

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 4/4(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 lily
Schéma de certification pour le lis

Specific scope

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

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 lis 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 lily 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.

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 lis 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. Selection of candidate nuclear stock

The scheme applies to cultivars of *Lilium* spp. The candidate material may be new cultivars, good-quality material of existing cultivars or meristem-tip cultures of any of these (regenerated cultivars). Material of lily is selected visually from several different stocks. The plants selected should be vigorous, free from virus symptoms, and with good quality, true-to-type flowers which open in the middle of the normal flowering period. In some cases, existing cultivars will need to pass through meristem-tip culture (regeneration) to eliminate *Lily symptomless carlavirus* (LSV). Material imported from outside the EPPO region should be inspected and, if appropriate, tested under quarantine for all EPPO quarantine pests of lily 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.

1. Sélection de plantes candidates au stade initial

Le schéma s'applique aux cultivars de *Lilium* spp. 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). Les lis doivent être sélectionnés visuellement à partir de plusieurs matériels différents. Les plantes sélectionnées doivent être vigoureuses, sans symptômes apparents de viroses, avec des fleurs de bonne qualité, conformes au type et s'épanouissant au milieu de la saison normale de floraison. En général, les cultivars existants seront régénérés par culture de méristème afin d'éliminer le *Lily symptomless carlavirus* (LSV) (régénération). 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 lis présents naturellement dans la région d'origine, et généralement inspecté ou, le cas échéant, testé pour détecter tout autre organisme nuisible.

