

◆ Normes OEPP ◆

PROTOCOLES DE DIAGNOSTIC POUR LES ORGANISMES REGLEMENTES

TOBACCO RINGSPOT NEPOVIRUS

PM 7/2(1) Français



Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes
1, rue Le Nôtre, 75016 Paris, France

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.

REVISION

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.

REFERENCES

- EPPO/CABI (1996) *Organismes de quarantaine pour l'Europe*, 2ème edn. CAB International, Wallingford (GB).
- CIPV (1993) *Principes de quarantaine végétale liés au commerce international*. NIMP no. 1. Secrétariat de la CIPV, FAO, Rome (IT).
- CIPV (1999) *Glossaire des termes phytosanitaires*. NIMP no. 5. Secrétariat de la CIPV, FAO, Rome (IT).
- 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 PM1 Mesures phytosanitaires générales*, pp. 5-17. OEPP/EPPO, Paris (FR).
- 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.

DEFINITIONS

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.), qui n'est 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).

NORMES OEPP DEJA EXISTANTES DANS CETTE SERIE

Cette série est nouvelle.

Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés

TOBACCO RINGSPOT NEPOVIRUS

Champ d'application spécifique

Cette norme décrit un protocole de diagnostic pour le *Tobacco ringspot nepovirus*.

Approbation et amendement spécifiques

Approbation initiale en 2000-09.

Introduction

Tobacco ringspot virus (TRSV) est le représentant type du genre *Nepovirus*. Il possède des particules isométriques d'environ 28 nm et est facilement transmis par inoculation de la sève. Il est transmis naturellement par le nématode vecteur *Xiphinema americanum* et les *Xiphinema* spp. étroitement apparentés. *Thrips tabaci*, et certains acariens, sauterelles et pucerons, ont également été signalés comme des vecteurs possibles (Stace-Smith, 1985) mais leur importance dans la dissémination naturelle de TRSV n'est pas claire. TRSV est transmis par les semences chez plusieurs plantes-hôtes. Il infecte naturellement une vaste gamme d'hôtes herbacés ou ligneux, causant des problèmes graves dans les régions d'Amérique du nord où les nématodes vecteurs sont présents. Les cultures les plus importantes atteintes par TRSV sont le soja (*Glycine max*), la vigne (*Vitis vinifera*) et le myrtillier (*Vaccinium corymbosum*) et, dans une moindre mesure, le tabac (*Nicotiana tabacum*), certaines plantes ornementales et les *Cucurbitaceae*. Sa gamme d'hôtes est similaire à celle du *Tomato ringspot nepovirus* (TomRSV) mais il est généralement moins important sur les cultures fruitières. Cependant, les cultures de *Vaccinium* et *Vitis* de la région OEPP sont exposées à un risque significatif. TRSV a été signalé dans de nombreuses parties du monde, mais la plupart des signalements sont associés à du matériel originaire d'Amérique du nord. Il a été signalé en particulier dans plusieurs pays OEPP mais ces signalements ne sont pas confirmés ou concernent des interceptions de matériel importé, principalement de pélargonium. Le vecteur naturel de TRSV est limité à l'Amérique; il n'existe aucune preuve de dissémination naturelle dans d'autres zones géographiques.

Identité

Nom: *Tobacco ringspot virus*

Synonyme: Anemone necrosis virus, blueberry necrotic ringspot virus

Acronyme: TRSV

Classement taxonomique: Virus: *Comoviridae*: *Nepovirus*

Code informatique Bayer: TRSV00

Organisme de quarantaine: liste A2 de l'OEPP no. 228; Désignation annexe UE: I/A1

Détection et identification

Le TRSV est généralement présent dans tous les organes de ses plantes-hôtes (y compris les racines et les semences); la détection est toutefois plus facile à partir des tissus verts (par ex. jeunes feuilles ou pousses). Pour cette raison, il est important de choisir un moment adéquat de la période de végétation de l'espèce hôte afin d'extraire une concentration suffisante du virus. Pour le pélargonium, par exemple, il est préférable d'effectuer les tests entre novembre et avril, ou lorsque les températures sont plus fraîches.

