

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

Schéma de certification pour le fraisier

Champ d'application spécifique

Cette norme décrit la production de matériel de fraisier soumis à une certification sanitaire.

Approbation et amendement spécifiques

Approbation initiale en septembre 1994 et révision en 2008.

Le schéma de certification sanitaire pour le matériel de fraisier (*Fragaria* × *ananassa*) donne des détails sur la production de plants de fraisier obtenus par propagation végétative. Ce schéma de certification a pour objectif de produire des plants de fraisier conformes au type, indemnes de virus et pratiquement indemnes d'autres organismes nuisibles. 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, et qui ont été produites dans des conditions minimisant l'infestation par d'autres organismes nuisibles.

Le schéma est présenté selon le plan général proposé par le Groupe d'experts OEPP sur la certification sanitaire des cultures fruitières et adopté par le Conseil de l'OEPP (OEPP/EPPO, 1992).

Vue d'ensemble du schéma

Pour produire des plants de fraisier certifiés, les étapes suivantes doivent être suivies:

- 1 Sélection pour une qualité pomologique : des plantes individuelles de chaque cultivar à introduire dans le schéma sont sélectionnées.
- 2 Production du stade initial: les plantes candidates au stade initial sont testées, ou sont soumises à une thérapie ou à une méthode d'amélioration sanitaire *in vitro*, suivie de tests. Seules les plantes candidates au stade initial qui respectent toutes les exigences peuvent être considérées comme appartenant au stade initial.
- 3 Maintien du stade initial : les plantes du stade initial sont maintenues dans des conditions garantissant l'absence d'infection par l'intermédiaire du pollen, de vecteurs aériens ou de vecteurs du sol, avec des tests supplémentaires si nécessaire.
- 4 Production du stade de propagation : les plantes du stade de propagation sont produites à partir du matériel du stade initial en une ou plusieurs étapes (stade de propagation) dans des conditions assurant l'absence d'infection, avec de nouvelles analyses si nécessaire.
- 5 Production de matériel certifié : des stolons prélevés sur le stade de propagation sont cultivés dans des conditions minimisant les infections afin de produire des plantes certifiées (stolons ensuite distribués pour la production de fruits).

Tout au long de la procédure, des précautions doivent être prises pour conserver les caractéristiques pomologiques des plantes sélectionnées au départ. Des contrôles doivent porter sur d'éventuelles mutations.

Le schéma est représenté à la Figure 1. Le schéma de certification doit être mis en œuvre par une organisation officielle, ou par une pépinière ou un laboratoire spécialisé officiellement 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 réalisées pendant la production, et sur des inspections visuelles visant à vérifier l'état sanitaire du matériel.

1. Sélection de plantes candidates au stade initial

Des cultivars de fraisier (*Fragaria* × *ananassa*) nouveaux ou existants peuvent être sélectionnés comme matériel candidat. Le matériel de départ doit être sélectionné visuellement pour son authenticité variétale, sa vigueur, sa qualité et l'absence de symptômes d'organismes nuisibles. Le matériel de départ peut également être issu de schémas de certification mis en place dans d'autres pays OEPP. Le matériel d'importation provenant de pays n'appartenant pas à la région OEPP doit également subir des tests pour tous les virus naturellement présents sur le fraisier dans sa région d'origine.

2. Production du stade initial

Le matériel candidat au stade initial doit être placé en quarantaine dans un abri ou une serre 'insect-proof' réservé à cet usage, et doit être séparé du stade initial. Toutes les plantes doivent être cultivées en pots individuels contenant un substrat stérilisé, en prenant des précautions contre les infections par les organismes nuisibles. Des précautions particulières doivent être prises pour éviter les infections par les organismes nuisibles listés à l'annexe 1. L'état sanitaire général des plantes doit être régulièrement contrôlé par des inspections visuelles permettant de détecter ces organismes nuisibles, ou d'autres maladies ou encore l'apparition de symptômes inconnus.

Toutes les plantes sont testées individuellement (conformément à l'annexe 1) pour les pathogènes suivants: *Arabid mosaic virus* (*Nepovirus*), *Raspberry ringspot virus* (*Nepovirus*), *Strawberry crinkle virus* (*Cytorhabdovirus*), strawberry green petal phytoplasma, *Strawberry latent ringspot virus* (*Sadwavirus*), *Strawberry mild yellow edge virus* (*Potexvirus*), *Strawberry mottle virus* (*Sadwavirus*), *Strawberry veinbanding virus* (*Caulimovirus*), *Tomato black ring virus* (*Nepovirus*). Toutes les plantes sont également testées individuellement pour: *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, *Xanthomonas fragariae*, *Phytophthora cactorum*, *Colletotrichum acutatum*, *Ditylenchus dipsaci* et les espèces suivantes du genre *Aphelenchoides*: *A. besseyi*, *A. blastophthorus*, *A. fragariae* et *A. ritzemabosi*. Les méthodes de test recommandées figurent à l'annexe 1. Les plantes présentant des résultats négatifs pour tous les tests sont considérées comme appartenant au stade initial et doivent être transférées dans un abri séparé de conception similaire (voir section 3). Les plantes présentant des résultats positifs pour l'un des tests doivent être immédiatement éliminées.

