

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 4/25(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 kalanchoe**  
**Schéma de certification pour le kalanchoë**

**Specific scope**

This standard describes the production of certified pathogen-tested material of kalanchoe.

**Specific approval and amendment**

First approved in 1998-09.

Revision approved in 2000-09.

**Champ d'application spécifique**

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

**Approbation et amendement spécifiques**

Approbation initiale en 1998-09.

Révision approuvée en 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 kalanchoe 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.

**1. Selection of candidate nuclear stock**

The scheme applies to cultivars of *Kalanchoe blossfeldiana*. The candidate material may be new cultivars, good-quality material of existing cultivars or meristem-tip cultures of any of these (regenerated cultivars). Material imported from outside the EPPO region should be inspected and, if appropriate, tested under quarantine for all EPPO quarantine pests of kalanchoe occurring naturally in the region of origin according to the relevant EPPO phytosanitary procedures and generally inspected or, if appropriate, tested for any other pests.

In general, flowering plants are selected and are then moved to an isolated place, separated from other candidate nuclear stock, where flowers are removed in order to induce the plants to become vegetative. Thereafter, cuttings are taken and rooted to become the candidate

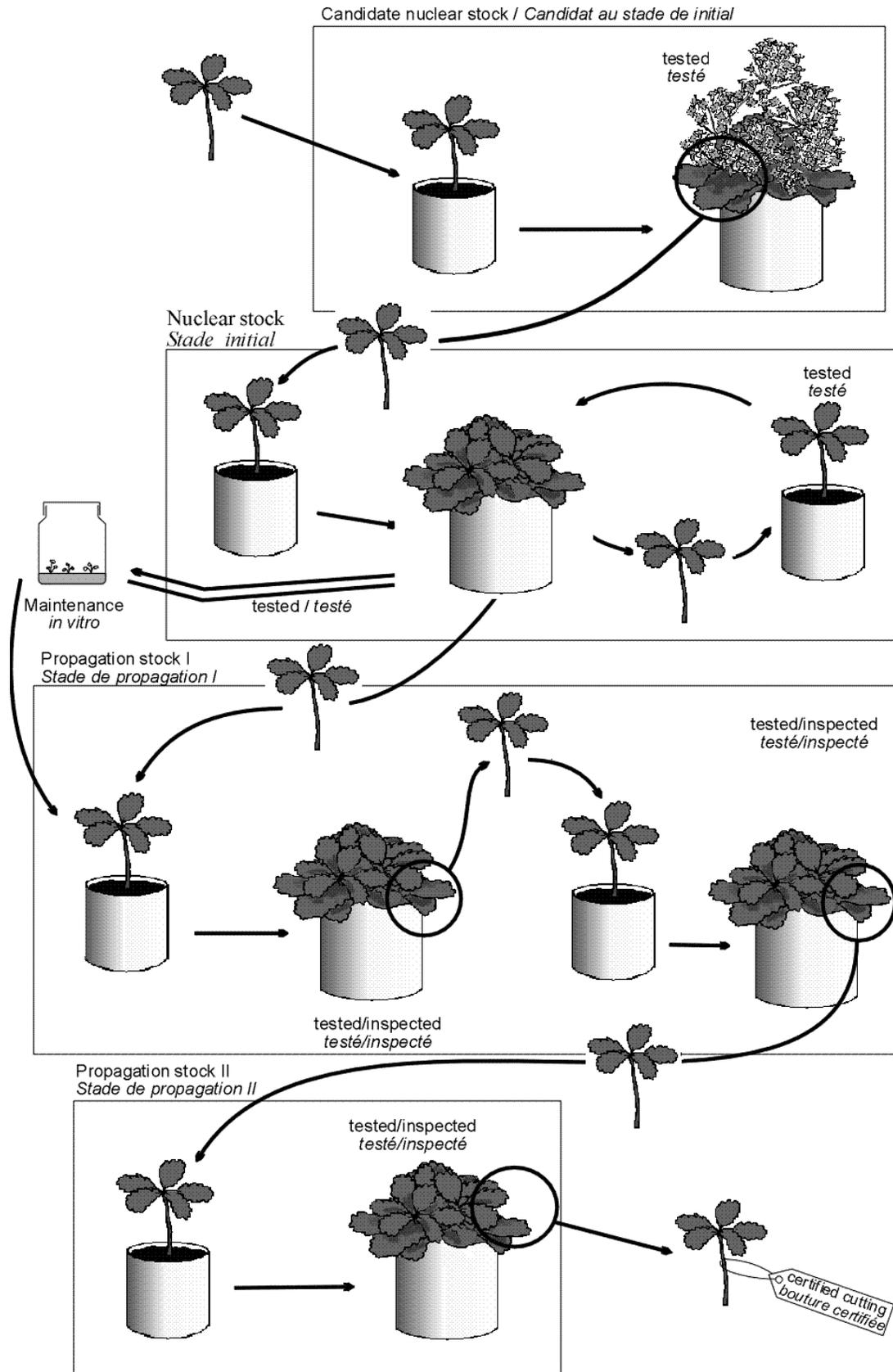
---

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, 1990). 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 kalanchoë 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.

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

Le schéma s'applique aux cultivars de *Kalanchoe blossfeldiana*. Le matériel candidat peut correspondre à de nouveaux cultivars, à du matériel de qualité appartenant à des cultivars déjà existants ou à des cultures de méristèmes de tous ceux-ci (cultivars régénérés). Le matériel importé de l'extérieur de la région OEPP doit également être inspecté et, le cas échéant, testé en quarantaine, par des méthodes recommandées par l'OEPP, pour tous les organismes de quarantaine OEPP du kalanchoë présents naturellement dans la région d'origine, et généralement inspecté ou, le cas échéant, testé pour détecter tout autre organisme nuisible.

