

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 4/6(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> 31 , 441–444.
PM 4/8 (1)	Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> 24 , 347–367
PM 4/9 (1)	Pathogen-tested material of <i>Ribes</i> . <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> 24 , 857–864
PM 4/10 (1)	Pathogen-tested material of <i>Rubus</i> . <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> 24 , 865–873
PM 4/11 (1)	Pathogen-tested material of strawberry. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> 24 , 875–889
PM 4/12 (1)	Pathogen-tested citrus trees and rootstocks. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> 25 , 737–755
PM 4/16 (1)	Pathogen-tested material of hop. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> 27 , 175–184
PM 4/17 (1)	Pathogen-tested olive trees and rootstocks. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> 27 , 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> 31 , 441–444
PM 4/8 (1)	Certification sanitaire des variétés et porte-greffe de la vigne. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> 24 , 347–367
PM 4/9 (1)	Certification sanitaire des <i>Ribes</i> . <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> 24 , 857–864
PM 4/10 (1)	Certification sanitaire des <i>Rubus</i> . <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> 24 , 865–873
PM 4/11 (1)	Certification sanitaire du fraisier. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> 24 , 875–889
PM 4/12 (1)	Certification sanitaire des arbres et porte-greffe d'agrumes. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> , 25 , 737–755
PM 4/16 (1)	Certification sanitaire du houblon. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> 27 , 175–184
PM 4/17 (1)	Certification sanitaire d'arbres et de porte-greffe d'olivier. <i>Bulletin OEPP/EPPO Bulletin</i> 27 , 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 chrysanthemum
Schéma de certification pour le chrysanthème

Specific scope

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

Specific approval and amendment

First approved in 1992-09.

Revision approved in 2000-09.

Champ d'application spécifique

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

Approbation et amendement spécifiques

Approbation initiale en 1992-09.

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 chrysanthemum 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 florists' chrysanthemums (especially *Dendranthema × grandiflorum*), grown for cut flowers or pot plants. The candidate material may be new cultivars, good-quality material of existing cultivars or meristem-tip cultures of any of these (regenerated cultivars). Meristem-tip culture may be used to increase the probability of obtaining virus-free candidate material. Material imported from outside the EPPO region should be inspected and, if appropriate, tested under quarantine for all EPPO quarantine pests of chrysanthemum 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.

Cuttings taken from the selected plants are rooted and transferred to candidate nuclear stock conditions.

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 chrysanthème 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 chrysanthème des fleuristes (notamment *Dendranthema × grandiflorum*), cultivés en pot ou pour les fleurs coupées. 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). La culture de méristème peut être utilisée pour augmenter la probabilité d'obtention de matériel candidat indemne de virus. 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 chrysanthème présents naturellement dans la région d'origine, et généralement inspecté ou, le cas échéant, testé pour détecter tout autre organisme nuisible.

Les boutures prises sur les plantes sélectionnées sont enracinées et transférées dans les conditions du stade initial.