Si aucune plante d'un cultivar ou d'un clone ne se révèle indemne de ces pathogènes, la thérapie peut être appliquée pour éliminer l'infection. Les plantes ainsi traitées sont à nouveau considérées comme du matériel candidat et doivent à nouveau être testées pour les virus mentionnés ci-dessus, et leurs caractéristiques agronomiques et variétales doivent être réévaluées.

La culture de méristème peut également être utilisée pour éliminer les infections (annexe 3). Dans ce cas, les plantes du stade initial ainsi produites sont généralement maintenues en culture de tissu et des explants doivent être testés pour les virus mentionnés ci-dessus. Il faut également noter que la culture de méristème permet aussi d'éliminer efficacement les maladies fongiques et bactériennes du fraisier et les nématodes des feuilles.

Si aucune plante d'un cultivar ou d'un clone ne se révèle indemne des nématodes des tiges et des feuilles *D. dipsaci*, *A. fragariae*, *A. besseyi*, *A. blastophthorus* ou *A. ritzemabosi*, les plantes peuvent être traitées selon les méthodes décrites à l'annexe 3 (Élimination des nématodes des feuilles et des tiges) puis retestées.

3. Maintien du stade initial

Les plantes du stade initial doivent être placées dans un abri 'insect-proof' convenablement conçu ne contenant que des plantes du stade initial. Elles doivent être maintenues dans les mêmes conditions et subir les mêmes tests sur l'absence d'organismes nuisibles que les plantes candidates au stade initial. Les plantes du stade initial sont généralement multipliées une fois par an à l'aide de la première méthode décrite à la section 4.1: des stolons de chaque plant sont conservés pour devenir les plantes du stade initial de l'année suivante, s'ils sont cultivés dans les mêmes conditions et individuellement testés¹ au moins pour *P. fragariae* var. *fragariae* et les virus transmis par les pucerons; d'autres stolons sont prélevés et servent d'échantillons pour les tests sur les nématodes des tiges et des feuilles; les stolons restants seront généralement utilisés pour

¹ La possibilité d'infection par d'autres organismes nuisibles pour lesquels les candidats au stade initial ont été testés doit être envisagée ; il est conseillé d'effectuer occasionnellement de nouvelles analyses.

produire le stade de propagation (section 4). Après la multiplication, la plante-mère est éliminée (et peut également faire l'objet de tests pour les nématodes des tiges et des feuilles). En général, toute plante présentant un résultat positif à un test ou présentant les symptômes d'une maladie (fongique, bactérienne, virale) citée au tableau 2 doit être éliminée.

Le stade initial de réserve peut être conservé *in vitro* sur un substrat sans hormones, à 2°C pendant 3-4 ans sans sous-culture ou pendant une période plus longue avec sous-culture tous les 2 ans. Si ce matériel de réserve quitte les conditions de culture *in vitro* pour être multiplié, son authenticité variétale doit être vérifiée.

4. Production du stade de propagation

4.1 Stade de propagation I

Deux méthodes de production du stade de propagation I peuvent être utilisées:

Méthode 1. Les extrémités des stolons des plantes du stade initial sont placées dans des pots individuels contenant un substrat désinfecté. Les pots dans lesquels les stolons ont raciné sont conservés à un niveau plus élevé que les pots du stade initial pour éviter la transmission de pathogènes du sol ou des racines lors de l'irrigation. Lorsque les stolons ont raciné, ils sont séparés de leurs plantes-mères du stade initial. Ces plantules constituent la première étape du stade de propagation I et sont transférées dans un abri insect-proof séparé où ils peuvent être plantés sur des planches de substrat stérilisé pour servir de plantes-mères pour une deuxième génération de stade de propagation I (soit un maximum de deux générations de stade de propagation I).

Méthode 2. La multiplication se fait entièrement *in vitro*, à partir des méristèmes, des bourgeons apicaux ou axillaires de plantes du stade initial (annexe 4). Le nombre de cycles de multiplication ne doit pas dépasser 10 (voir l'annexe 4). Les plants racinés quittent les conditions *in vitro* et deviennent du stade de propagation I ou II, en fonction du nombre de plants requis. Tous les plants produits par multiplication *in vitro* doivent être clairement désignés comme tels. Cependant, la descendance de ces plants n'a pas besoin de porter cette désignation, car l'authenticité variétale peut être correctement déterminée en une étape de multiplication, à condition de laisser un nombre suffisant de plantes fructifier.