Les principales méthodes disponibles pour la détection et l'identification du TRSV sont les suivantes:

- symptômes de maladie: ils peuvent être utiles sur certains hôtes (par ex. soja et myrtillier) mais d'autres hôtes (par ex. pélargonium) peuvent ne présenter aucun symptôme;

- inoculation à des plantes test herbacées: elle a une valeur limitée pour le diagnostic, même si un isolat de référence du TRSV est utilisé. Des tests sérologiques sont nécessaires pour attribuer spécifiquement au TRSV les réactions produites sur les plantes indicatrices;
- microscopie électronique: elle est très rapide et très fiable, mais économique seulement pour analyser de petits nombres d'échantillons et lorsqu'un microscope à transmission électronique est disponible;
- DAS-ELISA: c'est la méthode préférée de détection et d'identification.

Hôtes naturels et symptômes

A part les cultures déjà mentionnées, le TRSV a été trouvé sur *Anemone*, *Malus domestica*, *Solanum melongena*, *Begonia semperflorens*, *Rubus fruticosus*, *Capsicum annuum*, *Prunus avium*, *Cornus*, *Vigna unguiculata*, *Daphne*, *Fraxinus*, *Gladiolus*, *Hydrangea*, *Iris*, *Lobelia*, *Lupinus*, *Mentha*, *Narcissus*, *Carica papaya*, *Pelargonium*, *Petunia*, *Sambucus* et diverses adventices (EPPO/CABI, 1997). Sur soja, les bourgeons terminaux sont courbés et les autres bourgeons deviennent progressivement bruns et cassants. Des bandes brunes peuvent se développer sur les tiges et les pétioles des feuilles les plus grandes et les gousses ne se développent pas complètement et sont avortées. Les gousses qui apparaissent avant l'infection présentent parfois des taches sombres. Sur tabac, le TRSV provoque des marques en anneaux et en lignes sur le feuillage, ainsi que le rabougrissement. Sur cucurbitacées, les symptômes sont un rabougrissement, une marbrure foliaire et la déformation des fruits. Sur vigne, les jeunes pousses sont faibles et rares, les entrenœuds sont raccourcis, les feuilles sont petites et déformées et les plantes sont rabougries et produisent très peu de baies, elles-mêmes déformées. Le TRSV a été observé seulement à quelques reprises sur cerisier: des jeunes feuilles dispersées dans la couronne présentent des taches irrégulières sur l'ensemble du limbe et ont des bordures déformées. Sur les *R. fruticosus* sauvages, on observe des taches en anneau légères à prononcées, la marbrure et la mosaïque, des lignes jaunes, une déformation des feuilles et le rabougrissement du feuillage infecté (Stace-Smith, 1987). Le virus a été trouvé une seule fois dans un *Rubus* sp. cultivé. Aucun symptôme précis n'est associé au TRSV sur pélagonium.

Inoculation mécanique sur des plantes indicatrices

L'inoculation mécanique sur des plantes indicatrices herbacées est simple, sensible et fiable. Il s'agit d'une méthode traditionnelle de détection des virus, mais elle ne conduit pas seule à l'identification spécifique du TRSV car les symptômes produits sur les plantes indicatrices sont généralement les mêmes pour tous les népovirus. Cependant, l'inoculation à des plantes indicatrices peut être utilisée pour identifier et isoler le virus, ainsi que pour augmenter la concentration en TRSV dans les tissus végétaux afin d'appliquer d'autres méthodes d'identification comme l'immunoélectromicroscopie (IEM) et la méthode DAS-ELISA.

Tampons d'extraction à utiliser pour les inoculations

Les tampons suivants, présentés à titre d'exemple, peuvent servir à l'extraction de diverses plantes pour préparer un inoculum à appliquer mécaniquement sur les plantes tests.

- Pour la préparation de l'inoculum pour la plupart des espèces végétales, écraser du matériel infecté dans un tampon phosphate 0,02 M/Na/K, pH 7,0, contenant 2% (poids volume) de polyvinylpyrrolidone (PVP) (poids moléculaire 10000 à 40000);
- Lorsque l'inoculum est préparé à partir de vigne ou de myrtilier, une solution aqueuse de nicotine à, respectivement, 2,5 et 2% doit être utilisée ou, alternativement, un tampon 0,5 M Tris-HCl, pH 8,2, contenant 2% de PVP (poids moléculaire 10 000 à 40 000);
- L'inoculum de pélagonium est plus infectieux lorsque les feuilles sont triturées dans un tampon phosphate 0,06 M, pH 7,6, contenant 4% de polyéthylène glycol (PEG) (poids moléculaire 6000) (OEPP/EPPO, 1990).