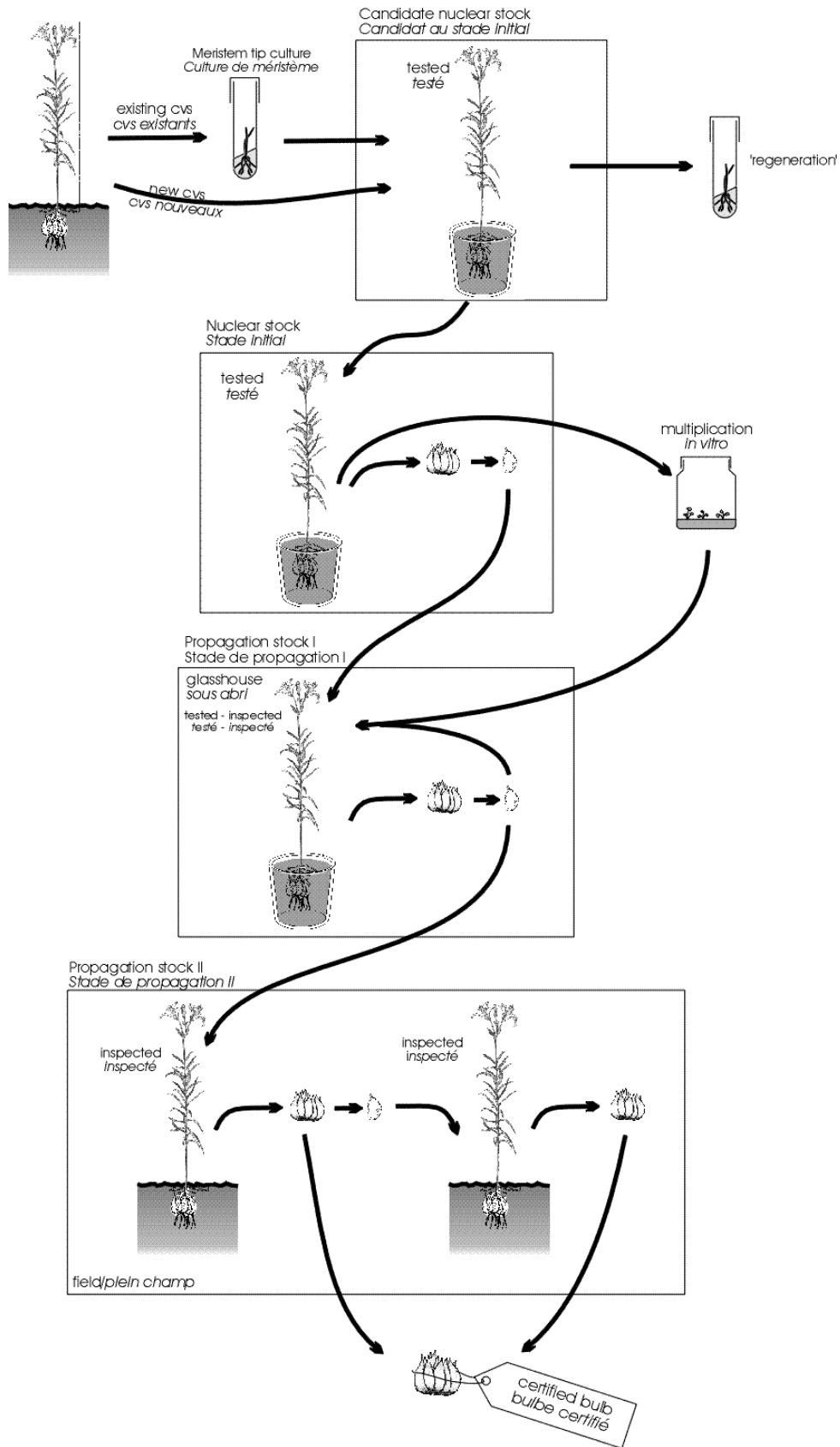


Fig. 1 Diagram of the stages in the lily certification scheme
 Diagramme des stades du schéma de certification du lis

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.

The selected bulbs should be grown in pots in soil-less or sterilized growing medium, avoiding contact between plants and with strict precautions against infection by pests (including pathogens). Adequate control of aphids should be ensured.

2.2 Testing requirements

All plants should be individually tested on three occasions for the following viruses:

- Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV);
- Lily symptomless carlavirus* (LSV);
- Lily X potexvirus* (LVX);
- Lily mottle potyvirus* (LMoV).

Of these viruses, the most severe, causing most difficulties in practice, are the aphid-transmitted viruses, LSV and LMoV. CMV can give very severe symptoms but does not occur very commonly. LVX seldom occurs and causes no symptoms or damage; it is probably disappearing from commercial stocks. The nematode-transmitted viruses *Arabid mosaic nepovirus* (ArMV) and *Tobacco rattle tobnavirus* (TRV), which have a wide host range, occur even less commonly in lily. They can be excluded from certified stocks without too much difficulty. Recommended test methods for viruses are given in Appendix II.

The plants should be visually inspected regularly for these pests and, generally, for others. Any plant found to be infected, by testing or by visual examination, should immediately be eliminated, except in the case of pests which can be adequately controlled.

2.3 Promotion to nuclear stock

The plants that give negative results in all tests and inspections, and which have shown no virus symptoms for more than 1 year, may be used to produce nuclear-stock plants by propagation from bulbs. If no such plants were obtained, vigorous plants from the selected material may be 'regenerated' by meristem-tip culture. The progeny should then pass through the whole above procedure (i.e. three tests, and observation) before it qualifies as nuclear stock. In addition, it should be checked for agronomic and floristic characteristics (quality and trueness to type). Before a plant or any material from it may be transferred to the nuclear-stock conditions, its promotion to nuclear stock 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

Tissue taken from the promoted candidate nuclear stock can be maintained *in vitro* and, in this form, will retain the same status in the

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. Les bulbes sélectionnés doivent être cultivés dans des pots individuels contenant un substrat sans sol ou stérilisé, en évitant le contact entre les plantes et en prenant des précautions strictes afin d'éviter la contamination par les organismes nuisibles (y compris les pathogènes). Des mesures de lutte adéquates doivent être prises contre les virus.

2.2 Exigences relatives aux tests

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

- Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV);
- Lily symptomless carlavirus* (LSV);
- Lily X potexvirus* (LVX);
- Lily mottle potyvirus* (LMoV).

Dans la pratique, les virus causant les principales difficultés sont les virus transmis par les pucerons: LSV et LMoV. Le CMV peut donner des symptômes très graves, mais il n'est pas très courant sur lis. Le LVX est rarement présent et ne provoque ni symptômes, ni dégâts; il est probablement en train de disparaître des cultures commerciales. Les virus transmis par les nématodes, *Arabid mosaic nepovirus* (ArMV) et *Tobacco rattle tobnavirus* (TRV), possèdent une large gamme d'hôtes et sont encore moins souvent présents sur lis. Ils peuvent être éliminés du matériel certifié sans trop de difficulté. Dans la pratique le TRV est le plus important. Les méthodes de test recommandées pour les virus figurent à l'Annexe II.

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.

2.3 Promotion au stade initial

Les plantes qui donnent des résultats négatifs pour tous les tests et inspections, et qui ne présentent pas de symptômes de virus pendant au moins 1 an, peuvent être utilisées pour produire des plantes du stade initial, par multiplication de bulbes. Si de telles plantes n'ont pas pu être obtenues, des plantes vigoureuses appartenant au matériel sélectionné peuvent être régénérées par culture de méristème. La descendance doit ensuite subir l'ensemble de la procédure (c'est-à-dire trois tests et des observations) avant de pouvoir passer au stade initial. De plus, les caractéristiques agronomiques et florales (qualité, authenticité variétale) doivent être contrôlées. Avant qu'une plante, ou tout matériel issu de celle-ci, ne soit transférée dans les conditions du stade initial, sa promotion doit être autorisée par l'organisation officielle, après avoir vérifié que tous les tests et inspections exigés ont été effectués et ont donné des résultats négatifs. Les normes de certification figurent à l'Annexe IV.

