

# Diagnostic moléculaire des maladies bactériennes de quarantaine de la pomme de terre

Christophe Debonneville, Isabelle Kellenberger et Olivier Schumpp  
Agroscope, Protection des Végétaux, Route de Duillier 50, 1260 Nyon, Suisse  
Renseignements: christophe.debonneville@agroscope.admin.ch

<https://doi.org/10.34776/afs12-157> Date de publication: 29. Septembre 2021



**Figure 1** | Tubercule montrant des symptômes de pourriture brune caractéristiques d'une infection par *Ralstonia solanacearum*.

## Résumé

Les bactéries *Clavibacter sepedonicus* et *Ralstonia solanacearum* sont responsables de la pourriture annuelle et de la pourriture brune de la pomme de terre. Elles sont placées sur la liste des organismes nuisibles par l'Organisme Européen de la Protection des Plantes (OEPP) et soumises à une réglementation stricte en Suisse. L'entrée en vigueur de la nouvelle Ordonnance sur la Santé des Végétaux (OSaVé) au début de l'année 2020 implique le contrôle aléatoire des zones de production de pommes de terre de consommation ce qui accroît significativement le nombre de lots de pommes de terre à tester. La méthode de détection par la microscopie d'immunofluorescence (IF), utilisée par Agroscope depuis plus de 30 ans, est très fastidieuse et peu adaptée au haut débit. Ce travail présente une comparaison entre

l'IF et une méthode d'analyse moléculaire par qPCR, plus appropriée à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Les résultats montrent que la performance de la qPCR est comparable voire meilleure que celle de la méthode actuelle en termes de sensibilité et de spécificité. De plus, elle permet la détection simultanée des deux pathogènes induisant un gain de temps important. Tout comme l'IF, la qPCR est efficace pour mettre en évidence les infections latentes des tubercules. Cette technique sera mise en place à Agroscope en 2021 et permettra d'assurer le dépistage initial des bactéries de quarantaine de manière robuste et fiable.

**Key words:** Potato, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter sepedonicus*, detection.

## Introduction

Les bactéries phytopathogènes *Clavibacter sepedonicus* (Cs) et *Ralstonia solanacearum* (Rs) provoquent la pourriture annulaire et la pourriture brune de la pomme de terre (Figure 1). Ces deux organismes peuvent affecter considérablement le rendement des pommes de terre. Ils sont inscrits sur la liste A2 des organismes nuisibles de l'Organisation Européenne de la Protection des Plantes (OEPP) depuis 1975 (OEPP 2017). Les organismes nuisibles de la liste A2 sont présents de façon très localisée et sont recommandés pour une réglementation en tant qu'organismes de quarantaine dans tous les pays de la zone OEPP pour limiter leur dissémination. Sur son territoire, la Suisse soumet les organismes de quarantaine à une réglementation stricte qui inclut une obligation d'annonce et de contrôle (OSaVé-DEFR-DETEC). En cas de détection de ces organismes dans leurs cultures, les producteurs de pommes de terre sont soumis à des tests supplémentaires, des mesures de confinement d'une partie de leur exploitation et des restrictions sur la croissance des pommes de terre les années suivantes.

Agroscope prend en charge le dépistage de Cs dans les lots de multiplication suisses depuis 1988. Ce dépistage inclut Rs depuis 1995 suite à la découverte de lots de semences infectés en Hollande – fournisseur important pour la Suisse – et à l'interception à la frontière d'un lot infecté par cette bactérie en provenance de Turquie (Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, 1988, 1995). Depuis cette date, les lots issus de la multiplication en Suisse ou importés sont testés chaque année par microscopie d'immunofluorescence (IF). Si le test est positif, le diagnostic doit alors être confirmé par l'isolement du pathogène et un test d'identification. Un test de pathogénicité est nécessaire pour déclarer un échantillon comme étant infecté (EC, 2006a, 2006b). Cette stratégie se révèle efficace pour protéger la filière de production de la pomme de terre, la Suisse étant exempte de ces deux pathogènes à ce jour.