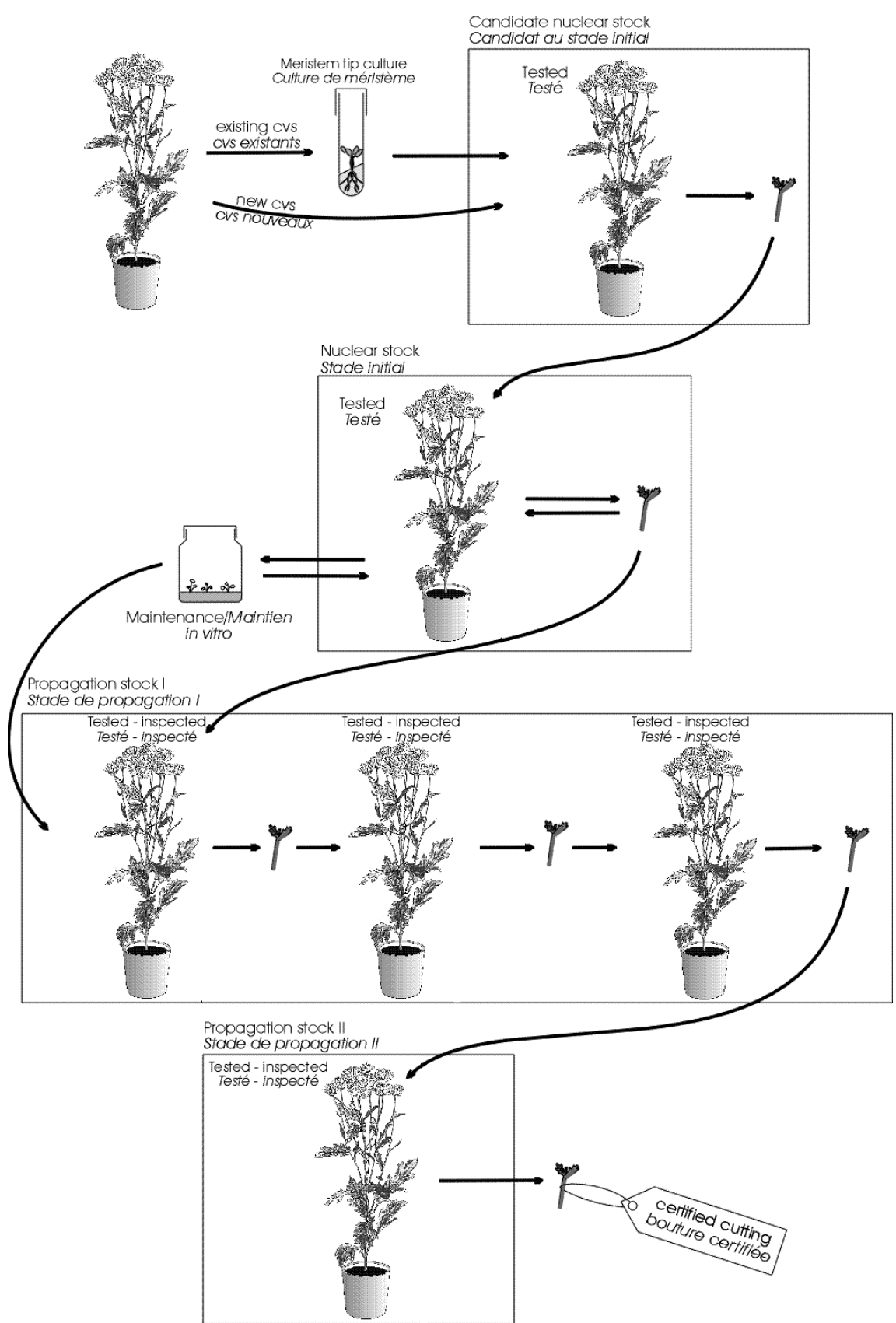


Fig. 1 Diagram of the stages in the chrysanthemum certification scheme
 Diagramme des stades du schéma de certification du chrysanthème

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) where they can be observed and tested. All plants should be grown in individual pots in new or sterilized growing medium, avoiding contact between plants and with strict precautions against infection by *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Verticillium* spp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi*, *Puccinia horiana*, *Aphelenchoides ritzemabosi* and *Agrobacterium tumefaciens*.

2.2 Testing requirements

All plants should be individually tested for the following pests, during growth and flowering, at the time and frequency in Appendix I:

Chrysanthemum B carlavirus (CVB);
Tomato aspermy cucumovirus (TAV);
Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV);
Impatiens necrotic spot tospovirus (INSV);
Chrysanthemum stunt pospiviroid (CSVd).

Recommended tests methods for viruses are given in Appendix II and for CSVd in Appendix III.

The plants should be visually inspected regularly for these pests, in particular at flowering, and, generally, for other pests. 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.

2.3 Promotion to nuclear stock

The plants that give negative results in all tests and inspections are used to produce nuclear-stock plants by cuttings. Before material from any plant is 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). Adequate control of insects should be ensured. A check on trueness to type should be made, by bringing either the nuclear-stock plants, or cuttings taken from them,

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) pour être observées et testées. Toutes les plantes doivent être cultivées dans des pots individuels contenant un substrat neuf ou stérilisé, en évitant le contact entre les plantes et en prenant des précautions strictes afin d'éviter la contamination par *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Verticillium* spp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi*, *Puccinia horiana*, *Aphelenchoides ritzemabosi* et *Agrobacterium tumefaciens*.

