393L0085

18.10.93 *EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING* Nr L 259/1

RÅDETS DIREKTIV 93/85/EEG

av den 4 oktober 1993

om bekämpning av ljus ringröta på potatis

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS RÅD HAR ANTAGIT DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen, särskilt artikel 43 i detta,

med beaktande av kommissionens förslag([1]),

med beaktande av Europaparlamentets yttrande([2]),

med beaktande av Ekonomiska och sociala kommitténs yttrande([3]), och

med beaktande av följande:

Potatisproduktionen intar en viktig plats inom gemenskapens jordbruk. Avkastningen hotas ständigt av växtskadegörare.

Genom att skydda potatisodlingarna mot sådana skadegörare skulle inte endast produktionskapaciteten upprätthållas utan jordbruksproduktionen skulle också öka.

Skyddsåtgärder mot införsel av växtskadegörare till en medlemsstats territorium skulle endast ha begränsad effekt om inte sådana skadegörare bekämpades samtidigt och metodiskt i hela gemenskapen och hindrades från att sprida sig.

En av skadegörarna på potatis är *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., den patogen som orsakar ljus ringröta på potatis. Denna sjukdom har förekommit i vissa delar av gemenskapen och det finns ännu några begränsade smittkällor.

Det föreligger en avsevärd risk för potatisodlingar i hela gemenskapen om effektiva åtgärder inte vidtas för att lokalisera denna sjukdom och kartlägga dess utbredning, för att förhindra dess förekomst och spridning och, om den konstateras, för att förhindra dess spridning och för att bekämpa den i syfte att utrota den.

För att säkerställa detta måste vissa åtgärder vidtas inom gemenskapen. Medlemsstaterna måste dessutom om nödvändigt kunna vidta ytterligare eller strängare åtgärder, förutsatt att dessa inte skapar andra hinder för handeln med potatis inom gemenskapen än de som fastställs i rådets direktiv 77/93/EEG av den 21 december 1976 om skyddsåtgärder mot att skadegörare på växter eller växtprodukter förs in till medlemsstaterna([4]). Sådana åtgärder måste anmälas till de andra medlemsstaterna och till kommissionen.

I rådets direktiv 80/665/EEG av den 24 juni 1980 om bekämpning av ljus ringröta på potatis([5]) fastställs minimiåtgärder som medlemsstaterna skall vidta mot ljus ringröta.

Sedan dess har en betydande utveckling skett angående förståelsen av ljus ringröta och upptäckten av den patogen som förorsakar ljus ringröta på potatis.

Tillämpningen av gemenskapens växtskyddsordning på gemenskapen som ett område utan inre gränser har påkallat en ny genomgång och omarbetning av vissa bestämmelser i direktiv 80/665/EEG.

Denna genomgång har visat att bestämmelserna i direktiv 80/665/EEG är otillräckliga och att det är nödvändigt att ytterligare specificera de åtgärder som skall vidtas.

Under dessa omständigheter bör direktiv 80/665/EEG upphöra att gälla och nödvändiga åtgärder vidtas.

Åtgärderna måste för det första ta hänsyn till att sjukdomen kan vara latent utan synliga symptom både hos den växande grödan och i lagrade knölar, och kan således förebyggas effektivt endast genom produktion och användning av utsädespotatis som är fri från smitta, och för det andra till att systematiska officiella undersökningar är nödvändiga för att lokalisera den. Spridningen av patogenen mellan knölar under tillväxten är inte den viktigaste faktorn, men patogenen kan övervintra i kvarglämnade knölar och dessa är den huvudsakliga smittkällan då de för över smittan från en odlingssäson till nästa. Patogenen sprids huvudsakligen genom nedsmittning av potatis vid kontakt med angripen potatis och vid kontakt med utrustning för sättning, upptagning och hantering eller med transport- och lagringsbehållare som har nedsmittats av patogenen vid tidigare kontakt med angripen potatis. Sådana nedsmittade föremål kan bära på smitta en tid efter nedsmittningen. Spridningen av patogenen kan minskas eller förhindras genom desinfektion av sådana föremål. Varje nedsmittning av utsädespotatis innebär en stor risk att patogenen sprids.

([1]) EGT nr C 93, 2.4.1993, s. 12.
([2]) EGT nr C 176, 28.6.1993, s. 210.
([3]) EGT nr C 161, 14.6.1993, s. 18.
([4]) EGT nr L 26, 31.1.1977, s. 20. Direktiv senast ändrat genom kommissionens direktiv 92/103/EEG (EGT nr L 363, 11.12.1992, s. 1).
([5]) EGT nr L 180, 14.7.1980, s. 30.

För att kunna bestämma vilka allmänna åtgärder som skall vidtas liksom för de strängare eller ytterligare åtgärder som medlemsstaterna vidtar för att förhindra införsel av patogenen till sitt territorium, är det önskvärt att medlemsstaterna har ett nära samarbete med kommissionen inom Ständiga kommittén för fytosanitära frågor, nedan kallad "kommittén".

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Detta direktiv rör de åtgärder som skall vidtas i medlemsstaterna mot den organism som orsakar ljus ringröta på potatis, *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., nedan kallad "skadegöraren", för att

a) lokalisera den och kartlägga dess utbredning,

b) förhindra dess förekomst och spridning,

och

c) om den konstateras, förhindra dess spridning och bekämpa den i syfte att utrota den.

Artikel 2

1. Medlemsstaterna skall utföra systematiska officiella undersökningar avseende skadegöraren på knölar och i tillämpliga fall på potatisplantor (*Solanum tuberosum L.*) med ursprung på deras territorium för att bekräfta att skadegöraren inte förekommer där.

Vid dessa undersökningar skall, vad avser knölar, stickprov tas både av utsädespotatis och annan potatis, helst av partier i lager, och de skall underkastas en officiell eller en officiellt övervakad laboratorieundersökning enligt den metod som avses i bilaga 1 för att upptäcka och diagnosticera skadegöraren. I tillämpliga fall kan dessutom en officiell eller officiellt övervakad visuell inspektion utföras på andra prover genom att knölarna skärs i delar.

Då det gäller plantor, skall dessa undersökningar genomföras enligt lämpliga metoder och på stickproven skall det utföras lämpliga officiella eller officiellt övervakade undersökningar.

Provernas antal, ursprung och stratifiering samt tidpunkt för deras insamlande skall beslutas av de ansvariga officiella organen i enlighet med direktiv 77/93/EEG på grundval av sunda vetenskapliga och statistiska principer och skadegörarens biologi, och med hänsyn till de särskilda system för potatisproduktion som de berörda medlemsstaterna har. Ovannämnda uppgifter skall årligen meddelas till de andra medlemsstaterna och till kommissionen för att säkerställa att alla medlemsstater med samma säkerhet bekräftar att skadegöraren inte förekommer på deras territorium.

2. Resultaten av de officiella undersökningar som fastställs i punkt 1 skall anmälas till de andra medlemsstaterna och till kommissionen minst en gång per år. Innehållet i denna anmälan skall vara konfidentiellt. Den kan överlämnas till kommittén i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG.

3. Följande bestämmelser får fastställas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG:

— Innehållet i de undersökningar som fastställs i punkt 1 ovan och som skall utföras enligt sunda vetenskapliga och statistiska principer.

— Innehållet i den anmälan som fastställs i punkt 2 ovan.

4. Följande bestämmelse skall fastställas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG:

— De metoder som är lämpliga för de undersökningar som fastställs i tredje stycket i punkt 1 ovan.

Artikel 3

Medlemsstaterna skall säkerställa att den misstänkta förekomsten eller bekräftade närvaron av skadegöraren på potatisplantor och knölar, eller på skördade, lagrade eller salufördа knölar på deras territorium rapporteras till deras egna ansvariga officiella organ.

Artikel 4

1. Då det föreligger misstanke om att skadegöraren förekommer, skall de ansvariga officiella organen i den medlemsstat där förekomsten har rapporterats säkerställa att officiella eller officiellt övervakade laboratorieundersökningar utförs enligt den metod som anges i bilaga 1 och enligt de villkor som anges i bilaga 2.1 för att bekräfta eller vederlägga den misstänkta förekomsten. I det förstnämnda fallet skall de krav som fastställs bilaga 2.2 tillämpas.

