

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

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

Certification sanitaire d'arbres et de porte-greffe d'olivier

Champ d'application spécifique

Cette norme décrit la production d'arbres et de porte-greffe d'olivier soumis à une certification sanitaire.

Approbation et amendement spécifiques

Approbation initiale en 1996-09.

Révision approuvée en 2005-09.

Le schéma de certification sanitaire d'arbres et de porte-greffe d'olivier (*Olea europea*) fournit des conseils détaillés sur la production de variétés multipliées pour être cultivées sur leurs propres racines, de porte-greffe multipliés par voie végétative ou par pousse, et d'arbres greffés. Bien que la production de végétaux greffés soit couverte dans ce schéma, il doit être noté que, dans la pratique, les plants d'olivier sont principalement produits par l'enracinement de pousses sur un lit chauffé. Le matériel végétal produit selon ce schéma de certification est tiré des plantes du matériel initial qui ont été testées et trouvées exemptes des agents pathogènes suivants : *Arabid mosaic nepovirus* (ArMV), *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV), *Strawberry latent ringspot sadwavirus* (SLRSV), Olive leaf-yellowing associated closterovirus (OLYaV), *Cherry leaf roll nepovirus* (CLRV), et produites dans des conditions minimisant l'infestation par d'autres organismes nuisibles.

Le matériel oléicole certifié pour l'exportation doit satisfaire dans tous les cas les réglementations phytosanitaires des pays importateurs, particulièrement par rapport aux agents pathogènes couverts par le schéma qui sont aussi 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-greffes d'olive certifiés, les étapes successives suivantes doivent être suivies :

1. Sélection pour une qualité pomologique : les plants individuels de chaque variété et les porte-greffes à prendre dans le schéma sont sélectionnés.
2. Production du matériel initial : les plantes candidates au matériel initial sont multipliées par pousses, boutures ou greffes. Pour des plantes candidates au matériel initial greffées, des porte-greffes appartenant au matériel initial doivent être utilisés. Les plantes candidates sont maintenues isolées du matériel initial. Le matériel initial candidat est testé et maintenu dans des conditions assurant l'absence d'infection. Seules les plantes candidates au matériel initial qui ont répondu à toutes les exigences sont considérées comme appartenant au matériel initial.
3. Maintien du matériel initial : les plantes du matériel initial sont maintenues dans des

conditions assurant l'absence d'infection, avec de nouvelles analyses si nécessaire. Les plantes doivent être cultivées dans des conteneurs de milieu de croissance stérilisé, isolés du sol.

4. Production du matériel de propagation : le matériel de propagation est produit à partir de matériel initial avec le moins d'étapes possible dans des conditions assurant l'absence d'infection.
5. Production de plants certifiés : les plants certifiés (variétés, porte-greffes ou arbres greffés) sont produits dans des pépinières à partir du matériel de propagation. Pour les arbres greffés, des porte-greffes ayant au minimum le niveau de certification du matériel de propagation standard doivent être utilisés.

Tout au long de la procédure, des précautions doivent être prises pour conserver les caractéristiques pomologiques du matériel sélectionné au départ. Des contrôles doivent être incorporés pour détecter d'éventuelles mutations, surtout pour les variétés.

Le schéma est représenté par le diagramme de la Figure 1. Le schéma de certification doit être mis en œuvre par une organisation officielle ou officiellement agréée, une pépinière spécialisée ou un laboratoire se conformant aux critères définis (voir la *Norme OEPP PM 4/7(2)*). Toutes les analyses et inspections durant la production doivent être enregistrées. Si les stades du schéma de certification sont conduits par une pépinière agréée, la certification sera accordée par l'organisation officielle sur les bases des enregistrements des analyses et inspections effectuées durant la production, et sur la base des inspections visuelles pour vérifier l'état phytosanitaire apparent du matériel.

1. Sélection des candidats pour le matériel initial

Variétés

Un certain nombre d'arbres en production, présentant les caractères typiques de chaque variété ou clone à prendre en compte dans le schéma (authenticité variétale) doit être sélectionné dans différents vergers et/ou dans des parcelles d'essais pomologiques.

Plantules de porte-greffe

Des plantes d'apparence saine, vigoureuses, poussant uniformément et bien racinées pour chaque type de porte-greffe à prendre en compte dans le schéma doivent être sélectionnées dans différents lits de germination.

