

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 884 259

(21) N° d'enregistrement national : 05 03519

(51) Int Cl⁸ : C 12 Q 1/70 (2006.01), C 12 Q 1/68, C 07 H 21/00,
C 12 R 1/94

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 08.04.05.

(30) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 13.10.06 Bulletin 06/41.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Ce dernier n'a pas été établi à la date de publication de la demande.

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA — FR, FEDERATION NATIONALE DES PRODUCTEURS DE PLANTS DE POMMES DE TERRE — FR et GROUPEMENT NATIONAL INTERPROFESSIONNEL DES SEMENCES, GRAINES ET PLANTS — FR.

(72) Inventeur(s) :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : REGIMBEAU.

(54) PROCÈDE DE DETECTION D'ISOLATS DU VIRUS DE LA POMME DE TERRE Y (PVY) RESPONSABLES DE NECROSES.

(57) La présente invention concerne un procédé de détection de souches du virus PVY consistant en un test SNP de mutations correspondant à R/K₄₀₀ et D/E₄₁₉, la présence d'au moins une desdites mutations étant une indication de la présence d'une souche de PVY virulente responsable de la nécrose chez les plantes de la famille des Solanacées, en particulier chez la pomme de terre.

FR 2 884 259 - A1



- 5 La présente invention concerne un procédé de détection du virus PVY consistant en un test SNP de mutations correspondant à R/K₄₀₀ et D/E₄₁₉, la présence d'au moins une desdites mutations étant une indication de la présence d'une souche de PVY virulente pouvant être responsable de la nécrose chez les plantes de la famille des *Solanacées*, en particulier chez la pomme de terre.

10

Le virus de la pomme de terre Y (PVY), appartenant à la famille *Potyvirus*, est l'un des pathogènes des plantes les plus importants d'un point de vue économique (Milne, 1988 ; Shukla *et al.*, 1994). Tout d'abord signalé dans les années 1930 chez la pomme de terre (Smith, 1931), le PVY est maintenant distribué dans le monde entier sur de nombreux hôtes différents. Le virus est transmis par des pucerons selon le mode non persistant (Sigvald, 1984) et infecte plusieurs espèces de plantes cultivées appartenant à la famille des *Solanacées* (De Bokx et Huttinga, 1981 ; Brunt *et al.*, 1996).

20

Le génome viral est constitué d'une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 10 kb de longueur, avec une protéine VPg liée de manière covalente à son extrémité 5' et une queue poly-A à son extrémité 3'. L'ARN viral code une polyprotéine, qui est clivée en 9 produits par trois protéases codées par le virus (Dougherty et Carrington, 1988). Selon l'hôte dont on les a récolté à l'origine, les isolats de PVY ont été classés en quatre souches différentes correspondant aux souches pomme de terre, piment, tabac et tomate. Au sein de la souche pomme de terre, les isolats ont été caractérisés sur la base de leur propriétés biologiques (symptômes et réponses à différentes sources de résistance). Cette caractérisation a permis de définir différents groupes de virus. Ainsi, trois groupes de souches de pomme de terre : PVY^N, PVY^O et PVY^C (De Bokx et Huttinga, 1981) ont été identifiées. Ces groupes sont notamment définis par le caractère systémique ou local des symptômes induits sur *Nicotiana tabacum* et *Solanum tuberosum*.

Les isolats appartenant au groupe PVY^N induisent une nécrose des nervures sur les feuilles de *N. tabacum* cv. Xanthi et une très légère marbrure, avec seulement rarement des feuilles nécrotiques sur pomme de terre. Les isolats PVY^O induisent seulement des symptômes de marbrure et de mosaïque sur tabac et une mosaïque légère à grave et une chute des feuilles sur pomme de terre. Finalement, les isolats PVY^C induisent des symptômes de stries nécrotiques sur certains cultivars de pomme de terre.

Les isolats PVY^N et PVY^O sont responsables de pertes à haut rendement allant jusqu'à 10 40 à 70 % dans le cas des pommes de terre. Ainsi, la détection et l'identification efficace des isolats de PVY nécrotiques et non nécrotiques dans les cultures de pomme de terre sont un problème majeur pour les producteurs.

La caractérisation des isolats « pomme de terre » de PVY à tout d'abord reposé sur des tests biologiques. Cependant, une telle approche prend à la fois du temps et de l'espace et n'est pas facilement adaptable soit pour un diagnostic rapide soit pour un test à grande échelle.

Puis, pour remplir les besoins en un test fiable et rapide, des tests immuno-enzymatiques en sandwich à double ou triple anticorps (DAS- ou TAS-ELISA), utilisant des anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux (Gugerli et Fries, 1983 ; Matt et Huttinga, 1987 ; Oshima et al., 1990 ; Sanz et al., 1990 ; Singh et al., 1993 ; Ellis et al., 1996), une approche par immuno microscopie électronique (Walkey et Webb, 1984) et par agglutination au latex (Berckx, 1967 ; Tallay et al., 1980) ont été développés.

25

Néanmoins, aucun de ces tests ne s'est avéré capable de discriminer les isolats capable ou non d'induire un nécrose (Mac Donald et Singh, 1996 ; Boonham et Barker, 1998 ; Ounouna, 2002).

30 En effet, la récente émergence de nouveaux variants de PVY^N comprenant les isolats PVY^{NTN} de la nécrose en tache annulaire sur tubercule (Le Romancer et al., 1994 ;

Kerlan et al., 1999) et les isolats PVY^N-W (Chrzanowska, 1991) a souligné les limites des outils sérologiques disponibles. En effet, les anticorps monoclonaux et/ou polyclonaux spécifiques de PVY placent les isolats PVY^N-W dans le groupe PVY^O. De plus, les outils sérologiques ne sont pas capables de faire la distinction entre les isolats 5 PVY^{NTN} et les isolats PVY^N.

Quatre séquences complètes de PVY^N (Robaglia et al., 1989 ; Jakab et al., 1997 ; Abdelmaksoud et Gamal Eldin, 2002 ; Nie et Singh, 2003), deux séquences complètes de PVY^{NTN} (Thole et al., 1993 ; Nie et Singh, 2003) et une séquence complète de 10 PVY^O (Singh et Singh, 1996) (numéro d'accès : PVYN-Fr : Do00441 ; PVYN-605 : X97895 ; PVYN-Egypte : AF522296 ; PVYN-Jg : AY166867 ; PVYNTN-H : M95491 ; PVYNTN-Tu660 : AY16866 ; PVYO-139 : U09509) ont été publiées.

En complément des outils sérologiques décrit ci-dessus, des tests moléculaires ont été 15 développés par différentes équipes. Cependant aucun de ces outils n'est capable de caractériser précisément les isolats de PVY inducteurs de nécroses. Pour résoudre ce problème, nous avons développé des outils moléculaires plus rapides, fiables et plus spécifique pour la détection des virus capable d'induire la nécrose de la plante infectée. En d'autres termes, l'invention apporte pour la première fois un test 20 permettant une telle discrimination entre les différents isolats et plus particulièrement une détection très sensible des PVY selon leurs propriétés biologiques différentes (par exemple, nécrose (Y^N) ou marbrure (Y^O)) liées aux propriétés biologiques réelles utilisées dans la classification du PVY.

25 Dans le cadre de nos investigations, nous avons découvert deux mutations chez ces différents isolats directement impliquées dans la nécrose, notamment la nécrose tuberculaire de la pomme de terre, et d'autres plantes de la famille des *Solanacées*.

Cette découverte n'a été rendue possible que par une approche de génétique inverse 30 lors de laquelle des mutations d'acides aminés situés dans la partie carboxy-terminale de la protéine HC-Pro ont été identifiées comme étant responsables de la nécrose.

L'invention ouvre désormais la voie à une détection systématique des isolats de PVY nécrotiques et non nécrotiques, ce qui permettra aux producteurs de diminuer très sensiblement le risque de perte de récolte.

5

DESCRIPTION

- Dans la description, on fera référence à la numérotation correspondant à la séquence NCBI numéro d'acquisition X97895 (**Jakab G.**, Droz E., Brigneti G., Baulcombe D. and Malnoe P. Infectious in vivo and in vitro transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. J. Gen. Virol. 78 (Pt 12), 3141-3145 (1997)). La séquence nucléotidique et la séquence peptidique sont présentées respectivement aux SEQ ID No 1 et 2. Pour les souches PVY^o, une séquence de référence est accessible dans NCBI sous le numéro U09509 (Singh M. and Singh R.P., Nucleotide sequence and genome organization of a Canadian isolate of the common strain of potato virus Y (PVY^o). Can. J. Plant Pathol. 18, 209-214 (1996) (SEQ ID No 3 et 4), mais la numérotation se fera selon Jakab et al. (1997) par alignement.
- Ainsi, dans un premier aspect, l'invention concerne un procédé de détection de la présence ou de l'absence de souches du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires chez les plantes de la famille des *Solanacées*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) extraction des acides nucléiques d'un échantillon de plante,
 - b) amplification RT-PCR d'une région de l'ARN viral de PVY comprenant les codons 738 et 757 (SEQ ID No 1 et 3) correspondant aux acides aminés 400 et 419 respectivement de la protéine HC-Pro (SEQ ID No 2 et 4, fig 7A et 7B),
 - c) détection sur les cDNA obtenus à l'étape b) de la présence ou de l'absence de mutations correspondant à R/K₄₀₀ et D/E₄₁₉ au moyen i) d'au moins une sonde marquée spécifique d'un polymorphisme sur le codon 738 et ii) d'au moins une sonde marquée

spécifique d'un polymorphisme sur le codon 757, lesdites sondes i) et ii) présentant des marqueurs émettant un signal de fluorescence différent,
la présence d'au moins une desdites mutations R/K₄₀₀ et D/E₄₁₉ étant une indication de la présence d'une souche de PVY virulente responsable de la nécrose chez les plantes
5 de la famille des *Solanacées*.

- Grâce à ce procédé, on détecte en un seul test les 4 génotypes/phénotypes suivants :
- [R₄₀₀, D₄₁₉] (souche incapable d'induire la nécrose)
 - [R₄₀₀, E₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
 - 10 - [K₄₀₀, D₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
 - [K₄₀₀, E₄₁₉] (souche induisant la nécrose)
- Des exemples de séquences détectées comportant une de ces combinaisons de polymorphismes sont présentés à la figure 6B (SEQ ID No 14 à 19).
- 15 A titre d'exemple, on peut mettre en œuvre ce procédé chez la pomme de terre. Dans ce cas, la détection à l'étape d) de souches de PVY [R₄₀₀, E₄₁₉] et/ou [K₄₀₀, D₄₁₉] et/ou [K₄₀₀, E₄₁₉] est une indication que la plante de pomme de terre est contaminée avec une ou plusieurs souche(s) pouvant induire des nécroses tuberculaires (Figure 6A).
- 20 Dans un mode préféré de réalisation, on utilise comme **sonde i)** à l'étape c), au moins une sonde spécifique d'un polymorphisme sur le codon 738 (correspondant à R/K₄₀₀), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 738 est AAA avec le polymorphisme A₂₂₁₃. Le test peut être complété avec d'autres sondes en fonction d'autres polymorphismes sur ce codon :
- 25 K (Lysine) : AAA, AAG

De préférence, on utilise une sonde comportant de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence capable de s'hybrider avec la séquence SEQ ID No 5 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2213,
30 notamment la SEQ ID No 7 : ctcaaatgaaaatattctac

On peut utiliser en outre une **sonde i) contrôle** à l'étape c), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 738 est AGA avec le polymorphisme G₂₂₁₃. Le test peut être complété avec d'autres sondes en fonction d'autres polymorphismes sur ce codon :

- 5 R (Arginine) CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG

A ce effet, on peut utiliser une sonde contrôle comportant de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence capable de s'hybrider avec la séquence SEQ ID No 6 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2213, notamment la SEQ ID No 8 : **c**tcaaat**g**agaa**t**attct**a**

10

Avantageusement, la sonde i) et la sonde i) contrôle sont marquées différemment.

Egalement dans un mode préféré de réalisation, on utilise comme **sonde ii) contrôle** à l'étape c), au moins une sonde spécifique d'un polymorphisme sur le codon 757 (correspondant à D/E₄₁₉), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 757 est GAA avec le polymorphisme A₂₂₇₁. Le test peut être complété avec d'autres sondes en fonction d'autres polymorphismes sur ce codon :

E (Glutamique) : GAA, GAG

- 20 De préférence, on utilise une sonde comportant de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 5 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2271, notamment avec la SEQ ID No 9 ou SEQ ID No 10 qui sont des sondes spécifiques YN :
- 5'- **c**gatcac**g**aa**a**cgcagaca - 3' (SEQ ID No 9)
- 25 5'- **a**tcac**g**aa**a**cgcagaca - 3' (SEQ ID No 20)

30 On peut utiliser en outre une **sonde ii) contrôle** à l'étape c), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 757 est GAC avec le polymorphisme C₂₂₇₁. Le test peut être complété avec d'autres sondes en fonction d'autres polymorphismes sur ce codon :

D (Aspartique) : GAT,GAC

A ce effet, on peut utiliser une sonde ii) contrôle comportant de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 6 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2213, 5 notamment avec la SEQ ID No 10 : **5'- accatgacactaaa -3'** ou avec la SEQ ID No 21 : **5'- tgaccatgacactcaa -3'**

Avantageusement, la sonde ii) et la sonde ii) contrôle sont marquées différemment.

10 On peut utiliser des sondes telles que décrites ci-dessus comportant un marqueur fluorescent (reporter) et une molécule captant le signal lorsqu'elle se trouve à proximité du marqueur fluorescent (quencher).

15 Les étapes de RT et de PCR ont lieu l'une après l'autre dans le même tube. Lors de l'étape b), la transcription inverse est effectuée avec au moins 2 ou 4 paires d'amorces sens et antisens, plus particulièrement au moins une première paire permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY-N, au moins une deuxième paire permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY_O.

20 Ladite première paire d'amorces (FpN et RpN) comprend de préférence une amorce sens FpN et une amorce antisens RpN pouvant comporter une séquence de 20 à 40 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 1 ou 5. L'amorce sens FpN se situe de préférence en amont du codon 738 polymorphique et 25 l'amorce RpN se situe de préférence en aval du codon 757 polymorphique.

Dans une autre alternative, on met en œuvre deux premières paires :

- FpN1 en amont du codon 738
- RpN1 en aval du codon 738
- FpN2 en amont du codon 757
- 30 - RpN2 en aval du codon 757

- Ladite deuxième paire d'amorces (FpO et RpO) comprend de préférence une amorce sens FpO et une amorce antisens RpO pouvant comporter une séquence de 20 à 40 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 3 ou 6. L'amorce sens FpO se situe de préférence en amont du codon 738 polymorphique et
- 5 l'amorce RpO se situe de préférence en aval du codon 757 polymorphique.
- Dans une autre alternative, on met en œuvre deux deuxièmes paires :
- FpO1 en amont du codon 738
 - RpO1 en aval du codon 738
 - FpO2 en amont du codon 757
- 10 - RpO2 en aval du codon 757

Ce mode de réalisation préféré n'est pas limitatif. En effet, l'invention vise également un procédé tel que défini ci-dessus dans lequel l'étape b) comprend l'utilisation de nombreuses paires d'amorces couvrant l'ensemble du spectre des virus PVY.

15

Un exemple de réalisation est illustré à la figure 2. Parmi ces amorces, on peut citer les SEQ ID No 11 et 12.

Dans un mode préféré de réalisation, les amorces des deux paires sont choisies parmi :

20 Amorces sens pour YN

SEQ ID No 22 F1 : 5'-ATGATGCAGAACTGCCTAGAATACTAGT-3'
 SEQ ID No 23 F2 : 5'-ATGATGCAGAACTGCCTAGAATACTAGTC-3'
 SEQ ID No 24 F3 : 5'-CATGATGCAGAACTGCCTAGAATACTA-3'

Amorces anti-sens pour YN :

25 SEQ ID No 28 R1 : 5'-GTGAGCCAAACGAGTCAACTACAT-3'
 SEQ ID No 29 R2 : 5'-TTTGTGAGCCAAACGAGTCAACTA-3'
 SEQ ID No 30 R3 : 5'-TTGTGAGCCAAACGAGTCAACT-3'

Amorces sens pour YO

SEQ ID No 25 F1 : 5'-GCAGAGCTGCCTAGTTATTGGTT-3'
 30 SEQ ID No 26 F2 : 5'-ATGATGCAGAGCTGCCTAGTTATT-3'
 SEQ ID No 27 F3 : 5'-TGCAGAGCTGCCTAGTTATTGG-3'

Amorces anti-sens pour YO :

SEQ ID No 31 R1 : 5'-GCCAAATGAGTCAACCACATGA-3'

SEQ ID No 32 R2 : 5'-AGCCAAATGAGTCAACCACATG-3'

SEQ ID No 33 R3 : 5'-CCAAATGAGTCAACCACATGACA-3'

5

L'invention porte également sur un procédé de sélection sanitaire de plants appartenant à la famille des Solanacées susceptibles d'être contaminés par des souches du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires, notamment de nécroses tuberculaires chez la pomme de terre comprenant la mise en œuvre systématique du procédé de détection mentionné ci-dessus sur les semences, plants et/ou plantes susceptibles d'être mis en culture et procéder à la destruction ou mise sous quarantaine desdites semences, plants ou plantes contaminés avec une souche présentant au moins un des polymorphismes correspondant à

- [R₄₀₀, E₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K₄₀₀, D₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K₄₀₀, E₄₁₉] (souche induisant la nécrose)

Le contrôle sanitaire peut être effectué comme mentionné ci-dessus avec des semences, plants et/ou plantes importés dans un territoire donné, par exemple entrant dans l'Union Européenne ou au Canada ou encore provenant de zones à risque.

25

Dans un autre aspect, l'invention concerne un kit de détection de la présence ou de l'absence du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires chez les plantes de la famille des *Solanacées*, caractérisé en ce qu'il comprend :

30

- au moins une première paire d'amorces permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY^N, au moins une deuxième paire d'amorces permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY^O.

- au moins une sonde marquée i) spécifique d'un polymorphisme sur le codon 738 et au moins une sonde marquée ii) spécifique d'un polymorphisme sur le codon 757, lesdites sondes i) et ii) étant telle que décrite ci-dessus et présentant des marqueurs émettant des signaux de fluorescence différents.

5

Le kit peut comprendre également les sondes i) et ii) de contrôle telles que décrites précédemment, les sondes i) et contrôle i) étant marquées avec des marqueurs de fluorescence différents, les sondes ii) et contrôle ii) étant marquées avec des marqueurs de fluorescence différents.

10

Le kit peut également comprendre des moyens d'extraction des acides nucléiques d'un échantillon de plante, par exemple un tampon de broyage et un tampon d'extraction des ARN viraux tels que décrits ci-après. Le Kit peut également comprendre les réactifs nécessaires à l'amplification et/ou un dispositif de détection qualitative et quantitative 15 des signaux de fluorescence.

15

A titre d'exemple, le kit peut comprendre une solution comprenant les amorces pour qu'elles puissent être utilisées à une concentration optimale se situant entre 400 nM et 20 1200 nM, notamment 800 nM et une solution comprenant les sondes à une concentration se situant entre 100 nM et 300 nM, notamment 200 nM.

20

Dans un autre aspect, l'invention se rapporte à une sonde ou amorce et aux collections de sondes et collection d'amorces mentionnées ci-dessus.

25

Dans un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation desdites sondes et amorces et collections de sondes et amorces pour la détection de la présence ou de l'absence du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires chez les plantes de la famille des *Solanacées*, notamment chez la pomme de terre et aussi l'aubergine, la tomate, les piments ou le tabac.

