

Schemes for the production of healthy plants for planting
Schémas pour la production de végétaux sains destinés à la plantation

Certification sanitaire de variétés et de porte-greffe de vigne

Champ d'application spécifique

Cette norme décrit la production de variétés et de porte-greffe de vigne soumis à une certification sanitaire.

Approbation et amendement spécifiques

Approbation initiale en septembre 1993 et révision en 2008.

Le schéma de certification de la vigne (*Vitis* spp.) donne des détails sur la production de variétés et de porte-greffe de vigne soumis à une certification sanitaire. Le matériel produit selon ce schéma de certification est issu de plantes du stade initial qui ont été testées et trouvées indemnes des pathogènes listés au tableau 1, et produites dans des conditions minimisant l'infection par les autres pathogènes majeurs des espèces concernées. Le matériel certifié de vigne destiné à l'exportation doit, dans tous les cas, satisfaire aux réglementations phytosanitaires des pays importateurs, en particulier pour ce qui concerne les pathogènes couverts par le schéma qui sont également des organismes de quarantaine. Le schéma est présenté selon le plan général proposé par le Groupe d'experts OEPP sur la certification sanitaire des cultures fruitières et adopté par le Conseil de l'OEPP (OEPP/EPPO, 1992).

Vue d'ensemble du schéma

Pour produire des variétés et des porte-greffe de vigne certifiés, les étapes suivantes doivent être suivies:

- 1 Sélection pour une qualité pomologique et œnologique : des plantes individuelles de chaque variété et porte-greffe à introduire dans le schéma sont sélectionnées. Les plantes sélectionnées ne doivent pas présenter de symptômes apparents de virus : les tests sérologiques et/ou moléculaires effectués à ce stade peuvent fortement réduire le risque d'introduire dans le schéma des plantes qui ne répondent pas aux exigences sanitaires. Si aucun clone de la variété sélectionnée n'est trouvé indemne des pathogènes concernés, on peut sélectionner ceux qui sont affectés par un moindre nombre de virus ou par les virus les plus faciles à éliminer par des méthodes d'amélioration sanitaire.
- 2 Production du stade initial : les plantes candidates au stade initial sont multipliées par boutures. Dans le cas des plantes candidates au stade initial greffées, on doit utiliser des porte-greffe ayant le statut de stade initial. Les plantes candidates sont maintenues isolées du stade initial. Les plantes candidates au stade initial sont testées et maintenues sous abri dans des conditions assurant l'absence d'infection. Des plantes indemnes de virus (candidates au stade initial) peuvent également être produites par thérapie et/ou culture de méristèmes (extrémité de pousses) suivie de tests. Seules les plantes candidates au stade initial qui respectent toutes les exigences peuvent être considérées comme appartenant au stade initial.
- 3 Maintien du stade initial : les plantes du stade initial sont maintenues dans des conditions garantissant l'absence d'infection, avec des tests supplémentaires si nécessaire. Les plantes doivent être cultivées dans des conteneurs de substrat stérilisé, isolés du sol.
- 4 Production du stade de propagation : les plantes du stade de propagation sont produites à partir du stade initial avec le moins d'étapes possibles dans des conditions garantissant l'absence d'infection.
- 5 Production de plantes certifiées : des plantes certifiées (variétés greffées, porte-greffe multipliés par voie végétative) sont produites en pépinière à partir du stade de propagation. Pour les plantes greffées, on doit utiliser des porte-greffe ayant au moins le statut de stade de propagation.

Tout au long de la procédure, des précautions doivent être prises pour conserver les caractéristiques pomologiques et œnologiques des plantes sélectionnées à l'origine. Des contrôles doivent porter sur d'éventuelles mutations, surtout pour les variétés.

Le schéma est représenté à la Figure 1. Le schéma de certification doit être mis en œuvre par une organisation officielle, ou par une pépinière ou un laboratoire spécialisé officiellement agréé, répondant à des critères donnés (voir la Norme OEPP PM 4/7). Tous les tests et inspections réalisés au cours de la production doivent être notés. Si les stades du schéma de certification sont conduits par une pépinière agréée, la certification sera accordée par l'organisation officielle en se basant sur les documents relatifs aux tests et aux observations réalisés pendant la production, et sur des inspections visuelles visant à vérifier l'état sanitaire du matériel.

1. Sélection de plantes candidates au stade initial

Sélectionner des plantes de chaque variété ou porte-greffe selon des procédures garantissant l'authenticité variétale et une bonne qualité pomologique et œnologique. Les plantes sélectionnées ne doivent pas présenter de symptômes apparents de virus : des tests sérologiques et/ou moléculaires effectués à ce stade peuvent fortement réduire le risque d'inclure dans le schéma des plantes qui ne répondent pas aux exigences sanitaires. Si aucun clone de la variété sélectionnée n'a été trouvé indemne des pathogènes concernés, on peut sélectionner ceux qui sont affectés par un moindre nombre de virus ou par les virus les plus faciles à éliminés par des méthodes d'amélioration sanitaire.

