

◆ Normes OEPP ◆

**SCHEMAS POUR LA PRODUCTION DE VEGETAUX
SAINS DESTINES A LA PLANTATION**

SCHEMA DE CERTIFICATION POUR LES CERISIERS

PM 4/29(1) Français



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

APPROBATION

Les Normes OEPP sont approuvées par le Conseil de l'OEPP. La date d'approbation figure dans chaque norme.

REVISION

Les Normes OEPP sont sujettes à des révisions et des amendements périodiques. La prochaine date de révision de cette série de Normes OEPP est décidée par le Groupe de travail pour l'étude de la réglementation phytosanitaire.

ENREGISTREMENT DES AMENDEMENTS

Des amendements seront préparés si nécessaire, numérotés et datés. Les dates de révision figurent (si nécessaire) dans chaque norme individuelle.

DISTRIBUTION

Les Normes OEPP sont distribuées par le Secrétariat de l'OEPP à tous les Etats membres de l'OEPP. Des copies sont disponibles, sous certaines conditions, auprès du Secrétariat de l'OEPP pour toute personne intéressée.

CHAMP D'APPLICATION

Les schémas de l'OEPP pour la production de végétaux sains destinés à la plantation sont destinés aux ONPV ou aux organismes équivalents, en leur qualité d'autorités responsables de la mise en place de systèmes de production de végétaux sains destinés à la plantation, de l'inspection des végétaux proposés pour la certification phytosanitaire, et de la délivrance des certificats appropriés.

REFERENCES

OEPP/EPPO (1991) Recommandations du Conseil de l'OEPP en 1990: schéma pour la production de plantes ornementales, à multiplication végétative, certifiées 'pathogen-tested'. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **21**, 740.

OEPP/EPPO (1992) Recommandations du Conseil de l'OEPP en 1981: certification virologique des arbres fruitiers, greffons et porte-greffe. *Documents techniques de l'OEPP* n° 1013, 10-11.

OEPP/EPPO (1993) Recommandations du Conseil de l'OEPP en 1992: schéma pour la production de matériel classifié de plantes ornementales multipliées par voie végétative et répondant aux normes sanitaires. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **23**, 729-730.

DEFINITIONS

Candidat au stade initial

Toute plante qui peut devenir stade initial ou peut être multipliée pour produire le stade initial. Des tests de détection sont exigés pour des organismes nuisibles précisés avant que la plante ne soit acceptée dans le stade initial. Elle reste candidate au stade initial jusqu'à ce que tous les tests aient été effectués et aient donné un résultat négatif.

Filiation

La lignée d'une plante par multiplication végétative à partir d'un parent identifié.

Matériel certifié

Matériel de multiplication issu du dernier stade de propagation. Le matériel certifié respecte les normes de certification recommandées et est certifié pour être commercialisé. Si des plantes sont commercialisées greffées sur des porte-greffe, ceux-ci doivent également provenir du dernier stade de propagation et les plantes doivent être maintenues dans des conditions approuvées entre le greffage et la commercialisation. Le matériel certifié peut, selon l'espèce végétale concernée, avoir un nom plus spécifique, comme par exemple plantes certifiées, boutures certifiées, bulbes certifiés, etc.

Matériel de base

Matériel issu d'un stade de propagation à l'exception du dernier. Le matériel de base respecte les normes de certification recommandées et est certifié pour être commercialisé. Il peut y avoir plusieurs grades de matériel de base selon le nombre de stades de propagation.

Matériel de pré-base

Matériel issu du stade initial. Le matériel de pré-base respecte les normes de certification recommandées et est certifié pour être commercialisé.

Matériel issu du stade initial

Matériel de multiplication issu du stade initial, qui peut être multiplié sans changement de propriétaire ou être certifié pour être commercialisé comme matériel de pré-base.

Matériel issu du stade de propagation

Matériel de multiplication issu d'un stade de propagation, qui peut être multiplié sans changement de propriétaire ou être certifié pour être commercialisé comme matériel de base ou certifié, selon le stade de propagation concerné.

Schéma de certification

Système pour la production par voie végétative de végétaux destinés à la plantation (pour la multiplication ou la commercialisation) obtenus à partir du stade initial après plusieurs étapes de multiplication dans des conditions garantissant le respect de normes sanitaires définies. La filiation du matériel est suivie pendant tout le schéma.

Schéma de classification

Système pour la production par voie végétative de végétaux destinés à la plantation (pour la multiplication ou la commercialisation) obtenus à partir de matériel candidat après une ou plusieurs étapes de multiplication dans des conditions garantissant le respect de normes sanitaires définies. Des classes différentes peuvent être définies en fonction des inspections et des tests utilisés, des tolérances appliquées et des précautions prises. La classification ne tient pas compte de la filiation du matériel.

Stade de propagation

Plantes issues du stade initial, multipliées et maintenues dans des conditions garantissant l'absence de contamination. L'absence de pathogènes est contrôlée par des procédures appropriées. La multiplication peut être réalisée en plusieurs stades successifs dans des conditions différentes approuvées. Les plantes sont alors identifiées comme du stade de propagation I, stade de propagation II, etc. Chaque stade de propagation peut comprendre plusieurs générations si les plantes ne quittent pas les conditions précisées. Le nombre de stades et/ou de générations autorisés est généralement limité et dépend de la culture concernée. Si les plantes du stade de propagation sont greffées sur des porte-greffe, ceux-ci doivent provenir au moins du stade de propagation correspondant.

Stade initial

Plantes testées individuellement selon la procédure la plus rigoureuse du schéma de certification et trouvées indemnes d'organismes nuisibles précisés. Toutes ces plantes sont maintenues en permanence dans des conditions strictes garantissant l'absence de contamination. Selon les cultures concernées, les plantes multipliées à partir du stade initial peuvent rester stade initial si elles ne quittent pas les conditions du stade initial. Si des plantes du stade initial sont greffées sur des porte-greffe, ceux-ci doivent également provenir du stade initial.