Les plantes du stade de propagation I font l'objet de tests par sondage pour *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora fragariae*, *Colletotrichum acutatum* et *Xanthomonas fragariae* var. *fragariae*.

Des précautions générales contre les organismes nuisibles doivent être maintenues, mais les produits phytosanitaires connus pour masquer les symptômes des espèces de *Phytophthora* ou ceux de *Verticillium albo-atrum* et *Verticillium dahliae* doivent être évités. Toute plante présentant les symptômes d'un organisme nuisible mentionné à l'annexe 2 doit être éliminée.

Pour les nématodes des tiges et des feuilles, l'inspection visuelle des plantes en serre peut ne pas être suffisante pour détecter leur présence, car les symptômes ne sont pas très prononcés dans ces conditions. Pour ces nématodes, des tests peuvent être effectués sur les plantes-mères au moment où les plantes-filles sont séparées des plantes-mères (voir section 3 et annexe 1).

La filiation des plantes est notée afin que l'on puisse savoir si chaque plante du stade de propagation I est bien issue du stade initial par un nombre de générations n'excédant pas la limite fixée (c'est-à-dire deux générations pour la méthode 1 ou dix générations pour la méthode 2). Il est admis d'avoir des générations supplémentaires par la méthode 1, pour les cultivars qui produisent peu de stolons.

4.2 Stade de propagation II

Les plantes du stade de propagation II sont produites à partir des stolons du stade de propagation I en un nombre de générations aussi réduit que possible. Les plantes sont produites dans des conditions limitant les risques d'attaques par des pucerons vecteurs et le sol doit être testé pour les nématodes (voir annexe 1). Le site doit être utilisé pour produire des plants de stade de propagation uniquement s'il est trouvé pratiquement indemne ou si les nématodes trouvés sont reconnus ne portant pas de virus (voir la Norme OEPP PM 4/35)

Les plants sont multipliés sur des parcelles séparées d'au moins 50 m d'autres parcelles de matériel de fraisier non certifié. Des précautions doivent être prises contre les vecteurs aériens et les maladies transmises par le sol. La présence d'hôtes alternes de *C. acutatum* doit être prise en compte.

Des précautions générales doivent être maintenues contre les organismes nuisibles, mais les produits phytosanitaires connus pour masquer les symptômes de *V. albo-atrum* ou de *P. fragariae* doivent être évités.

Les plantes du stade de propagation II doivent être inspectées régulièrement et doivent être conformes aux normes de certification de l'annexe 2.

5. Production du matériel certifié

Les plantes sur lesquelles le matériel certifié sera prélevé (stolons ensuite cultivés pour la production de fruits) sont produites à partir de stolons du stade de propagation II. Ces plantes sont maintenues dans des parcelles séparées d'au moins 50 m de tout matériel de fraisier non certifié. Des précautions doivent être prises contre les vecteurs aériens et les maladies transmises par le sol.

Le sol doit être testé pour les nématodes (voir l'annexe 1) et le site doit être utilisé pour la production de plantes du stade de propagation uniquement s'il est trouvé pratiquement indemne ou si les nématodes trouvés sont indemnes de virus (voir la Norme OEPP 4/35).

Des précautions doivent être prises pour éviter au maximum les infestations par des pucerons vecteurs des virus du fraisier et par *Meloidogyne hapla* (par exemple en traitant au bon moment avec un produit phytosanitaire approprié).

Des précautions générales contre les organismes nuisibles doivent être maintenues et les plantes doivent être régulièrement inspectées et trouvées conformes aux normes de certification recommandées à l'annexe 2. Il peut être utile de laisser fructifier ces plantes. Toute plante présentant des symptômes d'organismes nuisibles cités au tableau 2 doit être éliminée.

Les plantes doivent être pratiquement indemnes de *Sphaerotheca alchemillae* et *Tetranychus urticae*. Le matériel certifié (stolons) peut être conservé un certain temps avant d'être vendu, dans des frigos ou sur des planches d'attente dans des conditions identiques à celles de leurs plantes-mères.

Tout au long de la production du stade de propagation et des plants certifiés, effectuer des contrôles sur la pureté variétale, sur d'éventuelles mutations ou réversions et sur le June yellows. Des précautions particulières doivent être prises pour le matériel issu de la multiplication *in vitro*.

L'inspection permettant la délivrance des certificats sera effectuée au début de l'été.

