UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

**UNIVERSITE DE STRASBOURG**
**2012**

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
STRASBOURG

# THÈSE

présentée par :

**Jean Le Maguet**

pour obtenir le grade de

## Docteur de l'Université de Strasbourg

Domaine : Sciences du vivant

Spécialité : Virologie végétale et épidémiologie

# Epidémiologie de l'enroulement viral de la vigne dans les vignobles français septentrionaux et transmission par cochenilles vectrices

Soutenue publiquement le 26 juin 2012 devant la commission d'examen suivante :

| | | |
|---|---|---|
| M. Hervé Lecoq | DR INRA, Avignon | Rapporteur externe |
| M. Yvan Rahbé | DR INRA, Lyon | Rapporteur externe |
| M. Mario Keller | Prof. UDS, Strasbourg | Examinateur interne |
| M. Christoph Hoffmann | Chercheur JKI, Siebeldingen | Examinateur externe |
| M. Etienne Herrbach | CR INRA, Colmar | Co-encadrant |
| M. Olivier Lemaire | DR INRA, Colmar | Directeur de thèse |
| Mme Géraldine Uriel | Chef de projet, CIVC Epernay | Membre invité |

anrt association nationale recherche technologie

Cifre Conventions

COMITÉ CHAMPAGNE CIVC

BOURGOGNES Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne

CIVA Conseil Interprofessionnel des Vins d'Alsace

FranceAgriMer

INRA

TABLE DES MATIERES


Avant-propos 1

Chapitre 1. Virus de l'enroulement et cochenilles 3

**I. L'enroulement viral de la vigne 3**

I.1. Historique de l'identification de la maladie 3
*I.1.a. Premiers signalements de l'enroulement viral 3*
*I.1.b. Association de l'enroulement avec la présence de particules virales 3*
*I.1.c. Caractérisation des agents viraux associés à l'enroulement 4*
I.2. Les virus responsables de l'enroulement de la vigne 4
*I.2.a. Taxonomie 4*
*I.2.b. Les onze virus associés à l'enroulement viral de la vigne 6*
*I.2.c. Organisation génomique des GLRaVs 7*
I.3. Infection mixte enroulement viral - complexe bois du strié 9
*I.3.a. Premier signalement de la maladie 9*
*I.3.b. Identification des agents responsables du complexe du bois strié 9*
*I.3.c. Taxonomie 10*
*I.3.d. Etiologie des maladies du bois strié 10*
*I.3.e. Agents viraux responsables du complexe du bois strié 11*
*I.3.f. Organisation génomique du GVA 11*
I.4. Symptomatologie 12
*I.4.a. Description des symptômes d'enroulement 12*
*I.4.b. Description des symptômes du bois strié 14*
*I.4.c. Confusions possibles 14*
I.5. Impact des virus de l'enroulement et du complexe du bois strié 14
*I.5.a. Gamme d'hôtes des virus 14*
*I.5.b. Effets des viroses sur la vigne 16*
*I.5.c. Effet des viroses sur la récolte de raisin 18*
I.6. Distribution 19
*I.6.a. Répartition des espèces virales au niveau mondial 20*
*I.6.b. En France 20*

**II. Les cochenilles 22**

II.1. Généralités 22
*II.1.a. Systématique 22*
*II.1.b. Identification 22*
*II.1.c. Morphologie 23*
*II.1.d. Biologie 23*
*II.1.e. Comportement alimentaire 25*
*II.1.f. Impact des cochenilles 25*
II.2. Les cochenilles sur la vigne en France 26
*II.2.a. Diversité 26*
*II.2.b. Présentation des familles 27*
II.3. Fiches descriptives de cinq espèces de cochenilles 28

Chapitre 2. Contexte scientifique 39

**I. Vection de phytovirus 39**

I.1. Généralités 39
*I.1.a. Vection de virus : définitions 39*
*I.1.b. Diversité des vecteurs 40*
*I.1.c. Spécificité vectrice 42*
*I.1.d. Les modes de transmission 43*

I.2. Vection de virus par cochenilles 43

**II. Epidémiologie 64**

II.1. Généralités 64
*II.1.a. Définitions 64*
*II.1.b. Epidémiologie des viroses de plantes 64*
*II.1.c. Les étapes d'une épidémie 65*
II.2. L'étude des épidémies d'enroulement viral 66
*II.2.a. Dispersion naturelle de l'enroulement et du bois strié 66*
*II.2.b. Analyse temporelle et spatiale de la dispersion 66*

Objectifs de la thèse 69

Chapitre 3. Approche biologique de la transmission des virus de l'enroulement et du bois strié 73

**I. Introduction 73**

**II. Démarche expérimentale 74**

**III. Biologie de la vection de virus par *Phenacoccus aceris* 74**

III.1. ARTICLE 1 : Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris* (Signoret) 75
III.2. Expériences additionnelles avec *P. aceris* : transmission du GLRaV-2 85
III.3. Analyse de la rétention hivernale de virus 86

**IV. Biologie de la vection de virus par *Neopulvinaria innumerabilis* 88**

IV.1. Evaluation de la spécificité vectrice 89
IV.2. Confirmation de la transmission des GLRaV-1, GLRaV-3 et GVA 90

**V. Bilan de l'approche biologique de la vection 91**

Chapitre 4. Suivi épidémiologique de l'enroulement viral dans les vignobles septentrionaux 93

**I. Introduction : état sanitaire des vignobles en France 93**

I.1. Travaux antérieurs 93
I.2. Des problématiques régionales 94

**II. Démarche expérimentale 95**

**III. Travaux préparatoires 95**

III.1. Synthèse du statut sanitaire d'un réseau de parcelles viticoles 95
III.2. Présentation des parcelles d'étude 96

**IV. Analyse de la présence de cochenilles vectrices sur quatre parcelles viticoles 101**

IV.1. ARTICLE 2 : Monitoring of grapevine scale insects in leafroll-infected vineyards of northeastern France. 101

**V. Analyse pluri-annuelle de l'épidémie de l'enroulement sur quatre parcelles 117**

V.1. Etat de la contamination des vignobles de 1998 à 2006 117
*V.1.a. Relevés symptomatologiques sur les quatre parcelles 117*
*V.1.b. Diagnostic par DAS-ELISA 118*
V.2. Perspectives d'étude 120
*V.2.a. Synthèse de la situation épidémique en 2006 et hypothèses sur l'origine des contaminations 120*
*V.2.b. Sélection de deux parcelles d'étude 121*
V.3. Recherches préliminaires sur le matériel végétal de plantation à Marsannay-la-Côte et Bonzon 121
V.4. ARTICLE 3 : The role of the mealybug *Phenacoccus aceris* in the epidemic of *Grapevine leafroll-associated virus -1* (GLRaV-1) in two French vineyards. 122
V.5. Analyses spatiales complémentaires à Plumecoq et Odenas 139
*V.5.a. Parcelle de Plumecoq 141*
*V.5.b. Parcelle d'Odenas 141*

**VI. Bilan épidémiologique sur les quatre parcelles 142**

Chapitre 5. Approche moléculaire de l'épidémiologie du GLRaV-1 et de la cochenille vectrice *P. aceris* 145

**I. Epidémiologie moléculaire du GLRaV-1 145**

I.1. Travaux préliminaires 145
*I.1.a. Détection virale dans les non-Vitis 145*
*I.1.b. Evaluation de la prévalence des GLRaV-1, GLRaV-3 et GVA dans les parcelles viticoles adjacentes. 146*
I.2. Etude de la diversité génétique du GLRaV-1 147
*I.2.a. Cadre de l'étude 147*
*I.2.b. Matériels et Méthodes 148*
*I.2.c. Résultats 150*
*I.2.d. Discussion 155*

**II. Analyse comparative des populations de Phenacoccus aceris 159**

II.1. Constat 159
II.2. Matériel et méthodes 160
*II.2.a. Collecte des échantillons 160*
*II.2.b. Extraction d'ADN, amplification par PCR et séquençage 161*
*II.2.c. Identification morphologique 161*
II.3. Résultats 162
*II.3.a. Caractérisation moléculaire 162*
*II.3.b. Caractérisation morphologique 164*
II.4. Conclusion 165

Chapitre 6. Conclusion et perspectives 167

**I. Compréhension de l'épidémiologie de l'enroulement viral de la vigne 168**

**II. Implications agronomiques dans la lutte contre l'enroulement viral 169**

II.1. Gestion de l'enroulement viral à la plantation d'une parcelle 170
*II.1.a. Un matériel végétal indemne de virus : la clef pour garantir un vignoble exempt de viroses graves 170*
*II.1.b. Un environnement sain : une clef pour limiter les contaminations 171*
II.2. Gestion de l'enroulement viral après la plantation 172
*II.2.a. L'élimination des sources de virus : un assainissement progressif du vignoble 172*
*II.2.b. Réduire l'impact des vecteurs : une mise en œuvre difficile et environnementalement discutable 172*

**III. Perspectives 174**

Matériel et méthodes 177

Références bibliographiques 186

Annexes 202

# Avant-propos

La vigne et le vin suscitent un intérêt majeur pour l'homme depuis des temps très anciens. La recherche archéologique témoigne d'ailleurs que les baies de *Vitis vinifera* ont fait l'objet de cueillette par les hommes préhistoriques dès le Paléolithique inférieur. On estime que la domestication de la vigne remonte à environ 7000 ans, dans l'aire d'origine de la plante, en Mésopotamie et dans le Caucase. A partir de deux sous-espèces de *Vitis*, *V. vinifera* subsp. *sylvestris* et *V. vinifera* subsp. *sativa*, dérivent à présent un nombre considérable de cépages, dont la diversité s'accroît continuellement grâce aux croisements avec des *Vitis* issus notamment d'Amérique du Nord.

La viticulture apparaît indissociable de l'histoire de l'humanité, et en particulier du développement des civilisations antiques dans le bassin méditerranéen. Après les Phéniciens et les Grecs, les conquêtes de l'Empire romain ont ainsi représenté un vecteur d'expansion de la viticulture à travers toute l'Europe. Bien plus tard, à partir du XVI$^{ème}$ siècle, la vigne sera implantée dans de très nombreux pays, au rythme de leur colonisation par les puissances européennes. La viticulture est désormais présente dans plus d'une centaine de pays sur tous les continents, excepté dans les régions polaires et équatoriales.

La vigne et le vin évoquent un pan de l'histoire de France tant leurs liens avec la religion et les pouvoirs politiques ont été étroits. La viticulture a ainsi joué un rôle majeur dans le façonnement progressif d'un paysage viti-vinicole et dans l'économie de certaines régions. Actuellement, la viticulture représente en France moins de 2 % de la surface cultivée c'est à dire environ 820 000 ha, mais un montant total d'exportation important, s'élevant à plus de 6 milliards d'euros (Agreste, 2010).

Pour la plupart des espèces végétales cultivées, l'homme est confronté à un certain nombre de problèmes sanitaires qui nuisent aux rendements. La culture de *Vitis vinifera* ne fait pas exception à la règle, la filière viticole représentant en tonnage encore 20 % des produits phytosanitaires consommés dans l'agriculture française. Outre la compétition entrainée par la présence de plantes adventices, la culture de la vigne se heurte surtout aux dégâts engendrés par divers ravageurs et maladies. On distingue parmi les ravageurs principaux, les insectes, les acariens et les nématodes. Un exemple célèbre, celui du phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch)), a notamment conduit à une crise sans précédent dans la viticulture française et également au niveau mondial. La vigne peut être également attaquée par un cortège d'agents fongiques responsables de maladies cryptogamiques bien connues, comme l'oïdium ou le mildiou. Enfin, la vigne est l'hôte d'un grand nombre d'agents parasites obligatoires, virus et phytoplasmes. Pas moins de 60 viroses différentes ont été identifiées à ce jour sur *Vitis vinifera* (Martelli, 2010). Parmi elles, 22 sont réellement inféodées à la vigne, et 6 groupes de virus, engendrant des dégâts économiquement préjudiciables occasionnent des viroses graves. On distingue ainsi (i) le court-noué, provoqué en particulier par le *Grapevine fanleaf virus*, (ii) le "decline", provoqué par des *Nepovirus* américains, (iii) la marbrure, engendrée par le *Grapevine fleck virus*, (iv) l'incompatibilité au greffage, provoqué par le *Grapevine leafroll-associated virus 2*, (v) le complexe du bois strié, provoqué notamment par les *Grapevine virus* et enfin (vi) l'enroulement viral, provoqué par plusieurs espèces de *Grapevine leafroll-associated virus*.

L'enroulement viral est une maladie citée depuis le XIX$^{ème}$ siècle. Son étiologie complexe a rendu difficile sa distinction avec d'autres maladies virales ou désordres physiologiques, ainsi que l'identification des agents viraux putatifs. La multiplication végétative a longtemps été considérée comme l'unique mode de diffusion de la maladie. Cependant, la découverte de cochenilles vectrices a définitivement changé la donne concernant l'épidémiologie de la maladie, expliquant ainsi les cas de dispersions naturelles observés au vignoble.

En raison des échanges commerciaux et de la création des vignobles dans les pays du nouveau monde, la large diffusion de cépages et de porte-greffes infectés a conduit à une généralisation de l'épidémie d'enroulement viral à l'ensemble des zones de culture de la vigne.
En France, les vignobles septentrionaux situés en Alsace, Champagne et Bourgogne, constituent les zones où la problématique de l'enroulement viral est la plus sérieuse. La maladie représente dans ces régions, ainsi que dans les vignobles limitrophes du Jura et du Beaujolais, une préoccupation réelle pour la filière viticole.
L'impact important de la maladie dans ces vignobles et les caractéristiques inhérentes d'un phytovirus rendent l'épidémiologie de l'enroulement viral cruciale. En effet, en l'absence de traitement curatif applicable au vignoble, les marges de manœuvre pour lutter contre le virus sont de ce fait très limitées. De même, la persistance de la maladie depuis la multiplication du matériel végétal jusqu'au produit final touche la filière viticole dans son ensemble, du pépiniériste à l'exploitant. Enfin, l'enroulement viral étant transmissible par insecte vecteur, la problématique est complexifiée par la diffusion naturelle de la maladie au niveau local par les cochenilles. Les mœurs cryptiques de ces insectes les rendent encore peu connus du grand public, contribuant ainsi à sous évaluer l'ampleur du problème de la dispersion de l'enroulement viral à l'échelle de la parcelle.

Dans ce contexte, trois interprofessions viticoles du nord-est de la France, le Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne (CIVC), le Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB) et le Comité Interprofessionnel des Vins d'Alsace (CIVA), ainsi que l'instance représentant l'interprofession viticole au niveau national, FranceAgriMer, ont souhaité financer un projet de recherche visant à approfondir les connaissances sur l'épidémiologie de l'enroulement viral. Cette thèse a donc été conduite dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) impliquant l'INRA de Colmar, l'Université de Strasbourg, l'ANRT, et les trois interprofessions viticoles.

La maladie étudiée dans cette thèse possède des caractéristiques singulières, puisque sous le terme "enroulement viral", on évoque de multiples espèces et variants de virus possédant une organisation génomique, des propriétés sérologiques ainsi qu'une étiologie différentes. Face à ces formes virales distinctes, on trouve de multiples espèces de cochenilles, capables de transmettre à la vigne un, ou plusieurs des virus de l'enroulement, sans compter les virus du complexe du bois strié, « compagnons réguliers » de l'enroulement viral. D'abord, nous présentons dans le Chapitre 1 l'ensemble de ces acteurs au cours d'une synthèse bibliographique. Le Chapitre 2 permet ensuite de faire entrer les acteurs en scène en les plaçant dans le cadre de la vection de virus et de l'épidémiologie. L'intrigue étant révélée, l'action de la pièce se déroule dans les chapitres suivants, au cours desquels nous présentons les travaux de recherche menés pendant cette thèse.

# Chapitre 1. Virus de l'enroulement et cochenilles

## I. L'enroulement viral de la vigne

### I.1. Historique de l'identification de la maladie

#### *I.1.a. Premiers signalements de l'enroulement viral*

Les premières mentions correspondant à l'enroulement viral de la vigne se sont basées principalement sur les symptômes caractéristiques exprimés par les feuilles de *Vitis vinifera*, en particulier sur cépages rouges. Cependant, étant donné la similitude des symptômes d'enroulement avec d'autres affections touchant la vigne, l'origine géographique réelle de la maladie reste difficile à définir. On présume toutefois que cette origine est liée à la zone historique de domestication de la vigne.
L'enroulement viral de la vigne semble connu depuis la fin du XIX$^{ème}$ siècle, sous le terme d'anthracnose déformante (Planchon, 1884). Cependant, diverses maladies et désordres physiologiques touchant la vigne semblent avoir été regroupés sous ce terme. Une description plus détaillée des déformations sur feuilles de cépages touchés pose toutefois la présomption de la présence d'enroulement viral sur cépages européens et américains (Viala, 1885).
Décrit d'une façon plus précise au début du XX$^{ème}$ siècle, l'enroulement viral est désigné sous le terme "rossore" en Italie (Sannino, 1906) et de "rougeau" en France (Ravaz et Verge, 1924). Le "rougeau" est décrit par le rougissement prématuré des feuilles, leur caractère enroulé, ainsi que l'incurvation des limbes vers l'intérieur. Il faut noter qu'à présent le terme "rougeot" correspond à la maladie du rougeot parasitaire de la vigne, ou Brenner, désignant une maladie cryptogamique provoquée par *Pseudopezicula tracheiphila,* et assez rare dans les vignobles européens. L'association des symptômes d'enroulement avec la présence d'une maladie virale, désignée sous le terme "Rollkrankheit", est avancée en Allemagne après la démonstration de sa transmission par greffage (Scheu, 1936). Dans ce pays, plus de 80 % des vignes plantées étaient alors estimées porteuses de la maladie (Scheu, 1950). De la même façon, Harmon et Snyder signalent en 1946 que la maladie connue en Californie sur le raisin de table 'Emperor' sous le nom de "White Emperor disease" est également transmissible par greffage (Harmon et Snyder, 1946). Goheen et ses collaborateurs démontrent en 1958 les similitudes entre les maladies du 'rougeau', "Rollkrankheit", et du "White Emperor disease" et proposent de désigner la maladie sous l'unique terme de "Leafroll", c'est à dire "enroulement des feuilles" (Goheen et al., 1958).

#### *I.1.b. Association de l'enroulement avec la présence de particules virales*

L'étiologie de la maladie a été clarifiée grâce aux techniques de microscopie électronique dans les années 1970. Cependant, l'identification des virus associés à l'enroulement de la vigne s'est révélée délicate du fait des co-infections quasi systématiques des vignes par d'autres virus, en particulier avec ceux associés au complexe du bois strié.

L'observation des coupes de tissus issues de cépages exprimant des symptômes typiques d'enroulement a confirmé l'existence d'agents viraux responsables de l'enroulement. L'analogie des virions du "grapevine leafroll virus" avec les *Potyvirus* (Tanne et al., 1977) ou les *Closterovirus* (Namba et al., 1979; Faoro et al., 1981) a alors été suggérée.

### *I.1.c. Caractérisation des agents viraux associés à l'enroulement*

Les études effectuées dans les années 1980 confirment l'étiologie virale de l'enroulement de la vigne grâce aux observations de longs virions flexueux, confinés exclusivement aux cellules du phloème (Faoro et al., 1981; Castellano et al., 1983).

En 1984, Gugerli et son équipe parviennent à extraire des particules filamenteuses de 2200 et 1800 nm de longueur, à les purifier, et à mettre au point un test de détection immuno-enzymatique qui révèle rapidement la présence de deux types viraux sérologiquement distincts (Gugerli et al., 1984). L'existence de particules virales distinctes est confirmée par la suite, avec la découverte d'un troisième sérotype de virus filamenteux : les virus sont alors appelés GLRaV-1 (2200nm), GLRaV-2 (1800nm) et GLRaV-3 (Rosciglione et Gugerli, 1986). Les nombreuses recherches sur la détection immuno-enzymatique des virus de l'enroulement ont conduit peu après à l'isolement d'un quatrième type qui sera appelé GLRaV-4 (Hu et al., 1990; Zimmermann, 1990; Zimmermann et al., 1990). Lors du 10ème International Council for the study of Virus and virus diseases of Grapevine (ICVG) à Volos, Grèce, la dénomination des quatre virus identifiés par le terme "*Grapevine leafroll-associated virus*" (GLRaV-1, -2, -3 et -4) est définitivement adoptée (Gugerli et al., 1990b).

## I.2. Les virus responsables de l'enroulement de la vigne

### *I.2.a. Taxonomie*

L'étiologie complexe de l'enroulement viral est démontrée par plusieurs travaux impliquant un nombre croissant de virus sérologiquement distincts, appelant ainsi à la révision de la taxonomie et de la nomenclature de ces virus. Les différents virus de l'enroulement identifiés alors (GLRaV-1 à -6 ; (Boscia et al., 1995)) sont ainsi classés dans de nouveaux taxons. Lors de sa création, la famille des *Closteroviridae* (le terme grec 'closter' signifiant filament) comprenait deux genres : les *Crinivirus* et les *Closterovirus*, différenciés par le caractère bipartite ou monopartite de leur génome (Van Regenmortel et al., 2000). Grâce aux nouvelles informations disponibles sur les caractéristiques moléculaires et biologiques des GLRaVs, Karasev propose la même année de créer le genre *Vinivirus* (Karasev, 2000). Le classement des virus dans les trois genres au sein des *Closteroviridae* s'effectue ainsi selon le type d'insecte vecteur associé au virus. Cette classification est ensuite adoptée par l'International Commitee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (Martelli et al., 2002).

A l'image de celle employée pour tout être vivant, la classification des virus est fondée sur les mêmes niveaux taxonomiques de base : ordre, famille, genre, espèce (Astier et al., 2001). La famille des *Closteroviridae* est alors divisée en trois genres selon la taille et l'organisation du génome, les propriétés biologiques (type de vecteur et gamme d'hôtes), et les résultats des analyses phylogénétiques (Encadré 1).

**Encadré 1 : Classification des *Closteroviridae***

| | |
|---|---|
| *Closterovirus* | Espèce type : *Beet yellows virus* (BYV), particules d'environ 1200 nm, génome monopartite de 15,5 à 19,3 kb, transmis par pucerons. |
| *Ampelovirus* (nom remplaçant le terme *Vinivirus*) | Espèce type : *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), particules entre 1400 et 2000 nm, génome monopartite de 16,9 kb à 19,5 kb, transmis par cochenilles. |
| *Crinivirus* | Espèce type : *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV), particules de 650 à 900 nm, génome bipartite de 15,3 à 19 kb, transmis par aleurodes. |

Grâce aux avancées des méthodes moléculaires dans les années 2000, le nombre de virus identifiés associés à l'enroulement de la vigne a doublé (Martelli et Candresse, 2010). De façon chronologique, deux nouveaux GLRaVs sont identifiés en Italie (GLRaV-7 ; (Choueiri et al., 1996), et aux États-Unis (GLRaV-9 ; (Alkowni et al., 2004). La description du virus désigné par GLRaV-8 (Monis, 2000) correspondant à une erreur scientifique, cette espèce n'existe plus à présent (Bertsch et al., 2009). Enfin, deux nouveaux GLRaVs sont identifiés en Grèce à partir d'une collection d'accessions de *Vitis* (GLRaV-Pr et GLRaV-De ; (Maliogka et al., 2008; Maliogka et al., 2009b) et un dernier à partir du cépage Carnelian, cultivé en Californie (GLRaCV ; (Abou-Ghanem et al., 2010)). L'identification du GLRaCV donne l'occasion de préciser la phylogénie des différents virus de l'enroulement (Figure 1).

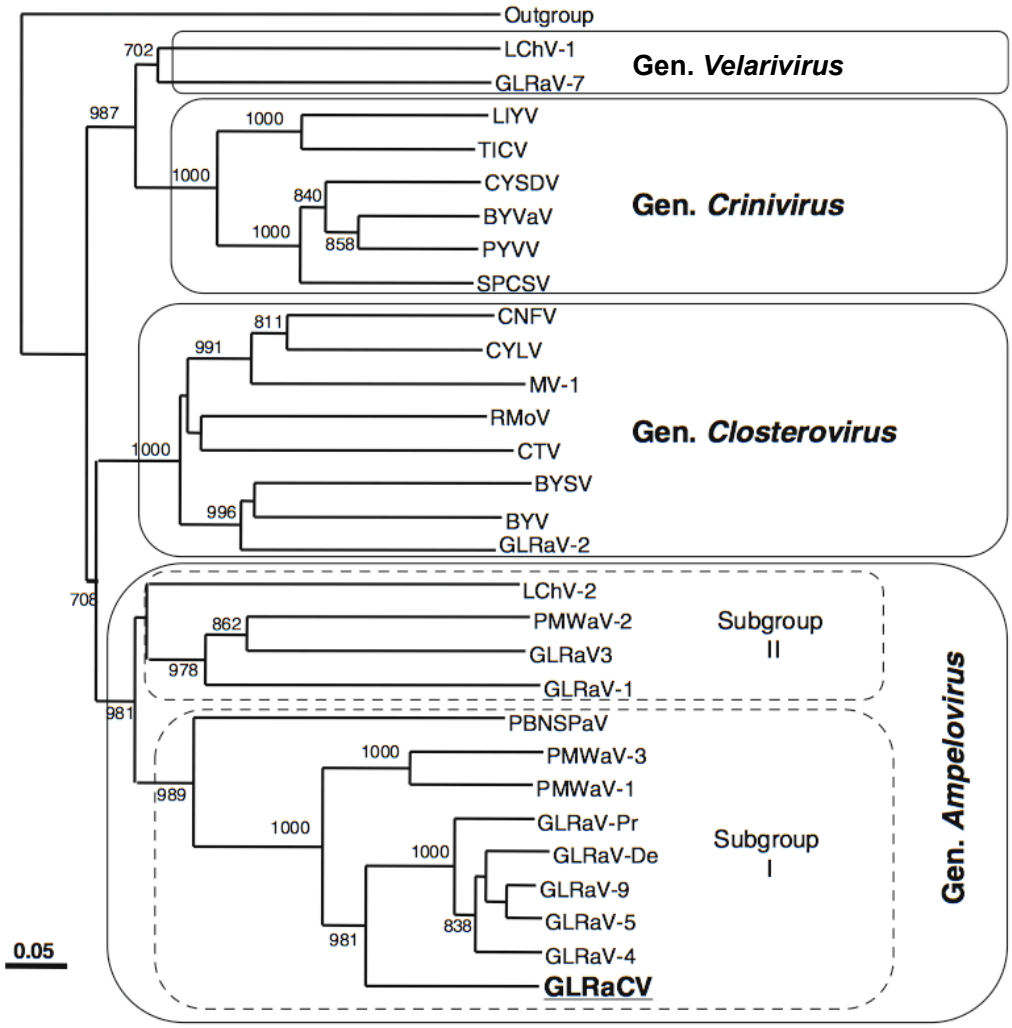



**Figure 1. Arbre phylogénétique construit à partir de la séquence partielle de la HSP70h de plusieurs membres des *Closteroviridae.* Outgroup : HSP70h *d'Arabidopsis thaliana* (AAN71949). D'après Abou-Ghanem et al. (2010).**

Très récemment, les études sur les propriétés sérologiques, l'organisation génomique et la phylogénie des GLRaVs ont permis de réviser la classification des *Closteroviridae* établie en 2002, en particulier concernant les genres *Ampelovirus* et les espèces putatives de la famille (Martelli et al., 2012). Plusieurs espèces ont notamment ainsi été regroupées en tant que variants d'une même espèce d'enroulement. Ces modifications taxonomiques seront vraisemblablement discutées et adoptées au futur congrès de l'ICVG (UC Davis, Californie, Octobre 2012, voir Encadré 2).

**Encadré 2 : Classification des *GLRaVs***

Genre : *Closterovirus*

**Espèce GLRaV-2**

Genre : *Ampelovirus*

| Sub-group I | Sub-Group II |
|---|---|
| **Espèce GLRaV-4** | **Espèce GLRaV-1** |
| Variant GLRaV-5 | **Espèce GLRaV-3** |
| Variant GLRaV-6 | |
| Variant GLRaV-9 | |
| Variant GLRaV-Pr | |
| Variant GLRaV-De | |
| Variant GLRaV-Car | |

Genre : *Velarivirus* (nouveau genre proposé; du latin 'velari' signifiant cryptique)

**Espèce GLRaV-7**

### *I.2.b. Les onze virus associés à l'enroulement viral de la vigne*

**Tableau 1. Liste des différentes espèces d'enroulement viral et référence bibliographique mentionnant la première description de chaque espèce et les informations disponibles sur leur génome (N° d'accessions : base de données GenBank). * Désigne des séquences partielles du génome.**

| Espèce virale | Première description | Taille du génome en nucléotides (origine géographique/souche) | Numéro d'accession | Référence |
|---|---|---|---|---|
| GLRaV-1 | (Gugerli et al., 1984) | 18659 (isolat 1050)<br>*12394 (isolat BL-4) | JQ 023131<br>AF 195822 | (submitted Rott et al.)<br>(Fazeli et Rezaian, 2000) |
| GLRaV-2 | (Gugerli et al., 1984) | *15000 (PN)<br>*8590 (Sémillon)<br>*597 (H4)<br><br>16494 (93/955)<br>*4966(PV20)<br>16486 (OR1)<br>16535 (BD)<br>16527 (RG) | AF 039204<br>Y 14131<br>AY 697863<br><br>AY 881628<br>EF 012721<br>FJ 436234<br>DQ 286725<br>NC_004724 | (Zhu et al., 1998)<br>(Abou-Ghanem et al., 1998)<br>(Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2000)<br>(Meng et al., 2005a)<br>(Beuve et al., 2007)<br>(Liu et al., 2009)<br>(Bertazzon et al., 2010)<br>(Alkowni et al., 2011) |
| GLRaV-3 | (Gugerli et al., 1984) | 17919 (NY1)<br>18798 (GP18)<br>17919 (Cl-766)<br>18498 (621)<br>18498 (623)<br>18433 (PL-20)<br>18498 (WA-MR) | AF 037268<br>EU 259806<br>EU 344893<br>GQ 352631<br>GQ 352632<br>GQ 352633<br>GU 983863 | (Ling et al., 1998)<br>(Maree et al., 2008)<br>(Engel et al., 2008)<br>(Jooste et al., 2010)<br><br><br>(Jarugula et al., 2010a) |
| GLRaV-4 | (Hu et al., 1990) | 13380 (LR106) | FJ 467503 | (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2012) |
| GLRaV-5 | (Walter et Zimmermann, 1990) | 13384 (Y217) | FR 822696 | (Thompson et al., 2012) |
| GLRaV-6 | (Boscia et al., 1995) | 13807 (Estellat) | FJ 467504 | (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2012) |
| GLRaV-7 | (Choueiri et al., 1996) | 16404 (AA42)<br>16496 (Swi) | HE 588185<br>JN 383343 | (Jelkmann et al., 2012)<br>(Al Rwahnih et al., 2012) |
| GLRaV-9 | (Alkowni et al., 2004) | *12588 | AY 072797 | (Alkowni et al., 2004) |
| GLRaV-Pr ou GLRaV-10 | (Maliogka et al., 2008) | 13696 (Prevezianiko) | AM 182328 | (Maliogka et al., 2008)<br>(Elbeaino et al., 2009) |
| GLRaV-De ou GLRaV-11 | (Maliogka et al., 2009b) | *4319 (Debina) | AM 494935 | (Maliogka et al., 2009b) |
| GLRaCV ou GLRaV-Car | (Abou-Ghanem et al., 2010) | *13626 (Carnelian) | FJ 907331 | (Abou-Ghanem et al., 2010) |

### *I.2.c. Organisation génomique des GLRaVs*

Les régions viticoles du monde sont concernées principalement par trois espèces d'enroulement viral : les GLRaV-1, -2 et -3. L'organisation génomique des virus de l'enroulement sera donc davantage détaillée pour ces trois espèces. La présence d'un gène codant pour un analogue à celui de la protéine HSP70, et deux copies divergentes du gène de la coque protéique constitue une des caractéristiques moléculaires des *Closteroviridae*. L'étude de ces gènes a ainsi permis de comparer les séquences des différents taxons de GLRaVs et de distinguer plusieurs variants au sein d'une même espèce virale.

- GLRaV-1 et GLRaV-3

Les GLRaV-1 et GLRaV-3 appartiennent au genre *Ampelovirus*, dans lequel les virions ont une taille comprise entre 1400 et 2200 nm et contiennent une molécule linéaire d'ARN simple brin de polarité positive de 16,1 à 19,5 kb. Parmi les membres de la famille des *Closteroviridae*, le GLRaV-3 correspond à l'espèce type du genre *Ampelovirus* et constitue l'espèce la plus répandue dans le monde (Martelli et al., 2002). Le GLRaV-1 est également signalé dans de nombreux pays mais avec une faible prévalence.
Le GLRaV-3 possède le second plus long génome parmi les phytovirus (18 kb ou précisément 18798 nt) après celui du *Citrus tristeza virus* (CTV, 19296 nt). Son génome possède 13 ORFs (voir détails en Figure 2) et les particules de GLRaV-3 ont une longueur approximative de 2000 nm.
La première séquence complète du GLRaV-3 est issue de l'étude de l'isolat NY-1 (Ling et al., 1998; Ling et al., 2004). Les recherches montrent ensuite que la partie 5' terminale (88 nucléotides de la région non traduite 5' (5'UTR) et 329 nucléotides adjacents de l'ORF1a) présente une variabilité importante (Jooste et Goszczynski, 2005). L'analyse de cette région divergente permet alors de mettre en évidence deux groupes de variants distincts présentant entre 80,8 et 85,1 % d'identité nucléotidique. Au contraire, dans la partie 3', les ORFs 4, 5, 6 et 7 sont relativement conservées parmi les isolats (Jooste et Goszczynski, 2006). Comme pour le GLRaV-1, plusieurs variants de GLRaV-3 peuvent être détectés au sein d'une même vigne. De même, aucune corrélation entre le profil génétique et l'origine géographique n'a pu être faite pour le GLRaV-3, ce qui soutient la prédominance du rôle du matériel végétal dans la diffusion du virus (Turturo et al., 2005). Le séquençage complet d'un second isolat de GLRaV-3 en Afrique du Sud, GP18, révèle la présence d'une séquence 5' UTR de 737 nt, dont la fonction est encore inconnue, et absent dans le premier isolat séquencé NY1 (Maree et al., 2008). La diversité génétique constatée au niveau de l'ORF1 est confirmée lors du séquençage d'un 3$^{ème}$ isolat de GLRaV-3 au Chili, Cl-766 (Engel et al., 2008). Les recherches sur la diversité génétique du GLRaV-3 conduisent alors à classer les isolats en 5 groupes distincts, notamment grâce à la région 5'UTR (Chooi et al., 2009; Fuchs et al., 2009; Jooste et al., 2010; Jooste et al., 2011; Wang et al., 2011) : groupe I (isolat NY-1 et 621), groupe II (isolat GP-18), groupe III (PL-20 et MT48-2), groupe IV (isolat NZ-1) et groupe V (isolat C5-1). A ce jour, sept isolats de GLRaV-3 ont été totalement séquencés.
La séquence complète du GLRaV-1 a été diffusée fin 2011 mais les travaux décrivant ce génome complet n'ont encore pas été publiés : la description de cette espèce se basera donc sur la séquence de l'isolat BL-4 (12394 nt) publiée par Fazeli et Rezaian (2000). Le GLRaV-1 possède dix ORFs (Figure 2) dont trois présentent une hypervariabilité : les ORFs 3, 6 et 7 codant respectivement pour la HSP70, la CPm1 et la CPm2 (Little et al., 2001; Little et Rezaian, 2006). Au contraire, l'ORF 9 présente le taux de variation le plus bas de tout le génome (Little et Rezaian, 2006).

Une étude de la variabilité moléculaire du gène codant pour la HSP70 a mis en évidence l'existence de deux groupes d'isolats : le groupe A (pour Américain et Australien) et le groupe E (pour Européen) (Kominek et al., 2005).
La détection de l'isolat GLRaV-1 'WC', n'ayant que 84 % d'identité avec le 'type' BL-4, appuie le constat précédent et permet de le classer dans le groupe A (Prosser et al., 2007). La variation nucléotidique atteint 9,6 % dans le gène codant pour la HSP70, et les deux types d'isolats peuvent se trouver en infection mixte dans une même vigne. L'étude de la diversité génétique du GLRaV-1 dans plusieurs cépages sources issus de trois régions viticoles des USA tend à prouver l'existence d'un troisième groupe distinct d'isolats. La comparaison des séquences HSP70, CP, Cpd2 et p24 montre ainsi que les 3 groupes de variants seraient séparés selon le cépage source plutôt que par leur provenance géographique (Alabi et al., 2011).

- GLRaV-2

Le GLRaV-2 diffère des autres espèces d'enroulement aussi bien aux niveaux moléculaire que sérologique et biologique. Appartenant au genre *Closterovirus*, le GLRaV-2 est le seul virus de l'enroulement avec le GLRaV-7 à être transmissible par inoculation mécanique sur plante herbacée (*Nicotiana benthamiana*). Les virions des membres de ce genre ont une taille comprise entre 1250 et 2200 nm et contiennent une molécule linéaire d'ARN simple brin de polarité positive de 15,5 à 19,3 kb. Le poids moléculaire de la capside du GLRaV-2 est d'environ 22 kDa contre 35 à 43kDa pour les autres GLRaVs (Zhu et al., 1998). De plus, le GLRaV-2 est le *Closterovirus* dont l'organisation génomique se rapproche le plus de celle du *Beet yellows virus* (BYV) (Meng et al., 2005a). L'organisation de son génome présente neuf ORFs. Au cours des années 2000, 6 variants distincts de GLRaV-2 ont été identifiés : Pinot noir (PN), Red-Globe (RG), 93/955, OR1, BD, et PV-20 (Beuve et al., 2007). La majeure partie des isolats détectés de par le monde appartient au groupe GLRaV-2 PN ; leurs séquences nucléotidiques étant similaires de 95 à 99 %. Le variant RG présente 74 % d'homologie de séquence avec le variant GLRaV-2 PN (Rowhani et al., 2002). Le variant BD a respectivement 73,5 et 80,2 % d'homologie de séquence avec les variants PN et RG, tandis que le variant 93/955 présente respectivement 89,8 et 72,4 % d'homologie de séquence avec les variants PN et RG.
L'analyse de la CP complète et de la HSP70h partielle a confirmé récemment la séparation des isolats de GLRaV-2 selon 6 groupes de variants (Jarugula et al., 2010b) : PN (regroupant les isolats Semillon et 94/970), 93/555, H4, BD, RG et enfin PV-20.

- Diversité génétique des enroulements

La génomique des GLRaVs révèle une diversité d'espèces importante (Jarugula, 2010). Les études phylogénétiques tendent à prouver que les processus d'évolution ayant conduit à cette diversité virale au sein des *Closteroviridae* sont similaires à ceux qui ont entrainé la diversification des formes de vie sur terre (Dolja et al., 2006) : la complexification des différents *Closteroviridae* seraient donc le résultat de l'évolution à partir d'un ancêtre commun. En outre, le fait que ces virus soient inféodés au genre *Vitis* a conduit à l'accumulation de multiples formes virales au sein de ce taxon de végétaux pérennes (Karasev, 2000). L'ampleur de la variabilité moléculaire signalée pour chaque virus de l'enroulement s'accroît ainsi parallèlement avec la multiplication des recherches consacrées à cet aspect.

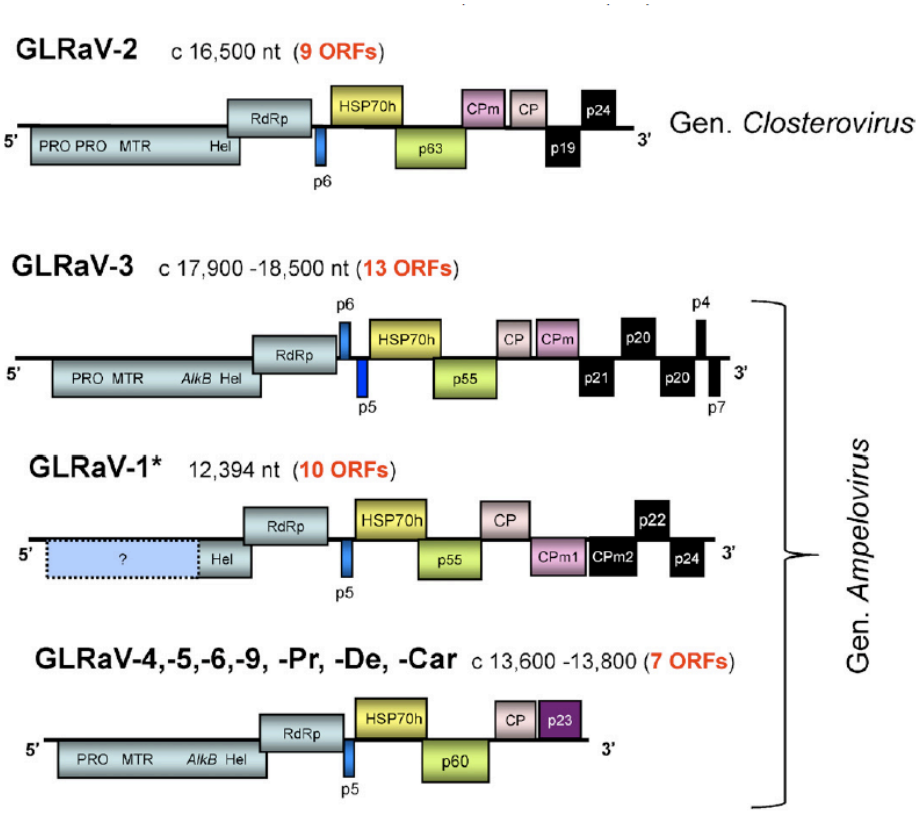



**Figure 2. Organisation génomique des virus de l'enroulement (*Grapevine leafroll-associated virus*). Une même couleur indique une fonction biologique similaire ou identique. PRO = protease, MTR = methyltransferase, AlkB = AlkB domaine, Hel = helicase, RdRp = RNA-dependent RNA polymerase, HSP70h = heat shock 70 protein homolog, CP = coat protein, CPm = coat protein minor. P5 ≈ HSP90, heat shock protein 90, P19 = suppresseurs de silencing (Gouveia et al., 2012). D'après Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (2012).**

## I.3. Infection mixte enroulement viral - complexe bois du strié

Les cas d'infection mixte chez *Vitis vinifera* sont courants. La présence régulière dans les vignes d'un ou plusieurs agents de l'enroulement viral avec les virus du complexe du bois strié a rendu difficile la distinction entre les deux types de maladies. La morphologie des virions des deux groupes étant similaire, les observations microscopiques ont souvent conduit à des méprises sur l'étiologie des maladies étudiées.

### *I.3.a. Premier signalement de la maladie*

Une des premières descriptions précise de striures, ou de cannelures sur tronc de vigne est effectuée sur des plantes atteintes de la maladie qualifiée alors de "rougeau" (Ravaz et Verge, 1924). La mention de deux types de symptômes distincts sur une même plante illustre, dès cette époque, que les virus de l'enroulement et du complexe du bois strié co-infectent la vigne de manière régulière. La maladie est désignée sous le terme "rough bark" en Californie (Hewitt, 1954) et "legno riccio" en Italie (Graniti et Ciccarone, 1961).

### *I.3.b. Identification des agents responsables du complexe du bois strié*

Après une identification préliminaire des agents putatifs (Goheen, 1968), il a fallu attendre la mise au point des techniques de détection sérologique pour distinguer définitivement les agents viraux respectivement responsables de l'enroulement et du complexe du bois strié (Gugerli et al., 1984).

Les deux premiers agents sont alors décrits et nommés Grapevine virus (GVs) : *Grapevine virus A* (GVA) et *Grapevine virus B* (GVB) (Milne et al., 1984; Boscia et al., 1993). Une troisième espèce, le GVC, (Monette et Godkin, 1993) se révèle être finalement identique au GLRaV-2 et n'existe donc plus désormais (Masri et al., 2006). Les méthodes moléculaires permettent par la suite la description du GVD (Abou-Ghanem et al., 1997) puis du GVE (Nakaune et al., 2008) (Tableau 2).

Une autre espèce virale du complexe du bois strié, identifiée comme sérologiquement distincte des GVs (Monette et Godkin, 1995), est associée définitivement aux symptômes observés sur *V. rupestris* (Meng et al., 1999) et appelée *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV).

### *I.3.c. Taxonomie*

L'observation et la description des particules flexueuses des virus associés au complexe du bois strié ont d'abord conduit à classer successivement ces viroses dans les genres *Trichovirus* et *Capillovirus* (Martelli, 1992; Martelli et al., 1994a; Monette et Godkin, 1995). Plus tard, l'ICTV approuve la création du genre *Vitivirus* qui regroupe notamment les GVA, GVB et GVD (Martelli et al., 1997). Ce genre est d'abord classé dans la famille des *Flexiviridae* (Adams et al., 2004), avant la division de cette dernière famille en quatre familles distinctes (Saldarelli, 2009). La dernière classification proposée pour les *Betaflexiviridae,* famille comprenant les virus associés au complexe du bois strié (Encadré 3), a été adoptée récemment (Carstens, 2010).

**Encadré 3 : Classification des *Betaflexiviridae* (ordre des *Tymovirales*)**

| | |
|---|---|
| Genre : *Vitivirus* | **Espèce GVA** |
| | **Espèce GVB** |
| | **Espèce GVD** |
| | **Espèce GVE** |
| Genre : *Foveavirus* | **Espèce GRSPaV** |
| Genre : *Trichovirus* | **Espèce *Grapevine berry inner necrosis virus*, GINV** |

### *I.3.d. Etiologie des maladies du bois strié*

Les maladies associées au bois strié de la vigne, ou Rugose wood, présentent une étiologie complexe, du fait des différentes espèces virales associées et de la variété des symptômes induits. Cependant, quatre maladies peuvent être distinguées selon ces symptômes sur la base de l'indexage sur hôte différentiels (Boudon-Padieu et al., 2000a) :

- Rupestris stem pitting (RSP)
- Kober stem grooving (KSG)
- Corky bark (CB)
- LN33 Stem grooving

On sait que le GVA provoque le KSG sur le porte greffe Kober 5BB (Garau et al., 1994; Borgo et al., 1997; Choueiri et al., 1997), le GRSPaV provoque le RSP sur *Vitis rupestris* et le GVB est associé au CB (Boscia et al., 1993). L'étiologie du LN33 Stem grooving semble plus délicate à définir et est vraisemblablement associée à la présence de plusieurs espèces virales. Les dégâts et symptômes sur le bois sont variables selon la combinaison des espèces virales impliquées (Rosa et al., 2011). Ainsi, le GVD seul apparaît avoir l'effet le plus important sur la réduction de la croissance, alors que le GVB semble avoir l'effet le plus défavorable pour la vigne lorsqu'il est en co-infection avec un autre virus du bois strié.

### *I.3.e. Agents viraux responsables du complexe du bois strié*

**Tableau 2. Liste des différents virus associés à la maladie du complexe du bois strié (N° d'accessions : base de données GenBank). * Désigne des séquences partielles du génome.**

| Espèce virale | Première description | Taille du génome en nucléotides (origine géographique/souche) | Numéro d'accession | Référence |
|---|---|---|---|---|
| GVA | (Milne et al., 1984) | 7351 (isolat PA3)<br>7378 (israel)<br>7360 (isolat GTR1-1)<br>7471 (isolat P163-M5) | AF 007415<br>AY 244516<br>DQ 787959<br>DQ 855082 | (Galiakparov et al., 2003a)<br>(Galiakparov et al., 2003b)<br>(Goszczynski et al., 2008)<br>(Goszczynski, 2007) |
| GVB | (Milne et al., 1984; Boscia et al., 1993) | 7599 (Italie)<br>7599 (isolat 94/971)<br>7599 (GVB-H1) | X 75448<br>EF 583906<br>GU 733707 | (Minafra et al., 1994)<br>(Moskovitz et al., 2008)<br>(Goszczynski, 2010a) |
| GVD | (Abou-Ghanem et al., 1997) | *963 -ORF 1&2<br>*363 –RdRp- | Y 07764<br>Y 15892 | (Abou-Ghanem et al., 1997)<br>(Saldarelli et al., 1998) |
| GVE | (Nakaune et al., 2008) | 7564 (TvAQ7)<br>7568 (SA94) | AB 432910<br>GU 903012 | (Nakaune et al., 2008)<br>(Coetzee et al., 2010) |
| GRSPaV | (Monette et Godkin, 1995) | 8744 (RSPaV-1)<br>8742 (St Georges 1)<br>8742 (Syrah)<br>8749 (Isolat GRSPaV-Mg) | AF 057136<br>AY 881626<br>AY 368590<br>FR 691076 | (Meng et al., 1998)<br>(Meng et al., 2005b)<br>(Lima et al., 2006)<br>(Morelli et al., 2011) |

### *I.3.f. Organisation génomique du GVA*

Le génome du GVA correspond à un ARN simple brin de polarité positive et de taille d'environ 7,4 kb. Il existe aussi des copies partielles de l'ARN génomique du GVA correspondant à trois ARN subgénomiques distincts (Figure 3). Le génome du GVA est organisé en cinq ORFs (Minafra et al., 1997; Martelli et al., 2007), qui codent pour une réplicase (ORF1), une protéine de mouvement (ORF3), une protéine de capside (ORF4) et une protéine suppresseur de silencing (ORF5). La fonction du polypeptide codé par l'ORF2 est encore inconnue (du Preez et al., 2011). Les études moléculaires sur de nombreux isolats de GVA ont permis l'identification de trois groupes de variants sur la base de similarités nucléotidiques (Goszczynski et Jooste, 2003b). L'analyse de la région 3' comprenant une partie de l'ORF 3, la totalité des ORFs 4 et 5 et une portion de l'UTR 3' montre que ces groupes présentent entre eux une identité nucléotidique allant de 78 à 89,3 %.

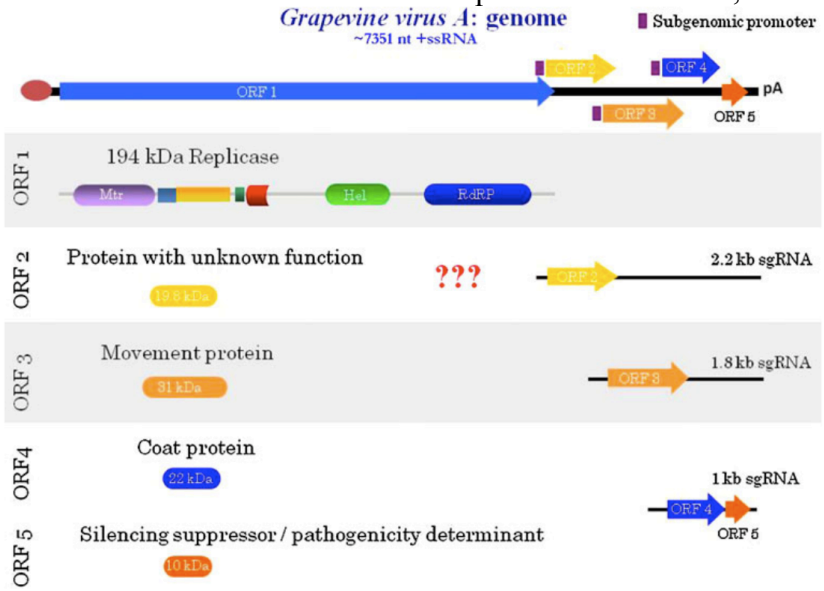



**Figure 3. Organisation génomique du *Grapevine virus A* et représentation de la stratégie d'expression du virus grâce aux trois ARN sub-genomiques. Mtr = methyltransferase, Hel = helicase, RdRP = RNA-dependent RNA polymerase. D'après du Preez (2011).**

## I.4. Symptomatologie

### *I.4.a. Description des symptômes d'enroulement*

L'enroulement viral provoque des symptômes caractéristiques sur les cépages de *Vitis vinifera* (Martelli et Boudon-Padieu, 2006). On observe premièrement, dès le mois de juin pour les ceps les plus touchés, l'apparition de ponctuations sur les limbes dans la partie inférieure des sarments. Sur les cépages rouges, ces taches sont rougeâtres, alors que sur les cépages blancs, le changement de coloration du vert au jaune blanchâtre est beaucoup moins évident à identifier. Ces manifestations sont la conséquence de la présence du virus dans les tissus phloémiens et de l'accumulation des produits de la photosynthèse dans les cellules végétales infectées, leur translocation vers les grappes et les organes de réserve de la vigne étant fortement perturbée par l'enroulement. Au cours de la saison végétative, les plages colorées fusionnent et s'étendent progressivement à toute la surface du limbe, à l'exception des nervures primaires et secondaires qui restent vertes (Bovey et al., 1980). Les feuilles malades présentent par la suite un enroulement caractéristique du limbe vers l'intérieur. Celui-ci s'épaissit, devient gaufré et cassant, et s'enroule vers la face inférieure. Les rougissements ou jaunissements s'étendent par la suite de façon systémique vers la partie supérieure des rameaux. Selon les cépages, le rougissement peut varier du rouge sang au rouge violacé (Figure 4). Les variations colorimétriques dans les cépages blancs sont moindres, et c'est surtout l'association de l'aspect chlorotique, de l'épaississement du limbe et de l'enroulement des feuilles qui témoigne de la présence d'enroulement. À la fin de l'été, les feuilles les plus atteintes peuvent brunir et présenter une nécrose de l'épiderme supérieur.

Pour tous les cépages, les vignes malades présentent des grappes plus chétives et un nombre réduit de raisins par souche (Goheen, 1970). La maturation des baies chez les ceps enroulés est retardée et irrégulière au niveau de la grappe et sur le cep. L'impact de l'enroulement sur la couleur des baies est faible sur les cépages à raisin noir, mais significatif sur les autres cépages. Sur les variétés à raisin rouge comme 'Emperor', 'Mission', 'Red Malaga' ou 'Tokay', les baies habituellement rouges sont insuffisamment colorées ; ce défaut est notamment à l'origine du nom "White Emperor disease" donné auparavant à l'enroulement viral en Californie (Galet, 1977). Sur les cépages blancs comme 'Melon', 'Riesling', 'Sylvaner' ou 'Sultanine', les baies des pieds infectés sont jaunâtres à la récolte au lieu d'être d'un blanc-verdâtre. L'enroulement viral ne provoque pas de symptômes sur bois, ni de défaut d'aoûtement des rameaux. L'intensité des symptômes d'enroulement est très variable, et peut même l'être d'une année à l'autre sur un même cep. L'expression de l'enroulement viral est dépendante de deux types de facteurs :

- facteurs agronomiques : comme nous l'avons vu précédemment les symptômes sur vigne dépendent principalement du type de cépage, mais également du type de porte-greffe utilisé (Golino et al., 2000b), ainsi que des conditions météorologiques, des températures estivales caniculaires tendant à réduire l'intensité des symptômes,
- facteurs sanitaires : l'expression de l'enroulement est dépendante de l'espèce virale considérée et de ses variants, certaines souches d'enroulement étant probablement hypoagressives. Cependant, on ne peut distinguer de façon précise une espèce virale lors d'un simple diagnostic de symptôme. Le cas du GLRaV-2 est particulier puisque cette espèce est en outre associée à des problèmes d'incompatibilité au greffage (Greif et al., 1995). Une vigne atteinte d'enroulement viral sera d'autant plus affectée si d'autres viroses, phytoplasmes, ou maladies cryptogamiques sont également présentes. Les vignes atteintes par le GLRaV-2 manifestent ainsi des symptômes d'enroulement extrêmement marqués lorsqu'elles sont aussi contaminées par le GVB (Golino et al., 2000a).

**Figure 4. Symptômes de l'enroulement viral sur (a) 'Pinot noir', (b) 'Einuni', (c) 'Pinot meunier', (d) 'Gamay' et (e) 'Gewurztraminer'. (f) Symptômes de Stem grooving sur LN33, cep témoin à gauche et cep contaminé à droite. Crédits photos : a, b, c, d, e (JLM), f (Lazar et Bisztray, 2011).**

### *I.4.b. Description des symptômes du bois strié*

Contrairement à l'enroulement viral, les symptômes du complexe du bois strié se manifestent chez la vigne surtout sur bois, bien que la présence concomitante d'un des virus du bois strié avec un GLRaV accentue les symptômes foliaires. Les porte-greffes américains sont les plus sensibles au bois strié, certaines combinaisons de greffage pouvant conduire à la mort du greffon (Galet, 1977). Les cépages européens sont souvent asymptomatiques mais des cas graves de bois strié peuvent survenir sur des *V. vinifera* francs de pied (Boudon-Padieu et al., 2000a).

Les maladies associées au complexe du bois strié se caractérisent par une faible vigueur, un retard de débourrement et un dépérissement des ceps touchés. Les symptômes sont observables sous le rhytidome, sous forme de striures et de cannelures sur le cylindre du bois (Figure 4). L'intensité des symptômes varie en fonction de l'assemblage porte-greffe/greffon, et ils apparaissent soit sur le greffon, soit sur le porte-greffe, soit sur les deux. La diminution de la vigueur d'un cep sera d'autant plus forte si l'on trouve sur un même pied les GVA, GVB, GVE, ou le GRSPaV en association (Rosa et al., 2011). Les altérations sur le bois sont diverses : striures creuses, cannelures profondes, aspect liégeux et spongieux, épaississement au niveau du point de greffe (Galet, 1977). Enfin, l'étiologie de la malade du "Syrah Decline", longtemps comparée au complexe du bois strié, ne semble pour autant pas associée avec la présence de GVs (Goszczynski, 2010b).

### *I.4.c. Confusions possibles*

Lors du diagnostic des symptômes d'enroulement, il peut y avoir un risque de confusion, principalement concernant les cépages rouges, avec des accidents climatiques ou mécaniques, des carences, des dégâts de ravageurs ou d'autres maladies infectieuses (Gugerli et al., 1990a; Collectif, 2006). On peut ainsi citer (Figure 5) :

- les confusions sur cépage rouge avec les dégâts des cicadelles *Empoasca vitis* ou *Stictocephala bisonia*, avec des jaunisses (notamment phytoplasmes de la flavescence dorée et du bois noir), avec l'Esca (maladie du bois), ou encore avec des carences minérales (magnésium, bore, ou potassium),
- les confusions sur cépage blanc avec des phytoplasmoses ou encore avec des carences minérales.

## I.5. Impact des virus de l'enroulement et du complexe du bois strié

### *I.5.a. Gamme d'hôtes des virus*

Les GLRaVs classés dans le genre *Ampelovirus* sont exclusivement inféodés aux plantes du genre *Vitis,* alors que les caractéristiques biologiques des GLRaV-2 et GLRaV-7 font qu'ils sont transmissibles mécaniquement à des plantes hôtes herbacées, soit de manière artificielle, soit par l'intermédiaire d'une plante parasite (Tableau 3). Contrairement au GRSPaV qui n'a été signalé à ce jour que sur plusieurs espèces de *Vitis*, les GVs sont également transmissibles mécaniquement et par vecteurs à diverses espèces de plantes herbacées, en particulier dans le genre *Nicotiana*. A la différence de la vigne, la présence des GVs, notamment du GVA, induit chez ces plantes l'apparition de symptômes caractéristiques sur feuilles : ponctuations jaunâtres, déformations importantes, rabougrissement.

Sur la vigne, les GLRaVs et GVs ont été détectés notamment sur *V. sylvestris* (Scheu, 1950), *V. rupestris* St George (Monette et Godkin, 1995), *V. labrusca* et *V. labruscana* (Soule et al., 2006), *V. coignetiae* (Saldarelli et al., 2005), *V. californica* et *V. californica* x *V. vinifera* (Klaassen et al., 2011; Karthikeyan et al., 2011 ).

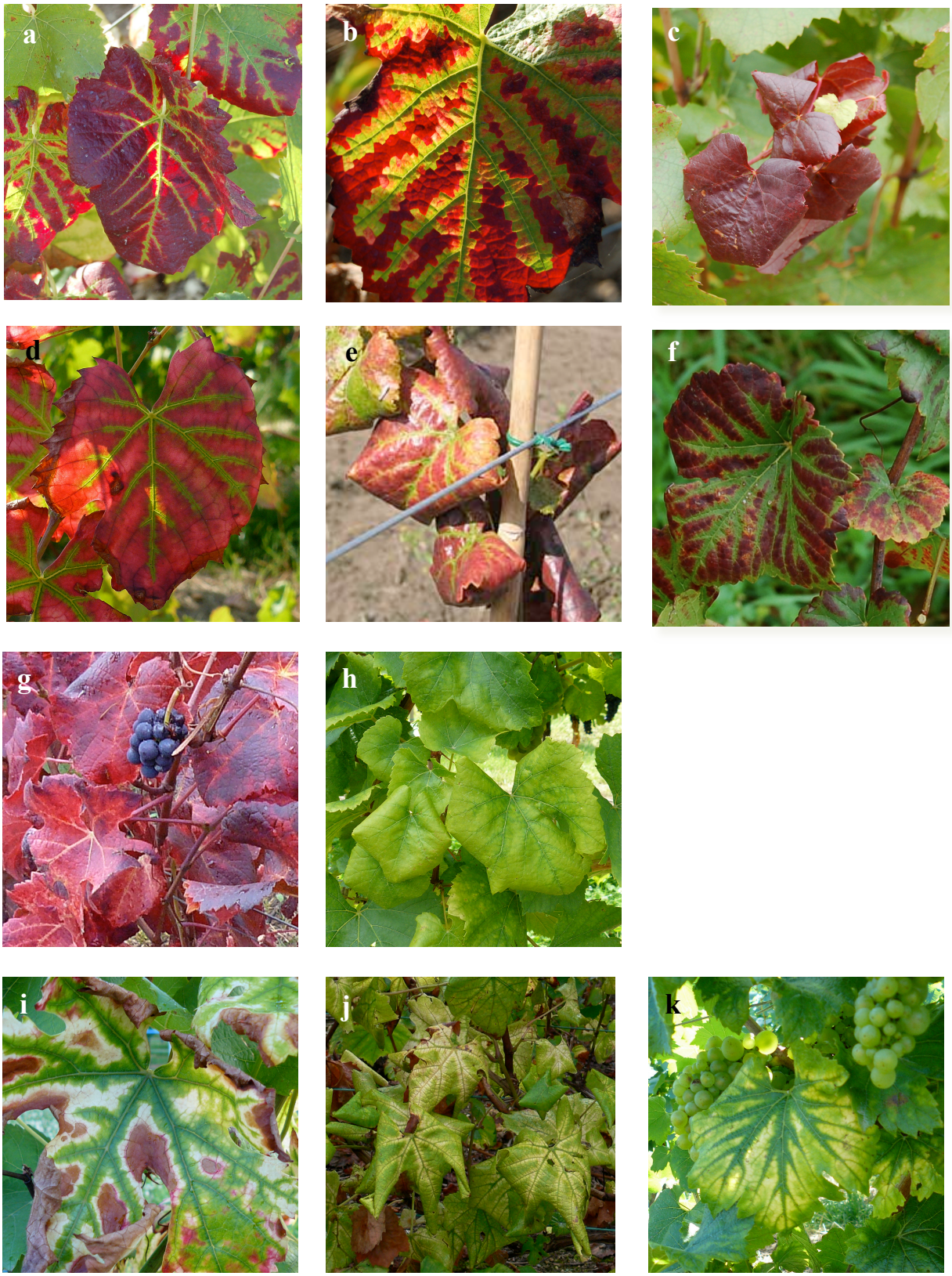



**Figure 5. (a) Symptômes d'enroulement viral sur 'Pinot meunier', (b) dégâts de la cicadelle *Empoasca vitis* sur 'Pinot meunier', (c) dégâts de la cicadelle *Stictocephala bisonia* sur 'Gamay', (d) symptômes d'Esca sur 'Gamay', (e) symptômes de Bois Noir sur 'Pinot noir', (f) carence magnésienne sur 'Pinot noir', (g) symptômes d'enroulement viral et bois strié sur 'Pinot noir', (h) symptômes d'enroulement viral sur 'Chardonnay', (i) symptômes d'Esca sur 'Ahmeur mouara', (j) symptômes de Flavescence dorée sur 'Chardonnay' et (k) carence magnésienne sur 'Chardonnay'. Crédits photos : a, b, c, d, f, g, h, i, k (JLM), e (INRA) et j (G. Uriel, CIVC).**

**Tableau 3. Liste des plantes hôtes herbacées connues pour certains virus de l'enroulement (sauf *Ampelovirus*) et du bois strié.**

| Espèce virale | Plantes hôtes herbacées connues | | Référence bibliographique |
|---|---|---|---|
| | Famille | Genre, espèce | |
| GLRaV-2 | *Solanaceae* | *Nicotiana benthamiana, N. clevelandii, N. occidentalis* | (Goszczynski et al., 1996; Abou-Ghanem et al., 1998; Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2000) |
| GLRaV-7 | *Aizoaceae* | *Tetragonia expansa* | (Mikona et Jelkmann, 2010) |
| | *Convolvulaceae* | *Cuscuta campestris, C. europea, C. reflexa* | |
| | *Solanaceae* | *N. occidentalis* | |
| GVA (GVB, GVD, GVE) | *Amaranthaceae* | *Gomphrena globosa* | (Monette et al., 1990; Martelli et al., 1994b) |
| | *Chenopodiaceae* | *Chenopodium amaranticolor, C. quinoa* | |
| | *Cucurbitaceae* | *Cucumis sativus, Cucurbita pepo* | |
| | *Fabaceae* | *Phaseolus vulgaris, Pisum sativum* | |
| | *Solanaceae* | *N. benthamiana, N. cavicola N. clevelandii, N. glutinosa, N. occidentalis, N. megalosiphon, N. rustica, N. tabacum* | |

### *I.5.b. Effets des viroses sur la vigne*

Aucune variété de *V. vinifera* n'est connue à ce jour comme étant résistante aux GLRaVs et aux GVs (Martelli et Boudon-Padieu, 2006). Les virus associés à l'enroulement et au complexe du bois strié sont strictement localisés dans les tubes criblés de la sève élaborée et les cellules compagnes et phloémiennes, induisant ainsi la systémie de la maladie des racines jusqu'aux baies, la transmission par greffage des viroses, et la persistance des virus dans le matériel dormant.

La présence de l'enroulement viral n'a a priori pas d'impact sur la longévité du cep bien que la maladie puisse être impliquée dans des cas de dépérissement de jeunes assemblages (Golino et al., 2002). Le GLRaV-2 possède un statut à part, car responsable d'un taux important d'incompatibilité au greffage (Boscia et al., 1995; Greif et al., 1995; Goszczynski et al., 1996). La maladie a d'autant plus d'impact lorsque les variants GLRaV-2 PN et RG infectent simultanément un même cep. Dans tous les cas, les dommages causés au greffage par les différents GLRaV-2 dépendent du porte-greffe utilisé (Borgo et al., 2006).

Le complexe du bois strié affecte l'alimentation hydrique et en nutriments par une déformation du système vasculaire et peut provoquer des incompatibilités au niveau du point de greffe pouvant conduire à la mort des ceps (Graniti et al., 1970; Gribaudo et al., 2006).

La vigne est co-infectée de manière très régulière, il a donc été difficile d'imputer véritablement les conséquences agronomiques à un type de virus précis avant l'identification des viroses par technique sérologique.

- Effet sur la photosynthèse et la vigueur

La présence des particules flexueuses des GLRaVs et des GVs entraîne des modifications du fonctionnement des cellules infectées. Les virus s'accumulent dans les cellules phloémiennes au sein d'inclusions cytoplasmiques, conduisant au dérèglement de la photosynthèse (Martelli et Boudon-Padieu, 2006). Par la suite, les tubes criblés se bouchent et se déforment empêchant la translocation des glucides depuis les parenchymes foliaires. La photosynthèse de type II est perturbée par une baisse sensible de la présence de polypeptides à la surface des thylakoïdes (Bertamini et al., 2004). Ainsi, l'amidon s'accumule dans les chloroplastes dégénérés conduisant alors aux symptômes foliaires caractéristiques décrits précédemment (Hoeffert et Gifford, 1967).

Les études effectuées à l'aide de mesures de la photosynthèse nette, de l'évapotranspiration, de la conductance stomatique ou encore des taux de chlorophylle ou de caroténoïde, montrent que l'impact de l'enroulement sur la photosynthèse varie principalement selon le cépage (Tableau 4). La photosynthèse nette est ainsi dépréciée de 25 à 65 % : il est admis que l'activité photosynthétique d'une vigne est d'autant plus affectée que l'intensité des symptômes d'enroulement est forte (Charles et al., 2006; Besse et al., 2009). L'intensité des symptômes et donc le niveau d'impact de l'enroulement viral varient ainsi selon l'âge du cep (Sampol et al., 2003), le cépage (Credi et Babini, 1997), la période de l'année (Mannini et al., 1996; Guidoni et al., 1997a), le ou les espèce(s) ou variant(s) de virus (Woodham et al., 1983; Boudon-Padieu et al., 2000a). Toutefois, l'impact de l'enroulement sur l'activité photosynthétique peut être significatif dès le début de la saison végétative, bien avant l'apparition des premiers symptômes d'enroulement (Guidoni et al., 1997b; Mannini et al., 1997b).

**Tableau 4. Exemples de l'impact de l'enroulement sur la photosynthèse nette (Pn), l'évapotranspiration (E), la conductance stomatique ($g_s$), le taux de chlorophylle (Chl) et de caroténoïdes (Car). Pourcentages correspondant à la différence par rapport au témoin sain. ns : différence entre témoin sain et cep infecté non significative.**

| Cépage/Porte-greffe | Pays | Pn | E | $g_s$ | Chl | Car | Référence |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Albariño | Espagne | -26 à -65 % | + 19 à 0 % | ns | | | (Cabaleiro et al., 1997) |
| Albariño/SO4 et 197-17C | Espagne | -40 à -50 % | ns | ns | | | (Cabaleiro et al., 1999) |
| Nebbiolo /Kober 5BB | Italie | -50 % | | | | | (Mannini et al., 1997a) |
| Malvasia de Banyalbufar | Espagne | -45 % | | -44 % | -41 % | -29 % | (Sampol et al., 2003) |
| Lagrein/Kober 5BB | Italie | - 65 % | -48 % | -59 % | -38 % | -22 % | (Bertamini et al., 2004) |
| Dolcetto/Kober 5BB | Italie | -33 % | | | | | (Mannini et al., 2009) |

L'infection par l'enroulement et le bois strié conduit également à une baisse de la croissance des sarments : les essais montrent ainsi que le poids des bois de taille diminue de 15 à 78 % (Cabaleiro et Segura, 1996; Walter et Martelli, 1996; Credi et Babini, 1997; Guidoni et al., 1997b; Komar et al., 2010).

Toutefois, l'effet de ces viroses sur la croissance et la vigueur de la vigne est parfois sujet à polémique. La diminution de croissance provoquée chez certains cépages est en effet jugée bénéfique, notamment dans certains vignobles à climat semi-continental, car réduisant les travaux de taille, le développement de maladies cryptogamiques, et augmentant la qualité des grappes obtenues (Guidoni et al., 1997a).

- Impact sur la phénologie de la vigne

Les effets de l'enroulement sur la phénologie de la vigne ont été assez peu étudiés. Selon les essais, le débourrement des plantes infectées peut être aussi bien avancé (Mannini et al., 1999) que retardé (Over De Linden et Chamberlain, 1970; Woodham et al., 1984). La période de floraison peut ainsi être retardée de 14 jours (Over De Linden et Chamberlain, 1970), reportant ainsi la véraison des baies (Goheen et al., 1988).

### *I.5.c. Effet des viroses sur la récolte de raisin*

Les conséquences de la présence de l'enroulement ont davantage été mesurées sur la récolte de raisin : rendement, concentration en sucre dans les moûts, acidité tritrable, teneur en anthocyanes.

- Effet sur le rendement

L'enroulement viral est associé à des chutes de rendement dues à une diminution du nombre de grappes, de la taille des grappes, ou encore du nombre de baies par grappes. Il a ainsi été démontré que les rendements pouvaient être réduits de 17 à 40 % sur 'Gamay' en Suisse (Bovey, 1970), de 20 à 68 % sur 'Pinot noir' en France et en Allemagne (Hofmann, 1984; Walter et Legin, 1986), de 43 à 50 % sur 'Chardonnay' en France (Walter et Legin, 1986), de 42 à 54 % sur 'Savagnin Rose' en France (Komar et al., 2010), et de 30 à 50 % sur 'Cabernet franc' (Atallah et al., 2012). En revanche, il semble que l'impact de l'enroulement sur le rendement soit réduit, voire inexistant dans les pays viticoles à climat doux, notamment dans le pourtour méditerranéen. Ainsi les quantités de raisin ne sont pas réduites pour les cépages 'Tinto Cao' et 'Touriga Nacional' (Magalhaes et al., 1997), 'Crato Branco' et 'Moscatel de Setúbal' (Martins et al., 1997), 'Nebbiolo' (Mannini et al., 1997a), ou 'Albariño' (Cabaleiro et al., 1999). Mais des contre-exemples existent, notamment pour les cépages 'Cannonau' (Grenache) (Garau et al., 1997), 'Moll' et 'Manto-Negro' (Cretazzo et al., 2010) et 'Dolcetto' (Mannini et al., 2012).

- Impact sur la qualité

L'enroulement viral conduit généralement à une dépréciation de la qualité des baies par une diminution du taux de sucre dans les moûts ainsi que par augmentation de l'acidité titrable (Bovey, 1970; Goheen, 1970; Lider et al., 1975; Wolpert et Vilas, 1992; Kovacs et al., 2001; Besse et al., 2009). Cependant, la présence de la maladie peut également entraîner de meilleurs taux de sucres chez certains cépages (Tableau 5).

**Tableau 5. Exemple de l'impact des viroses de l'enroulement et du bois strié sur la concentration en sucre (°Brix) et l'acidité titrable dans les baies (différence moyenne par rapport au témoin sain). ns : différence non significative entre le témoin et les ceps infectés.**

| Cépage infecté | Viroses impliquées | Pays | Durée de l'étude | Concentration en sucre (°Brix) | Acidité titrable (g/L) | Référence |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Merlot | GLRaV-3 | Italie | 2 ans | - 1,6 | + 1,3 | (Borgo et Angelini, 2002) |
| Albariño | GLRaV-3 | Espagne | 3 ans | - 1 | + 1 | (Cabaleiro et al., 1999) |
| Pinot noir<br><br>Chasselas | GLRaV-1<br>GLRaV-3<br>GLRaV-3 | Suisse | 2 ans | + 0,7<br>- 2,1<br>- 1,1 | + 0,2<br>+ 0,4<br>ns | (Besse et al., 2009) |
| Savagnin rose | GLRaV-1<br>GVA<br>GRSPaV | France | 6 ans | + 3 | - 1 | (Komar et al., 2010) |
| Tinto Cão<br>Touriga nacional | GLRaV-3 | Portugal | 4 ans | ns | ns | (Magalhaes et al., 1997) |
| Vidal blanc<br>St. Vincent | GLRaV-3 | Etats-Unis | 1 an | + 1<br>+ 0,6 | + 0,6<br>+ 0,8 | (Kovacs et al., 2001) |
| Nebbiolo | GLRaV-3<br>GVA | Italie | 5 ans | + 0,5 | + 0,4 | (Mannini et al., 1997a) |
| Riesling | GLRaV-3 | USA | 3 ans | - 1,2 | + 0,5 | (Wolpert et Vilas, 1992) |

Sur les plantes enroulées, on constate une baisse de 14 % d'alcool probable sur 'Chardonnay' ou de 10 % sur 'Pinot noir' (Walter et Legin, 1986). Des expérimentations menées en Italie sur 'Nebbiolo' montrent que l'association GLRaV-3 et GVA diminue les taux d'anthocyanes dans les baies, alors que ces taux augmentent proportionnellement dans les feuilles, entraînant ainsi une modification de la coloration du vin (Mannini et al., 1997a). La chute des taux d'anthocyanes a également été observée chez d'autres cépages comme le 'Pinot noir' (Lee et Martin, 2009) ou 'Emperor', pour lequel la couleur des baies est fortement impactée (Krake, 1993). On peut signaler que les modifications de la couleur des baies par l'enroulement peut présenter un aspect économique positif, notamment pour le cépage 'Crimson Seedless', dont les baies sont davantage appréciées sur le marché asiatique lorsqu'elles sont moins noires (Singh Brar et al., 2008).

Les recherches se sont concentrées également sur les mécanismes de défense mis en place par la vigne lors de l'infection virale. Ainsi, il semble que l'infection par le GLRaV-3 occasionne une augmentation des taux de stilbènes dans les feuilles sur 'Merlot' (Bertazzon et al., 2009). De même, les concentrations en polyamines semblent supérieures dans les feuilles infectées chez le 'Pinot noir' (Lee et Martin, 2010). Ces études tendent ainsi à montrer que la présence des viroses entraîne un stress biotique et ainsi une synthèse accrue de molécules de défense par les ceps infectés.

## I.6. Distribution

La présence de l'enroulement viral et du bois strié de la vigne a été signalée dans pratiquement l'ensemble des pays viticoles du globe (Figure 6).

**Figure 6. Localisation des pays affectés par les viroses de l'enroulement et du bois strié.**

Le signalement de ces viroses s'est basé d'abord sur les observations des symptômes, puis principalement sur l'utilisation en routine de la détection par DAS-ELISA pour la sélection sanitaire. Ainsi, les nombreuses études menées sur l'état sanitaire des vignobles permettent de fournir une liste précise, mais certainement non exhaustive, de la présence de chaque espèce virale dans les pays viticoles (Tableau 6).

### *I.6.a. Répartition des espèces virales au niveau mondial*

Le GLRaV-3 est l'espèce prédominante dans les vignobles mondiaux, particulièrement dans le bassin méditerranéen et les pays viticoles émergents (Afrique du Sud, Argentine, Australie, Chili, Nouvelle-Zélande et Etats-Unis). En revanche, le GLRaV-1 semble davantage cantonné aux pays sous influence continentale : Allemagne, Autriche, France, Slovaquie, Suisse, Tchéquie. Cette différence est certainement davantage liée à l'état sanitaire des cépages utilisés plutôt qu'à une adaptation d'une espèce virale à une zone climatique donnée. Le matériel végétal potentiellement infecté étant échangé entre des zones climatiques semblables, il apparaît cohérent d'observer la prédominance d'une espèce virale dans un pays, ou même au sein d'une région viticole.

Les GLRaV-1 et GLRaV-3 sont fréquemment signalés en infection mixte avec le GVA. L'espèce la plus répandue ensuite est le GLRaV-2. Les autres espèces virales ont été décrites plus récemment et ont donc été signalées dans un nombre moindre de pays. De même, les programmes de sélection sanitaire n'ont pas encore établi de détection systématique au vignoble pour ces espèces, ce qui explique sans doute leurs signalements plus rares.

### *I.6.b. En France*

A ce jour, seuls les GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3 et le GVA sont reconnus comme étant naturellement présents dans les vignoble commerciaux en France métropolitaine. Une étude de l'état sanitaire d'une collection de cépages et de porte-greffes montre que le GRSPaV est présent dans 99 % des vignes testées (IFV 2011).

**Tableau 6. Liste des pays dans lesquels chaque espèce d'enroulement et du bois strié a été signalée au vignoble. D'après Bovey et Martelli (1986), Bovey (1999), Martelli et Boudon-Padieu (2006).**

| Virus | Europe | Afrique | Asie | Océanie | Amériques |
|---|---|---|---|---|---|
| GLRaV-1 | Albanie<br>**Allemagne**<br>**Autriche**<br>**Chypre**<br>Croatie<br>**Espagne**<br>**France**<br>Grèce<br>Hongrie<br>Italie<br>Malte<br>Pologne<br>Slovénie<br>Serbie<br>Suisse<br>**Slovaquie**<br>**Tchéquie** | Afrique du Sud<br>Egypte<br>Tunisie | Inde<br>Iran<br>Japon<br>Liban<br>Palestine<br>**Turquie**<br>Syrie<br>Yémen | Australie<br>Nouvelle-Zélande | Argentine<br>Brésil<br>Canada<br>Chili<br>Etats-Unis |
| GLRaV-2 | Chypre<br>Croatie<br>Espagne<br>**France**<br>Grèce<br>Hongrie<br>Italie<br>Portugal<br>Suisse<br>Tchéquie | Afrique du Sud<br>Tunisie | Chine<br>Palestine<br>Japon<br>Syrie<br>Turquie<br>Yémen | Australie<br>Nouvelle-Zélande | Argentine<br>Brésil<br>Canada<br>Chili<br>Etats-Unis |

**Tableau 6, suite.**

| Virus | Europe | Afrique | Asie | Océanie | Amériques |
|---|---|---|---|---|---|
| GLRaV-3 | Albanie<br>Allemagne<br>Autriche<br>Chypre<br>**Croatie**<br>Espagne<br>**France**<br>Grèce<br>Hongrie<br>Italie<br>Malte<br>Portugal<br>Roumanie<br>Slovénie<br>Suisse<br>Serbie<br>Tchéquie<br>Ukraine | Afrique du Sud<br>**Egypte**<br>**Tunisie** | Corée du Sud<br>Chine<br>**Iran**<br>Israël<br>Japon<br>Jordanie<br>Palestine<br>Taiwan<br>Turquie<br>Syrie<br>Yémen | Australie<br>Nouvelle-Zélande | Argentine<br>Brésil<br>**Canada**<br>Chili<br>**Etats-Unis**<br>Mexique |
| GLRaV-4 | Chypre<br>Espagne<br>Hongrie<br>Portugal | Afrique du Sud | Chine<br>Taiwan<br>Turquie | Australie | Etats-Unis<br>Chili |
| GLRaV-5 | Espagne<br>Grèce<br>Hongrie<br>Portugal<br>Tchéquie | Afrique du Sud<br>Tunisie | Chine<br>Turquie | Australie<br>Nouvelle-Zélande | Brésil<br>Etats-Unis<br>Chili |
| GLRaV-6 | Italie<br>Grèce<br>Slovénie | Afrique du Sud | Turquie | | Brésil |
| GLRaV-7 | Albanie<br>Grèce<br>Italie<br>Suisse | Egypte | Arménie<br>Egypte<br>Palestine<br>Turquie | | Chili<br>Etats-Unis |
| GLRaV-9 | | Tunisie | | Australie | Chili<br>Etats-Unis |
| GLRaV-10 | Grèce | | | | |
| GLRaV-11 | Grèce | | | | |
| GLRaV-Car | | | | | Etats-Unis |
| **Virus** | **Europe** | **Afrique** | **Moyen-Orient , Asie** | **Océanie** | **Amériques** |
| GVA | **Allemagne**<br>Bulgarie<br>**Chypre**<br>**Croatie**<br>Espagne<br>**France**<br>Grèce<br>Hongrie<br>Italie<br>Malte<br>Serbie<br>Slovaquie<br>Slovénie<br>Tchéquie<br>Ukraine | **Egypte**<br>**Tunisie**<br>Afrique du Sud | Chine<br>Iran<br>Israël<br>Japon<br>Jordanie<br>Liban<br>**Turquie**<br>Syrie<br>Yémen | | Argentine<br>Chili<br>Colombie<br>Brésil<br>Etats-Unis |
| GVB | Chypre<br>Croatie<br>Grèce<br>Italie<br>Portugal<br>Suisse<br>Tchéquie | Afrique du Sud<br>Egypte<br>Tunisie | Chine<br>Iran<br>Israël<br>Japon<br>Palestine<br>Turquie<br>Syrie | | Argentine<br>Canada<br>Chili<br>Etats-Unis<br>Mexique |
| GVD | Italie | | | | |
| GVE | | | | | Japon |

# II. Les cochenilles

Les cochenilles sont distribuées dans toutes les régions biogéographiques du monde, dont environ 2000 espèces dans la région Paléarctique. Leur statut de ravageurs des cultures, plus rarement d'insectes utiles, n'en fait pour autant pas un groupe d'insecte très connu, vraisemblablement du fait de leur caractère cryptique.
L'existence et la diversité des cochenilles sont intimement liées à l'apparition et à l'évolution du règne végétal, en particulier des angiospermes, avec lesquelles elles ont établi des associations étroites. Les fossiles de cochenilles primitives les plus anciens connus à ce jour datent du Permien, après l'explosion de la diversité végétale terrestre pendant le Carbonifère. Une des premières traces de cochenille morphologiquement semblable à celles d'aujourd'hui provient de fragment d'ambre datant du Crétacé Supérieur (Beardsley, 1969).
L'étude des cochenilles, ou coccidologie, débute véritablement en Europe au XVIII$^{ème}$ siècle avec le développement de l'arboriculture, de l'horticulture et l'intensification des échanges de végétaux depuis les colonies. René Antoine Ferchault de Réaumur consacrera notamment un travail remarquable à l'étude des cochenilles, ou gallinsectes, avec nombre d'illustrations de leurs caractéristiques morphologiques (De Réaumur, 1738).
Après quelques généralités sur les cochenilles, nous décrirons les caractéristiques principales des trois familles dans lesquelles sont classées les espèces trouvées sur vigne en France. Parmi elles, nous présenterons une fiche descriptive des 5 espèces les plus couramment rencontrées sur vigne.

## II.1. Généralités

### *II.1.a. Systématique*

Les cochenilles sont des insectes classés dans la super-famille des *Coccoidea*, qui comprend environ 7500 espèces décrites, et certainement encore de nombreuses non identifiées (Ben-Dov et al., 2012). Classées dans l'ordre des *Hemiptera* et le sous ordre des *Sternorryncha,* les cochenilles sont donc parentes d'autres insectes piqueurs-suceurs, pucerons (*Aphidoidea*), aleurodes (*Aleyrodoidea*) et psylles (*Psylloidea*) (Kondo et al., 2008). Parmi les 46 familles de cochenilles identifiées (dont 14 sont des familles fossiles), on distingue 6 familles d'importance économique : *Coccidae*, *Diaspididae*, *Eriococcidae*, *Margarodidae*, *Ortheziidae*, et *Pseudococcidae.*

### *II.1.b. Identification*

La classification et l'identification des cochenilles sont basées essentiellement sur la morphologie des femelles adultes grâce à une observation microscopique des caractéristiques de leur cuticule (Kosztarab et Kozar, 1988). Bien qu'ils soient difficiles à observer du fait de leur courte durée de vie, les mâles de cochenilles peuvent représenter un moyen pour distinguer les espèces (Giliomee, 1995). L'amélioration des méthodes d'observations microscopiques et d'analyses phylogénétiques a permis l'utilisation de ces techniques pour l'étude des cochenilles, conduisant ainsi régulièrement des révisions dans la taxonomie de ces insectes. On peut ainsi citer les travaux sur la phylogénie des *Coccoidea* basés sur les séquences ADN de gènes nucléaires (Cook et al., 2002; Downie et Gullan, 2004), sur l'utilisation complémentaire d'analyses phylogénétiques et morphologiques de la famille des *Pseudococcidae* (Hardy et al., 2008; Williams et Gullan, 2010), ou bien sur l'analyse de la diversité des endosymbiontes au sein de la sous-famille *Phenacoccinae* (Gruwell et al., 2010).

La distinction morphologique des espèces de cochenilles nécessite d'observer le stade de développement approprié de l'insecte et requiert ainsi une expertise importante. Ces contraintes ont entraîné la mise au point de techniques moléculaires de routine pour distinguer rapidement les espèces de cochenilles et ainsi faciliter la gestion de ces ravageurs. Des marqueurs largement utilisés pour l'identification des espèces dans le règne animal ont ainsi été mis au point. On distingue notamment le gène mitochondrial cytochrome oxidase I (COI), très utilisé en barcoding (Demontis et al., 2007; Rung et al., 2008; Saccaggi et al., 2008; Correa et al., 2011; Malausa et al., 2011). Les gènes nucléaires EF1-α, 18S, et 28S (Gullan et al., 2010) sont également utilisés. Les régions internal transcribed spacer 1 et 2 (ITS1, ITS2), sont utilisées pour distinguer des espèces proches (Beuning et al., 1999). Enfin, les gènes de l'endosymbionte *Tremblaya princeps* (16S-23SrDNA) sont employés pour distinguer et classer les genres et espèces de cochenilles dans les sous-familles au sein des *Pseudococcidae* (Baumann et Baumann, 2005).
Les manuels utilisés pour la reconnaissance et l'identification des cochenilles traitent généralement d'une famille particulière, ou bien d'une région biogéographique donnée :

- *Coccidae* – monde : (Ben-Dov, 1993; Hodgson, 1994)
- *Pseudococcidae* – monde : (Ben-Dov, 1994)
- *Coccoidea* – Europe centrale : (Kosztarab et Kozar, 1988)

### *II.1.c. Morphologie*

Les cochenilles sont des insectes généralement petits, sauf quelques espèces subtropicales (Foldi, 2003b). D'un aspect très différent des autres hémiptères, les femelles de cochenilles sont toujours aptères et sont qualifiées de néoténiques, c'est à dire ressemblant aux formes larvaires, à l'exception des cochenilles dites à kystes (*Kermesidae* notamment) pour lesquelles chaque stade est morphologiquement différent. Les femelles sont de couleurs et de formes très variables (Figure 7) mais généralement ovoïdes, allongées ou circulaires, avec des tailles variant entre 1 et 5 mm de longueur en Europe (Kosztarab et Kozar, 1988). La forme du corps des femelles peut subir des modifications importantes en raison du processus de ponte, notamment chez les *Coccidae.*
On observe chez les cochenilles un dimorphisme sexuel très prononcé. Chez la femelle, la tête et le thorax sont fusionnés, alors que le mâle présente la morphologie d'un insecte parfait : tête, thorax et abdomen sont bien différenciés (Giliomee, 1967). Les mâles sont ailés (ressemblant à des moucherons), dépourvus de pièces buccales, d'un aspect délicat, et ne vivent que quelques jours le temps de s'accoupler. Leurs trois paires de pattes sont bien développées, les antennes sont longues et filiformes et l'on observe des soies cireuses au bout de l'abdomen (Giliomee, 1997).

### *II.1.d. Biologie*

Selon l'espèce de cochenille, les femelles pondent des œufs (oviparité) ou donnent naissance à de jeunes larves (viviparité), soit dans une 'chambre' située sous leur corps, soit à l'intérieur d'un ovisac cireux. Selon l'espèce, les femelles peuvent produire de 5000 à 8000 œufs. L'exosquelette de la femelle morte permet pour certaines espèces (*Coccidae* et *Kermesidae*) de protéger les œufs avant leur éclosion (Kosztarab et Kozar, 1988). Après l'éclosion, les larves de premier stade se dispersent sur les tissus végétaux après avoir observé une courte période d'immobilité (Marotta, 1997). De forme elliptique ou ovoïde et de taille réduite (0,3 à 1 mm), ces larves de premier stade, ou néonates, correspondent au stade le plus mobile et sont responsables de la dispersion passive et active de l'insecte (Greathead, 1997).

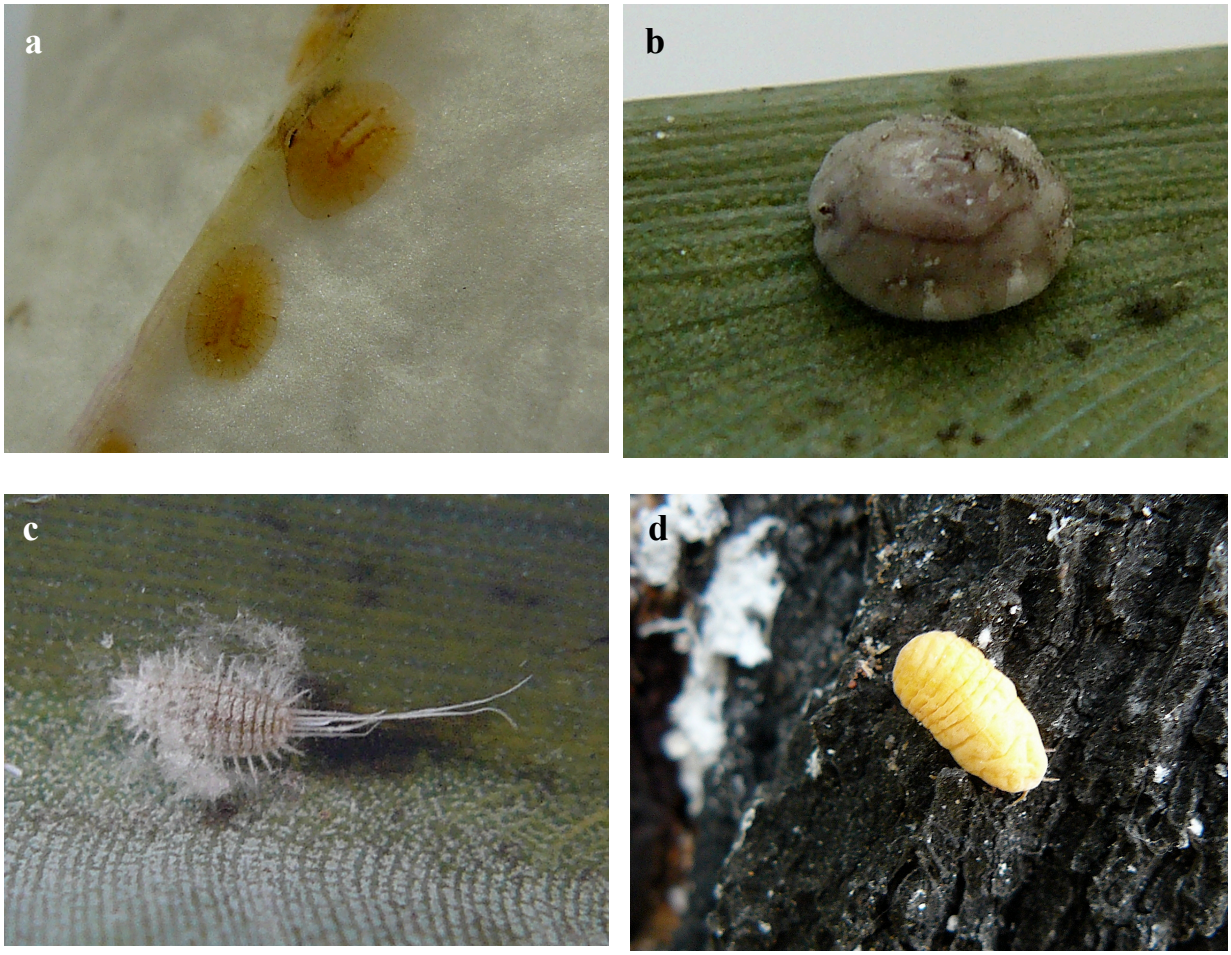



**Figure 7. Exemple de diversité morphologique chez les *Coccoidea*. (a) *Coccus hesperidum* (*Coccidae)* sur fleur de *Phalaenopsis* sp., (b) *Ceroplastes rusci* (*Coccidae*) sur *Strelitzia* sp., (c) *Pseudococcus longispinus* (*Pseudococcidae*) sur *Strelitzia* sp., (d) *Marchalina hellenica* (*Margarodidae*) sur *Pinus halepensis*. Crédits photos : JLM.**

Une fois fixées sur les tissus végétaux, les néonates se déplacent rarement une nouvelle fois avant la mue au stade larvaire suivant. On assiste à la différenciation entre le cycle de la future femelle et celui du futur mâle aux stades larvaires suivants. Les femelles passent par deux ou trois stades larvaires successifs (L1, L2, L3) avant d'atteindre le stade adulte alors que les mâles possèdent deux stades différenciés, un stade prépupe (L3) et pupe (L4). Les cochenilles hivernent à divers stades de développement selon l'espèce. Pour les espèces univoltines, les cochenilles se déplacent avant la chute des feuilles et se réfugient sur les parties ligneuses des plantes afin d'hiverner généralement au second stade larvaire pour les femelles, et au stade prépupe pour les mâles. La distinction entre les deux sexes est donc aisée en hiver notamment grâce au comportement grégaire des mâles qui sont concentrés en agrégats sur les branches ou sous l'écorce. Après leur émergence, la maturation des mâles prend quelques jours avant qu'ils puissent voler, répondre aux phéromones sexuelles des femelles et enfin s'accoupler. La reproduction est en général bisexuée mais d'autres modes de reproduction existent également, comme la parthénogénèse (Kosztarab et Kozar, 1988; Borges da Silva et al., 2010). Les diverses modes de reproduction peuvent d'ailleurs coexister au sein d'une même espèce (Foldi, 2003a). Le nombre de générations par année varie principalement selon l'espèce ainsi que la zone géographique considérée.

### *II.1.e. Comportement alimentaire*

Les cochenilles sont des insectes phytophages, piqueurs-suceurs de sève. Les femelles sont souvent regroupées en colonies, et fixées au végétal hôte sur lequel elles se nourrissent en pénétrant leur rostre vers les tissus phloémiens, plus rarement dans le mésophylle et le xylème. Le rostre des cochenilles, comme de la plupart des insectes chez les *Sternorrhyncha* est composé de stylets mandibulaires qui coulissent indépendamment et alternativement pour ensuite permettre aux stylets maxillaires d'atteindre les tissus végétaux adéquats (Foldi, 1997). Les stylets maxillaires délimitent deux canaux: le canal salivaire (position ventrale) permet la sécrétion d'une salive formant une gaine solidifiée facilitant la pénétration des stylets, et le canal alimentaire (position dorsale) permet l'adduction de la sève vers le cibarium, l'œsophage et le reste du système digestif. Le régime alimentaire des cochenilles se composant principalement d'hydrates de carbone, le système excréteur permet l'évacuation de leur surplus et de réguler le déséquilibre alimentaire via la chambre filtrante, sous la forme d'une substance visqueuse et riche en sucre appelée miellat.

Les cochenilles possèdent une association obligatoire avec des procaryotes endosymbiotiques leur permettant d'avoir un complément en nutriments (notamment en azote et stérols), et jouant probablement un rôle dans la résistance aux pathogènes ou dans la détoxification de composé végétaux secondaires (Tremblay, 1997; Baumann et Baumann, 2005).

### *II.1.f. Impact des cochenilles*

La plupart des espèces de cochenilles sont polyphages, certaines sont oligophages, n'infestant que certaines plantes au sein d'une famille ou d'un genre botanique, très peu sont enfin monophages (Kosztarab et Kozar, 1988). Ces insectes peuvent infester aussi bien les plantes ligneuses qu'herbacées. Les conditions de croissance du végétal influencent considérablement les infestations par les cochenilles, expliquant ainsi que les plantes cultivées (donc fertilisées, taillées, et irriguées) représentent des hôtes très favorables pour les cochenilles (Franco et al., 2009).

Quelques espèces de cochenilles représentent un intérêt économique notable pour les activités humaines. L'exemple le plus connu est une cochenille originaire du Mexique, *Dactylopius coccus* (Costa), qui fournit le colorant rouge carmin. En Europe, le kermès des teinturiers, *Kermes vermilio* (Planchon), est connu et utilisé depuis l'Antiquité à des fins similaires (Foldi, 2003a). On peut citer également l'utilisation du miellat de cochenilles pour la fabrication de miel notamment à partir d'espèces de *Margarodidae*: *Ultracoelostoma assimile* (Maskell) en Nouvelle-Zélande, *Xylococcus macrocarpi* (Coleman) aux Etats-Unis et *Marchalina hellenica* (Gennadius) en Grèce et en Turquie (Kunkel, 1997). Enfin, *Ericerus pela* (Chavannes) est connu en Chine depuis des temps anciens pour l'utilisation de ses cires, notamment dans la fabrication de bougies et dans la médecine traditionnelle (Qin, 1997).

Hormis ces quelques aspects avantageux, les cochenilles constituent d'importants ravageurs des cultures au niveau mondial. Elles sont souvent difficiles à discerner de par leurs mœurs cryptiques et sont ainsi seulement repérées quand leur niveau d'infestation est déjà important. Les cochenilles provoquent des dommages sur arbres fruitiers, plantes ornementales, arbres forestiers ou encore plantes d'intérieur. Le pommier, l'avocatier, le caféier, le cacaoyer, les agrumes, la vigne, le manioc, l'ananas, le riz et la canne à sucre représentent les cultures parmi les plus touchées par les problèmes sanitaires causés par cochenilles (Jahn et al., 2003).

Les dégâts engendrés par cochenilles sont de deux types :

- dégâts directs, par prélèvement de sève qui conduit à un affaiblissement général de la plante. De même, la toxicité de la salive injectée peut entraîner une réaction spécifique des végétaux (Vranjic, 1997) avec déformations et chloroses sur feuilles, avortements et dessèchements de jeunes pousses et nanismes. La vigueur de la plante et donc les rendements agricoles sont d'autant plus affectées en cas de pullulation,
- dégâts indirects, par vection de maladies virales. Cet aspect sera approfondi en détail dans la synthèse consacrée à la transmission de virus par cochenilles (Chapitre 2). La sécrétion de miellat engendre également des dégâts sur les plantes infestées. D'une part, les feuilles sont recouvertes d'une pellicule de miellat qui perturbe la photosynthèse et les échanges gazeux à cause de l'obstruction des stomates, et de l'effet loupe de cette couche luisante. D'autre part, le miellat est également le siège du développement de champignons saprophytes, non pathogènes pour les plantes, regroupés sous le nom de fumagine. Le mycélium de ces champignons forme une couche noirâtre et poudreuse adhérant à la surface les organes végétaux souillés par le miellat. Le développement important de cette fumagine perturbe la transmission des rayons lumineux (Mibey, 1997) et donc la photosynthèse. L'impact du miellat et de la fumagine est également important sur la valeur esthétique et gustative des fruits commercialisés.

Enfin, le caractère ravageur des cochenilles peut aussi être considéré comme utile lorsque qu'elles sont utilisées en tant qu'agent de lutte biologique contre des espèces végétales exotiques invasives. Un exemple célèbre est le succès de la lutte biologique en Australie contre le cactus *Opuntia stricta* (Haw.) grâce à la cochenille *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hosking et al., 1994).