Suite au renforcement de l'ordonnance sur la protection des végétaux entrée en vigueur en janvier 2020 (OSaVé-DEFR-DETEC) et qui étend la surveillance systématique de ces deux maladies aux pommes de terre de consommation, le nombre d'échantillons à analyser a fortement augmenté. La méthode de microscopie d'immunofluorescence n'est pas assez rapide et n'est plus adaptée. Une méthode d'analyse moléculaire basée sur la PCR quantitative en temps réel (qPCR) est une alternative efficace pour le dépistage initial des bactéries de quarantaine (Vreeburg *et al.*, 2016). Similaire à celle utilisée pour le dépistage des 6 virus de la pomme de

terre dans les plants de semences (Schumpp *et al.*, 2021), elle est particulièrement adaptée à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Elle est aussi très flexible et peut intégrer la détection d'une grande diversité de maladies bactériennes. Elle a été mise en place à Agroscope à Changins en 2021. Cet article présente les résultats de comparaison de la sensibilité et de la spécificité de la détection de Rs et de Cs par microscopie d'immunofluorescence et par qPCR.

## Matériels et méthodes

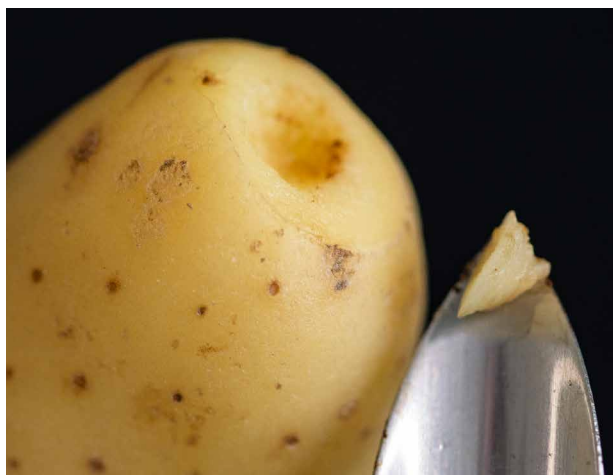
### Préparation des extraits

Une gamme de 6 concentrations de  $10e^7$  bactéries par ml (cfu/ml) à  $10e^2$  cfu/ml a été préparée dans de l'extrait de tubercule sain pour chacune des souches bactériennes décrites dans le tableau 1. L'extrait de tubercule sain a été produit selon la méthode utilisée pour le dépistage bactérien réalisé chaque année à Agroscope: 200 tubercules ont été lavés et séchés à l'air. Une pelure recouvrant l'extrémité du talon de chaque tubercule a été retirée pour prélever un cône de tissu vasculaire (Figure 2). Les cônes ont été incubés dans 25 ml de tampon de macération (30 mM  $Na_2HPO_4$ , 20 mM  $KH_2PO_4$ , 4 mM  $Na_4P_2O_4$ , pH 7,0) à 4°C sur un agitateur rotatif pendant la nuit. Le surnageant a été centrifugé à 4°C pendant 20 min à 4000 rpm et le culot a été suspendu par agitation au vortex dans 7,5 mM  $Na_2HPO_4$ , 2,5 mM  $NaH_2PO_4 \times 1 H_2O$ , pH 7,2 en conditions stériles.

Pour la détection de l'infection latente, un cône de chaque tubercule a été incubé dans 1 ml de tampon de macération à 4°C sur un agitateur rotatif pendant la nuit. Le surnageant a été ensuite traité selon la même procédure décrite ci-dessus.

