réalisé correctement ou qu'il a été inhibé. Une lecture ELISA positive dans les puits des témoins négatifs indique une contamination croisée ou une liaison d'anticorps non spécifique.

## 9. Test biologique

NB : Les tests préliminaires réalisés suivant cette méthode doivent permettre une détection reproductible de 10<sup>3</sup> à 10<sup>4</sup> unités formant des colonies de *R. solanacearum* par ml ajoutées aux extraits d'échantillons ayant donné antérieurement des résultats négatifs (préparation : voir appendice 3).



Le degré de sensibilité le plus élevé pour la détection peut être attendu en utilisant un extrait d'échantillon fraîchement préparé et dans des conditions de croissance optimales. Toutefois, la méthode peut être appliquée avec succès aux extraits qui ont été entreposés dans du glycérol entre - 68 et - 86 ° C.

Le protocole suivant est fondé sur celui de Janse (1988) :

9.1. Utiliser dix plantes tests d'un cultivar de tomate sensible (par exemple : Moneymaker ou cultivar d'une sensibilité équivalente déterminée par le laboratoire de tests) au stade de la troisième vraie feuille de chaque échantillon. Pour les détails de la culture, voir appendice 8. Il est également possible d'utiliser des aubergines (par exemple : Black Beauty ou cultivars d'une sensibilité équivalente) en ne choisissant que des plants au stade de la deuxième ou troisième feuille jusqu'au développement complet de la troisième vraie feuille. Cependant, il est apparu que les symptômes sont moins graves et se développent plus lentement sur les aubergines. Si possible, il est donc recommandé d'utiliser des plantules de tomates.

9.2. Répartir 100 µl d'extrait entre les plantes tests.

9.2.1. Inoculation par injection

Avec une seringue munie d'une aiguille hypodermique (pas moins de 23G), pratiquer l'inoculation dans les tiges de la plante juste au-dessus des cotylédons. Répartir l'échantillon entre les plantes tests.

9.2.2. Inoculation par incision

Tenir la plante entre deux doigts et déposer à la pipette sur la tige, entre les cotylédons et la première feuille, une goutte (environ 5 à 10 µl) d'extrait concentré en suspension.

A l'aide d'un scalpel stérile, pratiquer, en partant de la goutte d'extrait concentré, une incision diagonale d'une longueur de 1,0 cm et d'une profondeur égale approximativement aux deux tiers de l'épaisseur de la tige.

Refermer l'incision avec de la vaseline stérile au moyen d'une seringue.

9.3. Inoculer par la même technique cinq plantules avec une suspension aqueuse de 105 à 106 cellules/ml préparée à partir d'une culture de quarante-huit heures d'une souche virulente du biovar 2 de *R. solanacearum* comme témoin positif et avec un tampon concentré (appendice 4) comme témoin négatif. Séparer les plantes témoins positifs et négatifs des autres plantes pour éviter des contaminations croisées.

9.4. Cultiver les plantes tests dans des installations de quarantaine pendant une durée allant jusqu'à quatre semaines à 25-30 ° C et dans une humidité relative élevée en assurant un arrosage approprié pour prévenir un engorgement hydrique ou un flétrissement par manque d'eau. Pour éviter une contamination, incuber les plantes témoins positifs et négatifs sur des bancs nettement séparés dans une serre ou une chambre de culture ou, au cas où l'espace serait limité, veiller à une stricte séparation entre les traitements. Si les plantes de différents échantillons doivent incuber à proximité les unes des autres, prévoir une séparation entre elles avec des écrans appropriés. Lors de la fertilisation, de l'arrosage, de l'inspection ou de toute autre manipulation, veiller soigneusement à éviter une contamination croisée. Il est essentiel de maintenir les serres et chambres de culture exemptes d'insectes étant donné qu'ils peuvent transmettre la bactérie d'échantillon à échantillon.

Observer l'apparition des symptômes du flétrissement : épïnastie, chlorose et/ou rabougrissement.

9.5. Isoler les plantes infectées (section II.3) et identifier les cultures purifiées de *R. solanacearum* supposé (section VI. B).

9.6. Si aucun symptôme n'est observé après trois semaines, effectuer un IF/PCR/isolement sur un échantillon composite de morceaux de tiges d'un cm provenant de chaque plante test et prélevés au-dessus du point d'inoculation. Si le test est positif, effectuer un test par dilution et étalement (section 4.1).

9.7. Identifier toute culture purifiée de *R. solanacearum* supposé (section VI. B).

#### Interprétation des résultats du test biologique

Des résultats valides du test biologique sont obtenus lorsque les plantes témoins positifs présentent des symptômes typiques, les bactéries peuvent être isolées une nouvelle fois sur ces plantes, et aucun symptôme n'est observé sur les témoins négatifs.

Le test biologique est négatif si les plantes tests ne sont pas infectées par *R. solanacearum* et sous réserve que *R. solanacearum* soit détecté sur les témoins positifs.

Le test biologique est positif si les plantes tests sont infectées par *R. solanacearum*.

#### B. TESTS D'IDENTIFICATION

Identifier des cultures pures supposées de *R. solanacearum* en utilisant au moins deux des tests suivants fondés sur des principes biologiques différents.

Inclure des souches de référence connues, le cas échéant, pour chaque test réalisé (voir appendice 3).

##### 1. Tests d'identification nutritionnels et enzymatiques

Déterminer les caractéristiques phénotypiques suivantes, systématiquement présentes ou absentes chez *R. solanacearum*, suivant les méthodes de Lelliott et Stead (1987), Klement et al. (1990), et Schaad (2001).

Pour la consultation du tableau, voir image

##### 2. Test IF

2.1. Préparer une suspension d'environ  $10^6$  cellules/ml dans un tampon d'immunofluorescence (appendice 4).

2.2. Préparer une série de dilutions au demi d'un antisérum approprié .

2.3. Suivre la procédure du test IF (section VI.A.5).

2.4. Pour qu'un test IF soit positif, le titre obtenu avec la culture en immunofluorescence doit être équivalent à celui obtenu avec le témoin positif.

##### 3. Test ELISA

NB : En cas de réalisation de deux tests d'identification seulement, ne pas utiliser d'autre test sérologique en plus de cette méthode.

- 3.1. Préparer une suspension d'environ 10<sup>8</sup> cellules/ml dans du PBS 1X (appendice 4).
- 3.2. Effectuer une procédure ELISA appropriée avec un anticorps monoclonal spécifique de *R. solanacearum*.
- 3.3. Un test ELISA est positif si la lecture ELISA obtenue de la culture est au moins égale à la moitié de celle obtenue pour le témoin positif.