En général, des plantes en fleur sont sélectionnées puis sont transférées dans un endroit isolé, séparément des plantes candidates au stade initial, et les fleurs sont éliminées pour induire un état végétatif. Des boutures sont ensuite prélevées, enracinées et deviennent les plantes



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

nuclear-stock plants. These plants are transferred to candidate nuclear-stock conditions.

## 2. Maintenance and testing of candidate nuclear stock

### 2.1 Growing conditions

The candidate plants for nuclear stock should be kept 'in quarantine' (that is in an isolated, suitably designed, aphid-proof house, separately from the nuclear stock, with as far as possible precautions to exclude thrips) where they can be observed and tested. All plants should be grown in individual pots in sterilized growing medium, avoiding contact between plants and with strict precautions against infection by root pathogens (e.g. *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Myrothecium roridum*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Thielaviopsis basicola* and *Thanatephorus cucumeris*). Drip irrigation is advised since standard watering procedures increase the risk of the introduction and spread of these pests. Adequate control of powdery mildew (caused by *Oidium kalanchoeae* or *Sphaerotheca humuli*) and *Botryotinia fuckeliana* should be ensured. Monitoring for thrips should be done using blue sticky traps<sup>1</sup> and adequate control should be ensured.

### 2.2 Testing requirements

All plants should be individually tested for the following pests:

*Kalanchoe mosaic potyvirus* (KMV);  
*Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV);  
*Impatiens necrotic spot tospovirus* (INSV);  
*Kalanchoe latent carlavirus* (KLV);  
*Sonchus yellow net rhabdovirus* (SYNV);  
 pathogenic *Erwinia* spp.

The most important of these are KMV, TSWV and INSV. Infections by KMV indirectly reduce the quality of the plants. TSWV and INSV can be transmitted by thrips or contaminated equipment. They became much more important in the EPPO region as a result of the introduction of the thrips vector *Frankliniella occidentalis*. KLV can intensify the symptoms of other viruses, in the case of double infection. SYNV is only found occasionally.

Each candidate nuclear-stock plant should have been tested at least twice (with an interval of some months) for pathogenic *Erwinia* spp., KMV, TSWV and INSV and found free. If the candidate nuclear-stock plant is selected from material within the certification scheme, one batch of tests may be sufficient. Candidate plants of kalanchoe should be tested by inoculation to indicator plants (e.g. *Chenopodium quinoa* and *Nicotiana benthamiana*) to check for the occurrence of other viruses not included in the scheme (note that these indicator species may already be used to test for the named viruses above). Recommended test methods for kalanchoe viruses are given in Appendix II. Recommended test methods for pathogenic *Erwinia* spp. are given in Appendix III. In addition, all plants should be visually inspected in spring and in autumn for symptoms of *Kalanchoe top spotting badnavirus* (KTSV). The plants should be visually inspected regularly for all these pests, and, generally, for others.

<sup>1</sup>There are large differences in efficacy of different types of traps. This is especially critical in periods with low light intensity.

candidates au stade initial. Ces plantes sont transférées dans les conditions du stade initial.

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

### 2.1 Conditions de culture

Les plantes candidates au stade initial doivent être mises en quarantaine (c'est-à-dire placées dans un abri aphid-proof conçu et réservé à cet usage, séparément du stade initial, avec autant que possible des précautions contre les thrips) pour être observées et testées. Toutes les plantes doivent être cultivées dans des pots individuels contenant un substrat stérilisé, en évitant le contact entre les plantes et en prenant des précautions strictes afin d'éviter la contamination par les pathogènes racinaires (par ex. *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Myrothecium roridum*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Thielaviopsis basicola* et *Thanatephorus cucumeris*). L'irrigation goutte à goutte est conseillée car les méthodes d'arrosage habituelles augmentent le risque d'introduction et de dissémination de ces organismes nuisibles. Des mesures de lutte adéquates doivent être prises contre l'oïdium (causé par *Oidium kalanchoeae* ou *Sphaerotheca humuli*) et *Botryotinia fuckeliana*. Une surveillance des populations de thrips doit être mise en place à l'aide de pièges bleus englués<sup>1</sup> et des mesures de lutte adéquates doivent être appliquées.

### 2.2 Exigences relatives aux tests

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

*Kalanchoe mosaic potyvirus* (KMV);  
*Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV);  
*Impatiens necrotic spot tospovirus* (INSV);  
*Kalanchoe latent carlavirus* (KLV);  
*Sonchus yellow net rhabdovirus* (SYNV);  
*Erwinia* spp. pathogènes.

Les virus les plus importants sont le KMV, le TSWV et l'INSV. Les infections par le KMV réduisent indirectement la qualité des plantes. Le TSWV et l'INSV peuvent être transmis par des thrips ou du matériel contaminé. Leur importance dans la région OEPP s'est accrue suite à l'introduction du thrips vecteur *Frankliniella occidentalis*. Le KLV peut intensifier les symptômes d'autres virus en cas d'infection combinée. SYNV est trouvé seulement occasionnellement.

Chaque plante candidate au stade initial doit avoir été testée au moins deux fois (à quelques mois d'intervalle) pour les *Erwinia* spp. pathogènes, le KMV, le TSWV et l'INSV, et trouvée indemne. Si la plante candidate au stade initial est choisie dans le matériel faisant partie du schéma de certification, une seule série de tests suffit. Les plantes candidates de kalanchoë doivent être testées par inoculation sur des plantes indicatrices (par ex. *Chenopodium quinoa* et *Nicotiana benthamiana*) pour vérifier l'absence des autres virus ne faisant pas partie du schéma (noter que ces plantes indicatrices sont parfois utilisées pour tester les virus mentionnés ci-dessus). Les méthodes de test recommandées pour les virus du kalanchoë figurent à l'Annexe II. Les méthodes de test recommandées pour les *Erwinia* spp. pathogènes figurent à l'Annexe III. En outre, toutes les plantes doivent être inspectées visuellement au printemps et en automne pour rechercher les symptômes

<sup>1</sup>Les différents types de pièges présentent de grandes différences d'efficacité. Ceci est particulièrement important dans les périodes de faible intensité lumineuse.