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 durant 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 peuvent affecter la qualité, de façon à ce que les plants certifiés vendus aux producteurs de fraises 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.

Références

Bonants PJM, van Gent-Pelzer MPE, Hooftman R, Cooke DEL, Guy DC & Duncan JM (2004) A combination of baiting and different PCR formats, including measurement of real time quantitative

- fluorescence, for the detection of *Phytophthora fragariae* in strawberry plants. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 689–702.
- Converse RH (1987) *Virus Diseases of Small Fruits*. USDA Agriculture Handbook no. 631, pp. 3–4. USDA, Washington (US).
- Cook RTA (1993) Strawberry black spot caused by *Colletotrichum acutatum*. In: *Plant Health and the European Single Market* (Ed. Ebbels D), pp. 301–304. British Crop Protection Council, Farnham (GB).
- Duncan JM (1980) A technique for detecting red stele (*Phytophthora fragariae*) infection of strawberry stocks before planting. *Plant Disease* **64**, 1023–1025.
- Martin RR & Tzanetakis IE (2006) Characterization and recent advances in detection of strawberry diseases. *Plant Disease* **90**(4), 384–396.
- 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. PM4/7(1) Nursery requirements – recommended requirements for establishments participating in certification of fruit or ornamental crops. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **23**(2), 249–252.
- OEPP/EPPO (2004) Diagnostic protocol for regulated pests PM7/25(1) *Glomerella acutata*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **34**(2), 193–199.
- OEPP/EPPO (2006) Diagnostic protocol for regulated pests PM7/65(1) *Xanthomonas fragariae*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **36**(1), 135–144.
- OEPP/EPPO (in preparation) EPPO Standards PM4/35(1) Soil test for virus-vector nematodes in fruit crops.
- Taylor CE & Brown DJF (1976) The geographical distribution of *Xiphinema* and *Longidorus* nematodes in the British Isles and Ireland. *Annals of applied Biology* **84**, 383–402.

Annexe 1 Directives concernant les méthodes de test

Tests pour les virus sur des plantes indicatrices

Les virus spécifiquement inféodés au fraisier sont détectés par inoculation mécanique sur des plantes indicatrices herbacées sensibles appropriées ou par greffage de feuilles sur des plantes indicatrices du genre *Fragaria*. Une liste des plantes indicatrices utilisées et les instructions relatives à la méthode de greffage de feuille figurent dans Converse (1987) (dont le tableau 1 s'est inspiré).

En général, tous les virus du fraisier présents dans la région OEPP peuvent être détectés par greffage de feuilles sur les clones hybrides UC4 ou UC5, *Fragaria vesca* EMC ou *Fragaria vesca* var. *semperflorens* Alpine (pour les virus transmis par les pucerons). Les népovirus peuvent être détectés par inoculation mécanique sur *Chenopodium quinoa* ou *Chenopodium amaranticolor*. Pour l'identification de ces virus, les méthodes sérologiques et moléculaires ou les plantes indicatrices mentionnées au tableau 1 peuvent être utilisées. Les phytoplasmes peuvent être détectés par la PCR ou l'observation visuelle des symptômes.

Xanthomonas fragariae

Des méthodes de test pour *X. fragariae* figurent dans le protocole de diagnostic de l'OEPP (Norme OEPP PM7/65(1), 2006).

Phytophthora fragariae

Toutes les méthodes de détection utilisées reposent sur le test de piégeage initialement développé par Duncan (1980). Couper les extrémités des racines (2,0-2,5 cm de long) des plantes à tester, et les mélanger dans un substrat indemne de terre (1:3 sable/tourbe, plus engrais, oligo-éléments et chaux, pH 5,5). Le mélange est placé dans des pots en plastique de 12,5 cm, et on plante dans chaque pot 5 plantes d'environ 7,5-10 cm de haut de *F. vesca* var. *semperflorens* cv. Baron Solemacher (issu de semence), ou d'un clone hybride stolonifère sensible (par ex. UC5). Les plantules doivent avoir été transplantées dans des plateaux contenant le substrat 2-3 semaines après le semis et avoir été cultivées pendant 4-6 semaines dans une chambre climatique à 20°C sous éclairage permanent (8000 lux). Si on utilise des stolons racinés, ceux-ci doivent être enracinés pendant 10-14 jours avant d'être utilisés dans le test de piégeage. Les pots sont placés sur une tablette permettant de collecter l'eau de drainage des pots afin d'empêcher les contaminations locales. La température de la serre est maintenue à 15°C. Les plants sont arrosés par brumisation pendant 15 min toutes les 6 h ou par arrosage direct soigneux. Au bout de 5 semaines, les racines de chaque plante-piège sont examinées pour détecter les symptômes typiques de rougissement du cylindre central des racines (stèles

rouges) et les oospores. Des plantes témoins sont cultivées dans le substrat seul et placées au hasard parmi les plantes test afin de détecter les éventuelles contaminations croisées.