**Tableau 1 | Souches de bactéries utilisées dans cette étude**

	Identification	Provenance	Plante hôte
<i>Ralstonia solanacearum</i> (Phylotype II)	06/086	Collection Agroscope	Pomme de terre
<i>Ralstonia solanacearum</i> (Phylotype I)	97/41-1	Collection Agroscope	Tabac
<i>Ralstonia solanacearum</i> (Phylotype III)	R1	Collection Agroscope	Rosier
<i>Clavibacter sepedonicus</i>	1027	CNBP Angers	Pomme de terre
<i>Clavibacter sepedonicus</i>	2137	NCPPB	Pomme de terre
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	1460	CNBP Angers	Tomate
<i>Dickeya solani</i>	07/044	Collection Agroscope	Pomme de terre



**Figure 2** | Prélèvement d'un cône de tissu vasculaire sur un tubercule.

### Microscopie d'immunofluorescence

La détection des souches de *Rs* a été réalisée avec des anticorps polyclonaux développés à Agroscope dilués à 1/400 et les souches de *Cs* ont été détectées avec des anticorps polyclonaux de Loewe #07364 dilués à 1/8000. 20 µl d'extrait de tubercule ont été étalés sur 2 alvéoles de lames de microscope (MP, #6041805E) puis séchés 30 à 60 min à 50 °C et recouvert de 20 µl d'anticorps primaires dilués dans du tampon IF (140 mM NaCl, 7,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 1 H<sub>2</sub>O, 0,02 % NaN<sub>3</sub>) pendant 30 min dans une boîte humidifiée. Les alvéoles ont été lavées 2 × 3 min avec du tampon IF et recouvertes de 20 µl d'anticorps secondaires couplés à une molécule d'isothiocyanate de fluorescéine dilués 100 × dans du tampon IF pendant 30 minutes dans une boîte humidifiée à l'abri de la lumière (Sigma-Aldrich #F-6005 pour *Rs*; Loewe #07200 pour *Cs*). Les alvéoles ont été lavées 2 × 3 min avec du tampon IF puis séchées à l'aide d'un papier absorbant.

Une goutte de «Dako Fluorescence Mounting Medium» (Dako, Réf. S3023) a été déposée sur chaque alvéole de la lame recouverte d'une lamelle scellée avec du vernis à ongles avant l'observation au microscope à épifluorescence (Leitz, Laborlux K) selon le standard de la directive européenne EC (1998) qui recommande d'observer deux diamètres perpendiculaires ainsi que le pourtour des alvéoles de la lame à un grossissement de 500 ou 1000.

### Extraction des ADN

150 µl d'extrait et 550 µl de tampon d'extraction (250 mM NaCl, 200 mM Tris, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS, 2 % PVP, pH 7,5) ont été incubés dans un micro tube de 1,5 ml pendant 20 min à 70 °C sous agitation puis à température ambiante pendant 30 min sans agitation. Après centrifuga-

tion à 6800 rpm pendant 4 min, 600 µl de surnageant ont été transférés dans un tube 1,5 ml contenant 600 µl d'isopropanol. Ils ont été mélangés par inclination douce des tubes 3 à 4 fois et les ADN ont été précipités par incubation 1 h à température ambiante ou toute la nuit à -20 °C. Après centrifugation à 14 000 rpm pendant 2 min, le culot d'ADN a été lavé avec 750 µl d'éthanol 70 %, séché pendant la nuit à température ambiante et suspendu le lendemain dans 250 µl de Tris 10 mM (pH 7,5).

### Analyse par qPCR

L'analyse qPCR a été réalisée à l'aide de deux microlitres d'acide nucléique dans une réaction PCR de 15 µl (Promega, A6101) selon les recommandations du fabricant. Le programme du thermocycleur était le suivant: 1 cycle de dénaturation (95 °C pendant 5 min) suivi de 35 cycles d'amplification (15 s à 95 °C, 30 s à 60 °C). Les amplifications ont été réalisées sur une machine CFX96 (BioRad) et les résultats analysés à l'aide du programme CFX Maestro 2.0 (BioRad V5.0.021.0616). Les amorces et sondes utilisées sont issues de Schaad *et al.* (1999) pour *Cs*, de Körner *et al.* (2017) pour *Rs* et de Weller *et al.* (2000) pour le gène de la cytochrome oxydase de la pomme de terre (*Cox*) utilisé comme contrôle interne de l'amplification de la qPCR.

