

◆ Normes OEPP ◆

SCHEMAS DE CERTIFICATION

CERTIFICATION SANITAIRE DES ARBRES
ET PORTE-GREFFE D'AGRUMES

PM 4/12(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 certification et de classification de l'OEPP sont destinés aux Organisations Nationales de Protection des Végétaux 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

Filiation: Lignée d'une plante à partir d'un parent identifié.

Matériel certifié: Matériel produit à partir du matériel de propagation dans des conditions adéquates.

Matériel de propagation: Matériel issu de la multiplication du matériel initial, dans des conditions garantissant l'absence de contamination. L'absence de pathogènes est contrôlée selon une procédure appropriée. Le matériel issu du matériel de propagation dans les mêmes conditions reste du matériel de propagation, mais, en fonction de l'espèce végétale concernée, un nombre maximum de générations peut être déterminé à ce stade.

Matériel initial: Matériel testé individuellement à l'aide des procédures les plus rigoureuses du schéma. Le matériel issu du matériel initial peut rester du matériel initial dans certaines conditions. Tout ce matériel doit être constamment maintenu dans des conditions strictes garantissant l'absence de contamination.

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 de matériel candidat 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.

VUE D'ENSEMBLE

Un schéma de certification ou de classification de l'OEPP 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 certification et de classification de l'OEPP 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.

Schéma de certification

CERTIFICATION SANITAIRE DES ARBRES ET PORTE-GREFFE D'AGRUMES

Champ d'application spécifique

Cette norme décrit la production de matériel certifié d'arbres et porte-greffe d'agrumes.

Approbation et amendement spécifiques

Première approbation en septembre 1995.
Edité sous forme de Norme OEPP en 1998.

Pour produire des arbres et des porte-greffe de *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella* et leurs hybrides certifiés, les étapes successives décrites ci-dessous doivent être suivies. Elles sont présentées 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). Les stades du schéma de certification sont illustrés à la figure 1. Les indications à suivre pour les arbres greffés, les porte-greffe et les semences pour porte-greffe sont présentées séparément. Tout au long de la procédure, des précautions doivent être prises pour conserver les caractéristiques pomologiques du matériel sélectionné au départ. Des contrôles peuvent être effectués pour détecter d'éventuelles mutations ou mutations réverses, surtout pour les variétés.

1. Sélection du matériel

Variétés

Sélectionner dans différents vergers et/ou dans des parcelles d'essais pomologiques un certain nombre d'arbres en production, présentant les caractères typiques de chaque variété à prendre en compte dans le schéma (authenticité variétale). Il peut être utile d'effectuer des essais sérologiques rapides sur du matériel prélevé sur ces arbres.

Arbres pour la production de semences pour porte-greffe

Sélectionner dans différents vergers ou plantations des arbres vigoureux, en production, pour chaque type de porte-greffe à prendre en compte dans le schéma. Pour les espèces pour lesquelles des virus transmissibles par les semences sont connus, choisir des arbres sans symptômes apparents, ou affectés le moins possible par ces maladies. Les arbres sélectionnés doivent être reconnus capables de fournir une descendance à croissance homogène, sinon des études doivent être menées à ce sujet

2. Production du matériel initial

Procédure générale

Prélever le matériel de propagation sur des arbres sélectionnés pour leurs qualités pomologiques. Ecussonner ou greffer ce matériel sur des porte-greffe indemnes de virus. Conserver ces plantes (arbres candidats au stade de matériel initial) dans un abri insect-proof, isolé, et séparé du matériel initial (en quarantaine) pendant la période de test. Les plantes doivent être cultivées sur un substrat stérilisé dans des conteneurs isolés du sol pour éviter tout type de contamination. Des tests doivent être effectués sur les plantes pour les virus, phytoplasmes et maladies cités au tableau 1, à l'aide des méthodes de l'annexe I¹.

Si le matériel sélectionné donne un résultat négatif au test, la plante candidate correspondante pourra être considérée comme appartenant au matériel initial et transplantée dans la parcelle du matériel initial, ou multipliée pour donner du matériel initial.

Elimination des pathogènes

Pour les plantes pour lesquelles aucun matériel sélectionné n'a donné de résultat négatif, ainsi que pour tout matériel soupçonné d'être infecté, la production de clones nucellaires, la thérapie ou le greffage d'apex peuvent être utilisés comme méthodes de sélection sanitaire (annexe II).