2. I avvaktan på bekräftelse eller vederläggande av misstänkt förekomst såsom avses i punkt 1, skall medlemsstaternas ansvariga officiella organ i de fall av misstänkt förekomst där

i) det antingen har konstaterats misstänkta synliga symptom,

eller

ii) ett positivt immunofluorescencetest enligt bilaga 1 eller ett annat lämpligt test med positivt resultat har gjorts

a) förbjuda flyttning av alla partier eller sändningar från vilka stickproven har tagits, förutom då det sker under deras övervakning och förutsatt att det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas,

b) vidta åtgärder för att spåra den misstänkta förekomstens ursprung,

c) införa ytterligare lämpliga försiktighetsåtgärder på grundval av hur stor risken bedöms vara, för att förhindra

all spridning av skadegöraren. Dessa åtgärder får inbegripa officiell övervakning av alla andra knölars eller plantors flyttning inom eller utom det område som berörs av den misstänkta förekomsten.

3. Följande bestämmelse får fastställas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG:

— De åtgärder som avses i punkt 2. c ovan.

4. Följande bestämmelse skall fastställas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG:

— Det andra lämpliga test som fastställs i punkt 2 ii ovan.

Artikel 5

1. Om en officiell eller officiellt övervakad laboratorieundersökning enligt den metod som avses i bilaga 1 bekräftar närvaron av skadegöraren i ett stickprov av knölar, plantor, eller delar av plantor, skall de ansvariga officiella organen i en medlemsstat med hänsyn till sunda vetenskapliga principer, skadegörarens biologi och de särskilda systemen för produktion, saluföring och bearbetning i den medlemsstaten

a) förklara följande för nedsmittade: knölarna eller plantorna, sändningen eller partiet, och maskinerna, fordonet, fartyget, lagret, eller delar av dessa, och alla andra föremål, inklusive förpackningsmaterialet, från vilka stickprovet togs och, i de fall då det är lämpligt, produktionsplatsen eller -platserna och fältet eller fälten från vilka knölar eller plantor hade skördats,

b) med beaktande av bestämmelserna i bilaga 3.1, bestämma omfattningen av trolig nedsmittning genom kontakt före eller efter skörden eller genom produktionsmässig anknytning till den angivna nedsmittningen,

c) avgränsa ett område på grundval av förklaringen om nedsmittning enligt a, bestämma omfattningen av den troliga nedsmittningen enligt b och skadegörarens möjliga spridning, med beaktande av bestämmelserna i bilaga 3.2.

2. Medlemsstaterna skall, i enlighet med bestämmelserna i bilaga 3.3, omedelbart anmäla till de andra medlemsstaterna och till kommissionen om eventuell nedsmittning enligt punkt 1 a och om det avgränsade området enligt punkt 1 c.

Uppgifterna i denna anmälan skall vara konfidentiella. De kan lämnas till kommittén i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG.

3. Till följd av den anmälan som avses i punkt 2 och de element som nämns där, skall andra medlemsstater som anges i anmälan, om lämpligt avge en förklaring om nedsmittning, bestämma omfattningen av den troliga nedsmittningen och avgränsa ett område i enlighet med punkt 1 a–c.

Artikel 6

Medlemsstaterna skall föreskriva att om knölar eller plantor har förklarats vara nedsmittade enligt artikel 5.1 a skall potatispartier ur kloner som är närbesläktade med de som berörs av nedsmittningen undersökas enligt artikel 4.1. Undersökningarna skall utföras på så många knölar eller plantor som är nödvändigt för att fastställs den troliga primära smittkällan och omfattningen av den troliga nedsmittningen, helst efter avtagande smittorisk.

Till följd av testerna skall vid behov en förklaring om nedsmittning avges, omfattningen av den troliga nedsmittningen bestämmas och ett område avgränsas på nytt i enlighet med artikel 5.1 a–c.

Artikel 7

1. Medlemsstaterna skall föreskriva att knölar eller plantor, som har förklarats vara nedsmittade enligt artikel 5.1 a inte får sättas och att de under deras ansvariga officiella organs tillsyn skall

— förstöras,

eller

— på annat sätt undanröjas inom ramen för en eller flera åtgärder under officiell kontroll i enlighet med bilaga 4.1, förutsatt att det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas.

2. Medlemsstaterna skall föreskriva att knölar och plantor som har förklarats som troligen smittade enligt artikel 5.1 b, inte får sättas och att de, utan att det påverkar resultatet av de tester som avses i artikel 6 för potatispartier ur närbesläktade kloner, skall på lämpligt sätt användas eller undanröjas under tillsyn av deras ansvariga officiella organ, enligt vad som specificeras i bilaga 4.2, på ett sådant sätt att det är säkerställt att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas.

3. Medlemsstaterna skall föreskriva att alla maskiner, fordon, fartyg, lager, eller delar av dessa, och alla andra föremål inklusive förpackningsmaterial som har förklarats som nedsmittade enligt artikel 5.1 a eller som har förklarats som troligen nedsmittade enligt artikel 5.1 b antingen skall förstöras eller rengöras och desinficeras med lämpliga metoder som specificeras i bilaga 4.3. Efter desinfektion skall inga sådana föremål längre anses vara nedsmittade.

4. Utan att det påverkar tillämpningen av de åtgärder som införs i punkt 1–3 skall medlemsstaterna föreskriva att i det område som avgränsas enligt artikel 5.1 c skall ett antal åtgärder vidtas enligt bilaga 4.4.

Artikel 8

1. Medlemsstaterna skall föreskriva att utsädespotatis skall uppfylla kraven i direktiv 77/93/EEG och skall härstamma i direkt led från material som har erhållits genom ett officiellt godkänt program och som har befunnits vara frittfrån skadegöraren vid officiella eller officiellt övervakade tester enligt den metod som avses i bilaga 1.

Ovan nämnda tester skall utföras:

— på plantorna i det ursprungliga klonurvalet, i de fall då nedsmittningen påverkar produktionen av utsädespotatis,

— antingen på plantorna i det ursprungliga klonurvalet eller på representativa stickprov av basutsädespotatis eller av tidigare potatisgenerationer.

2. Följande bestämmelser får fastställas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG:

— De närmare tillämpningsföreskrifterna i punkt 1 andra stycket första strecksatsen i denna artikel.

— De bestämmelser avseende representativa stickprov som fastställs i punkt 1 andra stycket andra strecksatsen i denna artikel.

Artikel 9

Medlemsstaterna skall förbjuda innehav och hantering av skadegöraren.

Artikel 10

Utan att det påverkar tillämpningen av bestämmelserna i direktiv 77/93/EEG får medlemsstaterna tillåta undantag från de åtgärder som avses i artiklarna 6, 7 och 9 i det här direktivet i experimentellt eller vetenskapligt syfte och för växtförädling, förutsatt att sådana undantag inte påverkar bekämpningen av skadegöraren och inte skapar någon risk för spridning av den.

Artikel 11

Medlemsstaterna får besluta om de ytterligare eller strängare åtgärder som kan krävas för att bekämpa skadegöraren eller för att förhindra att den sprids, så till vida som de är förenliga med bestämmelserna i direktiv 77/93/EEG.

De ytterligare åtgärder som avses i första stycket får inbegripa bestämmelser om att endast sådan utsädespotatis får användas som antingen är officiellt certifierad eller som i en officiell kontroll visat sig uppfylla fastställda sundhetskrav. Det sist nämnda kan komma i fråga i synnerhet då en jordbrukare har tillstånd att i sitt eget jordbruksföretag använda utsädespotatis som de har erhållit från sin egen skörd och i andra fall då egen producerad utsädespotatis används.

De andra medlemsstaterna och kommissionen skall meddelas om åtgärderna.

Artikel 12

Ändringar till bilagorna i detta direktiv till följd av utvecklingen av det vetenskapliga eller tekniska kunnandet skall beslutas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG.

Artikel 13

1. Senast den 15 november 1993 skall medlemsstaterna fastställa och publicera de bestämmelser som är nödvändiga för att följa detta direktiv. De skall omedelbart informera kommissionen om detta.

När en medlemsstat antar dessa bestämmelser skall de innehålla en hänvisning till detta direktiv eller åtföljas av en sådan hänvisning när de offentliggörs. Närmare föreskrifter om hur hänvisningen skall göras skall varje medlemsstat själv utfärda.

Medlemsstaterna skall tillämpa dessa bestämmelser från och med den 16 november 1993.

2. Medlemsstaterna skall omedelbart meddela kommissionen de bestämmelser i nationell lagstiftning som de antar inom det område som omfattas av detta direktiv. Kommissionen skall meddela de andra medlemsstaterna om detta.

Artikel 14

Direktiv 80/665/EEG skall upphöra att gälla från och med den 16 november 1993.

Artikel 15

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Luxemburg den 4 oktober 1993.

