

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 4/19(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 begonia
Schéma de certification pour le bégonia

Specific scope

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

Specific approval and amendment

First approved in 1997-09.

Revision approved in 2000-09.

The scheme is presented according to the general sequence proposed by the EPPO Panel on Certification of Pathogen-tested Ornamentals and adopted by EPPO Council (OEPP/EPPO, 1991). It gives details, for the different steps of certification, of the operations to be carried out on the crop in the nursery, including tests and visual inspections, to ensure that defined health standards required for the certification are met, and also defines those health standards. Certified begonia 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 *Begonia* spp. propagated vegetatively by cuttings; it does not cover begonias propagated by tubers. 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 begonia 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.

Champ d'application spécifique

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

Approbation et amendement spécifiques

Approbation initiale en 1997-09.

Révision approuvée en 2000-09.

Ce schéma est présenté selon le plan général proposé par le Groupe d'experts OEPP sur la certification sanitaire des plantes ornementales et adopté par le Conseil de l'OEPP (OEPP/EPPO, 1991). Il donne des détails, pour les différentes étapes de la certification, sur les opérations qui doivent être effectuées en pépinière, y compris les tests et les inspections visuelles, pour garantir que le matériel soit conforme aux normes sanitaires; ces normes sont également définies dans ce schéma. Le matériel certifié de bégonia 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 *Begonia* spp. multipliés par voie végétative par bouturage; il ne couvre pas les bégonias multipliés par tubercules. 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 être inspecté et, le cas échéant, testé en quarantaine, par des méthodes recommandées par l'OEPP, pour tous les organismes de quarantaine OEPP du bégonia 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.