Les tests suivants peuvent aussi être utilisés pour détecter *P. fragariae* (Bonants *et al.*, 2004):

- Procédure de piégeage à l'eau suivis d'un examen visuel pour les stèles rouges et les oospores
- PCR gigogne (nested PCR) effectuée sur l'eau provenant d'une procédure de piégeage à l'eau
- Procédure de piégeage à l'eau combinée à un test de PCR sur les racines-pièges.

La procédure de piégeage à l'eau peut être utilisée seule ou en combinaison avec un test de PCR sur les plantes-pièges et sur l'eau de la procédure de piégeage. La PCR directe sur de petits échantillons est également possible, mais la procédure de piégeage à l'eau est recommandée pour les échantillons plus grands.

Phytophthora cactorum

Sur chaque plante à tester, prélever trois bases de feuilles et les recouvrir d'eau du robinet ou d'eau du sol stérile dans une boîte de Petri, ou les transférer sur un milieu de culture approprié. Les incubent à la lumière à température ambiante (environ 20°C), puis les examiner chaque jour afin de détecter les sporanges de *P. cactorum*, et les éliminer au bout de 3 jours.

Colletotrichum acutatum

Test « paraquat »

Les plants de fraisier peuvent porter ce pathogène à l'état latent sous forme de lésions peu visibles sur toute partie de plante et l'infection peut ne pas être détectée de manière fiable par un examen visuel. Le pathogène se trouve le plus souvent à la base des pétioles des feuilles âgées. La sporulation peut être stimulée par un traitement avec l'herbicide paraquat avant l'incubation (Cook, 1993), comme suit. L'échantillon à tester est obtenu en enlevant les pétioles les plus âgées (mais toujours vivants) sur chaque plante. Prélever 2 cm à la base de chaque pétiole, y compris les stipules. Ces morceaux sont lavés, désinfectés en surface puis rincés. Les bases des pétioles sont ensuite immergées pendant 1 min dans une solution de paraquat dilué au 1:40 dans de l'eau. Elles sont rincées et mises à incuber sur un papier humide dans des boîtes en plastique à 25°C sous une lumière constante pendant 6 j. Les bases de pétioles ainsi incubées sont ensuite examinées au microscope pour détecter les acervules présentant les conidiophores et les conidies caractéristiques.

D'autres méthodes peuvent être utilisées pour détecter *C. acutatum*, combinant les traitements au paraquat avec les tests ELISA et la PCR (voir la Norme OEPP PM 7/25, 2004).

Nématodes des tiges (*Ditylenchus dipsaci*) et nématodes des feuilles et bourgeons (*Aphelenchoides besseyi*, *A. blastophthorus*, *A. fragariae* et *A. ritzemabosi*)

Sur les plantes à tester, prélever de jeunes feuilles encore enroulées et des bourgeons de la couronne, ainsi que les extrémités et les nœuds de stolons. Si un échantillonnage destructif est possible, utiliser tous les tissus concernés, sinon (si la plante testée doit être conservée, comme dans le cas des plantes candidates au stade initial) prélever environ 50% des tissus appropriés. À l'aide d'une paire de ciseaux, couper les tissus et les déposer sur un filtre en mousseline ou en nylon, placé sur un entonnoir rempli d'eau (optionnellement avec 0,15% de H₂O₂), de façon à ce que les tissus soient juste immergés. Un tube en caoutchouc est attaché à la base de l'entonnoir et fermé par une pince. Les nématodes présents quitteront les tissus pour se rassembler à la base de l'entonnoir; ils pourront être collectés au bout de 2-5 j en libérant une petite quantité d'eau au moyen de la pince. Cette méthode est connue sous le nom de technique de l'entonnoir de Baermann.

L'observation de l'échantillon peut s'effectuer à l'aide d'un microscope au grossissement 50× et tout nématode trouvé devra être monté sur lame et identifié à un grossissement plus fort. Seul un taxonomiste expérimenté ou du personnel qualifié peut réaliser une identification au niveau de l'espèce.

Tests du sol pour les nématodes vecteurs de virus

Le sol où le stade de propagation II et les plants produisant le matériel certifié seront plantés doit être échantillonné et les échantillons doivent être trouvés pratiquement indemnes des nématodes suivants: *Xiphinema diversicaudatum* (vecteur de l'*Arabis mosaic virus* et du *Strawberry latent ringspot virus*), *Longidorus macrosoma* (*Raspberry ringspot virus*), *L. attenuatus* (*Tomato black ring virus*) et *L. elongatus* (*Raspberry ringspot virus* et *Tomato black ring virus*). Les nématodes peuvent être testés directement pour

détecter la présence de virus (voir Norme OEPP PM 4/35). Une méthode de piégeage peut également être appliquée sur un double échantillon de sol prélevé au champ (Taylor & Brown, 1976).