På rådets vägnar

W. CLAES

Ordförande

BILAGA 1

METOD FÖR ATT UPPTÄCKA OCH DIAGNOSTICERA DEN BAKTERIE SOM ORSAKAR LJUS RINGRÖTA, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (SMITH) DAVIS ET AL. SSP. *SEPEDONICUS* (SPIECKERMANN ET KOTTHOF) DAVIS ET AL. I PARTIER MED POTATISKNÖLAR

1. Uttagning av prover från naveländarna

1.1. Tvätta 200 knölar under rinnande kranvatten och avlägsna epidermis runt naveländan av varje knöl med en skalpell eller potatisskalare som desinficeras regelbundet; desinficeringen kan göras genom att doppa skalaren i 70- procentig etanol innan man flamberar den.

1.2. Avlägsna försiktigt koniska vävnadsbitar från naveländarna med en kniv eller en potatisskalare. Försök att få med så lite icke-vaskulär vävnad som möjligt. Efter uttagningen bör naveländarna bearbetas inom 24 timmar (se punkt 3) eller förvaras i – 20 °C i högst två veckor.

2. Visuell undersökning avseende symptom på ringröta

Efter att provbitarna har avlägsnats, skär igenom varje knöl på tvären och iakttag knölen efter symptom på ringröta.

Pressa knölarna och observera om upplöst vävnad pressas fram ur kärlringsvävnaden.

De första symptomen är lätt glasaktighet eller genomskinlighet hos vävnaden, utan att området runt kärlringen har mjukats upp, särskilt nära naveländan. Kärlringen vid naveländan kan vara en aning mörkare än normalt. Det första klart identifierbara symptomet är att kärlringen har en gulaktig färg och då knölen pressas försiktigt tränger strängar av ostliknande material fram ur kärlringen. Denna utsöndring innehåller miljontals bakterier. På detta stadium kan den kärlringsvävnaden bli brunaktig. Först kan dessa symptom begränsas till en del av ringen, inte nödvändigtvis nära naveländan, och de kan gradvis breda ut sig till hela ringen. Då infektionen fortsätter, förstörs kärlringen; yttre cortex kan skiljas från inre cortex. I ett framskridet stadium av infektionen uppträder sprickor på ytan av knölen, dessa är ofta rödbruna vid kanterna. Sekundära angrepp av svampar eller bakterier kan dölja symptomen och det kan vara svårt, t.o.m. omöjligt, att skilja symptom på framskriden ringröta från andra former av röta hos knölar.

3. Preparering av prover för Gramfärgning, färgning med immunofluorescensteknik och äggplanttest

3.1. Homogenisera naveländarna, tills de nätt och jämnt är upplösta, i en buffert som är ogiftig för *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (t.ex. 0,05 M fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS) pH 7,0) vid en temperatur som är lägre än 30 °C; det är tillrådligt att tillsätta ett ogiftigt deflockulerande medel och ett ogiftigt antiskummedel kan behövas (appendixerna 1 och 2). Onödig sönderdelning bör undvikas.

3.2. Skilj ut bakterier från blandningen med en av följande metoder(1):

A. a) Centrifugera med högst 180 g i 10 minuter.

b) Centrifugera supernatanten med minst 4 000 g i 10 minuter. Dekantera och kasta bort supernatanten.

B. a) Låt det uppblötta materialet stå i 30 minuter så att det nedbrutna vävnadsmaterialet kan lägga sig. Dekantera det ovanpåflytande lagret utan att vävnadsmaterialet rörs upp.

b) Filtrera supernatanten genom filterpapper (Whatman nr 1) som placeras i en glasfiltertratt (nr 2 = 40—100 µm) med hjälp av en vattenvakuumpump. Samla filtratet i ett centrifugrör. Tvätta filtret med steril fosfatbuffrad koksaltlösning så att en filtratvolym på maximalt 35 ml erhålls.

c) Centrifugera filtratet med minst 4 000 g i 20 minuter.

3.3. Uppslamma det koncentrerade extraktet i steril 0,01 M fosfatbuffert pH 7,2 (appendix 2) så att den totala volymen blir ungefär 1 ml. Dela detta i två lika stora delar och förvara den ena delen i referenssyfte genom att frysa ned den vid – 20 °C(2) eller genom att frystorka den. Dela den andra delen i två halvor och använd den ena halvan för immunofluorescenstest och Gramfärgning och det andra för äggplanttest.

3.4. Det är absolut nödvändigt att alla positiva kontroller och prover rörande *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* hanteras skilda från varandra för att undvika nedsmittning. Detta gäller även för IF-glas och äggplanttest.

(1) En alternativ metod för att skilja ut bakterier ges av Dinesen, 1984.

(2) Det har bevisats (Janse och Van Vaerenberg, 1987) att nedfrysning kan nedsätta livskraften hos *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Detta problem kan undvikas om torrsubstans läggs i 10-procentig glycerol.

4. **Gramfärgning**

4.1. Förbered Gramfärgning för alla utspädningar av det koncentrerade extraktet (5.2.1) och för alla genomskurna knölar (2) som visar tecken på glasaktighet, förruttnelse eller andra misstänkta symptom. Prover bör tas från kanten av den sjuka vävnaden.

4.2. Förbered Gramfärgning för kända odlingar av *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* och om möjligt för vävnad som har infekterats på naturligt sätt (5.1).

4.3. Avgör vilka prover som innehåller typiska Grampositiva coryneforma celler. I allmänhet är celler av *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* 0,8 till 1,2 µm långa och 0,4 till 0,06 µm breda.

Ett lämpligt sätt att förfara vid färgningen anges i appendix 3.

Preparat från naturliga angrepp eller nyligen isolerade odlingar uppvisar ofta en dominans av kockoida stavar, vilka vanligtvis är en aning mindre än celler från andra agarodlingar. På de flesta odlingssubstrat är *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* pleomorfa coryneforma stavar och kan ge en variabel Gramreaktion. Cellerna uppträder ensamma, parvis med karaktäristiska "armbågar" som är typiskt böjliga, och ibland i oregelbundna grupper som ofta hänvisas till som palissader och kinesiska bokstäver.

5. **Metoder för immunofluorescenstest**

5.1. Använd ett antiserum på en känd stam av *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* — ATCC 33113 (NCPPB 2137), eller NCPPB 2140. Detta bör ha en immunofluorescenstiter som är större än 1:600. Ta med en kontroll med fosfatbuffrad koksaltlösning på provglaset för att bestämma om fluorescein isothiocyanat anti-kanin immunoglobulin konjugatet (FITC) binds icke-specifikt till bakterieceller. *Clavibacter michiganensis* spp. *sepedonicus* (ATCC 33113 (NCPPB 2137), NCPPB 2140) bör användas som homologa antigen kontroller på ett särskilt glas. Naturligt angripen vävnad (som har bevarats genom frystorkning eller nedfrysning vid – 20 °C) bör då det är möjligt användas som en liknande kontroll på samma glas (figur 2).

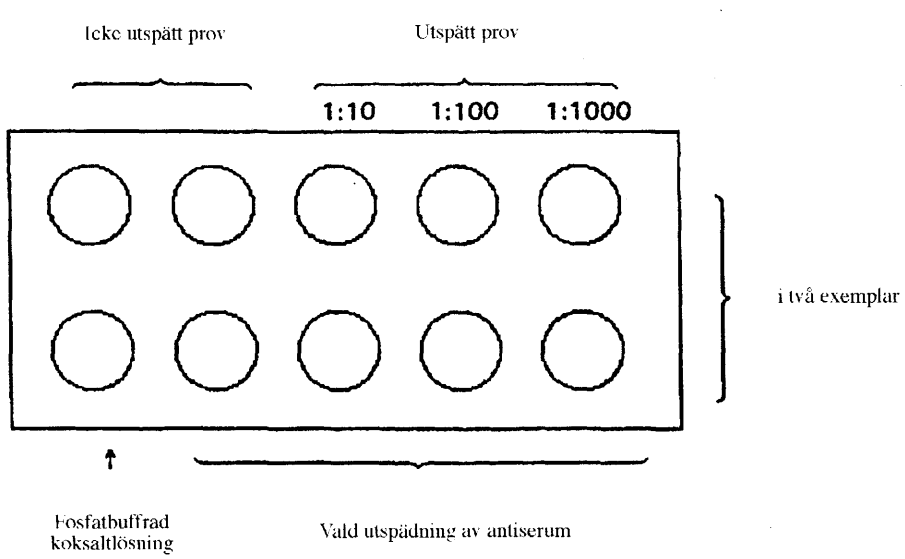
5.2. *Utförande*

5.2.1. Förbered tre serier av utspädningar, där förhållandet är en exponentiell serie av 10 (10^1, 10^2, 10^3), av det slutliga koncentrerade extraktet i destillerat vatten (figur 1).