Prélever des boutures sur les plantes sélectionnées et les conserver au froid (par ex. à 2-4°C) jusqu'à leur utilisation. Lorsque les conditions sont favorables (par ex. sols sableux, faibles taux d'infestation par le phylloxera, *Viteus vitifoliae*), faire raciner les boutures des variétés de greffons ou de porte-greffe par forçage en serre et transplanter les boutures racinées au champ. Pour les variétés greffons, on peut aussi écussonner des bourgeons ou rameaux à bourgeons issus des plantes sélectionnées sur des porte-greffe certifiés multipliés par voie végétative. Avant utilisation, les boutures et porte-greffe doivent être testés pour garantir l'absence des maladies et des pathogènes indiqués aux tableaux 1 et 2.

Le sol doit être indemne de nématodes vecteurs et les plantes de vigne doivent être soigneusement protégées contre les vecteurs aériens (cochenilles et cicadelles) dans les zones où ceux-ci peuvent être présents. Une distance de sécurité entre la collection et les vignobles commerciaux ou parcelles de vignes-mères n'est pas strictement nécessaire. Cependant, il faut éviter que la collection et d'autres parcelles de vigne soient contiguës.

2. Production du stade initial

Pour devenir des plantes du stade initial, les plantes sélectionnés doivent subir des tests pour détecter les maladies et pathogènes nuisibles présents dans la région OEPP (tableaux 1 et 2), et/ou une amélioration sanitaire selon les méthodes décrites dans les annexes 1 et 2. Le matériel importé de l'extérieur de la région OEPP doit également être testé selon des méthodes recommandées par l'OEPP pour tous les autres virus et analogues aux virus présents naturellement chez *Vitis* dans la région d'origine. Les tests sur plantes indicatrices ligneuses, cités au tableau 2, sont essentiels pour le matériel qui sera qualifié d'initial, alors que les autres méthodes citées dans les résumés de détection des maladies de l'annexe 1 peuvent servir au criblage préliminaire ou à la répétition des tests. Quel que soit le type de traitement utilisé, les vignes ayant subi une amélioration sanitaire doivent être à nouveau testées. Planter les explants racinés ayant subi une thérapie ou provenant de culture de tissus dans des pots séparés, et les cultiver en serre ou sous abri pour assurer l'absence de vecteurs aériens. Un double des plantes du stade initial doit être maintenu *in vitro* ou en cryopréservation. Si on obtient une croissance vigoureuse, les tests sérologiques ou moléculaires et les tests sur plantes indicatrices ligneuses peuvent être réalisés dans l'année qui suit la transplantation. Si une plante candidate au stade matériel initial, correspondant à une variété ou un à porte-greffe donné, présente des résultats négatifs pour tous les tests, elle peut être considérée comme matériel initial, puis transférée dans la collection de matériel initial.

Si, pour une variété ou un porte-greffe donné, on s'attend à trouver 100% de contamination par des virus, il vaut mieux ne pas perdre du temps avec les premiers tests mais passer directement à l'amélioration sanitaire.

Inspections concernant d'autres organismes nuisibles

En plus des maladies et pathogènes mentionnés ci-dessus, tout le matériel doit aussi être contrôlé pour vérifier l'absence d'autres organismes nuisibles qui pourraient être véhiculés par le matériel de propagation et en altérer la qualité. En particulier, ceci doit être vérifié pour le crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*, *A. vitis*), *Xylophilus ampelinus*, les maladies de type fongique (*Phomopsis viticola*, *Eutypa* spp., *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fomitoporia punctata*, *Phaeomoniella chlamydospora*) et les acariens (*Calepitrimerus vitis*, *Panonychus ulmi*, *Eotetranychus carpini*). Noter que des infections latentes par *A. tumefaciens* et *A. vitis* peuvent se produire. Les autres maladies transmissibles par greffage dont la présence est connue dans la région OEPP sont tolérées pour le moment, mais des efforts doivent être faits pour les éliminer.

Tableau 1. Pathogènes, transmission, répartition géographique et vecteurs des maladies de la vigne présentes dans la région OEPP

