

Matériel végétal sain et certification

Christian Vernière

La protection des cultures dans son approche la plus large doit tenir compte des coûts de traitement chez le producteur, de la perte de l'homologation de certains produits phytosanitaires, des problèmes liés à la protection de l'environnement, de la demande d'un produit de qualité par le consommateur. Par ailleurs, la mise au point d'une méthode de lutte doit prendre en considération trois types de facteur affectant directement ou indirectement la santé des arbres et la qualité de la culture : les facteurs abiotiques (structure de la culture, pratiques culturales, environnement), biotiques (résistance de l'hôte, nature du porte-greffe, physiologie, compétition) et politiques (programme d'assainissement et d'enregistrement du matériel végétal, quarantaine, éradication). La gestion commune de ces facteurs doit conduire à la mise au point d'une méthode de lutte aussi satisfaisante que possible. La composante politique apparaît primordiale en protection des cultures car elle permet de proposer des stratégies visant à garantir au producteur la qualité des plants avant la plantation et de prévenir l'introduction de plantes contaminées dans un territoire.

Intérêts et objectifs d'un programme d'assainissement et de certification

Les méthodes de régulation interviennent principalement dans deux situations, où elles se révèlent être une barrière efficace. Dans un premier type de situation, lorsqu'une maladie n'est pas encore présente dans une région, la pre-

mière défense consiste à éviter son introduction et à exclure l'agent pathogène s'il devait être introduit. La quarantaine est un moyen très efficace pour contrôler le passage de plants contaminés et pour détecter la présence de porteurs sains, contaminés mais n'exprimant pas la maladie. Les programmes d'assainissement et de production de plants sains permettent alors de pourvoir à la demande des professionnels et limitent ainsi l'introduction non contrôlée ou illégale de matériel dont l'état sanitaire est inconnu. Un second type de situation est représenté par l'apparition d'une nouvelle maladie dont l'incidence est faible. La lutte consiste alors à réduire l'inoculum ou à l'éliminer avec la mise en place d'un programme d'éradication et la distribution de matériel assaini, qui empêche la diffusion de plants contaminés.

Les programmes d'assainissement et de certification ont pour objectifs de fournir du matériel de propagation et des plants indemnes des principales maladies de dégénérescence répertoriées et dont l'authenticité variétale est reconnue.

Depuis 1994, pour circuler librement à travers les pays de l'Union européenne, le matériel végétal doit être accompagné d'un passeport phytosanitaire. Ce passeport, dont la délivrance est soumise à l'approbation du service de la protection des végétaux, garantit que la plante est indemne des organismes phytopathogènes de quarantaine, qui sont des organismes nuisibles soumis à réglementation dans l'Union européenne. Ce passeport phytosanitaire n'est délivré que pour des plantes provenant d'une zone reconnue indemne de ces agents pathogènes ou produites selon un schéma de certification.

Par exemple, pour satisfaire à cette directive européenne, les plants d'agrumes produits en Corse doivent être issus d'un tel schéma car *Spiroplasma citri*, agent du *stubborn* et organisme de quarantaine, est présent sur l'île.

Pour illustrer la conduite d'un programme d'assainissement, des exemples seront pris chez différentes cultures fruitières et notamment chez les agrumes, pour lesquels un tel programme existe depuis le début des années 60 en Corse. Pour cette culture soumise à de fortes contraintes pathologiques, de nombreux travaux ont été réalisés et ont permis de mettre en place un schéma national de certification depuis 1996.

L'introduction et l'échange du matériel végétal

L'échange de matériel végétal comporte toujours un risque d'introduction accidentelle d'agents phytopathogènes. Les agents pathogènes se trouvant sur des hôtes asymptomatiques jouant le rôle de porteur sain constituent un risque particulier. Des mesures doivent être prises dans le cadre de la collecte et dans le choix du matériel ainsi qu'à l'exportation et à l'importation. Une désinfec-

tion sera appliquée et l'envoi de plantes racinées est à bannir quand une autre solution existe. Dans le cas du transfert de matériel végétatif, on cherchera à appliquer des mesures de quarantaine (observation des plantes dans un lieu protégé, mise en place de procédures d'indexation). Les mesures décrites ci-dessous pour différentes espèces peuvent être combinées, quand cela est possible, pour un meilleur contrôle sanitaire du matériel végétal.

Les agrumes

L'introduction, à des fins de recherche ou de production, d'espèces végétales ou de cultivars nouveaux, résultant d'hybridations ou de mutations et potentiellement intéressants pour certaines conditions pédoclimatiques, est souhaitable. Ce transfert peut être parfois réalisé sans risque phytosanitaire. C'est le cas des variétés d'agrumes polyembryonnées où les graines peuvent être échangées quasiment sans risque de transmission d'agents pathogènes. Mais le plus souvent, l'introduction se fait par une propagation végétative, qui peut mener à l'importation de nouveaux ravageurs et de maladies car de nombreux cas de porteurs sains existent selon le couple hôte-pathogène. L'établissement d'une quarantaine offre une garantie sanitaire à l'introduction de matériel végétatif. Elle prévient la contamination des plantes voisines en gérant le matériel végétal potentiellement infecté lors de son cheminement depuis l'introduction jusqu'à l'utilisation par les pépiniéristes et les producteurs. Cette quarantaine se déroule selon trois étapes principales : le contrôle et l'isolement du matériel introduit, la régénération et l'indexation (NAVARRO *et al.*, 1984).