¹ Les agents pathogènes cités sont ceux qui sont présents dans la région OEPP. L'importation d'agrumes en provenance d'autres continents est généralement interdite, aussi tout matériel de ce type devrait être accompagné d'un permis et soumis à la quarantaine post-entrée sous le contrôle de l'Organisation nationale de protection des végétaux. Une méthode phytosanitaire de l'OEPP est en cours de préparation concernant les tests pour les virus et organismes analogues non-européens des agrumes. Le matériel en quarantaine peut aussi passer par le greffage apical pour le régénérer.

Inspection sur d'autres organismes nuisibles

En dehors des maladies et pathogènes mentionnés ci-dessus, tous les matériels (variétés, arbres destinés à la production de semences) doivent également être contrôlés pour vérifier l'absence d'autres organismes nuisibles qui peuvent être transmis par le matériel de propagation. En particulier, ceci doit être effectué pour *Aleurothrixus floccosus* et *Parabemisia myricae*; *Deuterophoma tracheiphila*, *Phytophthora citrophthora* et *P. parasitica*.

3. Maintien du matériel initial

Maintenir les plantes du matériel initial dans un lieu où les conditions garantissent l'absence de recontamination. Les plantes sont cultivées dans un substrat stérilisé dans des conteneurs isolés du sol, et de préférence dans un abri inaccessible aux insectes (insect-proof). Si possible, conserver *in vitro* une partie du matériel source pour chaque variété, ou type de porte-greffe.

Maintenir un nombre limité de plantes du matériel initial (au moins 2) de chaque source, pour chaque variété ou arbre destiné à la production de semences admis dans le schéma, et s'assurer que l'authenticité variétale a bien été conservée. Maintenir au début toutes les sources pour chaque variété ou arbre destiné à la production de semences. Toutefois, le nombre de sources peut être réduit lorsque les comparaisons pomologiques ont été réalisées et que les meilleures sources sont connues.

Chaque plante maintenue dans cette collection de matériel initial doit être testée tous les 3 ans pour vérifier l'absence de viroïdes et tous les 6 ans pour les virus et pathogènes analogues (tableau 1). Des essais sérologiques pour détecter le citrus tristeza closterovirus doivent être effectués sur les plantes tous les 1-2 ans. Les plantes doivent être maintenues indemnes de *D. tracheiphila*. Elles doivent également être visuellement inspectées tous les ans pour détecter les éventuelles mutations ou mutations réverses.

4. Production de matériel de propagation

Multiplier le matériel initial, avec le moins d'étapes possibles, pour obtenir une quantité suffisante de matériel de propagation. Cette multiplication peut être réalisée *in vitro*. Le matériel de propagation doit être placé dans un abri insect-proof, ou dans des parcelles séparées d'au moins 100 m de tout matériel d'agrumes non certifié et raisonnablement éloignées des sources de contamination. Par exemple, une zone de 2 m de large autour de la parcelle peut être maintenue indemne de toute végétation. Noter que l'eau d'irrigation peut être une source d'infection par des pathogènes et leurs vecteurs.

Dans les pays où *D. tracheiphila* est présent, le matériel de propagation de *Citrus limon* (citronnier), *C. aurantifolia* (lime) et *C. bergamia* (bergamote) doit être placé dans des parcelles où aucune de ces espèces

n'a été cultivée depuis au moins 5 ans. Les plantes-mères de ces espèces doivent être couvertes par un filet (filet blanc en plastique utilisé habituellement pour protéger les arbres contre les dégâts du vent et de la grêle) afin d'éviter des contaminations par *D. tracheiphila*.

Le matériel de propagation doit être surveillé de façon continue et traité régulièrement avec les produits phytosanitaires appropriés, afin de contrôler les organismes nuisibles attaquant habituellement les agrumes. Les arbres destinés à la production des variétés ne doivent pas être conservés plus de 30 ans et les arbres destinés à la production de semences pour porte-greffe ne doivent pas être gardés plus de 40 ans.

Inspecter visuellement le matériel de propagation chaque année pour vérifier l'absence de symptômes d'attaques par des virus (au moment approprié, c'est-à-dire quand les symptômes sont susceptibles d'être les plus visibles) et d'autres nuisibles (par ex. *A. floccosus* et *Parabemisia myricae*), ainsi que pour détecter les possibles mutations ou mutations réverses. Les plantes doivent être testées pour les virus et pathogènes analogues, de sorte que chacune ait été testée au moins une fois au bout de 10 ans. Dans les pays où le citrus tristeza closterovirus est présent, les plantes doivent être testées pour ce virus par la méthode ELISA au moins une fois par an.