Arbres pour la production de semences pour porte-greffe

Des arbres vigoureux et en production doivent être sélectionnés dans différents vergers ou plantations, pour chaque type de porte-greffe à prendre en compte dans le schéma. Les arbres sélectionnés doivent être indemnes de symptômes apparents de virus, et aussi peu affectés que possible par des maladies transmissibles par greffage. Les arbres sélectionnés doivent être reconnus, autant que possible, capables de fournir une descendance à croissance homogène et respectant la variété, sinon des études doivent être menées à ce sujet.

Fig. 1. Diagramme des stades du schéma de certification de l'olivier.

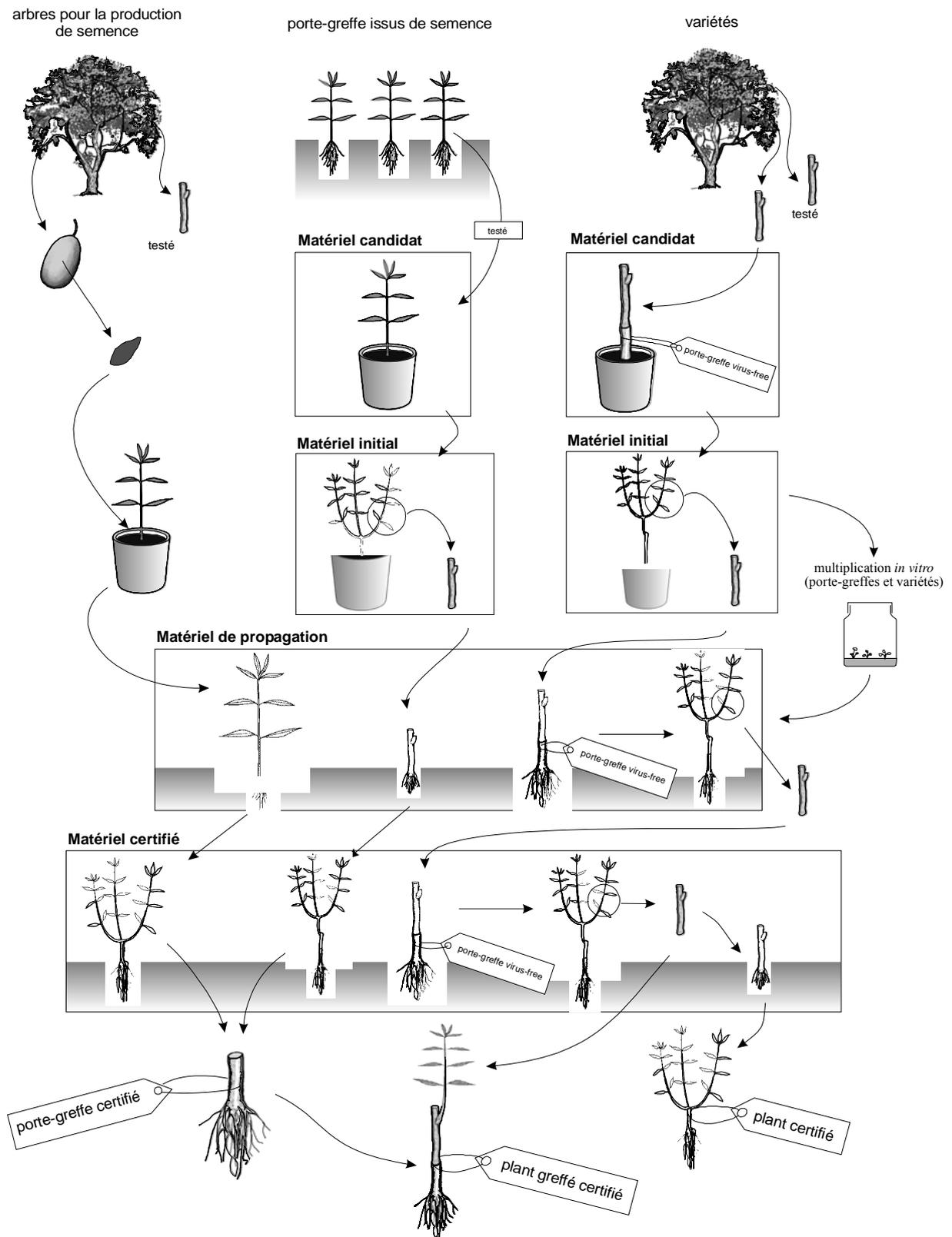


Tableau 1. Virus présents chez l'olivier

Virus	Répartition géographique	Fréquence	Références
<i>Strawberry latent ringspot sadwavirus</i> (SLRSV)	Italie, Espagne, Portugal, Turquie	Répandu	Bertolini et al. (1998) Caglayan et al. (2004) Henriques et al. (1990, 1992) Marte et al. (1986) Savino et al. (1979)
<i>Olive latent ringspot nepovirus</i> (OLRSV)	Italie, Portugal	Répandu	Rei et al. (1993) Savino et al. (1983)
<i>Arabid mosaic nepovirus</i> (ArMV) (1)	Italie, Portugal, Turquie	Rare	Caglayan et al. (2004) Savino et al. (1979)
<i>Cherry leaf roll nepovirus</i> (CLRV)	Italie, Espagne, Portugal	Répandu	Bertolini et al. (2001) Caglayan et al. (2004) Rei et al. (1993) Savino & Gallitelli (1981)
<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i> (CMV) (2)	Italie, Espagne, Portugal, Turquie	Répandu	Bertolini et al. (2001) Caglayan et al. (2004) Rei et al. (1993) Savino & Gallitelli (1983)
<i>Olive latent necrovirus 1</i> (OLV-1)	Italie, Jordanie	Rare	Gallitelli & Savino (1985) Martelli et al. (1995)
<i>Olive latent oleavirus 2</i> (OLV-2)	Italie	Rare	Savino et al. (1984)
Olive leaf yellowing associated closterovirus (OLYaV)	Italie	Répandu	Sbanadzovic et al. (1996) Savino et al. (1996)
Olive vein yellowing associated potexvirus (OVYaV)	Italie	Rare	Faggioli & Barba (1995)
<i>Tobacco mosaic tobamovirus</i> (TMV)	Italie	Rare	Triolo et al. (1996)
Olive semilatif virus (OSLV)	Italie	Rare	Materazzi et al. (1996)
Olive yellow mottling and decline associated virus (OYMDaV)	Italie	Rare	Savino et al. (1996)
<i>Tobacco necrosis necrovirus</i> (TNV)	Portugal	Rare	Felix & Clara (2002)

2. Production de matériel initial