## II.2. Les cochenilles sur la vigne en France

### *II.2.a. Diversité*

La faune coccidienne de France métropolitaine a été répertoriée assez récemment et révèle une diversité de 381 espèces réparties dans 143 genres et 13 familles (Foldi, 2001). Les quatre familles prépondérantes sont les *Pseudococcidae, Diaspididae, Coccidae* et *Eriococcidae*. Parmi toutes ces espèces, neuf seulement ont été décrites sur la vigne en France (Tableau 7). En comparaison, 36 espèces ont par exemple pu être répertoriées sur vigne en Argentine, au Chili et au Brésil (Foldi et Soria, 1989). Parmi les neuf espèces de cochenille décrites sur vigne en France, huit sont considérées comme ayant un impact économique important (Foldi, 2001), et la plupart sont également problématiques sur la vigne dans d'autres pays.

Comme beaucoup d'autres organismes biologiques, les cochenilles sont susceptibles d'être introduites dans de nouvelles zones, où elles sont considérées alors comme exotiques. L'intensification actuelle des flux intercontinentaux entraîne un accroissement des échanges de marchandises et de voyageurs, ce qui augmente les risques d'introduction de nouvelles espèces, et par conséquent la liste des ravageurs potentiels sur une culture. Ainsi, quatre espèces introduites sont établies depuis longtemps sur la vigne en France : *N. innumerabilis*, *P. vitis* provenant d'Amérique du Nord ainsi que *P. citri* et *P. ficus*, vraisemblablement importées depuis le pourtour méditerranéen ou le Moyen-Orient. Plus récemment, les coccidologues ont signalé l'introduction de nombreuses autres espèces de cochenille en France depuis les pays méditerranéens, asiatiques, ou d'Australasie (Streito et Martinez, 2005; Germain et Matile-Ferrero, 2006).

**Tableau 7. Liste des espèces de cochenilles répertoriées sur la vigne en France. Les données relatives à leur répartition correspondent aux aires de répartition connues actuellement pour chaque espèce. D'après Sforza (2008).**

| Famille | Genre, espèce | Distribution |
|---|---|---|
| *Coccidae* | *Neopulvinaria innumerabilis* | Zone méditerranéenne, Aquitaine |
| | *Parthenolecanium persicae* | Sud-est de la France |
| | *Parthenolecanium corni* | Toute la France |
| | *Pulvinaria vitis* | Zone septentrionale |
| *Diaspididae* | *Targonia vitis* | Corse, Alpes-Maritimes |
| *Pseudococcidae* | *Heliococcus bohemicus* | Bourgogne, Jura, Alsace, Vallée du Rhône |
| | *Phenacoccus aceris* | Alsace, Bourgogne, Vallée du Rhône |
| | *Planococcus citri* | Côte d'azur, Corse |
| | *Planococcus ficus* | Zone méditerranéenne, Languedoc, Corse |

### *II.2.b. Présentation des familles*

La distinction entre les familles de cochenilles peut se baser sur les caractéristiques morphologiques et biologiques des femelles :

- forme générale, taille et coloration,
- revêtement dorsal (présence ou non d'un bouclier),
- mobilité des individus à chaque stade (présence ou non de pattes),
- type de ponte (œuf, larves, sous l'insecte, dans un ovisac).

- Les cochenilles à coque : *Coccidae*

Les femelles adultes des *Coccidae* (soft scales en anglais) possèdent une face ventrale aplatie, fixée au végétal, et une face dorsale convexe. Le test du mâle, formé après le 2$^{nd}$ stade larvaire, est caractéristique de la famille : transparent, vitreux et composé d'une série de plaques cireuses. On distingue dans cette famille les cochenilles lécanines, dont les œufs sont contenus sous la coque de la femelle, et les cochenilles floconneuses, dont les œufs sont contenus dans un ovisac blanc, cireux et collant, qui peut atteindre plusieurs fois la taille du corps de la femelle. La parthénogénèse est très répandue dans cette famille, les femelles engendrant généralement une importante descendance jusqu'à plusieurs milliers d'œufs. Les *Coccidae* ont deux ou trois stades larvaires avec une ou deux générations par année en région tempérée. Dans la plupart des cas, le premier stade larvaire (0,4-0,7 mm de long et 0,3-0,4 mm de large) colonise les feuilles de la plante hôte. Le premier stade larvaire des *Coccidae* peut être différencié de celui des autres familles par la présence de deux opercules anaux sclérifiés, de soies stigmatales différenciées et d'une rangée de pores stigmataux, et par l'absence de lobes anaux et de pores dans l'atrium stigmatal (Williams et Hodges, 1997). Les stades larvaires suivants possèdent les mêmes caractères en plus d'une fente anale bien développée pour le deuxième stade et davantage de soies et de pores pour le troisième stade (Annexe 1). Les femelles immatures continuent à se nourrir sur les feuilles jusqu'à la fin de l'été et le début de l'automne, moment où elles migrent vers les tiges, les branches et l'écorce (Canard, 1957).

- Les cochenilles à bouclier : *Diaspididae*

Cette famille de cochenilles (armoured scales en anglais) est considérée comme la plus évoluée au sein des *Coccoidea*. Les *Diaspididae* possèdent trois caractéristiques qui les distinguent des autres familles de cochenilles (Ben-Dov, 1990). D'une part, le corps des femelles, souvent en forme de virgule, est protégé de l'environnement extérieur par un bouclier, non solidaire du corps, et constitué de sécrétions cireuses, mais aussi des exuvies des stades juvéniles précédents.

D'autre part, l'estomac n'est pas directement relié à l'intestin antérieur et les cochenilles évitent les prélèvements importants de liquide en se nourrissant dans le parenchyme plutôt que dans le phloème (Foldi, 1990). Aussi, les *Diaspididae* ne produisent pas de miellat ce qui implique des conséquences agronomiques notables : absence de développement de fumagine et absence de trophobiose avec les fourmis. Enfin, les cochenilles de cette famille se distinguent par la présence d'un pygidium postérieur, issus de la fusion des segments postérieurs de l'abdomen. Munis au moins d'une paire de lobes, il a vraisemblablement un rôle dans la répartition des cires lors de la construction du bouclier de la cochenille. Il y a deux stades larvaires chez la femelle et quatre chez le mâle, les œufs ou les larves sont produits sous le bouclier. Le premier stade larvaire, pourvu de pattes, assure la dispersion des *Diaspididae* de manière active par reptation ou bien de manière passive par le vent. Les autres stades de développement sont dépourvus de pattes (sauf chez les 3 et 4$^{ème}$ stades larvaires du mâle et mâle adulte) impliquant ainsi un degré de sédentarisation encore plus important que chez les *Coccidae*.

- Les cochenilles farineuses : *Pseudococcidae*

Cette vaste famille (mealybugs en anglais) regroupe des espèces ayant des biologies très diverses, ubiquistes et capables de coloniser toutes les parties de la plante, des racines jusqu'aux feuilles. Les *Pseudococcidae* se distinguent principalement grâce aux sécrétions cireuses blanchâtres couvrant leur cuticule membraneuse, d'où leur nom vernaculaire de cochenille farineuse (Kosztarab et Kozar, 1988). Les femelles sont ovoïdes et pourvues de pattes, ce qui leur permet de se déplacer vers une zone protégée de la plante hôte afin d'y pondre leurs œufs. Les femelles produisent généralement un ovisac blanchâtre et cireux protégeant les œufs de la dessiccation ou de l'humidité, des ennemis naturels, et des souillures par le miellat (Sforza, 2008a). On compte classiquement chez cette famille trois stades larvaires chez la femelle et quatre chez le mâle. Les larves de deuxième stade chez les mâles sécrètent un cocon de nymphose duquel l'imago ailé émergera. Le premier stade larvaire des cochenilles farineuses (0,5-0,7 mm de long et 0,2-0,3 mm de large) et les stades suivants peuvent être différenciés des autres familles par la présence des caractères suivants : antennes à six articles, pores triloculaires, pas de pore multiloculaire, circulus, ostioles, cerarii avec deux ou trois soies coniques et sans base sclérifiée à l'exception des deux ou trois paires postérieures (Annexe 2). Tous les stades de développement sont pourvus de pattes permettant aux cochenilles de se mouvoir pour hiverner, changer de substrat, ou muer. La plupart des espèces ont une ou deux générations annuelles, mais quelques unes peuvent en avoir jusqu'à huit, en particulier en culture sous abris ou en région tropicale.

## II.3. Fiches descriptives de cinq espèces de cochenilles

Dans cette partie, nous présentons les cinq espèces de cochenilles communément rencontrées sur la vigne dans les régions du nord-est de la France. Les fiches signalétiques suivantes ont été conçues pour résumer les caractéristiques morphologiques et biologiques de chaque espèce et précisent leur distribution géographique, leur gamme de plante hôte et ennemis naturels. Pour chaque espèce, nous indiquons le cycle biologique suivi sur la vigne et illustrons les différents stades de développement (crédits photos : JLM, sauf mention indiquée, stades repères de la vigne : source IFV).

# *Neopulvinaria innumerablis* (Rathvon, 1854)

*Coccidae*

**Syn**. *N. imeretina* Canard 1966
**Nom commun :** cochenille floconneuse de l'érable

## Morphologie

L'une des plus grandes cochenilles floconneuses d'Europe. Femelles de 7,5 mm de long sur 5 mm de large. Test dorsal de couleur grise ou beige avant la ponte, puis plus foncé durant la ponte. Les œufs sont de couleur saumon et contenus dans un ovisac cireux et collant.

Chapelet de femelles adultes sur un cep

## Biologie

Espèce univoltine. Hiverne sous forme de jeune femelle fécondée. Les femelles restent fixées sur leur support d'hivernation et croissent lentement jusqu'à la parturition en juin. Chaque femelle peut donner jusqu'à 8000 œufs. A l'éclosion, les larves L1, très mobiles, se dispersent rapidement sur la plante hôte et se fixent sur les feuilles, indistinctement sur la face inférieure ou supérieure si la variété de vigne est glabre. La cochenille poursuit sa croissance sur feuille jusqu'au stade L3. Les mâles émergent en septembre et la copulation a lieu. Les jeunes femelles fécondées migrent ensuite vers les baguettes et le cep à l'automne.

## Distribution

Espèce vraisemblablement originaire d'Amérique du Nord. Commune dans le nord-est des Etats-Unis et au Canada. Signalée pour la première fois en France dans le Languedoc (Canard, 1966). Infestations importantes sur vigne citées dans le sud de France, le nord de l'Italie et la Slovénie (Seljak, 2007). Signalée également en France dans le sud de la Bourgogne depuis 1989 (Hodgson, 1994).

## Plantes hôtes

Uniquement sur plantes ligneuses. Infestations observées sur les plantes des genres *Ampelopsis, Cornus, Gleditsia, Malus*, *Prunus*, *Pyrus, Vitis, Tilia*.

## Ennemis naturels

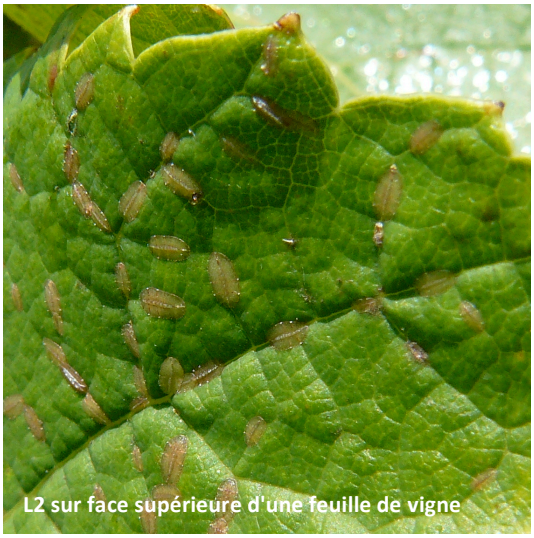
**Parasitoïdes :** *Coccophagus scutellaris, C. lycimnia*
**Prédateurs :** les oiseaux peuvent consommer les femelles avant la ponte (Canard, 1966), mais ce type de prédation reste anecdotique.

# *Neopulvinaria innumerablis* (Rathvon, 1854)

Jeunes femelles adultes hivernante

Femelles adultes et leur ovisac cireux

L1 à l'éclosion


L2 sur face supérieure d'une feuille de vigne

| | Jan | Fev | Mar | Avr | Mai | Juin | Juil | Août | Sept | Oct | Nov | Dec |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Feuille | | | | | | | | L3 | L3 | | | |
| | | | | | | | L2 | L2 | | | | |
| | | | | | | L1 | L1 | | | | | |
| Baguette | Ad | Ad | Ad | Ad | Ad | Ad | | L3 | L3 | Ad | Ad | Ad |
| | | | | | | | L2 | L2 | | | | |
| | | | | | Œufs | Œufs | | | | | | |
| Cep et écorce | Ad | Ad | Ad | Ad | Ad | Ad | | | | | Ad | Ad |
| | | | | | Œufs | Œufs | | | | | | |

# *Parthenolecanium corni* (Bouché, 1844)

*Coccidae*

**Syn**. *Lecanium corni* Bouché 1844, *L. vini* Bouché 1851, *L. wistariae* Signoret 1873, *L. robiniarum* Douglas 1890, *Eulecanium corni* Balachowsky & Mesnil 1935.
**Noms communs :** cochenille du cornouiller, lécanine du cornouiller, brown scale, European fruit lecanium, Zwetschgenschildlaus.

## Morphologie

Femelles fécondées de taille et de couleur très variable selon la plante hôte (Habib, 1957; Canard, 1960). Les spécimens âgés possèdent une coque très sclérifiée, convexe, marron, d'environ 6 mm de long sur 4 mm de large (Kosztarab et Kozar, 1988).

Femelles adultes pendant la ponte

## Biologie

Espèce univoltine en Europe. Reproduction sexuée avec parthénogénèse possible. On observe 3 migrations successives au cours de l'année sur la plante hôte (Canard, 1957). Les L2 hivernantes migrent au début du printemps sur les baguettes et peuvent représenter des colonies importantes. La parturition a lieu en mai, les femelles gonflent et plus de 5000 œufs peuvent être contenus sous la coque. La coque desséchée, ou test, peut rester fixée à la plante pendant plusieurs mois avant de se décrocher. A l'éclosion, les L1 migrent vers les feuilles et colonisent leur face inférieure le long des nervures. Après le passage au stade L2, les cochenilles migrent de nouveau avant la chute des feuilles vers le tronc et les rameaux aoûtés.

## Distribution

Répartie dans toutes les zones tempérées du globe. Sa nuisibilité est citée dans les années 1950 dans les vignobles et vergers de mirabelles et quetsches des régions septentrionales françaises et également en Allemagne. Infestations régulièrement signalées sur la vigne dans toutes les régions françaises.

## Plantes hôtes

Cochenille extrêmement polyphage citée sur environ 350 plantes hôtes ligneuses différentes, dont le genre *Vitis* (Ben-Dov et al., 2012).

## Ennemis naturels

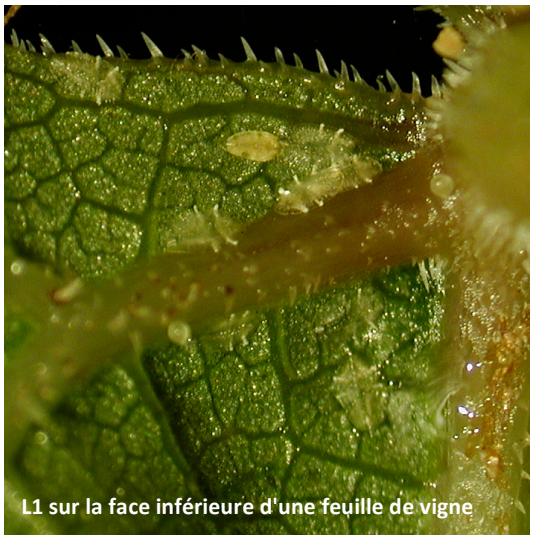
**Parasitoïdes :** *Blastothrix britanica*, *B. hungarica*, *B. longipennus, Cheiloneurus claviger, Coccophagus lycimnia*, *C. semicircularis*, *Encarsia lutea, Eusemion cornigerum, Metaphycus insidiosus*, *M. dispar*, *M. punctipes*, *Pachyneuron muscarum* (Sforza et al., 2003b).
**Prédateurs :** *Adalia bipunctata*, *Chrysopa perla, Coccinella septempunctata*, *Exochomus quadripustulatus* (Kosztarab et Kozar, 1988).

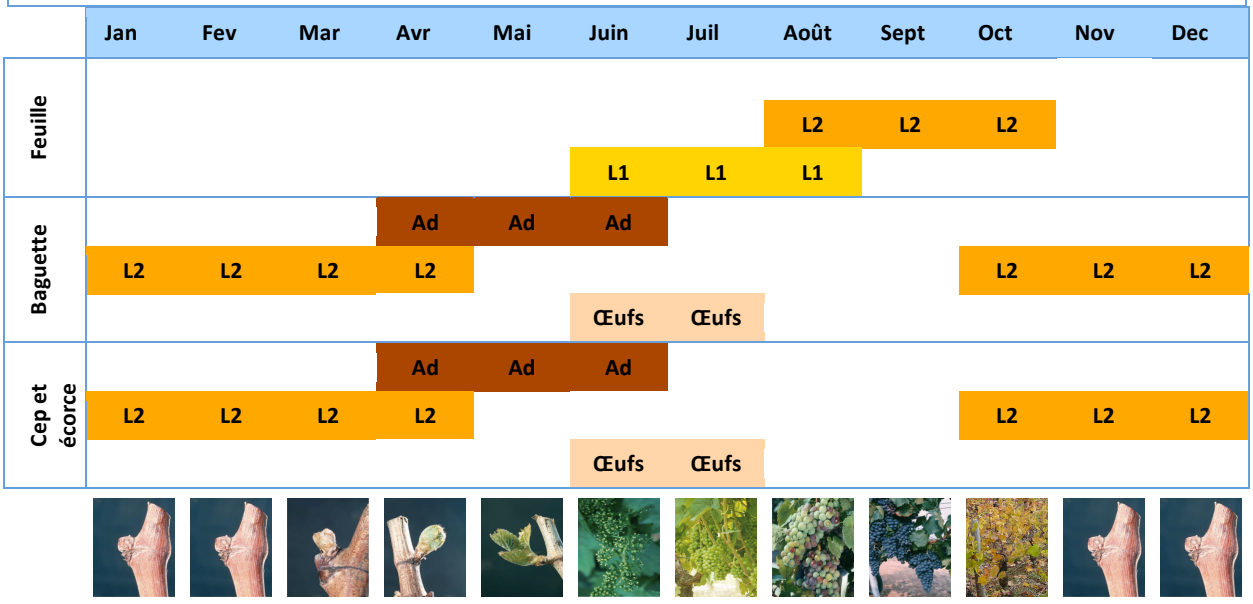
# *Parthenolecanium corni* (Bouché, 1844)

L2 femelles hivernantes

Exuvies des mâles après éclosion

Œufs pondus sous le test des femelles


L1 sur la face inférieure d'une feuille de vigne



# *Pulvinaria vitis* (Linné, 1758)

*Coccidae*

**Syn**. *Coccus vitis* Linné 1758, *Pulvinaria betulae Bodenheimer* 1944.
**Noms communs :** pulvinaire de la vigne, cochenille floconneuse de la vigne, cottony grape scale, Wollige Rebenschildlaus

## Morphologie

Jeunes femelles plus petites que celles de *Parthenolecanium corni.* Femelles de 5 mm de long sur 4 mm de large, de couleur marron-brun. Les œufs sont de couleur rouge vineux. Espèce régulièrement confondue avec *Neopulvinaria innumerabilis*.

Femelle adulte et son ovisac

## Biologie

Espèce univoltine, ayant en général une reproduction sexuée mais également parthénogénèse possible (Phillips, 1962). Hivernation sous forme de jeune femelle adulte. Les femelles doublent de taille au printemps puis pondent vers le mois de mai jusqu'à 5000 œufs dans un ovisac cireux (Pellizzari-Scaltritti et Dalla Montà, 1997). Les L1 colonisent la face inférieure des plantes hôtes. Les cochenilles poursuivent leurs croissance sur feuille jusqu'au stade L3 puis migrent vers les baguettes et le cep à la fin de l'été.

## Distribution

Espèce holarctique : Europe de l'ouest, Moyen-Orient, Amérique du Nord. Signalée comme ravageur du pêcher au Canada (Phillips, 1963), et sur *Pyracantha, Prunus et Ribes*.

## Plantes hôtes

Cochenille uniquement connue sur plantes ligneuses, polyphage. Sur les genres *Acer*, *Aesculus*, *Alnus*, *Betula*, *Carpinus*, *Corylus*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Euonymus*, *Fagus*, *Fagus Fraxinus*, *Juglans*, *Malus*, *Mespilus*, *Populus*, *Prunus*, *Pyrus*, *Ribes*, *Rosa*, *Salix*, *Sorbus*, *Tilia*, *Vitis*.

## Ennemis naturels

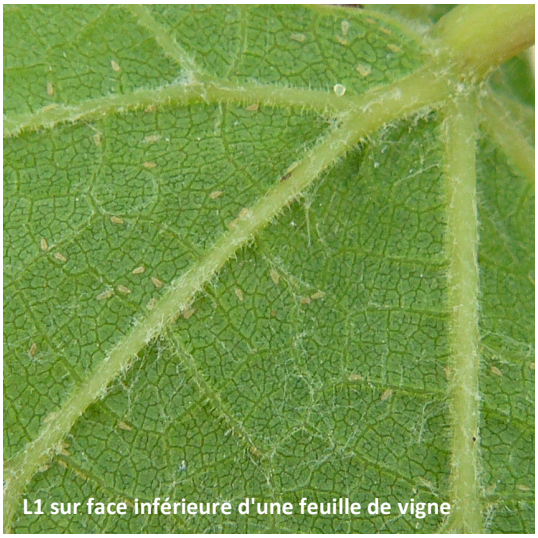
**Parasitoïdes :** *Aphycus maculipes*, *Coccophagus lycimmia, C. semi-circularis.*
**Prédateurs :** *Chrysopa carnea*, *Hyperaspis binotata, Leucopomya silesiaca*

# *Pulvinaria vitis* (Linné, 1758)

Jeunes femelles hivernantes

Ovisac de la femelle

L1 fraichement écloses


L1 sur face inférieure d'une feuille de vigne

| | Jan | Fev | Mar | Avr | Mai | Juin | Juil | Août | Sept | Oct | Nov | Dec |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Feuille | | | | | | | | L3 | L3 | | | |
| | | | | | | | L2 | L2 | | | | |
| | | | | | | L1 | L1 | | | | | |
| Baguette | Ad | Ad | Ad | Ad | Ad | Ad | | | Ad | Ad | Ad | Ad |
| | | | | | | | | L3 | L3 | | | |
| | | | | | Œufs | Œufs | | | | | | |
| Cep et écorce | Ad | Ad | Ad | Ad | Ad | Ad | | | Ad | Ad | Ad | Ad |
| | | | | | | | | L3 | L3 | | | |
| | | | | | Œufs | Œufs | | | | | | |

# *Heliococcus bohemicus* Šulc, 1912

*Pseudococcidae - Phenacoccinae*

**Syn**. *H. stacyos* Kiritchenko 1931, *H. hystrix* Kiritchenko 1932, *H. mutinensis* Marotta 1997.
**Noms communs :** cochenille bohémienne, Bohemian mealybug, Röhmische Schmierlaus.

## Morphologie

Le genre *Heliococcus* Šulc a fait l'objet d'une étude taxonomique récente (Danzig, 2007). Femelles adultes roses, jusqu'à 3,5 mm de long et 2 mm de large, avec de longs filaments cireux dressés, caractéristiques de l'espèce.

Femelle adulte

## Biologie

Univoltine à bivoltine en climat tempéré (Camporese, 1994). La cochenille hiverne au second stade larvaire. Au printemps, les cochenilles migrent vers les bourgeons et jeunes pousses. La parturition a lieu à partir du mois de mai. Les femelles ont rejoint les zones abrités, notamment sous l'écorce et « pondent » puis meurent. Cette espèce est ovovivipare, les femelles donnant directement naissance à des larves L1. Les néonates colonisent la face inférieure des feuilles, muent au cours de l'été, puis rejoignent l'écorce pour hiverner à partir d'octobre.

## Distribution

Espèce cosmopolite, zone paléarctique : Europe de l'ouest, Caucase, Russie, Chine (Kosztarab et Kozar, 1988). Infestations signalées sur *Parthenocissus* dans le Rhône (Goux, 1934). En France, infestation signalée surtout en zone septentrionales (Sforza et al., 2003b). Signalée en Allemagne dans le Bade-Wurtemberg (Hoffmann, 2002b).

## Plantes hôtes

Espèce polyphage, rencontrée essentiellement sur espèces ligneuses. Connue sur les plantes des genres *Aesculus*, *Calluna*, *Caragana*, *Catalpa*, *Clematis*, *Fragaria, Pinus*, *Platanus*, *Populus*, *Quercus*, *Robinia*, *Tussilago, Vitis*.

## Ennemis naturels

**Parasitoïdes :**
*Allotropa mecrida, Anagyrus szodensis, Chartocerus subaeneus, Conostigmus fasciatipennis, Dendrocerus aphidum, Ericydnus sipylus, Leptomastix histrio, Leptomastidea bifasciata, Pachyneuron muscarum, Prochiloneurus bolivari* (Kosztarab et Kozar, 1988; Sentenac et Kuntzmann, 2003; Sforza et al., 2003b)
**Prédateurs :** *Nephus quadrimaculatus*

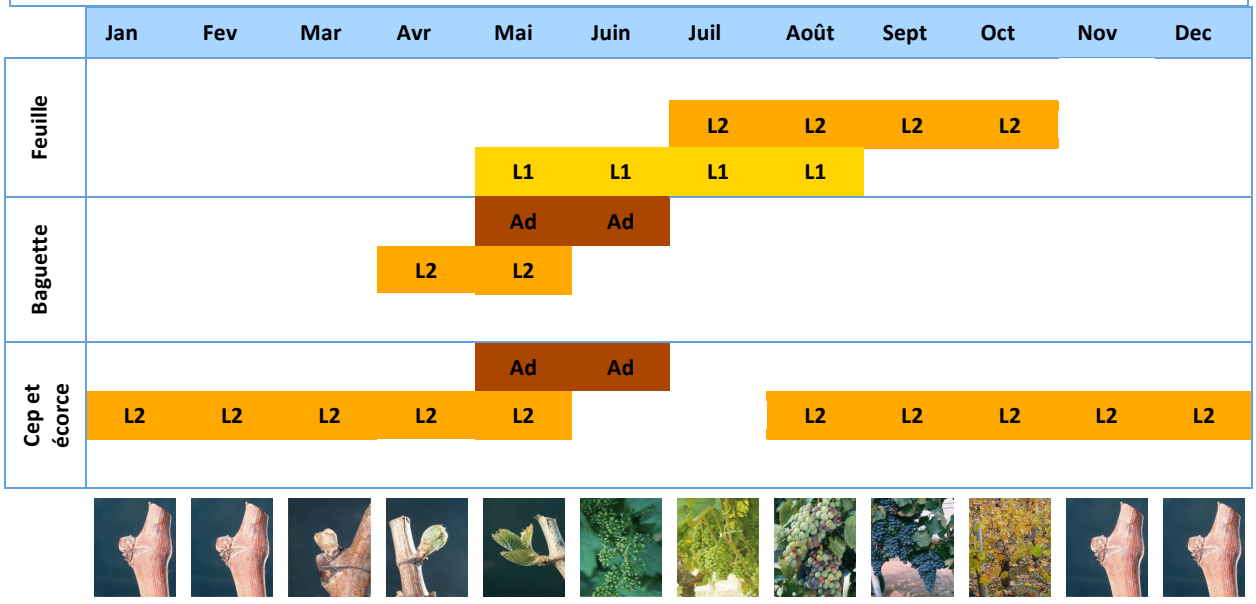
# *Heliococcus bohemicus* Šulc, 1912

Groupe de L2 à la base d'un bourgeon

Femelle adulte sur baguette

Mâle adulte

Production des L1 par la femelle



# *Phenacoccus aceris* (Signoret, 1875)

*Pseudococcidae - Phenacoccinae*

**Syn**. *Pseudococcus aceris* Signoret 1875, *Ps. quercus* Douglas 1888, *Ps. ulmi* Douglas 1888, *Ps. socius* Newstead 1892, *Ps. pergendei* Cockerell 1896, *Dactylopius vagabundus* Schilling 1897, *Phenacoccus polyphagus* Borchsenius 1949.
**Noms communs :** cochenille du platane, cochenille du pommier, polyphagous tree-mealybug, apple mealybug, maple mealybug, Ahornschmierlaus.

## Morphologie

Le genre *Phenacoccus* Cockerell a fait l'objet d'une étude taxonomique récente (Danzig, 2003, 2006). De couleur blanche à orange. Femelles jusqu'à 4,3 mm de long et 2,5 mm de large. Ovisacs longs et bien développés, contenant jusqu'à 3800 œufs.

Jeunes femelles sollicitées par des fourmis

## Biologie

Univoltine en climat tempéré. La cochenille hiverne au stade L2 femelle ou L3 mâle. Les femelles ont 3 stades larvaires, les mâles 4 : deux stades mobiles, prépupe et pupe. La reproduction est sexuée avec possibilité de parthénogénèse (Gavrilov et Trapeznikova, 2007). La copulation a lieu en mai-juin, les femelles pondent puis meurent. Les ovisacs sont généralement situés sous le rhytidome ou à l'aisselle des rameaux. Après un mois d'incubation, les néonates éclosent et colonisent la face inférieure des feuilles.

## Distribution

Espèce cosmopolite, zone holarctique : Europe de l'ouest, Russie, Canada, Etats-Unis, Japon, Corée (Rau, 1942; Kosztarab et Kozar, 1988; Park et al., 2010b). Infestations signalée dans le vignoble rhénan, en Moselle et Palatinat en 1920 (Balachowsky et Mesnil, 1935), sur pommier,cerisier et sur vigne en Côte d'Or et dans le Jura (Bonnemaison, 1961), sur vigne en Bourgogne (Sforza et al., 2003b) et dans le Bade-Wurtemberg (Hoffmann, 2002a; Petruschke et al., 2011).

## Plantes hôtes

Espèce très polyphage rencontrée uniquement sur espèces ligneuses. Infeste les genres *Acer*, *Actinidia*, *Aesculus*, *Alnus*, *Aralia*, *Betula*, *Buxus*, *Carpinus*, *Cornus*, *Corylus*, *Crataegus*, *Fagus*, *Fraxinus*, *Hedera*, *Juglans*, *Malus*, *Mespilus*, *Morus*, *Platanus,* *Prunus*, *Pyrus*, *Quercus*, *Ribes*, *Salix*, *Sorbus, Spirea*, *Vitis*.

## Ennemis naturels

**Parasitoïdes :**
*Allotropa utilis*, *Anagyrus schoenherri, Leptomastidea bifasciata* (Panis, 1969; Kuntzmann, 2003; Sforza et al., 2003b; Kuntzmann, 2005 ).
**Prédateurs :** *Nephus quadrimaculatus*, *Chrysoperla lucanisa*, *Mycroteris chalcostomus* (Kosztarab et Kozar, 1988; Sentenac, 2008)

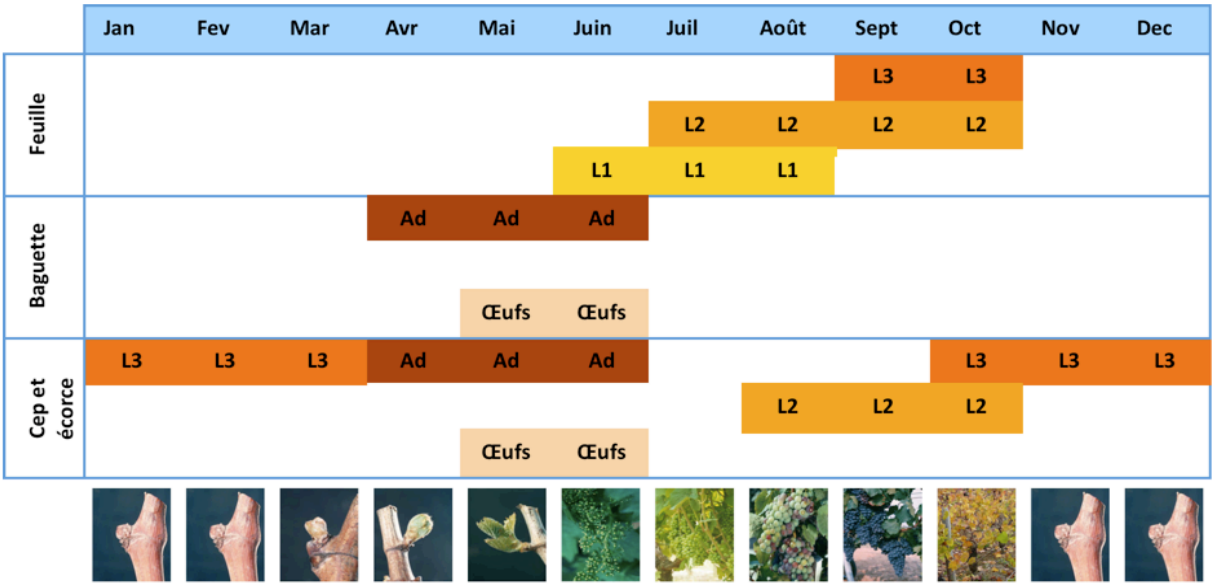
# *Phenacoccus aceris* (Signoret, 1875)

Cocons des larves hivernantes

Femelle et son ovisac ouvert

L1 fraichement éclose

L2 et exuvie après la mue



# Chapitre 2. Contexte scientifique

La transmission de la majorité des phytovirus repose sur l'intervention d'un insecte vecteur. La présence d'un troisième acteur dans le pathosystème plante-virus a ainsi de nombreuses implications dans l'épidémiologie de la maladie, notamment selon le type de vecteur. Nous présentons dans ce chapitre les concepts fondamentaux de la vection de phytovirus et abordons la notion d'épidémiologie, en particulier dans le cadre d'une maladie à virus sur plante pérenne.

## I. Vection de phytovirus

### I.1. Généralités

#### *I.1.a. Vection de virus : définitions*

Un virus est un parasite intracellulaire obligatoire dont le cycle de développement a pour but principal d'assurer sa pérennité au sein d'un organisme hôte ou d'une population d'hôtes. Les virus ont donc développé des stratégies diverses pour atteindre et infecter un nouvel hôte. Pour cela, une étape de transmission est impérative et implique un passage délicat dans le milieu extérieur.

La transmission d'un virus est qualifiée de verticale, ou d'interne, lorsque la génération suivante de l'organisme hôte est infectée. Pour les phytovirus, la contamination des organes de multiplication des végétaux assure ainsi la transmission des virus à la descendance. Hormis quelques rares cas de transmission verticale naturelle par le pollen, les semences ou les embryons, ce type de transmission est assuré majoritairement par la multiplication végétative des différents organes de plantes vivrières ou ornementales : boutures de tiges, récolte de greffons, marcottage de stolons, divisions de tubercules, bulbes ou caïeux (Figure 8). La transmission verticale concourt à la propagation des phytovirus sur l'ensemble du globe par le biais des échanges internationaux de matériel végétal infecté (Astier et al., 2001).

La transmission d'un virus est qualifiée d'horizontale, ou d'externe, lorsqu'un nouvel hôte est infecté. La transmission horizontale des phytovirus peut s'effectuer par voie mécanique, grâce au contact direct entre deux plantes (*Tobamovirus*, *Potexvirus*). Ces propriétés sont notamment utilisées au laboratoire pour l'inoculation artificielle de nombreux virus sur hôtes herbacés (*Nepovirus, Vitivirus*). On peut également considérer que le greffage d'un greffon sain sur un porte greffe infecté (ou l'inverse) est un type de transmission horizontale. Le plus souvent, la transmission horizontale fait intervenir un troisième acteur, en plus de l'hôte et du virus : le vecteur (Figure 8). Les phytovirus sont en effet confrontés à deux difficultés supplémentaires par rapport aux virus infectant les animaux : le caractère immobile de leur(s) hôte(s), et la présence de la cuticule et de la paroi pecto-cellulosique entourant les cellules végétales qui constituent une barrière physique que les virus ne peuvent traverser seuls. C'est pourquoi les stratégies de transmission des phytovirus font intervenir majoritairement un organisme tiers (Hébrard et al., 1999).

La vection correspond donc à la transmission d'un agent pathogène, dans notre cas le virus, depuis un hôte infecté vers un nouvel hôte par l'intermédiaire d'un organisme vivant tiers, le vecteur. Les vecteurs de phytovirus sont le plus souvent très mobiles et capables de passer de manière autonome d'une plante à une autre sans impliquer la disparition immédiate de leur plante hôte (Nault, 1997). La vection est un processus actif, les particules virales étant inoculées directement dans les cellules des plantes hôtes, le plus souvent lors des prises alimentaires.

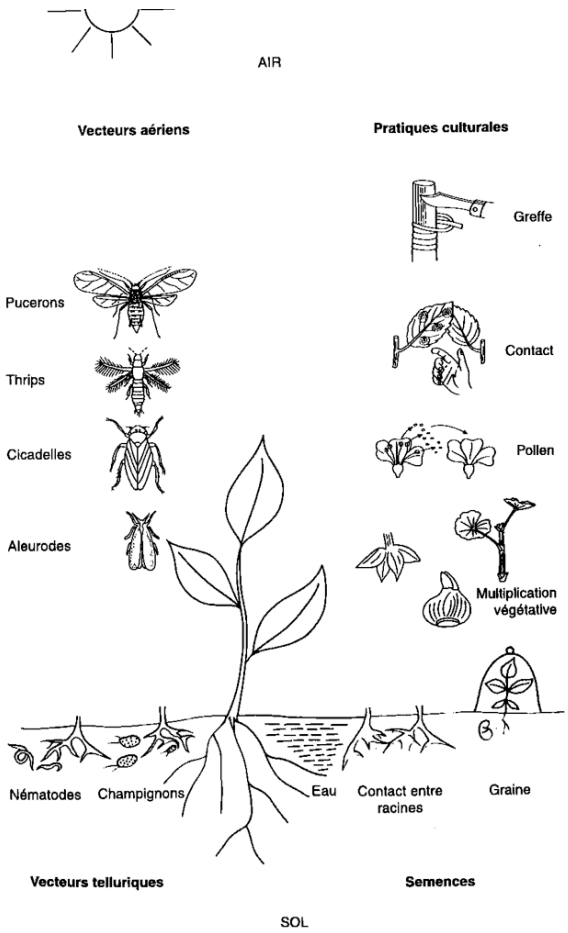



**Figure 8. Représentation des différents modes de dissémination des phytovirus. D'après Astier et al. (2001).**

### *I.1.b. Diversité des vecteurs*

Les virus de plantes représentent la moitié des espèces virales identifiées à ce jour (King et al., 2009). Cependant, la diversité de phytovirus est certainement sous estimée, les espèces virales identifiées étant étudiées presque uniquement sur des plantes d'intérêt économique (Wren et al., 2006). Parmi les virus de plantes identifiés, 76 % ont un ou plusieurs vecteur(s) connu(s) (Hogenhout et al., 2008). Les organismes vecteurs de phytovirus font partie de divers taxons (Figure 9)

La transmission horizontale peut être opérée par le biais de plantes parasites, notamment dans le cas des plantes du genre *Cuscuta*. Ces plantes parasites non chlorophylliennes peuvent en effet établir des contacts entre protoplasmes de cellules de plantes infectées et de plantes saines et ainsi servir de « vecteur » de virus d'une plante à l'autre (Mikona et Jelkmann, 2010). On distingue à ce jour une trentaine d'espèces de virus transmises par champignons et rhizaires. Ceux-ci sont des parasites obligatoires (*Chytridiomycota* et *Plasmodiophoromycota*) et infectent les plantes grâce à leurs zoospores (Kummert et Lepoivre, 2003). Les nématodes (*Ecdysozoa, Nematoda*) sont également des organismes vecteurs de virus et possèdent une spécificité de transmission importante : les *Xiphinema* et autres *Longidoridae* transmettent des *Nepovirus* alors que les nématodes des genres *Trichodorus* et *Paratrichodorus* (famille *Trichodoridae*) transmettent des *Tobravirus*. Les phytovirus sont transmis majoritairement par des arthropodes. C'est dans ce taxon qu'on démontra pour la première fois, la fonction d'organisme vecteur d'agents pathogènes : la cicadelle *Recelia dorsalis* transmettant le *Rice dwarf virus* (RDV) au riz, ou les tiques du genre *Ixodes* transmettant la fièvre du Texas *(Babesia sp.*) au bétail (Nault et Ammar, 1989).

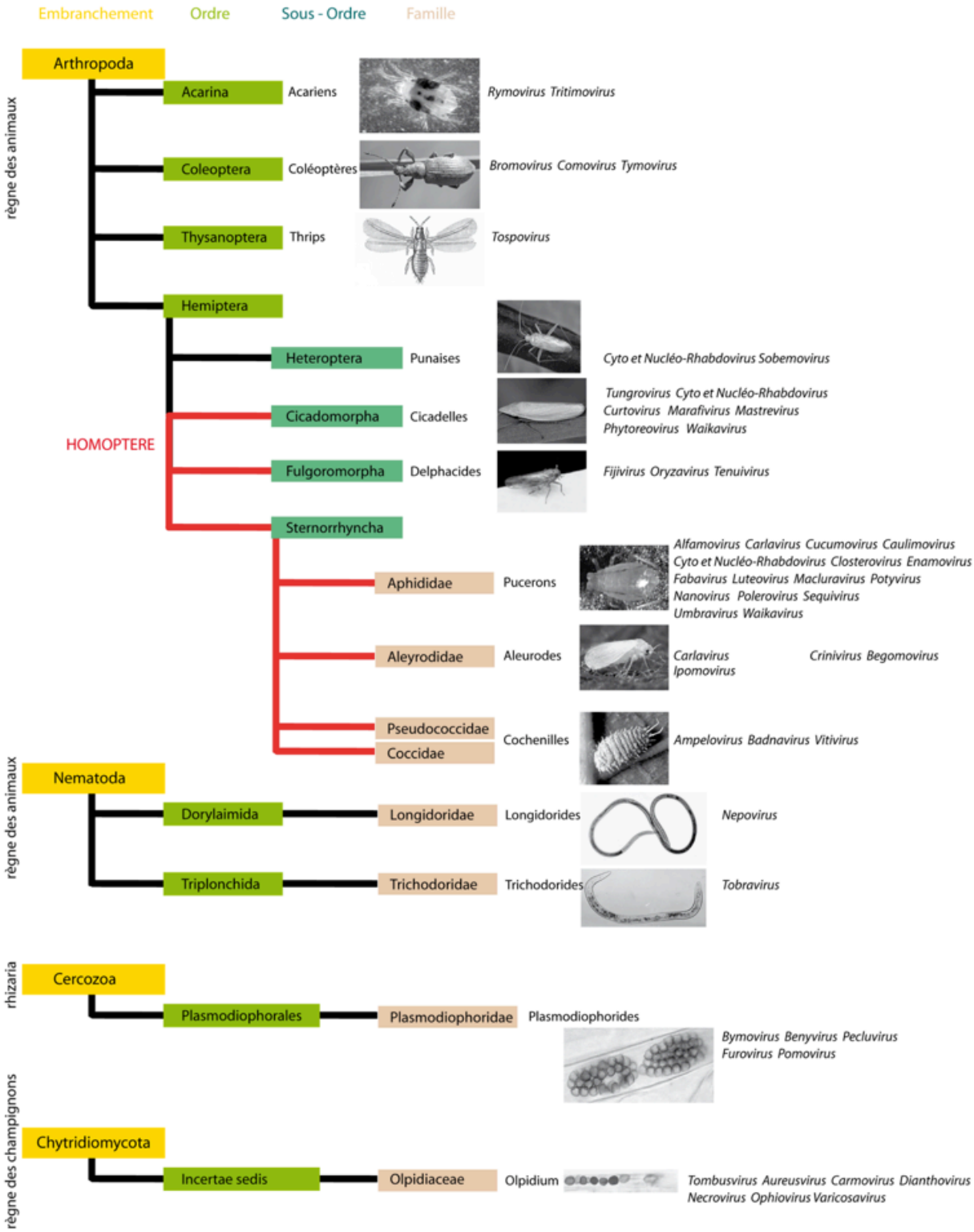



**Figure 9. Principaux taxons comprenant des vecteurs de phytovirus. La branche représentée en rouge correspond à l'ordre des homoptères, au sein duquel on trouve la majorité des vecteurs. D'après Schellenberger (2010).**

Certains phytovirus sont transmis par acarien (*Eriophyidae* et *Tetranychidae*), mais la grande majorité des arthropodes vecteurs se trouve dans la classe des insectes. Parmi les 10 ordres d'insectes phytophages, les hémiptères et les coléoptères dominent par le nombre d'espèces vectrices et le nombre de virus transmis (Nault, 1997). Chez les coléoptères, c'est au sein de la famille des *Chrysomelidae* que l'on trouve les vecteurs de virus des genres *Bromovirus*, *Comovirus*, *Sobemovirus* et *Tymovirus* (Fulton et al., 1987).

Les hémiptères constituent de loin l'ordre le plus important parmi les insectes vecteurs de phytovirus. Leurs pièces buccales formant un rostre permettent l'alimentation de ces insectes piqueurs-suceurs sans provoquer de dommage aux cellules végétales. La cellule végétale ponctionnée reste ainsi vivante et fonctionnelle, ce qui est essentiel aux particules virales transmises lors de la piqûre pour assurer par la suite leur réplication, leur mouvement intra et inter-cellulaire, et leur dissémination dans le reste de la plante hôte (Nault, 1997). Chez les homoptères, on distingue les *Sternorrhyncha*, *Cicadomorpha* et *Fulgoromorpha* qui assurent la transmission de 80 % des phytovirus transmis par insectes. Les pucerons représentent le groupe le plus important de vecteurs de phytovirus avec 275 virus transmis (Nault, 1997). La première preuve de vection par cochenilles est apportée en 1945 grâce au travaux sur la maladie du *swollen shoot* du cacaoyer (Box, 1945). Etant jusqu'alors uniquement considérées comme problématiques en région tropicale, les cochenilles ont davantage été étudiées en tant que vecteur de virus après la démonstration de la transmission de virus à la vigne (Rosciglione et al., 1983). Dans ce manuscrit, la vection de virus par cochenille fait l'objet d'un chapitre de synthèse (Herrbach *et al.*) qui est présenté dans la partie I-2.

### *I.1.c. Spécificité vectrice*

La spécificité vectrice correspond aux relations existant entre une espèce virale distincte et le, ou les vecteurs associés. Ainsi, les *Rhabdovirus* peuvent être transmis par cicadelles, pucerons ou punaises alors que le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) est par exemple uniquement transmis par *Xiphinema index* (Andret-Link et Fuchs, 2005). Cependant, un *Rhabdovirus* donné ne sera transmis uniquement que par un taxon d'hémiptère donné. Les degrés de spécificité existant entre insectes vecteurs et espèces virales se définissent donc à diverses échelles, et tendent à montrer une spécialisation des taxons d'insectes dans la vection de certains virus. Ainsi, au sein de la famille des *Closteroviridae,* les *Closterovirus* sont uniquement transmis par pucerons, les *Crinivirus* par aleurodes et les *Ampelovirus* par cochenilles (Figure 10).

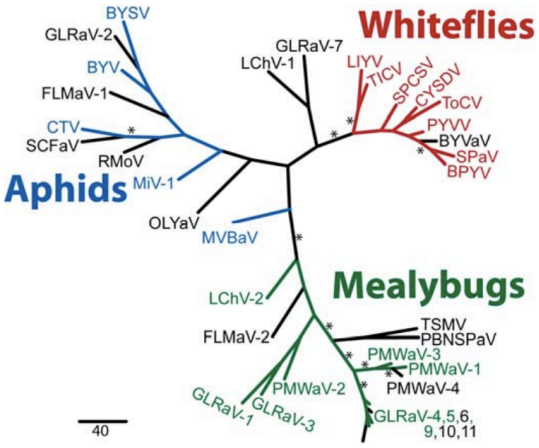



**Figure 10. Arbre phylogénétique construit à partir d'un test de maximum de parcimonie au sein de la famille des *Closteroviridae*. Les astérisques indiquent les branches significativement divergentes (> 70%). Les branches colorées indiquent les virus pour lesquels les preuves de vection par hémipères ont été obtenues. Bleu : *Aphididae,* rouge : *Aleyrodidae,* vert : *Coccoidea.* D'après Tsai et al. (2010).**

### *I.1.d. Les modes de transmission*

On distingue deux phases dans la vection de virus. D'abord, la phase d'acquisition du virus, qui a lieu lors de la prise alimentaire du vecteur sur une plante infectée, puis la phase d'inoculation qui correspond au relargage des particules virales dans une plante saine lors d'une autre prise alimentaire du vecteur. Ces deux phases distinctes dépendant du temps de rétention et du site de rétention des virus, et de l'internalisation des virions dans le vecteur, il existe ainsi quatre modes de transmission différents, définis selon le type d'interaction entre l'espèce virale et le vecteur (Tableau 8). Chaque espèce virale est associée à un seul mode de transmission.

Dans le cas du mode non circulant, le virus reste accroché au niveau du site de rétention jusqu'à la prochaine prise alimentaire du vecteur. La majorité des phytovirus sont transmis selon ce mode. On distingue les modes non persistant et semi persistant, pour lesquels les temps de rétention du virus varient respectivement de quelques minutes à plusieurs jours. Dans le cas du mode circulant, le virus est internalisé dans le vecteur. On distingue le mode persistant non multipliant pour lequel les particules virales migrent vers les glandes salivaires du vecteur, et le mode persistant multipliant, pour lequel le virus internalisé peut se répliquer au sein même du vecteur. Ce dernier mode de transmission implique que le vecteur reste virulifère tout au long de sa vie.

**Tableau 8. Caractéristiques des modes de transmission de phytovirus par insecte. D'après Nault (1997).**

| Caractéristique de transmission | Mode de transmission | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Non circulant | | Circulant | |
| | Non persistant | Semi persistant | Persistant non multipliant | Persistant multipliant |
| Durée d'acquisition et d'inoculation | Seconde à minutes | Minutes à heures | Heures | Heures |
| Durée de latence | Aucune | Aucune | Heures à jours | Jours à semaines |
| Durée de rétention | Minutes à heures | Heures à jours | Plusieurs jours | Toute la vie |
| Passage trans-stadial | Non | Non | Oui | Oui |
| Passage trans-ovarien | Non | Non | Non | Possible |
| Réplication du virus | Non | Non | Non | Oui |
| Spécificité vectrice | Large | Etroite | Etroite | Etroite |

## I.2. Vection de virus par cochenilles

L'étude de la transmission de maladies virales par cochenilles reste marginale par rapport aux travaux menés sur les pucerons, mais de réelles avancées ont été effectuées depuis une vingtaine d'années. Le dernier bilan existant sur la vection par cochenilles ne prenant pas en considération la transmission de virus à la vigne (Roivainen, 1980), nous proposons dans un chapitre de synthèse d'établir le bilan actuel des connaissances. Au sein d'un ouvrage traitant de la transmission d'agents pathogènes par vecteur, cette synthèse sera publiée prochainement par l'American Phytopathological Society, et éditée par Judy Brown. Elle s'articule en trois parties principales qui contiennent successivement :

- Une présentation des composantes du pathosystème, cochenilles et virus,
- Une description des trois pathosystèmes principaux cochenille-virus : *Cacao swollen shoot virus* (CSSV), *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV) et *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV),
- Un état des connaissances sur les mécanismes de transmission de virus par cochenilles.

CHAPITRE DE SYNTHESE

# Virus transmission by mealybugs and soft scales (*Hemiptera*, *Coccoidea*)

**Etienne Herrbach[1,2], Jean Le Maguet[1,2,3], Gérard Hommay[1,2]**

[1]INRA, UMR1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin, F-68000 Colmar, France, [2]Université de Strasbourg, UMR1131, F-67000 Strasbourg, France, [3]Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne, 5 rue Henri Martin, BP 135, F-51200 Epernay, France.

**Accepted for publication in *Vector Mediated Transmission of Plant Pathogens,* (J. K. Brown Ed.), American Phytopathological Society (APS) Press.**

## 1- Introductory considerations

Scale insects are phytophagous Hemipteran insects classified in the *Coccoidea* superfamily, which comprizes about 30 extant families (Ben-Dov et al., 2012). These unconspicuous insects have been studied for two centuries because of their remarkable biological pecularities (Miller and Kosztarab, 1979; Gullan and Kosztarab, 1997) and their importance as agricultural pests, especially on perennials (Kosztarab and Kozar, 1988; Pellizzari and Germain, 2010). Well known examples of important scale insects that affected severely citrus industry worldwide are the cottony cushion scale (*Icerya purchasi* Maskell, *Monophlebidae*) and the Californian red scale (*Aonidiella aurantii* (Maskell), *Diaspididae*); let's also mention the San José scale (*Diaspidiotus perniciosus* (Comstock), *Diaspididae*), noxious to many fruit trees worldwide (Ben-Dov et al., 2012).

However, when considering virus transmission, only few scale insects species (*ca.* 35) are known to vector up to 30 different plant viruses. These low numbers strongly contrast with their relatives, the *Aphidoidea* (aphids *s.l.*), that contain more than 200 species vectoring over 300 virus species even though *Coccoidea* display a wider specific richness (*ca*. 8,000 species described) than *Aphidoidea* (*ca*. 4,400). This observation is obviously related to biological and ecological differences between the two taxa, despite their common status of plant sap feeders; particularly scale insects are much less mobile than aphids. Moreover, even though coccoids are found under all climates, they are more abundant in tropical and subtropical regions. It is likely that new vectors be discovered among scale insects, along with increasing insights into ecology and virology of tropical agrosystems.

Coccoids identified as vectors belong to only two families, *Pseudococcidae* (mealybugs) and *Coccidae* (soft scales). The first demonstration of the involvement of mealybugs in the transmission of swollen shoot disease of cacao dates from 1945 in West African cacao plantations (Box, 1945; Owusu, 1983). Later, mealybugs were found to transmit viruses to grapevine (Rosciglione et al., 1983) to pineapple (Rohrbach et al., 1988) and to some other crops such as sugarcane and cherry. As to soft scales, the vector ability of some species is known only on grapevine (Belli et al., 1994) Scale insects as virus vectors are currently investigated mainly for grapevine and pineapple. No phytoplasm or other plant-pathogenic bacterium has ever been found to rely on scale insects for transmission.

This chapter aims to review current knowledge of virus transmission by scale insects. This topic has been reviewed previously by Roivainen (1980) and, more briefly, by Harris (1983) and Plumb (2002).

## 2- Partners of the virus-vector interaction

### 2.1. Scale insects

Scale insects are characterized by a huge diversity in morphology and biology. Nevertheless, they share many common properties, such as their tiny size (usually < 5 mm) and their cryptic and sedentary way of life (Gullan and Martin, 2003).

Like in other Sternorrhyncha (aphids, whiteflies, psyllids), scale insects are plant sap feeders and possess piercing-sucking mouthparts, shaped as a rostrum, which is attached to head segments between the forelegs. The feeding apparatus comprizes two pairs of needle-like stylets (maxillae and mandibles) that are interlocked so as to shape a food canal and a salivary canal, and surrounded by the labium. The stylets are used to puncture plant epidermis and attain the vascular tissues from whence sap ingestion occurs (apart from *Diaspididae* or armored scales, which seem to feed in parenchyma (Washington and Walker, 1990). Members of *Pseudococcidae* and *Coccidae* are globally considered as phloemophagous (Kondo et al., 2008; Stafford et al., 2012), though there are few studies aimed to localize the actual ingestion site (Calatayud et al., 1994; Renard et al., 1998; Silva and Mexia, 1999; Huang et al., 2012). A recent study revealed that *Planococcus citri* (Risso) ingests both phloem and xylem sap of grapevine (Cid and Fereres, 2010).

Scale insects are characterized by a high sexual dimorphism, with neotenic adult females and winged males (if any). Most species display an amphimictic reproduction strategy; however, various forms of parthenogenesis are possible among coccoids (Miller and Kosztarab, 1979; Kosztarab and Kozar, 1988; Normark, 2003),). They are generally oviparous, but many species are ovoviviparous (Ben-Dov and Hodgson, 1997). Coccoids have one to a few generations per year, depending on climatic regions. Usually, their lifestyle is sedentary, if not fixed; however, newly born first instars, or « crawlers », are often very mobile (Gullan and Kosztarab, 1997).

Within the *Coccoidea*, only two families are as yet recognized to contain virus vectors: *Pseudococcidae* and *Coccidae*. Doubtful transmission of two alleged 'viruses' by *Orthezidae* has been mentionned by Heinze (1959).

* The ***Pseudococcidae*** form a numerous family, with *ca*. 2,200 species worldwide (Ben-Dov et al., 2012). Pseudococcids are commonly called 'mealybugs' because of the mealy wax secretions covering their soft teguments. The larval development of females comprizes 2 or 3 instars, depending on species. Males display an additional instar, the puparium. Male imagos are deprived of mouthparts, therefore unable to feed, they are winged and short-lived (1-2 days devoted to spread and mate). Some species are viviparous (*Heliococcus* spp.). Virus vectors have been identified in the genera *Dysmicoccus*, *Ferrisia*, *Heliococcus*, *Phenacoccus*, *Planococcoides*, *Planococcus*, *Pseudococcus*, *Saccharicoccus* (Tables 1-3).

* The ***Coccidae*** family is also numerous (over 1,100 species worldwide) (Ben-Dov et al., 2012). Members, commonly called 'soft scales', show various aspects. In most species, adult females are sessile, i.e. fixed on the host plant. After hatching, first instar larvae (crawlers) have a mobile phase, but later tend to settle and move less. During maturation, their dorsum thickens into a heavily sclerified or waxy 'shield' under which the female oviposits. In some species, such as the European lecanium, *Parthenolecanium corni* (Bouché), the eggs are confined under the shield, whereas in others, e.g. *Pulvinaria* spp., the eggs are embedded within a cotton-like structure, called ovisac, that goes beyond the shield. Coccids display 2 to 4 larval instars, plus an additional stage for males. Adult males are winged and mouthless. Virus vectors have been found so far in the genera *Ceroplastes, Neopulvinaria, Parthenolecanium and Pulvinaria* (Tables 1&2).

**2.2. Viruses transmitted**

Virus species vectored by scale insects belong to three genera : *Badnavirus*, *Ampelovirus* and *Vitivirus*. A common feature of these viruses, despite their basic differences, is their restriction to phloem tissues in their host plants. This property is in parallel with the feeding habits of the vectors. Phloem-infecting viruses vectored by hemipterans like aphids, whiteflies and hoppers, are acquired and inoculated during phloem feeding. However, whereas aphids and leafhoppers can also acquire and transmit other viruses during epidermal probes, there is no evidence for such cases with scale insects.

*** Badnaviruses**

The genus *Badnavirus* (from Bacilliform DNA viruses) belongs to the family *Caulimoviridae*, also called 'plant pararetroviruses', that groups six genera of DNA viruses of plants (Fauquet et al., 2005). Their non-enveloped virions are rod-shaped, with a 30 nm diameter and a length varying from 60-900 nm. They contain a circular double-stranded DNA genome of ca. 7.5 kb, replicated by reverse transcription and comprizing 3 open reading frames (ORF), one encoding a polyprotein producing the capsid protein, the reverse transcriptase among some other peptides; the proteins expressed from the other two ORFs have no known function.

Over 18 distinct virus species have been described in *Badnavirus*. However, further species are likely to be assigned to this genus. *E.g.* Banana streak virus, long considered a single entity, has recently been split into several related species (Iskra-Caruana et al., 2010). Badnaviruses infect only perennials or vegetatively propagated plants, mostly in the tropics such as banana, cacao and sugarcane. Host ranges are usually narrow, such as banana streak viruses restricted to *Musa* spp. (bananas and plantains); however *Cacao swollen shoot virus* (CSSV) is found in several botanical families. The symptoms they induce on leaves are diverse, from chlorotic areas to ringspots.

At least a dozen *Badnavirus* species are known to be transmitted by mealybug vectors (Table 3). It has been reported that *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) is vectored by two mealybugs, *Planococcus citri* and *Ferrisia virgata* (Cockerell) (Lockhart et al., 1997; Bhat et al., 2003; Bhat et al., 2005), but also by a Tingid bug, *Diconocoris distanti* Drake (de Silva et al., 2002) even though, this latter report has not been confirmed, to our knowledge. Moreover, at least two badnaviruses, *viz* an unnamed spiraea virus and *Rubus yellow net virus* (RYNV), are vectored by aphids, respectively *Amphorophora* spp. and *Aphis spiraecola* (Patch) [= *A. citricola* van der Goot] (Lockhart and Lachner, 1999; Jones et al., 2002). For other badnaviruses, the vectors, if any, are unkown (Fauquet et al., 2005). A subantarctic tentative badnavirus, Stilbocarpa mosaic bacilliform virus (SMBV) is endemic to Macquarie Island, Australia (Skotnicki et al., 2003), where no mealybug has been reported (Ben-Dov et al., 2012).

Finally, a species of the related genus *Soymovirus* is suspected to be mealybug-transmitted (Table 3).

*** Ampeloviruses**

The genus *Ampelovirus* (from gr. *ampelos*, grapevine) belongs to the family *Closteroviridae* (Fauquet et al., 2005). These viruses are composed of a linear single-stranded RNA and a flexuous capsid, with a diameter of 12 nm and a length from 1400-2200 nm depending on species. Closterovirids, containing three genera, have probably the largest genomes among plant viruses (13-19 kb), comprizing from 7 to 13 ORFs, depending on species. The systematics of *Ampelovirus* is under revision (Maliogka et al., 2008; Martelli, 2009; Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2012).

Ampeloviruses have a very narrow host range. Thus, the species *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV) -1, -3, -4, -5, -6, -9, -Pr and -De, as well as the putative Grapevine leafroll-associated Carnelian virus (GLRaCV), infect only grapevine, *Vitis vinifera*, and its wild relatives, inducing leafroll symptoms. *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) -1, -2 and -3 are involved in 'mealybug wilt' of pineapple, *Ananas comosus*. Finally, *Little cherry virus*-2 infects *Prunus* spp.

While most members of the genera *Clostero-* and *Crinivirus* are transmitted respectively by aphids and whiteflies (when the vector is known), *Ampelovirus* species, either have no known vector (Fauquet et al., 2005) or are transmitted by scale insects, i.e. *ca*. ten by pseudococcids, among which three also by coccids (Table 1).

*** Vitiviruses**

The genus *Vitivirus* (from lat. *vitis*, grapevine) belongs to the family *Betaflexiviridae* (Fauquet et al., 2005). Members of this genus are composed of a flexuous capsid, with a diameter of 12 nm and a length from 725-825 nm, and a linear single-stranded RNA bearing 5 ORFs. Their host range is quite narrow. This genus groups four grapevine-infecting viruses, associated to 'rugose wood complex': *Grapevine virus A* (GVA), GVB, GVD and GVE (Du Preez et al., 2011). GVA, GVB and GVE are vectored from vine to vine by mealybugs and the first two also by coccids (Table 2). GVA, GVB and GVD can be transmitted to some herbaceous hosts, such as *Nicotiana* spp., both by sap inoculation and by scale insects (Rosciglione et al., 1983; Agran et al., 1990; Garau et al., 1995; La Notte et al., 1997b; Hommay et al., 2008). GVA variants have been associated to Shiraz disease, a mealybug-transmitted disease of grapevine in South Africa (Goszczynski and Jooste, 2003a). Interestingly, some aphid-borne viruses are also assigned to the genus *Vitivirus*, namely *Heracleum latent virus* (HLV) and *Mint virus* 2 (MV-2), both definite members, and Peppermint stunt virus (PmSV), a tentative member (Tzanetakis et al., 2010).

*** Other viruses**

Roivainen's review mention a few early reports of mealybugs as plant disease vectors (Roivainen, 1980) ; however, in most cases, either the pathogen or the mealybug was insufficiently characterized. Moreover, *Tobacco mosaic virus* (TMV, *Tobamovirus*) has been claimed to be transmissible by *Planococcus citri*; however, attempts to reproduce this finding have failed and Roivainen suggested that mealybugs could transmit mechanically at very low rates this highly stable virus, like aphids can do in certain conditions (Wang and Pirone, 1996).

A member of *Soymovirus* (*Caulimoviridae*), *Blueberry red ringspot virus* (BRRV), is suspected to be vectored by the mealybug *Dysmicoccus vaccinii* Miller and Polavarapu (Gillett and Ramsdell, 1998; Stuart and Polavarapu, 2002).

'Rice chlorotic streak virus' has been claimed to be vectored by the rice mealybug *Brevennia rehi* (Lindinger) in India (Anjanenyulu et al., 1980) ; however, rice chlorotic streak is probably not caused by a virus.

Finally, the mealybug *Ferrisia virgata* has been reported in 1953 to transmit 'lime dieback' of citrus (Heinze, 1959; Gullan et al., 2010); however, this report requires confirmation, since this syndrome is now attributed to *Citrus tristeza virus* (CTV, *Closterovirus*) which is aphid-borne (Raccah et al., 1989).

**3- Main pathosystems involving coccoid-vectored viruses**

**3.1- Cacao swollen shoot disease**

First reported in 1936 in the eastern Gold Coast (now Ghana) but probably present since 1920, cacao swollen shoot is a devastating disease of cacao (*Theobroma cacao*), especially in Ghana and Nigeria, and to a lesser extent in Togo and Ivory Coast (reviewed by Owusu, 1983; Lockhart and Sackey, 2001; Ollennu, 2003; Ploetz, 2007; Dzahini-Obiatey et al., 2010). Severe outbreaks were observed in Ghana during the 1930s and 1940s and caused dramatic losses of cocoa production.

Though very diverse depending on virus strain and cacao cultivar, symptoms typically include leaf discoloration and swelling of stems and roots, leading to the death of the plant. The only control measure was, and globally still is), to remove infected trees (Domfeh et al., 2011). Thus a Ghana-wide survey conducted in 1946-47 was followed by a massive campaign to eradicate 50 million trees and by serious social and political troubles, probably the costliest and most ambitious campaign ever launched against a plant virus in the world.

Extensive research has been devoted to cacao swollen shoot in order to understand and try to solve the problem. A special mention must be awarded to the seminal work of Dr 'Peter' A.F. Posnette (1914-2004), whose determinant findings paved the way for a research program on all aspects of the disease. In 1940, his grafting experiments demonstrated that swollen shoot is caused by a virus, called *Cacao swollen shoot virus* (CSSV), and stimulated the search for vectors. The role of mealybugs as vectors, suggested then by Posnette, was proven by (Box, 1945) and described in a series of papers by Posnette (Roivainen, 1976). At least 14 mealybug species have been identified as vectors, among which the most efficient and abundant is *Formicococcus* [formerly *Pseudococcus* then *Planococcoides*] *njalensis* (Laing) (Roivainen, 1980; Dufour, 1988; Ben-Dov et al., 2012). Other vectors are *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell), *Ferrisia virgata*, *Planococcus citri*, *Pseudococcus longispinus* (Targioni Tozzetti) and a few species of the genera *Delococcus*, *Maconellicoccus*, *Paraputo*, *Phenacoccus*, *Planococcus* and *Tylococcus* (Table 3). Mealybugs can also inoculate CSSV to cacao plants by feeding on seeds (Posnette, 1947). Mealybugs spread the virus between adjoining trees; therefore, when roguing infected trees, it is advised to eliminate also adjacent symptomless trees (Sosnowski et al., 2009) and to introduce barrier crops between cacao plantations (Dzahini-Obiatey et al., 2006).

CSSV displays a wide diversity of strains, formerly sometimes described as distinct viruses on the basis of symptoms and virulence (Roivainen, 1980; Ollennu, 2003) and now investigated at the molecular level (Muller and Sackey, 2005; Muller et al., 2009; Oro et al., 2012a). Since cacao is not indigenous of Africa, but originates from the Amazon Basin where CSSV is not found, it is commonly accepted, though not proven (Tinsley, 1971), that CSSV was present in African wild perennials prior to the introduction of cacao as a crop into Ghana (1871) and its colonization by indigenous infectious mealybugs. Indeed, CSSV can infect African relatives, such as kola (*Cola* spp.) and baobab (*Adansonia digitata*), even in areas where no cacao is grown; the wide diversity of CSSV also argues for a long history with wild plants (Posnette, 1960; Legg and Bonney, 1967; Lockhart and Sackey, 2001; Ollennu, 2003).

**3.2- Pineapple mealybug wilt disease**

Knowledge about this devastating disease has been reviewed by Carter (1963); Rohrbach et al. (1988); German et al. (1992); and Jahn et al. (2003). The disease was described in 1910 in Hawaiian pineapple plantations, causing wilt starting at the field edge and progressively reaching the entire plot, and reducing fruit yields by 30-55 % (Sether and Hu, 2002b). Infected plants show reddening of inner leaves which then dry up, as well as root collapse, and eventually die or recover to produce symptomless leaves (Jahn et al., 2003). This disease is known from all pineapple producing areas worldwide.

Since 1925, the disease was associated to the presence of mealybugs and ants. Early workers and among them, Dr W. Carter who spent many years attempting to elucidate and control this complex disease in Hawaii, thought that mealybug feeding was the direct cause of the pathology, by a so-called 'systemic phytotoxemia', i.e. induction of symptoms caused by secretion into the host plant of a toxic factor within the insect's saliva (Carter, 1962). This concept, which explains the name 'mealybug wilt', evolved after Carter's observations that mealybugs originating from pineapple seedlings or other plants did not induce the disease on healthy pineapples. This lead Carter to suggest the presence of a 'latent virus' which would interact with mealybugs to provoke the wilt.

Subsequent work (reviewed by Rohrbach et al. (1988)) demonstrated the viral etiology of the disease and detected a flexuous-shaped virus, named Pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV). PMWaV has later been shown to form a complex of distinct viral entities. So far, three virus species have been characterized: PMWaV-1, -2 and -3 (Melzer et al., 2001; Melzer et al., 2008; Sether et al., 2009); two further species, PMWaV-4, and -5, as well as badnavirus-related sequences, have been reported recently (Gambley et al., 2008 ) (Gambley et al., 2008). PMWaV-1, -2 and -3 are typical members of the genus *Ampelovirus* and can be transmitted by the mealybugs *Dysmicoccus brevipes* and *D. neobrevipes* Beardsley (Sether et al., 1998; Sether et al., 2005). However, the etiology of mealybug wilt is complex, since the presence of either PMWaV species alone does not induce symptoms (Sether and Hu, 2002a); only the exposure to mealybugs along with the presence of PMWaV-2, but not PMWaV-1 or -3, trigger wilt symptom (Sether and Hu, 2002a). The pathophysiological mechanism by which each agent contributes to the disease remains unknown.

### 3.3- Grapevine leafroll disease

Grapevine leafroll is one of the most serious viral diseases of grapevine worldwide. It is known since the early 1900s and its viral etiology was hypothetized in 1935 (Martelli and Boudon-Padieu, 2006). Later, filamentous virions associated to the disease were attributed to a clostero-like 'Grapevine leafroll-associated virus' (GLRaV). Today, over 10 distinct 'species' have been described and named 'GLRaV' (Martelli, 2009); however, recent work suggests to consider several of them as strains of a same species (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2012). With the exception of GLRaV-2 (*Closterovirus*), and GLRaV-7 (assigned to the novel genus Velarivirus, *Closteroviridae* (Al Rwahnih et al., 2012)), both with no known vector, all these species belong to the genus *Ampelovirus*. Evidence for 'GLRaV' vectorship was first reported for the mealybug *Planococcus ficus* (Signoret) and GLRaV-3 (Rosciglione and Gugerli, 1989) and later for several other pseudococcid and coccid species, and for the viral species GLRaV-1, -4, -5, -6 and -9 (Sforza, 2008; Le Maguet et al., 2012a) (Table 1). The natural vectors, if any, of GLRaV-Pr, -De and GLRaCV are still unknown. Other grapevine sap-feeding insects such as the flatid *Metcalfa pruinosa* (Say) (Materazzi et al., 1998) and several aphid species including grape phylloxera (Conti et al., 1980; Teliz et al., 1989; Kuniyuki et al., 1995; Charles et al., 2006b) have not been shown to vector any grapevine virus.

Leafroll symptoms are characterized by downward rolling of the leaf margins and leaf reddening or yellowing in red- and white-berried varieties respectively. This woldwide distributed disease affects all grape varieties, including the rootstocks used for grafting, which are ususally asymptomatic. Leafroll can decrease grape yield by an average 15-20 %, retards the maturation of grapes and therefore lowers the quality of musts. Variations in symptom expression can result from the co-infection by two or more leafroll virus species. Moreover, leafroll ampeloviruses are often associated with a vitivirus (GVA, GVB, GVD, GVE). GLRaV-3 is largely predominant, especially under Mediterranean climates, whereas GLRaV-1 is more prevalent in more temperate regions (Charles et al., 2006a; Martelli and Boudon-Padieu, 2006).

Finally, Vidano (1963) mentionned alleged transmission of 'vine mosaic' by *P. corni* and 'vine roncet' by *Pseudococcus* sp. However, whether these diseases are associated with one of the now known GLRaVs cannot be verified.

## 4- Virus-vector interactions

Rather few studies have been devoted so far to the mechanisms of virus transmission by coccoids, especially with regard to the countless literature published on aphid vectors. Evidently, coccoid species have been identified as vectors more recently and in much less numbers as vectors, than aphids. Moreover, investigations on transmission mechanisms in coccoids raise difficult problems, among which the uneasy mass rearing and handling of these minute insects and their long life cycle (one to a few generations per year), as well as the great difficulty of adapting from aphids to coccoids such potent methods as membrane feeding, micro-injection, hemolymph sampling or immunomicroscopy. Moreover, coccoid-borne viruses are usually difficult to purify and to study at the molecular level. The current knowledge, reviewed below, on the mechanisms of virus transmission by coccoids is mainly based on investigations on the badnaviruses CSSV and 'BSV', and on grapevine ampelo- and vitiviruses. The state of art on this domain raises hypotheses which are described here.

### 4.1- Badnaviruses

Roivainen reviewed and studied the transmission biology of CSSV by mealybugs (Roivainen, 1976, 1980). By means of controlled transmission experiments, he estimated classical parameters such as acquisition and inoculation times, viral retention and persistence in vector, from whence he concluded that CSSV is « *best grouped with persistent circulative viruses than non-persistent stylet-borne viruses* », even though there were « *some anomalous properties* » (Roivainen 1980). However, surprisingly he did not consider the « semi-persistent » mode of transmission, that had been defined by (Sylvester, 1956) to characterize the relationship between *Beet yellows virus* (BYV, *Closterovirus*) and the aphid *Myzus persicae* (Sulzer), and that of other viruses and vectors since then. It appears that the parameters described by Roivainen for CSSV are rather consistent with a semi-persistent interaction (Ng and Falk, 2006). Indeed, his findings of (1) a transmission cycle of hours, (2) a minimum acquisition time of 2 hours, (3) a persistence of 3-4 days in the vector, and (4) the presence of virus in phloem tissues, all apply to circulative viruses, but are compatible with the semi-persistent mode as well. Similarly, the result that a viruliferous mealybug can infect only two successive plants applies both to the non- and semi-persistent modes. However, a difference between these two modes is that preacquisition starvation increases (non-persistent) or not (semi-persistent) the transmission rate; Roivainen found that this treatment increased the transmission rate, as well as the settling and food uptake; it is therefore likely that the increased transmission rate merely resulted from a more efficient virus uptake.

Finally, the only parameter of Roivainen's that poses a problem is the virus retention through a moult, which sustains a persistent circulative mode; however, this finding obtained with one CSSV isolate and *Formicococcus njalensis* has never been confirmed to our knowledge for any coccoid-borne virus. There is now a wide consensus about a semi-persistent transmission mode of CSSV and other badnaviruses by mealybugs (Kubiriba et al., 2001; Plumb, 2002; Iskra-Caruana et al., 2010). Interestingly, histology studies revealed that the stylets of *F. njalensis* reach phloem much more readily than that of the poor CSSV vector *Ferrisia virgata*, whereas those of the non-vector *Phenacoccus madeirensis* Green did not. At the cellular and molecular levels, transmission mechanisms of badnaviruses have not been studied to our knowledge.

Banana streak badnaviruses display a very noteworthy feature in relation to transmission. In addition to their horizontal transmissibility by at least four mealybug species (Watson and Kubiriba, 2005) banana streak viruses can be transmitted vertically to the plant progeny via integration within the host genome (Iskra-Caruana et al., 2010). The viral DNA sequence can thus exist in two distinct forms, an *endogenous* integrated form, called 'eBSV' and transmitted vertically, and an *episomal* form, expressed from eBSV and causing host infection (Dallot et al., 2001; Gayral et al., 2008; Gayral et al., 2010). When certain *Musa* genotypes are subjected to a stress, such as wounding, *in vitro* propagation or interspecific crosses, the integrated eBSV can evolve into an active episomal virus that induces a *de novo* infection and can then be acquired and spread out by mealybugs (Meyer et al., 2008; Iskra-Caruana et al., 2010).

Furthermore, endogenous viral sequences homologous to badnaviruses and other caulimovirids ('pararetroviruses') have also been identified in an increasing number of plant species (Harper et al., 2002; Geering et al., 2010a), including pineapple (Gambley et al., 2008) and grapevine (Bertsch et al., 2009). Unlike eBSV and a few other examples, most of these sequences, called 'endogenous pararetroviruses' (EPRV), are replication-defective and do not trigger infection; a new genus, Dionyvirus, is proposed to group these sequences (Geering et al., 2010b). The existence of such integrated sequences offer a rapidly expanding research field, addressing fundamental questions in evolution biology.

**4.2- Grapevine ampeloviruses and vitiviruses**

The ability of scale insects to vector grapevine viruses was suggested by observed correlations between field spread of virus (Dimitrijevic, 1973) and presence of coccoid populations (Caudwell and Dalmasso, 1985; Engelbrecht and Kasdorf, 1991; Habili and Nutter, 1997; Cid et al., 2006; Golino et al., 2008; Le Maguet et al., 2009) and is confirmed by controlled transmission experiments. Investigations on transmission biology of ampelo- and/or vitiviruses by scale insects were reported from 1983 onwards for the following species: *Pseudococcus longispinus* vector of GVA, GVB, GLRaV-1, -3, -5 and -9 (La Notte et al., 1997b; Petersen and Charles, 1997; Golino et al., 2002; Sim et al., 2003; Kuniyuki et al., 2005; Douglas and Krüger, 2008) ; *Planococcus citri* vector of GVA, GLRaV-3 and -1 (Agran et al., 1990; Cabaleiro and Segura, 1997; Scotto, 2007) ; *Pl. ficus* vector of GLRaV-3, -5 and GVA (Acheche et al., 2000; De Borbon et al., 2004) (Engelbrecht and Kasdorf, 1990; Douglas and Krüger, 2008; Tsai et al., 2008; Mahfoudhi et al., 2009; Tsai et al., 2010) ; *Pulvinaria vitis* (L) vector of GLRaV-3 (Belli et al., 1994), *Ps. viburni* (Signoret) [formerly *Ps. affinis* (Maskell)] vector of GVA and GVB (Garau et al., 1995) and of GLRaV-3 (Golino et al., 2002) ; *Ps. maritimus* (Ehrhorn) vector of GLRaV-1 and -3 (Petersen and Charles, 1997; Golino et al., 2002); *Ps. calceolariae* (Maskell) vector of GLRaV-1 and -3 (Petersen and Charles, 1997); *Neopulvinaria innumerabilis* (Rathvon) vector of GLRaV-1, -3 and GVA (Fortusini et al., 1997; Zorloni et al., 2006b); *Parthenolecanium corni* vector of GLRaV-1 and GVA (Fortusini et al., 1997; Hommay et al., 2008); *Heliococcus bohemicus* Sulc vector of GLRaV-1, -3 and GVA (Sforza et al., 2003; Zorloni et al., 2004, 2006a) *Phenacoccus aceris* (Signoret) vector of six ampelo- and two vitiviruses (Sforza et al., 2003; Le Maguet et al., 2012a); *Pseudococcus comstocki* (Kuwana) vector of GVE (Nakaune et al., 2008); *Ceroplastes rusci* (L) vector of GLRaV-3 and -5 (Mahfoudhi et al., 2009). Based on these reports, the described properties are globally consistent with a non-circulative semi-persistent transmission strategy, as summarized herafter.

Crucial criteria for describing transmission mode are time parameters, such as acquisition, inoculation and retention periods; however, these parameters are difficult to measure with coccoids, because it implies a double handling of the insects, which is time-consuming and can physically harm them; this explains why such studies have been performed on only few vector-virus combinations. The acquisition (AAP) and inoculation (IAP) access period used by the various authors ranged from a few hours to several days, sometimes 3-4 weeks. To produce an efficient transmission, the minimum AAP reported is 1 h for *Ps. longispinus* and GVA (La Notte et al., 1997b) and for GLRaV-3 and *Pl. ficus* (Tsai et al., 2008). As to the inoculation access period (IAP), similar ranges are reported, with a minimal time of 30 mn (La Notte et al., 1997b); for GLRaV-3, transmission rate increased with AAPs from 1 to 24 h (Tsai et al., 2008).

The minimal total transmission time (AAP + IAP) enough to an efficient transfer of the virus lies within the range of hours: e.g. 5 h AAP and 30 min IAP for *Ps. longispinus* and GVA (La Notte et al., 1997b) and 1 h AAP and 1 h IAP for *Pl. ficus* and GLRaV-3 (Tsai et al., 2008). Such short durations reveal the lack of a latency period, which is incompatible with a circulative transmission mode and sustain a non-circulative mode. Another criterion for the latter mode is the absence of transstadial passage of the virus; however, since the larval instars of scale insects usually last for weeks, this criterion is very uneasy to verify and has rarely been investigated; yet Scotto (2007) reported that GLRaV-1 was lost when viruliferous *Pl. citri* nymphs processed moulting. Moreover, any transovarial passage of GLRaV-3 to the offspring of *Pl. ficus* is very unlikely to occur (Tsai et al., 2008). Finally, the interaction between PMWaV-2 and *D. neobrevipes* too is likely semi-persistent (Hu et al., 2009). Taken together, these data sustain a semi-persistent mode of interaction between coccoids and ampelo- or vitiviruses. Moreover, phloem restriction of these viruses, that implies phloem feeds by the vector for efficient acquisition and inoculation, is a further characteristic of semi-persistently transmitted viruses (Ng and Falk, 2006). Finally, both properties of semi-persistent transmission and of phloem restriction are shared by all members of *Closteroviridae* with a known vector (coccoids, aphids and whiteflies for respectively *Ampelo-*, *Clostero-* and *Crinivirus* genera).

Nevertheless the non-circulative mode of transmission of grapevine viruses by coccoids has been questionned by Cid et al. (2007). These authors detected GLRaV-3, but not GLRaV-1, by IC-RT-PCR (immunocapture-reverse transcription-PCR) in salivary glands, intestine and Malpighian tubes of *Pl. citri* after an AAP of several days; moreover, immunogold labeling of GLRaV-3 was reported in principal salivary glands. These still unconfirmed observations are probably not relevant for transmission and are subjected to further research (Cid and Fereres, 2010). Recently, Gatehouse et al. (2012) reported an molecular interaction between GLRaV-3 capsid and a chaperonin expressed in the mealybug hemolymph by bacterial endosymbiont, a phenomenon similar to what occurs in luteovirus-vectoring aphids ; however, this observation may well have no biological significance, since ampelovirus transmission by mealybugs, being semi-persistent, is very unlikely to involve the hemolymph compartment (Tsai et al., 2008).

Several studies have generally shown that mealybug nymphs are more efficient vectors than adult females (Tsai et al., 2008; Mahfoudhi et al., 2009; Le Maguet et al., 2012a); however, Scotto (2007) found that all instars of *Pl. citri*, including adult females, vectored efficiently GLRaV-1. Petersen and Charles (1997) reported that first-instar, but not third-instar, nymphs of *Ps. longispinus* and *Ps. calceolariae* were able to transmit GLRaV-3. Both L1 and L2 of *Pa. corni*, either sampled from vineyard-grown infected vines or after controlled acquisition in the laboratory, were naturally infective for GLRaV-1 and GVA when transferred onto healthy vine cuttings (Hommay et al., 2008; Hommay et al., 2009). A single nymph of *Pl. ficus* or *Ps. longispinus* is sufficient to infect a vine with GLRaV-3 (Douglas and Krüger, 2008); moreover, two (GLRaV-1 and -3) or three (the same plus GVA) were detected together in single immature and adult scale insects sampled from diseased vines (Fuchs et al., 2009; Bertin et al., 2010). However, whether an individual insect can efficiently inoculate a vine with two or more distinct viruses remains an unanswered question.

The existence, in grapevine, of coccoid-vectored phloem-limited viruses belonging to two distinct viral genera (*Ampelo-* and *Vitivirus*) raises interesting and underinvestigated questions pertaining to the possible effect of co-infecting viruses on virus–plant–vector interrelations. Even though GVA has sometimes been reported to occur in vines free of GLRaV-1 and -3 (Agran et al., 1990; Milkus et al., 2000; Gribaudo et al., 2009), GVA is most frequently detected together with either GLRaV-1 or -3 or both (Goszczynski and Jooste, 2003b; Ipach and Kling, 2008; Fiore et al., 2011). Moreover, GVA (Zorloni et al., 2004, 2006a; Hommay et al., 2008; Bertin et al., 2010; Le Maguet et al., 2012a), and GVE (Nakaune et al., 2008) were acquired from co-infected vines and transmitted by scale insects along with GLRaV-1 or -3, suggesting that the vitivirus may depend on the presence of an ampelovirus in the same source-plant for its efficient transmission to a new host, i.e. a possible phenomenon (‘dependent transmission’ or ‘hetero-assistance’) where the ampelovirus would act as a ‘helper virus’ for the vitivirus. When fed on a vine infected by GLRaV-1 and GVA, the coccid *Pa. corni* transmitted GVA always together with GLRaV-1 to healthy vines, as well as GVA alone to *Nicotiana benthamiana* (Hommay et al., 2008), a plant immune to the ampelovirus. With another coccid, *N. innumerabilis*, (Fortusini et al., 1997) reported the transmission of GVA alone (without GLRaV-1) to one vine, suggesting that the helper would be the vitivirus; however, the recipient vines were tested only once (4 months post transmission) and it is observed that vitiviruses are detected earlier than the co-infecting ampelovirus (Hommay et al., 2009). In the same way, GVB have been recently shown to be transmissible by *Ph. aceris* in strict association with GLRaV-1. Finally, the transmission of the aphid-borne vitiviruses HLV and MV2 is also suspected to depend on a helper virus (Pirone and Blanc, 1996; Tzanetakis et al., 2010).

If confirmed, the dependent transmission hypothesis would involve one of two kinds of mechanisms, both well characterized for other virus–vector interactions (Ng and Falk, 2006). According to the first mechanism, the ampelovirus may express a helper factor, or helper component, required for his own transmission by its vector (like in the well known cases of aphid-borne caulimo- and potyviruses (Pirone and Blanc, 1996; Syller, 2006), and in coinfected vines the vitivirus would also rely on the same factor in order to be acquired and transmitted by a 'transcomplementation' strategy, as described by Froissart et al. (2002). The existence of a helper factor has been suspected, though not proven, for an aphid-borne closterovirid (*Citrus tristeza virus*, *Closterovirus*) since no transmission was observed after the vector acquired this virus from a purified preparation (Herron et al., 2006); similarly, no transmission of GVA was obtained with purified virions-fed mealybugs (La Notte et al., 1997b). However, a whitefly-vectored *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV, *Crinivirus*) is readily transmissible from purified preparations, therefore no helper factor is needed (Stewart et al., 2010), but whether this pertains to other criniviruses is not known.

The second mechanism underlying dependent transmission is 'hetero-encapsidation', largely documented for *Luteoviridae* and other aphid-borne viruses (Syller, 2000) where the assisted virus ARN is encapsidated partly or entirely by capsid subunits from the helper virus that bear the viral determinants for transmission. Heteroencapsidation between GVA and GVB has been reported in *Nicotiana* plants. As to transmission determinants of ampelo- and vitiviruses, these factors have so far not been identified, though a putative 19-kDa protein encoded by the open reading frame (ORF) 2 of GVA has been suggested to play a role in vector transmission (Galiakparov et al., 2003). For LIYV (*Crinivirus*), a protein named CPm (minor coat protein) and participating to the virion 'tail' structure is known to be involved in transmission by whiteflies (Stewart et al., 2010) and retained in the anterior foregut (Chen et al., 2011). However, it is not known whether the homolog CPm protein of *Clostero-* and *Ampelovirus* members, or any other 'tail' component (Dolja et al., 2006; Alzhanova et al., 2007), has an analog function in transmission by aphids or coccoids respectively. In addition, the CPm-encoding ORF is divergent among ampeloviruses (Dolja et al., 2006) and can even seem to lack in some species (GLRaV-5 and -9, PMWaV-1 and -3) (Martelli and Candresse, 2010). Further research is needed to localize transmission determinants in ampeloviruses.

**5- Prospects for future work**

Over the last decades, virus vectorship of scale insects is an increasingly known and investigated domain. The currrent knowledge, though still incomplete, reveals convincingly a semi-persistent mode of virus transmission by coccoids, at least for the few studied pathosystems. However, whether this transmission mode applies to all known coccoid-vectored viruses cannot be asserted. A common feature of these viruses is a relatively broad vector range of a given virus, i.e. a low degree of specificity, as emphasized by Tsai et al. (2010). Indeed, ampelo- and vitiviruses are probably the only phytovirus taxa that admit vector species from two separate, though close, insect families, the *Pseudococcidae* and the *Coccidae*. Undoubtedly, new vector species among coccoids are to be discovered in future. This specificity, even broad, is the likely result of underlying cellular and molecular interactions between virus particles and vector tissues, and elucidating these interactions represent an almost unexplored and challenging field of research.

To take up this challenge of investigating virus–coccoid interplay, several questions remain to be tackled, with the help of the newest concepts and technologies (Blanc et al., 2011). These questions include retention site of virus, cellular and molecular interactions between virus and vector, interactions among co-infecting viruses, inter- and intraspecific variability of vector efficiency, field spread of vector and virus. All these research directions will also benefit from any improved methods to rear scale insects and handle them, especially nymphs, for transmission experiment. On viral retention sites in vectors, data available are still very scarse. Apart from one report (Cid et al., 2007), results from immuno-microscopy in a viruliferous coccoid and from virus detection methods in dissected vector organs are lacking. The semi-persistent interaction suggests that the retention site is located in the foregut; however, to confirm this assumption and to determine precisely where in the foregut the virions are retained by a vector before being released for inoculation, progress are needed toward vizualization of virions in histological sections of coccoids, prepared either for light or electron microscopy.

Knowledge on the structure and gene functions of coccoid-vectored viruses (badna-, ampelo- and vitiviruses) is steadily increasing. However, the capsid components and motifs involved in virus recognition by the vector are still unknown, even though the CPm is suspected in this process. Investigating this issue requires full-length DNA or cDNA clones of the viral genome, in order to mutate specific genomic regions and evaluate the transmissibility of mutants. Full-length clones have been obtained for some badnaviruses (Hagen et al., 1994; Huang and Hartung, 2001) and for the vitiviruses GVA and GVB (Du Preez et al., 2011), but not yet for ampeloviruses.

Also, the development of fluorescent labelling of viral particles or proteins will be required to follow the fate of virus inside vectors (Chen et al., 2011). On the long term, the identification of transmission determinants on the virus side will help locating their interactants (receptors) on the vector side, providing data for understanding virus–vector molecular interactions. The pursuit of virological work will also help to improve sensitivity and specificity of methods of virus detection, especially in vectors (Minafra and Hadidi, 1994; La Notte et al., 1997a; Acheche et al., 2000; Cid et al., 2007; Douglas and Krüger, 2008; Douglas et al., 2009; Fuchs et al., 2009; Bertin et al., 2010) to be used in all facets of coccoid–virus–plant relations, from transmission mechanisms to epidemiology.

Available knowledge reviewed here reveals that scale insect-related pathosystems are rarely associated to a single virus species. Grapevine is subjected to many coccoid-borne ampelo- and vitiviruses; in addition, a badnavirus, so far without known vector, has newly been described in grapevine (Zhang et al., 2011). Pineapple mealybug wilt is associated to at least five ampeloviruses, to which two badnaviruses and a possible endogenous virus have recently been added (Gambley et al., 2008; Gambley et al., 2008 ). Banana streak has been related to a range of badnavirus species, combined to the possibility of vertical transmission through the plant genome that adds a further degree of complexity to the system (Iskra-Caruana et al., 2010). Sugarcane, too, can harbor a badnavirus and an ampelovirus (Lapierre and Signoret, 2004). During the last years, novel badna-, ampelo- and vitiviruses have been described (Blouin et al., 2012) and further discoveries are arguably to occur; there is little doubt that some of them, if not all, will prove coccoid-borne and that new viral complexes and possible interactions between co-infecting viruses will come into light. The frequency of mixed infections raises interesting questions about possible synergistic effects between different viruses in a co-infected plant, in terms of transmissibility and plant infection. Particularly, the possible hetero-assistance between viruses for transmission, as hypothesized in the case of grapevine and perhaps pineapple, opens burgeoning horizons. Searching for a possible helper factor will require to develop membrane feeding by scale insects on viral preparations, a technique rarely used (La Notte et al., 1997b) and uneasy to perform with these insects and the viruses they transmit, especially ampelo- and vitiviruses, difficult to purify.

Much progress has been made over the last two decades in the understanding of the epidemiological role of coccoid vectors in the virus spread, and further research is expected to provide new findings to be exploited in controlling the diseases they induce. It is noteworthy that most cultivated plants susceptible to coccoid-borne diseases are usually vegetatively propagated (banana, cacao, grapevine, pineapple); these crops are therefore submitted to sanitary controls of propagative material, which limit primary introduction of a virus into the crop and the risk to provoke new encounters with potential vectors and/or incoming viruses. In these conditions, the respective role of insect vectors and plant material, depending on the availability and reliability of sanitary control and detection methods, is a crucial parameter for crop protection. Epidemiological studies also require better insights into the intraspecific variability of viruses (Theilmann et al., 2004; Muller and Sackey, 2005; Sether et al., 2005) and of vector efficiency of coccoids, e.g. using molecular markers (Downie and Gullan, 2004; Saccaggi et al., 2008; Bertin et al., 2010; Daane et al., 2011; Malausa et al., 2011; Park et al., 2011)

Furthermore, since scale insects seem to alternate dispersal and feeding behavior during their annual cycle, more studies are to be devoted to their active intra- and inter-plant movement throughout the year (Grasswitz and James, 2008; Almeida et al., 2009; Cid and Fereres, 2010), as well as their passive aerial movement, in relation to their probability to acquire and inoculate a virus. Moreover, movement of certain mealybug species may be enhanced by transport of nymphs by ants, a much overlooked phenomenon (Rohrbach et al., 1988; Jahn et al., 2003; Daane et al., 2007). These factors, along with coccoid–plant interplays (Qin et al., 2011), are believed to drive the spatio-temporal dynamics of the disease and their knowledge will help to decide and schedule management measures, such as roguing, targeted insecticides or biological control. For grapevine, pineapple, and cacao viruses, field experiments under different climates have shown that a mealybug population can spread leafroll throughout a vine plot in several years (Cabaleiro and Segura, 2006; Cabaleiro et al., 2008; Golino et al., 2008; Sether et al., 2010; Le Maguet et al., 2012b; Oro et al., 2012b). More field work is required to better understand the coccoid-related pathosystems, and integrate this knowledge as a basis to improve crop management.

**Table 1. Inventory of members of genus *Ampelovirus*, family *Closteroviridae*, transmitted by scale insects.**

| Virus species | Acronym | Vector species (a) (b) | References |
|---|---|---|---|
| *Grapevine leafroll-associated virus*-1 | GLRaV-1 | *Heliococcus bohemicus, Phenacoccus aceris, Planococcus citri, Parthenolecanium corni*, Neopulvinaria innumerabilis** | (Fortusini et al., 1997; Sforza et al., 2003; Zorloni et al., 2004; Scotto, 2007; Le Maguet et al., 2012a) |
| *Grapevine leafroll-associated virus*-3 (type-member of genus) | GLRaV-3 | *Heliococcus bohemicus, Phenacoccus aceris, Planococcus citri, Pl. ficus, Pseudococcus calceolariae, Ps. comstocki, Ps. longispinus, Ps. maritimus, Ps. viburni, Pulvinaria vitis*, Neopulvinatia innumerabilis*, Ceroplastes rusci*, Coccus longulus*, Parasaissetia nigra*, Saissetia* sp.* | (Tanne, 1988; Rosciglione and Gugerli, 1989; Pedroso et al., 1991; Belli et al., 1994; Golino et al., 1994; Golino et al., 1995; Petersen and Charles, 1997; Nakano et al., 2003; Sforza et al., 2003; Zorloni et al., 2006a; Zorloni et al., 2006b; Krüger and Douglas, 2009; Mahfoudhi et al., 2009) |
| *Grapevine leafroll-associated virus*-4 (c) | GLRaV-4 | *Planococcus ficus, Phenacoccus aceris* | (Tsai et al., 2010; Le Maguet et al., 2012a) |
| *Grapevine leafroll-associated virus*-5 (c) | GLRaV-5 | *Heliococcus bohemicus, Phenacoccus aceris, Planococcus ficus, Pseudococcus longispinus, Parthenolecanium corni*, Ceroplastes rusci** | (Golino et al., 2002; Sim et al., 2003; Mahfoudhi et al., 2009; Le Maguet et al., 2012a) |
| *Grapevine leafroll-associated virus*-6 (c) | GLRaV-6 | *Phenacoccus aceris* | (Le Maguet et al., 2012a) |
| *Grapevine leafroll-associated virus*-9 (c) | GLRaV-9 | *Phenacoccus aceris, Planococcus ficus, Pseudococcus longispinus* | (Sim et al., 2003; Tsai et al., 2010; Le Maguet et al., 2012a) |
| *Little cherry virus*-2 (formerly LChV-LC5 and LChV-3) | LChV-2 | *Phenacoccus aceris* | (Raine et al., 1986; Theilmann et al., 2002; Petruschke et al., 2011) |
| *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1 | PMWaV-1 | *Dysmicoccus brevipes, D. neobrevipes* | (Sether et al., 2005) |
| *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-2 | PMWaV-2 | *Dysmicoccus brevipes, D. neobrevipes, Pseudococcus longispinus* | (Sether et al., 2005; Subere et al., 2009) |
| *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-3 | PMWaV-3 | *Dysmicoccus brevipes, D. neobrevipes* | (Sether et al., 2005) |
| Sugarcane mild mosaic virus | SMMV | *Saccharicoccus sacchari* | (Lapierre and Signoret, 2004) |

(a) All coccoid species belong to *Pseudococcidae*, unless those noted * = *Coccidae*.
(b) To avoid confusion on this table and in the text, the coccoid genera with an initial P are abbreviated with two letters; e.g. *Pl*. for *Planococcus*, *Ps*. for *Pseudococcus*.
(c) Recent work suggests to consider GLRaV-4, -5, -6, -9, -Pr, -De and GLRaCV as strains of the same species, i.e. GLRaV-4 (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2012).

**Table 2. Inventory of members of genus *Vitivirus*, family *Betaflexiviridae*, transmitted by scale insects.**

| Virus species | Acronym | Vector species (a) (b) | References |
|---|---|---|---|
| *Grapevine virus A* (type-member of genus) | GVA | *Heliococcus bohemicus, Phenacoccus aceris, Planococcus citri, Pl. ficus, Pseudococcus comstocki, Ps. longispinus, Ps. viburmi, Parthenolecanium corni*, Pulvinaria vitis*, Neopulvinaria innumerabilis** | (Rosciglione et al., 1983; Rosciglione and Castellano, 1985; Garau et al., 1995; Fortusini et al., 1997; Nakano et al., 2003; Zorloni et al., 2006a; Hommay et al., 2008; Le Maguet et al., 2012a) |
| *Grapevine virus B* | GVB | *Phenacoccus aceris, Planococcus citri, Pl. ficus, Pseudococcus longispinus, Ps. viburni* | (Tanne et al., 1989; Boscia et al., 1993; Garau et al., 1995; Golino et al., 1995; Le Maguet et al., 2012a) |
| *Grapevine virus E* | GVE | *Pseudococcus comstocki* | (Nakaune et al., 2008) |

**Table 3. Inventory of members of family *Caulimoviridae* transmitted by scale insects.**

| Virus species | Acronym | Vector species (a) (b) | References |
|---|---|---|---|
| *Blueberry red ringspot virus* | BRRV | *Dysmicoccus vaccinii* ? | (Stuart and Polavarapu, 2002) |
| 'Banana streak virus' group (now split into several species) | | *Planococcus citri, Saccharicoccus sacchari, Pl. ficus, Pl. minor, Pseudococcus comstocki, Dysmicoccus brevipes* | (Kubiriba et al., 2001; Arias et al., 2002; Watson and Kubiriba, 2005; Meyer et al., 2008) |
| *Cacao swollen shoot virus* (includes former Cocoa mottle leaf, Cocoa Trinidad, Ceylon cocoa viruses) | CSSV | *Formicococcus njalensis, F. celtis, Planococcus citri, Pl. kenyae, Pl. lilacinus, Delococcus tafoensis, Delottococcus proteae, Dysmicoccus brevipes, Ferrisia virgata, Maconellicoccus ugandae, Paraputo anomalus, Phenacoccus hargreavesi, Pseudococcus calceolariae, Ps. comstocki, Ps. concavocerarii, Ps. longispinus, Ps. masakensis, Tylococcus westwoodi* | (Roivainen, 1980; Dufour, 1988) |
| *Citrus yellow mosaic virus* | CYMV | *Planococcus citri* | (Borah et al., 2009) |
| *Commelina yellow mottle virus* (type-member of genus) | CoYMV | mealybug | (Lockhart, 1995) |
| *Dioscorea bacilliform virus* | DBV | *Planococcus citri* | (Phillips et al., 1999) |
| *Kalanchoë top-spotting virus* | KTSV | *Planococcus citri* | (Yang et al., 2005) |
| *Piper yellow mottle virus* | PYMoV | *Planococcus citri, Ferrisia virgata; Diconocoris distanti* (*Tingidae*, lacebug) | (Lockhart et al., 1997; de Silva et al., 2002; Bhat et al., 2003; Bhat et al., 2005) |
| *Schefflera ringspot virus* | SRV | *Planococcus citri* | (Lockhart and Olszewski, 1996) |
| 'Sugarcane bacilliform virus' (now split into two viral species) | SCBIMV & SCBMV | *Saccharicoccus sacchari, Dysmicoccus boninsis, Planococcus citri* | (Lockhart et al., 1992) |
| *Taro bacilliform virus* | TaBV | *Pseudococcus solomonensis* | (Macanawai et al., 2005) |
| Ensete streak virus (= BSV?) | | *Paraputo ensete* | (Williams and Matile-Ferrero, 1999) |
| Pineapple bacilliform CO virus | PBCoV | *Dysmicoccus brevipes, Planococcus citri* | (Gambley et al., 2008 ) |
| Pineapple bacilliform ER virus | PBErV | *Dysmicoccus brevipes* | (Gambley et al., 2008 ) |

(a) All coccoid species belong to *Pseudococcidae*, unless those noted * = *Coccidae*.
(b) To avoid confusion on this table and in the text, the coccoid genera with an initial P are abbreviated with two letters; e.g. *Pl*. for *Planococcus*, *Ps*. for *Pseudococcus*

**Litterature cited**


**Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Gugerli, P., and Rowhani, A.** (2012). Genome organization, serology and phylogeny of Grapevine leafroll-associated viruses 4 and 6: Taxonomic implications. *Virus Res.* **163,** 120-128.