30

- Ainsi, dans la présente invention, nous proposons un dosage à base de polymorphisme nucléotidique pour la détection des isolats PVY^N et PVY^O, qui cible un marqueur moléculaire spécifique lié à la capacité des membres du groupe de PVY^N à provoquer une nécrose. Le protocole développé comprend un mode opératoire rapide pour
- 5 l'échantillonnage des plantes, un processus d'extraction de l'acide nucléique rapide ("feuille humide") et une réaction de RT-PCR fluorescente en une seule étape (en utilisant au moins deux sondes TaqMan®), qui ne nécessitent pas de manipulation post-PCR.
- 10 De telles caractéristiques font qu'il est possible d'effectuer jusqu'à 96 tests en moins de 3 heures, à partir de l'échantillonnage de la plante jusqu'à la génération des résultats diagnostiques.
- Le test de diagnostic à base de SNP tel que décrit ci-dessus a permis la détection fiable
- 15 de 42 isolats de pomme de terre de PVY de 13 pays et a été capable de les assigner de manière correcte dans les groupes PVY^N ou PVY^O. Les échantillons contenant plus de 10^4 copies de l'ARN de PVY^N et/ou PVY^O ont été efficacement détectés par ce test et ce dernier rend possible la co-détection de PVY^N et de PVY^O dans les infections mixtes.
- 20 Ce nouvel outil de détection combine une sensibilité élevée des techniques de détection moléculaire avec rapidité (séries de RT-PCR effectuées en environ deux heures), simplicité (pas de kit d'extraction nécessaire pour la préparation de l'échantillon et mode opératoire sans gel) et une compatibilité avec les postes de travail
- 25 robotiques utilisés pour les dosages sérologiques. Les principales améliorations offertes par ce test pour la détection de PVY sont tout d'abord le choix d'utiliser la technologie SNP, habituellement appliquée pour les dosages de discrimination allélique, les études de ségrégation génique et la cartographie chromosomique d'organismes diploïdes (pour une revue, voir Oefner, 2002).
- 30 En outre, nous apportons pour la première fois un test permettant de détecter spécifiquement les isolats de PVY qui induisent la nécrose par rapport aux isolats

avirulentes grâce à l'identification des caractéristiques des nucléotides polymorphes cités ci-dessus. Appliquée à des organismes haploïdes (tels que des virus à ARN simple brin), la technologie de l'invention a le potentiel d'identifier des échantillons contenant seulement une (visualisée comme homozygote) soit une combinaison de 5 deux variants (considérées par le test comme hétérozygote) de la séquence polymorphe ciblée.

Ainsi, l'invention porte également sur un lot de semences, plants et/ou plantes de la famille des *Solanacées*, caractérisé en ce qu'il est dépourvu de semences, plants ou 10 plantes contaminés par le PVY présentant au moins un des polymorphismes correspondant à :

- [R₄₀₀, E₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K₄₀₀, D₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K₄₀₀, E₄₁₉] (souche induisant la nécrose).

15 Parmi ces lots, l'invention vise des lots de tomates, piments, tabac, poivron et aubergines. De préférence, l'invention vise un lot de plants ou tubercules de pomme de terre, caractérisé en ce que qu'il est dépourvu de plants ou tubercules contaminés avec une souche de PVY présentant au moins un des polymorphismes correspondant à :

- [R₄₀₀, E₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K₄₀₀, D₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K₄₀₀, E₄₁₉] (souche induisant la nécrose).

20 Les lots précités sont susceptibles d'être obtenus par la mise en œuvre du procédé ou 25 du kit décrit ci-dessus.

Pour la suite de la description, on fera référence aux légendes des figures.

Légendes des figures

30

Figure 1 : Séquences encadrant les polymorphismes responsables de la nécrose

- Figure 2 : Séquences de PVY^N-605 et de PVY^O-139 utilisées comme cible dans un test à base de polymorphisme nucléotidique.** Sont présentés les sites de liaison pour les amorces sens (FpN et FpO), les amorces anti-sens (RpN et RpO) et les deux sondes TaqMan® (Sonde^N et Sonde^O). On a indiqué le nucléotide polymorphe A/G₂₂₁₃.
- 5 L'indicateur spécifique (rapporteur) de la sonde (FAM et Vic pour la Sonde^N et la Sonde^O respectivement) est illustré par une carré gris et un cercle respectivement. Les quencheur, molécules de liaison à petit sillon non fluorescentes (MGB [Applied Biosystems]) liées à l'extrémité 3' des sondes fluorescentes, sont indiquées par des étoiles grises. ^a : les positions des nucléotides données sont comme dans Jakab et al.,
10 (1997).
- Figure 3 : Signal fluorescent brut (CFS) obtenu en utilisant des échantillons de contrôle positif (PVY^N, PVY^O et Y^N/Y^O mélangés) et négatif (contrôle sans matrice).** A. CFS associé avec des sondes spécifiques de PVY^N(FAM) et PVY^O(Vic). Sont indiquées les valeurs moyennes et écarts types calculés avec quatre réplications
15 de NTC, PVY^N-605 purs et PVY^O-139 purs. Les valeurs obtenues avec les deux réplicats des échantillons mélangés Y^N/Y^O sont listées. B. représentation schématique des données de CFS. Chaque point correspond aux données (FAM ; Vic) associées à un des échantillons testés. On a défini quatre zones n'ayant pas de chevauchement selon la nature des échantillons testés.
- 20 **Figure 4 : Représentation schématique des données fluorescentes brutes (A) cibles (B) et normalisées (C).** Les triangles, les carrés et les cercles correspondent aux échantillons de PVY^O purs, NTC et PVY^N purs. La quantité d'ARN de PVY théorique présente dans chaque échantillon testé est indiquée. FAMt et Vict correspondent aux seuils pour la détection efficace de PVY^N et PVY^O respectivement. Les zones de détection et de caractérisation sont indiquées sur les graphiques bruts (A) et normalisés (C).

- 25 **Figure 5 : Représentation graphique de la co-détection de PVY^N et de PVY^O en utilisant des données fluorescentes cibles par SNP.** Les limites de détection seuil pour PVY^N et PVY^O sont indiquées par FAMt et Vict, respectivement. La détection simple de PVY^N et ou PVY^O correspond aux zones ① et ②, respectivement. Les groupes de la zone ③ n'ont pas détecté d'échantillon. Les rapports Y^N/Y^O

correspondant à 1/100, 1/10, 1,10/1 et 100/1 sont représentés par des triangles, des cercles, des carrés, des étoiles et des losanges, respectivement.

Figure 6 : Analyse des propriétés nécrotiques des isolats PVY chimères sur pomme de terre.

5 **Figure 7 : Sequence PVY^N-605 et zone d'intérêt et HC-PRO**

A - Sequence nucleotidique (codon d'initiation de la traduction en **gras**, bases polymorphes d'interet en *gras italique*)
 B - Sequence en aa de la polyproteine (qui contient la protéine HC-Pro séquence soulignée), aa d'interet en **gras**.

Figure 8 : Sequence PVYO-139 et zone d'intérêt et HC-PRO

- 10 A- Sequence nucleotidique (codon d'initiation de la traduction en **gras**, bases polymorphes d'interet en *gras italique*)
 B - Sequence en aa de la polyproteine (qui contient la protéine HC-Pro séquence souligné), aa d'interet en **gras**.

15 **Exemple 1 : Origines des souches de PVY et préparation des échantillons**

1.1 Virus et plantes hôtes

On a utilisé dans cette étude 42 isolats de PVY de pomme de terre caractérisés de 20 manière sérologique et moléculaire appartenant aux différents groupes de PVY (PVY^N ou PVY^O) et variants (Y^{NTN} ou Y^N-W) –tableau 1). On a utilisé PVY^N-605 (Jakab et al., 1997) et PVY^O-139 (Singh et Singh, 1996) comme isolats de référence pour les groupes PVY^N et PVY^O respectivement. On les a utilisé pour développer le test alors qu'on a utilisé d'autres isolats de PVY dans le processus d'évaluation du dosage 25 développé. On a maintenu les isolats dans une serre par inoculation mécanique sur *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. On a utilisé ce dernier comme plante test dans un test biologique pour la caractérisation des isolats PVY^N et PVY^O, sur la base de leur capacité ou leur incapacité à induire des symptômes de nécrose des feuilles.

Tableau I : Origine et références des isolats PVY testés dans le cadre de l'invention

	Souche	isolat	origine	référence
5	N	605	Switzerland	Jakab <i>et al.</i> , 1997
		C3VN	Scotland	Glais <i>et al.</i> , 1996
		Irl	Ireland	Glais <i>et al.</i> , 1996
		607	The Netherlands	Glais <i>et al.</i> , 1996
		P21	Tunisia	Fakhfakh <i>et al.</i> , 1996
		B203	France	Glais <i>et al.</i> , 1998
		Sp20	Spain	Blanco-Urgoiti <i>et al.</i> , 1998
		Sp125	Spain	Blanco-Urgoiti <i>et al.</i> , 1998
		TVNQ	Canada	Mc Donald and Kristjansson, 1993
		B4	France	From this report
10	O	B7	France	From this report
		B8	France	From this report
		139	Canada	Singh and Singh, 1996
		Irl	Ireland	Glais <i>et al.</i> , 1998
		Sc	Scotland	Glais <i>et al.</i> , 1998
15	N-W	N1702	The Netherlands	Glais <i>et al.</i> , 1998
		Lw	Poland	Glais <i>et al.</i> , 1998
		B18	France	From this report
		i-P	Poland	Glais <i>et al.</i> , 1998
		N242	France	Glais <i>et al.</i> , 1998
20	NTN	B11	France	Glais <i>et al.</i> , 2002
		Sp17	Spain	Blanco-Urgoiti <i>et al.</i> , 1998
		B15	France	From this report
		N5	France	From this report
		N10	France	From this report
		N12	France	From this report
		N15	France	From this report
		N324	France	From this report
		N341	France	From this report
		N362	France	From this report
25	NTN	Lb	Lebanon	Glais <i>et al.</i> , 1996
		FrOrl	France	Glais <i>et al.</i> , 1996
		H	Hungary	Glais <i>et al.</i> , 1996
		CzLuk1	Czech Republic	Glais <i>et al.</i> , 1996
		Sp47	Spain	Blanco-Urgoiti <i>et al.</i> , 1998
		Lx2	Tunisia	From this report
		B6	France	From this report
		B9	France	From this report
		N4	France	From this report
		N18	France	From this report
30		May2	France	From this report
		Dk	Denmark	From this report

1.2 Préparation de l'échantillon

On a extrait le jus brut des plantes de *N. tabacum* sains ou infectées par PVY en pressant les feuilles (0,5 g) dans une presse à cylindre, en présence de 1 mL de tampon
5 de broyage froid (PBS ; 0,05 % (v/v) de Tween 20). On a immédiatement utilisé ces échantillons pour effectuer un test ELISA ou une extraction des acides nucléiques.

On a effectué un mode opératoire d'extraction "par feuilles humides" rapide adapté de Robert *et al.*, 2000, en utilisant trois disques de feuille (0,2 cm² chacun récoltés en
10 utilisant un bouchon de microtube comme dispositif de perforation) de chaque plante. On a incubé le matériau récolté pendant 15 min à 95 °C dans 100 µL de tampon de broyage et on l'a placé à 4°C pendant 10 min. Après une étape de centrifugation (8 000 g pendant 5 min), on a récolté le surnagent, on l'a transféré dans un nouveau tube et on l'a dilué 10 fois dans de l'eau sans RNase. On a stocké les extraits à – 20 °C
15 jusqu'à utilisation.

1.3 Dosage par méthode immunoenzymatique. (ELISA)

On a réalisé une détection de PVY dans une plante en utilisant un protocole DAS-
20 ELISA. On a rempli les puits des plaques de microtitrage avec 1 µg/mL d'anticorps polyclonal de PVY (FNPPPT-INRA, France) dans un tampon carbonate (pH 9,6) pendant 2 h à 37 °C. Entre chaque étape du protocole ELISA, on a lavé les plaques trois fois avec un tampon PBST (PBS, 0,05 % (v/v) Tween 20). On a ajouté 100 µL des jus bruts de plante dans les puits et on les a laissés jusqu'au lendemain à 4 °C. On a dilué les anticorps monoclonaux de souris conjugués à une phosphatase alcaline et dirigés contre le PVY^N [Bioreba, Suisse] ou le PVY^{O/C} [Adgen, Royaume-Uni] au 1/1000 ou au 1/2000 respectivement, dans un tampon de broyage complété avec 0,2 % d'ovalbumine (p/v). Selon la spécificité attendue de la détection, on a ajouté 100 µL de l'un de ces anticorps monoclonaux aux puits de la plaque pendant 2 heures à 37 °C. On a rempli les puits de la plaque avec 100 µL de phosphate de p-nitrophényle (1 mg/mL) dans un tampon substrat (diéthanolamine à 1 N, pH 9,6). Après incubation pendant 1

heure à température ambiante, on a lu l'absorbance des échantillons à 405 nm en utilisant un lecteur de plaque de microtitrage (Titertek Multiscan [MCC]).

1.4 Préparation des standard d'ARN viral pour les test par SNP

5

On a extrait l'acide nucléique total de 100 µL de jus brut pris dans des plantes infectées par PVY^N-605 ou PVY^O-139, en utilisant un mode opératoire de phénol/chloroforme et on l'a remis en suspension dans 50 µL d'une eau sans nucléase. On a réalisé une transcription inverse de l'ARN viral avec 3 U de transcriptase inverse AMV [Promega], 10 pmoles de l'oligonucléotide 5'-⁹⁷⁰²GTCTCCTGATTGAAGTTAC⁹⁶⁸²-
10 3' (SEQ ID No 13) (positions nucléotidiques selon l'isolat PVY^N-605), 20 nmoles de dNTP, 20 U de RNasin [Promega] et 10 µL de l'extrait d'acide nucléique total. On a effectué la réaction selon les instructions du fabricant de l'enzyme dans un volume final de 20 µL. On a ensuite amplifié par PCR la région de l'ADNc correspondant à
15 une partie des gènes HC-Pro/P3 de PVY^N-605 ou PVY^O-139 en utilisant 2,5 U de la polymérase AmpliTaq [Applied Biosystems], 40 pmoles de l'amorce avant
5'-aacgtgttctcgcatgctaattaacattggcgaggagg-3' (SEQ ID No 11 correspondant à nt
2079 à 2108 de PVY^O-139 et comprenant un site *NruI*) et l'amorce inverse 5'-
20 agccatcgtataaccaggggataatattgatagaatcaac-3' (SEQ ID No 12 correspondant à nt de
2592 à 2561 PVY^O-139, et comprenant un site *BstZ17I*),
20 nmol de dNTP, 75 nmol de MgCl₂, 10 µL d'ADNc et on a ajusté un volume final de
50 µL avec de l'eau stérile. On a fait des cycles de réaction avec un cycleur thermique
Hybaid Express® pendant 40 cycles de 94°C pendant 1 min, 52 °C pendant 1 min et
72 °C pendant 1 min. On a cloné séparément les produits de la PCR correspondant aux
25 séquences de PVY^N ou PVY^O dans les sites *NruI* et *BstZ17I* dans d'un vecteur
pBluescript modifié (pMTlink), dans lequel la cassette de clonage multiple de
pBluescriptKS [Statagene] a été remplacée entre les sites *KpnI* et *SacI* par une courte
séquence nucléotidique, comprenant les sites de restriction unique *KpnI-NruI-BstZ17I-SacI*. On a utilisé les plasmides résultants pMT_{NB}^N et PMT_{NB}^O pour produire des
30 produits de la transcription de l'ARN viral correspondant aux nucléotides 2086 à 2591
de PVY^N-605 et PVY^O-139 respectivement. On a séparément linéarisé 1 µg de

pMT_{NB}^N et pMT_{NB}^O par *SacI*, on l'a purifié en utilisant un protocole d'extraction par phénol/chloroforme et on l'a remis en suspension dans 5 µL d'eau sans nucléase. On a généré les produits de la transcription de l'ARN de PVY en présence de 15 U de l'ARN polymérase T3 [Promega], 10 mM de rNTP et 5 mM de dithiotreitol pendant 3 heures

5 à 37 °C. On a complété le processus de la transcription *in vitro* par la digestion du plasmide en utilisant une ADNase I dépourvue d'activité ARNase pendant 15 min à 37 °C. On a extrait les produits de transcription viraux en utilisant la procédure d'extraction au phénol/chloroforme, de l'alcool isoamylique, on les a précipités et mis en suspension dans 100 µL d'eau sans ARNase. On a déterminé la concentration

10 d'ARN final (µg/µL et copies/µL) par spectrophotométrie. On a effectué des dilutions des produits de la transcription *in vitro* de PVY^N et PVY^O afin d'obtenir des solutions contenant 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ ou 10² copies de l'ARN viral produit *in vitro* dans 2,5 µL.

15 **Exemple 2 : Conception d'une amorce et d'une sonde et détection SNP**

On a choisi le nucléotide 2213 de PVY (numéroté selon Jakab et al., 1997), signalé comme étant impliqué dans la nécrose des nervures du tabac de l'isolat PVY^N-605 (Balme-Sinibaldi et al., 2004), pour définir deux sondes marquées par FAM-(Sonde^N)

20 ou Vic-(Sonde^O) de TaqMan®-MGB, [Applied Biosystems] correspondant aux séquences de PVY^N-605 ou PVY^O-139 respectivement (figures 1 et 2). On a conçu les paires d'amorce sens (Fp) et anti-sens (Rp) (figure 2) qui encadrent les séquences ciblées par la sonde pour PVY^N-605 (FpN et RpN) et PVY^O-139 (FpO et RpO) en utilisant le logiciel Primer Express [Applied Biosystems].

25

Test SNP utilisant des sondes fluorescentes TaqMan®

On a effectué des réactions de SNP basés sur la technologie TaqMan® dans un volume final de 25 µL en utilisant le kit One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit [Applied Biosystems], selon les instructions du fabricant. On a effectué des réactions de RT-PCR en une seule étape, réalisées avec 2,5 µL d'extraits de "feuilles humides" provenant de plantes saines ou infectées, ou en utilisant des produits de la transcription

30

in vitro, en utilisant le système ABI Prism 7700 Sequence Detection System [Applied Biosystems]. On a effectué la transcription inverse de l'ARN viral à 48 °C pendant 30 minutes. On a effectué la PCR avec une polymérase hot-start AmpliTaq [Applied Biosystems] et en utilisant une étape d'activation enzymatique (10 min à 95 °C), suivie
5 de cycles de dénaturation/hybridation/extension (15 s à 95 °C ; 1 min à 60 °C). Pour chaque échantillon, on a lu les signaux de fluorescence correspondant à FAM, Vic et au contrôle interne ROX de Applied Biosystems® au point final du programme de RT-PCR. On a mathématiquement transformé les données obtenues (fluorescence brute) en utilisant le logiciel SDS v1.7 [Applied Biosystems], afin de produire des données
10 correspondant au signal fluorescent du composant cible (FAMm et Vicm) et les données fluorescentes normalisées (FAMn et Vicn). On a répliqué le test SNP et le mode opération de validation complet dans au moins trois expériences indépendantes.

**Exemple 3 : Détection de PVY^N-605 et PVY^O-139 dans des échantillons purs et
15 mélangés en utilisant un dosage de SNP suivant l'exemple 2.**

Selon les recommandations du fabricant et en prenant en compte les protocoles connus de RT-PCR en temps réel publiés au préalable (Fabre et al. 2003 ; Roberts et al. 2000), on a testé les deux sondes TaqMan® (Sonde^N et Sonde^O) et les paires d'amorce (FpN
20 et RpN ; FpO et RpO) à différentes concentrations allant de 50 nM à 900 M. Les signaux fluorescents récoltés à la fin des réactions de PCR étaient optimaux quand chaque sonde était inclus à 200 nM et les quatre amorces à 800 nM. On a effectué trente-deux cycles de PCR dans toutes les expériences de détection pour éviter le clivage non spécifique des sondes observées dans les expériences utilisant plus de 35
25 cycles de PCR. On a effectué le test SNP sur la base de quatre répétitions, y compris un contrôle sans matrice (NTC) ou des produits de la transcription de l'ARN virale *in vitro* (10^6 PVY^N ou 10^6 PVY^O copies/réaction) et avec duplication des échantillons mélangés contentant PVY^N et PVY^O (10^6 de chaque type d'ARN). On a enregistré des signaux fluorescents bruts (CFS) associés à chaque sonde à la fin de la réaction de RT-PCR
30 en une seule étape (figure 3). Pour les échantillons NTC, CFS correspond au niveau fluorescent de base du système ($0,782 \pm 0,024$ et $0,424 \pm 0,008$ pour la

fluorescence de FAM et de Vic respectivement), produit par les sondes non clivées (figure 3A). Quand on a testé les échantillons contenant les produits de la transcription de l'ARN, les CFS associés à une sonde ont augmenté selon le type d'ARN présent dans les échantillons testés (Sonde^N (signal FAM) et Sonde^O (signal Vic) pour PVY^N et PVY^O respectivement). Ce résultat prouve l'hybridation hautement spécifique des sondes à leurs cibles d'ARN et l'absence de tout niveau significatif d'interaction non spécifique. Dans les échantillons mélangés Y^N/Y^O, à la fois les signaux fluorescents de FAM et de Vic ont augmenté de manière significative quand on les compare aux données NTC, ce qui reflète la liaison et le clivage de deux sondes au cours de la réaction de PCR. La représentation graphique des données des signaux fluorescents bruts (figure 3B) illustre à la fois la distinction de quatre zones correspondant à chaque échantillon testé et dans ces zones, la variation du niveau fluorescent enregistré pour chaque réplication.

