II

(Actes dont la publication n'est pas une condition de leur applicabilité)

CONSEIL

DIRECTIVE 93/85/CEE DU CONSEIL

du 4 octobre 1993

concernant la lutte contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre

LE CONSEIL DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne, et notamment son article 43,

vu la proposition de la Commission (1),

vu l'avis du Parlement européen (2),

vu l'avis du Comité économique et social (3),

considérant que la production de pommes de terre tient une place importante dans l'agriculture de la Communauté; que le rendement de cette production est constamment menacé par des organismes nuisibles;

considérant que la protection de la culture des pommes de terre contre ces organismes nuisibles permettra non seulement le maintien du rendement, mais aussi l'accroissement de la productivité de l'agriculture;

considérant que les mesures de protection contre l'introduction d'organismes nuisibles sur le territoire d'un État membre n'auraient qu'une portée limitée si ces organismes n'étaient pas combattus simultanément et méthodiquement dans l'ensemble de la Communauté et si le nécessaire n'était pas fait pour prévenir leur propagation;

considérant qu'un des organismes nuisibles que l'on trouve sur la pomme de terre est le *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. agent pathogène de la maladie dite «flétrissement bactérien de la pomme de terre»; que cette maladie s'est manifestée dans certaines parties de la Communauté et qu'il existe encore quelques foyers limités d'infection;

considérant que la culture des pommes de terre dans l'ensemble de la Communauté est exposée à un danger considérable si des mesures efficaces ne sont pas prises pour localiser cette maladie et déterminer sa diffusion, pour prévenir son apparition et sa propagation et, si elle est détectée, pour prévenir sa propagation et pour la combattre en vue de son éradication;

considérant que, pour atteindre ce but, certaines mesures doivent être adoptées dans la Communauté; que, en outre, les États membres doivent pouvoir prendre des mesures complémentaires ou plus rigoureuses, pour autant que celles-ci soient nécessaires et ne créent aucune entrave à la circulation des pommes de terre dans la Communauté, sauf dans les cas prévus par la directive 77/93/CEE du Conseil, du 21 décembre 1976, concernant les mesures de protection contre l'introduction dans les États membres d'organismes nuisibles aux végétaux et produits végétaux (4); que de telles mesures doivent être notifiées aux autres États membres et à la Commission;

considérant que la directive 80/665/CEE du Conseil, du 24 juin 1980, concernant la lutte contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre (5) prévoit l'adoption par les États membres de mesures minimales contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre;

(1) JO n° C 93 du 2. 4. 1993, p. 12.
(2) JO n° C 176 du 28. 6. 1993, p. 210.
(3) JO n° C 161 du 14. 6. 1993, p. 18.
(4) JO n° L 26 du 31. 1. 1977, p. 20. Directive modifiée en dernier lieu par la directive 92/103/CEE de la Commission (JO n° L 363 du 11. 12. 1992, p. 1).
(5) JO n° L 180 du 14. 7. 1980, p. 30.

considérant que, depuis cette époque, la connaissance du flétrissement bactérien de la pomme de terre et la détection de l'agent pathogène de la maladie ont sensiblement progressé;

considérant que l'application du régime phytosanitaire communautaire à la Communauté en tant qu'espace sans frontières intérieures implique le réexamen et la révision de certaines dispositions de la directive 80/665/CEE;

considérant que, à la suite de ce réexamen, les dispositions de la directive 80/665/CEE ont été jugées insuffisantes et qu'il est nécessaire de préciser les mesures prévues;

considérant que, dans cette situation, la directive 80/665/CEE doit être abrogée et les mesures nécessaires adoptées;

considérant que les mesures doivent tenir compte, premièrement, du fait que la maladie peut rester latente et ne pas être détectée dans les pommes de terre en cours de croissance ou dans des tubercules entreposés et qu'elle ne peut donc être efficacement combattue que par la production et l'emploi de pommes de terre de semence indemnes, et, deuxièmement, du fait qu'il est nécessaire de procéder à des recherches officielles systématiques visant à la localiser; que la propagation de l'agent pathogène parmi les pommes de terre en cours de croissance n'est pas le facteur le plus important, mais que l'agent pathogène peut exister pendant l'hiver dans les plantes provenant de tubercules oubliés (plantes dites «spontanées») et que celles-ci constituent la principale source de contamination d'une campagne à l'autre; que l'agent pathogène se propage principalement lorsque les pommes de terre sont en contact avec des pommes de terre infectées et avec des équipements de plantation, d'arrachage et de manutention ou des récipients utilisés pour le transport et le stockage qui ont été contaminés par un contact antérieur avec des pommes de terre infectées; que ces objets contaminés peuvent rester infectieux pendant un certain temps après une telle contamination; que la propagation de l'agent pathogène peut être réduite ou évitée par la désinfection de ces objets; que de telles contaminations de pommes de terre de semence constituent un risque majeur de propagation de l'agent pathogène;

considérant que, pour la fixation des modalités des mesures générales ainsi que pour toute mesure plus rigoureuse ou complémentaire prise par les États membres en vue de prévenir l'introduction de cet agent pathogène sur leurs territoires respectifs, il est souhaitable que les États membres coopèrent étroitement avec la Commission au sein du comité phytosanitaire permanent (ci-après dénommé «comité»),

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

Article premier

La présente directive concerne les mesures à prendre dans les États membres contre le *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., agent du flétrissement bactérien de la pomme de terre (ci-après dénommé «organisme»), pour:

a) le localiser et déterminer sa diffusion;

b) prévenir son apparition et sa propagation

et

c) s'il est détecté, prévenir sa propagation et le combattre en vue de son éradication.

Article 2

1. Les États membres procèdent à des recherches officielles systématiques visant à détecter l'organisme sur des tubercules et, le cas échéant, sur des plantes de pommes de terre (*Solanum tuberosum L.*) provenant de leur territoire, en vue de la confirmation de l'absence dudit organisme.

Aux fins de ces recherches, dans le cas des tubercules, des échantillons de pommes de terre de semence et d'autres pommes de terre sont prélevés, de préférence sur des lots en stock, et soumis à un test en laboratoire effectué officiellement ou sous contrôle officiel, selon la méthode décrite à l'annexe I concernant la détection et le diagnostic de l'organisme. Le cas échéant, une inspection visuelle officielle ou officiellement contrôlée peut être effectuée sur d'autres échantillons en coupant les tubercules.

Dans le cas des plantes, ces recherches sont effectuées selon des méthodes appropriées et les échantillons sont soumis à des tests appropriés, officiels ou officiellement contrôlés.

Le nombre, l'origine, la stratification et le calendrier de prélèvement des échantillons sont arrêtés par les organismes officiels compétents au sens de la directive 77/93/CEE, sur la base de principes scientifiques et statistiques fondés et de la biologie de l'organisme, ainsi qu'en fonction des systèmes particuliers de production de pommes de terre des États membres considérés. Les modalités y afférentes sont transmises chaque année aux autres États membres et à la Commission afin que la confirmation de l'absence de l'organisme soit soumise à des garanties comparables entre États membres.

