

## Schéma pour la production de végétaux sains destinés à la plantation

### SCHEMA DE CERTIFICATION POUR LE NOISETIER

#### Champ d'application spécifique

Cette norme décrit la certification sanitaire de matériel de noisetier (*Corylus avellana*).

#### Approbation et amendement spécifiques

Approbation initiale en 2003-09.

#### Introduction

Le schéma de certification sanitaire du noisetier (*Corylus avellana*) donne des détails sur la production de variétés multipliées pour être cultivées sur leurs propres racines. Le matériel végétal produit selon ce schéma de certification est issu de plantes du stade initial qui ont été testées et trouvées indemnes des agents pathogènes suivants : *Apple mosaic ilarvirus* (ApMV), *Prunus necrotic ringspot ilarvirus* (PNRSV) et *Hazelnut maculatura lineare phytoplasma* (HML phytoplasma), et ont été produites dans des conditions minimisant les infections par d'autres organismes nuisibles.

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 variétés certifiées, les étapes suivantes doivent être suivies.

- 1 Sélection pour qualité pomologique : des plantes individuelles sont sélectionnées pour chaque variété à introduire dans le schéma.
- 2 Production du stade initial : les plantes candidates au stade initial sont produites par marcottage ou à partir des drageons. Les plantes candidates sont maintenues isolées du matériel initial. Les plantes candidates au stade initial sont testées. 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, 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 dans des conditions garantissant l'absence d'infection.
- 5 Production des plantes certifiées: les plantes certifiées sont produites à partir du stade de propagation sous forme de tiges enracinées d'un an après une ou deux étapes 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. Le schéma est représenté par la Fig.1.

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). 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 matériel initial candidat

Un certain nombre d'arbres en production présentant les caractères typiques (authenticité variétale) de chaque variété à prendre en compte dans le schéma doivent être sélectionnés dans différents vergers et/ou dans des parcelles d'essais pomologiques. Les plantes sans symptômes apparents doivent être sélectionnées. Les variétés sont multipliées sur leurs propres racines et il n'y a, par conséquent, pas de production de porte-greffes.

Alternativement, le matériel de départ peut être importé d'autres pays. Le matériel importé de l'extérieur de la région OEPP doit être indemne de tous les virus et phytoplasmes présents naturellement sur le genre *Corylus* dans la région d'origine, et de tout autre organisme nuisible réglementé.

## 2. Maintien et test du matériel initial candidat

### 2.1 Conditions de culture

Les plantes sélectionnées pour leurs qualités pomologiques sont multipliées par marcottage ou à partir des drageons. La multiplication réussit mieux sous abri. Les plantes obtenues (plantes candidates au stade initial) doivent, pendant la période de test, être gardées dans un abri "insect-proof" conçu et réservé à cet usage, séparé du stade initial. Elles doivent être cultivées dans un milieu de culture stérilisé dans des conteneurs isolés du sol. Les contrôles sanitaires adéquats doivent être assurés, en particulier pour *Mikomyia coryli*, *Cryptosporiopsis coryli*, *Chondrostereum purpureum*, *Nectria galligena*, *Phyllactinia guttata*.

### 2.2 Exigences pour les tests

Les plantes candidates au stade initial doivent être testées individuellement pour les organismes suivants : *Apple mosaic ilarvirus* (ApMV), *Prunus necrotic ringspot ilarvirus* (PNRSV) et *Hazelnut maculatura lineare phytoplasma* (HML phytoplasma) (Annexe I) par les méthodes mentionnées à l'Annexe II. Les plantes doivent être inspectées visuellement pour *Phytoptus avellanae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*, *Pseudomonas avellanae*, *Armillariella mellea* et *Verticillium* spp. Toute plante trouvée infectée, par test ou par inspection, doit être immédiatement notée et éliminée.

### 2.3 Promotion du matériel initial

Les plantes qui donnent des résultats négatifs pour tous les tests et inspections peuvent être considérées comme matériel initial et être transférées dans la collection de stade initial. Il n'y a pas d'expérience de thérapie ou d'autres techniques sanitaires pour le noisetier, la production de matériel initial repose donc sur la sélection de matériel indemne de virus. Le traitement de plantes qui sont testées positives pourrait être une possibilité à l'avenir.

## 3. Maintien du matériel initial

### 3.1 Conditions de culture

Les plantes du stade initial doivent être maintenues dans un abri "insect-proof", dans des conditions garantissant l'absence de (re)contamination. Chaque plante doit être cultivée dans un conteneur isolé du sol contenant un milieu de culture stérilisé. Du matériel peut être conservé *in vitro* (Annexe IV) comme stock de réserve, mais on devra vérifier ses caractères agronomiques en particulier l'authenticité variétale après qu'il ait quitté les conditions *in vitro*. La floraison du matériel initial doit être évitée pour minimiser les infections virales. L'authenticité variétale doit être vérifiée par l'observation de la fructification des plantes multipliées à partir du matériel initial, celles-ci doivent être gardées dans un lieu différent de celui du matériel initial. Des précautions générales contre les infections doivent être prises, et le contrôle adéquat des autres organismes nuisibles doit être assuré.