| Virus | Répartition géographique | Vecteur |
|--|---|--|
| A. Complexe des dégénérescences de la vigne (toutes mécaniquement transmissibles) | | |
| 1. <i>Arabid mosaic virus</i> (<i>Nepovirus</i> , ArMV) | Europe, Japon, Etats-Unis (California) | <i>Xiphinema diversicaudatum</i> |
| 2. <i>Grapevine chrome mosaic virus</i> (<i>Nepovirus</i> , GCMV) | Hongrie, ex-Yougoslavie, Slovaquie, Autriche | Inconnu |
| 3. <i>Grapevine fanleaf virus</i> (<i>Nepovirus</i> , GFLV) | Mondiale | <i>Xiphinema index</i> , <i>Xiphinema italiae</i> , <i>Xiphinema vuittenezi</i> |
| 4. <i>Raspberry ringspot virus</i> (<i>Nepovirus</i> , RpRSV) | Allemagne | <i>Paralongidorus maximus</i> , <i>Longidorus macrosoma</i> , <i>Longidorus elongatus</i> |
| 5. <i>Strawberry latent ringspot virus</i> (<i>Sadwavirus</i> , SLRV) | Allemagne, Italie, Turquie | <i>Xiphinema diversicaudatum</i> |
| 6. <i>Tomato black ring virus</i> (<i>Nepovirus</i> , TBRV) | Canada (Ontario), Allemagne, Hongrie | <i>Longidorus attenuatus</i> , <i>Longidorus elongatus</i> |
| B. Complexe de l'enroulement de la vigne | | |
| 7. <i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> (<i>Ampelovirus</i> , GLRaV 1) | Mondiale | <i>Heliococcus bohemicus</i> , <i>Neopulvinaria innumerabilis</i> , <i>Phenacoccus aceris</i> , <i>Parthenolecanium corni</i> |
| 8. <i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (<i>Closterovirus</i> , GLRaV 2) | Mondiale | Inconnu |
| 9. <i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i> (<i>Ampelovirus</i> , GLRaV 3) | Mondiale | <i>Planococcus citri</i> , <i>Planococcus ficus</i> , <i>Pseudococcus affinis</i> , <i>Pseudococcus calceolariae</i> , <i>Pseudococcus comstocki</i> , <i>Pseudococcus longispinus</i> , <i>Pseudococcus maritimus</i> , <i>Pseudococcus viburni</i> , <i>Pulvinaria vitis</i> |
| 10. <i>Grapevine leafroll-associated virus 4</i> (<i>Ampelovirus</i> , GLRaV 4) | Méditerranée, Etats-Unis | Inconnu |
| 11. <i>Grapevine leafroll-associated virus 5</i> (<i>Ampelovirus</i> , GLRaV 5) | Méditerranée, Etats-Unis | <i>Pseudococcus longispinus</i> |
| 12. <i>Grapevine leafroll-associated virus 6</i> (<i>Ampelovirus</i> , GLRaV 6) | Europe | Inconnu |
| 13. <i>Grapevine leafroll-associated virus 7</i> (GLRaV 7) | Italie, Grèce, Albanie | Inconnu |
| 14. <i>Grapevine leafroll-associated virus 8</i> (<i>Ampelovirus</i> , GLRaV 8) | Etats-Unis | Inconnu |
| 15. <i>Grapevine leafroll-associated virus 9</i> (GLRaV 9) | Etats-Unis, Australie | <i>Pseudococcus longispinus</i> |
| C. Complexe du bois strié (seul le Grapevine closterovirus A est transmissible mécaniquement) | | |
| 16. <i>Grapevine virus A</i> (<i>Vitivirus</i> , GVA) | Mondiale | <i>Heliococcus bohemicus</i> , <i>Neopulvinaria innumerabilis</i> , <i>Planococcus citri</i> , <i>Planococcus ficus</i> , <i>Pseudococcus affinis</i> , <i>Pseudococcus comstocki</i> , <i>Pseudococcus longispinus</i> |
| 17. <i>Grapevine virus B</i> (<i>Vitivirus</i> , GVB) | Europe, Bassin méditerranéen, Etats-Unis, Australie | <i>Planococcus ficus</i> , <i>Pseudococcus affinis</i> , <i>Pseudococcus longispinus</i> |
| 18. <i>Grapevine rupestris stem pitting associated virus</i> (<i>Foveavirus</i> , GRSPV) | Mondiale | Pollen (soupçonné) |
| D. Marbrure | | |
| 19. <i>Grapevine fleck virus</i> (<i>Maculovirus</i> , GFkV) | Mondiale | Inconnu |
| E. Maladies de la vigne causées par des phytoplasmes | | |
| 20. <i>Grapevine flavescence dorée phytoplasma</i> | Europe | <i>Scaphoideus titanus</i> |
| 21. Bois noir de la vigne et autres phytoplasmes responsables de jaunisses | Europe, Chili, Israël, Nouvelle-Zélande, Australie | <i>Hyalestes obsoletus</i> (bois noir) <i>Oncopsis alni</i> (Palatinate yellows) |