Le matériel de propagation doit être prélevé sur des arbres sélectionnés pour leurs qualités pomologiques. Ce matériel doit être écussonné ou greffé sur des porte-greffes testés pour les agents pathogènes, ou de jeunes pousses âgées de 1 an doivent être enracinées dans un lit chauffé de vermiculite à 100% d'humidité dans un abri insect-proof isolé, convenablement conçu, et séparé du matériel initial (en quarantaine). Les plantules bien enracinées (3 mois sont généralement suffisants pour obtenir des plantules enracinées) doivent être transplantées dans des conteneurs appropriés. Les plantes doivent être cultivées sur un substrat stérilisé dans des conteneurs isolés du sol pour éviter tout type de contamination et testées pour les virus et autres organismes nuisibles pouvant être transmis par le matériel de propagation et cités dans le Tableau 1, à l'aide des méthodes de l'Annexe I. A ce jour, 13 virus de 7 genres ont été isolés à partir d'oliviers (Tableau 1). Les plantes ayant donné des résultats négatifs à tous les tests peuvent être considérées comme appartenant au matériel initial et transplantées dans la parcelle du matériel initial, ou multipliées pour donner du matériel initial.

Note

La plupart des virus concernés ont été isolés d'arbres asymptomatiques et signalés seulement sur un arbre ou un très petit nombre d'arbres (par exemple *Olive latent ringspot nepovirus* (OLRSV), *Olive semilatif virus* (OSLV)). Le *Strawberry latent ringspot sadwavirus* (SLRSV) chez l'olivier a été bien étudié. Il a été signalé pour la première fois en 1979 dans le centre de l'Italie et son rôle dans l'apparition de la maladie du 'fruit bosselé' sur le cultivar 'Ascolana tenera' a ensuite été déterminé. Par ailleurs, son effet sur certains paramètres morphologiques du cultivar 'Raggiola' a été clairement démontré, confirmant son importance pathogénique et économique parmi les virus de l'olivier. D'autres virus de l'olivier ont été trouvés associés à des symptômes spécifiques. Par exemple, l'*Arabis mosaic nepovirus* (ArMV), le *Cherry leaf roll nepovirus* (CLRV), l'*Olive vein yellowing associated potexvirus* (OVYaV) et l'*Olive leaf yellowing associated closterovirus* (OLYaV) ont été associés avec la maladie appelée leaf-yellowing complex disease. L'OSLV a été associé avec la maladie du vein clearing et le *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV) avec la maladie du vein banding. Cependant, il n'y a pas de preuve formelle de la liaison étiologique de ces virus avec ces maladies.