Any plant found to be infected, by testing or by visual examination, should be immediately eliminated, except in the case of pests which can be adequately controlled (e.g. powdery mildew, *Botryotinia fuckeliana*, thrips).

### 2.3 Promotion to nuclear stock

The plants that give negative results in all tests and inspections can be promoted to nuclear stock or used to produce nuclear-stock plants 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 IV.

## 3. Maintenance of the nuclear stock

### 3.1 Growing conditions

Cuttings taken from the candidate nuclear stock when planted become the nuclear stock. The nuclear stock can be maintained *in vitro* (but not multiplied) and, in this form, will retain the same status in the scheme. Otherwise, nuclear-stock plants should be kept in a suitably designed aphid-proof house, containing only nuclear-stock plants. 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<sup>2</sup>, 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.

The useful life of a nuclear-stock plant of kalanchoe does not generally exceed 2 years.

### 3.2 Testing requirements

The plants should be visually inspected for the presence of any pest. Any plant found to be infected, by testing or by visual examination, should be immediately eliminated, except in the case of pests which can be adequately controlled (e.g. powdery mildew, *Botryotinia fuckeliana*, thrips).

If nuclear-stock plants are kept for over 12 months, they should be individually retested once a year for KMV, INSV and TSWV (Appendix II) and pathogenic *Erwinia* spp. (Appendix III).

Cuttings taken from nuclear-stock plants can also be considered as nuclear stock, provided that they do not leave the nuclear-stock conditions<sup>3</sup> and are individually retested at least for KMV, INSV,

<sup>2</sup>In view of the great diversity of kalanchoe cultivars, checks for absolute trueness to type may be difficult. However, the material should be checked for any serious deviation from type (mutations, etc.).

<sup>3</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.

du *Kalanchoe top spotting badnavirus* (KTSV). L'état général des plantes relatif à ces organismes nuisibles, et d'une façon générale, à tous les autres, doit être régulièrement contrôlé par des inspections visuelles. 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 (par ex. oïdium, *Botryotinia fuckeliana*, thrips).

### 2.3 Promotion au stade initial

Les plantes qui donnent des résultats négatifs pour tous les tests et inspections peuvent être utilisées pour produire des plantes du stade initial par bouturage, ou être promues au stade initial. 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 IV.

## 3. Maintien du stade initial

### 3.1 Conditions de culture

Lorsque les boutures prises sur le matériel candidat sont plantées, elles deviennent les plantes du stade initial. Le stade initial peut être maintenu *in vitro* (mais sans être multiplié), et, sous cette forme, il pourra conserver le même statut dans le schéma. Sinon, les plantes du matériel initial doivent être conservées dans une serre aphid-proof, conçue pour cet usage et ne contenant que des plantes du stade initial. Elles doivent être placées dans les mêmes conditions de culture et 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<sup>2</sup> 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.

La durée de vie utile d'une plante de kalanchoë du stade initial ne dépasse généralement pas 2 ans.

### 3.2 Exigences relatives aux tests

Les plantes doivent être inspectées visuellement pour détecter la présence de tout autre organisme nuisible. Si elles sont conservées pendant plus de 12 mois, elles doivent être individuellement retestées une fois par an pour rechercher le KMV, le TSWV et l'INSV (Annexe II) et les *Erwinia* spp. pathogènes (Annexe III). 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 (par ex. oïdium, *Botryotinia fuckeliana*, thrips).

Les boutures prélevées sur les plantes du stade initial peuvent aussi être considérées comme faisant partie du stade initial, à condition qu'elles ne quittent pas les conditions du stade initial<sup>3</sup> et qu'elles soient retestées individuellement au moins pour le KMV, le TSWV et l'INSV.

<sup>2</sup>Compte tenu de la grande diversité des cultivars de kalanchoë, la vérification de l'authenticité variétale absolue peut être difficile. Cependant, il faut vérifier que le matériel ne présente pas de déviation sérieuse par rapport au type (mutations, etc.).

<sup>3</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.

TSWV and pathogenic *Erwinia* spp. The same applies to plants transferred from *in vitro* culture to pots; in this case, a careful control of true-ness 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 IV. 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

Cuttings taken from the nuclear-stock plants when planted become propagation stock I. The plants should be kept in isolated houses, separated from any other plants that are not at an equivalent stage of the certification scheme or any similar certification scheme. They should be grown either in individual containers or in a system of small growing units ensuring adequate isolation. General precautions against pests should be maintained (including the use of sticky traps).

The useful life of a propagation stock I plant does not generally exceed 2 years. After this period, all the propagation-stock I plants should be discarded and replaced by new plants. The filiation of the plants should be recorded, so that each lot is known to be derived from nuclear stock by not more than the fixed number of generations of propagation under the required conditions. Throughout the production of propagation stock I, checks should be made on varietal purity and on possible mutations.

### 4.2 Testing requirements

The plants should be randomly tested for KMV, INSV and TSWV. Any plant giving a positive result at random testing should be eliminated and recorded. In the case of a positive test result, all plants in the group of plants from which the sample was taken (whole lot or subunit) should be individually tested. All positive plants should be eliminated. The plants should be visually inspected regularly for the presence of any pest. Any plant found to be infected by any pest should be eliminated (e.g. powdery mildew, *Botryotinia fuckeliana*, thrips), except in the case of pests which can be adequately controlled. If symptoms of viruses are seen, it is recommended that certification should not be granted.