Les stades 1-4 ne peuvent être réalisés que par des établissements spécialisés, officiellement agréés et répondant à un certain nombre de critères donnés (OEPP/EPPO, 1993).

5. Distribution du matériel de propagation et production de matériel certifié

Distribuer aux pépinières le matériel issu du matériel de propagation, sous strict contrôle officiel. Dans l'absolu, une organisation officielle ou officiellement reconnue devrait effectuer cette distribution. La production des plantes certifiées ne peut être réalisée que par des établissements spécialisés et agréés, pour lesquels les critères d'admission sont moins stricts que pour les stades 1-4 (OEPP/EPPO, 1993). Le producteur doit noter le nombre de plantes-mères pour chaque catégorie, en justifiant l'origine du matériel de propagation indemne de virus par des documents officiels.

Là où un risque d'infection par *Phytophthora citrophthora* existe, le point de greffe ne doit pas être situé à moins de 40 cm de la base du tronc. S'il est nécessaire, exceptionnellement, de regreffer (avec du matériel appartenant au même cultivar, d'origine et d'état sanitaire identiques), la distance entre le point de greffe et la base du tronc doit être de 35 cm.

Le matériel certifié est placé dans des pépinières indemnes de *Pratylenchus vulnus* et pratiquement indemnes de *Tylenchulus semipenetrans*, *Phytophthora citrophthora* et *P. parasitica* (ou ayant subi une fumigation, puis un nouveau test pour vérifier l'absence de ces organismes nuisibles); les pépinières doivent être séparées d'au moins 15 m de tout matériel

d'agrumes non certifié, et raisonnablement éloignées des sources de contamination. Par exemple, une zone de 2 m de large autour de la parcelle peut être maintenue indemne de toute végétation. Noter que l'eau d'irrigation peut être une source d'infection par des pathogènes et leurs vecteurs.

Dans les pays où *D. tracheiphila* est présent, les citronniers doivent être protégés par un filet (filet blanc en plastique utilisé habituellement pour protéger les arbres contre les dégâts du vent et de la grêle) afin d'éviter des contaminations par *D. tracheiphila*.

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

L'utilisation du matériel de propagation dans les pépinières pour produire du matériel certifié doit être vérifiée par une organisation officielle ou officiellement agréée qui contrôle l'état sanitaire, l'origine et le nombre de plantes indemnes de virus, en se basant sur les inspections au champ, les rapports et les documents présentés par le pépiniériste. Au cours de la production du matériel certifié dans les pépinières, plusieurs tests par sondage peuvent être effectués si l'on dispose de méthodes de test rapides pour les virus des agrumes (par ex. test ELISA).

Le programme de protection phytosanitaire de la pépinière et les inspections doivent prendre en compte les maladies fongiques et bactériennes ainsi que les ravageurs (par ex. *A. floccosus* et *Parabemisia myricae*), afin que le matériel certifié, vendu au producteur, soit pratiquement indemne de ces organismes nuisibles.

7. Certification

Les autorités responsables de la certification délivrent les certificats au pépiniériste, sur la base des points 4, 5 et 6. Pour diverses raisons (mais cela dépend des systèmes de certification et de production des différents pays) l'étiquetage de chaque arbre est une excellente manière de délivrer les certificats. Le nombre exact d'étiquettes est ainsi délivré et leur utilisation est officiellement contrôlée.

Le matériel certifié d'agrumes destiné à l'exportation doit, dans tous les cas, répondre aux exigences phytosanitaires des pays importateurs, en particulier pour ce qui concerne les nuisibles couverts par le schéma qui sont également des organismes de quarantaine.

ANNEXE I

Directives sur les méthodes de test

1. Tests sur *Citrus* indicateurs

L'utilisation de citrus comme plantes indicatrices est une étape obligatoire dans tous les programmes de certification des agrumes. Ce type de test ne peut être

omis car plusieurs maladies, dont certaines sont d'une grande importance économique, ne peuvent être identifiées que sur des hôtes différentiels ligneux. La méthode consiste à inoculer par greffage les plantes indicatrices, en utilisant un greffon prélevé sur les plantes candidates ou suspectes, puis à observer l'apparition de symptômes sur les nouvelles pousses des plantes sensibles. Les symptômes sont généralement spécifiques et très caractéristiques pour un grand nombre de maladies. Les tests doivent être effectués, de préférence, dans une serre où la température est modulable dans des unités particulières, afin de pouvoir placer les plantes à une température permettant l'expression des symptômes. Deux méthodes de greffage peuvent être utilisées:

(a) greffage d'écussons, de lambeaux d'écorce ou d'autres inoculum sur de jeunes plants issus de semis de la plante indicatrice (méthode utilisée dans la majorité des cas);

(b) méthode de support: des lambeaux d'écorce, puis la plante indicatrice, sont greffés sur un porte-greffe (méthode recommandée pour la cachexie-xyloporose).

