

European and Mediterranean Plant Protection Organization
Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes

Normes OEPP EPPO Standards

Diagnostic protocols for regulated pests
Protocoles de diagnostic pour les organismes
réglementés

PM 7/6(1)



European and Mediterranean Plant Protection Organization
1, rue Le Nôtre, 75016 Paris, France

Approval

EPPO Standards are approved by EPPO Council. The date of approval appears in each individual standard. In the terms of Article II of the IPPC, EPPO Standards are Regional Standards for the members of EPPO.

Review

EPPO Standards are subject to periodic review and amendment. The next review date for this EPPO Standard is decided by the EPPO Working Party on Phytosanitary Regulations.

Amendment record

Amendments will be issued as necessary, numbered and dated. The dates of amendment appear in each individual standard (as appropriate).

Distribution

EPPO Standards are distributed by the EPPO Secretariat to all EPPO member governments. Copies are available to any interested person under particular conditions upon request to the EPPO Secretariat.

Scope

EPPO Diagnostic Protocols for Regulated Pests are intended to be used by National Plant Protection Organizations, in their capacity as bodies responsible for the application of phytosanitary measures to detect and identify the regulated pests of the EPPO and/or European Union lists.

In 1998, EPPO started a new programme to prepare diagnostic protocols for the regulated pests of the EPPO region (including the EU). The work is conducted by the EPPO Panel on Diagnostics and other specialist Panels. The objective of the programme is to develop an internationally agreed diagnostic protocol for each regulated pest. The protocols are based on the many years of experience of EPPO experts. The first drafts are prepared by an assigned expert author(s). They are written according to a 'common format and content of a diagnostic protocol' agreed by the Panel on Diagnostics, modified as necessary to fit individual pests. As a general rule, the protocol recommends a particular means of detection or identification which is considered to have advantages (of reliability, ease of use, etc.) over other methods. Other methods may also be mentioned, giving their advantages/disadvantages. If a method not mentioned in the protocol is used, it should be justified.

References

- EPPO/CABI (1996) *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn. CAB International, Wallingford (GB).
- EU (2000) Council Directive 2000/29/EC of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community. *Official Journal of the European Communities* L169, 1–112.

Approbation

Les Normes OEPP sont approuvées par le Conseil de l'OEPP. La date d'approbation figure dans chaque norme. Selon les termes de l'Article II de la CIPV, il s'agit de Normes régionales pour les membres de l'OEPP.

Révision

Les Normes OEPP sont sujettes à des révisions et des amendements périodiques. La prochaine date de révision de cette Norme OEPP est décidée par le Groupe de travail pour l'étude de la réglementation phytosanitaire.

Enregistrement des amendements

Des amendements seront préparés si nécessaire, numérotés et datés. Les dates de révision figurent (si nécessaire) dans chaque norme individuelle.

Distribution

Les Normes OEPP sont distribuées par le Secrétariat de l'OEPP à tous les Etats membres de l'OEPP. Des copies sont disponibles, sous certaines conditions, auprès du Secrétariat de l'OEPP pour toute personne intéressée.

Champ d'application

Les protocoles de diagnostic de l'OEPP pour les organismes réglementés sont destinés aux Organisations Nationales de Protection des Végétaux, en leur qualité d'autorités responsables de l'application de mesures phytosanitaires pour la détection et l'identification des organismes nuisibles réglementés des listes de l'OEPP et/ou de l'Union européenne.

L'OEPP a initié en 1998 un nouveau programme de préparation de protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés de la région OEPP (y compris l'UE). Le travail est réalisé par le Groupe d'experts OEPP sur le diagnostic et d'autres Groupes d'experts spécialisés. L'objectif du programme est de développer, pour chaque organisme nuisible réglementé, un protocole de diagnostic approuvé internationalement. Les protocoles reposent sur les nombreuses années d'expérience des experts de l'OEPP. La première version d'un protocole est préparée par un expert. Elle est rédigée suivant le 'format et contenu communs d'un protocole de diagnostic' approuvé par le Groupe d'experts sur le diagnostic, modifié, le cas échéant, dans les cas individuels. En règle générale, un protocole recommande un moyen de détection ou d'identification particulier considéré avoir des avantages sur les autres (du point de vue de la fiabilité, la facilité d'utilisation, etc.). D'autres méthodes sont parfois mentionnées, en précisant leurs avantages/inconvénients. Des justifications doivent être fournies si on utilise une méthode qui n'est pas mentionnée dans le protocole.

Références

- EPPO/CABI (1996) *Organismes de quarantaine pour l'Europe*, 2ème edn. CAB International, Wallingford (GB).
- FAO (1997) *Convention internationale pour la protection des végétaux* (nouveau texte révisé). FAO, Rome (IT).
- OEPP/EPPO (1999) Normes OEPP PM 1/2(8) Listes A1 et A2 d'organismes de quarantaine de l'OEPP. In: *Normes OEPP PMI Mesures phytosanitaires générales*, pp. 5–17. OEPP/EPPO, Paris (FR).

FAO (1997) *International Plant Protection Convention* (new revised text).
FAO, Rome (IT).
OEPP/EPPO (1999) EPPO Standards PM 1/2 (8): EPPO A1 and A2 lists of
quarantine pests. In *EPPO Standards PM1 General phytosanitary meas-
ures*, 5–17. OEPP/EPPO, Paris (FR).

Definitions

Regulated pest: a quarantine pest or regulated non-quarantine pest.

Quarantine pest: a pest of potential economic importance to the area
endangered thereby and not yet present there, or present but not widely
distributed and being officially controlled.

Outline of requirements

EPPO Diagnostic Protocols for Regulated Pests provide all the
information necessary for a named pest to be detected and positively
identified by a general expert (i.e. an entomologist, mycologist,
virologist, bacteriologist, etc.) but not necessarily a specialist on the
organism or its taxonomic group. Each protocol begins with some short
general information on the pest (its appearance, relationship with other
organisms, host range, effects on host, geographical distribution and
its identity) and then gives details on the detection, identification,
comparison with similar species, requirements for a positive diagnosis,
list of institutes or individuals where further information on that
organism can be obtained, references (on the diagnosis, detection/
extraction method, test methods).

Many protocols include laboratory tests involving the use of chem-
icals or apparatus which may present a certain hazard. In all cases, local
safety procedures should be strictly followed.

Named trade products have been shown to work in these protocols.
Other similar products may be equally effective.

Existing EPPO Standards in this series

Five EPPO diagnostic protocols have already been approved and
published. Each standard is numbered in the style PM 7/4 (1), meaning
an EPPO Standard on Phytosanitary Measures (PM), in series no. 7
(Diagnostic Protocols), in this case standard no. 4, first version. The
existing standards are:

- PP 7/1 (1) *Ceratocystis fagacearum*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 41–44.
- PP 7/2 (1) *Tobacco ringspot nepovirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 45–51.
- PP 7/3 (1) *Thrips palmi*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 53–60.
- PP 7/4 (1) *Bursaphelenchus xylophilus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 61–69.
- PP 7/5 (1) *Nacobbus aberrans*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 71–77.

UE (2000) Directive du Conseil 2000/29/EC du 8 mai 2000 concernant les
mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté
d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre
leur propagation à l'intérieur de la Communauté. *Journal Officiel des*
Communautés Européennes L169, 1–112.

Définitions

Organisme nuisible réglementé: organisme de quarantaine ou organisme
réglementé non de quarantaine.

Organisme de quarantaine: organisme nuisible qui a une importance
potentielle pour l'économie de la zone menacée et qui n'est pas encore
présent dans cette zone ou bien qui y est présent mais n'y est pas
largement disséminé et fait l'objet d'une lutte officielle.