2. Les résultats des recherches officielles visées au paragraphe 1 sont notifiés au moins une fois par an aux autres États membres et à la Commission. Le détail de cette notification est confidentiel. Le comité peut en être saisi selon la procédure prévue à l'article 16 *bis* de la directive 77/93/CEE.

3. Les dispositions suivantes peuvent être adoptées selon la procédure prévue à l'article 16 *bis* de la directive 77/93/CEE:

— les modalités des recherches prévues au paragraphe 1, à effectuer selon des principes scientifiques et statistiques fondés,

— les modalités de la notification prévue au paragraphe 2.

4. Les dispositions suivantes sont adoptées selon la procédure prévue à l'article 16 *bis* de la directive 77/93/CEE:

— la méthode appropriée pour les recherches et les tests visés au paragraphe 1 troisième alinéa.

Article 3

Les États membres veillent à ce que l'apparition suspectée ou la présence confirmée, sur leur territoire, de l'organisme dans des pommes de terre en cours de végétation ou dans des tubercules récoltés, entreposés ou commercialisés, soient signalées à leurs organismes officiels compétents.

Article 4

1. Les organismes officiels compétents de l'État membre dans lequel des cas d'apparition suspectée ont été signalés veillent à ce qu'un test en laboratoire soit effectué officiellement ou sous contrôle officiel selon la méthode décrite à l'annexe I et conformément aux conditions énumérées au point 1 de l'annexe II, afin de confirmer ou d'infirmer ladite apparition. Si la présence de l'organisme est confirmée, les dispositions du point 2 de l'annexe II s'appliquent.

2. Dans l'attente de la confirmation ou de l'infirmation de l'apparition suspectée visée au paragraphe 1, dans les cas d'apparition suspectée où on a constaté:

i) des symptômes visuels diagnostiques suspects suggérant la présence de la maladie

ou

ii) une réaction positive au test d'immunofluorescence précisé à l'annexe I ou à un autre test approprié,

les organismes officiels compétents des États membres:

a) interdisent le mouvement de tous les lots ou envois sur lesquels les échantillons ont été prélevés, sauf sous leur contrôle et pour autant qu'il ait été établi qu'il n'existe aucun risque identifiable de propagation de l'organisme;

b) prennent les mesures nécessaires pour remonter à l'origine de l'apparition suspectée;

c) introduisent des mesures de précaution supplémentaires appropriées, fondées sur le degré de risque estimé, en vue de prévenir toute propagation de l'organisme. Parmi ces mesures peut figurer le contrôle officiel des mouvements de tout autre tubercule ou plante à l'intérieur ou à partir de toute installation associée à l'apparition suspectée.

3. Les mesures suivantes peuvent être adoptées selon la procédure prévue à l'article 16 *bis* de la directive 77/93/CEE:

— les mesures visées au paragraphe 2 point c).

4. Les mesures suivantes sont adoptées selon la procédure prévue à l'article 16 *bis* de la directive 77/93/CEE:

— les autres tests appropriés prévus au paragraphe 2 point ii).

Article 5

1. Si les tests en laboratoire effectués officiellement ou sous contrôle officiel, selon la méthode décrite à l'annexe I, confirment la présence de l'organisme dans un échantillon de tubercules, de plantes ou de parties de plantes, les organismes officiels compétents d'un État membre, compte tenu de principes scientifiques fondés, de la biologie de l'organisme et des systèmes particuliers de production, de commercialisation et de transformation en usage dans cet État membre:

a) déclarent contaminés les tubercules ou plantes, l'envoi et/ou le lot ainsi que le matériel, le véhicule, le récipient, l'entrepôt ou des parties de ceux-ci et tout autre objet, y compris les emballages, d'où l'échantillon a été prélevé, mais aussi, le cas échéant, le(s) lieu(x) de production ainsi que le(s) champ(s) où les tubercules ou plantes ont été récoltés;

b) déterminent, compte tenu des dispositions du point 1 de l'annexe III, l'étendue de la contamination probable par contact avant ou après la récolte avec des éléments déclarés contaminés ou par un lien avec ceux-ci dans le système de production;

c) délimitent une zone sur la base de la déclaration de contamination visée au point a), de la détermination de l'étendue de la contamination probable visée au point b) et de la propagation possible de l'organisme, compte tenu des dispositions du point 2 de l'annexe III.

2. Les États membres notifient immédiatement aux autres États membres et à la Commission, selon la procédure prévue au point 3 de l'annexe III, toute contamination déclarée conformément au paragraphe 1 point a) ainsi que les informations détaillées concernant la délimitation de la zone visée au paragraphe 1 point c).

Le détail de cette notification est confidentiel. Le comité peut en être saisi selon la procédure prévue à l'article 16 *bis* de la directive 77/93/CEE.

3. À la suite de la notification visée au paragraphe 2 et des éléments y figurant, les autres États membres visés dans cette dernière, selon le cas, déclarent une contamination, déterminent l'étendue de la contamination probable et délimitent une zone, conformément au paragraphe 1 points a), b) et c).

Article 6

Les États membres prescrivent que, lorsque des tubercules ou des plantes ont été déclarés contaminés en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point a), les tests visés à l'article 4 paragraphe 1 sont effectués sur tous les stocks de pommes de terre qui possèdent une relation clonale avec ceux impliqués dans la contamination. Les tests sont effectués sur le nombre de tubercules ou de plantes nécessaires pour déterminer la source probable d'infection primaire et l'étendue de la contamination probable, de préférence selon le degré de risque.

À la suite des tests, il est procédé une nouvelle fois, en tant que de besoin, à une déclaration de la contamination, à une détermination de l'étendue de la contamination probable et à la délimitation d'une zone en vertu de l'article 5 paragraphe 1 points a), b) et c).

Article 7

1. Les États membres prescrivent que les tubercules ou les plantes déclarés contaminés en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point a) ne peuvent pas être plantés et que, sous le contrôle de leurs organismes officiels compétents, ils sont:

— détruits

ou

— éliminés d'une autre manière, dans le cadre d'une ou plusieurs mesures sous contrôle officiel conformément au point 1 de l'annexe IV, pour autant qu'il soit établi qu'il n'y a aucun risque identifiable de propagation de l'organisme.

2. Les États membres prescrivent que les tubercules ou plantes déclarés probablement contaminés en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point b) ne peuvent pas être plantés et sont, sans préjudice du résultat des tests visés à l'article 6 pour les stocks ayant une relation clonale avec eux, utilisés ou éliminés de manière appropriée comme indiqué au point 2 de l'annexe IV, sous le contrôle de leurs organismes officiels compétents, de telle sorte que l'absence de risque identifiable de propagation de l'organisme soit garantie.

3. Les États membres prescrivent que le matériel, les véhicules, les récipients, les entrepôts ou des parties de ceux-ci, ainsi que tout autre objet, y compris les emballages, déclarés contaminés en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point a) ou considérés comme probablement contaminés en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point b), doivent être détruits ou nettoyés et désinfectés selon des méthodes appropriées visées au point 3 de l'annexe IV. Après désinfection, ces objets ne sont plus considérés comme contaminés.