A la réception du matériel végétal, celui-ci doit être examiné pour déceler toute anomalie, d'autant plus s'il provient d'une région où une maladie grave de dégénérescence est connue. Ce matériel est ensuite désinfecté. Par exemple, les baguettes de greffons d'agrumes sont trempées dans une solution d'hypochlorite de sodium contenant un agent mouillant (FRISON et TAHER, 1991 ; NAVARRO *et al.*, 1984).

Ces règles doivent aussi être appliquées lors de l'envoi de matériel végétal et limitent l'échange d'agents pathogènes et de ravageurs.

De nouveaux problèmes pathologiques apparus récemment et l'existence de souches sévères géographiquement limitées rendent nécessaires l'application de soins et d'un contrôle particulier pour circonscrire ces menaces (chlorose variéguée, *witches'broom*, *chlorotic dwarf*, souches sévères de *tristeza*).

Le caféier et le cacaoyer

Il est fortement recommandé que les échanges de matériel végétal entre les pays producteurs passent d'abord dans un pays non producteur pour y subir une quarantaine. C'est dans cet esprit que les actions de conservation, d'enri-

chissement et de sauvegarde de la biodiversité concernant le caféier et le cacaoyer ont conduit le Cirad à se doter à Montpellier d'une installation de quarantaine afin d'assurer les échanges intercontinentaux de matériel végétal en s'entourant de garanties sanitaires suffisantes.

Des recommandations ont été émises pour assurer une collecte et un acheminement présentant un minimum de risques.

L'EXPÉDITION À PARTIR D'UN PAYS PRODUCTEUR

Avant tout envoi de matériel végétal à partir de la zone de prélèvement, il convient d'éviter les prélèvements dans une zone où la maladie est présente. Si cette condition n'est pas remplie, il faut prélever uniquement sur du matériel végétal d'apparence saine — ce qui ne représente cependant pas une garantie absolue — en étant très strict sur le choix.

Suivant les organes expédiés, différentes procédures seront retenues.

Si le matériel est prélevé sous forme de fruits ou de cabosses en cours de maturation ou à maturité, les fruits ou les cabosses collectés doivent être d'apparence saine. Dans le cas des caféiers, si les conditions le permettent, les semences sont dépulpées, lavées et séchées, sinon elles sont conservées en l'état. Dans le cas du cacaoyer, il est préférable de prélever la cabosse entière.

Les semences doivent être traitées avec un fongicide et un insecticide sous forme de poudre puis mises dans un sachet en plastique. Les cabosses doivent être pulvérisées ou immergées dans une solution de fongicide.

Si le matériel est prélevé sous forme de baguettes à greffer ou à bouturer, les baguettes munies de feuilles ou sans feuilles doivent être collectées sur du matériel apparemment sain. Elles doivent être immergées dans une solution fongicide et insecticide appropriée et emballées dans du papier journal humidifié avec cette solution traitante.

Pour le matériel prélevé sous forme de boutures racinées ou de plants racinés, le bon état sanitaire de la plante doit être contrôlé avec une attention toute particulière pour les racines. Celles-ci sont nettoyées et les débris végétaux et de terre ainsi que les parties nécrosées sont éliminés.

Les plantes racinées doivent être pulvérisées ou immergées dans une solution insecticide puis fongicide. Elles sont emballées dans du papier journal humidifié avec cette solution traitante.

LA RÉCEPTION DU MATÉRIEL VÉGÉTAL AU LABORATOIRE DE QUARANTAINE

Un contrôle sanitaire du matériel reçu est effectué et tout matériel douteux est détruit. Le matériel végétal est placé dans un compartiment isolé avec des visites limitées. Les fragments de végétal restant après le prélèvement et les emballages sont détruits par incinération à l'autoclave.

Dans les conditions particulières d'un matériel végétal introduit *in vitro* après réception puis passage dans une serre, la présence d'un éventuel pathogène de nature cryptogamique ou bactérienne devrait s'exprimer dans le milieu de culture et, de ce fait, être éliminé comme agent contaminant. L'élimination est réalisée sans connaître la nature du contaminant. Ainsi, il est hautement improbable d'introduire un parasite fongique ou bactérien.