### 4.3 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 IV. 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.

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 IV. 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

Lorsque les boutures prélevées sur des plantes du stade initial sont plantées, elles deviennent le stade de propagation I. 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. Elles peuvent être cultivées soit en conteneurs individuels, soit dans un système de petites unités de culture garantissant un bon isolement. Des précautions générales contre les organismes nuisibles doivent être maintenues (y compris l'utilisation de pièges gluants).

La durée de vie utile d'une plante du stade de propagation I n'excède généralement pas 2 ans. Après cette période, toutes les plantes du stade de propagation I doivent être éliminées et remplacées. 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.

### 4.2 Exigences relatives aux tests

Des plantes doivent être prélevées par sondage et testées pour le KMV, l'INSV et le TSWV. Toute plante présentant un résultat positif aux tests doit être éliminée et répertoriée. En cas de résultat positif, toutes les plantes du groupe dans lequel l'échantillon a été prélevé (lot entier ou sous-unité) doivent être testées individuellement. Toutes les plantes positives doivent être éliminées. L'état des plantes doit être régulièrement contrôlé par inspection visuelle pour détecter la présence d'organismes nuisibles. Toute plante trouvée contaminée doit être éliminée, sauf dans le cas des organismes nuisibles contre lesquels il existe une lutte efficace (par ex. oïdium, *Botryotinia fuckeliana*, thrips). Il est recommandé de ne pas accorder la certification si des symptômes de virus sont observés.

### 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 IV. 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. Propagation stock II (production of certified cuttings)

### 5.1 Growing conditions

Cuttings taken from the propagation-stock I plants, when planted, become propagation stock II, from which the certified cuttings are taken. The plants should be kept in isolated houses, separated from any other plants that are not at an equivalent stage of the certification scheme or any similar certification scheme. Plants should be grown either in individual containers or in a system of small growing units ensuring adequate isolation. General precautions against pests should be maintained (including the use of sticky traps).

The useful life of propagation-stock II plants does not generally exceed 2 years. 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 randomly tested for KMV, and preferably also for TSWV and INSV. Any plant giving a positive result at random testing should be eliminated and recorded. In the case of a positive test result, all plants in the group of plants from which the sample was taken (whole lot or subunit) should be individually tested. All plants giving a positive result should be eliminated. The plants should be visually inspected regularly for the presence of any pest. Any plant found to be infected by any pest should be eliminated, except in the case of pests which can be adequately controlled (e.g. powdery mildew, *Botryotinia fuckeliana*, thrips).

### 5.3 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 IV. Propagating material leaving the scheme may be labelled as 'certified' material. The certification inspection should be done on the plants from which the certified material will be taken.

## 6. Execution and administration of the certification scheme

### 6.1 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

## 5. Stade de propagation II (production de boutures certifiées)

### 5.1 Conditions de culture

Lorsque les boutures prélevées sur des plantes du stade de propagation I sont plantées, elles deviennent le stade de propagation II sur lequel les boutures certifiées sont prises. 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 plantes peuvent être cultivées soit en conteneurs individuels, soit dans un système de petites unités de culture garantissant un bon isolement. Des précautions générales contre les organismes nuisibles doivent être maintenues (y compris l'utilisation de pièges gluants).

La durée de vie utile des plantes du stade de propagation II ne dépasse généralement pas 2 ans. 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

Des plantes doivent être prélevées par sondage et testées pour le KMV. Il est conseillé de soumettre également les plantes du stade de propagation II à des tests par sondage visant à vérifier l'absence du TSWV et de l'INSV. Toute plante présentant un résultat positif aux tests doit être éliminée et répertoriée. En cas de résultat positif, toutes les plantes du groupe dans lequel l'échantillon a été prélevé (lot entier ou sous-unité) doivent être testées individuellement. Toutes les plantes positives doivent être éliminées. L'état des plantes doit être régulièrement contrôlé par inspection visuelle pour détecter la présence d'organismes nuisibles. Toute plante trouvée contaminée doit être éliminée, sauf dans le cas des organismes nuisibles contre lesquels il existe une lutte efficace (par ex. oïdium, *Botryotinia fuckeliana*, thrips).

### 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 IV. 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. Exécution et administration du schéma de certification

### 6.1 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

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.

## 6.2 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 cuttings 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 kalanchoe

The tests and inspections for kalanchoe are summarized in Table 1.

## APPENDIX II

### Guidelines for kalanchoe viruses in a certification scheme

#### Procedures for each virus

##### *Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) and Impatiens necrotic spot tospovirus (INSV)*

Plants of *K. blossfeldiana* infected by TSWV may show symptoms, to varying degrees, of chlorotic vein clearing and vein banding on the youngest leaves, followed by yellow mottling along the leaf edges, later followed by chlorotic and necrotic sunken spots, 5–10 mm in diameter, and, for INSV, yellowish chlorotic rings, spots or patterns on leaves. Shoots developed some time after the infection may be symptomless. Plants can be tested by inoculation to *Nicotiana benthamiana* or *Nicotiana occidentalis* P1. A very reliable detection method, and the preferred one, is the ELISA test.

##### *Kalanchoe mosaic potyvirus (KMV)*

Leaves of infected *K. blossfeldiana* plants show a characteristic 'green islands' mosaic, but symptoms vary with cultivars, being almost symptomless in cultivars with thick-skinned, dark-green leaves. Symptoms are more pronounced in spring and are most clearly seen in the uppermost three or four leaf pairs. Infected plants often show reduced growth. Other *Kalanchoe* spp. usually show no symptoms although they may be latently infected. When KMV is transmitted to virus-free plants of *K. blossfeldiana* cv. Attraction, either by sap or grafting, characteristic symptoms are seen. KMV is transmitted by aphids. Plants can be freed from KMV by meristem-tip culture. Heat treatment may be used before meristems are excised. Characteristic symptoms are produced by inoculation on *Chenopodium quinoa*. ELISA tests are possible, but antisera are difficult to obtain.