2.2 Exigences relatives aux tests

Toutes les plantes doivent être testées individuellement pour les organismes nuisibles suivants, au cours de la croissance et de la floraison, au moment et à la fréquence mentionnés à l'Annexe I:

Chrysanthemum B carlavirus (CVB);
Tomato aspermy cucumovirus (TAV);
Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV);
Impatiens necrotic spot tospovirus (INSV);
Chrysanthemum stunt pospiviroid (CSVd).

Les méthodes de test recommandées figurent, pour les virus, à l'Annexe II, et pour CSVd à l'Annexe III.

Toutes les plantes doivent être inspectées visuellement, spécifiquement pour détecter ces organismes nuisibles, en particulier à la floraison, et généralement pour détecter la présence de tout autre organisme nuisible. 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.

2.3 Promotion au stade initial

Les plantes qui donnent des résultats négatifs pour tous les tests et inspections sont utilisées pour produire des plantes du stade initial par bouturage. Avant que le matériel issu d'une plante ne soit transféré 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). Des mesures de lutte adéquates doivent être prises contre les insectes. Un contrôle de l'authenticité

to flower¹. 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 chrysanthemum does not generally exceed a few months. They are propagated by the cutting-from-cutting method (generally every 3–4 months).

3.2 Testing requirements

The plants should be individually tested for CVB, TAV, TSWV, INSV and CSVd. Because of their short life, each plant is tested only once. They should also 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.

Cuttings taken from nuclear-stock plants can also be considered as nuclear stock, provided that they do not leave the nuclear-stock conditions² and are individually retested at least for CVB, TAV, TSWV, INSV and CSVd. 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 step 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, with precautions to exclude aphids and thrips, and separate 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. Adequate control of insects should be ensured. General precautions against pests should be maintained.

The number of generations of propagation stock I should not exceed three and the useful life of a propagation stock I plant does not generally

¹In view of the great number of chrysanthemum cultivars, checks for absolute trueness to type may be difficult. However, the material should be checked for any serious deviation from type (mutations, etc.).

²They 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.

variétale doit également être effectué en cultivant les plantes du stade initial, ou des boutures prises sur ces plantes, jusqu'à la floraison¹. 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 chrysanthème du stade initial ne dépasse généralement pas quelques mois. Les plantes sont multipliées par bouturage (en général tous les 3–4 mois).

3.2 Exigences relatives aux tests

Les plantes doivent être testées individuellement pour le CVB, le TAV, le TSWV, l'INSV et le CSVd. En raison de sa courte durée de vie, chaque plante est testée une seule fois (soit au stade candidat si la plante est promue directement au stade initial, soit au stade initial si elle est promue sous la forme de bouture). L'état des plantes doit être régulièrement contrôlé par inspection visuelle pour détecter la présence d'organismes nuisibles. 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.

Les boutures prélevées sur les plantes du stade initial peuvent aussi être considérées comme faisant partie du stade initial² et qu'elles soient retestées individuellement au moins pour le CVB, le TAV, le TSWV, l'INSV et le CSVd. 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, avec des précautions pour exclure les pucerons et les thrips, 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 mesures de lutte adéquates doivent être prises contre les insectes. Des précautions générales contre les organismes nuisibles doivent être maintenues.

Le nombre de générations pour le stade de propagation I ne doit pas être supérieur à trois, et la durée de vie utile d'une plante de ce stade

¹En raison du nombre important de cultivars de chrysanthème, la vérification de l'authenticité variétale peut s'avérer difficile. Cependant, le matériel doit être contrôlé pour détecter toute déviation importante par rapport au type (mutations, etc.).

²Elles 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.

exceed 6 months. 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 CVB, TAV, TSWV, INSV and CSVd. 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 tested individually. 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, except in the case of pests which can be adequately controlled.

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 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.