15 Exemple 4 : Test de la sensibilité du test SNP de PVY^{N/O}

On a produit et testé des fractions issues de dilutions en série contenant de 10^7 à 10^3 copies d'ARN/2,5 µL, de transcript *in vitro* de PVY^N et PVY^O en utilisant le protocole de test SNP, afin de déterminer la limite de détection de ce nouveau procédé (figure 4). Une bonne corrélation a pu être observée entre la quantité virale décroissante dans les échantillons testés et la baisse du signal fluorescent, à la fois pour PVY^N et PVY^O (figure 4A). On a détecté de manière efficace les trois dilutions les plus concentrées et on les a identifiées comme un type PVY^N ou PVY^O par le dosage SNP (figure 4A) ; 10^7 , 10^6 et 10^5 fractions dans les zones de PVY^N et PVY^O). Cependant, quand on a testé les échantillons contenant seulement 10^4 et 10^3 molécules d'ARN, les données fluorescentes obtenues étaient soit proches (10^4) soit non distinguables (10^3) de celles associées aux échantillons NTC. Les variations de ces données pour les réplications de NTC (figures 3A et 3B) fait qu'il est difficile d'identifier clairement le seuil fluorescent qui délimite la détection de PVY positive de la détection de PVY négative. Afin de résoudre ce problème, le logiciel SDS software® [Applied Biosystems] permet des transformations mathématiques du signal fluorescent brut en données fluorescentes

cibles (figure 4B) et en données fluorescentes normalisées (figure 5C). Ces données permettent de déterminer de manière précise la dilution du critère d'évaluation du dosage SNP dans la gamme (10^4 à 10^5) pour PVY^N et PVY^O.

5 Exemple 5 : Co-détection de PVY^N et PVY^O en mélange dans un échantillons (mimant une co-infection)

En utilisant des fractions contenant entre 10^4 et 10^8 de produits de la transcription *in vitro* de PVY^N ou PVY^O [NruI-BsZ17I], on a préparé plusieurs fractions mélangées, en 10 créant des échantillons avec des rapports de Y^N/Y^O de 1/100 à 100/1 (tableau 2 et figure 5). On a testé ces fractions comme des échantillons inconnus dans un dosage SNP comprenant NTC, des échantillons de contrôle de PVY^N purs (10^6 produits de la transcription) et de PVY^O purs (10^6 produits de la transcription). Les données 15 fluorescentes brutes obtenues à partir des échantillons purs (FAM=1,753 et Vic=1,276 pour PVY^N et PVY^O, respectivement) étaient équivalentes à celles obtenues dans les échantillons mélangés contenant 10^6 copies des deux types d'ARN (rapport 1/1 ; PVY^N et PVY^O à 10^6 copies ; FAM=1,653 et Vic=1,198). Ceci illustre que la détection simple et la co-détection de PVY^N et/ou PVY^O dans des échantillons contenant des quantités similaires d'ARN ciblée étaient efficaces pour les deux cibles. Comme précédemment 20 démontré, la quantité d'ARN de PVY présente dans les échantillons tests influence directement le niveau fluorescence brute. Les fractions contenant 10^8 copies des deux types d'ARN de PVY étaient associées à des valeurs de CFS élevées (proches de 2,000), alors que les fractions contenant seulement 10^4 copies d'ARN de PVY ont produit des données de CFS (FAM=0,860 et Vic=0,563) proches de celles attendues 25 pour le contrôle négatif (NTC ; FAM=0,754 et Vic=0,427). L'utilisation des données fluorescentes cibles (tableau 2) avec le seuil de détection de FAMt et Vict (figure 5) fait qu'il est facile de distinguer la détection simple d'une co-détection. En prenant en compte les observations, on a efficacement caractérisé les fractions avec des quantités d'ARN de PVY allant de 10^5 à 10^8 à un rapport de Y^N/Y^O de 1 comme des échantillons 30 mélangés. Quand on a testé les fractions contenant un type d'ARN de PVY en excès (rapport=1/100, 1/10, 10/1 ou 100/1), le CFS pour une quantité constante d'un type

d'ARN de PVY est réduit selon l'excès de l'autre type d'ARN de PVY ($PVY^N=10^6$: FAMm était 1,216, 0,970, 0,798, 0,454 et 0,68 pour les échantillons contenant 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 et 10^8 PVY^O, respectivement)..

5 Exemple 6 : Validation du test SNP sur une large gamme d'isolats de PVY

On a validé le test SNP développé en utilisant une large gamme d'isolats de PVY comprenant trente-sept isolats européens, deux isolats africains, deux isolats nord-américain et un isolat du proche orient, appartenant aux groupes PVY^N et PVY^O, 10 comprenant des variants PVY^{NTN} et PVY^N-W (tableau 1). On a caractérisé les propriétés biologiques et sérologiques des quarante-deux isolats en utilisant les observations des symptômes sur *N. tabacum* cv. Xanthi et des tests ELISA (tableau 3). Tous les résultats étaient en accord avec les résultats attendus. On a préparé des extraits de « feuilles humides » provenant de *N. tabacum* cv. Xanthi infectées par ces 15 isolats de PVY et on les a testées en utilisant le test SNP développé. Les données fluorescentes cibles et les résultats diagnostiques de SNP associés à chaque échantillon testé sont présentés dans le tableau 3. Tous les 42 isolats de PVY testés ont pu être correctement assignés par le test SNP dans leur groupe de PVY respectif. Les variants PVY^{NTN} et PVY^N-W ont été correctement caractérisés comme membres du groupe 20 PVY^N. Comme on s'y attendait, aucun des échantillons testés provenant de notre collection d'isolats de PVY n'a été identifié par le test SNP comme un échantillon co-infecté.

REFERENCES

- Abdelmaksoud, H.M., Gamal Eldin, A.S., 2002. The complete nucleotide sequence of
 5 the Potato virus Y strain N-Egypt. Unpublished. Genbank Accession umber:
 AF522296
- Berckx, R., 1967. Methodische untersuchungen über den serologischen nachweis
 pflanzenpathogener viren mit dem bentonit-flockungstest, den latex-text und
 dem bariumsulfat test. Phytopathologische Zeitschrift 58, 1-17.
- 10 Blanco-Urgoiti, B., Tribodet, M., Leclere, S., Ponz, F., Perez de San Roman, C.,
 Legorburu, F.J., Kerlan, C., 1998. Characterization of potato potyvirus Y
 (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z
 isolates. Eur. J. Plant Pathol. 104: 811-819.
- 15 Boonham, N., Walsh, K., Preston, S., North, J., Smith, P., Barker, I., 2002. The
 detection of tuber necrotic isolates of Potato virus Y, and the accurate
 discrimination of PVY(O), PVY^N and PVY^C strains using RT-PCR. J. Virol.
 Methods 102(1-2):103-12
- Boonham, N., Barker, I., 1998. Strain specific recombinant antibodies to potato virus
 Y potyvirus. J. Virol. Methods 74(2):193-9.
- 20 Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L., Zurcher, E.J., 1996.
 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database.
 Version: 20th August 1996.' URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Chrzanowska, M., 1991. New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVY^N)
 found recently in Poland. Potato Res. 34:179-182.
- 25 De Bokx, J.A., Huttinga, H., 1981. Potato virus Y. CMI/AAB Description of plant
 viruses No. 242, CMI/AAB, Slough, England, 6pp.
- Dougherty, W.G., Carrington, J.C., 1988. Expression and function of potyviral gene
 products. Ann. Rev. Phytopathology 26:123-143
- Ellis, P., Stace-Smith, R., Bowler, G., Mackenzie, D.J., 1996. Production of
 30 monoclonal antibodies for detection and identification of strains of potato virus
 Y. Can. J. Plant Pathol. 18, 64-70.

- Fabre, F., Kervarrec, C., Mieuzet, L., Riault, G., Vialatte, A., Jacquot, E., 2003. Improvement of Barley yellow dwarf virus-PAV detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 110(1):51-60
- 5 Fakhfakh, H., Vilaine, F., Makni, M., Robaglia, C., 1996. Cell-free cloning and biolistic inoculation of an infectious cDNA of potato virus Y. *J. Gen. Virol.* 77: 519-523.
- Gugerli P., Fries, P., 1983. Characterization of monoclonal antibodies to potato virus Y and their use for virus detection. *J. Gen. Virol.* 64:2471-2477.
- 10 Glais, L., Tribodet, M., Gauthier, J.P., Astier-Manifacier, S., Robaglia, C., Kerlan, C., 1998. RFLP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of different biological groups of potato virus Y. *Arch. Virol.* 143: 2077-2091.
- 15 Glais, L., Kerlan, C., Robaglia, C., 2001. Variability and evolution of potato virus Y, the type species of the potyvirus genus. In Plant Viruses as molecular pathogens. Ed. Jawaid A. Khan and Jeanne Dijkstra, Food Products Press, The Haworth Press, Inc, New York.
- Glais, L., Tribodet; M., Kerlan, C., 2002. Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY^(N)W and PVY^(NTN) variants are single to multiple recombinants between PVY^(O) and PVY^(N) isolates. *Arch. Virol.* 147(2):363-78.
- 20 Glais, L., Colombel, A.S., Tribodet, M., Kerlan, C., 2004. PVY^N-605, the reference PVYN isolate, displays a PVY^{NTN} non-recombinant genome. The 12th EAPR virology section meeting, Rennes-France, 2004 June 13-19th, abstracts. pp 50
- Health, R., Sward, R.J., Moran, J.R., Mason, A.J., Hallam, N.D., 1987. Biological characterization of six Australian isolates of potato virus Y and their serological detection by ELISA. *Australian Journal of Agricultural Research* 38, 395-402.
- 25 Jakab, G., Droz, E., Brigneti, G., Baulcombe, D., Malnoe, P., 1997. Infectious in vivo and in vitro transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. *J. Gen. Virol.* 78(12):3141-5.
- Kerlan, C., Tribodet, M., Glais, L., Guillet, M., 1999. Variability of potato virus Y in 30 potato crops in France. *J. Phytopathology* 147:643-651.

- Le Romancer, M., Kerlan, C., Nedellec, M., 1994. Biological characterization of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathol.* 43, 138-144.
- Maat, D.Z., Huttinga, H., 1987. Serology. In *Viruses of potatoes and seed-potato production*. Ed. by De Bokx, J.A. and van der Want, J.P.H., Pudoc Wageningen, NL.
- Marie-Jeanne Tordo, V., Chachulska, A.M., Fakhfakh, H., Le Romancer, M., Robaglia, C., Astier-Manifacier, S., 1995. Sequence polymorphism in the 5'NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 76:939-49.
- Matousek, J., Ptacek, J., Dedic, P., Schubert, J., 2000. Analysis of variability of P1 gene region of N strain of potato virus Y using temperature-gradient gel electrophoresis and DNA heteroduplex analysis. *Acta Virol.* 44(1):41-6.
- Mc Donald, J.G. and Kristjansson, G.T., 1993. Properties of strains of potato virus YN in North America, *Plant Disease*, 77(1): 87-89.
- Mc Donald, J.G., Singh R.P., 1996. Host range, symptomatology, and serology of isolates of Potato virus Y (PVY) that share properties with both the PVY^N and PVY^O strain groups. *American Potato Journal* 73:309-315.
- Milne, R.G., 1988. The Plant Viruses-4. The filamentous plant viruses, ed. by R.G. Milne, Plenum Press New York & London, 1988.
- Moravec, T., Cerovska, N., Boonham, N., 2003. The detection of recombinant, tuber necrosing isolates of Potato virus Y (PVY^{NTN}) using a three-primer PCR based in the coat protein gene. *J. Virol. Methods* 109(1):63-8.
- Nie, X., Singh, R.P., 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. *J. Virol. Methods* 91, 37-49.
- Nie, X., Singh R.P., 2002. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of Potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR. *J. Virol. Methods* 104(1):41-54.
- Nie, X., Singh, R.P., 2003. Specific differentiation of recombinant PVY^(N:O) and PVY^(NTN) isolates by multiplex RT-PCR. *J. Virol. Methods* 113(2):69-77.

- Oefner, P.J. 2002. Sequence variation and the biological function of genes: methodological and biological considerations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 25;782(1-2):3-25.
- Ounouna, H., Kerlan, C., Lafaye P., Loukili M.J., ElGaaied, A. 2002. Production of 5 monoclonal antibodies against synthetic peptides of the N-terminal region of Potato virus Y coat protein and their use in PVY strain differentiation. *Plant Pathol.* 51: 487-494
- Oshima, K., Inoue, A.K., Ishikawa, Y., Shikata, E., Takashi, H., 1990. Production and application of monoclonal antibodies specific to ordinary strain and necrotic 10 strain of potato virus Y. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 56: 508-514.
- Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manifacier, S., Casse-Delbart, F., 1989. Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 70:935-947.
- Roberts, C.A., Dietzgen, R.G., Heelan, L.A., Maclean, D.J., 2000. Real-time RT-PCR 15 fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. *J. Virol. Methods* 88, 1-8.
- Rosner, A., Maslenin, L., 1999. Differentiating PVYNTN by unique single-restriction cleavage of PCR products. *Potato Res.* 42, 215-221.
- Rosner, A., Maslenin, L., 2001. Differentiating PVY^(NTN) from PVY^(N) by annealing to reference RNA transcripts. *J. Virol. Methods.* 97(1-2):125-31.
- Rosner, A., Maslenin, L., 2003. Tagging of viral RNA transcripts with strain-specific 20 oligonucleotides: characterization and application. *J. Virol. Methods.* 110(1):105-9.
- Sanz, A., Cambra, M., Perez de San Roman, C., Miguet, J.G., Cortés, E., Gorris, M.T., Vela., C., 1990. Preparation of additional monoclonal antibodies for detection 25 and discrimination of potato virus Y isolates infecting potato. *Potato Res.* 33: 365-375.
- Shukla,D.D., Ward, C.W., Brunt, A.A., 1994. The Potyviridae. Cambridge University Press, Cambridge, 516p.
- Singh, R.P., Boucher, A., Somerville, T.H., Dhar, A.K., 1993. Selection of monoclonal 30 antibody to detect PVY^N and its use in ELISA and DIBA assays. *Can. J. Plant Pathol.* 15, 293-300.

- Singh, M., Singh, R.P., 1996. Nucleotide sequence and genome organization of a Canadian isolate of the common strain of potato virus Y (PVYO). *Can. J. Plant Pathol.* 18:209-224.
- 5 Sigvald, R., 1984. The relative efficiency of some aphid species as vector of potato virus Y. *Potato Res.* 27, 285-290.
- Smith, K.M., 1931. Composite nature of certain potato viruses of the mosaic group as revealed by the use of plant indicators. *Proc. Royal Soc. London, B* 109: 251-267.
- 10 Szemes, M., Klerks, M.M., van den Heuvel, J.F., Schoen, C.D., 2002. Development of a multiplex AmpliDet RNA assay for simultaneous detection and typing of potato virus Y isolates. *J. Virol. Methods* 100(1-2):83-96.
- Talley, J., Warren, F.H.J.B., Torrance, L., Jones, R.A.C. 1980. A simple kit for detection of plant viruses by the latex serological test. *Plant Pathol.* 29: 77-79.
- 15 Thole, V., Dalmay, T., Burgyan, J., Balazs, E., 1993. Cloning and sequencing of Potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA. *Gene* 123:149-156.
- Walsh, K., North, J., Barker, I., Boonham, N., 2001. Detection of different strains of Potato virus Y and their mixed infections using competitive fluorescent RT-PCR. *J. Virol. Methods* 91(2):167-73.
- 20 Walkey, D.G.A., Webb, M.J.W., 1984. The use of a simple electron microscope serology procedure to observe relationships of seven potyviruses. *Phytopathologische Zeitschrift* 110: 319-327.

REVENDICATIONS

- 5 1. Procédé de détection de la présence ou de l'absence de souches du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires chez les plantes de la famille des *Solanacées*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) extraction des acides nucléiques d'un échantillon de plante,
- b) amplification RT-PCR d'une région de l'ARN viral de PVY comprenant les codons 738 et 757 (SEQ ID No 1 et 3) correspondant aux acides aminés 400 et 419 respectivement de la protéine HC-Pro (SEQ ID No 2 et 4, fig 7A et 7B),
- c) détection sur les cDNA obtenus à l'étape b) de la présence ou de l'absence de mutations correspondant à R/K₄₀₀ et D/E₄₁₉ au moyen i) d'au moins une sonde marquée spécifique d'un polymorphisme sur le codon 738 et ii) d'au moins une sonde marquée spécifique d'un polymorphisme sur le codon 757, lesdites sondes i) et ii) présentant des marqueurs émettant un signal de fluorescence différent,
- caractérisé en ce que la présence d'au moins une desdites mutations R/K₄₀₀ et D/E₄₁₉ est une indication de la présence d'une souche de PVY virulente responsable de la nécrose chez les plantes de la famille des *Solanacées*.
- 20 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'en un seul test, on détecte les 4 génotypes/phénotypes suivants :
- [R₄₀₀ , D₄₁₉] (souche incapable d'induire la nécrose)
- [R₄₀₀ , E₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
- 25 - [K₄₀₀ , D₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K₄₀₀ , E₄₁₉] (souche induisant la nécrose).
- 30 3. Procédé selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce qu'il est effectué chez la pomme de terre.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la détection à l'étape d) de souches de PVY [R₄₀₀, E₄₁₉] et/ou [K₄₀₀, D₄₁₉] et/ou [K₄₀₀, E₄₁₉] est une indication que la plante de pomme de terre est contaminée avec une ou plusieurs souche(s) induisant des nécroses tuberculaires.
- 5
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on utilise comme **sonde i)** à l'étape c), au moins une sonde spécifique d'un polymorphisme sur le codon 738 (correspondant à R/K₄₀₀), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 738 est AAA avec le polymorphisme A₂₂₁₃.
- 10
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la sonde i) comporte de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 5 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2213, notamment la SEQ ID No 7 : **ctcaaatgaaatattctac**
- 15
7. Procédé selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce qu'on utilise en outre une **sonde i) contrôle** à l'étape c), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 738 est AGA avec le polymorphisme G₂₂₁₃.
- 20
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la sonde i) contrôle comporte de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 6 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2213, notamment la SEQ ID No 8 : **ctcaaatgagaatattcta**
- 25
9. Procédé selon l'une des revendications 7 et 8, caractérisé en ce que la sonde i) et la sonde i) contrôle sont marquées différemment.
- 30
10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'on utilise comme **sonde ii)** à l'étape c), au moins une sonde spécifique d'un polymorphisme sur le codon 757 (correspondant à D/E₄₁₉), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 757 est GAA avec le polymorphisme A₂₂₇₁.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la sonde ii) comporte de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 5 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2271, notamment avec la séquence **5'- cgatcacgaaacgcagaca - 3'** (SEQ ID No 9) ou **5'- atcacgaaacgcagaca - 3'** (SEQ ID No 20).
12. Procédé selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce qu'on utilise en outre une **sonde ii) contrôle** à l'étape c), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 757 est GAC avec le polymorphisme C₂₂₇₁.
13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la sonde ii) contrôle comporte de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 6 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2213, notamment avec la SEQ ID No 10 : **5'- accatgacactcaa - 3'** ou avec la SEQ ID No 21 : **5'- tgaccatgacactcaa -3'**
14. Procédé selon la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce que la sonde ii) et la sonde ii) contrôle sont marquées différemment.
15. Procédé selon l'une des revendications précédentes dans les sondes comporte un marqueur fluorescent (reporter) et une molécule captant le signal lorsqu'elle se trouve à proximité du marqueur fluorescent (quencher).
16. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que lors de l'étape b), la transcription inverse est effectuée avec au moins 2 paires d'amorces sens et antisens.
17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la transcription inverse est effectuée au moins avec une première paire d'amorces permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY^N, et

au moins une deuxième paire d'amorces permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY^O.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que la première paire
5 d'amorces (FpN et RpN) comprend une amorce sens FpN et une amorce antisens RpN pouvant comporter une séquence de 20 à 40 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 1 ou 5.

19. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'amorce sens FpN se situe
10 en amont du codon 738 polymorphique et l'amorce RpN se situe en aval du codon 757 polymorphique.

20. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'on met en œuvre deux premières paires :

- 15 - FpN1 en amont du codon 738
- RpN1 en aval du codon 738
- FpN2 en amont du codon 757
- RpN2 en aval du codon 757

20 21. Procédé selon l'une des revendications 16 à 20, caractérisé en ce que la deuxième paire d'amorces (FpO et RpO) comprend de préférence une amorce sens FpO et une amorce antisens RpO pouvant comporter une séquence de 20 à 40 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 3 ou 6.

25 22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que l'amorce sens FpO se situe en amont du codon 738 polymorphique et l'amorce RpO se situe en aval du codon 757 polymorphique.

30 23. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'on met en œuvre deux deuxièmes paires :

- FpO1 en amont du codon 738

- RpO1 en aval du codon 738
- FpO2 en amont du codon 757
- RpO2 en aval du codon 757

5 24. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce les amorces des deux paires sont choisies parmi :

Amorces sens pour YN

SEQ ID No 22 F1 : 5'-ATGATGCAGAACTGCCTAGAATACTAGT-3'

SEQ ID No 23 F2 : 5'-ATGATGCAGAACTGCCTAGAATACTAGTC-3'

10 SEQ ID No 24 F3 : 5'-CATGATGCAGAACTGCCTAGAATACTA-3'

Amorces anti-sens pour YN :

SEQ ID No 28 R1 : 5'-GTGAGCCAACGAGTCAACTACAT-3'

SEQ ID No 29 R2 : 5'-TTTGTGAGCCAACGAGTCAACTA-3'

SEQ ID No 30 R3 : 5'-TTGTGAGCCAACGAGTCAACT-3'

15 Amorces sens pour YO

SEQ ID No 25 F1 : 5'-GCAGAGCTGCCTAGTTATTGGTT-3'

SEQ ID No 26 F2 : 5'-ATGATGCAGAGCTGCCTAGTTATT-3'

SEQ ID No 27 F3 : 5'-TGCAGAGCTGCCTAGTTATTGG-3'

Amorces anti-sens pour YO :

20 SEQ ID No 31 R1 : 5'-GCCAAATGAGTCAACCACATGA-3'

SEQ ID No 32 R2 : 5'-AGCCAAATGAGTCAACCACATG-3'

SEQ ID No 33 R3 : 5'-CCAAATGAGTCAACCACATGACA-3'

25 25. Procédé de sélection sanitaire de plants de la famille des Solanacées susceptibles d'être infectées par une ou plusieurs souches du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires, notamment de nécroses tuberculaires chez la pomme de terre, comprenant la mise en œuvre systématique du procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 24 sur les semences, plants et/ou plantes susceptibles d'être mis en culture et procéder à la destruction ou mise sous quarantaine desdites 30 semences, plants ou plantes contaminés avec une souche présentant au moins un des polymorphismes correspondant à :

- [R₄₀₀, E₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
 - [K₄₀₀, D₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
 - [K₄₀₀, E₄₁₉] (souche induisant la nécrose)
- 5 26. Kit de détection de la présence ou de l'absence d'isolats du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires chez les plantes de la famille des *Solanacées*, caractérisé en ce qu'il comprend :
- au moins une première paire d'amorces permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY^N, au moins
 - 10 une deuxième paire d'amorces permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY^O.
 - au moins une sonde marquée i) spécifique d'un polymorphisme sur le codon 738 et au moins une sonde marquée ii) spécifique d'un polymorphisme sur le codon 757, lesdites sondes i) et ii) étant définies selon l'une des revendications 5 à 6 et 10 à 11
 - 15 respectivement, et présentant des marqueurs émettant un signal de fluorescence différent.
27. Kit de détection selon la revendication 25 comprenant en outre les sondes i) et ii) de contrôle telles que définies selon l'une des revendications 7 à 8 et 12 à 13
- 20 respectivement, les sondes i) et contrôle i) étant marquées avec des marqueurs de fluorescence différents, les sondes ii) et contrôle ii) étant marquées avec des marqueurs de fluorescence différents.
28. Kit de détection selon la revendication 26 ou 27 comprenant une solution
- 25 comprenant les amorces à une concentration optimale se situant entre 400 nM et 1200 nM, notamment 800 nM et une solution comprenant les sondes à une concentration se situant entre 100 nM et 300 nM, notamment 200 nM.
29. Sonde ou collection de sondes définie(s) selon l'une des revendications 5 à 15.
- 30 30. Amorce ou collection d'amorces définie(s) selon l'une des revendications 17 à 24.

31. Utilisation d'une sonde et d'une amorce ou des collections selon la revendication 29 et 30 respectivement pour la détection de la présence ou de l'absence de souches du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires chez les 5 plantes de la famille des *Solanacées*, notamment chez la pomme de terre, l'aubergine, la tomate, les piments et le tabac.
32. Lot de semences, plants et/ou plantes de la famille des *Solanacées*, caractérisé en ce qu'il est dépourvu de semences, plants ou plantes contaminés avec une souche de 10 PVY présentant au moins un des polymorphismes correspondant à :
- [R₄₀₀, E₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K₄₀₀, D₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K₄₀₀, E₄₁₉] (souche induisant la nécrose).
- 15 33. Lot de plants ou tubercules de pomme de terre, caractérisé en ce que qu'il est dépourvu de plants ou tubercules contaminés avec une souche de PVY présentant au moins un des polymorphismes correspondant à :
- [R₄₀₀, E₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K₄₀₀, D₄₁₉] (souche capable d'induire la nécrose)
20 - [K₄₀₀, E₄₁₉] (souche induisant la nécrose).
34. Lot selon la revendication 32 ou 33 susceptible d'être obtenu par la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 24 et 25 ou du kit selon l'une des revendications 26 à 28.

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)
 GROUPEMENT NATIONAL INTERPROFESSIONNEL DES SEMENCES ET
 PLANTES (GNIS)
 FEDERATION NATIONALE DES PRODUCTEURS DE PLANTS DE POMMES DE
 TERRE (FNPPPT)

<120> DETECTION DU VIRUS DE LA POMME DE TERRE

<130> D21019

<160> 33

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 9701

<212> ADN

<213> Virus de la pomme de terre

<220>

<223> Séquence PVYN-605

<400> 1

aaattaaaac aactcaatac aacataagaa aatcaacgca	aaaacactca caaaagcttt	60
caactctaatt tcaaacaatt tgttaagttt caatttcgtat	cttcatcaaa caaactcttt	120
caatttcagt gtaagctatc gtaattcagt aagttatttc	aaactctcgat aaattgcaga	180
agatcatcca tggcaattta cacatcaaca atccagtttg	gttccattga atgcaaactt	240
ccatactcac ccgctccttt tggcttagtt gcggggaaac	gagaagtttc aaccaccact	300
gacccttcg caagtttggaa gatgcagctc agtgcgcgtat	tacgaaggca ggagtttgca	360
actattcgaa catccaagaa tggtaacttgc atgtatcgat	acaagactga tgcgcagatt	420
gcgcgcattc aaaagaagcg cgaggaaaga gaaagagagg	aatataattt ccaaattggct	480
gctgtcaagt gttgtcgaa gatcactatt gctggggag	agccaccttc aaaacttgaa	540
tcacaagtgc ggaggggtgt catccacaca actccaagga	tgcgcacagc aaaaacatat	600
cacacgccaa agttgacaga gggacaaatg aaccacctta	tcaagcaggta gaagcaaatt	660
atgtcaacca aaggagggtc tgcgcactg attagcaaga	aaagtaccca ttttactat	720
aaagaagttt tggatcaca tcgcccgtt gtttgcactg	cacatatgag agtttacga	780
aaggaggtgg actttcggtg tgataaatgg accgttgtgc	gtctacagca tctcgccagg	840
acggacaagt ggactaacca agttcggtct actgatctac	gcaaggggcgta tagtggagtt	900
atatttgatcataactaatct caaaggaaac ttggggagaa	gctcgagggg cctattcata	960
gtgcgtgggt cgcacgaagg aaaaatctat gatgcacgtt	ccaaggttac tcaaggggtt	1020
atggattcaa tggttcgtt ctcaagcgct gaaagcttt	ggaagggatt ggacggcaat	1080
tgggcacaaa tggatcataactcat acatgtgtgg	cagcttacc agttgaagac	1140
tgtggcagag ttgcgcgtat aatgacacac agtattttac	cgtctataa gattacctgc	1200
cctacctgtg cccacaata tgccaaacttg ccagccgtg	acttacttaa gatattacac	1260
aagcacgcaa gtgatgtct aaatcgattt gggcagaca	aagatcgctt tgcgcacgtc	1320
aaaaagttct tgacaatctt agacactta actgaaccgg	ttgatcttag tctagaaatt	1380
ttaaatgaaat tattcaagtc tataggggag aagcaacaat	caccttcaa aaacctgaat	1440
attctgaata atttctttt gaaaggaaag gaaaatacag	ctcgtgaatg gcaggtggct	1500
caattaagct tacttgaatt ggcaagattc caaaagaaca	gaacggataa tatcaagaaa	1560
ggagacatct cgttcttag gaataaaacta tctgc当地	caaattggaa cttgtatctg	1620
tcatgtgata accagctgaa taagaatgca agcttcgtt	gcccacatcg ttttgcact	1680
gctaaggcgat ttttctcgaa ctatttcgag gaaattgtac	cagcgaagggttattcagca	1740
tacgaaaatc gtttgcattcc gaatgggaca agaaaaacttg	caattggaaa cctaatttgc	1800
ccacttgcgtt tggcttagtt taggcggaaat gtaaaagggt	attataaaag acagccagg	1860
gtgatgttgcgtt gatgcacgtt ctcgttgcgtt gtttgcact	ggaaactacg ttttgcact	1920
acacttgcgtt atggctcgtt ttttgcactt ctcgttgcact	acattttacc cgc当地actaa gaagcacctc	1980
gtaataggtt atagtggcgtt cccaaaatgtt gtttgcactt	caaaaggaa ttctgtatctg	2040
tttatatattt ccaggcaagg ctctgttac attaacattt	tcctcgat gttgatattac	2100
attatgtgagg aagatgcaaa ggatttactt aagaagggtt	gtgcacatgtg ttttgcact	2160

cttggAACCT	ggccaaccat	gatggatctg	gctacaactt	gtgctcaaatt	gaaaatattc	2220
taccctgtg	ttcatgtatgc	agaactgcct	agaataactag	tcgatcacga	aacgcagaca	2280
tgccatgtag	ttgactcggt	tggctcacaa	acaactgggt	atcatatttt	gaaagcatct	2340
agcgtgtccc	aacttatttt	gtttgctaatt	gatgagtggt	agtctgacat	taagcactat	2400
agagttggtg	gtattccctgg	agcatgcct	gagcttgggt	ccacaatatac	accttttaga	2460
gaaggaggaa	tcataatgtc	tgagtca	gcgcctaaaac	tgctcctaaa	gggaattttt	2520
aggcccaaag	tgtgaagca	attgctactg	gatgaaccat	atttgctcat	tttatcgata	2580
ttatccctg	gtatacttat	ggctatgtac	aacaatggga	tatttgagtt	agcggtaag	2640
ttgtggatca	atgagaaaca	atctatagcc	atgatagcat	cgttattgtc	cgccttgct	2700
ttacgagtgt	cagcagcaga	aacactcggt	gcacagagga	ttataattga	cacggcagca	2760
acagatcttc	tcgatgtac	gtgtgatgga	ttcaatttaa	atctgacata	tcccactgca	2820
ctcatggtgt	tgcaaggttgt	taagaacaga	aatgaatgtg	atgatacggt	gtttaaagca	2880
ggttttcac	attacaacat	gagtgtcg	cagattatgg	aaaaaaatta	tctaagcctc	2940
ttgggcgtat	cctggaaaga	tttaacctgg	cgagaaaaat	tatccgcaac	atggcactca	3000
tacaaagcaa	agcgctctat	cactcagttc	ataaaaccca	taggcaaagc	agatttaaaa	3060
gggttgtaca	acatatacc	gcaagcattc	ttgggtcagg	gcgtacagag	agtcaaaggc	3120
accgcctcag	ggttgaatga	gcgactcaat	aattatatac	atactaagt	tgttaatatt	3180
tcatcccttt	tcattcgtag	aattttccgg	cgcttgc	cttttgc	tttcattaaat	3240
tcattattag	ttatttagtat	gtctaactgt	gtatgcag	tgtgtcaagc	aataattcta	3300
gatcaaagga	agtataaaaa	agaaatttag	ttgatgcaga	ttgagaagaa	tgaaattgtt	3360
tgtatggagt	tgtatgcgag	tctgcagcgc	aaacttgc	gtgaattcac	atgggatgaa	3420
tatatggat	atttgaatc	tgtgaatccc	cagatagttc	aattcgcgc	agctcaaattg	3480
gaagaatata	atgtgcgaca	tcagcgtcc	acaccagg	ttaagaattt	agagcagg	3540
gtagcattta	taactcta	tatcatgt	tttgatgtc	aaaggagcga	ctgtgtattc	3600
aagactctca	acaaattca	aggcatcg	tcttcaatgg	atcatgaat	taaacaccag	3660
tccttggat	atgtatcaa	gaatttgc	gaaaggaaac	aagttattga	ttttgagct	3720
aatgaggata	caattaaac	atcatcag	ttggacac	agtttagcga	ctgggtggat	3780
cggcaaatcc	aaatgggaca	cacactccc	cattatagaa	ctgagggaca	cttcatgaa	3840
ttcacaaggg	caactcg	acaagtggcc	aacgacatcg	cgcatag	gcaccta	3900
tttctagtga	ggggagctgt	tgggtctgga	aaatctact	gactgcctgt	ccatctc	3960
gcagctggat	ccgtgc	tttgc	gatagaacca	actcgacc	ttgcagaaaa	4020
caattatcca	gtgaaccgtt	tttcaagaag	ccaaactgc	gatgcgagg	aaatagtgt	4080
tttgggtcct	ctccaaatc	catcatgact	agcggctt	cggtgc	actatgc	4140
aatcgctctc	agctaactca	gtttaattt	ataattttt	atgaatgt	tgttttagat	4200
ccttctgca	tggcattcg	tagctgtt	agtgtgtatc	accaaacat	caaagtgtt	4260
aagggtcg	ccactcc	gggaagggg	gtcgagg	caacacaaca	accagttaaa	4320
ttgggtgg	aggatacact	tttcaattt	tcttttgc	atgcgc	ctcaaaaacc	4380
aatgccgac	ttgttcag	tgttgc	atactcg	atgtgtcg	ttacaatgaa	4440
gtggatacat	tagccaag	tctaacag	aggaatatgg	tagtct	agttgatgg	4500
agaacaatga	agcacggat	cttagaaatt	gtacgaaag	ggactgt	aaagccacat	4560
tttgcgtat	caaccaac	tattgaaaat	ggagtaact	tagatata	tgtgttgc	4620
gattttggac	ttaaagtctc	accgtttt	gatattgaca	ataggag	tgcatacaat	4680
aagatttagt	ttagctatgg	agaaagaatt	cagaggttgg	gccgtgttgg	gchgcttta	4740
aagggtgg	cattcg	tgcacac	gaaaagg	ttattgagat	tccaaatgt	4800
attgctatgt	aagctcg	tgcgtgc	gcatacaatt	tgccg	atacg	4860
gtttcaacta	gcctcatt	caattgt	gttcgt	taaaaactat	gcaacaattt	4920
gagctgagtc	cattctt	acaaaattt	gttgc	atggatca	gcattc	4980
atacatgaca	ttcttaa	gtataaact	cgagat	tgacg	ccctt	5040
tcatacctt	acagac	aagca	ttgtc	gtgag	acgactcg	5100
gtgggtttgg	acattccaa	acagat	attgc	atcaag	catccct	5160
aagttcgat	aatgc	ggaaacag	ttcaaaat	aggat	tttgc	5220
agttatcg	tttgc	tttgc	ttcaattt	tttgc	tttgc	5280
attcccagaa	ccctt	atgtgaa	ttgat	ggagg	aggac	5340
caattcagaa	gtctcatt	tgaaggat	tcaag	catgt	tttcaattt	5400
aacactctt	gagct	tgcaaaagg	tacact	aaaacata	gaagctcg	5460
aaagtgg	gtc	ggagttct	aattt	atgc	tgaggaga	5520
ttaatgaa	ggtatgaa	tctac	gtgc	catc	aagcaaca	5580
aaggatttga	agttgaa	agg	aagt	catt	tttactcata	5640
gcgggtgc	ttgc	tggat	ttgt	gcag	tttactcata	5700
gaaactgtgt	ctcacc	agg	aa	tc	ttcaagcatt	5760
cacggcccg	ataagagg	gc	tt	ca	gaagttcga	5820

ttctttggat ctgcatacag gaagaaggga aaaggtaaag gcaccactgt tggtatggc	5880
aagtcaagca ggagggttgt taatatgtat ggatttgc accaacaata ttcatccatc	5940
cagttcggtt atccgctcac tggagctcaa attgaagaga acgtctatgc tgatattaga	6000
gacatccaag agcgcttag tggatgtccgc aagaaaatgg tagaggatga tgaaatcgaa	6060
ttgcaagcat tgggcagcaa cacaaccatt catgcttact tcagggaaaga ttggtctgac	6120
aaggctctaa aaattgattt gatgccacac aaccactca aaatctgtga taaatcgaaat	6180
ggcattgcta agttcctga aagagaactt gagttgaggc aaactgggccc agcaataagag	6240
gttgatgtga aagacattcc aaaacaggaa gtggagcatg aagccaaatc actcatgaga	6300
ggtttaaggg atttcaatcc aattgctcaa acagtttgcgagatgggaaatgt gtctgttga	6360
tatggAACGT ctgaaatgtt tgggttcggg tttgggtcgat attttatgtt aaaccaccat	6420
ctattcaaga gcttcaatgg atccatggaa gtgcgatcaa tgcattggaaatccatgaga	6480
aagaatttgc atagcttgcgat ctttttaccg atcaaaggca gagacattat catcataaag	6540
atgc当地点 atttccctgt tttcccacaa aactgcact tccgagctcc agtgc当地点	6600
gagaggattt gtttgggtgg aactaattttt caagaaaaac atgcatcatc aatcatcaca	6660
gaaacgagta ctacatacaa tgtaccggc agcactttt ggaagcattt gatttgaaca	6720
aatgtatggc attgtggatt accagtagtg agtacagctg atggatgtct agtggaaata	6780
cacagcttgg cgaataatgt gcaaaccacg aatttattt cagccttgc tgaggatttt	6840
gaaagtaagt atctccgaac taatgagcat aatgagttggc ccaaactcgat ggtatataac	6900
ccagatactg tgggtgggg tccattggaa ctcaaggaga gtacccctaa aggctgttt	6960
aagacaacaa aacttgcata ggatttaattt gatcatgatg ttgttgcata gcaagctaaa	7020
cattctgcgtt ggtatgtatgaa ggctctaaaca ggaaatttgc aactgtggc gacaatgaag	7080
agtcagcttag tgacaagca cgtggcataaa ggggaggtgtc ggcaacttcaa agagttctta	7140
actgtggattt cggaaaggcaga agcttcttc aggccttgc tgatgtctt tggagagac	7200
ttgttaaata gagaaggata tataaaggac ataatgaaat actcaaagcc tattgtatgtt	7260
ggaatagtag actgtgtatgc ttttgcagat gctatcaata gggatcat ttatctgaa	7320
gtgc当地点 tccagaaatgc caatttacatc accatgatgac agggaaatttt caaagctctc	7380
aatatgaaatgc ctgctgtcgat agctatgtatgc ggaggcaaga agaaagacta ctgc当地点	7440
tttactgagg cgatggataa gggaaatttgc atgcaagat ttttcgattt gtaaaggc	7500
tcgcttggca tatggatgg atcatttgc gcaacttc ggtgc当地点 gaagataactt	7560
gcaaataaga caaggacattt cactgctgc cctttagata ctctacttggg tggaaagggt	7620
tcgcttgcgtt attttatataa tcaatttctac tcaaaagaca ttgaatgtctt ctggactgtt	7680
ggaatgacta agttttatgg agttggcattt aaatttgc ggcgtctacc tgaaaattgg	7740
gtgtactgc当地点 atgccc当地点 ttcacaattt gatagttcac tcacccata ccttattaaat	7800
gctgttctca tcatcagaag cacatacatg gaagatttggg acttgggggtt gcaaatttgg	7860
cgcaatttgc acacagaacaa aattttacaca ccaatctca cttccagatgg aacaatttgc	7920
aagaagtttgc gaggtataaa tagcggtca ctttctaccg ttgttgcataa ttctctcatg	7980
gttgc当地点 ctatgc当地点 cgctctcattt aaggagttgc ttgttgcata agaaatcgac	8040
agcacgtgtg tatttttgc taatggatgat gacttatttgc ttgttgcata tccggagaaa	8100
gagagcatttgc tcgatagaat gtcacaacat ttctcagatc ttgttgcata ctatgtttt	8160
tcgtcgagaa caagaaggaa ggaggaatttgc ttgttgcata cccatagagg cctgcttaatc	8220
gaggatgttgc acgtgc当地点 gtttgc当地点 gagagaatttgc tatttttgc gcaatgggat	8280
agagctgtatc tgccagagca cagatttgc gcgatttgc cagcaatgtt agaatttgc当地点	8340
ggttatttttgc agtttgc当地点 ccaatcatttgc agatttgc当地点 catgggttgc gcaacagca	8400
ccttttca cgtatgc当地点 ggaaggaaa gctccatata tagcgagcat ggcatttgc当地点	8460
aagctgtaca tgaataggac agtagatgtatgc gaggaacttgc aggttttgc当地点 tggatgtatgc	8520
gttgc当地点 atgatgtatgc ttagtgc当地点 acttgc当地点 tgcaccatca agggaaatgtatgc	8580
acaatcgatc caggaggaag cactaaaaatgc gatgc当地点 aagagcaagg tagcatttgc当地点	8640
ccaaatctca acaaggaaa ggaaaaggac gtgaatgttgc gacatcttgc aactcataact	8700
gtgccacgaa ttaaagctat cacgtccaa atgaaaatgc ccaagagtaa aggtgc当地点	8760
gtactaaatttgc tggacactt actcgatgtatgc gtc当地点 cagacaaatctca ctcaaataact	8820
cgagcaactt aatcacatgtt tgc当地点 ctttgc当地点 tatgaagcag tacaacttgc atacgc当地点	8880
ggagaaacttgc aatgc当地点 tgc当地点 gatgtatgc gggcttgc当地点 ttgggtgc当地点 tgaaaatgtatgc	8940
acctcgccaa acatcaacgg agtttgggtt atgatgtatgc gaaatgtatgc agtgc当地点	9000
ccactgaaac caatcgatgc当地点 gatgtatgc当地点 ccaacacttgc gcaacatcat ggc当地点	9060
tcagatgttgc cagaagcgatgc当地点 tatgtatgc当地点 cgcaacaaaa aggaaccata tatgc当地点	9120
tatgttgc当地点 ttc当地点 ggc当地点 gatgtatgc当地点 agtttgc当地点 gctatgtatgc当地点 tgacttttgc当地点	9180
gaagttatgc当地点 cacggacacc agtgagggttgc当地点 agagaggc当地点 acattcaatgc当地点 gaaggccgc当地点	9240
gctttaaaatgc cagctcaatgc当地点 tcgactttgc当地点 ggatttgc当地点 gtggc当地点 tacacaagag	9300
gaaaacacag agggc当地点 caccgaggat gtttgc当地点 gatgtatgc当地点 tctacttgc当地点	9360
gttgc当地点 tgc当地点 gatgtatgc当地点 ggacgatata tagatatttgc当地点 tggttgc当地点	9420
aagtattttgc当地点 gcttttgc当地点 tactacttttgc当地点 atgc当地点 attatgtatgc当地点 gaatattact	9480

