

Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes  
European and Mediterranean Plant Protection Organization

# **Normes OEPP EPPO Standards**

Production of healthy plants for planting  
Production de végétaux sains destinés à la  
plantation

PM 4/21(2)



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

## Approval

EPPO Standards are approved by EPPO Council. The date of approval appears in each individual standard.

## Review

EPPO Standards are subject to periodic review and amendment. The next review date for this set of EPPO Standards is decided by the EPPO Working Party on Phytosanitary Regulations.

## Amendment record

Amendments will be issued as necessary, numbered and dated. The dates of amendment appear in each individual standard (as appropriate).

## Distribution

EPPO Standards are distributed by the EPPO Secretariat to all EPPO member governments. Copies are available to any interested person under particular conditions upon request to the EPPO Secretariat.

## Scope

EPPO Schemes for the Production of Healthy Plants for Planting are intended to be used by NPPOs or equivalent authorities, in their capacity as bodies responsible for the design of systems for production of healthy plants for planting, for the inspection of such plants proposed for phytosanitary certification, and for the issue of appropriate certificates.

## References

- OEPP/EPPO (1991) Recommendations made by EPPO Council in 1990: general scheme for the production of certified pathogen-tested vegetatively propagated ornamental plants. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **21**, 757.
- OEPP/EPPO (1992) Recommendations made by EPPO Council in 1981: certification of virus-tested fruit trees, scions and rootstocks. *EPPO Technical Documents* **1013**, 42–43.
- OEPP/EPPO (1993) Recommendations made by EPPO Council in 1992: scheme for the production of classified vegetatively propagated ornamental plants to satisfy health standards. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **23**, 735–736.

## Definitions

*Basic material*: propagation stock material from all but the last stage of propagation stock, satisfying the recommended certification standards and certified for sale. According to the number of stages of propagation stock, there may be several grades of basic material.

*Candidate nuclear stock*: any plant that may become or may be propagated to produce nuclear stock. Testing for specified pests is required before the plant can be accepted as nuclear stock. Until testing is complete and negative, the plant remains candidate nuclear stock.

*Certification scheme*: system for the production of vegetatively propagated plants for planting, intended for further propagation or for sale,

## Approbation

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

## Révision

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

## Enregistrement des amendements

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

## Distribution

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

## Champ d'application

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

## Références

- OEPP/EPPO (1991) Recommendations du Conseil de l'OEPP en 1990: schéma pour la production de plantes ornementales, à multiplication végétative, certifiées 'pathogen-tested'. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **21**, 740.
- OEPP/EPPO (1992) Recommendations du Conseil de l'OEPP en 1981: certification virologique des arbres fruitiers, greffons et porte-greffe. *Documents techniques de l'OEPP* **1013**, 10–11.
- OEPP/EPPO (1993) Recommendations du Conseil de l'OEPP en 1992: schéma pour la production de matériel classifié de plantes ornementales multipliées par voie végétative et répondant aux normes sanitaires. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **23**, 729–730.

## Définitions

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

*Filiation*: la lignée d'une plante par multiplication végétative à partir d'un parent identifié.

*Matériel certifié*: matériel de multiplication issu du dernier stade de propagation. Le matériel certifié respecte les normes de certification

obtained from nuclear stock after several propagation stages under conditions ensuring that stated health standards are met. The filiation of the material is recorded throughout the scheme.

*Certified material:* propagating material from the last stage of propagation stock, satisfying the recommended certification standards and certified for sale. In the case of plants which are sold grafted onto rootstocks, the rootstocks must also be at least of the last stage of propagation stock, and the plants must be held under approved conditions between grafting and sale. Certified material may, according to the plant concerned, be referred to more specifically as, for example, certified plants, certified cuttings, certified bulbs, etc.

*Classification scheme:* system for the production of vegetatively propagated plants for planting, intended for further propagation or for sale, obtained from selected candidate material after one or several propagation stages under conditions ensuring that stated health standards are met. Different classes may be defined according to the inspections and tests used, the tolerance levels applied and the precautions taken. The filiation of classified material is not considered.

*Filiation:* the line of descent by vegetative propagation from a defined parent plant.

*Nuclear stock:* plants individually tested by the most rigorous procedure in a certification scheme and found free from specified pests. All such plants must be maintained at all times under strict conditions ensuring freedom from infection. According to the crop concerned, plants propagated from nuclear stock material may remain nuclear stock provided that they do not leave the nuclear stock conditions. In the case of plants which are maintained by grafting onto rootstocks, the rootstocks must also be nuclear stock.

*Nuclear stock material:* propagating material derived from nuclear stock, which may be further propagated without change of ownership, or certified for sale as pre-basic material.

*Pre-basic material:* nuclear stock material, satisfying the recommended certification standards and certified for sale.

*Propagation stock:* plants derived from nuclear stock, propagated and maintained under conditions ensuring freedom from infection. Pathogen freedom is checked by appropriate procedures. Propagation may be done in a number of successive stages under different approved conditions. The plants are then known as propagation stock I, propagation stock II, etc. There may be several generations within each of these stages, provided that the plants do not leave the approved conditions. The number of stages and/or generations allowed within propagation stock is generally limited and will depend on the crop concerned. In the case of propagating material which is maintained by grafting on a rootstock, the rootstock should be at least of the corresponding stage of propagation stock.

*Propagation stock material:* propagating material derived from propagation stock, which may be further propagated without change of ownership, or certified for sale as basic or certified material, according to the stage of propagation stock concerned.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Outline of requirements

EPPO Schemes for the Production of Healthy Plants for Planting describe the steps to be followed for the production of vegetatively propagated planting material of a particular cultivated plant, whose

## Vue d'ensemble

Un Schéma de l'OEPP pour la production de végétaux sains destinés à la plantation décrit, pour une plante cultivée donnée, les étapes de la production par voie végétative de matériel destiné à la plantation, dont

health status is attested by an official certificate. Certification and classification represent distinct alternative approaches to the production of healthy planting material. In a typical certification scheme, the certified material is descended by not more than a fixed number of steps from individual plants, each of which is tested and found free from pests, and is then maintained and propagated under rigorous conditions excluding recontamination. In a classification scheme, the classified material is descended by one or more steps from material which, as a population, meets certain health standards and is maintained and propagated under conditions minimizing recontamination. In both cases, however, health status is attested by an official certificate. Which of the approaches is appropriate for a given cultivated plant depends on considerations of cost and resources, health status required, practical possibilities for testing, rate of recontamination, value of the final material.

EPPO Schemes for the Production of Healthy Plants for Planting give details on the selection, growth and maintenance of the candidate material, and on the propagation of this material in several stages under conditions ensuring that stated health standards are met. Appropriate checks on specified pests are specified throughout the scheme. Information is provided, as necessary, on relevant pests, cultural practices, inspection and testing methods, recommended certification standards.

### Existing EPPO Standards in this series

Thirty EPPO Standards have already been approved and published, under the title *Certification Schemes*. This set of revised standards introduces a new title for the series. Each standard is numbered in the style PM 4/2 (1), meaning an EPPO Standard on Phytosanitary Measures (PM), in series no. 4 (EPPO Schemes for the Production of Healthy Plants for Planting), in this case standard no. 2, first version.

This set constitutes a revision of all the existing standards concerning ornamental plants. The EPPO Panel on certification of pathogen-tested ornamentals developed a new basic text for its certification schemes. This has now been applied to all 10 Standards on certification schemes. The Panel also reviewed the technical content of all the Standards for which it was responsible, including the six Standards on classification schemes. All 16 Standards for ornamentals have thus been updated with the latest technical information. The other standards in the series are:

PM 4/7 (2)	Nursery requirements. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> <b>31</b> , 441–444.
PM 4/8 (1)	Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> <b>24</b> , 347–367
PM 4/9 (1)	Pathogen-tested material of <i>Ribes</i> . <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> <b>24</b> , 857–864
PM 4/10 (1)	Pathogen-tested material of <i>Rubus</i> . <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> <b>24</b> , 865–873
PM 4/11 (1)	Pathogen-tested material of strawberry. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> <b>24</b> , 875–889
PM 4/12 (1)	Pathogen-tested citrus trees and rootstocks. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> <b>25</b> , 737–755
PM 4/16 (1)	Pathogen-tested material of hop. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> <b>27</b> , 175–184
PM 4/17 (1)	Pathogen-tested olive trees and rootstocks. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> <b>27</b> , 185–194

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

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

### Normes OEPP déjà existantes dans cette série

Trente normes OEPP ont déjà été approuvées et publiées, sous le titre de *Schémas de certification* actuellement remplacé par la nouvelle dénomination de la série. Chaque norme est individuellement numérotée: par exemple la norme PM 4/2 (1) est une Norme OEPP sur les mesures phytosanitaires (PM), appartenant à la série 4 (Schémas pour la production de végétaux sains destinés à la plantation); il s'agit dans ce cas de la Norme 2, 1ère version.

Les textes présentés ici correspondent à la révision de toutes les normes concernant les plantes ornementales. Le Groupe d'experts de l'OEPP sur la certification sanitaire des plantes ornementales a développé un nouveau texte de base pour les schémas de certification qui le concernent. Il l'a appliqué à chacune des dix Normes de certification. Le Groupe a aussi passé en revue le contenu technique de toutes les Normes qui sont de son ressort, y compris les six Normes de classification. Ainsi, l'ensemble des 16 Normes sur les plantes ornementales a été mis à jour par rapport aux dernières informations techniques. Les autres normes de la série sont:

PM 4/7 (2)	Exigences pour les établissements de certification. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> <b>31</b> , 441–444
PM 4/8 (1)	Certification sanitaire des variétés et porte-greffe de la vigne. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> <b>24</b> , 347–367
PM 4/9 (1)	Certification sanitaire des <i>Ribes</i> . <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> <b>24</b> , 857–864
PM 4/10 (1)	Certification sanitaire des <i>Rubus</i> . <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> <b>24</b> , 865–873
PM 4/11 (1)	Certification sanitaire du fraisier. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> <b>24</b> , 875–889
PM 4/12 (1)	Certification sanitaire des arbres et porte-greffe d'agrumes. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> , <b>25</b> , 737–755
PM 4/16 (1)	Certification sanitaire du houblon. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> <b>27</b> , 175–184
PM 4/17 (1)	Certification sanitaire d'arbres et de porte-greffe d'olivier. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> <b>27</b> , 185–194

PM 4/18 (1)	Pathogen-tested material of <i>Vaccinium</i> spp. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 27</i> , 195–204	PM 4/18 (1)	Certification sanitaire de matériel de <i>Vaccinium</i> spp. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 27</i> , 195–204
PM 4/27 (1)	Pathogen-tested material of <i>Malus</i> , <i>Pyrus</i> and <i>Cydonia</i> . <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 29</i> , 239–252	PM 4/27 (1)	Certification sanitaire de <i>Malus</i> , <i>Pyrus</i> and <i>Cydonia</i> . <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 29</i> , 239–252
PM 4/28 (1)	Seed potatoes <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 29</i> , 253–267	PM 4/28 (1)	Pommes de terre de semence. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 29</i> , 253–267
PM 4/29 (1)	Certification scheme for cherry. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 31</i> , 447–461	PM 4/29 (1)	Schéma de certification pour le cerisier. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 31</i> , 447–461
PM 4/30 (1)	Certification scheme for almond, apricot, peach and plum. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 31</i> , 463–478	PM 4/30 (1)	Schéma de certification pour l'abricotier, l'amandier, le pêcher et les pruniers. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 31</i> , 463–478

## Production of healthy plants for planting Production de végétaux sains destinés à la plantation

### Certification scheme for rose Schéma de certification pour le rosier

#### Specific scope

This standard describes the production of certified pathogen-tested material of *Rosa* species and hybrids.

#### Specific approval and amendment

First approved in 1997-09.

Revision approved in 2000-09.

---

The scheme is presented according to the general sequence proposed by the EPPO Panel on Certification of Pathogen-tested Ornamentals and adopted by EPPO Council (OEPP/EPPO, 1991). It gives details, for the different steps of certification, of the operations to be carried out on the crop in the nursery, including tests and visual inspections, to ensure that defined health standards required for the certification are met, and also defines those health standards. Certified rose material for export should in any case satisfy the phytosanitary regulations of importing countries, especially with respect to any of the pathogens covered by the scheme which are also quarantine pests. The stages of the certification scheme are illustrated in Fig. 1. The tests and inspections to be carried out at different stages of the scheme are summarized in Appendix I and the pests covered by the scheme are summarized in Table 1.

For the production of certified pathogen-tested material of rose, selection, testing and production under conditions ensuring freedom from reinfection are required for both cultivars and rootstocks. Cultivars are either grown on their own roots or grafted onto rootstocks. Some rootstock types are vegetatively propagated and others are obtained from seeds. Some are cultivated outdoors and others under glass.

#### 1. Selection of candidate nuclear stock

The scheme applies to species, hybrids and cultivars of *Rosa* spp.