### 3.2 Exigences pour les tests

A cause des possibilités de re-infection, chaque plante du matériel initial doit être régulièrement re-testée pour ApMV, PNRSV et HML phytoplasma. En l'absence d'information précise sur la re-infection du noisetier, la fréquence de renouvellement des tests proposée est de 5 ans. Elles peuvent aussi être régulièrement inspectées pour les virus et analogues, *Phytoptus avellanae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*, *Pseudomonas avellanae*, *Armillariella mellea* et *Verticillium* spp. Toute plante trouvée infectée, par test ou par inspection, doit être immédiatement notée et éliminée.

### 3.3 Certification

Avant qu'une plante au stade initial puisse être multipliée plus loin dans le schéma de certification, le passage à l'étape suivante doit être autorisée par l'organisation officielle en se basant sur les documents relatifs aux tests et aux observations réalisés pendant la production, et sur une ou plusieurs inspections (visuelles) de certification. Les normes de certification recommandées sont données en Annexe III.

## 4. Matériel de propagation

### 4.1 Conditions de culture

Le matériel de propagation est produit à partir du matériel initial par marcottage. Il doit être planté dans des marcottières dans lesquels aucun symptôme d'*Agrobacterium tumefaciens* n'a été observé dans les 5 dernières années. Si nécessaire pour obtenir une quantité suffisante de plants certifiés, une marcottière de seconde génération peut être plantée. Il est conseillé de ne pas garder les marcottières pendant plus de 15 ans, à cause du risque croissant de re-infection. La multiplication *in vitro* peut aussi être utilisée (Annexe IV), mais il faut prendre soin de limiter le nombre d'étapes de propagation et d'éviter la formation de

cal. Des précautions générales contre les infections doivent être maintenues, et des mesures de contrôle adéquates doivent être prises si un organisme nuisible est observé.

#### 4.2 Exigences pour les tests

Le matériel de propagation doit aussi être inspecté visuellement tous les ans pour les virus et analogues, *Phytoptus avellanae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*, *Pseudomonas avellanae*, *Armillariella mellea* et *Verticillium* spp. Toute plante trouvée infectée doit être notée et éliminée.

#### 4.3 Certification

La certification du matériel de propagation doit être garantie en se basant sur les documents relatifs aux tests et aux observations réalisés pendant la production, et sur une inspection (visuelle) de certification. Les normes de certification recommandées pour le matériel de propagation sont données en Annexe III.

### 5. Production de plantes certifiées

Les plantes certifiées à vendre aux producteurs sont pris directement de la première ou deuxième génération du matériel de propagation en tant que tiges enracinées de un an.

### 6. Administration du schéma de certification

#### *Supervision du schéma*

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

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

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

### Annexe I

#### **Virus et phytoplasmes du noisetier testés pour le schéma de certification**

##### *Apple mosaic ilarvirus*

L'ApMV est l'agent pathogène le plus important sur noisetier. Il provoque une mosaïque sur les feuilles et peut affecter le rendement et la vigueur. Il doit être testé par ELISA ou RT-PCR.

##### *Prunus necrotic ringspot ilarvirus*

Le PNRSV produit peu de symptômes par lui-même, mais il a un effet synergique en présence de l'ApMV. Il est transmis par le pollen. Il doit être testé par ELISA ou RT-PCR.

### *Hazelnut maculatura lineare phytoplasma*

Le HML phytoplasma cause des longues taches sur les feuilles. Il a surtout été observé en Italie avec une faible importance. Cependant son vecteur n'est pas connu et il doit être maintenu hors de la propagation.

## **Annexe II**

### **Directives sur les procédures de test**

#### *Tests pour les virus*

L'ELISA peut être utilisée pour détecter ApMV et PNRSV. Des anticorps polyclonaux doivent être utilisés. Le test doit être effectué sur de jeunes feuilles en croissance. Les échantillons peuvent être préparés en suivant une méthode normalisée. Toutes les étapes du test ELISA doivent être effectuées conformément aux procédures publiées ou aux instructions accompagnant les réactifs disponibles dans le commerce.

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) peut être utilisée pour la détection de l'ApMV et du PNRSV. Des tests sérologiques et moléculaires peuvent être combinés pour augmenter la sensibilité intrinsèque de chaque méthode, par ex. immunocapture-PCR (IC-RT-PCR).

#### *Tests pour les phytoplasmes*

La PCR peut être utilisée pour rechercher le HML phytoplasma et d'autres phytoplasmes en utilisant des amorces universelles. La méthode DAPI (utilisant la microscopie à fluorescence après coloration avec l'acide nucléique 4,6-diamino-2-phenylindole) permet des tests rapides à petite échelle pour les maladies à phytoplasme mais elle n'est pas aussi sensible que la PCR.