**Acheche, H., Fattouch, S., M'Hirsi, S., Chabbouh, N., and Marrakchi, M.** (2000). Studies on grapevine leafroll associated virus 3 transmission by mealybugs in tunisian grapevine. In 13th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Adelaïde). 12-17/3/2000.

**Agran, M.K., Di Terlizzi, B., Boscia, D., Minafra, A., Savino, V., Martelli, G.P., and Askri, F.** (1990). Occurrence of grapevine virus A (GVA) and other closteroviruses in Tunisian grapevines affected by leafroll disease. *Vitis* **29,** 43-48.

**Al Rwahnih, M., Dolja, V.V., Daubert, S., Koonin, E.V., and Rowhani, A.** (2012). Genomic and biological analysis of Grapevine leafroll-associated virus 7 reveals a possible new genus within the family Closteroviridae. *Virus Res.* **163,** 302-309.

**Almeida, R.P.P., Tsai, C.W., and Daane, K.M.** (2009). The role of seasonality on mealybugs transmission of *Grapevine leafroll-associated viruses:* an ecological hypothesis. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 278. 31 Aug- 4 Sept.

**Alzhanova, D.V., Prokhnevsky, A.I., Peremyslov, V.V., and Dolja, V.V.** (2007). Virion tails of *Beet yellows virus:* coordinated assembly by three structural proteins. *Virology* **359,** 220-226.

**Anjanenyulu, A., Singh, S.K., Shukla, V.D., and Shenoi, M.M.** (1980). Chorotics streak, a new virus disease of rice. *International Rice Research Newsletter* **5,** 12-13.

**Arias, G.G., Font, C., and Miranda, E.** (2002). *Planococcus minor* (Maskell), vector del virus estriado del platano (BSV). *Fitosanidad* **6,** 47-48.

**Belli, G., Fortusini, A., Casati, P., Belli, L., Bianco, P.A., and Prati, S.** (1994). Transmission of a grapevine leafroll associated closterovirus by the scale insect Pulvinaria vitis L. *Riv. Pat. Veg.* **4,** 105- 108.

**Ben-Dov, Y., and Hodgson, C.J.** (1997). Soft scale insects -Their biology, natural enemies and control (Amsterdam: Elsevier Science), pp. 442.

**Ben-Dov, Y., Miller, D.R., and Gibson, G.A.P.** (2012). ScaleNet. http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm

**Bertin, S., Cavalieri, V., Graziano, C., and Bosco, D.** (2010). Survey of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) vectors of Ampelovirus and Vitivirus in vineyards of northwestern Italy. *Phytoparasitica* **38,** 401-409.

**Bertsch, C., Beuve, M., Dolja, V.V., Wirth, M., Pelsy, F., Herrbach, E., and Lemaire, O.** (2009). Retention of the virus-derived sequences in the nuclear genome of grapevine as a potential pathway to virus resistance. *Biology Direct* **4,** 21.

**Bhat, A.I., Devasahayam, S., Sarma, S., and Pant, R.P.** (2003). Association of a badnavirus in black pepper (*Piper nigrum* L.) transmitted by mealybug (*Ferrisia virgata*) in India. *Current Science* **84,** 1547-1550.

**Bhat, A.I., Devasahayam, S., Hareesh, P.S., Preethi, N., and Tresa, T.** (2005). *Planococcus citri* (Risso) - an additional mealybug vector of Badnavirus infecting black pepper (*Piper nigrum* L.) in India. *Entomon* **30,** 85-90.

**Blanc, M., Uzest, M., and Drucker, M.** (2011). New research horizons in vector-transmission of plant viruses. *Current Opinion in Microbiology* **14,** 483-491.

**Blouin, A., Chavan, R., Pearson, M., MacDiarmid, R., and Cohen, D.** (2012). Detection and characterisation of two novel vitiviruses infecting *Actinidia*. *Archives of Virology* **157,** 713-722.

**Borah, B., Johnson, A., Sai Gopal, D., and Dasgupta, I.** (2009). Sequencing and computational analysis of complete genome sequences of *Citrus yellow mosaic badna virus* from acid lime and pummelo. *Virus Genes* **39,** 137-140.

**Boscia, D., Savino, V., Minafra, A., Namba, S., Elicio, V., Castellano, M.A., Gonsalves, D., and Martelli, G.P.** (1993). Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. *Arch. Virol.* **130,** 109-120.

**Box, H.E.** (1945). Insect transmission of the 'swollen-shoot' virus in West African cacao. *Nature* **155,** 608-609.

**Cabaleiro, C., and Segura, A.** (1997). Some characteristics of the transmission of grapevine leafroll associated virus 3 by *Planococcus citri* Risso. *Eur. J. Plant Pathol.* **103,** 373-378.

**Cabaleiro, C., and Segura, A.** (2006). Temporal analysis of grapevine leafroll associated virus 3 epidemics. *Eur. J. Plant Pathol.* **114,** 441-446.

**Cabaleiro, C., Couceiro, C., Pereira, S., Cid, M., Barrasa, M., and Segura, A.** (2008). Spatial analysis of epidemics of *Grapevine leafroll associated virus-3*. *Eur. J. Plant Pathol.* **121,** 121-130.

**Calatayud, P.A., Rahbé, Y., Delobel, B., Khuong-Huu, F., Tertuliano, M., and Le Rü, B.** (1994). Influence of secondary compounds in the phloem sap of cassava on expression of antibiosis towards the mealybug *Phenacoccus manihoti*. *Entomol. Exp. Appl.* **72,** 47-57.

**Carter, W.** (1962). Insects in relation to plant disease (New York: John Wiley and Sons), pp. 759.

**Carter, W.** (1963). Mealybug Wilt of Pineapple ; A reappraisal. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **105,** 741-764.

**Caudwell, A., and Dalmasso, A.** (1985). Epidemiology and vectors of grapevine viruses and yellows diseases. *Phytopathologia Mediterranea* **24,** 170-176.

**Charles, J.G., Cohen, D., Walker, J.T.S., Forgie, S.A., Bell, V.A., and Breen, K.C.** (2006a). A review of grapevine leafroll associated virus type 3 (GLRaV-3) for the New Zealand wine industry (The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand Ltd (HortResearch), Client Report No 18447, 79 p.).

**Charles, J.G., Cohen, D., Walker, J.T.S., Forgie, S.A., Bell, V.A., and Breen, K.C.** (2006b). A review of the ecology of grapevine leafroll associated virus type 3 (GLRaV-3). *N.Z. Plant protection* **59,** 330-337.

**Chen, A.Y.S., Walker, G.P., Carter, D., and Ng, J.C.K.** (2011). A virus capsid component mediates virion retention and transmission by its insects vector. *PNAS* **108,** 16777-16782.

**Cid, M., and Fereres, A.** (2010). Characterization of the Probing and Feeding Behavior of Planococcus citri (Hemiptera: Pseudococcidae) on Grapevine. *Annals of the Entomological Society of America* **103,** 404-417.

**Cid, M., Pereira, S., Cabaleiro, C., Faoro, F., and Segura, A.** (2007). Presence of Grapevine leafroll-associated virus 3 in primary salivary glands of the mealybug vector Planococcus citri suggests a circulative transmission mechanism. *Eur. J. Plant Pathol.* **118,** 23-30.

**Cid, M., Pereira, S., Gago, P., Couceiro, C., Cabaleiro, C., and Segura, A.** (2006). Planococcus citri (Risso) (Homoptera : Pseudococcidae) as a GLRaV-3 Vector. In 15th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Stellenbosch), pp. 252-254.

**Conti, M., Milne, R.G., Luisoni, E., and Boccardo, G.** (1980). A closterovirus from a stem-pitting-diseades grapevine. *Phytopathology* **70,** 394-399.

**Daane, K.M., Sime, K.R., Fallon, J., and Cooper, M.L.** (2007). Impacts of Argentine ants on mealybugs and their natural enemies in California's coastal vineyards. *Ecological Entomology* **32,** 583-596.

**Daane, K.M., Middleton, M.C., Sforza, R., Cooper, M.L., Walton, V.M., Walsh, D.B., Zaviezo, T., and Almeida, R.P.P.** (2011). Development of a multiplex PCR for identification of vineyard mealybugs *Environ. Entomol.* **40,** 1595-1603.

**Dallot, S., Acuña, P., Rivera, C., Ramírez, P., Cōte, F., Lockhart, B.E.L., and Caruana, M.L.** (2001). Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant in the expression of *Banana streak virus* integrated into the genome of the FHIA 21 hybrid (*Musa* AAAB). *Archives of Virology* **146,** 2179-2190.

**De Borbon, C.M., Gracia, O., and Gomez Talquenca, G.S.** (2004). Mealybugs and grapevine leafroll-associated virus 3 in vineyards of Mendoza, Argentina. *Am. J. Enol. Viticult.* **55,** 283-285.

**de Silva, D.P.P., Jones, P., and Shaw, M.W.** (2002). Identification and transmission of Piper yellow mottle virus and Cucumber mosaic virus infecting black pepper (*Piper nigrum*) in Sri Lanka. *Plant Pathology* **51,** 537-545.

**Dimitrijevic, B.** (1973). Some observations on natural spread of Grapevine Leafroll disease in Yugoslavia. *Riv. Pat. Veg.* **9,** 114-119.

**Dolja, V.V., Kreuze, J.F., and Valkonen, J.P.T.** (2006). Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res.* **117,** 38-51.

**Domfeh, O., Dzahini-Obiatey, H., Ameyaw, G.A., Abaka-Ewusie, K., and Opoku, G.** (2011). Cocoa swollen shoot virus disease situation in Ghana: A review of current trends. *Afr. J. Agric. Res.* **6,** 5033-5039.

**Douglas, N., and Krüger, K.** (2008). Transmission efficiency of Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybugs Planococcus ficus and Pseudococcus longispinus (Hemiptera: Pseudococcidae). *Eur. J. Plant Pathol.* **122,** 207-212.

**Douglas, N., Pietersen, G., and Krüger, K.** (2009). A real-time RT-PCR assay for the detection and quantification of *Grapevine leafroll-associated virus -3* (GLRaV-3) in *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) and *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae). In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 292-293.

**Downie, D.A., and Gullan, P.J.** (2004). Phylogenetic analysis of mealybugs (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) based on DNA sequences from three nuclear genes and a review of the higher classification. *Systematic Entomology* **29,** 238-259.

**Du Preez, J., Stephan, D., Mawassi, M., and Burger, J.T.** (2011). The grapevine-infecting vitiviruses, with particular reference to grapevine virus A. *Arch. Virol.* **156,** 1495-1503.

**Dufour, B.** (1988). Utilisation d'une méthode de transmission pour la caractérisation des formes togolaises de virus de swollen shoot du cacaoyer. *Café Cacao Thé* **32,** 219-228.

**Dzahini-Obiatey, H., Akumfi Ameyaw, G., and Ollennu, L.A.** (2006). Control cocoa swollen shoot disease by eradicting infected trees in Ghaha: a survey of treated and replanted areas. *Crop Protection* **25,** 647-652.

**Dzahini-Obiatey, H., Domfeh, O., and Amoah, F.M.** (2010). Over seventy years of a viral disease of cocoa in Ghana: from researcher's perspective. *Afr. J. Agric. Res.* **5,** 476-485.

**Engelbrecht, D.J., and Kasdorf, G.G.F.** (1990). Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug, *Planococcus ficus*. *Phytophylactica* **22,** 341-346.

**Engelbrecht, D.J., and Kasdorf, G.G.F.** (1991). Field spread of corky bark, fleck, leafroll and Shiraz decline diseases and associated viruses in South African grapevines. *Phytophylactica* **22,** 347-354.

**Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A.** (2005). Vitus taxonomy. Eighth report of the International Commitee on Taxonomy od Viruses, E.A. Press, ed (Amsterdam), pp. 1259.

**Fiore, N., Zamorano, A., Rivera, P.A., Gonzales, F., Aballay, E., Montealegre, J., and Pino, A.M.** (2011). Grapevine viruses in the Atacama region of Chile. *J. Phytopathol.* **159,** 743-750.

**Fortusini, A., Scattini, G., Prati, S., Cinquanta, S., and Belli, G.** (1997). Transmission of *Grapevine leafroll virus 1* (GLRaV-1) and *Grapevine virus A* (GVA) by scale insects. In 12th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Lisbon, Portugal), pp. 121.

**Froissart, R., MIchalakis, Y., and Blanc, S.** (2002). Helper component-transcomplementation in the vector transmission of plant viruses. *Phytopathology* **92,** 576-579.

**Fuchs, M., Marsella-Herrick, P., Loeb, G.M., Martinson, T.E., and Hoch, H.C.** (2009). Diversity of Ampeloviruses in Mealybug and Soft Scale Vectors and in Grapevine Hosts from Leafroll-Affected Vineyards. *Phytopathology* **99,** 1077-1184.

**Galiakparov, N., Tanne, E., Sela, I., and Gafny, R.** (2003). Functional analysis of the *Grapevine Virus* A genome. *Virology* **306,** 42-50.

**Gambley, C., Geering, A., Steele, V., and Thomas, J.** (2008). Identification of viral and non-viral reverse transcribing elements in pineapple (*Ananas comosus*), including members of two new badnavirus species. *Archives of Virology* **153,** 1599-1604.

**Gambley, C.F., Steele, V., Geering, A.D.W., and Thomas, J.E.** (2008 ). The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease *Australasian Plant Pathology* **37,** 95-105.

**Garau, R., Prota, V.A., Boscia, D., Fiori, M., and Prota, U.** (1995). *Pseudococcus affinis* Mask., new vector of grapevine trichoviruses A and B. *Vitis* **34,** 67-68.

**Gatehouse, L.N., Sutherland, P., Forgie, S.A., Kaji, R., and Christeller, J.T.** (2012). Species Endosymbionts of Three Mealybug Secondary (Gammaproteobacteria) of Primary (Betaproteobacteria) and Molecular and Histological Characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **78,** 1187-1197.

**Gayral, P., Blondin, L., Guidolin, O., Carreel, F., Hippolyte, I., Perrier, X., and Iskra-Caruana, M.L.** (2010). Evolution of endogenous sequences of *Banana streak virus*: what can we learn from banana (*Musa* sp.) evolution ? *J. Virol.* **84,** 7346-7359.

**Gayral, P., Noa-Carrazana, J.C., Lescot, M., Lheureux, F., Lockhart, B.E.L., Matsumoto, T., Piffenelli, P., and Iskra-Caruana, M.L.** (2008). A single Banana Streak Virus integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus. *J. Virol.* **82,** 6697-6610.

**Geering, A., Scharaschkin, T., and Teycheney, P.-Y.** (2010a). The classification and nomenclature of endogenous viruses of the family Caulimoviridae. *Archives of Virology* **155,** 123-131.

**Geering, A., Choisne, N., Vezzuli, S., Scalabrin, S., Quesneville, H., Velasco, R., and Teycheney, P.Y.** (2010b). Viruses for breakfast, lunch and dinner. In 9th Australasian Plant-Virology Workshop (Melbourne, Australia). 16-19 nov.

**German, T.L., Ulman, D.E., and Gunasinghe, U.B.** (1992). Mealybug wilt of pineapple. *Advances Dis. Vector Res.* **9,** 241-259.

**Gillett, J.M., and Ramsdell, D.C.** (1998). Blueberry ringspot virus. *AAB Description of plant viruses* **327**.

**Golino, D.A., Sim, S.T., and Rowhani, A.** (1995). Transmission studies of grapevine leafroll associated virus and grapevine corky bark associated virus by the obscure mealybug. *Am. J. Enol. Viticult.* **46,** 408.

**Golino, D.A., Sim, S.T., Gill, R., and Rowhani, A.** (1994). Evidence that California mealy bug species can transmit grapevine leafroll-associated viruses. *Am. J. Enol. Viticult.* **45, 356**.

**Golino, D.A., Sim, S.T., Gill, R., and Rowhani, A.** (2002). California mealybugs can spread grapevine leafroll disease. *Calif. Agric.* **56,** 196-201.

**Golino, D.A., Weber, E., Sim, S.T., and Rowhani, A.** (2008). Leafroll disease is spreading rapidly in Napa Valley vineyard. *Calif. Agric.* **62,** 156-160.

**Goszczynski, D.E., and Jooste, A.E.C.** (2003a). Identification of divergent variants of *Grapevine virus A*. *Eur. J. Plant Pathol.* **109,** 397-403.

**Goszczynski, D.E., and Jooste, A.E.C.** (2003b). Shiraz disease (SD) is transmitted by mealybug *Planococcus ficus* and associated with *Grapevine virus A* (GVA). In 14th meeting of the International Council for the

study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Locorotondo, Italy), pp. 219-220. 12-17 September 2003.

**Grasswitz, T.R., and James, D.G.** (2008). Movement of grape mealybug, *Pseudococcus maritimus*, on and between host plants. *Entomol. Exp. Appl.* **129,** 268 - 275.

**Gribaudo, I., Gambino, G., Bertin, S., Bosco, D., Cotroneo, A., and Mannini, F.** (2009). Monitoring the spread of viruses after vineyard replanting with heat-treated clones of Vitis vinifera 'Nebbiolo'. *J. Plant Pathol.* **91,** 741-744.

**Gullan, P., and Kosztarab, M.** (1997). Adaptations in scale insects. *Annual Review of Entomology* **42,** 23-50.

**Gullan, P., and Martin, J.H.** (2003). Sternorrhyncha. In *Encyclopedia of Insects*, V.H. Resh and R.T. Cardé, eds (Amsterdam: Academic Press), pp. 1079-1089.

**Gullan, P., Kaydan, B.M., and Hardy, N.B.** (2010). Molecular phylogeny and species recognition in the mealybug genus Ferrisia Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae). *Systematic Entomology* **35,** 329-339.

**Habili, N., and Nutter, F.W.** (1997). Temporal and spatial analysis of grapevine leafroll-associated virus 3 in Pinot Noir grapevines in Australia. *Plant Dis.* **81,** 625-628.

**Hagen, L.S., Lot, H., Godon, C., Tepfer, M., and Jacquemond, M.** (1994). Infection of *Theobroma cacao* using cloned DNA of cacao swollen shoot virus and particle bombardment. *Phytopathology* **84,** 1239-1243.

**Harper, G., Hull, R., Lockhart, B., and Olszewski, N.E.** (2002). Viral sequences integrated into plant genomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40,** 119-136.

**Harris, K.F.** (1983). Sternorrhynchous Vectors of Plant Viruses: Virus-Vector Interactions and Transmission Mechanisms. *Advances in Virus Research* **28,** 113-140.

**Heinze, K.** (1959). Phytopathogene Viren und ihre Überträger (Berlin).

**Herron, C.M., Mirkov, T.E., da Graça, J.V., and Lee, R.F.** (2006). *Citrus tristeza virus* transmission by the *Toxoptera citricida* vector: In vitro acquisition and transmission and infectivity immunoneutralization experiments. *Journal of Virological Methods* **134,** 205-211.

**Hommay, G., Komar, V., Lemaire, O., and Herrbach, E.** (2008). *Grapevine virus* A transmission by larvae of *Parthenolecanium corni*. *Eur. J. Plant Pathol.* **121,** 185-188.

**Hommay, G., Le Maguet, J., Komar, V., Lemaire, O., and Herrbach, E.** (2009). Transmission of *Grapevine leafroll-associated virus -1* and *-3* (*Ampelovirus*) and *Grapevine virus A* (*Vitivirus*) by natural populations of soft scales and mealybugs in the north-eastern french vineyard. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 286-287.

**Hu, J.S., Sether, D.M., Melzer, M.J., Subere, C.V., Cheah, K., Chen, Y., Li, Q., Borth, W., Wang, I.C., Nagai, C., and Wang, M.L.** (2009). Characterization and management of pineapple mealybug wilt associated viruses. *Acta Horticulturae* **822,** 185-189

**Huang, F., Tjallingii, W.F., Zhang, P., Zhang, J., Lu, Y., and Lin, J.** (2012). EPG waveform characteristics of solenopsis mealybug stylet penetration on cotton. *Entomol. exp. appl.*, 47-54.

**Huang, Q., and Hartung, J.S.** (2001). Cloning and sequence analysis of an infectious clone of Citrus yellow mosaic virus that can infect sweet orange via Agrobacterium-mediated inoculation. *J. Gen. Virol.* **82**.

**Ipach, U., and Kling, L.** (2008). Grapevine Virus A in Rheinland-Pfalz : Vorkommen und Bedeutung für den deutschen Weinbau. *Gesunde Pflanzen* **60,** 63-66.

**Iskra-Caruana, M.L., Baurens, F.C., Gayral, P., and Chabannes, M.** (2010). A four-partner plant–virus interaction: Enemies can also come from within. *Molelucar Plant-Microbe Intercation* **23,** 1394-1402.

**Jahn, G.C., Beardsley, J.W., and Gonzales-Hernandez, H.** (2003). A review of the association of ants with mealybug wilt disease of pineapple. *Proc. Hawaiian Entomol. Soc.* **36,** 9-28.

**Jones, A.T., McGavin, W.J., Geering, A.D.W., and Lockhart, B.E.L.** (2002). Identification of Rubus yellow net virus as a distinct badnavirus and its detection by PCR in Rubus species and in aphids. *Annals of Applied Biology* **141,** 1-10.

**Kondo, T., Gullan, P., and Williams, D.J.** (2008). Coccidology. The study of scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* **9,** 55-61.

**Kosztarab, M., and Kozar, F.** (1988). Scale insect of central Europe (Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 454.

**Krüger, K., and Douglas, N.** (2009). Transmission of Grapevine Leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) by three soft scale inset species (Hemiptera: Coccidae) and notes on their developmental biology on gravine. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 281-282.

**Kubiriba, J., Legg, J., Tushemereirwe, W., and Adipala, E.** (2001). Vector transmission of Banana streak virus in the screenhouse in Uganda. *Ann. appl. Biol.* **139,** 37-43.

**Kuniyuki, H., Yuki, V.A., Costa, C.L., and Costa, A.S.** (1995). Nao transmissao de tres virus da videira atraves do afideo Aphis illinoisensis. *Fitopatologia Brasileira* **20,** 513-514.

**Kuniyuki, H., Rezende, J.A.M., de Willink, C.G., Novo, J.P.S., and Yuki, V.A.** (2005). Transmission of the Grapevine leafroll-associated virus 3 by the mealybug Pseudococcus longispinus Targioni-Tozetti (Hemiptera: Pseudococcidae). *Summa Phytopathol., Botucatu* **31,** 65-68.

**La Notte, P., Minafra, A., and Saldarelli, G.P.** (1997a). A spot-PCR technique for the detection of phloem-limited grapevine viruses. *J. Virol. Methods* **66,** 103-108.

**La Notte, P., Buzkan, N., Choueiri, E., Minafra, A., and Martelli, G.P.** (1997b). Acquisition and transmission of grapevine virus A by the mealybug *Pseudococcus longispinus*. *J. Plant Pathol.* **79,** 79-85.

**Lapierre, H., and Signoret, P.A.** (2004). Viruses and virus diseases of *Poaceae* (*Gramineae*) (Paris).

**Le Maguet, J., Beuve, M., Herrbach, E., and Lemaire, O.** (2012a). Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris*. *Phytopathology* **102,** 717-723.

**Le Maguet, J., Fuchs, J.-J., Beuve, M., Herrbach, E., and Lemaire, O.** (2012b). The role of the mealybug *Phenacoccus aceris* in the epidemic of *Grapevine leafroll-associated virus -1* (GLRaV-1) in two French vineyards. *Eur. J. Plant Pathol.* **Submitted**

**Le Maguet, J., Herrbach, E., Hommay, G., Beuve, M., Boudon-Padieu, E., and Lemaire, O.** (2009). Monitoring of Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1) dispersion by the mealybug *Phenacoccus aceris*. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 283-284. 31 Aug- 4 Sept.

**Legg, J.T., and Bonney, J.K.** (1967). The host range and vector species of viruses from *Cola chlamydantha* K.Schum., *Adansonia digitata* L. and *Theobroma cacao* L. . *Ann. Appl. Biol.* **60,** 399-403.

**Lockhart, B.E.L.** (1995). Banana streak badnavirus infection in Musa: Epidemiology, diagnostic and control. *Technical Bulletin* **143,** 11.

**Lockhart, B.E.L., and Olszewski, N.E.** (1996). Schefflera ringspot virus, a widely distributed mealybug-transmitted badnavirus occurring in *Schefflera* and *Aralia*. *Acta Horticulturae* **432,** 196-202.

**Lockhart, B.E.L., and Lachner, J.** (1999). An aphid-transmitted badnavirus associated with yellow leafspot of spiraea. *Phytopathology* **89,** S46.

**Lockhart, B.E.L., and Sackey, S.T.** (2001). Cacao swollen shoot virus. In *Encyclopedia of plant pathology*, O.C. Maloy and T.D. Murray, eds (New York: John Wiley and Sons.

**Lockhart, B.E.L., Autrey, L.J.C., and Comstock, J.C.** (1992). Partial purification and serology of sugarcane mild mosaic virus, a mealybug transmittied cloterolike virus. *Phytopathology* **82,** 691-695.

**Lockhart, B.E.L., Kiratiya-Angul, K., Jones, P., Eng, L., Silva, P.d., Olszewski, N.E., Lockhart, N., Deema, N., and Sangalang, J.** (1997). Identification of Piper yellow mottle virus, a mealybug-transmitted badnavirus infecting Piper spp. in southeast Asia. *Eur. J. Plant Pathol.* **103,** 303-311.

**Macanawai, A.R., Ebenebe, A.A., Hunter, D., Devitt, L.C., Hafner, G.J., and Harding, R.M.** (2005). Investigations into the seed and mealybug transmission of Taro bacilliform virus. *Australasian Plant Pathology* **34,** 73-76

**Mahfoudhi, N., Digiaro, M., and Dhouibi, M.H.** (2009). Transmission of grapevine leafroll viruses by *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) and *Ceroplastes rusci* (Hemiptera: Coccidae). *Plant Dis.* **93,** 999-1002.

**Malausa, T., Fenis, A., Warot, S., Germain, J.-F., Ris, N., Prado, E., Botton, M., Vanlerberghe-Masutti, F., Sforza, R., Cruaud, C., Coulou, A., and Kreiter, P.** (2011). DNA markers to disentangle complexes of cryptis taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). *J. Appl. Entomol.* **135,** 132-145.

**Maliogka, V.I., Dovas, C.I., and Katis, N.I.** (2008). Evolutionary relationships of virus species belonging to a distinct lineage within the *Ampelovirus* genus. *Virus Res.* **135,** 125–135.

**Martelli, G.P.** (2009). Grapevine virology highlights 2006-09. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 15-23. 31 Aug- 4 Sept.

**Martelli, G.P., and Boudon-Padieu, E.** (2006). Directory of infectious diseases of grapevine and viroses and virus-like diseases of the grapevine. In *Bibliographic report 1998-2004* (Options méditerranéennes, Série B: Studies and Research, CIEHAM-IAMB), pp. 59-75.

**Martelli, G.P., and Candresse, T.** (2010). Closteroviridae. In *Encyclopedia of Life Sciences* (Chichester: John Wiley & Sons).

**Materazzi, A., Triolo, E., and Lucchi, A.** (1998). No evidence for the transmission of three grapevine viruses by Metcalfa pruinosa (Say). *J. Plant Pathol.* **30,** 175.

**Melzer, M., Karasev, A., Sether, D., and Hu, J.S.** (2001). Nucleotide sequence, genome organization, and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt-associated virus-2. *J. Gen. Virol.* **82,** 1-7.

**Melzer, M., Sether, D., Karasev, A., Borth, W., and Hu, J.** (2008). Complete nucleotide sequence and genome organization of pineapple mealybug wilt-associated virus-1. *Arch. Virol.* **153,** 707-714.

**Meyer, J.B., Kasdorf, G.G.F., Nel, L.H., and Pietersen, G.** (2008). Transmission of activated episomal Banana streak OL badnavirus (BSOLV) to cv. Williams banana (Musa sp.) by three mealybug species. *Plant Dis.* **92,** 1158-1163.

**Milkus, B.N., Goodman, R.N., and Avery, W.J.J.** (2000). Detection of viruses in grapevines imported in Missouri from Eastern European countries. *Phytopathologia Mediterranea* **39,** 310-312.

**Miller, D.R., and Kosztarab, M.** (1979). Recent advances in the study of scale insects. *Annual Review of Entomology* **24,** 1-27.

**Minafra, A., and Hadidi, A.** (1994). Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *J. Virol. Methods* **47,** 175-187.

**Muller, E., and Sackey, S.** (2005). Molecular variability analysis of five new complete cacao swollen shoot virus genomic sequences. *Archives of Virology* **150,** 53-66.

**Muller, E., Kouakou, K., Kebe, I., Mississo, A., Oro, F.Z., and Cilas, C.** (2009). Variabilité moléculaire du virus du swollen shoot du cacaoyer (CSSV) en lien avec de nouveaux foyers au Togo et en Côte d'Ivoire ; validation d'un diagnostic polyvalent du virus. In 16ème Conférence Internationale sur la Recherche Cacaoyère, Alliance des Pays Producteurs de Cacao (Bali, Indonesia). 16-21 Nov.

**Nakano, M., Nakaune, R., and Komazaki, S.** (2003). Mealybug transmission of grapevine viruses in Japan. In 14th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Locorotondo (Bari), Italy), pp. 218.

**Nakaune, R., Toda, S., Mochizuki, M., and Nakano, M.** (2008). Identification and characterization of a new vitivirus from grapevine. *Arch. Virol.* **153,** 1827-1832.

**Ng, J.C.K., and Falk, B.W.** (2006). Virus-vector interations mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44,** 183-212.

**Normark, B.B.** (2003). The evolution of alternative genetic systems in insects. *Ann. Rev. Entomol.* **48,** 397-423.

**Ollennu, L.I.I.** (2003). Synthesis: case study of cocoa viruses. In *Plant Virology in Sub-Saharan Africa*, J.A. Hughes and B. Odu, eds (Ibadan), pp. 33-49.

**Oro, F., Mississo, E., Okassa, M., Guilhaumon, C., Fenouillet, C., Cilas, C., and Muller, E.** (2012a). Geographical differentiation of the molecular diversity of cacao swollen shoot virus in Togo. *Archives of Virology* **157,** 509-514.

**Oro, F.Z., Bonnot, F., Ngo-Bieng, M.A., Delaitre, E., Dufour, B.P., Ametefe, K.E., Mississo, E., Wegbe, K., Muller, E., and Cilas, C.** (2012b). Spatiotemporal pattern analysis of Cacao swollen shoot virus in experimental plots in Togo. *Plant Pathology*, Doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02589.x.

**Owusu, G.K.** (1983). The cocoa swollen shoot disease problem in Ghana. In *Plant virus Epidemiology*, R.T. Plumb and J.M. Tresh, eds (Oxford, UK: Blackwell scientific Publications.

**Park, D.-S., Suh, S.-J., Hebert, P.D.N., Oh, H.-W., and Hong, K.-J.** (2011). DNA barcodes for two scale insect families, mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) and armored scales (Hemiptera: Diaspididae). *Bull. entomol. Res.*, 1-6.

**Pedroso, E.I., Sequeira, O.A., Pinto, M.E.G., and Simões, V.** (1991). Ensaios de transmissão de virus de videira por cochonillas (Attempts to transmit grapevine viruses with mealybugs). *Ciência Téc. Vitiv.* **10,** 39-46.

**Pellizzari, G., and Germain, J.F.** (2010). Scales (Hemiptera, Superfamily Coccoidea). In *Alien terrestrial arthropods of Europe. BioRisk 4:475-510. doi:10.3897/biorisk.4.45*, A. Roques, ed, pp. 475-510.

**Petersen, C.L., and Charles, J.G.** (1997). Transmission of grapevine leafroll-associated closteroviruses by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceolariae*. *Plant Pathology* **46,** 509-515.

**Petruschke, M., Rissler, D., and Schneller, H.** (2011). Ahornschmierlaus *Phenaccocus aceris* als Uberträgger des *Little Cherry Virus-2* an Süsskirsche in Baden-Württemberg nachgewiesen. *Erwerbs-Obstbau* **53,** 11-13.

**Phillips, S., Briddon, R.W., Brunt, A.A., and Hull, R.** (1999). The partial characterization of a badnavirus infecting the Greater Asiatic or water yam (*Dioscorea alata*). *Journal of Phytopathology* **147,** 265-269.

**Pirone, T.P., and Blanc, S.** (1996). Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Ann. Rev. Phytopathol.* **34,** 227-247.

**Ploetz, R.C.** (2007). Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. *Phytopathology* **97,** 1634-1639.

**Plumb, R.T.** (2002). Other vectors. In *Advances in Botanical research. Plant virus vector interaction*, R.T.a.C. Plumb, J.A., ed (Academic Press), pp. 199-200.

**Posnette, A.F.** (1947). Use of seeds in the insect transmission of some plant viruses. *Nature* **159,** 500-501.

**Posnette, A.F.** (1960). Some aspects of virus spread among plants by vectors. Report of the Seventh Commonwealth Entomological Conference, 6-15 July (London), pp. 162-165.

**Qin, Z., Wu, J., Qiu, B.L., Ren, S., and Ali, S.** (2011). Effects of host plant on the development, survivorship and reproduction of Dysmicoccus neobrevipes Beardsley (Hemiptera: Pseudoccocidae). *Crop Protection* **30,** 1124-1128.

**Raccah, B., Roistacher, C.N., and Barbagallo, S.** (1989). Semipersistent transmission of viruses by vectors with special emphasis on citrus tristeza virus. *Advances in Disease Vector Research* **6,** 302-340.

**Raine, J., McMullen, R.D., and Farbes, A.R.** (1986). Transmission of the agent causing little cherry disease by the apple mealybug *Phenacoccus aceris* and the dodder *Cuscuta lupuliformis*. *Can. J. Plant. Pathol.* **8,** 6-11.

**Renard, S., Calatayud, P.A., Pierre, J.S., and Le Ru, B.** (1998). Recognition behavior of the cassava mealybug Phenacoccus manihoti Matile-Ferrero (Homoptera : Pseudococcidae) at the leaf surface of different host plants. *J. Insect Behav.* **11,** 429-450.

**Rohrbach, K.G., Beardsley, J.W., German, T.L., Reimer, N.J., and Sanford, T.L.** (1988). Mealybug wilt, Mealybugs and ants on pineapple. *Plant Dis.* **72,** 558-585.

**Roivainen, O.** (1976). Transmission of cocoa viruses by mealybugs (Homoptera: Pseudococcidae). *Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland* **48,** 203-304.

**Roivainen, O.** (1980). Mealybugs. In *Vectors of plant pathogens*, K.H.K. Maramorosch, ed (New-York, London, Toronto, Sydney, San-Francisco: Academic Press Inc.), pp. 15-38.

**Rosciglione, B., and Castellano, M.A.** (1985). Further evidence that mealybugs can transmit grapevine virus A (GVA) to herbaceous host. *Phytopathologia Mediterranea* **24,** 186-188.

**Rosciglione, B., and Gugerli, P.** (1989). Transmission of grapevine leafroll disease and an associated closterovirus to healthy grapevine by the mealybug *Planococcus ficus*. *Phytoparasitica* **17,** 63.

**Rosciglione, B., Castellano, M.A., Martelli, G.P., Savino, V., and Cannizzaro, G.** (1983). Mealybug transmission of grapevine virus A. *Vitis* **22,** 331-347.

**Saccaggi, D.L., Krüger, K., and Pietersen, G.** (2008). A multiplex PCR assay for the simultaneous identification of three mealybugs species (Hemiptera: Pseudococcidae). *Bull. entomol. Res.* **98,** 27–33.

**Scotto, C.** (2007). Trasmissione di Grapevine Leafroll associated Ampelovirus 1 (GLRaV-1) mediante Planococcus citri (Risso) (Hemiptera Pseudococcidae).Thesis, University of Pisa, Italy, pp 82.

**Sether, D., Ullman, D., and Hu, J.** (1998). Transmission of pineapple mealybug wilt-associated virus by two species of mealybug (*Dysmicoccus* spp.). *Phytopathology* **88,** 1224-1230.

**Sether, D., Melzer, M., Borth, W., and Hu, J.** (2009). Genome organization and phylogenetic relationship of *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* with family *Closteroviridae* members. *Virus Genes* **38,** 414-420.

**Sether, D.M., and Hu, J.S.** (2002a). Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. *Phytopathology* **92,** 928-935.

**Sether, D.M., and Hu, J.S.** (2002b). Yield impact and spread of Pineapple mealybug wilt associated virus-2 and mealybug wilt of pineapple in Hawaii. *Plant Disease* **86,** 867-874. .

**Sether, D.M., Melzer, M.J., and Busto, J.** (2005). Diversity and Mealybug transmissibility of ampeloviruses in Pineapple. *Plant Dis.* **89,** 450-456.

**Sether, D.M., Borth, W.B., Melzer, M.J., and Hu, J.S.** (2010). Spatial and temporal incidences of pineapple mealybug wilt-associated viruses in pineapple planting blocks. *Plant Disease* **94,** 196-200.

**Sforza, R.** (2008). Les cochenilles sur la vigne: bio-éthologie, impact agronomique, lutte et prophylaxie. In *Ravageurs de la vigne*, Féret, ed (Bordeaux), pp. 188-210.

**Sforza, R., Boudon-Padieu, E., and Greif, C.** (2003). New mealybug species vectoring Grapevine leafroll associated viruses -1 and -3 (GLRaV-1 and -3). *Eur. J. Plant Pathol.* **109,** 975-981.

**Silva, E.M.B., and Mexia, A.** (1999). Histological studies on the stylet pathway, feeding sites and nature of feeding damage by Planococcus citri (Risso) (Homoptera: Pseudococcidae) in sweet orange. *Entomologica [Special Issue: Proceedings of the ISSIS VIII International Symposium on Scale Insect Studies held at Wye College (U.K.), Aug. 31st - Sept. 6th, 1998.]* **33,** 347-350.

**Sim, S.T., Rowhani, A., Alkowni, R., and Golino, D.A.** (2003). Experimental transmission of *Grapevine leafroll-associated* viruses types 5 and 9 by longtailed mealybugs. In 14th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Locorotondo (Bari), Italy), pp. 211-212.

**Skotnicki, M.L., Selkirk, P.M., Kitajima, E., McBride, T.P., Shaw, J., and Mackenzie, A.** (2003). The first subantarctic plant virus report: Stilbocarpa mosaic bacilliform badnavirus (SMBV) from Macquarie Island. *Polar Biology* **26,** 1-7.

**Sosnowski, M.R., Fletcher, J.D., Daly, A.M., Rodoni, B.C., and Viljanen-Rollinson, S.L.H.** (2009). Techniques for the treatment, removal and disposal of host material during programmes for plant pathogen eradication. *Plant Pathology* **58,** 621-635.

**Stafford, C., Walker, G.P., and Ullman, D.E.** (2012). Hitching a ride: vector feeding and virus transmission. *Communicative and Intergrative Biology* **5,** 43-49.

**Stewart, L.R., Medina, V., Tian, T., Turina, M., Falk, B.W., and Ng, J.C.K.** (2010). A mutation in the Lettuce infectious yellows virus minor coat protein disrupts whitefly transmission but not in planta systemic movement. *J. Virol.*, 12165-12713.

**Stuart, R.J., and Polavarapu, S.** (2002). On the relationship between the ant, Acanthomyops claviger, and the blueberry mealybug, Dysmicoccus vaccinii. *J. Insect Beh.* **15,** 299-304.

**Subere, C.V., Sether, D.M., Borth, W.B., Melzer, M.J., and Hu, J.S.** (2009). Vector transmission of Pineapple mealybug wilt associated virus-2 by Dysmicoccus neobrevipes and Pseudococcus longispinus in Hawaii. *Phytopathology* **99,** 125-S125.

**Syller, J.** (2000). Heterologous encapsidation in transmission of plant viral particles by aphid vectors. *Acta Microbiol. Pol.* **49,** 5-18.

**Syller, J.** (2006). The roles and mechanisms of helper component proteins encoded by potyviruses and caulimoviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **67,** 119-130.

**Sylvester, E.S.** (1956). Beet yellows virus transmission by the green peach aphid. *J. econ. Entomol.* **49,** 789-800.

**Tanne, E.** (1988). Evidence for the transmission by mealybugs to healthy grapevines of a closter-like particle associated with grapevine leafroll disease *Phytoparasitica* **16,** 288.

**Tanne, E., Ben-Dov, Y., and Raccah, B.** (1989). Transmission of the corky-bark disease by the mealybug Planococcus ficus. *Phytoparasitica* **17,** 55.

**Teliz, D., Gonsalves, D., Hu, J., and Hummer, D.K.** (1989). Detection of grapevine leafroll-associated closterovirus in recently infected tissues in New York and spread of the disease in Mexico. In Proceedings of the 9th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine (ICVG), E. Tanne, ed (Kiryat Anavim, Israel), pp. 109-115.

**Theilmann, J., Orban, S., and Rochon, D.** (2004). High sequence variability among Little cherry virus isolates occurring in British Columbia. *Plant Dis.* **88,** 1092-1098.

**Theilmann, J., Mozafari, J., Reade, R., Wu, Z., Xie, W., Jesperon, G., Bernardy, M., Eastwell, K.C., and Rochon, D.** (2002). Partial nucleotide sequence and genome organization of a Canadian isolate of Little cherry virus and development of an enzyme-linked immunosorbent assay-based diagnostic test. *PHytopathology* **92,** 87-98.

**Tinsley, T.W.** (1971). The ecology of cacao viruses. The role of wild hosts in the incidence of swollen shoot virus in West Africa. *J. Appl. Entomol.* **8,** 491-495.

**Tsai, C.W., Rowhani, A., Golino, D.A., Daane, K., and Almeida, R.P.** (2010). Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: an analysis of virus-vector specificity. *Phytopathology* **100,** 830-834.

**Tsai, C.W., Chau, J., Fernandez, L., Bosco, D., Daane, K.M., and Almeida, R.P.P.** (2008). Transmission of *Grapevine leafroll-associated virus* 3 by the vine mealybug (*Planococcus ficus*). *Phytopathology* **98,** 1093-1098.

**Tzanetakis, I.E., Postman, J.D., Samad, A., and Martin, R.R.** (2010). Mint viruses: beauty, stealth, and disease. *Plant Dis.* **94,** 4-12.

**Vidano, C.** (1963). Alterazioni provocate da insetti in Vitis osservate, sperimentate e comparate. *Ann. Fac. Sci. Agr. Univ. Torino* **1,** 513-644.

**Wang, R.Y., and Pirone, T.P.** (1996). Relationship between poly-L-ornithine mediated transmission of tobacco mosaic virus by Myzus persicae and retention of virions in the stylets. *Phytopathology* **86,** 373.

**Washington, J.R., and Walker, G.F.** (1990). Histological studies of California red scale (Homoptera Diaspididae) feeding on citrus. *Ann. entomol. Soc. Am.* **83,** 939-948.

**Watson, G.W., and Kubiriba, J.** (2005). Identification of mealybugs (Hemiptera : Pseudococcidae) on banana and plantain in Africa. *African Entomology* **13,** 35-47.

**Williams, D.J., and Matile-Ferrero, D.** (1999). A new species of the mealybug genus *Cataenococcus* Ferris from Ethiopia on E*nsete ventricosum*, a plant infected by a virus (Hemiptera, Pseudococcidae; Musaceae). *Revue Francaise d'Entomologie (Nouvelle Serie)* **21,** 145-149.

**Yang, Z., Nicolaisen, M., Olszewski, N.E., and Lockhart, B.E.L.** (2005). Sequencing, improved detection, and a novel form of Kalanchoë top-spotting virus. *Plant Dis.* **89,** 298-302.

**Zhang, Y., Singh, K., Kaur, R., and Qiu, W.** (2011). Association of a novel DNA virus with the grapevine vein-clearing and vine decline syndrome. *Phytopathology* **101,** 1081-1090.

**Zorloni, A., Prati, S., Bianco, P., and Belli, G.** (2004). Further data on the experimental transmission of Grapevine leafroll-associated virus 1 and 3 and of Grapevine virus A by mealybugs. *J. Plant Pathol.* **86,** 339-340.

**Zorloni, A., Prati, S., Bianco, P., and Belli, G.** (2006a). Transmission of *Grapevine virus A* and *Grapevine leafroll-associated virus 3* by *Heliococcus bohemicus*. *J. Plant Pathol.* **88,** 325-328.

**Zorloni, A., Prati, S., Chiesa, S., and Bianco, P.** (2006b). Transmission of Grapevine leafroll-associated virus 3 by the soft scale insect *Neopulvinaria innumerabilis*. *J. Plant Pathol.* **88,** S61.

# II. Epidémiologie

## II.1. Généralités

### *II.1.a. Définitions*

L'épidémiologie correspond à l'étude du développement d'une maladie au sein d'une population d'hôtes sains. Cette discipline consiste ainsi à étudier les éléments influant sur la maladie, dans l'objectif de prévenir et de circonscrire le développement de la maladie au sein de la population touchée. L'épidémiologie s'intéresse donc au pathosystème hôte-agent pathogène ainsi qu'aux facteurs agissant sur ce pathosystème, et fait donc intervenir de nombreuses disciplines scientifiques (Van der Plank, 1963). Dans les domaines de la phytopathologie, l'épidémiologie se définit comme « l'étude des maladies causées par des populations d'organismes pathogènes au sein d'un peuplement de végétaux » (Sache, 2003). L'épidémiologie se base en premier lieu sur l'observation de la progression d'une maladie au sein d'une population végétale, c'est à dire sur les symptômes apparents provoqués par l'agent pathogène. Les notions de temps et d'espace sont donc indissociables dans la description, la compréhension et la prédiction d'une épidémie (Madden, 2006).
La description d'une épidémie consiste principalement à mesurer les variables liées à la maladie. Ainsi, on distingue :

- la prévalence : nombre ou taux d'individus malades par rapport à une population saine donnée à un instant t,
- l'incidence : nombre ou taux de nouveaux individus malades à un instant t+n par rapport à l'instant t dans une même population,
- la sévérité : degré de gravité de la maladie à un instant t.

### *II.1.b. Epidémiologie des viroses de plantes*

Dans le cas des maladies virales, l'épidémiologie est complexifiée par la présence d'un troisième acteur dans le pathosystème : le vecteur. Comme nous l'avons vu précédemment dans la partie sur la vection, la plupart des virus ont besoin d'un vecteur pour être transmis de plante à plante, contrairement aux maladies cryptogamiques par exemple, où les spores constituent le stade de dissémination du champignon pathogène. L'analyse du processus épidémique d'un phytovirus doit ainsi prendre en compte les caractéristiques biologiques du vecteur associé. Trois facteurs principaux conditionnent la dissémination d'un phytovirus dans une culture (Spence, 2001) :

- l'abondance de l'inoculum viral : les sources de virus sont soit internes à la culture, suite à l'apport de matériel végétal infecté ou à la contamination des plantes par le sol, ou bien externes, à partir de cultures avoisinantes virosées ou des plantes adventices réservoirs de virus,
- la biologie du vecteur : l'abondance, le cycle de reproduction, la gamme d'hôtes, et la mobilité de l'organisme vecteur sont des facteurs importants pour expliquer la dynamique d'une épidémie,
- l'association virus-vecteur : les interactions biotiques entre les deux acteurs représentent un facteur essentiel. La modélisation montre ainsi l'importance du mode de transmission de virus sur le développement de l'épidémie (Jeger et al., 1998).

Même si les modèles de prévision peuvent nous informer sur la dynamique d'un type d'épidémie donné, la complexité des interactions entre les trois composantes du pathosystème et la multiplicité des facteurs influençant ces interactions donnent à chaque situation épidémique un caractère unique (Figure 11).

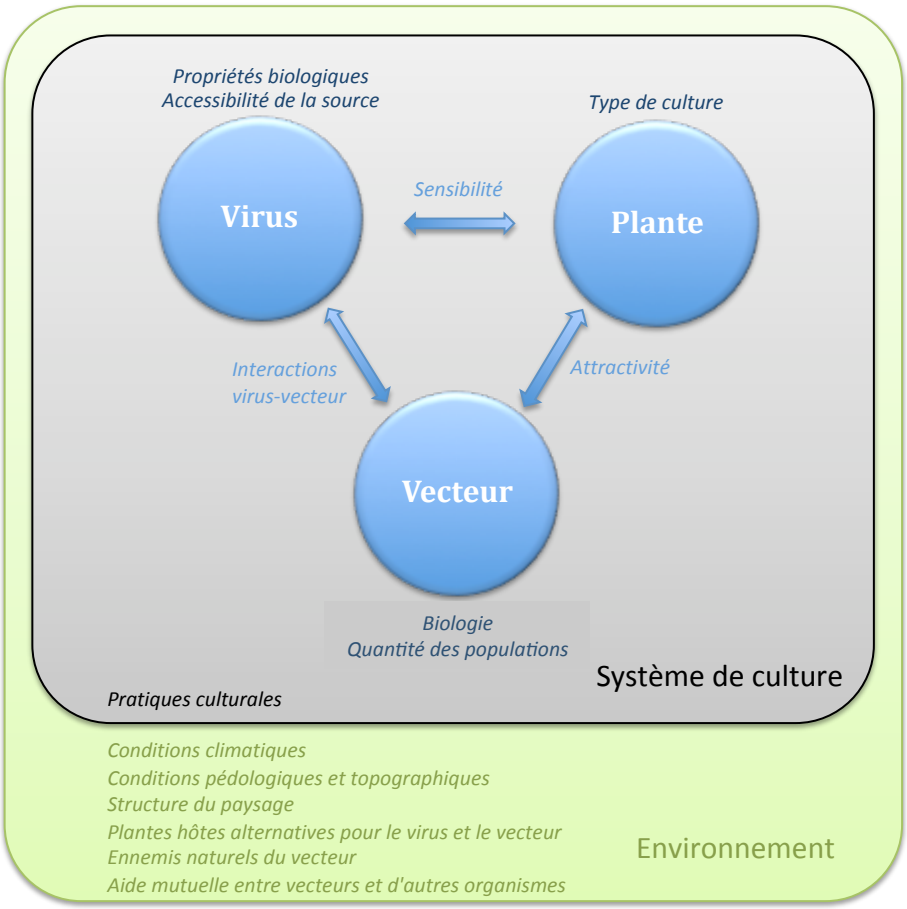



**Figure 11. Intégration systémique du pathosystème plante-virus-vecteur dans l'environnement naturel et cultural. Les facteurs associés à chaque composante et influençant la dynamique de l'épidémie sont indiqués en italique.**

### *II.1.c. Les étapes d'une épidémie*

Une épidémie débute par la contamination primaire d'une plante ou d'un groupe de plantes sur la zone cultivée. Celle-ci est due soit à l'apport de matériel végétal virosé, soit à la présences de vecteurs virulifères provenant du sol, des cultures avoisinantes ou bien des plantes adventices. Le cycle élémentaire d'une épidémie est généralement qualifié de monocycle, durant lequel l'agent pathogène a la possibilité d'effectuer la totalité de son cycle. Ce terme est ainsi adapté aux maladies cryptogamiques, mais ne correspond pas réellement au cycle élémentaire d'une maladie virale, puisque le virus utilise en continu la machinerie cellulaire de sa plante hôte afin de s'y développer. Le virus doit ainsi atteindre un nombre de cellules végétales suffisant pour que la maladie se déclare dans la plante. Le cycle épidémique de base d'une maladie virale correspondra donc plutôt à la généralisation de la maladie sur la plante, suite aux nouvelles contaminations systémiques permettant au virus de coloniser les organes végétaux.

On parle dans ce cas d'épidémie polycyclique, correspondant à la succession des monocycles (Figure 12). La seconde étape d'une épidémie correspond à la contamination secondaire de la culture : les plantes issues de la contamination primaire deviennent des sources de virus pour les plantes voisines.

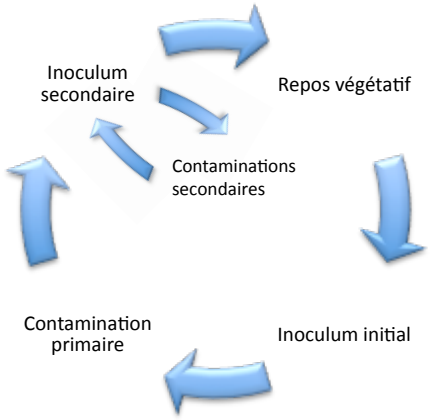



**Figure 12. Schéma du processus d'une épidémie polycyclique**

## II.2. L'étude des épidémies d'enroulement viral

Comme nous l'avons vu dans la section précédente, l'enroulement viral est une maladie présente dans l'ensemble des régions viticoles du monde. Les virus de l'enroulement sont présents sur *Vitis vinifera* dans le bassin méditerranéen, mais également sur les espèces de *Vitis* américaines, ces dernières ayant la particularité de ne pas exprimer de symptômes de la maladie (Cabaleiro, 2009). L'importation massive de ces variétés en tant que porte-greffes lors de la crise phylloxérique a vraisemblablement contribué à une dissémination conséquente de l'enroulement dans l'ensemble des vignobles européens et mondiaux.

### *II.2.a. Dispersion naturelle de l'enroulement et du bois strié*

Pendant longtemps, la diffusion de l'enroulement a été attribuée uniquement à la plantation de matériel végétal infecté. Le premier cas de transmission naturelle au vignoble est signalé en Yougoslavie sur la base d'observations de symptômes (Dimitrijevic, 1973). Cette étude fait ainsi mention d'une progression rapide de la maladie, vraisemblablement due à la présence d'un vecteur aérien. A l'époque, cette étude épidémiologique passe plutôt inaperçue et ce n'est qu'à la découverte de cochenilles vectrices que l'existence d'une diffusion naturelle de l'enroulement est envisagée (Rosciglione et al., 1983).

Même si les événements de diffusion naturelle de l'enroulement ont souvent été décrits, les suivis précis des épidémies au vignoble sur un nombre d'années conséquent sont plus rares (Tableau 9).

### *II.2.b. Analyse temporelle et spatiale de la dispersion*

L'analyse temporelle de l'évolution d'une épidémie d'enroulement nécessite un suivi pluriannuel sur le vignoble. Sur la base d'observations de symptômes ou de tests de détection de virus, la prévalence et l'incidence de la maladie permettent de tracer les courbes de progression de la maladie sur la période de suivi. Bien que l'incidence de la maladie soit variable selon les cas, la plupart des études citées dans le Tableau 9 montrent que la progression de l'épidémie est considérable compte tenu de la faible mobilité du vecteur. Les cochenilles sont en effet dépourvues d'ailes, et peu mobiles sur leur support végétal par rapport à d'autres vecteurs comme les pucerons. Selon les études effectuées sur le GLRaV-3, une période de 10-15 ans semble être suffisante pour atteindre la contamination totale d'une parcelle viticole par l'action de cochenilles vectrices (Walker et al., 2004; Cabaleiro et al., 2008).

**Tableau 9. Exemples de cas de diffusion naturelle de l'enroulement viral au vignoble.**

| Pays | Virus | Cochenille responsable | Progression de l'enroulement | Référence |
|---|---|---|---|---|
| Afrique du Sud | GLRaV | *Planococcus ficus* | Non précisé | (Engelbrecht et Kasdorf, 1985) |
| Mexique | GLRaV-GVB | *Pseudococcus longispinus* | Non précisé | (Teliz et al., 1989) |
| Afrique du Sud | GLRaV-3 GVA | *Planococcus ficus* | De 0 % à 71 % de ceps contaminés en 7 ans | (Engelbrecht et Kasdorf, 1991) |
| Italie | GLRaV-3 | Cochenilles à coque | Non précisé | (Belli et al., 1993) |
| Chypre | GLRaV-3 | Non précisé | De 41 % à 68 % de ceps contaminés en 2 ans | (Ioannou, 1993) |
| Nouvelle-Zélande | GLRaV-3 | Non précisé | De 10 % à 90 % de ceps contaminés en 5 ans | (Jordan, 1993) |
| Israël | GVB | Non précisé | Progression de 0,6 logit par an en 7 ans. | (Tanne et al., 1996) |
| Italie | GLRaV-1 GLRaV-3 | Cochenilles à coque | Non précisé | (Fortusini et al., 1996) |
| Australie | GLRaV-3 | Non précisé | De 20 % à 55 % de ceps contaminés en 4 ans Progression de 0,35 logit par an en 11 ans | (Habili et Nutter, 1997) |
| Espagne | GLRaV-3 | *Planococcus citri* | De 33 % à 83 % de ceps contaminés en 5 ans | (Cabaleiro et Segura, 1997b) |
| Australie | GLRaV-9 GVA | Non précisé | De 5 % à 11 % de ceps contaminés en 2 ans | (Habili et al., 2003) |
| Espagne | GLRaV-3 | *Planococcus citri* | De 35 % à 97 % de ceps contaminés en 9 ans | (Cabaleiro et Segura, 2003) |
| Etats-Unis | GLRaV-3 | *Pseudococcus maritimus* | De 23 % à 66 % de ceps contaminés en 5 ans | (Golino et al., 2008) |
| Italie | GLRaV-1 GLRaV-3 GVA | *Heliococcus bohemicus* | De 0 % à 20 % de ceps contaminés en 10 ans | (Gribaudo et al., 2009) |
| Nouvelle-Zélande | GLRaV-3 | *Pseudococcus longispinus* | De 0 % à 92 % de ceps contaminés en 7 ans | (Charles et al., 2009) |

L'analyse spatiale de la progression d'une épidémie permet de compléter les informations fournies par l'analyse temporelle. La distribution spatiale des ceps infectés nous renseigne ainsi sur la contamination primaire de la parcelle (matériel végétal infecté à la plantation, contamination par parcelles adjacentes ou cumul des deux facteurs) puis sur les éléments agissants sur la contamination secondaire et donc la diffusion de la maladie sur la parcelle (Madden et al., 2007).

L'ensemble des données épidémiologiques récoltées peut ainsi permettre d'établir des modèles de prédiction afin de comprendre les mécanismes de la progression d'une maladie et d'intégrer de la façon la plus exhaustive possible les facteurs régissant cette progression (Jeger et al., 2004). Les approches de ce type pour les phytovirus ont surtout été menées pour des modèles pucerons-cultures annuelles. La modélisation de la dynamique épidémiologique peut ainsi être poussée jusqu'à étudier les interactions entre la plante hôte, le virus, le ou les vecteurs et enfin les parasitoïdes et prédateurs des organismes vecteurs (Jeger et al., 2012). Pour la vigne, des modèles basés sur des suivis épidémiologiques ont été établis pour prévenir les épidémies de mildiou (Calonnec et al., 2009). Les recherches à ce niveau sont moins avancées concernant les virus, vraisemblablement du fait du caractère cryptique des organismes vecteurs et de l'étiologie complexe des maladies virales. Pour l'enroulement de la vigne, les modèles mis au point concernent principalement l'effet des épidémies sur les rendements et la qualité de la récolte, en lien avec la dynamique spatio-temporelle de la maladie (Walker et al., 2004).

# Objectifs de la thèse

## I. Contexte global de l'étude

Nous avons présenté, au cours du **Chapitre 1**, la diversité, la complexité, et l'importance des dommages causés par les acteurs impliqués dans le pathosystème enroulement/cochenille. L'enroulement viral constitue une maladie difficile à appréhender tant par le nombre d'espèces virales impliquées, que par la variation de ses effets sur *Vitis vinifera*. Les cochenilles représentent un vaste groupe d'insectes préjudiciables sur bon nombre de plantes cultivées, notamment par la vection de certaines maladies virales.

Le **Chapitre 2** a ensuite fait état des relations entre les composantes du pathosystème. Nous avons d'abord exposé les caractéristiques spécifiques de la vection par cochenille en montrant notamment qu'un nombre croissant d'espèces étaient impliquées dans la transmission de virus à la vigne. Puis, nous avons exposé comment l'ensemble des caractéristiques inhérentes aux virus et aux cochenilles régissait l'évolution d'une épidémie d'enroulement viral.

## II. Problématique

La maladie de l'enroulement viral de la vigne est en expansion dans les pays viticoles du monde entier. Cette diffusion mondiale a des causes multiples (certification sanitaire non satisfaisante ou mal adaptée, modification des pratiques viticoles, changement climatique) et suscite l'inquiétude des filières professionnelles dans les pays leaders de l'industrie viticole. Les études épidémiologiques menées depuis une vingtaine d'années montrent un consensus général sur la rapidité des dispersions naturelles de la maladie au vignoble et l'importance de la propagation de l'épidémie par les échanges de matériel végétal.

La viticulture française est touchée par l'épidémie d'enroulement viral, et de nombreux cas de dispersion naturelle de la maladie ont été signalés au vignoble. Les régions les plus touchées sont majoritairement situées en zone septentrionale : Alsace, Bourgogne, Beaujolais, Champagne, Jura et Savoie.

L'impact important de l'enroulement viral dans les vignobles du nord-est nécessite ainsi la conduite d'une étude pluriannuelle afin d'appréhender au mieux les caractéristiques épidémiologiques propres au complexe vigne-virus-cochenilles dans ces vignobles. Cette maladie virale étant inféodée strictement au genre *Vitis*, sans autre plante hôte connue, son épidémiologie ne peut être appréhendée que sur la base d'une approche de terrain de longue durée. Les caractéristiques biologiques de la vection par cochenille de l'enroulement et du complexe du bois strié sont encore mal connues. Ainsi, la spécificité vectrice des espèces de cochenilles, l'efficacité vectrice respective des différents stades larvaires, les temps d'acquisition et d'inoculation requis pour la vection, le temps de rétention et le site d'interaction des virions dans les insectes, constituent des données qui restent à acquérir pour la plupart des espèces de vecteur et de virus.

L'objectif de cette thèse est d'appréhender la situation épidémiologique actuelle des vignobles septentrionaux vis à vis de l'enroulement viral en étudiant d'une part les caractéristiques de sa transmission par cochenilles et, d'autre part les particularités des contaminations au vignoble.

## III. Cadre institutionnel

Le programme épidémiologique mené sur l'enroulement de la vigne a débuté en 1994 à l'initiative de l'INRA en relation avec la profession. Par la suite, les travaux de recherche ont été pérénisés sous l'impulsion des interprofessions viticoles du nord-est de la France*, qui ont confirmé leur engagement en finançant la présente thèse grâce un dispositif CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche) subventionné par l'Agence Nationale pour la Recherche Technique (ANRT).

Financements :

- Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne (CIVC)*, Epernay,
- Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB)*, Beaune,
- Comité Interprofessionnel des Vins d'Alsace (CIVA)*, Colmar,
- Etablissement national des produits de l'agriculture et de la mer FranceAgriMer (ex Viniflhor et Onivins), Montreuil sous Bois
- Conseil Régional de Bourgogne, Dijon

Collaborations techniques :

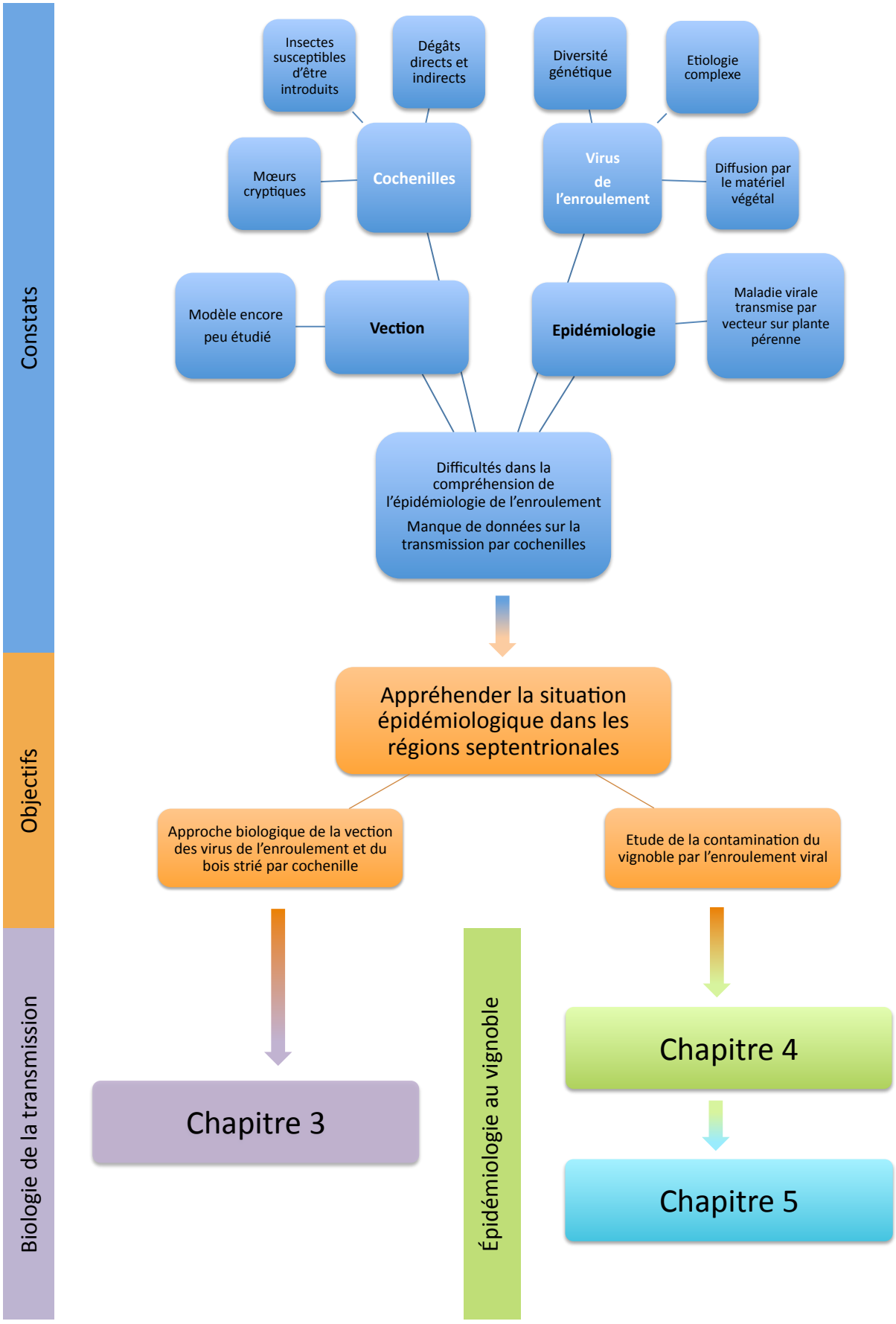
- Société d'Intérêt Collectif Agricole de Recherches Expérimentales (SICAREX) du Beaujolais, Villefranche-sur-Saône,
- Comité de Développement du Beaujolais (CDB), Villefranche-sur-Saône,
- Chambre d'Agriculture de Saône-et-Loire,
- Chambre d'Agrilculture de l'Aude,
- Institut Français de la Vigne (IFV), Beaune,
- IFV, Le Grau du Roi.

Collaborations scientifiques :

- INRA, Sophia-Antipolis,
- INRA, Avignon,
- European Biological Control Laboratory (EBCL), Montpellier.

## IV. Approche expérimentale

Ce travail de thèse est structuré selon deux axes complémentaires.
Le **chapitre 3** expose une approche biologique de la transmission de virus visant à caractériser au laboratoire la transmission par cochenille des virus de l'enroulement (GLRaVs) et du complexe du bois strié (GVs).
Le **chapitre 4** expose une étude épidémiologique de l'enroulement viral dans les régions du nord-est de la France, comprenant un examen de la présence de cochenilles vectrices au vignoble et une analyse pluriannuelle de l'épidémie d'enroulement sur des parcelles modèles.
L'étude épidémiologique se poursuit dans le **chapitre 5**, qui décrit des recherches préliminaires visant à élargir nos connaissances sur la transmission de l'enroulement viral.


Constats
Objectifs
Biologie de la transmission
Insectes susceptibles d'être introduits
Dégâts directs et indirects
Diversité génétique
Etiologie complexe
Mœurs cryptiques
Cochenilles
Virus de l'enroulement
Diffusion par le matériel végétal
Modèle encore peu étudié
Vection
Epidémiologie
Maladie virale transmise par vecteur sur plante pérenne
Difficultés dans la compréhension de l'épidémiologie de l'enroulement
Manque de données sur la transmission par cochenilles
Appréhender la situation épidémiologique dans les régions septentrionales
Approche biologique de la vection des virus de l'enroulement et du bois strié par cochenille
Etude de la contamination du vignoble par l'enroulement viral
Chapitre 3
Épidémiologie au vignoble
Chapitre 4
Chapitre 5

# Chapitre 3. Approche biologique de la transmission des virus de l'enroulement et du bois strié

## I. Introduction

Ce volet du travail de thèse vise à acquérir des connaissances fondamentales sur la biologie de la vection des virus de l'enroulement et du bois strié par cochenille. Cette première partie trouve une application directe au terrain dans le fait que les cochenilles étudiées sont précisément les espèces présentes sur la vigne dans le nord-est de la France. La détermination de la gamme de virus transmise par chaque espèce de cochenille, l'efficacité vectrice de leurs différents stades de développement, et les paramètres biologiques de la vection (temps d'acquisition, temps de latence, temps d'inoculation, sites de rétention) sont autant de caractéristiques qui, pour le taxon vecteur que constituent les cochenilles, sont encore loin d'être élucidées. Les implications des résultats apportés revêtent ainsi un caractère déterminant pour la compréhension de l'épidémiologie des viroses transmises à la vigne par les cochenilles.

Par rapport aux espèces des régions à climat méditerranéen, les recherches menées sur la transmission de virus restent marginales pour les cochenilles présentes sur vigne en zones septentrionales, ou par homologie dans les régions à climat sous influence continentale (Tableau 10). Les cinq espèces de cochenille décrites dans le Chapitre 1 sont ainsi uniquement étudiées en France et en Italie pour l'enroulement de la vigne, ainsi qu'en Allemagne et au Canada pour la maladie de la petite cerise (causé par le LChV-2, *Ampelovirus*) transmise par *P. aceris*. Les connaissances acquises sont donc loin d'être aussi développées par rapport aux espèces les plus étudiées sur vigne, *Planococcus spp.* et *Pseudococcus spp.*, plus rares en France, mais qui sont les plus préjudiciables dans les vignobles à l'échelle mondiale.

**Tableau 10 : Spécificités vectrices connues jusqu'en 2008 pour les cinq espèces de cochenilles rencontrées sur vigne dans le nord-est de la France.**

| | Sur *Vitis vinifera* | | | Sur *Prunus sp.* | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Genre, espèce** | **GLRaV-1** | **GLRaV-3** | **GVA** | **LChV-2** | **Référence** |
| *Neopulvinaria innumerabilis* | X | X | X | | (Fortusini et al., 1997; Zorloni et al., 2006a) |
| *Parthenolecanium corni* | X | | X | | (Sforza et al., 2003a; Hommay et al., 2008) |
| *Pulvinaria vitis* | | X | X | | (Belli et al., 1994) |
| *Heliococcus bohemicus* | X | X | X | | (Sforza et al., 2003a; Zorloni et al., 2006b) |
| *Phenacoccus aceris* | X | X | | X | (Raine et al., 1986; Eastwell et Bernardy, 2001; Sforza et al., 2003a; Petruschke et al., 2011) |

## II. Démarche expérimentale

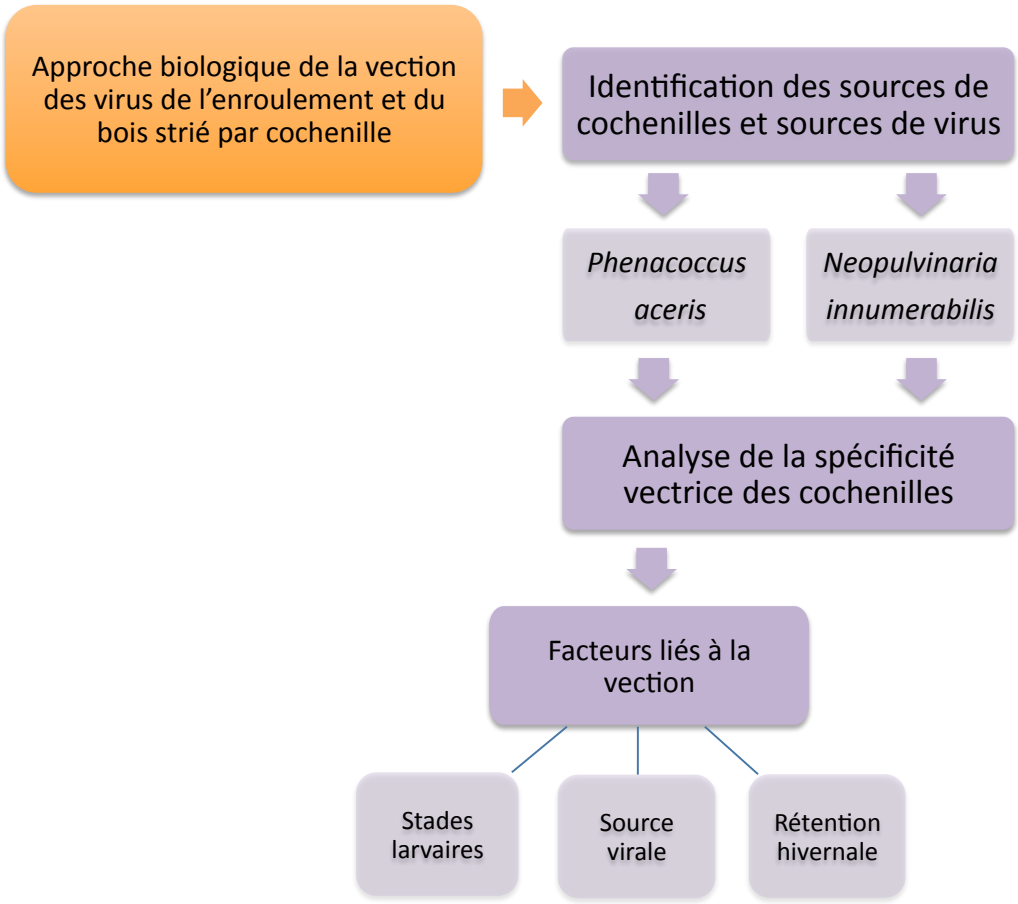



**Figure 13. L'approche biologique de la vection par cochenille s'est articulée en 3 étapes. Après une phase de choix des sources d'inoculum viral à utiliser et d'identification de parcelles sources de cochenilles pour la mise en place d'élevage de colonies avirulifères, la spécificité vectrice de *P. aceris* et *N. innumerabilis* vis à vis de plusieurs espèces virales de l'enroulement et du bois strié a été étudiée. Une analyse plus précise des facteurs biologiques liés à la vection a ensuite été entreprise notamment pour étudier l'efficacité vectrice selon le stade de développement et selon la source virale ainsi que la rétention hivernale du ou des virus. L'ensemble de ce volet repose sur des expériences de transmission de virus, décrites dans la section matériel et méthodes.**

## III. Biologie de la vection de virus par *Phenacoccus aceris*

L'approche biologique de la transmission de virus sur vigne se base majoritairement sur des expériences de transmission menées avec la cochenille farineuse *P. aceris*. Les nombreux signalements d'infestation dont elle fait l'objet dans les vignobles de Bourgogne (Côte de Nuits, Côte de Beaune et Mâconnais) ainsi qu'en Beaujolais indiquent la nécessité d'étudier plus en détail cette espèce. Plus globalement, cette espèce semble être actuellement en recrudescence dans les régions du nord de la France (Figure 14). Des infestations importantes sont signalées sur pommier (*Malus domestica*) en Normandie, Picardie, Champagne (N. Broussaud, Aval Conseil, communication personnelle) et dans le nord de l'Alsace (Collectif, 2009). A l'heure actuelle, cette cochenille n'est pas connue comme vectrice de virus sur pommier. Ceci illustre cependant que les zones de polyculture représentent un potentiel de dissémination de cochenilles entre espaces alternant vergers et vignobles ainsi que pour les parcelles de vignes-mères souvent implantées dans ces zones hors AOC.

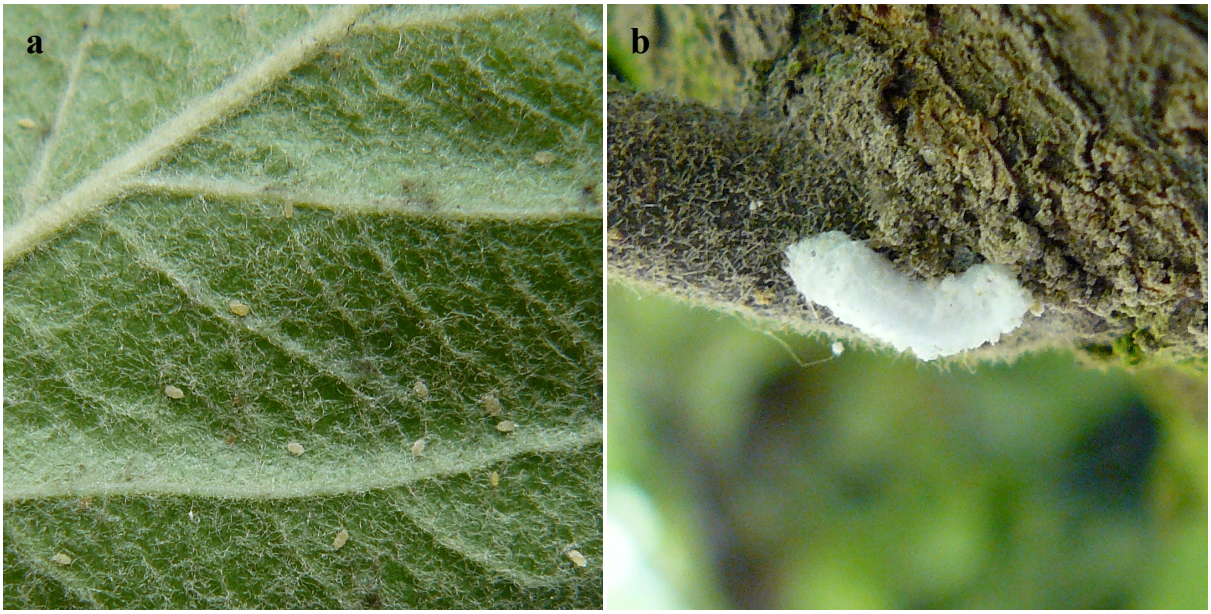



**Figure 14. (a) photographie de la face inférieure d'une feuille de *Malus domestica* infestées par des larves de premier stade de *P. aceris*. (b) ovisac de *P. aceris* sur l'écorce d'un pommier (22 juillet 2011, verger Epaux-Bezu, Aisne). Crédits photos : JLM.**

## III.1. ARTICLE 1 : Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris* (Signoret)

Publication acceptée dans *Phytopathology*, 102 : 717-723.

### *Etat de la question*

Onze virus distincts sont associés à l'enroulement viral de la vigne. Les Grapevine leafroll-associated viruses (GLRaVs) provoquent des pertes considérables pour la viticulture mondiale par une réduction des rendements et de la qualité des baies. Ces virus sont diffusés par la multiplication végétative d'organes végétaux infectés, mais sont également transmissibles par des cochenilles vectrices. Ainsi, de nombreuses espèces de cochenilles au sein des familles des *Coccidae* et *Pseudococcidae* ont été montrées vectrices d'un, ou plusieurs virus de l'enroulement dans le genre *Ampelovirus*. De même, elles sont capables de transmettre des virus associés au complexe du bois strié (*Grapevine virus A, Grapevine virus B* et *Grapevine virus E*), maladie couramment détectée dans la vigne en co-infection avec les virus de l'enroulement.

Neuf espèces de cochenilles ont été répertoriées à ce jour en France sur la vigne. Parmi celles-ci, la cochenille du platane *Phenacoccus aceris* semble être en recrudescence dans les vignobles septentrionnaux, notamment en Bourgogne et en Beaujolais où certaines parcelles font actuellement face à des infestations notables.

## *Objectifs*

Les premières recherches sur *P. aceris* ont montré qu'elle est capable de transmettre à la vigne les GLRaV-1 et -3, mais également un autre *Ampelovirus*, le *Little cherry virus -2* (LChV-2) au cerisier. Cette cochenille représente ainsi un problème sanitaire en terme de transmission naturelle de l'enroulement au vignoble, et nécessite donc des études plus poussées sur son aptitude à transmettre d'autres virus à la vigne.

Nous montrons donc dans cet article une étude exhaustive de la spécificité vectrice de cette cochenille vis à vis des GLRaV-1, -3, -4, -5, -6, -7, -9, GVA et GVB, accompagnée d'une évaluation des capacités vectrices des différents stades de développement de l'insecte.

## *Résultats principaux*

Les expériences de transmission contrôlée montrent que *P. aceris* est capable de transmettre à la vigne les *Ampelovirus* GLRaV-1, -3, -4, -5, -6, -9 et les *Vitivirus* GVA et GVB. Nous obtenons des taux de transmission similaires quelle que soit l'accession de vigne utilisée pour l'acquisition des GLRaV-1, -3 et GVA.

Nous prouvons que les larves de premier stade L1 constituent le stade le plus efficace dans la transmission des GLRaV-1, -3 et GVA. En effet, les transmissions contrôlées montrent d'une part une probabilité deux fois plus importante d'obtenir un évènement de transmission par L1 de *P. aceris* que par L2. D'autre part, les expériences d'infectivité, effectuées à partir de populations de cochenilles prélevées dans un vignoble enroulé, montrent que les taux de transmission par les L1 sont supérieurs à ceux obtenus par les L2. En outre, aucun évènement de transmission n'a pu être obtenu avec des L3 ou des femelles de *P. aceris.*

## *Conclusion*

Cette étude constitue la première preuve de la transmission du GLRaV-6, pour lequel aucun vecteur n'avait été identifié à ce jour. Nous montrons de ce fait que *P. aceris* est capable de transmettre à la vigne huit virus distincts. Ces résultats sont ainsi cohérents avec les recherches menées sur d'autres espèces de cochenilles vectrices et ayant montré une faible spécificité de ces vecteurs dans la transmission d'une espèce particulière *d'Ampelovirus* ou de *Vitivirus*.

*P. aceris* est une cochenille cosmopolite et polyphage, rencontrée dans de nombreux pays de l'hémisphère nord. A une époque où les échanges commerciaux s'intensifient, nous montrons ainsi qu'elle représente un problème potentiel dans les zones viticoles où elle est susceptible d'être introduite.

## *Perspectives*

Nous avons montré de nombreux cas de co-transmission entre GLRaVs et GVA ou GVB. Cependant, ces événements ne sont pas systématiques, ce qui nécessite des recherches plus poussées sur les interactions entre virus de l'enroulement et ceux du bois strié lors de la transmission par vecteur. De même, si nous indiquons que les L3 hivernantes ne sont pas vectrices, d'autres essais doivent cependant être entrepris pour tester cette capacité après la première prise de nourriture des insectes à la fin de l'hiver. De nouvelles expériences de transmission pourraient être ainsi entreprises avec des L3 de *P. aceris* émergentes pour évaluer leur capacité à transmettre les virus dès le début du printemps.

ARTICLE 1

# Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris* (Signoret)

**J. Le Maguet[1,2,3]*, M. Beuve[1,2], E. Herrbach[1,2] and O. Lemaire[1,2]**

[1]INRA, UMR1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin, F-68000 Colmar, France, [2]Université de Strasbourg, UMR1131, F-67000 Strasbourg, France, [3]Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne, 5 rue Henri Martin, BP 135, F-51200 Epernay, France.

***Phytopathology*, 102 : 717-723**

Virology

# Transmission of Six Ampeloviruses and Two Vitiviruses to Grapevine by *Phenacoccus aceris*

J. Le Maguet, M. Beuve, E. Herrbach, and O. Lemaire

First author: Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne, 5 rue Henri Martin, BP 135, F-51200 Epernay, France; and first, second, third, and fourth authors: INRA, UMR1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin, F-68000 Colmar, France, and Université de Strasbourg, UMR1131, F-67000 Strasbourg, France.
Accepted for publication 19 March 2012.

## ABSTRACT

Le Maguet, J., Beuve, M., Herrbach, E., and Lemaire, O. 2012. Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris*. Phytopathology 102:717-723.

Grapevine leafroll disease is caused by grapevine leafroll-associated viruses (GLRaVs). These viruses are common in vineyards worldwide and often associated with vitiviruses that are involved in the rugose wood complex of grapevine. Ten mealybug species are known as vectors of one or several of these grapevine viruses, including the apple mealybug *Phenacoccus aceris* which is widespread in Holarctic regions and able to transmit *Grapevine leafroll-associated virus-1* and *-3* (GLRaV-1 and -3). Our aim was to characterize the transmission features of leafroll viruses by *Phenacoccus aceris* in order to better understand the contribution of this mealybug to leafroll epidemics. Results showed that *Phenacoccus aceris* is able to transmit GLRaV-1, -3, -4, -5, -6, and -9 to grapevine but not GLRaV-7. This is the first report of GLRaV-6 transmission by a mealybug. Also, for the first time it was shown that *Phenacoccus aceris* could vector vitiviruses *Grapevine virus A* (GVA) and *Grapevine virus B* (GVB). First instar nymphs were the most efficient stage in transmitting GLRaV-1, -3, and GVA. This research sheds light on the transmission biology of grapevine viruses by *Phenacoccus aceris* and represents a step forward to leafroll disease management.

*Additional keywords*: *Betaflexiviridae*, *Closteroviridae*, *Vitis*.

Grapevine leafroll disease is becoming one of the most widespread and damaging viral diseases in grapevine growing areas worldwide (25). It affects all grapevine rootstocks and *Vitis vinifera* varieties, reducing yield and grape quality (9). Leafroll symptoms are characterized by downward rolling of the leaf margins, interveinal reddening of leaves in red-berried varieties and increased leaf thickness. The disease is caused by at least 11 serologically distinct grapevine leafroll-associated viruses (GLRaVs), all members of the family *Closteroviridae*. Most leafroll viruses (GLRaV-1, -3, -4, -5, -6, -9, -Pr, -De, and *Grapevine leafroll-associated Carnelian virus* [GLRaCV]) belong to the genus *Ampelovirus*, whereas GLRaV-2 is a member of the genus *Closterovirus* and GLRaV-7 is awaiting for a new genus assignment (16). All these viruses have long filamentous particles containing a positive-sense, single-stranded RNA molecule. Among leafroll-associated viruses, GLRaV-3 is the most widespread in vineyards worldwide, especially in Mediterranean climates (9). Grapevine leafroll viruses are graft-transmissible and persist in propagative material (budwood, rootstocks, and grafted vines). Thus, the worldwide expansion of leafroll is mainly attributed to the exchange of infected plant material, especially asymptomatic rootstocks (8). However, natural spread of leafroll in vineyards has also been described in many regions (7,13,31), where studies revealed a constant increase in the prevalence of leafroll and an association with mealybug (family *Pseudococcidae*) infestation. Transmission of GLRaV by mealybugs in laboratory conditions was first reported in 1990 (11). Since then, many field surveys and laboratory experiments showed that several mealybugs, as well as soft scale (family *Coccidae*) species are involved in transmission of GLRaVs. Currently, at least nine mealybug species (*Heliococcus bohemicus*, *Phenacoccus aceris*, *Planococcus citri*, *Planococcus ficus*, *Pseudococcus calceolariae*, *Pseudococcus comstocki*, *Pseudococcus longispinus*, *Pseudococcus maritimus*, and *Pseudococcus viburni*) and seven soft scale species (*Ceroplastes rusci*, *Coccus longulus*, *Neopulvinaria innumerabilis*, *Parthenolecanium corni*, *Pulvinaria vitis*, *Parasaissetia nigra*, and *Saissetia* sp.) have been reported to vector one or more GLRaV species (21). So far no vector has been identified for GLRaV-2, -6, -7, -Pr, -De, and GLRaCV (44). Leafroll viruses are phloem-limited pathogens and their mode of transmission by vectors is semipersistent (43). Vines are frequently coinfected by one or more GLRaV species. These viruses are often associated with *Grapevine virus A* (GVA) and *Grapevine virus B* (GVB) that are involved in the rugose wood disease complex, in particular in the Kober stem grooving and corky bark syndromes, respectively (24). GVA, GVB, and *Grapevine virus E* (GVE) from the genus *Vitivirus* in the family *Betaflexiviridae* are vectored by several mealybug and soft scale species (15,28, 34,46).

To date in France, only GLRaV-1, -2, -3, and GVA have been identified in naturally infected vineyards (5) and nine scale insect species are commonly observed on grapevine: *N. innumerabilis*, *Parthenolecanium corni*, *Parthenolecanium persicae*, *Pulvinaria vitis* (family *Coccidae*), *Targionia vitis* (family *Diaspididae*), *H. bohemicus*, *Phenacoccus aceris*, *Planococcus citri*, and *Planococcus ficus* (family *Pseudococcidae*) (37). Among these, the mealybug *Phenacoccus aceris* is able to transmit three different ampeloviruses; GLRaV-1 and -3 to grapevine (38) and LChV-2 (*Little cherry virus-2*) to cherry (32). *Phenacoccus aceris* is a common Holarctic mealybug that feeds on a wide range of perennial hosts (17). In Europe, this species is univoltine with females and males having three and four instar nymphs, respectively. Adult females appear in late spring and lay numerous eggs in a cottony egg sac within bark cracks of the host plant, especially grapevine. *Phenacoccus aceris* has been reported in

Corresponding author: J. Le Maguet; E-mail address: jean.le-maguet@orange.fr

http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-10-11-0289
© 2012 The American Phytopathological Society

French vineyards, especially in Burgundy where it infests vines heavily affected by GLRaV-1 and GVA. This mealybug is suspected to play a major role in the natural spread of GLRaV-1 and -3 (18,38) in vineyards. The purpose of this study was to extensively characterize the capability of *Phenacoccus aceris* to transmit grapevine viruses. To address this question, transmission experiments of GLRaV-1, -3, -4, -5, -6, -7, -9, GVA, and GVB were performed. Furthermore, the vector capacity of different life stages of *Phenacoccus aceris* was explored.

## MATERIALS AND METHODS

**Virus sources.** Virus source vines were rooted in a greenhouse from 12 accessions of field-collected dormant canes (Reference collection of grapevine viruses and virus-like diseases, INRA, France) and were used as mother-plants for infected leaf sampling. Virus content of the 12 accessions (PN01, PN02, PN03, P70, Y199, Y217, Y252, Y258, Y276, Y318, Cab119-66, and TE132; Table 1) was checked by double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) and by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). To avoid infestation by insects, the plants were regularly sprayed with insecticide until 1 month prior to acquisition experiments.

**Recipient grapevines.** A red-berried variety, *Vitis vinifera* 'Pinot noir', clone 115 (P115), frequently planted in vineyards of Alsace, Champagne, and Burgundy, was used as the recipient vine for transmission tests. The virus-free status of P115 was ascertained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) prior to running the experiments. Virus-free plants were rooted from greenhouse cuttings made in spring and grown individually in pots. Recipient vines were regularly sprayed bimonthly with an insecticide (alternatively Confidor 0.35 ml/liter, Kiros 1 m/liter, or Fuoro 3 ml/liter) until 1 month prior to inoculation to avoid infestation of test plants by insects. After inoculation, recipient vines were grown in a greenhouse and then placed at 4°C for 1 month in order to reproduce winter dormancy period.

***Phenacoccus aceris* colony.** Colonies of *Phenacoccus aceris* (Signoret) were laboratory reared in spring on virus-free sprouting potatoes, starting from field-collected gravid females (vineyard of Bonzon, Burgundy, France). Morphological identification of the species was made by J.-F. Germain (ANSES, Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Montpellier, France). The species identification was ascertained by molecular characterization using a set of markers able to efficiently distinguish taxa within *Pseudococcidae* (22). Insects were maintained in darkness at 23°C (±2°C) in plastic jars whose lids had been perforated and covered with a 28 µm mesh tissue to enable air circulation.

**Virus transmission by *Phenacoccus aceris*.** To determine the ability of *Phenacoccus aceris* to acquire and inoculate GLRaV-1, -3, -4, -5, -6, -7, -9, GVA, and GVB to grapevine, transmission assays were conducted from June to August (experiments A to H). Leaves of eight accessions of virus source vines were collected from greenhouse-grown mother-plants and distributed individually in transparent jars. The petiole of each leaf was placed into small wet cotton pieces to ensure continuous water supply during the acquisition access period (AAP). Straight after hatching, first instar nymphs (L1) were gently collected and transferred into the jars containing leaves of source vines to provide access to the virus. Following a 48 h AAP, batches of approximately 50 mealybugs were transferred onto each recipient vine, which were individually enclosed in a microperforated plastic bag. Each transmission test was made with 20 recipient vines. Recipient vines were placed at 25°C (±3°C), 16/8 h (light/dark) under artificial light. One recipient vine per assay was maintained under the same conditions with 50 mealybugs collected from the healthy *Phenacoccus aceris* colony. In addition, batches of 10 mealybugs were collected after AAP of each transmission assay and stored in 1.5-ml Eppendorf tubes with 150 µl of RLT buffer (RNeasy Plant Mini Kit; Qiagen, France) containing 1% β-mercaptoethanol. Tubes were kept at –20°C before total RNA extraction and detection of viruses by RT-PCR. After an inoculation access period (IAP) of 48 h, plastic bags were removed and plants were sprayed with mevinphos (Phosdrin W10 at 4 ml/liter) to kill the mealybugs. Recipient vines were kept in laboratory conditions for 1 week to ascertain the absence of mealybugs and then transferred to the greenhouse.

**Determination of transmission efficiency of first and second instar nymphs of *Phenacoccus aceris* from laboratory-reared colony.** We performed experiments on first (L1) and second (L2) instar nymphs of *Phenacoccus aceris* for virus transmission efficiency (experiments I to L). Aviruliferous mealybugs were collected from a laboratory-reared colony and placed, as described above, in jars containing source vines for an AAP of 48 h. This experiment was performed with four accessions of virus-infected Pinot noir: PN01 and P70 (GLRaV-1 and GVA) and PN02 and PN03 (GLRaV-1, -3, and GVA). These source vines were tested by double-antibody sandwich enzyme-linked immuno-

TABLE 1. Mean absorbance values of enzyme-linked immunosorbent assay on tissue of source vines used for transmission experiments

| Experiments[a] | Source plants[b] | ELISA $OD_{405}$ values[c] | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | GLRaV-1[d] | GLRaV-3 | GLRaV-4 | GLRaV-5 | GLRaV-6 | GLRaV-7 | GLRaV-9 | GVA |
| A | Yhsouh ali Y318 | 2.015 | 1.045 | – | – | – | – | – | 1.000 |
| B | Vardabouïre Y258 | 1.960 | 1.245 | – | – | – | – | – | 0.955 |
| C | Chardonnay TE132 | 1.410 | – | – | – | – | – | – | – |
| D | Koudsi Y252 | – | – | 1.895 | – | – | – | – | 0.875 |
| E | Black Monukka Y199 | – | – | - | 0.940 | 0.870 | – | – | 0.695 |
| F | White Emperor Y217 | – | – | – | 1.575 | – | – | – | 0.740 |
| G | Otcha Bala Y276 | – | – | – | – | – | 1.260 | – | 1.150 |
| H | Cabernet Cab119-66 | – | – | – | – | – | – | 1.320 | 1.350 |
| I, J | Pinot noir P70 | 2.110 | – | – | – | – | – | – | 1.360 |
| I, J | Pinot noir PN01 | 1.220 | – | – | – | – | – | – | 0.950 |
| K, L | Pinot noir PN02 | 1.260 | 1.645 | – | – | – | – | – | 0.915 |
| K, L | Pinot noir PN03 | 1.280 | 1.730 | – | – | – | – | – | 1.090 |
| M | Pinot noir (spring) | 2.220 | 1.535 | – | – | – | – | – | 0.995 |
| N | Pinot noir (early summer) | 2.090 | 1.800 | – | – | – | – | – | 1.285 |
| O | Pinot noir (late summer) | 1.785 | 1.730 | – | – | – | – | – | 1.040 |
| P | Pinot noir (winter) | 2.260 | 2.255 | – | – | – | – | – | 1.490 |

[a] Tissues tested were mature leaves for experiments A to L and O, young leaves for experiments M and N, and phloem scrapings of wood for experiment P.
[b] Source vines were from the reference collection of grapevine viruses at INRA, Colmar, France, for experiments A to L and from a commercial vineyards from experiments M to P.
[c] Absorbance values were adjusted after deducting absorbance values of blank controls.
[d] Abbreviations: GLRaV, *Grapevine leafroll-associated virus*; GVA, *Grapevine virus A*.

sorbent assay (DAS-ELISA) in order to compare the virus titer in each accession regarding standard titration. Mealybugs were gently transferred from source leaves to recipient vines using a fine brush, and in batches of 20 individuals for a 48 h IAP. We used 20 recipient grapevines for each virus source and mealybug life stage. Recipient vines were then treated as described above.

**Transmission efficiency analysis and estimation of individual infection rates.** Transmission efficiencies were compared using $\chi^2$ tests between the two life stages of *Phenacoccus aceris* and between the four leafroll accessions. The probability that a single mealybug was a vector was estimated using Burrows' formula (6): $p_B = 1 - [(2kR + k - 1)/(2kN + k - 1)]^{1/k}$, where $N$ is the total of test plants, $R$ is the number of negative plants, and $k$ is the number of individuals per plant.

**Assessment of transmission efficiency of field-collected *Phenacoccus aceris* from naturally infected grapevines.** We tested the ability of field populations of *Phenacoccus aceris* to transmit leafroll viruses and GVA in vineyards (experiments M to P). Vine sources of GLRaV-1, -3, and GVA were identified by DAS-ELISA in a commercial vineyard (Bonzon, Burgundy, France). Populations of *Phenacoccus aceris* were sampled on these vines between May 2010 and February 2011. Four developmental stages were used in transmission assays; adult females, L1, and L2 instar nymphs were taken from infected vine leaves or stems, whereas L3 instar nymphs were collected during winter in their cocoons beneath the bark. Immediately after collection, batches of 20 mealybugs were gently transferred with a fine brush onto each recipient vine for a 48 h IAP. We used 30 recipient grapevines for each transmission assay. Batches of 20 mealybugs of each life stage were collected from infected vines and conserved at –20°C in 150 µl of RLT buffer containing 1% β-mercaptoethanol for subsequent RNA extraction and RT-PCR analyses. Recipient vines were then treated as described previously.

**Virus detection.** Leaves of recipient vines were all tested by DAS-ELISA, except for plants inoculated with GVB which were tested by RT-PCR (2). Detection tests were first made 3 months after transmission experiments on blades of both mature and young leaves. After an artificial dormancy period of 5 weeks at 4°C, plants were retested 7 months after transmission by DAS-ELISA made on young leaves and petioles. Polyclonal antibodies produced in our laboratory were used for the detection of GLRaV-1, -5, -7, and GVA in a biotin-streptavidin procedure (45). Detection of GLRaV-3, -4, and -6 was performed using commercial antisera (Bioreba AG, Basel, Switzerland) following the manufacturer's instructions. Detection of GLRaV-9 was performed with monoclonal antibodies provided by S. Besse (ACW, Nyon, Switzerland). Total RNA extraction was performed using RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, France), as described by Beuve et al. (3), for all control tubes containing postacquisition sampled mealybugs. A multiplex RT-PCR assay (2) was used for the simultaneous detection of GRLaV-1, -3, and GVA and one step conventional RT-PCR (3) was performed for testing GLRaV-4, -5, -6, -7, -9, and GVB in control mealybug samples.

## RESULTS

**Virus transmission by *Phenacoccus aceris*.** *Phenacoccus aceris* voucher Bz12 partial sequences of cytochrome oxidase subunit I gene (COI), 28S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2 (ITS2) gene are available in a genomic sequence database (GenBank accessions nos. JN546624, JN546625, and JN546626). Transmission experiments were performed to assess the ability of *Phenacoccus aceris* to transmit nine grapevine viruses. Mean absorbance values obtained by DAS-ELISA in the source vines are presented in Table 1. Ampeloviruses GLRaV-1, -3, -4, -5, -6, and -9, and vitiviruses GVA and GVB were all transmitted by *Phenacoccus aceris*, whereas GLRaV-7 was not (Table 2). Healthy control vines used in each transmission assay tested negative for all viruses. RT-PCR performed on RNA extracted from batches of control mealybugs sampled after acquisition proved that all viruses were acquired except for GLRaV-7 (data not shown).