Les principales plantes indicatrices pour les virus et pathogènes analogues des agrumes dans la région OEPP sont présentées au tableau 2.

2. Inoculation sur plantes herbacées

L'utilisation de plantes indicatrices herbacées permet de détecter les virus mécaniquement transmissibles, y compris ceux de moindre importance. Cette méthode est considérée comme un complément aux autres méthodes de diagnostic, mais ne les remplace pas. Elle peut être utile, par exemple, pour un premier criblage ou pour des tests réalisés par sondage.

3. Tests sérologiques

Le test ELISA permet d'effectuer à grande échelle des tests sur les virus des agrumes pour lesquels des antisérums sont disponibles. Il doit, toutefois, faire face aux limites inhérentes à toute technique sérologique, comme le fait que les virus des agrumes sont généralement présents dans l'arbre à très faible concentration, qu'ils peuvent avoir une distribution inégale ou être temporairement non détectés pendant les périodes estivales à fortes températures. La technique d'immunoempreinte offre aussi des possibilités intéressantes d'utilisation en routine pour traiter un grand nombre d'échantillons, mais possède les mêmes limites que le test ELISA.

4. Electrophorèse PAGE

Les viroïdes des agrumes, parmi lesquels ceux de l'exocortis et de la cachexie, peuvent désormais être détectés par isolement de la molécule du viroïde à l'aide de l'électrophorèse sur gel, ouvrant ainsi des possibilités pour l'identification des souches spécifiques.

5. Détection des maladies individuelles

Citrus tristeza closterovirus

Plante indicatrice: Lime mexicaine (*Citrus aurantifolia*)

Nb. de plants/test: 3-5 plants issus de semis

Inoculum: 3 lambeaux d'écorce pour chaque plant

Température: 18-26°C

Symptômes: Les symptômes apparaissent au bout de 3-4 semaines sous la forme d'éclaircissement des nervures, suivi du développement de striures sur le bois des jeunes branches. La sévérité des striures indique la sévérité de la souche du virus présente dans l'inoculum

Autres tests: Sérologie (ELISA, ISEM).

Citrus ringspot virus et autres membres du complexe psorose

Plante indicatrice: Oranger (*Citrus sinensis*) cvs Pineapple, Madam Vinous, Hamlin, Dweet tangor

Nb. de plants/test: 3-5 plants issus de semis

Inoculum: 3 lambeaux d'écorce

Température: 18-26°C

Symptômes: Les symptômes apparaissent au bout de 1-4 mois sous la forme de taches claires de part et d'autre de la nervure centrale prenant l'aspect d'un feuille de chêne, ou de taches claires le long des nervures secondaires, parfois en forme d'anneaux sur les feuilles matures. Le dépérissement rapide des nouvelles pousses est généralement suivi d'un rétablissement. Les plantes doivent être conservées pendant au moins 6 mois. Les symptômes sont souvent transitoires, ce qui implique que l'inspection régulière des nouvelles pousses est essentielle. Les poussées de croissance du printemps et de l'automne sont plus favorables à l'expression des symptômes sur les plantes indicatrices. Lors des tests en vue de la certification, il n'est pas essentiel de déterminer le type de psorose présent.

Citrus exocortis viroid

Plante indicatrice: Cédrat Etrog (*Citrus medica*) 60-13, 861-S1 ou autres sélections

Nb. de plants/test: 2-4 plants

Inoculum: Dans la mesure où Etrog est généralement mono-embryonnaire, les plants issus de semis ne doivent pas être utilisés. Etrog est greffé sur n'importe quel plant vigoureux. Le greffage est réalisée avec 2 lambeaux d'écorce par plante

Température: 26-35°C

Symptômes: Les symptômes apparaissent après la première poussée de croissance, environ 4-6 semaines après l'inoculation. Le symptôme le plus marquant est l'épinastie foliaire. Des souches faibles peuvent provoquer seulement quelques craquelures à la face inférieure de la nervure centrale et des pétioles et un brunissement

Autres tests: Electrophorèse PAGE, 3-4 mois après l'écussonnage sur cédrat Etrog.