VUE D'ENSEMBLE

Un Schéma de l'OEPP pour la production de végétaux sains destinés à la plantation décrit, pour une plante cultivée donnée, les étapes de la production par voie végétative de matériel destiné à la plantation, dont l'état sanitaire est attesté par un certificat officiel. La certification et la classification sont des approches alternatives pour la production de matériel sain destiné à la plantation. Dans un schéma de certification, le matériel certifié descend, par un nombre maximum d'étapes, de plantes individuelles, chacune testée et trouvée indemne d'organismes nuisibles, puis maintenue et multipliée dans des conditions strictes empêchant toute recontamination. Dans un schéma de classification, le matériel classifié descend par une ou plusieurs étapes de matériel répondant, en tant que population, à certaines normes sanitaires; ce matériel est maintenu et multiplié dans des conditions minimisant la recontamination. Dans les deux cas, le statut phytosanitaire est attesté par un certificat officiel. L'approche appropriée pour une plante donnée dépend de la prise en compte du coût et des ressources nécessaires, du statut phytosanitaire recherché, des possibilités pratiques de test, du taux de recontamination, de la valeur du matériel final.

Les Schémas de l'OEPP pour la production de végétaux sains destinés à la plantation donnent des détails sur la sélection et le maintien du matériel initial, et sur la multiplication de ce matériel en plusieurs étapes dans des conditions assurant le respect de normes sanitaires définies. Les contrôles nécessaires pour les organismes nuisibles concernés sont spécifiés dans le schéma. Des informations sont fournies, au besoin, sur les organismes nuisibles concernés, les pratiques culturales, les méthodes de test et d'inspection, les normes de certification recommandées.

Schémas pour la production de végétaux sains destinés à la plantation

SCHEMA DE CERTIFICATION POUR LES CERISIERS

Champ d'application spécifique

Cette norme décrit la certification sanitaire de matériel de *Prunus avium*, *Prunus cerasus* et leurs porte-greffe.

Le schéma de certification sanitaire du cerisier doux (*Prunus avium*), du griottier (*Prunus cerasus*) et de leurs porte-greffe (*P. avium*, *P. cerasus*, *Prunus mahaleb* et hybrides interspécifiques) donne des détails sur la production d'arbres fruitiers greffés (variétés), de porte-greffe multipliés par voie végétative et de porte-greffe issus de semence. Le schéma s'applique également aux plantes ornementales de cerisier.

Le matériel végétal produit selon ce schéma de certification est issu de plantes du stade initial qui ont été testées et trouvées indemnes des pathogènes listés au tableau 1; ces plantes ont également été produites dans des conditions minimisant les infections par les autres pathogènes majeurs des espèces concernées. Le matériel certifié d'arbres fruitiers destiné à l'exportation doit, dans tous les cas, répondre aux exigences phytosanitaires des pays importateurs, en particulier pour ce qui concerne les pathogènes couverts par le schéma qui sont également des organismes de quarantaine. Le schéma est présenté selon le plan général accepté par le Groupe d'experts OEPP sur la certification sanitaire des cultures fruitières et adopté par le Conseil de l'OEPP (OEPP/EPPO, 1992).

Vue d'ensemble

Pour produire des arbres fruitiers et des porte-greffe certifiés de cerisier, les étapes suivantes doivent être suivies.

- 1 Sélection pour qualité pomologique: des plantes individuelles sont sélectionnées pour chaque espèce, type de porte-greffe ou variété à introduire dans le schéma ou, éventuellement, du matériel de départ indemne de virus est importé d'autres pays. (Dans ce schéma, les termes "variété" et "porte-greffe" sont utilisés dans le sens couramment employé en arboriculture: la variété correspond au cultivar du scion, alors que le porte-greffe peut être un cultivar ou une espèce.)
- 2 Production du stade initial: les plantes candidates au stade initial sont formées par écussonnage ou greffage sur des porte-greffe ayant le statut du stade

Approbation et amendement spécifiques

Approbation initiale en septembre 1990, en tant que partie constituante de la Norme OEPP PM 4/1.

Norme séparée approuvée en septembre 2000.

initial. Ces plantes sont maintenues dans des conditions garantissant l'absence d'infection. Les plantes candidates sont testées à l'aide des procédures les plus rigoureuses du schéma. Alternativement, des plantes indemnes de virus (candidates au stade initial) sont produites par thérapie thermique, suivie de tests. Seules les plantes candidates au stade initial qui respectent toutes les exigences peuvent être considérées comme du stade initial.

- 3 Maintien du stade initial: les plantes du stade initial sont maintenues dans des conditions garantissant l'absence de contamination par les contacts racinaires, le pollen ou les vecteurs aériens, avec des tests supplémentaires si nécessaire.
- 4 Production du stade de propagation: les plantes du stade de propagation sont produites à partir du stade initial avec le moins d'étapes possibles dans des conditions garantissant l'absence d'infection, avec des tests supplémentaires si nécessaire.
- 5 Production des plantes certifiées: les plantes certifiées sont produites en greffant du matériel issu du stade de propagation sur des porte-greffe ayant au moins le statut de stade de propagation.

Tout au long de la procédure, des précautions doivent être prises pour conserver les caractéristiques pomologiques des plantes sélectionnées à l'origine. Des contrôles doivent porter sur d'éventuelles mutations, surtout pour les variétés. Le schéma est représenté aux figures 1 et 2.

Le schéma de certification doit être réalisé par une organisation officielle, ou par une pépinière ou un laboratoire spécialisé agréé, répondant à des critères donnés (voir la Norme OEPP PM 4/7) Les exigences sont moins strictes pour les établissements réalisant la dernière phase de production (5) que pour les stades 1-4.

Tous les tests et inspections réalisés au cours de la production doivent être notés. Si les stades du schéma de certification sont conduits par une pépinière agréée, la certification sera accordée par l'organisation officielle en se basant sur les documents relatifs aux

tests et aux observations réalisés pendant la production, et sur des inspections visuelles visant à vérifier l'état sanitaire du matériel.

1. Sélection de plantes candidates au stade initial

Variétés

Un ou plusieurs arbres en production présentant les caractères agronomiques typiques de chaque variété à prendre en compte dans le schéma doivent être sélectionnés dans différents vergers et/ou dans des parcelles d'essais pomologiques. Alternativement, du matériel indemne de virus peut être importé d'autres pays. Le matériel importé de l'extérieur de la région OEPP doit être testé par des méthodes recommandées par l'ISHS (International Society for Horticultural Science) (voir Annexe II) pour tous les virus présents naturellement sur le genre concerné dans la région d'origine.

Porte-greffe multipliés par voie végétative

Des plantes d'apparence saine, vigoureuses et bien racinées présentant les caractères agronomiques typiques de chaque type de porte-greffe à prendre en compte dans le schéma doivent être sélectionnées dans des parcelles de multiplication de porte-greffe et/ou dans des parcelles d'essais pomologiques. Alternativement, du matériel indemne de virus peut être importé d'autres pays. Le matériel importé de l'extérieur de la région OEPP doit être testé comme pour les variétés (ci-dessus).