3. Maintien du stade initial

3.1 Conditions de culture

Le stade initial peut être maintenu *in vitro* et, sous cette forme, il pourra conserver le même statut dans le schéma. Sinon, des écailles issues des

scheme. Otherwise, scales taken from the candidate nuclear stock when planted become the nuclear stock, which should be kept in a suitably designed aphid-proof house, containing only nuclear-stock plants. The plants should be grown in individual pots in which the growing medium should be soil-free. Official requirements on the spacing between lily bulbs may be made. Nuclear-stock plants should be maintained under the same conditions, and with the same precautions against infection (especially by aphids), 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 bulbs taken from them, to flower. The flowering may need to be done in a different place to avoid risk of infection.

3.2 Testing requirements

The plants should be individually tested once a year for CMV, LSV, LMoV. They should be visually inspected for the presence of any pest. Any plant found to be infected, by testing or by visual examination, should be immediately eliminated, except in the case of pests which can be adequately controlled.

Bulbs taken from nuclear-stock plants can also be considered as nuclear stock, provided that they do not leave the nuclear stock conditions¹ and are individually retested at least for CMV, LSV and LMoV. The same applies to plants transferred from *in vitro* culture to pots; in this case, a careful control of trueness to type is also necessary for each plant/clone.

3.3 Certification

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

4. Propagation stock I (multiplication in the glasshouse)

4.1 Growing conditions

Bulbs taken from the nuclear-stock plants when planted become propagation stock I. For lily, scaling is the method of multiplication in the glasshouse, each bulb being dissected into individual scales, with careful attention being paid to hygiene, disinfection of equipment, incubation conditions and clone identification. The plants should be kept in isolated aphid-proof 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 either in individual containers or in a system of small growing units ensuring adequate isolation. The growing medium should be soil-free. General precautions against pests (especially aphids) should be maintained.

¹They 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.

plantes candidates au stade initial sont plantées et deviennent le stade initial. Celui-ci doit être conservé dans une serre aphid-proof, conçue pour cet usage et ne contenant que des plantes du stade initial. L'espacement entre les bulbes peut être fixé par des exigences officielles. Les plantes du stade initial doivent être placées dans les mêmes conditions de culture et avec les mêmes précautions contre l'infection (en particulier contre les pucerons) 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 bulbes pris sur ces plantes, jusqu'à la floraison. Il peut être nécessaire que la floraison ait lieu à un endroit différent pour éviter le risque d'infection.

3.2 Exigences relatives aux tests

Les plantes doivent être testées individuellement pour le CMV, le LSV et le LMoV. Elles doivent être inspectées visuellement pour détecter la présence de tout 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.

Les bulbes prélevés sur les plantes du stade initial peuvent aussi être considérées comme faisant partie du stade initial, à condition qu'ils ne quittent pas les conditions du stade initial¹ et qu'ils soient retestés individuellement au moins pour le CMV, le LSV et le LMoV. 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 (multiplication en serre)

4.1 Conditions de culture

Lorsque les bulbes prélevés sur des plantes du stade initial sont plantés, ils deviennent le stade de propagation I. Pour le lis, la méthode de multiplication en serre est la bouture d'écailles; pour chaque bulbe, les écailles sont soigneusement prélevées, une par une, en prenant garde aux conditions d'hygiène et de désinfection des outils, aux conditions d'incubation et à l'identification des clones. Les plantes doivent être placées dans des abris isolés, séparément de toute autre plante ne se trouvant pas à un stade équivalent du schéma de certification ou de tout schéma de certification similaire. Elles peuvent être cultivées soit en conteneurs individuels, soit dans un système de petites unités de culture garantissant un bon isolement. Le substrat doit être exempt de sol. Des

¹Elles 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.

Micropropagation is also very suitable for propagating lily (and special certification arrangements will then be needed). Micropropagated material remains at the same stage in the scheme. Since the risk of infection under these conditions is very low, no limit is set on the number of generations of propagation stock I. Throughout the production of propagation stock I, checks should be made on varietal purity and on possible mutations.

4.2 Testing requirements

The growing plants should be randomly tested for LSV and LMoV. The random tests for LMoV should give negative results and infection with LSV should not exceed 1%, otherwise certification should be refused to the group of plants from which the sample was taken. All groups of plants exceeding these tolerances should be eliminated² immediately.

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

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 two or more certification (visual) inspections. The certification inspections are performed during the growing season and on dry bulbs after harvest. 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.