3. Maintien du matériel initial

Les plantes du matériel initial doivent être conservées dans un abri insect-proof de conception adéquate, contenant uniquement des plantes de matériel initial. Elles doivent être placées dans les mêmes conditions et subir les mêmes contrôles portant sur l'absence de pathogènes que les plantes candidates au stade de matériel initial. Il faut maintenir un nombre limité de plantes du matériel initial (au moins 2) de chaque source, pour chaque variété, type de porte-greffe ou arbre destiné à la production de semences admis dans le schéma, et s'assurer que l'authenticité variétale a bien été conservée. Au début toutes les sources pour chaque variété, type de porte-greffe ou arbre destiné à la production de semences doivent être maintenues. Toutefois, le nombre de sources peut être réduit lorsque les comparaisons pomologiques ont été réalisées et que les meilleures sources sont connues. Chaque plante du matériel initial doit être testée régulièrement pour vérifier l'absence de tous les virus listés dans le Tableau 2 (chaque plante doit être testée au moins tous les 7 ans), et inspectée visuellement pour détecter les infections par *Verticillium dahliae*, *Spilocaea oleagina*, *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi*, et les infestations d'*Euzophera pinguis* et *Saissetia oleae*. Les plantes doivent également être inspectées visuellement tous les ans pour détecter les éventuelles mutations.

Tableau 2. Virus et autres agents pathogènes couverts par ce schéma

Organisme nuisible	Répartition géographique	Transmission
<i>Arabis mosaic nepovirus</i> (ArMV)	Europe, Japon, Nouvelle-Zélande, (signalements isolés ailleurs)	<i>Xiphinema diversicaudatum</i>
<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i> (CMV)	Mondiale	Pucerons
<i>Strawberry latent ringspot sadwavirus</i> (SLRSV)	Europe (signalements isolés ailleurs)	<i>Xiphinema diversicaudatum</i>
Olive leaf yellowing associated closterovirus (OLYaV)	Europe	Pseudococcides
<i>Cherry leaf roll nepovirus</i> (CLRV)	Europe	Pollen, graine
<i>Verticillium dahliae</i>	Mondiale	
<i>Pseudomonas syringae</i> ssp. <i>savastanoi</i>	Mondiale	
<i>Euzophera pinguis</i>	Bulgarie, Espagne, Tunisie	
<i>Saissetia oleae</i>	Mondiale	

4. Production du matériel de propagation

Le matériel initial est multiplié, avec le moins d'étapes possible, pour obtenir une quantité suffisante de matériel de propagation. Pour les plantes greffées, le matériel initial doit être écussonné ou greffé sur des porte-greffes de niveau de certification équivalent ou sur des plantules de porte-greffes produites dans les conditions du matériel initial. La multiplication *in vitro* à partir de boutons axillaires provenant de plantes de matériel initial peut aussi être utilisée (Annexe III) à la fois pour les variétés et pour les porte-greffes. Pour éviter les mutations, la multiplication *in vitro* de clones chimériques n'est pas autorisée. On doit faire attention à limiter le nombre d'étapes de multiplication (par exemple un maximum de 10 sous-cultures pour la phase de multiplication). La durée totale des étapes de multiplication ne doit pas excéder 4 ans, et le stockage au froid n'est pas autorisé pour plus de 12 mois. On doit faire attention à empêcher la formation de cals et toute culture *in vitro* montrant des anomalies morphologiques (par exemple des fasciations) doit être éliminée.

Le matériel de propagation est conservé sous abri ou à l'extérieur, dans des conteneurs de milieu de culture stérilisé ou dans du sol testé et trouvé indemne de *Xiphinema diversicaudatum*, *Meloidogyne arenaria*, *Pratylenchus vulnus* (voir la Norme OEPP PM 4/34, en préparation) et *Verticillium dahliae* (Annexe II). Au champ, le matériel de propagation doit être séparé d'au moins 20 m de tout matériel d'olivier, et suffisamment éloigné des sources d'infection (par ex. l'eau d'irrigation doit être filtrée et une bande de 2 m de large autour de la parcelle doit être maintenue exempte de toute végétation). Le matériel de propagation doit être surveillé de façon continue et traité régulièrement avec les produits phytosanitaires appropriés, afin de contrôler les organismes nuisibles attaquant habituellement l'olivier. Des précautions générales contre l'infection doivent être maintenues, et des mesures de contrôle appropriées doivent être prises si un quelconque organisme nuisible est observé.