Vue d'ensemble

Les protocoles de diagnostic de l'OEPP pour les organismes
réglementés donnent toutes les informations nécessaires à la détection
et l'identification d'un organisme nuisible donné par un expert
généraliste (c'est à dire un entomologiste, mycologue, virologue,
bactériologiste, etc.), et pas nécessairement par un spécialiste de
l'organisme ou du groupe taxonomique. Chaque protocole débute avec
de brèves informations générales sur l'organisme nuisible (aspect,
relations avec d'autres organismes, gamme d'hôte, effets sur l'hôte,
répartition géographique et identité), puis donne des détails sur la
détection, l'identification la comparaison avec des espèces similaires,
les exigences pour un diagnostic positif, une liste d'instituts ou
d'individus susceptibles de fournir des informations supplémentaires
sur cet organisme, des références (sur le diagnostic, la méthode de
détection/extraction, les méthodes de test).

Ces protocoles font souvent appel à des analyses de laboratoire
basées sur l'utilisation de produits chimiques ou d'appareils qui peuvent
présenter un certain danger. Il est important, dans tous les cas, de suivre
rigoureusement les procédures locales de sécurité.

L'efficacité des produits commerciaux qui sont mentionnés dans les
protocoles est reconnue. D'autres produits similaires peuvent aussi être
efficaces.

Normes OEPP déjà existantes dans cette série

Cinq protocoles de diagnostic OEPP ont déjà été approuvés et publiés.
Chaque norme est individuellement numérotée: par exemple la norme
PM 7/4(1) est une Norme OEPP sur les mesures phytosanitaires (PM),
appartenant à la série 7 (protocoles de diagnostic); il s'agit dans ce cas
de la Norme 4, 1ère version. Les normes existantes sont:

- PP 7/1 (1) *Ceratocystis fagacearum*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 41–44.
- PP 7/2 (1) *Tobacco ringspot nepovirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 45–51.
- PP 7/3 (1) *Thrips palmi*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 53–60.
- PP 7/4 (1) *Bursaphelenchus xylophilus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 61–69.
- PP 7/5 (1) *Nacobbus aberrans*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **31**, 71–77.

Diagnostic protocols for regulated pests
Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés

Chrysanthemum stunt pospiviroid

Specific scope

This standard describes a diagnostic protocol for *Chrysanthemum stunt pospiviroid*.

Specific approval and amendment

First approved in 2001-09.

Champ d'application spécifique

Cette norme décrit un protocole de diagnostic pour le *Chrysanthemum stunt pospiviroid*.

Approbation et amendement spécifiques

Approbation initiale en 2001-09.

Introduction

Chrysanthemum stunt is an economically important disease of florists' chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflorum*) and especially all-year-round cultivars. Found in most (if not all) chrysanthemum-growing regions of the world, the causal agent of the disease is *Chrysanthemum stunt viroid pospiviroid* (CSVd), a close-relative of *Potato spindle tuber pospiviroid*. CSVd contains no proteins but consists solely of a single-stranded, circular RNA of between 354 and 356 nucleotides in length. However, due to internal sequence complementarity, the viroid RNA folds and binds internally to form a double-stranded molecule, which exhibits a high degree of secondary structure and makes CSVd exceptionally stable. As a result of this, spread can occur mechanically (especially by contact with contaminated tools or plant-to-plant contact), although propagation from infected mother plants is the major means of CSVd transmission. Evidence for the transmission of CSVd by seed, dodder or insect vectors is not strong but, if transmission does occur by any of these means, it is rare. For more general information about CSVd, see EPPO/CABI (1997).

Identity

Name: *Chrysanthemum stunt viroid*

Synonyms: Chrysanthemum stunt mottle virus (in part)
American stunt virus (in part)

Taxonomic position: Family *Pospiviroidae*, Genus *Pospiviroid*

Acronym: CSVd

Bayer computer code: CSVD00

Phytosanitary categorization: EPPO A2 list no. 92; EU Annex designation II/A2

Detection

Hosts

The only important host of CSVd is florists' chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflorum*). CSVd has also been reported as a

Introduction

Le rabougrissement du chrysanthème est une maladie d'importance économique du chrysanthème des fleuristes (*Dendranthema × grandiflorum*), et particulièrement des cultivars qui produisent toute l'année. L'agent causal de la maladie est présent dans la plupart des régions productrices de chrysanthèmes du monde (si ce n'est toutes). Il s'agit du *Chrysanthemum stunt pospiviroid* (CSVd), étroitement apparenté au *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). Le CSVd ne contient pas de protéines, il est constitué simplement d'un ARN circulaire monocaténaire mesurant entre 354 et 356 nucléotides de longueur. Cependant, en raison d'une complémentarité de séquences interne, l'ARN du viroïde se replie et se lie à lui-même pour former une molécule bicaténaire, qui présente une forte structure secondaire et rend le CSVd exceptionnellement stable. En conséquence, la dissémination peut être mécanique (en particulier par contact avec des outils contaminés ou entre les plantes), même si la propagation à partir de plantes mères infectées constitue le principal moyen de transmission du CSVd. Il est peu probable que le CSVd soit transmis par les semences, les cuscutes ou des insectes vecteurs, mais si c'est le cas, cela reste rare. Pour plus d'informations générales sur le CSVd, voir EPPO/CABI (1997).

Identité

Nom: *Chrysanthemum stunt viroid*

Synonymes: Chrysanthemum stunt mottle virus (en partie), American stunt virus (en partie)

Classement taxonomique: Famille *Pospiviroidae*, genre *Pospiviroid*

Acronyme: CSVd

Code informatique Bayer: CHSXXX

Catégorisation phytosanitaire: Liste A2 de l'OEPP no. 92; Désignation Annexe UE II/A2

Détection

Hôtes

Le chrysanthème des fleuristes (*Dendranthema × grandiflorum*) est le seul hôte important du CSVd. Il a également été signalé infectant

natural infection on *Argyranthemum frutescens*, *Petunia hybrida* Surfinia hybrids and *Ageratum* spp., but all are considered to be minor hosts. In addition, a range of other hosts from the *Asteraceae*, as well as tomato (*Lycopersicon esculentum*), can be infected experimentally by sap inoculation or grafting.

Disease symptoms

In many chrysanthemum cultivars, up to 30% of infected plants are symptomless. When symptoms are seen, they are often variable and are highly dependent on environmental conditions, especially temperature and light. The main symptom is, as the name of the organism implies, stunting, with a reduction of up to 50% in overall height in mature plants. Stems also become very brittle, readily breaking at the branch point. The other common symptoms are floral, with infected plants having reduced flower size and demonstrating premature flowering, sometimes by up to 10 days. Less commonly, flowering can also be delayed. In certain cultivars, especially red-pigmented ones, symptoms can also include flower break or bleaching (a reduction in colour intensity). Foliar symptoms are less common and the presence of pale, upright young leaves is often the only indication of infection. Leaf spots or flecks, often associated with leaf distortions (crinkling), are also sometimes seen, the most extreme example being the symptom described as 'measles', which appears as large, yellow leaf blotches. However, this symptom is restricted to a handful of cultivars (e.g. cvs. Mistletoe and Bonnie Jean) and, as most of these cultivars are no longer commercially available, is very rarely seen in naturally infected plants.

The symptoms of CSVd on *Argyranthemum frutescens* are similar to those for *Dendranthema*, with stunting and premature flowering observed in some cultivars. On surfinias, there are generally no symptoms, although stunting is seen with some cultivars (W. Menzel, University of Hannover, DE, pers. comm.).

Sampling

Because of the high incidence of symptomless carriers, at least 10% of the total should be examined by visual inspection. Due to variability in symptoms, laboratory-based tests should be used to confirm suspect plants. With regard to the timing of sampling, some early research indicated that CSVd concentrations within infected plants decrease during the winter months (November to February in the Northern Hemisphere) and it is suggested that sampling during these months is best avoided. However, using more modern, sensitive tests, it has proved possible to detect CSVd at all times of the year, indicating that while spring and summer sampling is preferable, it is not critical.

The amount and type of tissue sampled depends on the test performed but, for the molecular methods described here, even a single leaf should be sufficient. CSVd distribution appears to be uniform within infected mature plants, but it is nevertheless recommended to take several fully grown leaves from a number of different stems of the same plant. Stems can also be tested, but are harder to sample and process.

naturellement *Argyranthemum frutescens*, *Petunia hybrida* hybrides Surfinia et *Ageratum* spp., mais tous sont considérés comme des hôtes mineurs. En outre, une gamme de plantes-hôtes de la famille des *Asteraceae*, ainsi que la tomate (*Lycopersicon esculentum*), peuvent être infectées expérimentalement par inoculation de sève ou greffe.