#### Cultivars and vegetatively propagated rootstocks

The candidate material may be existing *Rosa* clones used as rootstocks, or new or existing cultivars. The plants selected should, as far as possible, be healthy-looking, vigorous and of

#### Champ d'application spécifique

Cette norme décrit la production de matériel des espèces et hybrides de *Rosa* soumis à une certification sanitaire.

#### Approbation et amendement spécifiques

Approbation initiale en 1997-09.

Révision approuvée en 2000-09.

---

Ce schéma est présenté selon le plan général proposé par le Groupe d'experts OEPP sur la certification sanitaire des plantes ornementales et adopté par le Conseil de l'OEPP (OEPP/EPPO, 1991). Il donne des détails, pour les différentes étapes de la certification, sur les opérations qui doivent être effectuées en pépinière, y compris les tests et les inspections visuelles, pour garantir que le matériel soit conforme aux normes sanitaires; ces normes sont également définies dans ce schéma. Le matériel certifié de rosier destiné à l'exportation doit dans tous les cas satisfaire à la réglementation phytosanitaire des pays importateurs, notamment en ce qui concerne les pathogènes figurant dans le schéma et classés aussi comme organismes de quarantaine. Les stades du schéma de certification sont illustrés à la Fig. 1. Les tests et les inspections devant être effectués aux différents stades du schéma sont résumés à l'Annexe I et les organismes nuisibles couverts par le schéma sont résumés au Tableau 1.

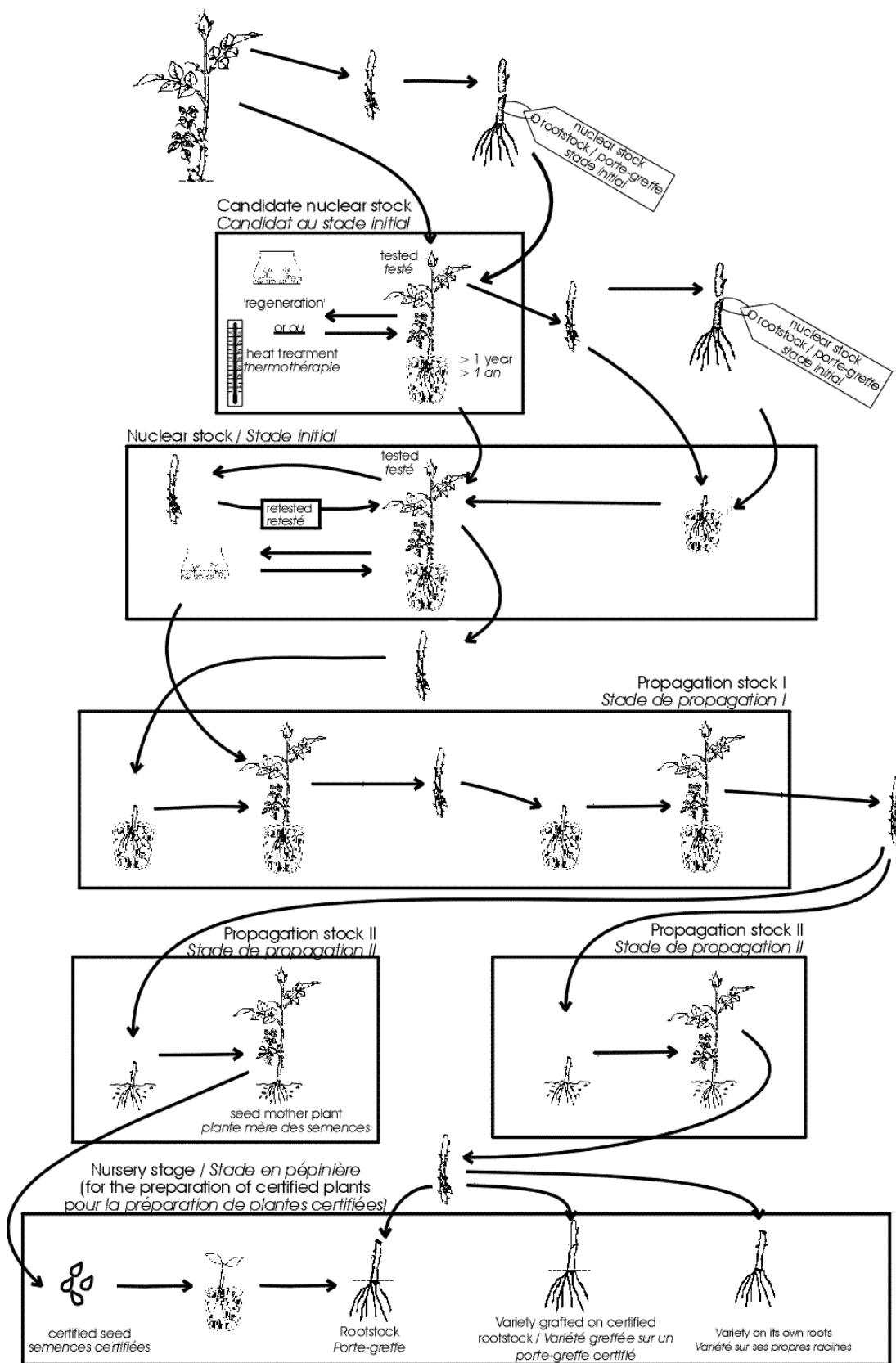
Pour la production de matériel de rosier certifié, les cultivars ainsi que les porte-greffe doivent subir une sélection et des tests, et être produits dans des conditions garantissant l'absence de réinfection. Les cultivars peuvent être autoracinées ou être greffées sur des porte-greffe. Certains types de porte-greffe sont multipliés par voie végétative et d'autres sont obtenus à partir de semences. Ils sont cultivés à l'extérieur ou en serre.

#### 1. Sélection de plantes candidates au stade initial

Le schéma s'applique aux espèces, hybrides et cultivars de *Rosa* spp.

#### Porte-greffe multipliés par voie végétative et cultivars

Des clones de *Rosa* déjà existants utilisés comme porte-greffe et des cultivars nouveaux ou déjà existants peuvent être sélectionnés comme matériel candidat. Les plantes sélectionnées doivent, autant que



**Fig. 1** Diagram of the stages in the rose certification scheme  
 Diagramme des stades du schéma de certification du rosier

**Table 1** Rose pests covered by the certification scheme  
Organismes nuisibles du rosier couverts par le schéma de certification

Pests/Organismes nuisibles	Common name or symptom/Nom commun ou symptôme	Vector/Vecteur
<b>Fungi/Champignons</b>		
<i>Verticillium alboatrum</i>	Verticillium wilt	
<i>Verticillium dahliae</i>		
<i>Leptosphaeria coniothyrium</i> (anamorph/anamorphe <i>Coniothyrium fuckelii</i> )	Common canker	
<i>Chondrostereum purpureum</i>	Silver leaf	
<i>Chalaropsis thielavioides</i>	Black mould	
<b>Bacteria/Bactéries</b>		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Crown gall	
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Hairy root	
<b>Viruses/Virus*</b>		
<i>Prunus necrotic ringspot ilarvirus</i> (PNRSV)	Mosaic, yellow mosaic, yellow net/mosaïque, mosaïque jaune, réseau de stries jaunes	Seeds, pollen/semences, pollen
<i>Apple mosaic ilarvirus</i> (ApMV)		
<i>Arabis mosaic nepovirus</i> (ArMV)	Line pattern/arabesques	<i>Xiphinema</i> , seeds/semences
<i>Strawberry latent ringspot nepovirus</i> (SLRSV)	Ringspot/taches annulaires	<i>Xiphinema</i> , seeds/semences
<b>Nematodes/Nématodes</b>		
<i>Meloidogyne</i> spp.	Root-knot nematodes/nématodes à galles	
<i>Pratylenchus penetrans</i>	Root-lesion nematode/nématode des racines	
<i>Pratylenchus thornei</i>	Root-lesion nematode/nématode des racines	
<i>Pratylenchus vulnus</i>	Root-lesion nematode/nématode des racines	
<i>Xiphinema diversicaudatum</i>	Virus-vector nematode/nématode vecteur de virus	

\*The name 'rose mosaic' is loosely used for the disease caused by one or other of the viruses PNRSV, ApMV and ArMV/La maladie dite 'mosaïque du rosier' peut être causée par un ou plusieurs des virus suivants: PNRSV, ApMV et ArMV.

good quality and should show typical agronomic characters (trueness to type).

New hybrid cultivars derived from seeds should preferably have been produced under conditions avoiding contamination, i.e. sown on a sterilized growing medium, grown in the glasshouse under controlled conditions, on their own roots or grafted only to certified rootstocks.

### Plants for the production of seeds for seedling rootstocks

The plants selected for the production of mother plants for seeds, leading to seedling rootstocks, should also be known to produce uniformly growing progeny from their seeds.

Material imported from outside the EPPPO region should be inspected and, if appropriate, tested under quarantine for all EPPPO quarantine pests of rose occurring naturally in the region of origin, according to the relevant EPPPO phytosanitary procedures, and generally inspected or, if appropriate, tested for any other pests.

## 2. Maintenance and testing of candidate nuclear stock

### 2.1 Growing conditions

The candidate plants for nuclear stock for all types of material (cultivars, vegetatively propagated rootstocks and plants for the

possible, avoir une apparence saine, vigoureuse et de bonne qualité, et elles doivent présenter des caractères agronomiques typiques (authenticité variétale).

Les nouveaux cultivars hybrides issus de semences doivent de préférence avoir été produits dans des conditions empêchant la contamination, c'est-à-dire semés sur un substrat stérilisé, cultivés sous serre en conditions contrôlées, autoracinés ou greffés (seulement sur des porte-greffe certifiés).

### Plantes pour la production de semences destinées à la production de porte-greffe

Les plantes sélectionnées pour la production des plantes-mères des semences destinées à la production de porte-greffe, doivent aussi être connues pour donner une descendance à croissance uniforme à partir de leurs semences.

Le matériel importé de l'extérieur de la région OEPP doit être inspecté et, le cas échéant, testé en quarantaine, par des méthodes recommandées par l'OEPP, pour tous les organismes de quarantaine OEPP du rosier présents naturellement dans la région d'origine, et généralement inspecté ou, le cas échéant, testé pour détecter tout autre organisme nuisible.

## 2. Maintien et test des plantes candidates au stade initial

### 2.1 Conditions de culture

Les plantes candidates au stade initial pour tous les types de matériel (cultivars, porte-greffe multipliés par voie végétative, et plantes pour la



production of seed for seedling rootstocks) should be kept 'in quarantine' (that is in an isolated, suitably designed house, separately from the nuclear stock and from any other rose crops) where they can be observed and tested. All plants should be grown in individual containers in soil-free or sterilized growing medium, to prevent contamination by soil pests such as *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*, endoparasitic nematodes (particularly *Meloidogyne hapla*, *Pratylenchus vulnus* and *Pratylenchus penetrans*) and virus-vector nematodes (particularly *Xiphinema diversicaudatum*). Contact between plants should be avoided. Strict precautions should be taken against infection by *A. tumefaciens* (especially through irrigation water), *Verticillium alboatrum*, *Verticillium dahliae*, *Leptosphaeria coniothyrium*, *Chondrostereum purpureum* and *Chalaropsis thielavioides*. Adequate control of other pests (particularly thrips, mites, aphids, and caterpillars, and the fungi *Botryotinia fuckeliana*, *Sphaerotheca pannosa*, *Peronospora sparsa*, *Diplocarpon rosae*, *Diaporthe eres*, *Chalaropsis thielavioides* and *Phragmidium* spp.) should be ensured throughout the life of the crop, according to good plant protection practice (GPP).

Many existing rootstocks and cultivars (especially long-established types) are infected with certain pathogens, the majority being viruses. Rootstocks that have been propagated vegetatively and that are suspected of being infected, and older cultivars, may therefore be subjected to a regeneration process to eliminate the pathogens. Regeneration may be by heat treatment (thermotherapy) and/or by *in vitro* apex culture, for elimination of viruses (e.g. *Prunus necrotic ringspot ilarvirus*) or other heat-sensitive pathogens (ring pattern, growth abnormalities) (see Appendices V and VI). Existing rootstock and cultivar material obtained by regeneration should also pass through the testing procedure described below. In addition, it should be checked for good agronomic quality and trueness to type. In the case of rootstocks regenerated by heat treatment, testing for *A. tumefaciens* and the viruses below can alternatively be done *in vitro* only.

## 2.2 Testing requirements

All plants should be individually tested for the following pests:

*Prunus necrotic ringspot ilarvirus* (cherry serotype) (PNRSV);  
*Apple mosaic ilarvirus* (apple serotype) (ApMV);  
*Arabis mosaic nepovirus* (ArMV);  
*Strawberry latent ringspot nepovirus* (SLRSV);  
*Agrobacterium tumefaciens*.

Candidate plants should remain in isolation under observation for at least 1 year during which time they should be tested twice for PNRSV, ApMV, ArMV and SLRSV, with an interval of several months. One of these tests should be performed in spring. Furthermore, all plants should be grafted with the range of indicator cultivars that are susceptible to graft-transmissible abnormalities (Appendix II). The grafted plants should be grown in a separate house and visually inspected during at least 2 years. Candidate plants considered satisfactory during the first year can be promoted to nuclear stock; if, however, any plant is later shown to be unsatisfactory, it should then be eliminated.