5. Propagation stock II (production of certified cuttings)

5.1 Growing conditions

Cuttings taken from the propagation stock I plants, when planted, become the propagation stock II, from which the certified cuttings are taken.

The plants should be kept in a glasshouse, separately from nuclear stock, propagation stock I and non-certified chrysanthemum material. General precautions against pests should be maintained, in particular against *Aphelenchoides ritzemabosi*, *Frankliniella occidentalis* (and other thrips species), *Liriomyza* spp., *Spodoptera* spp. and *Trialeurodes vaporariorum*.

The useful life of these plants does not generally exceed 6 months. Throughout the production of propagation stock II, checks should be made on varietal purity and on possible mutations or back mutations by growing on to flowering.

5.2 Testing requirements

The plants should be randomly tested (individual plants or pooled samples) for CVB and CSVd. It is advisable to test randomly also for TAV, TSWV and INSV. Any plant giving a positive result at random testing should be eliminated and recorded. Infection at random testing should not exceed 1%, otherwise certification will be refused to the lot. 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.

n'excède généralement pas 6 mois. 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 CVB, le TAV, le TSWV, l'INSV et le CSVd. 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.

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. 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 conservées en serre, séparément du stade initial, du stade de propagation I et de tout matériel non certifié de chrysanthème. Des précautions générales contre les organismes nuisibles doivent être maintenues, en particulier contre *Aphelenchoides ritzemabosi*, *Frankliniella occidentalis* (et autres espèces de thrips), *Liriomyza* spp., *Spodoptera* spp. et *Trialeurodes vaporarium*.

La durée de vie utile des plantes du stade de propagation II ne dépasse généralement pas 6 mois. Tout au long de la production du stade de propagation II, des contrôles doivent porter sur la pureté variétale et sur d'éventuelles mutations en amenant des plantes jusqu'à la floraison.

5.2 Exigences relatives aux tests

Les plantes doivent être testées par sondage (plantes individuelles ou échantillons regroupés) pour le CVB et le CSVd. Des tests par sondage pour le TAV, le TSWV et l'INSV sont également conseillés. Toute plante donnant un résultat positif doit être éliminée et répertoriée. Le niveau d'infection détecté par les tests par sondage ne doit pas dépasser 1%, sinon la certification sera refusée au lot. 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.

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. Propagation material from propagation stock II 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 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 chrysanthemum

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

APPENDIX II

Guidelines for chrysanthemum viruses in a certification scheme

Procedures for each virus

Chrysanthemum B carlavirus (CVB)

CVB is transmitted by aphids. Most cultivars are symptomless when infected, though some show mild leaf mottling and slight loss of flower quality. Therefore, visual examination provides no reliable indication. Nuclear stock can be checked by mechanical inoculation to *Petunia* or

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 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 chrysanthème

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

ANNEXE II

Directives pour les virus du chrysanthème dans le schéma de certification

Procédures pour chaque virus

Chrysanthemum B carlavirus (CVB)

Le CVB est transmis par les pucerons. La plupart des cultivars n'extériorisent pas de symptômes lorsqu'ils sont contaminés, bien que certains présentent une marbrure des feuilles modérée et une faible perte de qualité des fleurs. Par conséquent, l'inspection visuelle ne

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

Pests/Organismes nuisibles	Candidate nuclear stock and nuclear stock/ Candidat au stade initial et stade initial	Propagation stock I/ Stade de propagation I	Propagation stock II/ Stade de propagation II
CVB	Individual testing at least once by ELISA or by mechanical inoculation to <i>Petunia</i> /Test individuel au moins une fois par ELISA ou test biologique sur <i>Petunia</i>	Random testing by ELISA/ Test par sondage par ELISA	Random testing by ELISA/ Test par sondage par ELISA
TAV	Individual testing at least once by mechanical inoculation to <i>Petunia</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> or <i>Chenopodium quinua</i> or ELISA/Test individuel au moins une fois par test biologique sur <i>Petunia</i> , <i>N. tabacum</i> ou <i>C. quinua</i>	Random testing by ELISA/ Test par sondage par ELISA	Visual inspection (and possibly random testing)/ Inspection visuelle (éventuellement test par sondage)
TSWV/INSV	Individual testing at least once by ELISA or by mechanical inoculation to <i>Nicotiana benthamiana</i> or <i>N. occidentalis</i> PI/Test individuel au moins une fois par ELISA ou test biologique sur <i>N. benthamiana</i> ou <i>N. occidentalis</i> PI	Random testing by ELISA/ Test par sondage par ELISA	Visual inspection (and possibly random testing)/ Inspection visuelle (éventuellement test par sondage)
CSVd	Individual testing at least once by electrophoresis or probe/Test individuel au moins une fois par électrophorèse ou sonde	Random testing by the same method as nuclear stock/Test par sondage par la même méthode que pour le stade initial	Random testing by the same method as nuclear stock/Test par sondage par la même méthode que pour le stade initial
Other pests/Autres organismes nuisibles	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle

by ELISA. These tests are applied once to each nuclear-stock plant, which is used for 3–4 months only. Propagation stock II is tested by applying the same tests to randomly selected plants.

Tomato aspermy virus (TAV)

TAV is transmitted by aphids. It is often symptomless, but can induce dwarfing or flower distortion (especially in conjunction with CVB). Visual examination provides no reliable indications. Nuclear stock can be checked by mechanical inoculation to *Petunia*, *Nicotiana tabacum* or *Chenopodium quinoa*, or by ELISA. The tests are applied as for CVB above.

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

TSWV and INSV are transmitted by thrips. Infected plants of chrysanthemum can show (but do not always show) severe symptoms of infection. Symptoms are brown necrotic lesions, yellow/brown concentric rings and/or flower distortion. TSWV and INSV can be transmitted mechanically to *Nicotiana benthamiana* or *N. occidentalis* P1. They can also be detected 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 chrysanthemum viruses: *C. quinoa*, TAV; *Petunia* (use either whole plants or detached leaves), CVB, TAV; *N. benthamiana*, TSWV, INSV; *N. tabacum*, TAV; *N. occidentalis* P1, TSWV, INSV.

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

The test material should be triturated in a mortar in an extract such as the following: 0.05 M Na₂HPO₄–KH₂PO₄ buffer containing 4% PEG 6000 (polyethylene glycol), pH 7.6, and 100 mg/mL activated charcoal. Three millilitres of buffer should be used per g of leaf material. The crude extract may be clarified by filtration or centrifugation, but this may be omitted if the extract is clear.

A glass spatula should be dipped into the inoculum and rubbed over the leaf surface. Inoculation may also be done by finger, covered with a finger-stall (the use of an abrasive is recommended). 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 20–28 °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.

fournit pas d'indication fiable. Le stade initial peut être contrôlé par inoculation mécanique sur *Petunia* ou par ELISA. Ces tests sont appliqués une fois pour chaque plante du stade initial, qui est utilisée pendant 3–4 mois seulement. Le stade de propagation II est contrôlé par les mêmes tests sur des plantes prélevées au hasard.

Tomato aspermy cucumovirus (TAV)

Le TAV est transmis par les pucerons. Souvent les symptômes ne sont pas apparents, mais le virus peut induire un nanisme ou une déformation des fleurs (surtout en association avec le CVB). L'inspection visuelle ne fournit pas d'indications fiables. Le stade initial peut être contrôlé par inoculation mécanique sur *Petunia*, *Nicotiana tabacum* ou *Chenopodium quinoa* ou par test ELISA. Les tests sont effectués comme pour le CVB ci-dessus.

Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) et impatiens necrotic spot tospovirus (INSV)

Le TSWV et l'INSV sont transmis par les thrips. Les plants de chrysanthème contaminés peuvent présenter (mais pas dans tous les cas) des symptômes sévères de contamination. Les symptômes correspondent à des lésions nécrotiques brunes, des anneaux concentriques brun ou jaunes et/ou des déformations des fleurs. Le TSWV et l'INSV peuvent être transmis mécaniquement sur *Nicotiana benthamiana* ou *N. occidentalis* P1. Ils peuvent également être détectés 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 chrysanthème: *C. quinoa*, TAV; *Petunia* (utiliser des plantes entières ou des feuilles détachées), CVB, TAV; *N. benthamiana* et *N. occidentalis* P1, TSWV, INSV; *N. tabacum*, TAV.