La situation est différente dans le cas des virus (*swollen shoot* du cacaoyer) car les conditions de maintien en survie du virus sont mal connues. Dans ce cas, la seule précaution à prendre est d'exclure toute introduction de matériel végétal provenant de zones où la maladie est présente ou de s'assurer de l'état sanitaire du matériel végétal par un diagnostic électrophorétique (AMEFIA *et al.*, 1988).

L'EXPORTATION DU MATÉRIEL VÉGÉTAL

Après le temps de quarantaine nécessaire et le contrôle de l'état sanitaire, le matériel végétal peut être réexporté vers les zones de production où il subira une nouvelle quarantaine en condition tropicale d'une durée plus brève, avant son installation définitive en pépinière ou au champ.

LES PRINCIPALES MALADIES CONCERNÉES

Pour le caféier, les maladies sont la rouille orangée, bien que les pays épargnés soient maintenant très peu nombreux, le transfert de souches plus ou moins virulentes est à éviter et l'anthracnose des baies, pour l'instant limitée à l'Afrique centrale et à l'Afrique de l'Est. Dans de nombreux pays, la dispersion par les plants des nématodes des genres *Pratylenchus* et *Meloidogyne* doit être prise en considération. Des traitements rigoureux doivent être effectués en pépinière (désinfection du substrat au bromure de méthyle, traitement périodique avec un nématicide des types aldicarbe, carbofuran, terbufos, etc.), afin de distribuer aux caféiculteurs des plants rigoureusement sains.

Pour le cacaoyer, de nombreuses maladies redoutables sont encore localisées à un groupe de pays ou à un continent : le *swollen shoot*, au Ghana et au Togo, la moniliose et le balai de sorcière, à de nombreux pays d'Amérique du Sud. Le genre *Phytophthora* qui provoque la pourriture brune des cabosses a une répartition mondiale, mais on a vu dans la partie concernant les agents pathogènes que les espèces, voire les souches, pouvaient présenter des agressivités très différentes.

L'hévéa

La production de matériel végétal sain concerne essentiellement *Microcyclus ulei* afin d'empêcher le transfert de cette importante maladie d'Amérique du Sud vers d'autres continents. A l'instar de ce qui a été fait pour le caféier et le

cacaoyer, un relais phytosanitaire a été mis en place à la Guadeloupe où, en dehors de la station, il n'y a pas d'hévéa et où le matériel végétal, sous forme de porte-greffes greffés, vient de Guyane. Avant l'expédition, le matériel reste au moins un an en observation. *Microcyclus* n'a jamais été observé à la Guadeloupe pour un jardin à bois qui possède 300 génotypes.

Le palmier à huile et le cocotier

Les échanges de matériel végétal d'un pays ou d'un continent à l'autre ne se font que sous forme de pollen ou de semence.

Pour aucune maladie il n'a été mis en évidence de transmission par la semence, à l'exception, bien entendu, de contaminations externes toujours possibles. Par mesure de précaution supplémentaire, les envois de matériel végétal à partir de pays ou de régions où sévissent des maladies à virus ou à viroïde sont prohibés. Pour ce qui concerne ces maladies, on se référera, aux directives de la FaO (Food and agricultural organization).

Les récoltes de pollen se font, pour des raisons évidentes de légitimité, dans des conditions d'isolement très strictes. Quant à la préparation, elle se fait en enceinte stérile, le pollen étant séché, mis sous vide, puis conservé à basse température.

Avant l'expédition, les semences sont traitées avec des mélanges de fongicides et d'insecticides classiques pour prévenir d'éventuelles contaminations extérieures. Suivant les législations sanitaires des pays d'accueil, des mesures sanitaires complémentaires sont prises à la demande.

Le matériel *in vitro* peut être aussi échangé mais il devra subir après réception les procédures d'indexation adéquates.

Par ailleurs, un effort de prévention peut être réalisé par une information par affichage auprès du public sur les risques de contamination lors du transport de plantes (ROISTACHER *et al.*, 1977). Des guides techniques indiquant les règles à suivre pour une circulation sans risques des ressources génétiques végétales sont régulièrement édités par la FaO en collaboration avec l'Ipgr (International plant genetic resources institute) ; il en existe pour des espèces comme les agrumes, le cocotier ou le cacaoyer.

L'amélioration sanitaire : le cas des agrumes

L'obtention de variétés saines ou indemnes des principales maladies de dégénérescence est un atout dans la gestion des vergers agrumicoles. En effet, si l'ensemble des affections de type viral sont transmises par voie végétative, peu sont mécaniquement transmissibles (BOVÉ, 1995). Un seul virus des agrumes,

celui de la psorose, peut être transmis par la graine (CAMPIGLIA *et al.*, 1976) et certaines maladies pourraient être transmises par le pollen (VOGEL et BOVÉ, 1976). Cette absence de transmission par la graine permet d'obtenir des porte-greffes issus de semis avec une bonne garantie sanitaire. Elle a aussi permis de régénérer des variétés polyembryonnées par sélection nucellaire. Cependant, cette procédure ne peut s'appliquer aux variétés monoembryonnées et on observe une plus longue persistance des caractères juvéniles chez les plants nucellaires.