Recommended test methods for viruses and information on viruses and other abnormalities are given in Appendix II. Recommended test methods for *A. tumefaciens* are given in Appendix III.

production de semences destinées à la production de porte-greffe) doivent être mises en quarantaine (c'est-à-dire placées dans un abri conçu et réservé à cet usage, séparément du stade initial et de toute autre culture de rosier) pour être observées et testées. Toutes les plantes doivent être cultivées dans des pots individuels contenant un substrat sans sol ou stérilisé pour empêcher la contamination par les organismes nuisibles du sol, tels qu'*Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes*, les nématodes endoparasites (en particulier *Meloidogyne hapla*, *Pratylenchus vulnus* et *Pratylenchus penetrans*), et les nématodes vecteurs de virus (en particulier *Xiphinema diversicaudatum*). Le contact entre les plantes doit être évité. Des précautions strictes doivent être prises contre l'infection par *A. tumefaciens* (surtout par l'eau d'irrigation), *Verticillium alboatrum*, *Verticillium dahliae*, *Leptosphaeria coniothyrium*, *Chondrostereum purpureum* et *Chalaropsis thielavioides*. Des mesures de lutte adéquates doivent être prises contre les autres organismes nuisibles (en particulier les thrips, les acariens, les pucerons et les chenilles, ainsi que les champignons *Botryotinia fuckeliana*, *Sphaerotheca pannosa*, *Peronospora sparsa*, *Diplocarpon rosae*, *Diaporthe eres* et *Phragmidium* spp.) pendant toute la vie de la culture, et conformément à la bonne pratique phytosanitaire (BPP).

Un grand nombre de porte-greffe et de cultivars déjà existants (surtout les types établis depuis longtemps) sont touchés par des troubles dont la plupart sont dus à des virus. Les porte-greffe qui ont été multipliés par voie végétative et qui sont soupçonnés d'être infectés, ainsi que les cultivars plus anciens, peuvent donc être soumis à un processus d'élimination des pathogènes. La régénération peut se faire par thermothérapie et/ou par culture d'apex *in vitro*, afin d'éliminer les virus (par ex. *Prunus necrotic ringspot ilarvirus*) ou les autres pathogènes thermosensibles (formation d'anneaux, anomalies de croissance) (voir Annexes V et VI). Le matériel (cultivars ou porte-greffe) obtenu par régénération doit également subir la procédure de test décrite ci-dessous. Par ailleurs, ses bonnes qualités agronomiques et son authenticité variétale doivent être vérifiées. Dans le cas des porte-greffe régénérés par thermothérapie, les tests décrits ci-dessous pour *A. tumefaciens* et les virus peuvent être effectués *in vitro*.

## 2.2 Exigences relatives aux tests

Toutes les plantes doivent être testées individuellement pour les organismes nuisibles suivants:

*Prunus necrotic ringspot ilarvirus* (sérotype cerisier) (PNRSV);  
*Apple mosaic ilarvirus* (sérotype pommier) (ApMV);  
*Arabis mosaic nepovirus* (ArMV);  
*Strawberry latent ringspot nepovirus* (SLRSV);  
*Agrobacterium tumefaciens*.

Les plantes candidates doivent rester isolées en observation pendant au moins une année pendant laquelle elles doivent être testées deux fois pour le PNRSV, l'ApMV, l'ArMV et le SLRSV, à intervalle de plusieurs mois. Un de ces tests doit être réalisé au printemps. Par ailleurs, toutes les plantes doivent être greffées avec une gamme de cultivars indicateurs sensibles aux anomalies transmissibles par le greffage (Annexe II). Les plantes greffées doivent être cultivées dans un abri séparé réservé à cet usage et inspectées visuellement pendant au moins 2 ans. Les plantes candidates jugées satisfaisantes au cours de la première année peuvent être promues au stade initial, mais devront être éliminées si, par la suite, leur état sanitaire se dégrade et n'est plus satisfaisant.

Les méthodes de test recommandées pour les virus et des informations sur les virus et les anomalies de croissance figurent à l'Annexe II. Les méthodes de test recommandées pour *A. tumefaciens* figurent à l'Annexe III.

All plants should be visually inspected at regular intervals for absence of symptoms of *A. tumefaciens*, *Verticillium* spp., virus or growth abnormalities, particularly at times of the year favourable for their symptom expression. For *Verticillium* spp., isolation of the fungus on a specific medium can be employed as a diagnostic method for candidate plants suspected to be infected. This relatively laborious method is not, however, suitable for the systematic testing of all candidate plants.

Any plant found to be infected, by testing or by visual examination, should immediately be eliminated, except in the case of pests which can be adequately controlled. Similarly, plants showing growth abnormalities should be eliminated.

### 2.3 Promotion to nuclear stock

Only candidate plants recognized to be pathogen-free (by visual examination and testing as described) can be promoted to nuclear-stock plants. These plants can be directly transplanted to the nuclear-stock unit or nuclear-stock plants can be propagated from them by cuttings.

Before a plant or any material from it may be transferred to the nuclear-stock conditions, its promotion should be authorized by the official organization, after verifying that all required tests and observations have been performed with negative results. Recommended certification standards are given in Appendix VII.

## 3. Maintenance of the nuclear stock

### 3.1 Growing conditions

In the case of hybrid cultivars, the plants promoted to nuclear stock should be cultivated either on their own roots or (more commonly) grafted onto a rootstock which itself should derive from nuclear stock. The nuclear stock can be readily maintained by *in vitro* micropropagation (Appendix VI) and, in this form, will retain the same status in the scheme. Otherwise, nuclear-stock plants should be kept in a suitably designed protected environment (e.g. glasshouse, gauzhouse) containing only nuclear-stock plants. They should be grown in individual pots of soil-free or sterilized growing medium. They should be maintained under the same conditions, and with the same precautions against infection, as candidate nuclear-stock plants (see point 2 above). A check on trueness to type should be made, by bringing either the nuclear-stock plants, or cuttings taken from them, to flower. The flowering may need to be done in a different place to avoid risk of infection.

### 3.2 Testing requirements

After the first year of growth in the nuclear stock, all plants should be individually tested for PNRSV. Thereafter, nuclear-stock plants should be tested every 3 years (or a third of the plants tested every year) for PNRSV. The probabilities for reinfection by ApMV, ArMV or SLRSV are rather limited during the life of the nuclear-stock plants but it may nevertheless be advisable to retest the plants for these viruses at intervals (e.g. 5 years) to cover the possibility that the viruses may be introduced by human error. Pooled samples may be used for testing by

Les plantes doivent être examinées visuellement à intervalles réguliers pour vérifier l'absence de symptômes d'*A. tumefaciens*, *Verticillium* spp., de viroses ou d'anomalies de croissance, en particulier aux périodes de l'année favorables à l'expression de leurs symptômes. Pour *Verticillium* spp., l'isolement du champignon sur un milieu spécifique peut être utilisé comme méthode de diagnostic pour les plantes candidates suspectées d'être infectées. Par contre, cette méthode relativement laborieuse ne convient pas pour le test systématique de toutes les plantes candidates.

Toute plante trouvée contaminée, à la suite de tests ou d'inspections visuelles, doit être immédiatement éliminée, sauf dans le cas des organismes nuisibles contre lesquels il existe une lutte efficace. De même, les plantes présentant des anomalies de croissance doivent être éliminées.

### 2.3 Promotion au stade initial

Seules les plantes reconnues indemnes de pathogènes (par les examens visuels et tests décrits) peuvent être promues au stade initial. Ces plantes peuvent être transplantées directement dans l'unité du stade initial ou les plantes du stade initial peuvent être prélevées sous la forme de boutures.

Avant qu'une plante, ou tout matériel issu de celle-ci, ne soit transférée dans les conditions du stade initial, sa promotion doit être autorisée par l'organisation officielle, après avoir vérifié que tous les tests et inspections exigés ont été effectués et ont donné des résultats négatifs. Les normes de certification recommandées figurent à l'Annexe VII.

## 3. Maintien du stade initial

### 3.1 Conditions de culture

Dans le cas des cultivars hybrides, les plantes promues au stade initial sont soit autoracinées, soit (plus couramment) greffées sur un porte-greffe qui doit lui-même être issu du stade initial. Le stade initial peut facilement être maintenu et multiplié par micropropagation *in vitro* (Annexe VI) et il conserve sous cette forme le même statut dans le schéma. Les plantes du matériel initial peuvent alternativement être placées dans un environnement protégé et réservé à cet usage (par ex. serre, abri textile), exclusivement réservé aux plantes de même statut. Elles doivent être cultivées dans des pots individuels contenant un substrat sans sol ou stérilisé. Elles doivent être placées dans les mêmes conditions de culture, avec les mêmes précautions contre l'infection, que les plantes candidates au stade initial (voir point 2 ci-dessus). Un contrôle de l'authenticité variétale doit également être effectué en cultivant les plantes du stade initial, ou des boutures prises sur ces plantes, jusqu'à la floraison. Il peut être nécessaire que la floraison ait lieu à un endroit différent pour éviter le risque d'infection.

### 3.2 Exigences relatives aux tests

Après la première année de culture comme matériel initial, toutes les plantes doivent être testées individuellement pour le PNRSV. Par la suite, les plantes du stade initial doivent être testées tous les 3 ans (ou un tiers des plantes testé chaque année) pour le PNRSV. La probabilité de réinfection par l'ApMV, l'ArMV ou le SLRSV est assez faible pendant la durée de vie des plantes du stade initial, mais il est néanmoins conseillé de retester les plantes pour ces virus à intervalles réguliers (par ex. 5 ans) pour tenir compte de l'introduction éventuelle de virus à la

ELISA provided the plants are all of the same age. If a pooled sample is found to be infected, all the individual plants in the sample should be retested. Any plant giving a positive result in a virus test should be eliminated.

The plants should be examined visually at regular intervals (at least twice a year) for symptoms of *A. tumefaciens*, *Verticillium* spp., viruses or growth abnormalities, particularly at times of the year favourable for their symptom expression. Any plant which develops symptoms of any of these disorders should be eliminated immediately.

Cuttings taken from nuclear-stock plants can also be considered as nuclear stock, provided that they do not leave the nuclear stock conditions<sup>1</sup> and are individually retested for PNRSV, ApMV, ArMV and SLRSV. The same applies to plants transferred from *in vitro* culture to pots; in this case, a careful control of trueness to type is also necessary for each plant/clone.

### 3.3 Certification

Before a plant may be propagated further in the certification scheme, the passage to the next stage should be authorized by the official organization on the basis of records of the tests and observations performed during production, and of one or more certification (visual) inspections. Recommended certification standards are given in Appendix VII. If propagating material from nuclear stock leaves the scheme, it may be labelled as 'pre-basic' material.

## 4. Propagation stock I

### 4.1 Growing conditions

Propagation stock I is obtained from nuclear-stock plants by taking cuttings (for rootstocks and cultivars grown on their own roots) or by budding to rootstocks which have a propagation-stock (or nuclear-stock) status.

This stage of propagation should be conducted in protected conditions (e.g. glasshouse, gauzehouse). The plants should be kept in isolated houses, separate from any other plants that are not at an equivalent stage of the certification scheme or any similar certification scheme. The conditions are identical with those for nuclear stock. For the production of grafted miniplants, obtained by 'stenting', the microcuttings and graft scions produced on nuclear-stock plants should be grafted and rooted in protected conditions similar to those of the nuclear stock.

The number of generations of propagation stock I should not exceed two. Each generation should not normally exceed 4 years, but if propagation stock I is maintained for more than 4 years it becomes propagation stock II. The filiation of the plants should be recorded, so that each clone is known to derive from nuclear stock by not more than the appropriate number of generations under the required conditions.

Throughout the production of propagation stock I, checks should be made on varietal purity and on possible mutations.

<sup>1</sup>They may be transferred to other, similar, nuclear-stock conditions and still retain nuclear-stock status, provided that they are packed at all times during their transport in suitable containers designed to avoid contamination.

suite d'une erreur humaine. Plusieurs échantillons peuvent être regroupés pour les tests ELISA, à condition que les plantes soient du même âge. Si l'échantillon résultant se révèle infecté, toutes les plantes de l'échantillon doivent être retestées individuellement. Toute plante présentant un résultat positif à un test pour les virus doit être éliminée.

Les plantes doivent être examinées visuellement à intervalles réguliers (au moins deux fois par an) pour les symptômes d'*A. tumefaciens*, de *Verticillium* spp., de virus ou d'anomalies de croissance, en particulier aux époques de l'année favorables à l'expression de leurs symptômes. Toute plante présentant des symptômes d'un de ces troubles doit être immédiatement éliminée.

Les boutures prélevées sur les plantes du stade initial peuvent également être considérées comme faisant partie du stade initial, à condition qu'elles ne quittent pas les conditions du stade initial<sup>1</sup> et qu'elles soient retestées individuellement pour le PNRSV, l'ApMV, l'ArMV et le SLRSV. Le même principe s'applique aux plantes issues de culture *in vitro* et transférées en pot; dans ce cas, l'authenticité variétale de chaque plante/clone doit être soigneusement contrôlée.