ggcagatagg ggtggtatag cgattccgtc gttgttagtga ccttagctgt cgtttctgtat	9540
tattatgtt tgtataaaag tgccgggttg ttgttgttgg ggctgatcta tcgatttaggt	9600
gatgttgcga tttgtcgtag cagtactat gtctggattt agtacttgg gtgatgctgt	9660
gattctgtca tagcagtac tgtaaaacttc aatcaggaga c	9701

<210> 2
<211> 3061
<212> PRT
<213> Virus de la pomme de terre

<220>
<223> Polyprotéine contenant HC-PRO de PVYN-605

<400> 2

Met Ala Ile Tyr Thr Ser Thr Ile Gln Phe Gly Ser Ile Glu Cys Lys			
1	5	10	15

Leu Pro Tyr Ser Pro Ala Pro Phe Gly Leu Val Ala Gly Lys Arg Glu			
20	25	30	

Val Ser Thr Thr Asp Pro Phe Ala Ser Leu Glu Met Gln Leu Ser			
35	40	45	

Ala Arg Leu Arg Arg Gln Glu Phe Ala Thr Ile Arg Thr Ser Lys Asn			
50	55	60	

Gly Thr Cys Met Tyr Arg Tyr Lys Thr Asp Val Gln Ile Ala Arg Ile			
65	70	75	80

Gln Lys Lys Arg Glu Glu Arg Glu Arg Glu Glu Tyr Asn Phe Gln Met			
85	90	95	

Ala Ala Ser Ser Val Val Ser Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gly Glu Pro			
100	105	110	

Pro Ser Lys Leu Glu Ser Gln Val Arg Arg Gly Val Ile His Thr Thr			
115	120	125	

Pro Arg Met Arg Thr Ala Lys Thr Tyr His Thr Pro Lys Leu Thr Glu			
130	135	140	

Gly Gln Met Asn His Leu Ile Lys Gln Val Lys Gln Ile Met Ser Thr			
145	150	155	160

Lys Gly Gly Ser Val Gln Leu Ile Ser Lys Lys Ser Thr His Val His			
165	170	175	

Tyr Lys Glu Val Leu Gly Ser His Arg Ala Val Val Cys Thr Ala His			
180	185	190	

Met Arg Gly Leu Arg Lys Arg Val Asp Phe Arg Cys Asp Lys Trp Thr			
195	200	205	

Val Val Arg Leu Gln His Leu Ala Arg Thr Asp Lys Trp Thr Asn Gln			
210	215	220	

Val Arg Ala Thr Asp Leu Arg Lys Gly Asp Ser Gly Val Ile Leu Ser			
225	230	235	240

Asn Thr Asn Leu Lys Gly Asn Phe Gly Arg Ser Ser Glu Gly Leu Phe
 245 250 255
 Ile Val Arg Gly Ser His Glu Gly Lys Ile Tyr Asp Ala Arg Ser Lys
 260 265 270
 Val Thr Gln Gly Val Met Asp Ser Met Val Gln Phe Ser Ser Ala Glu
 275 280 285
 Ser Phe Trp Lys Gly Leu Asp Gly Asn Trp Ala Gln Met Arg Tyr Pro
 290 295 300
 Thr Asp His Thr Cys Val Ala Gly Leu Pro Val Glu Asp Cys Gly Arg
 305 310 315 320
 Val Ala Ala Ile Met Thr His Ser Ile Leu Pro Cys Tyr Lys Ile Thr
 325 330 335
 Cys Pro Thr Cys Ala Gln Gln Tyr Ala Asn Leu Pro Ala Ser Asp Leu
 340 345 350
 Leu Lys Ile Leu His Lys His Ala Ser Asp Gly Leu Asn Arg Leu Gly
 355 360 365
 Ala Asp Lys Asp Arg Phe Val His Val Lys Lys Phe Leu Thr Ile Leu
 370 375 380
 Glu His Leu Thr Glu Pro Val Asp Leu Ser Leu Glu Ile Phe Asn Glu
 385 390 395 400
 Val Phe Lys Ser Ile Gly Glu Lys Gln Gln Ser Pro Phe Lys Asn Leu
 405 410 415
 Asn Ile Leu Asn Asn Phe Phe Leu Lys Gly Lys Glu Asn Thr Ala Arg
 420 425 430
 Glu Trp Gln Val Ala Gln Leu Ser Leu Leu Glu Leu Ala Arg Phe Gln
 435 440 445
 Lys Asn Arg Thr Asp Asn Ile Lys Lys Gly Asp Ile Ser Phe Phe Arg
 450 455 460
 Asn Lys Leu Ser Ala Lys Ala Asn Trp Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Asp
 465 470 475 480
 Asn Gln Leu Asp Lys Asn Ala Ser Phe Leu Trp Gly Gln Arg Glu Tyr
 485 490 495
 His Ala Lys Arg Phe Phe Ser Asn Tyr Phe Glu Glu Ile Asp Pro Ala
 500 505 510
 Lys Gly Tyr Ser Ala Tyr Glu Asn Arg Leu His Pro Asn Gly Thr Arg
 515 520 525
 Lys Leu Ala Ile Gly Asn Leu Ile Val Pro Leu Asp Leu Ala Glu Phe
 530 535 540
 Arg Arg Lys Met Lys Gly Asp Tyr Lys Arg Gln Pro Gly Val Ser Lys
 545 550 555 560
 Lys Cys Thr Ser Ser Lys Asp Gly Asn Tyr Val Tyr Pro Cys Cys Cys

565	570	575
Thr Thr Leu Asp Asp Gly Ser Ala Val Glu Ser Thr Phe Tyr Pro Pro		
580	585	590
Thr Lys Lys His Leu Val Ile Gly Asn Ser Gly Asp Gln Lys Tyr Val		
595	600	605
Asp Leu Pro Lys Gly Asn Ser Glu Met Leu Tyr Ile Ala Arg Gln Gly		
610	615	620
Phe Cys Tyr Ile Asn Ile Phe Leu Ala Met Leu Ile Asn Ile Ser Glu		
625	630	635
Glu Asp Ala Lys Asp Phe Thr Lys Val Arg Asp Met Cys Val Pro		
645	650	655
Lys Leu Gly Thr Trp Pro Thr Met Met Asp Leu Ala Thr Thr Cys Ala		
660	665	670
Gln Met Lys Ile Phe Tyr Pro Asp Val His Asp Ala Glu Leu Pro Arg		
675	680	685
Ile Leu Val Asp His Glu Thr Gln Thr Cys His Val Val Asp Ser Phe		
690	695	700
Gly Ser Gln Thr Thr Gly Tyr His Ile Leu Lys Ala Ser Ser Val Ser		
705	710	715
720		
Gln Leu Ile Leu Phe Ala Asn Asp Glu Leu Glu Ser Asp Ile Lys His		
725	730	735
Tyr Arg Val Gly Gly Ile Pro Gly Ala Cys Pro Glu Leu Gly Ser Thr		
740	745	750
Ile Ser Pro Phe Arg Glu Gly Ile Ile Met Ser Glu Ser Ala Ala		
755	760	765
Leu Lys Leu Leu Lys Gly Ile Phe Arg Pro Lys Val Met Lys Gln		
770	775	780
Leu Leu Leu Asp Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Leu Ser Ile Leu Ser Pro		
785	790	795
800		
Gly Ile Leu Met Ala Met Tyr Asn Asn Gly Ile Phe Glu Leu Ala Val		
805	810	815
Lys Leu Trp Ile Asn Glu Lys Gln Ser Ile Ala Met Ile Ala Ser Leu		
820	825	830
Leu Ser Ala Leu Ala Leu Arg Val Ser Ala Ala Glu Thr Leu Val Ala		
835	840	845
Gln Arg Ile Ile Ile Asp Thr Ala Ala Thr Asp Leu Leu Asp Ala Thr		
850	855	860
Cys Asp Gly Phe Asn Leu Asn Leu Thr Tyr Pro Thr Ala Leu Met Val		
865	870	875
880		
Leu Gln Val Val Lys Asn Arg Asn Glu Cys Asp Asp Thr Leu Phe Lys		
885	890	895

Ala Gly Phe Ser His Tyr Asn Met Ser Val Val Gln Ile Met Glu Lys
 900 905 910

Asn Tyr Leu Ser Leu Leu Gly Asp Ala Trp Lys Asp Leu Thr Trp Arg
 915 920 925

Glu Lys Leu Ser Ala Thr Trp His Ser Tyr Lys Ala Lys Arg Ser Ile
 930 935 940

Thr Gln Phe Ile Lys Pro Ile Gly Lys Ala Asp Leu Lys Gly Leu Tyr
 945 950 955 960

Asn Ile Ser Pro Gln Ala Phe Leu Gly Gln Gly Val Gln Arg Val Lys
 965 970 975

Gly Thr Ala Ser Gly Leu Asn Glu Arg Leu Asn Asn Tyr Ile Asn Thr
 980 985 990

Lys Cys Val Asn Ile Ser Ser Phe Phe Ile Arg Arg Ile Phe Arg Arg
 995 1000 1005

Leu Pro Thr Phe Val Thr Phe Ile Asn Ser Leu Leu Val Ile Ser
 1010 1015 1020

Met Leu Thr Ser Val Val Ala Val Cys Gln Ala Ile Ile Leu Asp
 1025 1030 1035

Gln Arg Lys Tyr Arg Lys Glu Ile Glu Leu Met Gln Ile Glu Lys
 1040 1045 1050

Asn Glu Ile Val Cys Met Glu Leu Tyr Ala Ser Leu Gln Arg Lys
 1055 1060 1065

Leu Glu Arg Glu Phe Thr Trp Asp Glu Tyr Met Glu Tyr Leu Lys
 1070 1075 1080

Ser Val Asn Pro Gln Ile Val Gln Phe Ala Gln Ala Gln Met Glu
 1085 1090 1095

Glu Tyr Asn Val Arg His Gln Arg Ser Thr Pro Gly Val Lys Asn
 1100 1105 1110

Leu Glu Gln Val Val Ala Phe Ile Thr Leu Ile Ile Met Met Phe
 1115 1120 1125

Asp Ala Glu Arg Ser Asp Cys Val Phe Lys Thr Leu Asn Lys Phe
 1130 1135 1140

Lys Gly Ile Val Ser Ser Met Asp His Glu Val Lys His Gln Ser
 1145 1150 1155

Leu Asp Asp Val Ile Lys Asn Phe Asp Glu Arg Asn Glu Val Ile
 1160 1165 1170

Asp Phe Glu Leu Asn Glu Asp Thr Ile Lys Thr Ser Ser Val Leu
 1175 1180 1185

Asp Thr Lys Phe Ser Asp Trp Trp Asp Arg Gln Ile Gln Met Gly
 1190 1195 1200

His Thr Leu Pro His Tyr Arg Thr Glu Gly His Phe Met Glu Phe
 1205 1210 1215
 Thr Arg Ala Thr Ala Val Gln Val Ala Asn Asp Ile Ala His Ser
 1220 1225 1230
 Glu His Leu Asp Phe Leu Val Arg Gly Ala Val Gly Ser Gly Lys
 1235 1240 1245
 Ser Thr Gly Leu Pro Val His Leu Ser Ala Ala Gly Ser Val Leu
 1250 1255 1260
 Leu Ile Glu Pro Thr Arg Pro Leu Ala Glu Asn Val Phe Lys Gln
 1265 1270 1275
 Leu Ser Ser Glu Pro Phe Phe Lys Lys Pro Thr Leu Arg Met Arg
 1280 1285 1290
 Gly Asn Ser Val Phe Gly Ser Ser Pro Ile Ser Ile Met Thr Ser
 1295 1300 1305
 Gly Phe Ala Leu His Tyr Tyr Ala Asn Asn Arg Ser Gln Leu Thr
 1310 1315 1320
 Gln Phe Asn Phe Ile Ile Phe Asp Glu Cys His Val Leu Asp Pro
 1325 1330 1335
 Ser Ala Met Ala Phe Arg Ser Leu Leu Ser Val Tyr His Gln Thr
 1340 1345 1350
 Cys Lys Val Leu Lys Val Ser Ala Thr Pro Val Gly Arg Glu Val
 1355 1360 1365
 Glu Phe Thr Thr Gln Gln Pro Val Lys Leu Val Val Glu Asp Thr
 1370 1375 1380
 Leu Ser Phe Gln Ser Phe Val Asp Ala Gln Gly Ser Lys Thr Asn
 1385 1390 1395
 Ala Asp Val Val Gln His Gly Ser Asn Ile Leu Val Tyr Val Ser
 1400 1405 1410
 Ser Tyr Asn Glu Val Asp Thr Leu Ala Lys Leu Leu Thr Asp Arg
 1415 1420 1425
 Asn Met Val Val Ser Lys Val Asp Gly Arg Thr Met Lys His Gly
 1430 1435 1440
 Cys Leu Glu Ile Val Thr Lys Gly Thr Ser Ala Lys Pro His Phe
 1445 1450 1455
 Val Val Ala Thr Asn Ile Ile Glu Asn Gly Val Thr Leu Asp Ile
 1460 1465 1470
 Asp Val Val Val Asp Phe Gly Leu Lys Val Ser Pro Phe Leu Asp
 1475 1480 1485
 Ile Asp Asn Arg Ser Ile Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Val Ser Tyr
 1490 1495 1500
 Gly Glu Arg Ile Gln Arg Leu Gly Arg Val Gly Arg Phe Lys Lys

1505	1510	1515
Gly Val Ala Leu Arg Ile Gly His Thr Glu Lys Gly Ile Ile Glu		
1520	1525	1530
Ile Pro Ser Met Ile Ala Ser Glu Ala Ala Leu Ala Cys Phe Ala		
1535	1540	1545
Tyr Asn Leu Pro Val Met Thr Gly Gly Val Ser Thr Ser Leu Ile		
1550	1555	1560
Gly Asn Cys Thr Val Arg Gln Val Lys Thr Met Gln Gln Phe Glu		
1565	1570	1575
Leu Ser Pro Phe Phe Ile Gln Asn Phe Val Ala His Asp Gly Ser		
1580	1585	1590
Met His Pro Val Ile His Asp Ile Leu Lys Lys Tyr Lys Leu Arg		
1595	1600	1605
Asp Cys Met Thr Pro Leu Cys Asp Gln Ser Ile Pro Tyr Arg Ala		
1610	1615	1620
Ser Ser Thr Trp Leu Ser Val Ser Glu Tyr Glu Arg Leu Gly Val		
1625	1630	1635
Val Leu Asp Ile Pro Lys Gln Ile Lys Ile Ala Phe His Ile Lys		
1640	1645	1650
Asp Ile Pro Pro Lys Leu His Glu Met Leu Trp Glu Thr Val Ile		
1655	1660	1665
Lys Tyr Lys Asp Val Cys Leu Phe Pro Ser Ile Arg Ala Ser Ser		
1670	1675	1680
Ile Ser Lys Ile Ala Tyr Thr Leu Arg Thr Asp Leu Phe Ala Ile		
1685	1690	1695
Pro Arg Thr Leu Ile Leu Val Glu Arg Leu Ile Glu Glu Glu Arg		
1700	1705	1710
Val Lys Gln Ser Gln Phe Arg Ser Leu Ile Asp Glu Gly Cys Ser		
1715	1720	1725
Ser Met Phe Ser Ile Val Asn Leu Thr Asn Thr Leu Arg Ala Arg		
1730	1735	1740
Tyr Ala Lys Asp Tyr Thr Ala Glu Asn Ile Gln Lys Leu Glu Lys		
1745	1750	1755
Val Arg Ser Gln Leu Lys Glu Phe Ser Asn Leu Asn Gly Ser Ala		
1760	1765	1770
Cys Glu Glu Asn Leu Met Lys Arg Tyr Glu Ser Leu Gln Phe Val		
1775	1780	1785
His His Gln Ala Thr Thr Ser Leu Ala Lys Asp Leu Lys Leu Lys		
1790	1795	1800
Gly Val Trp Lys Lys Ser Leu Val Val Gln Asp Leu Leu Ile Ala		
1805	1810	1815

Gly Ala Val Ala Ile Gly Gly Ile Gly Leu Ile Tyr Ser Trp Phe
 1820 1825 1830
 Thr Gln Ser Val Glu Thr Val Ser His Gln Gly Lys Asn Lys Ser
 1835 1840 1845
 Lys Arg Ile Gln Ala Leu Lys Phe Arg His Ala Arg Asp Lys Arg
 1850 1855 1860
 Ala Gly Phe Glu Ile Asp Asn Asn Asp Asp Thr Ile Glu Glu Phe
 1865 1870 1875
 Phe Gly Ser Ala Tyr Arg Lys Lys Gly Lys Gly Lys Gly Thr Thr
 1880 1885 1890
 Val Gly Met Gly Lys Ser Ser Arg Arg Phe Val Asn Met Tyr Gly
 1895 1900 1905
 Phe Asp Pro Thr Glu Tyr Ser Phe Ile Gln Phe Val Asp Pro Leu
 1910 1915 1920
 Thr Gly Ala Gln Ile Glu Glu Asn Val Tyr Ala Asp Ile Arg Asp
 1925 1930 1935
 Ile Gln Glu Arg Phe Ser Asp Val Arg Lys Lys Met Val Glu Asp
 1940 1945 1950
 Asp Glu Ile Glu Leu Gln Ala Leu Gly Ser Asn Thr Thr Ile His
 1955 1960 1965
 Ala Tyr Phe Arg Lys Asp Trp Ser Asp Lys Ala Leu Lys Ile Asp
 1970 1975 1980
 Leu Met Pro His Asn Pro Leu Lys Ile Cys Asp Lys Ser Asn Gly
 1985 1990 1995
 Ile Ala Lys Phe Pro Glu Arg Glu Leu Glu Leu Arg Gln Thr Gly
 2000 2005 2010
 Pro Ala Ile Glu Val Asp Val Lys Asp Ile Pro Lys Gln Glu Val
 2015 2020 2025
 Glu His Glu Ala Lys Ser Leu Met Arg Gly Leu Arg Asp Phe Asn
 2030 2035 2040
 Pro Ile Ala Gln Thr Val Cys Arg Val Lys Val Ser Val Glu Tyr
 2045 2050 2055
 Gly Thr Ser Glu Met Tyr Gly Phe Gly Phe Gly Ala Tyr Ile Ile
 2060 2065 2070
 Val Asn His His Leu Phe Lys Ser Phe Asn Gly Ser Met Glu Val
 2075 2080 2085
 Arg Ser Met His Gly Thr Phe Arg Val Lys Asn Leu His Ser Leu
 2090 2095 2100
 Ser Val Leu Pro Ile Lys Gly Arg Asp Ile Ile Ile Lys Met
 2105 2110 2115