#### 4. Tests PCR

- 4.1. Préparer une suspension d'environ 10<sup>6</sup> cellules/ml dans de l'eau stérile pour biologie moléculaire.
- 4.2. Chauffer 100 µl de la suspension dans des tubes fermés dans un bloc chauffant ou au bain-marie bouillant à 100 ° C pendant quatre minutes. Les échantillons peuvent ensuite être stockés entre - 16 et - 24 ° C jusqu'au moment où ils sont requis.
- 4.3. Appliquer des procédures PCR appropriées pour amplifier les amplimères spécifiques de *R. solanacearum* [voir, par exemple : Seal et al. (1993), Pastrik & Maiss (2000), Pastrik et al. (2002), Boudazin et al. (1999), Opina et al. (1997), Weller et al. (1999)].
- 4.4. Une identification positive de *R. solanacearum* est obtenue si les amplimères PCR sont de la même taille et présentent les mêmes polymorphismes de taille des fragments de restriction que dans le cas de la souche témoin positif.

#### 5. Test FISH

- 5.1. Préparer une suspension d'environ 10<sup>6</sup> cellules/ml dans de l'eau ultrapure.
- 5.2. Appliquer la procédure FISH (section VI.A.7) avec au moins deux oligosondes spécifiques de *R. solanacearum* (appendice 7).
- 5.3. Un test FISH est positif si les mêmes réactions sont obtenues de la culture et du témoin positif.

#### 6. Test de profil des acides gras (FAP)

- 6.1. Cultiver la culture pendant quarante-huit heures à 28 ° C sur des boîtes de gélose trypticase-soja (Oxoid).
- 6.2. Appliquer une procédure de test FAP appropriée (Janse, 1991; Stead, 1992).
- 6.3. Pour qu'un test FAP soit positif, le profil de la culture supposée doit être identique à celui du témoin positif. La présence des acides gras caractéristiques 14 :0 3OH, 16 :0 2OH, 16 :1 2OH et 18 :1 2OH et l'absence de 16 :0 3OH sont très indicatives de *Ralstonia* sp.

#### 7. Méthodes de caractérisation de la souche

Une caractérisation de la souche utilisant l'une des méthodes suivantes est recommandée pour chaque nouveau cas d'isolement de *R. solanacearum*.

Inclure des souches de référence connues, le cas échéant, pour chaque test réalisé (voir appendice 3).

##### 7.1. Détermination du biovar

On distingue différents biovars de *R. solanacearum* en fonction de leur aptitude à utiliser et/ou à oxyder trois disaccharides et trois hexoses alcools (Hayward, 1964, et Hayward et al., 1990). Les milieux de croissance pour le test du biovar sont décrits à l'appendice 2. Le test peut être valablement réalisé en inoculant par piqûre profonde les milieux avec des cultures pures d'isolats de *R. solanacearum* et en incubant à 28 ° C. Si les milieux sont répartis dans 96 puits stériles de boîtes de culture (200 µl par puits), un changement de couleur du vert olive au jaune peut être observé dans les 72 heures, ce qui indique un résultat de test positif.

Pour la consultation du tableau, voir image

## 7.2. Empreinte génomique

Les procédés suivants permettent de réaliser une différenciation moléculaire des souches à l'intérieur du complexe *R. solanacearum* :

7.2.1. Analyse du polymorphisme de taille des fragments de restriction (PTFR) (Cook et al., 1989).

7.2.2. PCR sur des séquences répétitives utilisant des amorces (REP, BOX et ERIC (Louws et al., 1995, Smith et al., 1995).

7.2.3. Analyse du polymorphisme de taille des fragments de restriction amplifiés (Van der Wolf et al., 1998).

## 7.3. Méthodes PCR

Des amorces PCR spécifiques (Patrik et al., 2002; voir appendice 6) peuvent être utilisées pour différencier des souches appartenant à la division 1 (biovars 3, 4 et 5) et à la division 2 (biovars 1, 2A et 2T) de *R. solanacearum*, telles que définies initialement par l'analyse du PTFR (Cook et al., 1989) et la séquence 16S d'ADNr (Taghavi et al., 1996).

## C. TEST DE CONFIRMATION

Le test de pathogénicité doit être effectué en tant que confirmation finale d'un diagnostic de *R. solanacearum* et pour évaluer la virulence de cultures identifiées comme étant de *R. solanacearum*.

1) Préparer un inoculum d'environ 10<sup>6</sup> cellules/ml à partir d'une culture de 24 à 48 heures de l'isolat à tester et d'une souche témoin positif appropriée de *R. solanacearum* (par exemple : NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, voir appendice 3).

2) Inoculer cinq à dix plantules de tomates ou d'aubergines sensibles au stade de la troisième vraie feuille (voir section VI.A.9).

3) Incuber jusqu'à deux semaines à 25-28 ° C et dans une humidité relative élevée en assurant un arrosage approprié pour prévenir un engorgement hydrique ou le stress de sécheresse. Avec des cultures pures, un flétrissement typique devrait apparaître dans les quinze jours. En l'absence de symptômes à l'issue de cette période, la culture ne peut pas être confirmée comme étant une forme pathogène de *R. solanacearum*.

4) Observer l'apparition de symptômes de flétrissement et/ou d'épinastie, de chlorose et de rabougrissement.

5) Isoler les plantes symptomatiques en prélevant une section de tige environ 2 cm au-dessus du point d'inoculation. Réduire et mettre en suspension dans un petit volume d'eau stérile distillée ou de tampon phosphaté 50 mM (appendice 4). Isoler de la suspension par dilution sur un milieu approprié, de préférence sur un milieu sélectif (appendice 2), incubé pendant 48 à 72 heures à 28 ° C et observer la formation de colonies typiques de *R. solanacearum*.

#### Appendice 1

Laboratoires pratiquant l'optimisation et la validation des protocoles

Pour la consultation du tableau, voir image

#### Appendice 2

Milieus d'isolement et de culture de *R. solanacearum*

Pour la consultation du tableau, voir image

NB :

1. L'utilisation de réactifs autres que ceux spécifiés ci-dessus peut affecter la croissance de *R. solanacearum*.
2. Oxoid Agar #1 peut être utilisé en lieu et place de Bacto-Agar (Difco). Dans ce cas, la croissance de *R. solanacearum* sera plus lente, bien que la croissance de saprophytes concurrents puisse également être réduite. Des colonies typiques de *R. solanacearum* peuvent prendre un à deux jours de plus pour se constituer, et la coloration rouge peut être plus légère et plus diffuse que sur Bacto-Agar.
3. Une augmentation de la concentration de bacitracine à 2 500 U par l peut réduire les populations de bactéries concurrentes sans perturber la croissance de *R. solanacearum*.

Stocker les milieux et les solutions concentrées d'antibiotiques à 4 ° C dans l'obscurité et les utiliser dans le délai d'un mois.

Les boîtes doivent être exemptes de condensation en surface avant leur utilisation.

Eviter un séchage excessif des boîtes.

Un contrôle de qualité devrait être réalisé après la préparation de chaque nouveau lot de milieu de culture par étalement d'une suspension d'une culture de référence de *R. solanacearum* (voir appendice 3) et par l'observation de la formation de colonies typiques après incubation à 28 ° C pendant deux à cinq jours.

#### c) Milieux d'enrichissement validés

Bouillon SMSA (Elphinstone et al., 1996)

Même préparation que pour le milieu gélosé sélectif SMSA, mais sans Bacto-Agar ni chlorure de 2,3,5- tétrazolium.