### 3.3 Certification

Avant qu'une plante ne soit multipliée dans le schéma de certification, le passage au stade suivant doit être autorisé 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 figurent à l'Annexe VII. Si du matériel du stade initial quitte le schéma, il peut être appelé 'matériel de pré-base'.

## 4. Stade de propagation I

### 4.1 Conditions de culture

Le stade de propagation I est obtenu à partir de plantes du stade initial en prélevant des boutures (pour les porte-greffe et les cultivars autoracinés) ou par greffage sur des porte-greffe ayant un statut de stade de propagation I (ou de stade initial).

Ce stade de la multiplication doit être conduit sous abri (par ex. serre ou abri textile). Les plantes doivent être placées dans des abris isolés, séparément de toute autre plante ne se trouvant pas à un stade équivalent du schéma de certification ou de tout schéma de certification similaire. Les conditions sont identiques à celles du stade initial. Pour la production de miniplants greffés, obtenus par 'stenting', les microboutures et les greffons produits sur les plantes du stade initial doivent être greffés et enracinés sous abri, dans des conditions similaires à celles du stade initial.

Le nombre de générations pour le stade de propagation I ne doit pas être supérieur à deux. En principe, chaque génération ne doit pas dépasser 4 ans, mais, si le matériel de propagation I est maintenu pendant plus de 4 ans, il devient matériel de propagation II. La filiation des plantes doit être répertoriée pour permettre de vérifier que chaque lot provient du stade initial après, au plus, le nombre fixé de générations de propagation dans les conditions requises.

Tout au long de la production du stade de propagation I, des contrôles doivent porter sur la pureté variétale et sur d'éventuelles mutations.

<sup>1</sup>Elles peuvent être transférées dans des conditions de stade initial similaires et conserver leur statut de stade initial à condition qu'elles soient emballées pendant toute la durée de leur transport dans des conteneurs adéquats conçus pour éviter la contamination.

## 4.2 Testing requirements

No tests are required at this stage. For the production of grafted miniplants, a visual inspection should be performed at the end of the rooting period and before sale. Any plant with symptoms possibly caused by *A. tumefaciens* or *Verticillium* spp. should be tested and then eliminated; if the test is positive for either pathogen, all plants belonging to the same lot should be eliminated. Any plant showing symptoms possibly caused by a virus should be eliminated. It is advisable to perform random testing for PNRSV at regular intervals (e.g. every 1 or 2 years).

## 4.3 Certification

Certification should be granted on the basis of records of the tests and observations performed during production and of one or more certification (visual) inspections. Recommended certification standards are given in Appendix VII. If propagating material from propagation stock I leaves the scheme, it may be labelled as 'basic' material. The certification inspection should be done on the plants from which the basic material will be taken.

## 5. Propagation stock II

### 5.1 Growing conditions

Propagation stock II is derived directly from propagation stock I. The multiplication may be carried out in the field. Propagation stock II should only be planted in plots in which neither *A. tumefaciens* nor *Verticillium* spp. has occurred. Because certain cultivars or rootstocks are tolerant to *A. tumefaciens*, there is a risk that infection may be present if plants of *Rosaceae* or *Vitaceae* have been grown in the previous 5 years, even in the absence of symptoms. The field site should be tested for the presence of *Xiphinema diversicaudatum* (Appendix IV). If these nematodes are detected, they should be tested for the presence of nepoviruses (by a bait test or slash test; see Appendix IV) and, if ArMV or SLRSV is found, the site should not be used. If *X. diversicaudatum* is present in high numbers (e.g. > 100 nematodes/L), there is a risk of rapid spread of any nepoviruses which are introduced. It is advisable to avoid such sites, or to treat with a registered nematicide. The propagation plot should be isolated from any non-certified crop of *Rosaceae* or *Vitaceae* by at least 10 m and isolated from any other crop by fallow land of 3 m.

The filiation of the plants should be recorded, so that each clone is known to derive from nuclear stock by not more than the appropriate number of generations under the required conditions.

Throughout the production of propagation stock II, checks should be made on varietal purity and on possible mutations.

### 5.2 Testing requirements

The plants should be regularly inspected for visual symptoms. Any plant with galls possibly caused by *A. tumefaciens* should be eliminated. Plants showing virus symptoms should be eliminated and all plants belonging to the same lot should be tested individually or in groups by ELISA for the suspected virus; any plant or group of plants shown to be infected should be immediately eliminated. It is advisable

## 4.2 Exigences relatives aux tests

Aucun test n'est exigé à ce stade. Pour la production de miniplants greffés, une inspection visuelle doit être effectuée à la fin de la période d'enracinement et avant la commercialisation. Toute plante présentant des symptômes pouvant être attribués à *A. tumefaciens* ou à *Verticillium* spp. doit être testée puis éliminée; si le test donne un résultat positif, toutes les plantes appartenant au même lot doivent être éliminées. Toute plante présentant des symptômes pouvant être attribués à un virus doit être éliminée. Il est conseillé de réaliser un test par sondage pour le PNRSV à intervalles réguliers (par ex. tous les 1 ou 2 ans).

## 4.3 Certification

La certification sera accordée 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 figurent à l'Annexe VII. Si du matériel de propagation du stade de propagation I quitte le schéma, il peut être appelé 'matériel de base'. L'inspection de certification doit porter sur les plantes sur lesquelles le matériel de base sera pris.

## 5. Stade de propagation II

### 5.1 Conditions de culture

Le stade de propagation II est directement issu du stade de propagation I. La multiplication peut être conduite en plein champ. Le stade de propagation II doit être établi seulement dans des parcelles dans lesquelles ni *A. tumefaciens*, ni *Verticillium* spp. n'ont été trouvés. Parce que certains cultivars ou porte-greffe sont tolérants à *A. tumefaciens*, il existe un risque de présence d'une infection si des *Rosaceae* ou des *Vitaceae* ont été cultivées au cours des cinq dernières années, même en l'absence de symptômes. La parcelle utilisée doit être testée pour détecter la présence de *X. diversicaudatum* (Annexe IV). Si des nématodes de cette espèce sont détectés, ils doivent être testés pour détecter la présence de népovirus (voir Annexe IV) et le site ne doit pas être utilisé si l'ArMV ou le SLRSV sont trouvés. Si des populations importantes de *X. diversicaudatum* sont présentes (par ex. > 100 nématodes/L), même indemnes de virus, il existe un risque de dissémination rapide de tout népovirus éventuellement introduit. Il est conseillé d'éviter de tels sites ou de traiter à l'aide d'un nematicide homologué. La parcelle de multiplication doit être isolée de toute culture non certifiée de *Rosaceae* ou de *Vitaceae* par au moins 10 m et séparée de toute autre culture par une bande non cultivée de 3 m.

La filiation des plantes doit être répertoriée pour permettre de vérifier que chaque lot provient du stade initial après, au plus, le nombre fixé de générations de propagation dans les conditions requises.

Tout au long de la production du stade de propagation II, des contrôles doivent porter sur la pureté variétale et sur d'éventuelles mutations.

### 5.2 Exigences relatives aux tests

Les plantes doivent être régulièrement inspectées pour les symptômes visuels. Toute plante portant des galles pouvant être causées par *A. tumefaciens* doit être éliminée. Les plantes présentant des symptômes de virus doivent être éliminées et toutes les plantes appartenant au même lot doivent être testées par ELISA, individuellement ou en groupes, pour le virus suspecté; toute plante ou groupe de plantes

to perform random testing for PNRSV at regular intervals (e.g. every 1 or 2 years).

### 5.3 Certification

Certification should be granted on the basis of records of the tests and observations performed during production and of one or more certification (visual) inspections. Recommended certification standards are given in Appendix VII. If propagating material from propagation stock II leaves the scheme, it may be labelled as 'certified' material. The certification inspection should be done on the plants from which the certified material will be taken.

## 6. Seeds for rootstocks

Seed mother plants are obtained by taking propagation material from nuclear-stock or propagation-stock I plants. Normally, seed mother plants are grown on their own roots but, if grafted, the rootstock used should be certified. Seed mother plants should be grown on a separate plot, preferably isolated from flowering plants of *Rosa* spp. The soil on which the plants are growing should be free from *X. diversicaudatum* before planting. Each year, the lot of seed mother plants should be randomly tested for the absence of PNRSV. Every 5 years, the lot should be randomly tested for the absence of ArMV and SLRSV. Any plant showing virus symptoms or found positive on testing should be removed from the field immediately.

Certification should be granted on the basis of records of the tests performed during production, and of one or more certification (visual) inspections. Recommended certification standards are given in Appendix VII.

## 7. Nursery stage (for the production of certified plants)

### 7.1 Growing conditions

The plants to be certified are produced by propagation from either propagation stock I or propagation stock II. It should be noted that certified plants derived directly from propagation stock I have a higher health status ('basic') than those from propagation stock II ('certified'). This higher health status may be indicated on the certificate. Certified plants may be produced in nurseries which also cultivate non-certified material of rose, but strict precautions should be taken to ensure that certified and non-certified material are well separated. The origin (pedigree) of all material received by the nursery should be recorded. All material in the scheme should be clearly labelled as to origin and grown separately from material of a different origin. Grafted plants of rose to be cultivated in a nursery for the production of certified plants should be prepared with scions and rootstocks both derived from the certification scheme.

The soil in the production plot should be tested for endoparasitic nematodes of the genus *Pratylenchus* (*P. penetrans*, *P. thornei* and *P. vulnus*) and the virus-vector nematode *X. diversicaudatum* (Appendix IV). If the above-mentioned endoparasitic nematodes are detected, or if there is evidence that *Meloidogyne* spp. were present in the plot in a previous crop, the plot can still be used provided that the soil is disinfested with a registered nematicide and retested. If *X. diversicaudatum* is detected, the nematodes should be tested for the presence of nepoviruses (by a bait test or slash test; see Appendix IV) and, if ArMV or

trouvé infecté doit être immédiatement éliminé. Il est conseillé de réaliser des tests par sondage pour le PNRSV à intervalles réguliers (par ex. tous les 1 ou 2 ans).

### 5.3 Certification

La certification sera accordée 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 figurent à l'Annexe VII. Le matériel de propagation du stade de propagation II qui quitte le schéma peut être appelé 'matériel certifié'. L'inspection de certification doit porter sur les plantes sur lesquelles le matériel certifié sera pris.

## 6. Semences pour porte-greffe

Les plantes-mères des semences sont obtenues en choisissant des plantes du stade initial ou du stade de propagation I. Les plantes-mères sont en principe autoracinées mais, si elles sont greffées, le porte-greffe utilisé doit être certifié. Les plantes-mères des semences doivent être cultivées sur une parcelle séparée, de préférence isolée des plantes de *Rosa* spp. pouvant fleurir. Le sol sur lequel les plantes sont cultivées doit être indemne de *X. diversicaudatum* avant la plantation. Chaque année, le lot de plantes-mères des semences doit être testé par sondage pour vérifier l'absence du PNRSV. Tous les 5 ans, le lot doit être testé par sondage pour vérifier l'absence de l'ArMV et du SLRSV. Toute plante présentant des symptômes de virus ou donnant un résultat positif aux tests doit être immédiatement éliminée de la parcelle.

La certification sera accordée 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 figurent à l'Annexe VII.

## 7. Stade en pépinière (pour la production de rosiers certifiés)

### 7.1 Conditions de culture

Les plantes destinées à être certifiées sont produites par multiplication du stade de propagation I ou II. Noter que si les plantes certifiées sont directement issues du stade de propagation I, leur statut sanitaire sera plus élevé que si elles sont issues du stade de propagation II. Ce statut plus élevé peut être indiqué sur le certificat. Les plantes certifiées peuvent être produites dans des pépinières qui produisent aussi du matériel de rosier non certifié, mais des précautions strictes doivent être prises pour garantir que le matériel certifié est bien séparé du matériel non certifié. L'origine (pedigree) de tout le matériel reçu par la pépinière doit être enregistrée. Tout le matériel faisant partie du schéma doit être clairement étiqueté quant à son origine, et cultivé séparément de tout matériel d'origine différente. Les plants de rosier greffés devant être cultivés pour être certifiés doivent être préparés à partir de scions et de porte-greffe issus tous deux du schéma de certification.

Le sol de la parcelle de production doit être testé pour les nématodes endoparasites *Pratylenchus* spp. (*P. penetrans*, *P. thornei* and *P. vulnus*), et pour le nématode vecteur de virus *X. diversicaudatum* (Annexe IV). Si les nématodes endoparasites mentionnés ci-dessus sont détectés, où s'il existe des indications que des *Meloidogyne* spp. étaient présents dans la parcelle dans une culture précédente, la parcelle peut quand même être utilisée à condition de désinfecter le sol à l'aide d'un nematicide homologué, puis d'effectuer un nouveau test. Si *X. diversicaudatum* est détecté, les nématodes doivent être testés pour la présence

SLRSV are found, the site should not be used. If there is evidence that *A. tumefaciens* has occurred in the plot, then the site should not be used for production of certified plants. The plot should be separated from any non-certified crop of *Rosaceae* or *Vitaceae* by at least 5 m and isolated from any other crop by fallow land of 2 m.