Pro Lys Asp Phe Pro Val Phe Pro Gln Lys Leu His Phe Arg Ala
 2120 2125 2130
 Pro Val Gln Asn Glu Arg Ile Cys Leu Val Gly Thr Asn Phe Gln
 2135 2140 2145
 Glu Lys His Ala Ser Ser Ile Ile Thr Glu Thr Ser Thr Thr Tyr
 2150 2155 2160
 Asn Val Pro Gly Ser Thr Phe Trp Lys His Trp Ile Glu Thr Asn
 2165 2170 2175
 Asp Gly His Cys Gly Leu Pro Val Val Ser Thr Ala Asp Gly Cys
 2180 2185 2190
 Leu Val Gly Ile His Ser Leu Ala Asn Asn Val Gln Thr Thr Asn
 2195 2200 2205
 Tyr Tyr Ser Ala Phe Asp Glu Asp Phe Glu Ser Lys Tyr Leu Arg
 2210 2215 2220
 Thr Asn Glu His Asn Glu Trp Thr Lys Ser Trp Val Tyr Asn Pro
 2225 2230 2235
 Asp Thr Val Leu Trp Gly Pro Leu Lys Leu Lys Glu Ser Thr Pro
 2240 2245 2250
 Lys Gly Leu Phe Lys Thr Thr Lys Leu Val Gln Asp Leu Ile Asp
 2255 2260 2265
 His Asp Val Val Val Glu Gln Ala Lys His Ser Ala Trp Met Tyr
 2270 2275 2280
 Glu Ala Leu Thr Gly Asn Leu Gln Ala Val Ala Thr Met Lys Ser
 2285 2290 2295
 Gln Leu Val Thr Lys His Val Val Lys Gly Glu Cys Arg His Phe
 2300 2305 2310
 Lys Glu Phe Leu Thr Val Asp Ser Glu Ala Glu Ala Phe Phe Arg
 2315 2320 2325
 Pro Leu Met Asp Ala Tyr Gly Lys Ser Leu Leu Asn Arg Glu Ala
 2330 2335 2340
 Tyr Ile Lys Asp Ile Met Lys Tyr Ser Lys Pro Ile Asp Val Gly
 2345 2350 2355
 Ile Val Asp Cys Asp Ala Phe Glu Glu Ala Ile Asn Arg Val Ile
 2360 2365 2370
 Ile Tyr Leu Gln Val His Gly Phe Gln Lys Cys Asn Tyr Ile Thr
 2375 2380 2385
 Asp Glu Gln Glu Ile Phe Lys Ala Leu Asn Met Lys Ala Ala Val
 2390 2395 2400
 Gly Ala Met Tyr Gly Gly Lys Lys Lys Asp Tyr Phe Glu His Phe
 2405 2410 2415
 Thr Glu Ala Asp Lys Glu Glu Ile Val Met Gln Ser Cys Phe Arg

2420	2425	2430												
Leu	Tyr	Lys	Gly	Ser	Leu	Gly	Ile	Trp	Asn	Gly	Ser	Leu	Lys	Ala
2435					2440						2445			
Glu	Leu	Arg	Cys	Lys	Glu	Lys	Ile	Leu	Ala	Asn	Lys	Thr	Arg	Thr
2450					2455						2460			
Phe	Thr	Ala	Ala	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Val	Cys
2465					2470						2475			
Val	Asp	Asp	Phe	Asn	Asn	Gln	Phe	Tyr	Ser	Lys	Asn	Ile	Glu	Cys
2480					2485						2490			
Cys	Trp	Thr	Val	Gly	Met	Thr	Lys	Phe	Tyr	Gly	Gly	Trp	Asp	Lys
2495					2500						2505			
Leu	Leu	Arg	Arg	Leu	Pro	Glu	Asn	Trp	Val	Tyr	Cys	Asp	Ala	Asp
2510					2515						2520			
Gly	Ser	Gln	Phe	Asp	Ser	Ser	Leu	Thr	Pro	Tyr	Leu	Ile	Asn	Ala
2525					2530						2535			
Val	Leu	Ile	Ile	Arg	Ser	Thr	Tyr	Met	Glu	Asp	Trp	Asp	Leu	Gly
2540					2545						2550			
Leu	Gln	Met	Leu	Arg	Asn	Leu	Tyr	Thr	Glu	Ile	Ile	Tyr	Thr	Pro
2555					2560						2565			
Ile	Ser	Thr	Pro	Asp	Gly	Thr	Ile	Val	Lys	Lys	Phe	Arg	Gly	Asn
2570					2575						2580			
Asn	Ser	Gly	Gln	Pro	Ser	Thr	Val	Val	Asp	Asn	Ser	Leu	Met	Val
2585					2590						2595			
Val	Leu	Ala	Met	His	Tyr	Ala	Leu	Ile	Lys	Glu	Cys	Val	Glu	Phe
2600					2605						2610			
Glu	Glu	Ile	Asp	Ser	Thr	Cys	Val	Phe	Phe	Val	Asn	Gly	Asp	Asp
2615					2620						2625			
Leu	Leu	Ile	Ala	Val	Asn	Pro	Glu	Lys	Glu	Ser	Ile	Leu	Asp	Arg
2630					2635						2640			
Met	Ser	Gln	His	Phe	Ser	Asp	Leu	Gly	Leu	Asn	Tyr	Asp	Phe	Ser
2645					2650						2655			
Ser	Arg	Thr	Arg	Arg	Lys	Glu	Glu	Leu	Trp	Phe	Met	Ser	His	Arg
2660					2665						2670			
Gly	Leu	Leu	Ile	Glu	Asp	Met	Tyr	Val	Pro	Lys	Leu	Glu	Glu	Glu
2675					2680						2685			
Arg	Ile	Val	Ser	Ile	Leu	Gln	Trp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Pro	Glu
2690					2695						2700			
His	Arg	Leu	Glu	Ala	Ile	Cys	Ala	Ala	Met	Ile	Glu	Ser	Trp	Gly
2705					2710						2715			
Tyr	Phe	Glu	Leu	Thr	His	Gln	Ile	Arg	Arg	Phe	Tyr	Ser	Trp	Leu
2720					2725						2730			

Leu Gln Gln Gln Pro Phe Ser Thr Ile Ala Gln Glu Gly Lys Ala
 2735 2740 2745
 Pro Tyr Ile Ala Ser Met Ala Leu Lys Lys Leu Tyr Met Asn Arg
 2750 2755 2760
 Thr Val Asp Glu Glu Glu Leu Lys Ala Phe Thr Glu Met Met Val
 2765 2770 2775
 Ala Leu Asp Asp Glu Phe Glu Cys Asp Thr Tyr Glu Val His His
 2780 2785 2790
 Gln Gly Asn Asp Thr Ile Asp Ala Gly Gly Ser Thr Lys Lys Asp
 2795 2800 2805
 Ala Lys Gln Glu Gln Gly Ser Ile Gln Pro Asn Leu Asn Lys Glu
 2810 2815 2820
 Lys Glu Lys Asp Val Asn Val Gly Thr Ser Gly Thr His Thr Val
 2825 2830 2835
 Pro Arg Ile Lys Ala Ile Thr Ser Lys Met Lys Met Pro Lys Ser
 2840 2845 2850
 Lys Gly Ala Thr Val Leu Asn Leu Glu His Leu Leu Glu Tyr Ala
 2855 2860 2865
 Pro Gln Gln Ile Asp Ile Ser Asn Thr Arg Ala Thr Gln Ser Gln
 2870 2875 2880
 Phe Asp Thr Trp Tyr Glu Ala Val Gln Leu Ala Tyr Asp Ile Gly
 2885 2890 2895
 Glu Thr Glu Met Pro Thr Val Met Asn Gly Leu Met Val Trp Cys
 2900 2905 2910
 Ile Glu Asn Gly Thr Ser Pro Asn Ile Asn Gly Val Trp Val Met
 2915 2920 2925
 Met Asp Gly Asn Glu Gln Val Glu Tyr Pro Leu Lys Pro Ile Val
 2930 2935 2940
 Glu Asn Ala Lys Pro Thr Leu Arg Gln Ile Met Ala His Phe Ser
 2945 2950 2955
 Asp Val Ala Glu Ala Tyr Ile Glu Met Arg Asn Lys Lys Glu Pro
 2960 2965 2970
 Tyr Met Pro Arg Tyr Gly Leu Val Arg Asn Leu Arg Asp Gly Ser
 2975 2980 2985
 Leu Ala Arg Tyr Ala Phe Asp Phe Tyr Glu Val Thr Ser Arg Thr
 2990 2995 3000
 Pro Val Arg Ala Arg Glu Ala His Ile Gln Met Lys Ala Ala Ala
 3005 3010 3015
 Leu Lys Ser Ala Gln Ser Arg Leu Phe Gly Leu Asp Gly Gly Ile
 3020 3025 3030

Ser Thr Gln Glu Glu Asn Thr Glu Arg His Thr Thr Glu Asp Val
3035 3040 3045

Ser	Pro	Ser	Met	His	Thr	Leu	Leu	Gly	Val	Lys	Asn	Met
3050					3055						3060	

```
<210> 3  
<211> 9698  
<212> ADN  
<213> Virus de la pomme de terre
```

<220>
<223> Séquence PVYO-139

<400> 3
aattaaaaca actcaataca acataagaaa aacagcgaa aaacactcat aaacgcttat 60
tctcactcaa gcattgtct aagtttcaat ttaaatcatt tccttgcaat tctcttaaac 120
aatattggaa accatttcaa ctcaacaagc aatttcatca cttccaacca attaaaatc 180
ctcgatggca acttacatgt caacgatctg tttcggttcg tttgaatgca agctaccata 240
ctcacccgccc tcttcgggc ttatgtgaa ggaacgagaa gtgctggcct ccgttaatcc 300
tttgcagat ctgaaacac aacttagtgc acgattgctc aagcaagaat atgctactgt 360
tcgtgtgtc aagaacggta cttttacgta tcgatatacaag actgatgccc agataaagcg 420
cattcagaag aaactggaga ggaaggatag ggaagaatat cacttccaaa tggccgctcc 480
tagtattgtg tcaaaaatta ctatagctgg tggagatcct ccatcaaagt ctgagccaca 540
agcaccaaga gggatcattc atacaactcc aagggtgcgt aaagtcaaga cacgccccat 600
aataaagttg acagaaggcc agatgaatca tttcattaag caggtaaagc agattatgtc 660
ggagaagaga gggctgtcc acttaattaa taagaagacc actcatgtc aatataagga 720
gatacttggt gcatactccg ccacggtgc aactgcacat atgatgggt tgccgacggag 780
agtggacttc cgatgtgata tggacatgt tggacttttgc caacgtctcg ctcggacgga 840
caaatttgtcc aatcaagtcc gcactatcaa catacgaagg ggtgatagt gagtcatctt 900
gaacacaaaa agcctcaaaag gccacttgg tagaagttca ggagacttgt tcatagtgcg 960
cgatcacat gaaggaaat tggatgtgc acgttctaga ttactcaga gtgttttgg 1020
ctcaatgatc cagtttgcg atgctgatataa ttttggaa ggtctggacg gcaattggc 1080
acgaatgaga tatttttgcg atcacatgc tggatgtgtt ttacctgtcg aagattgtgg 1140
tagggttgct gcattgtgg cacacagttat cctcccatgc tataagataa cctgccccac 1200
ctgtgctcaa cagttatgcg gtttgcggtagt tagcgtatctg tttaagctgt tgccatcaa 1260
tgcaagagat ggttgaacc gattggggacg agataaagac cggttatac atgtaataa 1320
gttcttgata gcgttagagc atctaactga accgggtggat ttgaatctcg agctttcaa 1380
tgagatattt aaatccatag gggagaagca gcaagcaccc ttcaagaatt taaatgtctt 1440
gaataatttc ttcttggaaag gaaaagaaaa tacagctcat gaatggcagg tggctcaatt 1500
gagtttgcg gaatttagcaa ggttccagaa gaatagaact gataacatca agaaagggt 1560
tatatccttc ttcttggaaata aattatttgc caaggcaat tggatctgt atttgcgtg 1620
cgacaaccaa ttggacaaaa atgcaatattt cctgtgggaa caaaggagat atcatgctaa 1680
gcggtttttc tcaaaacttct ttgaggaaat tgatccagca aagggtatac cagcatatga 1740
aatccgcaag catccaatgt gaacaaggaa gctctcaatt ggtacttgc ttgtccact 1800
tgatttagct gagtttaggc agaagatgaa aggtgactat aggaaacaac caggggtcag 1860
cagaaagtgc acgagttcga aagatggta ttatgtgtat ccctgttgc ttcaacaact 1920
tgatgtgtt tcagccattt aatcaacatt ctatccacca actaaaaagc accttgcata 1980
aggcaatagt ggtgaccaaa agtttgcgtt tttacaaaaa ggggatttcg agatgttata 2040
cattgccaag cagggttattt gttatattaa cgttgcattt gcaatgctaa ttaacattgg 2100
cgaggaggat gcaaaaggatt tcacaaagaa agtccgcac atgtgtgtc cgaagcttgg 2160
aacctggcca actatgtatgg atttggcgcac cacttgcgtt caaatgagaa tattctatcc 2220
tgacgtgcattt gatgcagagc tgccttagttt attgggtgc acatgcactc aaacgtgtca 2280
tgtgggtgac tcattttggct cgcagacaaac tggatatcat attctaaaag catccagcgt 2340
gtctcaactt atcttgcattt caaatgtatgc attagaatct gatataaaaac attatagagt 2400
tggtggcggtt cctaatgtcat gcccgttgcact tgggtccacg atatcaccctt tttagagaagg 2460
aggagttata atgtctgttgc cggcagcgtt gaaactgtttt ttgaaggaa ttttttagacc 2520
taaggtgtatgc agacagtgc tggatgtgc gccttacgtt tgattctat caatattatc 2580
ccctggccata ctgatggctt tggatataaa tggatgtttt gaaacttgcgg taagattgtg 2640
qattaatqaa aaacaatcca tagctatgtt agcatcgctt ctatcagctt tagccctacg 2700

agtgtcagcg gcagaaaacac tcgtcgacata gagaattata attgtatgcg cagctacaga 2760
cctcccttgat gctacgtgt atggattcaa cctacatcta acgtacccca ctgcattaat 2820
ggtgttgc当地 gttttaaga atagaaatga atgtatgtat accctattca aggccc当地 2880
tccaagttac aacacgagtg ttgtgc当地 tatggaaaaa aattatctaa gtctt当地 2940
cgatgctgg aaagatttaa cttggc当地 aaaattatcc gcaacatgtt actcatacag 3000
agcaaaacgc tctatcactc ggtacataaa acccacagga agggcagatt tgaaagggtt 3060
ataacaacata tcaccacaag cattcttggg cc当地 agcgcc caggtggc当地 aaggcactgc 3120
ctcaggattg agcgagcgtt ttaataatta tttcaataact aagtgtgtt atatttc当地 3180
ttttttcatt cgtagaatct ttaggc当地 gccaacttcc gtcactt当地 ttaactc当地 3240
attagttatt agtatgttaa ctagc当地 ggc当地 gtc当地 caggcaataa ttttagatca 3300
gaggaagttt aggagagaaa tcgagttat gcaagatagag aagaatgaga ttgtctgcat 3360
ggagctataa gcaagtttac agcgcaact tgaacgc当地 ttc当地 catgaaaatggg 3420
tgagtattt aagtcaigtga accctc当地 agttc当地 gctcaagc当地 agatgaa 3480
atatgtgtg cgacaccaggc gttccacacc aggtttaaa aatttggaaac aagaggtagc 3540
attttatggct ttagtcatca tgggttgc当地 tgctgaaagg agtgattgc当地 tttcaaaac 3600
tctcaataaaa tttaagggtg tc当地 tccctc gctggaccat gaagttcgac atc当地 ctcc 3660
agacgatgtg atcaagaatt ttgatgagag gaatgagatt attgattt当地 agttgatgtga 3720
ggacacaaatt cgaacatcat ctagc当地 tacaatgtt agtgattt当地 gggaccgaca 3780
aatccagatg ggacatacacc ttccacatta cagaaccggg gggcacttca tggattt当地 3840
aagagcaact gctgttcaag tggctatga catttcccat agtgaacacc tagactt当地 3900
agtaaggggg gctgttgggt ctggaaagtc aacttgggtt cctgttcatc ttagtgttagc 3960
cgatctgtg ctttaattt aaccacgc当地 accactagcg gagaacggtt tcaaacagct 4020
atcttagtga ccatttctca agaagccaaactcactgc当地 tgc当地 gatattt当地 4080
ctcttctcca atctccgtca tgactagc当地 attc当地 cgtca actactt当地 ccaataaccg 4140
ctcccaatta gctcagttca actttgtaat atttgc当地 tgccatgtt当地 tggatc当地 4200
cgcaatggcg ttccgc当地 tgc当地 gagttt当地 ttatcatca gcatgcaaaatgattt 4260
gtcagctact ccagtgggaa gagaggttga attcacaaca cagcagccag tcaagttgat 4320
agtggaggac acactgtt当地 tccaaatcatt tggatgc当地 caagggtt当地 aaactaatgc 4380
ttagtgggat cagtttgggt caaaacttact tggatgtt当地 tc当地 gagctaca atgaagttga 4440
taccttggct aagctc当地 aagacaagaa tatgatggc当地 acaaagggtt atggc当地 4500
aatgaagcac ggtgc当地 tagtgc当地 aaatttgc当地 aaaaggaaacc agtgc当地 gagac cacattt当地 4560
ttagtcaacc aacataattt ggggtt当地 gtc当地 caccat tcttggacat tgacaatagg atagacg当地 ttgtggattt 4620
gagtgtagc tatggatgaaa gaattcaag gttgggtc当地 gttggacgct tcaagaaagg 4680
agtagcattt cgc当地 atttggac acactgagaa gggattt当地 gaaattccaa gcatggt当地 4740
tactgaggcg gctcttgc当地 gcttgc当地 taacttgc当地 gtatgacag gccc当地 tctc 4800
aacttagtctg atttgc当地 atttgc当地 ccaggtt当地 acaatgc当地 aatttgaattt 4860
gagtc当地 ctttccaga atttgc当地 tcatgatgga tcaatgc当地 ctgtc当地 ataca 4920
tgacattt当地 aaaaaggata aacttgc当地 ttgtatgaca ccttgc当地 tgc当地 atc当地 4980
accatacagg gcatcgtc当地 ct当地 gggtt当地 tgc当地 gtttagt当地 tatgagc当地 ac 5040
cttagaaatt ccaaaggaaat tcaaaatgc当地 atttccat当地 aaagagatcc ctc当地 5100
ccacggaaatg ctttggaaatc tc当地 gggtt当地 tgc当地 atacaaggac gtttgc当地 ttcaagcat 5160
tcgagcatcg tccatc当地 aatgc当地 cacattgc当地 acagacctt当地 tc当地 5220
aagaactcta atatttgggg agagattact tgaagaggag cgagtt当地 agagcaattt 5280
cagaagtc当地 atcgatgaaat ggtgc当地 taatgtt当地 attgttaact tgaccaacac 5340
tctc当地 agatatgc当地 aagattt当地 cgc当地 agagaac atacaaaac ttgagaaagg 5400
gagaagtc当地 taaaaggata tctcaatgc当地 ggtgggtt当地 gcatgtgagg agaattt当地 5460
aaagaggat gaggctt当地 agttc当地 tcaatgc当地 gatgggtt当地 gcatgtc当地 ac 5520
totcaagtt aaggggacct ggaaggaaatc atttagtggct taggactcat atatgtt当地 5580
cgctgtgca atttgggtt当地 ataaatccaa aagaatccaa ggc当地 atc当地 5640
tggatccc当地 caaggggaaaatc ttgaaatgc当地 caacaatgtt gacacaatag aggaattt当地 5700
tc当地 gacatcgatc当地 tataaggaaatc agggaaaagg taaaggtt当地 acagttgta tgggcaagtc 5760
aaggcaggaaatc ttcatc当地 aacttgc当地 tggatgggtt当地 tgatccaaaca ggtactcat tcatcc 5820
cgatc当地 tggatgggtt当地 tgatccaaaca ggtactcat tcatccatgc当地 gacacaatag 5880
tcaagataga tttagtgc当地 tgcaagaaatc aatgggtt当地 aatgtatgc当地 ttgaaatgc当地 5940
agccttgggt agtaacacaaatc cc当地 atactc当地 cgc当地 agagaatgc当地 ttagagacat 6000
tttgaagatt gacttaatgc cacacaaccc actcaaaggatc tgc当地 atc当地 6060
tgcaaaaatc cctgagagagag agctc当地 aagc当地 gagactt当地 tgc当地 gacacaatag 6120
tgc当地 gagaggac ataccagc当地 agggaggatc gcatgacatc当地 aatgc当地 6180
gagagactt当地 aatccaaatc cccaaacaggatc ttgttaggctg aaagatctg当地 ttgaaatatgg 6240
tcaagataga tttagtgc当地 tgcaagaaatc aatgggtt当地 aatgtatgc当地 ttgaaatgc当地 6300