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.

## 6.2 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 boutures 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 kalanchoë

Les tests et inspections pour détecter les organismes nuisibles du kalanchoë sont résumés au Tableau 1.

## ANNEXE II

### Directives pour les virus du kalanchoë dans le schéma de certification

#### Procédures pour chaque virus

##### *Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) et Impatiens necrotic spot tospovirus (INSV)*

Les plantes de *K. blossfeldiana* infectées par le TSWV peuvent présenter des symptômes, à des degrés divers, d'éclaircissement chlorotique des nervures et de liseré des nervures sur les feuilles les plus jeunes, puis de marbrure jaune sur le bord des limbes foliaires, et enfin de taches chlorotiques et nécrotiques concaves, de 5–10 mm de diamètre. Pour l'INSV, on observe des anneaux, des taches ou des traces chlorotiques jaunâtres sur les feuilles. Les pousses qui se développent quelque temps après l'infection peuvent ne pas présenter de symptômes. Les plantes peuvent être testées par inoculation sur *N. benthamiana* ou *N. occidentalis* P1. Le test ELISA est une méthode de détection très fiable, et préférée.

##### *Kalanchoe mosaic potyvirus (KMV)*

Les feuilles des plantes de *K. blossfeldiana* infectées présentent une mosaïque caractéristique verte, mais les symptômes varient selon les cultivars. Certains cultivars à feuilles vert foncé et épaisses ne présentent presque pas de symptômes. Les symptômes sont plus prononcés au printemps et sont plus clairs sur les trois ou quatre paires supérieures de feuilles. Les plantes infectées présentent souvent une croissance réduite. Les autres espèces de kalanchoë ne présentent généralement pas de symptômes même si elles peuvent porter des infections latentes. Des symptômes caractéristiques apparaissent lorsque que le KMV est transmis, par la sève ou par greffe, à des plantes saines de *K. blossfeldiana* cv. Attraction. Le KMV est transmis par des pucerons. Il peut être éliminé des plantes infectées par culture de méristèmes. Un traitement à la chaleur peut être appliqué avant d'exciser les méristèmes. Des symptômes caractéristiques sont produits par inoculation sur *C. quinoa*. Les tests ELISA sont possibles, mais les antisérums sont difficiles à obtenir.

**Table 1** Summary of tests and inspections for kalanchoe pests at different stages of the scheme  
 Résumé des tests et des inspections pour détecter les organismes nuisibles du kalanchoë aux différents stades du schéma

Pests/Organismes nuisibles	Candidate nuclear stock/ Candidat au stade initial	Nuclear stock/ Stade initial	Propagation stock I/ Stade de propagation I	Propagation stock II/ Stade de propagation II
Pathogenic <i>Erwinia</i> spp./ <i>Erwinia</i> spp. pathogènes	Individual testing, at least twice, by immunofluorescence or isolation on selective medium/Test individuel, au moins deux fois, par immunofluorescence ou isolement sur milieu sélectif	Individual testing once a year, by immunofluorescence or isolation on selective medium/Test individuel une fois par an, par immunofluorescence ou isolement sur milieu sélectif	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle
TSWV, INSV	Individual testing, at least twice, by ELISA or biological testing on <i>Nicotiana benthamiana</i> or <i>Nicotiana occidentalis</i> PI/Test individuel, au moins deux fois, par ELISA ou test biologique sur <i>N. benthamiana</i> ou <i>N. occidentalis</i> PI	Individual testing once a year, by ELISA or biological testing/Test individuel une fois par an, par ELISA ou test biologique	Random testing/ Test par sondage	Visual inspection (and possibly random testing)/Inspection visuelle (éventuellement test par sondage)
KMV	Individual testing, at least twice, by ELISA or biological testing on <i>C. quinoa</i> /Test individuel, au moins deux fois, par ELISA ou test biologique sur <i>C. quinoa</i>	Individual testing once a year, by ELISA or biological testing/Test individuel une fois par an, par ELISA ou test biologique	Random testing/ Test par sondage	Random testing/ Test par sondage
KLV	Individual testing by ELISA or biological testing on <i>C. quinoa</i> /Test individuel par ELISA ou test biologique sur <i>C. quinoa</i>	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle
SYNV	Individual testing by ELISA or biological testing on <i>N. benthamiana</i> or <i>N. occidentalis</i> PI/Test individuel par ELISA ou test biologique sur <i>N. benthamiana</i> ou <i>N. occidentalis</i> PI	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle
KTSV	Specific visual inspection in spring and autumn/Inspection visuelle spécifique au printemps et en automne	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle
Other pests/Autres organismes nuisibles	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle

*Kalanchoe top spotting badnavirus (KTSV)*

During periods of vegetative growth, infected plants show coalescing chlorotic spots and ringspots on emerging leaves. Spots usually fade as the leaves expand, but circular depressions often develop on the upper leaf surface at sites that previously showed chlorotic spots. The intensity of spotting varies among cultivars. KTSV is detected by visual inspection in spring and autumn, when the symptoms are the most distinct.

*Sonchus yellow net rhabdovirus (SYNV)*

An antiserum against this rhabdovirus is available at Plant Research International, Wageningen (NL) (formerly IPO-DLO). Plants can be tested by inoculation to *N. occidentalis* P1 or *N. benthamiana*.

*Kalanchoe latent carlavirus (KLV)*

KLV causes symptomless infections in various cultivars of *K. blossfeldiana*. However, double infection by KLV and another virus may intensify the symptoms of the second virus. Plants can be freed from KLV by heat treatment and meristem-tip culture. Plants can be tested by inoculation to *C. quinoa* or by ELISA.