The plants to be certified may be cultivated for only as long as it takes to produce a finished plant (normally 1 year, but maybe longer for garden plants) and they may not be multiplied.

## 7.2 Testing requirements

The plants should be regularly inspected for visual symptoms of *A. tumefaciens*, *Verticillium* spp., viruses and growth abnormalities.

## 7.3 Certification

Certification will be granted on the basis of records of the tests and observations performed during production, and of one or more certification (visual) inspections. Recommended certification standards are given in Appendix VII.

## 8. Execution and administration of the certification scheme

### 8.1 Execution of the scheme

The stages of the certification scheme may only be carried out by registered specialized establishments, satisfying defined criteria (EPPO Standard PM 4/7 Nursery requirements for certification schemes). The grower should ensure that all tests specified in the scheme (Appendix I) are performed and that records are kept of the results of the tests and inspections, and on the elimination of plants. Any plants removed during production should be recorded and the reasons for removal given. The official organization is responsible for the administration and monitoring of the scheme. It should confirm that all necessary tests and inspections have been performed during production, and that any tests have been conducted by approved methods and/or approved laboratories. It should also verify the general health status of the plants in the scheme by visual inspections; if the certification standards are not met, certification should not be granted and/or the plants concerned should not be permitted to continue in the certification scheme.

### 8.2 Control on the use and status of certified material

Throughout the certification scheme, the origin of each plant should be known so that any problems of health or trueness to type may be traced. Certified plants leaving the scheme should carry a certificate (which may be a label) indicating the certifying authority, the plant producer and the certification status.

## APPENDIX I

### Tests and inspections for rose

The tests and inspections for rose are summarized in Table 2.

de népovirus (voir Annexe IV) et le site ne doit pas être utilisé si l'ArMV ou le SLRSV sont trouvés. Un site précédemment trouvé infesté par *A. tumefaciens* ne doit pas être utilisé pour produire le matériel certifié. La parcelle doit être séparée de toute culture non certifiée de *Rosaceae* ou de *Vitaceae* par au moins 5 m et isolée de toute autre culture par une zone non cultivée de 2 m.

Les plantes qui seront certifiées peuvent être cultivées aussi longtemps que nécessaire pour produire une plante définitive (en principe 1 an, mais parfois plus longtemps pour les plants de jardin) et elles ne doivent pas être multipliées.

## 7.2 Exigences relatives aux tests

Les plantes doivent être inspectées régulièrement pour les symptômes visuels d'*A. tumefaciens*, de *Verticillium* spp., de virus et d'anomalies de croissance.

## 7.3 Certification

La certification sera accordée 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 figurent à l'Annexe VII.

## 8. Exécution et administration du schéma de certification

### 8.1 Exécution du schéma

Les stades du schéma de certification ne peuvent être réalisés que par des établissements spécialisés et enregistrés satisfaisant des critères précis (Norme OEPP PM 4/7 Exigences pour les pépinières). Le producteur doit garantir que tous les tests mentionnés dans le schéma (Annexe I) sont effectués et que des documents sont conservés sur les résultats des tests et des inspections, ainsi que sur l'élimination éventuelle de plantes. Toute plante éliminée pendant la production doit être répertoriée, et les raisons de l'élimination doivent être données. L'organisation officielle est responsable de l'administration et de la surveillance du schéma. Elle doit confirmer que tous les tests et les inspections nécessaires ont été effectués pendant la production, et que tous les tests ont été effectués selon des méthodes approuvées et/ou par des laboratoires approuvés. Elle doit également vérifier l'état général des plantes du schéma par des inspections visuelles. Si les normes de certification ne sont pas respectées, la certification ne sera pas accordée et/ou les plantes concernées ne pourront pas passer au stade suivant du schéma de certification.

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

Tout au long du schéma de certification, l'origine de chaque plante doit être connue afin de pouvoir retrouver l'origine de tout problème phytosanitaire ou de conformité au type. Les plantes certifiées quittant le schéma doivent porter un certificat officiel (qui peut être une étiquette) indiquant l'autorité responsable de la certification, le producteur et le statut de certification.

## ANNEXE I

### Tests et inspections pour le rosier

Les tests et inspections pour détecter les organismes nuisibles du rosier sont résumés au Tableau 2.

**Table 2** Summary of tests and inspections for rose pests at different stages of the scheme  
 Résumé des tests et des inspections pour détecter les organismes nuisibles du rosier aux différents stades du schéma

Pests/Organismes nuisibles	Candidate nuclear stock (except for rootstocks regenerated by heat treatment)/Candidat au stade initial (excepté les porte-greffe régénérés par thérapie thermique)			Nursery stage/Stade en pépinière
	Nuclear stock/Stade initial	Propagation stock I/Stade de propagation I	Propagation stock II/Stade de propagation II	
PNRSV	Individual testing by graft inoculation, sap inoculation ELISA or ISEM; twice in at least one year with an interval of several months (once in spring)/Test individuel par inoculation par greffe, inoculation de sève, ELISA ou ISEM, deux fois en au moins 1 an avec un intervalle de plusieurs mois (une fois au printemps)	Individual testing after 1 year, then every 3 years/Test individuel après un an, puis tous les 3 ans	Visual inspection (and possibly by random testing at regular intervals)/Inspection visuelle (et éventuellement test par sondage à intervalles réguliers)	Visual inspection/Inspection visuelle
ApMV	Individual testing by graft inoculation, sap inoculation ELISA or ISEM; twice in one year with an interval of several months (once in spring); after one year, then every 3 years/Test individuel par inoculation par greffe, inoculation de sève, ELISA ou ISEM; deux fois en 1 an avec un intervalle de plusieurs mois (une fois au printemps); après 1 an, puis tous les 3 ans	Visual inspection (and possibly by pooled samples at intervals)/Inspection visuelle (et éventuellement tests à intervalles sur des échantillons regroupés)	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle
ArMV	Individual testing by graft inoculation, sap inoculation ELISA or ISEM; twice in one year with an interval of several months (once in spring); after one year, then every 3 years/Test individuel par inoculation par greffe, inoculation de sève, ELISA ou ISEM; deux fois en 1 an avec un intervalle de plusieurs mois (une fois au printemps); après 1 an, puis tous les 3 ans	Visual inspection (and possibly by pooled samples at intervals)/Inspection visuelle (et éventuellement tests à intervalles sur des échantillons regroupés)	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle

Table 2 continued

Pests/Organismes nuisibles	Candidate nuclear stock (except for rootstocks regenerated by heat treatment)/Candidat au stade initial (excepté les porte-greffe régénérés par thérapie)	Nuclear stock/Stade initial	Propagation stock I/Stade de propagation I	Propagation stock II/Stade de propagation II	Nursery stage/Stade en pépinière
SLRSV	Individual testing by graft inoculation, sap inoculation ELISA or ISEM; twice in one year with an interval of several months (once in spring); after one year, then every 3 years/Test individuel par inoculation par greffe, inoculation de sève, ELISA ou ISEM; deux fois en 1 an avec un intervalle de plusieurs mois (une fois au printemps); après 1 an, puis tous les 3 ans	Visual inspection (and possibly by pooled samples at intervals)/Inspection visuelle (et éventuellement tests à intervalles sur des échantillons regroupés)	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle
Other graft-transmissible disorders and viruses mentioned in the text/Autres troubles transmis par greffage et virus mentionnés dans le texte <i>Verticillium</i> spp.	Individual testing by graft inoculation/Test individuel par inoculation par greffe	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection with confirmation test on suspect plants/Inspection visuelle, avec test de confirmation sur les plantes suspectes	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Individual testing of plants by PCR/Test individuel des plantes par PCR	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection with confirmation test on suspect plants/Inspection visuelle, avec test de confirmation sur les plantes suspectes	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle
Other pests/Autres organismes nuisibles	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle	Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle Soil tested/Test du sol	Visual inspection/Inspection visuelle Soil tested/Test du sol Soil tested/Test du sol
<i>Xiphinema diversicaudatum</i>	-	-	-	-	Soil
<i>Pratylenchus</i> spp.	-	-	-	-	Soil



## APPENDIX II

### Viruses and virus-like diseases of rose: symptoms and test methods

#### Viruses and virus-like diseases

Rose mosaic disease occurs wherever roses are grown in the field and under glass. Symptoms of yellow mosaic, chlorotic line pattern or vein banding in leaves appear in early and late summer. They have been generally associated with the ilarviruses PNRSV or ArMV, alone or in mixed infections. Sometimes, ArMV is also present.

The nematode-transmitted nepoviruses have a wide host range but only occur occasionally in rose. Nevertheless, ArMV and SLRSV have been frequently isolated from several rose cultivars in the UK, especially when budded to *Rosa rugosa*. These two viruses were detected in The Netherlands on this rootstock. The importance of the vector *X. diversicaudatum* as a mechanism of dispersal of ArMV and SLRSV has not been clearly demonstrated in rose production and the transmission of these two viruses appears limited to vegetative propagation through infected buds or rootstocks. ToRSV has been detected occasionally in rose but only in the USA. It does not occur naturally in the EPPO region, but may be found on imported material. It is an EPPO A2 quarantine pest.

All these viruses are mechanically transmitted to rose only with difficulty. They have no known aerial vector. Pollen transmission of PNRSV (which occurs in fruit trees) is suspected in rose. ArMV and SLRSV have been demonstrated to be seed-transmitted in *R. rugosa* and SLRSV also in *R. multiflora*.

Several other disorders, apparently transmitted through graft, have been described on rose, especially in the USA, and suspected to be caused by viruses ('virus-like' diseases). They seem to be related to the type of rootstock used. Spring dwarf, stunt, bud proliferation, leaf curl, wilt, rosette, little leaf and frisure are some examples of these growth abnormalities (Slack *et al.*, 1976). The aetiology of these disorders is still unknown. The causal agent of rose rosette disease on *R. multiflora* in the USA is thought to be transmitted by a species of mite (*Phyllocoptes fructiphilus*).

Two other virus diseases have occasionally been mentioned on rose, symptoms of which are so severe and recognizable that infected plants can easily be removed. On leaves, vein chlorosis and twisting have been associated with *Tobacco streak ilarvirus* (TSV) on *Rosa setigera* in the USA. On flowers, breaking and petal distortion have been observed in some cultivars in the UK, New Zealand and Australia; the virus responsible (possibly a tobamovirus) has not yet been clearly identified.

#### Testing procedures

The leaf symptoms induced by PNRSV (cherry isolates) in field-grown as well as in glasshouse roses are very variable in nature and severity according to the cultivar, the virus isolate and the environmental conditions. Irregular line patterns and chlorotic or yellow bands are most typical, with sometimes an 'oak-leaf' design. Chlorotic vein banding is more characteristic of a mixed infection by PNRSV and ArMV, although it is sometimes induced by PNRSV alone during prolonged periods of high temperature. In the USA and New Zealand, chlorotic mottle, stunting and distorted and puckered leaflets may be

## ANNEXE II

### Virus et analogues aux virus: symptômes et méthodes de test

#### Virus et analogues aux virus

La mosaïque du rosier est présente partout où les rosiers sont cultivés en plein champ et en serre. Des symptômes de mosaïque jaune, d'arabesques chlorotiques ou de liseré des nervures apparaissent sur les feuilles au début et à la fin de l'été. Ils sont généralement associés aux ilarvirus PNRSV et ArMV, seuls ou en infections mixtes. L'ArMV est parfois également présent.

Les népovirus transmis par les nématodes ont une gamme d'hôtes étendue mais ils sont présents seulement occasionnellement sur rosier. Néanmoins, l'ArMV et le SLRSV ont été isolés à de nombreuses reprises sur plusieurs cultivars de rosier au Royaume-Uni, en particulier sur des rosiers greffés sur *Rosa rugosa*. Ces deux virus ont été détectés aux Pays-Bas sur ce porte-greffe. L'importance du vecteur *X. diversicaudatum* dans la transmission de l'ArMV et du SLRSV n'a pas été clairement démontrée dans la production de rosiers, et ces deux virus semblent être transmis seulement par multiplication végétative avec des écussons ou porte-greffe infectés. Le ToRSV a été détecté occasionnellement sur rosier, mais seulement aux Etats-Unis. Il n'est pas présent naturellement dans la région OEPP, mais peut être trouvé sur du matériel importé. Il s'agit d'un organisme de quarantaine A2 de l'OEPP.

Tous ces virus sont difficilement transmis au rosier mécaniquement. Ils n'ont aucun vecteur aérien connu. La transmission du PNRSV par le pollen (qui existe pour les arbres fruitiers) est suspectée pour le rosier. La transmission de l'ArMV et du SLRSV par les semences a été démontrée pour *R. rugosa*, et celle du SLRSV également pour *R. multiflora*.