gacatcagag atgtacggtt ttgatttgg agcatacata atagcgaacc accatttgg	6420
taggagttac aatggttcca tggaggtgca atccatgcac ggtacattca gggtaagaa	6480
tctacacagt ttgagcggtc tgccaattaa aggtaggac atcatcctca tcaaatgcc	6540
gaaagattc cctgtcttc cacagaaatt gcatttcga gctctatac agaatgaaag	6600
agtttgtta gttgggacca acttcagga gaagtatgca tcgtaatca tcacagaaaac	6660
aagcactact tacaatatac cagcgacac attctggaa cattggattt aaacagataa	6720
tggacattgt ggactaccag tgtaaggac tgccgatgga tgtcttagtgc gaattcacag	6780
tttggcaaac aatgcacaca ccacgaacta ctactcagcc ttcatgagg attttgaaag	6840
caagtaccc cggccaatg agcacaatga atgggtcaag tcttggaaat ataatccaga	6900
cacagtgtt tggggccgt tgaaacttaa agacagca cccaaagggt tattnaaac	6960
aacaagctt gtgcaagatc taatcgagca tgatgtatg gtggagcaag ctaagcactc	7020
tgcgtggatg tttgaaggct tgacaggaaa ttgcagact gtgcacaa tgaagagcca	7080
attagtaacc aagcatgttag ttaaaggaga gtgtcgacac ttcaaggagt tcctgactgt	7140
ggatgcagaa gcagaggcat tcttcaggcc ttgtatggat gctgtatggaa aaagcttgct	7200
gaacagagat gcgtacatca aggacataat gaagtattca aaacctatac atgttggat	7260
cgtggattgt gatgcattcg aggaagccat caatagggtt atcatctacc tgcaagtgc	7320
cggcttcaag aagtgtcat atgtcaactg cgagcaagaa atttcaag cgcttaacat	7380
gaaagctgca gtcggagcca tggatgggg caaaaagaaa gactacttg agcatttcac	7440
tgatgcagac aaggaagaaa tagtcatgca aagctgtctg cgattgtata aaggcttgct	7500
cgcatttgg aatggatcat tgaaggcaga gctccgggt aagaaaaa tacttgcaaa	7560
taagacgagg acattcaactg ctgcacccct agacacttt ctgggtggta aagtgtgt	7620
tgacgacttc aataatcaat ttattcaaa gaatattgag tgctgttggc cagttggat	7680
gactaagttt tatgttgggtt gggataaaact gcttcggcg ttacctgaga attgggtata	7740
ctgtgtatg gatggctcac agtttgcata ttcaactaact ccatacttat tcaatgtgt	7800
tctcaccatc agaagcacat acatggaa ctggatgtt gggctgcaaa tgctgcgtaa	7860
tttataact gagattgttt acacacccat ttcaactcca gatggacaa ttgttaagaa	7920
gttcagagga aataacagtg gtcagccccc tactgttgc gacaactctc ttatggctgt	7980
ccttgcctt cactatgca tcatcagaga aggcatttgg tttgaagaaa ctgcacagcac	8040
gtgcgtgttc ttgtcaatg gtgtatgatt gctgtatgt gtgaatccgg ataaagagga	8100
cattctgac agattgtcac aacacttctc agatcttgc ttaaattatg atttctgc	8160
aagaacaaga aataaggaag agtttgcattt tatgtctcat agggcctac tgattgaggg	8220
catgtacgtg ccgaaacttg aagaagaaag gattgtgtcc atttctcaat gggacagagc	8280
agacttggct gaacacaggc ttgaggcgat ttgcgcacgt atgatagagt cctgggtta	8340
ttctgaacta acacacccaa tcaggagatt ctactcatgg ttattgcaac agcaacctt	8400
tgcacaata ggcaggagg ggaaggctcc ttatatacgca agcatggcat taaggaaact	8460
gtatatggat agggctgtgg atgaggaaga gcttagagcc ttcaactgaaa tgatggctgc	8520
attagacgt gagtttgcattt tgactctta tgaagtatac catcaagcaa atgacacaat	8580
tgatgcagga ggaagcaaca agaaagatac aaaaccagag caaaggcagca tccagtcaaa	8640
cccgaaacaaa gggaaagata aagatgtaa tgccggcaca tctgggacac acactgtacc	8700
gagaatcaag gctatcacgt cccaaatgag aatgccccaa agcaagggag cagctgtgt	8760
gaatttagaa cacttgcctt agtatgcctc acaacaaatt gatatttcaa atactcgggc	8820
aactcaatca cagtttgata cgtggatgca agcagtgcgg atggcatacg acataggaga	8880
aactgagatg ccaactgtga tgaatggct tatgtttgg tgcattgaaa atggAACCTC	8940
ccaaatgttc aacggagttt gggttatgat ggttggaaat gaacaagttt agtaccgg	9000
gaaaccaatc gttgagaatg caaaaccaac ctttaggcaatcatggcatttctcaga	9060
tgttgcagaa gctgtatataa aatgtgcac caaaaaggaa ccatatatgc cacgatatgg	9120
tttaatttgc aatctgcggg atatgggtt agcgcgttat gctttgcattttatgaggat	9180
cacatcacga acaccatgtga ggcttagggaa agcgcacattt caaatgaagg ccgcac	9240
gaaatcagcc caacccgcac ttccgggtt ggacgggttgc atcagttacac aagaggagaa	9300
cacagagagg cacaccaccc agatgtctc tccaagtttgc catactctac ttggatgca	9360
gaacatgtga tttttttttt cttccggacga tatataata ttatcatatg cagtaagtt	9420
tttggctttt cctgtactac ttatcatatc attaataatc agtttgcata ttactatag	9480
atagaggtgg cagggtgatt tcgtcattgt ggtgactcta tctgttaatt tcgcattt	9540
aagtcttgc taaaagtgc ggttgcgtt ttttttttgc gattcatgca tttaggtatg	9600
ttgcgattct gtcgtacgc tgactatgtc tggatctatc tgcttgggt atgttgcgt	9660
tttgtcataa cagtgcattt aaacttcaat caggagac	9698

<210> 4
<211> 3081
<212> PRT

<213> Virus de la pomme de terre

<220>

<223> Polyprotéine contenant HC-PRO de PVYO-139

<400> 4

Met Glu Thr Ile Ser Thr Gln Gln Ala Ile Ser Ser Leu Pro Thr Asn
1 5 10 15

Leu Lys Ser Ser Met Ala Thr Tyr Met Ser Thr Ile Cys Phe Gly Ser
20 25 30

Phe Glu Cys Lys Leu Pro Tyr Ser Pro Ala Ser Cys Gly Leu Ile Val
35 40 45

Lys Glu Arg Glu Val Leu Ala Ser Val Asn Pro Phe Ala Asp Leu Glu
50 55 60

Thr Gln Leu Ser Ala Arg Leu Leu Lys Gln Glu Tyr Ala Thr Val Arg
65 70 75 80

Val Leu Lys Asn Gly Thr Phe Thr Tyr Arg Tyr Lys Thr Asp Ala Gln
85 90 95

Ile Lys Arg Ile Gln Lys Leu Glu Arg Lys Asp Arg Glu Glu Tyr
100 105 110

His Phe Gln Met Ala Ala Pro Ser Ile Val Ser Lys Ile Thr Ile Ala
115 120 125

Gly Gly Asp Pro Pro Ser Lys Ser Glu Pro Gln Ala Pro Arg Gly Ile
130 135 140

Ile His Thr Thr Pro Arg Val Arg Lys Val Lys Thr Arg Pro Ile Ile
145 150 155 160

Lys Leu Thr Glu Gly Gln Met Asn His Phe Ile Lys Gln Val Lys Gln
165 170 175

Ile Met Ser Glu Lys Arg Gly Ser Val His Leu Ile Asn Lys Lys Thr
180 185 190

Thr His Val Gln Tyr Lys Glu Ile Leu Gly Ala Tyr Ser Ala Thr Val
195 200 205

Arg Thr Ala His Met Met Gly Leu Arg Arg Val Asp Phe Arg Cys
210 215 220

Asp Met Trp Thr Val Gly Leu Leu Gln Arg Leu Ala Arg Thr Asp Lys
225 230 235 240

Trp Ser Asn Gln Val Arg Thr Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asp Ser Gly
245 250 255

Val Ile Leu Asn Thr Lys Ser Leu Lys Gly His Phe Gly Arg Ser Ser
260 265 270

Gly Asp Leu Phe Ile Val Arg Gly Ser His Glu Gly Lys Leu Tyr Asp
275 280 285

Ala Arg Ser Arg Val Thr Gln Ser Val Leu Asp Ser Met Ile Gln Phe
 290 295 300
 Ser Asn Ala Asp Asn Phe Trp Lys Gly Leu Asp Gly Asn Trp Ala Arg
 305 310 315 320
 Met Arg Tyr Pro Ser Asp His Thr Cys Val Ala Gly Leu Pro Val Glu
 325 330 335
 Asp Cys Gly Arg Val Ala Ala Leu Met Ala His Ser Ile Leu Pro Cys
 340 345 350
 Tyr Lys Ile Thr Cys Pro Thr Cys Ala Gln Gln Tyr Ala Ser Leu Pro
 355 360 365
 Val Ser Asp Leu Phe Lys Leu Leu His Lys His Ala Arg Asp Gly Leu
 370 375 380
 Asn Arg Leu Gly Ala Asp Lys Asp Arg Phe Ile His Val Asn Lys Phe
 385 390 395 400
 Leu Ile Ala Leu Glu His Leu Thr Glu Pro Val Asp Leu Asn Leu Glu
 405 410 415
 Leu Phe Asn Glu Ile Phe Lys Ser Ile Gly Glu Lys Gln Gln Ala Pro
 420 425 430
 Phe Lys Asn Leu Asn Val Leu Asn Asn Phe Phe Leu Lys Gly Lys Glu
 435 440 445
 Asn Thr Ala His Glu Trp Gln Val Ala Gln Leu Ser Leu Leu Glu Leu
 450 455 460
 Ala Arg Phe Gln Lys Asn Arg Thr Asp Asn Ile Lys Lys Gly Asp Ile
 465 470 475 480
 Ser Phe Phe Arg Asn Lys Leu Phe Ala Lys Ala Asn Trp Asn Leu Tyr
 485 490 495
 Leu Ser Cys Asp Asn Gln Leu Asp Lys Asn Ala Asn Phe Leu Trp Gly
 500 505 510
 Gln Arg Glu Tyr His Ala Lys Arg Phe Phe Ser Asn Phe Phe Glu Glu
 515 520 525
 Ile Asp Pro Ala Lys Gly Tyr Ser Ala Tyr Glu Ile Arg Lys His Pro
 530 535 540
 Ser Gly Thr Arg Lys Leu Ser Ile Gly Asn Leu Val Val Pro Leu Asp
 545 550 555 560
 Leu Ala Glu Phe Arg Gln Lys Met Lys Gly Asp Tyr Arg Lys Gln Pro
 565 570 575
 Gly Val Ser Arg Lys Cys Thr Ser Ser Lys Asp Gly Asn Tyr Val Tyr
 580 585 590
 Pro Cys Cys Cys Thr Thr Leu Asp Asp Gly Ser Ala Ile Glu Ser Thr
 595 600 605
 Phe Tyr Pro Pro Thr Lys Lys His Leu Val Ile Gly Asn Ser Gly Asp

610	615	620
Gln Lys Phe Val Asp Leu Pro Lys Gly Asp Ser Glu Met Leu Tyr Ile		
625	630	635
Ala Lys Gln Gly Tyr Cys Tyr Ile Asn Val Phe Leu Ala Met Leu Ile		
645	650	655
Asn Ile Gly Glu Glu Asp Ala Lys Asp Phe Thr Lys Lys Val Arg Asp		
660	665	670
Met Cys Val Pro Lys Leu Gly Thr Trp Pro Thr Met Met Asp Leu Ala		
675	680	685
Thr Thr Cys Ala Gln Met Arg Ile Phe Tyr Pro Asp Val His Asp Ala		
690	695	700
Glu Leu Pro Ser Leu Leu Val Asp His Asp Thr Gln Thr Cys His Val		
705	710	715
720		
Val Asp Ser Phe Gly Ser Gln Thr Thr Gly Tyr His Ile Leu Lys Ala		
725	730	735
Ser Ser Val Ser Gln Leu Ile Leu Phe Ala Asn Asp Glu Leu Glu Ser		
740	745	750
Asp Ile Lys His Tyr Arg Val Gly Gly Val Pro Asn Ala Cys Pro Glu		
755	760	765
Leu Gly Ser Thr Ile Ser Pro Phe Arg Glu Gly Gly Val Ile Met Ser		
770	775	780
Glu Ser Ala Ala Leu Lys Leu Leu Leu Lys Gly Ile Phe Arg Pro Lys		
785	790	795
800		
Val Met Arg Gln Leu Leu Leu Asp Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Leu Ser		
805	810	815
Ile Leu Ser Pro Gly Ile Leu Met Ala Met Tyr Asn Asn Gly Ile Phe		
820	825	830
Glu Leu Ala Val Arg Leu Trp Ile Asn Glu Lys Gln Ser Ile Ala Met		
835	840	845
Ile Ala Ser Leu Leu Ser Ala Leu Ala Leu Arg Val Ser Ala Ala Glu		
850	855	860
Thr Leu Val Ala Gln Arg Ile Ile Asp Ala Ala Ala Thr Asp Leu		
865	870	875
880		
Leu Asp Ala Thr Cys Asp Gly Phe Asn Leu His Leu Thr Tyr Pro Thr		
885	890	895
Ala Leu Met Val Leu Gln Val Val Lys Asn Arg Asn Glu Cys Asp Asp		
900	905	910
Thr Leu Phe Lys Ala Gly Phe Pro Ser Tyr Asn Thr Ser Val Val Gln		
915	920	925
Ile Met Glu Lys Asn Tyr Leu Ser Leu Leu Asp Asp Ala Trp Lys Asp		
930	935	940

Leu Thr Trp Arg Glu Lys Leu Ser Ala Thr Trp Tyr Ser Tyr Arg Ala
 945 950 955 960
 Lys Arg Ser Ile Thr Arg Tyr Ile Lys Pro Thr Gly Arg Ala Asp Leu
 965 970 975
 Lys Gly Leu Tyr Asn Ile Ser Pro Gln Ala Phe Leu Gly Arg Ser Ala
 980 985 990
 Gln Val Val Lys Gly Thr Ala Ser Gly Leu Ser Glu Arg Phe Asn Asn
 995 1000 1005
 Tyr Phe Asn Thr Lys Cys Val Asn Ile Ser Ser Phe Phe Ile Arg
 1010 1015 1020
 Arg Ile Phe Arg Arg Leu Pro Thr Phe Val Thr Phe Val Asn Ser
 1025 1030 1035
 Leu Leu Val Ile Ser Met Leu Thr Ser Val Val Ala Val Cys Gln
 1040 1045 1050
 Ala Ile Ile Leu Asp Gln Arg Lys Tyr Arg Arg Glu Ile Glu Leu
 1055 1060 1065
 Met Gln Ile Glu Lys Asn Glu Ile Val Cys Met Glu Leu Tyr Ala
 1070 1075 1080
 Ser Leu Gln Arg Lys Leu Glu Arg Asp Phe Thr Trp Asp Glu Tyr
 1085 1090 1095
 Ile Glu Tyr Leu Lys Ser Val Asn Pro Gln Ile Val Gln Phe Ala
 1100 1105 1110
 Gln Ala Gln Met Glu Glu Tyr Asp Val Arg His Gln Arg Ser Thr
 1115 1120 1125
 Pro Gly Val Lys Asn Leu Glu Gln Glu Val Ala Phe Met Ala Leu
 1130 1135 1140
 Val Ile Met Val Phe Asp Ala Glu Arg Ser Asp Cys Val Phe Lys
 1145 1150 1155
 Thr Leu Asn Lys Phe Lys Gly Val Leu Ser Ser Leu Asp His Glu
 1160 1165 1170
 Val Arg His Gln Ser Leu Asp Asp Val Ile Lys Asn Phe Asp Glu
 1175 1180 1185
 Arg Asn Glu Ile Ile Asp Phe Glu Leu Ser Glu Asp Thr Ile Arg
 1190 1195 1200
 Thr Ser Ser Val Leu Asp Thr Lys Phe Ser Asp Trp Trp Asp Arg
 1205 1210 1215
 Gln Ile Gln Met Gly His Thr Leu Pro His Tyr Arg Thr Glu Gly
 1220 1225 1230
 His Phe Met Glu Phe Thr Arg Ala Thr Ala Val Gln Val Ala Asn
 1235 1240 1245

Asp Ile Ala His Ser Glu His Leu Asp Phe Leu Val Arg Gly Ala
 1250 1255 1260
 Val Gly Ser Gly Lys Ser Thr Gly Leu Pro Val His Leu Ser Val
 1265 1270 1275
 Ala Gly Ser Val Leu Leu Ile Glu Pro Thr Arg Pro Leu Ala Glu
 1280 1285 1290
 Asn Val Phe Lys Gln Leu Ser Ser Glu Pro Phe Phe Lys Lys Pro
 1295 1300 1305
 Thr Leu Arg Met Arg Gly Asn Ser Ile Phe Gly Ser Ser Pro Ile
 1310 1315 1320
 Ser Val Met Thr Ser Gly Phe Ala Leu His Tyr Phe Ala Asn Asn
 1325 1330 1335
 Arg Ser Gln Leu Ala Gln Phe Asn Phe Val Ile Phe Asp Glu Cys
 1340 1345 1350
 His Val Leu Asp Pro Ser Ala Met Ala Phe Arg Ser Leu Leu Ser
 1355 1360 1365
 Val Tyr His Gln Ala Cys Lys Val Leu Lys Val Ser Ala Thr Pro
 1370 1375 1380
 Val Gly Arg Glu Val Glu Phe Thr Thr Gln Gln Pro Val Lys Leu
 1385 1390 1395
 Ile Val Glu Asp Thr Leu Ser Phe Gln Ser Phe Val Asp Ala Gln
 1400 1405 1410
 Gly Ser Lys Thr Asn Ala Asp Val Val Gln Phe Gly Ser Asn Val
 1415 1420 1425
 Leu Val Tyr Val Ser Ser Tyr Asn Glu Val Asp Thr Leu Ala Lys
 1430 1435 1440
 Leu Leu Thr Asp Lys Asn Met Met Val Thr Lys Val Asp Gly Arg
 1445 1450 1455
 Thr Met Lys His Gly Cys Leu Glu Ile Val Thr Lys Gly Thr Ser
 1460 1465 1470
 Ala Arg Pro His Phe Val Val Ala Thr Asn Ile Ile Glu Asn Gly
 1475 1480 1485
 Val Thr Leu Asp Ile Asp Val Val Val Asp Phe Gly Leu Lys Val
 1490 1495 1500
 Ser Pro Phe Leu Asp Ile Asp Asn Arg Ser Ile Ala Tyr Asn Lys
 1505 1510 1515
 Glu Ser Val Ser Tyr Gly Glu Arg Ile Gln Arg Leu Gly Arg Val
 1520 1525 1530
 Gly Arg Phe Lys Lys Gly Val Ala Leu Arg Ile Gly His Thr Glu
 1535 1540 1545
 Lys Gly Ile Ile Glu Ile Pro Ser Met Val Ala Thr Glu Ala Ala