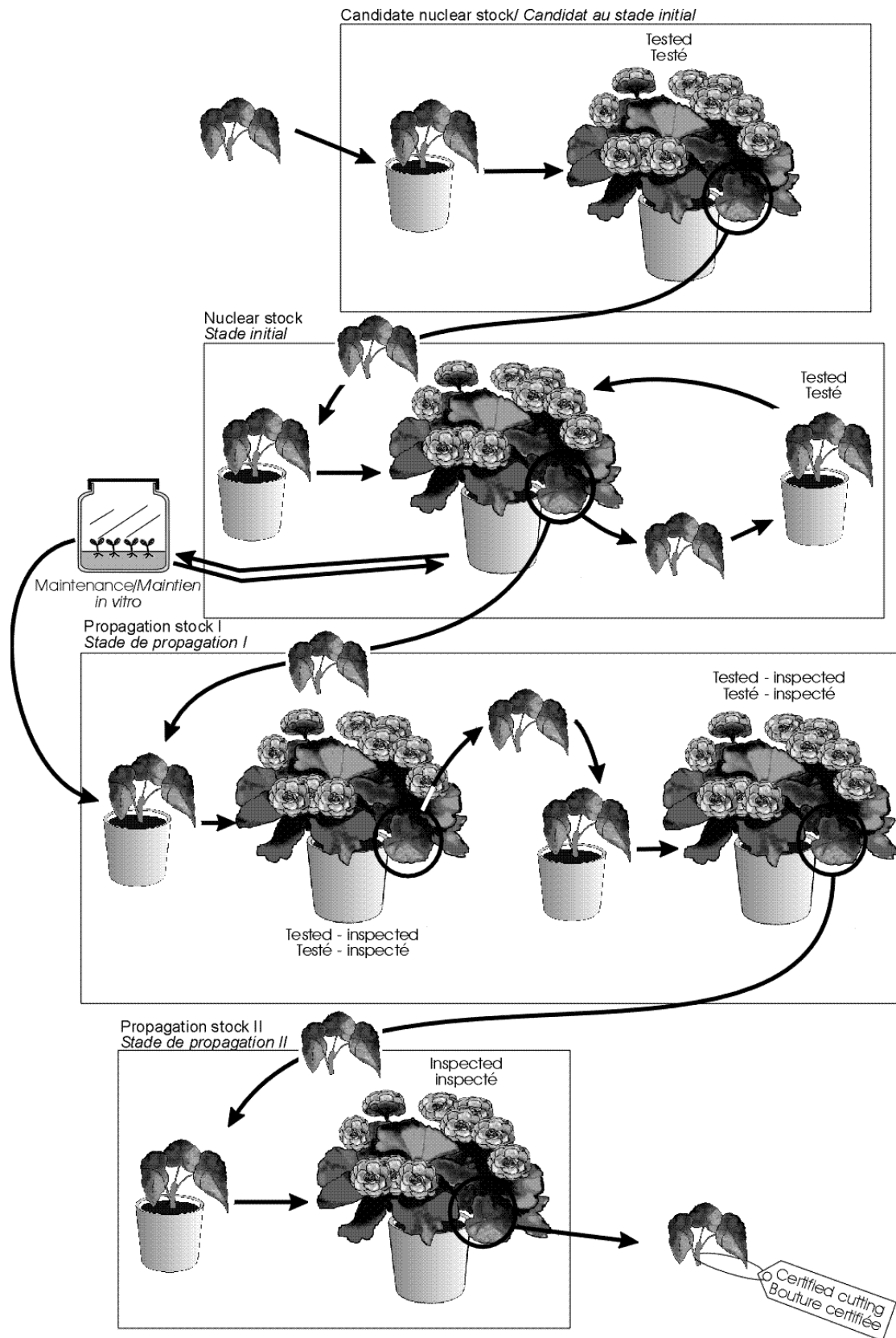


Fig. 1 Diagram of the stages in the begonia certification scheme
 Diagramme des stades du schéma de certification du bégonia

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, house with, as far as possible, precautions to exclude thrips, separately from the nuclear stock) 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 *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*. Adequate control of other pests (particularly *Oidium begoniae*, *Botryotinia fuckeliana*, the tarsonemids, *Steneotarsonemus pallidus* and *Polytarsonemus latus*, thrips, *Thrips flavus*, *Frankliniella occidentalis* and *Heliethrips haemorrhoidalis*) should be ensured.

2.2 Testing requirements

All plants should be individually tested for the following pests:

Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV);
Impatiens necrotic spot tospovirus (INSV);
Xanthomonas axonopodis pv. *begoniae*.

TSWV and INSV can both 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*. Candidate material of begonia for nuclear-stock status should as far as possible be free from TSWV and INSV, by visual inspection for symptoms, control measures taken against the vectors, and use of test methods. Recommended test methods for viruses are given in Appendix II¹. Recommended test methods for *X. a. begoniae* are given in Appendix III.

The plants should be inspected for symptoms of begonia leaf curl disease (whose cause is unknown) and, if found, the plant should be eliminated. The most typical symptoms are vein clearing or vein yellowing. Midribs are bent downwards and leaf margins are curled downwards. The lower face of the leaf takes a more pronounced red coloration and the growth of the plant is reduced. Since this disorder is slow to show symptoms, it is advisable to maintain inspection throughout all stages of the certification scheme.

The plants should be visually inspected regularly for all these pests and, generally, for others. 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.

¹Other viruses have been reported in the literature as infecting different species and cultivars of begonia, i.e. *Arabis mosaic nepovirus* (ArMV), *Broad bean wilt fabavirus* (BBWV), *Carnation mottle carmovirus* (CarMV), *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV), *Tobacco necrosis necrovirus* (TNV) and *Tobacco ringspot nepovirus* (TRSV), but these appear to be incidental and are not known in European production systems.

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 conçu et réservé à cet usage, en prenant autant que possible des précautions pour exclure les thrips et séparément du stade initial) 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 *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*. Des mesures de lutte adéquates doivent être prises contre les autres organismes nuisibles (en particulier *Oidium begoniae*, *Botryotinia fuckeliana*, les Tarsonemidae *Steneotarsonemus pallidus* et *Polytarsonemus latus*, et les thrips *Frankliniella occidentalis*, *Thrips flavus* et *Heliethrips haemorrhoidalis*).

2.2 Exigences relatives aux tests

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

Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV);
Impatiens necrotic spot tospovirus (INSV);
Xanthomonas axonopodis pv. *begoniae*.