2. Production du stade initial

Variétés

Procédure générale

Le matériel de propagation est prélevé sur les arbres sélectionnés pour leurs qualités pomologiques, et écussonné ou greffé sur des porte-greffe du stade initial. Ces plantes (plantes en pot candidates au stade initial) doivent être maintenues pendant la période de test dans des conditions garantissant l'absence de contamination par les contacts racinaires, le pollen ou les vecteurs aériens ou du sol. Elles doivent être cultivées dans un milieu de culture stérilisé. Utiliser un abri "aphid-proof" conçu et réservé à cet usage, séparé du stade initial pendant la période de test. Les plantes candidates au stade initial doivent être testées individuellement pour les virus et maladies analogues aux virus du tableau 1, par les méthodes mentionnées aux Annexes I et II. Une plante candidate peut être considérée comme du stade initial et être transférée dans la collection de stade initial seulement si elle donne des résultats négatifs pour tous les pathogènes du tableau 1.

Procédure d'amélioration sanitaire

Lorsqu'aucun des arbres sélectionnés pour une variété donnée ne donne des résultats négatifs aux tests, préparer le matériel pour la thérapie en écussonnant ou en greffant du matériel de propagation sur des porte-greffe en pots. Ces plantes sont alors traitées à la chaleur (Annexe III) et les plantes obtenues sont testées (en général par greffe d'apex) après une période de végétation, ce qui permet aux virus présents de se développer. Seules les plantes qui donnent un résultat négatif aux tests pourront être considérées comme du stade initial et transplantées dans la collection de stade initial. Si pour une variété donnée on s'attend à ce que toutes les plantes candidates soient infectées par des virus, on peut gagner du temps en n'effectuant pas le premier test et en passant directement à la thérapie.

Porte-greffe multipliés par voie végétative

Procédure générale

Les plantes ou boutures sélectionnées (candidates au stade initial) doivent être maintenues pendant la période de test dans des conditions garantissant l'absence d'infection par les contacts racinaires, le pollen ou les vecteurs aériens ou du sol. Elles doivent être cultivées dans un milieu de culture stérilisé. Utiliser un abri "aphid-proof" conçu et réservé à cet usage, séparé du stade initial pendant la période de test. Chaque plante candidate au stade de stade initial doit être testée pour les virus et maladies analogues aux virus du tableau 1 par les méthodes mentionnées aux Annexes I et II. Une plante candidate peut être considérée comme du stade initial et transférée dans la collection de stade initial seulement si elle donne des résultats négatifs aux tests.

Procédure d'amélioration sanitaire

Lorsqu'aucune des plantes sélectionnées pour un type de porte-greffe ne donne des résultats négatifs aux tests, le matériel est préparé pour thérapie en plaçant certaines plantes ou leur descendance en pots avant le début du traitement. Après traitement à la chaleur (Annexe III), les plantes doivent être testées à nouveau (comme ci-dessus) après une période de végétation, ce qui permet aux virus présents de se développer. Seules les plantes qui donnent un résultat négatif aux tests peuvent être considérées comme du stade initial et transplantées dans la parcelle du stade initial.

Pour un type de porte-greffe utilisé depuis longtemps, il est préférable de ne pas effectuer le premier test et de passer directement à la thérapie. Cependant, les tests sélectifs directs peuvent permettre de gagner du temps pour les nouveaux types de porte-greffe.

Inspections portant sur d'autres organismes nuisibles

En dehors des maladies et pathogènes mentionnés au tableau 1, toutes les plantes candidates au stade initial

(variétés et porte-greffe multipliés par voie végétative) doivent aussi être inspectées pour détecter la présence d'autres organismes nuisibles pouvant être transmis sur le matériel de propagation. Ces contrôles doivent porter en particulier sur l'absence d'*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Phytophthora* spp. et *Quadrascidiotus perniciosus*.

3. Maintien du stade initial

Les plantes du stade initial doivent être maintenues dans des conditions garantissant l'absence de (re)contamination. En raison du risque de contamination aérienne, les plantes doivent de préférence être maintenues dans un abri "aphid-proof" et cultivées dans des conteneurs isolés du sol contenant un milieu de culture stérilisé. Les plantes du stade initial peuvent être maintenues en plein champ où elles doivent être séparées d'environ 1 km de toute *Prunus* sp. du sous-genre *Cerasus*, cultivé ou sauvage. En outre, le sol doit être testé et trouvé indemne des nématodes vecteurs de virus des genres *Longidorus* et *Xiphinema* (Annexe IV). L'absence de nématodes doit être confirmée tous les 5 ans en testant le sol.

L'authenticité variétale de chaque plante doit être vérifiée pendant le stade végétatif. Des inspections doivent porter tous les ans sur les mutations éventuelles.

Chaque plante du stade initial doit être retestée tous les ans pour le PNRSV, le PDV et l'ApMV. En outre, toutes les plantes doivent être retestées pour tous les virus et analogues, selon l'espèce (tableau 1), lorsque les plantes sont greffées sur de nouveaux porte-greffe. Les plantes doivent être inspectées plusieurs fois par an pour détecter les symptômes de virus et analogues, ainsi que les autres organismes nuisibles mentionnés ci-dessus. Toute plante donnant des résultats positifs aux tests ou présentant des symptômes de virus ou d'analogues aux virus, ou d'autres organismes nuisibles mentionnés ci-dessus doit être immédiatement éliminée de la collection du stade initial.

4. Production du stade de propagation

Les plantes du stade initial doivent être multipliées, avec le moins d'étapes possibles, pour obtenir une quantité suffisante de plantes du stade de propagation. Le matériel issu du stade initial est écussonné ou greffé sur des porte-greffe de statut équivalent dans la certification ou sur des porte-greffe certifiés issus de semences. Le stade de propagation doit être conservé dans des parcelles testées et trouvées indemnes des nématodes vecteurs de virus des genres *Longidorus* et *Xiphinema* (Annexe IV) et isolées de tout matériel du même genre ne faisant pas partie d'un schéma de certification ou ayant un statut inférieur dans la certification. Les porte-greffe peuvent être multipliés *in vitro* et des directives sont données à l'Annexe V.