Annexe 2 Normes de certification recommandées pour le fraisier

Stade initial

Les données doivent démontrer que toutes les plantes du stade initial ont présenté des résultats négatifs aux tests pour tous les virus et organismes analogues listés, et pour *Xanthomonas fragariae*, *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, *P. cactorum*, *Colletotrichum acutatum*, *Aphelenchoides* spp. et *Ditylenchus dipsaci*. Aucune plante ne peut présenter de symptômes de maladie fongique, bactérienne ou virale, ni d'infestation par des organismes nuisibles listés au tableau 2. Toutes les plantes doivent également être pratiquement indemnes d'autres organismes nuisibles. Si ces conditions ne sont pas respectées lors de l'inspection, la certification sera refusée.

Stade de propagation I

Des tests par sondage doivent être effectués pour les infections asymptomatiques par *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, *Colletotrichum acutatum* et *Phytophthora cactorum*. Si une plante présente un résultat positif, la certification sera refusée à l'ensemble du lot. Aucune plante ne peut présenter de symptômes des organismes nuisibles listés au tableau 2. Toutes les plantes doivent également être pratiquement indemnes d'autres organismes nuisibles. Si ces conditions ne sont pas respectées lors de l'inspection de certification, la certification sera refusée à l'ensemble du lot.

Stade de propagation II

Lors de l'inspection de certification, les tolérances concernant les organismes nuisibles indiquées au tableau 2 ne doivent pas être dépassées. Si ces limites sont dépassées, la certification sera refusée à l'ensemble du lot.

Matériel certifié

Lors de l'inspection de certification, les tolérances concernant les organismes nuisibles indiquées au tableau 2 ne doivent pas être dépassées. Si ces limites sont dépassées, la certification sera refusée à l'ensemble du lot.

Annexe 3 Directives pour les procédures d'amélioration sanitaire

Élimination des virus, bactéries et champignons

Les virus, les organismes analogues aux virus, les champignons et les bactéries peuvent être éliminés par une combinaison de traitement à l'air chaud et de culture de tissu. Pour ce faire, des plantes en conteneurs sont exposées à des températures élevées (37-38°C) pendant 4 à 8 semaines. Des stolons sont ensuite collectés et leurs extrémités (0,2-10 mm) sont racinées et cultivées sur un substrat stérile.

Il est également possible de collecter et mettre en culture des méristèmes (de préférence apicaux) de 0,1-0,3 mm. Les microplants obtenus à partir des cultures de méristème sont ensuite transférés sur un milieu de prolifération contenant des régulateurs de croissance (acide indole-butyrique, benzylaminopurine, acide gibberellique). Les explants sont ensuite transférés sur un milieu sans benzylaminopurine, mais contenant de l'acide indole-butyrique pour favoriser la production des racines.

Lorsque les plantes issues de l'une de ces méthodes mesurent 3-4 cm et sont bien enracinées, elles sont transplantées dans des blocs de tourbe sous serre à une humidité relative élevée.

Les plantes produites de cette manière sont considérées comme des plantes candidates et doivent toujours être retestées individuellement selon les méthodes décrites à la section 2 (production du stade initial). Lorsque tous les tests mentionnés ci-dessus ont donné des résultats négatifs, le matériel peut être considéré comme du stade initial.

Élimination des nématodes des feuilles et des tiges

Si aucune plante d'un cultivar ou d'un clone ne se révèle indemne des nématodes des feuilles et tiges *Ditylenchus dipsaci*, *Aphelenchoides fragariae*, *A. besseyi*, *A. blastophthorus* et *A. ritzemabosi*, le traitement suivant peut être appliqué: retirer la plante de son pot et rincer les racines pour éliminer le sol ou le substrat;

couper transversalement la couronne (c'est-à-dire la tige comprimée) en dessous des tissus verts; jeter la partie supérieure et replanter les racines et la base de la couronne dans un substrat neuf; maintenir la plante à 20°C pendant 4 semaines pour permettre une régénération des feuilles et des stolons.

Annexe 4 Directives pour la multiplication *in vitro* du fraisier

La multiplication *in vitro* du fraisier comporte quatre stades. Le premier est généralement une 'régénération', c'est-à-dire l'élimination des virus, et les trois autres correspondent à la micropropagation en tant que telle. Un exemple de procédure de micropropagation figure ci-dessous.