Bouillon nutritif modifié de Wilbrink (Caruso et al., 2002)

Saccharose 10 g

Protéose peptone 5 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g

MgSO<sub>4</sub> 0,25 g

NaNO<sub>3</sub> 0,25 g

Eau distillée 1 l

Stériliser à l'autoclave à 121 ° C pendant quinze minutes et refroidir à 50 ° C.

Ajouter des solutions concentrées d'antibiotiques comme pour le bouillon SMSA.

Appendice 3

A. Matériel de contrôle normalisé disponible dans le commerce

a) Isolats de bactéries

Les isolats de bactéries suivants sont recommandés pour une utilisation en tant que matériel de référence standard ou témoins positifs (tableau 1), ou au cours de l'optimisation des tests pour éviter des réactions croisées (tableau 2). Toutes les souches sont disponibles dans le commerce aux adresses suivantes :

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBB), Central Science Laboratory, York, UK
2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Pays-Bas.
3. Collection française de bactéries phytopathogènes (CFBP), INRA - Station de phytobactériologie, Angers, France.

Pour la consultation du tableau, voir image

b) Matériau témoin normalisé disponible dans le commerce

Le matériau témoin normalisé suivant peut être obtenu auprès de la collection de cultures NCPBB :

Granules lyophilisées d'extrait de deux cents tubercules de pomme de terre sains en tant que témoin négatif pour tous les tests.

Granules lyophilisées d'extrait de deux cents tubercules de pomme de terre sains contenant de 103 à 104 et de 104 à 106 cellules du biovar 2 de *R. solanacearum* (p.ex : souche NCPBB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) en tant que témoins positifs pour les tests sérologiques et PCR. Comme la lyophilisation influe sur la viabilité des cellules, celles-ci ne conviennent pas comme témoins standard pour les tests d'isolement ou les tests biologiques.

Suspensions fixées à la formaline du biovar 2 de *R. solanacearum* (souche NCPBB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) à 106 cellules/ml en tant que témoins positifs pour les tests sérologiques.

## B. Préparation de témoins positifs et négatifs

Produire une culture de quarante-huit heures d'une souche virulente de biovar 2, race 3 de *R. solanacearum* (par exemple, la souche NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) sur un milieu de base SMSA et mettre en suspension dans un tampon phosphaté 10 mM pour obtenir une densité cellulaire d'environ  $2 \times 10^8$  ufc/ml. Elle est généralement obtenue par une suspension légèrement turbide équivalente à une densité optique de 0,15 à 600 nm.

Retirer les talons de deux cents tubercules prélevés sur une variété à peau blanche connue pour être indemne de *R. solanacearum*.

Traiter les talons selon la méthode habituelle et remettre en suspension l'extrait concentré dans 10 ml.

Préparer dix microtubes stériles de 1,5 ml avec 900 µl d'extrait concentré remis en suspension.

Verser 100 µl de la suspension de *R. solanacearum* dans le premier microtube. Homogénéiser au vortex.

Décimaliser les niveaux de contamination en poursuivant la dilution dans les cinq microtubes suivants.

Les six microtubes contaminés seront utilisés comme témoins positifs. Les quatre microtubes non contaminés seront utilisés comme témoins négatifs. Etiqueter les microtubes en conséquence.

Préparer des aliquotes de 100 µl dans des microtubes stériles de 1,5 ml pour obtenir neuf répliques de chaque échantillon témoin. Stocker entre -16 et -24 °C jusqu'à leur utilisation.

La présence et le niveau de *R. solanacearum* dans les échantillons témoins doivent être confirmés en premier lieu par IF.

Pour le test PCR, réaliser une extraction d'ADN sur des échantillons témoins positifs et négatifs pour chaque série d'échantillons des tests.

Pour les tests IF et FISH, réaliser des tests sur des échantillons témoins positifs et négatifs pour chaque série d'échantillons des tests.

Pour les tests IF et FISH, *R. solanacearum* doit être détecté au moins dans les 106 et 104 cellules/ml des témoins positifs et dans aucun des témoins négatifs.

## Appendice 4

### Tampons pour les procédures de test

GENERALITES : les tampons stérilisés non ouverts peuvent être stockés jusqu'à un an.

Pour la consultation du tableau, voir image

## Appendice 5

### Détermination du degré de contamination lors des tests IF et FISH

1. Compter le nombre moyen de cellules fluorescentes typiques par champ (c).

2. Compter le nombre de cellules fluorescentes typiques par fenêtre de lame de microscope (C).

$$C = c \times S/s$$

où S = superficie (S) de la fenêtre d'une lame multipuits

et s = la superficie du champ de l'objectif

$$s = \frac{EOEi^2}{4G^2K^2} \text{ où}$$

i = coefficient du champ (dépend du type d'oculaire et varie de 8 à 24)

K = coefficient du tube (1 ou 1,25)

G = grossissement (100 fois, 40 fois, etc.) de l'objectif.

3. Compter le nombre de cellules fluorescentes typiques par millilitre d'extrait concentré remis en suspension (N)

$$N = C \times 1000/y \times F$$

où y = volume d'extrait concentré remis en suspension sur chaque fenêtre

et F = facteur de dilution de l'extrait concentré remis en suspension

## Appendice 6

### Protocoles PCR et réactifs validés

NB : Les tests préliminaires doivent permettre la détection reproductible de 10<sup>3</sup> à 10<sup>4</sup> cellules de *R. solanacearum* par ml d'extrait d'échantillon. Les tests préliminaires doivent également ne montrer aucun faux résultat positif avec une gamme de souches bactériennes sélectionnées (voir appendice 3).

#### 1. Protocole PCR de Seal et al. (1993)

##### 1.1. Oligonucléotides amorces

Amorce sens OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'

Amorce antisens Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Taille prévue de l'amplimère de la matrice d'ADN de *R. solanacearum* = 288 bp

##### 1.2. Mélange réactif pour PCR

Pour la consultation du tableau, voir image

##### 1.3. Conditions de la réaction PCR

Exécuter le programme suivant :

1 cycle de i) 2 minutes à 96 ° C : dénaturation de la matrice ADN

35 cycles de : ii) 20 secondes à 94 ° C : dénaturation de la matrice ADN



iii) 20 secondes à 68 ° C : hybridation avec les amorces

iv) 30 secondes à 72 ° C : extension de l'ADN complémentaire

1 cycle de : v) 10 minutes à 72 ° C (extension finale)

vi) maintenir à 4 ° C.

NB : Ce programme a été optimisé pour une utilisation avec un thermocycleur PerkinElmer 9600. Une modification de la durée des étapes des cycles ii), iii) et iv) peut être nécessaire pour une utilisation avec d'autres modèles.

#### 1.4. Analyse de restriction enzymatique de l'amplimère

Les produits PCR amplifiés d'ADN de *R. solanacearum* produisent un polymorphisme de taille des fragments de restriction distinct avec l'enzyme Ava II après incubation à 37 ° C.