4. Sans préjudice des mesures mises en œuvre en application des paragraphes 1, 2 et 3, les États membres prescrivent que diverses mesures, définies au point 4 de l'annexe IV, doivent être mises en œuvre dans la zone délimitée en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point c).

Article 8

1. Les États membres prescrivent que les pommes de terre de semence doivent satisfaire aux exigences de la directive 77/93/CEE et provenir en ligne directe d'un matériel qui a été obtenu dans le cadre d'un programme officiellement approuvé et qui a été déclaré indemne de l'organisme à la suite de tests effectués officiellement ou sous contrôle officiel, selon la méthode décrite à l'annexe I.

Les tests susdits sont effectués:

— dans les cas où la contamination concerne la production de pommes de terre de semence, sur les plantes de la sélection clonale initiale,

— dans les autres cas, soit sur les plantes de la sélection clonale initiale, soit sur des échantillons représentatifs des pommes de terre de semence de base ou de générations antérieures.

2. Les dispositions suivantes peuvent être arrêtées conformément à la procédure prévue à l'article 16 *bis* de la directive 77/93/CEE:

— les modalités d'application du paragraphe 1 deuxième alinéa premier tiret,

— les règles concernant les échantillons représentatifs visés au paragraphe 1 deuxième alinéa deuxième tiret.

Article 9

Les États membres interdisent la détention et la manipulation de l'organisme.

Article 10

Sans préjudice des dispositions de la directive 77/93/CEE, les États membres peuvent accorder des dérogations aux articles 6, 7 et 9 de la présente directive à des fins expérimentales ou scientifiques et pour des travaux de sélection variétale, pour autant que ces dérogations ne nuisent pas aux mesures de lutte contre l'organisme et ne créent aucun risque de propagation de ce dernier.

Article 11

Les États membres peuvent adopter des mesures complémentaires ou plus rigoureuses requises pour la lutte contre l'organisme ou la prévention de sa propagation, pour autant qu'elles respectent les dispositions de la directive 77/93/CEE.

Les mesures complémentaires visées au premier alinéa peuvent comporter l'obligation de ne planter que des pommes de terre de semence officiellement certifiées ou soumises à une inspection officielle destinée à garantir le respect des normes phytosanitaires requises. Cette dernière possibilité peut s'appliquer en particulier aux cas dans lesquels les

agriculteurs sont autorisés à utiliser, sur leur exploitation, des pommes de terre de semence provenant de leur propre récolte ainsi qu'à d'autres cas où sont plantées des pommes de terre de semence produites par l'exploitant.

Le détail de ces mesures est notifié aux autres États membres et à la Commission.

Article 12

Les modifications à apporter aux annexes de la présente directive en raison de l'évolution des connaissances scientifiques ou techniques sont adoptées conformément à la procédure prévue à l'article 16 *bis* la directive 77/93/CEE.

Article 13

1. Les États membres adoptent et publient au plus tard le 15 novembre 1993 les dispositions nécessaires pour se conformer à la présente directive. Ils en informent immédiatement la Commission.

Lorsque les États membres adoptent ces dispositions, celles-ci contiennent une référence à la présente directive ou sont accompagnées d'une telle référence lors de leur publication officielle. Les modalités de cette référence sont arrêtées par les États membres.

Les États membres appliquent ces dispositions à partir du 16 novembre 1993.

2. Les États membres communiquent immédiatement à la Commission toutes les dispositions législatives nationales qu'ils arrêtent dans le domaine régi par la présente directive. La Commission en informe les autres États membres.

Article 14

La directive 80/665/CEE est abrogée à partir du 16 novembre 1993.

Article 15

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Luxembourg, le 4 octobre 1993.

Par le Conseil

Le président

W. CLAES

ANNEXE I

MÉTHODE PERMETTANT DE DÉTECTER ET DE DIAGNOSTIQUER LA PRÉSENCE DE LA BACTÉRIE RESPONSABLE DU FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN DE LA POMME DE TERRE, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (SMITH) DAVIS ET AL. SPP. *SEPEDONICUS* (SPIECKERMANN ET KOTTHOFF) DAVIS ET AL., DANS LES LOTS DE TUBERCULES DE POMMES DE TERRE

1. **Prélèvement des échantillons au talon**

1.1. Laver 200 tubercules à l'eau courante et peler le talon de chaque tubercule en utilisant un scalpel ou un éplucheur à pommes de terre régulièrement désinfecté; la désinfection peut s'effectuer en trempant l'éplucheur dans de l'éthanol à 70 % avant de le passer à la flamme.

1.2. Prélever soigneusement des cônes de tissu au talon avec un scalpel ou un éplucheur à pommes de terre. Prélever aussi peu que possible de tissu non vasculaire. Après leur prélèvement, les cônes doivent être traités dans les 24 heures (point 3) ou conservés à – 20 °C pendant un maximum de deux semaines.

2. **Recherche visuelle des symptômes du flétrissement bactérien**

Après avoir prélevé les échantillons, couper transversalement chaque tubercule et rechercher la présence de symptômes du flétrissement bactérien.

Presser les tubercules et regarder si le tissu vasculaire laisse exsuder des tissus décomposés.

Les premiers symptômes sont, surtout près du talon, un aspect légèrement vitreux ou translucide du tissu, sans ramollissement autour du système vasculaire. L'anneau vasculaire peut présenter, au talon, une couleur légèrement plus foncée que la normale. Les premiers symptômes aisément identifiables sont une coloration jaunâtre de l'anneau vasculaire et le fait que, lorsqu'on presse doucement le tubercule, des colonnes de matière ressemblant à du fromage sortent des vaisseaux. Cet exsudat contient des millions de bactéries. Le brunissement du tissu vasculaire peut apparaître à ce stade. Dans un premier temps, ces symptômes peuvent n'être présents que sur une partie de l'anneau, pas nécessairement proche du talon, avant de se propager graduellement à l'ensemble de l'anneau. Au fur et à mesure de la progression de l'infection, les tissus vasculaires sont détruits. Le cortex extérieur peut se séparer du cortex intérieur. Aux stades avancés de l'infection, des fissures, aux bords souvent rouge-brun, apparaissent à la surface du tubercule. Une invasion fongique ou bactérienne secondaire peut masquer les symptômes et il peut être malaisé, voire impossible, de distinguer les symptômes avancés du flétrissement bactérien de ceux d'autres pourritures des pommes de terre.

3. **Préparation d'échantillons pour la coloration de Gram, le test d'immunofluorescence et le test sur aubergines**

3.1. Homogénéiser les cônes provenant du talon dans un diluant connu pour ne pas être toxique pour le *C. m.* subsp. *sepedonicus* [par exemple un tampon au phosphate 0,05 M (TP) de pH 7,0] à une température inférieure à 30 °C jusqu'au moment où l'homogénéisation complète vient tout juste d'être obtenue; il est conseillé d'ajouter un agent dispersant non toxique et il peut être nécessaire d'ajouter un agent antimousse non toxique (appendices 1 et 2). Il y a lieu d'éviter tout broyage excessif.