Des semences produites sur des porte-greffe au stade de propagation¹ peuvent être récoltées, testées pour les virus transmis par les semences (Annexe I) et germées pour produire des porte-greffe issus de semence. Ceux-ci sont utilisés comme porte-greffe pour les arbres certifiés au stade en pépinière. Des porte-greffe issus de semence peuvent également être utilisés comme porte-greffe pour le stade de propagation, à condition que les plantes sur lesquelles les semences sont produites soient isolées d'au moins 300 m de toute plante de *Prunus* et restent dans les conditions du stade de propagation.

Le stade de propagation doit être inspecté visuellement tous les ans pour détecter les symptômes de virus et des autres organismes nuisibles mentionnés ci-dessus. Une attention particulière doit être portée aux virus qui se disséminent naturellement. Pour garantir une sécurité supplémentaire, les plantes de la première génération du stade de propagation peuvent être retestées chaque année par ELISA pour détecter le PNRSV et le PDV. Toute plante infectée doit être éliminée et, s'il existe des indications que l'infection peut être issue de la génération précédente, il est conseillé de supprimer toutes les plantes du lot et de retester la plante source.

Les plantes doivent être inspectées visuellement pour détecter les mutations éventuelles. Noter que c'est la première fois dans le schéma qu'une évaluation des fruits peut être réalisée, mais il faut noter que le type de porte-greffe peut influencer les caractéristiques du fruit.

5. Production de plantes et semences certifiées

Pour la production d'arbres fruitiers certifiés, les scions doivent être greffés ou écussonnés sur des porte-greffe de statut équivalent ou plus élevé dans la certification. Ces plantes doivent être maintenues dans des parcelles isolées des sources potentielles d'infection. Pour être certifiées, les plantes doivent être inspectées par l'organisation officielle pour détecter les symptômes de virus et d'analogues, ainsi que les autres organismes nuisibles mentionnés ci-dessus. Toute plante présentant des symptômes doit être éliminée et la certification peut être accordée au restant.

Pour la production de semences certifiées, les semences de porte-greffe du stade de propagation (voir ci-dessus) doivent être nettoyées, testées pour les virus transmis par les semences (Annexe I) et emballées dans des sacs scellés.

¹ Exceptionnellement, des semences peuvent être collectées sur un arbre sauvage de *Prunus avium*, testées pour les virus transmis par les semences comme pour les semences du stade de propagation et utilisées pour produire des porte-greffe issus de semence pour les plantes certifiées (mais pas pour le stade de propagation).

6. Administration du schéma de certification

Supervision du schéma

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

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

Tout au long de la procédure, l'origine de chaque plante doit être connue afin de pouvoir retrouver l'origine de tout problème phytosanitaire ou de conformité au type. L'utilisation dans les pépinières de matériel de propagation destiné à produire des plantes certifiées doit être supervisée par une organisation officielle ou officiellement reconnue qui contrôle l'état sanitaire, l'origine et la quantité de ce matériel, en se basant sur les inspections au champ, ainsi que sur les rapports et les documents présentés par les pépiniéristes. Le programme de protection phytosanitaire des pépinières et les inspections doivent prendre en compte les autres organismes nuisibles importants qui affectent la qualité, de façon à ce que les plantes certifiées vendues au producteur en soient pratiquement indemnes. Le matériel certifié d'arbres fruitiers destiné à l'exportation doit, dans tous les cas, répondre aux exigences phytosanitaires des pays importateurs.

Les plantes ou semences certifiées quittant le schéma doivent porter un certificat officiel (pouvant être une étiquette) pour indiquer l'autorité responsable de la certification, le producteur et le statut de certification des plantes.

Annexe I Directives sur les procédures de test

Tests sur indicateurs ligneux (en plein champ ou sous serre)

L'utilisation d'indicateurs ligneux reste une étape obligatoire dans tous les programmes de certification car certaines maladies d'importance majeure ne peuvent être identifiées que sur des hôtes différentiels ligneux. La méthode consiste à inoculer par greffage les plantes indicatrices, en utilisant un greffon ou chip (lambeau d'écorce) prélevé sur les plantes candidates ou suspectes, puis à observer l'apparition de symptômes sur les nouvelles pousses et/ou les fruits des plantes indicatrices; ces symptômes sont généralement spécifiques et très caractéristiques pour la plupart des maladies.

Si le test a lieu sous serre, la température doit être modulable (gamme de température 18-25°C), afin de pouvoir placer les plantes à une température qui permet

l'expression des symptômes (Annexe II). Il faut utiliser dans la serre au moins trois plantes de chaque indicateur. Les indicateurs maintenus en plein champ (3-5 plantes pour chacun) doivent être observés pendant au moins deux ans.

Tests sur des hôtes herbacés (sous serre)

L'utilisation d'indicateurs herbacés permet de détecter les virus transmissibles mécaniquement, y compris ceux d'importance mineure. Cette méthode doit toutefois être considérée comme un complément aux autres méthodes de diagnostic, et elle ne les remplace pas. Elle peut être utile, par exemple, pour un premier criblage ou pour des tests par sondage. Les tests sur des plantes herbacées doivent être effectués dans une serre où la température est modulable (gamme de température 18-25°C). Il faut utiliser au moins cinq plantes de chaque indicateur.

Tests ELISA

La méthode ELISA permet d'effectuer à grande échelle des tests sur les virus des arbres fruitiers pour lesquels des antisérums polyclonaux et/ou monoclonaux sont disponibles. Elle doit toutefois faire face aux limites inhérentes à toute technique sérologique, comme le fait que certains virus peuvent être présents dans l'arbre à très faible concentration, qu'ils peuvent avoir une distribution inégale ou ne pas être détectés à certaines périodes de l'année.

PCR

La PCR (polymerase chain reaction) peut être utilisée pour détecter certains virus ou analogues aux virus. Des tests sérologiques et moléculaires peuvent être combinés pour augmenter la sensibilité de chaque méthode prise séparément, par ex. IC-RT-PCR (immunocapture reverse-transcriptase-PCR).

Tests des lots de semence

Diverses méthodes d'échantillonnage et de test sont disponibles. Une méthode typique est la suivante: à partir d'un lot de semences (contenant 50 kg de semences), 200 semences (noyaux) sont échantillonnées et sont placées dans l'eau pendant au moins une nuit. Les noyaux sont ouverts et les semences extraites. Des groupes de 3-5 semences (y compris l'intégument et l'embryon) sont combinées et extraites par des techniques d'ELISA standard. Si un résultat est positif par ELISA, le lot est rejeté.