## Résultats

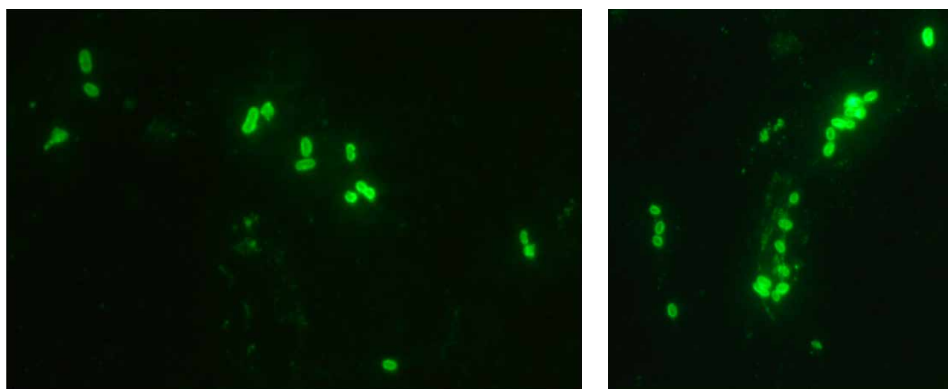
### Détection de *Rs* et *Cs* dans des extraits de pomme de terre

Une gamme de dilution dans un extrait de tubercules sains, de 10<sup>7</sup> cfu/ml à 10<sup>2</sup> cfu/ml, réalisée pour chaque souche bactérienne (Tableau 1) a été utilisée pour comparer la sensibilité et la spécificité de détection des méthodes IF et qPCR.

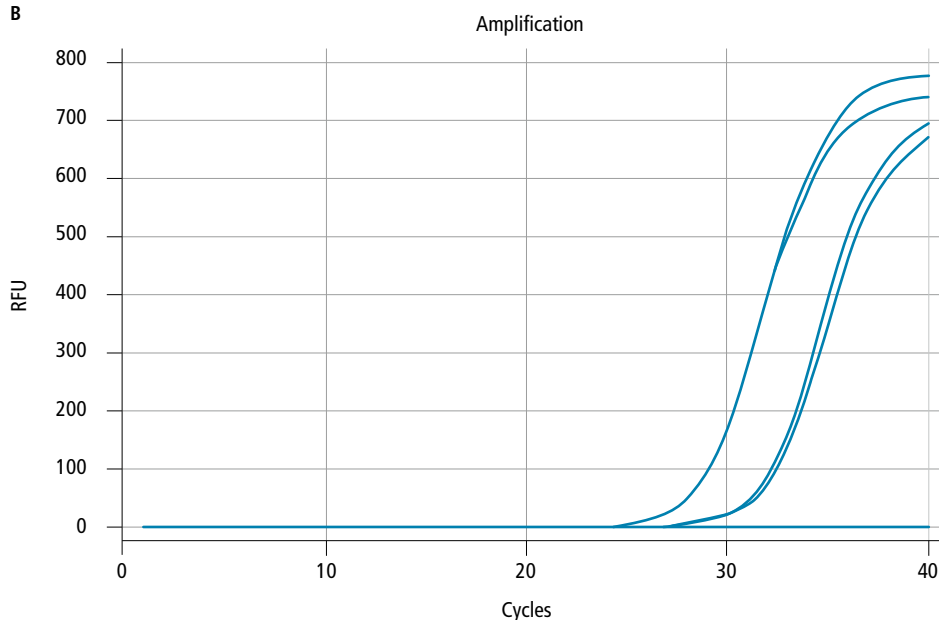
Pour chaque dilution, deux extractions indépendantes réalisées par deux expérimentateurs différents ont été analysées par IF et qPCR en dupliquat. Pour l'IF, 2 alvéoles par extrait ont été observées au microscope. La figure 3 présente une illustration des résultats obtenus avec les deux méthodes. La détection de *Ralstonia solanacearum* par IF montre une intensité lumineuse forte et une morphologie caractéristique (Figure 3 A). Les cellules ont une forme ovale avec un anneau continu de fluorescence verte. En qPCR, les échantillons positifs produisent une courbe d'amplification sigmoïdale alors que la courbe correspondant à des échantillons sains présente un tracé plat (Figure 3 B).