3.2. Extraire la bactérie du liquide homogénéisé par l'une des méthodes suivantes [1]:

A. a) centrifuger à 180 g au maximum pendant 10 minutes;

b) centrifuger le liquide surnageant à au moins 4 000 g pendant 10 minutes; décanter, puis éliminer le liquide surnageant;

B. a) laisser reposer pendant 30 minutes le broyat pour permettre aux débris tissulaires de se déposer; décanter le liquide surnageant sans remuer le sédiment;

b) filtrer le liquide surnageant au moyen d'un papier filtre (Whatman n° 1) placé dans un filtre en verre fritté (n° 2 = 40 – 100 µm) en utilisant une trompe à eau; recueillir le filtrat dans un tube à centrifuger; laver le filtre avec du tampon au phosphate stérile jusqu'à obtention d'une quantité maximale de filtrat de 35 ml;

c) centrifuger le filtrat à au moins 4 000 g pendant 20 minutes.

3.3. Remettre le culot (extrait concentré) en suspension dans un tampon au phosphate 0,01 M stérile de pH 7,2 (appendice 2) jusqu'à obtention d'environ 1 ml d'extrait concentré. Le diviser en deux parties égales et en conserver une à titre de référence en la congelant à – 20 °C [2] ou en la lyophilisant. Diviser l'autre moitié en deux parties égales destinées, l'une, au test d'immunofluorescence et à la réaction de Gram et, l'autre, au test sur aubergines.

---

[1] Une autre méthode d'extraction est donnée par Dinesen, 1984.

[2] Il est prouvé (Janse et Van Vaerenbergh, 1987) que la congélation peut réduire la viabilité de *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Employer une solution de glycérol à 10 % pour y mettre en suspension l'extrait concentré pourrait constituer la solution à ce problème.

3.4. Afin d'éviter toutes contaminations, il est impératif de traiter séparément les échantillons et les témoins positifs de *C. m.* subsp. *sepedonicus*, aussi bien pour les tests d'immunofluorescence que pour les tests sur aubergines

4. **Réaction de Gram**

4.1. Préparer des colorations de Gram pour toutes les dilutions de l'extrait concentré (point 5.2.1) et pour tout tubercule coupé (point 2) présentant un aspect vitreux, une pourriture ou tout autre symptôme suspect. Les échantillons doivent être prélevés à la limite des tissus malades.

4.2. Préparer des colorations de Gram pour des cultures connues de *C. m.* subsp. *sepedonicus* et, si possible, pour des tissus naturellement infectés (point 5.1).

4.3. Déterminer quels échantillons contiennent des cellules Gram positives coryneformes typiques. En général, les cellules de *C. m.* subsp. *sepedonicus* ont une longueur de 0,8 à 1,2 µm et une largeur de 0,4 à 0,6 µm.

Une procédure appropriée de coloration de Gram figure à l'appendice 3.

Les échantillons préparés à partir de tissu naturellement infecté ou de cultures récemment isolées présentent souvent une prédominance de bâtonnets coccoïdes qui sont généralement légèrement plus petits que les cellules provenant de cultures sur gélose plus anciennes. Dans la plupart des milieux de culture, les cellules de *C. m.* subsp. *sepedonicus* sont des bâtonnets pléomorphes corynemorphes qui peuvent réagir diversement à la coloration de Gram. Les cellules sont isolées, en paires avec des «coudes» caractéristiques de la division des corynebactéries ou, occasionnellement, en groupes irréguliers souvent qualifiés de palissades et de caractères chinois.

5. **Tests d'immunofluorescence**

5.1. Utiliser un antisérum d'une souche connue de *C. m.* subsp. *sepedonicus* ATCC 33113 (NCPPB 2137) ou NCPPB 2140. Il devra avoir un titre d'immunofluorescence d'au moins 1:600. Inclure du tampon au phosphate sur la lame de test à titre de témoin, pour déterminer si l'immunoglobuline anti-lapin conjuguée avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) se combine non spécifiquement avec les cellules bactériennes. Le *C. m.* subsp. *sepedonicus* [ATCC 33113 (NCPPB 2137), NCPPB 2140] devrait être utilisé comme témoin antigène homologue sur une lame séparée. Du tissu naturellement infecté (conservé par lyophilisation ou congélation à – 20 °C) devrait, dans la mesure du possible, être utilisé à titre de témoin similaire sur la même lame (figure 2).

5.2 *Procédure*

5.2.1. Préparer trois dilutions successives au dixième (10^1, 10^2 et 10^3) de l'extrait concentré final dans de l'eau distillée (figure 1).

5.2.2 Déposer à la pipette dans les puits d'une lame multifenêtre un volume standard suffisant pour couvrir le puits (environ 25 µl) de chaque dilution de l'extrait concentré ou de la suspension de *C. m.* subsp. *sepedonicus* (environ 10^6 cellules/ml), comme il est indiqué sur la figure 1.

Figure 1

Lame de l'échantillon et du puits témoin au tampon phosphate

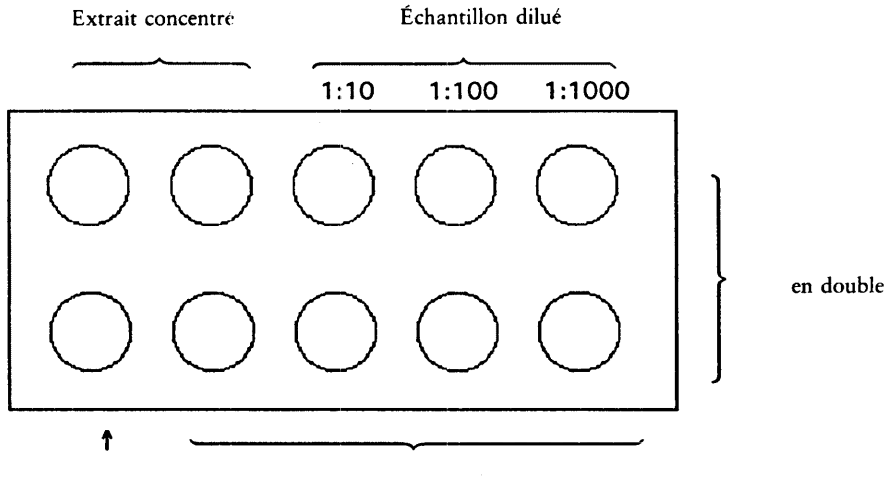
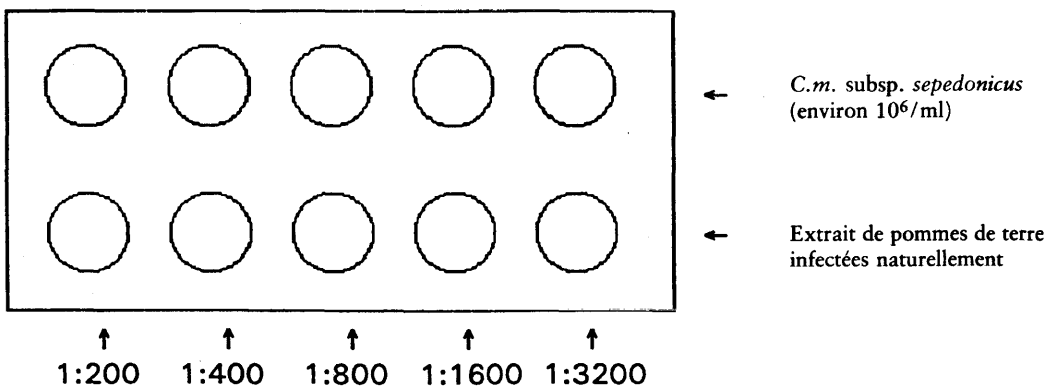


Figure 2

Lame de témoin positif



5.2.3. Laisser sécher à l'air à une température d'environ 37 °C et fixer avec de l'éthanol à 95 % ou en passant à la flamme.