Annexe II Directives sur la détection des maladies

Les méthodes de détection des maladies sont spécifiées aux tableaux 2 et 3 pour chaque virus ou maladie sous les titres suivants:

- tests ligneux (plein champ): tests sur indicateurs ligneux en plein champ;
- tests ligneux (serre): tests sur indicateurs ligneux sous serre;
- tests herbacés: tests sous serre sur des indicateurs herbacés;
- tests sérologiques ou moléculaires: utilisation d'ELISA, RT-PCR, IC-RT-PCR.

Pour les tests ligneux, les indicateurs sont listés, suivis de chiffres entre parenthèses indiquant le nombre de répétitions, la température en °C (pour les tests sous serre) et la durée des tests (d, jours; w, semaines, y, années, c, années de culture), puis d'une brève description des symptômes est donnée. En général, les tests sur indicateurs ligneux sont toujours nécessaires pour vérifier que le stade initial est indemne de virus, et un test sur indicateurs ligneux est donc toujours spécifié. Les tests sur indicateurs herbacés, tests sérologiques ou RT-PCR sont surtout utilisés pour réaliser un criblage rapide et économique du matériel candidat afin d'éliminer les plantes infectées, ou pour retester le stade de propagation.

Les informations sur les tests proviennent principalement des publications du Groupe d'étude de l'ISHS sur les virus des arbres fruitiers, qui sont publiées dans *Acta Horticulturae* après les réunions triennales (Anon, 1998). Les lecteurs sont invités à consulter les recommandations de l'ISHS les plus récentes, qui donnent également des références pour les techniques, en particulier pour la PCR qui se développe rapidement à l'heure actuelle. Les recommandations de l'ISHS comportent également des commentaires sur les avantages et les limitations des méthodes. Le Groupe d'experts OEPP sur la certification des cultures fruitières, en étudiant les recommandations de l'ISHS, a identifié les indicateurs ligneux qu'il recommande plus particulièrement, selon son expérience, pour leur efficacité et leur facilité d'utilisation. Néanmoins cela n'exclut pas l'utilisation d'autres indicateurs, recommandés par l'ISHS ou bénéficiant d'une expérience favorable dans les conditions locales.

Annexe III Méthodes d'amélioration sanitaire

La thermothérapie est la méthode largement utilisée pour éliminer les pathogènes des variétés et porte-greffe de cerisier; par contre l'expérience des cultures de méristèmes ou du greffage d'apex (voir Norme OEPP PM 4/30) est très limitée. Le matériel ainsi traité doit ensuite être testé pour évaluer son état sanitaire.

Thermothérapie

De nombreuses méthodes peuvent être utilisées pour le traitement à la chaleur des cultures fruitières selon le type de matériel. Les détails des méthodes ne sont donc pas donnés ici, mais peuvent être trouvés dans les publications suivantes: Anon (1970), Németh (1986) ou Fridlund (1989).

Thermothérapie *in vitro*

Les variétés de cerisier qui supportent mal une thermothérapie normale peuvent subir un traitement à la chaleur plus long à des températures modérées (34-38°C) lorsqu'elles sont à l'état de pousses *in vitro*.

Annexe IV Directives sur la détection des nématodes

Le sol où le matériel certifié sera planté doit avoir été échantillonné et les échantillons doivent être trouvés indemnes des espèces de nématodes vecteurs de virus spécifiées au tableau 4. Les échantillons de sol sont prélevés entre 10 et 30 cm de profondeur, à l'aide d'une tarière semi-cylindrique d'au moins 2,5 cm de diamètre. Les tarières à vis ou les outils d'un diamètre inférieur à celui-ci ne doivent pas être utilisés car ils pourraient endommager les nématodes au cours du prélèvement. L'échantillonnage doit être effectué si possible sur un sol humide, sinon il peut être nécessaire de prélever les échantillons dans des couches du sol plus profondes, par ex. 30-60 cm. Les échantillons sont prélevés sur le site en suivant une grille, par exemple 20 sous-échantillons pour des surfaces allant jusqu'à 0,2 ha, et 40 pour des surfaces entre 0,2 et 4 ha. Un autre schéma d'échantillonnage (plus intensif, mais utilisé dans certains pays) consiste à diviser le site en unités de 0,2 ha et à prélever 60 sous-échantillons dans chacune de ces unités. Des échantillons supplémentaires doivent être prélevés dans les bordures qui entourent le site.

L'extraction des nématodes du sol est réalisée à l'aide d'une méthode comme, par exemple, celle de Flegg (1967) qui nécessite peu de matériel spécialisé: mélanger soigneusement l'échantillon de sol et mesurer deux sous-échantillons de 200 mL, par déplacement du même volume d'eau. Laisser tremper dans l'eau chaque sous-échantillon pendant au moins 1 h, puis le laver dans un tamis de maille de 4 mm, placé au-dessus d'un seau de 10 L, qui sera rempli jusqu'au bord. Agiter à la main le contenu du seau afin de mettre le sol en suspension. Laisser reposer 25 s avant de décanter le surnageant sur une série de trois tamis de maille de 150 µm. Remplir le seau et, à nouveau, agiter la suspension, puis laisser reposer 15 s avant de décanter. Rincer les débris collectés sur les tamis et les transférer sur un tamis en nylon de maille de 110 µm. Placer le tamis sur un entonnoir en verre et verser la quantité d'eau nécessaire pour recouvrir les débris situés à la surface du tamis. Laisser reposer 24 h puis récupérer 25 mL à la base de l'entonnoir (ceci peut s'effectuer à l'aide d'un entonnoir se terminant par un tube de caoutchouc fermé par une pince) et examiner au grossissement $\times 25$. Le comptage des nématodes peut se faire au grossissement $\times 25$, mais l'identification des espèces ne peut être réalisée que par un taxonomiste expérimenté à un grossissement bien supérieur.

Les nématodes peuvent être testés directement pour détecter la présence de virus en disloquant un petit nombre de nématodes adultes (>5 nématodes) dans un tampon phosphate (pH 6,9) et en inoculant la

suspension à des feuilles de *Chenopodium quinoa*. Une méthode indirecte de test pour détecter la présence de virus dans les nématodes consiste à cultiver, pendant 3 semaines, des *Petunia hybrida* servant d'appât dans des pots contenant du sol collecté en plein champ et infesté par les nématodes, puis de tester les racines pour détecter la présence de virus à l'aide d'une inoculation à des plantes indicatrices.