La limite de détection de 10<sup>5</sup> cfu/ml a été atteinte avec l'IF et la qPCR pour *Rs*. Les deux tests sont spécifiques des 3 souches de *Rs* utilisées et aucune réaction croisée n'a

A



B



**Figure 3** | Bactéries *R. solanacearum* observées au microscope à fluorescence (A) ou détectées grâce à la méthode de PCR en temps réel et montrant une courbe d'amplification (B). Un échantillon sain présente un tracé plat.

été observée avec *Cs* ou la souche de *Dickeya solani* et la souche de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Tableau 2). La détection de *Cs* par IF et par qPCR présente une sensibilité 10 fois supérieure à la détection de *Rs*, avec une limite de concentration de  $10^4$  cfu/ml (Tableau 2). Toutefois, la détection de *Cs* par IF montre un problème de spécificité et induit une réaction croisée avec la souche de *C. michiganensis subsp. michiganensis*. La méthode d'analyse par qPCR ne produit pas de signal non spécifique.

#### Détection simultanée de *Rs* et *Cs* par qPCR

Des ADN préparés à partir d'extraits de tubercules ou de cultures bactériennes ont été utilisés pour vérifier les performances de l'analyse par qPCR lorsque les deux

bactéries sont recherchées simultanément à l'aide d'une seule réaction de qPCR (qPCR multiplex). Cette qPCR en multiplex inclut également la détection du gène *Cox* utilisé comme contrôle interne de la réaction d'amplification. Le Tableau 3 montre que les valeurs obtenues pour la détection de *Cs* et *Rs* avec deux réactions séparées (qPCR simple) ou avec une seule réaction en multiplex pour la détection simultanée de *Cs*, *Rs* et *Cox* sont quasiment identiques.

#### Détection d'une infection latente dans des tubercules

Quatre tubercules asymptomatiques infectés par 4 souches différentes de *Rs* et un tubercule asymptomatique infecté par 1 souche de *Cs* ont été analysés pour comparer l'efficacité de l'IF et de la qPCR à détecter les

**Tableau 2 |** Détection de différentes dilutions de *R. solanacearum* (A) et *C. sepedonicus* (B) par immunofluorescence (IF) et PCR en temps réel (qPCR).

A IF

Souche	Dilution	10 <sup>7</sup> cfu/ml	10 <sup>6</sup> cfu/ml	10 <sup>5</sup> cfu/ml	10 <sup>4</sup> cfu/ml	10 <sup>3</sup> cfu/ml	10 <sup>2</sup> cfu/ml
<i>Rs</i> 06/086		Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.
<i>Rs</i> 97/41-1		Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.
<i>Rs</i> R1		Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.
<i>Dickeya solani</i>		Neg.	n/t	n/t	n/t	n/t	n/t
<i>C. michiganensis</i>		Neg.	n/t	n/t	n/t	n/t	n/t

qPCR

Souche	Dilution	10 <sup>7</sup> cfu/ml	10 <sup>6</sup> cfu/ml	10 <sup>5</sup> cfu/ml	10 <sup>4</sup> cfu/ml	10 <sup>3</sup> cfu/ml	10 <sup>2</sup> cfu/ml
<i>Rs</i> 06/086		Pos. (23,5)	Pos. (26,2)	Pos. (28,9)	Neg.	Neg.	Neg.
<i>Rs</i> 97/41-1		Pos. (24,9)	Pos. (27,7)	Pos. (30,5)	Neg.	Neg.	Neg.
<i>Rs</i> R1		Pos. (24,7)	Pos. (27,3)	Pos. (29,5)	Neg.	Neg.	Neg.
<i>Dickeya solani</i>		Neg.	n/t	n/t	n/t	n/t	n/t
<i>C. michiganensis</i>		Neg.	n/t	n/t	n/t	n/t	n/t