Production des plantes indicatrices

Effectuer les semis dans des pots contenant un sol riche en humus. Repiquer 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

Broyer le matériel à étudier dans un mortier contenant la solution suivante: un tampon 0,05 M Na₂HPO₄–KH₂PO₄ avec 4% de PEG 6000 (polyéthylène glycol), pH 7,6, et 100 mg/mL charbon actif. Utiliser 3 mL de tampon par g de matériel foliaire. L'extrait brut peut être clarifié par filtration ou par centrifugation, mais ceci n'est pas nécessaire si l'extrait est bien clair.

Tremper une spatule de verre dans l'inoculum et la frotter à la surface des feuilles. L'inoculation peut aussi être faite avec le doigt recouvert d'un doigtier (l'utilisation d'un abrasif est recommandée). 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 en serre à 20–28 °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

CVB: on *Petunia*, symptoms should appear after 2–5 weeks. Depending on the isolate, local yellow or necrotic or green spots or yellow rings. Symptomless systemic infection occurs rarely.

TAV: on *Petunia*, local grey spots 1–1.5 mm diameter after 6–10 days, sometimes rings 2–3 mm diameter with a green centre, systemic green mosaic and severe leaf malformation. On *N. tabacum*, severe systemic mottle, dwarfing and distortion. On *C. quinoa*, numerous chlorotic or necrotic local lesions in 3–7 days and no systemic infection.

TSWV and INSV: on *N. benthamiana* and *N. occidentalis* P1, chlorotic or necrotic local lesions.

ELISA testing for chrysanthemum viruses

The test should be performed by DAS or TAS (double- or triple-antibody sandwich) ELISA. Proprietary reagent sets are available for CVB, TAV, TSWV and INSV. Antibodies to all known serogroups of viruses should be used.

Preparation of chrysanthemum samples

Freshly collected chrysanthemum roots or leaves (with symptoms, if present) should be triturated in Tris buffer (60 g of Tris, 10 g of $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25 g of PVP and 0.5% Tween L^{-1}). Because TSWV is present at rather low concentrations, the ratio of leaf sample weight to volume of trituration buffer should be high in this case (e.g. 0.3–1 g of leaf to 1 mL of buffer), but dilutions by two magnitudes and in duplicate should also be used. Extracts should be transferred to ELISA plates immediately they are ready.

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

APPENDIX III**Guidelines for testing for CSVd in a certification scheme**

CSVd can give weak or non-specific symptoms, especially on actively growing non-flowering plants, and none at all on certain cultivars, so testing is essential. Three methods are available: (1) grafting onto a susceptible cultivar; (2) electrophoresis; (3) molecular probe; the grafting method is now rarely used. CSVd is an EPPO A2 quarantine pest, and the test methods have been presented in OEPP/EPPO (1989).

APPENDIX IV**Recommended certification standards for chrysanthemum**

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, 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.

Observations des symptômes sur les plantes indicatrices

CVB: sur *Petunia*, symptômes apparaissant généralement au bout de 2–5 semaines. En fonction de l'isolat, taches localisées jaunes ou nécrotiques ou vertes, ou anneaux jaunâtres. Une infection systémique sans symptôme se produit rarement.

TAV: sur *Petunia*, taches localisées grises de 1–1,5 mm de diamètre au bout de 6–10 jours, parfois des anneaux de 2–3 mm de diamètre avec un centre vert, une mosaïque verte systémique et des malformations sévères des feuilles. Sur *N. tabacum*, marbrure systémique sévère, nanisme et déformations. Sur *C. quinoa*: nombreuses lésions locales chlorotiques ou nécrotiques au bout de 3–7 jours mais pas d'infection systémique.

TSWV et INSV: sur *N. benthamiana* et *N. occidentalis* P1, lésions chlorotiques ou nécrotiques.