Citrus cachexia-xyloporosis viroid

Plante indicatrice: Mandarinier Parsons special (*Citrus reticulata*), cédrat Etrog 861-S1

Nb. de plants/test: 4-5 plants

Inoculum: La méthode du support est recommandée, en utilisant *Citrus jambhiri* ou tout autre plant vigoureux issu de semis comme porte-greffe. Sur ces plants sont greffés des écussons du mandarinier cv. Parsons special, ainsi que trois lambeaux d'écorce prélevés sur l'arbre candidat

Température: 26-35°C

Symptômes: Gomme sous l'écorce et au point d'attache des bourgeons, et striures du bois

Autres tests: Electrophorèse PAGE, 3 mois après écussonnage sur cédrat Etrog.

Spiroplasma citri

Plante indicatrice: Oranger cvs Pineapple ou Madam Vinous, Dweet tangor

Nb. de plants/test: 3-5 plants issus de semis

Inoculum: Le meilleur inoculum est le jeune feuillage (lambeaux de feuilles avec nervure principale)

Température: 26-34°C

Symptômes: Les symptômes apparaissent au bout de 1-6 mois après l'inoculation. Les réactions positives comportent un rabougrissement général, des entrenœuds courts, et de petites feuilles souvent incurvées vers le haut et marbrées. Le test est considéré

comme vraiment positif lorsque les plantes inoculées présentent une marbrure verte près de l'extrémité de la feuille. La maladie peut être détectée sur les arbres au champ dans certains pays, mais ce n'est pas le cas en Europe

Culture *in vitro*: Les jeunes feuilles et les extrémités des tiges sont coupées finement et placées dans un milieu nutritif. Le pathogène est identifié par microscopie à fond noir ou par microscopie électronique qui toutes deux révèlent la présence de petites spirales en rotation, ou par microscopie électronique de particules dans un milieu liquide. La croissance de *S. citri* change la couleur du milieu liquide, qui passe de rouge à ambre et provoque une légère turbidité dans les cultures au bout de 1-4 semaines.

Impietratura

Plante indicatrice: Oranger cvs Pineapple, Madam Vinous ou Hamlin, Dweet tangor

Nb. de plants/test: 3-5 plants issus de semis

Inoculum: 3 lambeaux d'écorce pour chaque plant

Température: 18-26°C

Symptômes: Les symptômes apparaissent au bout d'un an sous forme de dépôts de gomme dure dans l'écorce et le cœur du fruit. Des symptômes foliaires semblables à ceux de la psorose peuvent se produire mais ils ne suffisent pas pour établir un diagnostic.

Cristacortis

Plante indicatrice: Oranger cvs Pineapple, Madam Vinous ou Hamlin, Dweet tangor

Nb. de plants/test: 3-5 plants issus de semis

Inoculum: 3 lambeaux d'écorce pour chaque plant

Température: 18-26°C

Symptômes: Les symptômes apparaissent au bout de 10 mois ou plus. Des symptômes foliaires semblables à ceux de la psorose ou du concave gum peuvent apparaître mais ils ne suffisent pas à établir un diagnostic. Une désorganisation du cambium peut apparaître sous la forme de dépressions dans le bois.

Citrus leaf rugose ilarvirus

Indicateur: Lime mexicaine, citronnier Eureka, pomélo Duncan

Nb. de plants/test: 4-5 plants issus de semis

Inoculum: Deux écussons ou lambeaux d'écorce au minimum pour chaque indicateur

Température: 24-27°C

Symptômes: Rugosité variable des feuilles de la lime mexicaine, taches chlorotiques en tête d'épingle sur les feuilles en croissance du citronnier Eureka sans distorsion des feuilles, et rabougrissement prononcé et chlorose des plants du pomélo cv. Duncan

Autres tests: Le CLRV peut être détecté par inoculation mécanique à des hôtes herbacés et par des essais sérologiques (ELISA de préférence).