Symptômes de maladie

Dans de nombreux cultivars de chrysanthème, jusqu'à 30% des plantes infectées ne présentent pas de symptômes. Lorsque des symptômes sont observés, ils sont souvent variables et dépendent fortement des conditions environnementales, en particulier de la température et de la lumière. Le principal symptôme est un rabougrissement, comme le nom de l'organisme l'indique, avec une réduction de la taille totale des plantes matures pouvant atteindre 50%. Les tiges sont également très cassantes et se rompent facilement aux nœuds. Les autres symptômes courants sont observés sur les fleurs. Leur taille est réduite et la floraison est précoce, parfois anticipée de 10 jours. Dans des cas plus rares, la floraison est retardée. Pour certains cultivars, en particulier ceux à floraison rouge, les symptômes peuvent inclure également une panachure ou une décoloration de l'inflorescence (réduction de l'intensité des couleurs). Les symptômes foliaires sont moins courants et la présence de jeunes feuilles pâles et dressées est souvent la seule indication de l'infection. Une moucheture ou tacheture des feuilles, souvent associées à des déformations ('frisolée'), sont également parfois observées; l'exemple le plus extrême étant le symptôme décrit sous le nom de 'rougeole' qui apparaît comme une marbrure diffuse jaune. Toutefois, ce symptôme ne concerne que quelques cultivars (par exemple les cvs. Mistletoe et Bonnie Jean) et il est rarement observé dans des plantes infectées naturellement étant donné que la plupart de ces cultivars ne sont plus disponibles commercialement.

Le CSVd produit des symptômes similaires sur *Argyranthemum frutescens*, avec un rabougrissement et une floraison prématurée chez certains cultivars. Les surfinias ne présentent généralement pas de symptômes, même si un rabougrissement est observé chez certains cultivars (W. Menzel, université de Hanovre, comm. pers.).

Echantillonnage

En raison de la forte incidence des porteurs asymptomatiques, au moins 10% du total d'une culture entière doit être examiné par inspection visuelle. Compte tenu de la diversité des symptômes, des tests de laboratoire doivent être réalisés pour confirmer tout symptôme suspect. En ce qui concerne les périodes d'échantillonnage, des résultats anciens ont montré que les concentrations du CSVd dans les plantes infectées décroissent pendant les mois d'hiver (novembre à février dans l'Hémisphère nord) et ils suggéraient d'éviter d'échantillonner pendant cette période. Cependant, des tests plus sensibles et modernes permettent de détecter le CSVd à tout moment de l'année. Il est toujours préférable de prélever les échantillons au printemps ou en été, mais cela n'a plus une importance critique.

La quantité et le type de tissus échantillonnés dépendent du test employé. Une seule feuille devrait en principe suffire pour les méthodes moléculaires décrites ici. Le CSVd a une répartition apparemment uniforme dans les plantes matures infectées, mais il est néanmoins recommandé de prélever plusieurs feuilles complètement développées sur un certain nombre de tiges d'une même plante. Les tiges peuvent également être testées, mais l'échantillonnage et le test sont plus difficiles.

Identification

For identifying CSVd in samples, four methods are available:

- return polyacrylamide gel electrophoresis (R-PAGE) – this only permits viroid detection and not identification [the latter only when R-PAGE is combined with nucleic acid hybridization (Northern blot analysis)];
- nucleic acid hybridization using a digoxigenin (DIG)-labelled cRNA probe – this is sensitive and reliable but only economical when large numbers of samples are to be analysed;
- reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) – this is the preferred method of detection and identification when combined with restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of RT-PCR products and when equipment is unavailable for TaqMan (see below);
- fluorogenic 5'-nuclease assay (TaqMan) – this is a very sensitive and specific method for CSVd detection and identification. It is the preferred method if equipment is available.

R-PAGE method

This method was developed by J.W. Roenhorst (Roenhorst *et al.*, 2000). It is an improved version of the protocol given in EPPO Phytosanitary Procedure No. 24 (OEPP/EPPO, 1989).

Sample preparation

Sap is extracted from several leaves (up to 1 g) using a leaf press, e.g. Pollähne Press (Meku, Germany) and 0.5 mL added to a 2-mL centrifuge tube, containing 250 µL of extraction buffer (1 M Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% (w/v) SDS) and 750 µL of water-saturated phenol (containing 0.1% 8-hydroxyquinoline). After adding the sap, the contents of the tube are mixed by vortexing for 90 s and then centrifuged at 12 000 *g* for 10 min at 4 °C. A portion of the upper, aqueous phase (400 µL) is then transferred to another centrifuge tube containing 1 mL of 96% ethanol and 40 µL of 3 M sodium acetate, pH 5.6. The RNA is then precipitated by incubation at –20 °C for at least 1 h, before centrifugation as described before. The supernatant is then removed and the pellet dried, before being resuspended in 30 µL of RNase-free water, containing 0.05% xylene cyanol FF (added as an electrophoresis dye marker). Samples can be stored at –20 °C for at least one week. Before loading, samples are centrifuged for 2 min at 12 000 *g* to remove any insoluble material.

Gel preparation

Polyacrylamide gels are prepared on GelBond PAGfilm (124 × 258 mm) using a Multiphor II casting kit (Amersham Pharmacia Biotech). Before use, the glass plates are coated with Repel-Silane ES (Amersham Pharmacia Biotech). Gels are prepared to a thickness of 1 mm, using a 5% acrylamide mix: 3.75 mL of 40% (w/v) acrylamide/bis solution (ratio 37.5:1; Bio-Rad), 1.5 mL of 10 × TBE stock (890 mM Tris pH 8.3, 890 mM boric acid, 20 mM EDTA; Bio-Rad), 36 µL of TEMED and 200 µL of 10% ammonium persulfate (freshly prepared), made up to a total volume of 30 mL with distilled

Identification

Quatre méthodes sont disponibles pour identifier le CSVd dans les échantillons:

- la R-PAGE électrophorèse inverse sur gel de polyacrylamide – elle permet seulement de détecter des viroïdes, mais pas de les identifier; l'identification est possible seulement en combinant la R-PAGE avec l'hybridation moléculaire (Northern blot);
- l'hybridation moléculaire avec une sonde d'ARNc marquée à la digoxigénine – elle est sensible et fiable mais économique seulement pour l'analyse de nombreux échantillons;
- la RT-PCR (amplification génique après transcription réverse) – la méthode préférée de détection et d'identification lorsqu'elle est combinée avec l'analyse RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction) des produits de RT-PCR et lorsqu'on ne dispose pas du matériel nécessaire à la méthode TaqMan (voir ci-dessous);
- la technique TaqMan – méthode très sensible et spécifique pour la détection et l'identification du CSVd. C'est la méthode préférée si la matériel est disponible.

Méthode R-PAGE

C'est la méthode développée par J.W. Roenhorst (Roenhorst *et al.*, 2000). Il s'agit d'une version améliorée du protocole donné dans la Méthode phytosanitaire no. 24 de l'OEPP (OEPP/EPPO, 1989).