Test ELISA pour les virus du chrysanthème

Les tests ELISA peuvent être effectués en utilisant la méthode DAS ou TAS (double- or triple-antibody sandwich) ELISA. Des réactifs commerciaux sont disponibles pour le CVB, le TAV, le TSWV et l'INSV. Utiliser des anticorps pour tous les groupes sérologiques connus de virus.

Préparation des échantillons de chrysanthème

Broyer des racines ou des feuilles de chrysanthème fraîchement récoltées (si possible présentant des symptômes) dans un tampon Tris (60 g de Tris, 10 g de $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25 g de PVP et 0,5% de Tween par L). Comme le TSWV est présent à de faibles concentrations, la proportion entre le poids des feuilles de l'échantillon et le volume du tampon d'extraction doit être élevé dans ce cas (par ex. 0,3–1 g de feuille pour 1 mL de tampon), mais des dilutions à deux magnitudes et en double doivent être également utilisées. Transférer immédiatement les extraits, dès qu'ils sont prêts, dans des plaques ELISA.

Toutes les autres étapes de la méthode 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 du CSVd dans le schéma de certification**

Le CSVd provoque des symptômes peu apparents ou non spécifiques, en particulier sur les plantes en croissance active et non fleuries, et parfois aucun symptôme sur certains cultivars. Par conséquent les tests sont essentiels. Trois méthodes sont disponibles: (1) le greffage sur des cultivars sensibles; (2) l'électrophorèse; (3) les sondes moléculaires. La méthode utilisant le greffage est désormais peu utilisée. Le CSVd est un organisme de quarantaine de la liste A2 de l'OEPP, et les méthodes de test ont été présentées dans OEPP/EPPO (1989).

ANNEXE IV**Normes de certification recommandées pour le chrysanthème**

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.

Table 2 Recommended tolerance levels at visual inspection of chrysanthemum. 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 chrysanthème. 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
Viruses/Virus	0	0
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	0	0
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0	0
<i>Verticillium</i> spp.	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>chrysanthemi</i>	0	0
<i>Puccinia horiana</i>	0	0
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0	0
Other pests/Autres organismes nuisibles	Substantially free/Pratiquement indemne	Substantially free/Pratiquement indemne

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 were negative for CVB, TAV, TSWV, INSV and CSVd. No plant may show any symptom of fungal, bacterial or viral disease. If these conditions are not met at the time of certification inspection, certification should be refused to the plants concerned.

Propagation stock I

Results should show that random tests for CVB, TAV, TSWV, INSV and CSVd gave negative results or that all plants in the group of plants from which the sample was taken (whole lot or subunit) were tested, and infected plants were removed. No virus symptoms should have been seen during production. No plant may show any symptom of fungal, bacterial or viral disease. If these conditions are not met at the time of certification inspection, certification should be refused to the lots concerned.

Propagation stock II

Results of random testing for CVB, CSVd, and of optional random testing for TAV, TSWV and INSV, should be presented and should show less than 1% virus infection. Any plants found infected 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

OEPP/EPP (1989) EPP Standards PM 3/24. Chrysanthemum stunt viroid – inspection and test methods. *Bulletin OEPP/EPP Bulletin* **19**, 161–164.

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 des contrôles doivent montrer que tous les tests effectués sur la plante du stade initial ont donné des résultats négatifs pour le CVB, le TAV, le TSWV, l'INSV et le CSVd. Aucune plante ne doit présenter des symptômes de maladie fongique, bactérienne ou virale. 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 par sondage pour le CVB, le TAV, le TSWV, l'INSV et le CSVd doivent être négatifs, ou toutes les plantes du groupe dans lequel l'échantillon a été pris doivent avoir été testées et les plantes infectées éliminées. Aucun symptôme de virose ne doit avoir été observé pendant la production. Aucune plante ne doit présenter des symptômes de maladie fongique, bactérienne ou virale. 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.

Propagation stock II

Les résultats des tests par sondages pour le CVB et le CSVd, et des tests par sondage facultatifs pour le TAV, le TSWV et l'INSV, doivent être présentés et montrer moins de 1% de contamination. Toute plante trouvée infectée 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 2. Si ces conditions ne sont pas respectées au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée aux lots concernés.