5.2.4. Couvrir les puits appropriés, comme indiqué sur la figure 1, avec de l'antisérum de C. *m.* subsp. *sepedonicus* dilué dans les proportions recommandées (dilution de travail) dans un tampon au phosphate 0,01 M de pH 7,2 (appendice 2) (utiliser un tampon au phosphate à titre de témoin pour le FITC). La dilution de travail de l'antisérum devrait être approximativement égale à la moitié du titre d'immunofluorescence. S'il faut inclure d'autres dilutions de l'antisérum, il y a lieu de préparer des lames séparées pour chaque dilution à utiliser.

5.2.5. Laisser incuber 30 minutes en chambre humide à température ambiante.

5.2.6. Rincer soigneusement avec le tampon au phosphate 0,01 M de pH 7,2. Faire trois lavages successifs de 5 minutes avec le tampon au phosphate 0,01 M de pH 7,2. Changer la solution de lavage à chaque fois.

5.2.7. Enlever soigneusement toute moisissure excessive.

5.2.8. Couvrir chaque puits avec du conjugué FITC à la même dilution utilisée lors du titrage et laisser incuber 30 minutes en chambre noire humide à température ambiante.

5.2.9. Rincer et laver comme précédemment.

5.2.10. Appliquer environ 5 à 10 µl de solution de glycérine tamponnée au phosphate 0,1 M de pH 7,6 (ou un support similaire d'un pH d'au moins 7,6) sur chaque puits et recouvrir d'une lamelle couvre-objets (appendice 2).

5.2.11. Examiner avec un microscope équipé d'une source lumineuse épifluorescente et de filtres adaptés pour travailler avec le FITC. Un grossissement de 400 à 1 000 fois est approprié. Balayer chaque puits selon deux diamètres perpendiculaires et en suivant le pourtour.

Rechercher les cellules fluorescentes dans les témoins positifs et titrer. Rechercher les cellules fluorescentes dans le contrôle tampon FITC et, s'il n'y en a pas, passer aux puits échantillons. Déterminer sur un minimum de 10 champs microscopiques le nombre moyen de cellules fluorescentes morphologiquement typiques par champ et calculer le nombre de ces cellules par millilitre d'extrait concentré non dilué (appendice 4).

Il existe un certain nombre de problèmes inhérents aux tests d'immunofluorescence.

— Des populations de bactéries saprophytes peuvent montrer des cellules fluorescentes morphologiquement atypiques et provoquer des réactions croisées. D'autres peuvent être similaires par la taille et la morphologie au C. *m.* subsp. *sepedonicus*. Seules les cellules fluorescentes dont la taille et la morphologie sont typiques doivent être prises en considération.

  En raison de la possibilité de réactions croisées, les échantillons réagissant positivement au test d'immunofluorescence devraient être une nouvelle fois soumis au test, avec un antisérum différent.

— La limite technique de détection de cette méthode se situe entre 10^3 et 10^4 cellules par millilitre d'extrait concentré non dilué. Les échantillons pour lesquels le décompte de cellules fluorescentes typiques est à la limite de détection sont généralement indemnes de C. *m.* subsp. *sepedonicus* mais peuvent être soumis au test sur aubergines.

Le test d'immunofluorescence est négatif pour tous les échantillons dans lesquels on n'a trouvé aucune cellule fluorescente morphologiquement typique. On considère que ces échantillons ne sont «pas contaminés» par le *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Il n'est pas nécessaire de les soumettre au test sur aubergines.

Le test d'immunofluorescence est positif pour tous les échantillons dans lesquels des cellules fluorescentes morphologiquement typiques sont décelées.

On considère que les échantillons pour lesquels le test d'immunofluorescence est positif avec les deux antisérums sont «potentiellement contaminés» par le *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Il est nécessaire d'effectuer un test sur aubergines pour tout échantillon considéré comme potentiellement contaminé.

6. **Test sur aubergines**

Pour les détails de la culture, voir l'appendice 5.

6.1. Répartir l'extrait concentré obtenu au point 3.3 entre au moins 25 aubergines au stade 3 feuilles (appendice 5) par une des méthodes exposées ci-dessous (points 6.2, 6.3 ou 6.4).

6.2. *Inoculation par incision I*

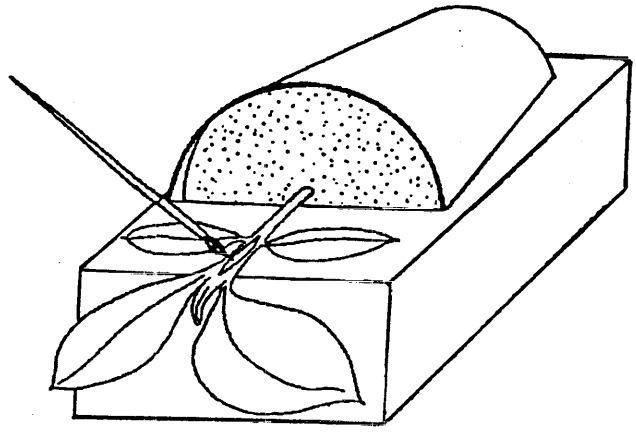
6.2.1. Poser chaque pot horizontalement sur un support [un bloc de mousse de polystyrène de la surface duquel on a retiré un morceau de 5 cm de profondeur, 10 cm de largeur et 15 cm de longueur (figure 3) convient pour un pot de 10 cm]. Pour chaque échantillon testé, une bande de feuille d'aluminium stérile doit être placée entre la tige et le bloc de mousse de polystyrène. La plante peut être tenue en place par un élastique entourant le bloc.

6.2.2. Avec un scalpel, pratiquer entre les cotylédons et la première feuille une incision longitudinale ou légèrement diagonale d'une longueur de 0,5 à 1 cm et d'une profondeur égale approximativement aux trois quarts du diamètre de la tige.

6.2.3. Maintenir ouverte l'incision avec la pointe de la lame du scalpel et la badigeonner d'inoculum avec un pinceau trempé dans l'extrait concentré. Répartir l'extrait concentré entre les aubergines.