In experiment A, *Phenacoccus aceris* efficiently transmitted GLRaV-1, -3, and GVA. Seven recipient vines out of 20 were mixed-infected with GLRaV-1, -3, and GVA and nine were double-infected with GLRaV-3 and GVA. Two vines were infected with only GVA, as shown by DAS-ELISA. GLRaV-1, -3, and GVA were transmitted in experiment B, but with a lower efficiency when compared with experiment A. In experiment C, 18 plants out of 26 were infected with GLRaV-1, among which seven were infected with GVB. Experiment D showed that *Phenacoccus aceris* transmitted GLRaV-4 to four plants, but GVA was not cotransmitted. In experiments E and F, GLRaV-5 was transmitted to nine recipient vines and cotransmitted with GLRaV-6 to three recipient vines; no transmission of GVA was observed in these two assays. In experiment G, none of the 20 recipient vines were

TABLE 2. Transmission experiments performed with 50 first instar nymphs (L1) of *Phenacoccus aceris* per recipient vine with acquisition and inoculation access periods of 48 h

| Exp. | Source plants[a] | Origin | Viruses in source plants[b] | Transmission rate[c] | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | GLRaV-1 | GLRaV-3 | GLRaV-4 | GLRaV-5 | GLRaV-6 | GLRaV-7 | GLRaV-9 | GVA | GVB |
| A | Yhsouh ali Y318 | Iran | GLRaV-1, -3, GVA | 7/20[d] | 16/20 | – | – | – | – | – | 18/20 | – |
| B | Vardabouïre Y258 | Azerbaijan | GLRaV-1, -3, GVA | 1/20 | 6/20 | – | – | – | – | – | 9/20 | – |
| C | Chardonnay TE132 | France | GLRaV-1, GVB | 18/26 | – | – | – | – | – | – | – | 7/26 |
| D | Koudsi Y252 | Israel | GLRaV-4, GVA | – | – | 4/20 | – | – | – | – | 0/20 | – |
| E | Black Monukka Y199 | USA | GLRaV-5, -6, GVA | – | – | – | 3/20 | 3/20 | – | – | 0/20 | – |
| F | Emperor Y217 | USA | GLRaV-5, GVA | – | – | – | 9/13 | – | – | – | 0/13 | – |
| G | Otcha Bala Y276 | Uzbekistan | GLRaV-7, GVA | – | – | – | – | – | 0/20 | – | 0/20 | – |
| H | Cabernet sauvignon Cab119-66 | France | GLRaV-9, GVA | – | – | – | – | – | – | 14/26 | 9/26 | – |

[a] Source vines were from the reference collection of grapevine viruses at INRA, Colmar, France.
[b] Abbreviations: GLRaV, *Grapevine leafroll-associated virus*; GVA, *Grapevine virus A*; GVB, *Grapevine virus B*.
[c] Virus detected in recipient vines by double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay except for GVB (reverse transcription-polymerase chain reaction).
[d] Number of positive plants/number of inoculated plants.

positive to GLRaV-7 or GVA. Experiment H proved that *Phenacoccus aceris* efficiently transmitted GLRaV-9 with 14 positive plants out of 26, among which eight were coinfected with GVA.

**Determination of transmission efficiency of first and second instar nymphs of *Phenacoccus aceris* from laboratory-reared colony.** The mealybug life stage had an important effect on GLRaV-1, -3, and GVA transmission. The $\chi^2$ test revealed a significant difference between experiments I and J ($P$ = 0.023 [GLRaV-1], $P$ = 0.003 [GVA], Table 3, experiments I and J) and between experiments K and L ($P$ < 0.001 [GLRaV-1], $P$ = 0.025 [GLRaV-3], $P$ < 0.001 [GVA], Table 3, experiments K and L). In addition, individual infection rates given by Burrows' estimator $p_B$ showed a higher probability for a single L1 to transmit GLRaV-1, -3, and GVA than a single L2 (Table 3). Values of $p_B$ are at least two times higher for L1 (from 0.038 to 0.53) than for L2 (from 0.009 to 0.023). The transmission rates were similar between source grapevines. Furthermore, DAS-ELISA revealed a similar virus titer in the four accessions. The $\chi^2$ test was not significant between PN01 and P70 nor between PN02 and PN03 (values not shown).

**Assessment of transmission of GLRaV-1, -3, and GVA by mealybugs collected from naturally infected grapevines.** Experiments N and O, performed with L1 and L2 instars, respectively, showed efficient transmission of GLRaV-1, -3, and GVA by field-collected populations of *Phenacoccus aceris* (Table 4). No virus was detected in recipient vines inoculated using adult females and L3. The transmission rates obtained with first and second instar nymphs were significantly different for GLRaV-3 and GVA ($\chi^2$ test, $P$ = 0.008 [GLRaV-3], $P$ = 0.03 [GVA]) but not for GLRaV-1. Virus presence was tested by multiplex RT-PCR in mealybugs collected from infested vines in a vineyard. Viruses GLRaV-1, -3, and GVA were detected in L1 and L2 instars of *Phenacoccus aceris* but not in L3 (Table 4). GLRaV-3 was detected in adult females of *Phenacoccus aceris*, but with a very faint signal.

## DISCUSSION

This study is the first report on GLRaV-6 transmission by a mealybug. Although this ampelovirus was suspected to be mealybug-borne, its vector was unknown until now and no study had focused on its transmission, probably due to its restricted distribution in vineyards. To our knowledge, GLRaV-6 has been found only around the Mediterranean basin (20). In our experiments, GLRaV-6 was transmitted in association with GLRaV-5 from the mixed-infected accession Y199. GLRaV-5 was also transmitted from the mono-infected accession Y217. As GLRaV-5 and -6 are two related ampeloviruses both classified in the subgroup I (23), recipient vines were assayed for both viruses by specific RT-PCR in order to confirm the results obtained by DAS-ELISA. GLRaV-5 is known to be vectored by *Planococcus ficus*, *Pseudococcus longispinus*, and *Ceroplastes rusci* (21,39). Our results add *Phenacoccus aceris* as a new vector of this virus.

We also evaluated the capability of *Phenacoccus aceris* to transmit GLRaV-9, which is closely related to GLRaV-5 (23). Known vectors of GLRaV-9 are *Planococcus ficus*, *Pseudococcus longispinus*, and *C. rusci* (21,39,44). We showed that *Phenacoccus aceris* is an efficient vector of GLRaV-9. For this experiment, the use of batches of 50 mealybugs per recipient vine during IAP probably explains why the GLRaV-9 transmission rate was three times higher than those previously reported when using batches of 20 *Pseudococcus longispinus* or *Planococcus ficus* (44). Our study shows that *Phenacoccus aceris* was able to transmit GLRaV-4, which confirms the transmission of this virus

TABLE 3. Comparative transmission of *Grapevine leafroll-associated virus-1* and *-3* (GLRaV-1 and -3) and *Grapevine virus A* (GVA) of L1 and L2 nymphs of *Phenacoccus aceris* with acquisition and inoculation access periods of 48 h

| | | Source vines[a] | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PN01 | | P70 | | Cumulative[b] | | $p_B$[c] | | $P(\chi^2)$[d] | |
| Exp. | Instar | GLRaV-1 | GVA | GLRaV-1 | GVA | GLRaV-1 | GVA | GLRaV-1 | GVA | GLRaV-1 | GVA |
| I | L1 | 12/20[e] | 13/20 | 10/20 | 14/20 | 22/40 | 27/40 | 0.038 | 0.054 | 0.023 | 0.003 |
| J | L2 | 5/20 | 5/20 | 6/20 | 8/20 | 11/40 | 13/40 | 0.016 | 0.019 | | |

| | | Source vines[a] | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PN02 | | | PN03 | | | Cumulative[b] | | | $p_B$[c] | | | $P(\chi^2)$[d] | | |
| Exp. | Instar | GLRaV-1 | GLRaV-3 | GVA | GLRaV-1 | GLRaV-3 | GVA | GLRaV-1 | GLRaV-3 | GVA | GLRaV-1 | GLRaV-3 | GVA | GLRaV-1 | GLRaV-3 | GVA |
| K | L1 | 18/20[e] | 7/20 | 19/20 | 15/20 | 19/20 | 20/20 | 33/40 | 26/40 | 39/40 | 0.081 | 0.050 | 0.153 | <0.001 | 0.025 | <0.001 |
| L | L2 | 4/20 | 10/20 | 7/20 | 3/20 | 5/20 | 6/20 | 7/40 | 15/40 | 13/40 | 0.009 | 0.023 | 0.019 | | | |

[a] Source vines were from the reference collection of grapevine viruses at INRA, Colmar, France.
[b] Cumulative transmission rate independent from the source vine.
[c] The probability, $p_B$, that a single insect had transmitted the virus is calculated with Burrows' estimate. Estimates were calculated from total rates obtained for each virus species.
[d] Significance of differences in transmission efficiency between first and second instars ($\chi^2$ test).
[e] Transmission rate obtained after virus detection in recipient vines by double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay.

TABLE 4. Transmission efficiency of *Grapevine leafroll-associated virus-1* and *-3* (GLRaV-1 and -3) and *Grapevine virus A* (GVA) by *Phenacoccus aceris* collected from field naturally infected vines with inoculation access period of 48 h

| | | | Detection in mealybugs[b] | | | Transmission rate[c] | | | $P(\chi^2)$[d] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Exp. | Inoculation date[a] | Growth stage | GLRaV-1 | GLRaV-3 | GVA | GLRaV-1 | GLRaV-3 | GVA | GLRaV-1 | GLRaV-3 | GVA |
| M | 28 May 2010 | Adult female | – | +/– | – | 0/30 | 0/30 | 0/30 | | | |
| N | 20 July 2010 | First, L1 | + | + | + | 7/30 | 23/30 | 19/30 | 0.7 | 0.008 | 0.03 |
| O | 2 September 2010 | Second, L2 | + | + | + | 9/30 | 12/30 | 10/30 | | | |
| P | 3 February 2011 | Third, L3 | – | – | – | 0/30 | 0/30 | 0/30 | | | |

[a] Each recipient vine was inoculated with batches of 20 mealybugs taken from infected leaves.
[b] Virus detection by reverse transcription-polymerase chain reaction in a batch of 20 mealybugs after RNA extraction; – no detection, +/– faint signal, + strong signal on ethidium bromide-stained agarose gel.
[c] Virus detected in recipient vines by double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay.
[d] Significance of differences in transmission efficiency between L1 and L2 ($\chi^2$ test).

by mealybugs (44). GLRaV-4 transmission experiments relied on accession Y252 that is serologically and molecularly distinguishable from GLRaV-4 isolate LR106 (36) previously shown to be transmitted by *Planococcus ficus* (44). Although the same AAP and IAP durations were applied across all transmission tests, the transmission efficiency obtained for GLRaV-4 was lower compared with that of GLRaV-3, -5, or -9. In the current state of knowledge, GLRaV-4 is not an efficiently mealybug-transmissible leafroll virus species. However, since GLRaV-4 was reported in vineyards in Chile, People's Republic of China, and Spain (30), further experiments are needed to evaluate the vectoring capacity of other mealybug and soft scale species collected in these countries. Finally, we tested the ability of *Phenacoccus aceris* to vector GLRaV-7. As expected, no GLRaV-7 was detected by DAS-ELISA in any recipient vine, or by RT-PCR in mealybugs, suggesting that *Phenacoccus aceris* may not be able to acquire and/or retain this virus. Recent transmission experiments showed that parasitic dodder successfully transmits GLRaV-7 from grapevine to herbaceous hosts (26), but no insects have been shown to vector this leafroll-associated virus. The complete nucleotide sequencing of a GLRaV-7 isolate has recently confirmed its close relation with the genus *Crinivirus* but also showed that its molecular properties would justify classifying GLRaV-7 in a new genus (16). Criniviruses are transmitted only by whiteflies but no experiment has so far implicated these insects in GLRaV-7 transmission.

Recent studies dealing with the phylogenetic relationships of members of the genus *Ampelovirus* suggested that leafroll viruses of subgroup I, GLRaV-4, -5, -6, -9, -De, -Pr, and GLRaCV, might be considered as divergent isolates of the same species (1,41). This proposal could imply that mealybugs would transmit indiscriminately all GLRaVs within this group. This hypothesis is confirmed by the lack of evidence of virus-vector specificity in the mealybug transmission of ampeloviruses (44). Our work with *Phenacoccus aceris* is consistent with these findings by showing the shared transmissibility of leafroll species within the same genus. However, in spite of homogeneous experimental conditions, transmission efficiencies obtained were quite different, and noticeably lower for GLRaV-4 and -6 compared with GLRaV-5 and -9. The low differences between virus titer in source vines seem also unlikely to explain such variable transmission rates. The molecular mechanisms of leafroll virus transmission are not well understood, but it can be hypothesized that each ampelovirus species carries specific structural features involved in recognition with vector ligands, as shown for other invertebrate vectors (29).

Our transmission experiments were conducted with three different GLRaV-1 accessions that were mixed-infected with a vitivirus: either GVA (accessions Y258 and Y318) or GVB (accession TE132). The use of these source vines enabled us to show for the first time that *Phenacoccus aceris* is able to transmit GVA and GVB from vine to vine. GVA is known to be transmitted by *H. bohemicus*, *Planococcus citri*, *Planococcus ficus*, *Pseudococcus comstocki*, *Pseudococcus longispinus*, *Parthenolecanium corni*, and *N. innumerabilis* (11,12,14,15,27,46) and GVB by *Planococcus citri*, *Planococcus ficus*, and *Pseudococcus longispinus* (4,40). Thus, *Phenacoccus aceris* is now regarded a vector of these two rugose wood disease-associated viruses. Interestingly, transmission of GVA by *Phenacoccus aceris* occurred from source vines Y318, Y258, Cab119-66, PN01, PN02, PN03, and P70, but not from Y252, Y199, Y217, and Y276. Comparisons between partial nucleotide sequences of the coat protein gene of GVA isolates from accessions Y199, Y217, Y252, Y276, and Cab 119-66 did not suggest an association between genetic variability and transmission patterns. More work is needed to ascertain apparent differences in transmission efficiencies among GVA isolates. Furthermore, several authors reported previously a frequent association between GVA and GLRaV species, and a heteroassistance mechanism in transmission between ampelo- and viti-viruses had been suggested (11,12,15). Nevertheless, no clear picture arises from available data and further experiments are needed to characterize the biological interactions between GVA and GLRaVs for mealybug transmission and vine infection.

Two series of detection tests were performed to assess virus content in recipient vines. The first series that was conducted 3-months postinoculation revealed 24% of positive recipient grapevines. The second series, made 7-months postinoculation, a time span including a period of 5 weeks at temperature around 4°C, has shown an increase in the number of positive recipient vines by 51%. The additional months and/or the artificial dormancy applied to recipient vines thus had a positive effect on virus detectability in the plants. A low number of virus particles inoculated by the mealybugs and a putative slow viral cycle and/or movement within grapevine sieve elements and companion cells may explain why these viruses are not detected at first DAS-ELISA testing in all recipient vines.

Our results indicate that L1 of *Phenacoccus aceris* transmit more efficiently the GLRaV-1, -3, and GVA than L2. Experiments performed with field-collected mealybugs during the growing season confirmed that L1 were most efficient vectors than L2, L3, and adult females for GLRaV-3 and GVA. However, field-collected L1 and L2 transmitted GLRaV-1 with the same efficiency. ELISA optical density values showed similar GLRaV-1 titers regardless of the collection time point, suggesting constant virus availability in source vines. This exception may also be explained by the competition between GLRaV-1 and -3 during acquisition by mealybugs.

Adult females and L3 of *Phenacoccus aceris* did not transmit leafroll viruses, in spite of similar virus titers in source vines during all transmission tests. The lack of virus transmission by later instars is probably linked to the mealybug development stage. Transmission experiments with field-collected *Phenacoccus aceris* were performed with dormant L3 taken directly from their cocoons after a long period of diapause at low temperature usual under a semi-continental climate. However, observations of *Phenacoccus aceris* third instar showed from the very end of winter, a breaking of insect diapause and a feeding activity under vine bark. The detection of GLRaV-1, -3, and GVA by RT-PCR in the majority of these L3 supported this early feeding of mealybugs before spring (data not shown). It suggests that L3 become infectious after their first food intake on infected vines. Further experiments are thus needed to study the influence of first feeding on vector capacity of L3. Adult females of *Phenacoccus aceris* were not able to transmit leafroll viruses and GVA. Previous studies reported similarly that adult females of *Planococcus ficus* were unable to efficiently transmit GLRaV-3 (43). The delicate transfer of mealybugs may have disrupted the insect' stylets and could explain the failure of virus transmission. However, considering the low mobility of adult females, the spread of leafroll in vineyard is more likely to occur with first instars. Among the three immature stages of *Phenacoccus aceris*, L1 (or crawlers) are the most mobile and can readily be dispersed by wind. Since L1 efficiently transmit leafroll and rugose wood-associated viruses, field spread relies mostly on summer dispersal, as mentioned by Tsai et al. (42). Knowing that crawlers are the most susceptible to insecticides (10), control of *Phenacoccus aceris* should target L1 emergence in spring and summer.

*Phenacoccus aceris* is present in France and infests vineyards, orchards, and many noncultivated perennials (17,32). Many leafroll epidemic events have been reported in France, especially in Beaujolais and Burgundy, where some vineyards heavily infested by *Phenacoccus aceris* have been totally contaminated with leafroll within 7 years (19). *Phenacoccus aceris* is a cosmopolitan mealybug and is reported in many European countries, as well as in Russia, North America, Korea, and Japan (17). It was likely introduced into United States at the beginning of the 20th century (33), where it caused direct damage in apple orchards and

disseminated little cherry disease (35) in cherry growing areas. In our study, all transmission experiments were done using a single population of *Phenacoccus aceris*, collected from a French vineyard infected with GLRaV-1, -3, and GVA. We proved that in the presence of other vine sources, this local population has the capability to transmit four additional ampeloviruses and two vitiviruses. Thus, there is a potential risk of vineyard contamination with ampeloviruses and vitiviruses wherever *Phenacoccus aceris* is present or likely to be introduced.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Misbach and his team for having provided experimental grapevine material and C. Rodriguez for improving the English text. This research was supported by three French professional committees for viticulture: Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne, Epernay; Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne, Beaune; and Comité Interprofessionnel des Vins d'Alsace, Colmar; and by FranceAgriMer grants (2009-47-005-104, 2009-77-030-104, and 2011-0106-001-104).

## LITERATURE CITED

1. Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Gugerli, P., and Rowhani, A. 2012. Genome organization, serology and phylogeny of Grapevine leafroll-associated viruses 4 and 6: Taxonomic implications. Virus Res. 163:120-128.
2. Beuve, M., Moury, B., Spilmont, A.-S., Sempé-Ignatovic, L., Hemmer, C., and Lemaire, O. 2009. Viral sanitary status and genetic diversity of *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) in French Syrah clones exhibiting various susceptibility levels to decline. Pages 52-53 in: 16th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine, Dijon, France.
3. Beuve, M., Sempé, L., and Lemaire, O. 2007. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants in grapevine. J. Virol. Methods 141:117-124.
4. Boscia, D., Savino, V., Minafra, A., Namba, S., Elicio, V., Castellano, M. A., Gonsalves, D., and Martelli, G. P. 1993. Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. Arch. Virol. 130:109-120.
5. Boudon-Padieu, E., Ridé, M., and Walter, B. 2000. L'enroulement viral. Pages 47-55 in: Maladies à Virus, Bactéries et Phytoplasmes de la Vigne. B. Walter, ed. Féret, Bordeaux, France.
6. Burrows, P. M. 1987. Improved estimation of pathogen tranmission rates by group testing. Phytopathology 77:363-365.
7. Cabaleiro, C., Couceiro, C., Pereira, S., Cid, M., Barrasa, M., and Segura, A. 2008. Spatial analysis of epidemics of *Grapevine leafroll associated virus-3*. Eur. J. Plant Pathol. 121:121-130.
8. Cabaleiro, C., and Segura, A. 1997. Some characteristics of the transmission of grapevine leafroll associated virus 3 by *Planococcus citri* Risso. Eur. J. Plant Pathol. 103:373-378.
9. Charles, J. G., Cohen, D., Walker, J. T. S., Forgie, S. A., Bell, V. A., and Breen, K. C. 2006. A review of grapevine leafroll associated virus type 3 (GLRaV-3) for the New Zealand wine industry. The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand Ltd. (HortResearch), Client Report No. 18447.
10. Daane, K., Bentley, W., Walton, V. M., Malakar-Kuenen, R., Millar, J. G., Ingels, C. A., Weber, E. A., and Gispert, C. 2006. New controls investigated for vine mealybug. Calif. Agric. 60:31-38.
11. Engelbrecht, D. J., and Kasdorf, G. G. F. 1990. Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug, *Planococcus ficus*. Phytophylactica 22:341-346.
12. Fortusini, A., Scattini, G., Prati, S., Cinquanta, S., and Belli, G. 1997. Transmission of *Grapevine leafroll virus 1* (GLRaV-1) and *Grapevine virus A* (GVA) by scale insects. In: 12th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine, Lisbon, Portugal.
13. Golino, D. A., Weber, E., Sim, S. T., and Rowhani, A. 2008. Leafroll disease is spreading rapidly in Napa Valley vineyard. Calif. Agric. 62:156-160.
14. Goszczynski, D. E., and Jooste, A. E. C. 2003. Shiraz disease (SD) is transmitted by mealybug *Planococcus ficus* and associated with *Grapevine virus A* (GVA). Pages 219-220 in: 14th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine, Locorotondo, Italy.
15. Hommay, G., Komar, V., Lemaire, O., and Herrbach, E. 2008. *Grapevine virus* A transmission by larvae of *Parthenolecanium corni*. Eur. J. Plant Pathol. 121:185-188.
16. Jelkmann, W., Mikona, C., Turturo, C., Navarro, B., Rott, M., Menzel, W., Saldarelli, P., Minafra, A., and Martelli, G. 2012. Molecular characterization and taxonomy of grapevine leafroll-associated virus 7. Arch. Virol. 157:359-362.
17. Kosztarab, M., and Kozar, F. 1988. Scale Insect of Central Europe. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
18. Le Maguet, J., Herrbach, E., Hommay, G., Beuve, M., Boudon-Padieu, E., and Lemaire, O. 2009. Monitoring of Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1) dispersion by the mealybug *Phenacoccus aceris*. Pages 283-284 in: 16th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine, Dijon, France.
19. Le Maguet, J., Herrbach, E., and Lemaire, O. 2010. L'enroulement viral de la vigne et la cochenille *Phenacoccus aceris*. Phytoma. La Défense des Végétaux 636:46-50.
20. Mahfoudhi, N., Digiaro, M., and Dhouibi, M. H. 2008. Incidence and distribution of grapevine leafroll-associated viruses in Tunisian vineyards. J. Phytopathol. 156:556-558.
21. Mahfoudhi, N., Digiaro, M., and Dhouibi, M. H. 2009. Transmission of grapevine leafroll viruses by *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) and *Ceroplastes rusci* (Hemiptera: Coccidae). Plant Dis. 93:999-1002.
22. Malausa, T., Fenis, A., Warot, S., Germain, J.-F., Ris, N., Prado, E., Botton, M., Vanlerberghe-Masutti, F., Sforza, R., Cruaud, C., Coulou, A., and Kreiter, P. 2010. DNA markers to disentangle complexes of cryptis taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). J. Appl. Entomol. 135:132-145.
23. Maliogka, V. I., Dovas, C. I., and Katis, N. I. 2008. Evolutionary relationships of virus species belonging to a distinct lineage within the *Ampelovirus* genus. Virus Res. 135:125-135.
24. Martelli, G. P. 1993. Rugose wood complex. Pages 45-54 in: Graft-Transmissible Diseases of Grapevine. G. P. Martelli, ed. FAO, Rome, Italy.
25. Martelli, G. P., and Boudon-Padieu, E. 2006. Directory of infectious diseases of grapevine and viroses and virus-like diseases of the grapevine. Pages 59-75 in: Bibliographic Report 1998-2004 Options méditerranéennes, Série B: Studies and Research, CIEHAM-IAMB.
26. Mikona, C., and Jelkmann, W. 2010. Replication of *Grapevine leafroll-associated virus-7* (GLRaV-7) by *Cuscuta* species and Its transmission to herbaceous plants. Plant Dis. 94:471-476.
27. Nakano, M., Nakaune, R., and Komazaki, S. 2003. Mealybug transmission of grapevine viruses in Japan. Page 218 in: 14th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine, Locorotondo (Bari), Italy.
28. Nakaune, R., Toda, S., Mochizuki, M., and Nakano, M. 2008. Identification and characterization of a new vitivirus from grapevine. Arch. Virol. 153:1827-1832.
29. Ng, J. C. K., and Falk, B. W. 2006. Virus-vector interations mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. Annu. Rev. Phytopathol. 44:183-212.
30. Padilla, C. V., Cretazzo, E., Lopez, N., Garcia de Rosa, B., Padilla, V., and Velasco, L. 2010. First report of *Grapevine leafroll-accosicated virus 4* (GLRaV-4) in Spain. New Dis. Rep. 21:21.
31. Pietersen, G. 2006. Spatio-temporal distribution dynamics of grapevine leafroll disease in western cape vineyards. Page 126 in: 15th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine, Stellenboch, South Africa.
32. Raine, J., McMullen, R. D., and Farbes, A. R. 1986. Transmission of the agent causing little cherry disease by the apple mealybug *Phenacoccus aceris* and the dodder *Cuscuta lupuliformis*. Can. J. Plant. Pathol. 8:6-11.
33. Rau, G. J. 1942. The Canadian apple mealybug, *Phenacoccus aceris* Signoret and its allies in Northeastern America. Can. Ent. 74:118-125.
34. Rosciglione, B., Castellano, M. A., Martelli, G. P., Savino, V., and Cannizzaro, G. 1983. Mealybug transmission of grapevine virus A. Vitis 22:331-347.
35. Rott, M. E., and Jelkmann, W. 2001. Detection and partial characterization of a second closterovirus associated with little cherry disease, Little cherry virus-2. Phytopathology 91:261-267.
36. Saldarelli, P., Cornuet, P., Vigne, E., Talas, F., Bronnenkant, I., Dridi, A. M., Andret-Link, P., Boscia, D., Gugerli, P., Fuchs, M., and Martelli, G. P. 2006. Partial characterization of two divergent variants of *Grapevine leafroll-associated virus 4*. J. Plant Pathol. 88:203-214.
37. Sforza, R. 2008. Les cochenilles sur la vigne: Bio-éthologie, impact agronomique, lutte et prophylaxie. Pages 188-210 in: Ravageurs de la Vigne. J. Stochel, ed. Féret, Bordeaux, France.
38. Sforza, R., Boudon-Padieu, E., and Greif, C. 2003. New mealybug species vectoring Grapevine leafroll associated viruses-1 and -3 (GLRaV-1 and -3). Eur. J. Plant Pathol. 109:975-981.
39. Sim, S. T., Rowhani, A., Alkowni, R., and Golino, D. A. 2003. Experimental transmission of *Grapevine leafroll-associated* viruses types 5 and 9 by longtailed mealybugs. Pages 211-212 in: 14th Meeting of the

International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine, Locorotondo (Bari), Italy.
40. Tanne, E., Ben-Dov, Y., and Raccah, B. 1993. Mealybug transmission of corky bark disease and an associated virus to healthy grapevine. Pages 59-60 in: 11th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine, Montreux, Switzerland.
41. Thompson, J. R., Fuchs, M., and Perry, K. L. 2012. Genomic analysis of Grapevine leafroll associated virus-5 and related viruses. Virus Res. 163:19-27.
42. Tsai, C. W., Bosco, D., Daane, K. M., and Almeida, R. P. 2011. Effect of host plant tissue on the vector transmission of grapevine leafroll-associated virus 3. J. Econ. Entomol. 104:1480-1485.
43. Tsai, C. W., Chau, J., Fernandez, L., Bosco, D., Daane, K. M., and Almeida, R. P. P. 2008. Transmission of *Grapevine leafroll-associated virus* 3 by the vine mealybug (*Planococcus ficus*). Phytopathology 98:1093-1098.
44. Tsai, C. W., Rowhani, A., Golino, D. A., Daane, K., and Almeida, R. P. 2010. Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: An analysis of virus-vector specificity. Phytopathology 100:830-834.
45. Zimmermann, D., Bass, P., Legin, R., and Walter, B. 1990. Characterization and serological detection of four closterovirus-like particles associated with leafroll disease on grapevine. J. Phytopathol. 130:205-218.
46. Zorloni, A., Prati, S., Bianco, P., and Belli, G. 2006. Transmission of *Grapevine virus A* and *Grapevine leafroll-associated virus 3* by *Heliococcus bohemicus*. J. Plant Pathol. 88:325-328.

## III.2. Expériences additionnelles avec *P. aceris* : transmission du GLRaV-2

Parmi les virus de l'enroulement, l'espèce GLRaV-2 (*Closterovirus*) n'a pas d'insecte vecteur connu à ce jour. Même si les expériences de transmission par cochenille se sont toujours révélées infructueuses, le large spectre vecteur démontré pour *P. aceris* nous a incité à mener une vérification sur sa capacité à transmettre ce virus de l'enroulement. Les larves de premier stade, après acquisition pendant 48 h sur feuilles infectées (Acquisition Access Period, AAP) ont été placées sur 6 plantes tests à raison d'une centaine d'individus en moyenne par plante pendant 72 h de temps d'inoculation (Inoculation Access Period, IAP) (Tableau 11).

**Tableau 11. Résultat du test de transmission du GLRaV-2 (accession Y204) avec *P. aceris*. Tests de détection effectués sur plantes inoculées par DAS-ELISA et RT-PCR, 4 mois après inoculation. [a]nombre de L1 fixées aux feuilles des plantes tests à la fin de l'IAP.**

| ID plante inoculée | Nb larves L1 fixées par plante[a] | Résultat test détection GLRaV-2 |
|---|---|---|
| Trans 56-1 | 104 | - |
| Trans 56-2 | 95 | - |
| Trans 56-3 | 100 | - |
| Trans 56-4 | 78 | - |
| Trans 56-5 | 121 | - |
| Trans 56-6 | 117 | - |

Aucune plante test n'a été détectée positive au GLRaV-2 par DAS-ELISA ou RT-PCR, montrant qu'aucun événement de transmission par *P. aceris* n'a eu lieu. Cependant, il semble que les cochenilles aient la capacité d'acquérir le virus. Des analyses effectuées sur *P. corni* prouvent en effet la présence du GLRaV-2, après extraction d'ARN totaux puis RT-PCR sur des individus alimentés sur une vigne infectée par ce virus (Figure 15). Ce résultat montrerait que les particules virales du GLRaV-2 pourraient être acquises par cochenille, sans que l'insecte puisse les transmettre par la suite en raison sans doute d'une absence de rétention dans les stylets ou le tube digestif antérieur.

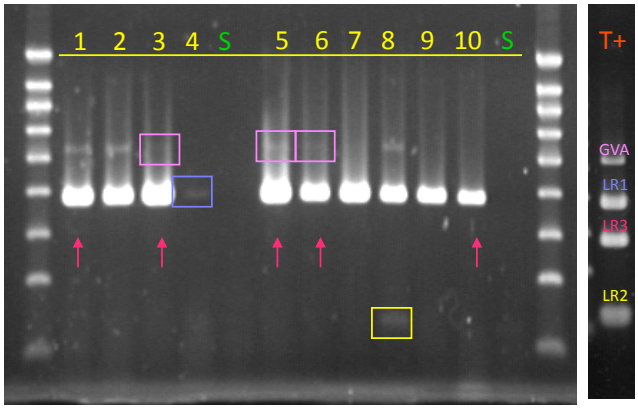



**Figure 15. Test de détection des GLRaV-1, -2, -3 et GVA par RT-PCR multiplexe sur *P. corni* (entre 12 et 15 cochenilles par échantillon) récoltées à Nothalten (67) sur vignes infectées par plusieurs espèces d'enroulement. La bande faible obtenue en piste 8 (120 pb, rectangle jaune) correspond à la détection du GLRaV-2.**

Dans la famille des *Closteroviridae,* le GLRaV-2 est le seul virus de l'enroulement classé au sein du genre *Closterovirus*. Les analyses de son organisation génomique montrent qu'il est très proche des *Closterovirus* transmis par pucerons comme le *Beet yellows virus* (BYV), le *Beet yellow stunt virus* (BYSV), le *Citrus tristeza virus* (CTV) ou encore le *Carnation necrotic fleck virus* (CNFV) (Zhu et al., 1998). Pour autant, aucun puceron n'a pour le moment été prouvé comme étant vecteur du GLRaV-2.

Les interactions entre les virus et leurs sites de rétention spécifiques chez les vecteurs ont été étudiées principalement pour les pucerons (Gray et Gildow, 2003) et aleurodes (Chen et al., 2011) et montrent que la capside joue un rôle majeur dans les mécanismes de transmission du virus. La transmission du *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV), un autre *Closteroviridae* (*Crinivirus*) dépend ainsi de l'interaction entre des récepteurs viraux dont la présence est postulée dans le stylet ou l'intestin antérieur des aleurodes et un ensemble de protéines structurales (CPm) situé à l'une des deux extrémités du virion filamenteux (Tian et al., 1999; Stewart et al., 2010). Aucune information n'existe à ce jour sur les récepteurs viraux pour les cochenilles, mais on peut supposer que la non transmission du GLRaV-2 par cochenille s'explique par l'absence de site de rétention spécifique du virus chez ces insectes.
Dans l'état actuel des connaissances, on peut considérer que la propagation du GLRaV-2 ne repose que sur la diffusion par l'homme de greffons et porte-greffes contaminés. La séparation physique, notamment par isolation géographique, entre un vecteur aphidien, s'il existe, et la vigne pourrait ainsi expliquer l'évolution séparée des deux partenaires, et donc la perte des capacités du vecteur dans la transmission (Karasev, 2000; Klaassen et al., 2011). La persistance du GLRaV-2 dans les *Vitis* serait donc assurée par la multiplication végétative des variétés infectées et le caractère asymptomatique fréquent de cette espèce d'enroulement. Le vignoble du Bordelais représente un exemple typique de cette situation. La remontée de la filière de production de matériel végétal a en effet prouvé que la contamination quasi généralisée de ce vignoble par le GLRaV-2 est la conséquence du greffage de clones de Cabernet sauvignon et Cabernet blanc sur porte-greffes infectés, puis de la large diffusion des cépages infectés dans l'ensemble de la région ainsi qu'en Californie.

### III.3. Analyse de la rétention hivernale de virus

Les cochenilles, de par leur faible mobilité, se caractérisent par leur capacité à effectuer l'ensemble de leur cycle biologique sur une même plante hôte, les contraignant à se protéger pour résister aux mauvaises conditions climatiques. Le passage de la saison hivernale est ainsi facilité sur la vigne par l'abondance du rhytidome sur le cep. La cochenille *P. aceris* passe ainsi l'hiver, à partir de la fin octobre jusqu'en février-mars, sous forme de L3 mâle ou femelle dans un cocon cireux situé dans l'écorce (voir Chapitre 1). Aussi, contrairement à d'autres espèces comme *H. bohemicus* ou *P. corni* qui ne possèdent pas ce genre de cocon, on a ici l'assurance que l'insecte ne peut opérer de prise alimentaire pendant sa période de diapause. *P. aceris* constitue donc une espèce particulièrement intéressante pour étudier la rétention hivernale des virus de l'enroulement et du bois strié. La transmission de virus par cochenilles est considérée comme semi-persistante, des expériences ayant confirmé une perte d'infectivité des insectes au bout de 4 jours après acquisition et également après la mue (Tsai et al., 2008). Cependant, la durée de rétention du virus pendant la période de diapause des cochenilles n'a pas été étudiée.

Un échantillonnage mensuel a été conduit durant l'hiver 2008-2009, complété par un échantillonnage en décembre 2009. Des fragments d'écorce de vigne comportant des cocons de *P. aceris* ont été prélevés dans la parcelle de Bonzon (voir description Chapitre 4) sur des ceps infectés aux GLRaV-1, GLRaV-3 et GVA. Ces fragments, conservés en chambre froide, ont été observés sous loupe binoculaire afin d'extraire les cochenilles hors de leur cocon. Pour le prélèvement de mars 2009, les cochenilles émergentes ont directement été stockées en tube eppendorf. Selon chaque cep source, les L3 femelles ont été regroupées par échantillons de 2 à 18 individus, et les L3 mâles ont été regroupées par lots de 10. Ces échantillons ont été stockés à -20°C en tubes eppendorf de 1,5 mL dans 150 µl de tampon RLT (DNA Plant extraction MiniKit, Qiagen, France) en vue des extractions d'ARN totaux et des tests de détection virale par RT-PCR (Annexe 3).

**Tableau 12. Synthèse des résultats des tests de détection par RT-PCR multiplexe sur larves de stade L3 femelles de *P. aceris* prélevée à Bonzon.**

| Echantillonnage | | Virus détectés par RT-PCR | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Date** | **Larves prélevées** | **GLRaV-1** | **GLRaV-3** | **GVA** | **TOTAL** | **% de lots positifs** |
| Décembre 2008 | L3 en cocon | 6/13 | 0/13 | 1/13 | **6/13** | **46 %** |
| Janvier 2009 | L3 en cocon | 4/10 | 1/10 | 1/10 | **4/10** | **40 %** |
| Février 2009 | L3 en cocon | 2/10 | 0/10 | 1/10 | **2/10** | **20 %** |
| Mars 2009 | L3 émergentes | 23/24 | 0/24 | 23/24 | **23/24** | **96 %** |
| Décembre 2009 | L3 en cocon | 3/40 | 9/40 | 0/40 | **10/40** | **25 %** |

Le Tableau 12 synthétise les résultats des tests de détection pour l'ensemble des échantillons analysés chaque mois. On constate que les virus persistent dans le corps des femelles L3, en revanche les tests de détection sont négatifs pour les échantillons de L3 mâles (non détaillé ici). Au cours de l'hiver, le pourcentage d'échantillons positifs décroît, mais il faut cependant tempérer cette conclusion de par les effectifs moindres analysés en janvier et février.

Contrairement aux autres dates d'échantillonnage de l'hiver, les cochenilles prélevées au mois de mars ont été récoltées sur le bois de taille laissé au sol au niveau des inter-rangs (Figure 16). Même s'ils n'ont pas été opérés sur des ceps précis, ces prélèvements ont été réalisés dans une zone choisie pour sa forte prévalence vis à vis du GLRaV-1. Cet échantillonnage se distingue également au niveau du stade de développement de l'insecte. A la faveur d'une fin d'hiver douce dans la région en 2009, les L3 femelles ont en effet émergé précocement de leur cocon et ont donc été prélevées sous le rhytidome du bois de taille, en contact avec le phloème (Figure 16) : prélevés au pinceau, la plupart des individus restaient attachés au support végétal par leur rostre. Les tests de détection montrent que la majorité des échantillons de ces *P. aceris* émergentes sont positifs pour le GLRaV-1 et le GVA. Cela indique que *P. aceris* a repris ses prises de nourriture dès la fin d'hiver, permettant aux particules des virus de l'enroulement et du bois strié d'être acquises.

**Figure 16. Photographies dans la parcelle de Bonzon (71), 19 mars 2009. (a) résidus de taille au niveau des inter-rangs, (b) L3 femelles après écorçage d'un bois de taille, (c) L3 femelle parcourant une baguette. Crédits photos : JLM.**

Ces premiers résultats indiquent que les particules virales peuvent être retenues pendant plusieurs mois lors de la diapause de *P. aceris*. Cependant, cela ne présage en rien de la capacité ou non des cochenilles, lors de leur émergence des cocons, à inoculer ces virus au cours de leur première prise de nourriture.

On sait en effet que les virus transmis par cochenille ont un taux d'acquisition important, mais faible concernant le taux d'inoculation (Cid et Fereres, 2010).

Ces résultats trouvent une application directe dans la connaissance de l'épidémiologie de l'enroulement viral. La détection systématique de virus dans les L3 émergentes prouve que *P. aceris* acquiert les GLRaVs et le GVA dès la fin de l'hiver. D'une part, le bois de taille laissé au sol constitue un réservoir de virus, les GLRaV-1, -3 et GVA y étant détectables au moins deux mois après la période de taille (tests par DAS-ELISA, données non présentées). D'autre part, les cochenilles présentes sur ces résidus de taille peuvent émerger précocement en conditions favorables. Par temps doux, les rayons solaires réchauffent davantage la surface du sol et donc les bois de taille potentiellement infestés par cochenilles. Les résidus de taille laissés en inter-rang peuvent donc constituer un relais entre rangs, pouvant ainsi contribuer au transfert des vecteurs et des virus vers les vignes encore saines. La dispersion naturelle de l'enroulement viral et du complexe du bois strié est probablement négligeable par cette voie, mais nécessite cependant d'être étudiée en commençant par l'évaluation des capacités vectrices des femelles L3 émergentes après leur première prise de nourriture. D'un point de vue pratique, le brûlage des bois de taille, avant le retour de températures favorables à l'émergence des cochenilles, constitue le moyen le plus adapté afin d'éviter la dispersion de cochenilles virulifères.

## IV. Biologie de la vection de virus par *Neopulvinaria innumerabilis*

Une des caractéristiques notables de *Neopulvinaria innumerabilis* est son statut d'espèce introduite (voir Chapitre 1). Observée principalement dans les vignobles bordelais et languedociens, elle est devenue problématique depuis quelques années dans le Beaujolais et le sud Mâconnais. Les viticulteurs signalent des infestations sérieuses, avec dans certains cas plusieurs centaines de femelles par baguette (Figure 17). Ces colonies entraînent un affaiblissement des ceps touchés et surtout des dégâts dus à leur production abondante de miellat souillant les feuilles et les fruits sur lesquels la fumagine se développe (Figure 17). La qualité des baies étant fortement dépréciée, les vendanges sur les parcelles touchées sont très compromises, et ne sont généralement même pas engagées.

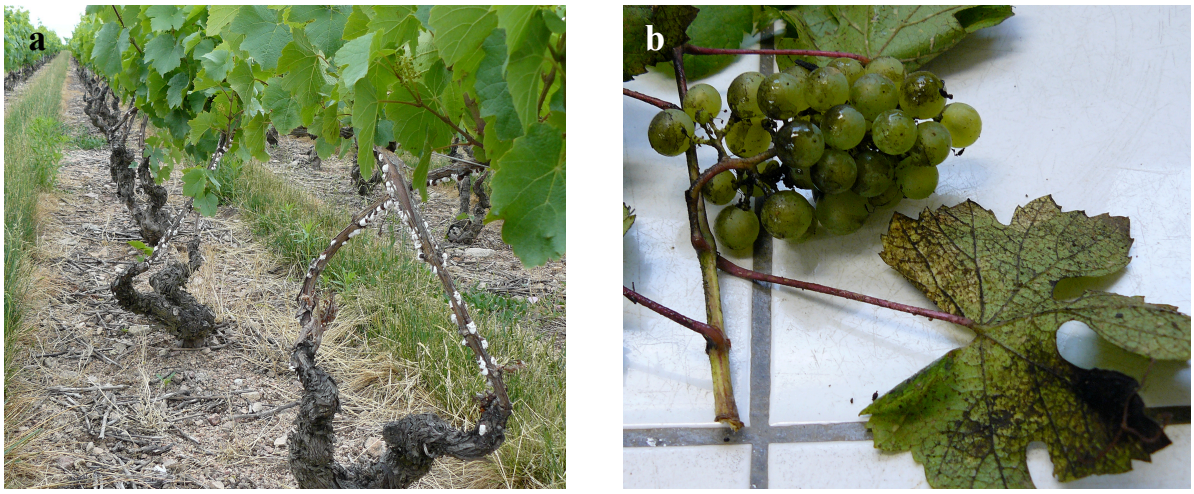



**Figure 17. Infestation d'une parcelle de 'Gamay' par *N. innumerabilis* à Lancié (69). (a) baguettes infestées par femelles adultes (02/06/11), (b) feuilles et baies souillées par le miellat produit par les L1 de la cochenille et la fumagine s'y développant. Crédits photos : JLM.**

La profession viticole a donc toutes les raisons de s'inquiéter de telles infestations. Des tests entrepris à l'initiative de la Chambre d'Agriculture de Saône-et-Loire sont actuellement en cours pour étudier l'efficacité de plusieurs produits insecticides sur les parcelles infestées. Cette espèce de cochenille représente également une menace pour le vignoble puisqu'elle est en mesure de transmettre les GLRaV-1, -3 et GVA. Aucune expérience de transmission n'ayant été menée sur des populations prélevées dans les vignobles en France, la vérification des capacités vectrices de *N. innumerabilis* est donc apparue comme indispensable.
Des ovisacs de femelles adultes de *N. innumerabilis* ont été récoltés en masse avant l'émergence des L1 sur une parcelle fortement infestée (Lancié, 69). Parallèlement un échantillon de jeunes femelles a été envoyé pour identification afin de confirmer le statut taxonomique de l'espèce (J.-F. Germain, Anses, LNPV, Campus de Baillarguet, Montferrier-sur-Lez). Au laboratoire, les ovisacs ont été placés directement en bocaux sur différentes accessions de vignes sources de virus en attendant l'émergence des L1. La procédure employée par la suite est identique à celle décrite pour *P. aceris* (voir Matériel et Méthodes).

Une étude préliminaire de spécificité vectrice de l'espèce a été entreprise pour tester la capacité de *N. innumerabilis* à transmettre les GLRaV-4, -5, -6, -9, GVB et GVD. Ensuite, sa capacité à transmettre les GLRaV-1, -3 et GVA a été vérifiée en procédant à des tests comparatifs avec *P. aceris*.

## IV.1. Evaluation de la spécificité vectrice

Malgré la quantité importante d'ovisacs prélevés pour les expériences de transmission, la phase d'acquisition des L1 de *N. innumerabilis* s'est révélée délicate, sans doute à cause des conditions confinées de l'essai. La forte mortalité des cochenilles a conduit à réduire considérablement le nombre de répétitions de plantes tests à inoculer.

**Tableau 13. Taux de transmission obtenus lors des expériences de spécificité vectrice avec *N. innumerabilis* (50 larves L1 par plante test). Tests de détection sur plantes inoculées effectués par DAS-ELISA ou RT-PCR, 4 mois après inoculation.**

| | | Virus transmis | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ID. Expérience | Accession | GLRaV-1 | GLRaV-2 | GLRaV-4 | GLRaV-5 | GLRaV-6 | GLRaV-9 | GVA | GVB | GVD |
| Trans 50 | Y252 (4,A) | | | 0/5 | | | | 0/5 | | |
| Trans 51 | Y217 (5,A) | | | | 0/4 | | | 0/4 | | |
| Trans 52 | Y199 (5,6,A) | | | | 0/4 | 0/4 | | 0/4 | | |
| Trans 53 | Cab 119-66 (9,A) | | | | | 0/2 | 0/2 | | | |
| Trans 54 | Te 132 (1,B) | 0/4 | | | | | | | 0/4 | |
| Trans 55 | R63 (2,B,D) | | 0/5 | | | | | | 0/5 | 0/5 |

Ces expériences préliminaires n'ont pas permis d'obtenir d'évènement de transmission. Des temps d'acquisition et d'inoculation plus longs que ceux habituellement pratiqués pour les cochenilles (respectivement 72 et 96 h) ont pourtant été appliqués. Cependant, sur les 50 cochenilles placées sur vignes saines, 18 en moyenne étaient fixées aux feuilles à la fin de la période d'inoculation. Ce faible nombre de cochenilles fixées lors de l'IAP peut donc expliquer en partie pourquoi aucune plante test n'a été inoculée, en particulier avec le GLRaV-1. Ces expériences de transmission nécessitent donc d'être renouvelées pour étudier le spectre vecteur de *N. innumerabilis.*

## IV.2. Confirmation de la transmission des GLRaV-1, GLRaV-3 et GVA

Une expérience de transmission a été menée en utilisant *N. innumerabilis* comparativement avec *P. aceris*. Pour chaque espèce de cochenille, 20 plantes ont été inoculées simultanément avec 5, 20, ou 50 L1, issues d'une acquisition sur une même accession source (Y258). Les six modalités ont été opérées avec les mêmes conditions d'acquisition et d'inoculation (48 h pour chaque étape). Pour l'inoculation, les cochenilles ont été placées dans des petites boîtes de Petri (diamètre 40 mm, épaisseur 5 mm) fixées aux feuilles des plantes tests pour éviter toute fuite qui fausserait les effectifs introduits.

**Tableau 14. Taux de transmission obtenus lors du test comparatif entre *N. innumerabilis* et *P. aceris.* Tests de détection sur plantes inoculées effectués DAS-ELISA 4 mois après inoculation.**

| | *Neopulvinaria innumerabilis* | | | | *Phenacoccus aceris* | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nb Larves** | **GLRaV-1** | **GLRaV-3** | **GVA** | **TOTAL** | **GLRaV-1** | **GLRaV-3** | **GVA** | **TOTAL** |
| 5 L1 | 0/20 | 0/20 | 0/20 | **0/20** | 2/20 | 1/20 | 3/20 | **3/20** |
| 20 L1 | 1/20 | 0/20 | 1/20 | **1/20** | 1/20 | 0/20 | 3/20 | **3/20** |
| 50 L1 | 4/20 | 0/20 | 2/20 | **4/20** | 5/20 | 6/20 | 7/20 | **11/20** |

Les résultats confirment tout d'abord que *N. innumerabilis* est bien vectrice du GLRaV-1 et du GVA. En revanche, aucun événement de transmission du GLRaV-3 n'a été constaté pour *N. innumerabilis* contrairement à *P. aceris.* On constate que, dans les mêmes conditions expérimentales, l'efficacité vectrice de *P. aceris* est globalement plus importante que celle de *N. innumerabilis*. Cette différence entre *Pseudococcidae* et *Coccidae* a déjà été observée pour d'autres espèces (Mahfoudhi et al., 2009). Des caractéristiques intrinsèques au comportement alimentaire des cochenilles, liées notamment à leurs stylets, ou à une capacité de rétention différente des particules virales, pourraient expliquer la différence d'efficacité entre ces deux familles de cochenille. Cependant, le nombre de L1 engendré par une femelle étant bien supérieur pour *N. innumerabilis*, cela peut compenser sa moindre capacité vectrice et ainsi augmenter proportionnellement les risques de transmission de l'enroulement.

Les pullulations de *N. innumerabilis* touchant actuellement les vignobles du sud Bourgogne et du Beaujolais se caractérisent par un impact visuel remarquable : chapelets d'ovisacs blanchâtres, feuilles et grappes collantes recouvertes de fumagine, ceps dépérissants. Cependant, ces manifestations ne doivent pour autant pas faire oublier que cette cochenille est également problématique du fait de son potentiel vecteur de virus. Elle peut donc jouer un rôle non négligeable dans la dissémination de l'enroulement viral dans les vignobles de cette région. Les signalements de pullulations d'insectes sur plantes cultivées sont généralement effectués bien après la réelle introduction des ravageurs dans l'écosystème. Il est ainsi fort probable que *N. innumerabilis* soit durablement établie en Bourgogne et Beaujolais depuis plusieurs dizaines d'années sur la vigne. La présence de cette espèce de cochenille, concomitante avec quatre autres espèces de cochenille vectrices de l'enroulement a certainement contribué à entretenir une prévalence importante de l'enroulement viral et du complexe du bois strié dans ces régions particulièrement touchées par l'épidémie.

## V. Bilan de l'approche biologique de la vection

L'approche biologique de la transmission par cochenille a été menée sur deux espèces cosmopolites et particulièrement problématiques dans les régions viticoles françaises. Les nouvelles connaissances acquises sur la biologie de la vection de virus par *P. aceris* et *N. innumerabilis* comblent ainsi le manque de données disponibles sur ces espèces plutôt septentrionales, encore peu étudiées pour leur statut de vecteur.
Sur la base de la phylogénie actuelle des espèces d'*Ampelovirus*, nous prouvons pour *P. aceris* le plus large spectre vecteur de virus jamais encore montré pour une cochenille à ce jour (Figure 18).

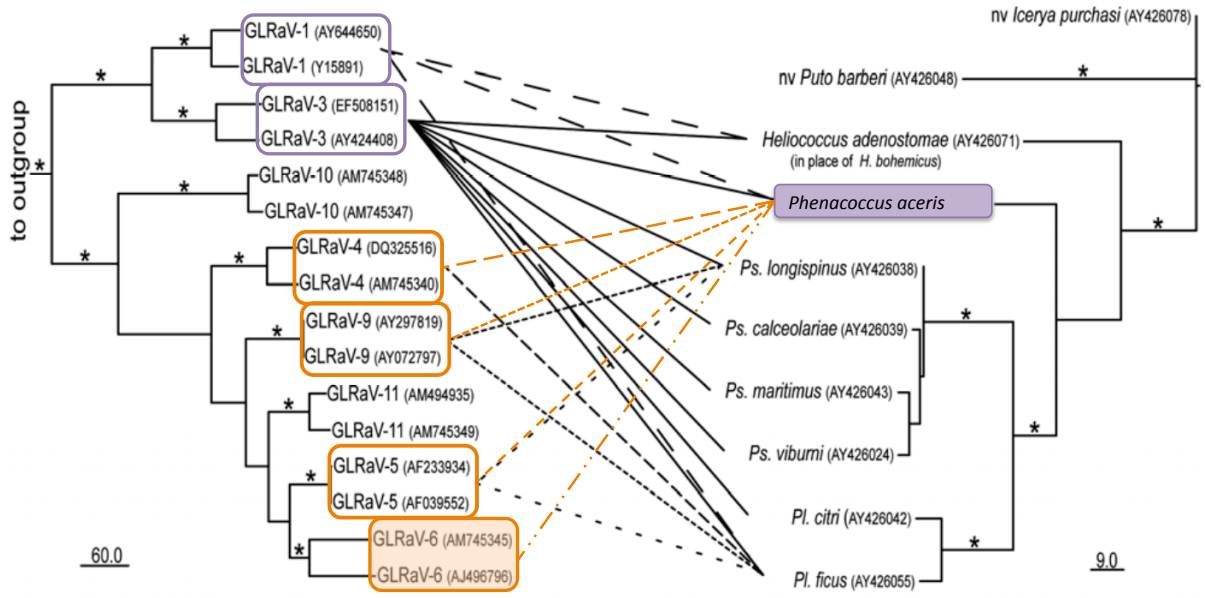



**Figure 18. Spécificité vectrice de différentes *Pseudoccocidae* vis-à-vis plusieurs espèces d'*Ampelorivus*. Les cadres violets indiquent la confirmation de transmission des GLRaV-1 et -3 par *P. aceris*. Les cadres et lignes oranges montrent les nouvelles données acquises dans cette étude sur le spectre vecteur de *P. aceris*, en particulier la preuve de vection du GLRaV-6. Arbre phylogénétique (parcimonie maximale) des *Ampelovirus* basé sur la séquence HSP70h, et des *Pseudococcidae* basé sur la séquence 18S, d'après Tsai *et al.* 2010. nv : non vecteur, * bootrasp significatifs à 70%.**

La capacité des cochenilles à transmettre à la vigne plusieurs espèces virales classées dans les *Ampelovirus* et *Vitivirus* montre que l'étude de la spécificité vectrice de ces insectes est complexe et indispensable pour mieux comprendre l'épidémiologie des viruses transmises par ces vecteurs. L'absence de transmission pour les virus GLRaV-2 et GLRaV-7, pourtant classés eux aussi dans les *Closteroviridae,* mais dans d'autres genres que *Ampelovirus*, indique que cette spécificité est régie par des mécanismes d'interaction vecteur-virus encore peu étudiés pour les cochenilles. Le binôme GLRaVs-*P. aceris* constitue ainsi un modèle particulièrement adapté dans l'étude ultérieure de ces mécanismes moléculaires. Les différences dans l'organisation génomique des GLRaVs, notamment au niveau des protéines de capside (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2012), sont-elles à l'origine de la spécificité de transmission entre *Ampelovirus, Closterovirus et Velarivirus* ? La vection des *Vitivirus* est-elle uniquement possible avec l'assistance d'un GLRaV comme proposé par Fortusini et al. (1997) et Hommay et al. (2008), et répond-elle dans ce cas à des mécanismes de transcomplémentation intergénérique faisant intervenir un facteur « helper » produit par *Ampelovirus* ?

En sortant du cadre des virus inféodés à la vigne, on sait que *P. aceris* est capable d'infester plusieurs espèces d'arbres fruitiers, cerisier, poirier et pommier notamment. On peut ainsi proposer que cette cochenille pourrait jouer un rôle dans la transmission sur *Malus* de l'*Apple stem pitting virus* (ASPV, *Foveavirus*) ou de l'*Apple stem grooving virus* (ASGV, *Capillovirus*), pour lesquels aucun organisme vecteur n'est connu à ce jour. Même si aucune diffusion naturelle apparente n'a été signalée au verger, la proximité taxonomique de ces virus avec les *Vitivirus* (*Betaflexiviridae*) et leurs caractéristiques étiologiques semblables (symptômes de cannelure sur bois, infectivité sur plantes herbacées) justifieraient l'étude de la vection de ces virus par *P. aceris*.

Les connaissances acquises dans le premier volet de cette thèse fournissent des éléments significatifs pour aborder l'épidémiologie de l'enroulement viral. L'étude du spectre vecteur des cochenilles, l'évaluation de l'efficacité vectrice des stades larvaires et l'analyse de la rétention hivernale de virus montrent que ces insectes constituent un problème sanitaire sous estimé jusqu'alors dans les vignoble français. La vection des virus GLRaV-1 et GVA, dont la prévalence est très forte en Bourgogne et en Beaujolais, implique que *P. aceris* et *N. innumerabilis* peuvent y jouer un rôle substantiel dans la dispersion naturelle de l'enroulement viral et du bois strié dans ces régions. Cela justifie ainsi d'accorder une attention particulière à ces deux espèces et plus généralement aux cochenilles vectrices.

L'étude épidémiologique qui suit décrit ainsi les résultats obtenus au cours de relevés exhaustifs de cochenilles sur des parcelles viticoles, avant d'établir leurs liens avec la contamination par l'enroulement viral des différents sites.

# Chapitre 4. Suivi épidémiologique de l'enroulement viral dans les vignobles septentrionaux

## I. Introduction : état sanitaire des vignobles en France

### I.1. Travaux antérieurs

A ce jour, seuls les virus GLRaV-1, -2, -3 et le GVA ont été répertoriés en conditions naturelles dans les vignobles français (hors collections ampélographiques et virologiques, notamment à l'INRA de Colmar ; au domaine de Vassal de l'INRA Montpellier, Marseillan Plage ; au domaine de l'Espiguette de l'IFV, Le Grau du Roi). Aucune étude nationale d'envergure n'ayant été menée sur l'état sanitaire des différents vignobles français, l'épidémiologie de l'enroulement n'a en conséquence été abordée que d'une manière ponctuelle et régionale. L'expression marquée des symptômes de l'enroulement sur cépage rouge par rapport aux cépages blancs a certainement contribué à biaiser le signalement des cas de la maladie du fait de la dominance de cépages spécifiques au sein d'une région viticole. Il est avéré au milieu du XX$^{ème}$ siècle que la Bourgogne, l'Alsace et le Jura sont des régions fortement touchées par l'enroulement viral (Vuittenez, 1958). C'est en Bourgogne qu'a lieu un premier essai dans les années 1980 sur la dispersion naturelle de l'enroulement viral (encadré 4). Plusieurs espèces de cochenilles sont signalées en France à cette époque sur la vigne, *Neopulvinaria innumerabilis* (Aquitaine et Méditerranée), *Parthenolecanium corni* (toute la France), *Pulvinaria vitis (*régions septentrionales), *Heliococcus bohemicus* (Savoie) et *Phenacoccus aceris* (Coteaux du Barrois) (Panis, 1984), mais leur lien avec la maladie de l'enroulement n'est pas encore établi en France ou à l'international.

Une première enquête épidémiologique sur l'enroulement viral a été menée dans les années 1990 sur des parcelles de prémultiplication (Greif et al., 1997a; Greif et al., 1997b) réparties dans 8 bassins viticoles. Cette étude révèle alors des taux moyens de contamination du matériel de base par les GLRaV-1 et -3 de 1,5 et 3 % respectivement. Une seconde enquête, effectuée sur 4 années, révèle ensuite que les vignobles bourguignons et alsaciens sont majoritairement touchés par le GLRaV-1 et que le vignoble de Champagne est concerné à part égale par les GLRaV-1 et GLRaV-3 (Grenan et Boidron, 2001). Les relevés entomologiques dans les vignobles du nord-est de la France signalent la présence de quatre espèces principales de cochenilles qui, après expérimentations au laboratoire, seront montrées comme vectrices des virus de l'enroulement (Sforza et Greif, 2000a; Sforza et al., 2003a).

**Encadré 4 : Première étude sur la dispersion naturelle de l'enroulement en France.**

En Bourgogne, l'observation de la dynamique d'une épidémie d'enroulement sur une parcelle de 'Pinot noir' laisse penser à l'époque que la maladie est transmise de façon naturelle par le biais d'un vecteur aérien (Legin, 1984). Des plants-pièges sains sont alors installés dans cette parcelle, en intercalant ces pieds sains avec les ceps malades de la parcelle. Bien que très lente, une diffusion naturelle est alors observée avec 50 % de ceps pièges atteints d'enroulement au bout de 12 années (Walter et Legin, 1986). On peut noter ici que l'un des pieds-pièges contaminé, le pied n°70, fut multiplié, puis implanté au sein de la collection virologique de Colmar, pour constituer l'accession Pinot noir 70 (P70) utilisée à présent pour les expérimentations au laboratoire.

## I.2. Des problématiques régionales

Sur la base des informations disponibles, la situation épidémique des vignobles montre des disparités entre les grandes régions viticoles (Figure 19). Depuis le début des études épidémiologiques sur l'enroulement viral en France, les enquêtes tendent à montrer que les régions du nord-est et centre-est de la France, Alsace, Champagne, Bourgogne et Jura sont les plus touchées par l'enroulement, en particulier l'espèce GLRaV-1.

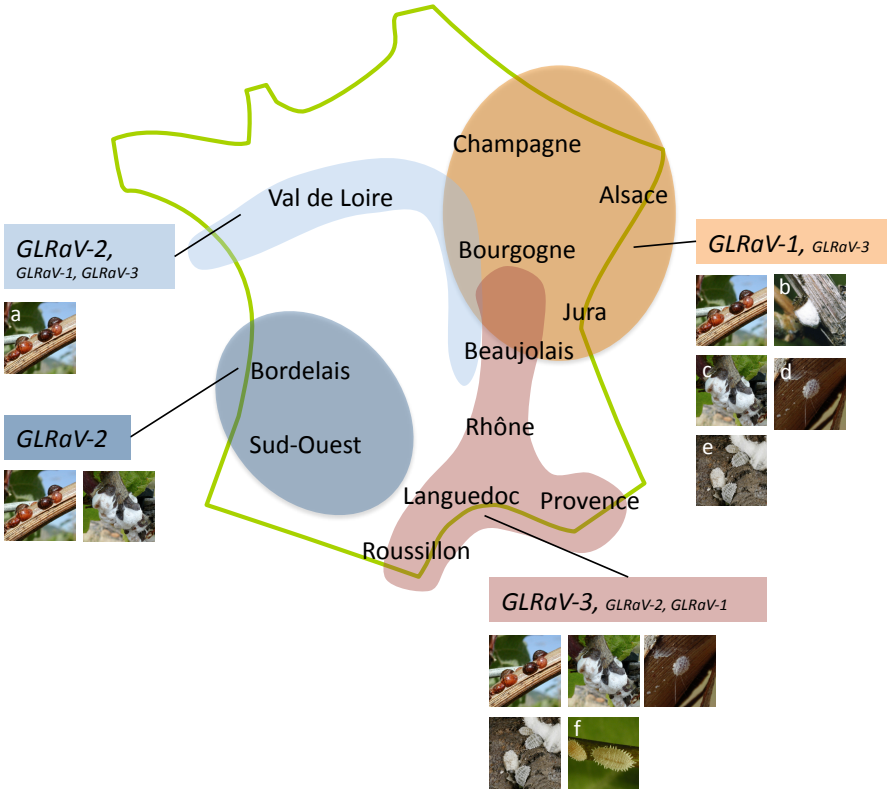



**Figure 19. Prédominance des espèces d'enroulement viral et des espèces de cochenilles selon les régions viticoles françaises. Pour chaque région, l'espèce virale principale est indiquée en gros caractère. Les vignettes correspondent aux espèces de cochenilles signalées sur vigne: (a) *P. corni,* (b) *P. vitis,* (c) *N. innumerabilis,* (d) *H. bohemicus,* (e) *P. aceris,* et (f) *P. ficus.***

Le Beaujolais, situé à l'interface entre les vignobles bourguignons et ceux du Rhône, constitue une situation intéressante. La partie nord (de Chaintré à Villefranche sur Saône) est davantage contaminée par le GLRaV-1, alors que la partie sud (de Villefranche sur Saône à Lyon) est plutôt concernée par le GLRaV-3 (Desperrier, 2002). Cette situation reflèterait la superposition des deux zones de contamination, entre le vignoble bourguignon majoritairement touché par le GLRaV-1, et les vignobles du Rhône et du sud-est de la France, principalement concernés par le GLRaV-3. Les deux dernières grandes régions viticoles, Bordelais et Val de Loire, sont majoritairement touchées par le GLRaV-2, espèce virale pour laquelle aucun vecteur n'a encore été identifié. Cette contamination est par conséquent jugée beaucoup moins préoccupante dans ces régions, aucune diffusion naturelle n'ayant été signalée au vignoble (M.-C. Dufour, Chambre d'Agriculture de Gironde, communication personnelle). Pourtant, certaines régions viticoles du Val de Loire sont touchées par les GLRaV-1 et -3. Un diagnostic sanitaire effectué sur un réseau de parcelles plantées en 'Gamay' dans diverses régions françaises montre ainsi que les vignobles ligériens des côtes du Roannais et du Forez ainsi que de Saint-Pourçain sont largement contaminés par les GLRaV-1 et -3 alors que les vignes testées en Touraine présentent un aspect sanitaire très satisfaisant (4 % de cep seulement contaminés par le GLRaV-1 ou -3, et 3 % par le GLRaV-2) (Desperrier et Séréno, 2012).

## II. Démarche expérimentale

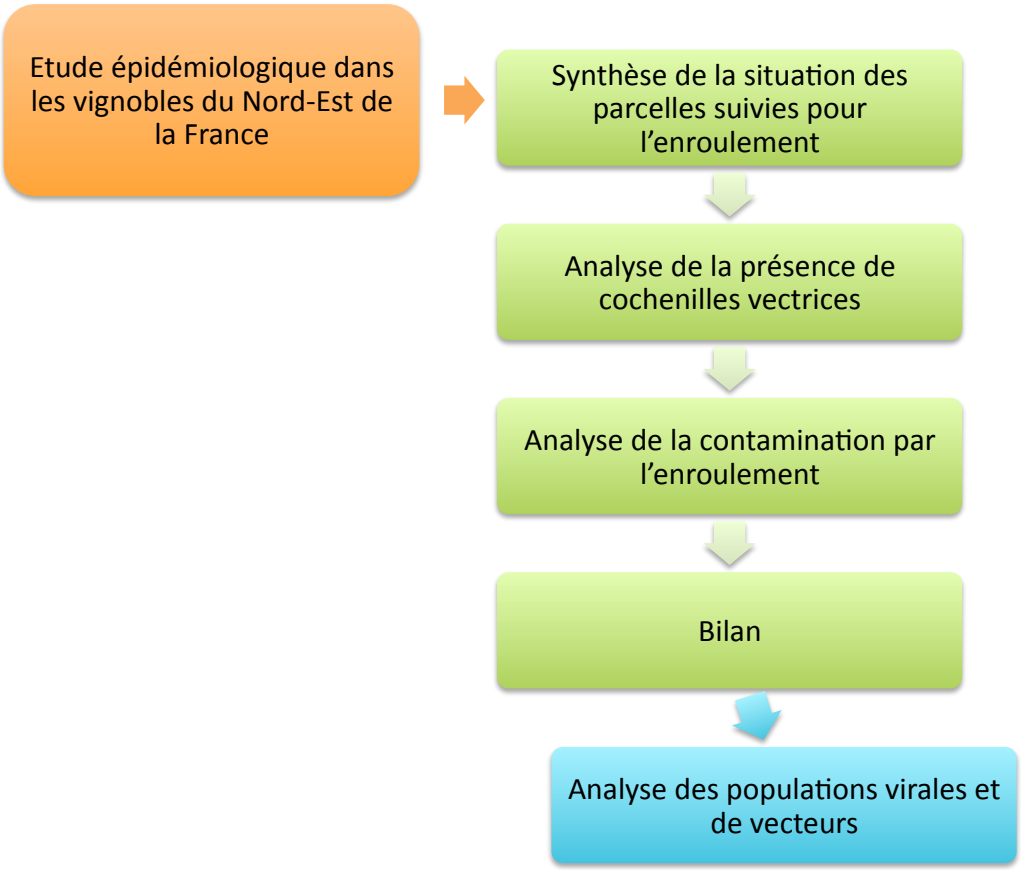



**Figure 20. L'étude épidémiologique s'articule en quatre étapes principales, correspondant aux parties de ce chapitre 4. Quatre parcelles d'étude ont été sélectionnées parmi un réseau de parcelles viticoles suivies dans le nord-est de la France. La présence de cochenilles vectrices y a été étudiée afin d'apporter les éléments nécessaires à l'analyse de la contamination par l'enroulement. D'après les résultats obtenus, nous avons ouvert notre étude sur l'examen de la diversité au sein d'une population virale, ainsi qu'au sein d'une espèce de cochenille vectrice. Ces deux thématiques de recherches sont présentées dans le chapitre 5.**

## III. Travaux préparatoires

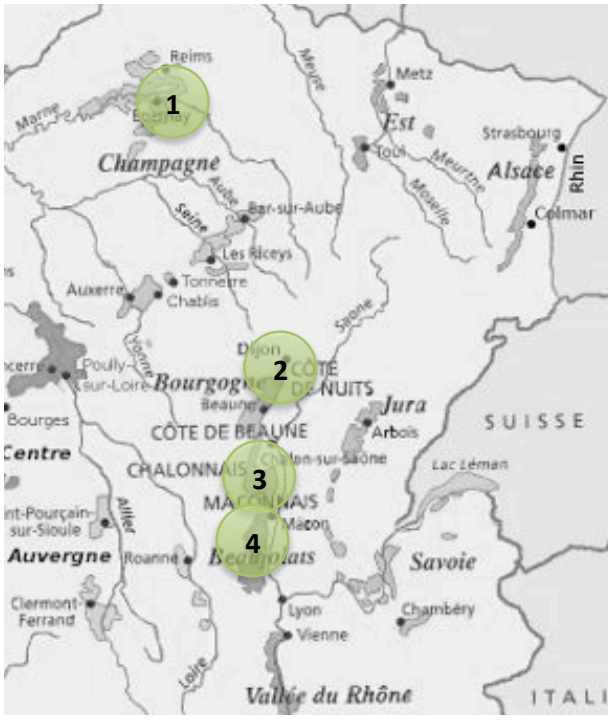
### III.1. Synthèse du statut sanitaire d'un réseau de parcelles viticoles

Pour cette étude épidémiologique, nous nous sommes basés sur un réseau de 70 parcelles ayant fait l'objet de suivis vis à vis de l'enroulement viral. Divers organismes, notamment le CIVC, la Sicarex Beaujolais et l'ENTAV, ont effectué des notations de symptômes d'enroulement viral, des diagnostics sérologiques et des relevés préliminaires de cochenilles entre 1998 et 2005. Les données disponibles sur ces parcelles situées en Alsace, Bourgogne, Champagne, ainsi que dans le Rhône ont donc été rassemblées auprès de chaque organisme afin d'être synthétisées (tableau de synthèse en Annexe 4).

## III.2. Présentation des parcelles d'étude

L'étude épidémiologique s'est déroulée sur quatre parcelles, choisies pour faire l'objet de suivis pluriannuels de l'enroulement viral et des populations de cochenilles présentes. Chacun des sites d'étude a été sélectionné dans un vignoble différent du nord-est de la France (Figure 21), selon trois critères principaux :

- la connaissance de l'état sanitaire initial du matériel végétal à la plantation,
- l'existence d'un suivi de l'épidémie d'enroulement dès la première apparition de symptômes,
- l'existence d'observations préliminaires sur la présence de cochenilles.




**1 : Parcelle du domaine de Plumecoq, Chouilly (51), Côte des blancs, Champagne**
Plantée en 1996 par le CIVC. Tests ELISA et relevés de symptômes entre 1999 et 2001

**2 : Parcelle de Marsannay-la-Côte (21), Côte de Nuits, Bourgogne**
Plantée en 1997 et 1998 par INRA de Dijon, suivie pour l'étude flavescence dorée et enroulement de 1998 à 2005

**3 : Parcelle de Bonzon, Saint-Gengoux-de-Scissé (71), Mâconnais, Bourgogne**
Plantée par la Chambre d'Agriculture de Saône-et-Loire en 2001, suivi enroulement de 2003 à 2004

**4 : Parcelle du Château de la Chaize, Odenas (69), Brouilly, Beaujolais**
Plantée en 1991, suivi enroulement entre 1997 et 2000 par la SICAREX Beaujolais

**Figure 21. Localisation géographique des quatre parcelles d'étude. Crédit photo : http://www.vignobles-de-france.fr**

Les quatre fiches descriptives suivantes résument les caractéristiques de chaque parcelle d'étude.

# Parcelle de Plumecoq

## Localisation géographique

*Divisions administratives :* Champagne, Marne, Chouilly
*Vignoble* : Côte des blancs
*GPS :* 49.0116732 N – 3.982555 W

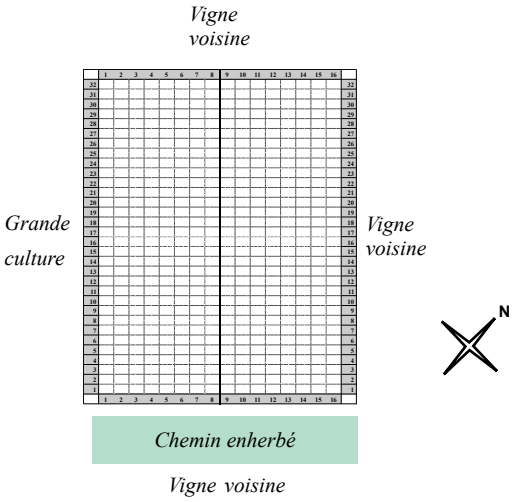
## Caractéristiques

*Année de plantation :* 1996
*Surface:* 7 ares
*Nombre de ceps :* 512
*Rangs x souches :* 16 rangs x 32 souches
*Orientation des rangs :* NO-SE
*Distance entre souches* : 1,2 m
*Distance entre rangs :* 1,1 m

## Matériel végétal

*Porte-greffe* : 41B clone 87
*Cépages :* 'Pinot noir' clone 743, 'Pinot meunier' clone 865

## Schéma



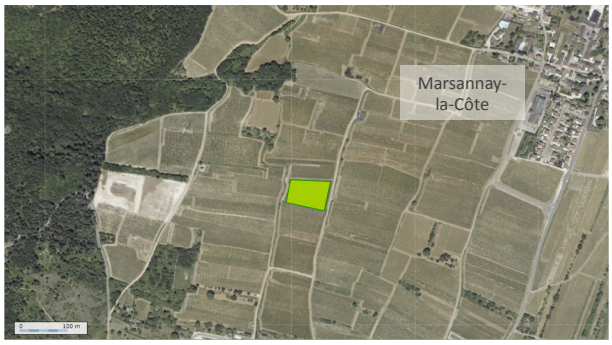

## Description

La parcelle d'étude se situe dans le domaine de Plumecoq, au sein du vignoble expérimental du Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne (Epernay). Les ceps ont été plantés dans le sens de la pente, la partie basse étant longée par un chemin enherbé avec diverses espèces de graminées séparant les rangs suivants d'environ 5 mètres. La partie S-0 de la parcelle est longée par un champ dédié aux grandes cultures. La parcelle a fait l'objet d'un suivi enroulement à partir de 1999.

# Parcelle de Marsannay-la-Côte

## Localisation géographique

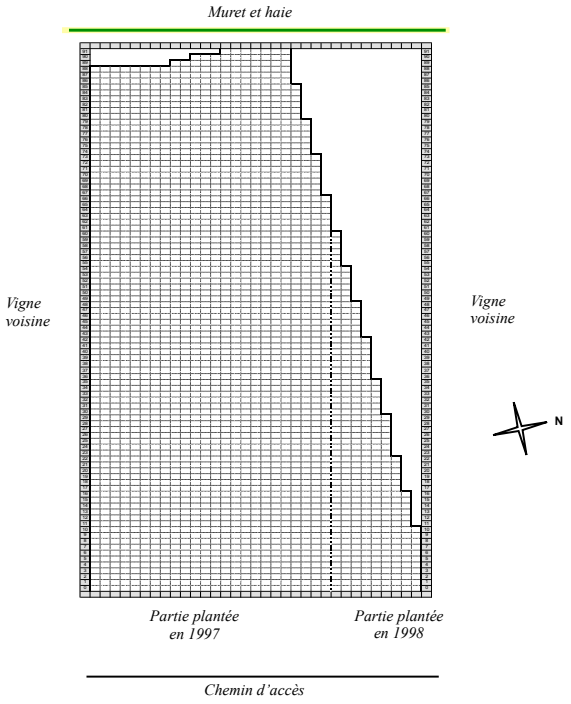
*Divisions administratives :* Bourgogne, Côte d'Or, Marsannay-la-Côte
*Vignoble :* Côte de Nuits
*GPS :* 47.265726 N – 4.978437 W




## Caractéristiques

*Années de plantation :* 1997, 1998
*Surface:* 20 ares
*Nombre de ceps :* 2435
*Rangs x souches :* 32 rangs x 91 souches
*Orientation des rangs :* O-E
*Distance entre souches* : 0,7 m
*Distance entre rangs :* 1 m

## Schéma




## Matériel végétal

*Porte-greffe* : 3309 C clone 144
*Cépages :* 'Pinot noir' clones 115 et 777

## Description

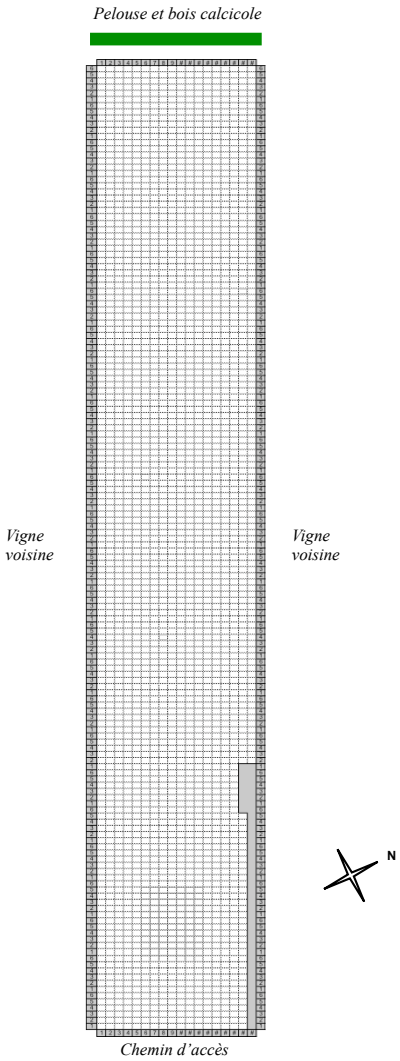
Cette parcelle, située dans la zone AOC d'appellation Marsannay village (Agi et Okimoto, 2005) a été suivie depuis sa plantation en 1996 pour l'étude flavescence dorée menée par l'INRA de Dijon. Les ceps ont ainsi fait l'objet d'une pression phytosanitaire importante en raison de cet essai (3 insecticides par année depuis la plantation jusqu'en 2006). La parcelle a été plantée avec des plants greffés-soudés provenant de l'Association Technique pour l'Amélioration de la Pépinière (ATAP) et de l'ENTAV. Dans le cadre de sa surveillance sanitaire globale, les symptômes d'enroulement ont été relevés entre 1998 et 2005, et appuyés par des tests sérologiques en 1999, 2000, 2001 et 2005. A l'extrémité ouest de la parcelle, on trouve une haie mixte composée essentiellement de lierre, de ronce, de cornouiller, et de plantes adventices annuelles et bisannuelles. Dans la partie est, se situe le chemin d'accès, puis, en contrebas, d'autre parcelles de 'Pinot noir' en continu jusqu'à la route D 974.

# Parcelle de Bonzon

## Localisation géographique

*Divisions administratives :* Bourgogne, Saône-et-Loire, Saint-Gengoux-de-Scissé, Bonzon.
*Vignoble :* Mâconnais
*GPS :* 46.477400 N – 4.777722 W

## Schéma




## Caractéristiques

*Année de plantation :* 2001
*Surface:* 36 ares
*Nombre de ceps :* 2758
*Rangs x souches :* 18 rangs x 156 souches
*Orientation des rangs :* ONO-ESE
*Distance entre souches* : 1 m
*Distance entre rangs :* 1,3 m

## Matériel végétal

*Porte-greffe* : 3309 C clone 143
*Cépages :* 'Pinot noir' clones 115 et 667, 828

## Description

La parcelle du lieu dit 'Bonzon' a été plantée par la Chambre d'Agriculture de Saône-et-Loire avec du matériel de base fourni par le Groupement Régional d'Amélioration et de Prémultiplication de la Vigne (GRAPVI) afin de disposer de pieds-mères de greffons. Les 2758 ceps ont été introduits dans un vignoble mixte de 'Chardonnay' et 'Pinot noir'. Les 18 rangs sont plantés dans le sens de la pente. À l'extrémité haute, on trouve une végétation typique de pelouse calcaire (Genévrier, chêne blanc, buis, anémone pulsatile, hélianthème). En contrebas, un chemin d'accès sépare la parcelle avec une parcelle de 'Chardonnay' appartenant au même propriétaire.

# Parcelle d' Odenas

## Localisation géographique

*Divisions administratives :* Rhône-Alpes, Rhône, Odenas
*Vignoble :* Beaujolais, Brouilly
*GPS :* 46.09044 N – 4.638741 W

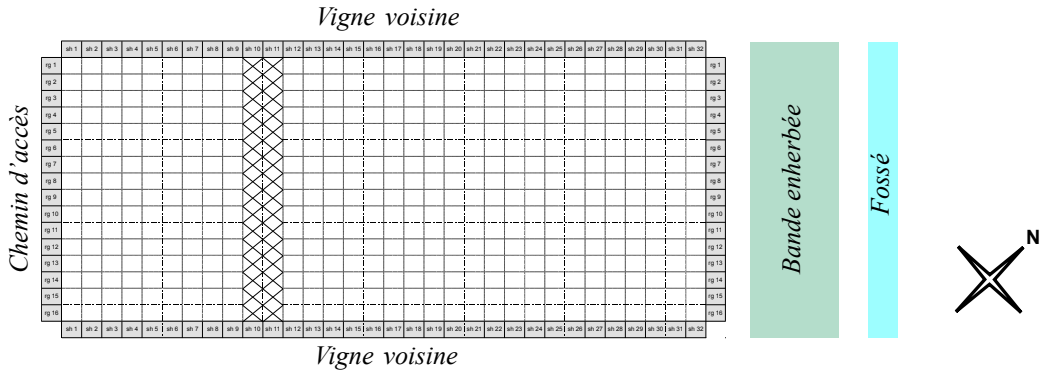
## Caractéristiques

*Année de plantation :* 1991
*Surface:* 5 ares
*Nombre de ceps :* 480
*Rangs x souches :* 30 rangs x 16 souches
*Orientation des rangs :* ONO-ESE
*Distance entre souches* : 1 m
*Distance entre rangs :* 1 m

## Matériel végétal

*Porte-greffe* : 101.14 clone 87
*Cépages :* 'Gamay' clone 282

## Schéma




## Description

La parcelle d'Odenas se situe près du Château de la Chaize, dans la zone d'appellation Brouilly. La parcelle élémentaire d'étude constitue une partie réduite par rapport à la parcelle exploitée par le viticulteur. La totalité des côtés de la parcelle est ainsi bordée de vignes, à l'exception de la partie ENE délimitée par une bordure enherbée avec plusieurs espèces de graminées. Les rangs 10 et 11 ont été arrachés en 2001. Cette parcelle a fait l'objet d'un suivi enroulement depuis 1997 par la SICAREX Beaujolais.

# IV. Analyse de la présence de cochenilles vectrices sur quatre parcelles viticoles

## IV.1. ARTICLE 2 : Monitoring of grapevine scale insects in leafroll-infected vineyards of northeastern France.

Publication soumise dans le *Bulletin of Entomological Research*, 27 février 2012.

### *Etat de la question*

Les cochenilles représentent des ravageurs importants des cultures dans le monde entier. Ces insectes engendrent des dégâts directs par ponction de sève sur le végétal hôte, mais également indirects à cause de la transmission de maladies virales. L'une d'entre elles, l'enroulement viral de la vigne, fait partie des maladies les plus préjudiciables dans les vignobles mondiaux. De nombreuses espèces de cochenilles farineuses et de cochenilles à coque ont été montrées capables de transmettre en conditions expérimentales un, ou plusieurs *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV). En France, neuf espèces de cochenilles sont répertoriées sur la vigne (Sforza, 2008a). Cinq espèces de cochenilles sont connues sur la vigne dans le nord-est du pays, *Neopulvinaria innumerabilis* (Rathvon), *Parthenolecanium corni* (Bouché), *Pulvinaria vitis* (Linné), *Heliococcus bohemicus* Sulc, et *Phenacoccus aceris* (Signoret), et sont capables de transmettre l'enroulement viral.

Des cas de diffusion naturelle de la maladie ont été observés dans de nombreux pays, ce qui rend ainsi l'étude des cochenilles vectrices essentielle pour comprendre la dynamique épidémique de l'enroulement au vignoble.

La viticulture représente un secteur économiquement important en France. La Bourgogne et la Champagne, deux régions leaders du secteur viticole en terme d'exportation et d'image, constituent deux régions très touchées par l'épidémie d'enroulement viral. Depuis une première étude sur les cochenilles au début des années 2000 (Sforza et al., 2003a), aucune recherche n'avait été entreprise dans ces vignobles pour tenter de comprendre la situation.

### *Objectifs de l'étude*

Cet article décrit une étude de deux années sur un réseau de parcelles dans le nord-est de la France. La présence de cochenilles a ainsi été suivie dans quatre parcelles viticoles atteintes par l'enroulement viral, afin d'évaluer la diversité spécifique et l'abondance des populations de chaque espèce sur chacun des sites. Les relevés effectués cep par cep visent ainsi à établir une représentation spatiale des zones infestées afin d'apporter les éléments indispensables à la compréhension de l'épidémie d'enroulement dans cette région de la France.

### *Résultats principaux*

- Présence de cochenille sur la vigne

Les cochenilles *P. corni, P. vitis, H. bohemicus* et *P. aceris* ont été identifiées sur la vigne entre 2006 et 2007. Les parcelles présentent une diversité spécifique et des taux d'infestation différents. A Bonzon, 68 % des vignes ont été observées avec au moins un individu sur les deux années d'étude.

Les quatre espèces de cochenilles y sont présentes avec une prédominance de *P. aceris*. A Odenas, 46 % des ceps sont infestés par au moins une des quatre espèces de cochenille présentes sur le site.

A Plumecoq, on ne trouve que *P. corni* et *P. vitis*, qui infestent jusqu'à 35 % des ceps. Aucune cochenille n'ayant été observée à Marsannay-la-Côte pendant les relevés effectués au printemps, les deux campagnes supplémentaires réalisées en été ont par la suite révélé la présence sporadique de *P. aceris*.

- Distribution spatiale sur les parcelles

La présence des espèces de cochenilles sur les ceps a été localisée sur plan, puis la répartition spatiale des ceps infestés a été analysée pour les quatre parcelles d'étude. A Bonzon, on observe une concentration en foyer de *P. aceris* principalement dans des foyers situés en bordure des parcelles contigües. A Odenas et à Plumecoq, l'analyse spatiale des ceps infestés montre une agrégation significative en foyer des ceps infestés par *H. bohemicus* et *P. corni* respectivement. Bien que la population de *P. aceris* ne se soit pas établie durablement sur vigne à Marsannay-la-Côte, l'analyse spatiale prouve la présence d'un foyer de ceps touchés par cette cochenille.

## *Conclusion*

La diversité spécifique des cochenilles observées sur la vigne est en accord avec les précédentes études effectuées dans ces régions. Les parcelles d'étude montrent des caractéristiques diverses en termes d'abondance et de distribution spatiale selon les espèces de cochenilles en présence. A Plumecoq, la parcelle est touchée essentiellement par des foyers de *P. corni,* même si peu d'individus sont retrouvés sur les baguettes. En revanche, on trouve les quatre espèces de cochenille à Odenas et Bonzon où *H. bohemicus* et *P. aceris* constituent des colonies importantes.

Cette étude met en évidence les modes de dispersion de ces insectes. La répartition en foyer, le long des bordures des parcelles, en particulier à Bonzon, prouve une dispersion à courte distance. Les vignes ont été infestées de proche en proche, soit par dispersion active, soit par dispersion passive par anémochorie ou par transport via fourmis. La situation de la parcelle de Marsannay-la-Côte illustre bien la dispersion des larves de cochenille à plus longue distance par le vent. Une colonie de *P. aceris* implantée dans une haie en bordure est ainsi à l'origine de la dissémination des larves L1 sur une partie des ceps de la parcelle. Ainsi, la présence de *P. aceris* est remarquable à Bonzon, tant par le nombre de cochenilles par cep, que par sa répartition en foyers d'infestation le long des deux parcelles contigües.

## *Perspectives*

Le bassin viticole dans lequel la parcelle de Bonzon est implantée est actuellement sévèrement touché par l'enroulement viral de la vigne, comme en témoigne la présence de nombreux foyers de maladie avec des ceps exprimant des symptômes typiques. Cette structuration en foyers des zones infectées fait fortement suspecter la responsabilité de cochenilles vectrices dans la diffusion naturelle de la maladie. Récemment (Chapitre 3), la cochenille *P. aceris* a été montrée capable de transmettre efficacement plusieurs *Ampelovirus* et *Vitivirus*, en particulier les GLRaV-1, -3, et GVA. Une analyse épidémiologique détaillée des parcelles s'impose donc afin d'étudier le rôle des cochenilles dans la dispersion de l'enroulement viral.

ARTICLE 2

# Monitoring of grapevine scale insects in leafroll-infected vineyards of northeastern France

**Jean Le Maguet[1,2,3], Jean-Jacques Fuchs[2], Etienne Herrbach[1,2], Olivier Lemaire[1,2]**

[1]INRA, UMR 1131 SVQV, F- 68000 Colmar, France, [2]Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France,

[3]Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne, F-51200 Epernay, France.

**Publication soumise dans le *Bulletin of Entomological Research*, 27 février 2012.**

# Monitoring of grapevine scale insects in leafroll-infected vineyards of northeastern France

**Jean Le Maguet[1,2]*, Jean-Jacques Fuchs[1], Etienne Herrbach[1], Olivier Lemaire[1]**
[1]INRA, UMR 1131 SVQV, F- 68000 Colmar, France.
[2]Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne, F-51200 Epernay, France.

## Abstract

Scale insects are major pests of crops worldwide. They cause severe damage to grapevines by reducing yield, depressing fruit quality, and vectoring viral diseases. Some species of mealybug and soft scale are able to transmit and to spread rapidly Grapevine leafroll-disease (GLRD) in vineyards. Knowledge of the species present on grapevines is also essential to understand leafroll epidemic in vineyards and to adapt the control strategies. A monitoring of scale insects was carried out on every vine of four leafroll-infected vineyards in northeastern France. Four scale insect species, all being leafroll-viruses vectors, were commonly observed: *Parthenolecanium corni* (Bouché), *Pulvinaria vitis* (Linné), *Heliococcus bohemicus* Sulc and *Phenacoccus aceris* (Signoret). Three plots showed high scale insect populations, particularly Bonzon where *P. aceris* was present on more than a third of vines. The spatial analysis showed the aggregative pattern of scale insects distribution in each study plots and two specific patterns of *P. aceris* infestation were distinguished. In Marsannay-la-Côte vineyard, windblown crawlers were present, but the mealybug was not performing its entire life cycle on grapevine. In Bonzon, the high concentration of *P. aceris* on the border of the plot showed the dissemination of the mealybug from the two contiguous vineyards. The high prevalence of GLRD in Bonzon and its occurrence in patches suggested also that this mealybug have played a major role in the contamination of this vineyard.

*Corresponding author: jean.le-maguet@orange.fr

**Running title:** Monitoring of scale insects in French vineyard.
**Key words:** Mealybug, Soft scale, *Phenacoccus aceris*, aggregative distribution, Grapevine Leafroll Disease.

## Introduction

Scale insects (Hemiptera: Coccoidea) are sap-sucking insects with a worldwide distribution across all zoogeographical regions. Species of three main families (Coccidae: soft scales, Diaspididae: armoured scales, Pseudococcidae: mealybugs) cause great economic losses on many crops, notably on fruit and nut trees, woody ornamentals, and grapevines (Kosztarab and Kozar, 1988). Adult females are between 1 and 5 mm long and emerge from second or third instar nymphs depending on the species (Kosztarab and Kozar, 1988). Scale insects exhibit a characteristic sexual dimorphism: males are winged, non-feeding, and are short-lived. Except some cases of parthenogenesis, most species reproduce sexually. Scale insects are polyphagous with both adult females and immature instars being detrimental to plant health (Bertin et al., 2010). Temperate climate predominant in Europe, allows generally scale insects a single non-overlapping generation per year limiting their infestation levels. Scale insects can inflict direct and indirect damages on the host plant. They negatively affect plant growth by removing phloem and injecting toxic saliva (Jahn et al., 2003). Additionally, their excretion of honeydew leads to growth of sooty mould on photosynthetic parts of the plants, reducing overall growth and thus primary production, particularly on heavily infested plants (Vranjic, 1997). More importantly, scale insects exert a major impact on various economic crops through the transmission of viral diseases, notably on grapevine (Sforza et al., 2003a). One of the most widespread and problematic viral diseases of grapevine worldwide is caused by Grapevine leafroll disease (GLRD) that is either transmitted by the propagation of infected plant material or by scale insect vectors (Boudon-Padieu et al., 2000b). Leafroll displays typical foliar symptoms consisting of a strong reddening of leaf blade, downward rolling of leaf-margins and an increase of leaf thickness (Martelli and Boudon-Padieu, 2006). This disease causes important losses to the worldwide wine industry and impacts all *Vitis vinifera* varieties by reducing yield and grape quality (Martelli and Boudon-Padieu, 2006).

Many species of soft scales and mealybugs have been shown to vector GLRD in experimental conditions (Golino et al., 2002; Sforza et al., 2003a; Mahfoudhi et al., 2009; Le Maguet et al., 2012b). In France, nine species of scale insects are commonly found on grapevine: the soft scales *Neopulvinaria innumerabilis* (Rathvon), *Parthenolecanium corni* (Bouché), *Parthenolecanium persicae* (Fabricius), *Pulvinaria vitis* (Linnaeus), the armoured scale *Targionia vitis* (Signoret), and the mealybugs *Heliococcus bohemicus* (Sulc), *Phenacoccus aceris* (Signoret), *Planococcus citri* (Risso), and *Planococcus ficus* (Signoret) (Sforza, 2000). Except *Pa. persicae and T. vitis,* all species have been shown to vector efficiently GLRD (Belli et al., 1994; Sforza et al., 2003a; Le Maguet et al., 2012b). Natural dispersal events observed worldwide make the studies on insect vectors essential to understand the disease dynamic in vineyards (Cabaleiro, 2009). Several approaches have been used to investigate the pattern of GLRD spread in relation with scale insects. In Spain, a long-term survey conducted on leafroll spread in several vineyards demonstrated the vectorial field transmission of GLRD by *Pl. citri* (Cabaleiro et al., 2008). In northwestern vineyards of Italy, the frequent detection of GLRD in adult females and nymphs of several mealybug species proved a high risk of natural transmission and disease spread in these regions (Bertin et al., 2010). In New-Zealand, the monitoring of a newly planted block enabled to propose three distinct methods for GLRD dispersal by *Pseudococcus longispinus* (Targioni & Tozzetti): natural crawling dispersal of infected mealybugs, human-assisted movement of crawlers, or aerial dispersal of infectious mealybugs (Charles et al., 2009).

Grapes represent one of the most economically important crops in France, with vineyards covering over about 800,000 hectares in 2010 (Agreste, 2010). Located in a semi-continental zone of the country, Burgundy and Champagne are two leading regions of the French wine industry in terms of international exports and renown.

However, these vineyards are currently severely affected by GLRD epidemic (Le Maguet et al., 2010a) and the cryptic ecology of scale insect vectors represents a recurrent problem in the management of the disease in vineyards. Since the survey of Sforza and colleagues (2003a), no information on grapevine-feeding scale insects has been reported in these regions. Grapevine is highly susceptible to mealybug-borne viruses but the ecology of GLRD transmission is not well understood. Furthermore, most of global research on grapevine scale insects and GLRD spread has been conducted in vineyards experiencing mild climates. The recent contribution on the vectoring capability of *P. aceris* suggested that each scale insect has its own biological characteristics and may explain particular features of the field spread of GLRD in vineyards (Le Maguet et al., 2012b).

This study reports a two-year monitoring conducted in a range of wine-growing regions of northeastern France. The scale insect diversity present on grapevine was monitored in four vineyards affected by GLRD to explore species composition and infestation levels. As it has been shown previously with other virus-mealybug complexes, the ecology of insect vector shapes the spatial distribution of the transmitted disease (Jahn et al., 2003). The main objective of this study was thus to investigate the distribution pattern of scale insects in each study plots, with the aim to shed light on the epidemiological characteristics of GLRD epidemic in northern vineyards of France.

## Material and Methods

### Study sites

The study plots of Plumecoq, Marsannay-la-Côte, Bonzon, and Odenas, all affected by GLRD, were located in different regions devoted to viticulture in northeastern France (figure 1). Characteristics of each vineyard are detailed in table 1. The four plots are entirely surrounded by other vineyards with exception of the southern border of Plumecoq (annual crop) and the western border of Bonzon (calcareous wood).

### Scale insects monitoring

Scale insect presence was first checked in the proximity of each study sites during the 2006 and 2007 springs. Either wild or cultivated perennials were examined on the slopes and hedges lining the plots. Each infested plant was photographed and specimens were collected and stored at -20°C in 70% ethanol for further identification.
The presence of scale insects on grapevine was monitored in every plot during spring in 2006 and 2007. This season was favourable for emerging scale insect observations and to identify the species according to a simple identification key based on morphological characters of young adult females (Sforza, 2000). Observations were made during the last week of april and in early may (23th april to 10th may), in accordance with the emergence period of insects. In each vineyard, we examined every grapevine individual by checking all parts of the plant: buds, young leaves, canes and vine stock. A 5-minutes timed count was systematically applied to each vine to ensure an efficient inspection (Geiger et al., 2001). The specimen number denoting for each scale insects species was recorded in XY matrix for each plot. The presence of ants in colonies of scale insects was also systematically recorded. A representative sample of each scale insect species was collected and stored at -20 °C in 70% ethanol for further slide-mounting to ascertain afterwards their taxonomic status. Scale insects identification was confirmed by J.-F. Germain (Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Campus International de Baillarguet, Montferrier-sur-Lez, France) with the taxonomic keys of (Kosztarab and Kozar, 1988; Hodgson, 1994; Danzig, 2007).

### Spatial distribution of scale insects in study plots

The spatial distribution of scale insect species in each plot was illustrated on grid plans for each year. Each vine was showed by a square and coloured according to its infestation status; absent: blank, present: filled in (colour depending on the species). In case of co-infestation on a vine, only the more abundant scale insect species was displayed. The pattern of the spatial distribution of scale insect species was analyzed in 2006 and 2007 in every study plot. Permutation tests for spatial independence were performed to verify whether each species was clustered in aggregates or randomly distributed in a plot. This non-parametric method, based on Monte Carlo test, can be exploited to study binary data from biological investigations (Peyrard et al., 2006). For all tests, we verified the randomization of data with the independence hypothesis $H_0$: the infested vines are independent and identically distributed (i.i.d.). The statistic enabling the evaluation of the spatial dependency is a variogram, which is compared to a confidence interval constructed with the random permutation of all data (Gaetan and Guyon, 2008). The numerical data available in XY matrix system for each scale insect species were first transformed into presence-absence binary data matrix (0: absence, 1: presence). Analyses were then conducted using packages designed previously by Peyrard et al. (2005) and running on R software (Version 2.13.0, R Development Core Team, 2011).

## Results

### Scale insects monitoring

*Prevalence of scale insects on border vegetation*

A total of 29 perennials species were checked for scale insect presence during investigations of 2006 and 2007 (table 2), but only few different species were present on these plants. In Plumecoq, some specimens of *Parthenolecanium corni* have been identified on *Cornus sanguinea*. In Marsannay-la-Côte, *P. corni, Phenacoccus aceris,* and *Unapsis euonymi* were detected both years respectively on *C. sanguinea*, *Hedera helix*, and *Euonymus europeanus*. The large colony of *P. aceris* was there observed on a slope colonized by *H. helix* in close proximity to vine rows. In Bonzon, *P. corni* was widespread on *Viburnum lantana* situated in the woody edge close to grapevine. No scale insects species were observed in the surrounding vegetation of Odenas vineyard. We believe that this is a conservative estimate as singular or small population may be missed in the observations due to the difficulties associated with detection of such small organisms, especially when hidden on bordering plants.

*Prevalence of scale insects on vines*

The soft scales *Parthenolecanium corni* and *Pulvinaria vitis* and the mealybugs *Heliococcus bohemicus* and *Phenacoccus aceris* were identified at young adult female stage on vines. Few differences between study sites and years were noticed concerning the biology and the emergence period of insects, except in Marsannay-la-Côte plot where no insects were recorded on grapevine in spring. Moreover, neither exuviae, nor remnant female tests were noticed on canes or under bark in this plot. Additional monitoring were consequently carried out in summers and enabled to observe first instar nymphs of scale insects on upper leaves of some vines.