5. Propagation stock II (production of certified bulbs)

5.1 Growing conditions

Bulbs taken from the propagation stock I plants (or plants produced *in vitro* at previous stages) when planted become propagation stock II. This stage is normally conducted in field conditions. General precautions against pests should be maintained. Propagation stock II can be multiplied by scaling. The number of generations in the field depends on the percentage of virus infection. Propagation should stop when testing shows that infection exceeds 10%. Throughout the production of propagation stock II, checks should be made on varietal purity and on possible mutations.

5.2 Testing requirements

The plants should be visually inspected regularly for the presence of any pest. Any plant found to be infected by any pest

²'Eliminated' means removed from propagation stock I conditions to avoid further infection, but such plants may be presented for certification at propagation stock II, if desired.

précautions générales contre les organismes nuisibles (en particulier les pucerons) doivent être maintenues. La micropropagation est aussi possible pour le lis (mais des dispositions particulières sont alors nécessaires pour la certification). Le matériel obtenu ainsi conserve le même stade dans le schéma.

Le risque d'infection dans ces conditions est très faible, et le nombre de générations du stade de propagation I n'est donc pas limité. 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 LSV et le LMoV. Les tests par sondage pour le LMoV et le LVX doivent donner des résultats négatifs et le niveau de contamination par le LSV ne doit pas dépasser 1%, sinon la certification sera refusée au groupe dans lequel l'échantillon a été prélevé. Tous les groupes de plantes dépassant ces tolérances doivent être immédiatement éliminés².

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

Avant qu'une plante ne soit utilisée pour la multiplication 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 au moins deux inspections (visuelles) de certification. Les inspections de certification sont effectuées pendant la période de végétation et sur les bulbes secs après la récolte. 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'.

5. Stade de propagation II (production de bulbes certifiés)

5.1 Conditions de culture

Lorsque les bulbes prélevés sur des plantes du stade de propagation I (ou des plantes produites *in vitro* aux stades précédents) sont plantés, ils deviennent le stade de propagation II. Ce stade est normalement conduit en plein champ. Des précautions générales contre les organismes nuisibles doivent être maintenues. Le stade de propagation II peut être multiplié par boutures d'écaïlles. Le nombre de générations en plein champ dépend du pourcentage d'infection par les virus. La multiplication doit s'arrêter lorsque les tests montrent que l'infection dépasse 10%. 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

L'état des plantes doit être régulièrement contrôlé par inspection visuelle pour détecter la présence d'organismes nuisibles. Toute plante

²'Éliminés' signifie retirés des conditions du stade de propagation I pour éviter toute contamination ultérieure, mais les plantes peuvent être présentées pour être certifiées au stade de propagation II, si on le souhaite.

should be eliminated, except in the case of pests which can be adequately controlled. After harvest, the bulbs should be randomly tested for LSV and LMoV. Infection should not exceed 1% for LMoV and 10% for LSV otherwise certification will be refused to the group of bulbs from which the sample was taken.

5.3 Certification

Bulbs produced from any of the field generations may be certified by the official organization on the basis of records of the tests and observations performed during production and of two or more certification (visual) inspections. The certification inspections are performed on growing plants in the field and on dry bulbs after harvest. Recommended certification standards are given in Appendix IV. By the introduction of stricter standards, higher classes of propagation stock II can be established. Propagating material from propagation stock II leaving the scheme may be labelled as 'certified' material.

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 bulbs 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 lily

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

trouvée contaminée doit être éliminée, sauf dans le cas des organismes nuisibles contre lesquels il existe une lutte efficace.

Après la récolte, les bulbes doivent être testés par sondage pour le LSV et le LMoV. Le niveau d'infection ne doit pas dépasser 1% pour le LMoV, et 10% pour le LSV, sinon la certification sera refusé au groupe de bulbes dans lequel l'échantillon a été prélevé.

5.3 Certification

Les bulbes issus de toute génération en plein champ peuvent être certifiés par l'organisation officielle en se basant sur les documents relatifs aux tests et aux observations réalisés pendant la production et sur au moins deux inspections (visuelles) de certification. Les inspections de certification sont effectuées pendant la période de végétation et sur les bulbes secs après la récolte. Les normes de certification recommandées figurent à l'Annexe IV. Des classes supérieures de stade de propagation II peuvent être établies en introduisant des normes plus strictes. Le matériel de propagation du stade de propagation II qui quitte le schéma peut être appelé 'matériel certifié'.