Annexe V Directives sur la multiplication *in vitro*

La micropropagation des porte-greffe de cerisier est couramment pratiquée dans plusieurs laboratoires européens, soit pour assurer une multiplication rapide et intensive du matériel de plantation, soit pour éliminer les virus (voir Annexe III). Pour les cerisiers, la multiplication *in vitro* peut être utilisée pour la plupart des porte-greffe, et l'expérience acquise est désormais suffisante pour qu'elle soit généralement recommandée. En général, la multiplication *in vitro* est plus aisée pour du matériel qui se multiplie facilement par greffage, mais elle est plus utile pour du matériel qui est difficile à multiplier par d'autres moyens. Aujourd'hui, cette méthode s'applique facilement pour *P. avium*, *P. cerasus* et *P. mahaleb*. De nombreux hybrides interspécifiques (par ex. Colt, Maxma 14) sont également multipliés *in vitro*. En général, la multiplication *in vitro* n'offre pas d'avantage particulier pour les scions qui ne seront pas cultivés sur leurs propres racines.

La culture *in vitro* peut aussi être utilisée pour conserver du matériel qui sera ainsi protégé de tout risque de contamination :

- en étant remis, toutes les 3 semaines, en culture. Seules les pousses axillaires doivent être prélevées comme explants, et la formation de cal doit être limitée afin d'éviter une dérive génétique par variation somaclonale;
- en étant conservé à 4°C, à la lumière ou à l'obscurité, pendant plusieurs mois, sans faire l'objet de sous-cultures;
- en congelant les apex (méristèmes avec plusieurs primordiums foliaires) dans l'azote liquide à -176 °C après traitement avec un protecteur ou inclusion dans l'alginate.

Le nouveau matériel de porte-greffe, multiplié *in vitro*, doit être multiplié à nouveau afin d'en vérifier les caractéristiques pomologiques et juvéniles avant d'effectuer le greffage. Tout matériel commercialisé qui a été multiplié *in vitro* doit de préférence être identifié comme tel.

References

- Anon (1970) *La Thémothérapie des Espèces Ligneuses*. Station de cultures fruitières et maraîchères, Gembloux (BE).
- Anon (1998) International Working Group on fruit-tree viruses – ISHS. Detection of virus and virus-like

diseases of fruit trees: laboratory assays, bioassays and indicators. *Acta Horticulturae* No. 472, 761-783.

Flegg JJM (1967) Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* spp. from soil by a modification of Cobb's decanting and sieving technique. *Annals of Applied Biology* **60**, 429-437.

Fridlund P (1989) Thermotherapy. In: *Virus and Virus-like Diseases of Pome Fruits and Simulating Noninfectious Disorders* (Ed. Fridlund P), pp. 284-295. Cooperative Extension, Washington State University, Pullman (US).

Németh M (1986) *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*, pp. 135-139. Martinus Nijhoff, Dordrecht (NL).

Tableau 1 Virus et autres pathogènes des variétés et porte-greffe de cerisiers (*Prunus avium*, *P. cerasus*, *P. mahaleb* et hybrides interspécifiques) présents dans la région OEPP et devant être testés dans le schéma de certification

| Virus | Acronyme |
|---|-----------------|
| <i>Apple chlorotic leaf spot trichovirus</i> | ACLSV |
| <i>Apple mosaic ilarvirus</i> | ApMV |
| <i>Arabis mosaic nepovirus</i> | ArMV |
| <i>Petunia asteroid mosaic tombusvirus</i> et <i>Carnation Italian ringspot tombusvirus</i> , agents du cherry detrimental canker | PAMV, CIRV |
| <i>Cherry green ring mottle foveavirus</i> | CGRMV |
| <i>Cherry leaf roll nepovirus</i> | CLRV |
| <i>Little cherry closteroviruses 1 et 2</i> | LChV-1, LChV-2 |
| <i>Cherry mottle leaf trichovirus</i> | ChMLV |
| <i>Prune dwarf ilarvirus</i> | PDV |
| <i>Prunus necrotic ringspot ilarvirus</i> | PNRSV |
| <i>Raspberry ringspot nepovirus</i> | RpRSV |
| <i>Strawberry latent ringspot nepovirus</i> | SLRSV |
| <i>Tomato black ring nepovirus</i> | TBRV |
| Maladies analogues aux virus | |
| Necrotic rusty mottle | |
| Rusty mottle (européen) | |

Tableau 2 Méthodes de détection des virus des cerisiers

| | |
|------------------------------------|---|
| ACLSV | |
| Test ligneux (plein champ) | GF305 issu de semence (ou Elberta) (3/-/2y) (marbrure concave vert foncé sur les feuilles) |
| Tests ligneux (serre) | GF305 issu de semence (5/20/12w) (marbrure concave vert foncé sur les feuilles) |
| Tests herbacés | <i>Chenopodium quinoa</i> , <i>Chenopodium amaranticolor</i> |
| Tests sérologiques ou moléculaires | ELISA, PCR et IC-PCR |
| Transmission naturelle | Inconnue |
| ApMV | |
| Test ligneux (plein champ) | GF305 issu de semence (3/-/2y) (les feuilles infectées présentent des anneaux, taches, bandes ou taches digitées, de couleur vert pâle, vert jaunâtre ou jaune vif) |
| Tests ligneux (serre) | GF305 issu de semence (5/20/12w) (les feuilles infectées présentent des anneaux, taches, bandes ou taches digitées, de couleur vert pâle, vert jaunâtre ou jaune vif) |
| Tests herbacés | Plus de 65 espèces de plantes herbacées de 19 familles sont sensibles à l'inoculation mécanique. Parmi elles, on trouve <i>C. quinoa</i> , <i>C. amaranticolor</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Cucurbita maxima</i> , <i>Nicotiana clevelandii</i> , <i>Petunia hybrida</i> |
| Tests sérologiques ou moléculaires | ELISA, PCR |
| Transmission naturelle | Inconnue |

ArMV

| | |
|------------------------------------|--|
| Test ligneux (plein champ) | Bing (3/-/2y) (énaions, excroissances à la face inférieure des feuilles) GF305 issu de semence (3/-/2y) (plante rabougrie, entre-nœuds courts et rosette) |
| Tests ligneux (serre) | GF305 issu de semence (5/20/12w) (plante rabougrie, entre-nœuds courts et rosette) |
| Tests herbacés | <i>C. quinoa</i> , <i>C. amaranticolor</i> , <i>C. sativus</i> |
| Tests sérologiques ou moléculaires | ELISA |
| Transmission naturelle | <i>Xiphinema diversicaudatum</i> |