Fig. 1. Diagramme des stades du schéma de certification sanitaire de la vigne

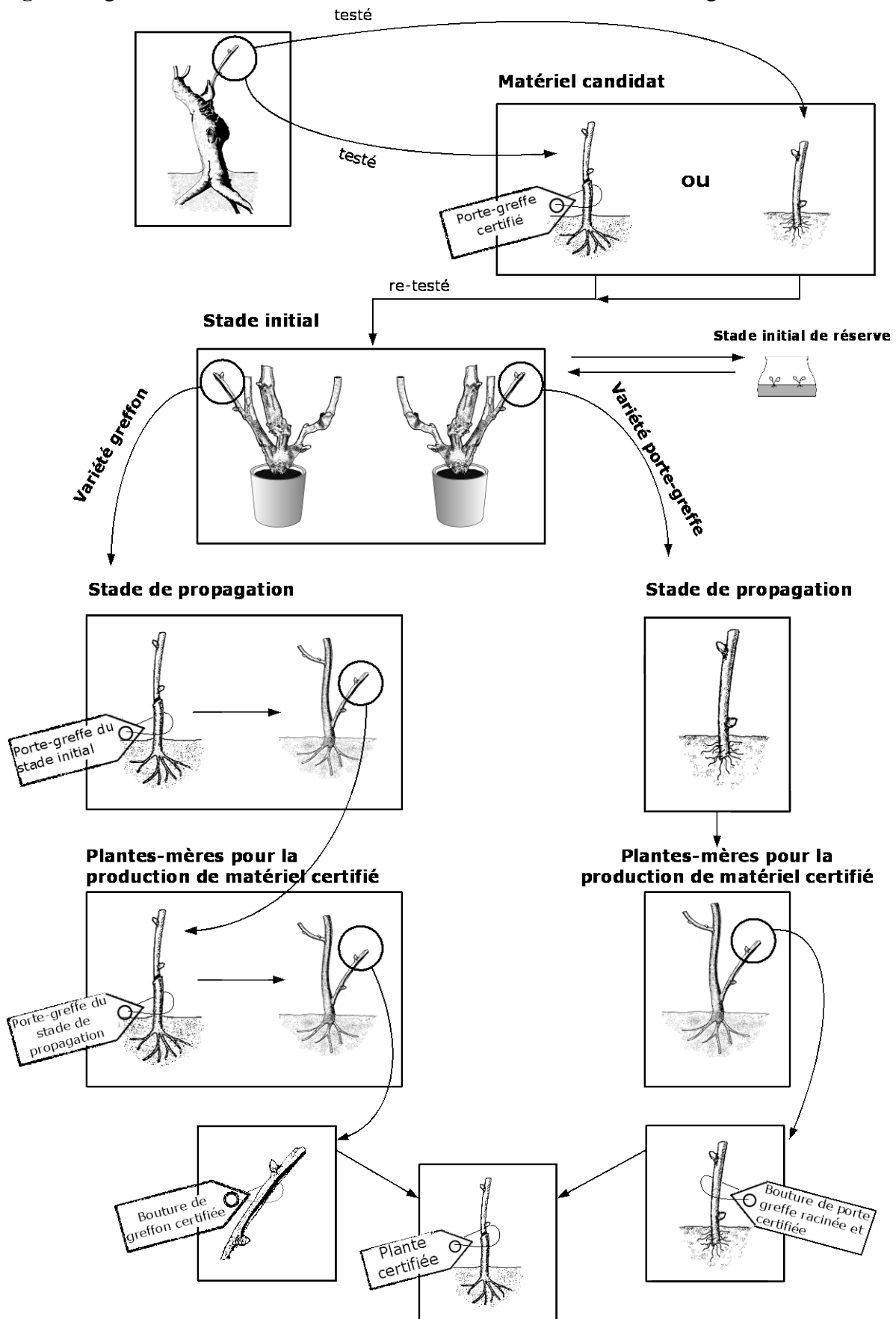


Table 2. Principales plantes indicatrices pour les virus et organismes analogues aux virus de la vigne*

| Plante indicatrice | Maladie identifiée |
|--|--|
| 1. <i>Vitis rupestris</i> St George | Dégénérescence [†] , marbrure, rupestris stem pitting |
| 2. <i>Vitis vinifera</i> Cabernet franc, Pinot noir et autres cultivars à baies rouges | Enroulement [‡] |
| 3. Kober 5BB (<i>Vitis berlandieri</i> × <i>Vitis riparia</i>) | Kober stem grooving |
| 4. LN 33 (Couderc 1613 × <i>Vitis berlandieri</i>) | Ecorce liégeuse, énation, LN33 stem grooving |
| 5. <i>Vitis riparia</i> Gloire de Montpellier | Mosaïque des nervures [§] |
| 6.110 R (<i>Vitis rupestris</i> × <i>V. berlandieri</i>) | Nécrose des nervures [§] |

* L'annexe 1 détaille les conditions des tests et suggère d'autres plantes indicatrices.

[†] Dans les pays où la dégénérescence est également provoquée par des népovirus autres que le grapevine fanleaf nepovirus, Siegfriedrebe (FS4 201/39) peut être utilisé comme plante indicatrice.

[‡] Le choix de la plante indicatrice la plus appropriée pour l'enroulement dépend des conditions climatiques dans la région où les tests sont effectués.

[§] Comme noté à l'annexe 1, ces plantes indicatrices sont optionnelles.

3. Maintien du stade initial

Mettre en pot (individuellement) un nombre limité de plantes (2-5) pour chaque provenance (clone) de chaque type de variété ou de porte-greffe, et les placer dans des conditions de culture garantissant l'absence de recontamination par les vecteurs aériens ou vecteurs du sol. A cet effet, les abris 'insect-proof', munis d'une double porte, avec sol recouvert de gravillons, de bâche plastique, de toile goudronnée ou de tout autre matériau évitant le contact entre les racines et la terre, sont appropriés. Les plantes du stade initial doivent être constamment surveillées et traitées régulièrement avec les produits phytosanitaires adéquats, afin de lutter contre les organismes nuisibles classiques de la vigne (organismes de qualité).

La conservation *in vitro* d'une série de réserve de chaque plante du stade initial pourra être envisagée lorsque des méthodes fiables de conservation *in vitro* de matériel génétique de *Vitis* seront mises au point.

Les plantes de la collection doivent être contrôlées tous les ans pour vérifier l'absence de symptômes de virus ou d'autres désordres d'origine pathologique. Les tests seront renouvelés si des méthodes de détection, des plantes indicatrices, des techniques moléculaires ou des antisérums nouveaux et plus efficaces deviennent disponibles, ou si les inspections visuelles en indiquent la nécessité.