Citrus infectious variegation ilarvirus

Indicateur: Citronnier ou cédrat Etrog

Nb. de plants/test: 4-5 plants issus de semis

Inoculum: Deux écussons ou lambeaux d'écorce au minimum pour chaque indicateur

Température: 24-30°C

Symptômes: Le cédrat Etrog développe des symptômes de distorsion et de chlorose sur les feuilles, qui persistent sur le feuillage mature. Les arbres infectés peuvent être rabougris et certains fruits déformés ou atteints de plages chlorotiques. La gravité diffère en fonction des isolats

Autres tests: L'inoculation de *Phaseolus vulgaris* cv. Red Kidney par la sève induit l'apparition systémique de bandes brillantes le long des nervures et un éclaircissement des nervures des feuilles trifoliées. Le niébé (*Vigna sinensis*) inoculé à la sève montre des lésions chlorotiques/nécrotiques sur les feuilles primaires. Le CIVV peut aussi être détecté par des essais sérologiques (ELISA de préférence).

Citrus vein enation/woody gall

Indicateur: Lime mexicaine, *Citrus jambhiri*

Nb. de plants/test: 4-5 plants issus de semis

Inoculum: Lambeaux d'écorce

Température: 18-26°C

Symptômes: Des étiations apparaissent à la face inférieure des feuilles. des galles ou des bourrelets se développent sur les troncs de *C. jambhiri*.

Satsuma dwarf virus

Indicateur: *Citrus natsudaidai*, cédrat, sour lemon, Dweet tangor, mandarinier ou satsuma

Nb. de plants/test: 4-5 plants issus de semis

Inoculum: Deux écussons ou lambeaux d'écorce au minimum sont greffés sur la partie inférieure du plant indicateur

Température: Températures fraîches, ne dépassant pas 26°C maximum le jour, 12-18°C minimum la nuit

Symptômes: En général, les symptômes induits sur les plants indicateurs sont similaires à ceux induits par le CIVV. Les jeunes feuilles présentent des tâches, marbrures et chloroses semblables à celles de la psorose. Les feuilles matures peuvent être courbées et recroquevillées. Arabesques et feuilles déformées sont communément observées

Autres tests: La méthode ELISA, utilisant un sérum anti-SDV est recommandé pour l'indexage du SDV. L'inoculation mécanique sur sésame est également recommandée.

ANNEXE II

Méthodes d'amélioration sanitaire

Les méthodes d'élimination des pathogènes des agrumes comportent la production de clones nucellaires, la thermothérapie et le greffage d'apex. L'état sanitaire du matériel ainsi traité doit être testé.

Clones nucellaires

La production et la sélection de lignées nucellaires constituent une méthode classique pour obtenir des variétés indemnes des pathogènes intracellulaires. La plupart des variétés d'agrumes présentent le phénomène de polyembryonie nucellaire, c'est-à-dire la formation d'embryons nucellaires au sein de la semence. Les embryons nucellaires donnent des plantules conformes à la variété et sont indemnes des pathogènes qui peuvent contaminer l'arbre parent. Au cours des premières années, les clones nucellaires présentent des caractères juvéniles: croissance vigoureuse, présence d'épines, croissance verticale, mise à fruit tardive et alternance précoce. Les caractères juvéniles s'atténuent avec le temps, dans la mesure où le processus de vieillissement est associé à une répétition des divisions

cellulaires plutôt qu'à l'âge du clone nucellaire *per se*. Généralement 10-15 ans, voire plus, sont nécessaires pour que le processus de vieillissement permette une multiplication commerciale de jeunes plants nucellaires. Au cours du processus de production des clones nucellaires, la pollinisation est contrôlée en utilisant comme parent mâle *Poncirus trifoliata*, car le caractère trifolié est déterminé par un gène dominant, qui permet de différencier aisément à un stade précoce les plants nucellaires des plants sexués.

Thermothérapie

La thermothérapie est une méthode efficace pour éliminer le citrus tristeza closterovirus, la psorose et l'impetratura. Elle s'est révélée inefficace pour l'élimination des pathogènes suivants: citrus cachexia-xyloporosis viroid, citrus exocortis viroid, *Spiroplasma citri*. Plus récemment, la thermothérapie a été partiellement abandonnée avec le développement de la technique de greffage d'apex. Cependant, les deux méthodes peuvent être combinées pour obtenir de meilleurs résultats en matière d'élimination des virus.

Lorsque la thermothérapie est utilisée, il est essentiel de préparer les plantes avant le traitement. Elles doivent être cultivées à des températures élevées (32-40°C le jour et 26-30°C la nuit) pendant 1-3 mois avant le traitement. Les écussons prélevés sur les plantes ainsi préparées sont greffés sur des porte-greffe résistants à la chaleur. Les plantes greffées sont placées dans une chambre climatique sous une forte humidité et à une température initiale de 38-39°C, avec 16 h d'éclairage et 8 h à 30°C à l'obscurité. Au bout d'une semaine, la température est augmentée à 40-50°C. Les plantes greffées sont conservées à cette température pendant 8 à 12 semaines, elles sont ensuite transférées dans une serre où elles subiront un forçage. Les nouvelles pousses, après une période de croissance, sont testées pour vérifier l'absence de virus.