5.2.2. Med pipett droppas en uppmätt standardvolym, som är tillräcklig för att täcka ett fönster (ca. 25 µl), av varje suspension eller *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* lösning (ca. 10^6 celler/ml) i fönstren på ett objektglas med flera fönster, s.k. multispotglas enligt figur 1.

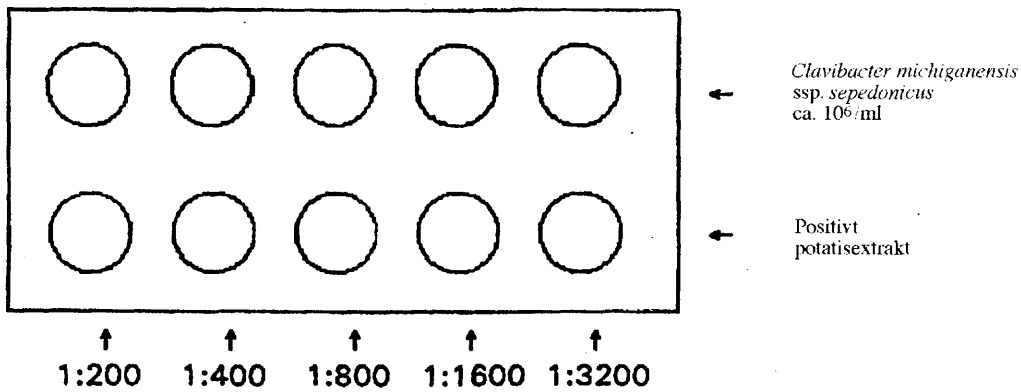
Figur 1

Glas med prover och fosfatbuffrad koksaltlösningskontroll



Figur 2

Glas för positiv kontroll



5.2.3. Låt lufttorka vid 37 °C och bind med 95–procentig etanol eller genom flambering.

5.2.4. Täck de lämpliga fönstren enligt figur 1 med *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* antiserum utspätt enligt rekommenderade proportioner, 0,01 M fosfatbuffrad koksaltlösning pH 7,2 (appendix 2). (Använd fosfatbuffrad koksaltlösning till FITC kontrollen. Antiserumets arbetsutspädning bör vara ungefär hälften av immunofluorescenstitern. Om andra antiserumutspädningar skall inbegripas, bör skilda glas förberedas för varje utspädning som skall användas.

5.2.5. Inkubera i en fuktig kammare vid den omgivande temperaturen i 30 minuter.

5.2.6. Skölj noggrant med 0,01 M fosfatbuffrad koksaltlösning pH 7,2. Tvätta i fem minuter i tre omgångar med 0,01 M fosfatbuffrad koksaltlösning pH 7,2.

5.2.7. Avlägsna försiktigt överflödig vätska.

5.2.8. Täck varje fönster med FITC konjugat med samma utspädning som användes för att bestämma titer och inkubera i en mörk fuktig kammare vid omgivande temperatur i 30 minuter.

5.2.9. Skölj och tvätta som ovan.

5.2.10. Anbringa ca. 5–10 µl 0,1 M fosfatbuffrat glycerin pH 7,6 (eller ett liknande preparat med ett pH på minst 7,6) på varje fönster och täck med ett täckglas (appendix 2).

5.2.11. Undersök med ett mikroskop som är utrustat med en epifluorescerande ljuskälla och filter som är lämpliga för att arbeta med FITC. En förstoring på 400 till 1 000 är lämplig. Genomsök varje fönster och dess upprepning längs två vinkelräta diametrar och genom att följa fönstrens omkrets.

Sök efter fluorescerande celler i de positiva kontrollerna och bestäm titern. Sök efter fluorescerande celler i kontrollfönstret med FITC/fosfatbuffrad koksaltlösning och, om det inte finns några, gå vidare till fönstren med prover. Bestäm medeltalet av morfologiskt typiska fluorescerande celler per fält i minst 10 mikroskopfält och beräkna antalet per ml koncentrerat extrakt (appendix 4).

Immunofluorescenstest medför flera problem.

— Bestånd av fluorescerande celler med atypisk morfologi och korsreagerande saprofytiska bakterier som har en liknande storlek och morfologi som *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* kan förekomma i potatisvävnad. Endast fluorescerande celler med typisk storlek och morfologi tas i beaktande.

På grund av möjligheten för korsreaktion, bör prover från ett positivt immunofluorescenstest kontrolleras på nytt med ett annat antiserum.

— Den tekniska gränsen för upptäckt med denna metod går vid mellan 10^3 och 10^4 celler per ml koncentrerat extrakt. Prover i vilka de typiska fluorescerande cellernas antal ligger nära gränsen för upptäckt är vanligtvis negativa för *C. m.* ssp. *sepedonicus* men kan underkastas äggplanttest.

Ett immunofluorescenstest skall anses vara negativt då inga morfologiskt typiska fluorescerande celler har upptäckts. Proverna skall betraktas som "icke nedsmittade" med *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Äggplanttest behövs inte.

Immunofluorescenstestet fastställs som positivt för alla prover där morfologiskt typiska fluorescerande celler hittas.

Prover för vilka ett positivt immunofluorescenstest har fastslagits med båda antiserumen skall betraktas som "potentiellt nedsmittade" med *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Äggplanttest krävs för alla prover som betraktas som potentiellt nedsmittade.

6 Äggplanttest

För detaljer angående odling se appendix 5.

6.1. Fördela det koncentrerade extraktet från punkt 3.3 mellan minst 25 äggplantor på bladstadium 3 (appendix 5) med hjälp av en av de metoder som anges nedan (6.2, 6.3 eller 6.4).

6.2 *Inympning genom skåra I*

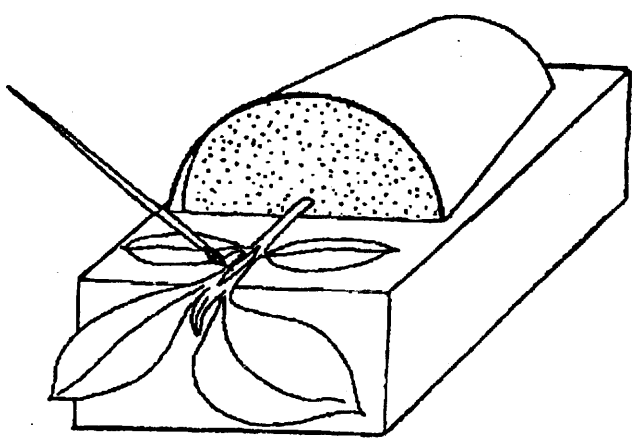
6.2.1. Placera varje enskild kruka horisontellt (ett block av polystyren ur vars ena yta en 5 cm djup × 10 cm bred × 15 cm lång bit har avlägsnats (figur 3) är tillräckligt stort för en kruka på 10 cm). En remsa av steril aluminium folie bör placeras mellan stjälken och blocket för varje exemplar som testas. Plantan kan hållas på plats med ett gummiband runt krukan.

6.2.2. Med en skalpell görs en längsgående eller lätt diagonal skåra 0,5–1,0 cm lång och ungefär lika djup som tre fjärdedelar av stjälkens diameter, mellan hjärtbladen och det första bladet.

6.2.3. Håll skåran öppen med udden på skalpellen och pensla den med det material som skall inympas med hjälp av en eyeliner eller en fin konstnärspensel som är doppad i det koncentrerade extraktet. Fördela det kvarvarande extraktet mellan äggplantorna.

6.2.4. Förslut skåran med sterilt vaselin från en 2 ml spruta.

Figur 3



6.3 *Inympning genom skåra II*

6.3.1. Håll plantan mellan två fingrar, droppa med hjälp av en pipett en droppe (ca. 5–10 µl) av det uppslammade koncentrerade extraktet på stjälken mellan hjärtbladen och det första bladet.

6.3.2. Med en steril skalpell görs en diagonal skåra (i ungefär 5° vinkel) 1,0 cm lång och ungefär lika djup som två tredjedelar av stjälkens diameter med början vid droppen med det koncentrerade extraktet.

6.3.3. Förslut skåran med sterilt vaselin från en spruta.

6.4 *Inympning med en spruta*

6.4.1. Undvik att vattna äggplantorna en dag före ympningen för att minska saftspänningen.

6.4.2. Inokulera äggplantornas stjälkar just ovanför hjärtbladen med en spruta som är försedd med injektionsnål (minst 23 G). Fördela det koncentrerade extraktet mellan äggplantorna.

6.5. Inokulera 25 plantor med en känd *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* kultur och, om det är möjligt, med naturligt angripen knölvävnad (5.1) med samma inokuleringsmetod (6.2, 6.3 eller 6.4).

6.6. Inokulera 25 plantor med steril 0,05 M fosfatbuffrad koksaltlösning med samma inokuleringsmetod (6.2, 6.3 eller 6.4).