4. Production du stade de propagation

Le stade initial doit être multiplié par le moins d'étapes possibles pour obtenir la quantité requise de stade de propagation. Le stade de propagation doit être établi, de préférence, sur des sols où la vigne n'a jamais été cultivée ou sur des sols où la vigne n'a pas été cultivée depuis au moins 6 ans. Ces sols doivent, dans tous les cas, être indemnes de nématodes vecteurs de virus. Les parcelles doivent être séparées de tout vignoble comportant du matériel d'une catégorie inférieure (certifié) par une distance de sécurité de 15-20 m, qui peut être réduite si le sol des champs adjacents (vignobles ou vergers) a été trouvé indemne de nématodes vecteurs de virus.

(a) *Porte-greffe*. Placer les boutures provenant de chaque type de porte-greffe (du stade initial) dans une serre pour les faire raciner, et transplanter directement au champ les boutures racinées. Chaque provenance doit être placée dans une parcelle ou un rang distinct, et doit être étiquetée pour pouvoir être aisément distinguée des autres.

(b) *Variétés*. Greffer chaque variété du schéma sur des porte-greffe du même niveau de certification, et transplanter les plants de vigne greffés au champ.

Tous les ans, contrôler visuellement le stade de propagation pour vérifier l'absence de symptômes de maladies transmissibles par greffage et tester immédiatement les plantes présentant des symptômes suspects. Tout au long de la production du stade de propagation, des tests par sondage doivent aussi être effectués pour les virus par des méthodes rapides (par ex. test ELISA, greffage en vert). Ce système de tests par sondage peut débuter lorsque les plantes ont 5 ans, en testant 10% des plantes chaque année de manière à ce que toutes les plantes aient été testées au moins une fois au bout de 10 ans.

5. Production de plantes certifiées

(a) *Variétés*. Les greffons issus du stade de propagation sont distribués aux pépinières. Dans les pépinières de production de plantes-mères de vigne, à partir desquelles sera issu le matériel certifié, les scions du stade de propagation doivent être greffés seulement sur des porte-greffe appartenant à la catégorie de stade de propagation.

(b) *Porte-greffe*. Les boutures racinées qui deviendront des plantes-mères de vigne pour la production de boutures ou de boutures racinées certifiées sont distribuées aux pépinières.

Les plantes-mères destinées à la production de matériel certifié (scions, boutures racinées de porte-greffe, vignes greffées) doivent être plantées dans des parcelles distantes d'au moins 8-10 m d'autres vignobles ou vergers, et dans des sols indemnes de nématodes vecteurs de virus. Les pépinières doivent présenter un certificat d'analyse nématologique, délivré par une organisation officielle ou officiellement agréée.

Tout au long de la production du matériel certifié dans les pépinières, des tests par sondage pour détecter les virus doivent également être effectués, en utilisant des méthodes rapides (par ex. test ELISA, greffage en vert).

6. Administration du schéma de certification

Supervision du schéma

Une organisation officielle doit être responsable de l'administration et de la supervision du schéma. Si les différents stades du schéma sont réalisés par des pépinières agréées, l'organisation officielle doit confirmer que tous les tests et inspections nécessaires ont été effectués pendant la production et doit vérifier l'état sanitaire général des plantes du schéma par des inspections visuelles. Sinon la certification ne sera pas accordée et/ou les plantes concernées ne pourront pas rester dans le schéma de certification.

Contrôle de l'utilisation et de l'état du matériel certifié

Tout au long de la procédure, l'origine de chaque plante doit être connue afin de pouvoir retrouver l'origine de tout problème phytosanitaire ou de conformité au type. L'utilisation dans les pépinières de matériel de propagation destiné à produire des plantes certifiées doit être supervisée par une organisation officielle ou officiellement reconnue qui contrôle l'état sanitaire, l'origine et la quantité de ce matériel, en se basant sur les inspections au champ, ainsi que sur les rapports et les documents présentés par les pépiniéristes. Le programme de protection phytosanitaire des pépinières et les inspections doivent prendre en compte les autres organismes nuisibles importants qui affectent la qualité, de façon à ce que les plantes certifiées vendues au producteur en soient pratiquement indemnes. Le matériel certifié destiné à l'exportation doit, dans tous les cas, répondre aux exigences phytosanitaires des pays importateurs. Les plantes certifiées quittant le schéma doivent porter un certificat officiel (pouvant être une étiquette) pour indiquer l'autorité responsable de la certification, le producteur et le statut de certification des plantes et le nom de la variété et du porte-greffe.

Annexe 1 Directives sur les procédures de test

1. Tests sur plantes indicatrices du genre *Vitis*

L'utilisation de plantes indicatrices du genre *Vitis* reste une étape obligatoire du programme de certification de la vigne. Elle ne peut pas être exclue en raison de l'existence de certaines maladies (enroulement et complexe du bois strié) qui ne peuvent être identifiées que sur des hôtes ligneux différentiels. Les tests sont effectués par greffage sur les plantes indicatrices citées au tableau 2. Au minimum trois répétitions de chaque variété ou type de porte-greffe entrant dans le schéma sont greffées sur chaque indicateur, et 6-8 greffons au total sont donc nécessaires pour chaque plant de vigne candidat. Plusieurs techniques de greffage peuvent être utilisées:

- (a) Greffage à l'anglaise ou en fente au champ
- (b) Greffage mécanique
- (c) Greffage en vert (Walter *et al.*, 1990)

Il est admis que le greffage en vert présente des avantages par rapport aux autres méthodes. Par conséquent, un effort doit être fait pour encourager son utilisation.