Préparation des échantillons

Le jus est extrait de plusieurs feuilles (jusqu'à 1 g) à l'aide d'une presse, par ex. du type presse Pollähne (Meku, DE). 0,5 mL sont ajoutés à un microtube de 2 mL, contenant 250 µL de tampon d'extraction (Tris-HCl 1 M à pH = 8,0, 100 mM de NaCl, 10 mM d'EDTA (acide éthylène diamine tétracétique disodique), SDS 2% (p/v)) et 750 µL de phénol saturé en eau (contenant 0,1% de 8-hydroxyquinoline). Après ajout du jus, le contenu du tube est mélangé à l'aide d'un agitateur type Vortex pendant 90 s, puis centrifugé à 12 000 *g* pendant 10 min à 4 °C. Une portion de la phase supérieure aqueuse (400 µL) est alors transférée à un autre microtube contenant 1 mL d'éthanol à 96% et 40 µL d'acétate de sodium 3 M à pH = 5,6. L'ARN est ensuite précipité par incubation à –20 °C pendant au moins 1 h, avant centrifugation comme décrit ci-dessus. Le surnageant est ensuite éliminé et le résidu séché avant d'être remis en suspension dans 30 µL d'eau sans ARNase, contenant 0,05% de xylène cyanol FF (ajouté comme colorant marqueur de l'électrophorèse). Les échantillons peuvent être stockés à –20 °C pendant au moins une semaine. Avant le chargement, les échantillons sont centrifugés pendant 2 min à 12 000 *g* pour éliminer tout matériel non soluble.

Préparation du gel

Le gel de polyacrylamide est préparé sur film GelBond PAGfilm (124 × 258 mm) à l'aide d'un kit de coulage Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech). Avant utilisation, le verre est recouvert de Repel-Silane ES (Amersham Pharmacia Biotech). Les gels à 5% d'acrylamide ont une épaisseur de 1 mm. Ils sont obtenus en mélangeant 3,75 mL d'une solution à 40% (masse/volume) d'acrylamide/bisacrylamide (en proportion 37,5 pour 1), 1,5 mL de tampon TBE concentré 10 fois de chez Bio-Rad (Tris 890 mM à pH = 8,3, acide borique 890 mM, EDTA 20 mM), 36 µL de TEMED, 200 µL d'une solution aqueuse

water. The wells are formed using a 40-tooth comb (giving wells of $4 \times 4 \times 0.25$ mm).

Gel electrophoresis

Electrophoresis is performed using the horizontal Multiphor II system (Amersham Pharmacia Biotech), in combination with a power supply (capable of delivering up to 400 V) and a circulating chiller-heater unit (e.g. Amersham Pharmacia Biotech MultiTemp III).

Once the gel has been prepared, it is placed onto the ceramic plate of the Multiphor unit, which has been precoated with a thin layer of melting-point bath oil (Sigma, Cat. No. M-6884) and aligned so that the leading edge of the wells is at position 4. Paper wicks (250×50 mm \times 1.2 mm thick; Schleicher & Schull, GB004), which have been soaked in $1.67 \times$ TBE, are then arranged to overlay the gel edges by 10–15 mm. The samples (5 μ L) are then loaded into the wells. At least one positive control and one negative control is included. A glass plate ($125 \times 260 \times 3$ mm) is then placed on the inner edges of the wicks, thereby covering the whole surface of the gel. The apparatus cover is then replaced, so that the electrodes make contact about 5 mm from the outer edge of the wicks.

The first run is performed under native conditions at 15 °C and a constant current of 20 mA. After about 6 min, the current is increased to 30 mA and the run continued for approximately another 55 min, by which time the dye marker has reached marker 8 on the ceramic plate. At this point, the valve controlling the flow from the water bath to the ceramic plate is closed, and the temperature of the water bath is then adjusted to 75 °C. While this heats, the run is continued for another 15 min, or until the dye front is between positions 10 and 11 and the water temperature of the disconnected water bath has reached 75 °C.

Prior to the return run (under denaturing conditions), the paper wicks are replaced with fresh ones and the gel and wicks covered by two polyester sheets, to prevent dehydration. The first sheet (95×270 mm) is placed between the paper wicks (covering the gel) and the second (175×270 mm) covers both the gel and the wicks. The glass plate and electrodes are then replaced and the valve carefully opened to achieve a gradual heating of the gel. The temperature of the water bath is then reduced to 60 °C, the polarity reversed and the return run started; initially at a constant 2 mA for 8 min, before increasing the current to 50 mA and running for 25–30 min, by which time the loading dye marker should have reached the left-hand wick. The gel is then removed from the ceramic plate and carefully rinsed in 96% ethanol to remove any residual oil, before rinsing in distilled water.

Silver staining

After electrophoresis is finished, the gel is fixed for 10 min in 10% ethanol containing 0.5% acetic acid (made up in distilled water). Fixing and all subsequent stages are done at room temperature with gentle shaking. The gel is transferred into 10 mM silver nitrate for 20 min, before washing twice in distilled water (1 min each). The gel is then transferred into a solution of 375 mM sodium hydroxide containing 2.3 mM sodium borohydride and 0.4% formaldehyde (37% w/v) and left for 3–5 min, to allow the stain to develop, before stopping for 10 min in 1% acetic acid. In positive samples, the viroid band should appear as a distinct band, separated from the other nucleic acids. To store gels, incubate in 10% acetic acid and 5% glycerol for at least

(fraîchement préparée) de persulfate d'ammonium à 10%, et de l'eau distillée en quantité suffisante pour porter le volume total à 30 mL. Les puits sont formés à l'aide d'un peigne à 40 dents (donnant des puits de $4 \times 4 \times 0,25$ mm).

Electrophorèse sur gel

L'électrophorèse est réalisée à l'aide du système horizontal Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech), en combinaison avec un générateur (capable de délivrer jusqu'à 400 V) et un bain thermostaté (par ex. Amersham Pharmacia Biotech MultiTemp III).

Une fois le gel préparé, il est placé sur la plaque en céramique de l'unité Multiphor, préalablement enduite d'une fine couche d'huile de bain au point de fusion (Sigma, Cat. No. M-6884). Il est aligné de sorte que les puits se trouvent en face du repère 4. Des mèches de papier (250×50 mm \times 1,2 mm épaisseur; Schleicher & Schull, GB004), trempés dans du TBE \times 1,67 sont alors disposées de manière à dépasser de 10–15 mm des bords du gel. Les échantillons (5 μ L) sont alors déposés dans les puits. Utiliser au moins un témoin positif et un témoin négatif. Une plaque de verre ($125 \times 260 \times 3$ mm) est ensuite disposée à la bordure interne des mèches, recouvrant ainsi toute la surface du gel. L'appareil est refermé de manière à ce que les électrodes soient en contact à environ 5 mm de la bordure externe des mèches.

La première migration a lieu en conditions natives à 15 °C et sous un courant constant de 20 mA. Après environ 6 min, le courant est porté à 30 mA et l'électrophorèse se poursuit pendant environ 55 min, au bout desquelles le colorant marqueur a atteint le repère 8 de la plaque de céramique. La vanne contrôlant le flux entre le bain thermostaté et la plaque de céramique est alors fermée et la température du bain est ajustée à 75 °C. Pendant ce temps, la migration continue pendant 15 min supplémentaires, ou jusqu'à ce que à la fois le front de migration du colorant se situe entre les positions 10 et 11, et que la température du bain ait atteint 75 °C.

Avant l'électrophorèse retour (en conditions dénaturantes), les mèches de papier sont remplacées par de nouvelles, et l'ensemble gel et bandes est recouvert de deux feuilles de polyester afin d'empêcher la déshydratation. La première feuille (95×270 mm) est placée entre les mèches (et couvre le gel) et la seconde (175×270 mm) couvre à la fois le gel et les mèches. La plaque de verre et les électrodes sont alors remises en place et la vanne rouverte avec précautions pour obtenir un réchauffement progressif du gel. La température du bain thermostaté est ensuite réduite à 60 °C, la polarité inversée et la migration inverse commence; le courant initial est constant à 2 mA pendant 8 min, puis augmenté à 50 mA; la migration dure pendant 25–30 min, pendant lesquelles le colorant marqueur doit avoir atteint la bande de gauche. Le gel est ensuite enlevé de la plaque de céramique et soigneusement rincé d'abord dans de l'éthanol 96% pour éliminer l'huile résiduelle, puis dans de l'eau distillée.