### 2. Protocole PCR de Pastrik & Maiss (2000)

#### 2.1. Oligonucléotides amorces

Amorce sens Ps-1 5'-agt cga acg gca gcg ggg g-3'

Amorce antisens Ps-2 <Tc>5'-ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca-3'

Taille prévue de l'amplimère de la matrice d'ADN de *R. solanacearum* = 553 bp.

#### 2.2. Mélange réactif pour PCR

##### 1.2. Mélange réactif pour PCR

Pour la consultation du tableau, voir image

#### 2.3. Conditions de la réaction PCR

Exécuter le programme suivant :

1 cycle de : i) 5 minutes à 95 ° C : dénaturation de la matrice ADN

35 cycles de : ii) 30 secondes à 95 ° C : dénaturation de la matrice ADN

iii) 30 secondes à 68 ° C : hybridation avec les amorces

iv) 45 secondes à 72 ° C : extension de l'ADN complémentaire

1 cycle de : v) 5 minutes à 72 ° C (extension finale)

vi) maintenir à 4 ° C.

NB : Ce programme a été optimisé pour une utilisation avec le thermocycleur MJ Research PTC 200. Une modification de la durée des étapes des cycles ii), iii) et iv) peut être nécessaire pour une utilisation avec d'autres modèles.

#### 2.4. Analyse de restriction enzymatique de l'amplimère

Les produits PCR amplifiés d'ADN de *R. solanacearum* produisent un polymorphisme de taille des fragments de restriction distinct avec l'enzyme Taq I après incubation à 65 ° C pendant trente minutes. Les fragments de restriction tirés du fragment spécifique de *R. solanacearum* ont une longueur de 457 bp et de 96 bp.

### 3. Protocole PCR multiplex avec contrôle interne de la PCR (Patrik et al., 2002)

#### 3.1. Oligonucléotides amorces

Amorce sens Rs-1-F <Tc>5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Amorce antisens Rs-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Amorce sens Ns-5-F 5'-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3'

Amorce antisens Ns-6-R 5'-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3'

Taille prévue de l'amplimère de la matrice d'ADN de *R. solanacearum* = 718 bp (en présence de l'amorce Rs)

Taille de l'amplimère prévue du contrôle interne de la PCR de 18S ARNr = 310 bp (en présence de l'amorce Ns).

#### 3.2. Mélange réactif pour PCR

Pour la consultation du tableau, voir image

#### 3.3. Conditions de la réaction PCR

Exécuter le programme suivant :

1 cycle de : i) 5 minutes à 95 ° C : dénaturation de la matrice ADN

35 cycles de : ii) 30 secondes à 95 ° C : dénaturation de la matrice ADN

iii) 30 secondes à 58 ° C : hybridation avec les amorces

iv) 45 secondes à 72 ° C : extension de l'ADN complémentaire

1 cycle de : v) 5 minutes à 72 ° C (extension finale)

vi) maintenir à 4 ° C.

Note : Ce programme a été optimisé pour une utilisation avec le thermocycleur MJ Research PTC 200. Une modification de la durée des étapes des cycles ii), iii) et iv) peut être nécessaire pour une utilisation avec d'autres modèles.

#### 3.4. Analyse de restriction enzymatique de l'amplimère

Les produits PCR amplifiés d'ADN de *R. solanacearum* produisent un polymorphisme de taille des fragments de restriction distinct avec l'enzyme Bsm I ou un isoschizomère (par exemple : Mva 1269 I) après incubation à 65° C pendant trente minutes.

#### 4. Protocole PCR spécifique au biovar de *R. solanacearum* (Patrik et al., 2001)

##### 4.1. Oligonucléotides amorces

Amorce sens Rs-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Amorce antisens Rs-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Amorce antisens Rs-3-R 5'-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3'

Taille prévue de l'amplimère de la matrice d'ADN de *R. solanacearum* :

avec Rs-1-F/Rs-1-R = 718 bp

avec Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp

##### 4.2. Mélange réactif pour PCR

Pour la consultation du tableau, voir image

##### 4.3. Conditions de la réaction PCR

Exécuter le programme suivant pour les réactions spécifiques au biovar 1/2 et au biovar 3/4/5 :

1 cycle de : i) 5 minutes à 95 ° C : dénaturation de la matrice ADN

35 cycles de : ii) 30 secondes à 95 ° C : dénaturation de la matrice ADN

iii) 30 secondes à 58 ° C : hybridation avec les amorces

iv) 45 secondes à 72 ° C : extension de l'ADN complémentaire

1 cycle de : v) 5 minutes à 72 ° C (extension finale)

vi) maintenir à 4 ° C

NB : Ce programme a été optimisé pour une utilisation avec le thermocycleur MJ Research PTC 200. Une modification de la durée des étapes des cycles ii), iii) et iv) peut être nécessaire pour une utilisation avec d'autres modèles.

##### 4.4. Analyse de restriction enzymatique de l'amplimère

Les produits PCR amplifiés d'ADN de *R. solanacearum* utilisant les amorces Rs-1-F et Rs-1-R produisent un polymorphisme de taille des fragments de restriction distinct avec l'enzyme Bsm I ou un isoschizomère (par exemple. : Mva 1269 I) après incubation à 65 ° C pendant trente minutes. Les produits PCR amplifiés d'ADN de *R. solanacearum* utilisant les amorces Rs-1-F et Rs-3-R n'ont pas de sites de restriction.

#### 5. Préparation du tampon de lest

##### 5.1. Bleu de bromophénol (solution concentrée à 10 %)

Bleu de bromophénol 5 g

Eau distillée (bidest) 50 ml

5.2. Tampon de lest

Glycérol (86 %) 3,5 ml

Bleu de bromophénol (5.1) 300 µl

Eau distillée (bidest) 6,2 ml

6. Tampon tris-acétate EDTA (TAE) 10X, pH 8,0

Tampon tris 48,40 g

Acide acétique glacial 11,42 ml

EDTA (sel disodique) 3,72 g

Eau distillée 1,00 l

Diluer jusqu'à 1X avant utilisation.

Egalement disponible dans le commerce (par exemple : Invitrogen ou équivalent)

Appendice 7

Réactif validés pour le test FISH

1. Oligosondes

Sonde OLI-1-CY3 spécifique de *R. solanacearum* : 5'-ggc agg tag caa gct acc ccc-3'

Sonde eubactérienne EUB-338-FITC non spécifique : 5'-gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. Solution de fixation

[ATTENTION! LE FIXATIF CONTIENT DU PARAFORMALDEHYDE, QUI EST TOXIQUE. PORTER DES GANTS ET NE PAS INHALER. IL EST CONSEILLE DE TRAVAILLER SOUS UNE HOTTE DE CHIMISTE.]

i) Chauffer 9 ml d'eau pour la biologie moléculaire (exemple : eau ultrapure) à environ 60 ° C et ajouter 0,4 g de paraformaldéhyde. Le paraformaldéhyde est dissous après avoir ajouté cinq gouttes de 1N NaOH et remué avec un agitateur magnétique.

ii) Ajuster le pH à 7,0 par l'ajout de 1ml de tampon phosphaté 0,1M (PB; pH 7,0) et de cinq gouttes de 1N HCl. Vérifier le pH avec les bandes indicatrices et ajuster en cas de besoin avec du HCl ou du NaOH. [ATTENTION! NE PAS UTILISER UN PH-METRE DANS LES SOLUTIONS CONTENANT DU PARAFORMALDEHYDE.]

iii) Filtrer la solution au travers d'un filtre à membrane de 0,22 µm et protéger de la poussière à 4 ° C jusqu'à l'utilisation.