**Inoculation to indicator plants**

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.

The following indicator plants can be used for detecting kalanchoe viruses: *C. quinoa*, KMV, KLV; *N. benthamiana*, *N. occidentalis* P1, TSWV, INSV, SYNV.

*Production of indicator plants*

Indicator plants should be sown in pots in a humus-rich soil. The seedlings should be pricked out into trays about 6 days after sowing and grown on at 20–25 °C, with supplementary lighting (minimum 12 h). They should be planted out into individual pots 3 weeks later. The usual stage for inoculation is when four to six leaves have fully developed (5 weeks after sowing).

*Mechanical inoculation*

For all viruses, the extraction should be performed using 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.2, containing 4% polyethylene glycol (PEG). About 4 mL of buffer per g of leaf material should be used.

The leaves to be inoculated should be dusted with carborundum powder (400 mesh), then two fingers should be dipped into the inoculum and rubbed over the leaf surface. Inoculation may also be done by means of cotton wool, but this is less sensitive. At least two leaves per plant and one plant per sample should be inoculated. The leaves should be washed with tap water immediately after inoculation and the plants placed, carefully labelled, in a glasshouse at about 20 °C for at least 3 weeks, ensuring that the individual pots are placed so as to prevent any contact between plants.

Other standard methods of trituration and inoculation may also be used.

*Kalanchoe top spotting badnavirus (KTSV)*

Pendant les périodes de croissance végétative, les plantes infectées par le KTSV présentent des taches, simples ou annulaires, chlorotiques et coalescentes sur les jeunes feuilles. Ces taches s'estompent généralement lorsque les feuilles se développent, mais des dépressions circulaires apparaissent souvent à la face supérieure des feuilles à l'emplacement des taches chlorotiques. L'intensité des taches varie selon les cultivars. Le KTSV est détecté par inspection visuelle au printemps et en automne, lorsque les symptômes sont les plus nets.

*Sonchus yellow net rhabdovirus (SYNV)*

Un antisérum est disponible auprès de Plant Research International (NL) (auparavant IPO-DLO). Les plantes peuvent être testées par inoculation sur *N. occidentalis* P1 ou *N. benthamiana*.

*Kalanchoe latent carlavirus (KLV)*

Le KLV provoque des infections sans symptôme sur plusieurs cultivars de *K. blossfeldiana*. Par contre, les infections combinées de KLV et d'un autre virus sont susceptibles d'intensifier les symptômes du deuxième virus. Le KLV peut être éliminé des plantes par traitement à la chaleur et culture de méristèmes. Les plantes peuvent être testées par inoculation sur *C. quinoa* ou par ELISA.

**Inoculation sur des plantes indicatrices**

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.

Les plantes indicatrices suivantes peuvent être utilisées pour détecter les virus du kalanchoë: *C. quinoa*, KMV, KLV; *N. benthamiana*, *N. occidentalis* P1, TSWV, INSV, SYNV.

*Production des plantes indicatrices*

Effectuer les semis dans des pots contenant un sol riche en humus. Répiquer les jeunes plants dans des plateaux, environ 6 jours après le semis, et les placer à 20–25 °C avec un éclairage supplémentaire (minimum 12 h). Placer les plantes dans des pots individuels 3 semaines plus tard. Le stade d'inoculation habituel comporte 4–6 feuilles bien développées (5 semaines après le semis).

*Inoculation mécanique*

Pour tous les virus, l'extraction peut être réalisée à l'aide d'un tampon phosphate de potassium 0,1 M, pH 7,2, contenant 4% de polyéthylène glycol (PEG). Utiliser environ 4 mL de tampon par g de matériel foliaire. Saupoudrer les feuilles de carborundum (calibre 400). Tremper deux doigts dans l'inoculum et les frotter à la surface des feuilles. L'inoculation peut également être réalisée en utilisant de la ouate, mais cette méthode est moins sensible. Inoculer au moins deux feuilles par plante et une plante par échantillon. Rincer les feuilles à l'eau du robinet immédiatement après l'inoculation. Placer les plantes soigneusement étiquetées dans une serre à 20 °C pendant au moins 3 semaines, en s'assurant que les pots individuels sont disposés de manière à éviter tout contact entre les plantes.

D'autres méthodes standards de broyage et d'inoculation peuvent aussi être utilisées.

*Observation of symptoms on indicator plants*

KMV and KLV: local lesions;

TSWV, INSV: systemic infection, vein clearing;

SYNV: many clear chlorotic local lesions after 6 days.

**ELISA testing for kalanchoe viruses**

ELISA can be performed for INSV, TSWV, KMV, KLV and SYNV.

For INSV, TSWV, SYNV and KMV, leaves should be triturated in extraction buffer at a dilution of 1:10 (1 g of leaf per 10 mL of buffer). The extraction buffer is a phosphate buffer, pH 7.4 (8 g of NaCl, 1 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 14.5 g of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g of  $\text{NaN}_3$ , 20 g of PVP, 1 mL of Tween 20 dissolved in distilled water and made up to 1 L).

Other buffers to be used are as follows: coating buffer, pH 9.6: 1.59 g of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2.93 g of  $\text{NaHCO}_3$ , 0.5 g of  $\text{NaN}_3$  dissolved in distilled water and made up to 1 L; conjugate buffer (extraction buffer without PVP); substrate buffer, pH 9.8, 97 mL of diethanolamine, 800 mL of distilled water, 0.5 g of  $\text{NaN}_3$  (first adding 800 mL of distilled water, then HCl to establish pH at 9.8, and finally making up to 1 L with distilled water).