Coloration à l'argent

Après l'électrophorèse, le gel est fixé pendant 10 min dans de l'éthanol à 10% (dans de l'eau distillée) contenant 0,5% d'acide acétique. La fixation et toutes les étapes suivantes sont réalisées à température ambiante sous agitation lente. Le gel est transféré dans du nitrate d'argent 10 mM pendant 20 min, avant de subir deux lavages à l'eau distillée (1 min chaque fois). Il est ensuite transféré d'abord pendant 3 à 5 min dans une solution d'hydroxyde de sodium 375 mM contenant du borohydride 2,3 mM et 0,4% de formaldéhyde (à partir d'une solution à 37% p/v) pour permettre le développement de la coloration, puis pendant 10 min dans de l'acide acétique 1% pour stopper la réaction. Dans les échantillons positifs, la bande du viroïde est une

15 min, before covering with cellophane, placing on a glass plate and leaving to dry for around 2 days at room temperature.

Nucleic acid hybridization method

Probe preparation

In the method described here, the clone used is pCSVD-5 (generated by R.A. Mumford, Central Science Laboratory, GB), which consists of a single, full-length cDNA copy of CSVd, cloned into a pGEM plasmid vector (Promega). Other clones, such as pCS9 (Candresse *et al.*, 1990), are very similar constructs and could also be used. Plasmid is purified using a Wizard kit (Promega) or similar, following the manufacturer's instructions.

Purified plasmid is cut using restriction enzyme *Sma I* (Promega), following the conditions recommended by the manufacturer. The linearized plasmid is purified by phenol:chloroform extraction and ethanol precipitation, using standard methods. After precipitation, the plasmid pellet is washed in 70% ethanol, dried and resuspended in 50 μ L of sterile distilled water. The plasmid is then quantified using a Nucleic dot metric quantitation kit (VH Bio, UK) or a similarly accurate method.

DIG-labelled probe is synthesized by *in-vitro* transcription. Reactions are performed by adding 1 μ g of linearized plasmid to 1 \times transcription buffer (Promega), 10 mM DTT, 1 \times DIG RNA labelling mix (Roche Diagnostics¹), 40 U RNasin (Promega) and 20 U of T7 RNA polymerase (Promega). The reaction is made up to a total volume of 20 μ L, using RNase-free water and incubated at 37 °C for up to 2 h. Following synthesis, the amount of labelled probe produced is quantified against a known DIG-labelled RNA standard (Roche Diagnostics), using the recommended method. cRNA probes should be stored at -20 °C (or below), where they will remain stable for up to a year.

Sample and test membrane preparation

Samples are prepared using a method adapted from Podleckis *et al.* (1993). Leaf tissue (up to 0.5 g) is ground in AMES extraction buffer (3% SDS, 20% ethanol, 1 M NaCl, 0.5 M sodium acetate, 10 mM MgCl₂, pH 6.0), at a ratio of 1:1.5 (w/v). The resulting extract is then transferred to a 1.5-mL centrifuge tube and incubated at 37 °C for 15 min. Following incubation, an equal volume of chloroform is added, mixed until an emulsion has formed and centrifuged at maximum speed for 5 min, to separate the phases. The samples are then used immediately or can be stored at 4° until the next day (at most).

For each sample, 3–5 μ L of the aqueous upper phase is taken and pipetted directly onto the surface of a positively charged nylon membrane (Roche Diagnostics). In addition to the test samples, appropriate positive (infected and plasmid) and negative (uninfected and buffer) controls are also applied. After sample application, the membrane is dried (at 80 °C for 10 min), before fixation in a UV-crosslinker at 70 000 μ J cm⁻²; baking at 80 °C for 2 h can also be used for drying/fixing but background signals are increased. If required, at this stage, the membrane can be stored for several days in the dark at room temperature.

¹Roche Diagnostics is the new trading name for Boehringer Mannheim, the name normally associated with the DIG-labelling probe system.

bande distincte, séparée des autres acides nucléiques. Pour conserver les gels, les laisser incuber pendant au moins 15 min dans une solution aqueuse d'acide acétique à 10% et de glycérol à 5%, puis les couvrir avec du papier cellophane, les disposer sur une plaque en verre et les laisser sécher pendant environ 2 jours à température ambiante.

Méthode d'hybridation moléculaire

Préparation des sondes

Dans la méthode décrite ici, le clone utilisé est pCSVD-5 (généré par R.A. Mumford, Central Science Laboratory, GB), qui consiste en une copie simple d'ADNc de CSVd, clonée dans un plasmide vecteur pGEM (Promega). D'autres clones, tel pCS9 (Candresse *et al.*, 1990), sont des constructions très similaires et peuvent également être utilisés. Le plasmide est purifié à l'aide d'un kit Wizard (Promega) ou équivalent, et en suivant les instructions du fabricant.

Le plasmide purifié est coupé à l'aide de l'enzyme de restriction *Sma I* (Promega), suivant les conditions recommandées par le fabricant. Le plasmide linéarisé est purifié par une extraction au phénol-chloroforme, puis par une précipitation à l'éthanol, selon des méthodes classiques. Après précipitation, le culot de plasmide est lavé dans de l'éthanol à 70%, séché et remis en suspension dans 50 μ L d'eau distillée. La quantité de plasmide est ensuite mesurée à l'aide d'un kit *Nucleic dot metric quantitation* (VH Bio, GB) ou d'une méthode de même précision.

La sonde marquée à la digoxygénine est synthétisée par transcription *in-vitro*. Les réactions sont effectuées en ajoutant 1 μ g de plasmide linéarisé à une solution contenant les réactifs suivants aux concentrations finales indiquées: du tampon de transcription 1 \times (Promega), 10 mM de DTT, 1 \times DIG RNA labelling mix (Roche Diagnostics), 40 U de RNasin (Promega) et 20 U de polymérase ARN T7 (Promega). Le volume est ajusté à 20 μ L avec de l'eau sans ARNase et incubé à 37 °C pendant jusqu'à 2 h. Après la synthèse, la quantité de sonde marquée produite est déterminée par comparaison à un ARN marqué à la digoxygénine de référence (Roche Diagnostics), à l'aide de la méthode recommandée. Les sondes d'ARNc doivent être conservées à -20 °C (ou moins). Dans ces conditions, elles restent stables pendant un an.

Préparation des échantillons et de la membrane test

Les échantillons sont préparés à l'aide d'une méthode adaptée de Podleckis *et al.* (1993). Du tissu foliaire (jusqu'à 0,5 g) est broyé dans un tampon d'extraction AMES (SDS 3%, éthanol 20%, NaCl 1 M, acétate de sodium 0,5 M, MgCl₂ 10 mM à pH = 6,0), en proportion 1:1,5 (p/v). L'extrait obtenu est alors transféré dans un tube à centrifugation de 1,5 mL et incubé à 37 °C pendant 15 min. Après incubation, un volume égal de chloroforme est ajouté, mélangé jusqu'à formation d'une émulsion et centrifugé à la vitesse maximale pendant 5 min pour séparer les phases. Les échantillons sont utilisés immédiatement ou peuvent être stockés à 4 °C jusqu'au jour suivant (au plus).

Pour chaque échantillon, 3 à 5 μ L de la phase aqueuse supérieure sont prélevés et pipetés directement à la surface d'une membrane chargée positivement (Roche Diagnostics). Des témoins positifs (infecté et plasmide) et négatifs (non infecté et tampon) sont également appliqués. Après dépôt, la membrane est séchée (à 80 °C pendant 10 min), avant fixation dans un crosslinker à UV à 70 000 μ J cm⁻²; la cuisson à 80 °C pendant 2 h peut également être utilisée pour sécher/fixer mais les bruits de fond sont augmentés. Si nécessaire à ce stade, la membrane peut être stockée pendant plusieurs jours à l'obscurité à température ambiante.

¹Roche Diagnostics est le nouveau nom commercial de Boehringer Mannheim, le nom normalement associé au système de sondes marquées à la digoxygénine.