2. Test ELISA

L'utilisation du test ELISA est recommandée pour le *Grapevine fanleaf virus* et les autres népovirus européens dans les zones où ils sont présents, ainsi que pour les *Closteroviridae* (GLRaV 1 à 9), les vitivirus (GVA et GVB) et les maculavirus (GFkV) pour lesquels on dispose d'antisérum. Les antigènes pour les tests ELISA peuvent provenir des bourgeons, des racines, des feuilles ou de copeaux de bois de vigne. Les copeaux de bois présentent des avantages: (i) ils peuvent être utilisés toute l'année, sans perte apparente d'efficacité liée aux variations saisonnières du taux d'antigène dans les organes végétatifs; (ii) ils donnent un bruit de fond faible et constant; (iii) ils sont beaucoup plus fiables pour l'identification des virus de la famille *Closteroviridae* sur les porte-greffe américains, en particulier *Vitis rupestris* et ses hybrides. Le test ELISA peut être considéré comme un complément aux autres méthodes de diagnostic, sans toutefois pouvoir les remplacer. Il peut servir notamment pour un criblage préliminaire ou pour des tests par sondage.

3. Tests moléculaires

La popularité de la PCR a augmenté au cours des dernières années en raison de sa plus grande sensibilité par rapport aux méthodes biologiques et aux tests ELISA. La PCR est particulièrement utile si les antisérums pour les tests ELISA ne sont pas disponibles ou ne conviennent pas. Il a été montré que l'utilisation de la RT-PCR peut augmenter (d'au moins 10%) le nombre d'échantillons positifs, surtout pour la détection du GFLV et du GFkV (Faggioli & La Starza, 2006). Pour cette raison l'utilisation de la RT-PCR, dans des réactions simples ou multiplexes, est fortement suggérée pour les échantillons présentant un résultat négatif au test ELISA. Cette procédure réduira le nombre de greffes sur plantes indicatrices, avec pour conséquence que quasiment 90% des clones candidats donneront des résultats négatifs par les méthodes biologiques. Des protocoles de RT-PCR multiplexe (mRT-PCR) ont été mis au point pour détecter plusieurs virus en une seule réaction, permettant ainsi un diagnostic de routine rapide, fiable et de bonne efficacité-coût (Faggioli & La Starza, 2006; Gambino & Gribaudo, 2006).

Le phloème prélevé en raclant des rameaux matures collectés lors de la taille d'hiver constitue le meilleur tissu pour l'extraction de l'ARN. Différents protocoles d'extraction totale de l'ARN peuvent être appliqués. Plusieurs séries d'amorces pour la détection des virus peuvent être utilisées dans des combinaisons simples ou multiplexes (Faggioli & La Starza, 2006; Gambino & Gribaudo, 2006). Les tests moléculaires sont utiles pour le criblage précoce du matériel destiné à la culture de tissus, dans le cadre des programmes d'amélioration sanitaire, car ils nécessitent une quantité faible de tissus frais cultivés *in vitro* (200 mg).

4. Détection des maladies individuelles

Plusieurs maladies et virus (tels que l'énation, la nécrose des nervures, la mosaïque des nervures, l'*Artichoke Italian latent virus*, le *Grapevine Bulgarian latent virus* et le *Grapevine Tunisian ringspot virus*) faisaient partie de la première version de ce schéma de certification OEPP, mais ils en ont été supprimés en raison de leur rareté et de leur faible importance.

Court-noué (GFLV)

Transmission par greffage

Plante indicatrice: *Vitis rupestris* St George

Nb. de plantes par test: 3-5 boutures racinées

Inoculum: Écussons de bois, bourgeons isolés, rameaux à bourgeons, extrémités de pousses

Température: 22-24°C

Symptômes: (a) Symptômes de la phase aiguë (choc). Taches chlorotiques, anneaux et lignes, nécroses localisées 3-4 semaines après le greffage (écussonnage ou greffage en vert).

(b) Symptômes chroniques. Croissance réduite, feuilles sévèrement déformées avec des dents plus aiguës (souches déformantes), décolorations jaune vif et légère déformation des feuilles (souches de mosaïque jaune).

Tests recommandés : Sérologique (ELISA), moléculaires (RT-PCR, sondes).

Dégénérescence de la vigne (népovirus européens)

Transmission par greffage

Plante indicatrice: Plusieurs cultivars de *Vitis vinifera*: Pinot noir, Jubileum 75 (GCMV); Siegfriedrebe (ArMV, RRV, TBRV)

Nb. de plantes par test: 3-5 boutures racinées

Inoculum: Écussons de bois, bourgeons isolés, rameaux à bourgeons, extrémités de pousses

Température: 22-24°C

Symptômes: Rabougrissement sévère et nécrose de l'apex sur Pinot noir durant la deuxième année de végétation (GCMV); décolorations foliaires et déformations des rameaux sur Siegfriedrebe durant l'année qui suit l'inoculation.

Tests recommandés : Sérologique (ELISA), moléculaires (RT-PCR, sondes).