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 bulbes certifiés 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 lis

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

Table 1 Summary of tests and inspections for lily pests at different stages of the scheme
Résumé des tests et des inspections pour détecter les organismes nuisibles du lis 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 II	Propagation stock II/ Stade de propagation I
CMV	Individual testing on three occasions by ELISA and/or ISEM or biological testing/ Test individuel à trois reprises par ELISA et/ou ISEM ou test biologique	Individual testing once a year by ELISA, and/or ISEM or biological testing/Test individuel une fois par an par ELISA et/ou ISEM, ou test biologique	Visual inspection/ Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle
LSV	Individual testing on three occasions by ELISA and/or ISEM/Test individuel à trois reprises par ELISA et/ou ISEM	Individual testing once a year by ELISA and/or ISEM/Test individuel une fois par an par ELISA et/ou ISEM	Random testing/Test par sondage	Random testing on bulbs/Test par sondage sur les bulbes
LVX	Individual testing on three occasions by ELISA and/or ISEM/Test individuel à trois reprises par ELISA et/ou ISEM	–	–	–
LMoV	Individual testing on three occasions by ELISA and/or ISEM/Test individuel à trois reprises par ELISA et/ou ISEM	Individual testing once a year by ELISA and/or ISEM/Test individuel une fois par an par ELISA et/ou ISEM	Random testing/Test par sondage	Random testing on bulbs/Test par sondage sur les bulbes
Other pests/Autres organismes nuisibles	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle	Visual inspection/ Inspection visuelle	Visual inspection/Inspection visuelle

APPENDIX II

Guidelines for lily viruses in a certification scheme

Procedures for each virus

Cucumber mosaic cucumovirus (CMV)

Symptoms may be absent, but sometimes mosaic or twisted leaves may be seen. CMV is transmitted by aphids. It is best identified by ELISA and/or ISEM in bulbs or leaves of naturally infected hosts or in inoculated indicator plants.

Lily mottle potyvirus (LMoV)

LMoV may cause a mosaic pattern on leaves and flowers. It is transmitted by aphids. Serological procedures (ISEM and ELISA) can be used to detect and identify LMoV in lily, which can also be inoculated to the indicator plant *Lilium formosanum*. ELISA can be used to detect LMoV in bulbs.

Lily symptomless carlavirus (LSV) and Lily X potexvirus (LVX)

LSV causes yield reduction. The leaves of infected plants appear to have wider veins. From July onwards, light green stripes and flecks may appear that turn brown after flowering. LVX causes no symptom. The two viruses are best detected and identified in naturally infected lilies by ELISA and/or ISEM and in inoculated indicator plants. ELISA can be used to detect LSV in bulbs.

ANNEXE II

Directives pour les virus du lis dans le schéma de certification

Procédure pour chaque virus

Cucumber mosaic cucumovirus (CMV)

Le CMV peut ne pas provoquer de symptômes, mais une mosaïque ou des feuilles déformées sont parfois observées. Il est transmis par les pucerons. Il peut être identifié par ELISA et/ou par ISEM sur des bulbes ou les feuilles des hôtes naturellement contaminés, ou par inoculation à des plantes indicatrices.

Lily mottle potyvirus (LMoV)

Le LMoV peut provoquer une mosaïque sur les feuilles et les fleurs. Il est transmis par les pucerons. Des méthodes sérologiques (ISEM et ELISA) peuvent être utilisées pour détecter et identifier le LMoV sur le lis. Il peut aussi être inoculé à la plante indicatrice *Lilium formosanum*. La méthode ELISA peut être utilisée pour détecter le LMoV dans les bulbes.

Lily symptomless carlavirus (LSV) et Lily X potexvirus (LVX)

Le LSV entraîne une réduction du rendement. Les feuilles des plantes infectées semblent avoir des nervures plus larges. A partir de juillet, des bandes et des mouchetures vert clair peuvent apparaître, puis brunir après la floraison. Le LVX ne provoque aucun symptôme. Ces virus peuvent être détectés et identifiés dans les lis naturellement infectés par ELISA et/ou ISEM et sur des plantes indicatrices. La méthode ELISA peut être utilisée pour détecter le LSV dans les bulbes.

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 indicator plants considered most useful are presented in Table 2 and are listed below with brief details on how they should be grown and inoculated. The symptoms obtained are to a certain extent characteristic of the different viruses, but it is recommended in general to use ELISA and/or ISEM to confirm the identification (if necessary). It should not be assumed that only the viruses mentioned give symptoms on the indicators.

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

A 0.03 M phosphate buffer, pH 7.2, containing 2% sodium sulphite, is suitable for extraction of all viruses from lily material. About 10 mL of buffer per g of leaf material should be used. The leaves to be inoculated should be dusted with carborundum powder (400 mesh), then two fingers should be dipped into the inoculum and rubbed over the leaf surface. Inoculation may also be done by means of cotton wool, but this is less sensitive. At least two leaves per plant and one plant per sample should be inoculated. The leaves should be washed with tap water immediately after inoculation and the plants placed, carefully labelled, in a glasshouse at about 20 °C for at least 3 weeks, ensuring that the individual pots are placed so as to prevent any contact between plants.