1. Établissement de la culture

Les plantes-mères sont sélectionnées dans des parcelles de production. Des méristèmes de 0,1-0,3 mm sont prélevés, désinfectés et mis en culture. L'objectif est d'éliminer les pathogènes tels que les virus, les phytoplasmes et les champignons, ainsi que les nématodes. Les apex (supérieurs à 0,3 mm) ou les bourgeons axillaires peuvent également être mis en culture de la même manière mais ne permettront pas d'éliminer les nématodes des feuilles et des tiges, et ils devront donc être prélevés sur des plantes du stade initial ayant déjà été testées pour ces nématodes. En principe, une plante du stade initial indemne de pathogènes peut également être mise en culture de méristème de la même manière.

2. Multiplication

Le microplant obtenu à partir de la culture de méristème est transféré sur un milieu de culture contenant des régulateurs de croissance (acide indole-butyrique, benzylaminopurine, acide gibbérélique). Dix cycles de multiplication peuvent être réalisés, mais ce nombre ne doit pas être dépassé. Dans tous les cas le matériel est renouvelé au moins tous les 2 ans.

3. Enracinement

Les explants sont placés dans un milieu sans benzylaminopurine, mais contenant de l'acide indole-butyrique pour favoriser l'apparition des racines.

4. Plantation

Lorsque les plantes atteignent 3-4 cm et sont bien racinées, elles sont transplantées dans des blocs de tourbe en serre et maintenues à une humidité relative élevée. Ces plantes sont considérées comme du stade de propagation *in vitro*. Le taux de succès aux différents stades est variable mais peut atteindre 90-95%. La culture *in vitro* du fraisier peut poser quelques problèmes (par ex. perte de l'authenticité variétale, comportement anormal des microplants). C'est la raison pour laquelle il est important d'utiliser un milieu de culture contenant des taux d'hormones relativement faibles, de limiter le nombre de stades de multiplication et d'éviter la formation de cals. Avec ces précautions, la multiplication *in vitro* peut se révéler tout à fait satisfaisante pour produire du matériel certifié.

Tableau 1. Méthodes recommandées de détection et d'identification des virus et organismes analogues du fraisier. Adapté à partir de Converse (1987).

Pathogène	Symptômes sur cvs*	Inoculation mécanique sur plantes herbacées	Plantes indicatrices pour transmission par greffage foliaire†	Autres méthodes (voir notes 1 et 2)
Virus et organismes analogues présents dans la région OEPP et testés dans ce schéma				
Transmis par les pucerons				
<i>Strawberry crinkle virus</i> (<i>Cytorhabdovirus</i> , SCV)	-	-	4, 5	Striure des pétales, RT-PCR
<i>Strawberry mild yellow edge virus</i> (<i>Potexvirus</i> , SMYEV)	-	-	4, 5	UC-6 latent, RT-PCR
<i>Strawberry mottle virus</i> (<i>Sadwavirus</i> , SmoM)	-	-	4, 5	par Cf, RT-PCR
<i>Strawberry veinbanding virus</i> (<i>Caulimovirus</i> , SVBV)	-	-	6, 12	10,11 latent, PCR
Transmis par les cicadelles				
Strawberry green petal phytoplasma	+	-	-	Distinguer sur hôtes herbacés, PCR
Transmis par les nématodes				
<i>Arabis mosaic virus</i> (<i>Nepovirus</i> , ArMV)	-	+	-	
<i>Raspberry ringspot virus</i> (<i>Nepovirus</i> , RpRSV)	-	+	-	
<i>Strawberry latent ringspot virus</i> (<i>Sadwavirus</i> , SLRV)	-	+	-	
<i>Tomato black ring virus</i> (<i>Nepovirus</i> , TBRV)	-	+	-	
Virus et organismes analogues absents de la région OEPP ou d'importance mineure pouvant également faire l'objet de tests (optionnel)				
Transmis par les pucerons				
<i>Strawberry pseudo mild yellow-edge virus</i> (<i>Carlavirus</i> , SPMYEV)	-	-	4, 12, Alp	10, 11 latent
Strawberry latent C	-	-	5, EMC	
Transmis par les cicadelles				
Aster yellows phytoplasma	+	-	-	PCR
Lethal decline	+	-	-	
Phytoplasma yellows	+	-	-	
Rickettsia yellows	+	-	-	
Transmis par les nématodes				
<i>Tomato ringspot virus</i> (<i>Nepovirus</i> , TRSV)	-	+	4, 5, Alp	
Vecteur inconnu				
Strawberry chlorotic fleck virus (<i>Closterovirus</i> , StCFV)	-	-	EMB, EMK	RT-PCR
Leafroll	+	-	5	
Witches' broom	+	-	4, 5	
Multiplier plant	+	-	-	
Feather-leaf	+	-	Alp, 4, 1	
Strawberry associated pallidosis virus (<i>Crinivirus</i> , SpaV)	-	-	10, 11	RT-PCR
Strawberry necrotic shock virus (<i>Ilarvirus</i> , SNSV)	-	+	Alp, 4	RT-PCR
<i>Beet pseudo-yellows virus</i> (<i>Crinivirus</i> , BPYV)	-	-	-	RT-PCR, ELISA
<i>Fragaria chiloensis</i> cryptic virus (FCICV)	-	-	-	RT-PCR
<i>Fragaria chiloensis</i> latent virus (<i>Ilarvirus</i> , CILV)	-	-	-	RT-PCR
<i>Apple mosaic virus</i> (<i>Ilarvirus</i> , ApMV)	-	-	-	RT-PCR