Greffage d'apex

La technique de greffage d'apex *in vitro* est réalisée à l'aide d'outils spéciaux dans des conditions aseptiques et comporte les étapes suivantes. Les plantules porte-greffe (issues de semis) sont cultivées sur un milieu gélosé à l'obscurité. Des pousses du matériel à régénérer d'environ 1 cm de long sont collectées et désinfectées au laboratoire. Les feuilles immatures sont éliminées puis, sous le microscope, un très petit apex (environ 0.1-0.2 mm) composé d'un méristème et de deux ou trois primordia foliaires est prélevé. L'apex est soigneusement inséré dans une encoche en 'T', réalisée à proximité de l'extrémité coupée de la plantule porte-greffe. La jeune plante greffée est cultivée sur un milieu nutritif pendant au moins 5 semaines sous éclairage (1000 lux Growlux) puis transplantée dans le sol ou greffée sur *C. jambhiri* ou *C. volkameriana*. Des tests sont alors effectués comme habituellement pour les virus et pathogènes analogues des agrumes.

Test du sol pour la présence de *Phytophthora* spp.

La densité d'inoculum (DI) de *Phytophthora* spp. dans le sol peut être déterminée par la méthode de dilution en boîtes de Petri, en utilisant le milieu sélectif PDA + BNPRAH (Masago *et al.*, 1977). Des échantillons de sol (10-20 par ha, 500 g chacun) sont mis à sécher à l'air libre pendant 24 h et tamisés à l'aide d'un tamis de 2 mm. Des aliquotes de 10 g de sol sont collectées à partir de chaque échantillon et mises en suspension dans de l'eau contenant 0,1% d'agar avec un ratio 1:10 (poids/volume). La suspension obtenue est placée à l'aide d'une pipette dans des boîtes de Petri (1 ml par boîte) contenant un milieu PDA + BNPRAH (potato dextrose agar contenant en mg l⁻¹: bénomyl 10, nystatine 25, pentachloronitrobenzène (PCNB) 25, rifampicine 10, ampicilline 500, hymexazole 25-50) à la température de fusion (43-45°C). Les boîtes de Petri sont mises à incuber à l'obscurité pendant 4-6 j à 20±2°C. Pour chaque échantillon, l'essai est répété trois fois, avec 10 boîtes par répétition. Les espèces de *Phytophthora* sont identifiées après avoir transféré, en conditions stériles, les isolats obtenus à partir du sol dans des boîtes de Petri contenant un milieu CMA (cornmeal agar). Le nombre moyen de colonies par boîte, divisé par le poids sec obtenu, représente la densité de l'inoculum dans le sol, exprimée sous forme de nombre de propagules par g de sol

Echantillonnage du sol pour analyse nématologique

Avant l'analyse, diviser visuellement le verger en blocs d'échantillonnage représentant les différences de texture du sol, de drainage ou de techniques culturales. Dans une plantation établie, prélever des échantillons de sol et de racines sur la raie d'irrigation ou près des goutteurs où les racines absorbantes sont les plus nombreuses. Le sol ne doit pas être trop sec ou trop humide. Les terrains nus peuvent être échantillonnés à tout moment de l'année. Le meilleur moment pour réaliser un échantillonnage dans une pépinière est mars/avril. Dans les sols limoneux, échantillonner à une profondeur de 60 cm; dans un sol sableux échantillonner à 90 cm. Utiliser une tarière, un tube de Viehmeyer ou une pelle. Une tarière (7,5 cm de diamètre) est mieux appropriée pour des profondeurs de 60 cm en sols sableux. Pour échantillonner à plus de 60 cm de profondeur, un tube de Viehmeyer est préférable car il permet de réduire le volume de sol prélevé. Le tube peut aisément être enfoncé dans le sol jusqu'à 1,20 m; la quantité de racines prélevées sera beaucoup plus faible qu'avec une tarière.