6.2.4. Refermer l'incision avec de la vaseline stérile en utilisant une seringue d'une capacité de 2 ml.

Figure 3



6.3. *Inoculation par incision II*

6.3.1. Tenir la plante entre deux doigts et déposer à la pipette une goutte (environ 5 à 10 µl) de l'extrait concentré en suspension sur la tige entre les cotylédons et la première feuille.

6.3.2. Avec un scalpel stérile, pratiquer, en partant de la goutte d'extrait concentré une incision diagonale (à un angle d'environ 5°) d'une longueur de 1 cm et d'une profondeur égale approximativement aux deux tiers de l'épaisseur de la tige.

6.3.3. Refermer l'incision avec de la vaseline stérile en utilisant une seringue.

6.4. *Inoculation par injection*

6.4.1. Avant l'inoculation, ne pas arroser les aubergines pendant une journée afin de réduire la pression de turgescence.

6.4.2. Avec une seringue munie d'une aiguille hypodermique (pas moins de 23G), pratiquer l'inoculation dans les tiges d'aubergine juste au-dessus des cotylédons. Répartir l'extrait concentré entre les aubergines.

6.5. Par la même méthode d'inoculation (points 6.2, 6.3 ou 6.4), inoculer 25 plantes avec une culture connue de *C. m.* subsp. *sepedonicus* et, si possible, avec de l'extrait de tubercule naturellement infecté (point 5.1).

6.6. Par la même méthode d'inoculation (points 6.2, 6.3 ou 6.4), inoculer 25 plantes avec un tampon au phosphate 0,05 M stérile.

6.7. Laisser incuber les plantes 40 jours dans des conditions appropriées (appendice 5). Après les 8 premiers jours, examiner régulièrement pour déceler l'apparition de symptômes. Compter combien de plantes présentent des symptômes. Le *C. m.* subsp. *sepedonicus* provoque chez l'aubergine un flétrissement des feuilles qui peut commencer par une flaccidité au bord des feuilles ou entre les nervures. Au départ, le tissu flétri peut prendre une couleur vert foncé ou être tacheté, mais il pâlit avant de se nécroser. Les flétrissures entre les nervures ont souvent un aspect graisseux et gorgé d'eau. Le tissu nécrosé présente souvent un bord jaune vif. Les plantes ne meurent pas nécessairement. Plus les symptômes tardent à apparaître plus les chances de survie sont élevées. Les plantes peuvent surmonter l'infection. Les jeunes aubergines sensibles réagissent beaucoup plus à de faibles populations de *C. m.* subsp. *sepedonicus* que les plantes plus âgées, ce qui explique qu'il y a lieu d'utiliser des plantes qui sont au stade 3 feuilles ou vont l'atteindre.

Des flétrissements peuvent également être provoqués par des populations d'autres bactéries ou de champignons présentes dans l'extrait concentré de tissu tuberculaire. Il s'agit par exemple de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* et de *E. carotovora* subsp. *atroseptica,* de *Phoma exigua* var. *foveata,* ainsi que de fortes populations de bactéries saprophytes. Ces flétrissements se distinguent de ceux causés par le *C. m.* subsp. *sepedonicus* car des feuilles entières ou des plantes entières fanent rapidement.

6.8. Préparer une coloration de Gram (point 4) pour tous les lots d'aubergines présentant des symptômes, en utilisant des sections de tissu provenant des feuilles flétries ou de la tige des plantes et procéder à l'isolement sur un milieu nutritif approprié (point 7). Désinfecter la surface des feuilles et des tiges d'aubergine en les frottant avec de l'éthanol à 70 %.

6.9. Dans certaines circonstances, surtout si les conditions de culture ne sont pas optimales, du *C. m.* subsp. *sepedonicus* peut être présent dans les aubergines à l'état d'infection latente même après une incubation de 40 jours. Une telle infection peut entraîner chez les plantes inoculées un retard de croissance et un manque de vigueur. Si le test d'immunofluorescence est considéré comme positif, on peut estimer qu'il y a lieu de poursuivre l'analyse. Il est dès lors essentiel de comparer les taux de croissance de toutes les plantes du test sur aubergines avec les témoins inoculés avec un tampon au phosphate 0,05 M stérile et de surveiller les conditions environnementales dans la serre.

En cas de poursuite de l'expérimentation, il est recommandé de procéder comme indiqué ci-après.

6.9.1. Couper les tiges au-dessus du point d'inoculation et enlever les feuilles.

6.9.2. Broyer les tiges dans un tampon au phosphate 0,05 M à pH 7,0, comme indiqué aux points 3.1 et 3.2.

6.9.3. Utiliser la moitié de l'extrait concentré pour une réaction de Gram (point 4) et un test d'immunofluorescence (point 5).

6.9.4. Utiliser l'autre moitié pour effectuer un nouveau test sur aubergines (point 6) si la réaction à la coloration de Gram et/ou au test d'immunofluorescence est positive. Utiliser comme témoins une culture connue de *C. m.* subsp. *sepedonicus* et un tampon au phosphate 0,05 M stérile. Si des symptômes n'apparaissent pas lors de ces tests complémentaires, on considère que l'échantillon est négatif.

7. **Isolement du *C. m.* subsp. *sepedonicus***

Le diagnostic ne peut être confirmé que par l'isolement et l'identification (point 8) du *C. m.* subsp. *sepedonicus.* Bien qu'il s'agisse d'un organisme difficile à isoler, il est possible de le faire au départ de tissu présentant des symptômes d'infection. Toutefois, des bactéries saprophytes à croissance rapide peuvent l'étouffer et, dès lors, il n'est pas recommandé de l'isoler directement au départ de l'extrait concentré de tissu tuberculaire (obtenu au point 3.3). Les aubergines représentent un excellent milieu sélectif de multiplication pour la culture de *C. m.* subsp. *sepedonicus* et permettent donc de réaliser un excellent test de confirmation sur hôte.

Les isolements doivent être pratiqués sur tous les tubercules de pommes de terre et toutes les aubergines présentant des symptômes (points 4 et 6). Le cas échéant, les tiges d'aubergines doivent êtres broyées selon la méthode décrite aux points 3 et 6.9.

7.1. Purifier par un nouvel ensemencement en stries avec les suspensions un des milieux suivants (les formules figurent à l'appendice 6):

gélose nutritive avec dextrose (uniquement pour les repiquages),

gélose avec levure, peptone et glucose,

gélose nutritive avec levure et dextrose,

gélose avec extrait de levure et sels minéraux.

Laisser incuber jusqu'à 20 jours à 21 °C.

Le *C. m.* subsp. *sepedonicus* a une croissance lente et produit généralement en 10 jours des colonies de la taille et de la forme d'une tête d'épingle, de couleur crème, et convexes.

Ensemencer à nouveau en stries pour obtenir des cultures pures.

Les taux de croissance sont meilleurs pour les repiquages. Les colonies typiques sont de couleur blanc crème ou ivoire, arrondies, lisses, dressées, présentant un dôme convexe, de consistance muqueuse à fluide, avec des bords nets ou réguliers et d'un diamètre allant généralement de 1 à 3 mm.