B IF

Souche	Dilution	10 <sup>7</sup> cfu/ml	10 <sup>6</sup> cfu/ml	10 <sup>5</sup> cfu/ml	10 <sup>4</sup> cfu/ml	10 <sup>3</sup> cfu/ml	10 <sup>2</sup> cfu/ml
<i>Cs</i> 1027		Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
<i>Cs</i> 2137		Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
<i>Dickeya solani</i>		Neg.	n/t	n/t	n/t	n/t	n/t
<i>C. michiganensis</i>		Pos.	Pos.	n/t	n/t	n/t	n/t

qPCR

Souche	Dilution	10 <sup>7</sup> cfu/ml	10 <sup>6</sup> cfu/ml	10 <sup>5</sup> cfu/ml	10 <sup>4</sup> cfu/ml	10 <sup>3</sup> cfu/ml	10 <sup>2</sup> cfu/ml
<i>Cs</i> 1027		Pos. (27,9)	Pos. (30,9)	Pos. (33,7)	Pos. (36,5)	Neg.	Neg.
<i>Cs</i> 2137		Pos. (27,9)	Pos. (30,1)	Pos. (32,6)	Pos. (35,5)	Neg.	Neg.
<i>Dickeya solani</i>		Neg.	n/t	n/t	n/t	n/t	n/t
<i>C. michiganensis</i>		Neg.	n/t	n/t	n/t	n/t	n/t

Les valeurs entre parenthèses représentent la valeur Ct moyenne de 4 mesures différentes.

Pos = échantillon déterminé positif

Neg = échantillon déterminé négatif

n/t = non testé

infections latentes. Le tableau 4 présente les résultats de la qPCR sur les extraits de tubercules asymptomatiques infectés. Toutes les souches ont pu être détectées par qPCR. Les extraits infectés étalés sur milieu de culture semi-sélectif ont permis de confirmer la présence de souches de *Rs* mais aucune colonie de *Cs* n'a pu se développer (données non présentées).

## Discussion

La comparaison des performances de la méthode de détection par microscopie d'immunofluorescence utilisée en Suisse, avec un protocole de qPCR montre qu'il n'y a pas de différence de sensibilité entre les deux méthodes. La sensibilité de la détection de *Cs* établie à une concentration de 10<sup>4</sup>cfu/ml est 10 fois plus performante que la limite de détection de *Rs* établie à 10<sup>5</sup>cfu/ml avec les deux méthodes. Ces valeurs sont comparables à celles présentées dans d'autres études menées par Vreeburg *et al.* (2016) et van Vaerenbergh *et al.* (2017) sur des

extraits de tubercules infectés. La densité de bactéries résultant de la présence d'un tubercule infecté parmi 199 tubercules sains ayant été estimée entre 10<sup>6</sup>cfu/ml et 10<sup>8</sup>cfu/ml par Elphinstone *et al.* (1996), la qPCR permet donc la détection d'un seul tubercule infecté avec une marge de sécurité de 10 à 1000 ordres de grandeur pour *Rs* et 100 à 10000 ordres de grandeur pour *Cs*. Dans ce travail, la spécificité des tests a été étudiée en incluant des souches de bactéries d'espèces et de genres différents (*Dickeya solani*, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*). Pour l'IF, les anticorps polyclonaux sont le principal paramètre à l'origine de la spécificité et la qualité de ceux-ci peut varier pour chaque immunisation. L'anticorps ciblant *Cs* n'a pas permis de distinguer *C. sepedonicus* de *C. michiganensis subsp. michiganensis* tandis que la détection par qPCR n'a pas donné lieu à une réaction croisée avec la souche de *C. michiganensis subsp. michiganensis*. Ce manque de spécificité n'est toutefois pas problématique dans la mesure où cette bactérie est un pathogène de la tomate qui n'infecte pas les

**Tableau 3 | PCR en temps réel sur différents extraits d'ADN de tubercules infectés (Cs\_1 à Cs\_4 et Rs\_1 à Rs\_8) ou de cultures bactériennes (Rs I à Rs IV et Cs)**