Hybridization

Hybridization is performed using the general conditions recommended by Roche Diagnostics, for use with DIG-labelled RNA probes. The test membrane is placed in a hybridization tube, containing 10 mL of DIG Easy-Hyb buffer (Roche Diagnostics) and prehybridized at 68 °C, in a hybridization oven (Hybaid). After 1–2 h, the prehybridization buffer is poured off and replaced with 6 mL of preheated DIG Easy-Hyb containing 100–250 ng of probe; the tube is returned to the oven and incubated overnight at 68 °C. Following hybridization, the membrane is transferred to a sandwich box and washed four times on an orbital/rocking platform shaker; two washes are performed at room temperature in $2 \times \text{SSC} + 0.1\% \text{ SDS}$ for 30 min, followed by two further 15 min washes at 68 °C in $0.5 \times \text{SSC} + 0.1\% \text{ SDS}$.

Detection

Detection is performed using CSPD substrate (Tropix), following the protocol recommended by Roche Diagnostics for chemiluminescent detection of DIG-labelled RNA probes. When using Kodak X-Omat film, an exposure of 1 h is generally ideal for giving a clear result. However, a second exposure (longer or shorter) may be necessary depending on the strength of signal detected.

Alternative method

As an alternative for laboratories which are not equipped for performing hybridization tests, a commercially available CSVd hybridization test kit is available from Agdia (Elkhart, Indiana, US). With this system, the user prepares the samples and test membrane, which is then returned to Agdia for testing, who in turn supply the final results. This system has been shown to give identical results to the hybridization system described here.

RT-PCR method

This follows the method described in Mumford *et al.* (2000).

Total nucleic acid extraction

Total nucleic acid (TNA) is extracted from samples, using a method adapted from Lohdi *et al.* (1994). Leaf tissue (100 mg) is placed in a $10 \times 15 \text{ cm}$ 500-gauge polythene bag and frozen in liquid nitrogen, before being ground into a fine powder using a small hand roller. Grinding is continued until thawing begins and the tissue forms a smooth paste. One mL (10 volumes) of grinding buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na sulphite, 2.0% PVP-40) is added and mixed thoroughly using the roller. The ground sap is decanted into a 1.5-mL centrifuge tube and incubated at 65 °C for 10–15 min. After incubation, the tubes are centrifuged at maximum speed for 5 min (at room temperature). Clarified sap (700 μL) is removed and placed in another microtube to which is added an equal volume of chloroform:iso-amyl alcohol (24:1 v:v) and mixed to emulsion by inverting the tube. It is centrifuged at maximum speed in a microfuge for 5 min (at room temperature). The upper (aqueous) layer is carefully removed and transferred to a fresh tube. An equal volume of chloroform:isoamyl alcohol added, mixed and spun as before. The aqueous layer is removed, taking extra care not to disturb the interphase, and 0.5 volumes of 5 M NaCl and an equal volume of ice-cold iso-propanol is added to it. It is well mixed and incubated at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ overnight. The TNA is pelleted by centrifuging for 10 min at maximum speed. The salt/ethanol is decanted off and pellet is washed by adding 500 μL 70% ethanol and spinning for 3–4 min. The ethanol is decanted off and the pellet is air-dried to remove residual

Hybridation

L'hybridation est réalisée selon les conditions générales recommandées par Roche Diagnostics dans le cadre de l'utilisation de sondes d'ARN marquées à la digoxygénine. La membrane à tester est placée dans un tube d'hybridation contenant 10 mL de tampon DIG Easy-Hyb (Roche Diagnostics) et pré-hybridé à 68 °C, dans un four à hybridation (Hybaid). Après 1–2 h, le tampon de pré-hybridation est éliminé et remplacé par 6 mL de tampon DIG Easy-Hyb pré-chauffé contenant 100–250 ng de sonde; le tube est remis au four et incubé pendant une nuit à 68 °C. Après hybridation, la membrane est transférée dans une boîte sandwich et soumise à quatre lavages sous agitation (agitateur orbital ou à bascule): deux à température ambiante dans du $\text{SSC } 2 \times + \text{SDS } 0,1\%$ pendant 30 min, puis deux de 15 min à 68 °C dans du $\text{SSC } 0,5 \times + \text{SDS } 0,1\%$.

Détection

La détection est réalisée à l'aide de substrat CSPD (Tropix), suivant le protocole recommandé par Roche Diagnostics pour la détection des sondes d'ARN marquées à la digoxygénine. En général, une exposition d'1 h est idéale pour donner un résultat net si on utilise le film Kodak X-Omat. Une deuxième exposition (plus longue ou plus courte) peut toutefois être nécessaire selon l'intensité du signal obtenu.

Méthode alternative

Pour les laboratoires qui ne sont pas équipés pour effectuer des tests d'hybridation, un kit d'hybridation pour le CSVd est disponible auprès d'Agdia (adresse donnée dans la section 'renseignements complémentaires'). Avec ce système, l'utilisateur prépare les échantillons et la membrane. Celle-ci est envoyée à Agdia, qui renvoie les résultats. Ce système donne des résultats identiques au système d'hybridation décrit ici.

Méthode RT-PCR

La méthode est celle de Mumford *et al.* (2000).

Extraction de l'acide nucléique total

L'acide nucléique total est extrait des échantillons à l'aide d'une méthode adaptée de Lohdi *et al.* (1994). Du tissu foliaire (100 mg) est placé dans un sac de polyéthylène de $10 \times 15 \text{ cm}$ épais de 500 gauges et congelé à l'azote liquide. Il est ensuite broyé en une poudre fine à l'aide d'une petite presse manuelle. Le broyage continue jusqu'à ce que la décongélation commence et que le tissu forme une pâte lisse. On ajoute 1 mL (10 volumes) de tampon de broyage (CTAB 2%, Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, sulfite de sodium 1,0%, PVP-40 2,0%) et on mélange soigneusement à l'aide de la presse. L'extrait est décanté dans un tube à centrifugation de 1,5 mL et incubé à 65 °C pendant 10–15 min. Après incubation, les tubes sont centrifugés à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse pendant 5 min (à température ambiante). 700 μL d'extrait clarifié sont prélevés et placés dans un autre microtube. On ajoute un volume égal de mélange chloroforme: alcool isoamylique (24:1 v:v) et on mélange jusqu'à obtenir une émulsion en retournant le tube. Celui-ci est centrifugé à la vitesse maximale dans une microcentrifugeuse pendant 5 min (à température ambiante). La phase supérieure (aqueuse) est soigneusement prélevée et transférée dans un tube propre. Un volume égal de chloroforme: alcool isoamylique est ajouté, mélangé et le tube agité comme auparavant. La couche aqueuse est prélevée, en prenant garde de ne pas perturber l'interphase, et 0,5 volumes de NaCl 5 M plus un volume égal d'isopropanol glacé sont ajoutés. Le tube est bien mélangé et incubé à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant la nuit. Les acides nucléiques

ethanol. The pellet is then re-suspended in 100 μ L of molecular-biology grade water.

RT-PCR

One μ L of TNA or control (infected RNA, uninfected RNA and water) is aliquoted into a 0.2-mL PCR tube and 20 μ M of each primer Vir 1 (5'-CTTCAGTTGTTTCCACCGGTAG-3') and Vir 2 (5'-TTCTGTGGTGCCTCTGACC-3') is added. A final volume of 15 μ L is produced by adding molecular-biology grade water. The viroid RNA is denatured by heating to 95 °C for 3 min, before cooling to 4 °C (or below) for 5–10 min (for convenience, this can be done on a thermal cycler, if it has a cooling facility). Once the denaturation step has been completed, the remaining components of the reaction mix can be added (1.25 U *Taq* polymerase, 10 U AMV reverse transcriptase, 1 \times *Taq* buffer containing 1.5 mM $MgCl_2$ and 300 μ M dNTPs; all components from Promega), in a total volume of 35 μ L, made up with sterile, nuclease-free water. After mixing, the tubes are returned to the thermal cycler and RT-PCR is performed using the following program: 50 °C for 30 min, 95 °C for 4 min, followed by 30 cycles of 95 °C, 60 °C, 72 °C (each for 1 min), followed by a final extended extension soak of 72 °C for 5 min.