Certains pathogènes réduisent le choix du porte-greffe. Par exemple, le virus de la tristezza peut entraîner un dépérissement de variétés greffées sur le bigaradier ou le viroïde de l'exocortis, altère *Poncirus trifoliata* et ses hybrides de type citrange, limitant ainsi la croissance et la production de l'arbre. La régénération des variétés d'agrumes a permis d'utiliser ces porte-greffes en éliminant les principaux pathogènes des agrumes (virus, viroïdes, phytoplasmes, spiroplasmes, bactéries endocellulaires).

La régénération par microgreffage de méristèmes

La technique de microgreffage, mise au point par NAVARRO *et al.* (1975), est appliquée à la station de recherche agronomique Inra-Cirad de San Giuliano, en Corse, depuis 1978. Elle a permis de s'affranchir du niveau d'embryonie et des caractères juvéniles liés à la sélection nucellaire (NICOLI, 1985 ; VOGEL *et al.*, 1988a). Le microgreffage de méristèmes consiste à isoler de façon aseptique des méristèmes à partir de plantes infectées puis de les greffer sur des jeunes semis de porte-greffes étiolés qui ont poussé *in vitro*.

Les jeunes pousses à partir desquelles sont prélevés les méristèmes, constitués du dôme apical et de deux ou trois ébauches foliaires, proviennent de plants cultivés en cage d'isolement ou de baguettes qui sont forcées dans un phytotron à 32 °C (VOGEL *et al.*, 1988a). La température sélectionnée est un compromis entre l'élimination des virus et la survie de la plante. Cette thermothérapie est pratiquée en fonction de l'origine des plantes et des agents pathogènes potentiellement présents (virus de la psorose, virus du *tatter leaf*). Le méristème est déposé à la base d'une fente en T inversé réalisée sur le porte-greffe étiole *in vitro* (photo 107). Le pourcentage de reprise à l'issue du microgreffage est d'environ 36 % et varie selon les espèces de 23 à plus de 60 % (VOGEL *et al.*, 1988a). Lorsque la plantule a émis quelques feuilles, l'acclimatation du jeune plant se fait par greffage sur un porte-greffe vigoureux bien raciné en pot et maintenu ensuite sous un sac de polyéthylène (photo 108). La plante est alors constituée de trois espèces : le porte-greffe du pot, le porte-greffe *in vitro* pris en sandwich et la variété qu'on laisse pousser. Ce transfert sur un plant porteur a amélioré, dans ces conditions, les résultats de l'acclimatation par transplantation directe dans un substrat (NAVARRO *et al.*, 1975 ; NICOLI, 1985). Considérant le taux de reprise lors de ce deuxième greff-

fage, le pourcentage de plants microgreffés et acclimatés obtenus est de 25 % en moyenne. Les plantes sont ensuite cultivées en serre et indexées pour les principales maladies de dégénérescence.

L'indexation et le contrôle sanitaire

Des méthodes d'indexation sûres et faciles à mettre en œuvre sont nécessaires et ont été développées pour une détection sensible et une identification fiable des pathogènes. Des techniques de détection sérologiques et moléculaires ont été mises au point récemment pour une utilisation de routine, qui associe rapidité et spécificité. Cependant, pour des virus mal caractérisés ou des agents inconnus, ces méthodes de détection ne sont pas disponibles ou insuffisamment sensibles. L'indexation biologique par greffe d'inoculation ou par transmission mécanique reste alors la seule méthode de détection (ROISTACHER, 1991 ; SPIEGEL *et al.*, 1993).

L'INDEXATION BIOLOGIQUE

Des symptômes indiquant une infection virale peuvent apparaître chez les plantes sur lesquelles le matériel à régénérer a été prélevé et ainsi orienter un diagnostic. Cependant, l'existence d'espèces tolérantes asymptomatiques, porteurs sains, à l'égard de certains pathogènes rend nécessaire l'utilisation de plantes indicatrices sensibles pour la détection d'un certain nombre de pathogènes (BOVÉ, 1995 ; ROISTACHER, 1991).

L'expression des symptômes de différentes maladies peut réclamer l'application de températures données. Par exemple, chez les agrumes, les symptômes de psorose ou des maladies apparentées (*concave-gum*, *cristacortis*, *impietratura*) apparaissent pour des températures voisines de 20-25 °C, alors que les symptômes de *stubborn* et de maladies à viroïdes (*exocortis*, cachexie) sont mis en évidence pour des températures de 32-34 °C. En pratique, la mise en place d'un tel programme d'indexation nécessitera donc deux compartiments indépendants dédiés chacun à la détection de ces différentes maladies (FRISON et TAHER, 1991 ; ROISTACHER, 1991).