Plusieurs autres troubles, apparemment transmis par greffage, ont été décrits pour le rosier, surtout aux Etats-Unis, et une origine virale est suspectée (maladies analogues aux virus). Ils semblent être liés au type de porte-greffe utilisé. Des exemples de ces anomalies de croissance sont le nanisme, la prolifération des bourgeons, l'enroulement foliaire, le flétrissement et la diminution de la taille des feuilles, la frisure (Slack *et al.*, 1976). L'étiologie de ces troubles est encore inconnue. On pense que l'agent causal de la maladie 'rose rosette' sur *R. multiflora* aux Etats-Unis est transmis par un acarien (*Phyllocoptes fructiphilus*).

Deux autres viroses ont été occasionnellement mentionnées sur rosier; leurs symptômes sont tellement sérieux et reconnaissables que les plantes infectées peuvent être facilement éliminées. Sur les feuilles, des chloroses et des déformations des nervures ont été associées au *Tobacco streak ilarvirus* (TSV) sur *Rosa setigera* aux Etats-Unis. Sur les fleurs, des anomalies de couleur et des distorsions des pétales ont été observées sur certains cultivars au Royaume-Uni, en Nouvelle-Zélande et en Australie; le virus responsable (peut-être un tobamovirus) n'a pas encore été clairement identifié.

#### Procédures de test

La nature et la gravité des symptômes provoqués par le PNRSV (isolats du cerisier) sur les feuilles de rosiers, en plein champ ou en serre, varient beaucoup selon le cultivar, l'isolat du virus et les conditions environnementales. Les symptômes les plus typiques sont des arabesques irrégulières et des liserés jaunes ou chlorotiques, avec parfois des taches digitées. Les liserés chlorotiques des nervures sont plus caractéristiques d'une infection mixte de PNRSV et d'ArMV, même s'ils sont parfois induits seulement par le PNRSV durant des périodes prolongées de températures élevées. Aux Etats-Unis et en

induced by ApMV on some rose cultivars. Symptom production is always erratic and restricted to a few leaves only. It is most often observed in spring but has frequently disappeared by summer (recovery). Plants infected by ArMV or SLRSV may be symptomless for much or all of the growing season. Visual inspections are therefore insufficient to detect or to identify the viruses causing so-called 'rose mosaic'.

PNRSV infections may be detected by graft inoculation to peach seedlings or testing on flowering cherry, *Prunus serrulata* cv. Shirofugen (Fleisher *et al.*, 1971). All the ilarviruses and nepoviruses affecting rose can be mechanically transmitted to herbaceous plants, the most commonly used being cucumber seedlings (*Cucumis sativus*), *Chenopodium quinoa* and *Nicotiana clevelandii*. It is more difficult to transmit ApMV from rose to *C. quinoa* than PNRSV (Thomas, 1984).

PNRSV is reliably detected by ELISA, but some infections by ArMV and SLRSV are not. The serological detection of PNRSV and ApMV, sometimes considered as two serotypes of the same virus, require the use of two different antisera, as the relationship is too distant to be revealed in ELISA tests. ISEM is a very quick and reliable method for detection of the three viruses PNRSV, ArMV and SLRSV. It is twice as sensitive as ELISA but its main disadvantage is, of course, the need for an electron microscope. It is also very labour-intensive.

The methods available for testing rose for different viruses and growth abnormalities are summarized in Table 3.

Nouvelle-Zélande, l'ApMV induit des marbrures chlorotiques, le rabougrissement ainsi que la déformation et le plissement des folioles sur certains cultivars de rosier. L'apparition des symptômes est toujours irrégulière et limitée à quelques feuilles. Les symptômes sont observés le plus souvent au printemps et ils disparaissent souvent en été (rétablissement). Les plantes infectées par l'ArMV ou le SLRSV peuvent ne pas présenter de symptômes pendant la plus grande partie ou l'ensemble de la période de végétation. Les inspections visuelles sont donc nettement insuffisantes pour détecter ou identifier les divers virus associés à la 'mosaïque du rosier'.

Les infections par le PNRSV peuvent être détectées par greffage sur des plants de pêcheurs issus de semence ou par des tests sur le cerisier ornemental *Prunus serrulata* cv. Shirofugen (Fleisher *et al.*, 1971). Tous les ilarvirus et népovirus infectant le rosier sont transmis mécaniquement à plusieurs plantes herbacées, dont les plus fréquemment utilisées sont *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana clevelandii* et les plantules de concombre (*Cucumis sativus*). La transmission de l'ApMV du rosier à *C. quinoa* est plus difficile que celle du PNRSV (Thomas, 1984).

Le PNRSV est détecté de manière fiable par ELISA, mais certaines infections par l'ArMV et le SLRSV ne le sont pas. La détection sérologique du PNRSV et de l'ApMV, quelquefois considérés comme deux sérotypes du même virus, nécessite l'utilisation de deux antisérums différents car ces deux virus sont trop éloignés pour que leur parenté apparaisse dans les tests ELISA. L'ISEM est une méthode très rapide et très fiable pour détecter les trois virus PNRSV, ArMV et SLRSV. Elle est deux fois plus sensible que l'ELISA; par contre, son principal désavantage est la nécessité de disposer d'un microscope électronique; de plus cette méthode demande beaucoup de travail.

Les méthodes de détection des virus et anomalies de croissance chez le rosier sont résumées au Tableau 3.

**Table 3** Summary of methods for detecting viruses and growth abnormalities in rose  
Résumé des méthodes de détection des virus et anomalies de croissance chez le rosier

Virus or abnormality/ Virus ou anomalie	Method/Méthode								
	ELISA	Visual inspection/ Inspection visuelle	Indicator plant/Plante indicatrice						
			Cs	Nt	Cq	MB	BU	SH	Nc
<i>Apple mosaic ilarvirus</i>	+		+				+		
<i>Prunus necrotic ringspot ilarvirus</i>	+		+					+	+
<i>Tobacco streak ilarvirus*</i>	+			+					
<i>Arabidopsis mosaic nepovirus</i>	+				+			+	
<i>Strawberry latent ringspot nepovirus</i>	+				+				
<i>Tobacco ringspot nepovirus*</i>	+					+			+
<i>Tomato ringspot nepovirus*</i>	+					+			+
Rose streak							+		
Rose leaf curl							+		
Rose rosette								+	
Rose spring dwarf								+	
Rose ring pattern								+	
Rose flower break		+							
Rose flower proliferation		+							
Rose frisure		+							

Cs, *Cucumis sativus*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Cq, *Chenopodium quinoa*; MB, *Rosa* cv. Madame Butterfly; BU, *Rosa multiflora* cv. Burr; SH, *Prunus serrulata* cv. Shirofugen; Nc, *Nicotiana clevelandii*.

\*In the EPPO region, these North American viruses do not occur in rose, and only very sporadically in other hosts/Dans la région OEPP, ces virus nord-américains n'infectent pas le rosier et ne sont présents que très sporadiquement dans d'autres plantes-hôtes.

### Description of test methods

Care should be taken when using mechanical inoculation as a test method because it necessarily multiplies viruses, which could act as a source of infection to other plants in the nursery. Indicator plants should therefore be kept in insect-proof houses separate from any other plants.

#### *Graft inoculation to woody indicators*

*Prunus serrulata* cv. Shirofugen reacts to grafts of PNRSV-infected rose buds with a hypersensitive response of local necrosis and gumming at the site where rose tissues are inserted. This reaction can be observed 1–2 months after budding. Young peach seedlings (homozygote line GF305), commonly used for the detection of many fruit-tree viruses, react to grafts (chip budding) of rose buds infected by PNRSV, ApMV and nepoviruses with foliar and top necrosis, usually within 15–20 days followed by a significant reduction of growth. *R. multiflora* cv. Burr may be used for the detection of pathogens suspected to be involved in rose spring dwarf, rosette and ring pattern diseases. Some hybrid cultivars (e.g. Madame Butterfly), when infected by grafting with infected rose buds or when budded onto infected rootstocks, develop symptoms of leaf curl, streak or growth abnormalities, revealing latent infections.

#### *Sap inoculation to herbaceous bioassay plants*

Attempts to transmit PNRSV from rose to cucumber or *C. quinoa* in mid-summer generally fail. The best results are obtained during May or early June with young infected rose leaves. Transmission is improved when 2% polyvinylpyrrolidone (PVP, molecular weight 44 000) is used in the extraction buffer (for instance, Tris-HCl/phosphate buffer at pH 8). In this case, the maximum ineffective dilution of rose-leaf extracts may reach 1:100. Transmission rate is higher on *C. quinoa* than on cucumber.

#### *Observation of symptoms on indicator plants*

ArMV: chlorotic local lesions/systemic infection on *C. quinoa*; chlorotic local lesions/systemic chlorotic spotting on *C. sativus*.

SLRSV: chlorotic or necrotic local lesions/systemic chlorosis, leaf deformations on *C. quinoa*; chlorotic local lesions or no symptoms/systemic chlorosis or necrosis, recovery on *C. sativus*.

PNRSV, ApMV: chlorotic primary lesions on cotyledons/systemic infection with stunting, tip killing and proliferation from axillary buds, on *C. sativus*.

#### *ELISA testing*

Rose-leaf tissues should be ground either manually with mortar and pestle or with a mechanical press, 1:10 w/v in an extraction phosphate-buffered saline, 0.1 M, pH 7.4, with 0.5 mL/L Tween 20 (PBS-T), containing 2% polyvinylpyrrolidone (PVP, molecular weight 24 000–40 000) and 0.2% ovalbumin (OVA or fresh egg white). Samples may be kept frozen at –70 °C.

The conventional DAS type of ELISA is suitable for extracts from rose. ACP direct ELISA procedures are unreliable. The test should preferably be performed in spring on young leaf samples. In summer, high non-specific reactions may occur which can be reduced by absorbing

### Description des méthodes de test

Des précautions doivent être prises si l'inoculation mécanique est utilisée comme méthode de test, car elle multiplie les virus ce qui peut entretenir une source d'infection pour les autres végétaux de la pépinière. Les plantes indicatrices doivent donc être conservées dans des abris insect-proof séparément de toute autre plante.

#### *Inoculation par greffe sur des indicateurs ligneux*

*Prunus serrulata* cv. Shirofugen réagit aux greffes d'écussons de rosiers infectés par le PNRSV par une réponse hypersensible de nécrose locale et de production de gomme à l'endroit où les tissus de rosier sont insérés. Cette réaction peut être observée 1–2 mois après l'écussonnage. Les jeunes plants de pêcher issus de semence (lignée homozygote GF305), couramment utilisés pour détecter de nombreux virus des arbres fruitiers, réagissent aux greffes d'écussons (lambeaux d'écorce) de rosier infectés par le PNRSV, l'ApMV ou les népovirus par une nécrose foliaire et de l'extrémité, normalement après 15–20 jours, puis par une réduction significative de leur croissance. *R. multiflora* cv. Burr peut être utilisé pour détecter les pathogènes suspectés d'être impliqués dans les maladies suivantes: rose spring dwarf disease, rose rosette disease et rose ring pattern disease. Certains cultivars hybrides (par ex. cv. Madame Butterfly), lorsqu'ils sont infectés en les greffant avec des écussons de rosier infectés ou lorsqu'ils sont greffés sur des porte-greffe infectés, développent des symptômes d'enroulement foliaire, de striure des feuilles ou des anomalies de croissance révélant des infections latentes.

#### *Inoculation de sève à des plantes herbacées*

Les tentatives de transmission du PNRSV du rosier au concombre ou à *C. quinoa* au milieu de l'été échouent en général. Les meilleurs résultats sont obtenus en mai et au début de juin pour de jeunes feuilles de rosiers infectés. La transmission est améliorée lorsqu'on utilise 2% de polyvinylpyrrolidone (PVP, 44 kDa) dans le tampon d'extraction (par ex. tampon Tris-HCl/phosphate à pH 8). Dans ce cas, la dilution inefficace maximale des extraits de feuilles de rosier peut atteindre 1:100. Le taux de transmission est plus élevé sur *C. quinoa* que sur concombre.

#### *Observation des symptômes sur les plantes indicatrices*

ArMV: lésions locales chlorotiques/infection systémique sur *C. quinoa*; lésions chlorotiques locales/taches chlorotiques systémiques sur *C. sativus*.

SLRSV: lésions locales chlorotiques ou nécrotiques/chlorose systémique, déformation des feuilles sur *C. quinoa*; lésions locales chlorotiques ou aucun symptôme/chlorose systémique ou nécrose, rétablissement sur *C. sativus*.

PNRSV, ApMV: lésions primaires chlorotiques sur les cotylédons/infection systémique avec rabougrissement, mort des extrémités et prolifération à partir des bourgeons axillaires sur *C. sativus*.

#### *Tests ELISA*

Les tissus foliaires de rosier doivent être broyés soit manuellement avec un mortier et un pilon, soit à l'aide d'une presse mécanique (rapport poids/volume = 1:10) dans un tampon phosphate salin, 0,1 M, pH 7,4, avec 0,5 mL/L de Tween 20 (PBS-T), contenant 2% de polyvinylpyrrolidone (PVP, MW 24–40 kDa) et 0,2% d'ovalbumine (OVA ou blanc d'oeuf frais). Les échantillons peuvent être congelés à –70 °C.