Agarose gel electrophoresis

Following RT-PCR, products are analysed by gel electrophoresis. PCR mix (12.5 μ L) is combined with 2.5 μ L of 6 \times loading buffer and loaded onto a 2% agarose-TBE gel and run in 1 \times TBE buffer, at 5–10 V cm^{-1} . For sizing, a 100-bp ladder (AB Gene, UK) is also run on the gel, in addition to the samples. After running, the gel is stained in ethidium bromide (1 μ g mL^{-1} in deionized water), before being visualized under UV light. Positive samples will give a band of 262 base pairs (bp). An image (film or digital) of the gel is captured to include with the final report.

RFLP

RT-PCR products from positive samples are purified using a PCR product purification kit (MN Nucleo-Spin Extract or similar). The purified product is then digested using *Hind* III restriction enzyme (Promega), in a reaction containing 17 μ L of product, 10 U of enzyme, 2 μ L of 10 \times buffer. Reactions are then incubated for 2 h at 37 °C. Following incubation, the reaction products are then analysed by agarose gel electrophoresis, as described above. For products generated using the Vir primer pair, *Hind* III will cut CSVd products (to give a 220-bp band) but will not cut PSTVd.

Fluorogenic 5'-nuclease assay (TaqMan) method

This follows the method described in Mumford *et al.* (2000).

Total nucleic acid extraction

TNA is extracted using the same method as described above, for RT-PCR.

totaux sont précipités par centrifugation pendant 10 min à vitesse maximale. Un culot est produit en centrifugeant le mélange pendant 10 min à la vitesse maximale. La phase liquide est éliminée et le culot est lavé en ajoutant 500 μ L d'éthanol 70% et en centrifugeant pendant 3–4 min. L'éthanol est éliminé et le culot est séché à l'air pour éliminer l'éthanol résiduel. Il est ensuite remis en suspension dans 100 μ L d'eau (qualité pour biologie moléculaire).

RT-PCR

1 μ L d'acide nucléique total ou de témoin (ARN infecté, ARN non infecté et eau) est aliquoté dans un tube de PCR de 0,2 mL et 20 μ M de chaque amorce Vir 1 (5'-CTTCAGTTGTTTCCACCGGTAG-3') et Vir 2 (5'-TTCTGTGGTGCCTCTGACC-3') sont ajoutées. Un volume final de 15 μ L est obtenu en ajoutant de l'eau (de qualité pour biologie moléculaire). L'ARN du viroïde est dénaturé par chauffage à 95 °C pendant 3 min, avant refroidissement à 4 °C (ou moins) pendant 5–10 min (par facilité, cela peut être réalisé dans un thermocycleur, si celui-ci possède un dispositif de refroidissement). Une fois l'étape de dénaturation terminée, les autres composants du mélange de réaction peuvent être ajoutés (1,25 U de *Taq* polymérase, 10 U de transcriptase réverse AMV, du tampon *Taq* 1 \times contenant du $MgCl_2$ 1,5 mM et des dNTPs 300 μ M; tous composants de Promega), dans un volume total de 35 μ L, obtenu avec de l'eau stérile sans nucléases. Après mélange, les tubes sont remis dans le thermocycleur et la RT-PCR est effectuée avec le programme suivant: 50 °C pendant 30 min, 95 °C pendant 4 min, suivi de 30 cycles de 95 °C, 60 °C, 72 °C (chaque palier pendant 1 min), et enfin une élongation finale à 72 °C pendant 5 min.

Electrophorèse sur gel d'agarose

Suite à la RT-PCR, les produits sont analysés par électrophorèse sur gel. Le mélange de PCR (12,5 μ L) est combiné à 2,5 μ L de tampon de charge 6 \times et déposé sur un gel d'agarose à 2% dans du TBE. L'électrophorèse est effectuée dans un tampon TBE 1 \times , à 5–10 V cm^{-1} . Pour obtenir une échelle de taille, on utilise en plus des échantillons des marqueurs de taille par multiples de 100-pb (AB Gene, UK). Après électrophorèse, le gel est coloré au bromure d'éthidium (1 μ g mL^{-1} dans de l'eau déionisée), avant d'être visualisé sous lumière UV. Les échantillons positifs donneront une bande de 262 paires de base (pb). Une photographie ou une image digitale est incluse dans le rapport final.

RFLP

Les produits de RT-PCR provenant des échantillons positifs sont purifiés à l'aide d'un kit de purification des produits de la PCR (MN Nucleo-Spin Extract ou similaire). Le produit purifié est ensuite digéré à l'aide de l'enzyme de restriction *Hind* III (Promega), dans une réaction utilisant 17 μ L de produit, 10 U d'enzyme, 2 μ L de tampon 10 \times . Incuber 2 h à 37 °C. Après incubation, les produits de digestion sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, comme décrit ci-dessus. Pour les produits générés à l'aide de la paire d'amorce Vir, *Hind* III coupe les produits du CSVd (pour donner une bande de 220 pb) mais ne coupe pas le PSTVd.

TaqMan (Méthode de 5'-nucléase fluorogénique)

La méthode est celle de Mumford *et al.* (2000).

Extraction de l'acide nucléique total

L'acide nucléique total est extrait à l'aide de la méthode décrite ci-dessus pour la RT-PCR.

TaqMan assay

Reactions are set up, in duplicate, in 96-well reaction plates using reagents supplied by Applied Biosystems (unless otherwise stated). For each reaction, 1 µL of TNA extract is added to 7.5 pmol of reverse primer (CSVd 297R: 5'-GGAAAAAAGGCGTTGAAGCTT-3') and made up to a final volume of 5 µL, with molecular-biology grade water. This mix is then heated to 95 °C for 3 min before chilling on ice. After chilling for 5–10 min, the denatured RNA-reverse primer mix is then added to the remainder of the master mix containing 1 × Buffer A (supplied with AmpliTaq Gold), 5.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 7.5 pmol forward primer (CSVd 220F: 5'-CTGCCC-TAGCCCGGTCTT-3'), 2.5 pmol of TaqMan probe (CSVd 249T: 5'-[FAM] -CAGTTGTTCCACCGGTTAGTAGCCAA-[TAMRA]-3'), 0.625 U AmpliTaq Gold and 10 U of M-MLV RT (Promega), made up to a final volume of 25 µL, with molecular-biology grade water. Plates are then cycled at generic system conditions (48 °C for 30 min, 95 °C for 10 min and 40 cycles of 60 °C for 1 min, 95 °C for 15 s) within the 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems), using real-time data collection. After cycling, data is analysed using the Sequence Detector software package, supplied by Applied Biosystems.

Comparison with similar species

R-PAGE: viroids such as *Potato spindle tuber pospiviroid* (PSTVd) and other pospiviroids that are very similar in size, cannot be distinguished from CSVd using R-PAGE. For identification to species level, additional testing will be required (see below).

Hybridization: the hybridization technique is very specific for CSVd. Under the stringent conditions described above, no cross hybridization should occur between the CSVd probe and any other plant viroids or viruses (although at unnaturally high concentrations of PSTVd, a very weak signal can be obtained).

RT-PCR: the primers described here are designed in relation to highly conserved regions that are shared with other pospiviroids including PSTVd and *Citrus exocortis viroid*. The primers have been shown to also amplify PSTVd, giving a product of 264 bp. For identification to species level, further analysis of the PCR product by RFLP analysis using *Hind* III restriction enzyme (as described) is required.

TaqMan: the primer-probe combination described here is designed to be specific for CSVd and not other pospiviroids (or other pathogens). It has been shown that the CSVd assay will not detect PSTVd isolates.