3. Hybmix 3X

NaCl 2,7 M

Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)

EDTA (filtre stérilisé et passé à l'autoclave) 15 mM

Diluer jusqu'à 1X comme requis.

#### 4. Solution d'hybridation

Hybmix 1X

Dodécylsulfate de sodium (DSS) 0,01 %

Formamide 30 %

Sonde EUB 338 5 ng/μ l

Sonde OLI-1 ou OLI-2 5 ng/μ l

Préparer des quantités de solution d'hybridation suivant les calculs du tableau 1. Pour chaque lame (contenant deux échantillons différents en double), 90 μl de solution d'hybridation sont requis.

**IMPORTANT : LE FORMAMIDE EST TRES TOXIQUE. IL CONVIENT DONC DE PORTER DES GANTS ET DE PRENDRE LES MESURES DE SECURITE NECESSAIRES!**

Pour la consultation du tableau, voir image

#### 5. Tampon M phosphaté 0,1M, pH 7,0

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,52 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,44 g

Eau distillée 1,00 l

Dissoudre les ingrédients, vérifier le pH et stériliser à 1° autoclave à 121° C pendant quinze minutes.

#### Appendice 8

##### Culture d'aubergines et de tomates

Semer des graines de tomates (*Lycopersicon esculentum*) ou d'aubergines (*Solanum melongena*) dans une terre de semis pasteurisée. Repiquer les plantules dans de la terre de repotage pasteurisée lorsque les cotylédons sont entièrement développés (dix à quatorze jours).

Les aubergines ou les tomates doivent être cultivées en serre dans les conditions d'environnement suivantes avant l'inoculation :

Durée du jour : quatorze heures, ou durée naturelle de la journée si elle est supérieure,

Température : jour : 21 à 24 ° C,

nuit : 14 à 18 ° C.

Variété sensible de tomate : "Moneymaker"

Variété sensible d'aubergine : "Black Beauty"

## REFERENCES

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172 : 762-770.
2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Official Journal of the European Communities L235, 1-39.
3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology* 105; 373-380.
4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J.L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3634-3638.
5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* : detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1:113-121.
6. Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26; 663-678.
7. Englebrect, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In : A.C. Hayward (ed.) *Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27; 265-277.
9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 69; 269-280.
10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. *J. Phytopathology* 146; 379-384.
11. Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18, 343-351.
12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14; 335-345.
13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44; 693-695.

14. Klement Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.
16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In : H.W. Dehne et al., (eds). *Klewer Academic Publishers*. pp. 117-121.
17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295.
18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85; 528-536.
19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F Wang, T.-H Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F.Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5; 19-33.
20. Pastrok, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathology* 148; 619-626.
21. Pastrok, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. *European Journal of Plant Pathology* 108, 831-842.
22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67-79.
23. Schaad, W. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota : 373 pp.
24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing : construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J. Gen. Microbiol.* 139 : 1587-1594.
25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology* 61; 4262-4268.
26. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42; 281-295.
27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease

bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46; 10-15.

28. Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigalet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In : Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) *Bacterial wilt disease : Molecular and Ecological Aspects*. Springer (Berlin) pp. 44-49.

29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative fluorescent 5' nuclease TaqMan assay. *Applied and Environmental Microbiology* 66; 2853-2858.

30. Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse and A.D.L. Akkermans. 1998. Detection of *R. solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23s rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 4546-4554.

Vu pour être annexé à notre arrêté du 26 janvier 2014 relatif à la lutte contre la pourriture brune de la pomme de terre (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.)

PHILIPPE

Par le Roi :

La Ministre de l'Agriculture

Mme S. LARUELLE

### Annexe III

#### Matériel biologique de test

1. Dans tous les cas d'apparition suspectée pour lesquels on a constaté, lors du ou des tests de dépistage pratiqués selon les méthodes décrites à l'annexe II pour le matériel végétal énuméré et dans tous les autres cas, une réaction positive à confirmer ou infirmer par ces méthodes, il convient de garder et de conserver dans des conditions appropriées jusqu'à l'achèvement desdites méthodes :

a) tous les tubercules faisant partie de l'échantillon et, dans la mesure du possible, toutes les plantes faisant partie de l'échantillon,

b) tout extrait résiduel et matériel supplémentaire préparé pour le ou les tests de dépistage, tels que les lames préparées en vue de tests d'immunofluorescence et

c) toute documentation pertinente.

La conservation des tubercules permettra de tester les variétés, le cas échéant.

2. En cas de confirmation de la présence de l'organisme, il convient de garder et de conserver dans des conditions appropriées :

a) le matériel visé au point 1 et



b) un échantillon de la tomate ou aubergine contaminée par l'inoculation d'extrait de tubercule ou de plante, le cas échéant, et

c) la culture isolée de l'organisme,

et ce pendant au moins un mois après la notification aux autres Etats membres et à la Commission européenne de la contamination déclarée conformément à l'article 5, § 1er.

Vu pour être annexé à notre arrêté du 26 janvier 2014 relatif à la lutte contre la pourriture brune de la pomme de terre (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.)

PHILIPPE

Par le Roi :

La Ministre de l'Agriculture

Mme S. LARUELLE

Annexe IV

Détermination de l'étendue et de la ou des sources primaires de la contamination

Les éléments sur lesquels porte l'enquête visée à l'article 5, § 1er, a) i), sont les suivants, lorsqu'ils sont pertinents :

i) lieux de production :

a) culture, actuelle ou passée, de pommes de terre qui sont liées par clonage à des pommes de terre déclarées contaminées par l'organisme;

b) culture, actuelle ou passée, de tomates provenant de la même source que les tomates déclarées contaminées par l'organisme;

c) culture, actuelle ou passée, de pommes de terre ou de tomates placées sous contrôle officiel en raison de la présence suspectée de l'organisme;

d) culture, actuelle ou passée, de pommes de terre qui sont liées par clonage à des pommes de terre qui ont été cultivées dans des lieux de production déclarés contaminés par l'organisme;

e) culture de pommes de terre ou de tomates situées à proximité de lieux de production contaminés, et notamment de ceux partageant du matériel et des installations de production soit directement soit par l'intermédiaire d'un entrepreneur commun;

f) utilisation, pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation, d'eaux de surface provenant d'une source dont la contamination par l'organisme est confirmée ou suspectée;

g) utilisation, pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation, d'eaux de surface provenant d'une source utilisée en commun avec des lieux de production dont la contamination par l'organisme est confirmée ou suspectée;

h) submersion actuelle ou passée par des eaux de surface dont la contamination par l'organisme est confirmée ou suspectée et

ii) eaux de surface utilisées pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation d'un ou plusieurs champs ou lieux de production dont la contamination par l'organisme est confirmée ou qui ont submergé ceux-ci.