	Simplex		Multiplex		
	Cs	Rs	Cs	Rs	Cox
Cs_1	29 (+)	n/t	28,7 (+)	n/a	24,1
Cs_2	28,8 (+)	n/t	28,4 (+)	n/a	23,8
Cs_3	31,6 (+)	n/t	31,7 (+)	n/a	23,8
Cs_4	32,2 (+)	n/t	31,7 (+)	n/a	24
Rs_1	n/t	26,9 (+)	n/a	27 (+)	24
Rs_2	n/t	30 (+)	n/a	30,3 (+)	24,2
Rs_3	n/t	26,6 (+)	n/a	26,5 (+)	23,8
Rs_4	n/t	29,7 (+)	n/a	29,3 (+)	23,8
Rs_5	n/t	26,1 (+)	n/a	26,1 (+)	23,9
Rs_6	n/t	29,2 (+)	n/a	29,2 (+)	23,9
Rs_7	n/t	26,8 (+)	n/a	26,8 (+)	24
Rs_8	n/t	29,8 (+)	n/a	29,7 (+)	23,8
Rs I	n/t	20,1 (+)	n/a	20,3 (+)	n/a
Rs II	n/t	20,1 (+)	n/a	20 (+)	n/a
Rs III	n/t	20,1 (+)	n/a	20,2 (+)	n/a
Rs IV	n/t	20,3 (+)	n/a	20,3 (+)	n/a
Cs	22,6 (+)	n/t	22,4 (+)	n/a	n/a

Les cibles sont testées individuellement (simplex) ou simultanément avec un contrôle d'extraction (multiplex)  
 Cox = contrôle d'extraction  
 n/a = échantillon négatif  
 n/t = non testé

tubercules de pomme de terre en conditions naturelles. Elle révèle toutefois une spécificité plus faible de l'IF comparée à la qPCR. Pour *Rs*, aucune réaction positive incorrecte n'a été mise en évidence pour les deux méthodes qui montrent le même niveau de performance. Indépendamment des performances analytiques, l'analyse moléculaire par qPCR présente l'avantage de pouvoir détecter plusieurs cibles simultanément par multiplexage. Cette approche permet d'inclure dans une seule réaction la détection de différents pathogènes, mais aussi la détection d'un contrôle d'extraction interne, c'est-à-dire un gène de référence de la plante hôte. La détection de ce gène garantit le bon déroulement des étapes d'extraction et d'amplification ainsi que l'absence d'inhibiteurs dans l'extrait qui seraient susceptibles de limiter la sensibilité de détection de *Cs* ou *Rs*. Le gène *Cox*, choisi pour le diagnostic moléculaire par qPCR mis en place à Agroscope, est un gène de la pomme de terre dont l'ADN diffuse dans le milieu de macération au moment de l'étape d'extraction. Il est amplifié efficacement dans tous les échantillons de notre étude. Par ailleurs, le diagnostic moléculaire par qPCR

**Tableau 4 | Résultats de la PCR en temps réel sur les tubercules asymptomatiques.**

Tubercule	Valeurs Ct (multiplex)		
	Rs	Cs	Cox
Rs souche I	24,1 (+)	n/a	27,8
Rs souche II	21,9 (+)	n/a	24,2
Rs souche III	23,6 (+)	n/a	25,7
Rs souche IV	24,9 (+)	n/a	29,8
Cs	n/a	25,5 (+)	25,5
T+ Rs	23,5 (+)	n/a	17,8
T+ Cs	n/a	27,0 (+)	17,9
T-	n/a	n/a	n/a

La valeur Ct est indiquée pour *Rs*, *Cs* et le contrôle d'extraction (*Cox*)

T+ = contrôle positif

T- = contrôle négatif

n/a = échantillon négatif

utilise des thermocycleurs adaptés à l'analyse de 96 à 384 échantillons simultanément, ce qui confère à cette technique un potentiel important pour l'analyse d'un grand nombre de lots.