For KLV, the extraction buffer (0.1 g of leaf material per mL of buffer) is a phosphate buffer, pH 7.4: 8 g of NaCl, 1 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 14.5 g of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g of  $\text{NaN}_3$ , 20 g of PVP, 20 mL of Tween 20, 1.3 g of  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 2 g of powdered albumin (hen's egg), grade II, dissolved in distilled water and made up to 1 L. Coating buffer is as above and conjugate buffer is, pH 7.4: 8 g of NaCl, 1 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 14.5 g of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1 mL of Tween 20 dissolved in distilled water and made up to 1 L. Special ELISA plates can be used (delivered by the antiserum provider) and the substrate is peroxidase.

All other stages of the ELISA test should be performed according to the published procedures or by following the instructions accompanying the proprietary reagents.

**APPENDIX III****Guidelines for testing for pathogenic *Erwinia* spp. in a certification scheme**

The first symptoms in cuttings infected by pathogenic *Erwinia* spp. are stunting and wilting. Plants can be latently infected, and testing by immunofluorescence or isolation on selective medium is necessary.

**Immunofluorescence**

The test is performed on triturated stems or leaves of kalanchoe using the indirect method in which antibodies to the bacterium are reacted with the sample. Commercially produced anti-rabbit antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate are then bound to the bacterial antigens and can be seen under a suitable fluorescence microscope. The method is also suitable for combined samples. For more details on laboratory procedures for the immunofluorescence test, see OEPP/EPPO (1990).

*Observation des symptômes sur les plantes indicatrices*

KMV and KLV: lésions locales;

TSWV, INSV: infection systémique, éclaircissement des nervures;

SYNV: de nombreuses lésions locales chlorotiques et nettes apparaissant au bout de 6 jours.

**Test ELISA pour les virus du kalanchoë**

L'INSV, le TSWV, le KMV, le KLV et SYNV peuvent être détectés par un test ELISA. Pour l'INSV, le TSWV, le SYNV et le KMV, broyer des feuilles dans un tampon d'extraction à une dilution de 1:10 (1 g de feuille pour 10 mL de tampon). Le tampon d'extraction est un tampon phosphate, pH 7,4 (8 g de NaCl, 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 14,5 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g de  $\text{NaN}_3$ , 20 g de PVP, 1 mL de Tween 20, le tout dissous dans de l'eau distillée et ajusté à 1 L).

Les autres tampons à utiliser sont les suivants: tampon d'enrobage, pH 9,6, 1,59 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 2,93 g de  $\text{NaHCO}_3$  + 0,5 g de  $\text{NaN}_3$  dissous dans de l'eau distillée et ajusté à 1 L; tampon de conjugaison (tampon d'extraction sans PVP); tampon de substrat, pH 9,8, 97 mL de diéthanolamine, 800 mL d'eau distillée, 0,5 g de  $\text{NaN}_3$  (ajouter d'abord 800 mL d'eau distillée, puis ajuster le pH à 9,8 avec de l'HCl; amener enfin le volume à 1 L avec de l'eau distillée).

Pour le KLV, utiliser un tampon phosphate (0,1 g de feuille par mL de tampon), pH 7,4, 8 g de NaCl, 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 14,5 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g de  $\text{NaN}_3$ , 20 g de PVP, 20 mL de Tween 20, 1,3 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 2 g d'albumine (d'œuf de poule) en poudre de classe II, le tout dissous dans de l'eau distillée et ajusté à 1 L. Tampon d'enrobage comme plus haut. Tampon de conjugaison, pH 7,4, 8 g de NaCl, 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 14,5 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1 mL de Tween 20, le tout dissous dans de l'eau distillée et ajusté à 1 L. Des plaques ELISA spéciales (fournies en même temps que l'antisérum) peuvent être utilisées et le substrat est la peroxydase.

Toutes les autres étapes du test ELISA doivent être effectuées conformément aux procédures publiées ou aux instructions accompagnant les réactifs disponibles dans le commerce.

**ANNEXE III****Directives pour les tests de détection des *Erwinia* spp. pathogènes dans le schéma de certification**

Les premiers symptômes des *Erwinia* spp. pathogènes sur les boutures infectées sont le rabougrissement et le flétrissement. L'infection peut être latente et il est nécessaire de tester par immunofluorescence ou isolement sur milieu sélectif.

**Immunofluorescence**

Le test est réalisé sur des tiges ou feuilles de kalanchoë triturées, en utilisant la méthode indirecte dans laquelle des anticorps de la bactérie réagissent avec l'échantillon. Des anticorps de lapin produits commercialement, conjugués à de l'isothiocyanate de fluorescéine sont alors attachés aux antigènes bactériens et peuvent être observés sous un microscope à fluorescence adéquat. La méthode convient également pour des échantillons combinés. Pour plus de détails sur les procédures de laboratoire pour le test d'immunofluorescence, voir OEPP/EPPO (1990).

### Isolation on selective medium

Pathogenic *Erwinia* spp. can be isolated on pectate gel media using surface-sterilized fragments of stem or leaf. The pieces of tissue are placed in sterile distilled water and broken apart with sterile needles or scalpel, and then allowed to stand for 10–15 min. The suspension is plated onto either CVP medium (Cuppels & Kelman, 1974) or a pectate overlay medium (Paton, 1958; modified by Lelliott & Stead, 1987).

#### CVP medium

To 500 mL of boiling distilled water, add: 1.0 mL of 0.07% (w/v) aqueous crystal violet solution; 4.5 mL of 1 M NaOH; 3.0 mL of 10% (w/v) aqueous  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 2.0 g of Difco agar; 1.0 g of  $\text{NaNO}_3$ . After blending, add 9 g of sodium polypectate.