Ajouter du Celite à l'inoculum comme abrasif ou poudrer les feuilles avec du Carborundum avant inoculation. Ceux-ci doivent être éliminés par lavage après l'inoculation pour éviter tout dégât sur les feuilles inoculées, pouvant masquer les réactions. Conserver les plantes inoculées à 18-22°C dans une serre ou une chambre de croissance.

Plantes indicatrices recommandées et symptômes

Chenopodium amaranticolor et *C. quinoa* - lésions nécrotiques locales; taches chlorotiques et/ou nécrotiques systémiques et/ou dépérissement, mais les infections systémiques ne sont pas toujours induites.

Nicotiana benthamiana, *N. clevelandii* et *N. tabacum* - lésions nécrotiques locales devenant des anneaux ou taches annulaires; les feuilles infectées de manière systémique présentent généralement des marques en anneau ou en ligne.

Phaseolus vulgaris - taches nécrotiques sur les feuilles inoculées; les feuilles infectées de manière systémique présentent parfois des taches et des anneaux. L'apex en croissance se nécrose.

Cucumis sativus (concombre) - lésions chlorotiques ou nécrotiques locales; marbrures systémiques et nanisme avec distorsion apicale.

Immunoélectromicroscopie (IEM)

Dans cette méthode (Milne, 1984; Milne & Lesemann, 1984), les virions sont soit d'abord adsorbés sur la grille de microscopie électronique, ou soit capturés spécifiquement à partir d'extraits végétaux sur des grilles recouvertes d'antisérum. Des particules virales nettement plus nombreuses sont généralement "capturées" sur la grille dans le deuxième cas si des virions homologues à l'antisérum utilisé pour recouvrir la grille sont présents dans l'échantillon. Cette augmentation du nombre de particules donne déjà une indication de la présence d'un certain virus. Les virions adsorbés ou capturés doivent ensuite être incubés avec l'antisérum. Si cet antisérum est homologue aux virions adsorbés ou capturés, ils apparaissent "décorés", c'est à dire entourés d'un halo dense d'anticorps liés aux particules virales. Un isolat de référence du TRSV et un sérum normal (pré-immun) doivent être utilisés comme témoins, respectivement positif et négatif.

L'IEM nécessite une expertise considérable et l'accès à un microscope à transmission électronique. Lorsque les échantillons à analyser sont nombreux, cette méthode demande beaucoup de travail et de temps. Par contre, pour un petit nombre d'échantillons, elle présente l'avantage de pouvoir être effectuée dans une période très courte (moins d'1 h). Cette méthode constitue un moyen de diagnostic précis étant donné qu'elle permet de visualiser non seulement les particules virales mais également la réaction des anticorps avec les virions.

Les népovirus sont souvent présents à des concentrations faibles dans les plantes cultivées en plein champ et ne sont pas facilement adsorbés sur les grilles de microscope électronique, et la méthode d'IEM suivante est donc recommandée:

1. Les échantillons sont écrasés dans des tampons adéquats (voir la section inoculation mécanique), à l'aide d'un pilon et d'un mortier.
2. Les grilles de microscopie électronique sont recouvertes d'anticorps du TRSV en les faisant flotter sur des gouttelettes (10-20 μ L) d'antisérum du TRSV dilué à 1:1000 dans du PBS (phosphate-buffered saline) ou du TBS (Tris-buffered saline), pH 7,4, à température ambiante pendant 5 min.
3. Après lavage avec 20 gouttes de TBS ou de PBS, les grilles sont drainées (mais pas séchées) avec du buvard;
4. Pour la "capture" des virions du TRSV, les grilles sont mises à flotter sur des gouttes de 10 à 20 μ l de sève de plante pendant 15 min ou plus (incubation pour les virus à titre faible: 2 h à une nuit).
5. Pour "décorer" les particules virales, les grilles sont lavées avec du PBS ou du TBS comme auparavant et avant, et après drainage, sont, comme précédemment, mises sur l'antisérum du TRSV dilué de 1:50 à 1:100 dans un tampon phosphate pendant 15 min.
6. Après lavage à l'eau distillée, les grilles sont marquées avec de l'acétate d'uranyl à 1-2% et examinées au microscope électronique au grossissement $\times 40000$ environ.