Enroulement (les GLRaV). Vérification obligatoire pour au moins : GLRaV 1, 2, 3

Transmission par greffage

Plantes indicatrices: Plusieurs cultivars à baies rouges de *V. vinifera* (Pinot noir, Cabernet franc, Merlot, Barbera, Mission)

Nb. de plantes par test: 3-5 boutures racinées

Inoculum: Écussons de bois, bourgeons, rameaux à bourgeons, extrémités de pousses

Température: 22°C (greffage en vert)

Symptômes: Enroulement et rougissement des feuilles au bout de 4-6 semaines (greffage en vert) ou de 6-8 mois à 2 ans (test en plein champ)

Tests recommandés : Sérologique (ELISA), moléculaires (RT-PCR, sondes).

Complexe du bois strié (GVA, GVB)

Transmission par greffage

Plante indicatrice: Kober 5BB

Nb. de plantes par test: 3-5 boutures racinées

Inoculum: Écussons de bois ou bourgeons isolés (recommandé pour le rupestris stem pitting), rameaux à bourgeons

Température: 22°C (greffage en vert)

Symptômes: cannelure du bois (Kober stem grooving).

Tests recommandés : Sérologique (ELISA), moléculaires (RT-PCR, sondes)

Marbrure (GFkV)¹

Transmission par greffage

Plante indicatrice: *Vitis rupestris* St George

Nb. de plantes par test: 3-5 boutures racinées

Inoculum: Écussons de bois, bourgeons isolés, rameaux à bourgeons, extrémités de pousses

Température: 22°C (greffage en vert ou chambre climatique)

Symptômes: Éclaircissement des nervures secondaires au bout de 4-6 semaines en fonction des conditions de culture.

Tests recommandés : Sérologique (ELISA), moléculaires (RT-PCR, sondes).

Jaunisses de la vigne (flavescence dorée, bois noir et autres jaunisses européennes)

Symptômes: Observation des symptômes au champ en été. Jaunissement ou rougissement des feuilles en fonction du cultivar. Les feuilles s'enroulent vers le bas et deviennent cassantes. Les zones internervaires des feuilles peuvent subir une nécrose. Les pousses présentent une lignification incomplète et des rangées de pustules noires se développent sur l'écorce verte le long des branches malades ; celles-ci sont minces, ont l'aspect du caoutchouc et sont pendantes.

Tests recommandés : Moléculaire (PCR), des détails figurent dans le protocole de diagnostic de l'OEPP (Norme OEPP PM7/79, 2007).

Annexe 2 Directives sur les mesures sanitaires

1. Thermothérapie

Tous les agents infectieux de la vigne connus pour être transmissibles par greffage, à l'exception des viroïdes, peuvent être éliminés par thermothérapie des diverses parties des plantes infectées, mais avec un niveau d'efficacité variable. Quelle que soit la méthode de thermothérapie utilisée, l'état sanitaire du matériel traité doit être vérifié par la suite. Le traitement du matériel doit être séparé de la fin des tests virologiques par un intervalle suffisant pour éviter les résultats faux négatifs. L'utilisation de la technique de RT-PCR

¹ Doit être absent seulement pour les porte-greffe.

aidera à sélectionner le matériel pour lequel l'amélioration sanitaire a réussi, en évitant les faux négatifs dus à la très faible concentration de virus après la première étape de l'amélioration sanitaire.

Traitement à l'air chaud

Placer des plants de vigne cultivés en pot et en croissance végétative (par ex. boutures racinées de 2 ans ou plus) de chaque variété ou type de porte-greffe à introduire dans le schéma dans une chambre climatique, où sera maintenue une température constante de $38\pm 1^\circ\text{C}$ avec un éclairage artificiel de 16-18 h. Au moins 4 semaines après le début du traitement (jusqu'à 300 j si les vignes survivent), prélever des extrémités de 0,5-1 cm de long sur les pousses végétatives, et les faire raciner sur un lit de sable chauffé (25°C), sous brumisation, ou dans un milieu nutritif gélosé dans des conditions stériles après avoir désinfecté la surface des explants. Repiquer en pot les explants racinés et les laisser pousser en serre jusqu'à ce qu'ils soient prêts pour les tests. Pour plus d'informations, voir Goheen & Luhn (1973), Martelli (2002), Ottenwaelter *et al.* (1973), Stellmach (1980).

Traitement à l'eau chaude

Le traitement à l'eau chaude des rameaux en dormance est utilisé avec succès pour éliminer les phytoplasmes, partiellement *Agrobacterium vitis* et plusieurs autres organismes nuisibles. Le matériel dormant est immergé dans une eau agitée à 50°C et traité pendant 45 minutes en suivant la méthode de Caudwell *et al.* (1991). Le traitement à l'eau chaude doit être effectué immédiatement avant le greffage, à la fin du stockage, dans un matériel conçu à cet effet et permettant de maintenir précisément la température requise dans l'ensemble du matériel végétal par un système de mélange efficace (Burr *et al.*, 1996; Boudon-Padieu & Grenan, 2002).

2. Culture in vitro de méristèmes

Prélever des extrémités de pousses ou des bourgeons axillaires sur des plants de vigne cultivés à $36-38^\circ\text{C}$, désinfecter les explants en surface en les trempant pendant 20 min dans une solution commerciale à 5% d'hypochlorite de sodium et de 0,1% de Tween 20. Rincer abondamment 2-3 fois (10 min pour chaque rinçage) avec de l'eau distillée stérile.