La méthode conventionnelle DAS-ELISA convient pour les extraits de rosier. Les procédures d'ACP ELISA directes ne sont pas fiables. Le test doit être réalisé de préférence au printemps sur des échantillons de jeunes feuilles. En été, les réactions non spécifiques peuvent être

the enzyme conjugate with healthy leaf extract immediately before application to the ELISA plates. All other stages of the ELISA protocol should be performed according to the published procedure or by following the instructions accompanying the proprietary reagents.

#### *Immunospecific electron microscopy (ISEM)*

Standard ISEM procedures (Thomas, 1984) are applicable for detection of ilarviruses and nepoviruses in rose samples.

### APPENDIX III

#### **Detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tissues**

A specific and sensitive method for the detection of *A. tumefaciens* in plant tissues has been developed by INRA (Antibes, FR), based on enrichment and DNA extraction.

##### **Extraction and isolation**

The bacterium should be extracted by trituration of the plant sample using a ball mill and isolated and enriched on a semi-specific growing medium, derived from those of Brisbane & Kerr (1983): 5 g of yeast, 5 g of bacto-peptone, 10 g of glucose and 0.3 g of sodium taurocholate dissolved in water and made up to 1 L, autoclaved for 30 min at 110 °C. 2% Actinidione (1 mL) and 1 mL of 1% selenium should then be added for 200 mL of medium.

##### **Identification by PCR**

The target sequence for PCR amplification is located in the *vir* operon of the Ti plasmid (responsible for virulence). Two oligonucleotides (ANTvirB11887 and FGPvirG15') define a 418-bp area, the sequences being, respectively, TGCCGCATGGCGCGTTGTAG (Pionnat *et al.*, 1999) and GAACGTGTTTCAACGGTTCA (Nesme *et al.*, 1995).

### APPENDIX IV

#### **Soil sampling for nematodes**

##### **Soil test for virus-vector nematodes**

Soil samples for *X. a diversicaudatum* should be taken in the 10–30 cm depth layer, using a semi-cylindrical auger with a diameter of at least 2.5 cm. Screw augers or tools with a diameter of less than this should not be used because of the risk of damaging the nematodes during sampling. If possible, sampling should be performed when the soil is moist, otherwise it may be necessary to take samples from deeper soil layers. Samples should be taken on a grid pattern over the site with, for example, 20 subsamples for sites up to 0.2 ha and 40 for sites between 0.2 and 4 ha. Another possible sampling pattern (more intensive but used in some countries) is to divide the site into units of 0.2 ha and to take 60 subsamples in each of these sample units. Additional samples should be taken from any hedges which surround the site. Maas & Brinkman (1980) and Boag *et al.* (1989) provide further details.

importantes et elles peuvent être réduites en absorbant le conjuguât enzymatique avec un extrait de feuilles saines immédiatement avant d'appliquer le mélange dans les supports ELISA. Tous les autres stades du protocole ELISA doivent être effectués conformément aux procédures publiées ou aux instructions accompagnant les réactifs disponibles dans le commerce.

#### *Microscopie électronique spécifique (ISEM)*

Les procédures standards d'ISEM (Thomas, 1984) s'appliquent à la détection des ilarvirus et des népovirus dans les échantillons de rosier.

### ANNEXE III

#### **Détection d'*Agrobacterium tumefaciens* dans les tissus végétaux**

Une méthode spécifique et sensible de détection d'*A. tumefaciens* dans les tissus végétaux a été mise au point par l'INRA (Antibes, FR); elle repose sur l'enrichissement et l'extraction de l'ADN.

##### **Extraction et isolement**

L'extraction de la bactérie est réalisée par trituration de l'échantillon végétal à l'aide d'un broyeur à billes, suivie d'enrichissement sur un milieu de culture semi-spécifique, dont la composition dérive des milieux de Brisbane & Kerr (1983): 5 g de levure, 5 g de bacto-peptone, 10 g de glucose et 0,3 g de taurocholate de sodium dissout dans de l'eau et ramené à 1 L, autoclavé à 110 °C pendant 30 min. Actinidione 2% (1 mL) et 1 mL de sélénium 1% doivent alors être rajoutés pour 200 mL de milieu.

##### **Identification par PCR**

La séquence cible de l'amplification PCR se situe au niveau de l'opéron *vir* de la plasmide Ti (responsable de la virulence). Deux oligonucléotides (ANTvirB11887 et FGPvirG15') encadrent une région de 418 pb, leurs séquences étant respectivement TGCCGCATGGCGCGTTGTAG (Pionnat *et al.*, 1999) et GAACGTGTTTCAACGGTTCA (Nesme *et al.*, 1995).

### ANNEXE IV

#### **Echantillonnage du sol pour les nématodes**

##### **Test du sol pour les nématodes vecteurs de virus**

Des échantillons de sol sont prélevés pour *X. diversicaudatum* entre 10 et 30 cm de profondeur, à l'aide d'une tarière semicylindrique, de diamètre supérieur ou égal à 2,5 cm. Les tarières à vis ou les outils d'un diamètre inférieur à celui-ci ne doivent pas être utilisés car ils pourraient endommager les nématodes au cours du prélèvement. L'échantillonnage doit être effectué si possible sur un sol humide, sinon, il peut être nécessaire de prélever les échantillons dans des couches du sol plus profondes. Les échantillons sont prélevés sur le site en suivant une grille, par exemple 20 sous-échantillons pour des surfaces allant jusqu'à 0,2 ha et 40 pour des surfaces entre 0,2 et 4 ha. Un autre schéma d'échantillonnage (plus intensif mais utilisé dans certains pays) consiste à diviser le site en unités de 0,2 ha et à prélever 60 sous-échantillons dans chacune de ces unités. Des échantillons supplémentaires doivent être prélevés dans les bordures qui entourent le site. Maas & Brinkman (1980) et Boag *et al.* (1989) présentent ces questions en détail.

Extraction of nematodes from the soil should be performed by a method such as, for example, that of Flegg (1967) which requires little special equipment: the soil sample is mixed carefully but thoroughly and two subsamples of 200 mL are measured by displacement of water. Each subsample is left to soak in water for at least 1 h, then washed through a 4-mm-pore sieve into a 10-L bucket, which is filled to near the brim. The contents of the bucket are stirred with the hand in order to put the soil into suspension, left for 25 s, then the supernatant is decanted onto a set of three sieves of 150- $\mu\text{m}$  pore size. The bucket is refilled and the stirring and decanting is repeated (after leaving for only 15 s). The debris collected on the sieves is washed and transferred to a 110- $\mu\text{m}$ -pore nylon sieve. The sieve is placed on a glass funnel with just enough water to submerge the debris on the sieve surface, left for 24 h, then about 25 mL is collected from the stem of the funnel (this can be achieved by having the funnel stem terminating in a rubber tube closed with a clamp) for examination at 25 $\times$  magnification. Counting of nematodes can be done at 25 $\times$  magnification, but identification of species can only be done by a trained taxonomist at considerably higher magnification.

The nematodes can be tested directly for the presence of virus by a 'slash test', i.e. breaking up small numbers of adult nematodes (> five nematodes) in phosphate buffer (pH 6.9) and inoculating the leaves of *C. quinoa* with the suspension. An indirect method to test the nematodes for virus is to grow bait plants of *Petunia hybrida* in pots of field soil containing nematodes for 3 weeks and then to test the roots for the presence of virus by inoculation to indicator plants.

#### Soil test for endoparasitic nematodes

The pattern of sampling for *Pratylenchus* spp. should be similar to that for virus-vector nematodes (see above). Because of the considerably smaller size of these nematodes, there is less risk of damaging them during sampling and therefore screw augers or smaller sampling tools may be used. *Pratylenchus* spp. are extracted from the soil by any standard extraction method for nematodes less than 1 mm in length (Hooper, 1986), generally using sieves of 50–60  $\mu\text{m}$ .

## APPENDIX V

### Procedure for heat treatment of rose

Plants of the rose cultivar concerned should be grown in containers outdoors until July. They should carry normally developed flowers (checked for identity) and the budding wood should have matured. The plants should then be placed in a growth chamber at 30 °C and during the following 8 days the temperature should be increased up to the heat-treatment temperature of 37–38 °C. Starting after 2 weeks, some buds should be taken each week until 30–50 buds in total have been collected. These buds should be T budded onto *Rosa multiflora* cv. Burr rootstocks. This rootstock is also an indicator in the next season.

The rootstock should be cut back in spring, but not just above the bud, and the bud and rootstock allowed to grow out. In spring and summer, the indicator rootstock should be checked three times for symptoms. After the first check, the old leaves should be taken off to promote the growth of young leaves. After the third check, the rootstock should be cut back just above the bud. In summer, a test on

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

Les nématodes peuvent être testés directement pour détecter la présence de virus en disloquant un petit nombre de nématodes adultes (> cinq nématodes) dans un tampon phosphate (pH 6,9) et en inoculant la suspension à des feuilles de *C. quinoa*. Une méthode indirecte de test pour détecter la présence de virus dans les nématodes consiste à cultiver, pendant 3 semaines, des *Petunia hybrida* servant d'appât dans des pots contenant du sol collecté en plein champ et infesté par les nématodes, puis de tester les racines pour détecter la présence de virus à l'aide d'une inoculation à des plantes indicatrices.

#### Test du sol pour les nématodes endoparasites

L'échantillonnage pour *Pratylenchus* spp. doit être similaire à celui effectué pour les nématodes vecteurs de virus (voir ci-dessus). En raison de la taille bien inférieure de ces nématodes, le risque de les endommager pendant l'échantillonnage est moindre et des tarières à vis ou des outils d'échantillonnage plus petits peuvent être utilisés. Les *Pratylenchus* spp. sont extraits du sol par une méthode standard d'extraction de nématodes mesurant moins d'1 mm de longueur (Hooper, 1986), en général à l'aide de tamis de 50–60  $\mu\text{m}$ .

## ANNEXE V

### Procédure de thérapie thermique pour le rosier

Les plantes d'un cultivar sont placées dans des conteneurs et cultivées à l'extérieur jusqu'au mois de juillet. Elles ont en principe fleuri (vérification d'identité) et le bois de greffe est mature. Elles sont placées dans une chambre climatisée à 30 °C et la température est progressivement augmentée jusqu'à 37–38 °C au cours des 8 jours suivants. Au bout de 2 semaines, des écussons sont prélevés chaque semaine jusqu'à disposer de 30–50 écussons. Ces écussons sont écussonnés en T sur des porte-greffe de *Rosa multiflora* cv. Burr. Ce porte-greffe sert également d'indicateur pendant la période de végétation suivante.

Le porte-greffe est rabattu au printemps, mais pas juste au-dessus de l'écusson. L'écusson et le porte-greffe poussent. Au printemps et en été, le porte-greffe indicateur est observé trois fois pour détecter des symptômes. Les feuilles anciennes sont éliminées après la première vérification afin de favoriser la croissance des jeunes feuilles. Après la troisième vérification, le porte-greffe est rabattu juste au-dessus de

*Prunus serrulata* cv. Shirofugen should be done and ELISA may also be performed.

Holmes (1960) or Bjarnason *et al.* (1985) may be consulted for further details.

## APPENDIX VI

### Procedure for apex culture *in vitro*

The *in vitro* technique has been successfully applied to rose for some years. In France, it has been adapted for use with different types of rose: rootstocks, cultivars for cut flowers, polyanthus rose plants, miniature roses. The medium used is based on that of Murashige and Skoog, with vitamins, L-glutamine and glucose. Depending on the growth effect required, growth regulators (AIA, cytokinin, gibberellin) are added in varying proportions.

*In vitro* culture is now primarily used as a means of micropropagation of rose. Beginning with axillary buds no larger than 500 µm, a very large number of individual plants, each similar to the initial plant, can be obtained. With a multiplication rate of five per month, a single culture tube can produce 200 000–400 000 plants per year. The good phytosanitary conditions which can be maintained makes this method particularly suitable for the multiplication of healthy material (e.g. nuclear stock).

*In vitro* culture can also be used, after thermotherapy, as part of a regeneration procedure for rose (e.g. to eliminate PNRSV). Terminal buds, produced on vegetative shoots which develop during heat treatment, can be placed in culture tubes, thus avoiding traditional shoot-tipping or grafting on healthy rootstocks. The technique can also be used alone as a means of regenerating infected clones. Recent work has shown that the production of rose plants from apical meristems is now technically possible; it is already in use for certain rootstocks (*Rosa manetti*, *Rosa indica*). The initial tissue should be 100–200 µm in length and comprise the meristematic dome and first leaf primordia. The first (initiation) medium is particularly difficult to determine accurately because of the very limited reserves of the explant, and depends on the type of rose plant and the date of excising the tissue. Generally, less than 5% of cultures become established. The explant should be cultured on this medium for 1–2 months, then transferred to a multiplication medium, with a composition close to those used for micropropagation. Transfers are made at intervals of approximately 1 month.