Detrimental canker (causé par des tombusvirus comme PAMV et CIRV)

| | |
|------------------------------------|---|
| Test ligneux (plein champ) | Bing, Sam (3/-/2y) (nécrose des nervures principales des feuilles, enroulement du limbe, nécrose des pousses entraînant une courbure rectangulaire) |
| Tests ligneux (serre) | - |
| Tests herbacés | <i>C. quinoa</i> , <i>C. amaranticolor</i> , <i>C. Sativus</i> |
| Tests sérologiques ou moléculaires | ELISA |
| Transmission naturelle | Inconnue |

CGRMV

| | |
|------------------------------------|--|
| Test ligneux (plein champ) | Kwanzan, Shirofugen (3/-/2y) (épinastie du feuillage, nervures centrales ou latérales nécrotiques, déformation et enroulement des feuilles infectées. Des fissures longitudinales apparaissent souvent dans l'écorce, ce qui la rend rugueuse) |
| Tests ligneux (serre) | - |
| Tests herbacés | Impossible, à l'heure actuelle |
| Tests sérologiques ou moléculaires | PCR |
| Transmission naturelle | Inconnue |

CLRV

| | |
|------------------------------------|--|
| Test ligneux (plein champ) | Bing (3/-/2y) (anneaux chlorotiques sur les feuilles, rosette) GF305 issu de semence (3/-/2y) (rabougrissement de la plante, entre-nœuds courts et rosette, léger enroulement foliaire) |
| Tests ligneux (serre) | GF305 issu de semence (5/20/12w) (rabougrissement de la plante, entre-nœuds courts et rosette, léger enroulement foliaire) |
| Tests herbacés | <i>C. quinoa</i> , <i>Nicotiana</i> spp., <i>C. sativus</i> |
| Tests sérologiques ou moléculaires | ELISA |
| Transmission naturelle | Transmission par les nématodes douteuse |

LChV-1 et LChV-2

| | |
|------------------------------------|--|
| Test ligneux (plein champ) | Sam, Canindex (3/-/2y) (coloration rouge et bronze des feuilles à partir d'août, tissus le long des nervures principales et nervures principales restant vertes) |
| Tests ligneux (serre) | - |
| Tests herbacés | - |
| Tests sérologiques ou moléculaires | PCR |
| Transmission naturelle | Inconnue |

CMLV

| | |
|------------------------------------|--|
| Test ligneux (plein champ) | Sam, Bing (3/-/2y) (marbrure chlorotique irrégulière et déformation des feuilles) |
| Tests ligneux (serre) | GF305 issu de semence (5/20/12w) (les souches virulentes provoquent une marbrure jaunâtre sur le bord des feuilles. Les souches latentes peuvent être détectées par protection croisée. L'absence de symptômes sur les plantes indicatrices inoculées avec une souche virulente démontre la présence d'une souche latente du CMLV) |
| Tests herbacés | <i>C. quinoa</i> , <i>C. amaranticolor</i> , <i>Nicotiana occidentalis</i> |
| Tests sérologiques ou moléculaires | ELISA (anticorps polyclonaux et monoclonaux), PCR ² |
| Transmission naturelle | <i>Eriophyes inaequalis</i> |

PDV

| | |
|------------------------------------|---|
| Test ligneux (plein champ) | Bing (3/-/2y) (taches et anneaux chlorotiques sur les feuilles; au cours de la première année, étiations le long de la nervure principale) Shirofugen (5/-/16-52w) (tissus nécrotiques et gommose autour du bourgeon source inséré dans des pousses de 1 an) |
| Tests ligneux (serre) | GF305 issu de semence (5/20/12w) (les feuilles infectées sont plus petites. La plante est rabougrie et les entre-nœuds sont raccourcis) Shirofugen (5/22-26/8w) (tissus nécrotiques et gommose autour du bourgeon source inséré dans des pousses de 1 an) |
| Tests herbacés | <i>C. sativus</i> , <i>C. maxima</i> |
| Tests sérologiques ou moléculaires | ELISA, PCR |
| Transmission naturelle | Pollen, semences |

PNRSV

| | |
|------------------------------------|--|
| Test ligneux (plein champ) | Bing (3/-/2y) (taches et anneaux chlorotiques sur les feuilles, étiations entre les nervures sur le bord des feuilles) Shirofugen (5/-/16-52w) (tissus nécrotiques et gommose autour du bourgeon source, inséré dans des pousses de 1 an) |
| Tests ligneux (serre) | GF305 issu de semence (5/20/12w) (zones nécrotiques irrégulières sur les feuilles infectées; nécrose des pousses) Shirofugen (5/22-26/8w) (tissus nécrotiques et gommose autour du bourgeon source, inséré dans des pousses de 1 an) |
| Tests herbacés | <i>C. quinoa</i> , <i>C. sativus</i> , <i>C. maxima</i> |
| Tests sérologiques ou moléculaires | ELISA, PCR |
| Transmission naturelle | Pollen, semences |

RpRSV (agent de Pfeffinger disease)

| | |
|------------------------------------|---|
| Test ligneux (plein champ) | Bing (3/-/2y) (taches "huileuses" vert jaunâtre, feuilles déformées avec des sillons profonds. Symptômes secondaires: feuilles rapeuses et étroites, raides et cassantes) |
| Tests ligneux (serre) | GF305 issu de semence (5/20/12w) (marbrure chlorotique jaune le long de la nervure principale, feuilles étroites et ondulées) |
| Tests herbacés | <i>C. quinoa</i> , <i>C. amaranticolor</i> |
| Tests sérologiques ou moléculaires | ELISA, PCR |
| Transmission naturelle | Semences, nématodes (<i>Longidorus macrosoma</i> et <i>L. elongatus</i>) |

² Selon l'expérience européenne actuelle, ces méthodes ne donnent un résultat positif qu'avec les isolats nord-américains.