Le matériel de propagation doit être inspecté visuellement chaque année pour les symptômes de virus et pour les autres organismes nuisibles mentionnés ci-dessus. Toute plante infectée doit être enlevée. S'il y a une indication que l'infection peut provenir de la génération précédente, il est conseillé d'enlever toutes les plantes du lot et de retester la plante source éventuelle. Les plantes doivent être inspectées visuellement pour détecter d'éventuelles mutations et une évaluation pomologique des olives peut aussi être faite.

5. Production de matériel certifié

Pour la production d'oliviers greffés certifiés, le scion doit être greffé ou écussonné seulement sur des porte-greffes de niveau de certification équivalent (c'est-à-dire de matériel de propagation) ou de niveau supérieur. Les plantes à certifier doivent être placées en pépinière dans du sol testé et trouvé indemne de *Xiphinema diversicaudatum*, *Meloidogyne arenaria*, *Pratylenchus vulnus* et *Verticillium dahliae* (ou ayant subi une fumigation et puis un nouveau test pour vérifier l'absence de ces organismes nuisibles), séparées d'au moins 4 m de tout matériel d'olivier, et suffisamment éloignées des sources d'infection (par ex. l'eau d'irrigation doit être filtrée, et une bande de 2 m de large autour de la parcelle doit être maintenue exempte de toute végétation).

Pour être certifiées, les plantes doivent être inspectées par l'organisation officielle pour les symptômes de virus, les maladies semblables aux virus ou tout organisme nuisible mentionné ci-dessus. Toute plante montrant des symptômes doit être enlevée et la certification peut être accordée au reste.

6. Administration du schéma de certification

Suivi du schéma

Une organisation officielle doit être responsable de l'administration et du suivi du schéma. Si des pépinières officiellement agréées exécutent les différents stades du schéma, l'organisation officielle doit confirmer que tous les tests et inspections nécessaires ont été réalisés durant la production et doit vérifier l'état sanitaire général des plantes dans le schéma par des inspections visuelles. Sinon la certification ne sera pas accordée et/ou les plantes concernées ne seront pas autorisées à continuer dans le schéma de certification.

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

Tout au long du schéma de certification, l'origine de chaque plante doit être connue de sorte que tout problème phytosanitaire ou d'authenticité variétale soit traçable. L'utilisation du matériel de propagation dans les pépinières pour produire des plantes certifiées doit être vérifiée par une organisation officielle ou officiellement agréée qui contrôle l'état sanitaire, l'origine et la quantité d'un tel matériel, en se basant sur les inspections au champ, les rapports et les documents présentés par la pépinière.

Le programme de protection phytosanitaire de la pépinière et les inspections doivent prendre en compte d'autres organismes nuisibles qui peuvent affecter la qualité afin que les plantes certifiées, vendues au producteur, soient pratiquement indemnes de ces organismes nuisibles. Le matériel certifié d'olivier 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 (qui peut être une étiquette) indiquant l'autorité certificatrice, le producteur et le niveau de certification des plantes.

Références

- Bertolini E, Fadda Z, Garcia F, Celada B, Olmos A, Del Rio C, Caballero J, Duran-Vila N & Cambra M (1998) Virus diseases of olive detected in Spain. New diagnostic methods. *Phytoma España* no. 102, 191–193.
- Bertolini E, Olmos A, Martinez MC, Gorris MT & Cambra M (2001) Singlestep multiplex RT-PCR for simultaneous and colorimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *Journal of Virological Methods* 96, 33–41.
- Bertolini E, Olmos A, Lopez MM & Cambra M (2003) Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* in olive trees. *Phytopathology* 93, 286–292.
- Butterfield EJ & De Vay JE (1977) Reassessment of soil assays for *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 67, 1073–1078.
- Caglayan K, Fidan U, Tarla G & Gazel M (2004) First report of olive viruses in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 86, 91.
- Druart P (1997) Optimisation of culture media components for rooting *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan in vitro. *Biologia Plantarum* 39, 67–77.
- Faggioli F & Barba M (1995) An elongated virus isolated from olive (*Olea europaea*). *Acta Horticulturæ* no. 386, 593–599.
- Faggioli F, Ferretti L, Albanese G, Sciarroni R, Pasquini G, Lumia V & Barba M (2005) Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. *Journal of Plant Pathology* 87, 45–51.
- Faggioli F, Ferretti L, Pasquini G & Barba M (2002) Detection of Strawberry latent ringspot virus in leaves of olive trees in Italy using one-step RT-PCR. *Journal of Phytopathology* 150, 636–639.