6.7. Inkubera plantorna under lämpliga förhållanden (appendix 5) i 40 dagar. Efter åtta dagar undersöks plantorna på vanligt sätt med avseende på symptom. Räkna antalet plantor som uppvisar symptom. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* orsakar vissnade blad hos äggplantor och detta kan börja som slapphet längs kanterna eller mellan nerverna. Vissnad vävnad kan till en början se mörkgrön eller fläckig ut, men bleknar innan den blir nekrotisk. Vissnade områden mellan bladnerverna ser ofta feta och vattenfyllda ut. Nekrotisk vävnad har ofta en klart gul kant. Plantorna dör nödvändigtvis inte; ju längre tid som går innan symptomen visar sig, desto större är chansen för överlevnad. Plantorna kan växa ifrån angreppet. Mottagliga unga äggplantor är mycket känsligare för små populationer av *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* än äldre plantor, därför är det nödvändigt att använda plantor på eller lite före bladstadium 3.

Vissnandet kan också orsakas av andra bakterie– eller svamppopulationer som finns i det koncentrerade extraktet av knölarnas vävnad. Dessa kan utgöras av bl.a. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* och *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata* och stora bestånd av saprofytiska bakterier. Det vissnande som orsakas av dessa kan skiljas från det vissnande som orsakas av *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* eftersom hela blad eller hela plantor vissnar snabbt.

6.8. Preparera Gramfärgning (4) för alla partier med äggplantor som uppvisar symptom och använd delar av vissnad bladvävnad och stjälkvävnad från plantor och isolera proverna på egna lämpliga näringssubstrat (7). Desinficera ytan på äggplantornas blad och stjälkar genom att torka av dem med 70–procentig etanol.

6.9. Under vissa omständigheter, i synnerhet då tillväxtförhållandena inte är optimala, är det möjligt för *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* att existera som en latent infektion i äggplantorna t.o.m. efter inkubation under 40 dagar. Sådana infektioner kan resultera i hämmad tillväxt och avsaknad av livskraft hos de inokulerade plantorna. Om immunofluorescenstestet anses vara positivt, kan det vara nödvändigt med vidare undersökningar. Det är därför väsentligt att jämföra tillväxttakten hos alla äggplantor som ingår i testet med de kontroller som är inokulerade med steril 0,05 M fosfatbuffrad koksaltlösning och att övervaka miljöförhållandena i växthuset.

Rekommendationerna för vidare testning är följande:

6.9.1. Skär av stjälkarna ovanför inokuleringsstället och avlägsna bladen.

6.9.2. Lös upp stjälkarna i 0,05 M fosfatbuffrad koksaltlösning pH 7,0, på samma sätt som i 3.1 och 3.2.

6.9.3. Använd hälften av det koncentrerade extraktet till att göra en Gramfärgning (4) och ett immunofluorescenstest (5).

6.9.4. Använd den andra hälften till att göra ytterligare ett äggplanttest (6) om Gramfärgningen eller immunofluorescenstestet är positiva. Använd en känd kultur av *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* och sterila kontroller med 0,05 M fosfatbuffrad koksaltlösning. Om inga symptom iakttas i det påföljande testet, måste provet anses vara negativt.

7. Isolering av *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

Diagnosen kan bekräftas endast om *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* isoleras och identifieras som *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (8). Fastän *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* är en skadegörare som är svår att hantera är det möjligt att isolera den utgående från vävnad som visar symptom på angrepp. Den kan emellertid kvävas av snabbt växande saprofytiska bakterier och därför rekommenderas inte isolering direkt från det koncentrerade extraktet av knölvävnad (3.3). Äggplantor utgör ett utmärkt selektivt förökningssubstrat för kultur av *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* och är också utmärkta för bekräftande värdtest.

Isolering bör göras utgående från alla potatisknölar och äggplantor som uppvisar symptom (4, 6). Om nödvändigt bör upplösning av äggplantsstjälkar utföras som i punkterna 3 och 6.9.

7.1. Stryk suspension på ett av följande substrat (formler anges i appendix 6):

Näringsagar med dextros (endast för renkultur).

Agar med jäst, pepton och glukos.

Näringsagar med jäst och dextros.

Agar med jästextrakt och mineralsalter.

Inkubera i 21 °C i upp till 20 dagar.

Clavibacter michiganensis ssp. *sepedonicus* växer långsamt och producerar knappnålsliknande, krämfärgade, kupolformade kolonier inom 10 dagar.

Stryk om för att uppnå renhet.

Tillväxttakten förbättras genom renkulturodling. Typiska kolonier är krämvita eller elfenbensvita, runda, släta, upphöjda, kupolkonvexa, slemaktiga till flytande, har hela kanter och är vanligtvis 1 till 3 mm i diameter.

Identifiering

Många Grampositiva coryneforma bakterier som bildar kolonier liknande de hos *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* kan isoleras från frisk eller angripen potatis och äggplantor. I detta sammanhang måste *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* identifieras genom följande test:

Immunofluorescenstest (5.1).

Äggplanttest.

Näringstest och fysiologiskt test (appendix 7).

— Oxidations–/fermenteringstest (O/F).

— Oxidastest.

— Tillväxt vid 37 °C.

— Produktion av ureas.

— Hydrolys av aesculin.

— Hydrolys av stärkelse.

— Tolerans av 7-procentig natriumkloridlösning.

— Indoltest.

— Katalastest.

— Produktion av H_2S.

— Utnyttjande av citrat.

— Hydrolys av gelatin.

— Produktion av syra från glycerol, laktos, rhamnos och salicin.

— Gramfärgning.

Alla test bör inbegripa en känd stam av *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* som kontroll. Näringstest och fysiologiska test bör utföras med inokulum från renkulturer på näringsagar. De morfologiska jämförelserna bör göras på grundval av odlingar på näringsagar med dextros.

För immunofluorescenstestet bör cellkoncentrationen justeras till 10^6 celler/ml. Immunofluorescenstitern bör vara densamma som den hos den kända *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*-odlingen.

För äggplanttestet bör cellkoncentrationen justeras till 10^7 celler/ml. Vid äggplanttest bör 10 plantor användas för varje organism som testas, och här användes också en känd *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* odling och sterila vattenkontroller; med rena odlingar bör typiskt vissnande uppnås inom 20 dagar men plantor som inte visar symptom efter denna tid bör inkuberas i totalt 30 dagar vid temperaturer som främjar äggplantornas tillväxt, men som inte överstiger 30 °C (appendix 5). Om inga symptom märks efter 30 dagar, kan det inte fastslås att kulturen är en patogen form av *Clavibacter michiganensis* spp. *sepedonicus*.

Test	*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*
Oxidations–/fermentationstest (O/F)	Inert eller svagt oxiderande
Oxidastest	–
Katalastest	+
Nitratreduktion	–
Ureasaktivitet	–
Produktion av H_2S	–
Produktion av Indol	–
Utnyttjande av citrat	–

Hydrolys av stärkelse	– eller svag
Tillväxt vid 37 °C	–
Tillväxt i 7–procentig NaCl	–
Hydrolys av gelatin	–
Hydrolys av aesculin	+
Syra från:	
— glycerol	–
— laktos	– eller svag
— rhamnos	–
— salicin	–

Tillägg 1

FORMEL FÖR UPPLÖSNINGSVÄTSKA REKOMMENDERAD AV LELLIOTT OCH SELLAR, 1976

D C silicone Antifoam MS A compound (Hopkins & Williams Ltd, Cat nr 9964-25, Chatwell Heath, Essex, England)	10 ml
Flingor av Lubrol W (ICI Ltd)	0,5 g
Tetrasodium pyrofosfat	1 g
0,05 M fosfatbuffrad koksaltlösning pH 7,0 (appendix 2)	1 liter

Tillägg 2

BUFFERTAR

0,05 M fosfatbuffrad koksaltlösning pH 7,0

Denna buffert kan användas för upplösning av knölvävnad (2.1)

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
NaCl	8,0 g
Destillerat vatten upp till	1 liter

0,01 M fosfatbuffrad koksaltlösning pH 7,2

Denna buffert används för utspädning av antisera och för att tvätta IF-glas

$Na_2HPO_4 . 12\ H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4 . 2\ H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destillerat vatten upp till	1 liter

0,1 M fosfatbuffrad glycerin pH 7,6

Denna buffert används för att förstärka fluorescensen vid immunofluorescenstestet

$Na_2HPO_4 . 12\ H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4 . 2\ H_2O$	0,15 g
Glycerol	50 ml
Destillerat vatten	100 ml

Tillägg 3

FÖRFARANDE VID GRAMFÄRGNING (HUCKERS MODIFIKATION) (DOETSCH, 1981)

Lösning med kristallviolett

Lös upp 2 g kristallviolett i 20 ml 95–procentig etanol.