Lors de chaque série d'indexation, un témoin positif et un témoin négatif doivent être incorporés, ils témoigneront de la bonne application des conditions environnementales ou des effets autres que ceux induits par l'agent pathogène (ROISTACHER, 1991). Cela implique la constitution d'une banque d'agents pathogènes où la conservation de souches peu sévères sera recherchée.

LES TECHNIQUES SÉROLOGIQUES

Ces méthodes immunologiques reposent sur la spécificité de la réaction entre un anticorps et un antigène. Un anticorps donné est produit contre un déterminant antigénique ou un épitope spécifique. En réponse à la présence de plu-

sieurs épitopes, une population d'anticorps sera synthétisée, elle sera appelée anticorps polyclonal. Dans le cadre d'un programme de certification, si l'agent pathogène présente une grande variabilité antigénique, on choisira un anticorps ou un mélange d'anticorps permettant de détecter l'ensemble des souches du pathogène.

Le marquage enzymatique des anticorps a conduit au développement de deux techniques largement utilisées dans le diagnostic : le test Elisa et l'immunoempreinte. Ces techniques sont appliquées dans la détection des agents pathogènes car elles sont facilement mises en œuvre dans les manipulations de routine. Dans le cas des pathogènes des agrumes, elles permettent de détecter le virus de la tristezza, *Spiroplasma citri* agent du *stubborn*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* agent du chancre citrique et le virus du *satsuma dwarf* (CIVEROLO et FAN, 1982 ; GARNSEY et al., 1993 ; ROISTACHER, 1991).

LES TECHNIQUES MOLÉCULAIRES

Pour la détection sérologique, il faut que la protéine antigénique soit exprimée constamment dans la plante infectée, ce qui peut être une limite. Les techniques moléculaires détectant directement la présence de séquences nucléotidiques permettent de s'affranchir de cette contrainte et offrent une grande spécificité. Deux méthodes sont principalement utilisées dans la détection et dans l'identification des agents phytopathogènes : l'hybridation moléculaire et la réaction de polymérisation en chaîne (pcr). L'hybridation moléculaire repose sur la capacité qu'ont deux chaînes complémentaires de se dissocier et de se réassocier en fonction des conditions de salinité et de température. Des séquences monocaténaire marquées, ou sondes, peuvent alors s'hybrider à des séquences cibles et leur présence peut être ensuite révélée. Dans les opérations de routine, les sondes froides sont préférées aux sondes radioactives, plus sensibles mais de courte durée de demi-vie et d'un usage plus contraignant. La réaction de polymérisation en chaîne consiste à amplifier une séquence d'Adn à l'aide d'amorces spécifiques des brins cibles et d'une Adn polymérase thermostable. La répétition d'un cycle de dénaturation, d'appariement des amorces et de synthèse d'Adn aboutit à l'amplification de la séquence cible, qui sera visualisée sur un gel d'agarose.

La réaction de polymérisation en chaîne améliore la sensibilité de l'hybridation moléculaire, dont l'intensité de la réponse se trouve limitée par le nombre de séquences cibles présentes dans l'échantillon. Si ces méthodes ne sont pas encore appliquées en routine dans les programmes d'indexation sanitaire des agrumes, leur développement en cours pour certains pathogènes devrait permettre d'améliorer sensiblement leur détection (*Liberobacter* pour la maladie de *huanglongbin* ou *greening*, *Spiroplasma citri* pour le *stubborn*).

Pour favoriser la détection de virus à Arn nécessitant une phase de rétrotranscription ou limiter des effets inhibiteurs à partir des extraits végétaux, une purification préliminaire peut être nécessaire. L'immunocapture est une solution

qui permet de traiter rapidement un grand nombre d'échantillons et qui pourrait être développée en routine.

Cette technique est utilisée pour l'indexation et la production de matériel sain, exempt de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, à l'île de la Réunion où — et cela est vrai dans de nombreuses autres zones tropicales où les agrumes sont cultivés — l'inoculum primaire est souvent apporté à la plantation par des plants de pépinière. L'état sanitaire du matériel végétal en pépinière est donc un facteur à améliorer fortement. Il a été montré à l'île de la Réunion que le mode actuel de conduite des pépinières, en plein air avec un système d'irrigation par aspersion, favorise grandement le développement du chancre bactérien. De plus, les pluies de forte intensité et de courte durée sont les plus propices à la dissémination de l'agent pathogène par projection. L'efficacité en pépinière de techniques culturales modifiées pour limiter le développement du chancre bactérien est en phase d'évaluation. Le schéma de production retenu est le suivant : conservation des pieds mères servant de source de greffons et de semis de porte-greffes en serres *insect-proof*, élevage des plants greffés sous un tunnel en plastique avec une irrigation au goutte à goutte.

Il est également capital que l'état sanitaire des pieds mères servant de source de greffons soit régulièrement réévalué. A ce titre, la technique de détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* fondée sur l'immuncapture (Ic-n-pcr) mise au point par HARTUNG *et al.* (1996) se révèle très sensible. Elle permet la détection d'environ 100 cellules bactériennes par gramme de tissu.