* Le cultivar lui-même manifeste des symptômes permettant d'identifier l'agent responsable.

† Abréviations des plantes indicatrices pour le fraisier. Nombres = clones indicateurs UC 1-12; Alp = *F. vesca* var. *semperflorens* 'Alpine'; EMB, EMV, EMK = divers clones de *F. vesca* 'East Malling clone'; Cq = *Chenopodium quinoa*; Cf = *Chaetosiphon fragaefolii* (pour plus de détails, voir aussi Converse, 1987).

Note 1: La méthode ELISA peut être utilisée pour confirmer une infection si l'organisme doit être identifié au niveau de l'espèce. Certains népovirus (RpRSV, TBRV, TRSV et SNSV) peuvent être variables et un seul antisérum peut ne pas détecter tous les isolats. C'est le cas surtout si l'on utilise des anticorps monoclonaux. Martin et Tzanetakis (2006) donne un résumé de tous les virus du fraisier et des méthodes de détection.

Note 2: Le diagnostic des pathogènes par la PCR a subi une évolution rapide au cours des dix dernières années. Cela concerne aussi la technologie d'extraction de l'acide nucléique de quasiment tout tissu végétal, permettant des réactions enzymatiques. La PCR est par conséquent généralement disponible pour les pathogènes à partir du moment où leur génome a été caractérisé. Cependant, il faut garder à l'esprit que les méthodes de PCR ne peuvent être considérées comme fiables que si l'on dispose de données sur la variabilité des pathogènes individuels et d'une expérience de la culture spécifique. Pour les virus caractérisés sur fraisier, la situation de la détection par PCR se trouve à différents niveaux de développement. La détection par PCR est donc mentionnée seulement lorsque le Groupe d'experts disposait de données indiquant que les tests sont de qualité égale ou supérieure aux autres méthodes recommandées au tableau 1. On peut s'attendre à ce que d'autres méthodes de PCR deviennent disponibles avant que le présent schéma ne soit mis revu.

Tableau 2. Tolérances proposées lors des inspections visuelles pour les organismes nuisibles du fraisier à différents stades de la certification

		% de plantes			
		SI	SPI	SPII	MC
Virus	Cités pour le fraisier au tableau 1	0	0	0	2*
Phytoplasmes	Cités pour le fraisier au tableau 1	0	0	0	1
Bactéries	<i>Xanthomonas fragariae</i>	0	0	0	0
Oomycètes	<i>Phytophthora cactorum</i>	0	0	0	1
	<i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>fragariae</i>	0	0	0	0
Champignons	<i>Colletotrichum acutatum</i>	0	0	0	0
	<i>Verticillium dahliae</i> & <i>V. albo-atrum</i>	0	0	0	2
	<i>Rhizoctonia fragariae</i>	0	0	0	1
Arthropodes	<i>Chaetosiphon fragaefolii</i>	0	0	1	1
	<i>Phytonemus pallidus fragariae</i>	0	0	0	0,1†
Nématodes	<i>Aphelenchoides</i> spp.	0	0	0	0
	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	0	0	0	0
Autres organismes nuisibles et maladies	par ex. <i>Tetranychus urticae</i> , <i>Sphaerotheca alchemillae</i>	Pratiquement indemne	Pratiquement indemne	Pratiquement indemne	Pratiquement indemne

* À l'exception des virus de quarantaine dans le pays de production pour lesquels une tolérance zéro s'applique

† La tolérance s'applique à la présence d'acariens vivants et non aux symptômes.

SI = stade initial; SPI = stade de propagation I; SPII = stade de propagation II; MC = matériel certifié.

Note. Une maladie nouvelle (leaf marginal chlorosis) a été récemment observée en Espagne et en France. Elle a été décrite en France et est causée par une bactérie du phloème. Les tolérances n'ont pas encore été établies.

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