Vu pour être annexé à notre arrêté du 26 janvier 2014 relatif à la lutte contre la pourriture brune de la pomme de terre (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.)

PHILIPPE

Par le Roi :

La Ministre de l'Agriculture

Mme S. LARUELLE

Annexe V

Détermination de l'étendue de la contamination probable et de la contamination possible

Détermination de l'étendue de la contamination probable

1. La détermination de l'étendue de la contamination probable visée à l'article 5, § 1er, a) iii) et c) iii), comprend les éléments suivants :

a) le matériel végétal énuméré cultivé en un lieu de production déclaré contaminé conformément à l'article 5, § 1er, a) ii);

b) le ou les lieux de production ayant un lien avec le matériel végétal énuméré qui a été déclaré contaminé conformément à l'article 5, § 1er, a) ii), y compris ceux partageant l'équipement et les installations de production soit directement soit par l'intermédiaire d'un entrepreneur commun;

c) le matériel végétal énuméré produit dans le ou les lieux de production visés au b), ou présent dans lesdits lieux pendant la période où le matériel végétal énuméré qui a été déclaré contaminé conformément à l'article 5, § 1er, a) ii), était présent dans le lieu de production visé au a) ;

d) les locaux où le matériel végétal énuméré provenant des lieux de production visés aux a) à c) est manipulé;

e) tout matériel, véhicule, bâtiment, entrepôt ou partie de ceux-ci, ainsi que tout autre objet, y compris l'emballage, qui peut avoir été en contact avec le matériel végétal énuméré qui a été déclaré contaminé conformément à l'article 5, § 1er, a) ii);

f) tout matériel végétal énuméré entreposé dans des équipements ou objets visés au e) ou en contact avec eux, avant leur nettoyage ou leur désinfection;

g) à la suite de l'enquête et des tests visés à l'article 5, § 1er, a) i), dans le cas de la pomme de terre, les tubercules ou les plants ayant un lien clonal ou parental et, dans le cas de la tomate, une source commune avec le matériel végétal énuméré qui a été déclaré contaminé conformément à l'article 5, §

1er, a) ii) et pour lequel, bien que les résultats des tests concernant la présence de l'organisme aient été négatifs, il apparaît que la contamination est probable par le biais d'un lien clonal. Un test d'identification variétale peut être opéré sur les tubercules ou plants contaminés;

h) le ou les lieux de production du matériel végétal énuméré visés au g);

i) le ou les lieux de production du matériel végétal énuméré utilisant, pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation, de l'eau déclarée contaminée conformément à l'article 5, § 1er, c) ii);

j) le matériel végétal énuméré produit dans des champs submergés par des eaux de surface dont la contamination est confirmée.

Détermination de l'étendue de la contamination possible

2. La détermination de la propagation possible visée à l'article 5, § 1er, a) iv) et c) iii), comprend :

i) dans les cas visés à l'article 5, § 1er, a) iv),

a) la proximité d'autres lieux de production où le matériel végétal énuméré est cultivé,

b) la production et l'utilisation communes de stocks de plants de pommes de terre,

c) les lieux de production utilisant des eaux de surface, pour l'irrigation ou le traitement par pulvérisation du matériel végétal énuméré, dans les cas où il existe ou existait un risque d'écoulement d'eaux de surface à partir des lieux de production déclarés contaminés conformément à l'article 5, § 1er, a) ii), ou un risque de submersion de ceux-ci;

ii) dans les cas où des eaux de surface ont été déclarées contaminées conformément à l'article 5, § 1er, c) ii) :

a) le ou les lieux de production produisant du matériel végétal énuméré adjacents aux eaux de surface déclarées contaminées ou risquant d'être submergés par ces eaux;

b) tout bassin d'irrigation délimité, associé aux eaux de surface déclarées contaminées;

c) les étendues d'eau en liaison avec des eaux de surface déclarées contaminées, en tenant compte :

1° de la direction et du niveau de débit de l'eau déclarée contaminée

2° de la présence de plantes hôtes sauvages de la famille des solanacées.

Vu pour être annexé à notre arrêté du 26 janvier 2014 relatif à la lutte contre la pourriture brune de la pomme de terre (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.)

PHILIPPE

Par le Roi :

La Ministre de l'Agriculture

Mme S. LARUELLE

Annexe VI

## Mesures de lutte spécifiques

### Mesures pour l'élimination des tubercules et plantes déclarés contaminés

1. Les dispositions, visées à l'article 6, § 1er, pour l'élimination, sous contrôle de l'Agence, du matériel végétal déclaré contaminé en vertu de l'article 5, § 1er, a) ii) sont les suivantes :

a) utilisation comme aliment des animaux après un traitement thermique de telle sorte qu'il n'y ait aucun risque de survie de l'organisme ou

b) élimination dans un site d'élimination des déchets officiellement agréé ne présentant aucun risque identifiable de propagation de l'organisme dans l'environnement, par exemple par infiltration dans les terres agricoles ou contact avec des points d'eau susceptibles d'être utilisés pour l'irrigation de terres agricoles ou

c) incinération ou

d) transformation industrielle par livraison directe et immédiate à une entreprise de transformation disposant d'installations officiellement agréées d'élimination des déchets dont il a été établi qu'elles ne présentent aucun risque identifiable de propagation de l'organisme, ainsi que d'un système permettant de nettoyer et de désinfecter au moins les véhicules quittant l'entreprise ou

e) d'autres mesures, pour autant qu'il soit établi qu'elles ne présentent pas de risque identifiable de propagation de l'organisme; ces mesures et leur justification doivent être notifiées à la Commission et aux autres Etats membres.

Tout déchet restant, lié aux processus susmentionnés, et découlant de ceux-ci doit être éliminé selon des méthodes officiellement agréées conformément à l'annexe VII de la Directive 98/57/CE concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