Le contrôle initial des lots de pommes de terre (de semence ou de consommation) est réalisé sur des tubercules asymptomatiques potentiellement infectés de manière latente par des concentrations très faibles de bactéries. Nos résultats confirment les travaux précédents de Vreeburg *et al.* (2016) quant à l'efficacité de la qPCR sur ce type de matériel qu'elle que soit la souche de *Rs* ou *Cs* utilisée.

## Conclusions

Le dépistage de routine d'un grand nombre d'échantillons nécessite un protocole robuste avec un minimum d'étapes de traitement. La méthode actuelle par microscopie d'immunofluorescence utilisée depuis plus de 30 ans à Changins, trop laborieuse et à la spécificité réduite, n'est plus adaptée aux besoins d'analyse d'un très grand nombre d'échantillons potentiellement affectés par une diversité également croissante d'organismes réglementés. La présente publication montre que la qPCR est tout aussi sensible et plus spécifique pour le dépistage de routine des infections éventuellement latentes de *Cs* et *Rs*. Elle est parfaitement adaptée au nombre important d'analyses requises par l'évolution de la réglementation en Suisse et en Europe et présente un grand potentiel d'évolution. Elle permettra de s'adapter à la détection de l'ensemble des organismes bactériens connus ou émergents pour soutenir la filière de production de pommes de terre. ■

### Bibliographie

- Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2018) 48 (1), 32–63.
- EC (1998) Council directive 98/57/EC. Official Journal of the European Communities L-235, 1–39.
- EC (2006a) Council directive 2006/56/EC. Official Journal of the European Communities L-182, 1–43.
- EC (2006b) Council directive 2006/63/EC. Official Journal of the European Communities L-206, 1–106.
- EC (2017) Potato ring rot and brown rot surveys in the EU. Annual report 2016/2017. DG Health and Food Safety. <https://doi.org/10.2772/60062> ISBN: 978–92–79–43528–7.
- Elphinstone JG, Hennessy J, Wilson JK, Stead DE (1996) Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO Bulletin 26, 663–678.
- Körner UA, Kroll U & Hilgert S (2017) False positive *Ralstonia solanacearum* TaqMan PCR results in routine potato tuber samples caused by *Advenella* species: adaptations to avoid these crossreactions. EPPO Bulletin 47, 33–40.
- OEPP (2017) Global Database. MàJ 2021.03.23, Accès le 07.07.2021. <https://gd.eppo.int/>
- OSaVé-DEFR-DETEC (2019). Ordonnance du DEFR et du DETEC relative à l'ordonnance sur la santé des végétaux (RO 2019 4773).
- Schaad NW, Berthier-Schaad Y, Sechler A & Knorr D (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated TaqMan fluorescence detection system. Plant Disease 83, 1092–1100.
- Schumpp O, Brechon A, Brodard J, Dupuis B, Farinelli L, Frei P, Otten P, Pellet D (2021) Large-Scale RT-qPCR Diagnostics for Seed Potato Certification. Potato Research. <https://doi.org/10.1007/s11540-021-09491-3>
- Station fédérale de recherches agronomiques de Changins (1995) Rapport d'activité en bactériologie
- Station fédérale de recherches agronomiques de Changins (1988) Rapport d'activité en bactériologie
- Van Vaerenbergh J, Müller P, Elphinstone JG, Vreeburg RAM, Janse JD (2017) Euphresco inter-laboratory comparison (2009–2012) on detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Ralstonia solanacearum* in potato tubers: proposal to include TaqMan TaqMan PCR as a primary (core) screening test in EU/EPPO standard methods. EPPO Bulletin 47:24-32.
- Vreeburg RAM, Bergsma-Vlami M, Bollema RM, de Haan EG, Kooman-Gersmann M, Smits-Mastebroek L, Tameling WIL, Tjou-Tam-Sin NNA, van de Vossen BTLH (2016) Performance of real-time PCR and immunofluorescence for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Ralstonia solanacearum* in potato tubers in routine testing. EPPO Bulletin 46, 112–121.
- Weller SA, Elphinstone JG, Smith NC, Boonham N & Stead DE (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. Applied and Environmental Microbiology 66, 2853–2858.