Lös upp 0,8 g ammoniumoxalat i 80 ml destillerat vatten.

Blanda de två lösningarna.

Lugols jod

Jod	1 g
Kaliumjodid	2 g
Destillerat vatten	300 ml

Sönderdela de fasta ämnena tillsammans i en mortel. Tillsätt i vattnet och rör om i en stängd behållare så att ämnena upplöses.

Färgande lösning med saffranin

Utgångslösning:	
Saffranin O	2,5 g
95–procentig etanol	100 ml

Blanda och lagra.

Spädes i förhållandet 1:10 för att få en arbetslösning.

Förfarande vid färgning

1. Preparera utstrykningspreparaten, lufttorka och värmefixera dem.
2. Dränk objektglaset i kristallviolettlösning i en minut.
3. Tvätta snabbt i rinnande vatten.
4. Dränk objektglaset i Lugols jod i en minut.
5. Tvätta i rinnande vatten och torka med läskpapper.
6. Avfärga genom att tillsätta 95–procentig etanol droppvis tills ingen färg längre avlägsnas eller doppa glaset i etanol i 30 sekunder under försiktig omrörning.
7. Tvätta i rinnande vatten och torka med läskpapper.
8. Dränk objektglaset i saffraninlösning i 10 sekunder.
9. Tvätta i rinnande vatten och torka med läskpapper.

Grampositiva bakterier färgas violett–blåa; Gramnegativa bakterier färgas rosa–röda.

Tillägg 4

BESTÄMNING AV CELLTÄTHETEN FÖR IMMUNOFLUORESCENSPOSITIVA CELLER

Fönsteryta (S) på ett multispotglas

$$= \frac{\pi D^2}{4} \quad (1)$$

där D = fönstrets diameter

Synfältets yta

$$= \frac{\pi d^2}{4} \quad (2)$$

där d = synfältets diameter

Beräkna d antingen genom direkt mätning eller med följande formel:

$$s = \frac{\pi i^2}{G^2K^2 \times 4} \quad (3)$$

där i = synfältskoefficient (beror på typen av okular och varierar från 8 till 24),
K = tubkoefficient (1 eller 1,25)
G = objektivets förstoring (100 ×, 40 × etc.)

Av (2) fås d $= \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$

av (3) fås d $= \sqrt{\frac{4 \times \frac{\pi i^2}{G^2K^2 \times 4}}{\pi}} = \frac{i}{GK}$ (4)

Räkna antalet typiska fluorescerande celler per fält (c).

Beräkna antalet typiska fluorescerande celler per fönster (C).

$$C = \frac{cS}{s}$$

Beräkna antalet typiska fluorescerande celler per ml koncentrerat extrakt (N)

$$N = C \times \frac{1\,000}{y} \times F$$

där y = volymen av koncentrerat extrakt på fönstret,
där F = det koncentrerade extraktets utspädningsfaktor.

Tillägg 5

ODLING AV ÄGGPLANTOR

Så fröer av äggplanta (*Solanum melongena* cv. Black Beauty) i steril såjord. Fröplantorna utplanteras i steril planteringsjord då hjärtbladen är helt utvecklade (10 till 14 dagar).

Använd äggplantor på bladstadium 3 då två, men högst tre, blad är fullt utvecklade.

Äggplantor bör odlas i ett växthus under följande förhållanden:

Dagslängd: 14 timmar eller naturlig dagslängd om den är längre.

Temperatur: dag: 21–24 °C,

natt: 15 °C.

Obs.: *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* kan inte växa vid temperaturer över 30 °C. Om nattemperaturen inte faller till 15 °C, kan kromoforskador uppträda (silvernekros).

Skador på rötter vid angrepp av sciaridlarver kan undvikas genom användning av ett lämpligt insektmedel.

Äggplantor cv. Black Beauty kan erhållas från:

1. AB Hammenhögs Frö,
   270 50 Hammenhög,
   Sverige.

2. HURST Seeds Ltd,
   Avenue Road,
   Witham,
   Essex CM8 2 DX,
   England.

3. ASGRO Italia Sp A,
   Corso Lodi, 23,
   Milano.

4. KÜPPER
   Mitteldeutsche Samen GmbH,
   Hessenring 22,
   D–37269 Eschwege.

Tillägg 6

SUBSTRAT FÖR TILLVÄXT OCH ISOLERING AV *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* ssp. *SEPEDONICUS*

Näringsagar (NA)

Difco Bacto näringsagar i destillerat vatten i det förhållande som anges av tillverkaren. Sterilisera i autoklav vid 121 °C i 15 minuter.

Näringsagar med dextros (NDA)

Difco Bacto näringsagar innehållande 1–procentig D(+)-glukos (monohydrat). Steriliseras i autoklav vid 115 °C i 20 minuter.

Agar med jäst, pepton och glukos (YPGA)

Difco Bacto jästextrakt (nr 0127)	5 g
Difco Bacto pepton (nr 0118)	5 g
D(+)-glukos (monohydrat)	10 g
Difco Bacto agar (nr 0560)	15 g
Destillerat vatten	1 liter

Sterilisera 0,5 liter i taget i autoklav vid 115 °C i 20 minuter.

Agar med jästextrakt och mineralsalter (YGM)

Difco Bacto jästextrakt	2,0 g
D(+)-glukos (monohydrat)	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4 . H_2O$	0,015 g
NaCl	0,05 g
$FeSO_4 . 7H_2O$	0,005 g
Difco Bacto agar	18 g
Destillerat vatten	1 liter

Sterilisera 0,5 liter i taget i autoklav vid 115 °C i 20 minuter.

Tillägg 7

NÄRINGSTEST OCH FYSIOLOGISKT TEST FÖR IDENTIFIERING AV *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* ssp. *SEPEDONICUS*

Alla substrat bör inkuberas vid 21 °C och undersökas efter sex dagar. Om ingen tillväxt har skett, inkubera i upp till 20 dagar.

— **Oxidations- och fermentationstest** (Hugh & Leifson), 1953

Bassubstrat

KCl	0,2 g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0,2 g
$NH_4H_2PO_4$	1,0 g
Difco Bacto pepton	1,0 g
Difco Bacto agar	3,0 g
D(+)-glukos (monohydrat)	10,0 g
Bromtymolblått	0,03 g
Destillerat vatten	1 liter

Blanda och justera till pH 7,0–7,2 med 1N KOH.

Blandningen hälls på Pyrex odlingsrör 16 × 100 mm (innehåll 12 ml) i mängder om 5 och 10 ml.

Sterilisera i autoklav vid 115 °C i 10 minuter.

Stickinokulera varje kultur i 5 ml och 10 ml odlingsrör. Tillsätt aseptiskt 1–2 ml sterilt flytande paraffin till 10 ml röret. Inkubera.

Positiv reaktion

Rör	Färg	Tolkning
öppet slutet	gul gul	fermenterande
öppet slutet	gul blå–grön	oxiderande
öppet slutet	grönaktig blå-grön	oxiderande eller inert

— **Oxidastest** (Kovacs, 1956)

Kovacs oxidasreagens:

1–procentig vattenlösning av tetrametyl parafenylendiamin dihydroklorid (BDH nr 30386) i destillerat vatten.

Detta reagens bör prepareras färskt i mängder om 1 ml eller kan lagras i en brun glasflaska vid 5 °C i 1-4 veckor.

Placera en droppe reagens på filterpapper i en ren petriskål. Tillför omedelbart en del av provodlingen från näringsagaren genom att gnugga filterpappret med en platinaögla.

Positiv reaktion: inom 10 sekunder uppträder purpur färg. Odlingar hos vilka färgen uppträder inom 10–30 sekunder är svagt positiva.

Obs: Det är väsentligt att använda en platinaögla och bakterier som odlats på näringsagar eftersom spår av järn eller hög sockerhalt i tillväxtsubstratet kan ge ett falskt positivt resultat.

— **Produktion av syra från laktos, rhamnos, salicin, glycerol**

Tillred Hugh & Leifsons oxidations- och fermentationssubstrat utan glukos. Fördela i rör i mängder om 5 ml. Sterilisera i autoklav vid 115 °C i 10 minuter. Tillsätt aseptiskt 0,5 ml filtersteriliserad 10 % vattenlösning av antingen glycerol, laktos, rhamnos eller salicin till den flytande agarlösningen vid 45 °C. Blanda försiktigt.

Positiv reaktion: färgändring från blå–grön till gul indikerar syraproduktion.