Le TSWV et l'INSV peuvent tous deux être transmis par les thrips ou par des outils contaminés. Ils ont récemment pris beaucoup plus d'importance dans la région OEPP, suite à l'introduction du thrips vecteur *Frankliniella occidentalis*. Le matériel de bégonia candidat au stade initial doit être autant que possible maintenu indemne du TSWV et de l'INSV par des inspections visuelles pour détecter les symptômes, par des mesures de lutte contre les vecteurs, et par l'utilisation de méthodes de test. Les méthodes de test recommandées pour les virus figurent à l'Annexe II¹. Les méthodes de test recommandées pour *X. a. begoniae* figurent à l'Annexe III.

Toutes les plantes doivent être inspectées visuellement pour les symptômes de begonia leaf curl disease (dont la cause est inconnue); toute plante atteinte doit être éliminée. Les symptômes les plus caractéristiques sont l'éclaircissement ou le jaunissement des nervures. Les nervures principales sont orientées vers le bas et les bordures des feuilles sont enroulées vers le bas. La face inférieure des feuilles prend une coloration rouge plus prononcée et la croissance de la plante est réduite. Les symptômes de ce trouble n'apparaissent pas rapidement, et il est donc conseillé de maintenir les inspections à tous les stades du schéma de certification.

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.

¹Un certain nombre d'autres virus, à savoir l'*Arabis mosaic nepovirus* (ArMV), le *Broad bean wilt fabavirus* (BBWV), le *Carnation mottle carmovirus* (CarMV), le *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV), le *Tobacco necrosis necrovirus* (TNV) et le *Tobacco ringspot nepovirus* (TRSV), ont été mentionnés dans la littérature sur différentes espèces et cultivars de bégonia, mais leur présence semble secondaire et ils ne sont pas signalés dans les systèmes de production européens.

2.3 Promotion to nuclear stock

Plants that give negative results in all tests and inspections are used to produce nuclear-stock plants by cuttings. Before material from any plant 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 certified 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 house (with, as far as possible, precautions to exclude thrips), 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, 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 begonia does not generally exceed 15 months.

3.2 Testing requirements

The plants should be individually tested for TSWV, INSV and *X. a. begoniae*. The plants should be inspected for symptoms of begonia leaf curl disease (whose cause is unknown) and, if found, the plant should be eliminated. The plants should be visually inspected regularly 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 TSWV, INSV and *X. a. begoniae*. The same applies to plants transferred from *in vitro* culture to pots; in this case, a careful control of trueness to type is also necessary for each plant/clone.

3.3 Certification

Before a plant may be propagated further in the certification scheme, the passage to the next stage should be authorized by the official organization on the basis of records of the tests and observations performed during production, and of one or more certification (visual)

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.

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 un abri, conçu pour cet usage (avec, autant que possible, des précautions pour exclure les thrips) 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 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 bégonia du stade initial ne dépasse généralement pas 15 mois.

3.2 Exigences relatives aux tests

Les plantes doivent être testées individuellement pour le TSWV, l'INSV et *X. a. begoniae*. Elles doivent être inspectées visuellement pour les symptômes de begonia leaf curl disease (dont la cause n'est pas connue); toute plante atteinte doit être éliminée. Les plantes doivent être généralement inspectées pour les autres 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 TSWV, l'INSV et *X. a. begoniae*. 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

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.

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, 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 in individual pots. General precautions against pests should be maintained.

The number of generations of propagation stock I should not exceed two and the useful life of a propagation-stock I plant does not generally exceed 24 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 *X. a. begoniae*, TSWV and INSV. Any plant giving a positive result on random testing for TSWV or INSV 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 and all positive plants should be eliminated. Any plants giving a positive test result or showing symptoms of *X. a. begoniae* should be eliminated, provided that the overall level of infection is less than 0.1%, otherwise the whole lot should be removed. The plants should be inspected for symptoms of begonia leaf curl disease; if found, the plant should be eliminated and all other plants derived from the same nuclear-stock plant should also 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 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.

(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 doivent être cultivées dans des pots individuels. 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 deux, et la durée de vie utile d'une plante de ce stade n'excède généralement pas 24 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 *X. a. begoniae*, le TSWV et l'INSV. Toute plante donnant un résultat positif pour le TSWV ou l'INSV 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 et toutes les plantes positives doivent être éliminées. Toute plante donnant un résultat positif pour *X. a. begoniae* ou présentant des symptômes de cette maladie doit être éliminée, à condition que le niveau général d'infection ne dépasse pas 0,1%, sinon tout le lot doit être éliminé. Les plantes doivent être inspectées pour les symptômes de begonia leaf curl disease; si cette maladie est trouvée sur une plante, toutes les plantes issues de la même plante du stade initial 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. 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 isolated houses, separate 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.