The infestation levels of the study sites were compared between years according to scale insects species present (figure 2). The number of infested vines was greater in 2007 for every plot (7% increase in Plumecoq, 4% in Marsannay-la-Côte, 10% in Bonzon and 2% in Odenas). The plots of Plumecoq, Bonzon and Odenas were significantly infested by various species, whereas in Marsannay-la-Côte only few individuals were detected (table 3). The percentage of vines infested by soft scales in Plumecoq reached 28% and 35% in 2006 and 2007 respectively. Bonzon was the most heavily infested plot with 49% and 59% of vines infested by scale insects in 2006 and 2007 respectively. The rate of vines infested once reached there a total of 68%. In Odenas, about 40% of vines were colonized yearly, with an overall amount of 46% of vines observed once with scale insects.
The infestation characteristics (predominant scale insect species, co-infestation of several scale insects species on a single vine plant, location on vine plant, presence of groups or isolated individual, association with ants) were different according to the study sites. The soft scale *P. corni* was present in the four study plots and was the predominant species found in Plumecoq (table 3). Except in Marsannay-la-Côte plot, this species was detected mainly on vine canes and under bark, in groups of 5 to 20 young adult females. In Bonzon, the groups of *P. corni* were regularly observed in mixture on a single vine with *H. bohemicus* and particularly in company with *P. aceris* groups under vine bark (table 3). *Pulvinaria. vitis,* was rarely detected in the study sites: young adult females were observed occasionally on vine stocks in small groups hidden under bark. The mealybug *H. bohemicus* has been identified on many vines of Bonzon and Odenas. In Bonzon, only isolated single individuals were feeding on canes and buds, whereas in Odenas vines were infested by groups associated with different ants species and located around buds and under bark. In both vineyards, *H. bohemicus* was found along with the other species, and especially in Bonzon with *P. aceris* (table 3). The mealybug *P. aceris* was the most abundant and widespread species found in Bonzon. Not only the mealybug was there identified on many vines, but infested also each vine in aggregates of 40 or more young adult females. The mealybugs were feeding especially at the top of vine stocks, and in cracks and crevices under bark. *Phenacoccus aceris* was also occasionally identified on vines in Odenas and Marsannay-la-Côte but in much lower abundance. Among scale insects species, *P. aceris* was the most closely associated with ant species. The relationships with ants resulted in frequent observations of mealybug transport on wires along rows, and evidences of defense activities against predators especially ladybird beetles (Coccinellidae). Protective covers made of soil particles were regularly noticed over mealybug aggregates: tunnels were built by ants from the floor to as far as the top of vine stock where ants provided shelter for mealybug rearing, and fed on honeydew in return.

**Spatial distribution of scale insects in study plots**

*Mapping of scale insects distribution*

The location of vines found with scale insects is illustrated on grid plans established for each year and every study plots. In Plumecoq, the location of vines found with soft scales was fairly constant throughout the monitoring (figure 3a). *Parthenolecanium corni* was spread in the whole plot but was rather clustered in a patch limited in the northern rows. Contrary to the three other plots, grid plans of Marsannay-la-Côte plot were established from the summer monitoring on crawlers (figure 3b). We noticed that vines with *Phenacoccus aceris* were concentrated in 2007 on the western border of the plot. In Bonzon, *P. aceris* was spread throughout the plot, and particularly concentrated in specific areas located near the southern and northern borders. Such patches of *P. aceris* infested vines continued to increase in 2007 (figure 3c).
The other mealybug species, *H. bohemicus* was widespread throughout the plot, but was distributed randomly. Except heavily infested *P. aceris* patches, vines found with mealybugs in 2007 were not necessarily the same ones as those previously discovered in 2006. The concentration of *P. aceris* on the edge of Bonzon and Marsannay-la-Côte vineyard suggested the high prevalence of this mealybug species on bordering plants around the plots. In Odenas, the location of vines with scale insects was consistent during both years (figure 3d): vines infested by a given species in 2006 were also infested in 2007 by the same species. The plans of Odenas show the predominance of *H. bohemicus* infestation, which is clustered on vines located in the southern rows.

*Aggregation analysis*

Monte Carlo tests were performed to investigate whether each scale insect species was clustered in aggregates or randomly distributed in a plot. Each Monte Carlo test was performed with 200 permutations for distance d=20. Global permutations were performed on XY binary presence-absence data matrices of a given scale insect species. The spatial dependency between vines with scale insects was tested for both monitoring years for each species present in every plot. For each test, the $H_0$ hypothesis was rejected, i.e. aggregative pattern was significant, when the variogram (statistic calculated on observed data) was outside the confidence interval delimited by Monte Carlo confidence levels of 2.5% and 97.5% (table 3). In Plumecoq, the variogram calculated on the observations of *Parthenolecanium corni* is out of the confidence region below a distance d=6, which confirmed that this soft scale was aggregated in patches on the plot (figure 4a). As expected in Marsannay-la-Côte, the test of spatial independence on the distribution of *Phenacoccus aceris* was statistically significant for aggregation in 2007 but also in 2006 (figure 4b and 4c). The significance of the aggregation of *P. aceris* was much lower in 2006, as was shown by the variogram. This was correlated with the erratic distribution pattern of the mealybug in this year (figure 3b). The spatial distribution of three scale insect species found on grapevine in 2006 in Bonzon was also analyzed. The variograms obtained for the distribution analysis of *P. corni* and *H. bohemicus* were inside the confidence interval and consequently showed that the infested vines were i.i.d. (figures 4d and 4e). Conversely, permutation tests confirmed that the aggregation of *P. aceris* in this plot was highly significant (figures 4f and 4g). The variograms obtained were indeed clearly outside the confidence interval for both years. In Odenas, the distribution into a patch of vines of *H. bohemicus* was confirmed by the spatial analysis. Since the variogram of observed data is outside the confidence interval for distances below d=8, the aggregation of vines infested by this mealybug is significant (figure 4h). The spatial statistics have thus confirmed for the four plots the patterns of scale insects distribution displayed by the mapping of infested vines.

**Discussion**

This work allowed a comprehensive comparison of the diversity, the abundance, and the distribution patterns of the scale insect fauna present in the vineyards in northeastern France. Among the nine species known on grapevine in France (Sforza, 2000), the soft scales *Parthenolecanium corni* and *Pulvinaria vitis* and the mealybugs *Heliococcus bohemicus* and *Phenacoccus aceris* were reported in this study. We found that vines of each plot were predominantly colonized by a specific scale insect species. The mapping of infested vines distribution, associated to a statistical spatial analysis of scale insects, enabled to assess the aggregated patterns of soft scale or mealybug in each plot, and to examine their dissemination from bordering vineyards or hedges.

The diversity of scale insects found in the different vine growing regions is in agreement with previous sampling made by Sforza and colleagues (2003a). Only soft scales have been observed in Champagne (plot of Plumecoq) whereas plots located more in the south such as those in Burgundy and Beaujolais, were additionally infested by the mealybugs *H. bohemicus* and *P. aceris*. However, both mealybug species have been previously recorded nearby, (Sforza et al., 2003b), and *P. aceris* was recently detected in Champagne in apple orchards located near the vineyards (data not published). These mealybugs are also likely to be widespread in these regions and are therefore able to colonize vineyards up to the northern boundary of grapevine growing-area in France (line from Reims to Wissembourg). Surprisingly, the soft scale *Neopulvinaria innumerabilis* was not found during our monitoring. Described in France for the first time by (Canard, 1966) in 1966, its presence was confirmed in Burgundy in 1989 (Hodgson, 1994). This soft scale is known to occur occasionally in vineyards of Burgundy and Beaujolais, but is always reported at high levels involving a reduction of vine vigour and causing serious losses on the yield due to large volumes of honeydew production and the consequent sooty mould development (Danzig and Matile-Ferrrero, 1990). Although the adults of *N. innumerabilis* and *P. vitis* are sometimes difficult to distinguish due to similar morphological characteristics, our identification showed that only *P. vitis* was present in the study plots. The four scale insect species observed in our study sites have been also reported on grapevine during a previous survey carried out in Bad-Württemberg (Hoffmann, 2002b). This German region and northeastern of France undergo similar continental climates that select the more tolerant scale insect species. Thus, the survival of more thermophilic species, commonly infesting grapevine under mild climate, notably within the genus *Planococcus* or *Pseudococcus,* is also unlikely in the French northern vineyards.

In each plot, the diversity of species found on grapevine was not similar with that found in their surrounding vegetation. Although each scale insect species has a wide host range (Kosztarab and Kozar, 1988), some were found exclusively on grapevine and not in the wild border of the plots. It is unclear why some species, like *P. aceris* in Bonzon, or *H. bohemicus* in Odenas, were strictly associated with grapevine, whereas numerous plant genera present on the border of plots are known to be the hosts of both species. Intrinsic characteristics of vine biology, notably its abundant bark for overwintering insects, make probably grapevine more interesting for scale insects than other wild plants (Marotta and Tranfaglia, 1997).

Moreover, the cultivation of a crop involves the utilization of different practices such as pruning and fertilizing, which influence directly the physiology and growth of plants and their colonization by homoptereans (Vranjic, 1997). The continuous monoculture of grapevine may also advantages certain scale insect species on being locally adapted to vines. All of this may have consequently favoured the colonization of grapevine by sap-sucking organisms like scale insects.

Our monitoring allowed distinction between the infestation patterns of four vineyards, in terms of scale insect predominance, mix-population, abundance, location on vines and distribution pattern in the plot. Although this field monitoring was limited to a single period in the year, the systematic checking under bark of females, tests, and exuviae gave a representative picture of the distribution of each scale insect species (Geiger et al., 2001). The situation in Marsannay-la-Côte plot was different in comparison to the three other vineyards because only crawlers (*P. aceris*) were present on vines. The absence of mealybug exuviae or females aggregates on vine stock showed that this mealybug was not performing its entire life cycle on grapevine (Marotta and Tranfaglia, 1997), implying that crawlers have been disseminated from the edges of the vineyard. Interestingly, the common Ivy found to be heavily infested by *P. aceris* was located very closely to the patch of vines found with crawlers. This finding shows that windblown crawlers have been dispersed locally from the border to the adjoining vines of Marsannay-la-Côte plot. The local limitation of *P. aceris* population to the host-plant *H. helix* poses also the question of the existence of a distinct insect population within a same species. A genetic characterization and comparison of *P. aceris* populations in Marsannay-la-Côte and Bonzon could enable to address this hypothesis.

In the three other study plots, scale insects were largely spread, each vineyard being particularly infested with a predominant species. The location of vines infested with *P. corni* or *P. vitis* was almost identical throughout the two years monitoring in Plumecoq and Odenas. In contrary, *H. bohemicus* and *P. aceris* in Bonzon were found on different host vines (excepted in heavily infested patches) from one year to the next. These distinct distribution patterns illustrate the higher dispersal ability of adult stages of mealybugs compared to adults of soft scale species (Kosztarab and Kozar, 1988). Adult females of *H. bohemicus* or *P. aceris* can move slightly from vine to vine because they are mobile stages, whereas females of soft scales are settled on their host plant and do not move anymore until oviposition. The aggregative pattern of scale insect distribution along the edges the plots showed that the insects were disseminated from older neighbouring vines or nearby wild plants either by wind or by vineyard machinery (Greathead, 1975; Grasswitz and James, 2008).

One remarkable result in this monitoring was the abundance and the extensive spread of scale insects in the plot of Bonzon, notably *P. aceris*. This was the youngest plot among the four study vineyards but however the most infested by scale insects. This plot was planted between two older vineyards, in which population level was too low to induce obvious economic damages. In the absence of growth disorder of vine or high sooty mould development, no control program was carried out, that may explain the large spread of scale insects. Attendance of six ants species is well known for *P. aceris* (Schmutterer, 1952) implying that ants have certainly played a major role in its dissemination. These close relationships between insects could thus explain partially the specific distribution pattern of *P. aceris* in Bonzon vineyard, as has been observed for *Pl. ficus* in vineyards of South Africa (Mgocheki and Addison, 2010).

The apple mealybug *P. aceris* has been recently shown to be capable to vector a lot of grapevine infecting viruses (Le Maguet et al., 2012b). The large spread of this pest in Bonzon consequently leads to a high risk of leafroll transmission from vine to vine. Moreover, even if mealybugs are found at low populations on a vine, they represent a problematic pest in vineyards: low population level is actually needed to spread leafroll disease efficiently (Golino et al., 2008). Preliminary results obtained during a symptom survey indicated that GLRD was widespread in the vine-growing valley where Bonzon is located, and that many vineyards surrounding the study plot were heavily diseased (Le Maguet et al., 2009). The vineyard of Odenas was as well heavily diseased, unlike those of Plumecoq and Marsannay-la-Côte. Thus, the high prevalence of leafroll in Bonzon and Odenas associated with the presence of many mealybug or soft scale vectors implies that natural transmission of the disease is likely to happen. Symptoms of leafroll are commonly expressed in clusters of diseased vines (Cabaleiro, 2009). In addition, scale insects are known to have aggregative distribution due to its dispersal behavior (Nestel et al., 1995). Thus, the significant aggregated distribution of *P. aceris* is probably correlated with the presence of disease patches in the vineyard of Bonzon. Epidemiological studies in Spain, New Zealand and South Africa have described various vineyard contamination patterns according to mealybug infestation (Cabaleiro et al., 2008; Charles et al., 2009; Pietersen et al., 2009). However, the lack of information on vineyard history limits our ability to deduce the real origin and the pattern of the contamination in a plot. The high incidence of GLRD in French northern vineyards makes it essential to conduct further investigations to better understand the epidemiology of this disease in these regions.

Among results showed in our study, the plots of Marsannay-la-Côte and Bonzon appear to be appropriate models to explore in detail the field transmission of leafroll by scale insects. The findings exposed on scale insect vectors also provide significant clues in the comprehensive approach to understand leafroll epidemiology in French vineyards.

**Acknowledgements**

We thank Denis Clair, Jean-Michel Desperrier, Jocelyn Dureuil, and Géraldine Uriel for their collaboration with INRA, and all the grape growers who allowed us access to their properties. This research was supported by VINIFLHOR, the Université de Bourgogne, and the three French professional committees for viticulture: Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne, Epernay; Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne, Beaune; and Comité Interprofessionnel des Vins d'Alsace, Colmar.

**References**

**Agreste.** (2010). Surfaces, production, rendements (Bureau des Statistiques sur les Productions et les Comptabilités Agricoles ).

**Belli, G., Fortusini, A., Casati, P., Belli, L., Bianco, P.A., and Prati, S.** (1994). Transmission of a grapevine leafroll associated closterovirus by the scale insect Pulvinaria vitis L. *Riv. Pat. Veg.* **4,** 105- 108.

**Bertin, S., Cavalieri, V., Graziano, C., and Bosco, D.** (2010). Survey of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) vectors of Ampelovirus and Vitivirus in vineyards of northwestern Italy. *Phytoparasitica* **38,** 401-409.

**Boudon-Padieu, E., Ridé, M., and Walter, B.** (2000). L'enroulement viral. In *Maladies à virus, bactéries et phytoplasmes de la Vigne*, Féret, ed, pp. 47-55.

**Cabaleiro, C.** (2009). Current advances in the epidemiology of grapevine leafroll disease. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 264-268.

**Cabaleiro, C., Couceiro, C., Pereira, S., Cid, M., Barrasa, M., and Segura, A.** (2008). Spatial analysis of epidemics of *Grapevine leafroll associated virus-3*. *Eur. J. Plant Pathol.* **121,** 121-130.

**Canard, M.** (1966). Une Pulvinaire de la vigne, nouvelle pour la France : *Neopulvinaria imeretina* (Coccoidea coccidae). *Ann. Soc. Ent. Fr. (N.S.)* **2,** 189-197.

**Charles, J.G., Froud, K.J., van den Brink, R., and Allan, D.J.** (2009). Mealybugs and the spread of grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) in a New Zealand vineyard. *Australas. Plant Path.* **38,** 576-583.

**Danzig, E.M.** (2007). Mealybugs of the genus Heliococcus Sulc (Homoptera, Pseudococcidae) of the fauna of Russia and adjacent countries. *Entomol. Rev.* **87,** 988-1025.

**Danzig, E.M., and Matile-Ferrero, D.** (1990). *Neopulvinaria innumerabilis,* a pest of vine in Europe (Homoptera: Coccinea: Coccidae). In Sixth International Symposium of Scale Insects Studies (Kracov), pp. 131-132.

**Gaetan, C., and Guyon, X.** (2008). Statistics for spatial models. In *Spatial statistics and modeling*, Springer, ed, pp. 320.

**Geiger, C.A., Daane, K.M., Bentley, W., Yokota, G.Y., and Martin, L.A.** (2001). Sampling program for grape mealybugs impoves pest management. *Calif. Agric.* **55,** 19-27.

**Golino, D.A., Sim, S.T., Gill, R., and Rowhani, A.** (2002). California mealybugs can spread grapevine leafroll disease. *Calif. Agric.* **56,** 196-201.

**Grasswitz, T.R., and James, D.G.** (2008). Movement of grape mealybug, *Pseudococcus maritimus*, on and between host plants. *Entomol. Exp. Appl.* **129,** 268 - 275.

**Greathead, D.J.** (1975). Dispersal of the sugar-cane scale Aulacaspis tegalensis (Zhnt) (Hem. Diapsididae) by air currents. *Bull. entomol. Res.* **61,** 547-558.

**Hodgson, C.J.** (1994). The Scale Insects Family Coccidae: an identification Manual to genera (CAB international, Wallingford).

**Hoffmann, C.** (2002). Schildläuse im Weinbau und ihre Antagonisten.Thesis, Univ. Karlsruhe, pp 164.

**Jahn, G.C., Beardsley, J.W., and Gonzales-Hernandez, H.** (2003). A review of the association of ants with mealybug wilt disease of pineapple. *Proc. Hawaiian Entomol. Soc.* **36,** 9-28.

**Kosztarab, M., and Kozar, F.** (1988). Scale insect of central Europe (Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers).

**Le Maguet, J., Herrbach, E., and Lemaire, O.** (2010). L'enroulement viral de la vigne et la cochenille *Phenacoccus aceris*. *Phytoma. La Défense des Végétaux* **636,** 46-50.

**Le Maguet, J., Beuve, M., Herrbach, E., and Lemaire, O.** (2012). Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris*. *Phytopathology* **102,** 717-723.

**Le Maguet, J., Herrbach, E., Hommay, G., Beuve, M., Boudon-Padieu, E., and Lemaire, O.** (2009). Monitoring of Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1) dispersion by the mealybug

*Phenacoccus aceris*. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 283-284.

**Mahfoudhi, N., Digiaro, M., and Dhouibi, M.H.** (2009). Transmission of grapevine leafroll viruses by *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) and *Ceroplastes rusci* (Hemiptera: Coccidae). *Plant Dis.* **93,** 999-1002.

**Marotta, S., and Tranfaglia, A.** (1997). Seasonal history; diapause. In *Soft scale insects. Their biology, natural enemies, and control.*, Y. Ben-Dov and C.J. Hodgson, eds (Amsterdam & New York), pp. 343-350.

**Martelli, G.P., and Boudon-Padieu, E.** (2006). Directory of infectious diseases of grapevine and viroses and virus-like diseases of the grapevine. In *Bibliographic report 1998-2004* (Options méditerranéennes, Série B: Studies and Research, CIEHAM-IAMB), pp. 59-75.

**Mgocheki, N., and Addison, P.** (2010). Spatial distribution of ants (Hymenoptera: Formicidae), vine mealybugs and mealybug parasitoids in vineyards. *J. Appl. Entomol.* **134,** 285-295.

**Nestel, D., Cohen, H., Saphir, N., Klein, M., and Mendel, Z.** (1995). Spatial distribution of scale insects: comparative study using Taylor's power law. *Environ. Entomol.* **506-512**.

**Peyrard, N., Calonnec, A., Bonnot, F., and Chadoeuf, J.** (2005). Explorer un jeu de données sur grille par tests de permutation. *Revue de statistique appliquée* **53,** 59-78.

**Peyrard, N., Pellegrin, F., Chadoeuf, J., and Nandris, D.** (2006). Statistical analysis of the spatio-temporal dynamics of rubber tree (Hevea brasiliensis) trunk phloem necrosis: no evidence of pathogen transmission. *For. Path.* **36,** 360-371.

**Pietersen, G., Spreeth, N., Oosthuizen, T., Van Rensurg, A., D., L., Tooth, D., and Rossouw, N.** (2009). A case study of control of grapevine leafroll disease spread on Vergelegen Wine Estate, South Africa, 2002-2008. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 230-231.

**Schmutterer, H.** (1952). Die Ökologie der Cocciden (Homoptera, Coccoidea) Frankens. *Zeit. für angewandte Entomologie* **33,** 369-420.

**Sforza, R.** (2000). Les cochenilles sur la vigne: bio-éthologie, impact agronomique, lutte et prophylaxie. In *Ravageurs de la vigne*, Féret, ed (Bordeaux), pp. 130-150.

**Sforza, R., Boudon-Padieu, E., and Greif, C.** (2003a). New mealybug species vectoring Grapevine leafroll associated viruses -1 and -3 (GLRaV-1 and -3). *Eur. J. Plant Pathol.* **109,** 975-981.

**Sforza, R., Delvare, G., Sentenac, G., Kuntzmann, P., and Lanthiome, D.** (2003b). Inventaire et évaluation des antagonistes de cochenilles sur la vigne. *Phytoma. La Défense des Végétaux* **558,** 42-46.

**Vranjic, J.A.** (1997). Effects on Host Plant. In *Soft scale insects. Their biology, natural enemies, and control*, Y. Ben-Dov and C.J. Hodgson, eds, pp. 452.

**Tables**

Table 1. Main characteristics of the four study plots.

| Study plots | Plumecoq | Marsannay-la-Côte | Bonzon | Odenas |
|---|---|---|---|---|
| Region | Champagne | Burgundy | Burgundy | Beaujolais |
| Climate | Semi-Oceanic | Semi-Continental | Semi-Continental | Semi-Continental |
| GPS coordinates | 49.016732 N<br>3.982555 W | 47.265726 N<br>4.978437 W | 46.477400 N<br>4.777722 W | 46.09044 N<br>4.638741 W |
| Acreage, number of vines | 7 Ares, 512 vines | 20 Ares, 2435 vines | 36 Ares, 2758 vines | 5 Ares, 480 vines |
| Vine spacing | 1.2 m | 0.7 m | 1 m | 1 m |
| Row spacing | 1.1 m | 1 m | 1.3 m | 1 m |
| Row orientation | NW-SE | W-E | WNW-ESE | WNW-ESE |
| Year of planting | 1996 | 1997 | 2001 | 1991 |
| Cultivar | Pinot noir, Meunier | Pinot noir | Pinot noir | Gamay |
| Clones/Rootstock | 743/41B, 865/41B | 115,777/3309 | 115,667,828/3309 | 282/101.14 |

**Table 2.** List of the plant species checked for scale insects' presence
[a] N/A: not applicable
[b] Blank: no scale insect detected.

| Family | Genus, species | Common name | Plumecoq | Marsannay-la-Côte | Bonzon | Odenas |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Aceraceae* | *Acer campestre* | Common maple | N/A[a] | -[b] | - | N/A |
| *Adoxaceae* | *Viburnum lantana* | Cottoner | N/A | N/A | *Parthenolecanium corni* | N/A |
| *Araliaceae* | *Hedera helix* | Common ivy | - | *Phenacoccus aceris* | - | - |
| *Aquifoliaceae* | *Ilex aquifolium* | Common Holly | N/A | - | - | N/A |
| *Berberidaceae* | *Berberis vulgaris* | Common Barberry | N/A | - | N/A | N/A |
| *Buxaceae* | *Buxus sempervirens* | Common Box | N/A | - | - | N/A |
| *Caprifoliaceae* | *Lonicera periclymenum* | Common Honeysuckle | N/A | - | N/A | N/A |
| *Celastraceae* | *Euonymus europeaus* | Spindle Tree | N/A | *Unapsis euonymi* | N/A | N/A |
| *Cornaceae* | *Cornus mas* | Cornelian Cherry | N/A | N/A | - | N/A |
| | *Cornus sanguinea* | Common Dogwood | *Parthenolecanium corni* | *Parthenolecanium corni* | - | - |
| *Fabaceae* | *Robinia pseudo-acacia* | Locust Tree | N/A | N/A | - | N/A |
| *Fagaceae* | *Quercus pubescens* | Pubescent Oak | N/A | - | - | N/A |
| | *Quercus robur* | Common Oak | N/A | - | N/A | N/A |
| *Juglandaeae* | *Juglans regia* | Common Walnut | N/A | - | N/A | - |
| *Lamiaceae* | *Thymus serpyllum* | Wild Thyme | N/A | N/A | - | N/A |
| *Liliaceae* | *Ruscus aculeatus* | Butcher's Broom | N/A | - | - | - |
| *Oleaceae* | *Fraxinus excelsior* | Common Ash | N/A | - | N/A | - |
| | *Ligustrum vulgare* | Common Privet | N/A | - | - | N/A |
| *Pinaceae* | *Cedrus atlantica* | Atlas Cedar | N/A | N/A | N/A | - |
| | *Pinus nigra* | European black Pine | N/A | N/A | N/A | - |
| *Ranunculaceae* | *Clematis vitalba* | Old Man's Beard | - | - | - | - |
| *Rosaceae* | *Crataegus monogyna* | Common Hawthorn | - | - | - | - |
| | *Prunus avium* | Gean | N/A | - | N/A | N/A |
| | *Prunus persica* | Peech Tree | N/A | - | N/A | N/A |
| | *Prunus spinosa* | Sloe Tree | N/A | - | - | N/A |
| | *Pyrus piraster* | Wild Pear | N/A | - | - | N/A |
| | *Rosa canina* | Dog Rose | N/A | - | - | - |
| | *Rubus fruticosus* | Blackberry | - | - | - | - |
| *Salicaceae* | *Populus nigra* | Black Poplar | - | N/A | N/A | N/A |

**Table 3**. Percentages of vines with scale insects, or mixture of scale insects, obtained with the monitoring of each study plots in 2006 and 2007 and significance of Monte Carlo tests performed to test the spatial independence of infested vines according to each scale insect species. Pc: *Parthenolecanium corni*, Pv: *Pulvinaria vitis,* Hb: *Heliococcus bohemicus*, Pa: *Phenacoccus aceris*.

[a] N/A: not applicable

[b] S: significant spatial aggregation of infested vines

[c] i.i.d.: infested vines are independent and identically distributed

| | 2006 | | | | | | | 2007 | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % of infested vines | Pc | Pv | Hb | Pa | Pc + Pa | Pv +Hb | Hb +Pa | Pc | Pv | Hb | Pa | Pc + Pa | Pc +Hb | Pv +Hb | Hb +Pa |
| Plumecoq | 25.9% | 1.6% | N/A[a] | N/A | N/A | N/A | N/A | 33.9% | 1% | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Marsannay-la-Côte | 0.08% | N/A | N/A | 0.9% | 0% | N/A | N/A | 0% | N/A | N/A | 4.9% | 0% | N/A | N/A | N/A |
| Bonzon | 0.6% | 0.4% | 9.7% | 31.4% | 0.2% | 0.1% | 3.1% | 0.3% | 0% | 10.6% | 39.8% | 0.2% | 0.1% | 0% | 3.8% |
| Odenas | 4.5% | 1.5% | 32.2% | 2.8% | 0% | 0.2% | 0.2% | 5.7% | 1.7% | 31.6% | 2.5% | 0% | 0% | 0.2% | 0.8% |
| Spatial independence | Pc | Pv | Hb | Pa | | | | Pc | Pv | Hb | Pa | | | | |
| Plumecoq | **S**[b] | i.i.d.[c] | N/A | N/A | | | | **S** | i.i.d. | N/A | N/A | | | | |
| Marsannay-la-Côte | i.i.d. | N/A | N/A | i.i.d. | | | | i.i.d. | N/A | N/A | **S** | | | | |
| Bonzon | i.i.d. | i.i.d. | i.i.d. | **S** | | | | i.i.d. | i.i.d. | i.i.d. | **S** | | | | |
| Odenas | i.i.d. | i.i.d. | **S** | i.i.d. | | | | i.i.d. | i.i.d. | **S** | i.i.d. | | | | |

## Figures

**Figure 1.** Geographical location in France of the four study sites.

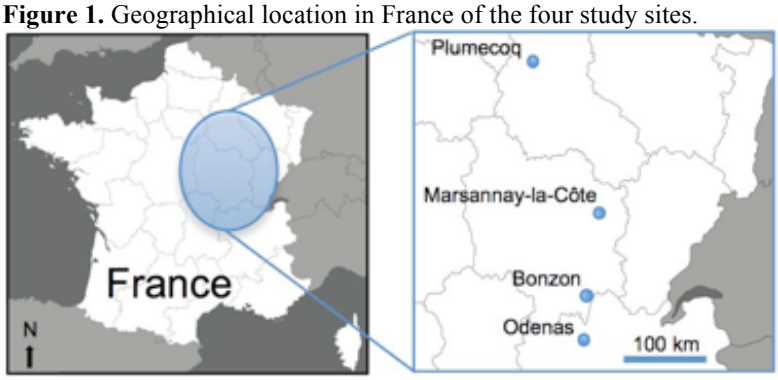



**Figure 2.** Cumulative rates of vines with scale insects in 2006 and 2007 in the four study sites. *Parthenolecanium corni* (blue), *Pulvinaria vitis* (black), *Heliococcus bohemicus* (green), *Phenacoccus aceris* (pink).

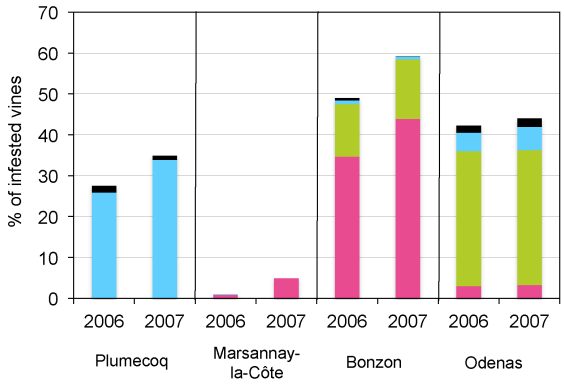


**Figure 3.** Plans of the spatial distribution of scale insects in 2006 and 2007 in each study sites. Each square shows a vine with its infestation status: no scale insect (white), *Parthenolecanium corni* (blue), *Pulvinaria vitis* (black), *Heliococcus bohemicus* (green), *Phenacoccus aceris* (pink).

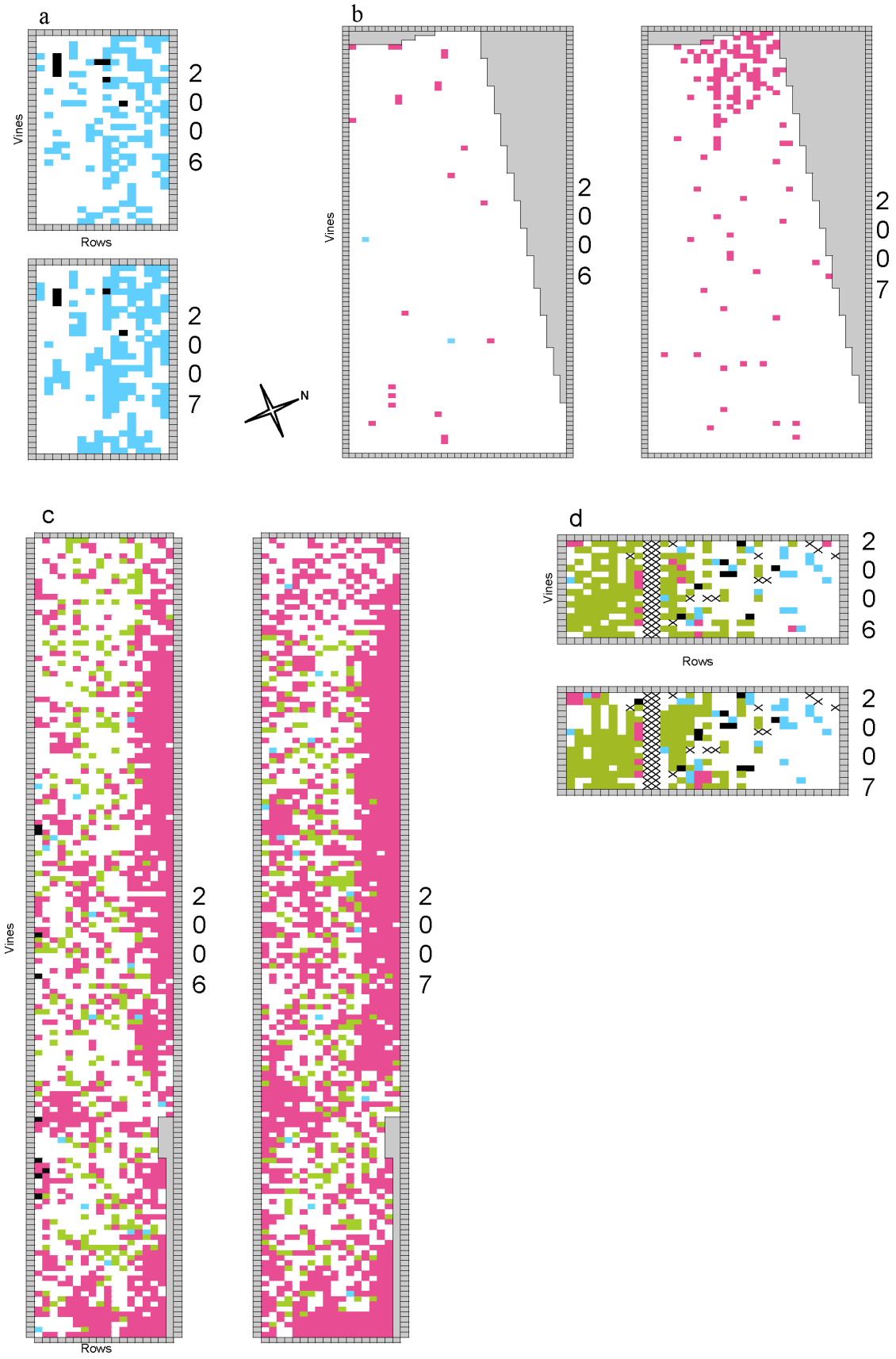
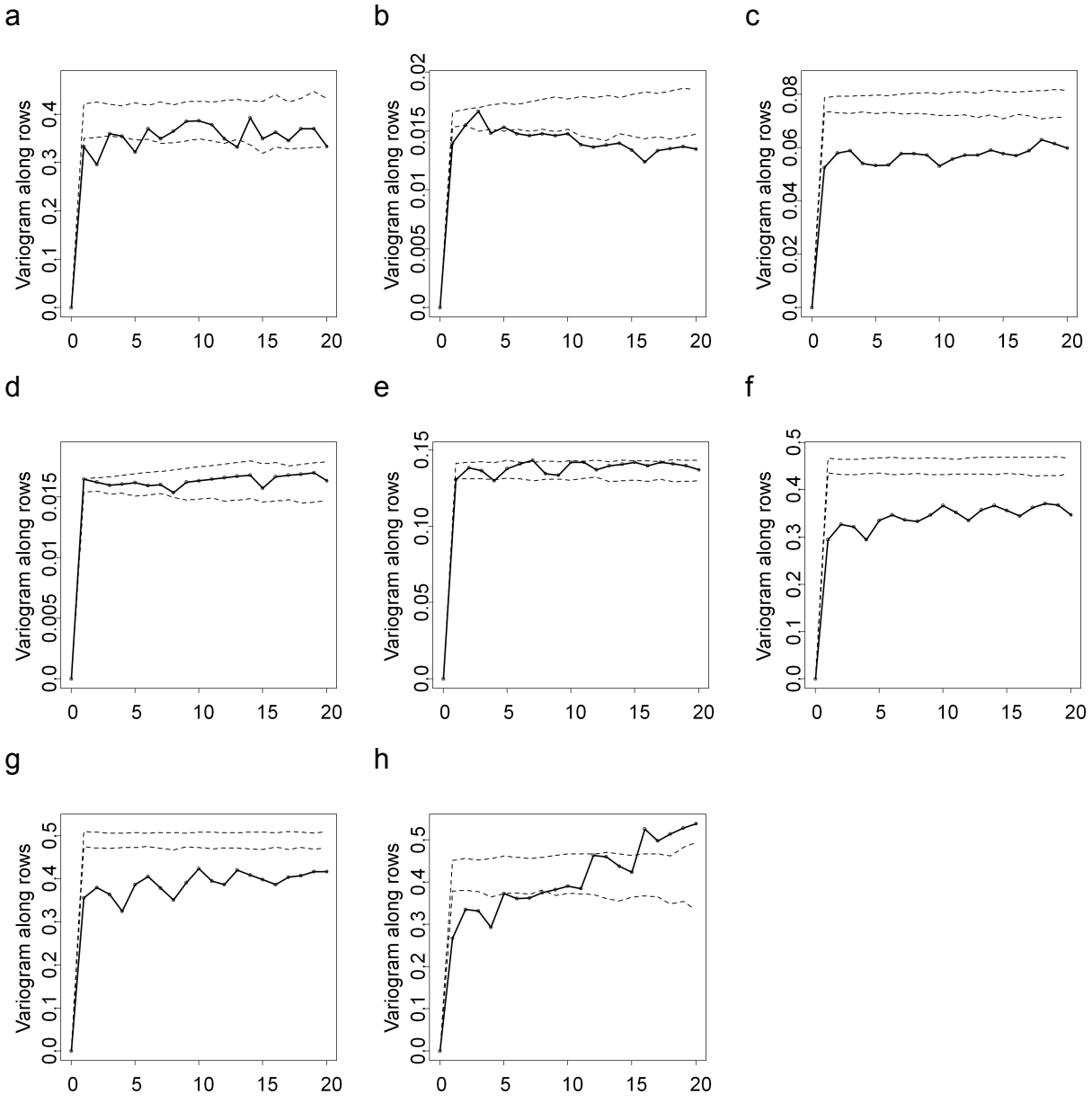


**Figure 4.** Variograms generated by tests of global independence for the analysis of the spatial distribution of scale insect species in vineyards. Each test was performed with 200 permutations for a distance of d=20 (spacing between vines). A spatial dependancy is proven when the variogram (continuous line) is outstide confidence interval delimited by Monte Carlo confidence levels of 2.5% and 97.5% (dashed lines). X-axis : distance ; Y-axis : value of the variogram; (a) Analysis of *Parthenolecanium corni* distribution in Plumecoq in 2006; (b) Analysis of *Phenacoccus aceris* distribution in Marsannay-la-Côte in 2006; (c) Analysis of *Phenacoccus aceris* distribution in Marsannay-la-Côte in 2007; (d) Analysis of *Parthenolecanium corni* distribution in Bonzon in 2006; (e) Analysis of *Heliococcus bohemicus* distribution in Bonzon in 2006; (f) Analysis of *Phenacoccus aceris* distribution in Bonzon in 2006; (g) Analysis of *Phenacoccus aceris* distribution in Bonzon in 2007; (h) Analysis of *Heliococcus bohemicus* distribution in Odenas in 2006.



# V. Analyse pluri-annuelle de l'épidémie de l'enroulement sur quatre parcelles

Cette analyse se déclinera en plusieurs étapes successives. (i) L'établissement d'un premier constat épidémiologique pour la période 1998-2005 a permis d'émettre des hypothèses (ii) pour tenter d'expliquer la contamination des 4 parcelles par l'enroulement viral. (iii) Après une partie relative au statut sanitaire du matériel végétal de plantation à Bonzon et Marsannay-la-Côte, (iv) nous exposerons dans l'article 3 les recherches effectuées sur ces deux parcelles, puis dans une partie suivante (v) les résultats additionnels concernant les parcelles de Plumecoq et Odenas.

## V.1. Etat de la contamination des vignobles de 1998 à 2006

### *V.1.a. Relevés symptomatologiques sur les quatre parcelles*

- Prévalence de la maladie

L'évolution de la prévalence de l'enroulement viral a été analysée sur la base des notations de symptômes menées à l'automne cep par cep (voir article 3 pour la description des notations de symptômes). Bien que ces relevés ne soient disponibles qu'en 2000 et 2001 à Plumecoq, on constate une stagnation de la situation, avec une prévalence annuelle stable de l'enroulement viral autour de 8,8 % (Tableau 15 et Figure 22). A Marsannay-la-Côte, on assiste à une lente évolution de la prévalence de la maladie sur la période 1998-2005, avec une valeur plus forte en 2004. Le niveau de contamination de la parcelle reste pour autant faible, avec environ 3,6 % de ceps symptomatiques en 2005. La parcelle de Bonzon étant plus récente, les notations n'ont en conséquence débuté qu'à partir de 2003, lors de la détection des premiers symptômes d'enroulement. Sur une période de 3 ans, on remarque une augmentation continue de la prévalence pour cette parcelle jusqu'à 8,5 %. La situation à Odenas est plus difficile à interprêter. Au moins la moitié des ceps ont exprimé des symptômes d'enroulement sur la période 1999-2005, ce qui confère à cette parcelle la prévalence de l'enroulement la plus forte parmi les quatre parcelles suivies. On constate cependant une prévalence réduite pour l'année 2003 par rapport aux quatre autres mesures disponibles. Ces observations sont loin d'être isolées, puisque des résultas similaires ont été obtenus sur un grand nombre de parcelles viticoles situées dans le Beaujolais (Annexe 4). A l'image des observations effectuées dans la région de Murcie en Espagne sur 'Napoleon' (Valero et al., 2003), il semblerait que les températures extrêmes survenues pendant la canicule de l'été 2003 soient à l'origine de la réduction importante de l'expression des symptômes d'enroulement sur 'Gamay', indiquant la possible action d'une « thermothérapie naturelle » en 2003 sur la réplication virale. Cela expliquerait ainsi la faible valeur de la prévalence obtenue pour 2003 et également 2005 à Odenas.

**Tableau 15. Prévalence de l'enroulement viral dans les quatre parcelles d'étude de 1998 à 2005.**

| | Années | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Parcelle** | **1998** | **1999** | **2000** | **2001** | **2002** | **2003** | **2004** | **2005** |
| Plumecoq | - | - | 8,79 % | 8,79 % | - | - | - | |
| Marsannay-la-Côte | 0,14 % | 0,37 % | 2,09 % | 2,6 % | 4,57 % | 2,29 % | - | 3,62 % |
| Bonzon | - | - | - | - | - | 0,18 % | 5,43 % | 8,44 % |
| Odenas | - | 46,5 % | 53,9 % | - | - | 16 % | 67 % | 46 % |

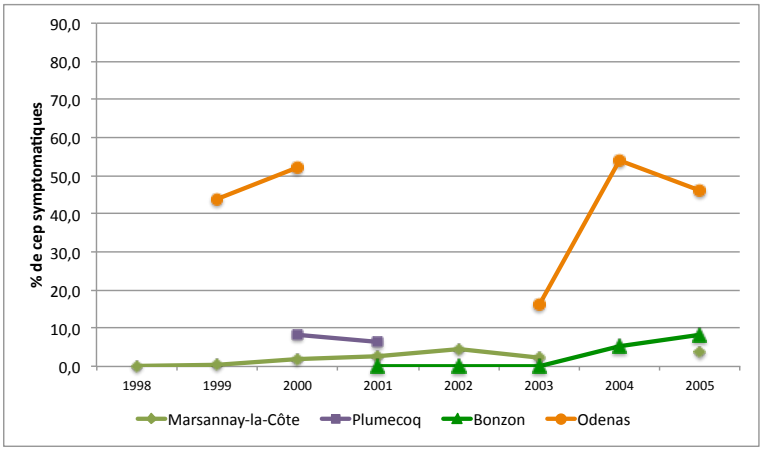



**Figure 22. Evolution de la prévalence de l'enroulement viral sur les quatre parcelles d'étude de 1998 à 2005.**

- Incidence de la maladie

L'incidence de la maladie nous renseigne sur le taux de nouveaux cas de ceps atteints par rapport à la première année de notation disponible (Tableau 16). Même si cette mesure repose sur des symptômes parfois difficiles à observer, ces données, confrontées à la prévalence, donnent également une idée sur la régularité de l'expression des symptômes par les ceps (Sforza et Greif, 2000b).

**Tableau 16. Incidence de l'enroulement viral selon les parcelles et les années. Correspond au pourcentage de ceps exprimant les symptômes typiques de l'enroulement viral pour la première fois.**

| | Années | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Parcelle** | **1999** | **2000** | **2001** | **2002** | **2003** | **2004** | **2005** | **TOTAL** |
| Plumecoq | - | - | 0 % | - | - | - | - | 0 % |
| Marsannay-la-Côte | 0, 31 % | 1,7 % | 0,9 % | 0,8 % | 0,5 % | - | 0,6 % | 4,81 % |
| Bonzon | - | - | - | - | - | 5 % | 3 % | 8 % |
| Odenas | - | 7,3 % | - | - | 0 % | 11 % | 0,1 % | 18,4 % |

A Plumecoq, Bonzon et Odenas, l'incidence de l'enroulement est conforme à l'évolution annuelle de la prévalence de la maladie. Pour Plumecoq, les mêmes ceps ont exprimé des symptômes d'enroulement sur deux années, sans aucun nouveau cas observé en 2001. A Bonzon, on constate que l'incidence de l'enroulement est moyenne, alors qu'elle est plus forte à Odenas. A Marsannay-la-Côte, la prévalence obtenue en 2005 (3,6 %) est plus faible par rapport à l'incidence de la maladie sur l'ensemble de la période de notation (4,81 %). Cela montre ainsi que l'expression des symptômes d'enroulement sur ce dernier site d'étude est plus irrégulière, certains ceps pouvant rester asymptomatiques pendant 3 années après une première expression.

### *V.1.b. Diagnostic par DAS-ELISA*

Un diagnostic sanitaire a été entrepris sur les quatre parcelles afin d'avoir une estimation plus fiable de la prévalence de l'enroulement viral par rapport aux seules notations visuelles de symptômes foliaires. Ainsi, une analyse sérologique a été effectuée sur chaque parcelle pendant l'hiver 2006-2007, en échantillonnant en décembre trois baguettes sur chaque cep selon une grille régulière d'un pied sur quatre (Figure 23). Chaque échantillon a ainsi été testé par DAS-ELISA pour deux espèces de virus d'enroulement : GLRaV-1 et GLRaV-3 (protocole en Annexe 3).

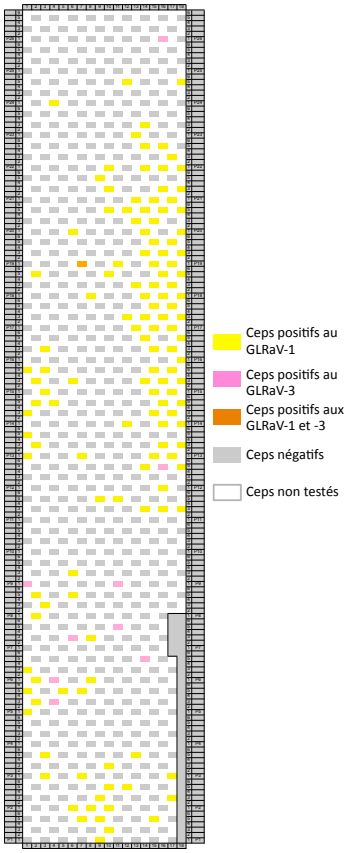



**Figure 23. Résultats des tests sérologiques des GLRaV-1 et -3 sur la parcelle de Bonzon.**

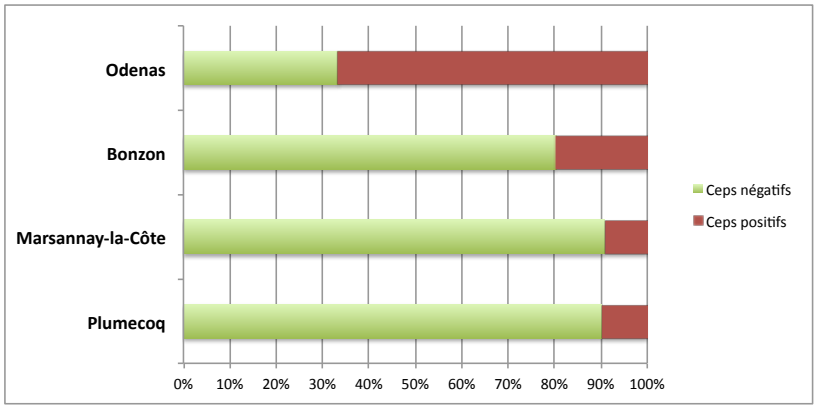



**Figure 24. Taux de ceps positifs obtenus d'après le test sérologique d'un quart des ceps de chaque parcelle au GLRaV-1 et GLRaV-3 pendant l'hiver 2006-2007.**

Les résultats montrés en Figure 24 confirment les données acquises sur la prévalence de la maladie à partir des notations de symptômes. Odenas constitue la parcelle la plus touchée par l'enroulement avec plus de 60 % des ceps testés positifs. De même, le taux de 10,2 % de ceps positifs à Plumecoq est en accord avec le niveau de prévalence de la maladie estimé sur la base des symptômes. En revanche, les taux de ceps positifs obtenus à Marsannay-la-Côte, Bonzon et Odenas sont plus importants par rapport à l'estimation réalisée sur la base des symptômes en 2006 (Tableau 17). Les tests sérologiques ayant été conduits sur bois récolté en décembre 2006, ils reflètent la situation sanitaire de chaque parcelle après la saison végétative 2006.

Aussi, ces tests révèlent une évolution rapide de l'état sanitaire à Bonzon et Marsannay-la-Côte sur la période 2005-2006. Cette évolution peut s'expliquer soit par un grand nombre de ceps restés asymptomatiques en 2006, soit par de nouvelles contaminations par cochenilles vectrices. A Odenas, la différence entre le taux de prévalence et des ceps positifs vient vraisemblablement d'une latence dans l'expression des symptômes, on trouve en effet en 2004 un niveau de 60 % de ceps symptomatiques.
Concernant les espèces de virus de l'enroulement détectées, l'analyse sérologique révèle une contamination des vignobles de Marsannay-la-Côte et d'Odenas uniquement par le GLRaV-1, alors qu'on détecte à Plumecoq et à Bonzon les GLRaV-1 et -3 en mélange (Tableau 17). Le GLRaV-1 est majoritaire à Bonzon, avec quelques cas de ceps co-infectés par le GLRaV-3, alors que le GLRaV-3 constitue l'espèce majoritaire à Plumecoq.

**Tableau 17. Bilan de l'analyse sérologique sur les 4 parcelles et comparaison avec le taux de prévalence de l'enroulement en 2006.**

| | | | % de ceps positifs en 2006 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Parcelle** | **Nombre de ceps** | **Nombre de ceps testés par DAS-ELISA** | **GLRaV-1** | **GLRaV-3** | **GLRaV-1 + GLRaV-3** | **TOTAL** | **Prévalence en 2006** |
| Plumecoq | 512 | 128 | 1,6 % | 8,6 % | - | **10,2 %** | 8 % |
| Marsannay-la-Côte | 2435 | 607 | 9,2 % | - | - | **9,2 %** | 3,5 % |
| Bonzon | 2758 | 689 | 19,4 % | 1,4 % | 0,1 % | **20,9 %** | 13 % |
| Odenas | 480 | 128 | 62,5 % | - | - | **62,5 %** | 36 % |

## V.2. Perspectives d'étude

### *V.2.a. Synthèse de la situation épidémique en 2006 et hypothèses sur l'origine des contaminations*

A Plumecoq, nos résultats concourent à penser que l'épidémie d'enroulement est stabilisée. A Odenas, plus de la moitié des ceps de la parcelle d'étude sont contaminés par le GLRaV-1. En revanche, l'épidémie d'enroulement semble progresser à Marsannay-la-Côte et à Bonzon, ce qui rend l'étude de l'épidémie sur ces parcelles particulièrement intéressante, puisque cela donne l'occasion de suivre la dynamique d'une probable épidémie depuis la contamination primaire de la parcelle. La confrontation du statut sanitaire de chacune des quatre parcelles avec les résultats obtenus lors de l'étude entomologique permet d'émettre des hypothèses pour expliquer la dynamique de la maladie sur chaque site.

- Statu quo à Plumecoq ?

Deux espèces de cochenilles ont été détectées sur cette parcelle. D'un côté, l'espèce la plus abondante, *P. corni,* n'est a priori pas vectrice du GLRaV-3 (Sforza et al., 2003a; Hommay et al., 2008). De l'autre, *P. vitis* est capable de transmettre le GLRaV-3 (Belli et al., 1994), mais a sûrement été trop peu abondante pour entraîner une diffusion de la maladie sur la parcelle. Malgré une prévalence plutôt modérée de la maladie au début des notations, il semble que la présence de cochenilles n'ait pas modifié le niveau de contamination de cette parcelle. Ces caractéristiques pourraient donc expliquer le *statu quo* de la situation à Plumecoq.

- Début d'épidémie à Marsannay-la-Côte ?

La population de cochenilles sur les ceps à Marsannay-la-Côte est très réduite, et se limite principalement à la présence estivale et localisée de quelques larves L1 de *P. aceris*. Pour autant, le diagnostic sérologique prouve que la prévalence de l'enroulement viral a tendance à augmenter depuis la plantation de la parcelle. Le rôle potentiel de la cochenille *P. aceris* dans la dispersion de la maladie doit donc être étudié, en le combinant avec une vérification du statut sanitaire du matériel végétal à la plantation.

- Prélude à une dispersion rapide de la maladie à Bonzon ?

On observe sur cette parcelle une présence abondante de cochenilles, en particulier *P. aceris,* ainsi qu'une prévalence croissante de l'enroulement viral. Ces deux constats indiquent ainsi que la diffusion de l'enroulement serait provoquée par la dissémination de cochenilles virulifères. L'analyse spatiale ayant contribué à montrer une agrégation significative de *P. aceris* le long des bordures de la parcelle d'étude, la responsabilité de cette espèce dans la contamination de la parcelle doit être vérifiée.

- Epidémie résultant d'une dispersion par cochenille à Odenas ?

Cette parcelle présente un taux important de contamination par le GLRaV-1 ainsi qu'une présence relativement abondante de cochenilles, en particulier *H. bohemicus*. On peut donc supposer, que cette cochenille farineuse est en partie responsable de la diffusion de l'enroulement. Cependant, cette parcelle étant plus ancienne par rapport aux autres sites d'étude, il est difficile de vérifier cette hypothèse puisque l'épidémie d'enroulement se situe déjà à un stade avancé.

### *V.2.b. Sélection de deux parcelles d'étude*

L'analyse de la présence de cochenilles vectrices à Marsannay-la-Côte et à Bonzon montre une prédominance de *P. aceris*. De même, le premier bilan épidémique montre que ces deux parcelles sont majoritairement concernées par le GLRaV-1. Pourtant, ces deux sites d'étude diffèrent tant par l'abondance, la répartition spatiale et la biologie de *P. aceris* que par l'incidence annuelle de l'enroulement viral. Les dynamiques de la maladie à Marsannay-la-Côte et à Bonzon semblent donc être régies par des mécanismes distincts justifiant ainsi une vérification de l'état sanitaire du matériel végétal à la plantation avant une étude détaillée du pathosystème GLRaV-1/*P. aceris* sur ces deux parcelles.

## V.3. Recherches préliminaires sur le matériel végétal de plantation à Marsannay-la-Côte et Bonzon

Les caractéristiques relatives au matériel végétal planté sur les deux sites sont résumées dans le Tableau 18 (Définitions des termes relatifs à la sélection clonale en Annexe 5). La parcelle de Marsannay-la-Côte a été plantée pour les besoins d'une expérimentation menée sur la flavescence dorée par l'INRA de Dijon. Ainsi, le matériel expérimental et certifié provenant de l'ENTAV a été traité par thermothérapie pour mesurer l'efficacité de cette technique sur la contamination par le phytoplasme. En revanche, aucune garantie n'a été apportée concernant l'absence d'enroulement viral dans le matériel expérimental.
La parcelle de Bonzon, agréée lors de sa plantation par FranceAgriMer en tant que parcelle de multiplication de greffons, a été mise en place avec du matériel de base provenant de 3 parcelles de prémultiplication différentes. Les quatre rangs d'isolement, situés de part et d'autre de la parcelle d'étude ont été plantés avec du matériel certifié (clone 115) produit par le viticulteur. L'ensemble des tests sanitaires réglementaires effectués sur les vignes mères ayant fourni le matériel végétal garantit ainsi l'absence de GLRaV-1, GLRaV-3, et GVA dans les assemblages mis en place sur la parcelle de Bonzon. Les premiers ceps ayant exprimé des symptômes d'enroulement en 2003 ont été arrachés puis remplacés, mais l'apparition de nombreux cas d'enroulement en 2004 a conduit FranceAgriMer à déclasser cette parcelle de son statut de vigne-mère de multiplication.

**Tableau 18. Résumé des données disponibles sur le matériel végétal planté à Marsannay-la-Côte et Bonzon**

| | **Parcelles** | |
|---|---|---|
| | **Marsannay la Côte** | **Bonzon** |
| **Année(s) de plantation** | 23 rangs en 1997, 9 rangs en 1998 | 18 rangs en 2001 |
| **Première expression de symptômes (prévalence)** | 1999 (0,14 %) | 2003 (0,18 %) |
| **Greffons** | Pinot noir | Pinot noir |
| Type | Matériel expérimental<br>Matériel certifié | Matériel de base (14 rangs)<br>Matériel certifié (4 rangs d'isolement) |
| Clones | 115, 777 | 115, 667, 828 |
| Provenance | ATAP-ENTAV | ATVB-Grapvi-Chambre d'agriculture de Saône et Loire |
| Vigne mère de prémultiplication | ENTAV (Hérault) | 115 : Mont Battois, Echevronnes (Côte d'Or)<br>667 : Rully (Saône-et-Loire)<br>828 : ENTAV (Hérault) |
| **Porte-greffe** | 3309 Couderc | 3309 Couderc |
| Clone | 144 | 143 |
| Provenance | ENTAV | Chambre d'agriculture de l'Aude |
| Vigne mère de prémultiplication | Domaine de l'Espiguette | N°46, Palaja |

## V.4. ARTICLE 3 : The role of the mealybug *Phenacoccus aceris* in the spread of *Grapevine leafroll-associated virus -1* (GLRaV-1) in two French vineyards.

*Publication révisée soumise dans le European Journal of Plant Pathology, 23 août 2012.*

### *Etat de la question*

L'enroulement viral occasionne des pertes économiques notables pour l'ensemble de la filière viticole au niveau mondial. La maladie, touchant tous les cépages de *Vitis vinifera* et les variétés de porte-greffe, est provoquée par plusieurs virus distincts nommés grapevine leafroll-associated viruses (GLRaVs). L'expansion actuelle de l'enroulement viral est attribuée principalement aux échanges mondiaux de matériel végétal infecté, notamment les porte-greffes américains qui restent asymptomatiques.

Cependant, des cas de dispersion naturelle de la maladie ont été signalés dans plusieurs pays. Le GLRaV-3, espèce la plus répandue en particulier dans les régions à climat méditerranéen, a fait ainsi l'objet de recherches montrant une dissémination significative et rapide de la maladie au vignoble. A la suite d'une première preuve de transmission par cochenille, de nombreuses espèces de *Coccidae* et de *Pseudococcidae* ont été montrées capables de transmettre à la vigne plusieurs *Ampelovirus* et *Vitivirus*. L'une d'entre elles, *Phenacoccus aceris,* possède un spectre vecteur particulièrement large et semble en recrudescence en France, notamment dans les vignobles de Bourgogne et du Beaujolais où elle est suspectée de jouer un rôle dans la diffusion de l'enroulement viral.

### *Objectifs de l'étude*

Les recherches précédentes menées sur le sujet décrivent le déroulement des épidémies d'enroulement au vignoble grâce à des suivis de symptômes, combinés à des analyses spatiales sur les zones touchées. Le rôle des cochenilles dans la diffusion de la maladie est signalé, mais aucune analyse statistique n'a à ce jour démontré une corrélation significative entre l'infestation d'une parcelle par cochenille et la diffusion de l'enroulement.

Cet article décrit ainsi une étude épidémiologique visant à évaluer la responsabilité de la cochenille *P. aceris* dans la présence d'enroulement viral sur deux parcelles contaminées par le GLRaV-1.

### *Résultats principaux*

- Suivi de l'épidémie d'enroulement viral

La prévalence de l'enroulement reste stable autour de 5% à Marsannay-la-Côte, sauf en 2011 (9%), alors que la maladie passe d'une prévalence de 5% en 2004 à 86% en 2011 à Bonzon. Ces évolutions temporelles différentes sont confirmées par la courbe d'incidence de la maladie et la transformation logistique de l'incidence pour les deux parcelles. Ainsi, sur la période de notation, le taux d'infection obtenu à Bonzon atteint 0,76 logit/an, alors qu'il est de 0,05 logit/an à Marsannay-la-Côte. La représentation spatiale sur des plans annuels successifs montre à Bonzon que les zones touchées par l'enroulement correspondent à quatre patchs principalement situés en bordure des parcelles contiguës. Ces quatre zones s'étendent progressivement au cours des années vers l'intérieur de la parcelle. En revanche, la localisation des ceps symptomatiques à Marsannay-la-Côte ne révèle aucune zone spécifique de la parcelle qui serait davantage touchée par l'enroulement.

- Suivi des populations de *Phenaccoccus aceris*

Les suivis de cochenille entrepris en 2006 et 2007 ont été renouvelés sur les deux sites, et montrent que la parcelle de Bonzon présente un taux d'infestation important par rapport à celle de Marsannay-la-Côte (respectivement 73,8 % et 8,1 % de ceps infestés par *P. aceris* sur la période 2006-2009). Les résultats indiquent de même que les zones les plus infestées par la cochenille se situent à des emplacements identiques d'une année sur l'autre pour les deux sites d'étude.

- Analyse statistique spatiotemporelle

L'analyse de la répartition spatiale des ceps enroulés montre que la maladie est présente à Bonzon sous forme de foyer. A Marsannay-la-Côte, les ceps malades sont répartis selon de petits agrégats de 3 ou 4 souches, chacun distribué aléatoirement dans la parcelle. La corrélation spatiale entre foyers symptomatiques et foyers infestés par *P. aceris* à Bonzon montre une dépendance très significative entre ces deux variables, alors qu'il y a indépendance totale pour Marsannay-la-Côte. Cela prouve ainsi que la variable *P. aceris* explique la présence de symptômes à Bonzon mais non à Marsannay-la-Côte.

## *Conclusion*

L'étude épidémiologique de l'enroulement sur deux parcelles touchées par le GLRaV-1 et *P. aceris* montre (i) que la dynamique de la diffusion de l'enroulement est fortement liée à la population de cochenilles vectrices, (ii) que *P. aceris* est responsable de la contamination totale de la parcelle de Bonzon en 8 années et, (iii) que la parcelle de Bonzon constitue le premier exemple au niveau européen d'une diffusion naturelle massive du GLRaV-1. Les dynamiques spatio-temporelles identifiées sont cohérentes avec les informations relatives au statut sanitaire du matériel végétal de plantation. A Bonzon, la mise en place d'un matériel garanti sans viroses montre que la contamination de la parcelle a majoritairement eu lieu depuis les vignes contiguës, par l'arrivée de cochenilles vectrices, principalement *P. aceris*. A Marsannay-la-Côte, l'année suivant la plantation, une partie du matériel expérimental s'est révélé être porteur de GLRaV-1. Les vignes ayant été plantées par fratries, dont certaines issues de pieds-mères infectés, cela explique pourquoi les ceps enroulés sont localisés par groupes le long du rang mais répartis de façon aléatoire sur l'ensemble de la parcelle.

## *Perspectives*

Notre étude montre que les dynamiques épidémiologiques peuvent être très différentes pour un même pathosystème selon le niveau d'inoculum initial présent dans l'environnement, mais surtout selon la quantité de vecteurs présents sur le site. La plus forte prévalence d'enroulement constatée pour 2011 à Marsannay-la-Côte implique d'y poursuivre les contrôles symptomatiques et entomologiques. La symptomatologie complexe observée sur cette parcelle rend indispensable la tenue de tests de détection afin de connaître précisément la prévalence actuelle de l'enroulement. Les différences d'expression de la maladie entre les deux sites d'étude pourraient également être clarifiées par une étude de la diversité génétique du GLRaV-1 sur les deux parcelles.

ARTICLE 3

# The role of the mealybug *Phenacoccus aceris* in the spread of *Grapevine leafroll-associated virus -1* (GLRaV-1) in two French vineyards.

**Jean Le Maguet[1,2,3]*, Jean-Jacques Fuchs[3], Monique Beuve[1,3], Joël Chadœuf [4], Etienne Herrbach[1,3], Olivier Lemaire[1,3]**

[1]INRA UMR 1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin, F-68000 Colmar, France.

[2]Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne (CIVC), F-51200 Epernay, France.

[3]Université de Strasbourg (UDS), F-67000 Strasbourg, France

[4]INRA UR 546 Biostatistique et processus spatiaux, F-84914 Avignon, France.

**Publication revisée soumise dans le *European Journal of Plant Pathology*, 23 août 2012.**

# The role of the mealybug *Phenacoccus aceris* in the spread of *Grapevine leafroll-associated virus -1* (GLRaV-1) in two French vineyards.

**Jean Le Maguet[1,2,3]*, Jean-Jacques Fuchs[3], Monique Beuve[1,3], Joël Chadœuf [4], Etienne Herrbach[1,3], Olivier Lemaire[1,3]**

[1]INRA UMR 1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin, F-68000 Colmar, France.
[2]Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne (CIVC), F-51200 Epernay, France.
[3]Université de Strasbourg (UDS), F-67000 Strasbourg, France
[4]INRA UR 546 Biostatistique et processus spatiaux, F-84914 Avignon, France.

## Abstract

Spread patterns of a *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1) epidemic and a mealybug infestation ten-year survey were recorded in two Burgundy French vineyards to investigate the relation between them . The temporal evolution of leafroll spread at both study sites was compared on disease incidence data with logistic regression models. We tested if the spatial distribution of the disease and the mealybug were aggregative using permutations methods, then we tested the independence between the two spatial patterns by randomly shifting one pattern. In Bonzon, an increase from 5% to 86% of leafroll prevalence was showed over an 8-year time span, whereas leafroll prevalence remained stable around 5% in Marsannay-la-Côte for the same period. In Bonzon, the disease spread rapidly from older neighboring vineyards in four main patches while no diffusion of the disease was recorded from infected vines in Marsannay-la-Côte. The mealybug *Phenacoccus aceris* was recorded on 74% of vines in Bonzon throughout the study and only 6% of vines in Marsannay-la-Côte. In this latter location, the disease was not associated with the presence of the mealybug, so that it may have arisen from infected plant material escaping the sanitary selection. In Bonzon, the significant statistical correlation between the mealybug distribution and diseased areas proved markedly that *P. aceris* was responsible for the rapid spread of GLRaV-1 in the vineyard. This is the first report of GLRaV-1 natural diffusion in Europe.

**Abbreviations:** GLRaV: Grapevine leafroll-associated virus, GVA: Grapevine virus A, GVB: Grapevine virus B, DAS-ELISA: double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay.

*Corresponding author: jean.le-maguet@orange.fr

**Key words:** Epidemiology, *Ampelovirus*, grapevine scale insects, leafroll disease, spatial statistics.

## Introduction

Grapevine leafroll disease is considered one of the most economically important virus diseases of wine grapes in many vine-growing regions around the world (Martelli and Boudon-Padieu, 2006). It negatively impacts yield by delaying ripening of berries, the yield losses being estimated between 740 and 1200 €/ha per year, according to (Atallah et al., 2012). Leafroll disease alters photosynthetic activity (Komar et al., 2010) and affects plant growth and longevity (Bertamini et al., 2004), lowers sugar content and phenolic compounds in berries, and increases acidity of must (Lee and Martin, 2009). All *Vitis vinifera* varieties are susceptible to leafroll infection. If american rootstocks remain asymptomatic, diseased vines show highly variable symptom patterns according to cultivars, virus strains, and climatic conditions (Boudon-Padieu et al., 2000). These foliar symptoms consisting of a strong reddening of leaf blade are easy to identify on red-cultivars such as Pinot noir and Cabernet franc. These discolorations are followed in late summer by downward rolling of leaf-margins and increase of leaf thickness (Martelli and Boudon-Padieu, 2006). This disease is caused by distinct phloem-limited grapevine leafroll-associated viruses (GLRaVs), all members of the family *Closteroviridae*. Most leafroll viruses (GLRaV-1, -3, -4, -5, -6, -9, -Pr, -De, and GLRaCV) belong to the *Ampelovirus* genus whereas GLRaV-2 is a *Closterovirus* and GLRaV-7 has been lately assigned to a new tentative genus, phylogenetically close to *Crinivirus* (Al Rwahnih et al., 2012). Among leafroll viruses, *Grapevine leafroll-associated virus -3* (GLRaV-3) is the most widespread especially in Mediterranean areas and most epidemiological studies have been conducted on this species (Cabaleiro and Segura, 2006; Pietersen, 2006; Golino et al., 2008). However, natural spread of leafroll has also been described for GLRaV-9 in Australia (Habili et al., 2003) and for GLRaV-1 in New-Zealand (Bonfiglioli et al., 2001).

The worldwide expansion of the disease is mainly attributed to the exchange of infected plant material, especially asymptomatic rootstocks (Cabaleiro and Segura, 1997), since grapevine leafroll viruses are graft-transmissible and persist in propagative material (budwood, rootstocks, and grafted vines). However, natural spread of leafroll in vineyards has also been described in many regions where studies revealed a continual increase in the incidence of leafroll (Habili et al., 2003; Cabaleiro et al., 2008; Golino et al., 2008; Jooste et al., 2011). In Yugoslavia, Dimitrijevic reported for the first time in 1973 the natural spread of leafroll in a vineyard over a 3-year period. Further evidence of natural spread was obtained in 1985 in South Africa in a plot where leafroll-infected vines were randomly interplanted with healthy LN33 indicator vines (Engelbrecht and Kasdorf, 1985). Since then, leafroll disease spread has been described in many vine-growing regions worldwide.

The first evidence of GLRaV transmission by scale insects (*Hemiptera*, *Coccoidea*) was obtained in 1990 in controlled laboratory experiments (Engelbrecht and Kasdorf, 1990). Since then, many species of soft scales (*Coccidae*) and mealybugs (*Pseudococcidae*) have been shown to transmit grapevine ampeloviruses and vitiviruses (Belli et al., 1994; Sforza et al., 2003; Zorloni et al., 2006; Mahfoudhi et al., 2009; Le Maguet et al., 2012). In France, GLRaV-1, -2, and -3 have been reported in naturally infected vineyards (Boudon-Padieu et al., 2000) and nine scale insect species have been commonly reported on grapevine: the soft scales *Neopulvinaria innumerabilis, Parthenolecanium corni, Parthenolecanium persicae, Pulvinaria vitis* (*Coccidae*)*,* the armoured scale *Targionia vitis* (*Diaspididae*), and the mealybugs *Heliococcus bohemicus, Phenacoccus aceris, Planococcus citri,* and *Planococcus ficus* (*Pseudococcidae*) (Sforza, 2008). Seven of these species have been shown to transmit one or more leafroll viruses efficiently (Belli et al., 1994; Cabaleiro and Segura, 1997; Fortusini et al., 1997; Sforza et al., 2003; Zorloni et al., 2006; Mahfoudhi et al., 2009; Le Maguet et al., 2012). Among them, *P. aceris* is regularly mentioned as infesting vineyards and apple orchards in northeastern France (Le Maguet et al., 2010). Recently, laboratory experiments showed that *P. aceris* is a particularly efficient vector, being able to transmit at least eight viruses to grapevine (Le Maguet et al., 2012).

Most of epidemiological observations done in vineyards worldwide have focused on the complex *Planococcus* sp./GLRaV-3 under Mediterranean-type climate. However, *P. aceris* is also a widely distributed mealybug, commonly reported on a wide range of perennial hosts in Holarctic regions. Under continental climate, adult females of *P. aceris* appear in late spring and lay numerous eggs in a cottony egg sac under bark of the host plant species, especially grapevine, and constitute so a good candidate for leafroll disease transmission. In fact, *P. aceris* is suspected to play a major role in the natural spread of leafroll in vineyards (Sforza et al., 2003) but no long-term study has been made to explore leafroll epidemiology in relation with mealybug infestation. Among the four scale insect species identified on grapevine during a monitoring of vineyards in northeastern France, *P. aceris* was widespread but its abundance and spatial distribution varied significantly between study sites (Le Maguet et al., 2010).

Patterns of leafroll distribution and spread have been well documented in vine growing regions through symptom surveys and spatial analyses (Cabaleiro et al., 2008; Golino et al., 2008; Jooste et al., 2011). The role of mealybugs in the diffusion of leafroll has been reported in such studies, but no statistical analysis has been performed to demonstrate the spatial correlation between mealybug infestation and leafroll spread in the studied plots.

The aim of this work is thus to assess the role of *P. aceris* in the spread of leafroll disease in vineyards using spatio- temporal analyses. To this end, a 10-year survey was conducted on two vineyards infected by GLRaV-1 and infested by *P. aceris*. This epidemiological study was conducted on the pathosystem *P. aceris*/GLRaV-1 in a semi-continental region of France, Burgundy complementary to the *Planococcus* sp./GLRaV-3 complex and is the first long-term comprehensive work relating incidence of leafroll disease with the distribution patterns and ecology of a mealybug in vineyards.

## Material and Methods

### Study sites.

The vineyard plots at the villages of Bonzon and Marsannay-la-Côte were monitored for leafroll prevalence and *P. aceris* presence (Figure 1). The Bonzon plot was planted between two older vineyards in 2001 (GPS: 46.477400 N, 4.777722 W, Burgundy, France) with virus-free certified scions of cv Pinot noir (2758 plants in 18 rows). Leafroll symptoms were first noticed in 2003 on five plants, and GLRaV-1 was then confirmed by double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA). The Marsannay-la-Côte plot was planted in 1997 (GPS: 47.265726 N, 4.978437 W, Burgundy, France), with 2435 vines of cv Pinot noir, in 33 rows. The first leafroll symptoms were recorded in 1998 and confirmed by DAS-ELISA testing of GLRaV-1.

### Leafroll monitoring.

*Symptoms marking*

Leafroll disease symptoms were monitored on each vine in both study sites every year from 2004 to 2011 in autumn between mid-September to mid-October before frost in order to compare the temporal evolutions. Symptom severity was ranked from 0 to 3 as follows: 0 for no leafroll symptoms; 1 for some lower leaves with reddish spots; 2 for most lower leaves being reddish, gradual reddening of leaves along branches; 3 for most or all leaves being deep red or purple, thick and brittle leaf blades, vines severely diseased. In Bonzon, vines of the two contiguous plots were also monitored in 2008 for leafroll symptom expression. All data were recorded on xy matrices for further mapping on grids and spatial analysis. The presence of GLRaV-1 was ascertained in winter 2006-2007 by DAS-ELISA for both study sites in a biotine-streptavidine procedure (Zimmermann et al., 1990). The sampling method was to collect one vine of every four along the row, regardless of previous visible symptoms. Tests were made on woody slices taken from three lignified canes from a total of 689 plants in Bonzon and 607 plants in Marsannay-la-Côte.

*Temporal analysis of leafroll spread*

The temporal pattern of disease progress was analyzed using previously tested methods (Habili and Nutter, 1997; Pietersen, 2006). The annual incidence of leafroll was estimated for both study sites by annual symptom data and plotted as disease progress curves. Change in leafroll incidence (progression rate of newly diseased vines each year) with the change in time ($dy/dt$ versus $t$) was plotted as rate curves. The incidence of leafroll was linearized using a logistic regression model to show the relationship between leafroll incidence and time.

### Mealybug monitoring.

The presence of *P. aceris* was studied from 2006 to 2009 in both study sites. Mealybug populations were counted in spring between the last week of April and the second week of May during their emergence period. Mealybug presence was systematically checked on buds, young leaves, canes, and vine stock according to a 5-minute count time per vine. The data obtained were recorded on an xy matrix system for further mapping and spatial analysis. The numbers of *P. aceris* present on each vine from 2006 to 2009 were converted for both study sites into 3-D charts.

### Statistical analysis of the spatio-temporal dynamics of leafroll distribution.

*Statistical tool*

Analyses were conducted using procedures designed previously (Peyrard et al., 2005) and running on R free software (Version 2.13.0, R Development Core Team, 2011). Monte Carlo tests were conducted to study leafroll distribution and its spatial correlation with that of *P. aceris* according the method described by Peyrard et al. (2006). Each test was performed with 200 permutations for distances d=20. For all tests, the randomization of data was verified with the independence hypothesis $H_0$: the symptomatic vines are independently and identically distributed (i.i.d.).

The statistical assessment of the spatial dependency provided a variogram, which was compared to a confidence interval constructed with the random permutation of all data (Gaetan and Guyon, 2008). The $H_0$ hypothesis of each test was rejected when the variogram or the covariogram was outside the confidence interval delimited by Monte Carlo confidence levels of 2.5% and 97.5% obtained under independence assumption.

*Strategy of analysis*

The three main steps used in the statistical analysis were applied for each year and at both study sites. (i) The global independence of the distribution of diseased vines was verified according to several matrixes: presence or absence of leafroll symptoms, severity grade and newly symptomatic vines. Tests of independence between and within rows were then performed to analyze whether the dependence between data was favoured rather along the lines or along the rows of the study plot (Gaetan and Guyon, 2008). A test of global independence was also applied to study leafroll distribution in Bonzon and its two contiguous vineyards using symptom notations recorded in 2008. (ii) The global independence of the distribution of *P. aceris*-infested vines was then studied according the presence/absence matrixes. (iii) The last step corresponded in the study of the spatial dependency of leafroll diseased areas with *P. aceris*-infested areas. The dependency between distribution patterns was therefore tested with permutations by translation and assessed by a covariogram (Peyrard et al., 2005). Since the analysis generated many graphs that can be included here, a representative selection was displayed in the following analysis (the entire set of graphs is available upon request).

## Results

### Temporal analysis of leafroll spread.

The temporal evolution in leafroll incidence was different between the two vineyards. In Bonzon, a sigmoid curve showed that the percentage of vines exhibiting leafroll symptoms increased constantly from 5% in 2004 to 86% in 2011 (Figure 2a). Conversely, the incidence of leafroll in Marsannay-la-Côte remained stable at around 5% throughout the study, even though a slight increase of symptomatic vines, up to 9%, was noticed there in 2011. The presence of GLRaV-1 was determined during the winter of 2006-2007 by DAS-ELISA in Bonzon and Marsannay-la-Côte. The serological detection of virus during the vegetative dormancy of vines gave information about the symptom expression latency. In Bonzon, the proportion of positive vines (20%) was between the percentages of symptomatic vines in autumn 2006 and 2007 (13% and 28% respectively). Conversely, 9% of GLRaV-1 positive vines were found in Marsannay-la-Côte whereas symptom prevalence was around 4% in 2006 and 2007. This showed for both study sites that about 5% of vines were infected in 2006, but symptomless.
The absolute rate curves (*dy/dt* versus *t*) show the instantaneous changes of the disease incidence (Figure 2b). For Bonzon, the curve is typically parabolic and shows that the incidence of leafroll increased for 4 years to reach a plateau: the rate of incidence was the highest in 2008 and 2009 with over 20% of newly infected vines per year. Then the *dy*/*dt* rate decreased as the proportion of new diseased vines decreased. For Marsannay-la-Côte, the *dy/dt* curve indicates that leafroll incidence remained stable throughout the study except in 2011 when 98 additional plants expressed symptoms compared with 2010. The logistic regression model confirmed the two different temporal leafroll patterns (Figure 2c). The estimated infection rate obtained for Bonzon was very high (0.76 logit/year) compared to that obtained in Marsannay-la-Côte (0.05 logit/year). The rapid spread of the disease is attested in Bonzon by the significant value of the determination coefficient of the logistic model ($R^2$=0.98).

### Temporal analysis of the mealybug distribution.

In Bonzon, young adult females of *P. aceris* were observed on stems, buds, and under vine bark. Conversely, since no adult females of *P. aceris* were observed in spring on vines in Marsannay-la-Côte, monitoring was repeated in summer, which enabled the detection of the first instar nymphs (crawlers) on vine leaves.
Depending on the year, from 35% to 44% of vines harboured at least one mealybug in Bonzon, and from 1% to 7% in Marsannay-la-Côte, but with no significant fluctuation of *P. aceris* population at either site throughout the monitoring period. The overall proportion of vines observed at least once with *P. aceris* was greater in Bonzon (74%) than in Marsannay-la-Côte (8%). Furthermore, populations observed on each vine were much higher in Bonzon: there were greater than 15 young adult females per vine in Bonzon compared to fewer 6 crawlers per vine in Marsannay-la-Côte.

**Statistical analysis of the spatio-temporal dynamics of leafroll and mealybug.**

*Analysis of leafroll symptoms distribution*

The annual distribution of symptomatic vines is represented on grids where each square corresponds to a single plant. The grids confirmed the two distinct temporal patterns described above. Figure 3 displays eight successive maps showing that leafroll spread rapidly throughout Bonzon plot from 2004 to 2011. The epidemic started in 2004, mainly in the northern part of the vineyard (Figure 3, box b1). Two main symptomatic patches located in the southern part were recorded from 2006 onwards (Figure 3, boxes b2 & b3). A fourth affected area appeared in 2007 near the access path, on the eastern side of the vineyard (Figure 3, box b4). In addition to these main diseased areas, leafroll affected many other vines distributed elsewhere in the plot. The diseased areas expanded each year so as to represent 86% of all vines in 2011. The distribution of diseased vines in 2008 was mapped also on the two contiguous plots (Figure 4). The illustration of the three plots on a single map shows clearly a continuity of the diseased areas on both sides of the study plot (Figure 4, boxes b1 to b3). Almost all vines of the northern plot showed leafroll symptoms whereas the southern plot was less infected with two main leafroll patches. In Bonzon, the spatial dependency between symptomatic vines was significant from 2004 to 2011. The aggregation of vines showing leafroll symptoms was also confirmed statistically since the test of independence based on permutations was rejected (Figure 6a). From 2004 to 2007, test of independence between rows showed that symptomatic vines were distributed significantly according to lines (Figure 6b), which implies that leafroll spread from one row to the next. Then, permutation by rotation within the rows proved a significant aggregation along the row from 2007 onwards (Figure 6c), showing a spread of leafroll along the row. The symptomatology of diseased aggregates was further analyzed with the severity grades given for each symptomatic vine. The test of complete spatial randomness) showed that symptomatic vines were distributed according to the severity of leafroll expression from 2007 onwards. This consequently revealed the existence of a gradient within diseased aggregates (Figure 6d): as leafroll spread in the plot from the bordering plots, the first diseased vines showed the most obvious symptoms whereas vines infected later showed milder symptoms. This finding was supported by the spatial analysis of the newly diseased vines of each year. The test proved a significant spatial dependency between vines showing leafroll for the first time from 2007 onwards (Figure 6e). This analysis implies that each year, new leafroll symptoms spread from aggregates of vines. An additional permutation test was done to study the prevalence of leafroll symptoms in 2008 on the two contiguous vineyards at Bonzon (variogram not shown). This test proved a significant aggregation of symptomatic areas in the three consecutive plots and confirmed statistically the continuity of diseased areas in these three plots (Figure 4, boxes b1 to b3). The northern bordering vineyard and the study plot shared the main leafroll cluster (Figure 4, box b1), whereas the southern bordering vineyard shared with the study plot, two other diseased patches (Figure 4, boxes b2 and b3). The aggregation of diseased vines was also significant in Bonzon, showing that the disease had spread in patches from neighbouring vineyards.
The distribution of symptomatic vines in Marsannay-la-Côte from 2005 to 2011 is shown in Figure 5. The number of symptomatic vines was greater in the northern rows of the plot (Figure 5, box m1) but no obvious spread of leafroll was observable throughout the study. The location of the 98 new symptomatic vines observed in 2011 suggested that the disease occurred at random (Figure 5). In Marsannay-la-Côte, the spatial dependency between symptomatic vines was significant throughout the study, but for a limited distance in all permutation tests. As shown in the graph for 2007, the variogram is under the confidence interval below 5 m (Figure 6f). This proves the occurrence of small-sized diseased aggregates and indicates that leafroll did not spread from these aggregates during the monitoring period. The permutation test by rotation within the rows shows more precisely that the aggregates were directed along the rows (Figure 6g). Finally, global permutations performed on newly diseased vines did not show any specific distribution pattern of vines expressing leafroll for the first time, particularly for the new symptomatic vines in 2011 (Figure 6h). Thus, the incidence of leafroll in Marsannay-la-Côte is characterized by a random distribution of the new symptomatic vines.

*Analysis of mealybug-infested vines distribution*

At both study sites, previous statistical analysis showed the aggregated patterns of *P. aceris* infestation (Le Maguet et al., 2010).. In Marsannay-la-Côte, the clustering of infested vines was observed from 2007 to 2009 in the western part of the plot (3D diagrams available in electronic supplementary material). *Phenacoccus aceris* was widespread in Bonzon, particularly in four areas along the edges of the plot, which suggests that insects moved from the contiguous plots. The main aggregate of infested vines was located along the northern part of the vineyard. The mealybug infestation was also large along the southern border of the vineyard) and near the access path of the plot. The population level of *P. aceris* in the main aggregate was stable throughout the survey.

*Correlation between leafroll symptoms and mealybug distribution*

In Bonzon, the spatial dependency between aggregates of symptomatic vines and mealybug-infested vines was significant every year throughout the monitoring period. As shown in 2007, the covariogram was outside the confidence interval above a distance of 5 m (Figure 6i). Below this threshold, the aggregates are too small to be significantly correlated. The spatial dependency shown in Bonzon proved a correlation of infected vine patches with aggregates of vines infested by *P. aceris*. In Marsannay-la-Côte, the covariogram shows no significant spatial dependency between the two tested variables (Figure 6j). Thus, there was no spatial correlation between the location of vines showing leafroll symptoms and the presence of crawlers of *P. aceris* in this plot.

## Discussion

Leafroll spread patterns were studied in two diseased vineyards where both leafroll disease and mealybug vectors occurred. This work is the first demonstration of a rapid natural spread of GLRaV-1 in Europe and proves for the first time that the almost total contamination of a Pinot noir vineyard within eight years could be attributed to the mealybug *P. aceris*.

In recent years, several approaches have been used to study leafroll spread, such as surveys on GLRaVs and scale insect prevalence (Charles et al., 2009; Fuchs et al., 2009; Bertin et al., 2010), spatio-temporal analysis of leafroll spread in a plot (Habili and Nutter, 1997; Cabaleiro et al., 2008), and analysis of the incidence of GLRaV-3 variants (Jooste et al., 2011). In previous studies, scale insects were associated with leafroll spread but without statistical correlation evidence. One of the novel findings of this work is also the spatial correlation of leafroll presence and its natural vector, proven by an statistical method.

Both survey sites were affected by the GLRaV-1/*P. aceris* pathosystem but were planted near older vineyards that harboured different viral inoculum and mealybug infestations. These differences resulted in two distinct patterns of leafroll spread in each vineyard during the following years. At Bonzon, virus inoculum and mealybugs were highly prevalent in the vicinity: leafroll disease spread also quickly within 8 years over the whole plot from patches which first appeared on the edges of the plot. No obvious disease diffusion was noticed in Marsannay-la-Côte where there were few infected source plants and low mealybug populations. The two sites illustrate the patterns described recently (Cabaleiro, 2009): high leafroll incidence due to rapid disease spread from a bordering infected vineyard in Bonzon vs. low incidence of the disease with symptomatic vines randomly distributed in Marsannay-la-Côte.

In Bonzon village, the incidence of GLRaV-1 was extremely high in the immediately neighbouring vineyards of the study plot (data not shown). The combination of leafroll spread mapping and permutation analysis on the three consecutive plots confirmed that the Bonzon plot was directly contaminated from the two contiguous vineyards. A similar contamination pattern has been reported in surveys performed on GLRaV-3 in vineyards in California (Golino et al., 2008) and Spain (Cabaleiro et al., 2008). The extension of leafroll patches in Bonzon implied that a vector with a limited dispersive ability played a major role in the contamination of the plot. The 4-year monitoring showed that *P. aceris* directly moved into the Bonzon plot from older infected neighbouring vineyards and then spread leafroll from one row to the next and also along the rows. Thus, the gradual spread of the disease in Bonzon coincides well with the known dispersal characteristics of mealybugs (Charles et al., 2009), and was confirmed by the statistical correlation of aggregates of diseased vines with mealybug distribution. Immature crawlers are mainly responsible for the dispersal of mealybugs because of their high activity and may also be the main stages responsible for leafroll spread from plant to plant (Tsai et al., 2008). Furthermore, the efficient vector capability of *P. aceris* crawlers has been demonstrated recently in controlled conditions (Le Maguet et al., 2012). However, for practical reasons, surveys of *P. aceris* were conducted in Bonzon on adult female stages. Therefore, the notation grids reflected the distribution of mealybugs at a specific time. The abundance of mealybugs may thus have been underestimated, but since no expansion of mealybug patches was shown during the 4-year survey, we can consider that the investigation on adult females gave a representative picture of *P. aceris* distribution.

The reason why the mealybug patches did not spread more in the Bonzon plot is not known. Environmental factors shape the spatial distribution of invertebrates, especially for insects of limited mobility like mealybugs (Nestel et al., 1995). Natural enemies or mutualistic insects, such as ants, may have regulated and influenced the *P. aceris* dispersal behaviour. Mealybugs produce a substantial amount of honeydew, and maintain thereby preferential relationships with different ant species (Gullan and Kosztarab, 1997). For other mealybug-vectored viral diseases, a close relationship between the ant-mealybug mutualism and disease spread has been suspected for cacao swollen shoot (Lockhart and Sachey, 2001) and shown for pineapple mealybug wilt disease (PMWD) (Jahn et al., 2003). PMWD can indeed be disseminated among pineapple plants through the transportation of mealybug-vector by different ant species. As it was previously shown in Bonzon (Le Maguet et al., 2010) and in other vineyards in Burgundy (Sforza et al., 2003), *P. aceris* colonies cohabited regularly with ants.

It can therefore be hypothesized that the presence of ants in Bonzon was a significant factor affecting the infestation by *P. aceris*, and thereby the spread of leafroll disease.
The spatial pattern of leafroll contamination in Bonzon suggests that viruliferous mealybugs were introduced from neighbouring vineyards at two levels. Over short distances, mealybugs could have moved by walking or were transported through ant attendance, explaining the occurrence of leafroll patches near the boundaries of the plot. Over longer distances, the small 500 µm long first instar of the mealybug could have been dispersed easily by wind or carried by vineyard machinery (Grasswitz and James, 2008), explaining the random distribution of some new diseased vines.
In Marsannay-la-Côte, the prevalence of leafroll in the neighbouring vineyards was very low compared to Bonzon. Furthermore, the disease expression in the study plot was erratic with some symptoms disappearing on diseased plants in some years. Both levels of viral inoculum and mealybug vectors were too low to induce any spread of leafroll disease. The spatial analysis showed no gradient towards neighbouring vineyards and the few infected plants present were rather distributed as small aggregates along the rows. It also seems obvious that diseased vines coming from the nursery had been planted in Marsannay-la-Côte plot. The planting of these vines side by side in the row, groups of vines originating from the vegetative multiplication of the same mother plant: diseased replicates were planted by siblings, and this disposition was pointed out by the permutation analysis. A similar situation was described previously in a South African vineyard, where infected vines were spatially associated with specific rootstocks or scion clones (Pietersen, 2006). The incidence of leafroll in Marsannay-la-Côte increased by about 5% in 2011, revealing a potential natural spread by mealybugs from infected vines. This possible leafroll spread warrants continued leafroll and mealybug monitoring on this plot.
We proved that the almost complete contamination of a vineyard within ten years after planting could be attributed to *P. aceris*. At Bonzon, the annual infection rate of 0.74 logit showed that the spread was twice as rapid as previously shown in another 'Pinot noir' plot recorded in Australia (Habili and Nutter, 1997). However, spread in Bonzon was similar to that estimated in Spain in an 'Albariño' vineyard infested by *Planococcus citri*, where GLRaV-3 prevalence reached 86% within seven years (Cabaleiro and Segura, 2006). Events of leafroll spread in mild climate regions have been mainly reported on GLRaV-3, with *Planococcus* sp.-infested vineyards. However, our work on the *P. aceris*/GLRaV-1 pathosystem could induce a serious leafroll epidemic. Furthermore, recent experiments have demonstrated that *P. aceris* efficiently transmits six distinct GLRaV species, *Grapevine virus A* and *Grapevine virus B* (GVA and GVB) (Le Maguet et al., 2012). The tolerance of *P. aceris* to low winter temperatures implies the need to give more attention to its occurrence in vineyards grown in temperate regions, notably in North America, Central Europe and Japan.
The ampelovirus GLRaV-1 is widespread in vineyards in many parts the world but its natural diffusion has only been reported on a rootstock nursery vineyard in New Zealand (Bonfiglioli et al., 2001). Our study demonstrates for the first time in Europe the major role of a mealybug in the natural spread of GLRaV-1 in a vineyard. The latency period of two years before GLRaV-1 detection and symptoms expression in Bonzon is consistent with previous results obtained for GLRaV-3 (Cabaleiro et al., 2008) but a substantial number of diseased vines could remain longer symptomless, particularly in Marsannay-la-Côte. Both vineyards were planted with similar clones and rootstocks and share a comparable semi-continental climate. The presence of specific GLRaV-1 isolates in Marsannay-la-Côte could explain the erratic symptomatology of leafroll in this vineyard as compared to Bonzon. A preliminary molecular analysis of the genetic diversity of GLRaV-1 isolates in Bonzon suggested that high variability of GLRaV-1 within a contaminated patch. Similarly, in a South African vineyard, virus GLRaV-3 has been proved to occur as specific variants in a single plot and to spread to adjacent vines according to infection clusters (Jooste and Goszczynski, 2005; Jooste et al., 2011). The two different epidemiological patterns described in our study also represent a unique opportunity to perform further studies on the comparative diversity in GLRaV-1 isolates within and between the two study sites.

**Acknowledgements**

We thank Dr. Boudon-Padieu, Mr. Dureuil, and the winegrowers of Bonzon and Marsannay-la-Côte, Mr. Barraud and Mr. Charlopin for having initiated the leafroll survey. We are most grateful to Dr. René Sforza for his critical reading of the manuscript. This research was financed by three French professional committees for viticulture: Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne, Epernay; Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne, Beaune; and Comité Interprofessionnel des Vins d'Alsace, Colmar; and by FranceAgriMer grants (N° 2009 47 005 104, N°2009 77 030 104 and N°2011 0106 001 104).

**References**


Al Rwahnih, M., Dolja, V.V., Daubert, S., Koonin, E.V., & Rowhani, A. (2012). Genomic and biological analysis of Grapevine leafroll-associated virus 7 reveals a possible new genus within the family *Closteroviridae*. Virus Research. 163, 302-309.

Atallah, S.S., Gomez, M.I., Fuchs, M., & Martinson, T.E. (2012). Economic impact of Grapevine leafroll disease on Vitis vinifera cv. Carbenet franc in Finger Lakes vineyards of New York. American Journal of Enology and Viticulture. 63, 73-79.

Belli, G., Fortusini, A., Casati, P., Belli, L., Bianco, P.A., and Prati, S. (1994). Transmission of a grapevine leafroll associated closterovirus by the scale insect *Pulvinaria vitis* L. Rivista di Patologia Vegetale. 4, 105- 108.

Bertamini, M., Muthuchelian, K., & Nedunchezhian, N. (2004). Effect of Grapevine Leafroll on the Photosynthesis of Field Grown Grapevine Plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). Journal of Phytopathololology. 152, 145-152.

Bertin, S., Cavalieri, V., Graziano, C., & Bosco, D. (2010). Survey of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) vectors of Ampelovirus and Vitivirus in vineyards of northwestern Italy. Phytoparasitica 38, 401-409.

Bonfiglioli, R.G.E., Hoskins, N., & Edwards, F. (2001). Grapevine leafroll viruses in New Zealand viticulture. Riversun Technical Bulletin, 1-8.

Boudon-Padieu, E., Ridé, M., & Walter, B. (2000). L'enroulement viral. (In Féret (Ed.), Maladies à virus, bactéries et phytoplasmes de la Vigne (pp. 47-55). Bordeaux)

Cabaleiro, C. (2009, September). Current advances in the epidemiology of grapevine leafroll disease. (Paper presented at the 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine,Dijon, France, pp. 264-268).

Cabaleiro, C., & Segura, A. (1997). Some characteristics of the transmission of grapevine leafroll associated virus 3 by *Planococcus citri* Risso. European Journal of Plant Pathology. 103, 373-378.

Cabaleiro, C., & Segura, A. (2006). Temporal analysis of grapevine leafroll associated virus 3 epidemics. European Journal of Plant Pathology. 114, 441-446.

Cabaleiro, C., Couceiro, C., Pereira, S., Cid, M., Barrasa, M., & Segura, A. (2008). Spatial analysis of epidemics of Grapevine leafroll associated virus-3. European Journal of Plant Pathology. 121, 121-130.

Charles, J.G., Froud, K.J., van den Brink, R., & Allan, D.J. (2009). Mealybugs and the spread of grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) in a New Zealand vineyard. Australasian Plant Pathology. 38, 576-583.

Dimitrijevic, B. (1973). Some observations on natural spread of Grapevine Leafroll disease in Yugoslavia. Rivista di Pathologia Vegetale. 9, 114-119.

Engelbrecht, D.J., & Kasdorf, G.G.F. (1985). Association of a closterovirus with grapevines indexing positive for grapevine leafroll disease and evidence for its natural spread in grapevine. Phytopathologia Mediterranea 24, 101-105.

Engelbrecht, D.J., & Kasdorf, G.G.F. (1990). Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug, *Planococcus ficus*. Phytophylactica 22, 341-346.

Fortusini, A., Scattini, G., Prati, S., Cinquanta, S., & Belli, G. (1997). Transmission of Grapevine leafroll virus 1 (GLRaV-1) and Grapevine virus A (GVA) by scale insects. (Paper presented at the 12th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine, Lisbon, Portugal).

Fuchs, M., Martinson, T.E., Loeb, G.M., & Hoch, H.C. (2009). Survey for the three major leafroll disease-associated viruses in Finger Lakes vineyars in New York. Plant Disease. 93, 395-401.

Gaetan, C., & Guyon, X. (2008). Statistics for spatial models. In Springer (Eds.), Spatial statistics and modeling (pp. 320).

Golino, D.A., Weber, E., Sim, S.T., & Rowhani, A. (2008). Leafroll disease is spreading rapidly in Napa Valley vineyard. California Agriculture. 62, 156-160.

Grasswitz, T.R., & James, D.G. (2008). Movement of grape mealybug, Pseudococcus maritimus, on and between host plants. Entomologia Experimentalis et Applicata. 129, 268 - 275.

Gullan, P., and Kosztarab, M. (1997). Adaptations in scale insects. Annual Review of Entomology 42, 23-50.

Habili, N., & Nutter, F.W. (1997). Temporal and spatial analysis of grapevine leafroll-associated virus 3 in Pinot Noir grapevines in Australia. Plant Disease. 81, 625-628.

Habili, N., Randles, I.J.W., & Rowhani, A. (2003). Evidence for the apparent spread of grapevine virus and grapevine leafroll associated virus 9 in research vineyard in Australia. (Paper presented at the 14th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine, Locorotondo, Italy, pp. 213).

Jahn, G.C., Beardsley, J.W., and Gonzales-Hernandez, H. (2003). A review of the association of ants with mealybug wilt disease of pineapple. Proceedings of the Hawaiian Entomology Society 36, 9-28.

Jooste, A.E.C., & Goszczynski, D.E. (2005). Single-strand conformation polymorphism (SSCP), cloning and sequencing reveals two major groups of divergent molecular variants of grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3). Vitis 44, 39-43.

Jooste, A.E.C., Pietersen, G., & Burger, J.T. (2011). Distribution of grapevine leafroll associated virus-3 variants in South African vineyards. European Journal of Plant Pathology. 131, 371-381.

Komar, V., Vigne, E., Demangeat, G., Lemaire, O., & Fuchs, M. (2010). Comparative Performance of Virus-Infected Vitis vinifera cv. Savagnin rose Grafted onto Three Rootstocks. American Journal of Enology and Viticulture. 61, 68-73.

Le Maguet, J., Beuve, M., Herrbach, E., & Lemaire, O. (2012). Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris*. Phytopathology. 102, 717-723.

Le Maguet, J., Herrbach, E., Hommay, G., Beuve, M., & Lemaire, O. (2010). The apple mealybug, *Phenacoccus aceris* is a vector of several grapevine-infecting viruses. (Paper presentend at the 12th International Symposium of Scale insect Studies (Chania, , Greece, pp. 18).

Lockhart, B. E., and Sachey, S. T. 2001. Cacao swollen shoot. Pages 172-173 in: Encyclopedia of Plant Pathology, vol. 1. O. C. Maloy, and T. D. Murray, eds. John Wiley and Sons, New York.

Lee, J., & Martin, R.R. (2009). Influence of grapevine leafroll associated viruses (GLRaV-2 and -3) on the fruit composition of Oregon *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir: Phenolics. Food Chemistry 112, 889-896.

Mahfoudhi, N., Digiaro, M., & Dhouibi, M.H. (2009). Transmission of grapevine leafroll viruses by *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) and *Ceroplastes rusci* (Hemiptera: Coccidae). Plant Disease. 93, 999-1002.

Martelli, G.P., & Boudon-Padieu, E. (2006). Directory of infectious diseases of grapevine and viroses and virus-like diseases of the grapevine. In Bibliographic report 1998-2004 (Options méditerranéennes, Série B: Studies and Research, CIEHAM-IAMB), pp. 59-75.

Nestel, D., Cohen, H., Saphir, N., Klein, M., & Mendel, Z. (1995). Spatial distribution of scale insects: comparative study using Taylor's power law. Environmental Entomolology. 506-512.