It is not known whether PNRSV can infect meristematic tissue. The fact that virus distribution is very heterogeneous in rose and that certain parts of the plant are apparently virus-free (as shown by ELISA) suggests that selection of healthy apices could be a very useful method for the regeneration of infected clones.

## APPENDIX VII

### Recommended certification standards for rose

Certification should be granted on the basis of records of the tests and observations performed during production and of a certification

l'écusson. En été, un test sur *Prunus serrulata* cv. Shirofugen est réalisé et un test ELISA peut également être conduit.

Holmes (1960) et Bjarnason *et al.* (1985) peuvent être consultés pour plus de détail.

## ANNEXE VI

### Procédure de culture d'apex *in vitro*

La technique de culture *in vitro* est appliquée avec succès sur rosier depuis un certain nombre d'années. En France, elle a été mise au point pour différents types de rosiers: porte-greffe, cultivars pour la production de fleurs coupées, rosiers polyanthus ou miniatures. Les milieux de culture utilisés contiennent les éléments de base de Murashige and Skoog, des vitamines, de la L-glutamine et du saccharose. Des régulateurs de croissance (AIA, cytokinine, gibbérelline) sont ajoutés dans des proportions variables selon le matériel végétal et le type d'organogenèse souhaités.

La culture *in vitro* est aujourd'hui largement utilisée comme moyen de micropropagation du rosier. De très nombreuses plantes, chacune identique à la plante de départ, peuvent être obtenues à partir de bourgeons axillaires dont la taille n'excède pas 500 µm. Avec un taux de multiplication de cinq par mois, un seul tube de culture peut produire 200 000–400 000 plantes par an. Les conditions sanitaires très rigoureuses dans lesquelles s'effectue cette micropropagation en font un moyen particulièrement bien adapté pour la multiplication de matériel sain (par ex. des plantes d'un matériel initial).

La culture *in vitro* peut également être utilisée, après thérapie thermique, dans le cadre d'un processus de régénération des rosiers (par ex. pour éliminer le PNRSV). Les bourgeons terminaux, prélevés sur les rameaux du végétal qui se sont développés au cours du traitement thermique, sont mis en culture en tubes, ce qui évite le microbouturage traditionnel ou le greffage sur des porte-greffe sains. La culture *in vitro* pourrait également être utilisée seule pour régénérer des clones infectés. Des travaux récents ont montré que la production de plants de rosier à partir d'apex méristématiques est désormais techniquement possible. Le protocole est actuellement bien au point pour certains porte-greffe (*R. manetti*, *R. indica*). Le tissu initial mesure 100–200 µm et comprend le dôme méristématique et les premières ébauches foliaires. La composition du premier milieu (dit d'initiation) est particulièrement délicate à déterminer compte tenu des réserves très limitées de l'explant; elle dépend du type de rosier et de la date de prélèvement. Le taux de reprise en tube est en général inférieur à 5%. L'explant est cultivé sur ce milieu pendant 1 ou 2 mois, puis repiqué sur un milieu de multiplication, dont la composition est voisine de celle des milieux utilisés pour la micropropagation. Des repiquages ont lieu environ tous les mois.

La capacité du PNRSV à infecter les tissus méristématiques reste inconnue. Le fait que, chez le rosier, la distribution du virus est très hétérogène et que certaines parties de la plante sont apparemment indemnes de virus (non détectable par ELISA) laisse présager de l'efficacité du prélèvement d'apex sains pour régénérer des clones particulièrement précieux qui seraient infectés par le virus.

## ANNEXE VII

### Normes de certification recommandées pour le rosier

La certification sera accordée en se basant sur les documents relatifs aux tests et aux observations réalisés pendant la production et sur une

(visual) inspection. In general, the certification inspection should be done on the plants from which the corresponding category of material will be taken. The assessor should verify that the standards mentioned below are fulfilled.

#### Candidate nuclear stock

Records should show that the candidate nuclear-stock plant gave negative results for all pests in the tests performed and was free from growth abnormalities. The plant should show no symptoms of pest attack. If these conditions are not met at the time of the certification inspection, certification should be refused to the plant concerned.

#### Nuclear stock

Records should show that the nuclear-stock plant was tested and gave a negative result for PNRSV. Any tests for ApMV, ArMV or SLRSV should have given negative results. No symptoms of virus disease, virus-like disease, bacterial disease or *Verticillium* should be seen. If these conditions are not met at the time of certification inspection, certification should be refused to the plants concerned.

#### Propagation stock I

No plant may show any symptom of virus disease, virus-like disease, bacterial disease or *Verticillium*. Records should show that any plant with symptoms possibly caused by *A. tumefaciens* or *Verticillium* spp. was tested and then eliminated, that if the test gave a positive result for either pathogen, all plants belonging to the same lot were eliminated, and that any plant showing symptoms possibly caused by a virus was eliminated. Any random tests for PNRSV should have given negative results. Visual inspection at certification should show that the incidence of pests in each lot does not exceed the thresholds in Table 4. If these conditions are not met at the time of certification inspection, certification should be refused to the lots concerned.

ou plusieurs inspections (visuelles) de certification. En général, une inspection de certification est réalisée sur les plantes sur lesquelles la catégorie correspondante de matériel sera prise. Le respect des normes mentionnées ci-dessous doit être vérifié.

#### Candidat au stade initial

Les résultats doivent montrer que la plante candidate au stade initial a donné des résultats négatifs pour tous les organismes nuisibles dans tous les tests effectués et est indemne d'anomalies de croissance. La plante ne doit pas montrer de symptôme d'attaque par des organismes nuisibles. Si ces conditions ne sont pas respectées au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée aux plantes concernées.

#### Stade initial

Les résultats doivent montrer que les tests effectués sur la plante initiale pour le PNRSV ont donné des résultats négatifs, de même que les tests éventuels pour l'ApMV, l'ArMV ou le SLRSV. Aucun symptôme de virose, de maladie analogue aux viroses, de maladie bactérienne ou de *Verticillium* ne doit être observé. Si ces conditions ne sont pas respectées au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée aux plantes concernées.

#### Stade de propagation I

Aucune plante ne doit présenter de symptômes de virose, de maladie analogue aux viroses, de maladie bactérienne ou de *Verticillium*. Les résultats doivent montrer que toute plante présentant des symptômes pouvant être causés par *A. tumefaciens* ou *Verticillium* spp. a été testée et éliminée, et qu'en cas de test positif pour un de ces pathogènes, toutes les plantes appartenant au même lot ont été éliminées. Toute plante présentant des symptômes pouvant être attribués à un virus doit avoir été éliminée. Les tests éventuels par sondage pour le PNRSV doivent avoir donné des résultats négatifs. L'inspection visuelle de certification doit montrer que l'incidence des organismes nuisibles dans chaque lot ne dépasse pas les seuils du Tableau 4. Si ces conditions ne sont pas respectées au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée aux lots concernés.

**Table 4** Recommended tolerance levels at visual inspection of rose. A lot of plants, derived from a single nuclear-stock plant, can remain in the scheme provided that the level of infection at certification inspection does not exceed the tolerance levels given

Tolérances recommandées lors des inspections visuelles du rosier. Un lot de plantes, issues d'une seule plante du stade initial, peut rester dans le schéma à condition que son niveau d'infection constaté lors de l'inspection de certification ne dépasse pas les seuils de tolérance donnés

Pests/Organismes nuisibles	% plants/plantes		
	Propagation stock I/ Stade de propagation I	Propagation stock II/ Stade de propagation II	Nursery stage/ Stade en pépinière
Viruses or virus-like symptoms/ Symptômes de virose ou de maladie analogue	0	0	0.5*
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0	0	0
<i>Verticillium</i> spp.	0	0.5	0.5
Other fungal diseases/ Autres maladies fongiques		Substantially free/ pratiquement indemne	
Insects and mites/ Insectes et acariens		Substantially free/ pratiquement indemne	

\*If possible, all plants showing symptoms should be removed/Toutes les plantes présentant des symptômes doivent si possible être éliminées.

### Propagation stock II

Records should show that the material is planted in a plot in which neither *A. tumefaciens* nor *Verticillium* spp. has occurred, that the soil in which the material is planted is free from *X. diversicaudatum* (or if not free from the latter, the nematodes should be free from nepoviruses), and that any plants with galls possibly caused by *A. tumefaciens* have been eliminated. Visual inspection at certification should show that the incidence of pests in each lot does not exceed the thresholds in Table 4. If these conditions are not met at the time of certification inspection, certification should be refused to the lots concerned.

### Seed for rootstocks

Records should show that the soil in which the material is planted is free from *X. diversicaudatum*, and that the plants were found free from PNRSV by annual testing and from ArMV and SLRSV by testing every 5 years. Visual inspection at certification should show no symptoms of virus or virus-like diseases. If these conditions are not met at the time of certification inspection, certification will be refused to the plants concerned.

### Nursery stage for the preparation of finished plants

Records should show that the soil in which the material is planted is free from *A. tumefaciens*, *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus penetrans*, *P. vulnus* and *X. diversicaudatum* (or if not free from the latter, the nematodes should be free from nepoviruses). No plant should show symptoms of *A. tumefaciens*. Visual inspection at certification should show that the incidence of pests in each lot does not exceed the thresholds in Table 4. If these conditions are not met at the time of certification inspection, certification should be refused to the lots concerned.

### References/Références

- Bjarnason EN, Hanger BC, Moran JR & Cooper JA (1985) Production of prunus necrotic ringspot virus-free roses by heat treatment and tissue culture. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **28**, 151–156.
- Boag B, Brown DJF & Banck ASG (1989) Optimizing sampling strategies for nematode-transmitted viruses and their vectors. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **19**, 491–499.
- Brisbane PG & Kerr A (1983) Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. *Journal of Applied Bacteriology* **54**, 425–431.
- Flegg JJM (1967) Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* species from soil by a modification of Cobb's decanting and sieving technique. *Annals of Applied Biology* **60**, 429–437.
- Fleisher Z, Drori T & Loebenstein G (1971) Evaluation of Shirofugen as a reliable indicator for rose mosaic virus. *Plant Disease Reporter* **55**, 431–433.
- Holmes FO (1960) Cure of rose mosaic by heat. *Phytopathology* **50**, 240.
- Hooper DJ (1986) Extraction of free-living stages from soil. In: *Laboratory*

### Propagation stock II

Le matériel doit être planté dans une parcelle où *A. tumefaciens* et *Verticillium* spp. n'ont pas été trouvé. Le sol dans lequel le matériel est planté doit être exempt de *X. diversicaudatum* (ou si ce dernier est présent, il doit être exempt de népovirus), et toute plante présentant des galles pouvant être causées par *A. tumefaciens* doit avoir été éliminée. L'inspection visuelle de certification doit montrer que l'incidence des organismes nuisibles dans chaque lot ne dépasse pas les seuils du Tableau 4. Si ces conditions ne sont pas respectées au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée aux lots concernés.

### Semences pour porte-greffe

Les résultats doivent montrer que le sol dans lequel les plantes sont établies est indemne de *X. diversicaudatum* et que les plantes ont été trouvées indemnes du PNRSV par test annuel et de l'ArMV et du SLRV par test tous les cinq ans. L'inspection visuelle de certification ne doit pas montrer de symptômes de virus ou d'analogues. Si ces conditions ne sont pas respectées au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée aux plantes concernées.

### Stade en pépinière pour la préparation de plantes certifiées

Les résultats des tests doivent montrer que le sol dans lequel le matériel est planté est exempt d'*A. tumefaciens*, de *Meloidogyne* spp., de *P. penetrans*, de *P. vulnus* et de *X. diversicaudatum* (ou si ce dernier est présent, il doit être exempt de népovirus). Aucune plante ne doit manifester de symptômes d'*A. tumefaciens*. L'inspection visuelle de certification doit montrer que l'incidence des organismes nuisibles dans chaque lot ne dépasse pas les seuils du Tableau 4. Si ces conditions ne sont pas respectées au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée aux lots concernés.

*Methods for Work with Plant and Soil Nematodes* (Ed. by JF Southey). HMSO, London (GB).

- Maas PWT & Brinkman H (1980) Sampling of soil for nematode vectors of plant viruses in The Netherlands. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* **45**, 769–773.
- Nesme X, Michel MF & Simonet P (1995) Specific DNA sequences for detection of soil bacteria. In: *Nucleic Acids in the Environment. Methods and Applications* (Ed. by JT Trevors & JD van Elsas). Springer, Berlin (DE).
- Pionnat S, Keller H, Hélicher D, Bettachini A, Dessaux Y, Nesme X & Poncet C (1999) Ti plasmids from *Agrobacterium tumefaciens* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4197–4206.
- Slack SA, Traylor JA, Nylard G & Williams HE (1976) Symptoms, indexing and transmissions of rose spring dwarf disease. *Plant Disease Reporter* **60**, 183–188.
- Thomas BJ (1984) Epidemiology of three viruses infecting the rose in the United Kingdom. *Annals of Applied Biology* **105**, 213–222.