Identification

Beaucoup de bactéries coryneformes Gram positives dont les colonies présentent des caractéristiques similaires à celles de *C. m.* subsp. *sepedonicus* peuvent être isolées à partir de pommes de terre ou d'aubergines saines ou malades. Dans ce contexte, il est possible d'identifier *C. m.* subsp. *sepedonicus* à l'aide des tests suivants:

test d'immunofluorescence (point 5.1),

test sur aubergines,

tests nutritionnels et physiologiques (appendice 7):

— test d'oxydation/fermentation (O/F),

— test de l'oxydase,

— croissance à 37 °C,

— production d'uréase,

— hydrolyse de l'esculine,

— hydrolyse de l'amidon,

— tolérance d'une solution de chlorure de sodium à 7 %,

— test de l'indole,

— test de la catalase,

— production de H_2S,

— utilisation du citrate,

— hydrolyse de la gélatine,

— production d'acide à partir de glycérol, de lactose, de rhamnose et de salicinoside,

— coloration de Gram.

Il faut inclure dans chaque test une souche connue de *C. m.* subsp. *sepedonicus* à titre de témoin. Les tests nutritionnels et physiologiques doivent être effectués sur de l'inoculat provenant de repiquages sur gélose nutritive. Les comparaisons morphologiques doivent se faire à partir de cultures sur gélose nutritive avec dextrose.

Pour le test d'immunofluorescence, les populations de cellules doivent être ajustées à 10^6 cellules/ml. Le titre d'immunofluorescence doit être similaire à celui de la culture connue de *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Pour le test sur aubergines, les populations de cellules doivent être amenées à environ 10^7 cellules/ml. Ces tests doivent se faire sur 10 plantes pour chacun des organismes à tester; on utilisera également ici une culture connue de *C. m.* subsp. *sepedonicus* et de l'eau stérile à titre de témoins. Avec des cultures pures, un flétrissement typique devrait apparaître dans les 20 jours, mais les plantes ne présentant pas de symptômes à l'issue de cette période devraient continuer à incuber pendant un total de 30 jours à des températures favorables à la croissance des aubergines mais ne dépassant pas 30 °C (appendice 5). Si des symptômes ne sont pas apparus après 30 jours, on ne peut pas confirmer qu'il s'agisse d'une culture d'une forme pathogène de *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Test	C. *m.* subsp. *sepedonicus*
Test d'oxydation/fermentation (O/F)	inerte ou faiblement oxydant
Test de l'oxydase	–
Test de la catalase	+
Réduction des nitrates	–
Activité uréasique	–
Production de H_2S	–
Production d'indole	–
Utilisation du citrate	–
Hydrolyse de l'amidon	– ou faible
Croissance à 37 °C	–
Croissance dans du NaCl à 7 %	–
Hydrolyse de la gélatine	–
Hydrolyse de l'esculine	+
Acide à partir de:	
— glycérol	–
— lactose	– ou faible
— rhamnose	–
— salicinoside	–

Appendice 1

FORMULE DU LIQUIDE D'HOMOGÉNÉISATION RECOMMANDÉ PAR LELLIOTT ET SELLAR, 1976

Composé DC silicone antimousse MS A (Hopkins & Williams Ltd, Cat n° 9964-25, Chadwell Heath, Essex, Angleterre)	10 ml
Flocons de Lubrol W (ICI Ltd)	0,5 g
Pyrophosphate tétrasodique	1 g
Tampon au phosphate 0,05 M de pH 7,0 (appendice 2)	1 l

Appendice 2

TAMPONS

Tampon au phosphate 0,05 M à pH 7,0

Ce tampon peut être utilisé pour l'homogénéisation de tissu tuberculaire (point 2.1).

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
NaCl	8,0 g
Eau distillée jusqu'à	1 l

Tampon au phosphate 0,01 M à pH 7,2

Ce tampon est utilisé pour diluer les antisérums et laver les lames des tests d'immunofluorescence.

$Na_2HPO_4 . 12 H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4 . 2 H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Eau distillée jusqu'à	1 l

Solution de glycérine tamponnée au phosphate 0,1 M à pH 7,6

Ce tampon est utilisé comme support pour renforcer la fluorescence dans le test d'immunofluorescence.

$Na_2HPO_4 . 12 H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4 . 2 H_2O$	0,15 g
Glycérol	50 ml
Eau distillée	100 ml

Appendice 3

PROCÉDURE POUR LA RÉACTION DE GRAM (MODIFICATION DE HUCKER) (DOETSCH, 1981)

Solution de violet cristallisé

Dissoudre 2 g de violet cristallisé dans 20 ml d'éthanol à 95 %.

Dissoudre 0,8 g d'oxalate d'ammonium dans 80 ml d'eau distillée.

Mélanger les deux solutions.

Soluté iodo-ioduré de Lugol

Iode	1 g
Iodure de potassium	2 g
Eau distillée	300 ml

Broyer les solides ensemble à l'aide d'un pilon et d'un mortier. Ajouter à l'eau et mélanger dans un récipient fermé pour dissoudre.

Solution colorante de safranine

Solution mère:

Safranine 0	2,5 g
Éthanol 95 %	100 ml

Mélanger et stocker.

Diluer à 1:10 pour obtenir une solution de travail.

Procédure de coloration

1. Préparer les frottis, les sécher à l'air et les fixer à la chaleur.
2. Plonger la lame dans la solution de cristal violet pendant 1 minute.
3. Laver rapidement à l'eau courante.
4. Plonger dans le soluté iodo-ioduré de Lugol pendant une minute.
5. Laver à l'eau courante et sécher au buvard.
6. Décolorer en ajoutant goutte à goutte de l'éthanol à 95 % jusqu'à ce qu'il ne modifie plus la couleur ou en plongeant dans l'éthanol pendant 30 secondes tout en agitant légèrement.
7. Laver à l'eau courante et sécher au buvard.
8. Plonger dans la solution de safranine pendant 10 secondes.
9. Laver à l'eau courante et sécher au buvard.

Les bactéries Gram positives ont une couleur violet-bleu; les bactéries Gram négatives ont une couleur rose-rouge.

Appendice 4

DÉTERMINATION DE LA POPULATION DE CELLULES POSITIVES AU TEST D'IMMUNO-FLUORESCENCE

Superficie (S) d'un puits d'une lame multipuits:

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

où D = diamètre du puits.

Superficie (s) du champ de l'objectif:

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

où d = diamètre du champ.

Calculer le diamètre du champ (d) par mesure directe ou en appliquant les formules suivantes:

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

où i = coefficient du champ (dépend du type d'oculaire et varie de 8 à 24),
K = coefficient du tube (1 ou 1,25),
G = grossissement (100 fois, 40 fois, etc.) de l'objectif.

De (2), on tire: $d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$

De (3), on tire: $d = \sqrt{\frac{4 \times \frac{\pi i^2}{G^2K^2 \times 4}}{\pi}} = \frac{i}{GK}$ (4)

Compter le nombre de cellules fluorescentes typiques par champ (c).

Calculer le nombre de cellules fluorescentes typiques par puits (C).