Peyrard, N., Calonnec, A., Bonnot, F., & Chadoeuf, J. (2005). Explorer un jeu de données sur grille par tests de permutation. Revue de statistique appliquée 53, 59-78.

Peyrard, N., Pellegrin, F., Chadoeuf, J., & Nandris, D. (2006). Statistical analysis of the spatio-temporal dynamics of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) trunk phloem necrosis: no evidence of pathogen transmission. Forest Pathology. 36, 360-371.

Pietersen, G. (2006). Spatio-temporal distribution dynamics of grapevine leafroll disease in western cape vineyards. (Paper presented at the 15th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine, Stellenboch, South Africa, pp. 126).

Sforza, R. (2008). Les cochenilles sur la vigne: bio-éthologie, impact agronomique, lutte et prophylaxie. In Féret (Ed.) Ravageurs de la vigne pp. 188-210, Bordeaux.

Sforza, R., Boudon-Padieu, E., & Greif, C. (2003). New mealybug species vectoring Grapevine leafroll associated viruses -1 and -3 (GLRaV-1 and -3). European Journal of Plant Pathology. 109, 975-981.

Tsai, C.W., Chau, J., Fernandez, L., Bosco, D., Daane, K.M., & Almeida, R.P.P. (2008). Transmission of Grapevine leafroll-associated virus 3 by the vine mealybug (Planococcus ficus). Phytopathology 98, 1093-1098.

Zimmermann, D., Bass, P., Legin, R., & Walter, B. (1990). Characterization and serological detection of four closterovirus-like particles associated with leafroll disease on grapevine. Journal of Phytopathology. 130, 205-218.

Zorloni, A., Prati, S., Chiesa, S., & Bianco, P. (2006). Transmission of Grapevine leafroll-associated virus 3 by the soft scale insect Neopulvinaria innumerabilis. Journal of Plant Pathology. 88, S61.

Figure 1: Geographical location of the two study sites, and schematic representation of the plots with row orientation.

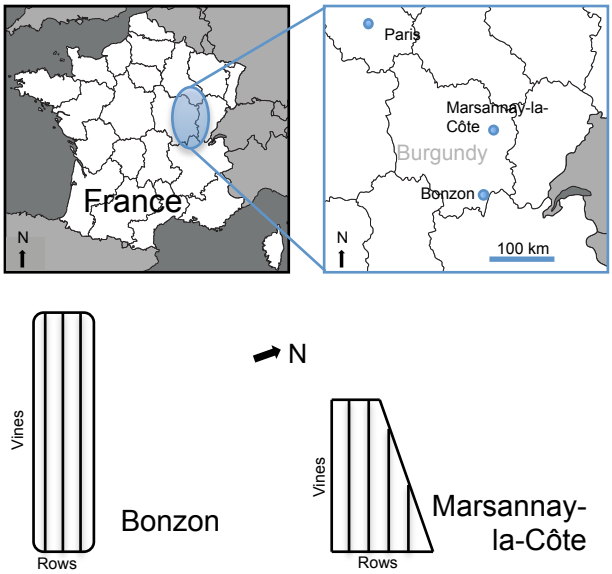


Figure 2: Evolution of grapevine leafroll epidemic in studied sites between 2004 and 2011. (a) Disease progress curve of annual prevalence of leafroll disease based on the annual percentages of symptomatic vines; (b) Curve of incidence of leafroll function of time; (c) Logit of leafroll disease incidence versus time. The slope of the regression lines corresponds to the rate of leafroll spread on each plot, respectively 0.76 logit/year and 0.05 logit/year in Bonzon and Marsannay-la-Côte.

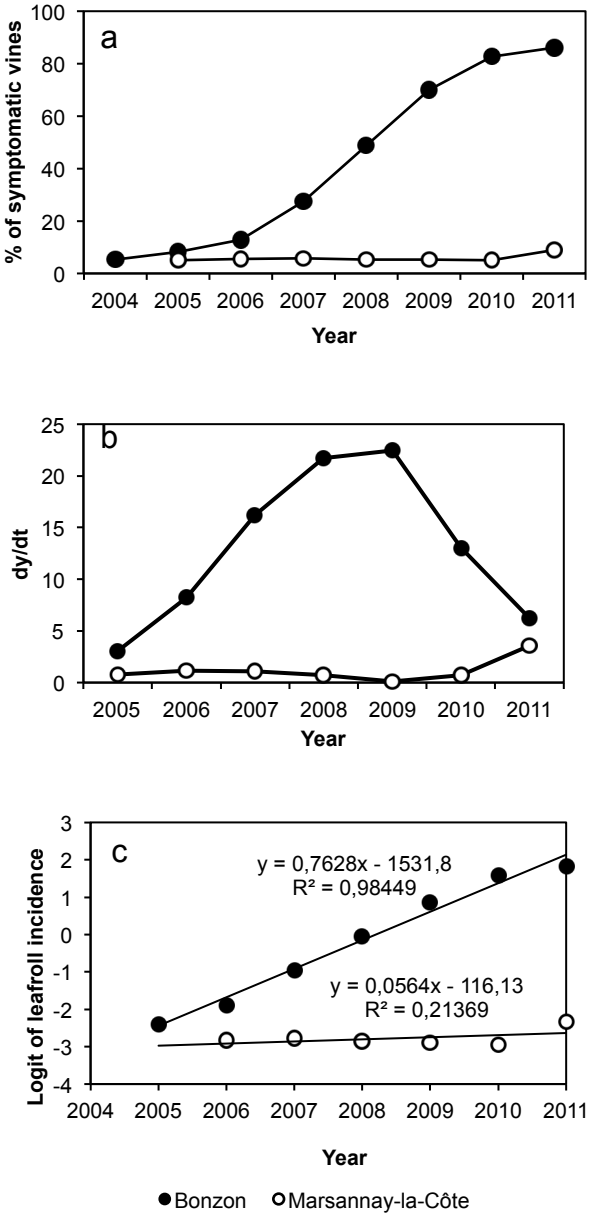


Figure 3: Maps of the spatial distribution of leafroll in Bonzon plot between 2004 and 2011. Each square represents a vine with its disease status: symptomless (white), symptomatic (red). Boxes “b1” to “b4” indicate the disease patches appearing.

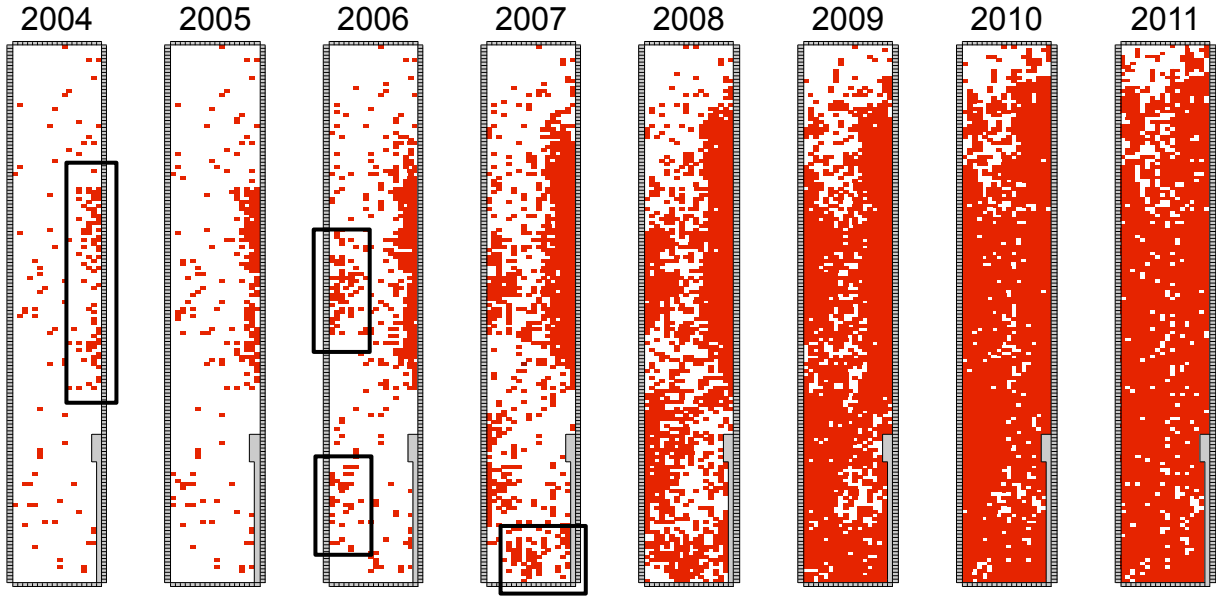



Figure 4: Map of the spatial distribution of leafroll in 2008 in Bonzon and its two adjacent plots. Each square represents a vine with its disease status: symptomless (white), symptomatic (red). Boxes “b1” to “b3” indicate the shared diseased areas across the plots.

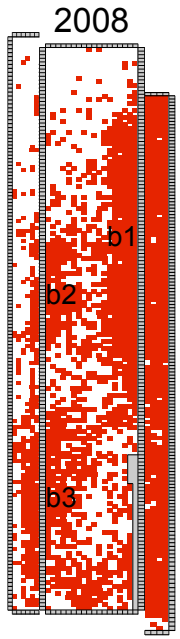


Figure 5: Maps of the spatial distribution of leafroll in Marsannay-la-Côte plot between 2005 and 2011. Each square represents a vine with its disease status: symptomless (white), symptomatic (red). Squares in black represent new symptomatic vines in 2011. Box “m1” indicates the area with the highest density of diseased vines.

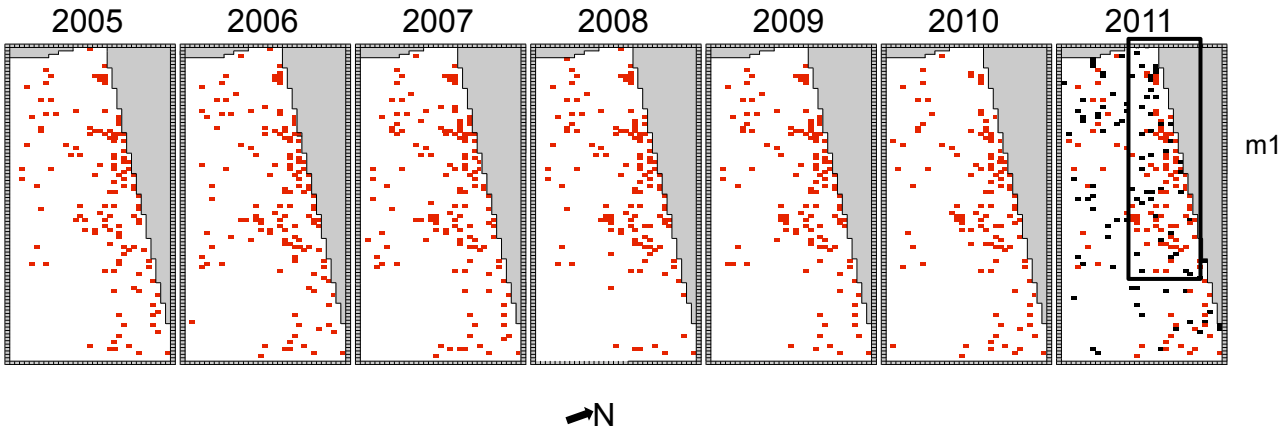
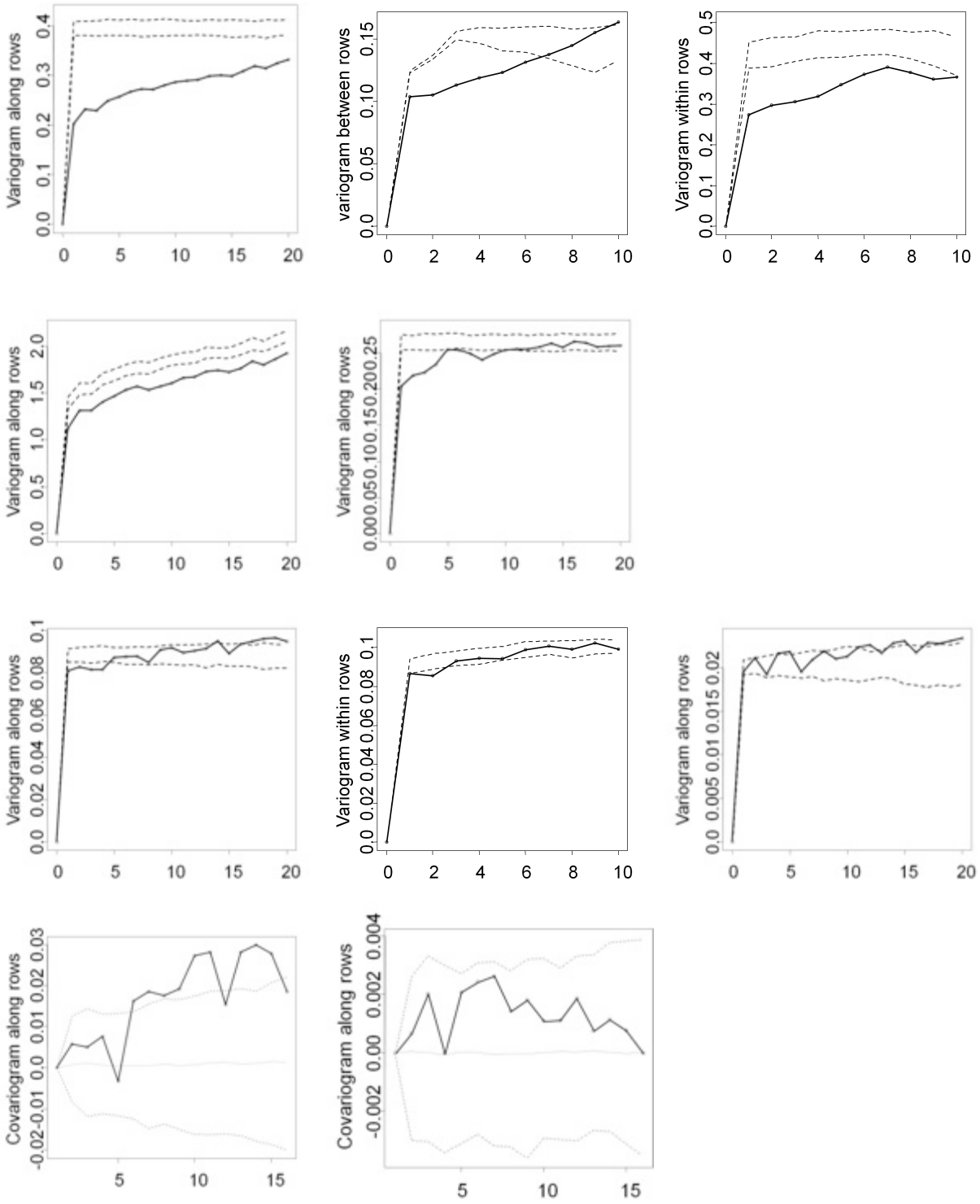
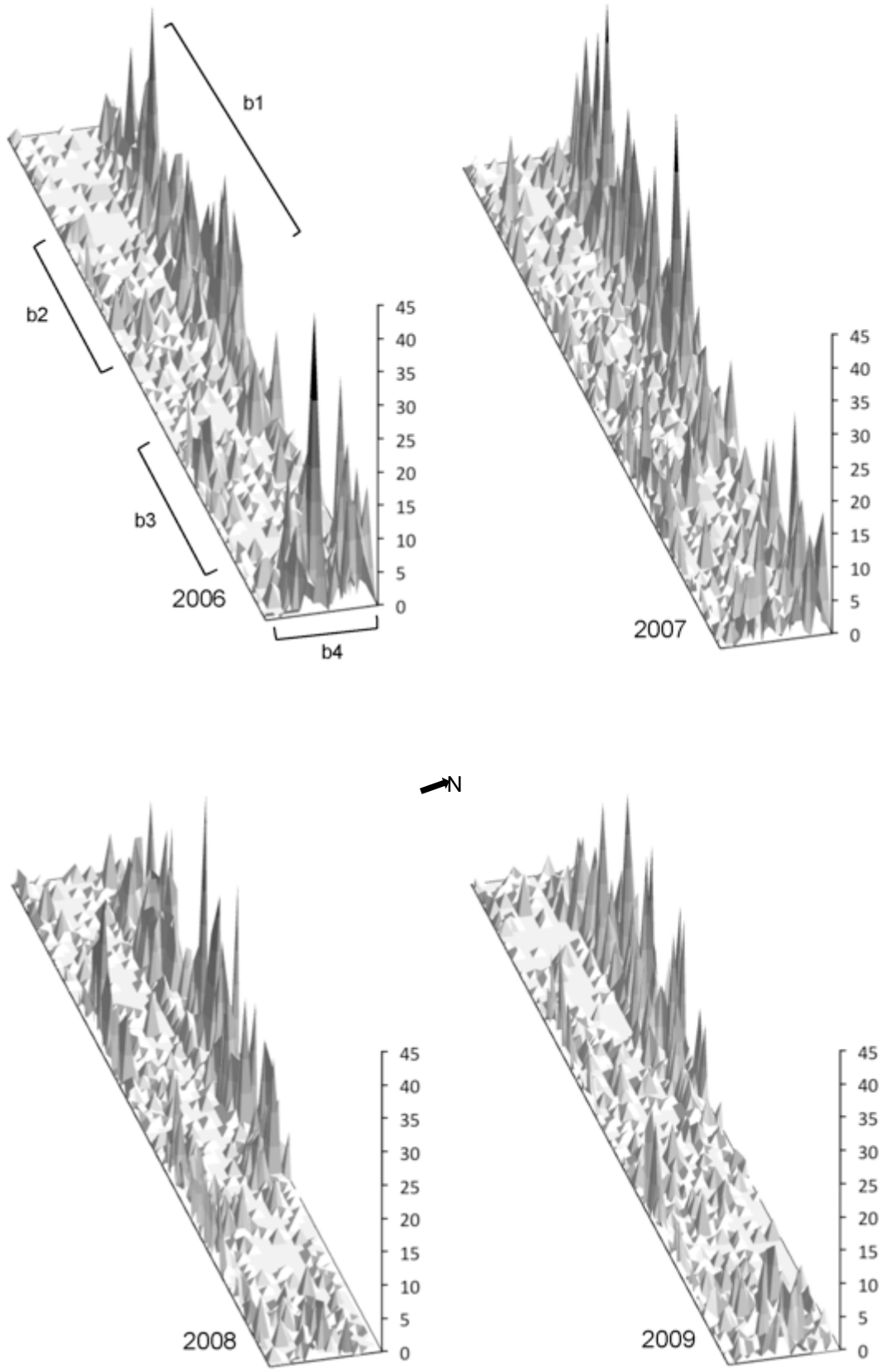


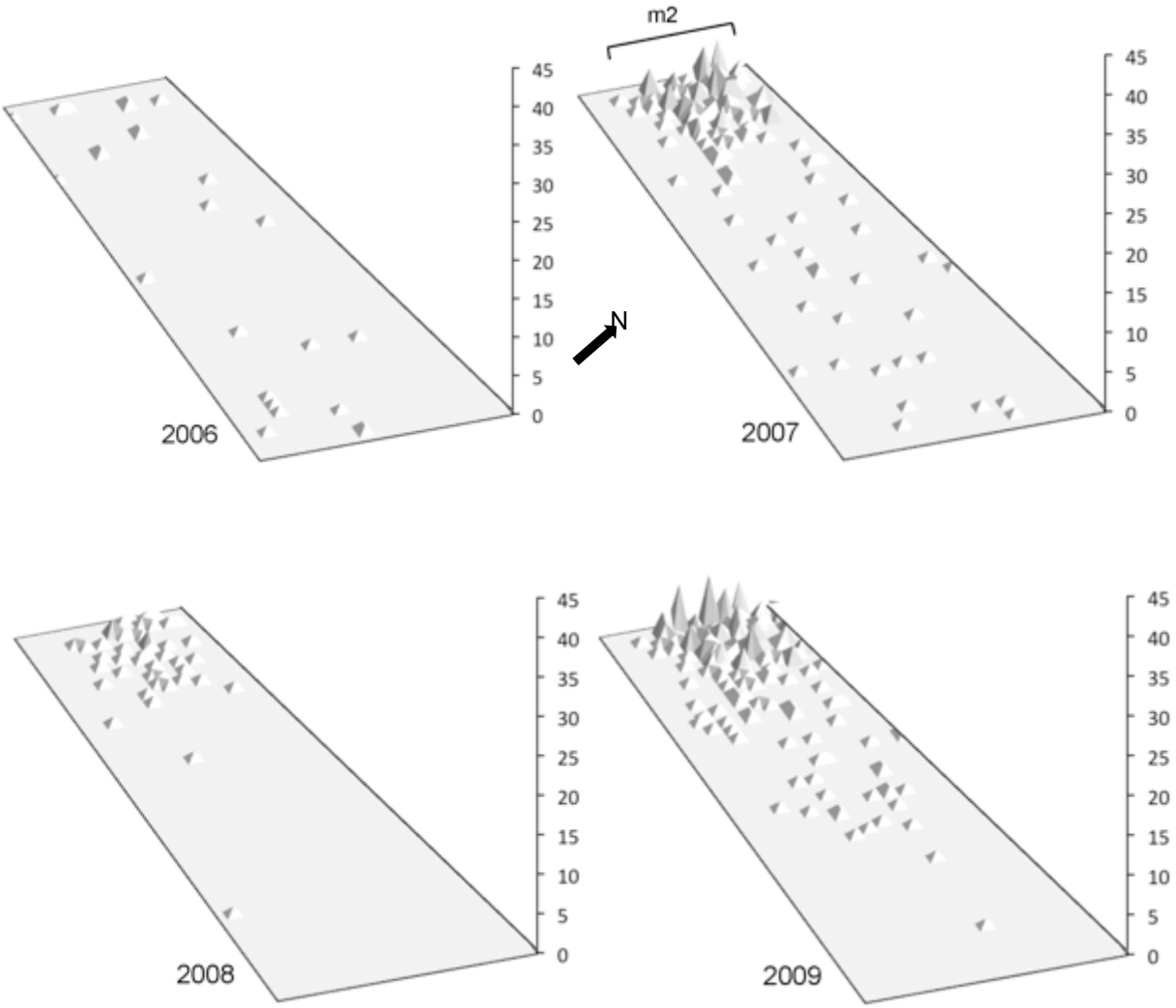
Figure 6: Variograms (a to h) and covariograms (i and j) generated by permutation tests. A spatial dependancy among data is proven when the variogram or the covariogram (continuous line) is outstide the confidence interval (dashed lines). X-axis : distance in meters; Y-axis : value of the variogram or covariogram; (a) Test of total independance on leafroll distribution in 2007 in Bonzon; (b) Test of independence of rows on leafroll distribution in 2005 in Bonzon; (c) Test of independence within rows on leafroll distribution in 2008 in Bonzon; (d) Test of total independence within disease aggregates in 2007 in Bonzon; (e) Test of total independence on newly diseased vines in 2007 in Bonzon; (f) Test of total independence on leafroll distribution in 2007 in Marsannay-la-Côte; (g) Test of independence within rows on leafroll distribution in 2007 in Marsannay-la-Côte; (h) Test of total independence on newly diseased vines in 2007 in Marsannay-la-Côte; (i) Test of total independence between leafroll and *Phenacoccus aceris* distributions in 2007 in Bonzon; (j) Test of total independence between leafroll and *Ph. aceris* distributions in 2007 in Marsannay-la-Côte.



Supplemental data 1: Chart of the spatial distribution of *Phenacoccus aceris* in Bonzon between 2006 and 2009. Square brackets “b1 to “b4” point out the areas heavily infested by the mealybugs. Vertical axis: number of mealybugs per vine.



Supplemental data 2 : Chart of the spatial distribution of *Phenacoccus aceris* in Marsannay-la-Côte between 2006 and 2009. Vertical axis: number of mealybugs per vine. Square bracket “m2” points out the patch of *Ph. aceris* infestationin the western part of the plot.



## V.5. Analyses spatiales complémentaires à Plumecoq et Odenas

A l'image des sites de Marsannay-la-Côte et Bonzon, la répartition spatiale des ceps infectés a été étudiée sur la base des symptômes à Plumecoq et Odenas, dans le but de rechercher la corrélation entre présence de cochenilles et présence de ceps symptomatiques.

### *V.5.a. Parcelle de Plumecoq*

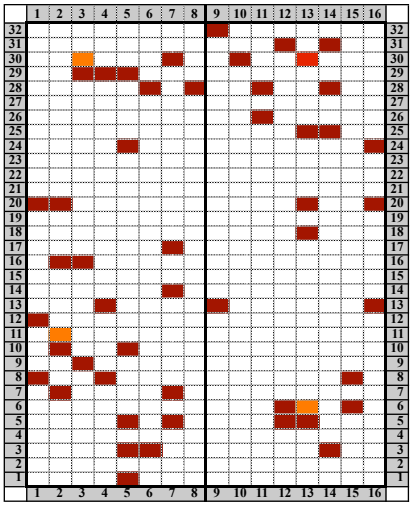


**Figure 25. Localisation des ceps exprimant des symptômes d'enroulement à Plumecoq. Premières expressions de symptômes ; de 2000 à 2007 : bordeaux, en 2008 : rouge, en 2009 : orange.**

La cartographie des ceps exprimant des symptômes à Plumecoq illustre l'absence de progression significative de l'enroulement viral. Quatre ceps enroulés supplémentaires sont signalés en 2008 et 2009 par rapport à l'ensemble des notations effectuées sur la période 2000-2007 (Figure 25). Le test d'indépendance spatiale appliqué à ces données est non significatif et ne prouve ainsi aucune structuration spatiale particulière, confirmant que les ceps malades sont répartis de façon aléatoire.

Le test d'indépendance spatiale confrontant les données cochenilles et symptômes n'est également pas significatif : la présence de cochenilles sur un cep n'explique donc pas l'infection de la plante par l'enroulement.

### *V.5.b. Parcelle d'Odenas*

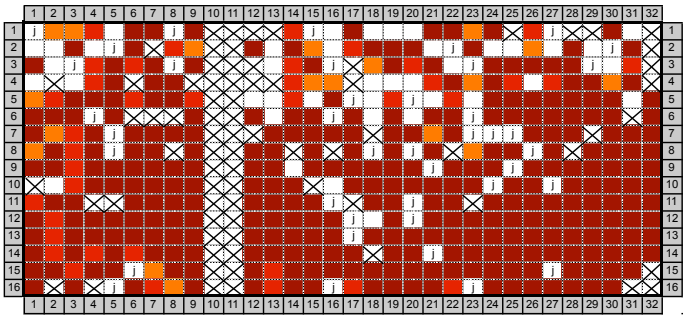


**Figure 26. Localisation des ceps exprimant des symptômes d'enroulement à Odenas. Premières expressions de symptômes ; de 1999 à 2007 : bordeaux, en 2008 : rouge, en 2009 : orange. Croix : ceps manquants ou arrachés, j : jeunes plantations.**

La corrélation spatiale entre présence de cochenilles et infection des ceps par l'enroulement est rendue malaisée par le stade avancé de l'épidémie sur cette parcelle. Comme la maladie touche plus de 85 % des ceps en cumul sur la période de notation, cette parcelle ne constitue en effet plus qu'un foyer unique d'enroulement.
Aussi, l'application d'un test d'indépendance spatiale comparant distribution des cochenilles et distribution des symptômes n'a donc pas de valeur statistique dans ce cas.

## VI. Bilan épidémiologique sur les quatre parcelles

Si l'on peut réellement parler d'épidémie d'enroulement viral à Bonzon et Odenas, le terme ne semble pas adapté pour décrire l'évolution de la maladie à Plumecoq et Marsannay-la-Côte. Du grec *epi* signifiant 'au dessus de' et *dêmos,* signifiant 'population', l'épidémie implique une notion de rapidité dans la dispersion de la maladie au sein de la population d'hôtes. Les sources médicales indiquent que cette définition peut être étendue à « toute maladie contagieuse ou non, tout événement de santé, affectant un très grand nombre d'individus » (Collectif, 2012a). La prévalence de la maladie à Plumecoq et Marsannay-la-Côte ne dépassant pas 10 % sur la période d'étude, on parlera donc plutôt dans ces deux cas de contamination par l'enroulement pour éviter les confusions.

L'analyse épidémiologique sur les parcelles d'étude met en évidence les disparités existant entre les parcelles et révèle trois dynamiques de contamination différentes. L'évolution de la contamination de chaque parcelle se distingue aussi bien au niveau temporel (Figure 27) qu'au niveau spatial (Figure 28). Ce bilan résume donc ces caractéristiques en replaçant chacune des parcelles dans leur contexte global.

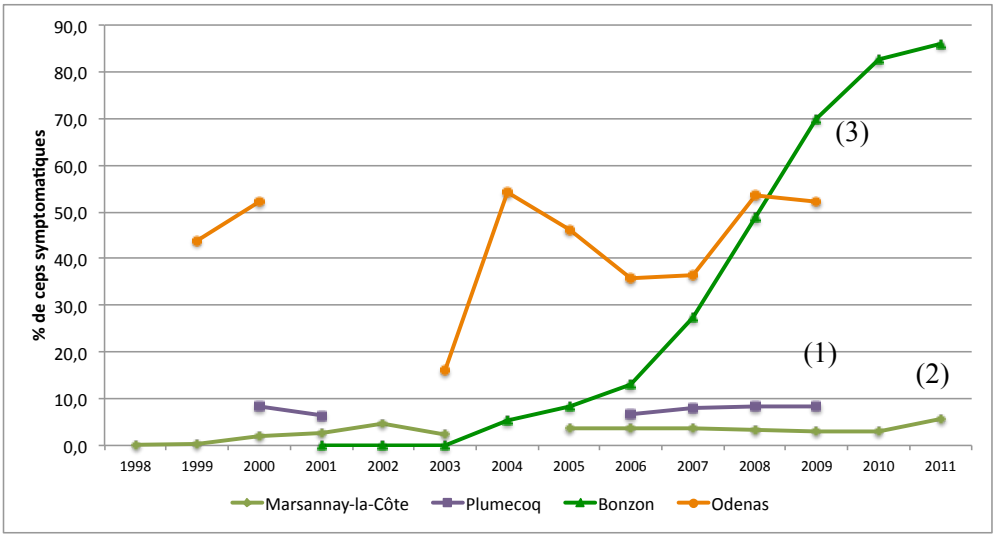



**Figure 27. Evolution de la prévalence de l'enroulement viral sur les quatre parcelles d'étude de 1998 à 2011. Aux trois types d'évolution temporelle identifiés (chiffres entre parenthèses) correspond un motif particulier de dispersion au niveau spatial (voir figure suivante).**

La parcelle de Plumecoq constitue un exemple de **contamination primaire par l'introduction de matériel végétal infecté**. Sur l'ensemble des ceps implantés en 'Pinot noir' et 'Pinot meunier', certains ont en effet exprimé précocément les symptômes d'enroulement et se sont ainsi révélés porteurs de GLRaV-3 et de GLRaV-1 (C. Palgé, CIVC, communication personnelle). Bien que l'inoculum primaire soit disponible au sein même de la parcelle, l'étude épidémiologique montre que la présence de deux espèces de *Coccidae* n'a conduit à aucune contamination secondaire. Aussi sur une période de 10 années, la présence concomitante de cochenilles vectrices et d'enroulement viral n'a pas conduit à une épidémie d'enroulement viral sur ce site (motif (1), Figure 27 et Figure 28).

La situation relativement isolée de Plumecoq par rapport au reste du vignoble situé autour d'Epernay confère à ce site une certaine protection sanitaire. Le domaine est en effet bordé d'une zone de grande culture, non hôte pour les cochenilles et l'enroulement viral, constituant une barrière physique efficace vis à vis des parcelles viticoles potentiellement sources d'enroulement et/ou de cochenilles virulifères.

La parcelle de Marsannay-la-Côte illustre également un cas d'introduction de matériel végétal contaminé par l'enroulement. Les suivis sanitaires ont cependant montré une expression irrégulière des symptômes dans le temps comme dans l'espace, faisant ainsi supposer l'apparition de nouveaux ceps contaminés par le biais d'insectes vecteurs. Nos relevés entomologiques montrent que la seule présence de cochenilles vectrices ne peut expliquer la contamination primaire de la parcelle. Ainsi, le type de répartition de la maladie observé sur cette parcelle d'étude est principalement la conséquence de la plantation aléatoire de fratries de ceps provenant de matériel végétal infecté. Toutefois, l'incidence de l'enroulement constatée en 2011 est plus importante que par les années passées. Cette situation ne peut toutefois être raisonnablement imputée à une expression subite de symptômes d'enroulement après une latence de plus de 15 ans.
Ce cas représenterait donc une **contamination secondaire de la parcelle à partir de sources internes d'inoculum**. Il est probable que la contamination secondaire des ceps ait eu lieu par le biais de *P. aceris* (motif (2), Figure 27 et Figure 28). Bien que la population de cette cochenille ne soit pas durablement établie sur vigne, la proximité de la colonie de *P. aceris* sur lierre (*Hedera helix*) implique que des évènements de transmission ponctuels peuvent survenir. Replacée dans un contexte plus global, cette parcelle d'étude est située en continuité directe avec l'ensemble des autres parcelles des vignobles de Marsannay-la-Côte et Couchey. La prévalence de l'enroulement viral y est très faible et aucune infestation de vigne par cochenille n'a été signalée à ce jour. L'incidence de la maladie et la présence de cochenilles étant faibles, la problématique de l'enroulement viral reste marginale dans ce vignoble.

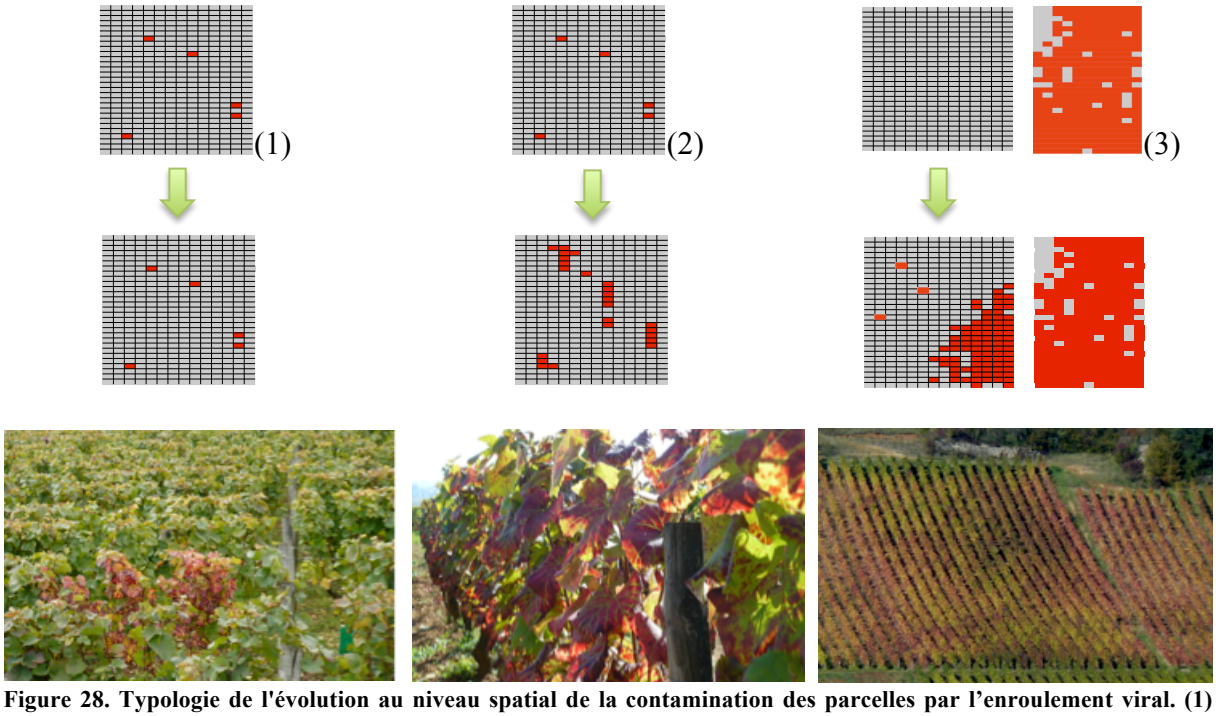



**Figure 28. Typologie de l'évolution au niveau spatial de la contamination des parcelles par l'enroulement viral. (1) Plantation de matériel végétal enroulé, révélée par la distribution aléatoire caractéristique des cep malades : aucune diffusion de la maladie (2). Introduction de matériel végétal enroulé de manière randomisée : début de diffusion de la maladie par cochenilles vectrices. (3) Mise en place d'une parcelle saine à proximité immédiate d'une zone infectée par l'enroulement viral : contamination des rangs de proche en proche par la dissémination de cochenilles virulifères.**

L'épidémie d'enroulement observée à Bonzon est liée au contexte de plantation de cette parcelle. Il n'est pas rare de remarquer à l'automne dans cette vallée viticole des parcelles de 'Pinot noir' ou de 'Chardonnay' totalement contaminées par l'enroulement, indiquant ainsi une prévalence très forte de la maladie dans la région. Malgré cela, la parcelle d'étude de Bonzon a été plantée en 2001 entre deux parcelles contigües plus anciennes très enroulées. Il faut noter que 3 des 4 cochenilles présentes sur vigne dans la région n'étaient à l'époque pas encore identifiées comme vectrices de l'enroulement viral (Sforza et al., 2003a). L'abondance de ces cochenilles sur le site, en particulier de *P. aceris,* est selon nos analyses à l'origine de la dispersion rapide de la maladie dans la parcelle d'étude. Cette parcelle illustre donc le cas d'une **contamination secondaire à partir de réservoirs d'inoculum externes à la parcelle** (motif (3), Figure 27 et Figure 28). L'inoculum primaire étant disponible à proximité immédiate, la population abondante de cochenilles vectrices présente sur le site a conduit à l'épidémie d'enroulement décrite dans notre étude.

Il est vraisemblable qu'une épidémie du même type se soit déroulée à Odenas. Ne disposant pas des mêmes informations qu'à Bonzon sur l'état sanitaire de la parcelle dès la plantation, cela n'exclut pas l'existence de sources internes de contamination liées à l'introduction de matériel végétal infecté. Pour autant, la prévalence de l'enroulement dans le vignoble alentour est forte, et la cochenille la plus abondante, *H. bohemicus,* a certainement joué un rôle majeur dans l'épidémie d'enroulement sur cette parcelle.

Les résultats obtenus au cours de cette analyse épidémiologique illustrent la variété des situations de contamination pouvant exister à l'échelle d'une région sur une même période. Les différences constatées selon les contextes de plantation des vignobles étudiés ont été déterminantes dans le développement de l'épidémie d'enroulement viral. D'une situation sanitaire stable illustrée par Plumecoq, une épidémie d'enroulement peut aussi bien évoluer très lentement comme à Marsannay-la-Côte, qu'avoir un caractère beaucoup plus sévère comme le montrent les cas d'Odenas et surtout de Bonzon.

Les raisons pour lesquelles les épidémies se sont déclarées ou non sur les parcelles n'ont pourtant pas pu être toutes élucidées. Bien qu'il soit clair que l'aspect "matériel végétal" soit essentiel, les caractéristiques biologiques des cochenilles et des virus de l'enroulement pourraient expliquer pourquoi on a assisté à la contamination quasi-totale de la parcelle de Bonzon en 8 années et non à Marsannay-la-Côte. En guise de perspectives pour cette étude épidémiologique, le chapitre suivant présente ainsi les travaux effectués sur l'analyse moléculaire du GLRaV-1 à Bonzon et sur une comparaison génétique et morphologique préliminaire entre les populations de *P. aceris* sur les sites de Marsannay-la-Côte et de Bonzon.

# Chapitre 5. Approche moléculaire de l'épidémiologie du GLRaV-1 et de la cochenille vectrice *P. aceris*

Les parcelles de Bonzon et Marsannay-la-Côte sont toutes deux concernées par le pathosystème GLRaV-1-*Phenacoccus aceris*. Cependant, l'étude entomologique et épidémiologique précédente a montré qu'elles diffèrent par la dynamique temporelle et spatiale de l'évolution de leur contamination par l'enroulement. Deux pistes visant à élargir l'étude épidémiologique ont donc été envisagées. D'une part, la parcelle de Bonzon, exemple typique de dispersion naturelle de l'enroulement viral par cochenille, nous a semblé particulièrement intéressante pour étudier la diversité moléculaire d'une population de virus transmise par insecte vecteur au vignoble. D'autre part, les différences biologiques constatées entre les deux populations de *P. aceris* de Bonzon et de Marsannay-la-Côte nous ont amenés à réaliser une étude comparative préliminaire au niveau morphologique et génétique.

## I. Epidémiologie moléculaire du GLRaV-1

Sur la base du diagnostic sérologique effectué à Bonzon en 2006, nous avons montré que le GLRaV-1 représente l'espèce d'enroulement majoritairement détectée sur la parcelle d'étude. Avant d'engager la piste moléculaire, nous avons examiné le statut sérologique de la végétation présente aux abords, afin notamment de confirmer la prédominance du GLRaV-1 au sein des parcelles de vigne situées dans l'environnement immédiat.

### I.1. Travaux préliminaires

#### *I.1.a. Détection virale dans les non-Vitis*

Nous avons tout d'abord cherché à identifier si les plantes ligneuses situées en bordure de la parcelle d'étude (haie et bordure boisée) pouvaient constituer un réservoir potentiel d'inoculum de GLRaVs ou de GVs.

**Tableau 19. Liste des espèces végétales échantillonnées et testées vis à vis des GLRaV-1, GLRaV-3 et GVA par DAS-ELISA et RT-PCR.**

| Famille | Genre, Espèce | Nom commun | Common name | DAS-ELISA | RT-PCR |
|---|---|---|---|---|---|
| *Aceraceae* | *Acer campestre* | Erable champêtre | Common Maple | - | - |
| *Adoxaceae* | *Viburnum lantana* | Viorne lantane | Cottoner | - | - |
| *Araliaceae* | *Hedera helix* | Lierre commun | Common ivy | - | - |
| *Aquifoliaceae* | *Ilex aquifolium* | Houx | Common Holly | - | - |
| *Buxaceae* | *Buxus sempervirens* | Buis | Common Box | - | - |
| *Cornaceae* | *Cornus mas* | Cornouiller mâle | Cornelian Cherry | - | - |
| | *Cornus sanguinea* | Cornouiller sanguin | Common Dogwood | - | - |
| *Fabaceae* | *Robinia pseudo-acacia* | Robinier faux-acacia | Locust Tree | - | - |
| *Fagaceae* | *Quercus pubescens* | Chêne pubescent | Pubescent Oak | - | - |
| *Lamiaceae* | *Thymus serpyllum* | Thym serpolet | Wild Thyme | - | - |
| *Liliaceae* | *Ruscus aculeatus* | Houx-fragon | Butcher's Broom | - | - |
| | *Ligustrum vulgare* | Troène commun | Common Privet | - | - |
| *Ranunculaceae* | *Clematis vitalba* | Clématite des haies | Old Man's Beard | - | - |
| *Rosaceae* | *Crataegus monogyna* | Aubépine monogyne | Common Hawthorn | - | - |
| | *Prunus spinosa* | Prunellier | Sloe Tree | - | - |
| | *Pyrus pyraster* | Poirier sauvage | Wild Pear | - | - |
| | *Rosa canina* | Eglantier commun | Dog Rose | - | - |
| | *Rubus fruticosus* | Ronce commune | Blackberry | - | - |

Bien qu'aucune plante hôte hors du genre *Vitis* ne soit connue pour les GLRaV-1 et GLRaV-3, une étude montre qu'une corrélation positive existerait entre des populations de végétaux a priori non hôtes (*Eucalyptus spp.*) et des parcelles proches particulièrement enroulées (Cabaleiro et Segura, 1997b).

Un échantillonnage sur plantes pérennes a été effectué à l'hiver 2006-2007 autour de la parcelle d'étude de Bonzon. Les 18 échantillons testés correspondent au regroupement de 2 à 3 plantes pour chaque espèce végétale (Tableau 19). Pour chaque plante, trois tronçons de branche ou de tige ont été prélevés. Un diagnostic par DAS-ELISA puis par RT-PCR a permis d'analyser la présence des GLRaV-1, GLRaV-3 et GVA dans les 18 échantillons (protocoles en Annexe 3).

Le test de détection sérologique n'a pas permis de détecter les virus testés dans les lots analysés. Ainsi, aucune autre plante hôte des GLRaV-1 et GLRaV-3 n'a pu être décelée à partir de notre diagnostic. D'une manière similaire, une étude menée en Californie ne découvre aucune autre espèce ligneuse ou herbacée hôte de GLRaVs ou de GVs dans les zones à proximité des parcelles viticoles (Klaassen et al., 2011). En revanche, cette même étude fait état d'une contamination de *Vitis* sauvages par les GLRaV-2, -3, GVA et GVB. En l'absence d'autres espèces du genre *Vitis* autour de la parcelle de Bonzon, et même d'autres plantes dans les *Vitaceae*, notre diagnostic tend à montrer que la source principale d'inoculum d'enroulement viral et du bois strié est exclusivement constituée par *Vitis vinifera*.

### *I.1.b. Evaluation de la prévalence des GLRaV-1, GLRaV-3 et GVA dans les parcelles viticoles adjacentes.*

La parcelle d'étude de Bonzon représente la vigne la plus récente par rapport au reste du parcellaire planté aux abords. Le diagnostic visuel à l'automne permet d'y constater une forte prévalence de l'enroulement viral : les symptômes de la maladie sont quasi généralisés sur certaines parcelles de 'Pinot noir' (Figure 29).

**Figure 29. Photographie du damier des parcelles de vigne à Saint-Gengoux-de-Scissé et Bonzon (octobre 2008). La forte prévalence de l'enroulement viral se remarque sur des parcelles de 'Pinot noir' fortement contaminées (flèches bordeaux) et sur les parcelles de 'Chardonnay' (flèches vertes).**

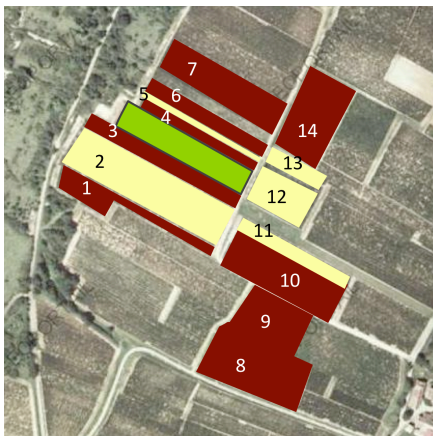
Des prélèvements sur bois ont été effectués à l'hiver 2006-2007 sur 14 parcelles viticoles situées dans l'environnement immédiat (dans un rayon de 200 m) afin d'estimer plus précisément la prévalence des GLRaV-1, GLRaV-3 et GVA, en particulier dans les parcelles de 'Chardonnay' où les symptômes d'enroulement sont moins faciles à déceler. Sur chaque parcelle, 25 plantes ont été prélevées au hasard en vue de tests de détection sérologique. Au total, 350 échantillons ont été analysés par DAS-ELISA (protocole en Annexe 3). Il apparaît que l'ensemble des parcelles analysées est contaminé par l'enroulement viral. De même, le GVA, a été détecté sur 13 des 14 parcelles (Tableau 20).

Sur les 350 échantillons testés, nous avons obtenu 79 % de ceps positifs vis à vis du GLRaV-1, 19 % vis à vis du GLRaV-3 et 65 % pour le GVA. En outre, les GLRaV-1, GLRaV-3 et GVA sont couramment présents en multi-infection dans les échantillons.

A partir de cette étude, on constate donc une prédominance du GLRaV-1 dans le parcellaire. De même, seuls le GLRaV-1 et le GVA ont été détectés sur les deux parcelles contigües à la parcelle d'étude. Ces résultats apparaissent donc conformes au diagnostic sérologique effectué sur la parcelle d'étude.

**Tableau 20. Diagnostic sérologique par DAS-ELISA sur les parcelles voisines de la parcelle d'étude à Bonzon (en vert). Résultats des tests de détection pour les GLRaV-1, GLRaV-3 et GVA et localisation des parcelles (bordeaux : 'Pinot noir', jaune : 'Chardonnay').**

| | Résultats des tests par DAS-ELISA | | |
|---|---|---|---|
| ID parcelle | GLRaV-1 | GLRaV-3 | GVA |
| 1 | + | - | + |
| 2 | + | - | + |
| 3, BzG | + | - | + |
| 4, BzA | + | - | + |
| 5 | + | + | + |
| 6 | - | + | - |
| 7 | + | - | + |
| 8 | + | - | + |
| 9 | + | - | + |
| 10 | - | + | + |
| 11 | + | - | + |
| 12 | + | + | + |
| 13 | + | + | + |
| 14 | + | - | + |




## I.2. Etude de la diversité génétique du GLRaV-1

### *I.2.a. Cadre de l'étude*

Le *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), membre du genre *Ampelovirus* (*Closteroviridae*), est un virus à ARN simple brin positif possédant un génome de 18,6 kb. En plus d'une propagation via les échanges commerciaux de matériel végétal infecté, le GLRaV-1 peut être diffusé naturellement au vignoble par plusieurs espèces de cochenilles vectrices (Sforza et al., 2003a). Cette espèce est présente dans le monde entier, notamment en France où sa prévalence dans les régions septentrionales est importante.

De nombreux virus infectant la vigne ont fait l'objet d'études de diversité moléculaire intra-spécifique : GFLV (Oliver et al., 2010), GRSPaV (Meng et al., 2006), GVA (Murolo et al., 2008), GLRaV-2 (Beuve et al., 2007; Jarugula et al., 2010b) et GLRaV-3 (Wang et al., 2011). L'analyse de la diversité génétique permet de mieux comprendre l'écologie, la biologie, ainsi que l'évolution au sein d'une espèce ou d'un genre viral. Ce type d'analyse permet ainsi de regrouper des isolats en différents clusters afin d'étudier la relation entre la divergence évolutive et certaines caractéristiques biologiques intrinsèques à chaque cluster et la dérive génétique virale. Les données peuvent également être utilisées pour reconstruire l'évolution épidémique d'une maladie virale sur un territoire (Almeida et al., 2009).

Récemment, une investigation menée sur plusieurs cépages plantés dans les Etats de New-York, Californie et Washington a montré l'existence de populations génétiquement différentes de GLRaV-1 (Alabi et al., 2011). Selon cette étude, les isolats analysés se répartissent selon trois groupes phylogénétiques distincts.

En revanche, ces phylogroupes ne semblent pas répondre à une quelconque structuration géographique comme cela a été proposé auparavant dans une étude de la variabilité moléculaire du GLRaV-1 (Kominek et al., 2005). En effet, l'analyse d'isolats issus de Tchéquie et de Slovaquie a confirmé une ségrégation du GLRaV-1 en deux groupes phylogénétiques distincts en fonction des continents d'origine (groupe A : Amérique et Australie ; groupe E : Europe).

Notre étude dans le vignoble de Bonzon montre que des épidémies de GLRaV-1 peuvent rapidement s'étendre aux parcelles viticoles avoisinantes. Malgré sa prévalence importante dans les vignobles septentrionaux français, la diversité génétique du GLRaV-1 n'avait jamais été étudiée jusqu'à ce jour dans ces régions.

Cette étude constitue donc un examen original de la diversité génétique du GLRaV-1 sur le continent européen. Pour cela, une analyse a été conduite sur une zone du gène codant pour la HSP70h chez un grand nombre d'isolats issus de zones géographiques et de cépages différents. Dans une première étape, les séquences d'isolats issus de France, de pays européens, et du Moyen-Orient, ont été comparées aux données disponibles dans les bases de données. La deuxième étape a consisté à analyser des isolats provenant du vignoble de Bonzon afin d'étudier le polymorphisme génétique du GLRaV-1 à l'échelle de la parcelle, en lien avec sa dispersion par cochenilles.

### *I.2.b. Matériels et Méthodes*

- Isolats de GLRaV-1

Dans cette étude, 207 isolats de GLRaV-1 ont été analysés (Tableau 21). Trente-huit isolats sont issus de prélèvements réalisés en 2005 dans diverses collections ampélographiques françaises. Un prélèvement de 149 isolats a été effectué à Bonzon de 2007 à 2010, sur les deux zones de contamination b1 et b2 identifiées à partir des relevés de symptômes (Figure 30). Dans la zone b1, 24 isolats issus de la parcelle BzG et 24 isolats issus de la parcelle BzN ont été analysés. Dans la zone b2, 55 isolats issus de la parcelle BzA et 46 isolats issus de la parcelle BzN ont été analysés. Enfin, 20 isolats sont issus des parcelles P7 et P8, situées à 2 km des 3 parcelles citées ci-dessus.

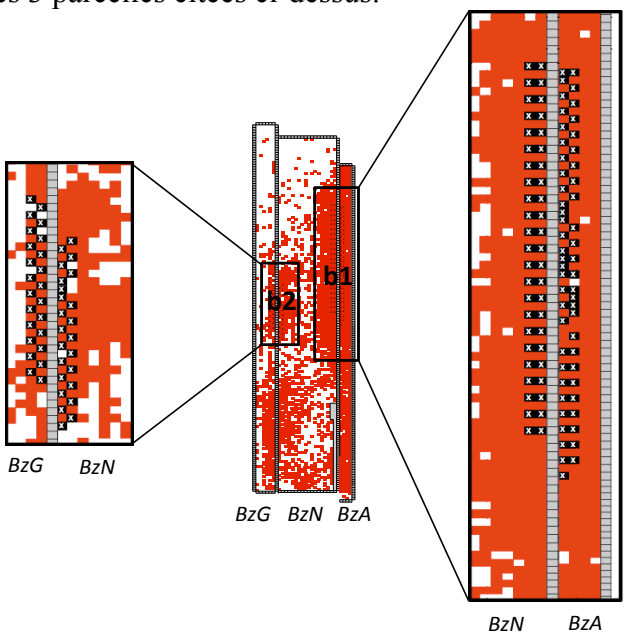



**Figure 30. Localisation des ceps sources de GLRaV-1 (signalés par un x) dans deux zones touchées par l'enroulement viral. La zone b1 est commune aux parcelles BzN et BzA, la zone b2 est commune aux parcelles BzN et BzG.**

**Tableau 21. Noms des isolats de GLRaV-1, origine et source des échantillons analysés. BzN correspond à la parcelle d'étude de Bonzon (parcelle receveuse) et BzG et BzA aux deux parcelles adjacentes sud et nord respectivement (parcelles donneuses).**

| | Nom d'isolat | Origine | Cépage | Source |
|---|---|---|---|---|
| Parcelles Bourgogne | BzN01 à BzN70 | BzN, Bonzon, Bourgogne (F) | Pinot noir | Vignoble Barraud |
| | BzG01 à BzG24 | BzG, Bonzon, Bourgogne (F) | Pinot noir | Vignoble Gil |
| | BzA01 à BzA55 | BzA, Bonzon, Bourgogne (F) | Pinot noir | Vignoble Jaillet |
| | P7-01 à P8-10 | P7&P8, Bonzon, Bourgogne (F) | Pinot noir | Vignoble Vacle |
| Collections ampélographiques | P70 | Côte d'Or (F) | Pinot noir | Collection INRA |
| | PV95 | Côte d'Or (F) | Pinot blanc | LNPV Colmar |
| | PV99 | Côte d'Or (F) | Pinot noir | LNPV Colmar |
| | PV120 | Haute Saône (F) | Franc noir | LNPV Colmar |
| | PV121 | Haute Saône (F) | Meslier | LNPV Colmar |
| | CH16-5 | Champagne (F) | Petit-Meslier | LNPV Colmar |
| | CB6 | Alsace (F) | Haussard | Collection Buecher |
| | CB7 | Alsace (F) | Knipperlé | Collection Buecher |
| | CB10 | Alsace (F) | Manharttraube | Collection Buecher |
| | CB13 | Alsace (F) | Rauschling blanc | Collection Buecher |
| | CB14 | Alsace (F) | Rotgipfler | Collection Buecher |
| | CB16 | Alsace (F) | Sylvaner bleu | Collection Buecher |
| | CB17 | Alsace (F) | Sylvaner rouge | Collection Buecher |
| | CB19 | Alsace (F) | Muskat Blume | Collection Buecher |
| | PV92 | Auvergne (F) | Portugais bleu | LNPV Colmar |
| | PV93 | Auvergne (F) | Muscat blanc | LNPV Colmar |
| | PV81 et PV82 | Ardèche (F) | Viognier | LNPV Colmar |
| | PV86, PV89 et PV90 | Gard (F) | Viognier | LNPV Colmar |
| | Z179 | Allemagne | Furmint | Collection INRA |
| | PV116 | Hongrie | Furmint | Collection INRA |
| | PV103 et PV105 | Italie | Victoria | Collection INRA |
| | PV135 | Grèce | (inconnu) | Collection INRA |
| | Y273 | Turquie | Narince | Collection INRA |
| | Y245 | Turquie | Karasakis | Collection INRA |
| | Y307 | Crimée | Tanagos Kosky | Collection INRA |
| | Y178 | Syrie | Assouad Afranji | Collection INRA |
| | Y233 | Syrie | Houedi | Collection INRA |
| | Y161 | Liban | Agmi assouad | Collection INRA |
| | Y170 | Arménie | Ambary | Collection INRA |
| | Y172 | Azerbaïdjan | Ara irna | Collection INRA |
| | Y258 | Azerbaïdjan | Vardabouïre | Collection INRA |
| | Y163 | Iran | Ahmeh Sal | Collection INRA |
| | Y303 | Iran | Shirazi | Collection INRA |
| | Y318 | Iran | Yshouhali | Collection INRA |

- Préparation des échantillons, extraction d'ARN et RT-PCR

Chaque échantillon a fait l'objet d'une détection préalable du GLRaV-1 par DAS-ELISA (protocole en Annexe 3) pour s'assurer de la présence du virus dans la plante source initiale. Les extractions d'ARN ont été effectuées selon une méthode éprouvée par Beuve et al. (2007) avec le RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Afin de minimiser les variations dues à une distribution inégale du virus dans la vigne source, des fragments de limbes, ou de bois, collectés sur trois baguettes différentes, ont été regroupés pour l'extraction de chaque échantillon. Les amorces utilisées pour les RT-PCR ont été dessinées à partir des alignements de séquences disponibles dans la base de données GenBank (NCBI). Les deux amorces LR1H70F1 (5'-GTTGGTGAATTCTCCGTTCGT-3') et LR1H70R1 (5'-ACTTCGCTTGAACGAGTTATAC-3'), situées dans le gène de la HSP70h ont été positionnées dans des zones conservées délimitant une zone présentant une forte variabilité. Le fragment amplifié correspond à une séquence de 382 pb (du nucléotide 9948 à 10329 ; NC_016509).

Les analyses par RT-PCR 'one-step' ont été effectuées avec le kit Ready-to-Go RT-PCR Beads (GE Healthcare) et adaptées de Beuve et al., (2007) : réaction de RT (1 h à 42°C suivie de 5 min à 95°C), réaction de PCR (40 cycles de 30 s à 94°C, 30s à 56°C, 45 s à 72°C suivis d'un cycle de 10 min à 72°C). Les amplicons ont été visualisés sous UV après migration sur gel d'agarose à 2 % coloré au bromure d'éthidium.

- Purification des produits PCR et séquençage

Les amplicons obtenus ont été purifiés à l'aide du QIAquick PCR purification kit (Qiagen) et envoyés à la plateforme de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (CNRS Strasbourg) pour le séquençage selon la méthode de Sanger avec un séquenceur multicapillaire ABI PRISM®. Pour chaque amplicon, le séquençage a été répété deux fois en sens et en réverse. Pour chaque isolat, la séquence consensus a été obtenue avec ContigExpress (VectorNTI suite) par assemblage des 4 séquences.

- Analyse phylogénétique et de diversité nucléotidique

Les alignements nucléotidiques multiples ont été effectués avec l'algorithme CLUSTAL W sous le logiciel MEGA 4 (Tamura et al., 2007). Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant les méthodes de Minimum Evolution (ME) et de Neighbor-Joining (NJ). Les séquences de la HSP70h issues du GLRaV-3 (AAC40708 et EF508151) ont été utilisées comme '*outgroup*'.
La diversité nucléotidique '$\pi$' a été calculée avec le logiciel MEGA 4, pour estimer le nombre moyen de différences entre des paires de séquences prises deux à deux au hasard au sein d'une population de séquences. Le test de neutralité évolutive (dérive génétique) a été évalué par la statistique de Tajima (D) (MEGA 4).

### *I.2.c. Résultats*

- Amplification par RT-PCR et séquençage des isolats de GLRaV-1

L'amplification par RT-PCR a donné, pour tous les isolats analysés, des signaux satisfaisants à la taille attendue (Figure 31). Le séquençage direct d'un produit PCR ne prend en compte que la séquence majoritaire de la quasi-espèce virale pour chaque isolat. Dans le cas de mélanges de variants viraux, les séquences obtenues ne sont pas exploitables directement et une étape préalable de clonage est requise. Ainsi, sur les 207 isolats analysés par séquençage, seuls 165 isolats ont été retenus dans cette étude, étant donné que 42 isolats correspondaient à des mélanges de séquences virales (pas d'étape de clonage effectuée).

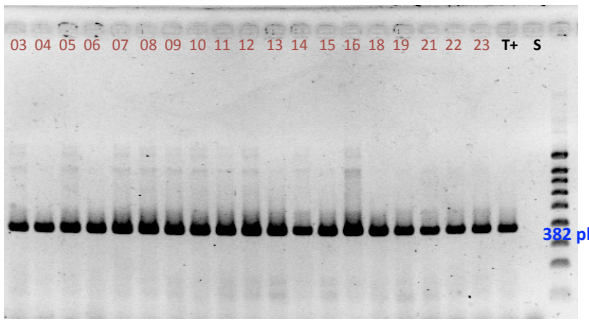



**Figure 31. Visualisation sur gel d'agarose 2% des amplicons de 382 pb de GLRaV-1 par RT- PCR pour les isolats issus de la parcelle BzG. T+ : accession P70, S : témoins sain P115.**

- Analyse phylogénétique des isolats de GLRaV-1 issus de collections ampélographiques

Afin de construire la phylogénie des isolats de GLRaV-1, les 38 séquences nucléotidiques issues des collections et caractérisées dans ce volet de l'étude ont été comparées aux 7 séquences disponibles dans la base GenBank (NCBI). Des arbres phylogénétiques similaires ayant été obtenus par les méthodes NJ et ME, seul celui issu de la méthode NJ est présenté (Figure 32). Cette analyse phylogénétique permet la ségrégation des isolats en 4 groupes principaux définis à partir de valeurs de bootstrap significatives (>70%). Chaque phylogroupe est désigné arbitrairement par les chiffres 1, 2, 3 et 4. On observe une tendance nette au regroupement des isolats selon leur provenance géographique. Le phylogroupe 1 est majoritairement représenté par des isolats issus de France (18 isolats). Les phylogroupes 2 et 4 concernent les isolats issus du Moyen-Orient (9 et 3 isolats respectivement), alors que le phylogroupe 3 concerne essentiellement des isolats européens (8 isolats).

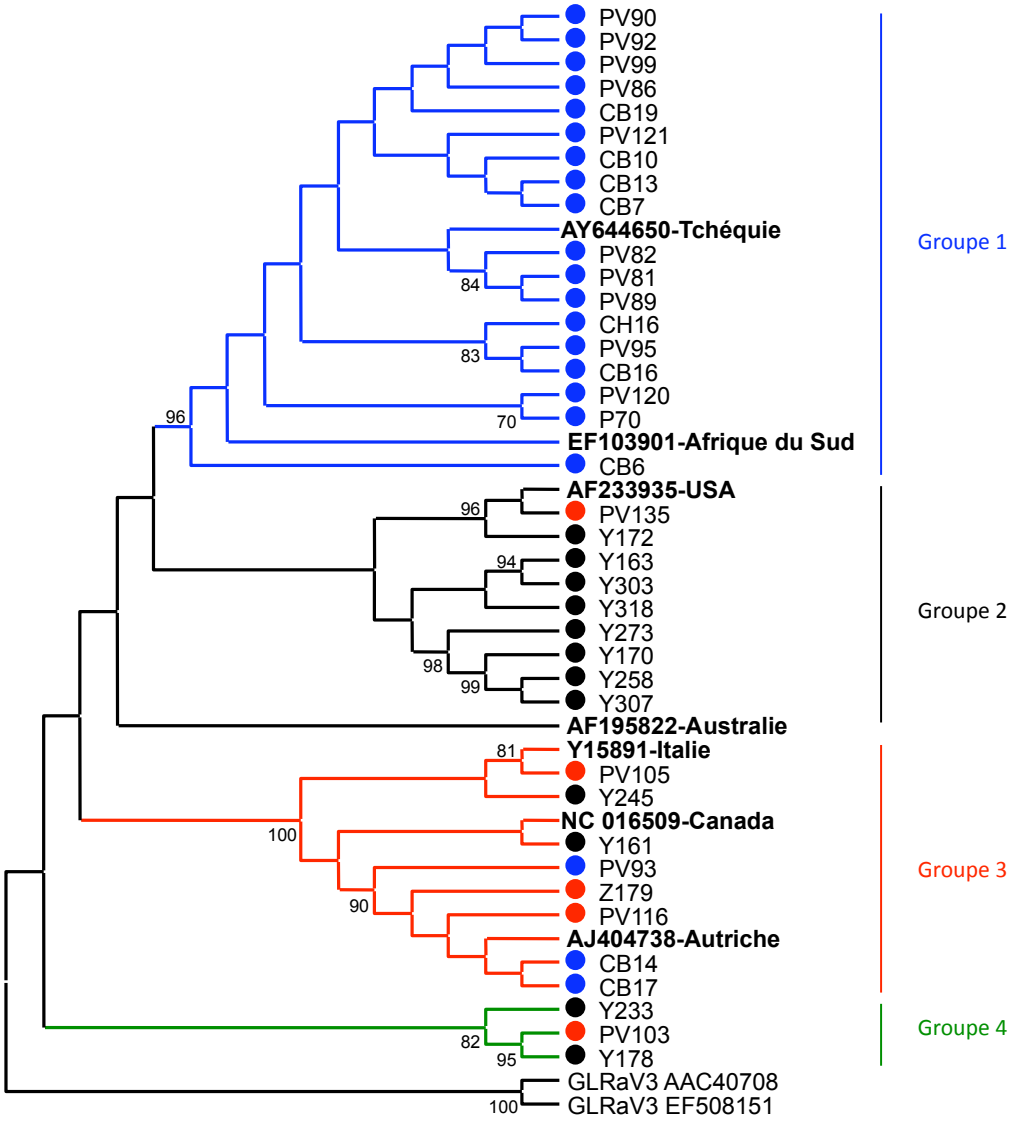



**Figure 32. Arbre phylogénétique de 38 isolats de GLRaV-1 issus de différentes régions de France, d'Europe et du Moyen-Orient. Analyse effectuée avec la méthode Neighbor Joining sur le logiciel MEGA 4 à partir des séquences nucléotidiques partielles du gène de la heat-shock protein 70 homolog (300 pb). Les valeurs significatives (>70%) de bootstrap (1000 réplicats) sont indiquées aux nœuds des branches. Les pastilles de couleur indiquent la provenance géographique de l'isolat ; bleu : France, noir : Moyen-Orient et Caucase, rouge : Europe).**

- Analyse phylogénétique des isolats de GLRaV-1 issus des parcelles de Bonzon

Dans l'arbre présenté en Figure 33, 50 isolats issus de Bonzon ont été ajoutés à l'analyse précédente. Dans cette représentation, 77 séquences présentant une identité nucléotidique totale avec l'un des 50 isolats précédents ont été exclues.
Aucun phylogroupe supplémentaire n'émerge par rapport à l'arbre généré précédemment. La grande majorité des isolats de Bonzon sont classés dans le phylogroupe 1 (43 isolats), le reste étant intégré dans le phylogroupe 3 (7 isolats). Le phylogroupe 1 a été décliné en 11 sous-groupes à partir des valeurs significatives de bootstrap (>70%) afin d'étudier plus finement la diversité génétique des isolats à l'échelle parcellaire.

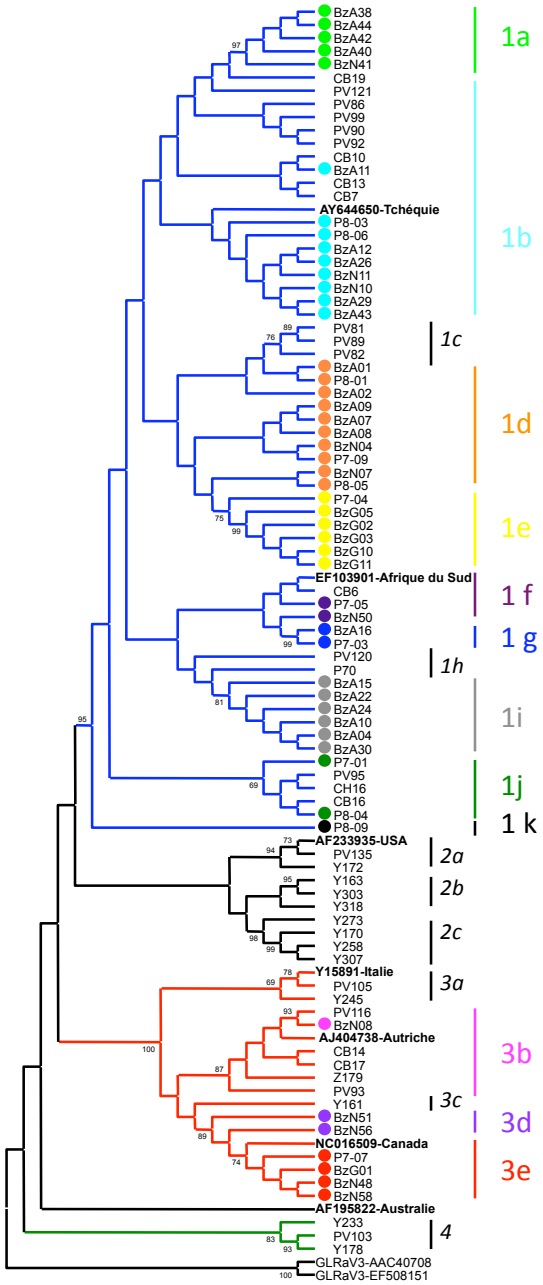



**Figure 33. Arbre phylogénétique de 95 isolats de GLRaV-1. Analyse effectuée avec la méthode Neighbor Joining sur le logiciel MEGA 4 à partir des séquences nucléotidiques partielles du gène de la heat-shock protein 70 homolog (HSP70h). Les valeurs significatives (>70%) de bootstrap (1000 réplicats) sont indiquées aux nœuds des branches. 50 isolats issus des parcelles de Bonzon (BzG, BzN, BzA, P7&P8) sont représentés avec une pastille de couleur et ont été ajoutés à l'arbre présenté dans la figure précédente. La couleur des pastilles désigne le sous-groupe phylogénétique auquel sont rattachés les isolats de Bonzon.**

- Diversité nucléotidique de la séquence partielle HSP70h

La diversité nucléotidique a été calculée au niveau global, ainsi que pour chaque groupe et sous groupe phylogénétique (Tableau 22). La diversité nucléotidique globale de toutes les séquences représentées sur l'arbre phylogénétique (Figure 33) est π = 0,099. Les phylogroupes 1, 2, 3 et 4 présentent des taux de diversité respectif de 0,041, 0,053, 0,056 et 0,071. Si l'on applique le calcul de diversité nucléotidique sans tenir compte des isolats issus de Bonzon pour les groupes 1 et 3, on obtient des valeurs de π respectives de 0,039 de 0,055, Ces valeurs apparaissent donc légèrement inférieures à celles présentées dans le Tableau 22. Le test statistique de Tajima (D) permet de comparer la diversité nucléotidique π avec la statistique θ calculée sur le nombre de sites polymorphes (Moury et al., 2006). Ces deux indices sont corrélés dans le cas d'une sélection neutre (ou dérive). Sur l'ensemble des phylogroupes, la statistique D est uniquement significative à 90 % pour le sous groupe 1i. Cela indiquerait l'influence d'une pression de sélection sur les isolats de ce sous-groupe.

**Tableau 22. Paramètres génétiques au sein des groupes et sous groupes phylogénétiques de GLRaV-1 identifiés en Figure 33. *n* = nombre d'isolat par groupe, *S* : nombre de sites nucléotidiques polymorphes, θ : statistique basée sur *S*, π : diversité nucléotidique, *D* de Tajima : valeur de la statistique évaluant la sélection neutre. * Significatif pour P=0,10, [a]94 + 1 séquence AF195822-Australie, non affectée aux groupes définis ci-dessous.**

| | | | | | | Nombre d'isolats | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Groupes phylogénétiques** | ***n*** | ***S*** | **θ** | **π** | ***D* de Tajima** | **Bonzon** | **Collec. Ampélo. + GenBank** |
| **Tous les groupes** | **94+1[a]** | **135** | **0,088** | **0,099** | **0,437** | **50** | **44** |
| **1** | **63** | **93** | **0,065** | **0,041** | **-1,290** | **43** | **20** |
| 1a | 5 | 4 | **0,006** | 0,007 | 0,273 | 5 | 0 |
| 1b | 19 | 39 | 0,037 | 0,025 | -1,320 | 9 | 10 |
| 1c | 3 | 6 | 0,013 | 0,013 | - | 0 | 3 |
| 1d | 10 | 19 | 0,023 | 0,017 | -1,151 | 10 | 0 |
| 1e | 6 | 18 | 0,026 | 0,021 | -1,170 | 6 | 0 |
| 1f | 4 | 24 | 0,043 | 0,043 | -0,071 | 2 | 2 |
| 1i | 6 | 9 | 0,013 | 0,010 | -1,42* | 6 | 0 |
| 1j | 5 | 18 | 0,018 | 0,025 | -1,057 | 2 | 3 |
| **2** | **10** | **43** | **0,051** | **0,053** | **0,270** | **0** | **10** |
| 2a | 3 | 5 | 0,011 | 0,011 | - | 0 | 3 |
| 2b | 3 | 23 | 0,051 | 0,051 | - | 0 | 3 |
| 2c | 4 | 7 | 0,012 | 0,012 | -0,817 | 0 | 4 |
| **3** | **18** | **61** | **0,059** | **0,056** | **-0,238** | **7** | **11** |
| 3a | 3 | 18 | 0,040 | 0,040 | - | 0 | 3 |
| 3b | 7 | 23 | 0,031 | 0,028 | -0,606 | 1 | 6 |
| 3e | 5 | 4 | 0,006 | 0,005 | -1,094 | 4 | 1 |
| **4** | **3** | **32** | **0,071** | **0,071** | **-** | **0** | **3** |

- Localisation du polymorphisme génétique intra parcellaire

Les isolats de GLRaV-1 de Bonzon (BzG, BzN et BzA) sont tous issus de vignes dont la position est précisément localisée sur les trois parcelles. Parmi 127 isolats, 60 % possèdent une séquence nucléotidique strictement identique à l'un des 50 isolats présentés dans l'arbre phylogénétique (Figure 33). Le Tableau 23 montre la répartition de ces 127 isolats pour chaque parcelle de Bonzon en fonction des phylogroupes définis précédemment. La Figure 34 permet de localiser sur plan les 112 isolats de GLRaV-1 (hors parcelles P7 et P8) issus des trois parcelles contigües BzG, BzN et BzA.

**Tableau 23. Nombre total d'isolats étudiés sur les 4 sites à Bonzon. Pour chaque phylogroupe et chaque parcelle, le nombre total d'isolats est indiqué, avec entre parenthèses le détail du nombre d'isolats possédant une séquence strictement identique. Les mêmes couleurs que celles utilisées dans l'arbre phylogénétique (Figure 33) représentent chaque phylogroupe.**

| | Nombre d'isolats selon les parcelles | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Groupes phylogénétiques** | **BzG** | **BzN** | **BzA** | **P7 et P8** |
| **Tous les groupes** | **19** | **57** | **36** | **15** |
| **1** | **16** | **39** | **36** | **14** |
| 1a | - | 13 (10+2) | 8 (5) | 0 |
| 1b | - | 7 (3+2) | 5 | 3 (2) |
| 1c | - | - | - | - |
| 1d | - | 3 | 9 (4+2) | 5(2+2) |
| 1e | 9 (5) | 1 | - | 1 |
| 1f | - | 1 | - | 1 |
| 1g | - | - | 1 | 1 |
| 1h | - | - | - | - |
| 1i | 7 (5+2) | 14 (12) | 13 (7) | - |
| 1j | - | - | - | 2 |
| 1k | - | - | - | 1 |
| 2a, 2b, 2c | - | - | - | - |
| **3** | **3** | **18** | **-** | **1** |
| 3a | - | - | - | - |
| 3b | - | 5 (5) | - | - |
| 3c | - | - | - | - |
| 3d | - | 2 | - | - |
| 3e | 3 (3) | 11 (8+2) | - | 1 |
| 4 | - | - | - | - |

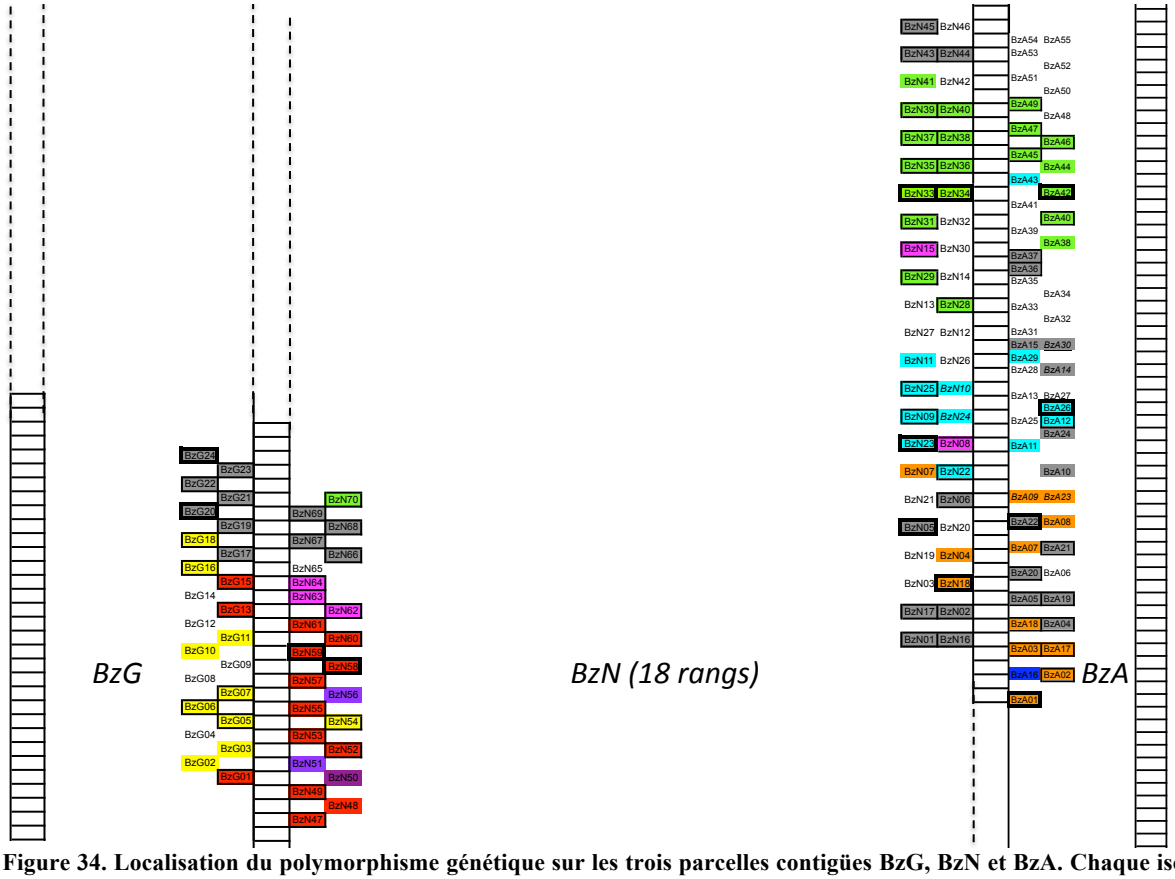



**Figure 34. Localisation du polymorphisme génétique sur les trois parcelles contigües BzG, BzN et BzA. Chaque isolat est coloré avec la couleur de son phylogroupe. Les isolats encadrés ou en italique désignent les groupes d'isolats ayant une séquence nucléotidique strictement identique. Par exemple, BzN05 = BzG20.**

On constate que les isolats analysés sont distribués spatialement selon les phylogroupes. On distingue trois types de distribution des phylogroupes

- **Phylogroupe présent sur les trois parcelles (30 % des isolats).** Les isolats sont détectés à la fois sur les deux parcelles donneuses BzG et BzA ainsi que sur la parcelle receveuse BzN ; phylogroupe 1i. Ce phylogroupe, en couleur grise, représente la majorité des isolats analysés sur les trois parcelles,
- **Phylogroupes présents sur deux parcelles (62 % des isolats).** Les isolats sont détectés sur l'une des parcelles donneuses (BzG ou BzA) et sur la parcelle receveuse BzN ; phylogroupes 1a, 1b, 1d, 1e, et 3e,
- **Phylogroupes présents sur une seule parcelle (8 % des isolats).** Les isolats sont détectés en petit nombre uniquement sur l'une des trois parcelles ; phylogroupes 1f, 1g, 3b et 3d.

### *I.2.d. Discussion*

La diversité génétique du GLRaV-1 a été analysée au niveau du gène de la HSP70h. L'analyse de 165 isolats de GLRaV-1 issus de diverses origines a permis, d'une part, d'obtenir des données conséquentes sur la diversité génétique de cette espèce au niveau de l'Europe et du Moyen-Orient, et d'autre part, d'effectuer une étude originale sur le polymorphisme génétique d'un virus de l'enroulement à l'échelle du parcellaire viticole.

- Analyse phylogénétique des isolats de GLRaV-1

Les groupes définis selon nos arbres phylogénétiques répondent à une structuration géographique assez nette en 4 clusters, ce qui avait antérieurement été observé par Kominek et al. (2005) avec la constitution de deux groupes A et E en fonction de l'origine européenne ou non des isolats. Pourtant, l'étude d'Alabi et al. (2011) tend à infirmer l'existence de cette structuration géographique des phylogroupes. Les isolats de GLRaV-1 issus de trois Etats américains sont en effet indistinctement classés dans l'un des 3 groupes phylogénétiques, quel que soit l'Etat d'origine.
La comparaison des résultats des études phylogénétiques disponibles sur le GLRaV-1 se heurte à deux problèmes. D'une part, il apparaît difficile de confronter deux analyses lorsqu'elles sont effectuées à différentes échelles spatiales, au sein d'un réseau de parcelles, d'un pays, ou d'un continent. D'autre part, la prise en compte de l'origine géographique des cépages d'où proviennent les isolats de GLRaV-1 paraît primordiale pour pouvoir statuer sur la présence ou l'absence de ségrégation géographique entre phylogroupes.
Notre analyse phylogénétique tend à revenir sur les conclusions apportées pour d'autres virus de l'enroulement quant à l'absence de relation entre origine géographique et répartition en phylogroupes des isolats viraux (Jarugula et al., 2010b; Wang et al., 2011). Les résultats de notre étude sont basés sur l'analyse d'isolats de GLRaV-1 issus de cépages originaires d'Europe, du bassin méditerranéen et du Moyen-Orient. Compte tenu de l'ancienneté de la viticulture dans ces régions (Arroyo-Garcia et al., 2006), il est probable que la diversité génétique du GLRaV-1 montrée dans notre analyse soit directement liée à l'origine géographique du cépage. De la sélection ancestrale des cépages dans le bassin méditerranéen et dans l'ancienne Mésopotamie, découle une variabilité génétique importante au sein de l'espèce *Vitis vinifera*, et donc probablement des agents viraux qui y sont associés. Les isolats européens PV103 et PV135, regroupés avec ceux du Moyen-Orient, sont issus de pays méditerranéens (Italie et Grèce), ce qui semble cohérent vu la proximité géographique de ces pays avec la Turquie ou la Syrie.

De même, l'origine alsacienne des isolats CB14 et CB17 paraît également cohérente avec leur regroupement dans le cluster d'isolats provenant d'Europe centrale.

La distribution des isolats issus des continents américain, australien et africain apparaît discordante avec cette structuration géographique. Toutefois, étant donné la récence de la viticulture en Australie, aux Etats-Unis, au Canada et en Afrique du Sud, les isolats de GLRaV-1 trouvés dans ces pays proviennent obligatoirement de matériel végétal introduit depuis l'Europe. Ces pays du « nouveau monde » ont en effet massivement importé des greffons de cépages européens pour l'établissement de leurs vignobles, disséminant par la même occasion les agents pathogènes présents dans les bois, notamment le GLRaV-1.
Le fait qu'il existe une ségrégation géographique des phylogroupes de GLRaV-1 est conforté par le mode de transmission de ce virus. Sa diffusion naturelle de vigne à vigne, uniquement assurée par cochenilles, est limitée par la faible mobilité de ces insectes vecteurs. Une étude phylogéographique du *Rice yellow mottle virus* (RYMV, *Sobemovirus*) dresse en effet le constat d'une séparation des groupes phylogénétiques de ce virus selon des zones géographiques distinctes (Fargette et al., 2004). La dispersion naturelle de ce virus étant essentiellement assurée par des vecteurs coléoptères, très peu mobiles, ces groupes auraient évolué de manière indépendante en l'absence d'autres modes de dispersion plus efficaces. Aussi, on peut penser que la diversité génétique observée chez le GLRaV-1, et plus généralement chez les *Ampelovirus*, répond à des mécanismes similaires. Cependant, les *Vitis* faisant l'objet d'une domestication et d'un commerce depuis plusieurs millénaires, l'homme a fortement contribué à la dispersion des GLRaVs, et donc à rendre plus difficile l'étude phylogéographique de ces virus.

- Diversité génétique des isolats de GLRaV-1

Pour les phytovirus, la diversité nucléotidique au sein d'une population est en général assez réduite, avec $\pi < 0,20$ (Garcia-Arenal et al., 2001). La diversité nucléotidique globale étudiée sur les 95 isolats de GLRaV-1 ($\pi = 0,099$) est légèrement inférieure à celle calculée dans une étude d'Alabi et al. ($\pi= 0,128$), sur une autre région du gène HSP70h (540 pb) de ce virus. Cette différence de diversité pourrait s'expliquer par la longueur de la séquence analysée (300 *vs* 540 pb), ainsi que par la région étudiée dans le gène de la HSP70h. Cependant, la présence d'isolats appartenant à deux groupes phylogénétiques distincts (1 et 3) indique un niveau important de polymorphisme du GLRaV-1 à l'échelle parcellaire et qui rejoint la diversité de l'ensemble des séquences analysées. Notre étude constitue la première analyse de la diversité génétique d'un GLRaV à l'échelle de la parcelle viticole. Les autres recherches effectuées sur la diversité des GLRaVs ont en effet analysé des isolats provenant de parcelles différentes, dans une ou plusieurs régions viticoles. Par exemple, pour une séquence partielle (4711 pb) de la CP du GLRaV-3, Wang et al. (2011) trouvent ainsi une diversité globale de 0,07 parmi 56 isolats issus de la Napa Valley (Californie). Pour Bonzon, on obtient une diversité de 0,101 uniquement en prenant en compte les 57 isolats issus de la parcelle receveuse BzN. Bien que cette analyse ait été effectuée sur une séquence relativement courte du génome du GLRaV-1, un tel niveau de polymorphisme à l'échelle de la parcelle n'était pas attendu. Cette diversité pourrait avoir un lien avec l'ancienneté de la viticulture dans cette région, la plantation de vigne ayant été généralisée par les Romains vers le II$^{ème}$ siècle (Collectif, 2012b).

- Dissémination des isolats viraux entre parcelles

L'étude de la parcelle BzN à Bonzon revêt un caractère unique. Plantée en 2001 avec du matériel certifié entre deux parcelles plus anciennes, sa contamination par le GLRaV-1 s'est exclusivement déroulée par l'intermédiaire de cochenilles vectrices, en particulier *Phenacoccus aceris* (Chapitre 4).

Aussi, la diversité virale observée sur cette parcelle résulte uniquement de la transmission naturelle par insecte vecteur, ce qui permet de s'affranchir totalement d'isolats viraux introduits lors de la plantation de matériel végétal infecté. La structuration génétique spatiale très nette observée dans cette étude illustre donc la conséquence de la contamination de la parcelle BzN par les parcelles contigües BzG et BzA via les cochenilles vectrices

On distingue ainsi les deux parcelles 'donneuses', BzG et BzA, qui constituent la source d'inoculum des GLRaV-1 et la parcelle receveuse, BzN. Nos résultats ont montré trois types de distribution des phylogroupes de GLRaV-1 au sein de ces parcelles. Pour un nombre minoritaire de phylogroupes, les isolats sont uniquement présents dans l'une des parcelles, et n'ont ainsi aucun représentant venant de l'une des parcelles contigües. Ce constat peut venir d'un échantillonnage trop réduit qui n'aurait pas assuré une représentativité des isolats sur les 3 parcelles. Cependant, ce motif de distribution peut également illustrer une diffusion du GLRaV-1 à plus longue distance par l'intermédiaire de cochenilles virulifères dispersées par le vent. Même si le taux de mortalité par ce mode de dispersion est important, diverses expérimentations montrent en effet que les courants aériens constituent une voie potentielle importante de transport des larves de cochenilles virulifères (Cornwell, 1957). Cette hypothèse serait recevable pour les phylogroupes 1f et 1g, puisque des isolats de ces phylogroupes ont été détectés dans les parcelles P7 et P8 situées 2 km plus loin dans la même vallée viticole. Pour les deux autres types de distribution, les phylogroupes sont présents simultanément dans la parcelle receveuse et dans l'une des parcelles donneuses, ou les deux. Ainsi, la présence de phylogroupes communs entre parcelle donneuse et receveuse illustre précisément la dissémination de proche en proche d'un même isolat par cochenilles vectrices. Au total, 86 % des isolats de la parcelle receveuse BzN proviennent des parcelles donneuses contigües.

Dans notre étude, l'hypothèse de la sélection neutre est rejetée uniquement pour le phylogroupe 1i. Il est intéressant de remarquer que c'est précisément ce phylogroupe qui est majoritairement représenté dans les trois parcelles. La transmission par cochenille aurait donc conduit à une sélection de certains isolats du GLRaV-1 « fortement transmissibles » par *P. aceris* (Encadré 5). Cependant, nos résultats n'ont qu'un caractère préliminaire et des analyses plus approfondies sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

**Encadré 5 : Transmission contrôlée d'isolats viraux issus de Bonzon**

Un panel représentatif des phylogroupes présents à Bonzon est désormais conservé au sein des collections ampélographiques à l'INRA de Colmar. Les accessions ainsi créées proviennent des ceps contaminés par le GLRaV-1, dont les différents isolats majoritaires ont été caractérisés dans notre étude. On peut ainsi noter que l'accession PN01 (utilisée lors des tests de transmission dans l'article 1, Chapitre 3) dérive de l'isolat BzA04, et a donné une transmission efficace du GLRaV-1 par *P. aceris*.

Un exemple similaire est observé dans un vignoble sud-africain contaminé par le GLRaV-3 et infesté par la cochenille *Planococcus ficus* (Jooste et al., 2011). Sur un système de placettes, cette étude montre qu'à partir de ceps sources uniques, un variant donné de GLRaV-3 serait transmis de façon prédominante. Par contre, une étude comparative menée dans la région des Finger Lakes (Etat de New York) sur le contenu viral des cochenilles et des ceps hôtes montre la présence d'haplotypes similaires de GLRaV-1 et GLRaV-3 dans ces deux compartiments. Ces résultats indiquent que la transmission par cochenilles n'induirait pas de goulet d'étranglement sur la variabilité génétique de ces virus. Une étude similaire pourrait être conduite à Bonzon en associant une étape de transmission au laboratoire pour différencier les haplotypes acquis par cochenilles de ceux qui sont inoculés.

Nos travaux indiquent un niveau de diversité du GLRaV-1 non attendu sur une même parcelle. Cette approche fournit les premières données sur la dispersion d'isolats de GLRaV-1 par cochenilles vectrices. Notre étude moléculaire a été conduite uniquement sur le site de Bonzon et mériterait d'être étendue au site de Marsannay-la-Côte. Cette parcelle présentant une symptomatologie complexe ainsi qu'une dynamique épidémique de l'enroulement viral peu évolutive par rapport à Bonzon, il serait ainsi intéressant de comparer la variabilité du GLRaV-1 entre ces deux parcelles d'étude.

## II. Analyse comparative des populations de Phenacoccus aceris

### II.1. Constat

L'analyse épidémiologique effectuée parallèlement à Marsannay-la-Côte et Bonzon montre que les deux parcelles d'étude sont concernées d'une manière très différente par la cochenille farineuse *Phenacoccus aceris*. A Bonzon, nous avons vu que l'épidémie d'enroulement viral est principalement due à la dissémination de *P. aceris* depuis des vignes adjacentes fortement enroulées et très infestées par la cochenille. L'état sanitaire de la parcelle de Marsannay-la-Côte est satisfaisant, malgré l'introduction de quelques ceps contaminés par le GLRaV-1 lors de la plantation. La cochenille *P. aceris* y est présente, mais d'une manière sporadique : seules des larves L1 sont détectées au cours de l'été sur les feuilles de vigne et aucun reste de cocon ou de femelle sur l'écorce des ceps ne témoigne d'un cycle biologique complet de l'insecte sur la vigne. L'analyse spatiale des ceps détectés avec les L1 nous a montré que *P. aceris* semble provenir d'un pied de lierre (*Hedera helix*) poussant sur un muret en bordure de parcelle. Malgré la très importante colonie de *P. aceris* sur ce lierre, aucune infestation des vignes à proximité immédiate n'a jamais été observée.

Ces différences biologiques entre deux populations de cochenille distantes d'environ 110 km représentent un caractère important en termes de vection et de dispersion de l'enroulement viral. La population de *P. aceris* à Marsannay-la-Côte semble en effet strictement inféodée au lierre, ce qui donne à cette cochenille un rôle tout à fait négligeable quant à une éventuelle dispersion de la maladie.

*P. aceris* est une cochenille très polyphage et présente dans la plupart des pays tempérés de l'hémisphère nord, du Japon et de la Corée du Sud, au Canada et aux Etats-Unis, en passant par la Russie et l'Europe (Kosztarab et Kozar, 1988). Ce caractère cosmopolite a conduit à de nombreuses dénominations pour cette espèce et également à des confusions avec d'autres espèces proches du même genre (Ben-Dov et Matile-Ferrero, 1995). Un récent remaniement au sein du genre *Phenacoccus* a permis de clarifier le statut de l'espèce *P. aceris* (Danzig, 2003, 2006). Pour autant, la polyphagie cette cochenille et sa large distribution dans le monde laisse penser qu'il existe une diversité génétique importante au sein de l'espèce.

L'exemple bien connu de *Bemisia tabaci* (Gennadius) illustre bien cette notion. On observe en effet chez cette espèce d'aleurode une diversité génétique importante, qui a conduit à la définition de plusieurs biotypes, chacun différencié par des aires de répartition bien précises (Perring, 2001). Certains biotypes révèlent un fort potentiel invasif, notamment les biotypes B et Q, qui posent de nombreux problèmes de pullulations dans le bassin méditerranéen (Simón et al., 2007) et dont le pouvoir vecteur respectif du *Tomato yellow leaf-curl virus* (*Begomovirus*) est discuté.

A ce jour, la diversité génétique chez les cochenilles est peu étudiée au sein d'une espèce, les recherches se concentrant principalement sur la distinction moléculaire entre des espèces morphologiquement proches (Park et al., 2010b; Correa et al., 2011; Malausa et al., 2011). Il semble pourtant que *P. aceris* présente une diversité génétique intra-spécifique importante. Une analyse conduite sur deux populations de *P. aceris* issues de deux îles de Corée du Sud montre que, malgré la faible distance séparant les deux lieux de prélèvements, les deux populations de cochenille diffèrent par leur gamme d'hôtes (*Eriobotria vs Liquidambar, Zelkova* et *Sorbus*) et se séparent en deux clusters phylogénétiques distincts (5,6 % de divergence) (Park et al., 2011).

Nous présentons ici une étude préliminaire de la diversité génétique de *P. aceris* grâce à l'analyse de trois marqueurs génétiques couplée à des identifications morphologiques, afin d'étudier plus précisément les différences biologiques constatées entre les deux populations de Marsannay-la-Côte et de Bonzon.

## II.2. Matériel et méthodes

### *II.2.a. Collecte des échantillons*

Des femelles adultes de *P. aceris* ont été prélevées dans 3 vignobles différents en 2010. Le vignoble d'Echevronne se situe aux alentours de Beaune, respectivement à 30 et 80 km des vignobles de Marsannay-la-Côte et Bonzon décrit précédemment. Ce vignoble infesté par *P. aceris* a été choisi afin de représenter une population tierce pour la comparaison entre les populations de *P. aceris* des deux vignobles d'étude. Pour chaque vignoble, 20 sites de prélèvement différents ont été choisis, chacun distant au minimum de 100 m (Tableau 24).
Nous estimons qu'avec cette distance, la probabilité que les larves prélevées soient issues d'une même femelle est très faible. En l'absence de *P. aceris* sur les vignes à Marsannay-la-Côte, les cochenilles ont été prélevées uniquement sur lierre commun (*Hedera helix)*, situés dans les haies bordant les parcelles viticoles (Encadré 6).

**Encadré 6 : Les particularités biologiques de *P. aceris* à Marsannay-la-Côte**

La caractéristique principale des deux populations de *P. aceris* sur les deux sites réside dans leur différence de plante hôte. Contrairement à Bonzon où l'on trouve la cochenille sur *Vitis vinifera*, les colonies de *P. aceris* à Marsannay-la-Côte ont été localisées uniquement sur lierre. Cette plante, largement répandue aux abords des parcelles viticoles, croît sur les murets de pierres sèches, sur les parois rocheuses et dans les haies. *P. aceris* a été détectée sur la majorité des pieds de lierre observés, l'ensemble des organes de la plante pouvant être infestés: feuilles, pétioles, tiges herbacées, rameaux ligneux et racines. Le lierre pouvant émettre des tiges entre les pierres, *P. aceris* semble en tirer parti en bénéficiant d'une protection substantielle face aux intempéries et aux ennemis naturels. Dans un certain nombre de cas, la présence d'un nombre important d'ovisacs semble témoigner d'une pullulation antérieure de la cochenille.
Une deuxième caractéristique intéressante à Marsannay-la-Côte est illustrée par la superposition des stades de développement sur une même période. On a ainsi constaté à l'automne la présence simultanée des stades L2, L3 et femelles adultes, ainsi que la présence d'ovisacs contenant les œufs proches de l'éclosion

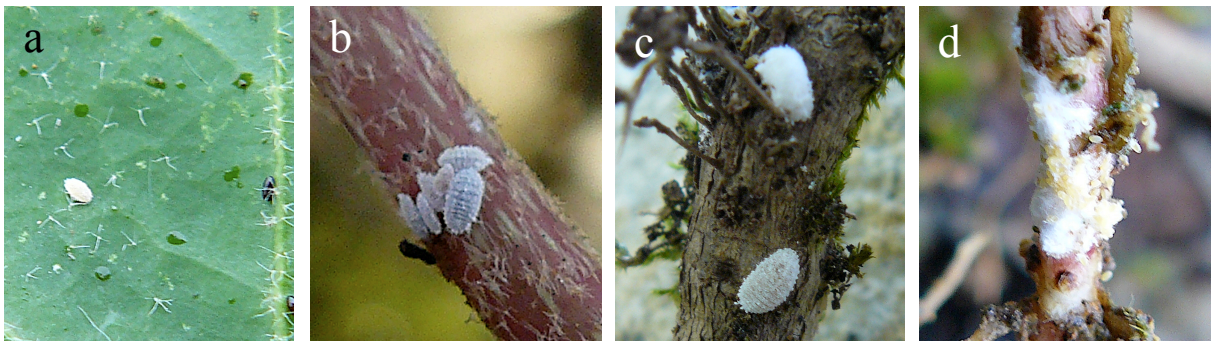



**Figure 35. *Phenacoccus aceris* observées à différents stades le 11/11/10 à Marsannay-la-Côte. (a) Stade L2, (b) stades L3, (c) femelle adulte et ovisac, (d) ovisac ouvert : œufs proches de l'éclosion.**

A Bonzon et Echevronne, les cochenilles ont été prélevées sous l'écorce des ceps. Sur chaque site, un échantillon de quatre individus de *P. aceris* a été prélevé sur un cep ou un pied de lierre unique, puis placé en tube Eppendorf à -20°C dans de l'éthanol à 95% avant analyses au laboratoire.

**Tableau 24. Détails des prélèvements de *P. aceris* effectués sur trois vignobles**

| Vignoble (département) | Distance moyenne entre sites | Distance totale de prélèvement (du nord au sud) | Echantillons prélevés Nb - identifiants |
|---|---|---|---|
| Marsannay-la-Côte (21) | 200 m | 1700 m | 20 - PaBz1 à PaBz20 |
| Echevronne (21) | 100 m | 1000 m | 20 - PaExt1 à PaExt20 |
| Bonzon (71) | 300 m | 3500 m | 20 - PaMr1 à PaMr20 |

### *II.2.b. Extraction d'ADN, amplification par PCR et séquençage*

L'ADN génomique a été extrait avec le DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Allemagne) sur une cochenille de chaque échantillon, soit 60 extractions individuelles. Les PCR ont été effectuées avec les réactifs et les concentrations utilisées par Malausa et al. (2011) pour amplifier le gène nucléaire ribosomal 28S et le gène mitochondrial COI (cytochrome oxidase I). Le couple d'amorces utilisé pour le gène 28S est M-28SD2-F (5'-AGAGAGAGTTCAAGAGTACGTG-3') et M-28SD2-R (5' TTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG-3') (Malausa et al., 2011). Pour le gène COI, les amorces utilisées sont COI-J-2183-F (5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3') et COI-N-2568-R (5'-GCWACWACRTAATAKGTATCATG-3') (Gullan et al., 2003). Les conditions de PCR suivantes on été employées : dénaturation initiale de 30 s à 98°C, suivie par 35 cycles de dénaturation de 10 s à 98°C, hybridation de 15 s entre 48–60°C, élongation à 72°C pendant 15 s, et extension finale de 5 min à 72°C. La qualité des produits PCR a ensuite été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% et coloration au BET.
Les produits PCR ont été envoyés à Genoscreen (Lille, France) pour séquençage (ABI automatic sequencers Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les séquences consensus ont été générées et contrôlées avec ContigExpress® et les alignements de séquences ont été effectués avec VectorNTI®. Nous avons utilisé l'outil BLAST de la base NCBI afin de chercher les similarités entre les séquences obtenues et les celle publiées dans la base GenBank.