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

Observation of symptoms on indicator plants

CMV: chlorotic or necrotic local lesions; not systemic on *C. amaranticolor* and *C. quinoa*; severe systemic leaf chlorosis on *C. sativus*; faint chlorotic local lesions; conspicuous systemic chlorosis on

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 jugées les plus utiles figurent au Tableau 2 et sont listées ci-dessous, avec de brèves explications sur le mode de culture et d'inoculation. Dans une certaine mesure, les symptômes obtenus sont caractéristiques des différents virus, mais il est généralement recommandé d'utiliser le test ELISA et/ou l'ISEM pour confirmer l'identification (si nécessaire). Il ne faut pas supposer que seuls les virus mentionnés sont capables de provoquer des symptômes sur les plantes indicatrices.

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). Mettre les plantes dans des pots individuels 3 semaines plus tard. Le stade d'inoculation habituel comporte 4–6 feuilles bien développées (5 semaines après le semis).

Inoculation mécanique

Pour tous les virus, l'extraction peut être réalisée à l'aide d'un tampon phosphate 0,03 M, pH 7,2, contenant 2% de sulfite de sodium. Utiliser environ 10 mL de tampon par g de matériel foliaire. Saupoudrer les feuilles de carborundum (calibre 400). Tremper deux doigts dans l'inoculum et les frotter à la surface des feuilles. L'inoculation peut également être réalisée en utilisant de la ouate, mais cette méthode est moins sensible. Inoculer au moins deux feuilles par plante et une plante par échantillon. Rincer les feuilles à l'eau du robinet immédiatement après l'inoculation. Placer les plantes soigneusement étiquetées dans une serre à 20 °C pendant au moins 3 semaines, en s'assurant que les pots individuels sont disposés de manière à éviter tout contact entre les plantes.

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

Observation des symptômes sur les plantes indicatrices

CMV: lésions locales chlorotiques ou nécrotiques, non systémiques, sur *C. amaranticolor* et *C. quinoa*; sévère chlorose systémique des feuilles sur *C. sativus*; lésions locales légèrement chlorotiques, nette

Indicator/Indicatrice	CMV	LSV	LVX	LMoV
<i>Tulipa gesneriana</i>		+		
<i>Tetragonia expansa</i>			+	
<i>Nicotiana tabacum</i>	+			
<i>Nicotiana glutinosa</i>	+			
<i>Nicotiana clevelandii</i>	+			
<i>Nicotiana benthamiana</i>	+			
<i>Lilium longiflorum</i>		+		
<i>Lilium formosanum</i>				+
<i>Cucumis sativus</i>	+			
<i>Chenopodium quinoa</i>	+			
<i>Chenopodium murale</i>		+		
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	+			

Table 2 Indicator plants suitable for detection of lily viruses
Plantes indicatrices pouvant être utilisées pour la détection des virus du lis

N. benthamiana and *N. tabacum*; chlorotic local lesions, with systemic chlorosis on *N. clevelandii* and *N. glutinosa*.

LVX: few chlorotic local lesions, not systemic, on *C. murale*; chlorotic local lesions and occasional necrotic rings, not systemic, on *T. expansa*.

LMoV: systemic chlorotic mottling on *L. formosanum*.

LSV: curled and chlorotic leaves at less than 15 °C on *L. longiflorum* (necrotic leaf flecking if CMV is also present); dark streaks along outer veins on *T. gesneriana* cv. Clara Butt or Rose Copland.

ELISA testing for lily viruses

ELISA can be performed for LMoV, LVX, LSV and CMV using DAS-ELISA (van Schadewijk, 1986). Antisera for CMV can be obtained from Plant Research International (formerly IPO-DLO) (NL). For other viruses, antisera are produced by the Bulb Research Centre Lisse (NL) and reagent sets can be obtained from the Dutch Flowerbulb Inspection Service. A specific antiserum to detect the lily strain of LMoV is used.

Triturate leaves or bulb scales from lilies in extraction buffer (w/v 1:5), pH 8.3, containing 0.05 M Na₂HPO₄, 0.15 M NaCl, 0.01% Tween 20, using a roller press. Plant extracts are incubated overnight at 6 °C in the test plates. Conjugates are incubated for 2 h at 37 °C in PBS buffer, pH 7.4, containing 0.3% Tween 20 and 0.5% dry skimmed milk powder. All other stages of the ELISA test should be performed according to the published procedures or by following the instructions accompanying the proprietary reagents.

ISEM testing

Standard ISEM procedures (Milne & Luisoni, 1977) are applicable for detection and identification of the viruses in lily and test plants.