1550	1555	1560
Leu Ala Cys Phe Ala Tyr Asn	Leu Pro Val Met Thr	Gly Gly Val
1565	1570	1575
Ser Thr Ser Leu Ile Gly Asn	Cys Thr Val Arg Gln	Val Lys Thr
1580	1585	1590
Met Gln Gln Phe Glu Leu Ser	Pro Phe Phe Ile Gln	Asn Phe Val
1595	1600	1605
Ala His Asp Gly Ser Met His	Pro Val Ile His Asp	Ile Leu Lys
1610	1615	1620
Lys Tyr Lys Leu Arg Asp Cys	Met Thr Pro Leu Cys	Asp Gln Ser
1625	1630	1635
Ile Pro Tyr Arg Ala Ser Cys	Thr Trp Leu Ser Val	Ser Glu Tyr
1640	1645	1650
Glu Arg Leu Gly Val Ala Leu	Glu Ile Pro Lys Gln	Ile Lys Ile
1655	1660	1665
Ala Phe His Ile Lys Glu Ile	Pro Pro Lys Leu His	Glu Met Leu
1670	1675	1680
Trp Glu Thr Val Val Lys Tyr	Lys Asp Val Cys Leu	Phe Pro Ser
1685	1690	1695
Ile Arg Ala Ser Ser Ile Ser	Lys Ile Ala Tyr Thr	Leu Arg Thr
1700	1705	1710
Asp Leu Phe Ala Ile Pro Arg	Thr Leu Ile Leu Val	Glu Arg Leu
1715	1720	1725
Leu Glu Glu Glu Arg Val Lys	Gln Ser Gln Phe Arg	Ser Leu Ile
1730	1735	1740
Asp Glu Gly Cys Ser Ser Met	Phe Ser Ile Val Asn	Leu Thr Asn
1745	1750	1755
Thr Leu Arg Ala Arg Tyr Ala	Lys Asp Tyr Thr Ala	Glu Asn Ile
1760	1765	1770
Gln Lys Leu Glu Lys Val Arg	Ser Gln Leu Lys Glu	Phe Ser Asn
1775	1780	1785
Leu Asp Gly Ser Ala Cys Glu	Glu Asn Leu Ile Lys	Arg Tyr Glu
1790	1795	1800
Ser Leu Gln Phe Val His His	Gln Ala Ala Thr Ser	Leu Ala Lys
1805	1810	1815
Asp Leu Lys Leu Lys Gly Thr	Trp Lys Lys Ser Leu	Val Ala Lys
1820	1825	1830
Asp Leu Ile Ile Ala Gly Ala	Val Ala Ile Gly Gly	Ile Gly Leu
1835	1840	1845
Ile Tyr Ser Trp Phe Thr Gln	Ser Val Glu Thr Val	Ser His Gln
1850	1855	1860

Gly Lys Asn Lys Ser Lys Arg Ile Gln Ala Leu Lys Phe Arg His
 1865 1870 1875
 Ala Arg Asp Lys Arg Ala Gly Phe Glu Ile Asp Asn Asn Asp Asp
 1880 1885 1890
 Thr Ile Glu Glu Phe Phe Gly Ser Ala Tyr Arg Lys Lys Gly Lys
 1895 1900 1905
 Gly Lys Gly Thr Thr Val Gly Met Gly Lys Ser Ser Arg Lys Phe
 1910 1915 1920
 Ile Asn Met Tyr Gly Phe Asp Pro Thr Glu Tyr Ser Phe Ile Gln
 1925 1930 1935
 Phe Val Asp Pro Leu Thr Gly Ala Gln Ile Glu Glu Asn Val Tyr
 1940 1945 1950
 Ala Asp Ile Arg Asp Ile Gln Asp Arg Phe Ser Glu Val Arg Lys
 1955 1960 1965
 Lys Met Val Glu Asn Asp Asp Ile Glu Met Gln Ala Leu Gly Ser
 1970 1975 1980
 Asn Thr Thr Ile His Ala Tyr Phe Arg Lys Asp Trp Ser Asp Lys
 1985 1990 1995
 Ala Leu Lys Ile Asp Leu Met Pro His Asn Pro Leu Lys Val Cys
 2000 2005 2010
 Asp Lys Thr Asn Gly Ile Ala Lys Phe Pro Glu Arg Glu Leu Glu
 2015 2020 2025
 Leu Arg Gln Thr Gly Pro Ala Val Glu Val Asn Val Lys Asp Ile
 2030 2035 2040
 Pro Ala Gln Glu Val Glu His Glu Ala Lys Ser Leu Met Arg Gly
 2045 2050 2055
 Leu Arg Asp Phe Asn Pro Ile Ala Gln Thr Val Cys Arg Leu Lys
 2060 2065 2070
 Val Ser Val Glu Tyr Gly Thr Ser Glu Met Tyr Gly Phe Gly Phe
 2075 2080 2085
 Gly Ala Tyr Ile Ile Ala Asn His His Leu Phe Arg Ser Tyr Asn
 2090 2095 2100
 Gly Ser Met Glu Val Gln Ser Met His Gly Thr Phe Arg Val Lys
 2105 2110 2115
 Asn Leu His Ser Leu Ser Val Leu Pro Ile Lys Gly Arg Asp Ile
 2120 2125 2130
 Ile Leu Ile Lys Met Pro Lys Asp Phe Pro Val Phe Pro Gln Lys
 2135 2140 2145
 Leu His Phe Arg Ala Pro Ile Gln Asn Glu Arg Val Cys Leu Val
 2150 2155 2160

Gly Thr Asn Phe Gln Glu Lys Tyr Ala Ser Ser Ile Ile Thr Glu
 2165 2170 2175
 Thr Ser Thr Thr Tyr Asn Ile Pro Gly Ser Thr Phe Trp Lys His
 2180 2185 2190
 Trp Ile Glu Thr Asp Asn Gly His Cys Gly Leu Pro Val Val Ser
 2195 2200 2205
 Thr Ala Asp Gly Cys Leu Val Gly Ile His Ser Leu Ala Asn Asn
 2210 2215 2220
 Ala His Thr Thr Asn Tyr Tyr Ser Ala Phe Asp Glu Asp Phe Glu
 2225 2230 2235
 Ser Lys Tyr Leu Arg Ala Asn Glu His Asn Glu Trp Val Lys Ser
 2240 2245 2250
 Trp Lys Tyr Asn Pro Asp Thr Val Leu Trp Gly Pro Leu Lys Leu
 2255 2260 2265
 Lys Asp Ser Thr Pro Lys Gly Leu Phe Lys Thr Thr Lys Leu Val
 2270 2275 2280
 Gln Asp Leu Ile Glu His Asp Val Val Val Glu Gln Ala Lys His
 2285 2290 2295
 Ser Ala Trp Met Phe Glu Ala Leu Thr Gly Asn Leu Gln Ala Val
 2300 2305 2310
 Ala Thr Met Lys Ser Gln Leu Val Thr Lys His Val Val Lys Gly
 2315 2320 2325
 Glu Cys Arg His Phe Lys Glu Phe Leu Thr Val Asp Ala Glu Ala
 2330 2335 2340
 Glu Ala Phe Phe Arg Pro Leu Met Asp Ala Tyr Gly Lys Ser Leu
 2345 2350 2355
 Leu Asn Arg Asp Ala Tyr Ile Lys Asp Ile Met Lys Tyr Ser Lys
 2360 2365 2370
 Pro Ile Asp Val Gly Ile Val Asp Cys Asp Ala Phe Glu Glu Ala
 2375 2380 2385
 Ile Asn Arg Val Ile Ile Tyr Leu Gln Val His Gly Phe Lys Lys
 2390 2395 2400
 Cys Ala Tyr Val Thr Asp Glu Gln Glu Ile Phe Lys Ala Leu Asn
 2405 2410 2415
 Met Lys Ala Ala Val Gly Ala Met Tyr Gly Gly Lys Lys Lys Asp
 2420 2425 2430
 Tyr Phe Glu His Phe Thr Asp Ala Asp Lys Glu Glu Ile Val Met
 2435 2440 2445
 Gln Ser Cys Leu Arg Leu Tyr Lys Gly Leu Leu Gly Ile Trp Asn
 2450 2455 2460
 Gly Ser Leu Lys Ala Glu Leu Arg Cys Lys Glu Lys Ile Leu Ala

2465	2470	2475
Asn Lys Thr Arg Thr Phe Thr Ala Ala Pro Leu Asp	Thr Leu Leu	
2480	2485	2490
Gly Gly Lys Val Cys Val Asp Asp Phe Asn Asn Gln	Phe Tyr Ser	
2495	2500	2505
Lys Asn Ile Glu Cys Cys Trp Thr Val Gly Met Thr	Lys Phe Tyr	
2510	2515	2520
Gly Gly Trp Asp Lys Leu Leu Arg Arg Leu Pro Glu	Asn Trp Val	
2525	2530	2535
Tyr Cys Asp Ala Asp Gly Ser Gln Phe Asp Ser Ser	Leu Thr Pro	
2540	2545	2550
Tyr Leu Phe Asn Ala Val Leu Thr Ile Arg Ser Thr	Tyr Met Glu	
2555	2560	2565
Asp Trp Asp Val Gly Leu Gln Met Leu Arg Asn Leu	Tyr Thr Glu	
2570	2575	2580
Ile Val Tyr Thr Pro Ile Ser Thr Pro Asp Gly Thr	Ile Val Lys	
2585	2590	2595
Lys Phe Arg Gly Asn Asn Ser Gly Gln Pro Ser Thr	Val Val Asp	
2600	2605	2610
Asn Ser Leu Met Val Val Leu Ala Met His Tyr Ala	Phe Ile Arg	
2615	2620	2625
Glu Gly Ile Glu Phe Glu Glu Thr Asp Ser Thr Cys	Val Phe Phe	
2630	2635	2640
Val Asn Gly Asp Asp Leu Leu Ile Ala Val Asn Pro	Asp Lys Glu	
2645	2650	2655
Asp Ile Leu Asp Arg Leu Ser Gln His Phe Ser Asp	Leu Gly Leu	
2660	2665	2670
Asn Tyr Asp Phe Ser Ser Arg Thr Arg Asn Lys Glu	Glu Leu Trp	
2675	2680	2685
Phe Met Ser His Arg Gly Leu Leu Ile Glu Gly Met	Tyr Val Pro	
2690	2695	2700
Lys Leu Glu Glu Glu Arg Ile Val Ser Ile Leu Gln	Trp Asp Arg	
2705	2710	2715
Ala Asp Leu Ala Glu His Arg Leu Glu Ala Ile Cys	Ala Arg Met	
2720	2725	2730
Ile Glu Ser Trp Gly Tyr Ser Glu Leu Thr His Gln	Ile Arg Arg	
2735	2740	2745
Phe Tyr Ser Trp Leu Leu Gln Gln Gln Pro Phe Ala	Thr Ile Ala	
2750	2755	2760
Gln Glu Gly Lys Ala Pro Tyr Ile Ala Ser Met Ala	Leu Arg Lys	
2765	2770	2775

Leu Tyr Met Asp Arg Ala Val Asp Glu Glu Glu Leu Arg Ala Phe
 2780 2785 2790

Thr Glu Met Met Val Ala Leu Asp Asp Glu Phe Glu Phe Asp Ser
 2795 2800 2805

Tyr Glu Val Tyr His Gln Ala Asn Asp Thr Ile Asp Ala Gly Gly
 2810 2815 2820

Ser Asn Lys Lys Asp Thr Lys Pro Glu Gln Ser Ser Ile Gln Ser
 2825 2830 2835

Asn Pro Asn Lys Gly Lys Asp Lys Asp Val Asn Ala Gly Thr Ser
 2840 2845 2850

Gly Thr His Thr Val Pro Arg Ile Lys Ala Ile Thr Ser Lys Met
 2855 2860 2865

Arg Met Pro Lys Ser Lys Gly Ala Ala Val Leu Asn Leu Glu His
 2870 2875 2880

Leu Leu Glu Tyr Ala Pro Gln Gln Ile Asp Ile Ser Asn Thr Arg
 2885 2890 2895

Ala Thr Gln Ser Gln Phe Asp Thr Trp Tyr Glu Ala Val Arg Met
 2900 2905 2910

Ala Tyr Asp Ile Gly Glu Thr Glu Met Pro Thr Val Met Asn Gly
 2915 2920 2925

Leu Met Val Trp Cys Ile Glu Asn Gly Thr Ser Pro Asn Val Asn
 2930 2935 2940

Gly Val Trp Val Met Met Asp Gly Asn Glu Gln Val Glu Tyr Pro
 2945 2950 2955

Leu Lys Pro Ile Val Glu Asn Ala Lys Pro Thr Leu Arg Gln Ile
 2960 2965 2970

Met Ala His Phe Ser Asp Val Ala Glu Ala Tyr Ile Glu Met Arg
 2975 2980 2985

Asn Lys Lys Glu Pro Tyr Met Pro Arg Tyr Gly Leu Ile Arg Asn
 2990 2995 3000

Leu Arg Asp Met Gly Leu Ala Arg Tyr Ala Phe Asp Phe Tyr Glu
 3005 3010 3015

Val Thr Ser Arg Thr Pro Val Arg Ala Arg Glu Ala Gln Ile Gln
 3020 3025 3030

Met Lys Ala Ala Ala Leu Lys Ser Ala Gln Pro Arg Leu Phe Gly
 3035 3040 3045

Leu Asp Gly Gly Ile Ser Thr Gln Glu Glu Asn Thr Glu Arg His
 3050 3055 3060

Thr Thr Glu Asp Val Ser Pro Ser Met His Thr Leu Leu Gly Val
 3065 3070 3075

Lys Asn Met
3080

<210> 5
<211> 161
<212> ADN
<213> Virus de la pomme de terre

<220>
<223> Séquence PVY-N

<400> 5
cctggccaac catgatggat ctggctacaa cttgtgctca aatgaaaata ttctaccctg 60
atgttcatga tgcagaactg cctagaatac tagtcgatca cgaaacgcag acatgccatg 120
tagttgactc gtttggctca caaacaactg ggtatcatat t 161

<210> 6
<211> 161
<212> ADN
<213> Virus de la pomme de terre

<220>
<223> Séquence PVYo

<400> 6
cctggccaac tatgatggat ttggcgacca cttgtgctca aatgagaata ttctatcctg 60
acgtgcattga tgcagagctg cctagttat tggttgacca tgacactcaa acgtgtcatg 120
tggttgactc atttggctcg cagacaactg gatatcatat t 161

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde PVYN (polymorphisme 400)

<400> 7
ctcaaatgaa aatattctac 20

<210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde PVYo (polymorphisme 400)
<400> 8
ctcaaatgag aatattcta 19

<210> 9
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Sonde PVYN (polymorphisme 419)		
<400> 9		
cgatcacgaa acgcagaca	19	
<210> 10		
<211> 15		
<212> ADN		
<213> Séquence artificielle		
<220>		
<223> Sonde PVYo (polymorphisme 419)		
<400> 10		
accatgacac tcaaa	15	
<210> 11		
<211> 40		
<212> ADN		
<213> Séquence artificielle		
<220>		
<223> Amorce sens nucléotide 2079 à 2108 de PVYo-139 avec un site NruI		
<400> 11		
aacgtgttcc tcgcgatgct aatTAACATT ggcgaggagg	40	
<210> 12		
<211> 40		
<212> ADN		
<213> Séquence artificielle		
<220>		
<223> Amorce antisens nucléotide 2592 à 2561 de PVYo-139 avec un site BstZ17I		
<400> 12		
agccatcaGAT ataccaggGGG ataataTTGA tagaatcaAC	40	
<210> 13		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Séquence artificielle		
<220>		
<223> Amorce pour transcriptase inverse		
<400> 13		
gtctcctgat tgaagtttac	20	
<210> 14		
<211> 163		
<212> ADN		
<213> Virus de la pomme de terre		
<220>		
<223> PVY-N-K400-E419		
<400> 14		
cctggccaac catgatggat ctggctacaa cttgtgctca aatgaaaata ttctaccctg atgttcatga tgcagaactg cctagaatac tagtcgatca cgaaacgcag acatgccatg tagttgactc gtttggctca caaacaactg ggtatcatat ttt	60 120 163	
<210> 15		

<211> 161
 <212> ADN
 <213> Virus de la pomme de terre

<220>
 <223> PVYo-R400-D419
 <400> 15
 cctggccaac tatgatggat ttggcgacca cttgtgctca aatgagaata ttctatcctg 60
 acgtgcata tgcagagctg cctagttat tggttgacca tgacactcaa acgtgtcatg 120
 tggttgactc atttggctcg cagacaactg gatatcatat t 161

<210> 16
 <211> 163
 <212> ADN
 <213> Virus de la pomme de terre

<220>
 <223> PVY-NTPN-K400-D419
 <400> 16
 cctggccaac catgatggat ctggctacaa cttgtgctca aatgaaaata ttctaccctg 60
 atgttcata tgcagaactg cctagaatac tagtcgatca cgacacgcag acatgccatg 120
 tagttgactc gtttggctca caaacaactg ggtatcatat ttt 163

<210> 17
 <211> 163
 <212> ADN
 <213> Virus de la pomme de terre

<220>
 <223> PVY-NTPN-R400-E419
 <400> 17
 cctggccaac catgatggat ctggctacaa cttgtgctca aatgagaata ttctaccctg 60
 atgttcata tgcagaactg cctagaatac tagtcgatca cgaaacgcag acatgcoatg 120
 tagttgactc gtttggctca caaacaactg ggtatcatat ttt 163

<210> 18
 <211> 161
 <212> ADN
 <213> Virus de la pomme de terre

<220>
 <223> PVY-NTPo-R400-E419
 <400> 18
 cctggccaac tatgatggat ttggcgacca cttgtgctca aatgagaata ttctatcctg 60
 acgtgcata tgcagagctg cctagttat tggttgacca tgaaactcaa acgtgtcatg 120
 tggttgactc atttggctcg cagacaactg gatatcatat t 161

<210> 19
 <211> 161
 <212> ADN
 <213> Virus de la pomme de terre

<220>
 <223> PVY-NTPo-K400-D429
 <400> 19
 cctggccaac tatgatggat ttggcgacca cttgtgctca aatgaaaata ttctatcctg 60
 acgtgcata tgcagagctg cctagttat tggttgacca tgacactcaa acgtgtcatg 120

tggttgactc atttggctcg cagacaactg gatatcatat t 161

<210> 20
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde PVYN (polymorphisme 419)
<400> 20
atcacgaaac gcagaca 17

<210> 21
<211> 16
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Sonde PVYo (polymorphisme 419)
<400> 21
tgaccatgac actcaa 16

<210> 22
<211> 28
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Amorce sens pour YN
<400> 22
atgatgcaga actgcctaga atactagt 28

<210> 23
<211> 29
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Amorce sens pour YN
<400> 23
atgatgcaga actgcctaga atactagtc 29

<210> 24
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Amorce sens pour YN
<400> 24
catgatgcag aactgcctag aatacta 27

<210> 25
<211> 24
<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce sens pour YO

<400> 25

gcagagctgc ctagtttatt ggtt

24

<210> 26

<211> 25

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce sens pour YO

<400> 26

atgatgcaga gctgcctagt ttatt

25

<210> 27

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce sens pour YO

<400> 27

tgcagagctg cctagtttat tgg

23

<210> 28

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce anti-sens pour YN

<400> 28

gtgagccaaa cgagtcaact acat

24

<210> 29

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce anti-sens pour YN

<400> 29

tttgtgagcc aaacgagtca acta

24

<210> 30

<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce anti-sens pour YN

<400> 30

tttgtgagcc aacgagtcaa ct

22

<210> 31
<211> 22
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Amorce anti-sens pour YO
<400> 31
gccaaatgag tcaaccacat ga

22

<210> 32
<211> 22
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Amorce anti-sens pour YO
<400> 32
agccaaatga gtcaaccaca tg

22

<210> 33
<211> 23
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Amorce anti-sens pour YO
<400> 33
ccaaatgagt caaccacatg aca

23