The useful life of these plants does not generally exceed 24 months. Throughout the production of propagation stock II, checks should be made on varietal purity and on possible mutations.

5.2 Testing requirements

It is advisable to check for the presence of *X. a. begoniae*, TSWV and INSV by random testing. Any plant giving a positive result at random testing for TSWV or INSV 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 and all positive plants should be eliminated. Any plant showing symptoms or giving a positive test result for *X. a. begoniae* should be eliminated, provided that the overall level of infection is less than 1%, otherwise the whole lot should be removed. The plants should be inspected for symptoms of begonia leaf curl disease; if found, the infected plant should be eliminated and all other plants derived from the same nuclear-stock plant should also 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.

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

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.

La durée de vie utile des plantes du stade de propagation II ne dépasse généralement pas 24 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.

5.2 Exigences relatives aux tests

Il est conseillé d'effectuer des tests par sondage pour *X. a. begoniae*, le TSWV et l'INSV. Toute plante donnant un résultat positif pour le TSWV ou l'INSV 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 et toutes les plantes positives doivent être éliminées. Toute plante présentant des symptômes de *X. a. begoniae* ou donnant un résultat positif pour cette maladie doit être éliminée, à condition que le niveau général d'infection ne dépasse pas 1%, sinon tout le lot doit être éliminé. Les plantes doivent être inspectées pour les symptômes de begonia leaf curl disease; si cette maladie est trouvée, la plante infectée et toutes les autres plantes issues de la même plante du stade initial 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.

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

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 begonia

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

APPENDIX II

Guidelines for begonia viruses in a certification scheme

Procedures for each virus

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

The symptoms on begonia are dark brown lines along the veins, yellow or bronze ringspots, blotches, mottling and delicate foliar necrotic ringspots. Tests for TSWV and INSV can be performed by inoculation to *Nicotiana benthamiana* or *Nicotiana occidentalis* P1, 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.

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).

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 bégonia

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

ANNEXE II

Directives pour les virus du bégonia dans le schéma de certification

Procedures pour chaque virus

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

Les symptômes sur bégonia sont des lignes brun foncé le long des nervures, des taches annulaires, taches ou marbrures jaunes ou bronze, et des taches annulaires nécrotiques délicates sur les feuilles. Les tests de détection du TSWV et de l'INSV peuvent être effectués par inoculation à *Nicotiana benthamiana* ou *Nicotiana occidentalis* P1, ou par ELISA.

Inoculation à 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.

Production de plantes indicatrices

Effectuer les semis dans des pots contenant un sol riche en humus. Repiquer les jeunes plants dans des bacs environ 6 jours après le semis, 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).

Table 1 Summary of tests and inspections for begonia pests at different stages of the scheme
 Résumé des tests et des inspections pour détecter les organismes nuisibles du bégonia 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
TSWV, INSV	Individual testing by ELISA or by biological testing/ Test individuel par ELISA ou test biologique	Individual testing by ELISA or by biological testing/ Test individuel par ELISA ou test biologique	Random testing, by same method as nuclear stock/ Test par sondage, par la même méthode que pour le stade initial	Visual inspection (and possibly random testing)/Inspection visuelle (éventuellement test par sondage)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	Individual testing by immunofluorescence or isolation/Test individuel par immunofluorescence ou isolement	Individual testing by immunofluorescence or isolation/Test individuel par immunofluorescence ou isolement	Random testing by immunofluorescence or isolation/Test par sondage par immunofluorescence ou isolement	Visual inspection (and possibly random testing)/Inspection visuelle (éventuellement test par sondage)
Begonia leaf curl disease	Specific visual inspection/ Inspection visuelle spécifique	Specific visual inspection/ Inspection visuelle spécifique	Specific visual inspection/ Inspection visuelle spécifique	Specific visual inspection/ Inspection visuelle spécifique
Other pests/Autres organismes nuisibles	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle

Mechanical inoculation

Test material should be triturated in a mortar and extracted with the following buffer: phosphate buffer, pH 7.4, containing 2% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP). The phosphate buffer is prepared as follows: mix 500 mL of solution I (89 g of Na_2HPO_4 in 500 mL demineralized water) with 200 mL of solution II (69 g of $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 500 mL demineralized water) and dilute 1:50 with demineralized water.