### Mesures visant les tubercules ou plantes déclarés probablement contaminés

2. L'utilisation ou l'élimination appropriées du matériel végétal énuméré visé à l'article 6, § 2, sous le contrôle de l'Agence moyennant une communication adéquate entre l'Agence et, le cas échéant, les organismes officiels compétents des Etats membres concernés de manière à garantir ce contrôle à tout moment et moyennant aussi l'accord de l'Agence ou, le cas échéant, de l'organisme officiel compétent de l'Etat membre où les pommes de terre doivent être conditionnées ou transformées quant aux installations d'élimination des déchets visées aux premier et deuxième tirets du point i) de l'annexe VII de la Directive 98/57/CE du 20 juillet 1998 du Conseil des Communautés européennes du 20 juillet 1998 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., impliquent :

i) pour les tubercules de pomme de terre :

a) leur utilisation en tant que pommes de terre de conservation destinées à la consommation, en emballages prévus pour une livraison et une utilisation directes ne nécessitant aucun réemballage, dans un site disposant d'installations appropriées d'élimination des déchets. Les pommes de terre destinées à la plantation ne peuvent être manipulées sur le même site que si cela se fait d'une manière séparée ou après nettoyage et désinfection ou

b) leur utilisation en tant que pommes de terre de conservation destinées à la transformation industrielle et à une livraison directe et immédiate à une entreprise de transformation disposant

d'installations appropriées d'élimination des déchets ainsi que d'un système permettant de nettoyer et de désinfecter au moins les véhicules quittant l'entreprise ou

c) une autre utilisation ou élimination, pour autant qu'il soit établi qu'il n'y a pas de risque identifiable de propagation de l'organisme et sous réserve de l'accord de l'Agence ou, le cas échéant, des organismes officiels compétents de ou des Etats membres concernés;

ii) pour d'autres parties de plantes comprenant la tige et les débris de feuillage :

a) destruction ou

b) une autre utilisation ou élimination, pour autant qu'il soit établi qu'il n'y a pas de risque identifiable de propagation de l'organisme et sous réserve de l'accord de l'Agence.

#### Méthodes de désinfection

3. Les méthodes appropriées de décontamination des objets visés à l'article 6, § 3, sont le nettoyage et, le cas échéant, la désinfection, de telle sorte qu'il n'y ait aucun risque identifiable de propagation de l'organisme; elles sont appliquées sous la surveillance de l'Agence.

#### Mesures dans la zone délimitée

4. Les diverses mesures à mettre en oeuvre par l'Agence dans la zone délimitée établie conformément à l'article 5, § 1er, a) iv), et § 2. auxquelles il est fait référence à l'article 6, § 4, sont les suivantes :

4.1. Dans les cas où des lieux de production ont été déclarés contaminés conformément à l'article 5, § 1er, a) ii) :

a) dans un champ ou une unité de production en culture protégée déclaré(e) contaminé(e) conformément à l'article 5, 1er, a) ii), soit :

i) pendant au moins les quatre campagnes suivant la contamination déclarée :

1° des mesures sont prises en vue d'éliminer les repousses de pommes de terre et de tomates et les autres plantes hôtes de l'organisme, y compris les plantes adventices de la famille des solanacées

et

2° ne peuvent être plantés :

I) ni tubercules, ni plantes, ni semences botaniques de pommes de terre,

II) ni plants, ni semences de tomates,

III) en prenant en considération les caractéristiques biologiques de l'organisme :

- ni d'autres plantes hôtes,

- ni des plantes de l'espèce Brassica pour lesquelles il existe un risque identifié de survie de l'organisme,

- ni culture pour laquelle il existe un risque identifié de propagation de l'organisme,

3° durant la première campagne de récolte des pommes de terre ou des tomates suivant la période indiquée au point a), i) et à la condition que le champ ait été déclaré exempt de repousses de pommes de terre et de tomates et d'autres plantes hôtes, y compris des plantes adventices de la famille des solanacées, lors des inspections officielles, pendant au moins les deux campagnes consécutives précédant la plantation :

I) dans le cas des pommes de terre, seule la production de pommes de terre de conservation sera autorisée,

II) dans le cas des pommes de terre et des tomates, les tubercules de pomme de terre récoltés ou les plants de tomates, selon le cas, seront testés officiellement suivant la procédure détaillée à l'annexe II,

III) durant la campagne de récolte des pommes de terre ou des tomates suivant celle visée au II) et après un cycle approprié de rotation, qui est de deux ans au moins si des plants de pommes de terre doivent être cultivés, des recherches officielles sont effectuées conformément à l'article 3, § 1er,

ou

ii) pendant les cinq campagnes suivant celle de la contamination déclarée :

1° des mesures sont prises en vue d'éliminer les repousses de pommes de terre et de tomates et les autres plantes hôtes de l'organisme spontanément présentes, y compris les plantes adventices de la famille des solanacées, et

2° le champ est mis et maintenu, durant les trois premières années, soit en jachère nue, soit en céréales, selon le risque identifié, soit en prairie permanente, auquel cas il est fréquemment fauché à ras ou mis en pâturage intensif, soit enherbé pour la production de semences, puis pendant les deux années suivantes, planté de plantes non hôtes de l'organisme pour lesquelles il n'y a pas de risque identifié de survie ou de propagation de l'organisme,

3° durant la première campagne de récolte des pommes de terre ou des tomates suivant la période indiquée au 2° ) et à la condition que le champ ait été déclaré exempt de repousses de pommes de terre et de tomates et d'autres plantes hôtes, y compris des plantes adventices de la famille des solanacées, pendant au moins les deux campagnes consécutives précédant la plantation, lors des inspections officielles :

I) dans le cas des pommes de terre, la production de plants ou de pommes de terre de conservation sera autorisée,

II) les tubercules de pomme de terre récoltés ou les plants de tomates, selon le cas, seront testés suivant la procédure détaillée à l'annexe II;

b) dans tous les autres champs du lieu de production contaminé et à condition que l'Agence acquière la certitude que le risque constitué par les repousses de pommes de terre et de tomates et les autres plantes hôtes de l'organisme, y compris les adventices de la famille des solanacées spontanément présentes, a été éliminé :

i) au cours de la campagne suivant la contamination déclarée,

1° aucun tubercule, plante ou semences botaniques de pommes de terre ou d'autre plante hôte de l'organisme n'est planté ni semé ou

2° dans le cas des tubercules de pomme de terre, des plants de pommes de terre certifiés peuvent être plantés exclusivement en vue de la production de pommes de terre de conservation,

3° dans le cas des plants de tomates, des plants de tomates issus de semences répondant aux critères de l'arrêté royal pour la production de fruits uniquement,

ii) au cours de la deuxième campagne et, au moins, de la troisième campagne suivant la contamination déclarée :

1° dans le cas des pommes de terre, seuls des plants de pommes de terre certifiés sont plantés en vue de la production de plants de pommes de terre ou de pommes de terre de conservation,

2° dans le cas des tomates, seuls des plants de tomates issus de semences répondant aux critères de l'arrêté royal,

iii) pendant chacune des campagnes visées aux i) et ii) des mesures seront prises pour éliminer les repousses de pommes de terre et d'autres plantes hôtes de l'organisme spontanément présentes et une inspection officielle de la culture est menée à des moments appropriés et, dans chaque champ de pommes de terre, les pommes de terre récoltées sont testées officiellement suivant la procédure détaillée à l'annexe II;

c) immédiatement après la déclaration de contamination conformément à l'article 5, 1er, a) ii), et après la première campagne suivante :

i) toutes les machines et installations de stockage sur le lieu de production servant à la production des pommes de terre ou des tomates sont nettoyées et, si nécessaire, désinfectées selon des méthodes appropriées précisées au point 3,

ii) des contrôles officiels des programmes d'irrigation ou de traitement par pulvérisation, y compris l'interdiction de ces programmes, sont mis en place en cas de besoin pour prévenir la propagation de l'organisme;

d) dans une unité de production en culture protégée déclarée contaminée conformément à l'article 5, § 1er, a) ii), permettant le remplacement total du milieu de culture :