#### Pectate overlay medium

To 1 L of distilled water, add: 5.0 g of peptone; 5.0 g of Laboratory-lemco; 5.0 g of calcium lactate; 12.0 g of Oxoid agar no. 3. Adjust to pH 7.2 and, after sterilizing and pouring, add the pectate overlay of 2.0 g of sodium polypectate and 0.01 g of EDTA  $\text{Na}_2$  salt in 100 mL of distilled water.

On both media, pectolytic *Erwinia* spp. produce deep cup-like pits, whereas other pectolytic bacteria produce shallower wider pits. In addition, *Erwinia* spp. cause liquefaction which is not common for other bacteria.

## APPENDIX IV

### Recommended certification standards for kalanchoe

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. In general, the certification inspection is 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 concerned in the tests performed. The plant should show no symptom 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 all tests on the nuclear-stock plant gave negative results for pathogenic *Erwinia* spp., KMV, INSV and TSWV. If these conditions are not met at the time of certification inspection, certification should be refused to the plant concerned.

#### Propagation stock I

Results should show that random tests for KMV, INSV and TSWV gave negative results or that all plants in the group of plants from which

### Isolement sur milieu sélectif

Les *Erwinia* spp. pathogènes peuvent être isolées sur un milieu gélosé à pectate en utilisant des fragments de tige ou de feuille stérilisés en surface. Les morceaux de tissus végétaux sont placés dans de l'eau distillée stérile et fractionnés à l'aide d'aiguilles stériles ou d'un scalpel, puis sont mis à reposer pendant 10–15 min. La suspension est placée soit sur un milieu CVP (Cuppels & Kelman, 1974) ou sur un milieu pectate (Paton, 1958; modifié par Lelliott & Stead, 1987).

#### Milieu CVP

Ajouter à 500 mL d'eau distillée portée à ébullition: solution aqueuse de crystal violet 0,07% (p/v) 1,0 mL; NaOH 1 M 4,5 mL;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  aqueux 10% (p/v) 3,0 mL; Difco agar 2,0 g;  $\text{NaNO}_3$  1,0 g. Après mélange, ajouter 9 g de polypectate de sodium.

#### Milieu pectate

Ajouter à 1 L d'eau distillée: 5,0 g de peptone; 5,0 g de Laboratory-lemco; 5,0 g de lactate de calcium; 12,0 g de Oxoid agar no. 3. Ajuster à pH 7,2 et, après stérilisation et répartition, ajouter la couche de pectate composée de: 2,0 g de polypectate de sodium et 0,01 g de sel d'EDTA  $\text{Na}_2$  dans 100 mL d'eau distillée.

Sur les deux milieux, les *Erwinia* spp. pectolytiques produisent des puits profonds en forme de coupes, tandis que les autres bactéries pectolytiques produisent des puits plus larges et plus superficiels. Par ailleurs, les *Erwinia* spp. entraînent une liquéfaction qui n'est pas courante pour les autres bactéries.

## ANNEXE IV

### Normes de certification recommandées pour le kalanchoë

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. 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. 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 tous les tests effectués sur la plante du stade initial ont donné des résultats négatifs pour les *Erwinia* spp. pathogènes, le KMV, l'INSV et le TSWV. 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

Les résultats des tests effectués par sondage pour le KMV, l'INSV et le TSWV doivent être négatifs, ou toutes les plantes du groupe dans lequel

**Table 2** Recommended tolerance levels at visual inspection of kalanchoe. 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 kalanchoë. 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
Pathogenic <i>Erwinia</i> spp./ <i>Erwinia</i> spp. pathogènes	0	0
Virus symptoms/Symptômes de virus	0	0
Other pests/Autres organismes nuisibles	Substantially free/Pratiquement indemne	Substantially free/Pratiquement indemne

the sample was taken (whole lot or subunit) were tested, and infected plants were removed. No virus symptoms should have been seen during production. Visual inspection at certification should show that the incidence of pests in each lot does not exceed the thresholds in Table 2. If these conditions are not met at the time of certification inspection, certification should be refused to the lots concerned.

### Propagation stock II

Results should show that all plants found positive by random tests for KMV, and optional random tests for INSV and TSWV, were eliminated. If the lot from which the sample was taken was tested, all plants giving a positive result should have been eliminated. Visual inspection for certification should show that the incidence of pests in each lot does not exceed the thresholds in Table 2. If these conditions are not met at the time of certification inspection, certification should be refused to the lots concerned.

### References/Références

- Cuppels D & Kelman A (1974) Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology* **64**, 468–475.
- Lelliott RA & Stead DE (1987) *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell Scientific Publications, Oxford (GB).

l'échantillon a été prélevé (lot entier ou sous-unité) doivent avoir été testées et les plantes infectées éliminées. Aucun symptôme de virus ne doit avoir été observé pendant la production. L'inspection visuelle de certification doit montrer que l'incidence des organismes nuisibles dans chaque lot ne dépasse pas les seuils du Tableau 2. Si ces conditions ne sont pas respectées au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée aux lots concernés.

### Stade de propagation II

Les résultats des tests effectués par sondage pour le KMV doivent être négatifs, ainsi que les résultats des tests facultatifs par sondage pour l'INSV et le TSWV. Si le lot dans lequel l'échantillon a été prélevé a été testé, toutes les plantes donnant un résultat positif doivent avoir été éliminées. L'inspection visuelle de certification doit montrer que l'incidence des organismes nuisibles dans chaque lot ne dépasse pas les seuils du Tableau 2. Si ces conditions ne sont pas respectées au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée aux lots concernés.

- OEPP/EPPO (1990) EPPO Standard PM 3/25. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* – inspection and test methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **20**, 235–254.
- Paton AM (1958) Pectin-decomposing strains of *Pseudomonas*. *Nature, London* **181**, 61–62.