Plants should be inoculated at the four- to five-leaf stage. 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. Care should be taken to avoid any damage to leaves, as this could mask reaction. At least two leaves per plant and one plant per sample should be inoculated, marking the inoculated leaves to distinguish between 'local' and 'systemic' reaction. 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.

Observation of symptoms on indicator plants

Mosaic development and leaf deformation may start from the third day after inoculation or can be delayed up to 2 weeks.

ELISA testing for begonia viruses

Plant sap should be obtained by macerating leaves of begonia with extraction buffer at a dilution of 1:12 (1 g of leaf + 12.5 mL of buffer). Extraction buffer is 0.2 M PBS with Tween, PVP and ovalbumin at pH 7.4: 8 g of NaCl, 0.4 g of KH_2PO_4 , 5.8 g of Na_2HPO_4 , 0.2 g of KCl (0.2 g of NaN_3 , for conservation only), 0.05% Tween 20 (= 500 $\mu\text{L L}^{-1}$), 2% PVP (20 g L^{-1}), 0.2% ovalbumin (= 2 g L^{-1}), made up to 1 L, maintaining the pH.

Testing should be performed by DAS-ELISA (double-antibody sandwich) or TAS (triple-antibody sandwich). 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 *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* in a certification scheme

The symptoms are small water-soaked spots near the leaf margins. They become yellow or brown. Infected veins usually collapse, and in severe infections whole leaves may progressively wither and fall. The plants may eventually die. *X. a. begoniae* can be detected by immunofluorescence or isolation.

Immunofluorescence

The test should be performed on triturated stems or leaves of begonia 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

Inoculation mécanique

Broyer le matériel végétal dans un mortier et extraire à l'aide du tampon suivant: tampon phosphate, pH 7,4, contenant 2% (poids/volume) de polyvinylpyrrolidone (PVP). Le tampon phosphate est préparé comme suit: mélanger 500 mL de solution I (89 g de Na_2HPO_4 dans 500 mL d'eau déminéralisée) avec 200 mL de solution II (69 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 500 mL d'eau déminéralisée) et diluer à 1:50 avec de l'eau déminéralisée.

Inoculer au stade quatre ou cinq feuilles. Tremper une spatule en verre dans l'inoculum et la frotter à la surface des feuilles. L'inoculation peut aussi être réalisée avec le doigt recouvert d'un doigtier. Éviter d'endommager les feuilles, ce qui pourrait masquer la réaction. Inoculer au moins deux feuilles par plante et une plante par échantillon, et marquer les feuilles inoculées pour distinguer les réactions 'locales' des réactions 'systémiques'. Laver les feuilles avec de l'eau du robinet immédiatement après l'inoculation. Placer les plantes, soigneusement étiquetées, dans une serre à 20–28 °C pendant au moins 3 semaines, en s'assurant que les pots individuels sont placés de manière à éviter tout contact entre les plantes.

Observation des symptômes sur les plantes indicatrices

Le développement de la mosaïque et la déformation des feuilles est susceptible de commencer dès le troisième jour suivant l'inoculation, ou il peut être retardé jusqu'à 2 semaines.

Tests ELISA pour les virus du bégonia

La sève des plantes est obtenue en faisant macérer des feuilles de bégonia dans un tampon d'extraction à une dilution de 1:12 (1 g de feuilles + 12,5 mL de tampon). Le tampon d'extraction est un tampon 0,2 M PBS avec du Tween, du PVP et de l'ovalbumine, à pH 7,4: 8 g de NaCl, 0,4 g de KH_2PO_4 , 5,8 g de Na_2HPO_4 , 0,2 g de KCl (0,2 g de NaN_3 , pour conservation seulement), 0,05% de Tween 20 (= 500 $\mu\text{L L}^{-1}$), 2% de PVP (= 20 g L^{-1}), 0,2% d'ovalbumine (= 2 g L^{-1}), complété à 1 L en maintenant le pH.