Quelques vergers expérimentaux ont été installés à l'aide de plants de pomelo très sensibles au chancre bactérien et produits dans des conditions où *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* n'est pas détecté par Ic-n-pcr. Ces vergers permettront d'évaluer la durabilité d'une stratégie fondée sur la production de plants indemnes de symptômes et porteurs de populations inférieures à la sensibilité de l'Ic-n-pcr par rapport à celle de plants obtenus selon une stratégie de lutte intégrée classique. Les premiers résultats montrent que, du fait de l'existence quasi systématique d'agrumes infectés dans un périmètre permettant une dissémination par association de vents et de pluies, une infection des plants des vergers expérimentaux s'est produite lors du passage de cyclones (les conditions climatiques favorables à une dissémination de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* sont réunies sur d'assez longues distances). Il demeure donc très difficile dans les conditions de l'île de la Réunion de développer des cultures d'agrumes très sensibles au chancre bactérien (pomelos, limettiers, combavas).

LE CHOIX D'UNE TECHNIQUE

Trois critères doivent guider le choix d'une technique d'indexation dans un programme d'assainissement ou de certification : sa sensibilité, sa spécificité et sa facilité d'utilisation. Le coût d'un test est aussi un facteur important à intégrer, mais il est relatif à la valeur des plants indexés (pieds mères, plants producteurs).

Un niveau de sensibilité idéal est celui qui permet de détecter des agents pathogènes en phase latente, à partir de petits échantillons ou d'arbres pour lesquels le pathogène est irrégulièrement distribué. Les tests moléculaires avec leur grande sensibilité offrent ces qualités et, malgré les contraintes liées à leur manipulation, ils devraient se multiplier.

La spécificité d'un test est primordiale pour l'exclusion d'un organisme de quarantaine donné. Cependant, pour réduire le coût du test, des techniques polyvalentes seront utiles dans le cadre des programmes d'indexation. Par exemple, une seule procédure, associant une amplification sur un hôte sensible et une électrophorèse en conditions dénaturantes, permet de détecter les onze viroïdes des agrumes (DURAN-VILA *et al.*, 1988). En revanche, la gestion variétale d'un verger pourra réclamer l'identification de races ou de pathotypes au sein d'une même espèce de pathogènes et donc une plus grande spécificité.

Enfin, les techniques de détection devront être simples et rapides. Elles devront permettre de traiter un grand nombre d'échantillons (automatisation) à moindre coût. Le choix d'un test dans une panoplie de techniques existantes devra prendre en compte ces avantages et ces contraintes.

Les programmes de certification

La réussite d'un verger dépend de la qualité des plants utilisés lors de la plantation. Pour cela, le producteur doit pouvoir bénéficier d'une qualité maximale sur le plan sanitaire et pomologique pour les plants achetés en pépinières, que ce soit pour le porte-greffe ou pour la variété.

Une garantie sanitaire et pomologique

Des programmes d'amélioration pour l'obtention de plants sains existent (VOGEL *et al.*, 1988b). Ils peuvent être développés pour des pathogènes spécifiques en fonction des contraintes. Dans le cadre d'une certification, la conformité pomologique des têtes de lignées saines, garantissant les caractères physico-chimiques du fruit, est confirmée (VOGEL *et al.*, 1988a). Un plant initial est alors sélectionné pour servir de base à la multiplication végétative. La sélection sanitaire et pomologique des agrumes pratiquée sur la station Inra-Cirad de San Giuliano a servi de point de départ au schéma de certification mis en place pour les plants fruitiers d'agrumes (VERNIÈRE, 1995 ; figure 1). Après une régénération et une vérification sanitaire, les plants sont enregistrés et conservés sous cage *insect-proof*. Ils sont multipliés et plantés dans un verger pour un contrôle pomologique. La situation phytosanitaire exceptionnelle de la Corse à l'égard des principales maladies de dégénérescence facilite l'observation de ces ressources génétiques en plein air. Pour préserver le plus pos-