Felix MR & Clara MIE (2002) Two necrovirus isolates with properties of olive latent virus 1 and tobacco necrosis virus from olive in Portugal. *Acta Horticulturae* no. 586, 725–728.

Gallitelli D & Savino V (1985) Olive latent virus 1. A single-RNA spherical virus isolate from olive in Apulia (southern Italy). *Annals of Applied Biology* 106, 295–303.

Goud JK & Termorshuizen AJ (2003) Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. *European Journal of Plant Pathology* 109, 523–534.

Grieco F, Alkowni R, Saponari M, Savino V & Martelli GP (2000) Molecular detection of olive viruses. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 30, 469–473.

Hadidi A & Candresse T (2001) Virus Detection – PCR. In: *Encyclopedia of Plant Pathology* (eds Maloy, OC & Murray, TD), pp. 1095–1100. Wiley, New York (US).

Hadidi A & Yang X (1990) Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. *Journal of Virological Methods* 30, 261–270.

Henriques MIC, Leitao F, Potes MF & Serrano JF (1990) [Viruses detected in *Olea europaea*.] In: *Congresso Iberico de Ciencias Hortícolas*, p. 245. Associação Portuguesa de Horticultura, Lisbon (PT) (in Portuguese).

Henriques MIC, Rei FT, Alit FA, Serena JF & Potes MF (1992) Immunodiagnostic of Strawberry Latent Ringspot Nepovirus. *Phytopathologia Mediterranea* 31, 127–132.

Lumia V, Ilardi V, Tomassoli L & Barba M (2001) Transgene detection in industrially processed genetically modified tomato. *Petria* 11, 159–165.

Marte M, Gadani F, Savino V & Rugini E (1986) Strawberry latent ringspot virus associated with a new disease of olive in central Italy. *Plant Disease* 70, 171–172.

Martelli GP (1999) Infectious diseases and certification of olive: an overview. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 29, 127–133.

Martelli GP, Sabanadzovic S, Savino V, Abou-Zurayc AR & Massanat M (1995) Virus-like diseases and viruses of olive in Jordan. *Phytopathologia Mediterranea* 34, 133–136.

Materazzi A, Toni S, Pantroni A, Osti M & Triolo E (1996) On the presence of a new isometric virus in *Olea europaea*. In: *Atti Convegno Annuale Della Società Italiana Di Patologia Vegetale*, pp. 57–59. Università Di Pisa, Pisa (IT).

Nadakavukaren MJ & Horner CE (1959) An alcohol agar medium selective for determining *Verticillium microsclerotia* in soil. *Phytopathology* 49, 527–528.

OEPP/EPPO (1992) Recommendations made by EPPO Council in 1981: certification of virus-tested fruit trees, scions and rootstocks. *EPPO Technical Documents* no. 1013, 42–43.

OEPP/EPPO (2001) Norme OEPP PM 4/7 (2) Schéma pour la production de végétaux sains destinés à la plantation – Exigences pour les établissements de certification. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 31, 441–444.

OEPP/EPPO (2007) Norme OEPP PM 4/34 (1) Echantillonnage de sol pour l'analyse de nématodes vecteurs de virus. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* (en préparation).

Rei FT, Henriques MIEC, Leitao FA, Serrano JF & Potes MF (1993) Immunodiagnosis of cucumber mosaic in different cultivars. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 23, 501–504.

Rugini E (1984) In vitro propagation of some olive cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae* 24, 123–134.

Rugini E & Fontanazza G (1981) In vitro Propagation of ‘Dolce Agogia’ Olive. *HortScience* 16, 492–493.

Savino V, Barba M, Gallitelli D & Martelli G (1979) Two nepoviruses isolated from olive in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 18, 135–142.

Savino V & Gallitelli D (1981) Cherry leafroll virus in olive. *Phytopathologia Mediterranea* 20, 202–203.

Savino V & Gallitelli D (1983) Isolation of cucumber mosaic virus from olive in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 22, 76–77.