DAS-ELISA

Le TRSV est un bon immunogène et la méthode ELISA peut être facilement utilisée pour détecter et identifier le virus dans les hôtes herbacés, la vigne et le myrtilier à l'aide des tampons d'extraction adéquats. Des kits ELISA contenant tous les éléments nécessaires au test sont largement disponibles commercialement et peuvent être utilisés par ceux qui ne souhaitent pas, ou n'ont pas les installations nécessaires pour, préparer les réactifs. La méthode DAS-ELISA (double antibody sandwich ELISA) (Clarke & Adams, 1977) est la méthode préférée pour la détection et l'identification du TRSV.

La procédure suivante est proposée. L'enrobage des plaques de microtitrage ELISA est effectué en remplissant les puits de 100 μ L de gamma globuline (IgG) spécifique au TRSV à 1-2 μ g mL⁻¹ dans un tampon de carbonate de sodium 0,05 M, pH 9,6. Les plaques sont incubées pendant 2-4 h à 33°C. Elles sont ensuite lavées trois fois avec du PBS-T (PBS +Tween).

Les échantillons sont constitués de matériel de feuille, de tige, de pousse, de racine ou de semence. Chaque échantillon est homogénéisé dans un tampon d'échantillonnage (à la proportion 1:10 environ) soit dans un sac plastique avec un rouleau, soit en utilisant un pilon et un mortier. Les tampons d'échantillonnage sont parfois différents selon le matériel testé et il est généralement suggéré de suivre les indications fournies avec le kit de réactifs.

Pour préparer un tampon d'échantillonnage d'utilisation générale, dissoudre dans 1000 mL de 1x PBS-T: sulfite de sodium (anhydre) - 1,3 g, polyvinylpyrrolidone (PVP) poids moléculaire 24-40000 - 20,0 g; azide de sodium (optionnel) - 0,2 g, albumine d'œuf (de poule) en poudre, Grade II - 2,0 g. Ajuster le pH à 7,4 et stocker à 4°C. Pour l'extraction du myrtilier, dissoudre dans 1000 mL du tampon d'extraction général: phosphate de sodium, dibasique (anhydre) - 10,4 g, phosphate de potassium, monobasique (anhydre) - 0,9 g. Stocker à 4°C. Pour l'extraction de la vigne, dissoudre dans 900 mL d'eau distillée: Tris - 60,5 g, chlorure de sodium 8,0 g, polyvinylpyrrolidone(PVP), poids moléculaire 24-40000 - 20,0 g, polyéthylène glycol - 10,0 g, - azide de sodium (optionnel) - 0,2 g, Tween-20 - 0,5 g. Ajuster le pH à 8,2 avec de l'acide chlorhydrique. Ajuster le volume à 1000 mL avec de l'eau distillée. Stocker à 4°C.

Les échantillons sont mis dans les plaques ELISA, à raison de 100 μ L dans un puits sur deux pour chaque échantillon, et incubés à 4°C pendant la nuit.

Un témoin positif pour le TRSV et plusieurs témoins sains (de préférence 6 extraits différents bien répartis sur la plaque ELISA) doivent être inclus, dans la mesure du possible le matériel sera identique à celui en cours de test. Si de tels témoins ne sont pas disponibles, utiliser des plantes tests herbacées. Prévoir en plus sur la plaque ELISA des puits contenant seulement les réactifs.

Après 4 lavages comme précédemment, chaque puits est rempli de 100 µL d'IgG anti-TRSV marqué à la phosphatase alcaline, dilué (par ex. 1:200) dans du PBS-Tween-PVP contenant 0,2% (poids/volume) d'ovalbumine. La plaque ELISA est incubée pendant 3-4 h à 33°C. Après trois lavages, les puits de la plaque ELISA sont remplis de 100 µL d'une solution substrat fraîchement préparée contenant 1 mg mL⁻¹ de p-nitrophényl phosphate dans un tampon diéthanolamine, pH 9,8. Les plaques sont lues à A_{405 nm} après une période d'incubation d'environ 1 h à température ambiante. Les échantillons qui présentent un résultat au moins deux fois supérieur à la moyenne des témoins sains sont considérés comme positifs.