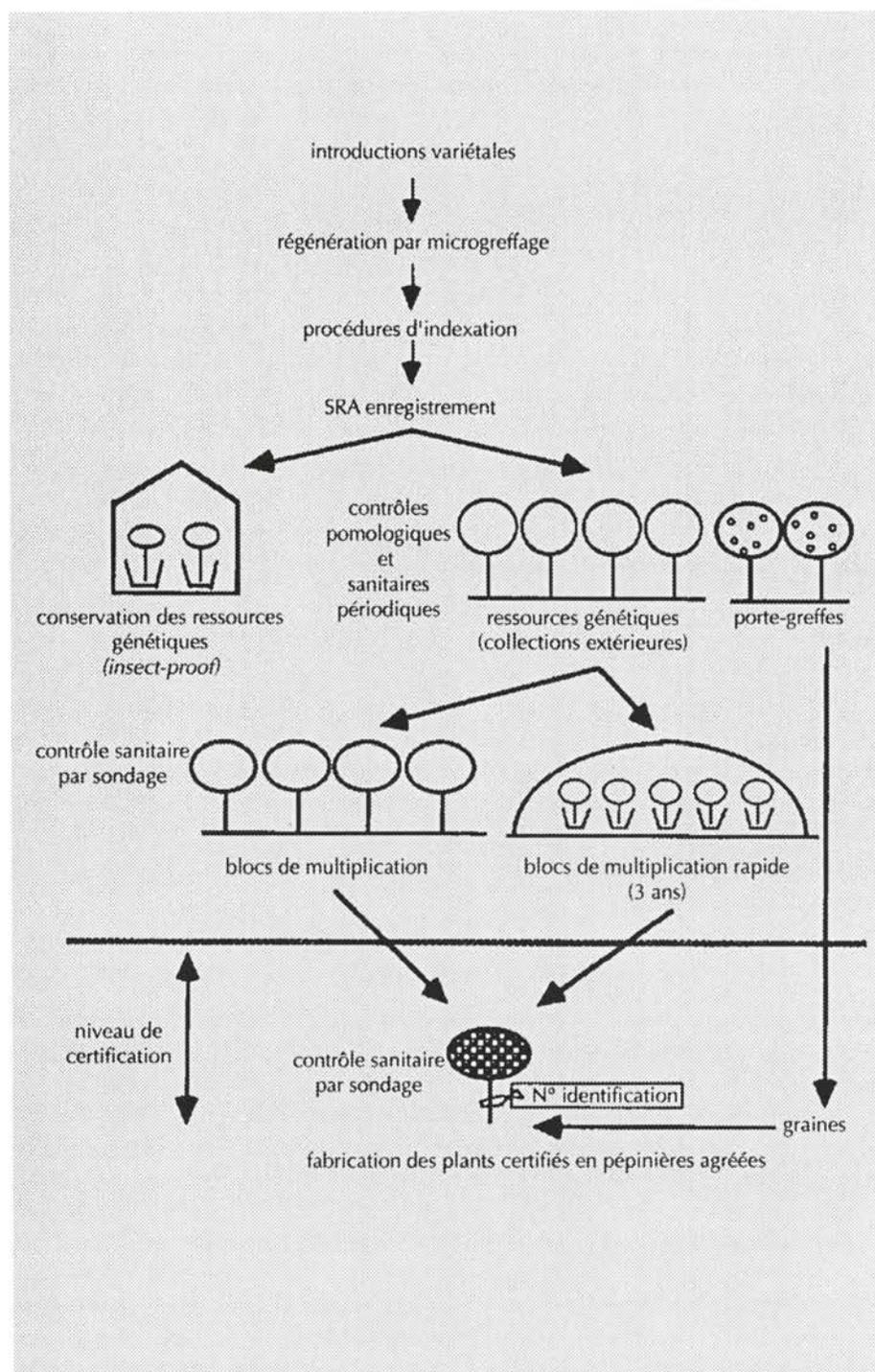


Figure 1. Procédure pour un programme de certification phytosanitaire : le cas des agrumes (d'après C. VERNIÈRE, 1995).

sible cette situation, des contrôles sont effectués par le service régional de la protection des végétaux pour certains agents de quarantaine afin d'envisager une éradication rapide dans le cas d'une introduction. En fonction des besoins des professionnels, des blocs de multiplication ont été plantés. Pour répondre dans les meilleurs délais à une demande, des blocs de multiplication rapide peuvent être réalisés et permettre ainsi une amplification significative de la production des greffons (ROISTACHER, 1992).

Une garantie à la plantation

Un programme de certification doit se faire sous le contrôle d'un organisme officiel. A partir des greffons et des semences de porte-greffe certifiés, la production de plants se fait en respectant un cahier des charges. Un agrément est accordé à des pépiniéristes qui s'engagent à le respecter. Après un contrôle de l'état sanitaire et de l'authenticité variétale, les plants portant des informations nécessaires à leur identification sont étiquetés individuellement.

Conclusion

La première condition pour garantir le succès d'une plantation est de disposer d'un matériel végétal parfaitement sain. Les programmes d'assainissement et de certification revêtent un caractère particulièrement important pour les agrumes affectés par un grand nombre de maladies, en particulier de type viral au sens large, souvent difficiles à détecter.

La création d'un tel programme d'amélioration sanitaire et pomologique en Corse au début des années 60 et s'intégrant maintenant dans un programme officiel de certification a permis d'éliminer la plupart des maladies transmissibles par greffage du verger corse et de préserver ce dernier des principales maladies de dégénérescence. Cependant, pour réussir, l'ensemble de la filière doit être prise en compte. Dans le cas des agrumes, les plants ornementaux ne rentrent pas dans le schéma de certification actuel alors que la frontière avec les plants fruitiers n'existe pas pour les pathogènes. La mise en place de programmes de quarantaine et de certification reste toutefois la principale barrière pour éliminer les agents pathogènes indésirables et diminuer l'inoculum potentiel. Cependant, pour réussir, un tel programme doit rencontrer l'adhésion totale des professionnels pépiniéristes ou arboriculteurs.