### *II.2.c. Identification morphologique*

Pour les trois vignobles étudiés, un lot de *P. aceris* provenant de l'un des sites de prélèvement a fait l'objet d'une identification morphologique. Les spécimens ont été préparés entre lame et lamelle selon les étapes suivantes : (i) les spécimens sont chauffés pendant 20 min à 50°C dans une solution de KOH à 10% après avoir effectué une légère incision de la cuticule au niveau de l'abdomen et les organes internes de l'insecte sont expulsés à l'aide d'une micro spatule, (ii) ces spécimens sont lavés pendant 20 min à l'eau distillée et (iii) subissent une étape de coloration par incubation d'1 h dans une solution saturée de fuchsine dans un mélange composé d'1/3 d'eau distillée, 1/3 d'acide lactique et 1/3 de glycérol ; (iv) les spécimens sont passés dans un bain d'acide acétique glacial pendant 1 h afin de stabiliser la coloration ; enfin, (v) les spécimens sont transférés dans un bain d'huile essentielle de lavande pendant au moins 1 h puis placés entre lame et lamelle dans une goutte de gomme arabique.

Les lames ont ensuite été étiquetées et observées sous microscope. L'identification des spécimens est basée sur les clefs taxonomiques de Kosztarab et Kozar (1988) et de Danzig (2003, 2006). Après séchage complet des lames (2 à 4 semaines à 42°C), les spécimens ont été déposés dans les collections du Laboratoire de la Santé des Végétaux, ANSES, Campus International de Baillarguet, Montferrier-sur-Lez, France.

## II.3. Résultats

### *II.3.a. Caractérisation moléculaire*

Les résultats des amplifications par PCR et du séquençage sont donnés pour chaque échantillon dans le Tableau 25. Sur les 60 échantillons analysés, nous avons obtenu des amplicons aux tailles attendues avec 39 échantillons pour le gène 28S (296 pb) et avec 57 échantillons pour le gène COI (403 pb). Après séquençage, seules 25 et 30 séquences se sont révélées respectivement exploitables pour 28S et COI. La méthode d'extraction d'ADN ayant fait ses preuves précédemment (Park et al., 2011), on peut penser que les rendements peu satisfaisants obtenus sont principalement dus à la présence d'organismes parasitoïdes (*Anagyrus sp.*) dans le corps des cochenilles analysées. Lors des amplifications par PCR, nous avons observé pour certains échantillons l'amplification d'une deuxième bande d'une taille très différente pour les deux gènes étudiés. Les conditions de PCR ont donc été adaptées pour tenter d'amplifier spécifiquement les gènes des cochenilles par rapport à ceux d'autres organismes. Malgré cela, les séquences obtenues montrent dans certains cas que l'ADN d'*Anagyrus* sp. était prédominant dans l'échantillon analysé.

L'alignement des séquences exploitables pour les gènes 28S et COI n'a montré que très peu de différences entre les échantillons.

Pour le gène 28S, nos séquences ont été comparées avec les séquences disponibles dans les bases de données : EU188477 et JQ085539, issues de *P. aceris* provenant respectivement de Russie et de France. L'identité nucléotidique globale pour les 25 séquences analysées est de 99,3 %, correspondant à seulement deux sites de polymorphisme.

Pour le gène COI, nos séquences ont été comparées avec la seule séquence existant dans les bases de données internationales pour cette région du gène (JQ085564 provenant de France). Sur cette séquence de 403 pb, l'identité globale entre les 30 séquences analysées est de 99,5% ; seuls deux sites de polymorphismes sont identifiés.

Pour les deux gènes analysés, le faible nombre de sites polymorphes rend l'analyse phylogénétique caduque. On peut noter que les sites polymorphes ne répondent pas à une ségrégation des échantillons selon leur origine géographique. On trouve ainsi des séquences identiques de *P. aceris* dans les échantillons de Marsannay-la-Côte, de Bonzon et d'Echevronne. Ceci peut d'ailleurs se vérifier sur les arbres phylogénétiques (données non présentées), même si les valeurs de bootstrap séparant les hypothétiques clusters ne sont pas significatives.

**Tableau 25. Résultats des amplifications par PCR et du séquençage sur les 60 échantillons de *P. aceris*. + : amplicon à la taille attendue ou séquence exploitable, - : pas d'amplification ou bande à une taille différente, a : séquence correspondant à *Anagyrus* sp.**

| | Amplification par PCR | | Séquençage | |
|---|---|---|---|---|
| **Id. échantillon** | **28s** | **COI** | **28s** | **COI** |
| Pa-Bz-1 | - | + | - | - |
| Pa-Bz-2 | - | + | a | a |
| **Pa-Bz-3** | + | + | + | + |
| **Pa-Bz-4** | + | + | + | + |
| Pa-Bz-5 | - | + | a | - |
| Pa-Bz-6 | + | + | - | - |
| Pa-Bz-7 | + | + | - | - |
| **Pa-Bz-8** | + | + | + | + |
| **Pa-Bz-9** | + | + | + | - |
| Pa-Bz-10 | - | + | - | - |
| Pa-Bz-11 | - | + | - | - |
| **Pa-Bz-12** | + | + | + | + |
| **Pa-Bz-13** | + | + | + | + |
| **Pa-Bz-14** | + | + | + | + |
| **Pa-Bz-15** | + | + | - | + |
| **Pa-Bz-16** | - | + | - | + |
| **Pa-Bz-17** | + | + | + | + |
| **Pa-Bz-18** | + | + | + | + |
| **Pa-Bz-19** | + | + | + | + |
| **Pa-Bz-20** | + | + | + | + |
| **Pa-Ext-1** | + | + | + | + |
| **Pa-Ext-2** | + | + | - | + |
| **Pa-Ext-3** | + | + | - | + |
| **Pa-Ext-4** | + | + | + | + |
| **Pa-Ext-5** | + | + | - | + |
| **Pa-Ext-6** | + | + | - | + |
| **Pa-Ext-7** | + | + | + | + |
| **Pa-Ext-8** | + | + | + | + |
| **Pa-Ext-9** | + | + | - | + |
| **Pa-Ext-10** | + | + | + | + |
| **Pa-Ext-11** | + | + | + | + |
| **Pa-Ext-12** | + | + | + | + |
| **Pa-Ext-13** | + | + | + | - |
| **Pa-Ext-14** | + | + | + | + |
| Pa-Ext-15 | + | + | a | - |
| Pa-Ext-16 | - | - | | |
| Pa-Ext-17 | + | + | - | - |
| Pa-Ext-18 | - | - | | |
| Pa-Ext-19 | - | - | | |
| Pa-Ext-20 | + | + | - | - |
| **Pa-Mr-1** | - | + | - | + |
| Pa-Mr-2 | + | - | a | |
| Pa-Mr-3 | + | - | a | |
| Pa-Mr-4 | - | - | | |
| **Pa-Mr-5** | + | + | + | + |
| Pa-Mr-6 | - | + | a | a |
| **Pa-Mr-7** | + | + | + | + |
| Pa-Mr-8 | - | - | | |
| **Pa-Mr-9** | + | + | + | + |
| Pa-Mr-10 | - | + | a | a |
| **Pa-Mr-11** | + | + | + | + |
| Pa-Mr-12 | - | + | - | - |
| Pa-Mr-13 | - | + | - | - |
| Pa-Mr-14 | - | + | - | - |
| **Pa-Mr-15** | + | + | + | - |
| Pa-Mr-16 | - | + | | |
| Pa-Mr-17 | - | + | a | a |
| Pa-Mr-18 | - | + | a | a |
| Pa-Mr-19 | - | + | | |
| Pa-Mr-20 | + | + | - | - |

### *II.3.b. Caractérisation morphologique*

Pour Bonzon, l'observation des femelles adultes préparées sur lame indique que les caractères morphologiques correspondent bien à l'espèce *P. aceris*.
*P. aceris* a été identifiée à partir des cinq caractéristiques principales suivantes (Figure 36) : (i) deux ou trois circuli ; (ii) glandes tubulaires à collerette nombreuses, sur la face ventrale et dorsale ; (iii) présence de glandes multiloculaires ; (iv) 18 paires de cerarii et entre 15 et 20 glandes triloculaires au niveau du dernier cerarius ($C_{18}$) et (v) antennes à 9 segments.
Pour Marsannay-la-Côte, deux types morphologiques de *Phenacoccus* ont pu être décrits. Le premier type correspond à l'espèce *P. aceris*, comme préalablement décrite lors des premières caractérisations morphologiques sur des cochenilles prélevées sur lierre (J-F Germain, Anses). Pour le deuxième type cependant, les spécimens présentaient un seul circulus, excluant ainsi *P. aceris* qui présente au moins deux circuli. Selon les différentes clés disponibles, nous avons donc diagnostiqué soit *Phenacoccus silvanae,* décrite à ce jour uniquement en Italie (Longo et al., 1989), soit *Phenacoccus mespili*, que Kosztarab et Kozar (1988) différencient également de *P. aceris* par la présence du circulus unique. Cependant, ces deux dernières espèces sont parfois considérées comme identiques à *P. aceris* (Ben-Dov et Matile-Ferrero, 1995).

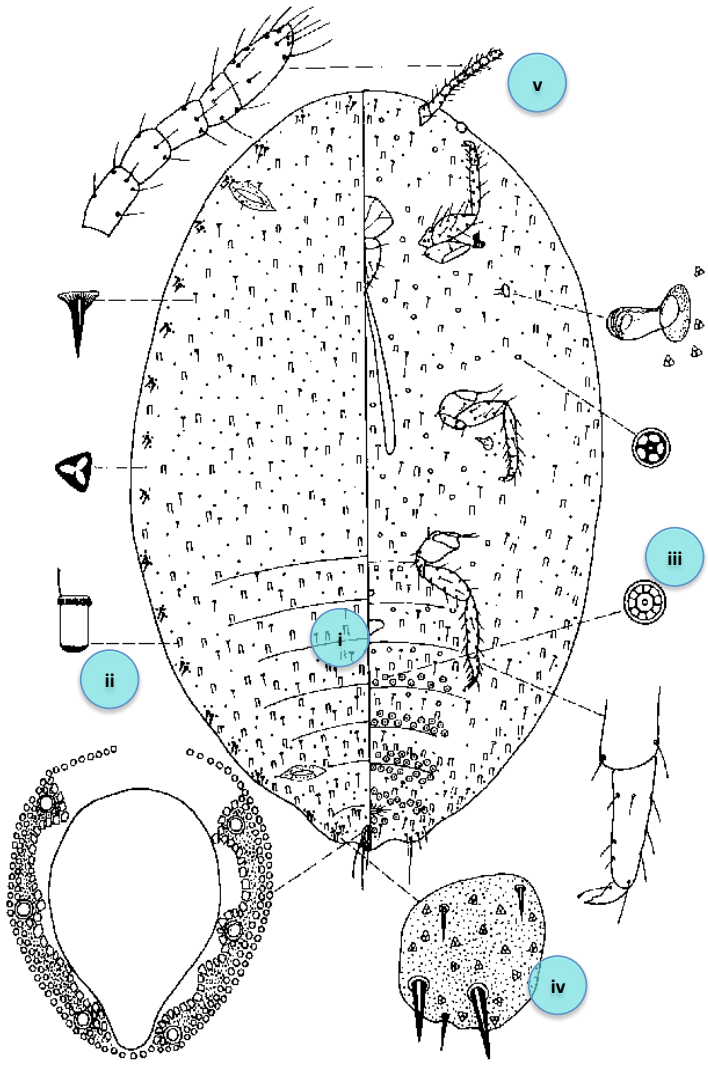



**Figure 36. Femelle adulte de *Phenacoccus aceris*. Illustration d'après Kosztarab & Kozar 1988.**

## II.4. Conclusion

Cette étude constitue une analyse préliminaire visant à comparer les populations de *P. aceris* issues de Marsannay-la-Côte et de Bonzon.
La caractérisation moléculaire n'a pas permis de déceler de différences entre les populations de *P. aceris* pour les deux gènes étudiés. Ce constat n'a cependant qu'un caractère préliminaire compte tenu du faible nombre d'échantillons comparés. De même, ces comparaisons ont été effectuées sur des séquences d'une taille relativement limitée. Les gènes COI et 28S sont régulièrement utilisés pour distinguer des espèces (Park et al., 2010a), mais on peut se demander si ces marqueurs sont suffisants pour distinguer des sous-populations au sein d'une même espèce. Par exemple, le gène internal transcribed spacer 2 (ITS2) permet de distinguer les cochenilles au niveau de l'espèce, mais également au niveau de la sous-espèce (Beuning et al., 1999; Ashfaq et al., 2010).

La caractérisation morphologique semble indiquer la présence de populations différentes entre les deux sites d'étude. Les échantillons analysés à Bonzon correspondent bien à la description de *P. aceris.* En revanche, un complexe d'espèces proches existerait à Marsannay-la-Côte. En plus des *P. aceris* "typiques", nous avons en effet observé la présence d'une autre forme de *Phenacoccus*. Cependant, la distinction de cette forme en tant qu'espèce est sujette à discussion taxonomique. Il est toutefois apparent que la population de *Phenacoccus* observée à Marsannay-la-Côte est moins homogène morphologiquement que celle observée à Bonzon. Des prélèvements supplémentaires sont nécessaires afin d'effectuer ces distinctions morphologiques sur un plus grand nombre d'échantillons.

Ces premiers résultats fournissent ainsi des pistes prometteuses dans l'optique d'une comparaison à plus grande échelle au sein du taxon *P. aceris*. Récemment, des infestations de *P. aceris* ont été signalées sur pommier en Alsace, Champagne, Picardie ou Normandie. Une analyse des différentes populations inféodées aux genres *Vitis, Hedera* ou *Malus,* pourrait ainsi être engagée afin de comparer les insectes aux niveaux morphologique et génétique. Enfin, des expérimentations mises en place parallèlement pourraient permettre d'évaluer leur capacité à être transférées sur la vigne, d'identifier d'éventuels « biotypes vigne », et ainsi de tester leur pouvoir vecteur vis à vis des virus de l'enroulement et du bois strié.

# Chapitre 6. Conclusion et perspectives

Comme tout organisme dans le monde du vivant, *Vitis vinifera* est susceptible d'être attaquée par des parasites qui sont préjudiciables à la croissance de la plante et donc à sa production de fruits. Parmi les très nombreux problèmes sanitaires dont fait l'objet la vigne, les virus constituent un groupe de parasites très dommageable de par leur persistance dans la plante, l'absence de résistance naturelle chez la vigne et l'absence de moyens de lutte curatifs. L'enroulement viral de la vigne et le complexe du bois strié sont deux viroses graves touchant l'ensemble des pays viticoles. Leurs étiologies complexes et l'existence de deux modes de dispersion, par le matériel végétal et par cochenilles vectrices, rendent indispensable la mise en œuvre d'études épidémiologiques pour mieux connaître ces maladies et essayer de limiter la progression des épidémies.
L'épidémiologie d'une maladie concerne des domaines variés des sciences agronomiques et nécessite de choisir l'échelle à laquelle l'étude est menée. Au cours de cette thèse, nous avons ainsi adopté une approche pluridisciplinaire combinant la virologie, l'entomologie, la biologie de la vection, les statistiques spatiales et la phylogénétique. L'épidémiologie de l'enroulement viral a été abordée selon plusieurs échelles, aux niveaux du pathosystème, de la parcelle, de la région et enfin au niveau international (Figure 37).

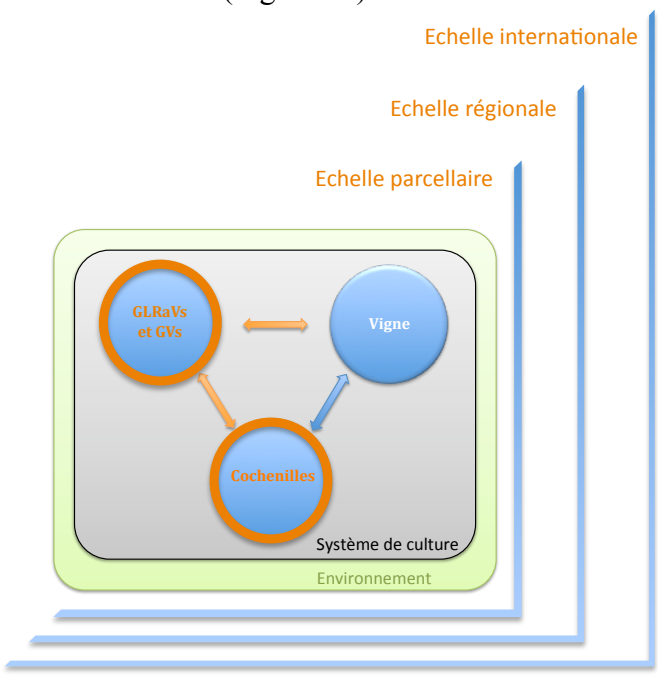



**Figure 37. Intégration du pathosystème selon les différentes échelles d'étudiées ; en orange sont indiquées les composantes et les interactions abordées aux cours de cette thèse. Au niveau du pathosystème, nous avons ainsi abordé particulièrement les interactions des virus de l'enroulement et du bois strié avec les cochenilles lors de l'approche biologique de la vection. A l'échelle parcellaire, ces deux composantes et leurs relations ont été également étudiées pour expliquer les dynamiques de contamination sur chaque site. L'étude de plusieurs sites a ainsi permis, à l'échelle régionale, de comparer les situations entre les parcelles et d'effectuer une première analyse de population de cochenilles vectrices. Enfin, l'épidémiologie moléculaire a représenté non seulement une approche de la diversité virale au niveau local, mais également à l'échelle régionale et internationale.**

Cette combinaison d'approches et d'échelles a ainsi permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur l'épidémiologie de l'enroulement viral. Les résultats et analyses de ce travail de thèse apportent non seulement des réponses dans la compréhension de l'épidémie d'enroulement viral dans les vignobles du nord-est de la France, mais fournissent également des éléments clefs dans un contexte scientifique plus large concernant la biologie de la vection par cochenille et les connaissances fondamentales sur les GLRaVs.

Ce dernier chapitre synthétise les principaux résultats présentés et discutés au cours de notre étude, avant d'exposer leurs implications agronomiques dans l'optique de la lutte contre l'épidémie d'enroulement viral.

## I. Compréhension de l'épidémiologie de l'enroulement viral de la vigne

Par une approche biologique de la vection, nous avons apporté des éléments substantiels sur la transmission des virus de l'enroulement et du bois strié par cochenilles. Notre étude a été menée sur deux espèces de cochenilles particulièrement nuisibles dans les vignobles septentrionaux français, mais représentant également, par leur caractère cosmopolite, des problèmes sanitaires dans la plupart des pays viticoles de la zone holarctique.

La capacité de la cochenille *Phenacoccus aceris* à transmettre à la vigne les virus de l'enroulement GLRaV-1, -3, -4, -5, -6, -9 et du bois strié GVA et GVB, a montré qu'elle possède un large spectre vecteur. Cette étude représente le premier signalement de la transmission du GLRaV-6, pour lequel aucune cochenille vectrice n'avait à ce jour été découverte. Nos résultats ont ainsi confirmé l'absence de spécificité des cochenilles dans la transmission des *Ampelovirus*. Nous avons montré que les larves L1 de *P. aceris* représentent le stade de développement le plus efficace dans la transmission de l'enroulement viral et du bois strié. En conséquence, leur capacité vectrice, associée au fort potentiel de dissémination de ces larves implique un risque important de dispersion naturelle de ces virus dans un vignoble infesté. Les expériences effectuées avec *Neopulvinaria innumerabilis* ont prouvé que cette cochenille, en plus des pullulations incontrôlées dont elle fait l'objet dans certains bassins viticoles, présente un risque important de dispersion naturelle des GLRaV-1 et du GVA au vignoble.

Les connaissances acquises sur les deux espèces de cochenilles étudiées ont non seulement ouvert la voie vers de nouvelles pistes de recherche, mais ont surtout fourni des éléments essentiels pour aborder l'épidémiologie de l'enroulement viral à l'échelle de la parcelle viticole.

Sur la base de travaux de terrain, nous avons engagé une étude épidémiologique dans les vignobles du nord-est de la France.

A partir des informations collectées sur un large réseau de parcelles viticoles, il s'avère que les coccides *Parthenolecanium corni* et *Pulvinaria vitis* et les pseudococcides *Heliococcus bohemicus* et *P. aceris* sont très communes en régions septentrionales. Nous avons ainsi mis en œuvre des relevés pluriannuels de la faune coccidienne sur quatre parcelles modèles, Plumecoq, Marsannay-la-Côte, Bonzon et Odenas, afin d'effectuer une description détaillée de la diversité, de l'abondance, et de la distribution spatiale des différentes espèces de cochenilles colonisant les vignes. Nos résultats ont montré la prédominance d'une espèce précise de cochenille sur chaque parcelle d'étude. De par les spécificités biologiques de chacune des espèces et les caractéristiques environnementales et culturales de chaque vignoble, les sites diffèrent tant par le taux de ceps infestés que par l'abondance des cochenilles sur chaque cep. Les parcelles étudiées présentent en revanche un caractère commun par la répartition en foyer des ceps infestés. Le site de Bonzon est remarquable à ce point du vue : l'infestation de la parcelle d'étude se caractérise principalement par des foyers de ceps colonisés par *P. aceris,* et situés en bordure des deux parcelles adjacentes. Même si *P. aceris* est très présente dans les haies naturelles bordant les rangs à Marsannay-la-Côte, les vignes n'y sont pour autant pas colonisées par cette cochenille.

Etant donné les différences de prévalence de l'enroulement viral entre les parcelles de la vallée viticole de Bonzon et à Marsannay-la-Côte, nous avons souhaité comparer les deux sites afin d'étudier la relation entre l'infestation par cochenille et l'incidence de l'enroulement viral. Une approche de terrain pluriannuelle a donc été conduite, afin d'étudier les caractéristiques épidémiques des sites d'étude en lien avec les populations de cochenilles.

Notre étude indique ainsi que même si les deux sites sont affectés par un même pathosystème GLRaV-1/*P. aceris* sur un même cépage, ils n'en présentent pas moins une dynamique épidémique très différente. Nous prouvons que la contamination des vignobles par le GLRaV-1 est étroitement liée à la biologie de *P. aceris*. A Bonzon, l'ancienne vigne-mère de greffons est désormais contaminée à 90 % par l'enroulement viral, seulement dix années après sa plantation. L'analyse statistique spatiale a permis de montrer à Bonzon que l'épidémie s'est propagée de proche en proche depuis les parcelles contigües à cause de la dissémination massive d'une population de *P. aceris* virulifères. Cette découverte représente la première preuve en Europe d'une dispersion naturelle du GLRaV-1. A Marsannay-la-Côte, une distribution aléatoire des ceps malades associée à une expression irrégulière des symptômes de la maladie a rendu l'analyse épidémiologique difficile. Il s'est avéré que la contamination de cette parcelle était due à l'introduction de matériel végétal infecté par l'enroulement. Cependant, l'incidence de la maladie étant en légère progression, on suspecte que la colonie de *P. aceris* présente à proximité pourrait jouer un rôle dans la lente diffusion du GLRaV-1.

L'étude épidémiologique a ainsi prouvé le rôle des espèces de cochenilles présentes dans les régions septentrionales françaises dans la dispersion de l'enroulement viral de la vigne. Les différentes dynamiques de contamination présentées au cours de ces travaux illustrent la dépendance du cycle épidémique de l'enroulement selon le niveau d'inoculum initial interne et externe à la parcelle, et selon les populations d'insectes vecteurs présents. Ainsi, les particularités constatées à l'échelle régionale entre les parcelles de Marsannay-la-Côte et de Bonzon, nous ont conduit à explorer d'autres pistes pour tenter d'expliquer les raisons de ces situations épidémiologiques contrastées.

L'épidémiologie moléculaire constitue la première piste engagée. Cette analyse, effectuée tant au niveau international qu'à l'échelle du parcellaire, nous a non seulement permis d'obtenir des données inédites sur la diversité génétique du GLRaV-1, mais également montré pour la première fois le niveau du polymorphisme génétique d'un GLRaV sur une parcelle ayant été contaminée par des cochenilles. La deuxième piste s'est attachée à comprendre les différences biologiques de la cochenille *P. aceris* constatées entre deux vignobles. Même si les caractérisations moléculaire et morphologique effectuée ne permet pas de statuer sur la présence de deux populations distinctes entre les deux sites d'étude, les premiers résultats obtenus posent les bases d'études plus approfondies de cette espèce de cochenille cosmopolite.

## II. Implications agronomiques dans la lutte contre l'enroulement viral

La combinaison des démonstrations expérimentales et des travaux de recherche de terrain a permis une meilleure compréhension de la situation épidémiologique dans les vignobles septentrionaux français vis à vis de l'enroulement viral. La gestion d'une épidémie d'enroulement implique que l'homme doive agir, soit sur l'une des composantes du pathosystème vigne-enroulement-cochenille, soit au niveau des interactions existant entre les deux composantes. Les connaissances acquises au cours de cette thèse CIFRE se révèlent particulièrement utiles pour proposer des pistes visant à optimiser la stratégie actuelle de lutte contre l'enroulement viral.

Ainsi, nous résumons dans les deux parties qui suivent les implications agronomiques de nos travaux de recherche, d'abord dans une gestion de la maladie avant l'implantation d'une parcelle viticole (y compris pour une vigne-mère), puis pendant son exploitation.

## II.1. Gestion de l'enroulement viral à la plantation d'une parcelle

Contrairement à d'autres viroses, la gestion de l'enroulement viral et du complexe du bois strié pose moins de problèmes concernant les sources d'inoculum présentes dans l'environnement naturel autour d'une parcelle. Hormis quelques espèces herbacées hôtes des virus associés au bois strié, les seules autres plantes pérennes connues pour héberger les GLRaVs et GVs sont des *Vitis* sauvages (Scheu, 1950; Saldarelli et al., 2005; Klaassen et al., 2011). En France, on trouve notamment *V. vinifera* subsp. *sylvestris* à l'état naturel en lisière de bois et dans les ripisylves (Arnold et al., 2005). Cependant, cette plante est non seulement rare, mais de plus ses caractéristiques autécologiques la rendent peu encline à croître dans les biotopes situés aux abords des vignobles. On trouve en revanche plus communément dans ces zones des *Vitaceae* exotiques, en particulier *Parthenociccus quinquefolia* ou *P. tricuspidata*, mais ces plantes n'ont encore jamais été montrées comme possibles réservoirs de l'enroulement viral ou du bois strié. Aussi, la vigne cultivée constitue très certainement l'unique source potentielle des virus de l'enroulement et du bois strié. La gestion de l'inoculum viral primaire lors de la plantation passe donc essentiellement par l'emploi de matériel végétal indemne de viroses.

### *II.1.a. Un matériel végétal indemne de virus : la clef pour garantir un vignoble exempt de viroses graves*

En France, le matériel végétal certifié issu de la sélection clonale répond désormais à des critères satisfaisants en terme de garantie sanitaire. Toute présence des GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GFLV, ArMV, et enfin GFkV (uniquement pour les porte-greffes) entraîne ainsi un rejet automatique lors de la certification d'un clone (Annexe 5). Toutefois, la réglementation en vigueur appliquée au schéma de certification sanitaire nécessite des améliorations pour garantir d'une façon irréprochable l'absence des principales viroses de la vigne.
L'arrêté du 20 septembre 2006 fixe les règles relatives à la sélection, à la production, à la circulation et à la distribution des matériels de multiplication végétative de la vigne (Journal officiel du 21 octobre 2006). Sur la base de notre étude épidémiologique, on peut montrer qu'un certain nombre de prescriptions relatives aux risques de contamination sont insuffisantes :

- parcelle de prémultiplication : les diagnostics sanitaires sérologiques n'y sont obligatoires que tous les 6 ans. Notre étude montre cependant qu'en présence de cochenilles vectrices, une épidémie d'enroulement peut toucher pendant cette période près de 2/3 d'une parcelle. Il serait donc souhaitable de rendre obligatoires des diagnostics tous les deux ans sur ce type de parcelle pour apporter une meilleure garantie sanitaire en amont,
- parcelle de multiplication : la problématique pour ce type de parcelle est identique à celle citée ci-dessus. Le risque de diffusion de matériel végétal infecté provenant de ces parcelles est d'ailleurs encore plus important, puisque les tests sanitaires ne sont appliqués que sur un échantillonnage de ceps. Ce n'est qu'au terme de 10 années que l'ensemble des ceps est testé. Là encore, les résultats apportés dans nos travaux montrent la nécessité d'un contrôle sanitaire biennal sur les parcelles de multiplication.

Quel que soit le type de parcelle inscrite dans le schéma de certification clonale, une réflexion approfondie serait de mise pour l'implantation de ces parcelles hors vignoble.

Aux insuffisances réglementaires existant lors de l'obtention de matériel végétal certifié, s'ajoute le fait que de nombreux vignobles sont encore plantés à partir de matériel végétal de catégorie "standard", notamment issu de la sélection massale. Ce type de matériel représente un risque réel de propagation de l'enroulement viral et des autres viroses réglementées. Le diagnostic de viroses sur les parcelles de pieds-mères de matériel standard est en effet réduit à une simple inspection visuelle, avec une tolérance de 10 % de souches avec symptômes d'enroulement viral. D'une part, nos travaux montrent qu'on ne peut se baser uniquement sur un diagnostic visuel pour détecter l'enroulement viral. Les tests sérologiques couplés aux relevés de terrain montrent en effet que près de la moitié des ceps malades peuvent rester asymptomatiques. D'autre part, un seuil de 10 % de ceps malades paraît inacceptable, puisque qu'on peut très bien imaginer qu'une parcelle commerciale puisse être implantée à partir de greffons issus uniquement de ces 10 % de ceps malades. Aussi, il s'avère indispensable d'utiliser uniquement du matériel certifié issu de la sélection clonale afin d'empêcher toute introduction de cep virosé.

### *II.1.b. Un environnement sain : une clef pour limiter les contaminations*

L'exemple de la parcelle de Bonzon illustre le fait que d'autres aspects réglementaires du schéma de certification sanitaire doivent être révisés. L'arrêté du 20 septembre 2006 ne précise en effet aucune règle concernant l'état sanitaire des parcelles adjacentes à une vigne-mère. Or, nous avons prouvé qu'en présence d'un niveau d'inoculum d'enroulement élevé et de populations importantes de cochenilles, la parcelle de Bonzon a été entièrement contaminée par l'enroulement en 8 années, conduisant à la radiation de son statut de vigne-mère de greffons dès la troisième année après sa plantation.

En outre, l'arrêté stipule qu'une parcelle de vigne-mère de greffons « doit être séparée de toute autre vigne par une distance de 5 m ». Pourtant, on peut considérer que le recours à des rangs d'isolement, encadrant les rangs donneurs de greffons, est contraire à cette directive. A la différence d'une bande enherbée par exemple, les vignes plantées dans les rangs d'isolement constituent autant de relais pour les vecteurs et donc pour le virus, et favorisent plus qu'elles ne limitent, la progression d'une épidémie d'enroulement de proche en proche.

Ainsi, compte tenu des preuves apportées lors de nos travaux en termes de vection et d'épidémiologie, la prise en compte de l'état sanitaire des parcelles adjacentes paraît indispensable avant d'implanter toute nouvelle parcelle viticole, a fortiori une parcelle de vigne-mère. Il s'agit notamment de prendre en compte :

- le niveau d'inoculum viral. Les symptômes d'enroulement viral sont connus des viticulteurs. Un diagnostic visuel à l'automne devrait constituer un minimum obligatoire, avec un appui par tests sérologiques en cas de doute sur la nature des symptômes,
- la présence de vecteurs. Même si les cochenilles sont encore assez peu connues, les interprofessions et les instituts viticoles sont à présent sensibilisés au problème et diffusent les informations aux viticulteurs. Les fiches signalétiques présentées dans ce manuscrit constituent d'ailleurs un support adapté pour apprendre à reconnaître les différentes espèces. La période la plus propice pour l'observation des cochenilles est le milieu du printemps. La végétation de la vigne n'étant encore que peu avancée, les insectes sont facilement détectables sur les ceps, les baguettes et à la base des rameaux. De plus, les colonies de cochenilles sont souvent signalées par la présence abondante de fourmis, voire également de miellat et de fumagine en cas de pullulation.

Pour lutter contre l'enroulement viral de la vigne, on comprend donc bien ici qu'il faut absolument travailler en amont pour réduire au maximum les sources d'inoculum. Aussi, la lutte contre l'épidémie actuelle d'enroulement viral passe principalement par une volonté commune de l'ensemble des acteurs de la filière, instances réglementaires, pépiniéristes et viticulteurs, pour implanter des parcelles indemnes de viroses.

## II.2. Gestion de l'enroulement viral après la plantation

Notre étude épidémiologique a montré sur quatre sites d'étude la variété des situations de contamination. Les interventions visant à réduire la dissémination des virus doivent donc impérativement tenir compte des caractéristiques épidémiologique observées au terrain. Dans le cas où l'enroulement viral est déjà présent au vignoble, il s'agit d'éviter et de limiter toute dispersion de la maladie depuis les sources d'inoculum existantes. Aucune action directe sur le virus n'étant possible, les pratiques culturales visant à limiter la propagation de l'enroulement viral consistent soit à agir sur les vignes sources de virus, soit à agir sur les populations de vecteurs (Tableau 26).

### *II.2.a. L'élimination des sources de virus : un assainissement progressif du vignoble*

La vigne étant une plante pérenne, l'approche visant à éliminer les sources de virus n'est pas la même que pour une culture annuelle.
L'éradication des plants enroulés s'avère applicable lorsque la prévalence de la maladie est faible. Une telle action paraît adaptée pour des parcelles présentant une contamination faible comme à Marsannay-la-Côte et à Plumecoq, d'autant plus si l'on sait que des cochenilles vectrices sont présentes. Pourtant, l'arrachage des pieds enroulés à Bonzon au début de l'épidémie d'enroulement n'a eu aucun effet, l'épidémie d'enroulement s'étant propagée depuis les rangs de bordure. Aussi, l'éradication de ceps virosés ou de foyers isolés paraît être une méthode adaptée uniquement si l'environnement proche de la parcelle présente un faible niveau d'inoculum. Lorsque la prévalence de la maladie est forte, l'arrachage complet de la parcelle est le seul moyen d'éradiquer le virus, mais paraît difficile à mettre en œuvre d'un point de vue économique tant certains vignobles et vallées sont touchés par l'épidémie. La parcelle de Bonzon illustre ainsi le cas de toute parcelle implantée au sein d'un vignoble fortement enroulé, et infesté par des cochenilles. A ce niveau, le raisonnement de la lutte contre l'enroulement viral ne s'effectue plus à l'échelle de la parcelle, mais du bassin viticole.

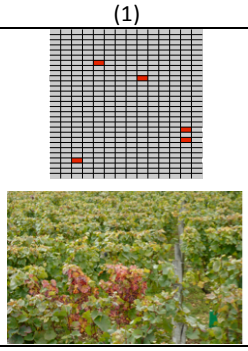
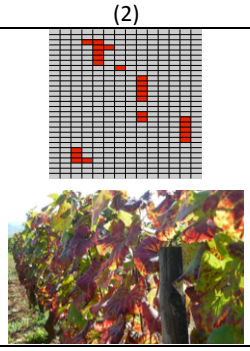
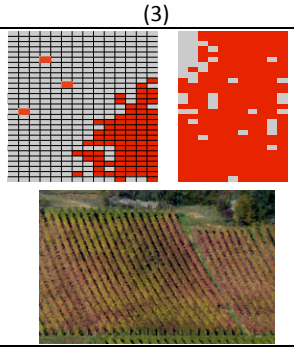
Aussi, seule des décisions fortes des instances politiques associées à la filière viticole pourrait permettre d'aboutir à un assainissement global d'un vignoble touché par l'enroulement viral. Au rythme des replantations de parcelles, l'utilisation de matériel végétal sain, couplé à l'application de mesures prophylactiques strictes permettraient d'enrayer l'épidémie d'enroulement et de réduire progressivement la prévalence de la maladie dans le vignoble.

### *II.2.b. Réduire l'impact des vecteurs : une mise en œuvre difficile et environnementalement discutable*

Nos travaux au laboratoire et notre étude épidémiologique au vignoble montrent que les cochenilles sont des vecteurs efficaces des GLRaVs et GVs. Nous montrons en effet qu'un nombre très réduit de larves de premier stade suffit pour infecter une plante saine. La lutte contre ces insectes vecteurs semble donc un moyen intéressant pour éviter la dispersion des virus à partir de sources internes ou externes d'inoculum. Cependant, quelles que soient les méthodes de lutte utilisées, l'absence totale d'insecte est impossible à garantir. Aussi, même si la lutte contre les vecteurs semble être séduisante de par son caractère préventif, elle n'a qu'une portée très limitée.

On peut par exemple à nouveau citer le cas de la parcelle de Bonzon, qui, malgré les traitements insecticides appliqués du fait de son statut de vigne-mère, a été totalement contaminée par l'enroulement viral transmis par les cochenilles. Le fait que ces insectes restent protégés à la face inférieure des feuilles ou sous l'écorce des ceps contribue à limiter fortement la portée de la lutte chimique. Cet exemple illustre bien la faible efficacité des traitements insecticides sur les populations de cochenilles et donc l'absence d'effet notable sur la dissémination de l'enroulement viral. L'application de mesures prophylactiques permet de contribuer à éviter la diffusion des cochenilles d'une parcelle à l'autre. Une excellente synthèse a été effectuée à ce sujet concernant la dispersion du GLRaV-3 en Nouvelle-Zélande (Charles et al., 2006). On peut proposer que la mise en place de haies basses ou de zones enherbées pourrait permettre d'isoler une parcelle de vigne nouvellement plantée et constituer une barrière physique limitant la colonisation des rangs de vignes par les cochenilles depuis les parcelles voisines. De tels dispositifs entraineraient cependant une perte de surface cultivée pour les viticulteurs et nécessitent d'être vérifiés avec des essais en plein champ.

**Tableau 26. Propositions dans la gestion de la contamination d'une parcelle par l'enroulement selon le motif spatial observé.**

| | | Motifs spatiaux | | |
|---|---|---|---|---|
| | | (1) | (2) | (3) |
| **Observations** | |  |  |  |
| **Contrôles** | Symptômes | Confusions possibles avec autres maladies ou désordres physiologiques | Confirmer si la progression de la maladie a lieu le long du rang | Contrôles sur les parcelles ajacentes |
| | Diagnostic sérologique | Confirmation de la présence de GLRaV(s) | Détermination des espèces de GLRaV présentes | Détermination des espèces de GLRaV présentes |
| | Provenance du matériel végétal | Implantation aléatoire de matériel végétal infecté | Implantation aléatoire de matériel végétal infecté | Non déterminante car diffusion depuis parcelles voisines |
| | Populations de cochenilles | Cochenilles absentes, peu abondantes ou non vectrices | Déterminer les espèces de cochenilles vectrices présentes | Forte population de cochenilles<br>Observation sur les parcelles voisines, présence présumée de cochenilles farineuses |
| **Méthodes de lutte** | Arrachage des plantes malades | A mettre en œuvre : suppression de l'inoculum | A mettre en œuvre pour réduire l'inoculum | Arrachage total<br>Peu réaliste si les foyers sont étendus car surcoût important |
| | Lutte contre les cochenilles | Pas d'action nécéssaire | Interventions à définir selon le niveau de population | Si foyers enroulés encore restreints, intervenir localement |
| **Méthodes prophylactiques** | Sur la parcelle | Contrôler si diffusion de la maladie aux vignes voisines les années suivantes | Eviter les passages dans les rangs à l'émergence des L1<br>Destruction des bois de taille | Eviter les passages dans les rangs à l'émergence des L1<br>Destruction des bois de taille |
| | Ordre des travaux entre parcelles | A exploiter en priorité avant le passage dans des parcelles enroulées | Ordre de passage dans la parcelle selon le niveau de prévalence | Exploiter impérativement en dernier pour éviter la dispersion de cochenille virulifère |

## III. Perspectives

L'enroulement viral constitue un problème sanitaire préoccupant pour les vignobles septentrionaux français. Les premières études épidémiologiques sur le sujet ont insisté sur la nécessité de poursuivre les recherches, particulièrement à l'échelle de la parcelle (Grenan et Boidron, 2001).

Nous apportons ainsi, grâce à ces travaux, de multiples éléments sur la faune coccidienne de la vigne, sur la biologie de ces cochenilles, leur spécificités et efficacités vectrices et surtout leur rôle dans la dispersion naturelle de l'enroulement viral et du bois strié au vignoble. Dans les différents chapitres et articles présentés au cours de ce manuscrit, nous avons ainsi proposé des pistes de recherche fondamentales pouvant être à la base de futures études pour améliorer encore la compréhension de l'épidémiologie de l'enroulement viral.

Nos travaux ont montré la complexité des interactions entre les facteurs impliqués dans l'épidémiologie de l'enroulement viral. Basé sur un grand nombre de données, les résultats exposés ici pourraient ainsi être à la base d'un modèle visant à prédire la dispersion de l'enroulement au vignoble. Cependant, la relation entre la physiologie de la vigne, les pratiques culturales et les infestations par cochenille doivent être davantage étudiées. Ces relations étant notamment liées à la structure du paysage agricole, l'évaluation du risque épidémique passe ainsi par l'intégration de la parcelle cultivée dans son contexte paysagé (Plantegenest et al., 2007).

Notre étude illustre le fait que de nombreuses pistes pratiques restent à étudier pour tenter de limiter les épidémies d'enroulement viral au vignoble.

On aura compris que la plantation de matériel végétal sain est la seule solution pour garantir un vignoble de qualité à long terme. La certification s'appuie donc nécessairement sur la recherche afin de disposer de techniques de détection toujours plus fiables. De même, des travaux importants sont effectués sur l'assainissement de matériel végétal infecté. Les recherches sur l'élimination des GLRaVs dans les plantes progressent, notamment pour les clones à haute valeur agronomique, grâce à l'embryogenèse somatique (Gribaudo et al., 2003; Gribaudo et al., 2006), l'électrothérapie (Guta et al., 2010), les antiviraux (Panattoni et al. 2007), ou la thermothérapie (Maliogka et al., 2009a; Mannini et al., 2012).

Les vignobles du nord-est de la France sont loin de faire face aux situations de certaines régions, notamment en Californie ou en Nouvelle-Zélande où les pullulations de cochenilles sont très fréquentes. De nombreuses recherches y sont effectuées pour contrecarrer l'impact des cochenilles et limiter ainsi les épidémies d'enroulement viral. Les études portent ainsi sur l'amélioration de la lutte chimique, qu'elle soit appliquée directement contre les cochenilles (Lo et al., 2009), ou indirectement en visant les fourmis (Daane et al., 2006b; Daane et al., 2007). Mais comme dans beaucoup de cas, le succès de la lutte contre un ravageur des cultures réside dans l'utilisation de stratégies de lutte intégrées (Geiger et al., 2001; Lo et al., 2006; Franco et al., 2009). D'autres pistes sont donc étudiées pour lutter contre les cochenilles vectrices. En France, l'IFV participe ainsi aux recherches sur l'enroulement en effectuant des essais de lutte biologique contre les cochenilles au vignoble (Sentenac, 2008; Sentenac et al., 2011). Ce type de lutte révèle ainsi une efficacité réelle pour limiter les populations de cochenilles, mais les coûts importants engendrés par l'utilisation d'insectes auxiliaires nécessitent une réflexion de fond de la filière viticole pour s'engager dans cette voie. En outre, la technique de la confusion sexuelle, bien connue au vignoble contre les vers de la grappe, fait l'objet d'applications prometteuses sur *Planococcus citri* (Zada et al., 2003; Passaro et Webster, 2004).

Aussi, des travaux sur la biologie de la reproduction des cochenilles (en particulier la part relative de la parthénogénèse et de la reproduction sexuée) et l'identification de leurs phéromones sexuelles, notamment pour *P. aceris* et *N. innumerabilis*, pourraient ainsi permettre de proposer à terme une solution économiquement viable pour suivre la dynamique de population des cochenilles et donc lutter contre leurs pullulations et contre l'épidémie d'enroulement viral.

La gestion de l'épidémie d'enroulement viral implique un travail commun entre tous les acteurs de la filière viticole et la recherche agronomique. Issue d'une forte volonté des interprofessions viticoles, notre étude épidémiologique représente ainsi un exemple fort de collaboration institutionnelle, scientifique et technique. Ces travaux pluridisciplinaires furent non seulement l'occasion de faire interagir science fondamentale et appliquée, mais également de sensibiliser davantage les professionnels de la viticulture au problème de l'enroulement viral au travers de nombreuses communications adressées à la filière.

Comme nous l'avons vu, l'enroulement viral de la vigne a largement profité des activités humaines pour se répandre dans l'ensemble des vignobles du monde. Les virus ne sont pas les seuls organismes à voyager clandestinement, et la viticulture fait ainsi face continuellement à de nouveaux ravageurs exotiques introduits (Sforza, 2008b). Ainsi, une pullulation de cochenilles vectrices importées depuis d'autres continents et l'introduction de nouveaux virus liés à l'enroulement représenteraient une problématique sanitaire nouvelle au vignoble. En outre, toutes les filières agricoles suivent à présent de près l'impact du changement climatique sur les agroécosystèmes. Les modifications environnementales engendrées par l'élévation des températures sont ainsi susceptibles de requérir une adaptation des pratiques viticoles (Duchêne et Schneider, 2005). Cela représente ainsi autant de facteurs nouveaux qui devront incontestablement être pris en compte dans la gestion de l'état sanitaire des vignobles, et notamment pour l'épidémiologie de l'enroulement viral.

# Matériel et méthodes

## I. Méthode de détection de virus

### I.1. Méthode sérologique

La technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) constitue un test immuno-enzymatique visant à détecter et/ou doser une protéine (l'antigène) dans un extrait biologique.

L'ensemble des tests sérologiques dans cette étude ont été effectué par le méthode DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-ELISA) (protocole en Annexe 3). Le principe de cette méthode repose sur l'utilisation de deux types d'anticorps : un anticorps fixé sur un support solide et un second anticorps couplé à un marqueur enzymatique (Figure 38). Lors d'une première étape (coating), les anticorps spécifiques à l'antigène recherché sont fixés sur les parois d'une plaque, comportant 96 puits où les anticorps s'adsorbent spontanément à pH alcalin. Après un temps d'incubation, les anticorps présents en excès sont éliminés par lavage. L'étape suivante consiste à ajouter dans chaque puits les extraits de plante à tester (étape 2) Après incubation, les antigènes en excès présents dans les extraits de plantes sont éliminés par lavage. Lors d'une troisième étape (conjugué), les anticorps couplés à une enzyme sont ajoutés dans les puits. Après une nouvelle incubation, les anticorps en excès sont éliminés et on dépose lors d'une quatrième étape le substrat de l'enzyme. S'il est hydrolysé, ce substrat incolore donne un produit coloré dont la densité optique est mesurée par spectrophotométrie. Une réaction positive se traduit par une coloration proportionnelle à la quantité d'antigène immobilisé par les anticorps fixés. Les densités optiques (DO) obtenues avec des échantillons témoins sains permettent de calculer un seuil de discrimination permettant d'établir la présence ou l'absence du pathogène recherché.

La détection des GLRaV-1, -3, -4, -6 et -9 a été effectuée selon cette méthode. Pour la détection des GLRaV-5, -7 et GVA, une étape supplémentaire consistant en l'ajout de la streptavidine marquée à la phosphatase alcaline est réalisée avant l'addition du substrat. En effet, les anticorps disponibles au laboratoire pour la détection de ces virus sont biotinylés, et non conjugués directement à la phosphatase alcaline. En l'absence de réactifs immuno-enzymatiques fiables, la détection des GVB et GVD a uniquement été réalisée par RT-PCR.

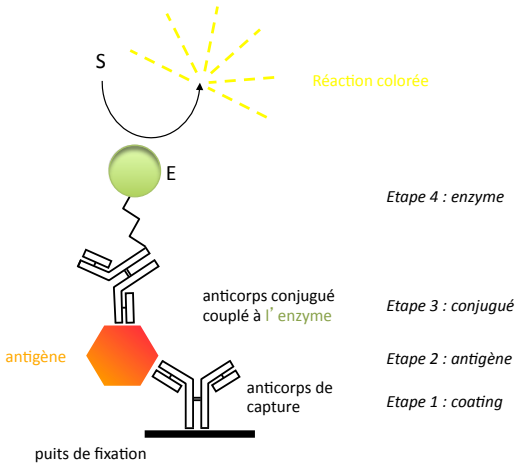



**Figure 38. Schéma de la méthode de détection sérologique par DAS-ELISA**

## I.2. Méthode moléculaire

### *I.2.a. Extraction d'ARN totaux*

L'extraction des ARNs constitue une étape cruciale dans la détection de virus par RT-PCR (protocole en Annexe 3). Selon l'efficacité de la méthode utilisée, la détection ultérieure du virus dans la plante infectée peut être compromise du fait de la dégradation des ARNs par des ribonucléases, de la copurification d'inhibiteurs de la PCR (polyphénols, sucres) ou d'un faible rendement de l'extraction. La quantité d'ARN viral extraite étant dans la fraction minoritaire des ARNs messagers (3 à 10 % des ARNs totaux), il est donc primordial de réaliser cette étape avec rigueur.

Les extractions d'ARN ont été réalisées avec le kit QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit. Ce kit s'est révélé être le plus performant lors d'une étude comparative réalisée au laboratoire. Toutefois, l'extraction d'ARN à partir de bois de vigne est plus délicate que celle à partir de limbes ou de pétioles, car la quantité extraite est nettement inférieure (10 à 40 µg/ml d'ARN extrait de bois contre 300 à 1000µg/ml d'ARN extrait de feuilles) et l'extrait d'ARN est de pureté moindre. Le dosage des ARN simple brin s'effectue ensuite au spectrophotomètre (1 unité de DO à 260 nm équivaut à 40 µg d'ARN/ml). La contamination protéique est déterminée en fonction du rapport des DO à 260 et à 280 nm. Le rapport pour un "ARN purifié" doit être compris entre 1,7 et 2.

### *I.2.b. RT-PCR*

La RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction ou transcription inverse - réaction de polymérisation en chaîne) permet de détecter dans le sang, dans les tissus animaux et végétaux la présence d'ARN de virus ou de bactéries par exemple. Les virus de l'enroulement et du complexe du bois strié étant des virus à ARN, il est nécessaire de rétro-transcrire l'ARN en ADN à l'aide d'une Reverse Transcriptase (RT) avant d'amplifier un fragment spécifique d'ADN avec une Taq polymérase (Figure 39).

Le principe de la RT consiste, après extraction des ARNs totaux dans les tissus à analyser, à les transcrire *in vitro* en ADNc simple brin. Les molécules d'ADN ainsi obtenues servent alors de matrices à une réaction de PCR. La synthèse de l'ADNc s'effectue avec une ADN polymérase ARN dépendante et une amorce anti-sens responsable de la spécificité en s'appariant à sa séquence complémentaire sur l'ARNm cible.

La PCR permet d'amplifier spécifiquement des séquences d'ADN par répétitions successives de réactions (i) de dénaturation des deux brins d'ADN à 94°C, afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténaires, (ii) d'hybridation (50°C-60°C) d'oligonucléotides complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible et (iii) d'élongation (72°C) en présence d'une ADN polymérase thermorésistante (Taq) et d'amorces nucléotidiques spécifiques. A chaque cycle de réaction, le nombre de copies du fragment d'ADN est théoriquement doublé : $2^n$ molécules sont ainsi obtenues après n cycles.

L'analyse des résultats de la PCR est réalisée par visualisation des fragments d'ADN amplifiés après électrophorèse sur un gel d'agarose. Le gel est immergé dans une solution de bromure d'éthidium à 1 µg/ml. Cette molécule s'intercale entre les bases des acides nucléiques et possède la propriété de rendre fluorescent l'ADN lorsqu'il est excité sous UV. L'exposition du gel au UV permet alors de visualiser les molécules d'ADN complexées au bromure d'éthidium.

Trois types de RT-PCR ont été utilisées pour détecter les GLRaVs et GVs dans cette étude : RT-PCR en une étape (Ready-to-Go RT-PCR Beads, GE Healthcare), RT-PCR classique en deux étapes (Eurogentec), et RT-PCR multiplexe (Multiplexe PCR kit, Qiagen) (protocoles en Annexe).

Le terme de "PCR multiplexe" désigne une variante de la technique PCR permettant l'amplification, en une seule réaction, de plusieurs fragments d'ADN (distincts par leur taille) si les différentes séquences cibles sont présentes dans l'échantillon. Les couples d'amorces correspondant aux différents fragments à amplifier sont introduits simultanément dans le même milieu réactionnel. Cette méthode mise au point au laboratoire INRA de Colmar a été utilisée pour la détection simultanée des GLRaV-1, -2, -3 et du GVA.

La PCR est une méthode de détection plus sensible que la technique ELISA. Ce point est capital quand on sait que la majorité des virus de la vigne ont une distribution non homogène dans la plante et qu'ils sont parfois présents en faible concentration. Cependant, la fiabilité de la PCR est limitée par la présence d'inhibiteurs d'enzymes (composés phénoliques et des polysaccharides) dans la plante. Le PVP-40 complexant les polyphénols et le β-mercaptoéthanol agissant comme anti-oxydant sont ajoutés dans les procédures d'extraction d'ARN pour réduire l'effet de ces inhibiteurs (Nassuth et al., 2000).

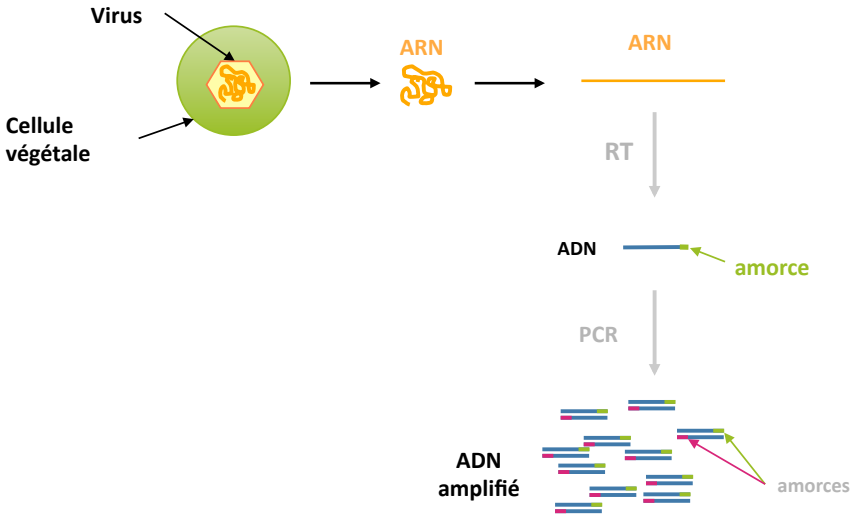



**Figure 39. Méthode moléculaire de détection de virus. Extraction d'ARN depuis un extrait végétal puis RT-PCR.**

## II. Transmission de virus par cochenilles

Les expériences de transmission ont pour objectif de tester la capacité des cochenilles à transmettre des agents viraux. Deux types d'expériences de transmission ont été utilisées au cours de cette étude : expérience d'infectivité et expérience de transmission contrôlée. On distingue trois étapes pour chacune de ces expériences (Figure 40).

### II.1. Etape d'acquisition (AAP)

Dans le cas des expériences d'infectivité, l'étape d'acquisition de virus a lieu directement au vignoble. Le prélèvement de cochenilles est effectué directement sur le terrain sur des ceps dont le statut sanitaire est préalablement vérifié par DAS-ELISA. On considère donc que les cochenilles prélevées sur les parties végétatives de ces vignes sont potentiellement virulifères. Le temps d'acquisition n'est donc pas contrôlé dans ce cas.

Dans le cas des expériences de transmission contrôlée, les cochenilles utilisées sont issues d'un élevage mené au laboratoire. Les colonies de cochenilles avirulifères sont maintenues en bocaux sur des plantes non hôtes des GLRaVs (*Solanum tuberosum*). Pour la phase d'acquisition, un nombre défini de cochenilles est prélevé au sein de ces colonies et placé sur des feuilles de vigne issues des diverses accessions disponibles dans la collection ampélographique de l'INRA de Colmar (Tableau 27). Les cochenilles se fixant généralement très rapidement aux feuilles d'acquisition, on peut donc contrôler le temps d'acquisition (en général 24, 48 ou 72h).

## II.2. Etape d'inoculation (IAP)

Cette étape consiste à transférer les cochenilles depuis les feuilles d'acquisition sur des vignes test saines. L'accession utilisée comme vigne test est *Vitis vinifera* 'Pinot noir' clone 115 ou P115. Ces vignes sont issues de boutures de pieds-mères de P115 dont le statut sanitaire est régulièrement contrôlé. Chaque plante test est cultivée en serre en pot individuel. On prélève un nombre défini de cochenilles au pinceau depuis les feuilles d'acquisition pour les placer grâce à des petites boîtes de pétri sur la face inférieure des feuilles des plantes tests. Suivant les expériences, on place de 5 à 300 cochenilles sur chaque plante test, en répartissant les lots sur les feuilles de la plante. Pour chaque expérience de transmission, 20 plantes tests sont généralement utilisées. L'IAP dure en général entre 24 et 72h. A la fin de l'IAP, on compte pour sur chaque plante test le nombre de cochenille fixées (en général le long des nervures centrales et secondaires) pour s'assurer que ce nombre corresponde approximativement à celui des cochenilles introduites au début de l'IAP. Après l'arrêt de l'IAP par un traitement insecticide (Phosdrin W10, dose 4 ml/l, substance active mevinphos), on s'assure qu'aucune cochenille ne subsiste sur les plantes test.

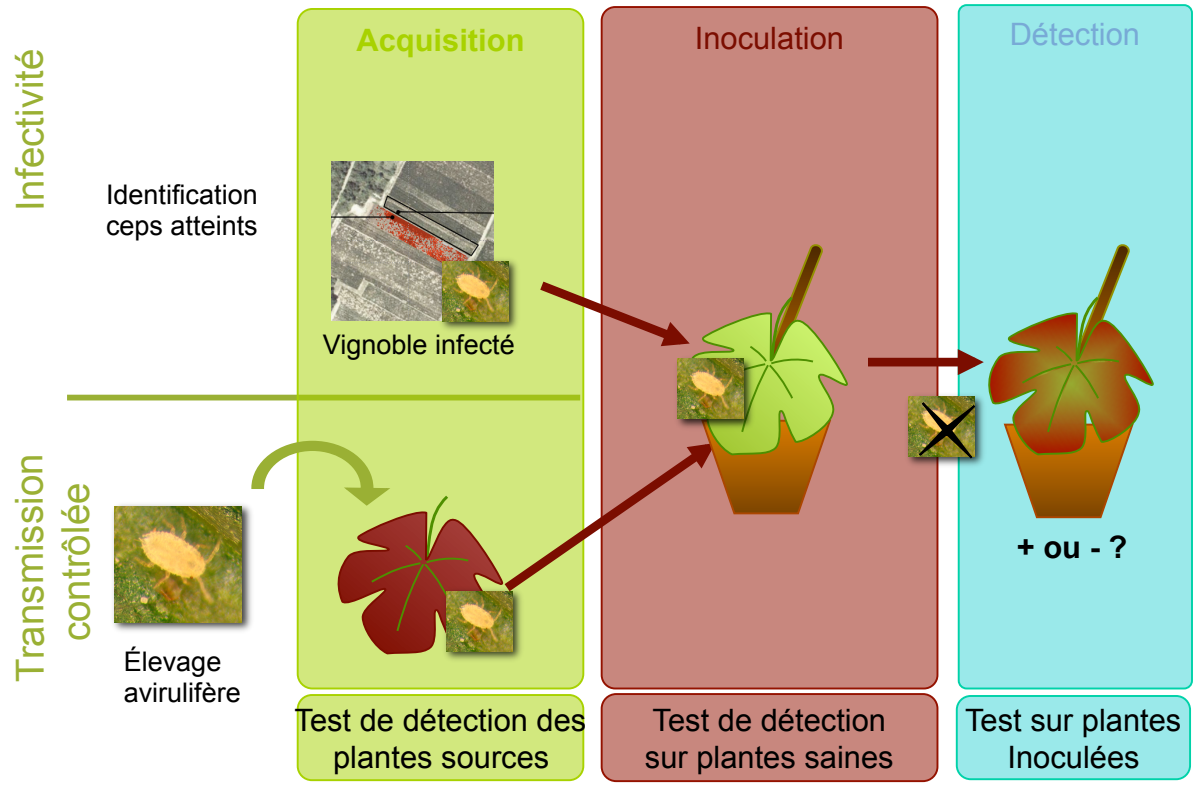



**Figure 40. Schéma des étapes composant les expériences de transmission de virus par cochenilles vectrices.**

## II.3. Détection

Les plantes tests inoculées sont maintenues en serre et les tests de détection (par DAS-ELISA et/ou RT-PCR) sont effectués au moins 2 mois après l'inoculation. En deçà de cette période, le ou les virus potentiellement inoculé(s) ne se sont pas suffisamment répliqués pour garantir un diagnostic fiable avec les techniques de détection utilisées. Après cette première phase de détection, les plantes sont conservées en serre puis subissent une dormance artificielle à 4°C en chambre froide pendant un minimum de 3 semaines. Une fois replacées en serre, ces plantes peuvent être de nouveau testées après la reprise de végétation. Les échantillons suivants sont utilisés comme témoin pour les tests de détection :

- Témoin sain : P115 issu de pied-mère,
- Témoin positif : accession virosée issue du pied-mère correspondant au virus testé,
- Témoin d'inoculation : permettant de vérifier le caractère avirulifère des cochenilles issues des élevages (feuilles d'un plant de P115 sur lequel des cochenilles issues de l'élevage ont été placée)
- Témoin d'acquisition : permettant de vérifier la positivité de la plante source pour l'acquisition (fragments de feuilles utilisés pour l'étape d'acquisition par cochenille).

**Tableau 27. Liste des accessions de *Vitis vinifera* ayant servi pour les acquisitions de virus par cochenille.**

| | | Virus de l'enroulement (GLRaVs) et du bois strié (GVs) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Plante source** | **Origine** | GLRaV -1 | GLRaV -2 | GLRaV -3 | GLRaV -4 | GLRaV -5 | GLRaV -6 | GLRaV -7 | GLRaV -9 | GVA | GVB | GVD |
| Pinot noir P70 | Bourgogne | + | | | | | | | | + | | |
| Pinot noir PN01 | Bourgogne | + | | | | | | | | + | | |
| Pinot noir PN02 | Bourgogne | + | | + | | | | | | + | | |
| Pinot noir PN03 | Bourgogne | + | | + | | | | | | + | | |
| Riesling R16 | Alsace | | | | | | | | | + | | |
| Riesling R33 | Alsace | | | | | | | | | + | | |
| Riesling R48 | Alsace | | | | | | | | | + | | |
| Riesling R63 | Alsace | | + | | | | | | | | + | + |
| Chardonnay TE132 | France | + | | | | | | | | | + | |
| Black monukka Y199 | Etats-Unis | | | | | + | + | | | + | | |
| Cape currant Y204 | Afrique du Sud | | + | | | | | | | | | |
| Emperor Y217 | Etats-Unis | | | | | + | | | | + | | |
| Karasakis Y245 | Turquie | + | | + | | | | | | + | | |
| Koudsi Y252 | Israël | | | | + | | | | | + | | |
| Koussan Y253 | Turquie | | | | + | | | | | + | | |
| Vardabouïre Y258 | Azerbaïdjan | + | | + | | | | | | + | | |
| Yhsouh ali Y318 | Iran | + | | + | | | | | | + | | |
| Otcha Bala Y276 | Ouzbékistan | | | | | | | + | | + | | |
| Cabernet Sauv. Cab119-66 | France | | | | | | | | + | + | | |

## III. Analyse statistique spatiale

Les relevés effectués sur les parcelles d'étude ont généré un grand nombre de données. On dispose ainsi d'informations annuelles sur le statut sanitaire des ceps : présence de symptômes d'enroulement viral, gravité des symptômes, statut sérologique vis à vis des GLRaV-1, -3 et GVA, présence de cochenilles (selon l'espèce, l'abondance). L'ensemble de ces données a été consigné dans des matrices où chaque cep possède ses coordonnées spatiales. Aussi, les matrices générées (présence/absence ou données en cumuls) ont pu faire l'objet d'analyses spatiales afin d'évaluer les motifs de distribution des variables étudiées.

### III.1. Choix de la méthode d'analyse

Les données acquises dans les domaines de la génétique, de l'écologie ou de la biologie des populations sont souvent spatialisées. Les statistiques spatiales se consacrent donc à relier la position géographique de ces mesures avec les observations effectuées.
L'enregistrement des données spatiales peut être de plusieurs types : surfacique (sur une aire définie par des limites), ponctuel (donnée de surface ramenée sur un point précis de mesure), de voisinage (espace défini par une relation de voisinage) ou de distance (différences mesurées deux à deux). Dans notre cas, les données sont consignées selon un enregistrement du voisinage : la parcelle viticole est définie selon une matrice comprenant i lignes et j colonnes (Figure 41).

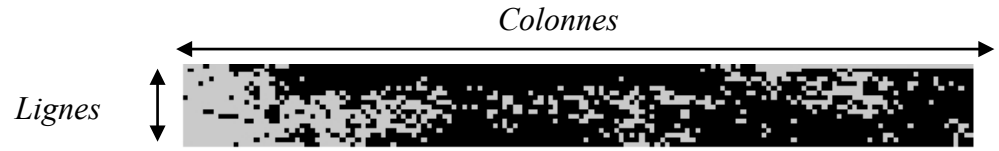



**Figure 41. Représentation schématique des données collectées sur une parcelle pour les i lignes et j colonnes (généré avec le pogramme R).**

Pour analyser ce type de données, les indices de Moran et Geary sont couramment utilisés afin d'évaluer l'indépendance spatiale sur le réseau défini par la matrice. L'indice de Moran évalue la corrélation spatiale au niveau global sur le réseau alors que l'indice de Geary mesure la dépendance spatiale comme un variogramme (Gaetan et Guyon, 2008). Une autre méthode, basée sur un test de permutation spatial permet d'étudier un jeu de données sur une grille (Peyrard et al., 2005). On utilise alors un test de Monte Carlo afin de tester l'indépendance spatiale entre tous les points de mesures. Ce type de test non paramétrique est fréquemment usité dans le cas de données consignées sur grilles régulières et permet une analyse des motifs spatiaux dans le domaine de la protection des plantes (Thébaud et al., 2005).

### III.2. Test de permutation d'indépendance spatiale

#### *III.2.a. Principe*

Le test de permutation repose sur une redistribution des données au hasard et consiste à analyser les seules données observées. L'hypothèse d'indépendance testée est $H_0$ : les données sont indépendantes et identiquement distribuées (i.i.d.). Selon cette hypothèse, toutes les permutations effectuées sur les données observées sont donc équiprobables.

Les critères servant de statistique de test correspondent au variogramme et au covariogramme, qui sont comparés à une enveloppe de confiance déterminée pour un nombre N de permutations et un seuil α.
On considère un jeu de données schématisé sous forme de grille régulière contenant i lignes et j colonnes. Les données relatives à chaque cep sont recueillies aux nœuds de la grille. Si on appelle X notre grille, on notera $X_{(i,j)}$ la valeur de X à la ligne i et à la colonne j, et d le pas de déplacement (Figure 42). On cherche à détecter une structure spatiale dans la grille, c'est-à-dire une agrégation des données de même valeur. Pour cela, on effectue un test de permutation pour évaluer l'indépendance des données par rapport à leur placement sur la grille.

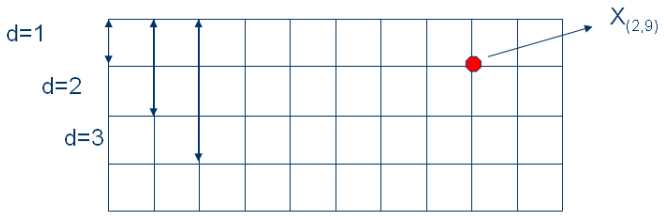



**Figure 42. Grille de donnée à maille régulière**

### *III.2.b. Test d'indépendance spatiale sur une grille de données*

On applique un test d'indépendance globale pour étudier l'agrégation des données. Le principe du test de permutation utilisé est de mélanger aléatoirement toutes les valeurs des $X_{(i,j)}$ pour tout i et j, et pour un nombre N de permutations selon les pas de déplacement *d*. La statistique d'évaluation de la dépendance spatiale correspond au variogramme *C(d)* (Figure 43). Les tests pour notre étude ont été effectués pour N = 200 permutations avec un seuil de confiance α = 5%.

$$C(d) = \frac{1}{I(J-d)} \sum_{i=1}^{I} \sum_{j=1}^{J-d} (X_{(i,j)} - X_{(i,j+d)})^2$$

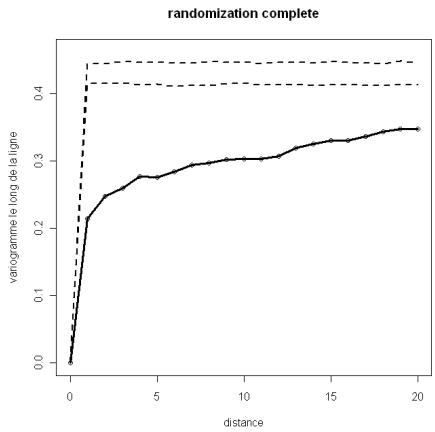



**Figure 43. Formule du variogramme *C(d)* pour le test d'indépendance spatiale globale et exemple de variogramme généré par un test d'indépendance spatiale globale. La statistique *C(d)* (en trait plein) se situe en dehors de la bande de confiance (en pointillés) délimitant l'ensemble des permutations calculées pour α = 5%. On déduit donc qu'il y a une dépendance spatiale au sein du jeu de données testé.**

On peut analyser le jeu de données avec deux autres types de tests d'indépendance spatiale. Le principe est d'effectuer des permutations sans changer la structure au sein même d'une ligne. On distingue ainsi le test d'indépendance par permutations aléatoires des lignes entre elles du test d'indépendance par rotations aléatoires au sein des lignes (Figure 44).

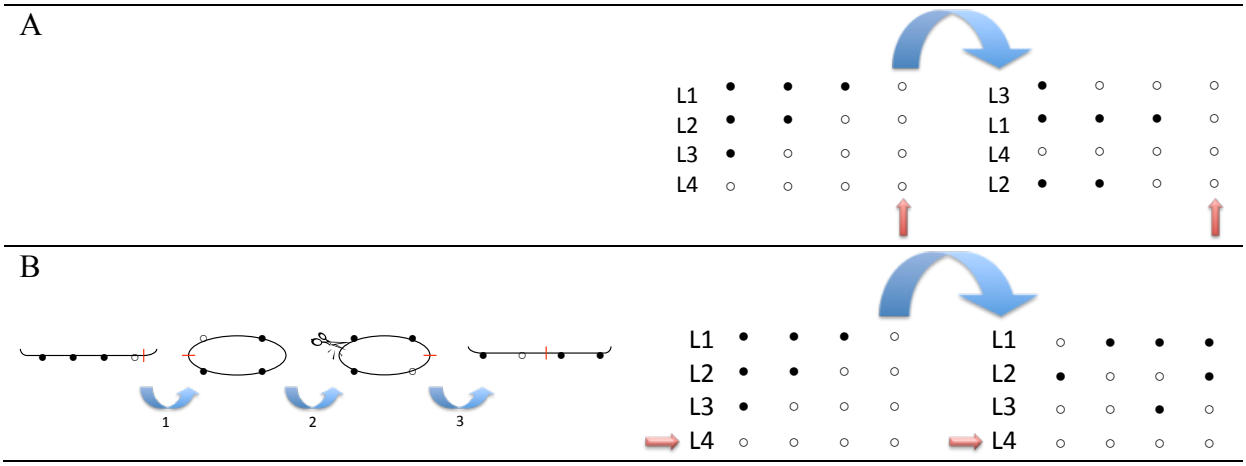



**Figure 44. A. Permutation aléatoire des lignes entre elles : l'ordre des lignes L1 à L4 change, mais la structure au sein de la colonne 4 reste inchangée. B. Rotation aléatoire au sein des les lignes : chaque ligne est refermée comme une boucle (1) puis on effectue une rotation de pas *d* au sein de cette boucle (2) avant de la déplier (3). Cette fois-ci, si les données sont identiques sur la ligne L4, sa structure restera donc inchangée.**

Ces deux tests d'indépendance spatiale permettent ainsi d'étudier plus précisément l'agrégation des données par rapport au test d'indépendance global. Selon le variogramme obtenu, on peut ainsi constater si les données sont davantage agrégées selon les lignes ou selon les colonnes.

### *III.2.c. Test d'indépendance spatiale de deux grilles de données*

Le principe général d'un test d'indépendance spatiale entre deux grilles repose sur le fait que, même s'il existe une structure spatiale dans chaque grille, ces structures sont disposées au hasard l'une par rapport à l'autre. S'il y a une structure spatiale dans les grilles, on cherche à la conserver dans le test, sinon ce dernier mêlera test d'indépendance entre grilles et test d'indépendance entre deux points de la même grille. Avant d'effectuer un test d'indépendance pour comparer deux grilles, il faudra donc au préalable appliquer un test d'indépendance global pour chaque grille afin d'y prouver l'existence d'une structuration spatiale.

On nomme X et Y deux grilles et les données correspondant aux mêmes points de ces deux grilles. Si l'une de ces grilles ne présente aucune structure, alors on considère qu'elles sont indépendantes, sinon, on peut procéder au test d'indépendance entre deux grilles (Figure 45).

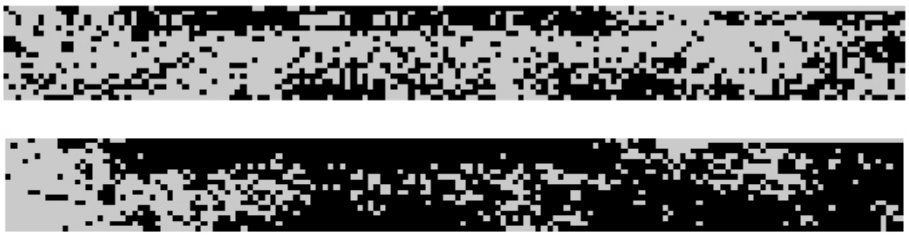


**Figure 45. Représentation schématique de deux jeux de données collectés sur une même grille (généré avec le programme R). Une structuration spatiale existant dans les deux grilles, on peut donc procéder au test d'indépendance spatiale entre les deux grilles.**

On effectue un test de permutation en utilisant la méthode de translation. Les deux grilles sont translatées l'une par rapport à l'autre, autant de fois qu'il y a de ligne et de colonnes dans la grille. Le nombre de translations sera donc n(T) = i*j .

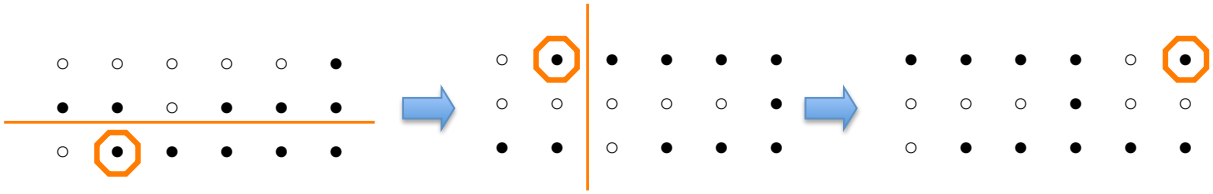


**Figure 46. Principe de la translation au sein d'une grille. Les deux translations illustrées sont effectuées par rapport au nœud entouré en orange.**

Il existe plusieurs possibilités pour tester l'indépendance spatiale entre deux grilles. Si les deux grilles possèdent des structures selon les lignes et les colonnes, on effectuera les translations dans les deux sens. Si elles ne possèdent qu'une structure dans un sens, on effectuera la translation uniquement dans un sens. En outre, on peut également effectuer toutes les translations possibles ou bien juste un nombre N de permutations. Le critère de comparaison correspond au covariogramme *C(d)* qui mesurera l'accord entre les deux grilles de données (Figure 47) :

$$C(d) = \frac{1}{I(J-d)} \sum_{i=1}^{I} \sum_{j=1}^{J-d} (X_{(i,j)} - X_{(i,j+d)})(Y_{(i,j)} - Y_{(i,j+d)})$$

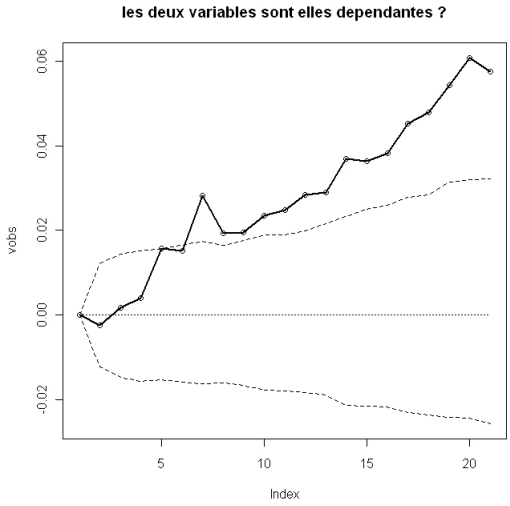



**Figure 47. Covariogramme issu d'un test d'indépendance spatiale entre deux grilles. A partir de *d*=7, la statistique *C(d)* (en trait plein) se situe en dehors de la bande de confiance (en pointillés) délimitant l'ensemble des translations calculées pour α = 5%. On déduit donc qu'il y a une dépendance spatiale au sein du jeu de données testé.**

# Références bibliographiques

## -A-


**Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Gugerli, P., and Rowhani, A.** (2012). Genome organization, serology and phylogeny of Grapevine leafroll-associated viruses 4 and 6: Taxonomic implications. *Virus Res.* **163,** 120-128.

**Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Castellano, M.A., Boscia, D., and Martelli, G.P.** (2000). Properties of a new isolate of grapevine leafroll-associated virus 2. *Vitis* **39,** 119-121.

**Abou-Ghanem, N., Sabanadzovic, S., Minafra, A., Saldarelli, P., and Martelli, G.P.** (1998). Some properties of grapevine leafroll-associated virus 2 and molecular organization of the 3' region of the viral genome. *J. Plant Pathol.* **80,** 37-46.

**Abou-Ghanem, N., Sabanadzovic, S., Uyemoto, J.K., Golino, D.A., and Rowhani, A.** (2010). A putative new ampelovirus associated with grapevine leafroll disease. *Arch. Virol.* **155,** 1871-1876.

**Abou-Ghanem, N., Saldarelli, P., Minafra, A., Buzkan, N., Castellano, M.A., and Martelli, G.P.** (1997). Properties of grapevine virus D, a novel putative trichovirus. *J. Plant Pathol.* **79**, 15-25.

**Adams, M.J., Antoniw, J.F., Bar-Joseph, M., Brunt, A.A., Candresse, T., Foster, G.D., Martelli, G.P., Milne, R.G., and Fauquet, C.M.** (2004). *Virology Division News*: The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Arch. Virol.* **149,** 1045-1060.

**Agi, T., and Okimoto, S.** (2005). Les gouttes de dieu. *4* (Tokyo: Glenat).

**Agreste.** (2010). Surfaces, production, rendements (Bureau des Statistiques sur les Productions et les Comptabilités Agricoles).

**Al Rwahnih, M., Dolja, V.V., Daubert, S., Koonin, E.V., and Rowhani, A.** (2012). Genomic and biological analysis of Grapevine leafroll-associated virus 7 reveals a possible new genus within the family Closteroviridae. *Virus Res.* **163,** 302-309.

**Alabi, O.J., Al Rwahnih, M., Karthikeyan, G., Poojari, S., Fuchs, M., Rowhani, A., and Rayapati, N.A.** (2011). Grapevine leafroll-associated virus 1 occurs as genetically diverse populations. *Phytopathology* **101,** 1446-1456.

**Alkowni, R., Rowhani, A., Daubert, S., and Golino, D.** (2004). Partial characterization of a new Ampelovirus associated with grapevine leafroll disease. *J. Plant Pathol.* **86,** 123–133.

**Alkowni, R., Zhang, Y.-P., Rowhani, A., Uyemoto, J., and Minafra, A.** (2011). Biological, molecular, and serological studies of a novel strain of grapevine leafroll-associated virus 2. *Virus Genes* **43,** 102-110.

**Almeida, R.P.P., Bennett, G.M., Anhalt, M.D., Tsai, C.-W., and O'Grady, P.** (2009). Spread of an introduced vector-borne banana virus in Hawaii. *Molecular Ecology* **18,** 136-146.

**Andret-Link, P., and Fuchs, M.** (2005). Transmission specificity of plant viruses by vectors. *J. Plant Pathol.* **87,** 153-165.

**Arnold, C., Schnitzler, A., Douard, A., Peter, R., and Gillet, F.** (2005). Is there a future for wild grapevine (*Vitis vinifera* subsp. *silvestris*) in the Rhine Valley? *Biodiversity and Conservation* **14,** 1507-1523.

**Arroyo-Garcia, R., Ruiz-Garcia, L., Bolling, L., Ocete, R., LoPez, M.A., Arnold, C., Ergul, A., Soylemezglu, G., Uzun, H.I., Cabello, F., Ibanez, J., Aradhya, M.K., Atanassov, A., Atanassov, I., Balint, S., Cenis, J.L., Costantini, L., Gorislavets, S., Grando, M.S., Klein, B.Y., McGovern, P.E., Merdinoglu, D., Pejic, I., Pelsy, F., Primikirios, N., Risovannaya, V., Roubelakis-Angelakis, K.A., Snoussi, H., Sotiri, P., Tamhankar, S., This, P., Troshin, L., Malpica, J.M., Lefort, F., and Martinez-Zapater, J.M.** (2006). Multiple origins of cultivated grapevine (Vitis vinifera L. ssp. sativa) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology* **15,** 3707-3714.

**Ashfaq, M., Noor, A.R., and Mansoor, S.** (2010). DNA-based characterization of an invasive mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) species damaging cotton in Pakistan *Appl. Entomol. Zool.* **45,** 395-404.

**Astier, S., Albouy, J., Maury, Y., and Lecoq, H.** (2001). Principes de virologie végétale (Paris: INRA Editions), 444 p.

**Atallah, S.S., Gomez, M.I., Fuchs, M., and Martinson, T.E.** (2012). Economic impact of Grapevine leafroll disease on *Vitis vinifera* cv. Carbenet franc in Finger Lakes vineyards of New York. *Am. J. Enol. Vitic.* **63,** 73-79.


## -B-


**Baumann, L., and Baumann, P.** (2005). Cospeciation between the primary Endosymbionts of mealybugs and thier Hosts. *Current Microbiology* **50,** 84- 87.

**Beardsley, J.W.** (1969). A new fossil scale insect from Canadian amber. *Psyche* **76,** 270-279.

**Belli, G., Fortusini, A., and Prati, S.** (1993). Natural spread of grapevine leafroll disease in a vineyard of northern Italy. In 11th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine, pp. 110. 6-9 September 1993.

**Belli, G., Fortusini, A., Casati, P., Belli, L., Bianco, P.A., and Prati, S.** (1994). Transmission of a grapevine leafroll associated closterovirus by the scale insect Pulvinaria vitis L. *Riv. Pat. Veg.* **4,** 105- 108.

**Ben-Dov, Y.** (1990). Taxonomic Characters. In *Armored Scale Insects, Their Biology, Natural Enemies and Control* D. Rosen, ed (Amsterdam, the Netherlands: Elsevier), pp. 85-92.

**Ben-Dov, Y.** (1993). A systematic catalogue of the soft scale insects of the world (Homoptera: Coccoidea: Coccidae) with data on geographical distribution, host plants, biology and economic importance (Gainesville, FL.: Sandhill Crane Press).

**Ben-Dov, Y.** (1994). A systematic catalogue of the mealybugs of the world (Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae) with data on geographical distribution, host plants, biology and economic importance (Andover: Intercept).

**Ben-Dov, Y., and Matile-Ferrero, D.** (1995). The identity of the mealybug taxa described by V.A. Signoret (Homoptera, Coccoidea, Pseudococcidae). *Bulletin de la Société Entomologique de France* **100,** 241-256.

**Ben-Dov, Y., Miller, D.R., and Gibson, G.A.P.** (2012). ScaleNet. http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm

**Bertamini, M., Muthuchelian, K., and Nedunchezhian, N.** (2004). Effect of Grapevine Leafroll on the Photosynthesis of Field Grown Grapevine Plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). *J. Phytopathol.* **152,** 145-152.

**Bertazzon, N., Borgo, M., and Angelini, E.** (2010). The complete genome sequence of the BD variant of grapevine leafroll-associated virus 2. *Arch. Virol.* **155,** 1717-1719.

**Bertazzon, N., Repetto, O., De Rosso, M., Flamini, R., Angelini, E., and Borgo, M.** (2009). Leafroll symptoms caused by GLRaV-3 are associated with an increase of resveratrol in grapevine leaves. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 252-253. 31 Aug- 4 Sept.

**Bertin, S., Cavalieri, V., Graziano, C., and Bosco, D.** (2010). Survey of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) vectors of Ampelovirus and Vitivirus in vineyards of northwestern Italy. *Phytoparasitica* **38,** 401-409.

**Bertsch, C., Beuve, M., Dolja, V.V., Wirth, M., Pelsy, F., Herrbach, E., and Lemaire, O.** (2009). Retention of the virus-derived sequences in the nuclear genome of grapevine as a potential pathway to virus resistance. *Biology Direct* **4,** 21.

**Besse, S., Rütsche, C., and Gugerli, P.** (2009). Tentative analysis of the economic impact of grapevine learoll disease in the vineyard of Valais (Switzerland). In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 232-233. 31 Aug- 4 Sept.

**Beuning, L.L., Murphy, P., Wu, E., Batchelor, T.A., and Morris, B.A.** (1999). Molecular-based approach to the differentiation of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) species. *J. Econ. Entomol.* **92,** 463-472.

**Beuve, M., Sempé, L., and Lemaire, O.** (2007). A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants in grapevine. *J. Virol. Methods* **141,** 117-124.

**Beuve, M., Moury, B., Spilmont, A.-S., Sempé-Ignatovic, L., Hemmer, C., and Lemaire, O.** (2009). Viral sanitary status and genetic diversity of *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) in French Syrah clones exhibiting various susceptibility levels to decline. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 52-53.

**Bonfiglioli, R.G.E., Hoskins, N., and Edwards, F.** (2001). Grapevine leafroll viruses in New Zealand viticulture. *Riversun Technical Bulletin***,** 1-8.

**Bonnemaison, L.** (1961). Sous-ordre des coccinea ou cochenilles. In *Les ennemis animaux des plantes cultivées et des forêts*, ed (Paris), pp. 531-562.

**Borges da Silva, E., Mendel, Z., and Franco, J.C.** (2010). Can facultative parthenogenesis occur in biparental mealybug species ? *Phytoparasitica* **38,** 19-21.

**Borgo, M., and Angelini, E.** (2002). Influence of grapevine leafroll (GLRaV-3) on Merlot cv. grape production. *Bulletin de l'OIV* **75,** 611-622.

**Borgo, M., Bertazzon, N., Anaclerio, F., and Angelini, E.** (2006). Graft incompatibility and leafroll symptoms in grapevines affected by different GLRaV-2 variants. In 15th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Stellenboch, South Africa), pp. 25-27.

**Borgo, M., Michielini, C., Sequeira, O.A.d., Sequeira, J.C., and Santos, M.T.** (1997). Relationship between rugose wood complex symptoms and grapevine virus A. In 12th Meeting ICVG, Lisbon, Portugal, 29 September-2 October (Oeiras, Portugal), pp. 37-38.

**Boscia, D., Greif, C., Gugerli, P., Martelli, G.P., Walter, B., and Gonsalves, D.** (1995). Nomenclature of grapevine leafroll-associated putative closteroviruses. *Vitis* **34,** 171-175.

**Boscia, D., Savino, V., Minafra, A., Namba, S., Elicio, V., Castellano, M.A., Gonsalves, D., and Martelli, G.P.** (1993). Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. *Arch. Virol.* **130,** 109-120.

**Boudon-Padieu, E., Ridé, M., and Walter, B.** (2000a). Les maladies à virus, bactéries et phytoplasmes de la Vigne (Bordeaux: Féret).

**Boudon-Padieu, E., Ridé, M., and Walter, B.** (2000b). L'enroulement viral. In *Maladies à virus, bactéries et phytoplasmes de la Vigne*, Féret, ed, pp. 47-55.

**Bovey, R.** (1970). Economic importance of grapevine virus diseases. *Bulletin de l'OIV* **43,** 124-138.

**Bovey, R.** (1999). The viroses and virus-like diseases of grapevine. Bibliographic report 1985-1997. *Options Méditerranéennes,Série B* **29,** 172.

**Bovey, R., and Martelli, G.** (1986). The viroses and virus-like diseases of the grapevine. A bibliographic report 1979-1984. *Vitis* **25,** 227-275.

**Bovey, R., Gaertel, W., Hewitt, W.B., Martelli, G.P., and Vuittenez, A.** (1980). Virus and virus-like diseases of grapevine (Lausanne: Editions Payot) 181p.

**Box, H.E.** (1945). Insect transmission of the 'swollen-shoot' virus in West African cacao. *Nature* **155,** 608-609.

**Burrows, P.M.** (1987). Improved estimation of pathogen tranmission rates by group testing. *Phytopathology* **77,** 363-365.

## -C-


**Cabaleiro, C.** (2009). Current advances in the epidemiology of grapevine leafroll disease. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 264-268. 31 Aug- 4 Sept.

**Cabaleiro, C., and Segura, A.** (1996). Efecto del enrollado de la vid (GLRaV-3) en un viñedo en plena produccion del cultivar "Albariño". *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* **11,** 451-463.

**Cabaleiro, C., and Segura, A.** (1997a). Some characteristics of the transmission of grapevine leafroll associated virus 3 by *Planococcus citri* Risso. *Eur. J. Plant Pathol.* **103,** 373-378.

**Cabaleiro, C., and Segura, A.** (1997b). Field transmission of grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybug Planococcus citri. *Plant Dis.* **81,** 283-287.

**Cabaleiro, C., and Segura, A.** (2003). Monitoring the field spread of GLRaV-3 for 12 years. In 14th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Locorotondo), pp. 216-217. 12-17 September 2003.

**Cabaleiro, C., and Segura, A.** (2006). Temporal analysis of grapevine leafroll associated virus 3 epidemics. *Eur. J. Plant Pathol.* **114,** 441-446.

**Cabaleiro, C., Pineiro, A., and Segura, A.** (1997). Photosynthesis in grapevines infected with leafroll virus (GLRaV-3). In 12th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Lisbon, Portugal).

**Cabaleiro, C., Segura, A., and Garcia-Berrios, J.** (1999). Effects of grapevine leafroll-associated virus 3 on the physiology and must of *Vitis vinifera* L. cv. Albariño following contamination in the field. *Am. J. Enol. Viticult.* **50,** 40-44.

**Cabaleiro, C., Couceiro, C., Pereira, S., Cid, M., Barrasa, M., and Segura, A.** (2008). Spatial analysis of epidemics of *Grapevine leafroll associated virus-3*. *Eur. J. Plant Pathol.* **121,** 121-130.

**Calonnec, A., Cartolaro, P., and Chadoeuf, J.** (2009). Highlighting features of spatiotemporal spread of powdery mildew epidemics in the vineyard using statistical Modeling on field experimental data. *Phytopathology* **99,** 411-422.

**Camporese, P.** (1994). Prime osservazioni sulla biologia di Heliococcus bohemicus Sulc nei vigneti del Veneto. *Memorie della Società entomologica Italiana* **72,** 195-200.

**Canard, M.** (1957). Déplacements et migrations de *Eulecanium corni* Bouché. *Bull. Soc Hist. Nat. Toulouse* **92,** 293-296.

**Canard, M.** (1960). Recherches sur la morphologie et la biologie de la cochenille Eulecanium corni (Bouché)- Chapitre V, pp. 77-80.

**Canard, M.** (1966). Une Pulvinaire de la vigne, nouvelle pour la France : *Neopulvinaria imeretina* (Coccoidea coccidae). *Ann. Soc. Ent. Fr. (N.S.)* **2,** 189-197.

**Carstens, E.** (2010). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch. Virol.* **155,** 133-146.

**Castellano, M.A., Martelli, G.P., and Savino, V.** (1983). Virus-like particles and ultrastructural modifications in the phloem of leafroll-affected grapevines. *Vitis* **22,** 23-39.

**Charles, J.G., Froud, K.J., van den Brink, R., and Allan, D.J.** (2009). Mealybugs and the spread of grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) in a New Zealand vineyard. *Australas. Plant Path.* **38,** 576-583.

**Charles, J.G., Cohen, D., Walker, J.T.S., Forgie, S.A., Bell, V.A., and Breen, K.C.** (2006). A review of grapevine leafroll associated virus type 3 (GLRaV-3) for the New Zealand wine industry (The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand Ltd (HortResearch), Client Report No 18447, 79 p.).

**Chen, A.Y.S., Walker, G.P., Carter, D., and Ng, J.C.K.** (2011). A virus capsid component mediates virion retention and transmission by its insects vector. *PNAS* **108,** 16777-16782.

**Chooi, K.M., Pearson, M.N., Cohen, D., and Pong, J.C.H.** (2009). Sequence variation in *Grapevine leafroll-associated virus -3* (GLRaV-3) New Zealand isolates. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 290-291.

**Choueiri, E., Boscia, D., Digiaro, M., Castellano, M.A., and Martelli, G.P.** (1996). Some properties of a hitherto undescribed virus of the grapevine. *Vitis* **35,** 91-93.

**Choueiri, E., Digiaro, M., Savino, V., Sequeira, O.A.d., Sequeira, J.C., and Santos, M.T.** (1997). Further evidence that grapevine virus A is the agent of Kober stem grooving. In 12th Meeting ICVG, Lisbon, 29 September-2 October (Oeiras, Portugal), pp. 39-40.

**Cid, M., and Fereres, A.** (2010). Characterization of the Probing and Feeding Behavior of Planococcus citri (Hemiptera: Pseudococcidae) on Grapevine. *Annals of the Entomological Society of America* **103,** 404-417.

**Coetzee, B., Freeborough, M.-J., Maree, H.J., Celton, J.-M., Rees, D.J.G., and Burger, J.T.** (2010). Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: virome of a vineyard. *Virology* **400,** 157-163.

**Collectif.** (2006). Jaunisse à phytoplasme de la vigne, Viniflhor, ed (Groupe de travail National Flavescence dorée), pp. 24.

**Collectif.** (2009). Bulletin de Santé du Végétal, viticulture (Chambre d'Agriculture d'Alsace), pp. 2. 26 mai.

**Collectif.** (2012a). Le Larousse Médical, Larousse, ed, pp. 1264.

**Collectif.** (2012b). Voyage au travers de l'histoire de la Bourgogne (Beaune: Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne). http://www.vins-bourgogne.fr/connaitre/la-terre-de-bourgogne

**Cook, L.G., Gullan, P.J., and Trueman, H.E.** (2002). A preliminar phylogeny of the scale insects (Hemiptera: Stenorrhyncha: Coccoidea) based on nuclear small-subunit ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **25,** 43-52.

**Cornwell, P.B.** (1957). Effect of wind currents on vector dispersal. *Annual Report of the West African Cacao Research Institute* **1955-56**.

**Correa, M., Aguirre, C., Germain, J.-F., Hinrichsen, P., Zaviezo, T., Malausa, T., and Prado, E.** (2011). A new species of *Pseudococcus* (Hemiptera: Pseudococcidae) belonging to the "*Pseudococcus maritimus*" complex from Chile: molecular and morphological description. *Zootaxa* **2926,** 46-54.

**Credi, R., and Babini, A.R.** (1997). Effects of virus and viruslike infections on growth, yield, and fruit quality of Albana and Trebbiano Romagnolo grapevines. *Am. J. Enol. Viticult.* **48,** 7–12.

**Cretazzo, E., Padilla, C., Carambula, C., Hita, I., Salmerón, E., and Cifre, J.** (2010). Comparison of the effects of different virus infections on performance of three Majorcan grapevine cultivars in field conditions. *Annals of Applied Biology* **156,** 1-12.

## -D-

**Daane, K., Bentley, W., Walton, V.M., Malakar-Kuenen, R., Millar, J.G., Ingels, C.A., Weber, E.A., and Gispert, C.** (2006a). New controls investigated for vine mealybug. *Calif. Agric.* **60,** 31-38.

**Daane, K.M., Sime, K.R., Fallon, J., and Cooper, M.L.** (2007). Impacts of Argentine ants on mealybugs and their natural enemies in California's coastal vineyards. *Ecological Entomology* **32,** 583-596.

**Daane, K.M., Sime, K.R., Hogg, B.N., Bianchi, M.L., Cooper, M.L., Rust, M.K., and Klotz, J.H.** (2006b). Effects of liquid insecticide baits on Argentine ants in California's coastal vineyards. *Crop Protection* **25,** 592-603.

**Danzig, E.M.** (2003). Mealybugs of the genus *Phenacoccus* Ckll. (Homoptera, Pseudococcidae) in the fauna of Russia and adjacent countries: I. *Entomological Review* **83,** 38-68.

**Danzig, E.M.** (2006). Mealybugs of the genus *Phenacoccus* Ckll. (Homoptera, Pseudococcidae) in the fauna of Russia and adjacent countries: II. *Entomological Review* **86,** 197-227.

**Danzig, E.M.** (2007). Mealybugs of the genus Heliococcus Sulc (Homoptera, Pseudococcidae) of the fauna of Russia and adjacent countries. *Entomol. Rev.* **87,** 988-1025.

**Danzig, E.M., and Matile-Ferrrero, D.** (1990). *Neopulvinaria innumerabilis,* a pest of vine in Europe (Homoptera: Coccinea: Coccidae). In Sixth International Symposium of Scale Insects Studies (Kracov), pp. 131-132. August 6-12.

**Demontis, M.A., Ortu, S., Cocco, A., Lentini, A., and Migheli, Q.** (2007). Diagnostic markers for Planococcus ficus (Signoret) and Planococcus citri (Risso) by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction and species-specific mitochondrial DNA primers. *J. Appl. Entomol.* **131,** 59-64.

**Desperrier, J.-M.** (2002). Etat de la contamination du vignoble français par le virus de l'enroulement et notamment de quelques parcelle en Beaujolais. *La Tassée Beaujolaise* **127,** 7-8.

**Desperrier, J.-M., and Séréno, C.** (2012). Bilan sanitaire de prospections sur Gamay. In IX International terroir Congress (Dijon, Reims). 25-29 june.

**Dimitrijevic, B.** (1973). Some observations on natural spread of Grapevine Leafroll disease in Yugoslavia. *Riv. Pat. Veg.* **9,** 114-119.

**Dolja, V.V., Kreuze, J.F., and Valkonen, J.P.T.** (2006). Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res.* **117,** 38-51.

**Downie, D.A., and Gullan, P.J.** (2004). Phylogenetic analysis of mealybugs (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) based on DNA sequences from three nuclear genes and a review of the higher classification. *Systematic Entomology* **29,** 238-259.

**du Preez, J., Stephan, D., Mawassi, M., and Burger, J.T.** (2011). The grapevine-infecting vitiviruses, with particular reference to grapevine virus A. *Arch. Virol.* **156,** 1495-1503.

**Duchêne, E., and Schneider, C.** (2005). Grapevine and climatic changes: a glance at the situation in Alsace. *Agronomy for Sustainable Development* **25,** 93-99.

## -E-

**Eastwell, K.C., and Bernardy, M.G.** (2001). Partial characterization of a closterovirus associated with apple mealybug-transmitted little cherry disease in North America. *Phytopathology* **91,** 268-273.

**Elbeaino, T., Numic, F., Digiaro, M., Sabanadzovic, S., and Martelli, G.P.** (2009). Partial characterisation of a *grapevine leafroll-associated virus* isolated from an infected cypriot vine of cv. Mavro *J. Plant Pathol.* **91,** 479-484.

**Engel, E., Girardi, C., Escobar, P., Arredondo, V., Dominguez, C., Pérez-Acle, T., and Valenzuela, P.** (2008). Genome analysis and detection of a Chilean isolate of *Grapevine leafroll-associated virus 3*. *Virus Genes* **37,** 110-118.

**Engelbrecht, D.J., and Kasdorf, G.G.F.** (1985). Association of a closterovirus with grapevines indexing positive for grapevine leafroll disease and evidence for its natural spread in grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* **24,** 101-105.

**Engelbrecht, D.J., and Kasdorf, G.G.F.** (1990). Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug, *Planococcus ficus*. *Phytophylactica* **22,** 341-346.

**Engelbrecht, D.J., and Kasdorf, G.G.F.** (1991). Field spread of corky bark, fleck, leafroll and Shiraz decline diseases and associated viruses in South African grapevines. *Phytophylactica* **22,** 347-354.

## -F-

**Faoro, F., Tornaghi, R., Fortusini, A., and Belli, G.** (1981). Association of a possible closterovirus with grapevine leafroll in northern Italy. *Riv. Pat. Veg.* **17,** 183-189.