## **Annexe III**

### **Normes de certification recommandées**

La certification doit être garantie en se basant sur les documents relatifs aux tests et aux observations réalisés pendant la production, et sur une ou plusieurs inspections (visuelles) de certification. En général, l'inspection de certification est faite sur les plantes à partir desquelles la catégorie de matériel est constituée. L'évaluateur doit vérifier que les normes mentionnées ci-dessous sont satisfaites.

#### *Matériel initial candidat*

Les documents doivent montrer que la plante candidate au stade initial est négative pour ApMV, PNRSV et HML phytoplasma pour les tests effectués, et que toute plante montrant des symptômes de virus ou analogues, *Phytoptus avellanae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*, *Pseudomonas avellanae*, *Armillariella mellea* et *Vertillicium* spp. a été éliminée. La plante ne doit montrer aucun symptôme d'attaque par un organisme nuisible. Si ces conditions ne sont pas remplies au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée pour la plante concernée.

#### *Matériel initial*

Les documents doivent montrer que tous les tests sur la plante au stade initial étaient négatifs pour ApMV, PNRSV et HML phytoplasma, et qu'aucun symptôme de virus ou analogues, *Phytoptus avellanae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*, *Pseudomonas avellanae*, *Armillariella mellea* and *Vertillicium* spp. n'a été observé. Si ces conditions ne sont pas remplies au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée pour la plante concernée.

#### *Matériel de propagation*

Les résultats doivent montrer que toute plante montrant des symptômes de virus ou analogues, *Phytoptus avellanae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*, *Pseudomonas avellanae*, *Armillariella mellea* et *Vertillicium* spp. a été éliminée. L'inspection visuelle de certification doit montrer l'absence de symptômes de maladies à virus ou analogues dans chaque marcottière. Si ces conditions ne sont pas remplies au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée pour l'ensemble de la marcottière concernée.

## Annexe IV

### Maintenance *in vitro* et multiplication du noisetier

La maintenance et la micropropagation du noisetier peut se faire *in vitro* en utilisant le milieu de Quoirin *et al.* (1977). Al Kaï *et al.* (1984) donnent une description pour la micropropagation de cette espèce :

La multiplication doit être faite avec des explants prélevés sur des plantes cultivées sous serre. Les explants sont des bourgeons axillaires avec une tige de 1-2 cm pris sur une partie non lignifiée des tiges en croissance. Pour désinfecter, le matériel est mis dans de l'alcool à 70° pendant 30-60 s, puis trempé dans du chlorure mercurique à 1 gL<sup>-1</sup> (avec quelques gouttes de Tween-20) pendant 10 min. Il est ensuite lavé, d'abord dans une solution de chlorure de calcium (2,5 gL<sup>-1</sup>), puis ensuite, trois fois dans de l'eau distillée.

Après que la croissance a commencé sur un milieu M & S (Murashige & Skoog, 1962) dilué de moitié, le milieu suivant est utilisé pour la multiplication et l'élongation : milieu M & S modifié contenant les ingrédients suivants : Fe EDDHA (200 mgL<sup>-1</sup>), mélange de vitamines Zuccherelli, acide gibbérelle (0,1 mgL<sup>-1</sup>), acide acétique naphthalène (0,01 mgL<sup>-1</sup>) et benzylaminopurine (5 mgL<sup>-1</sup>), avec un pH ajusté à 5,5. Le milieu doit ensuite être stérilisé à 115°C pendant 20 min. Noter que l'utilisation du Fe dans sa forme EDDHA (au lieu de EDTA comme pour d'autres plantes) est spécifique à la multiplication *in vitro* du noisetier afin d'éviter des problèmes spécifiques à cette espèce. Pour l'enracinement, un milieu de M & S contenant du mélange de vitamines Zuccherelli, de l'acide indole butyrique (0,1 mgL<sup>-1</sup>) et du Fe EDDTA (200 mgL<sup>-1</sup>) est utilisé et a donné 90% de succès. Les plantes sont ensuite transférées sous serre à 25 ± 2°C sur du compost stérilisé, et sous une bâche plastique pour maintenir une haute humidité relative pendant quelques jours.

### Références

- Al Kaï H, Salesses G & Mouras A (1984). Multiplication *in vitro* du noisetier (*Corylus avellana L.*). *Agronomie*, **4**, 399-402.
- Murashige T & Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **18**, 100-127.
- Quoirin M, Lepoivre P & Boxus P (1977). Un premier bilan de dix années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. *Rapport de la Station des Cultures Fruitières et Maraîchères de Gembloux*, 93-117.

**Fig. 1** Diagramme des stades dans le schéma de certification du noisetier.