— **Katalastest**

Lägg en droppe väteperoxid (volym 30) på ett rent objektglas och emulgera med en platinaögla full med material från odlingen.

Positiv reaktion: produktion av syrebubblor i droppen vittnar om förekomst av katalas.

— **Nitratreduktionsaktivitet och denitrifikation** (Bradbury, 1970)

Odlingssubstrat:

KNO_3 (nitritfri)	1 g
Difco Bacto jästextrakt	1 g
K_2HPO_4	5 g
Destillerat vatten	1 liter

Mängder på 10 ml hälles i 20 ml flaskor. De steriliseras i autoklav vid 121 °C i 15 minuter.

Reagens A:

H_2SO_4	8 g
5N ättiksyra	1 liter

Reagens B:

Naftylamin	5 g
5N ättiksyra	1 liter

Inokulera nitratsubstratet två gånger. Testa efter 10 och 20 dagar genom att tillsätta en droppe Lugols jod, 0,5 ml reagens A och 0,5 ml reagens B. Om substratet inte blir rödaktigt, tillsätt ca. 50 mg zinkpulver. Iakkta färgreaktionen.

Positiv reaktion:	*Färgreaktion*	
	Fas 1	Fas 2
Ingen reduktion av nitrat	färglös	röd
Reduktion av nitrat till nitrit (endast nitratreduktas)	röd	–
Reduktion av nitrat förbi nitritstadiet (denitrifiering – nitrat- och nitritreduktas)	färglös	färglös

— **Produktion av ureas** (Lelliott, 1966)

Bassubstrat:

Oxoid urea agarbas (CM 53)	2,4 g
Destillerat vatten	95 ml

Sterilisera i autoklav vid 115 °C i 20 minuter. Kyl ned den flytande agarlösningen till 50 °C och tillsätt aseptiskt 5 ml filtersteriliserad 40–procentig vattenlösning av urea (Oxoid SR 20). Blanda väl.

Fördela i mängder om 6 ml i sterila rör (16 × 100 ml), placera rören snett och låt massan sätta sig.

Positiv reaktion: det gul–orange substratet utvecklar en körsbärsröd eller magenta–rosa färg om ureasaktivitet har förekommit.

Utnyttjande av citrat (Christensen) (Skerman, 1967)

Citrat agarbas (Merck 2503)	23 g
Destillerat vatten	1 liter

Blanda och lös upp genom upphettning. Fördela mängder om 6 ml som för ureassubstratet. Sterilisera i autoklav vid 121 °C i 15 minuter och låt massan lägga sig i snedställda rör.

Positiv reaktion: utnyttjande av citrat anges av en ändring av substratets färg från orange till röd.

— **Produktion av svavelväte** (Ramamurthi, 1959)

Substrat:

Difco Bacto trypton (nr 0123)	10 g
K_2HPO_4	1 g

NaCl	5 g
Destillerat vatten	1 liter

Lös upp och fördela i mängder om 6 ml i rör 16 × 100 mm. Sterilisera i autoklav vid 115 °C i 10 minuter.

Inokulera röret och sätt in ett blyacetatpapper (Merck 9511) aseptiskt genom rörets mynning. Håll det på plats med locket. Inkubera i upp till 20 dagar.

Positiv reaktion: Produktion av H_2S från trypton påvisas genom att det utvecklas en svart–brun färg på testpappret.

— **Produktion av indol** (Ramamurthi, 1959)

Substrat:

Lika som i H_2S testet.

Avlägsna blyacetatpappret och tillsätt 1–2 ml dietyleter och skaka om försiktigt. Låt lagren skilja sig åt (fem minuter). Tillsätt försiktigt 0,5 ml av Kovacs reagens (Merck 9293) på insidan av det snedställda röret.

Positiv reaktion: förekomsten av indol påvisas genom att det utvecklas en röd färg i det gula lagret mellen etern och vattenfasen.

— **Tillväxt vid 37 °C** (Ramamurthi, 1959)

Substrat:

Difco Bacto näringsbuljong (nr 0003)	8 g
Destillerat vatten	1 liter

Blanda, lös upp och fördela i rör i mängder om 6 ml.

Sterilisera i autoklav vid 121 °C i 15 minuter.

Inokulera och inkubera vid 37 °C.

Positiv reaktion: iakktag tecken på tillväxt.

— **Tillväxt i 7–procentig natriumklorid** (Ramamurthi, 1959)

Substrat:

Difco Bacto näringsbuljong	8 g
NaCl	70 g
Destillerat vatten	1 liter

Blanda, lös upp och fördela i rör i mängder om 6 ml.

Sterilisera i autoklav vid 121 °C i 15 minuter.
Positiv reaktion: iakttag tecken på tillväxt.

— **Hydrolys av gelatin** (Lelliott, Billing & Hayward, 1966)

Substrat:

Difco Bacto gelatin (nr 0143)	120 g
Destillerat vatten	1 liter

Blanda, lös upp genom upphettning och fördela i rör i mängder om 6 ml.

Sterilisera i autoklav vid 121 °C i 15 minuter.

Positiv reaktion: gelatinet smälter även om temperaturen hålls vid 5 °C i 30 minuter.

— **Hydrolys av stärkelse**

Substrat:

Difco Bacto näringsagar (flytande)	1 liter
Difco Bacto löslig stärkelse (nr 0178)	2 g

Blanda, sterilisera i autoklav vid 115 °C i 10 minuter.

Gjutplattorna bestryks. Punktinokulera plattorna.

Efter det att en god tillväxt har skett (10 till 20 dagar), avlägsna en del av tillväxten och dränk med Lugols jod.

Positiv reaktion: hydrolys av stärkelse anges av klara områden under eller runt om bakterietillväxten; det kvarvarande substratet förblir purpurfärgat.

— **Hydrolys av aeskulin** (Sneath & Collins, 1974)

Substrat:

Difco Bacto pepton	10 g
Aeskulin	1 g
Järncitrat (Merck 3862)	0,05 g
Natriumcitrat	1 g
Destillerat vatten	1 liter

Blanda så att det löses upp och fördela i rör i mängder om 6 ml.

Sterilisera i autoklav vid 115 °C i 10 minuter.

Substratet är klart men har en blåaktig fluorescens.

Positiv reaktion: Hydrolys av aeskulin påvisas genom utveckling av en brun färg samtidigt som fluorescensen försvinner. Detta kan kontrolleras med en ultraviolett lampa.

REFERENSER

Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213-218.

Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147-152.

Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American society Microbiology, Washington, 21-23.

Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24-26.

Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections *(Corynebacterium sepedonicum)* in potato. EPPO Bull., No 17, 1987, pp. 1-10.

Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.

Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114-118.

Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470-489.

Lelliott, R. A. and P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 (2), 101-106.

Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 pp.

Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.

Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481-527.

BILAGA 2

1. Vid varje misstänkt förekomst för vilken ett positivt immunofluorescenstest har utförts enligt den metod som avses i bilaga 1 bör, i avvaktan på bekräftelse eller vederläggning genom slutförande av den nämnda metoden, följande föremål bevaras och förvaras på lämpligt sätt till dess att metoden har slutförts:

   — Alla de knölar och plantor från vilka prover har tagits, om möjligt.

   — Allt kvarvarande extrakt och ytterligare preparerade immunofluorescensglas.

2. Om det bekräftas att skadegöraren förekommer, bör följande föremål bevaras och förvaras på lämpligt sätt under åtminstone en månad efter det anmälningsförfarande som avses i artikel 5.2:

   — Det material som specificeras i punkt 1.

   — Ett prov av det angripna äggplantematerialet inokulerat med knöl- eller plantextraktet.

   — Den isolerade kulturen av skadegöraren.

BILAGA 3

1. Följande skall beaktas vid bestämningen av hur omfattande den troliga nedsmittning som avses i artikel 5.1 b är:

   — Knölar och plantor som har odlats på en plats som förklaras nedsmittad enligt artikel 5.1 a.

   — En eller flera produktionsplatser eller anläggningar med någon anknytning till produktionen av de knölar eller plantor som har förklarats nedsmittade i enlighet med artikel 5.1 a, inklusive anknytning via produktionsutrustning eller –anordningar som delas direkt eller genom en gemensam entreprenör.

   — Knölar eller plantor som har producerats på en sådan plats som avses i föregående strecksats, eller som har förvarats på en sådan plats under den tid då de knölar eller plantor som har förklarats nedsmittade i enlighet med artikel 5.1 a befann sig på den produktionsplats eller –anläggning som avses i första strecksatsen.

   — Centrallager som hanterar potatis från de ovan nämnda produktionsplatserna.