**Fazeli, C., and Rezaian, M.** (2000). Nucleotide sequence and organization of ten open reading frames in the genome of Grapevine leafroll-associated virus 1 and identification of three subgenomic RNAs. *J. Gen. Virol.* **81,** 605-615.

**Foldi, I.** (1990). Internal anatomy. In *Armored Scale Insects, Their Biology, Natural Enemies and Control* D. Rosen, ed (Amsterdam, the Netherlands: Elsevier), pp. 65-80.

**Foldi, I.** (1997). Internal anatomy of the adult female. In *Soft scale insects. Their biology, natural enemies, and control.*, Y. Ben-Dov and C.J. Hodgson, eds (Amsterdam & New York), pp. 73-90.

**Foldi, I.** (2001). Liste des cochenilles de France (Hemiptera, Coccoidea). *Bulletin de la Société Entomologique de France* **106,** 303-308.

**Foldi, I.** (2003a). Les cochenilles (1/2). *Insectes* **129** 3-7.

**Foldi, I.** (2003b). Les cochenilles (2/2). *Insectes* **130,** 27-30.

**Foldi, I., and Soria, S.J.** (1989). Les cochenilles nuisibles à la vigne en Amérique du Sud (Coccoidea, Coccidae). *Annales de la Société entomologique de France* **25,** 411-430.

**Fortusini, A., Scattini, G., Cinquanta, S., and Prati, S.** (1996). Diffusione naturale del virus 1 (GLrV-1), del virus 3 (GLrV-3) dell'accartocciamento fogliare e del virus della maculature infettiva o "fleck" (GFkV) della vitte. *Informatore fitopatologico* **46,** 39-43.

**Fortusini, A., Scattini, G., Prati, S., Cinquanta, S., and Belli, G.** (1997). Transmission of *Grapevine leafroll virus 1* (GLRaV-1) and *Grapevine virus A* (GVA) by scale insects. In 12th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Lisbon, Portugal), pp. 121.

**Franco, J.C., Zada, A., Mendel, Z., Ishaaya, I., and Horowitz, A.R.** (2009). Novel Approaches for the Management of Mealybug Pests Biorational Control of Arthropod Pests. In *Biorational control of arthropod pests*, I. Ishaaya and A.R. Horowitz, eds (Springer Netherlands), pp. 233-278.

**Fuchs, M., Martinson, T.E., Loeb, G.M., and Hoch, H.C.** (2009). Survey for the three major leafroll disease-associated viruses in Finger Lakes vineyars in New York. *Plant Dis.* **93,** 395-401.

**Fulton, J.P., Gergerich, R.C., and Scott, H.A.** (1987). Beetle transmission of plant viruses. *Ann. Rev. Phytopathol.* **25,** 111-123.

## -G-

**Gaetan, C., and Guyon, X.** (2008). Statistics for spatial models. In *Spatial statistics and modeling*, Springer, ed, pp. 320.

**Galet, P.** (1977). Les maladies et les parasites de la vigne. Tome I (Montpellier: Imprimerie du "Paysan du Midi").

**Galiakparov, N., Tanne, E., Sela, I., and Gafny, R.** (2003a). Functional analysis of the *Grapevine Virus* A genome. *Virology* **306,** 42-50.

**Galiakparov, N., Goszczynski, D.E., Che, X., Batuman, O., Bar-Joseph, M., and Mawassi, M.** (2003b). Two classes of subgenomic RNA of grapevine virus A produced by internal controller elements. *Virology* **312,** 434-448.

**Garau, R., Prota, V.A., Piredda, D., Boscia, D., and Prota, U.** (1994). On the possible relationship between Kober stem grooving and grapevine virus A. *Vitis* **33,** 161-163.

**Garau, R., Fiori, P.P., Prota, V.A., Tolu, G., Fiori, M., Prota, U., Sequeira, O.A.d., Sequeira, J.C., and Santos, M.T.** (1997). Effect of virus infection on own-rooted clones of different wine grapes cultivars from Sardinia. In 12th Meeting ICVG, Lisbon, 29 September-2 October (Oeiras, Portugal), pp. 171-172.

**Garcia-Arenal, F., Fraile, A., and Malpica, J.M.** (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* **39,** 157-186.

**Gavrilov, I.A., and Trapeznikova, I.V.** (2007). Karyotypes and reproductive biology of some mealybugs (Insecta: Coccinea: Pseudococcidae). *Comparative cytogenetics* **1,** 139-148.

**Geiger, C.A., Daane, K.M., Bentley, W., Yokota, G.Y., and Martin, L.A.** (2001). Sampling program for grape mealybugs impoves pest management. *Calif. Agric.* **55,** 19-27.

**Germain, J.F., and Matile-Ferrero, D.** (2006). *Comstockiella sabalis* (Comstock), *Crisicoccus pini* (Kuwana), et *Phenacoccus defectus* Ferris, cochenilles nouvelles pour la France (Hem., Diaspididae and Pseudococcidae). *Bulletin de la Société Entomologique de France* **111,** 395-401.

**Giliomee, J.H.** (1967). Morphology and taxonomy of adult males of the family *Coccidae* (Homoptera: Cocoidea). *Bulletin of the British Museum* **Supplement 7**, 168p.

**Giliomee, J.H.** (1995). An annotated key to the families of scale insects (Homoptera: Coccoidea) based on the characters of the adult male. *Israel Journal of Entomology* **29,** 11-17.

**Giliomee, J.H.** (1997). The Adult Male. In *Soft Scale Insects: Their biology, natural enemies and control*, Y. Ben-Dov and C.J. Hodgson, eds (Elsevier), pp. 452.

**Goheen, A.C.** (1968). Virustest auf corky bark in den USA (Virus indexing for corky bark in USA). *Weinberg und Keller* **15,** 510-514.

**Goheen, A.C.** (1970). Grapevine leafroll. In *A handbook of virus disease of small fruits and grapevines*, N.W. Frazier, ed (Berkeley), pp. 209-219.

**Goheen, A.C., Harmon, F.N., and Weinberger, J.H.** (1958). Leafroll (White Emperor disease) of grapes in California. *Phytopathology* **48,** 51.

**Goheen, A.C., Gonsalves, D., Martelli, G.P., Ramsdell, D.C., Savino, V., Stellmach, G., Pearson, R.C., and Goheen, A.C.** (1988). Diseases caused by viruses and viruslike agents. In *Compendium of grape diseases* (St. Paul, Minnesota 55121, USA.: APS Press, The American phytopathological Society), pp. 47.

**Golino, D., Sim, S., Rowhani, A., and Symons, R.H.** (2000a). Identification of the latent viruses associated with young vine decline in California. In 13th Meeting ICVG, Adelaide, Australia, 12-17 March 2000, pp. 85-86.

**Golino, D.A., Sim, S.T., and Rowhani, A.** (2000b). The role of GLRV-2 and GVB in virus-induced rootstock decline in California grapevines. *Phytopathology* **90,** S28.

**Golino, D.A., Sim, S.T., Gill, R., and Rowhani, A.** (2002). California mealybugs can spread grapevine leafroll disease. *Calif. Agric.* **56,** 196-201.

**Golino, D.A., Weber, E., Sim, S.T., and Rowhani, A.** (2008). Leafroll disease is spreading rapidly in Napa Valley vineyard. *Calif. Agric.* **62,** 156-160.

**Goszczynski, D.** (2010a). Divergent molecular variants of *Grapevine virus B* (GVB) from corky bark (CB)-affected and CB-negative LN33 hybrid grapevines. *Virus Genes* **41,** 273-281.

**Goszczynski, D.** (2010b). Rugose wood-associated viruses do not appear to be involved in Shiraz (Syrah) decline in South Africa. *Arch. Virol.* **155,** 1463-1469.

**Goszczynski, D.E.** (2007). Single-strand conformation polymorphism (SSCP), cloning and sequencing reveal a close association between related molecular variants of Grapevine virus A (GVA) and Shiraz disease in South Africa. *Plant Pathology* **56,** 755-762.

**Goszczynski, D.E., and Jooste, A.E.C.** (2003a). Shiraz disease (SD) is transmitted by mealybug *Planococcus ficus* and associated with *Grapevine virus A* (GVA). In 14th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Locorotondo, Italy), pp. 219-220. 12-17 September 2003.

**Goszczynski, D.E., and Jooste, A.E.C.** (2003b). Identification of divergent variants of *Grapevine virus A*. *Eur. J. Plant Pathol.* **109,** 397-403.

**Goszczynski, D.E., du Preez, J., and Burger, J.T.** (2008). Molecular divergence of Grapevine virus A (GVA) variants associated with Shiraz disease in South Africa. *Virus Res.* **138,** 105-110.

**Goszczynski, D.E., Kasdorf, G.G.F., Pietersen, G., and Van Tonder, H.** (1996). Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2) - Mechanical transmission, purification, production and properties of antisera, detection by ELISA. *South African Journal of Enology and Viticulture* **17,** 15-26.

**Gouveia, P., Dandlen, S., Costa, Â., Marques, N., and Nolasco, G.** (2012). Identification of an RNA silencing suppressor encoded by *Grapevine leafroll-associated virus 3*. *Eur. J. of Plant Pathol.* **133,** 237-245.

**Goux, L.** (1934). Notes sur les Coccides de la France. (9ème note). Contribution à l'étude du genre *Heliococcus* avec description de deux espèces nouvelles. *Bulletin de la Société Entomologique de France* **11,** 169-170.

**Graniti, A., and Ciccarone, A.** (1961). Osservazioni su alterazioni virosiche e virus-simili della vite in Puglia. (Observation on virus- and virus-like diseases of grapevine in Puglia). *Notiziario sulle Malattie delle Piante* **55 (N.S. 34),** 99.

**Graniti, A., Martelli, G.P., and Frazier, N.W.** (1970). Legno riccio. In *Virus Diseases of Small Fruits and Grapevines (A Handbook)*. (Berkeley, California, USA.: Division of Agricultural Sciences, University of California), pp. 243.

**Grasswitz, T.R., and James, D.G.** (2008). Movement of grape mealybug, *Pseudococcus maritimus*, on and between host plants. *Entomol. Exp. Appl.* **129,** 268 - 275.

**Gray, S., and Gildow, F.E.** (2003). Luteovirus-Aphid Intercations. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41,** 539-566.

**Greathead, D.J.** (1975). Dispersal of the sugar-cane scale Aulacaspis tegalensis (Zhnt) (Hem. Diapsididae) by air currents. *Bull. entomol. Res.* **61,** 547-558.

**Greathead, D.J.** (1997). Crawler behaviour and dispersal. In *World Crop Pests. Soft Scale Insects - Their Biology, Natural Enemies and Control*, Y. Ben-Dov and C.J. Hodgson, eds (Amsterdam & New York: Elsevier), pp. 339-342.

**Greif, C., Cloquemin, G., Blaszcyk, G., Gillet, J., Perrot-Minnot, M.J., Grenan, S., and Walter, B.** (1997a). Enquête épidémiologique sur la maladie de l'enroulement de la vigne en France. In 6e Rencontres de virologie végétale, Aussois, pp. 15. 9-13 mars 1997.

**Greif, C., Cloquemin, G., Blaszczyk, G., Gillet, J., Perrot-Minnot, M., Grenan, S., and Walter, B.** (1997b). Epidemiological survey of the grapevine leafroll disease in french wine growing regions. In 12th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Lisbon, Portugal), pp. 119-120. 29 September-2 October 1997.

**Greif, C., Garau, R., Boscia, D., Prota, V.A., Fiori, M., Bass, P., Walter, B., and Prota, U.** (1995). The relationship of grapevine leafroll-associated closterovirus 2 with a graft incompatibility condition of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* **34,** 167-173.

**Grenan, S., and Boidron, R.** (2001). Amélioration de la qualité sanitaire des bois et plants de vigne vis à vis de l'enroulement: epidemiologie appliquée à la sélection sanitaire. (ENTAV), pp. 13. Contrat de branche 1998-2001.

**Gribaudo, I., Bondaz, J., Cuozzo, D., and Gambino, G.** (2003). Elimination of grapevine leafroll-associated virus 3 from the wine grapevine Müller-Thurgau (Vitis vinifera L.) through somatic embryogenesis. In 14th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Locorotondo (Bari), Italy), pp. 240-241.

**Gribaudo, I., Gambino, G., Cuozzo, D., and Mannini, F.** (2006). Attempts to eliminate *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* from grapevine clones. *Journal of Plant Pathology* **88,** 293-298.

**Gribaudo, I., Gambino, G., Bertin, S., Bosco, D., Cotroneo, A., and Mannini, F.** (2009). Monitoring the spread of viruses after vineyard replanting with heat-treated clones of Vitis vinifera 'Nebbiolo'. *J. Plant Pathol.* **91,** 741-744.

**Gruwell, M.E., Hardy, N.B., Gullan, P., and Dittmar, K.** (2010). Evolutionary Relationships among Primary Endosymbionts of the Mealybug Subfamily Phenacoccinae (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae). *Applied and Environmental Microbiology* **76,** 7521-7525.

**Gugerli, P., Brugger, J.J., and Bovey, R.** (1984). L'enroulement de la vigne: mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immuno-enzymatique pour le diagnostic rapide. *Rev. suisse vitic. arboric. hortic.* **16,** 229-304.

**Gugerli, P., Brugger, J.J., and Basler, P.** (1990a). Symptômes de la vignes, virus, carences. *Rev. suisse vitic. arboric. hortic.* **22,** 33-48.

**Gugerli, P., Rosciglione, B., Brugger, J.J., Bonnard, S., Ramel, M.E., and Tremea, F.** (1990b). Further characterization of grapevine leafroll disease. In 10th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Volos, Greece), pp. 59-60.

**Guidoni, S., Mannini, F., Ferrandino, A., Argamante, N., and Di Stefano, R.** (1997a). The effect of grapevine leafroll and rugose wood sanitation on agronomic performance and berry and leaf phenolic conent of Nebbiolo clone (*Vitis vinifera* L.). *American Journal of Enology and Viticulture* **48,** 438.

**Guidoni, S., Mannini, F., Ferrandino, A., Argamante, N., and Di Stefano, R.** (1997b). Effect of virus status on leaf and berry phenolic compounds in two wine grapevine *Vitis vinifera* cultivars. In 5th International Symposium on Grapevine Physiology, B. BA, ed (Jerusalem, Israel), pp. 445-452.

**Gullan, P., Downie, D.A., and Steffan, S.A.** (2003). A new pest species of the mealybug genus *Ferrisia* Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae) from the United States. *Annals of the Entomological Society of America* **96,** 723-737.

**Gullan, P., Kaydan, B.M., and Hardy, N.B.** (2010). Molecular phylogeny and species recognition in the mealybug genus *Ferrisia* Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae). *Systematic Entomology* **35,** 329-339.

**Guta, I.C., Buciumeanu, E.-C., Gheorghe, R.N., and Teodorescu, A.** (2010). Solutions to eliminate grapevine leafroll associated virus serotype 1+3 from V. vinifera L. cv. Ranâi Magaraci. *Romanian Biotechnological Letters* **15,** 72-78.

## -H-

**Habib, A.** (1957). The morphology and biometry of Eulecanium corni group and its relation to host plants. *Bull. Soc. Entomol. Egypte* **41,** 381-410.

**Habili, N., and Nutter, F.W.** (1997). Temporal and spatial analysis of grapevine leafroll-associated virus 3 in Pinot Noir grapevines in Australia. *Plant Dis.* **81,** 625-628.

**Habili, N., Randles, I.J.W., and Rowhani, A.** (2003). Evidence for the apparent spread of grapevine virus and grapevine leafroll associated virus 9 in research vineyard in Australia. In 14th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Locorotondo), pp. 213. 12-17 September 2003.

**Hardy, N.B., Gullan, P.J., and Hodgson, C.J.** (2008). A subfamily-level classification of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) based on integrated molecular and morphological data. *Systematic Entomology* **33,** 51-71.

**Hébrard, E., Froissart, R., Louis, C., and Blanc, S.** (1999). Les modes de transmission des pathogènes par vecteurs. *Virologie* **3,** 35-48.

**Hewitt, W.B.** (1954). Some virus and virus-like diseases of grapevines. *California Department of Agriculture Bulletin* **43,** 47-64.

**Hodgson, C.J.** (1994). The Scale Insects Family Coccidae: an identification Manual to genera (CAB international, Wallingford).

**Hoeffert, L.L., and Gifford, E.M., Jr.** (1967). Grapevine leafroll virus - History and anatomical effects. *Hilgardia* **38,** 403-426.

**Hoffmann, C.** (2002a). In Reben auftretende Schildlaüse. *Der badische Winzer* **Sept.,** 21-23.

**Hoffmann, C.** (2002b). Schildlaüse im Weinbau und ihre Antagonisten.Thesis, Univ. Karlsruhe, pp 164.

**Hofmann, E.L.** (1984). Untersuchungen über die Blattrollkrankheit und die Frührotverfärbung bei Klonen der Sorte "Blauer Spätburgunder" (Research on grapevine leafroll and on the early reddening of clones of Pinot noir). *Die Wein-Wissenschaft* **39,** 16-29.

**Hogenhout, S.A., Ammar, E.-D., Whitfield, A.E., and Redinbaugh, M.G.** (2008). Infect vector interactions with persistently transmitted virus. *Ann. Rev. Phytopathol.* **46,** 327-359.

**Hommay, G., Komar, V., Lemaire, O., and Herrbach, E.** (2008). *Grapevine virus* A transmission by larvae of *Parthenolecanium corni*. *Eur. J. Plant Pathol.* **121,** 185-188.

**Hosking, J.R., Sullivan, P.R., and Welsby, S.M.** (1994). Biological control of *Opuntia stricta* (Haw.) Haw. var. *stricta* using *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) in an area of New South Wales, Australia, where *Cactoblastis cactorum* (Berg) is not a successful biological control agent. *Agriculture, Ecosystems, and Environnement* **48,** 214-245.

**Hu, J.S., Gonsalves, D., and Teliz, D.** (1990). Characterization of closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease. *Journal of Phytopathology* **128,** 1-14.

## -I-

**Ioannou, N.** (1993). Occurence and natural spread of grapevine leafroll-associated closteroviruses in Cyprus. In 11th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Montreux, Switzerland), pp. 111-112.

## -J-

**Jahn, G.C., Beardsley, J.W., and Gonzales-Hernandez, H.** (2003). A review of the association of ants with mealybug wilt disease of pineapple. *Proc. Hawaiian Entomol. Soc.* **36,** 9-28.

**Jarugula, S.** (2010). Genetic diversity and molecular biology of grapevine leafroll-associated viruses.Thesis, Washington state university, pp 159.

**Jarugula, S., Gowda, S., Dawson, W.O., and Naidu, R.A.** (2010a). 3'-coterminal subgenomic RNAs and putative cis-acting elements of Grapevine leafroll-associated virus 3 reveals 'unique' features of gene expression strategy in the genus Ampelovirus. *Virology journal* **7,** 1-14.

**Jarugula, S., Alabi, O.J., Martin, R.R., and Rayapati, N.A.** (2010b). Genetic variabillity of natural populations of *Grapevine leafroll-associated 2* in Pacific Northwest vineyards. *Phytopathology* **100,** 698-707.

**Jeger, M., Chen, Z., Cunningham, E., Martin, G., and Powell, G.** (2012). Population biology and epidemiology of plant virus epidemics: from tripartite to tritrophic interactions. *European Journal of Plant Pathology* **133,** 3-23.

**Jeger, M.J., van den BOSCH, F., Madden, L.V., and Holt, J.** (1998). A model for analysing plant-virus transmission characteristics and epidemic development. *Mathematical Medicine and Biology* **15,** 1-18.

**Jeger, M.J., Holt, J., Van Den Bosch, F., and Madden, L.V.** (2004). Epidemiology of insect-transmitted plant viruses: modelling disease dynamics and control interventions. *Physiological Entomology* **29,** 291-304.

**Jelkmann, W., Mikona, C., Turturo, C., Navarro, B., Rott, M., Menzel, W., Saldarelli, P., Minafra, A., and Martelli, G.** (2012). Molecular characterization and taxonomy of grapevine leafroll-associated virus 7. *Arch. Virol.* **157,** 359-362.

**Jooste, A., and Goszczynski, D.** (2006). Differenciation between two distinct molecular variants of GLRaV-3. In 15th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Stellenboch, South Africa), pp. 32-33.

**Jooste, A., Maree, H., Bellstedt, D., Goszczynski, D., Pietersen, G., and Burger, J.** (2010). Three genetic grapevine leafroll-associated virus 3 variants identified from South African vineyards show high variability in their 5'UTR. *Arch. Virol.* **155,** 1997-2006.

**Jooste, A.E.C., and Goszczynski, D.E.** (2005). Single-strand conformation polymorphism (SSCP), cloning and sequencing reveals two major groups of divergent molecular variants of grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3). *Vitis* **44,** 39-43.

**Jooste, A.E.C., Pietersen, G., and Burger, J.T.** (2011). Distribution of grapevine leafroll associated virus-3 variants in South African vineyards. *Eur. J. Plant Pathol.* **131,** 371-381.

**Jordan, D.** (1993). Leafroll spread in New-Zealand vineyards. *Aust. N.Z. Wine Ind. J.* **8,** 322-324.

## -K-

**Karasev, A.V.** (2000). Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38,** 293-324.

**Karthikeyan, G., Alabi, O.J., and Naidu, R.A.** (2011 ). Occurence of grapevine leafroll-associated virus 1 in two ornamental grapevine culvivars in Washington State. *Plant Dis.* **95,** 613.

**King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E., and Lefkowitz, E.J.** (2009). Ninth report of the International Commitee on Taxonomy of Viruses (London: Academic press, Elesvier).

**Klaassen, V.A., Sim, S.T., Dangl, G.S., Osman, F., Al Rwahnih, M., Rowhani, A., and Golino, D.A.** (2011). *Vitis californica* and *Vitis california x Vitis vinifera* Hybrids are Hosts for *Grapevine leafroll-associated virus-2* and *-3* and *GVA* and *GVB*. *Plant Dis.* **96,** 657-665.

**Komar, V., Vigne, E., Demangeat, G., Lemaire, O., and Fuchs, M.** (2010). Comparative Performance of Virus-Infected Vitis vinifera cv. Savagnin rose Grafted onto Three Rootstocks. *Am. J. Enol. Viticult.* **61,** 68-73.

**Kominek, P., Glasa, M., and Bryxiova, M.C.** (2005). Analysis of the molecular variability of *Grapevine leafroll-associated virus 1* reveals the presence of two distinct virus groups and their mixed occurrence in grapevines. *Virus Genes* **31,** 247-255

**Kondo, T., Gullan, P., and Williams, D.J.** (2008). Coccidology. The study of scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* **9,** 55-61.

**Kosztarab, M., and Kozar, F.** (1988). Scale insect of central Europe (Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 454.

**Kovacs, L., Hanami, H., Fortenberry, M., and Kaps, M.** (2001). Latent infection by leafroll agent GLRaV-3 is linked ot lower fruit quality in French-American hybrid grapevines Vidal blanc and St. Vincent. *Am. J. Enol. Viticult.* **52,** 254-259.

**Krake, L.R.** (1993). Characterization of grapevine leafroll disease by symptomatology. *The Australian & New Zealand Wine Industry Journal* **8,** 40-44.

**Kummert, J., and Lepoivre, P.** (2003). Les virus et viroïdes phytopathogènes. In *Phytopathologie*, P. Lepoivre, ed (Bruxelles: De Boeck Université), pp. 41-78.

**Kunkel, H.** (1997). Scale insect honeydew as forage for honey production. In *Soft scale insects. Their biology, natural enemies, and control.*, Y. Ben-Dov and C.J. Hodgson, eds (Amsterdam & New York), pp. 291-302.

**Kuntzmann, P.** (2003). Les antagonistes naturels des cochenilles Parthenolecanium corni (Bouche) et Phenacoccus aceris (Signoret). (ITV Colmar), pp. 25.

**Kuntzmann, P.** (2005). Les antagonistes naturels des cochenilles Parthenolecanium corni (Bouche) et Phenacoccus aceris (Signoret). (ITV Colmar), pp. 7.

## -L-

**Lazar, J., and Bisztray, G.D.** (2011). Virus and virus-like diseases of grapevine in Hungary. *Journal of Horticultural Science* **17,** 25-36.

**Le Maguet, J., Herrbach, E., and Lemaire, O.** (2010a). L'enroulement viral de la vigne et la cochenille *Phenacoccus aceris*. *Phytoma. La Défense des Végétaux* **636,** 46-50.

**Le Maguet, J., Fuchs, J.-J., and Lemaire, O.** (2012a). Monitoring of grapevine scale insects in leafroll-infected vineyards of northeastern France. *Bulletin of Entomological Research* **Submitted in February**.

**Le Maguet, J., Beuve, M., Herrbach, E., and Lemaire, O.** (2012b). Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris* Signoret. *Phytopathology* **102,** 717-723.

**Le Maguet, J., Herrbach, E., Hommay, G., Beuve, M., and Lemaire, O.** (2010b). The apple mealybug, *Phenacoccus aceris* is a vector of several grapevine-infecting viruses. In XII International Symposium of Scale insect Studies (Chania, Crete, Greece), pp. 18.

**Le Maguet, J., Herrbach, E., Hommay, G., Beuve, M., Boudon-Padieu, E., and Lemaire, O.** (2009). Monitoring of Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1) dispersion by the mealybug *Phenacoccus aceris*. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 283-284. 31 Aug- 4 Sept.

**Lee, J., and Martin, R.R.** (2009). Influence of grapevine leafroll associated viruses (*GLRaV-2* and *-3*) on the fruit composition of Oregon Vitis vinifera L. cv. Pinot noir: Phenolics. *Food Chemistry* **112,** 889-896.

**Lee, J., and Martin, R.R.** (2010). Analysis of grape polyamines from Grapevine leafroll associated viruses (GLRaV-2 and -3) infected vines. *Food Chemistry* **122,** 1222-1225.

**Legin, R.** (1984). Transmission naturelle de l'enroulement (Colmar: INRA, Station de Pathologie), pp. 2.

**Lider, L.A., Goheen, A.C., and Ferrari, N.L.** (1975). A comparison between healthy and leafroll-affected grapevine planting stocks. *Am. J. Enol. Vitcul.* **26,** 144-147.

**Lima, M.F., Alkowni, R., Uyemoto, J.K., Golino, D., Osman, F., and Rowhani, A.** (2006). Molecular analysis of a California strain of *Rupestris stem pitting associated virus* isolated from declining Syrah grapevines. *Archives of Virology* **151,** 1889-1894.

**Ling, K.S., Zhu, H.Y., and Gonsalves, D.** (2004). Complete nucleotide sequence and genome organization of Grapevine leafroll-associated virus 3, type member of the genus *Ampelovirus*. *J. Gen. Virol.* **85,** 2099-2102.

**Ling, K.S., Zhu, H.Y., Drong, R.F., Slightom, J.L., McFerson, J.R., and Gonsalves, D.** (1998). Nucleotide sequence of the 3'-terminal two-thirds of the grapevine leafroll-associated virus-3 genome reveals a typical monopartite closterovirus. *J. Gen. Virol.* **79,** 1299-1307.

**Little, A., and Rezaian, M.A.** (2006). Improved detection of grapevine leafroll-associated virus 1 by magnetic capture hybridisation RT-PCR on a conserved region of viral RNA. *Arch. Virol.* **151,** 753-761.

**Little, A., Fazeli, C.F., and Rezaian, M.A.** (2001). Hypervariable genes in Grapevine leafroll associated virus 1. *Virus Res.* **80,** 109-116.

**Liu, Y.-P., Peremyslov, V.V., Medina, V., and Dolja, V.V.** (2009). Tandem leader proteases of Grapevine leafroll-associated virus-2: Host-specific functions in the infection cycle. *Virology* **383,** 291-299.

**Lo, P.L., Bell, V.A., and Walker, J.T.S.** (2009). Maximising the effectiveness of insecticides to control mealybugs in vineyards. *N.Z. Plant protection* **62,** 296-301.

**Lo, P.L., Bell, V.A., Walker, J.T.S., Cole, L.C., Rogers, D.J., and Charles, J.G.** (2006). Ecology and Management of Mealybugs in Vineyards. In HortResearch Client Report No. 19636 (The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand, Aukland, New Zealand.).

**Longo, S., Marotta, S., Russo, S., and Tranfaglia, A.** (1989). Contribution to knowledge of the coccids (Homoptera, Coccoidea) from Sicily with the description of a new species. *Entomologica* **24,** 163-179.

## -M-

**Madden, L.V.** (2006). Botanical epidemiology: some key advances and its continuing role in disease management. *Eur. J. Plant Pathol.* **115,** 3-23.

**Madden, L.V., Hughes, G., and Van Den Bosch, F.** (2007). The study of plant disease epidemics (St Paul, USA.: APS Press).

**Magalhaes, N., Oliveira, A., Carvalho, J.B., Toscano, E., Correia, M.J., Pereira, A.M., Carneiro, L.C., Martins, A., Sequeira, O.A.d., Sequeira, J.C., and Santos, M.T.** (1997). Evolution of leafroll (GLRaV-3) effect on grapevine yield and potential ethanol. In Extended abstracts 12th Meeting ICVG, Lisbon, Portugal, 29 September-2 October 1997 (Oeiras, Portugal), pp. 175-176.

**Mahfoudhi, N., Digiaro, M., and Dhouibi, M.H.** (2008). Incidence and distribution of grapevine leafroll-associated viruses in Tunisian vineyards. *J. Phytopathol.* **156,** 556-558.

**Mahfoudhi, N., Digiaro, M., and Dhouibi, M.H.** (2009). Transmission of grapevine leafroll viruses by *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) and *Ceroplastes rusci* (Hemiptera: Coccidae). *Plant Dis.* **93,** 999-1002.

**Malausa, T., Fenis, A., Warot, S., Germain, J.-F., Ris, N., Prado, E., Botton, M., Vanlerberghe-Masutti, F., Sforza, R., Cruaud, C., Coulou, A., and Kreiter, P.** (2011). DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). *J. Appl. Entomol.* **135,** 132-145.

**Maliogka, V.I., Dovas, C.I., and Katis, N.I.** (2008). Evolutionary relationships of virus species belonging to a distinct lineage within the *Ampelovirus* genus. *Virus Res.* **135,** 125–135.

**Maliogka, V.I., Skiada, F.G., Eleftheriou, E.P., and Katis, N.I.** (2009a). Elimination of a new ampelovirus (GLRaV-Pr) and Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV) from two Vitis vinifera cultivars combining in vitro thermotherapy with shoot tip culture. *Scientia Horticulturae* **123,** 280-282.

**Maliogka, V.I., Dovas, C.I., Lotos, L., Efthimiou, K., and Katis, N.I.** (2009b). Complete genome analysis and immunodetection of a member of a novel virus species belonging to the genus *Ampelovirus*. *Arch. Virol.* **154,** 209-218.

**Mannini, F., Argamante, N., and Credi, R.** (1996). Improvements in the quality of grapevine "Nebbiolo" clones obtained by sanitation. *Acta Horticulturae* **(427),** 319.

**Mannini, F., Argamante, N., and Credi, R.** (1999). Contribution of virus infections to clonal variability of some Vitis vinifera L. cultivars. *Bulletin de l'OIV* **72,** 817-818.

**Mannini, F., Mollo, A., and Credi, R.** (2012). Field performance and wine quality modification in a clone of *Vitis vinifera* cv. Dolcetto after GLRaV-3 elimination. *Am. J. Enol. Vitcul.* **63,** 144-147.

**Mannini, F., Mollo, A., Cuozzo, D., and Credi, R.** (2009). Field performances and wine quality modification in a clone of Dolcetto (*Vitis vinifera* L.) after GLRaV-3 elimination. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 234-236.

**Mannini, F., Guidoni, S., Ferrandino, A., Argamante, N., Credi, R., Sequeira, O.A.d., Sequeira, J.C., and Santos, M.T.** (1997a). Photosynthesis and grape composition of a Vitis vinifera clone after virus sanitation. In Extended abstracts 12th Meeting ICVG, Lisbon, Portugal, 29 September-2 October 1997 (Oeiras, Portugal), pp. 155.

**Mannini, F., Guidoni, S., Ferrandino, A., Argamante, N., Credi, R., Sequeira, O.A.d., Sequeira, J.C., and Santos, M.T.** (1997b). Photosynthesis and grape composition of a Vitis vinifera clone after virus sanitation. In *Extended abstracts 12th Meeting ICVG, Lisbon, Portugal, 29 September-2 October 1997* (Oeiras, Portugal: Dept.Plant Pathology, Estação Agronomica Nacional), pp. 155.

**Maree, H., Freeborough, M., and Burger, J.** (2008). Complete nucleotide sequence of a South African isolate of *grapevine leafroll-associated virus 3* reveals a 5'UTR of 737 nucleotides. *Arch. Virol.* **153,** 755-757.

**Marotta, S.** (1997). Biology: general life history In *Soft scale insects. Their biology, natural enemies, and control.*, Y. Ben-Dov and C.J. Hodgson, eds (Amsterdam & New York), pp. 251-256.

**Marotta, S., and Tranfaglia, A.** (1997). Seasonal history; diapause. In *Soft scale insects. Their biology, natural enemies, and control.*, Y. Ben-Dov and C.J. Hodgson, eds (Amsterdam & New York), pp. 343-350.

**Martelli, G.P.** (1992). Classification and nomenclature of plant viruses: State of the art. *Plant Dis.* **76,** 436-442.

**Martelli, G.P.** (1993). Rugose wood complex. In *Graft-transmissible diseases of grapevine*, FAO, ed, pp. 45-54.

**Martelli, G.P.** (2010). Virus Diseases of Grapevine. In *Encyclopedia of Life Sciences* (Chichester: John Wiley & Sons).

**Martelli, G.P., and Boudon-Padieu, E.** (2006). Directory of infectious diseases of grapevine and viroses and virus-like diseases of the grapevine. In *Bibliographic report 1998-2004* (Options méditerranéennes, Série B: Studies and Research, CIEHAM-IAMB), pp. 59-75.

**Martelli, G.P., and Candresse, T.** (2010). Closteroviridae. In *Encyclopedia of Life Sciences* (Chichester: John Wiley & Sons).

**Martelli, G.P., Candresse, T., and Namba, S.** (1994a). *Trichovirus*, a new genus of plant viruses. *Arch. Virol.* **134,** 451-455.

**Martelli, G.P., Michael, J.A., Kreuze, J.F., and Dolja, V.V.** (2007). Family *Flexiviridae*: A Case Study in Virion and Genome Plasticity. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45,** 73-100.

**Martelli, G.P., Boscia, D., Choueri, E., Digiaro, M., Castellano, M.A., and Savino, V.** (1994b). Occurence of filamentous viruses and rugose wood of grapevine in Yemen. *Phytopath. medit* **33,** 146-151.

**Martelli, G.P., Saldarelli, P., Minafra, A., Sequeira, O.A.d., Sequeira, J.C., and Santos, M.T.** (1997). A critical appraisal of the taxonomic position of grapevine virus A, B, and D, and their assignement to a new genus. In *Extended abstracts 12th Meeting ICVG, Lisbon, Portugal, 29 September-2 October 1997* (Oeiras, Portugal), pp. 23.

**Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., Dolja, V.V., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H.J., Wisler, G.C., and Yoshikawa, N.** (2002). The family Closteroviridae revised. *Arch. Virol.* **147,** 2039-2044.

**Martelli, G.P., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Agranovsky, A.A., Al Rwahnih, M., Dolja, V.V., Fuchs, M., Gugerli, P., Jelkmann, W., Katis, N., Maliogka, V.I., Melzer, M., Menzel, W., Rott, M.E., Rowhani, A., Sabanadzovic, S., and Saldarelli, P.** (2012). Taxonomic revision the family *Closteroviridae* with special referecnce to the grapevine leafroll-associated members of the genus *Ampelovirus* and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology* **94,** 7-19.

**Martins, A., Carneiro, L.C., Pereira, A.M., Eiras-Dias, J., Magalhaes, N., Ramadas, I., Antunes, A., Madeira, D., Teixeira, K., and Banza, J.** (1997). Effect of leafroll-associated GLRaV-3 on yield of grapevines: new results, new perspectives. In Extended abstracts 12th Meeting ICVG, Lisbon, Portugal, 29 September-2 October 1997 (Oeiras, Portugal), pp. 177-178.

**Masri, S., Rast, H., Johnson, R., and Monette, P.** (2006). *Grapevine virus C* and *grapevine leaf roll associated virus 2* are serologically related and appear to be the same virus. *Vitis* **45,** 93-96.

**Meng, B., Rebelo, A.R., and Fisher, H.** (2006). Genetic diversity analyses of grapevine Rupestris stem pitting-associated virus reveal distinct population structures in scion versus rootstock varieties *Journal of General Virology* **87,** 1725-1733.

**Meng, B., Li, C., Goszczynski, D.E., and Gonsalves, D.** (2005a). Genome Sequences and Structures of Two Biologically Distinct Strains of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and Sequence Analysis. *Virus Genes* **31,** 31-41.

**Meng, B., Pang, S.-Z., Forsline, P.L., McFerson, J.R., and Gonsalves, D.** (1998). Nucleotide sequence and genome structure of grapevine rupestris stem pitting associated virus-1 reveal similarities to apple stem pitting virus. *Journal of General Virology* **79,** 2059-2069.

**Meng, B., Johnson, R., Peressini, S., Forsline, P.L., and Gonsalves, D.** (1999). Rupestris stem pitting associated virus-1 is consistently detected in grapevines that are infected with rupestris stem pitting. *Eur. J. of Plant Pathol.* **105,** 191-199.

**Meng, B., Li, C., Wang, G.P., Goszczynski, D., and Gonsalves, D.** (2005b). Complete genome sequences of two new variants of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus and comparative analyses. *Journal of General Virology* **86,** 1555-1560.

**Mgocheki, N., and Addison, P.** (2010). Spatial distribution of ants (Hymenoptera: Formicidae), vine mealybugs and mealybug parasitoids in vineyards. *J. Appl. Entomol.* **134,** 285-295.

**Mibey, R.K.** (1997). Sooty Mould. In *Soft scale insects. Their biology, natural enemies, and control.*, Y. Ben-Dov and C.J. Hodgson, eds (Amsterdam & New York), pp. 275-290.

**Mikona, C., and Jelkmann, W.** (2010). Replication of *Grapevine leafroll-associated virus-7* (GLRaV-7) by *Cuscuta* species and Its transmission to herbaceous plants. *Plant Dis.* **94,** 471-476.

**Milne, R.G., Conti, B., Lesemann, D.E., Stellmach, G., Tanne, E., and Cohen, J.** (1984). Closterovirus-like particles of two types associated with diseased grapvines. *Phytopathologische Zeitschrift* **110,** 360-368.

**Minafra, A., Saldarelli, P., and Martelli, G.P.** (1997). Grapevine virus A : nucleotide sequence, genome organization, and relationship in the Trichovirus genus. *Arch. Virol.* **142,** 417-423.

**Minafra, A., Saldarelli, P., Grieco, F., and Martelli, G.P.** (1994). Nucleotide sequence of the 3′ terminal region of the RNA of two filamentous grapevine viruses. *Arch. Virol.* **137,** 249-261.

**Monette, P., and Godkin, S.E.** (1995). Detection of capillovirus-like particles in a grapevine affected with rugose wood. *Vitis* **34,** 241-242.

**Monette, P., Godkin, S.E., and James, D.** (1990). Mechanical sap transmission of a closteroviruses from *in vitro* shoot tip cultures of a leafroll-affected grapevine to *Nicotiana benthamiana*. *Vitis* **29,** 49-55.

**Monette, P.L., and Godkin, S.E.** (1993). Mechanical transmission of closterovirus-like particles from a corky bark-affected grapevine to an herbaceous species. *Plant Pathology* **1,** 7-12.

**Monis, J.** (2000). Development of monoclonal antibodies reactive to a new grapevine leafroll-associated closterovirus. *Plant Dis.* **84,** 858-862.

**Morelli, M., Minafra, A., Boscia, D., and Martelli, G.** (2011). Complete nucleotide sequence of a new variant of grapevine rupestris stem pitting-associated virus from southern Italy. *Arch. Virol.* **156,** 543-546.

**Moskovitz, Y., Goszczynski, D., Bir, L., Fingstein, A., Czosnek, H., and Mawassi, M.** (2008). Sequencing and assembly of a full-length infectious clone of grapevine virus B and its infectivity on herbaceous plants. *Arch. Virol.* **153,** 323-328.

**Moury, B., Desbiez, C., Jacquemond, M., and Lecoq, H.** (2006). Genetic diversity of plant virus populations: towards hypothesis testing in molcular epidemiology. *Advances in Virus Research* **67,** 49-86.

**Murolo, S., Romanazzi, G., Rowhani, A., Minafra, A., La Notte, P., Branzanti, M., and Savino, V.** (2008). Genetic variability and population structure of *Grapevine virus* A coat protein gene from naturally infected Italian vines. *Eur. J. Plant Pathol.* **120,** 137-145.

## -N-

**Nakano, M., Nakaune, R., and Komazaki, S.** (2003). Mealybug transmission of grapevine viruses in Japan. In 14th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Locorotondo (Bari), Italy), pp. 218.

**Nakaune, R., Toda, S., Mochizuki, M., and Nakano, M.** (2008). Identification and characterization of a new vitivirus from grapevine. *Arch. Virol.* **153,** 1827-1832.

**Namba, S., Yamashita, S., Doi, Y., Yora, K., Terai, Y., and Yano, R.** (1979). Grapevine leafroll virus, a possible member of Closteroviruses. *Annals of the Phytopatholocal Society of Japan* **45,** 497-502.

**Nassuth, A., E., P., Helmeczy, K., Stewart, S., and Kofalvi, S.A.** (2000). Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *Journal of Virological Methods* **133,** 130-136.

**Nault, L.R.** (1997). Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America* **90,** 522-541.

**Nault, L.R., and Ammar, E.-D.** (1989). Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. *Ann. Rev. Entomol.* **34,** 503-529.

**Nestel, D., Cohen, H., Saphir, N., Klein, M., and Mendel, Z.** (1995). Spatial distribution of scale insects: comparative study using Taylor's power law. *Environ. Entomol.* **506-512**.

**Ng, J.C.K., and Falk, B.W.** (2006). Virus-vector interations mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44,** 183-212.

## -O-

**Oliver, J.E., Vigne, E., and Fuchs, M.** (2010). Genetic structure and molecular variability of Grapevine fanleaf virus populations. *Virus Research* **152,** 30-40.

**Over De Linden, A.J., and Chamberlain, E.E.** (1970). Effect of grapevine leafroll virus on vine growth and on fruit yield and quality. *New Zealand J. Agric. Res*.**13,** 689-698.

## -P-

**Padilla, C.V., Cretazzo, E., Lopez, N., Garcia de Rosa, B., Padilla, V., and Velasco, L.** (2010). First report of *Grapevine leafroll-accosicated virus 4* (GLRaV-4) in Spain. *New Disease Reports* **21,** 21.

**Panattoni, A., D'Anna, F., C., C., and Triolo, E.** (2007). Grapevine vitivirus A eradication in Vitis vinifera explants by antiviral drugs and thermotherapy. *J. Virol. Methods* **146,** 129-135.

**Panis, A.** (1969). *Aphycus apicalis* (Dalman) et *Leptomastidea bifasciata* (Mayr) [Hym. Encyrtidae], parasites de *Phenacoccus aceris* (Signoret) [Hom. Pseudococcidae] dans les Alpes-Maritimes. *Entomophaga* **14,** 383-391.

**Panis, A.** (1984). Les cochenilles des vignobles atteints : inventaire. *Vititechnique* **75,** 22-24.

**Park, D.-S., Suh, S.-J., Oh, H.-W., and Hebert, P.D.N.** (2010a). Recovery of the mitochondrial COI barcode region in diverse Hexapoda through tRNA-based primers. *BMC Genomics* **11**.

**Park, D.-S., Suh, S.-J., Hebert, P.D.N., Oh, H.-W., and Hong, K.-J.** (2011). DNA barcodes for two scale insect families, mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) and armored scales (Hemiptera: Diaspididae). *Bull. entomol. Res.*, 1-6.

**Park, D.-S., Leem, Y.J., Hahn, K.-W., Suh, S.-J., Hong, K.-J., and Oh, H.-W.** (2010b). Molecular Identification of Mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) Found on Korean Pears. *J. Econ. Entomol.* **103,** 25-33.

**Passaro, L.C., and Webster, F.X.** (2004). Synthesis of the female sex pheromone of the citrus mealybug, *Planococcus citri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52,** 2896-2899.

**Pellizzari-Scaltritti, G., and Dalla Montà, L.** (1997). Gli insetti fitofagi introdotti in Italia dal 1945 al 1995. *Informatore fitopatologico* **10,** 4-12.

**Petruschke, M., Rissler, D., and Schneller, H.** (2011). Ahornschmierlaus *Phenaccocus aceris* als Uberträgger des *Little Cherry Virus-2* an Süsskirsche in Baden-Württemberg nachgewiesen. *Erwerbs-Obstbau* **53,** 11-13.

**Peyrard, N., Calonnec, A., Bonnot, F., and Chadoeuf, J.** (2005). Explorer un jeu de données sur grille par tests de permutation. *Revue de Statistique Appliquée* **53,** 59-78.

**Peyrard, N., Pellegrin, F., Chadoeuf, J., and Nandris, D.** (2006). Statistical analysis of the spatio-temporal dynamics of rubber tree (Hevea brasiliensis) trunk phloem necrosis: no evidence of pathogen transmission. *For. Path.* **36,** 360-371.

**Phillips, J.H.H.** (1962). Description of the immature stages of *Pulvinaria vitis* (L.) and *P. innumerabilis* Rathvon (Homoptera Coccoidea), with notes on the habits of these species in Ontario, Canada. *Can. Ent.* **94,** 497-502.

**Phillips, J.H.H.** (1963). Life history of *Pulvinaria vitis* (L.) (Hemiptera Coccoidea), the cottony scale attacking peach in Ontario. *Can. Ent.* **95,** 372-407.

**Pietersen, G.** (2006). Spatio-temporal distribution dynamics of grapevine leafroll disease in western cape vineyards. In 15th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Stellenboch, South Africa), pp. 126.

**Pietersen, G., Spreeth, N., Oosthuizen, T., Van Rensurg, A., D., L., Tooth, D., and Rossouw, N.** (2009). A case study of control of grapevine leafroll disease spread on Vergelegen Wine Estate, South Africa, 2002-2008. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 230-231.

**Planchon.** (1884). Quelques mots sur l'Anthracnose déformante. *La Vigne Américaine***,** 201-208.

**Plantegenest, M., Le May, C., and Fabre, F.** (2007). Landscape epidemiology of plant diseases. *J. R. Soc. Interface* **4,** 963-972.

**Prosser, S.W., E., G.D., and Meng, B.** (2007). Molecular analysis of double-stranded RNAs reveals complex infection of grapevines with multiple viruses. *Virus Res.* **124,** 151-159.

## -Q-

**Qin, T.-K.** (1997). The pela wax scale and commercial was production. In *Soft scale insects. Their biology, natural enemies, and control.*, Y. Ben-Dov and C.J. Hodgson, eds (Amsterdam & New York), pp. 303-321.

## -R-

**Raine, J., McMullen, R.D., and Farbes, A.R.** (1986). Transmission of the agent causing little cherry disease by the apple mealybug *Phenacoccus aceris* and the dodder *Cuscuta lupuliformis*. *Can. J. Plant. Pathol.* **8,** 6-11.

**Rau, G.J.** (1942). The Canadian apple mealybug, *Phenacoccus aceris* Signoret and its allies in Northeastern America. *Can. Ent.* **74,** 118-125.

**Ravaz, L., and Verge, G.** (1924). Le rougeau de la vigne. *Progrès Agricole et Viticole* **79,** 11-17, 86-89, 110-113, 135-141.

**Réaumur, R.A.F.** (1738). Mémoires pour servir à l'histoire des insectes. *Tome IV: les galles, les mouches* 636 (Paris: Imprimerie Royale).

**Roivainen, O.** (1980). Mealybugs. In *Vectors of plant pathogens*, K. Harris & K. Maramorosch, ed (New-York, London, Toronto, Sydney, San-Francisco: Academic Press Inc.), pp. 15-38.

**Rosa, C., Jimenez, J.F., Margaria, P., and Rowhani, A.** (2011). Symptomatology and effects of viruses associated with rugose wood complex on growth of four different rootstocks. *Am. J. Enol. Viticult.* **62,** 207-213.

**Rosciglione, B., and Gugerli, P.** (1986). Maladies de l'enroulement et du bois strié de la vigne: analyse microscopique et sérologique. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* **18,** 207-211.

**Rosciglione, B., Castellano, M.A., Martelli, G.P., Savino, V., and Cannizzaro, G.** (1983). Mealybug transmission of grapevine virus A. *Vitis* **22,** 331-347.

**Rott, M.E., and Jelkmann, W.** (2001). Detection and partial characterization of a second closterovirus associated with Little Cherry Disease, Little cherry virus-2. *Phytopathology* **91,** 263-267.

**Rowhani, A., Zhang, J., Golino, D., and Uyemoto, J.K.** (2002). Isolation and characterization of a new closterovirus from grapevine. *Phytopathology* **92,** S71.

**Rung, A., Scheffer, S.J., Evans, G., and Miller, D.** (2008). Molecular identification of two closely related species of mealybugs of the genus Planococcus (Homoptera : Pseudococcidae) *Annals of the Entomological Society of America* **101,** 525-532.

## -S-

**Saccaggi, D.L., Krüger, K., and Pietersen, G.** (2008). A multiplex PCR assay for the simultaneous identification of three mealybugs species (Hemiptera: Pseudococcidae). *Bull. entomol. Res.* **98,** 27–33.

**Sache, Y.** (2003). L'épidémiologie. In *Phytopathologie*, P. Lepoivre, ed (Bruxelles: De Boeck Université), pp. 193-213.

**Saldarelli, P.** (2009). Flexiviruses: a grapevine point of view. In 16th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Dijon, France), pp. 324-326.

**Saldarelli, P., Castellano, M.A., and Harrison, B.D.** (2005). Two grapevine viruses in an ornamental species from scotland. *J. Plant Pathol.* **87,** 75-76.

**Saldarelli, P., Rowhani, A., Routh, G., Minafra, A., and Digiaro, M.** (1998). Use of degenerate primers in a RT-PCR assay for the identification and analysis of some filamentous viruses, with special reference to Clostero- and Vitiviruses of the grapevine. *Eur. J. Plant Pathol.* **104,** 945-950.

**Saldarelli, P., Cornuet, P., Vigne, E., Talas, F., Bronnenkant, I., Dridi, A.M., Andret-Link, P., Boscia, D., Gugerli, P., Fuchs, M., and Martelli, G.P.** (2006). Partial characterization of two divergent variants of *Grapevine leafroll-associated virus 4*. *J. Plant Pathol.* **88,** 203-214.

**Sampol, B., Bota, J., Riera, D., Medrano, H., and Flexas, J.** (2003). Analysis of the virus induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytologist* **160,** 403-412.

**Sannino, F.A.** (1906). Il rossore delle viti. *Riv. Pat. Veg.* **1,** 162-163.

**Schellenberger, P.** (2010). Caractérisation structurale et fonctionnelle de déterminants de la capside du *Grapevine fanleaf virus* impliqués dans la transmission par *Xiphinema index*.Thesis, Université de Strasbourg, pp 224.

**Scheu, G.** (1936). Mein Winzerbuch (Berlin: Reichnahrstands Verlag).

**Scheu, G.** (1950). Mein Winzerbuch 395 (Neustadt-Haardt: Verlag D. Meininger).

**Schmutterer, H.** (1952). Die Ökologie der Cocciden (Homoptera, Coccoidea) Frankens. *Zeit. für angew. Entomol.* **33,** 369-420.

**Seljak, G.** (2007). Scale insects introduced into Slovenia in the last fifty years. In XI International Symposium on Scale Insect Studies (Oeiras, Portugal), pp. 121-127.

**Sentenac, G.** (2008). Essai d'utilisation de la chrysope *Chrysoperla lucasina* agent comme agent de lutte biologique contre des cochenilles farineuses sur vigne. *Phytoma. La Défense des Végétaux* **621,** 25-29.

**Sentenac, G., and Kuntzmann, P.** (2003). Etude des cochenilles et des antagonistes qui leur sont associés dans des vignobles en Bourgogne et en Alsace de 2000 à 2002. *Bulletin OILB/SROP* **26,** 247-252.

**Sentenac, G., Kuntzmann, P., Perez, L., Gili, A., and Kreiter, P.** (2011). Biological control of Heliococcus bohemicus Sulc. (Hemiptera: Pseudococcidae) with the natural enemy Ericydnus sipylus (Walker) (Hymenoptera: Encyrtidae). *IOBC Bulletin* **67,** 31-40.

**Sforza, R.** (2000). Les cochenilles sur la vigne: bio-éthologie, impact agronomique, lutte et prophylaxie. In *Ravageurs de la vigne*, Féret, ed (Bordeaux), pp. 130-150.

**Sforza, R.** (2008a). Les cochenilles sur la vigne: bio-éthologie, impact agronomique, lutte et prophylaxie. In *Ravageurs de la vigne*, Féret, ed (Bordeaux), pp. 188-210.

**Sforza, R.** (2008b). Espèces invasives en viticulture. *Phytoma. La Défense des Végétaux* **619,** 24-29.

**Sforza, R., and Greif, C.** (2000a). Les cochenilles et l'enroulement viral de la vigne. Données de phytopathologie et d'éthologie. *Phytoma. La Défense des Végétaux* **532,** 46-50.

**Sforza, R., and Greif, C.** (2000b). Les cochenilles : attention danger. *Le Vigneron Champenois* **8,** 22-28.

**Sforza, R., Boudon-Padieu, E., and Greif, C.** (2003a). New mealybug species vectoring Grapevine leafroll associated viruses -1 and -3 (GLRaV-1 and -3). *Eur. J. Plant Pathol.* **109,** 975-981.

**Sforza, R., Delvare, G., Sentenac, G., Kuntzmann, P., and Lanthiome, D.** (2003b). Inventaire et évaluation des antagonistes de cochenilles sur la vigne. *Phytoma. La Défense des Végétaux* **558,** 42-46.

**Sim, S.T., Rowhani, A., Alkowni, R., and Golino, D.A.** (2003). Experimental transmission of *Grapevine leafroll-associated* viruses types 5 and 9 by longtailed mealybugs. In 14th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Locorotondo (Bari), Italy), pp. 211-212.

**Simón, B., Cenis, J.L., and De La Rúa, P.** (2007). Distribution patterns of the Q and B biotypes of Bemisia tabaci in the Mediterranean Basin based on microsatellite variation. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **124,** 327-336.

**Singh Brar, H., Singh, Z., Swinny, E., and Cameron, I.** (2008). Girdling and grapevine leafroll associated viruses affect berry weight, colour development and accumulation of anthocyanins in 'Crimson Seedless' grapes during maturation and ripening. *Plant Science* **175,** 885-897.

**Soule, M.J., Eastwell, K.C., and Naidu, R.A.** (2006). First report of Grapevine leafroll associated virus-3 in American Vitis spp. Grapevines in Washington State. *Plant Dis.* **90,** 1461.

**Spence, N.J.** (2001). Virus-vector interation in plant virus disease transmission and epidémiology. In *Biotic interactions in plant-pathogen associations*, M.J. Jeger and N.J. Spence, eds (New York: Oxford University Press), pp. 15-26.

**Stewart, L.R., Medina, V., Tian, T., Turina, M., Falk, B.W., and Ng, J.C.K.** (2010). A mutation in the Lettuce infectious yellows virus minor coat protein disrupts whitefly transmission but not in planta systemic movement. *J. Virol.*, **84** 12165-12713.

**Streito, J.-C., and Martinez, M.** (2005). Point sur les introductions d'insectes d'importance agronomique, de janvier 2000 à juin 2005. *Phytoma. La Défense des Végétaux* **558,** 42-46.

## -T-

**Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S.** (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24,** 1596-1599.

**Tanne, E., Ben-Dov, Y., and Raccah, B.** (1993). Mealybug transmission of corky bark disease and an associated virus to healthy grapevine. In 11th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Montreux, Switzerland), pp. 59-60. 6-9 September 1993.

**Tanne, E., Sela, I., Klein, M., and Harpaz, I.** (1977). Purification and characterization of a virus associated with the grapevine leafroll disease. *Phytopathology* **67,** 442-447.

**Tanne, E., Marcus, R., Dubitzky, E., and Raccah, B.** (1996). Analysis of progress and spatial pattern of corky bark in grapes. *Plant Dis.* **80,** 34-38.

**Teliz, D., Gonsalves, D., Hu, J., and Hummer, D.K.** (1989). Detection of grapevine leafroll-associated closterovirus in recently infected tissues in New York and spread of the disease in Mexico. In Proceedings of the 9th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine (ICVG), E. Tanne, ed (Kiryat Anavim, Israel), pp. 109-115.

**Thébaud, G., Peyrard, N., Dallot, S., Calonnec, A., and Labonne, G.** (2005). Investigating disease spread between two assessment date with permutation tests on a lattice. *Phytopathology* **95,** 1453-1461.

**Thompson, J.R., Fuchs, M., and Perry, K.L.** (2012). Genomic analysis of Grapevine leafroll associated virus-5 and related viruses. *Virus Res.* **163,** 19-27.

**Tian, T., Rubio, L., Yeh, H.H., Crawford, B., and Falk, B.W.** (1999). Lettuce infectious yellows virus : in vitro acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of General Virology* **80,** 1111-1117.

**Tremblay, E.** (1997). Endosymbionts. In *Soft scale insects. Their biology, natural enemies, and control.*, Y. Ben-Dov and C.J. Hodgson, eds (Amsterdam & New York), pp. 261-267.

**Tsai, C.W., Bosco, D., Daane, K.M., and Almeida, R.P.** (2011). Effect of host plant tissue on the vector transmission of grapevine leafroll-associated virus 3. *J. Econ. Entomol.* **104,** 1480-1485.

**Tsai, C.W., Rowhani, A., Golino, D.A., Daane, K., and Almeida, R.P.** (2010). Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: an analysis of virus-vector specificity. *Phytopathology* **100,** 830-834.

**Tsai, C.W., Chau, J., Fernandez, L., Bosco, D., Daane, K.M., and Almeida, R.P.P.** (2008). Transmission of *Grapevine leafroll-associated virus* 3 by the vine mealybug (*Planococcus ficus*). *Phytopathology* **98,** 1093-1098.

**Turturo, C., Saldarelli, P., Yafeng, D., Digiaro, M., Minafra, A., Savino, V., and Martelli, G.P.** (2005). Genetic variability and population structure of Grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. *Journal of General Virology.* **86,** 217-224.

## -V-

**Valero, M., Ibanez, A., and Morte, A.** (2003). Effects of high vineyard temperatures on the grapevine leafroll associated virus elimination from *Vitis vinifera* L. cv. Napoleon tissue cultures. *Scientia Horticulturae* **97,** 289- 296.

**Van der Plank, J.E.** (1963). Plant diseases : Epidemics and control (New York: Academic Press).

**Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E., Estes, M.K., S.M., L., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., and Wickner, R.B.** (2000). Virus taxonomy (London, UK).

**Viala, P.** (1885). L'anthracnose. *Ann. Ecol. Nat. Sup. Agric. Montpellier*, pp. 116-163.

**Vranjic, J.A.** (1997). Effects on Host Plant. In *Soft scale insects. Their biology, natural enemies, and control.*, Y. Ben-Dov and C.J. Hodgson, eds, pp. 452.

**Vuittenez, A.** (1958). Acquisitions récentes dans le domaine des viroses de la vigne. *Vignes et Vins* **73,** 11-17.

## -W-

**Walker, J.T.S., Charles, J.G., Froud, K.J., and Connolly, P.** (2004). Leafroll virus in vineyards: modelling the spread and economic impact (Hortresearch), pp. 19.

**Walter, B., and Legin, R.** (1986). Connaissances actuelles sur les viroses de l'enroulement de la vigne. *Le Vigneron Champenois* **107,** 436-446.

**Walter, B., and Zimmermann, D.** (1990). Further characterization of closterovirus-like particles associated with the grapevine leafroll disease. In 10th meeting of the International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine (Volos, Greece), pp. 62-66.

**Walter, B., and Martelli, G.P.** (1996). Clonal selection of the vine: sanitary and pomological selection. Influence of viroses on quality. Part one: Effects of viroses on the culture of the vine and its products. *Bulletin de l'OIV* **69,** 945-971.

**Wang, J., Sharma, A.M., Duffy, S., and Almeida, R.P.** (2011). Genetic diversity in the 3' Terminal 4.7-kb region of *Grapevine leafroll-associated virus 3*. *Phytopathology* **101,** 445-450.

**Williams, D.J., and Gullan, P.** (2010). Family-group names proposed in the family Pseudococcidae (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). *Zootaxa* **2400,** 66-68.

**Williams, M.L., and Hodges, G.S.** (1997). Taxonomic Characters - Nymphs. In *Soft scale insects. Their biology, natural enemies, and control.*, Y. Ben-Dov and C.J. Hodgson, eds (Amsterdam & New York), pp. 143-156.

**Wolpert, J.A., and Vilas, E.P.** (1992). Effect of mild leafroll disease on growth, yield and fruit maturity indices of Riesling and Zinfandel. *American Journal of Enology and Viticulture* **43,** 367-369.

**Woodham, R.C., Krake, L.R., and Cellier, K.** (1983). The effect of grapevine leafroll plus yellow speckle disease on annual growth, yield and quality of grapes from Cabernet Franc under two pruning systems. *Vitis* **22,** 324-330.

**Woodham, R.C., Antcliff, A.J., Krake, L.R., and Taylor, R.** (1984). Yield differences between Sultana clones related to virus status and genetic factors. *Vitis* **22,** 73-83.

**Wren, J.D., Roossinck, M.J., Nelson, R.S., Scheets, K., Palmer, M.W., and Melcher, U.** (2006). Plant Virus Biodiversity and Ecology. *PLoS Biol* **4,** e80.

## -Z-

**Zada, A., Dunkelblum, E., Assael, F., Harel, M., Cojocaru, M., and Mendel, Z.** (2003). Sex pheromone of the vine mealybug, *Planococcus ficus* in Israel: occurence of a second component in a mass reared population. *J. Chem. Ecol.* **29,** 977-988.

**Zhu, H.Y., Ling, K.S., Goszczynski, D.E., McFerson, J.R., and Gonsalves, D.** (1998). Nucleotide sequence and genome organization of grapevine leafroll-associated virus-2 are similar to beet yellows virus, the closterovirus type member. *J. Gen. Virol.* **79,** 1289-1298.

**Zimmermann, D.** (1990). La maladie de l'enroulement de la vigne: caractérisation de quatre particules virales de type closterovirus à l'aide d'anticoprs polylconaux et monoclonaux.Thesis, Université Louis Pasteur pp 155.

**Zimmermann, D., Bass, P., Legin, R., and Walter, B.** (1990). Characterization and serological detection of four closterovirus-like particles associated with leafroll disease on grapevine. *J. Phytopathol.* **130,** 205-218.

**Zorloni, A., Prati, S., Chiesa, S., and Bianco, P.** (2006a). Transmission of Grapevine leafroll-associated virus 3 by the soft scale insect *Neopulvinaria innumerabilis*. *J. Plant Pathol.* **88,** S61.

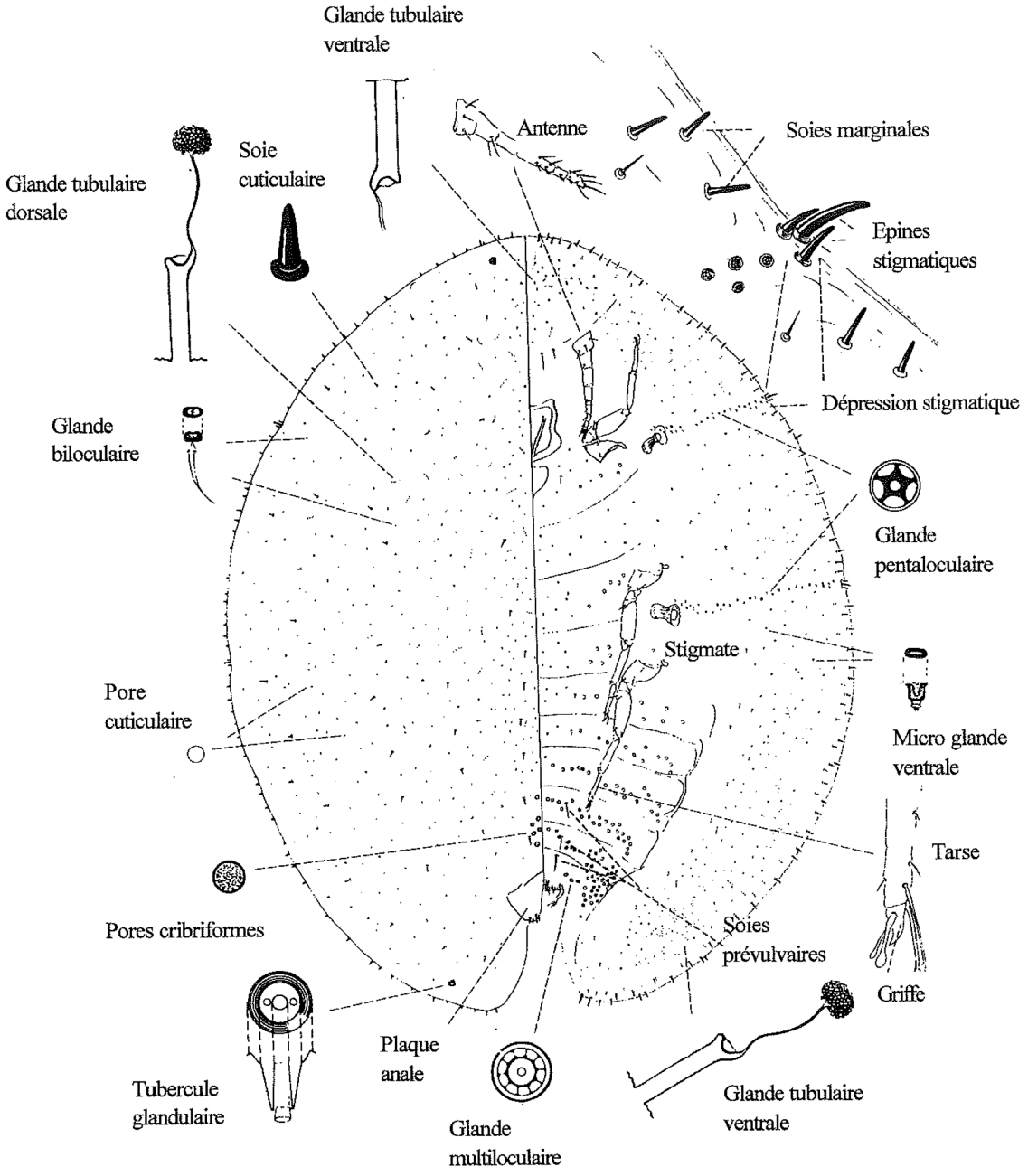
**Zorloni, A., Prati, S., Bianco, P., and Belli, G.** (2006b). Transmission of *Grapevine virus A* and *Grapevine leafroll-associated virus 3* by *Heliococcus bohemicus*. *J. Plant Pathol.* **88,** 325-328.

# Annexes

## ABREVIATIONS

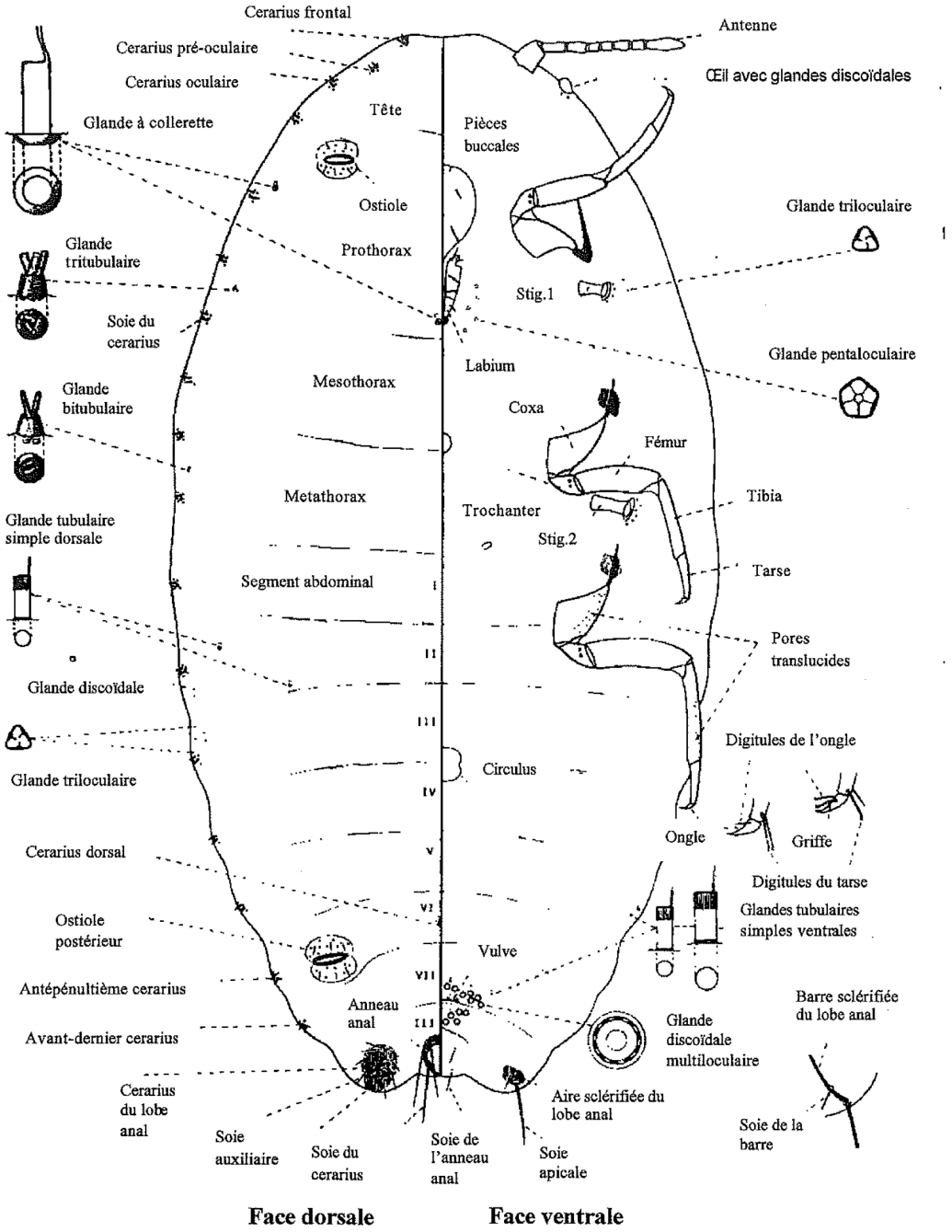
°C : degré Celsius
AAP : Acquisition access period
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
BET : Bromure d'éthidium
BIVB: Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne
CIVA : Comité Interprofessionnel des Vins d'Alsace
CIVC: Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne
CP : Capsid protein
DAS-ELISA : Double antibody sandwich-enzyme linked immuno sorbent assay
DO : Densité optique
GLRaV : *Grapevine leafroll-associated virus*
GV : *Grapevine virus* (*A, B, D* ou *E*)
h : heure
Ha : Hectare
HSP70h : Heat Shock Protein 70 homolog
IAP : Inoculation access period
ICTV : International commitee on taxonomy of viruses
ICVG : International Council for the study of Virus and virus diseases of Grapevine
IFV : Institut Français de la Vigne
iid : indépendantes et identiquement distribuées
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
kb : kilobase
kDa : Kilodalton
L1 : Larve de cochenille de premier stade
L2 : Larve de cochenille de deuxième stade
L3 : Larve de cochenille de troisième stade
mg : milligramme
mm : millimètre
nm : nanomètre
nt : nucléotide
ORF : Open reading frame
pb : paire de bases
PBS : Phosphate buffer saline
PVP : Polyvinylpolypyrrolidone
RT-PCR : Reverse transcription-polymerase chain reaction
Taq : *Thermophilus aquaticus*
UTR : UnTranslated Region
UV : Ultra violet
µg : microgramme

## ANNEXE 1. MORPHOLOGIE GENERALE D'UNE FEMELLE ADULTE DE *COCCIDAE*




Face dorsale / Face ventrale

# ANNEXE 2. MORPHOLOGIE GENERALE D'UNE FEMELLE ADULTE DE *PSEUDOCOCCIDAE*



## ANNEXE 3. PROTOCOLES DE DETECTION DE VIRUS

### PROTOCOLE DU DAS-ELISA

**1. Coating** (100 µl/puits)
- Diluer au 1/1000 les anticorps de coating (IgG) dans le tampon de coating.
- Introduire 100µl de la solution obtenue par puits.
- Incubation 3h à 37°C

*3 lavages avec le PBS*

**2. Dépôt échantillons** (100µl/puits)
- Broyer les échantillons dans du tampon de broyage pour vigne.
- Introduire 100µl dans chaque puits.
- Incubation une nuit à 4°C

*3 lavages avec le PBST*

**3. Dépôt du conjugué** (100µl/puits)
- Diluer au 1/2500 les anticorps conjugués dans le tampon conjugué + 5% de plante saine.
- Ajouter 100µl de la solution obtenue dans chaque puits.
- Incubation 2h à 37°C

*3 lavages avec le PBS*

**3. Dépôt Streptavidine PAL** (100µl/puits)
- Dilution au 1/2000 dans le tampon conjugué des IgG anti-rat conjugué à la PAL.
- Introduire 100µl par puits.
- Incuber 30 minutes.

*5 lavages avec le PBS*

**4. Substrat**
- 1mg/ml Paranitrophénylphosphate dans le tampon substrat (200µl/puits)
- Lectures à 405 nm (1/2h, 1h, 2h)

**Solutions à préparer :**

1- Tampon PBS pH=7,4: 8 g NaCl, 0,2 g $KH_2PO_4$, 2,9 g $Na_2HPO_4$, $12H_2O$, 0,2 g KCl, 2 ml $NaN_3$ 10% (ou 0,2g) et Eau UP qsp 1 litre + 0,5 ml Tween 20.

2-Tampon de broyage pH=8,2: 200 ml de solution 5x contenu dans le kit et 800 ml d'eau distillée pour former 1L de tampon Tris contenant : 137mM NaCl, 2% PVP 24kD, 1% PEG 6kD, 0,05% Tween 20 et 0,02% de $NaN_3$.

3-Tampon coating pH=9,6 : 1,59 g $Na_2CO_3$, 2,59 g $NaHCO_3$, 2 ml $NaN_3$ 10% (ou 0,2g) et Eau UP qsp 1 litre.

4-Tampon conjugué pH=7,4 : 10 ml de solution concenté 10x sont ajoutés à 90 ml d'eau distillée pour former 100 ml de tampon Tris contenant : 137mM NaCl, 3mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 2% PVP 24kD, 0,05% Tween, 0,2% BSA et 0,02% de $NaN_3$.

5- Tampon substrat pH=9,8 : 800 ml eau UP, 97 ml diéthanolamine, 2 ml $NaN_3$ 10% (ou 0,2g), Ajuster le pH à 9,8 avec HCl 10N et Eau UP qsp 1 litre.

## ANNEXE 3. PROTOCOLES DE DETECTION DE VIRUS

### EXTRACTION D'ARN TOTAUX

1. Broyer 50 mg de feuilles de vigne dans 1 ml de tampon de broyage (1 ml de tampon RLC, 10 mg de PVP et 10µl de β-mercaptoéthanol par échantillon ; tout cela réalisé sous sorbone).

2. Incuber 1 à 3 minutes à 56°C.

3. Réaliser une centrifugation de paillasse.

4. Déposer le lysat sur une colonne QIAschredder et centrifuger 2 minutes à 13 000 tours/min.

5. Transférer l'éluat dans un tube 1,5ml et ajouter la moitié de son volume en éthanol (96-100%) puis mélanger par pipetage.

6. Déposer 500 µl de ce mélange sur une colonne Rneasy puis centrifuger 15 secondes à 10 000 tr/min.

7. Jeter l'éluat et recommencer l'opération jusqu'à épuisement du mélange.

8. Déposer 700 µl de tampon RW1 dans la colonne, laisser incuber 5 minutes à température ambiante puis centrifuger 15 secondes à 10 000 tr/min. Jeter le sous-nageant et le tube.

9. Laver avec 500 µl de tampon RPE, centrifuger 15 secondes à 10 000 tr/min et jeter le sous nageant.

10. Laver avec 500 µl de tampon RPE, centrifuger 2 minutes à 10 000 tr/min et jeter le sous nageant ainsi que le tube.

11. Transférer la colonne Rneasy dans un tube de 1,5 ml, centrifuger 1 minute à 14 000 tours/minute afin d'éliminer toute trace de tampon RPE sur la membrane.

12. Transférer ensuite la colonne Rneasy dans un tube de 1,5 ml, ajouter 50 µl d'eau stérile, attendre 1 minute pour imprégner la membrane et centrifuger 1 minute à 10000 tr/min.

L'ARN sera ensuite conservé à -20°C (ou -80°C pour de longues conservations).

**Remarque concernant le broyage des échantillons au broyeur à billes :**

- Mettre l'échantillon fragmenté dans un tube de 2ml Eppendorf et y ajouter 2 billes inox (diamètre 5mm) RNAse free ainsi que le tampon de broyage.
- Broyer pendant 5 min vitesse à 100 et n'utiliser que les quatre positions frontales des adaptateurs en téflon.

## ANNEXE 3. PROTOCOLES DE DETECTION DE VIRUS

### RT-PCR QUADRIPLEXE

**Protocole de RT**

1. Déposer 5µl d'ARN totaux dans un microtube.
2. Ajouter 4 µl d'amorce antisens à 25 µM et 3,25 µl d'eau UP stérile Rnase free.
3. Incuber à 80°C pendant 2 minutes puis mettre dans la glace (pour bloquer la renaturation).
4. Ajouter 4 µl de tampon M-MLV 5x (Proméga), 2 µl de dNTP (Désoxyribonucléotide tri-phosphate) à 10 nM, 1 µl de DTT (dithiothréitol), 0,25 µl RNAsin à 40 U/µl et 0,5 µl de M-MLV Reverse Transcriptase à 200 U/µl.
5. Incuber 1 heure à 42°C, puis 15 minutes à 75°C et enfin quelques minutes dans la glace.
6. Ajouter 30 µl d'eau stérile et vortexer légèrement afin d'homogénéiser le contenu.

**Protocole de PCR multiplexe**

1. Placer le nombre de tubes souhaités sur glace.
2. Préparer le mélange des amorces : 25µM pour chacune des amorces.
3. Introduire dans chaque tube 12,5 µl de Master Mix, 0,9 µl d'amorces, 2,5 µl de facteur Q et 9,6 µl d'eau.
4. Rajouter 2 µl de cDNA par tube.
5. Vortexer pour homogénéiser la solution et les placer dans le thermocycleur avec le programme adapté.

## ANNEXE 3. PROTOCOLES DE DETECTION DE VIRUS

### RT-PCR CLASSIQUE

**Protocole de RT**

1. Déposer 5µL d'ARN totaux dans un microtube.
2. Ajouter 1 µl d'amorce antisens et 6,25 µl d'eau UP stérile Rnase free.
3. Incuber à 80°C pendant 2 minutes puis mettre dans la glace (pour bloquer la renaturation).
4. Ajouter 4 µl de tampon M-MLV 5x (Proméga), 2 µl de dNTP (Désoxyribonucléotide tri-phosphate) à 10 nM, 1 µl de DTT (dithiothréitol), 0,25 µl RNAsin à 40 U/µl et 0,5 µl de M-MLV Reverse Transcriptase à 200 U/µl.
5. Incuber 1 heure à 42°C, puis 15 minutes à 75°C et enfin quelques minutes dans la glace.
6. Ajouter 30 µl d'eau stérile et vortexer afin d'homogénéiser le contenu.

**Protocole de PCR**

1. Déposer 4 µl d'ADN complémentaire dans un microtube.
2. Rajouter 5 µl de tampon Taq ADN polymérase 10x (Taq = *Thermophilus aquaticus*).
3. Introduire 1 µl de dNTP à 10 mM, 1 µl d'amorce anti-sens à 50 pmoles/µl ainsi que 1 µl d'amorce sens à 50 pmoles/µl, 4 µl de $MgCl_2$ , 0,15 µl de Taq ADN polymérase à 5 U/µl (Hot Goldstar, Eurogentec) et de l'eau stérile (qsp 50 µL).
4. Après s'être assuré que les tubes sont correctement fermés, placer les tubes dans le thermocycleur avec le programme adapté.
5. Etape de dénaturation initiale (1 cycle) : 10 minutes à 94°C,
6. Etape de dénaturation / hybridation / extension (30-40 cycles) : 30 secs à 94°C, 1 minute à 50-65°C, 1 minute à 72°C,
7. Etape d'extension finale (1 cycle) : 5 minutes à 72°C.

Remarques :
- Manipuler sur glace
- Toujours vortexer légèrement les solutions avant d'effectuer un prélèvement

## ANNEXE 3. PROTOCOLES DE DETECTION DE VIRUS

### RT-PCR BEADS

1. S'assurer de la présence de la bille dans le tube.
2. Placer le nombre de tubes désirés sur la glace.
3. Préparer le mélange des amorces (aux concentrations souhaitées pour chaque amorce).
4. Introduire dans chaque tube 42µL d'eau ultra pure et 6µL du mélange d'amorces (à 25µM).
5. Laisser incuber sur la glace jusqu'à dissolution totale de la bille (environ 5 minutes).
6. Mélanger par aspiration/refoulement à l'aide d'un pipetman.
7. Rajouter 2µL d'ARN par tube.
8. Après s'être assuré que les tubes sont correctement fermés, les placer dans le thermocycleur avec le programme adapté.

## ANNEXE 4. SYNTHESE DES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES SUR UN RESEAU DE PARCELLES VITICOLES

| Région | Commune | Année plantation | Cépage | Dates de suivis | Etude, Réseau | Présence de cochenilles | Données sur l'enroulement viral |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Alsace | Ammerschwihr | | Riesling | 2005 | INRA Colmar, ITV Colmar | *P. corni*<br>*H. bohemicus* | nd |
| Alsace | Andlau | | Riesling | 2005 | INRA Colmar, ITV Colmar | *P. corni*<br>*P. vitis*<br>*H. bohemicus* | nd |
| Alsace | Bergheim | | Pinot noir | 2003-2005 | INRA Colmar, ITV Colmar | *P. corni*<br>*H. bohemicus*<br>*P. aceris* | GLRaV-1 |
| Alsace | Itterswiller | | | 1998 | LNPV-Contrat de Branche 98-01 | *Non* | En 1998,<br>48% de ceps porteurs du GLRaV-1 3% de ceps porteurs du GLRaV-3<br>3% de ceps en infection mixte |
| Alsace | Itterswiller | | | 1998-1999 | LNPV-Contrat de Branche 98-01 | *P. corni*<br>*H. bohemicus* | En 1998,<br>13% de ceps porteurs du GLRaV-1<br>10% de ceps porteurs du GLRaV-3 |
| Alsace | Kaysersberg | | Riesling | 2005 | INRA Colmar | *P. corni*<br>*P. vitis*<br>*H. bohemicus* | GLRaV-1 (90 %) |
| Alsace | Mittelwihr | | | 1998-1999 | LNPV-Contrat de Branche 98-01 | *P. corni*<br>*H. bohemicus*<br>*P. aceris* | De 53% de ceps porteurs du GLRaV-1 en 1998 à 57% en 1999 |
| Alsace | Nothalten | | Riesling | 1998-2005 | INRA Colmar, ITV Colmar | *P. corni*<br>*P. vitis*<br>*H. bohemicus* | En 2005,<br>9% de ceps porteurs du GLRaV-1<br>18% de ceps porteurs du GLRaV-3<br>7% de ceps en infection mixte |
| Alsace | Ribeauvillé | | Riesling | 2005 | INRA Colmar | *P. corni*<br>*P. vitis*<br>*H. bohemicus* | Présence GLRaV-1 et -3 |
| Alsace | Riquewihr | | | 1998-1999 | LNPV-Contrat de Branche 98-01 | *Non* | En 1998 et 1999,<br>28% de ceps porteurs du GLRaV-1<br>3% de ceps porteurs du GLRaV-3<br>2% de ceps en infection mixte |
| Alsace | Turckheim | | | 2003-2005 | INRA Colmar | *P. corni*<br>*P. vitis*<br>*H. bohemicus* | Présence GLRaV-1 |
| Beaujolais | Blacé | 1978 | Gamay | 2002-2005 | CDB-Sicarex-Observatoire Viseo | *P. corni* | De 71% de ceps avec symptômes en 2002 à 82% en 2005 |
| Beaujolais | Charnay | 1978 | Gamay | 1999-2000 | Sicarex-Contrat de branche 98-01 | *P. corni* | En 1998 et 1999,<br>4%, puis 7% de ceps porteurs du GLRaV-3 |
| Beaujolais | Charnay | 1976 | Gamay | 2003-2005 | CDB-Sicarex-Observatoire Viseo | *P. corni*<br>*H. bohemicus* | De 2% de ceps avec symptômes en 2003 à 16% en 2005 |

## ANNEXE 4. SYNTHESE DES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES SUR UN RESEAU DE PARCELLES VITICOLES

| Région | Commune | Année plantation | Cépage | Dates de suivis | Etude, Réseau | Présence de cochenilles | Données sur l'enroulement viral |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Beaujolais | Charnay | | Gamay | 2002-2005 | CDB-Sicarex-Observatoire Viseo | *oui* | De 16% de ceps avec symptômes en 2002 à 26% en 2005 |
| Beaujolais | Chiroubles | 1950 | Gamay | 2002-2005 | CDB-Sicarex-Observatoire Viseo | *P. corni* | De 94% de ceps avec symptômes en 2002 à 99% en 2005 |
| Beaujolais | Fleurie | | Gamay | 2003-2005 | CDB-Sicarex-Observatoire Viseo | *oui* | 0% des ceps avec symptômes entre 2003 et 2005 |
| Beaujolais | Jarnioux | 1977 | Gamay | 2002-2005 | CDB-Sicarex-Observatoire Viseo | *P. corni*<br>*H. bohemicus* | De 34% de ceps avec symptômes en 2002 à 37% en 2005 |
| Beaujolais | Lancié | 1934 | Gamay | 2002-2005 | CDB-Sicarex-Observatoire Viseo | *H. bohemicus* | De 80% de ceps avec symptômes en 2002 à 81% en 2005 |
| Beaujolais | Lucenay | 1947 | Gamay | 2002-2005 | CDB-Sicarex-Observatoire Viseo | *Oui* | De 14% de ceps avec symptômes en 2002 à 17% en 2005 |
| Beaujolais | Odenas | 1991 | Gamay | 1996-2000 | Sicarex-Contrat de branche 98-01 | *nd* | De 26% des ceps porteurs du GLRaV-1 en 1996 à 52% en 2000 |
| Beaujolais | Odenas | 1991 | Gamay | 1996-2000 | Sicarex-Contrat de branche 98-01 | *nd* | De 14% de ceps porteurs du GLRaV-1 en 1997 à 39% en 2000 |
| Beaujolais | Saint Etienne des Ouillères | 1971 | Gamay | 2002 à 2005 | CDB-Sicarex-Observatoire Viseo | *Oui* | De 72% de ceps avec symptômes en 2002 à 92% en 2005 |
| Beaujolais | Saint Etienne des Ouillères | 1981 | Gamay | 1996 à 2000 | Sicarex-Contrat de branche 98-01 | *P. corni* | De 36% des ceps porteurs du GLRaV-1 en 1996 à 46% en 2000 |
| Beaujolais | Saint Germain sur l'Arbresle | 1983 | Gamay | 2002-2005 | observatoire viseo CDB | *P. corni* | Pas de symptômes de 2002 à 2005 |
| Beaujolais | Saint Jean d'Ardières | 1979 | Gamay | 2002-2005 | observatoire viseo CDB | *P. corni*<br>*H. bohemicus* | De 13% de ceps avec symptômes en 2002 à 18% en 2005 |
| Beaujolais | Saint Laurent d'Oingt | 1979 | Gamay | 1996-1998 | Sicarex-Contrat de branche 98-01 | *Non* | De 77% de ceps porteurs du GLRaV-3 en 1996 à 94% en 1998 |
| Beaujolais | Saint Laurent d'Oingt | 1978 | Gamay | 2002-2005 | CDB-Sicarex-Observatoire Viseo | *Oui* | De 37% de ceps avec symptômes en 2002 à 30% en 2005 |
| Bourgogne | Aloxe-Corton (Côte de Beaune) | 1966 | Pinot noir | 2003-2004 | CA21-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *Oui* | nd |
| Bourgogne | Aloxe-Corton (Côte de Beaune) | 2002 | Pinot noir | 2003-2005 | SRPV-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *H. bohemicus* | Pas de symptômes de 2003 à 2005 |
| Bourgogne | Aluze (Chalonnais) | 1993 | Pinot noir | 2003 | CA71-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *Oui* | nd |
| Bourgogne | Beaune (Côte de Beaune) | | Pinot noir | 1998 | ATVB-Contrat de branche 98-01 | *Non* | En 1998,<br>19% de ceps porteurs du GLRaV-1<br>1% de ceps porteurs du GLRaV-3<br>1% de ceps en infection mixte |
| Bourgogne | Beaune (Côte de Beaune) | | Pinot noir | 2003-2005 | SRPV-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *Oui* | De 8% de ceps avec symptômes en 2003 à 25% en 2005 |
| Bourgogne | Beaune (Côte de Beaune) | 1985 | Pinot noir | 1998-1999 | ATVB-Contrat de branche 98-01 | *Non* | De 66% de ceps porteurs du GLRaV-1 en 1998 à 72% en 2000 |

## ANNEXE 4. SYNTHESE DES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES SUR UN RESEAU DE PARCELLES VITICOLES

| Région | Commune | Année plantation | Cépage | Dates de suivis | Etude, Réseau | *Présence de cochenilles* | Données sur l'enroulement viral |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bourgogne | Beaune (Côte de Beaune) | 1985 | Pinot noir | 2003-2005 | SRPV-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *Oui* | De 4% de ceps avec symptômes en 2003 à 14% en 2005 |
| Bourgogne | Bonzon (Mâconnais) | 2001 | Pinot noir | 2001-2005 | CA 71 | *P. corni*<br>*P. vitis*<br>*H. bohemicus*<br>*P. aceris* | De 0% de ceps avec symptômes en 2000 à 8% en 2005 |
| Bourgogne | Chassagne-Montrachet (Côte de Beaune) | 1980 | Pinot noir | 2003-2005 | SRPV-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *Oui* | De 67% de ceps avec symptômes en 2003 à 64% en 2005 |
| Bourgogne | Les Ursulines | 1951 | | 2000 | ATVB-Contrat de branche 98-01 | *Non* | En 1998,<br>28% de ceps porteurs du GLRaV-1<br>15% de ceps porteurs du GLRaV-3<br>3% de ceps en infection mixte |
| Bourgogne | Lugny (Mâconnais) | | Chardonnay | 2003 | CA71-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *Oui* | Nd |
| Bourgogne | Lugny (Mâconnais) | 1982 | Pinot noir | 2003 | CA71-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *Oui* | Nd |
| Bourgogne | Marsannay la Côte (Côtes de Nuit) | 1997, 1998 | Pinot noir | 1998-2005 | INRA-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *P. corni* | De 0,1% de cep avec symptômes 1998 à 2,3% en 2005 |
| Bourgogne | Meloisey (Hautes Côtes) | | Pinot noir | 2003-2005 | SRPV-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *Oui* | 16% de ceps avec symptômes en 2003, 36% en 2004, 28% en 2005 |
| Bourgogne | Mercurey (Chalonnais) | 1980 | Pinot noir | 2003-2004 | SRPV-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *Oui* | 45% de ceps avec symptômes en 2003, 77% en 2004, 53% en 2005 |
| Bourgogne | Meursault (Côte de Beaune) | 1965-1985 | Chardonnay | 2003-2005 | SRPV-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *P. corni* | De 0% de ceps avec symptômes en 2003 à 15% en 2005 |
| Bourgogne | Pernand Vergelesses (Côte de Beaune) | 1965,1982,1990 | Pinot noir | 2003-2005 | SRPV-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *Oui* | De 4% de ceps avec symptômes en 2003 à 10% en 2005 |
| Bourgogne | Pommard (Côte de Beaune) | 1987 | Pinot noir | 2003-2005 | SRPV-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *Oui* | De 4% de ceps avec symptômes en 2003 à 7% en 2005 |
| Bourgogne | Prémeaux-Prissey (Côte de Nuits | 1977 | Pinot noir | 2003-2005 | SRPV-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *Oui* | 43% de ceps avec symptômes en 2003, 57% en 2004, 26% en 2005 |
| Bourgogne | Vosnes-Romanée (Côte de Nuits) | 1972-1975 | Pinot noir | 2003-2005 | SRPV-Observatoire enroulement DRAF-SRPV | *Oui* | 3% de ceps avec symptômes en 2003, 14% en 2004, 2% en 2005 |
| Champagne | Balnot | 1975 | | 1998 et 2000 | CIVC- Contrat de branche 98-01 | *Non* | En 1998,<br>5% de ceps porteurs du GLRaV-1<br>18% de ceps porteurs du GLRaV-3<br>2% de ceps en infection mixte |
| Champagne | Epernay | 1996 | Pinot noir et Meunier | 1999 à 2000 | CIVC, parcelle de 512 pieds | *P. corni*<br>*P. vitis* | En 1999,<br>1% de ceps porteurs du GLRaV-1<br>5% de ceps porteurs du GLRaV-3<br>0,4% de ceps en infection mixte |

## ANNEXE 4. SYNTHESE DES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES SUR UN RESEAU DE PARCELLES VITICOLES

| Région | Commune | Année plantation | Cépage | Dates de suivis | Etude, Réseau | *Présence de cochenilles* | Données sur l'enroulement viral |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Champagne | Epernay | | Chardonnay | 2001 à 2004 | CIVC-Observatoire enroulement | *P. corni* | De 11% de ceps avec symptômes en 2001 à 27% en 2004 |
| Champagne | Hautvillers | | Chardonnay et Pinot noir | 2001 à 2004 | CIVC-Observatoire enroulement | *Oui* | De 7% de ceps avec symptômes en 2001 à 2% en 2004 |
| Champagne | Le Mesnils sur Oger | | Chardonnay | 2001 à 2004 | CIVC-Observatoire enroulement | *H. bohemicus* | De 3% de ceps avec symptômes en 2001 à 24% en 2004 |
| Champagne | Le Mesnils sur Oger | | Chardonnay | 2001 à 2004 | CIVC-Observatoire enroulement | *H. bohemicus* | De 16% de ceps avec symptômes en 2001 à 23% en 2004 |
| Champagne | Les Riceys | 1985 | | 1998 et 2000 | CIVC-Contrat de branche 98-01 | *Non* | En 1998,<br>13% de ceps porteurs du GLRaV-1<br>31% de ceps porteurs du GLRaV-3<br>14% de ceps en infection mixte |
| Champagne | Mailly | 1986 | Pinot Noir | 2001 à 2004 | CIVC-Observatoire enroulement | *Oui* | De 6% de ceps avec symptômes en 2001 à 11% en 2004 |
| Champagne | Mareuil le Port | | Chardonnay | 2001 à 2004 | CIVC-Observatoire enroulement | *P. corni* | De 4% de ceps avec symptômes de 2001 à 1% en 2004 |
| Champagne | Monthurel | 1989 | | 1998 et 2000 | CIVC-Contrat de branche 98-01 | *Non* | En 1998,<br>6% de ceps porteurs du GLRaV-1<br>12% de ceps porteurs du GLRaV-3<br>% de ceps en infection mixte |
| Champagne | Oger | 1972 | | 1998 et 2000 | CIVC-Contrat de branche 98-01 | *Non* | En 1998,<br>78% de ceps porteurs du GLRaV-1<br>1% de ceps porteurs du GLRaV-3<br>15% de ceps en infection mixte |
| Champagne | Oger | | Chardonnay | 2001 à 2004 | CIVC-Observatoire enroulement | *Oui* | De 5% de ceps avec symptômes en 2001 à 2% en 2004 |
| Champagne | Taissy | 1974 | Chardonnay | 2001 à 2004 | CIVC-Observatoire enroulement | *P. corni* | De 16% de ceps avec symptômes en 2001 à 22% en 2004 |
| Champagne | Verzenay | | Pinot noir | 2001 à 2004 | CIVC-Observatoire enroulement | *Oui* | De 3% de ceps avec symptômes en 2001 à 2% en 2004 |
| Champagne | Verzy | 1993 | Pinot noir | 2001 à 2004 | CIVC-Observatoire enroulement | *Oui* | 0% de ceps avec symptômes de 2001 à 2004 |
| Champagne | Villeneuve | 1986-87-88 | Chardonnay | 2001 à 2004 | CIVC-Observatoire enroulement | *P. corni* | De 6% de ceps avec symptômes en 2001 à 5% en 2004 |
| Champagne | Voixpreux | | Chardonnay | 2001 à 2004 | CIVC-Observatoire enroulement | *Oui* | De 5% de ceps avec symptômes en 2001 à 4% en 2004 |

# ANNEXE 5. SCHEMA DE SELECTION CLONALE DE LA VIGNE

IFV
INSTITUT FRANÇAIS
DE LA VIGNE ET DU VIN

## SÉLECTION CLONALE EN FRANCE

**Prospection dans des vieilles vignes**

**Pré-sélection dans les conservatoires régionaux**

**Introduction au domaine de l'Espiguette**

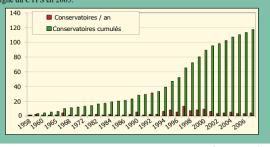
Prospection dans des vieilles vignes- Photo IFV

**Tests ELISA**

**Les conservatoires de clones**

L'IFV joue un rôle clé dans l'installation de conservatoires locaux. En effet, en plus de la collection présente sur le domaine de l'Espiguette, 117 conservatoires régionaux dans l'ensemble des bassins viticoles sont établis afin de maintenir la plus large diversité intra-variétale possible pour les principaux cépages. Ces collections comptent un total de plus 18 000 clones concernant 105 cépages. Ces conservatoires représentent un potentiel stratégique pour les sélections futures. En effet, lorsque l'ensemble des plus vieilles parcelles aura été arraché, ces conservatoires seront l'unique ressource pour de prochaines sélections clonales. Le suivi de ces conservatoires est assuré par les partenaires de l'IFV.

Le protocole d'installation, de gestion et d'étude des conservatoires de clones de vigne a été approuvé par la section vigne du CTPS en 2005.




Les conservatoires de clones

Parc de conteneurs - Photo IFV

**Têtes de clones en conteneurs**

Maladies à virus recherchées et méthodes

| PRINCIPALES MALADIES À VIRUS | INDEXAGE | SEROLOGIE |
|---|---|---|
| Court-noué : - Grapevine FanLeaf Virus - GFLV - Arabis Mosaic Virus - ArMV | Rupestris du Lot | GFLV ArMV (+Nw court-noué associés) |
| Enroulement : Grapevine LeafRoll associated Virus - GLRaV | Cabernet franc N Cabernet Sauvignon N Mueller N Pinot noir N | GLRaV-1 GLRaV-2 GLRaV-3 |
| Marbrure : Grapevine Fleck Virus - GFkV | Rupestris du Lot | GFkV |
| MALADIES À VIRUS SECONDAIRES | INDEXAGE | SEROLOGIE |
| Complexe du bois strié (ou cannelure) : - Rupestris Stem Pitting - RSP - Kober Stem Grooving - KSG - Grapevine Virus A - GVA | Rupestris du Lot LN 33 | GVA |
| MALADIES DE TYPE VIRAL uniquement recherchées pour la sélection clonale des porte-greffe | | |
| Nécrose des nervures : Grapevine Vein Necrosis - GVN | 110 R | |
| Mosaïque des nervures : Grapevine Vein Mosaic - GVM | Riparia Gloire | |

**Sélection sanitaire de l'IFV au domaine de l'Espiguette Dépistage des maladies à virus, INDEXAGE, ELISA**

**Sélection génétique dans la zone d'origine du cépage Evaluation du potentiel agronomique et technologique des clones**

**Clones sains**

**Procédure d'agrément Section vigne du CTPS**

**Qualité agronomique et/ou technologique**

**Conservatoire de l'IFV Domaine de l'Espiguette**

Matériel initial - Photo IFV

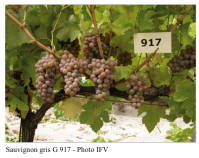
**Matériel initial**

**Prémultiplication**

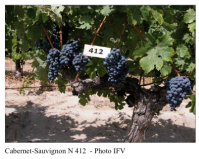
**Matériel de base**

**Multiplication**

**Plants certifiés**




Sauvignon gris G 917 - Photo IFV




Cabernet-Sauvignon N 412 - Photo IFV

Etiquette de certification - Photo IFV

**Partenaires :**
Chambres d'agriculture : Ardèche, Aude, Bouches-du-Rhône, Dordogne, Drôme, Gard, Gers, Gironde, Haute-Garonne, Hérault, Landes, Lot, Lot-et-Garonne, Pyrénées-Atlantiques, Roussillon, Saône-et-Loire, Tarn-et-Garonne, Var, Vaucluse
Bureau National Interprofessionnel du Cognac
Comité Interprofessionnel des Vins d'Alsace
Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne
Fédération des Vins de Savoie
Société de Viticulture du Jura
Union Platmont
Syndicat Général des Vignerons Réunis des Côtes-du-Rhône
Association Technique Viticole de Bourgogne
Conservatoire du Vignoble Charentais
CIVAM Région Corse
Centre d'Expérimentation Fruits Et Légumes
Sica La Tapy, Sicarex du Beaujolais.

*Travaux menés au domaine de l'Espiguette*
*Actions conduites dans les régions viticoles*

© Institut Français de la Vigne et du Vin - A-M. Denizot - novembre 2009