APPENDIX III

Hot water treatment

To control nematodes

Nematodes within lily bulbs are killed by holding the temperature in the bulbs at 41 °C for 2 h. This time/temperature regime is critical, and the temperature in particular should preferably not deviate by more than 1°. Pre-treatment storage for 1–2 weeks at 25 °C is advisable to limit damage to the bulbs. Bulbs should then be placed on mesh trays and lowered into a water bath at 41 °C for 2 h. The temperature can be kept constant throughout the bath by insulating the bath, using forced water circulation and ensuring that the bulbs are not touching each other. A small amount of wetter can aid penetration of hot water.

Nematodes on the outside of bulbs, especially those in the resistant, 'eelworm-wool' state, can withstand this time/temperature treatment and therefore formalin (= 40% formaldehyde) should be added to the water at 0.5%.

chlorose systémique, sur *N. benthamiana* et *N. tabacum*; lésions locales chlorotiques, chlorose systémique sur *N. clevelandii* et *N. glutinosa*.

LVX: lésions locales, peu nombreuses, non systémiques, sur *C. murale*; lésions locales chlorotiques et parfois anneaux nécrotiques, non systémiques, sur *T. expansa*.

LMoV: marbrure chlorotique systémique sur *L. formosanum*.

LSV: feuilles enroulées et chlorotiques, à une température inférieure à 15 °C, sur *L. longiflorum* (petites taches nécrotiques sur feuilles si le CMV est aussi présent); stries noirâtres le long des nervures apparentes sur *T. gesneriana* cv. Clara Butt ou Rose Copland.

Test ELISA pour les virus du lis

Les tests ELISA peuvent être effectués pour le LMoV, le LVX, le LSV et le CMV à l'aide de la méthode DAS-ELISA (van Schadewijk, 1986). Des antisérum pour le CMV peuvent être obtenus auprès de Plant Research International (anciennement IPO-DLO) (NL). Pour les autres virus, des antisérum sont produits par le Centre de Recherche de Lisse (NL) et des réactifs peuvent être obtenus auprès du Service néerlandais d'inspection des bulbes à fleurs. Un sérum spécifique est utilisé pour détecter la souche du LMoV attaquant le lis.

Broyer les feuilles ou les écailles de bulbes de lis dans un tampon d'extraction (poids/volume 1:5) à pH 8,3 contenant 0,05 M Na₂HPO₄, 0,15 M NaCl, 0,01% Tween 20, à l'aide d'une presse à rouleaux. Les extraits de plantes sont mis à incuber pendant une nuit à 6 °C dans des plaques de test. Les conjugués sont mis à incuber pendant 2 h à 37 °C dans un tampon PBS, pH 7,4, contenant 0,3% Tween 20 et 0,5% lait en poudre écrémé. Toutes les autres étapes du test ELISA doivent être effectuées conformément aux procédures publiées ou aux instructions accompagnant les réactifs disponibles dans le commerce.

Test ISEM

Les procédures standards pour l'ISEM (Milne & Luisoni, 1977) sont utilisables pour la détection et l'identification des virus des bulbes à fleurs et des plantes tests.

ANNEXE III

Traitement à l'eau chaude

Pour éliminer les nématodes

Les nématodes à l'intérieur des bulbes de lis sont éliminés par une température de 41 °C à l'intérieur du bulbe, maintenue pendant 2 h. Ce régime durée/température est critique, et il faut surtout éviter de déviations de température de plus d'un degré. Un traitement préliminaire, par stockage à 25 °C pendant 1–2 semaines, permet de limiter la détérioration des bulbes. Les bulbes sont ensuite placés sur des plateaux et plongés dans un bain à 41 °C pendant 2 h. La température peut être maintenue constante en isolant le bain, en utilisant une circulation forcée de l'eau et en s'assurant que les bulbes ne se touchent pas. Une petite quantité de mouillant peut faciliter la pénétration de l'eau chaude.

Les nématodes présents à la surface des bulbes, en particulier ceux qui sont dans un état de quiescence, peuvent supporter cette température pendant la durée du traitement, et par conséquent de la formaline à 0,5% (formaldéhyde à 40%) doit être ajoutée dans l'eau.

To control *Rhodococcus fascians*

The same method as above is effective. The temperature in the bulbs should be raised to 41 °C for 2 h. 0.5% Formaldehyde is also used.

Pour éliminer *Rhodococcus fascians*

La méthode est la même que ci-dessus. La température des bulbes doit être portée à 41 °C pendant 2 h. Du formaldéhyde à 0,5% est également utilisé.

APPENDIX IV**Recommended certification standards for lily**

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. 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 viruses in tests performed three times and that no virus symptoms were seen for more than 1 year. The plant should show no symptom of pest attack. If these conditions are not met at the time of the certification inspection, certification should be refused to the plant concerned.