Reference collection

CSVd (and other viroid) isolates are available from:
ATCC 12301 Parklane Drive, Rockville, Maryland 20852-1776 (USA)

Requirements for a positive identification

The procedures for detection and identification described in this protocol should have been followed. CSVd is positively identified when:

- nucleic acid hybridization analysis of samples gives readily discernible signals that are comparable to those of the positive control,
- or

Test TaqMan

Les réactions sont mises en œuvre, en double, dans des plaques de réaction à 96 puits à l'aide des réactifs fournis par Applied Biosystems (sauf indication contraire). Pour chaque réaction, 1 mL d'extrait d'acide nucléique total est ajouté à 7,5 pmoles d'amorce reverse (CSVd 297R: 5'-GGAAAAAAGGCGTTGAAGCTT-3') et complété avec de l'eau (qualité pour biologie moléculaire), pour obtenir un volume final de 5 µL. Ce mélange est ensuite chauffé à 95 °C pendant 3 min avant refroidissement sur glace. Après refroidissement pendant 5–10 min, le mélange ARN dénaturé – amorce reverse est ensuite ajouté au restant du mélange principal contenant du tampon A 1× (fourni avec l'AmpliTaQ Gold), du MgCl₂ 5,5 mM des dNTPs 0,5 mM, 7,5 pmoles d'amorce sens (CSVd 220F: 5'-CTGCCCTAGCCCGGTCTT-3'), 2,5 pmoles de sonde TaqMan (CSVd 249T: 5'-[FAM]-CAGTTG-TTTCCACCGGTTAGTAGCCAA-[TAMRA]-3'), 0,625 U d'AmpliTaQ Gold et 10 U de M-MLV RT (Promega), complété au volume final de 25 µL avec de l'eau de qualité pour biologie moléculaire. Les plaques sont alors soumises aux cycles dans des conditions génériques (48 °C/30 min, 95 °C/10 min et 40 cycles de 60 °C/1 min, 95 °C/15 s) dans le thermocycleur 7700 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems), en utilisant la collecte des données en temps réel. Après l'amplification, les données sont analysées à l'aide du logiciel *Sequence Detector* fourni par Applied Biosystems.

Comparaison avec des espèces similaires

R-PAGE: les viroïdes comme le *Potato spindle tuber pospiviroid* (PSTVd) et les autres pospiviroides de taille très similaire ne peuvent pas être distingués du CSVd à l'aide de R-PAGE. Pour l'identification au niveau de l'espèce, des tests supplémentaires sont nécessaires (voir ci-dessous).

Hybridation: la technique d'hybridation est très spécifique pour le CSVd. Dans les conditions strictes décrites ci-dessus, aucune hybridation croisée n'a en principe lieu entre la sonde du CSVd et les autres viroïdes ou virus des plantes (même si un signal très faible est parfois obtenu à des concentrations élevées (non naturelles) du PSTVd).

RT-PCR: les amorces décrites ici correspondent aux régions fortement conservées partagées avec d'autres pospiviroides, dont le PSTVd et le *Citrus exocortis viroid*. Les amorces amplifient également le PSTVd et donnent un produit de 264 pb. L'analyse des produits de la PCR par RFLP à l'aide de l'enzyme de restriction *Hind* III (comme décrit) est nécessaire pour l'identification au niveau de l'espèce.

TaqMan: la combinaison amorce-sonde décrite ici est spécifique au CSVd et pas aux autres pospiviroides (ou autres pathogènes). Il a été montré que le test pour le CSVd ne détecte pas les isolats du PSTVd.

Collection de référence

Les isolats du CSVd (et autres viroïdes) sont disponibles auprès de:
ATCC 12301 Parklane Drive, Rockville, Maryland 20852-1776 (USA)

Exigences pour un diagnostic positif

Les procédures de détection et d'identification décrites dans ce protocole doivent avoir été suivies.

- Le CSVd est identifié positivement lorsque:
- l'hybridation moléculaire des échantillons donne des signaux nets et comparables à ceux du témoin positif,

- use of the primer pair Vir 1 and Vir 2 yields an RT-PCR product of 262 bp, which upon RFLP analysis with *Hind* III gives a 220-bp product or which gives a Southern hybridization signal with DNA probe to CSVd,

or

- a C_T value (point at which exponential amplification begins) of less than 40 is generated using TaqMan.

All results should be confirmed relative to results of the appropriate positive or negative controls (for all methods, no signal/product/amplification should be detected with the latter). Unequivocal identification should be based on positive reactions in at least two independent tests (e.g. RFLP or hybridization analysis of an RT-PCR product of the expected size).

Report on the diagnosis

A report on the execution of the protocol should include:

- information on the origin of the infected material
- a description of the symptoms (including photographs), if any are evident on the sample
- confirmation of the results, including a copy of gel photograph or digital image (for R-PAGE and RT-PCR), autoradiogram (for hybridization) or amplification plot (for TaqMan).

Infected material should be stored by freezing, at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ or below, for future reference or re-testing. As CSVd is extremely stable, it can survive frozen for at least a year and probably considerably longer.

Further information/Renseignements supplémentaires

Further information on the techniques listed in this protocol can be obtained from: /Des renseignements supplémentaires sur les techniques listées dans ce protocole peuvent être obtenus auprès de:

R-PAGE

Naktuinbouw, PO Box 135, 2370 A C Roelofarendsveen (Netherlands)
Plant Protection Service, PO Box 9102, 6700 HC Wageningen (Netherlands)

Hybridization

Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, YO41 1LZ (UK)
INRA, Station de Pathologie Végétale, Domaine de la Grande-Ferrade BP 81, 33883 Villenave-d'Ornon cedex (France)

Agdia Inc., 30380 County Road 6, Elkhart, Indiana 45614 (US)

RT-PCR & TaqMan

Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, YO41 1LZ (UK)

Acknowledgements/Remerciements

This protocol was originally drafted by: /Ce protocole a été initialement préparé par:

R. Mumford, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ (UK)

- ou l'utilisation de la paire d'amorce Vir 1 et Vir 2 donne un produit de RT-PCR de 262 pb, qui après analyse RFLP avec *Hind* III donne un produit de 220 pb ou qui donne un signal d'hybridation Southern avec l'amorce d'ADN du CSVd,

- ou une valeur C_T (point à partir duquel l'amplification exponentielle commence) de moins que 40 est générée à l'aide de la méthode TaqMan.

Tous les résultats doivent être confirmés par rapport aux résultats de témoins positifs ou négatifs adéquats (pour ce dernier, on ne doit détecter aucun signal/produit/amplification). L'identification non équivoque repose sur des réactions positives dans au moins deux tests indépendants (par ex. RFLP ou analyse d'hybridation d'un produit de RT-PCR de la taille attendue).

Rapport sur le diagnostic

Un rapport sur la mise en oeuvre du protocole doit comprendre:

- des informations sur l'origine du matériel infecté;
- une description des symptômes (y compris des photographies), si des symptômes sont visibles sur l'échantillon;
- confirmation des résultats, y compris une copie de l'image digitale ou photographie du gel (pour R-PAGE et RT-PCR), autoradiogramme (pour hybridation) ou de l'enregistrement de la courbe de réponse d'amplification (pour la méthode TaqMan).

Le matériel infecté doit être stocké par congélation, à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou en dessous, pour référence ou test futur. Le CSVd est extrêmement stable, et peut survivre sous cette forme pendant au moins un an et probablement beaucoup plus.

References/Références

- Candresse T, Macquaire G, Brault V, Monsion M & Dunez J (1990) ^{32}P - and biotin-labelled *in-vitro* transcribed cRNA probes for the detection of potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid. *Research in Virology* **141**, 97–107.
- EPPO/CABI (1997) Chrysanthemum stunt viroid. *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn, pp. 1227–1230. CAB International, Wallingford (GB).
- Lodhi MA, Ye GN, Weeden NF & Reisch BI (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* **12**, 6–13.
- Mumford RA, Walsh K & Boonham N (2000) A comparison of molecular methods for the routine detection of viroids. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **30**, 341–346.
- OEPP/EPPO (1989) EPPO Standards PM 3/24 Phytosanitary procedures for *Chrysanthemum stunt viroid*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **19**, 161–164.
- Podleckis EV, Hammond RW, Hurtt SS & Hadidi A (1993) Chemiluminescent detection of potato and pome fruit viroids by digoxigenin-labelled dot blot and tissue blot hybridization. *Journal of Virological Methods* **43**, 147–158.
- Roenhorst JW, Butôt RPT, van der Heijden KA, Hooftman M & van Zaayen A (2000) Detection of chrysanthemum stunt viroid and potato spindle tuber viroid by return-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **30**, 453–456.