Savino V, Gallitelli D & Barba M (1983) Olive latent ringspot virus, a newly recognized virus infecting olive in Italy. *Annals of Applied Biology* 103, 243–249.

Savino V, Piazzola P, Di Franco A & Martelli GP (1984) Olive latent virus 2, a newly recognized virus with differently shaped particles. In: *Proceedings of the 6th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*. MPU & Cairo (EG).

Savino V, Sabanadzovic S, Scarito G, La Viola C & Martelli GP (1996) Two olive yellows of possible viral origin in Sicily. *Informatore Fitopatologico* 46 (5), 55–59.

Sbanadzovic S, Abou-Ghanem N, La Notte P, Savino V, Scaroto G & Martelli GP (1999) Partial molecular characterization and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with olive leaf yellowing. *Journal of Plant Pathology* 81, 37–45.

Sghir S, Chatelet P, Ouazzani N, Dosba F & Belkoura I (2005) Micropropagation of eight Moroccan and French olive cultivars. *HortScience* 40, 193–196.

Triolo E, Materazzi A & Toni S (1996) An isolate of tobacco mosaic tobamo virus from *Olea europaea*. *Advances in Horticultural Science* 10, 39–45.

Werner R, Mühlbach HP & Büttner C (1997) Detection of *Cherry leaf roll nepovirus* (CLRV) in birch, beech and petunia by immuno-capture RT-PCR using a conserved primer pair. *European Journal of Forest Pathology* 27, 309–318.

Annexe I Recommandations sur les méthodes de test

Tests sur des oliviers indicateurs

Aucune information n'est disponible pour le moment sur l'utilisation d'indicateurs ligneux pour détecter les virus cités dans le Tableau 2.

Inoculation sur des plantes herbacées

L'utilisation de plantes indicatrices herbacées permet de détecter tous les virus de l'olivier transmissibles mécaniquement. En fait, ils sont tous transmis par la sève aux plantes-hôtes herbacées à partir de pollen et de fleurs. Les principales plantes indicatrices herbacées sont énumérées dans le Tableau 3. Il doit être noté que les réactions sur les plantes indicatrices peuvent varier et chaque laboratoire effectuant les tests doit valider les tests dans ses conditions locales.

Tableau 3. Principaux indicateurs herbacés des virus listés dans le tableau 1 et symptômes provoqués par ces virus

Hôtes herbacés	ArMV	SLRV	CMV	CLRV
<i>Chenopodium quinoa</i>	ChLL, SM	ChLL, SM	-	NLL, ChLL, SM
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	ChLL, SM	ChLL, SM	-	ChLL, SMottle
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	ChLL	-	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-	ChLL	SM	-
<i>Nicotiana tabacum</i>	-	-	-	ChLL, NLL, SChR
<i>Cucurbita pepo</i>	-	-	SM	-

ChLL = lésions chlorotiques locales ; SM = mosaïque systémique ; NLL = lésions locales nécrotiques ; SChR = anneaux chlorotiques systémiques ; - = pas d'infection.

Test ELISA

Aucuns anticorps ni procédures ELISA appropriés ne sont pour l'instant disponibles pour l'olivier. Selon Martelli (1999) et Bertolini *et al.* (2001), les tests sérologiques n'étaient pas considérés comme fiables quand le matériel oléicole était analysé par ELISA.

Tests moléculaires

Au cours des dernières années, l'application de techniques de diagnostic moléculaire (ARNdb, hybridation moléculaire, RT-PCR : réaction de polymérisation en chaîne par transcriptase inverse) pour la détection de virus est apparue plus prometteuse que les méthodes de détection traditionnelles (Grieco et al., 2000; Bertolini et al., 2001; Faggioli et al., 2002; Bertolini et al., 2003). Leur fiabilité a permis des investigations accrues sur la répartition des virus de l'olivier en conduisant plusieurs suivis dans des zones géographiques différentes. Parmi les méthodes moléculaires, la RT-PCR s'est révélée la technique la plus rapide, sensible et fiable pour détecter l'ARN cible des plantes infectées (Hadidi & Yang, 1990; Hadidi & Candresse, 2001; Faggioli *et al.*, 2005). Par conséquent, la technologie RT-PCR utilisant des amorces spécifiques (Tableau 4) représente une étape importante dans l'optimisation et l'accélération des diagnostics chez l'olivier. Les meilleurs résultats sont obtenus quand le tissu du phloème de brindilles de 1 à 2 ans, ramassées entre la fin de l'hiver et le début du printemps (fin février – fin avril), est analysé.