Le test est effectué en utilisant la méthode DAS-ELISA (double-antibody sandwich) ou TAS-ELISA (triple-antibody sandwich). Toutes les autres étapes du test ELISA doivent être effectués conformément aux procédures publiées ou aux instructions accompagnant les réactifs disponibles dans le commerce.

ANNEXE III

Directives pour les tests de détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* dans le schéma de certification

Les symptômes sont de petites taches aqueuses près du bord des feuilles, devenant jaunes ou brunes. Les nervures infectées s'effondrent en général, et dans les infections graves, des feuilles entières flétrissent progressivement et tombent. Les plantes meurent parfois. *X. a. begoniae* peut être détecté par immunofluorescence ou isolement.

Immunofluorescence

Le test est réalisé sur des tiges ou feuilles triturées de bégonia en utilisant la méthode indirecte dans laquelle des anticorps de la bactérie réagissent avec l'échantillon. Des antigènes antilapin, produits dans le commerce et conjugués avec de la fluorescéine isothiocyanate, sont ensuite liés aux anticorps bactériens et sont visibles au microscope à

microscope. The method is also suitable for combined samples. OEPP/EPPO (1990) gives more details on laboratory procedures for the immunofluorescence test.

Isolation

Xanthomonas a. begoniae can be isolated on nutrient dextrose agar or yeast dextrose chalk agar, using fragments cut from surface-sterilized stems or leaves.

APPENDIX IV

Recommended certification standards for begonia

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 a negative result for all pests 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 the tests on the nuclear-stock plant gave negative results for TSWV, INSV and *X. a. begoniae*, and that no symptoms of begonia leaf curl disease were observed. If these conditions are not met at the time of certification inspection, certification should be refused to the plant concerned.

Propagation stock I

Records should show that random tests for TSWV and INSV 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, that the incidence of *X. a. begoniae* in random tests was less than 0.1% infection, and that no symptoms of begonia leaf curl disease were observed. 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

Records should show that any random tests for TSWV and INSV 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, that the incidence of *X. a. begoniae* in random tests was less than 1% infection, and that no symptoms of begonia leaf curl were observed. Visual inspection at certification should show that the

fluorescence. La méthode est aussi valable pour des échantillons mixtes. Pour plus de détails sur les techniques de laboratoire, voir OEPP/EPPO (1990).

Isolement

Xanthomonas a. begoniae peut être isolé sur milieu nutritif dextrose ou milieu levure dextrose calcaire, en utilisant des fragments excisés sur des tiges ou des feuilles stérilisées en surface.

ANNEXE IV

Normes de certification recommandées pour le bégonia

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

Pour toutes les plantes du matériel initial les résultats des contrôles doivent être négatifs pour le TSWV, l'INSV et *X. a. begoniae* et aucun symptôme de begonia leaf curl disease ne doit avoir été observé. Si ces conditions ne sont pas respectées au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée aux plantes concernées.

Stade de propagation I

Les résultats des tests effectués par sondage pour le TSWV et l'INSV doivent être négatifs, ou toutes les plantes du groupe dans lequel l'échantillon a été prélevé (lot entier ou sous-unité) doivent avoir été testées et les plantes infectées éliminées, l'incidence de *X. a. begoniae* dans ces tests doit avoir été inférieure à 0,1% d'infection et aucun symptôme de begonia leaf curl disease ne doit avoir été observé. 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 de tout test effectué par sondage pour le TSWV et l'INSV doivent être négatifs, ou toutes les plantes du groupe dans lequel l'échantillon a été prélevé (lot entier ou sous-unité) doivent avoir été testées et les plantes infectées éliminées, l'incidence de *X. a. begoniae* dans ces tests doit avoir été inférieure à 1% d'infection et aucun symptôme de begonia leaf curl disease ne doit avoir été observé.

Table 2 Recommended tolerance levels at visual inspection of begonia. 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 bégonia. 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
TSWV	0	0
INSV	0	0
Begonia leaf curl disease	0	0
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	0	0
Other virus symptoms/Autres symptômes de virus	0	0
Other pests/Autres organismes nuisibles	Substantially free/Pratiquement indemne	Substantially free/Pratiquement indemne

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.

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.

References/Références

OEPP/EPPO (1990) EPPO Standards PM 3/25. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* – inspection and test methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **20**, 235–254.