Comparaison avec des espèces similaires

Les symptômes induits sur les plantes indicatrices ressemblent à ceux causés par d'autres népovirus, et ces réactions ne constituent pas un diagnostic du TRSV. Les tests sérologiques sont actuellement les seuls tests fiables. Le TRSV n'est pas sérologiquement apparenté aux autres espèces de népovirus, et les réactions ELISA et IEM donnent généralement une bonne indication de la présence ou de l'absence du virus, surtout en combinaison avec l'inoculation sur des plantes indicatrices utilisée pour augmenter la concentration du virus. Sur pélargonium, on trouve parfois des infections mélangées du TRSV et du TomRSV; ces infections ne donnent généralement pas de symptômes et des échantillons doivent être testés séparément pour les deux virus.

Des isolats de référence (et de l'antisérum) pour le TRSV peuvent être obtenus auprès du Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig, Allemagne.

Exigences pour un diagnostic positif

Les procédures de détection et d'identification décrites dans ce protocole doivent avoir été suivies. Le TRSV est identifié positivement par un résultat adéquat en DAS-ELISA ou en IEM.

En DAS-ELISA, suite à une période d'incubation du substrat de 1-2 h à température ambiante, la valeur moyenne A_{405 nm} de l'échantillon doit dépasser une valeur seuil d'au moins le double de la moyenne des témoins sains. Dans ces conditions, les témoins sains et positifs doivent donner, respectivement, des valeurs de A_{405 nm} < 0,07 et > 0,14.

En IEM, des virions isométriques mesurant 25-28 nm de diamètre et densément décorés avec des anticorps sont visualisés sans équivoque suite à l'utilisation de l'antisérum du TRSV par IEM; la morphologie des particules et l'intensité des décorations doivent être identiques à celles obtenus avec un isolat de référence du TRSV. Les virions du TRSV ne doivent pas être décorés lorsqu'un sérum normal, pré-immun, est utilisé.

Rapport sur le diagnostic

Un rapport sur l'exécution du protocole doit comprendre:

- des informations sur l'origine du matériel infecté;
- une description des symptômes de maladie (y compris des photographies), si des symptômes sont visibles sur l'échantillon;
- le nombre de plantes (échantillons) infectés par le TRSV sur le nombre total de plantes (échantillons) testés;
- en cas d'IEM, des micrographes présentant les virions décorés à partir d'au moins un des échantillons infectés par le TRSV, ainsi que pour comparaison, des micrographes de particules décorées et non décorées visualisées dans les témoins;
- pour le DAS-ELISA, toutes les valeurs de l'A_{405 nm};
- une appréciation de la certitude ou non de l'identification.

Renseignements supplémentaires

Des renseignements supplémentaires sur cet organisme peuvent être obtenus auprès de:

CSL Diagnostics, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ (UK) (DAS-ELISA)

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig (Germany) (IEM and DAS-ELISA)

Naktuinbouw Laboratories, Sotaweg 25, P.O.Box 135, 2370 AC Roelofarendsveen (Netherlands) (IEM and DAS-ELISA)

Remerciements

Ce protocole de diagnostic a initialement été préparé par:

D.M. Wright, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ (UK)

H.J. Vetten, Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und Biologische Sicherheit, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig (Germany)

Références

- Chu PGW(1984) *Tobacco ringspot nepovirus*. In: *Viruses of plants: descriptions and lists from the VIDE Database* (eds Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L & Zurcher EJ), pp. 1267-1270. CAB International, Wallingford (GB).
- Clarke MF & Adams AN (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**, 475-483.
- EPPO/CABI (1997). Tobacco ringspot nepovirus. In: *Quarantine Pests For Europe*, 2nd edn, pp. 1357-1362. CAB International, Wallingford (GB).
- Milne RG (1984) Electron microscopy for the identification of plant viruses in *in-vitro* preparations. *Methods in Virology* **7**, 87-120.
- Milne RG & Lesemann DE (1984) Immunosorbent electron microscopy in plant virus studies. *Methods in Virology* **8**, 85-101.
- Stace-Smith R (1985) Tobacco ringspot virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* No. 309 (no. 17 revised). AAB, Wellesbourne (GB).
- Stace-Smith R (1987) Tobacco ringspot virus in *Rubus*. In: *Viruses Diseases of Small Fruits, Agriculture Handbook Number no. 631*, pp. 227-228. USDA/ARS, Washington (US).