Nuclear stock

Records should show that all tests on the nuclear-stock plant gave negative results for all pests. The plant should show no symptom of pest

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

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. 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 à trois reprises et qu'aucun symptôme de virus n'a été observé pendant plus d'1 an. La plante ne doit pas montrer de symptôme d'attaque par des organismes nuisibles. Si ces conditions ne sont pas respectées au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée aux plantes concernées.

Stade initial

Les résultats doivent montrer que tous les tests effectués sur la plante du stade initial sont négatifs. Aucune plante ne doit présenter des

Table 3 Recommended tolerance levels at visual inspection of propagation stock I and II. 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 des stades de propagation I et II. 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	Growing season inspection/ Inspection pendant la période de végétation	Dry bulb inspection/ Inspection des bulbes secs
Virus symptoms/Symptômes de virus		
At propagation stock I/au stade de propagation I	0	N.a.
At propagation stock II/au stade de propagation II	1.5%	N.a.
<i>Rhizoctonia</i> sp.	If infection is found, dry bulb inspection is required/ si une contamination est trouvée, les bulbes	0*
Other fungi (individually)/	secs doivent être inspectés	1%*
Autres champignons (individuellement)		
Fungi (total)/Champignons (total)		1.5%*
<i>Rhizoglyphus</i> spp.		1%*
<i>Liothrips vaneeckei</i>	N.a.	0
<i>Rhodococcus fascians</i>	0 (or hot water treatment of the bulbs/ ou traitement à l'eau chaude des bulbes)†	0 (or hot water treatment/ou traitement à l'eau chaude)†
Nematodes/Nématodes (<i>Aphelenchoides</i> spp.)	0.1% (or hot water treatment of the bulbs/ ou traitement à l'eau chaude des bulbes)†	1%
Bulb damage/Bulbes endommagés	N.a.	1%
Visible off-types/Non conformes au type	0.5%	0.5%

N.a. Not applicable/Ne s'applique pas.

*Inspection only if infection was found in the growing season inspection/Inspection uniquement si une contamination est trouvée au cours de la période de végétation.

†Appendix III/Annexe III.

attack. If these conditions are not met at the time of the certification inspection, certification should be refused to the plant concerned.

Propagation stock I

Records should show that random tests on growing plants for LMoV gave negative results, while infection by LSV did not exceed 1%. Two visual inspections should be performed for certification, a growing season inspection and a dry-bulb inspection after harvest. In both certification inspections, the incidence of other pests in each lot should not exceed the thresholds in Table 3. If these conditions are not met at the time of certification inspection, certification should be refused to the lots concerned or to the groups of plants from which the random samples were taken.

Propagation stock II

Records should show that random tests by ELISA on bulb samples after harvest show infection by LMoV not exceeding 1%, and by LSV 10%. Two visual inspections should be performed for certification, a growing season inspection and a dry-bulb inspection after harvest. In both certification inspections, the incidence of other pests in each lot should not exceed the thresholds in Table 3. If these conditions are not met at the time of certification inspection, certification should be refused to the lots concerned or to the groups of plants from which the random samples were taken.

References/Références

Milne RG & Luisoni E (1977) Rapid immune electron microscopy of virus preparations. In: *Methods in Virology* (Ed. by K Maramorosch & H Koprowski), Vol. VI, pp. 265–281. Academic Press, New York (US).

symptômes 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 de propagation I

Les résultats des tests par sondage sur les plantes pour le LMoV doivent être négatifs, tandis que le niveau d'infection par le LSV ne doit pas dépasser 1%. Deux inspections visuelles sont réalisées pour la certification, une inspection au cours de la période de végétation et une inspection des bulbes secs après la récolte. Pour les deux inspections de certification, l'incidence des organismes nuisibles dans chaque lot ne doit pas dépasser les seuils du Tableau 3. Si ces conditions ne sont pas respectées au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée aux lots concernés ou aux groupes de plantes dans lesquels les échantillons ont été prélevés.

Propagation stock II

Le niveau d'infection obtenu lors des tests par sondage par ELISA sur des échantillons de bulbes après la récolte ne doit pas dépasser 1% pour le LMoV et 10% pour le LSV. Deux inspections visuelles sont réalisées pour la certification, une pendant la période de végétation et une sur les bulbes secs après la récolte. Pour les deux inspections de certification, l'incidence des autres organismes nuisibles dans chaque lot ne doit pas dépasser pas les seuils du Tableau 3. Si ces conditions ne sont pas respectées au moment de l'inspection de certification, la certification sera refusée aux lots concernés ou aux groupes de plantes dans lesquels les échantillons ont été prélevés.

van Schadewijk AR (1986) Detection of tulip breaking virus and lily symptomless virus in lily bulbs by means of ELISA. *Acta Horticulturae* **177**, 121–128.