Dans chaque bloc d'échantillonnage, collecter 10 ou 20 carottes ou sous-échantillons. Regrouper les sous-échantillons, les mélanger soigneusement et placer le sol et les racines dans des sacs en plastique ou autres contenant imperméables. Sceller les sacs de manière étanche et les placer à l'ombre jusqu'à ce que le dernier échantillon soit prélevé. Fixer les étiquettes donnant le nom, l'adresse, la localisation du verger, le bloc d'échantillonnage, la texture du sol, l'historique de la

culture, les symptômes visibles et, si possible, le porte-greffe et les températures de l'air et du sol. Ces informations sont très importantes pour l'analyse qui va suivre. Porter ou envoyer les échantillons au laboratoire dès que possible. Expédier ceux-ci dans des boîtes en carton en les calant avec du papier journal, ou dans des boîtes en polystyrène. Si un retard se produit, conserver les échantillons dans un lieu frais (5-10°C).

Extraire les nématodes des échantillons de sol par la méthode d'élutriation/flottaison suivie par l'utilisation de l'appareil de Baermann. Les nématodes trouvés doivent être identifiés à fort grossissement par un nématologiste expérimenté. Préciser la méthode utilisée et l'efficacité de la méthode d'extraction en même temps que les résultats.

Bibliographie

MASAGO, H., YOSHIKAWA, M., FUKADA, M. & NAKANISHI, N. (1977) Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. *Phytopathology* **67**, 425-428.

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

OEPP/EPPO (1993) Certification schemes. No. 7. Nursery requirements - recommended requirements for establishments participating in certification of fruit or ornamental crops. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **23**, 249-252.

Tableau 1. Virus et pathogènes analogues des agrumes présents dans la région OEPP et couverts par le schéma

Maladie	Répartition géographique	Transmission
Virus		
Citrus tristeza closterovirus(CTV)	Mondiale (signalé çà et là dans le Bassin Méditerranéen, où il est généralement soumis à des contrôles officiels)	<i>Toxoptera citricida</i> , <i>T.aurantii</i> , <i>A. spiraeicola</i> , <i>A. crassivora</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , <i>Myzus persicae</i>
Citrus infectious variegation ilarvirus (CIVV)	Algérie, Espagne, France (Corse), Italie, Grèce, Liban, Maroc	Semences ?
Citrus ringspot virus et autres membres du complexe psorose (psorosis A,concave gum ,blind pocket)	Mondiale	
Satsuma dwarf virus (SDV)	Iran, Japon, Turquie	Voie mécanique sur les instruments de taille
Citrus leaf rugose ilarvirus	Italie, Argentine, Japon, USA (Florida)	?
Viroïdes		
Citrus exocortis viroid	Mondiale	Voie mécanique sur les instruments de taille, par les semences chez l'oranger cv. Baianinha Navel
Citrus cachexia-xyloporosis viroid	Mondiale	Aucun insecte vecteur n'est connu
Phytoplasmes		
<i>Spiroplasma citri</i>	Mondiale	Cicadelles: <i>Scaphytopius nitridus</i> , <i>S.acutus</i> , <i>Cirulifer tenellus</i> , <i>Neoarliturus haematoceps</i>
Maladies analogues		
Impietratura	Chypre, Espagne, Grèce, Israël, Italie, Liban, Maroc, Turquie	Aucun insecte vecteur n'est connu
Cristacortis	Zone méditerranéenne	Transmission par le pollen
Citrus vein enation/woody gall	Afrique du Sud, Australie, Espagne, Inde, Iran, Japon, Pérou, Turquie, USA	Greffage, <i>Aphis gossypii</i> , <i>Myzus persicae</i> , <i>Toxoptera citricida</i>

Tableau 2. Principales plantes indicatrices pour les virus et pathogènes analogues des agrumes dans la région OEPP

Plante indicatrice	Maladies identifiées
1. Lime mexicaine (<i>C.aurantifolia</i>)	Tristeza, rugose leaf, vein enation/woody gall
2. Oranger (<i>C. sinensis</i>) cvs Pineapple, Madam Vinous, Hamlin	Psorosis complex, stubborn, impietratura, cristacortis
3. Cédrot Etrog (<i>C. medica</i>) clones 861-S1, 60-13	Exocortis, infectious variegation et autres viroïdes
4. Parsons special mandarin (<i>C. reticulata</i>)	Cachexia-xyloporosis
5. Dweet tangor (<i>C. reticulata</i> × <i>C. sinensis</i>)	Satsuma dwarf, psorosis, cristacortis, impietratura

Fig. 1. Diagramme des stades du schéma de certification des citrus