SLRSV

| | |
|------------------------------------|--|
| Test ligneux (plein champ) | Bing (3/-/2y) (feuilles rapeuses et étroites, rosette) |
| Tests ligneux (serre) | GF305 issu de semence (5/20/12w) (rabougrissement de la plante, entre-nœuds raccourcis et rosette) |
| Tests herbacés | <i>C. quinoa</i> , <i>C. sativus</i> , <i>C. amaranticolor</i> |
| Tests sérologiques ou moléculaires | ELISA |
| Transmission naturelle | <i>Xiphinema diversicaudatum</i> |

TBRV

| | |
|------------------------------------|--|
| Test ligneux (plein champ) | GF 305 issu de semence, Elberta, Bing (3/-/2y) (rabougrissement de la plante, entre-nœuds raccourcis et rosette) |
| Tests ligneux (serre) | GF305 issu de semence (5/20/12w) (rabougrissement de la plante, entre-nœuds raccourcis et rosette) |
| Tests herbacés | <i>C. quinoa</i> , <i>C. sativus</i> , <i>C. amaranticolor</i> |
| Tests sérologiques ou moléculaires | ELISA |
| Transmission naturelle | <i>Longidorus elongatus</i> , <i>L. attenuatus</i> |

Tableau 3 Méthodes de détection des analogues aux virus des cerisiers**Cherry necrotic rusty mottle**

| | |
|------------------------------------|---|
| Test ligneux (plein champ) | Sam (3/-/2y) (jaunisse des jeunes feuilles, petites arabesques et taches annulaires suivies de nécrose) |
| Tests ligneux (serre) | - |
| Tests herbacés | - |
| Tests sérologiques ou moléculaires | PCR avec des amorces apparentées au CGRMV |
| Transmission naturelle | Inconnue |

Cherry rusty mottle (européen)

| | |
|------------------------------------|---|
| Test ligneux (plein champ) | Sam, Bing (3/-/2y) (les feuilles atteintes prennent progressivement une coloration vert pâle. A la fin d'août, une marbrure rouge apparaît) |
| Tests ligneux (serre) | - |
| Tests herbacés | Impossible, à l'heure actuelle |
| Tests sérologiques ou moléculaires | PCR avec des amorces apparentées au CGRMV |
| Transmission naturelle | Inconnue |

Tableau 4 Nématodes vecteurs des virus des cerisiers

| | |
|----------------------------------|-------------|
| Nématode vecteur | Virus |
| <i>Xiphinema diversicaudatum</i> | ArMV, SLRSV |
| <i>Longidorus macrosoma</i> | RpRSV |
| <i>Longidorus attenuatus</i> | TBRV |
| <i>Longidorus elongatus</i> | TBRV, RpRSV |

Fig. 1 Diagramme des stades du schéma de certification des cerisiers: variétés

A- scion varieties/variétés

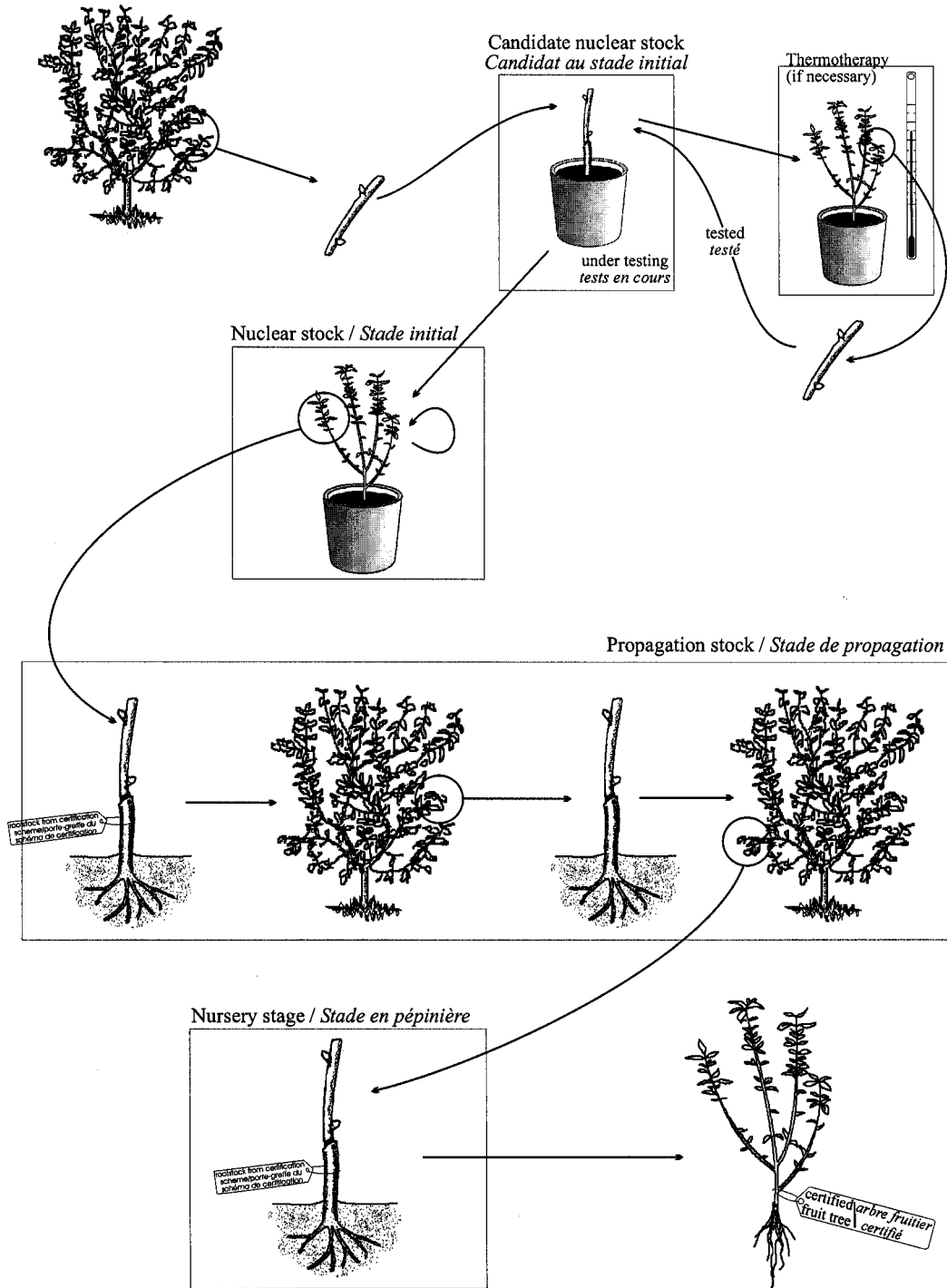


Fig. 2 Diagramme des stades du schéma de certification des cerisiers: porte-greffe