Prélever des explants de 0,4-0,6 mm de long comprenant le dôme méristématique et la première paire de primordia foliaires et les transférer dans des tubes stériles contenant le milieu gélosé de Murashige et Skoog additionné de 0,5 ppm de benzylaminopurine. Laisser les explants se développer pendant 45 j à 25°C dans une chambre climatique avec un éclairage artificiel journalier de 16 h (environ 4000 lux).

Sélectionner les pousses en croissance active et les transférer individuellement sur un milieu contenant 1 ppm de benzylaminopurine pendant 45-50 j d'élongation. Transférer individuellement les pousses (3 nœuds ou plus) sur un milieu contenant 0,5-1 ppm d'acide indolbutyrique pour la production de racines. Transférer les explants racinés dans des godets contenant de la vermiculite dans des conditions d'humidité saturante, puis dans des pots contenant du compost; protéger les plants avec un sac plastique aussi longtemps que nécessaire (généralement 2-3 semaines). Cultiver ces jeunes plants en serre jusqu'à ce qu'ils soient prêts à être testés.

Pour plus de détails, voir Barlass *et al.* (1982).

Références

- Barlass M, Skeene KGM, Woodham RC & Krake LR (1982) Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro* apical culture. *Annals of Applied Biology* **101**, 291-295.
- Ben Abdallah F, Fnayou A, Mliki A & Ghorbel A (2000) New indexing strategy of virus and virus-like diseases of grapevine. *Extended abstracts of the 13th ICVG Meeting, 2000-03-12/17, Adelaide, Australia* (ed RH Symons), p 171.
- Bottalico G, Savino V & Campanale A (2000) Improvements in grapevine sanitation protocols. *Extended abstracts of the 13th ICVG Meeting, 2000-03-12/17, Adelaide, Australia* (ed RH Symons), p 167.
- Boudon-Padieu E & Grenan S (2002) Hot water treatment. ICVG website. <http://www.icvg.ch/data/icvghotw.pdf> [accessed on 2008-06-10].
- Burr TJ, Reid CL, Splittstoesser DF & Yoshimura M (1996) Effect of heat treatment on grape bud mortality and survival of *Agrobacterium vitis* *in vitro* and in dormant grape cuttings. *American Journal of Enology and Viticulture* **47**(2), 119-123

- Faggioli F & La Starza S (2006) One-step multiplex RT-PCR for simultaneous detection of eight grapevine viruses and its application in a sanitary selection program. *Extended abstracts of the 15th ICVG Meeting, 2006-04-03/07, Stellenbosch, South Africa*.
- Gambino G & Gribaudo I (2006) Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex RT-PCR with coamplification of a plant RNA as internal control. *Phytopathology*, **96**(11), 1223-1229.
- Greif C (2003) Les virus de la vigne et les schémas de sélection et certification phytosanitaire. Avis du pathologiste. *Progrès Agricole et Viticole* **120**, 14-15.
- Gribaudo I, Mannini F, Cuozzo D, Gobetto, M, Lenzi R & Credi R (2002) Elimination of virus and virus-like diseases from grapevine clones. *Quaderni di Scienze Viticole ed Enologiche*. University of Torino, 25, 39-50.
- Gugerli P (2000) Diagnosis of grapevine virus disease: an overview and a practical implementation.
- Mannini F & Girando I (2004) Healing grapevine of virus and phytoplasma diseases and results. *Proceedings of 'La Vite – Convegno Nazionale', 2004-12-02/03, Torino, Italy*, pp 1-13.
- Mannini F, Rolle L & Guidoni S (2003) Vineyard management to optimize grape quality in virus-free clones of *Vitis vinifera* L. *Acta Horticulturae* no. 603, 121-126.
- Martelli GP (2002) [The current status of virus disease of grapevine.] Le principali virosi della vite oggi. *Informatore Fitopatologico* **52**(4), 18-27 (in Italian).
- Milkus BN, Avery JD & Pinska VN (2000) Elimination of grapevine viruses by heat treatment and meristematic shoot tip culture. *Extended abstracts of the 13th ICVG Meeting, 2000-03-12/17, Adelaide, Australia* (ed RH Symons), p 174.
- OEPP/EPPO (1992) Recommandations du Conseil de l'OEPP en 1981: certification virologique des arbres fruitiers, greffons et porte-greffe. *Documents techniques de l'OEPP* n° 1013, 42-43.
- OEPP/EPPO (2007) EPPO Standard PM 7/79. Diagnostics. Grapevine flavescente dorée phytoplasma. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **37**, 536-542.
- OEPP/EPPO (2009) EPPO Standard PM 4/35(1) Soil test for virus–vector nematodes in the framework of EPPO Standard PM 4 Schemes for the production of healthy plants for planting of fruit crops, grapevine, Populus and Salix. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **39**, 284–288.
- Walter B & Etienne L (1987) Detection of the grapevine fanleaf virus away from the period of vegetation. *Journal of Phytopathology* **120**, 355-364.
- Walter B & Martelli GP (1998) Considerations on grapevine selection and certification. *Vitis* **37**, 87-90.
- Walter B, Bass P, Legin R, Vernoy R, Collas A & Vesselle G (1990) The use of a green grafting technique for the detection of virus-like disease of the grapevine. *Journal of Phytopathology* **128**, 137-145.