i) aucun tubercule, plante ou semence botanique de pomme de terre ni aucune autre plante hôte de l'organisme, y compris les plants et semences de tomates, n'est planté(e), sauf si ladite unité de production a été soumise à des mesures sous contrôle officiel visant l'élimination de l'organisme et de tout matériel végétal hôte, y compris, au moins, le remplacement complet du milieu de culture ainsi que le nettoyage et, le cas échéant, la désinfection de ladite unité et de tout l'équipement, et si, par la suite, elle a été agréée pour la production de pommes de terre ou de tomates par l'Agence et,

ii) la production de pommes de terre est issue de plants de pommes de terre certifiés ou de minitubercules ou de microplantas provenant de sources testées,

iii) la production de tomates est issue de semences répondant aux critères de l'arrêté royal ou dans le cas de multiplication végétative de plants de tomates issus de ces semences cultivés sous contrôle officiel,

iv) des contrôles officiels des programmes d'irrigation ou de traitement par pulvérisation, y compris l'interdiction de ces programmes, sont mis en place en cas de besoin pour prévenir la propagation de l'organisme.

4.2. A l'intérieur de la zone délimitée, sans préjudice des mesures énumérées au point 4.1, l'Agence :

a) immédiatement après la déclaration de la contamination, fait en sorte que toutes les machines et installations de stockage sur le lieu de production et ayant servi à la production de pommes de terre ou de tomates soient nettoyées et, si nécessaire, désinfectées selon des méthodes appropriées précisées au point 3;

b) immédiatement après la contamination déclarée et pendant au moins trois campagnes :

i) dans les cas où la zone délimitée a été déterminée conformément à l'article 5, § 1er, a) iv) :

1° surveille les installations pratiquant la culture, le stockage ou la manutention de tubercules de pomme de terre ou de tomates, ainsi que les locaux des entreprises exploitant sous contrat du matériel utilisé pour la production de pommes de terre ou de tomates,

2° exige que seuls des plants certifiés soient plantés pour toutes les cultures de pommes de terre dans ladite zone, et que soient soumis à des tests les plants de pommes de terre récoltés sur des lieux de production dont il a été établi qu'ils sont probablement contaminés en vertu de l'article 5, § 1er, a) iii),

3° exige, dans toutes les entreprises de la zone, la manutention séparée des plants de pommes de terre et des pommes de terre de conservation, ou la mise en oeuvre d'un système de nettoyage et, le cas échéant, de désinfection entre la manutention des plants et les stocks de conservation,

4° exige la plantation de plants de tomates issus uniquement de semences répondant aux critères de l'arrêté royal;

5° procède à des recherches officielles conformément à l'article 3, § 1er;

ii) dans les cas où des eaux de surface ont été déclarées contaminées conformément à l'article 5, § 1er, c) ii), ou incluses parmi les éléments de propagation possible de l'organisme conformément à l'annexe V, point 2 :

1° procède à une enquête annuelle à des moments opportuns, y compris au prélèvement d'échantillons d'eaux de surface et, le cas échéant, de plantes hôtes appropriées de la famille des solanacées dans les points d'eau concernés ainsi qu'à des tests effectués suivant les méthodes figurant à l'annexe II pour le matériel végétal énuméré et pour les autres cas,

2° met en place, dans les zones visées à l'article 6 § 2, des contrôles officiels des programmes d'irrigation et de traitement par pulvérisation, conformément aux dispositions visées à l'annexe VII ;

3° dans les cas où des effluents de déchets liquides sont contaminés, mettent en place des contrôles officiels de l'élimination des déchets solides ou liquides des entreprises de transformation industrielle ou de conditionnement traitant du matériel végétal énuméré;

c) établit, le cas échéant, un programme de remplacement de tous les stocks de plants de pommes de terre sur une période appropriée.

Vu pour être annexé à notre arrêté du 26 janvier 2014 relatif à la lutte contre la pourriture brune de la pomme de terre (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.)

PHILIPPE

Par le Roi :



La Ministre de l'Agriculture

Mme S. LARUELLE

## Annexe VII

### Zones délimitées en cas de contamination des eaux de surface

Au sein des zones délimitées visées à l'article 5 § 2 :

a) les mesures suivantes sont d'application :

1° il est interdit d'utiliser, de quelque façon que ce soit, de l'eau de surface pour la culture de pommes de terre, de tomates et d'aubergines;

2° des installations ou parties d'installation, utilisées pour l'irrigation, au moyen d'eau de surface, de cultures autres que de pommes de terre, ne peuvent entrer en contact avec des parcelles de pommes de terre;

3° chaque producteur doit respecter les obligations suivantes :

i) chaque année avant le 30 avril, au moyen d'un formulaire fixé par l'Agence, déclarer toutes ses parcelles de pommes de terre, cultivées ou à cultiver, d'une superficie de plus de 10 ares. Cette déclaration doit être accompagnée d'un (de) plan(s) de situation à l'échelle 1/10 000 sur le(s)quel(s) ces parcelles de pommes de terre sont indiquées;

ii) s'engager à ne cultiver sur le même emplacement qu'une fois tous les trois ans des pommes de terre, y compris les plants de pommes de terre et les pommes de terre de primeur;

iii) avant de procéder à l'irrigation d'une parcelle de pommes de terre avec de l'eau autre que de l'eau de surface, rincer entièrement et à fond, avec de l'eau autre que de l'eau de surface, l'installation utilisée à cette fin;

iv) lors de l'irrigation, au moyen d'eau de surface, de parcelles autres que de pommes de terre, toujours prendre toutes les précautions nécessaires afin d'éviter tout contact entre cette eau de surface et des parcelles de pommes de terre;

b) En dérogation à l'interdiction définie en a), de l'eau de surface provenant d'un bassin collecteur peut être utilisée, sous la responsabilité du producteur, pour l'irrigation de tomates ou d'aubergines, à condition :

i. que le producteur introduise à cette fin, chaque année avant le 30 avril, une déclaration au moyen d'un formulaire fixé par l'Agence, accompagné d'un (de) plan(s) de situation à l'échelle 1/10 000 sur le(s)quel(s) les parcelles à irriguer ainsi que le bassin collecteur à utiliser sont indiqués;

ii. que le bassin collecteur concerné soit indemne de plantes hôtes de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.;

iii. que le bassin collecteur concerné soit rempli exclusivement d'eau souterraine et/ou de pluie, ou que le bassin collecteur concerné soit rempli d'eau de surface y entreposée pendant au moins 48 heures;

iv. que des analyses régulières effectuées dans un laboratoire agréé sur des échantillons d'eau de surface prélevés sous la surveillance de l'Agence démontrent qu'aucun risque phytosanitaire n'est présent.

Vu pour être annexé à notre arrêté du 26 janvier 2014 relatif à la lutte contre la pourriture brune de la pomme de terre (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.)

PHILIPPE

Par le Roi :

La Ministre de l'Agriculture

Mme S. LARUELLE

**Publié le : 2014-03-11**