Par ailleurs, avec les échanges de matériel végétal de plus en plus fréquents d'un continent à l'autre, les risques de disperser des maladies graves, souvent encore localisées, sont grands. Enfin, même pour une maladie ayant une répartition mondiale, toutes les souches de pathogènes n'ont pas la même agressivité. Pour ces raisons, les services de quarantaine ont un rôle très important à jouer.

Références bibliographiques

- AMEFIA Y.K., 1988. Utilisation des profils électrophorétiques pour la mise au point d'une méthode de diagnostic du *swollen shoot* du cacaoyer. *Café, cacao, thé*, vol. XXXII, n°1.
- BOVÉ J.-M., 1995. *Virus and virus-like diseases of citrus in the Near East region*. Rome, Italie, Fao, 518 p.
- CAMPIGLIA H.G., SILVEIRA C.M., SALIBE A.A., 1976. Psorosis transmission through seeds of trifoliolate orange. In : *Proc. VIIIth Conf. Int. Org. Citrus Virol.* E.C. Calavan édit., Riverside, Etats-Unis, p. 132-134.
- CIVEROLO E.L., FAN F. 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Dis.* 66 : 231-236.
- DURAN-VILA N., PINA J.A., BALLESTER J.F., JUAREZ J., ROISTACHER C.N., RIVERA-BUSTAMANTE, SEMANCIK J.S., 1988. The citrus exocortis disease : a complex of viroid-RNAs. In : *Proc. Xth Conf. Int. Org. Citrus Virol.* L.W. Timmer *et al.*, Eds. Riverside, Californie, p. 152-164.
- FRISON E.A., TAHER M.M., 1991. *FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of citrus germplasm*. Rome, Italie, Fao-lbpgr, 50 p.
- GARNSEY S.M., PERMAR T.A., CAMBRA M., HENDERSON C.T., 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). In : *Proc. XIIth Conf. Int. Org. Citrus Virol.*, P. Moreno *et al.* Eds. Riverside, Etats-Unis, p. 39-50.
- HARTUNG J.H., PRUVOST O., VILLEMOT I., ALVAREZ A., 1996. Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by immunocapture and a nested-polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 86 : 95-101.
- NAVARRO L., JUAREZ J., PINA J.A., BALLESTER J.-F., 1984. The citrus quarantine station in Spain. In : *Proc. IXth Conf. Int. Org. Citrus Virol.*, S.M. Garnsey *et al.* Eds. Riverside, Etats-Unis, p. 365-370.
- NAVARRO L., ROISTACHER C.N., MURASHIGE T., 1975. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100 : 471-479.
- NICOLI M., 1985. La régénération des agrumes en Corse par la technique du microgreffage de méristèmes *in vitro*. *Fruits* 40 : 113-136.
- ROISTACHER C.N., 1991. *Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis*. Rome, Italie, Fao, 286 p.
- ROISTACHER C.N., 1992. Rapid multiplication of citrus from a single plant. In : *Proc. Int. Soc. Citriculture*, vol. 1. Catania, Italie, Isc, p. 309-312.
- ROISTACHER C.N., CALAVAN E.C., NAVARRO L., 1977. Concepts and procedures for importation of citrus budwood. In : *Proc. Int. Soc. Citriculture*, vol. 1. Isc. Lake Alfred, Floride, Etats-Unis, Isc, p. 133-136.
- SPIEGEL S., FRISON E.A., CONVERSE R.H., 1993. Recent developments in therapy and virus-detection procedures for international movement of clonal plant germplasm. *Plant Dis.* 77 : 1176-1180.

VERNIÈRE C., 1995. Evolvement of the *Citrus* sanitary improvement program at the research station of San Giuliano. In : Proc. IIIrd Int. workshop on Ctv, Lake Alfred, Etats-Unis, 15-18 mai 1995. Lake Alfred, Etats-Unis, université de Floride, p. 154-156.

VOGEL R., BOVÉ J.-M., 1976. Transmission de maladies infectieuses d'agrumes à agrumes par le pollen d'arbres appliqué sous l'écorce de plantes saines. C.R. Acad. Sci. Paris, France, 283 : 1409-1412.

VOGEL R., BOVÉ J.-M., NICOLI M., 1988b. Le programme français de sélection sanitaire des agrumes. Fruits 43 : 709-720.

VOGEL R., NICOLI M., BOVÉ J.-M., 1988a. Le microgreffage de méristèmes *in vitro*. Son utilisation en Corse pour la régénération des agrumes. Fruits 43 : 167-173.