Tableau 4. Séquences of des amorces spécifiques utilisées pour la détection des virus de l'olivier.

Désignation	Taille du produit	Séquence de l'amorce	Références
ArMV-5 A ArMV-3 A	302	5'-TACTATAAGAAACCGCTCCC-3' sens 5'-CATCAAAACTCATAACCCAC3' antisens	Faggioli et al. (2005)
CMV-CPN5 CMV-CPN3	280	5'-ACTCTTAACCACCCAACCTT-3' sens 5'-AACATAGCAGAGATGGCGG-3' antisens	Lumia et al. (2001)
SLRSV-5D SLRSV-3D	293	5'-CCCTTGGTTACTTTTACCTCCTCATTGTCC-3' sens 5'-AGGCTCAAGAAAACACAC-3' antisens	Faggioli et al. (2002)
OLYaV-H OLYaV-C	346	5'- ACTACTTTCGCGCAGAGACG -3' sens 5'- CCCAAAGACCATTGACTGTGAC-3' antisens	Faggioli et al. (2005)
CLRV-5 CLRV-3	416	5'-TGCGACCGTGTAACGGCA-3' sens 5'-GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG-3' antisens	Werner et al. (1997)

Annexe II Recommandations pour l'échantillonnage du sol pour l'analyse de *Verticillium dahliae*

Les échantillons de sol sont séchés à l'air pendant 1-2 semaines à 25°C, passés à travers un tamis de 2 mm et bien mélangés. Des échantillons de 10 g sont alors prélevés pour la suite des analyses. Ces sous-échantillons sont lavés à travers des tamis de mailles de 125 et 37 mm. Les résidus restant sur le tamis de 37 mm sont désinfectés pendant 10 s dans du NaOCl à 0,525%, rincés et lavés dans un bécher de 50 ml (volume total de résidus et d'eau 15-20 ml). Ce mélange est alors réparti à l'aide d'une cuillère sur la surface de 10 boîtes de Petri (10 cm de diamètre) contenant un milieu éthanol-streptomycine-gélose préparé en ajoutant 1,6 g de gélose à 200 ml d'eau distillée et en passant le mélange à l'autoclave pendant 20 min (Nadakavukaren & Horner, 1959). Après refroidissement à 50°C du mélange de gélose, 27 mg de sulfate de streptomycine (75%) sont ajoutés. Ce mélange, combiné avec la gélose à base d'eau est versé dans 10 boîtes. Le sol est lavé de la surface gélosée avec de l'eau après 7-10 j d'incubation à 22°C dans l'obscurité. Les boîtes sont incubées pendant 2-3 j supplémentaires avant de vérifier l'identité du champignon. Pour l'estimation des populations de *Verticillium* dans le sol, la somme des colonies comptées dans chaque série de boîtes gélosées est égale au nombre de microsclérotés par 10 g de sol (Butterfield & De Vay, 1977; Goud & Termorshuizen, 2003).

Annexe III Maintien et multiplication *in vitro* de l'olivier

Deux méthodes de désinfection peuvent être utilisées : la méthode décrite par Rugini & Fontanazza (1981) ; tremper les échantillons dans de l'éthanol à 70% (1 min), Mercryl (1 min) et de l'hypochlorite de calcium à 2% (3 min). Les deux procédures de désinfection sont suivies par 3 rinçages de 10 min avec de l'eau distillée stérile.

La croissance des pousses est induite d'explants à un nœud en utilisant la culture sur un milieu de base Rugini (Rugini, 1984), avec 3% de sucrose, autoclavé 20 minutes à 121°C. Des régulateurs de croissance (BA, NAA, ZR) sont ajoutés si nécessaire (Sghir et *al.*, 2005).

Les cultures sont maintenues sous une lumière fluorescente ($40\mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$) avec une photopériode de 16 heures associée à une thermo période de 25/22°C. Les pousses *in vitro* sont enracinées dans un milieu OM (Rugini, 1984) contenant $5,37\mu\text{M}$ de NAA ou $24,6\mu\text{M}$ d'IBA (étape simple) ou avec un protocole à deux étapes (d'après Druart, 1997) avec une étape d'induction de 5 jours dans une solution de $24,6 \mu\text{M}$ d'IBA dans l'obscurité avec ensuite une culture sur le milieu sans régulateur Rugini.