   — Alla maskiner, fordon, fartyg, lager, eller delar av dessa, och alla andra föremål, inklusive förpackningsmaterial som, under de 12 föregående månaderna eller under någon annan period, kan ha kommit i kontakt med de knölar eller plantor som har förklarats nedsmittade i enlighet med artikel 5.1 a.

   — Alla knölar eller plantor som har lagrats i, eller kommit i kontakt med, något av de föremål som anges i föregående strecksats innan dessa föremål hade rengjorts och desinficerats.

   — Till följd av den undersökning som avses i artikel 6, knölar eller plantor som genom kloning har samma härstamning som de knölar eller plantor som har förklarats nedsmittade i enlighet med artikal 5.1 a och för vilka undersökningar visar att det är troligt att de är nedsmittade.

2. Följande skall beaktas vid bestämningen av den möjliga spridning som avses i artikel 5.1 c:

   — Närheten till andra produktionsplatser där det odlas potatis eller andra värdväxter.

   — Det gemensamma ursprunget för partierna av utsädespotatis.

3. Uppgifterna i den anmälan som avses i första stycket i artikel 5.2 skall inkludera följande:

   — För alla potatissändningar eller –partier som har förklarats nedsmittade, de certifikat som föreskrivs i artikel 7 eller artikel 8 i direktiv 77/93/EEG, och vilket som är lämpligast, växtpassnummer eller registreringsnummer.

   — Sortnamn för utsädespotatis, och om möjligt i alla andra fall.

   — En detaljerad beskrivning av smittans omfattning och det område som har avgränsats.

   — Tillgången på extrakt, preparerade immunofluorescensglas, infekterat äggplantmaterial och en isolerad kultur av skadegöraren från det test genom vilket det har getts en positiv bekräftelse på skadegöraren.

BILAGA 4

1. De officiellt övervakade åtgärder som avses i artikel 7.1, för bortskaffande av knölar eller plantor som har förklarats nedsmittade i enlighet med artikel 5.1 a, skall vara följande:

   — Användning för industriell bearbetning genom direkt och omedelbar leverans till en bearbetningsanläggning med lämpliga anordningar för avfallshantering för vilken det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas, och med ett system för desinfektion av lagerområden och avgående fordon.

   — Andra åtgärder, förutsatt att det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas; dessa åtgärder skall anmälas till kommissionen och till de andra medlemsstaterna.

2. Lämpliga sätt att under medlemsstaternas ansvariga officiella organs tillsyn använda eller bortföra de knölar eller plantor som har förklarats troligen nedsmittade i enlighet med artikel 5.1 b och som avses i artikel 7.2 skall vara följande:

   — Användning som matpotatis avsedd för konsumtion, färdigförpackad för direkt leverans och användning utan ompaketering, och avsedd för sådan direkt leverans och användning.

   — Användning som industripotatis avsedd för industriell bearbetning, och avsedd för direkt och omedelbar leverans till en bearbetningsanläggning som har lämpliga anordningar för avfallshantering och desinfektion.

   — Andra sätt att använda eller bortföra potatisen, förutsatt att det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas.

3. Lämpliga metoder för att rengöra och desinficera de föremål som avses i artikel 7.3 skall vara de för vilka det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas. De skall användas under övervakning av medlemsstaternas ansvariga officiella organ.

4. Den serie åtgärder som medlemsstaterna skall vidta inom det avgränsade område som upprättas i enlighet med artikel 5.1 c och som avses i artikel 7.4 skall inkludera följande:

4.1. På produktionsplatser som har förklarats nedsmittade i enlighet med artikel 5.1 a:

   a) På ett fält som har förklarats nedsmittat i enlighet med artikel 5.1 a, antingen

      i) — under åtminstone de tre odlingsår som följer på det år då fältet förklarades för nedsmittat,

         — skall åtgärder vidtas för att utrota plantor från övervintrande knölar och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren, och

         — skall inga knölar, plantor eller frön av potatis, eller andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren, eller grödor som medför en identifierad risk för att skadegöraren kommer att överleva eller spridas, sättas eller sås förrän fältet har befunnits vara fritt från plantor från övervintrande knölar under minst två på varandra följande odlingsår.

      — under den första växtsäsongen efter den period som specifieras i föregående strecksats, skall det endast odlas officiellt certifierad utsädespotatis som är avsedd för produktion av annan potatis än utsädespotatis, och en officiell undersökning skall göras i enlighet med artikel 2.1,

      — under den växtsäsong som följer på den som avses i föregående strecksats och efter en lämplig växtföljdscykel, skall det sättas officiellt certifierad utsädespotatis som är avsedd för produktion av utsädespotatis eller av annan potatis, och en officiell undersökning skall göras i enlighet med artikel 2.1, eller

      ii) — under de fyra odlingsår som följer på det år då fältet förklarades för nedsmittat,

         — skall åtgärder vidtas för att utrota plantor från övervintrande knölar och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren,

         — skall fältet antingen läggas i och bibehållas som hel träda eller som permanent betesmark som slås ofta eller som betas intensivt,

      — under den första växtsäsongen efter den period som specifieras i föregående strecksats, skall officiellt certifierad utsädespotatis användas, avsedd för produktion av utsädespotatis eller av annan potatis, och en officiell undersökning skall göras i enlighet med artikel 2.1.

b) På andra fält,

— under det odlingsår som följer det år då fältet förklarades nedsmittat,

— skall antingen inga knölar, plantor eller frön av potatis eller andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren sättas eller sås, och åtgärder skall vidtas för att på lämpligt sätt utrota plantor från övervintrande knölar, eller

— får endast användas officiellt certifierad utsädespotatis, avsedd för produktion av annan potatis än utsädespotatis, på villkor att de ansvariga officiella organen har förvissat sig om att risken för plantor från övervintrande knölar och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren har undanröjts.

— skall, under minst de två år som följer på det år som specificeras i föregående strecksats, endast officiellt certifierad utsädespotatis användas, antingen för produktion av utsädespotatis eller av annan potatis,

— skall, under vart och ett av de odlingsår som avses i de föregående strecksatserna, åtgärder vidtas för att utrota plantor från övervintrande knölar och naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren, och en officiell undersökning skall göras i enlighet med artikel 2.1.

— skall, om officiellt certifierad utsädespotatis används för produktion av annan potatis än utsädespotatis under det odlingsår som följer på det år då fältet förklarades nedsmittat, den växande grödan inspekteras vid lämpliga tidpunkter och plantor från övervintrande knölar undersökas avseende skadegöraren.

c) Alla maskiner och lageranläggningar på produktionsplatsen som har varit involverade i potatisproduktionen skall rengöras och desinfekteras på lämpligt sätt och med lämpliga metoder enligt punkt 3 omedelbart efter det att produktionsplatsen har förklarats för nedsmittad enligt artikel 5.1 a och under varje därpå följande odlingsår fram till och med den första tillåtna säsongen för potatisodling på det fält som har förklarats nedsmittat enligt punkt a.

d) I de produktionssystem där det är möjligt att fullständigt byta ut odlingssubstratet,

— skall inga knölar, plantor eller frön sättas eller sås om inte produktionsenheten har underkastats officiellt övervakade åtgärder för att utrota skadegöraren och avlägsna allt potatismaterial eller annat material av familjen Solanaceae, inklusive åtminstone ett totalt byte av odlingssubstrat och rengöring och desinfektion av produktionsenheten och all utrustning, och därefter har godkänts för potatisproduktion av det ansvariga officiella organet, och

— skall potatisproduktionen komma från officiellt certifierad utsädespotatis eller från miniknölar eller mikroplantor som härstammar från undersökta källor.

4.2. Utan att det påverkar tillämpningen av 4.1, skall medlemsstaterna inom det avgränsade området

a) omedelbart, och åtminstone under tre vegetationsperioder efter det att området har förklarats nedsmittat

— säkerställa övervakning genom deras ansvariga officiella organ av platser där potatisknölar odlas, lagras eller hanteras, och av företag som bedriver entreprenadverksamhet inom potatissektorn.

— kräva att maskiner och lager på sådana platser och företag rengörs och desinfekteras på lämpligt sätt och med lämpliga metoder enligt punkt 3.

— kräva att endast certifierat utsäde används för all potatisodling inom det avgränsade området,

— kräva att skördade utsädespartier från alla produktionsplatser inom det avgränsade området hanteras skilt från potatis avsedd för annat ändamål,

— genomföra en officiell undersökning i enlighet med artikel 2.1.

b) upprätta ett program för att vid behov byta ut alla partier av utsädespotatis under en lämplig period.

De åtgärder som införs under 4.2 skall, tillsammans med producenternas registreringsnummer, gemensamma lager och distributionscentraler inom det avgränsade området, årligen anmälas till de andra medlemsstaterna och till kommissionen.