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

Calculer le nombre de cellules fluorescentes typiques par millilitre d'extrait concentré (N):

$$N = C \times \frac{1000}{y} \times F$$

où y = volume d'extrait concentré sur le puits,
F = facteur de dilution de l'extrait concentré.

Appendice 5

CULTURE DES AUBERGINES

Semer des graines d'aubergines *(Solanum melongena* cv. Black Beauty) dans une terre de semis pasteurisée. Repiquer les plantules dans de la terre de rempotage pasteurisée lorsque les cotylédons sont entièrement développés (10 à 14 jours).

Utiliser des aubergines au stade 3 feuilles lorsque au moins 2 mais pas plus de 3 feuilles sont entièrement ouvertes (étalées)

Les aubergines doivent être cultivées en serre dans les conditions suivantes:

longueur du jour:	14 heures ou durée naturelle de la journée si elle est supérieure,
température diurne:	21 à 24 °C,
température nocturne:	15 °C.

NB: Le *C. m.* subsp. *sepedonicus* ne se développera pas à des températures supérieures à 30 °C. Si la température nocturne ne descend pas à 15 °C, des nécroses argentées peuvent survenir.

L'application d'un insecticide approprié permet de prévenir les dégâts aux racines causés par les larves de sciarides.

Les aubergines de la variété Black Beauty peuvent être commandées auprès de:

1. AB Hammenhögs Frö
   270 50 Hammenhög
   Suède
2. Hurst Seeds Ltd
   Avenue Road
   Witham
   Essex CM8 2DX
   Angleterre
3. ASGRO Italia SpA
   Corso Lodi 23
   Milan
4. KÜPPER
   Mitteldeutsche Samen GmbH
   Hessenring 22
   D-37269 Eschwege

Appendice 6

MILIEUX À UTILISER POUR LA CROISSANCE ET L'ISOLEMENT DE *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *SEPEDONICUS*

Gélose nutritive

La gélose nutritive de Difco Bacto dans de l'eau distillée à la concentration indiquée par le fabricant. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Gélose nutritive avec dextrose

La gélose nutritive de Difco Bacto contentant 1 % d-glucose (monohydraté). Stériliser à l'autoclave à 115 °C pendant 20 minutes.

Gélose avec levure, peptone et glucose

Extrait de levure de Difco bacto (nº 0127)	5 g
Peptone de Difco Bacto (nº 0118)	5 g
D-glucose (monohydraté)	10 g
Gélose purifiée de Difco Bacto (nº 0560)	15 g
Eau distillée	1 l

Stériliser par demi-litre à l'autoclave à 115 °C pendant 20 minutes.

Milieu de culture avec extrait de levure et sels minéraux

Extrait de levure de Difco Bacto	2,0 g
D-glucose (monohydraté)	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
Gélose purifiée de Difco Bacto	18 g
Eau distillée	1 l

Stériliser par demi-litre à l'autoclave à 115 °C pendant 20 minutes.

Appendice 7

TESTS NUTRITIONNELS ET PHYSIOLOGIQUES D'IDENTIFICATION DE CLAVIBACTER *MICHIGANENSIS* SUBSP. SEPEDONICUS

Tous les milieux doivent incuber à 21 °C et être examinés après 6 jours. Si on ne décèle aucune croissance, laisser incuber jusqu'à 20 jours.

— **Test d'oxydation et de fermentation (O/F)** (Hugh & Leifson, 1953)

Milieu de culture:

KCl	0,2 g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0,2 g
$NH_4H_2PO_4$	1,0 g
Peptone de Difco Bacto	1,0 g
Gélose purifée de Difco Bacto	3,0 g
D-glucose (monohydraté)	10,0 g
Bleu de bromothymol	0,03 g
Eau distillée	1 l

Mélanger et ajuster le pH à 7,0-7,2 avec du 1N KOH.

Répartir dans des tubes à culture en pyrex de 16 mm × 100 mm (d'une capacité de 12 ml), à raison de 5 et 10 ml par tube.

Stériliser à l'autoclave à 115 °C pendant 10 minutes

Inoculer chaque culture par piqûre profonde dans des tubes de 5 et 10 ml. Ajouter aseptiquement 1 à 2 ml de paraffine liquide stérile aux tubes de 10 ml. Laisser incuber.

Réaction positive

Tube	Couleur	Interprétation
ouvert fermé	jaune jaune	fermentation
ouvert fermé	jaune bleu-vert	oxydation
ouvert fermé	verdâtre bleu-vert	oxydation ou inerte

— **Test de l'oxydase** (Kovacs, 1956)

Réactif de Kovacs pour test de l'oxydase:

Solution aqueuse à 1 % de dihydrochlorure de tétraméthyle paraphénylènediamine (BDH n° 30386) dans de l'eau distillée.

Le réactif doit être fraîchement préparé en volumes de 1 ml ou peut être stocké dans une bouteille en verre brun à 5 °C pendant 1 à 4 semaines.

Dans une boîte de Petri propre, mettre une goutte de réactif sur un papier filtre. À l'aide d'une anse en platine, frotter immédiatement sur celui-ci un peu de culture du test provenant de la gélose nutritive.

Réaction positive: apparition d'une coloration pourpre dans les 10 secondes. Les cultures pour lesquelles la coloration apparaît dans un délai de 10 à 30 secondes sont considérées comme faiblement positives.

NB: Il est essentiel d'utiliser une anse en platine et des cultures faites sur gélose nutritive, car des traces de fer ou des teneurs élevées en sucre dans le milieu de culture peuvent donner des résultats faussement positifs.

— **Production d'acide à partir de lactose, de rhamnose, de salicinoside et de glycérol**

Préparer du milieu de culture pour test d'oxydation et de fermentation de Hugh & Leifson sans glucose. Répartir dans des tubes à raison de 5 ml par tube. Stériliser à l'autoclave à 115 °C pendant 10 minutes. À la base fondue portée à 45 °C, ajouter aseptiquement 0,5 ml de solution aqueuse à 10 % de glycérol, de lactose, de rhamnose ou de salicinoside, stérilisée par filtration. Mélanger soigneusement.

Réaction positive: la coloration virant du bleu-vert au jaune indique la production d'acide.

— **Test de la catalase**

Placer une goutte de peroxyde d'hydrogène (30 volumes) sur une lame propre et ajouter le contenu d'une anse de platine de la culture, en émulsionnant.

Réaction positive: la production de bulles d'oxygène dans la goutte témoigne de la présence de catalase.

— **Activité de réduction des nitrates et dénitrification** (Bradbury, 1970)

Milieu de culture:

KNO_3 (exempt de nitrites)	1 g
Extrait de levure de Difco Bacto	1 g
K_2HPO_4	5 g
Eau distillée	1 l

Répartir dans des bouteilles d'une capacité de 20 ml, à raison de 10 ml par bouteille. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Réactif A:

H_2SO_4	8g
Acide acétique 5N	1 l

Réactif B:

Naphtylamine	5 g
Acide acétique 5N	1 l

Inoculer le milieu nitrate en double. Tester après 10 et 20 jours, en ajoutant une goutte de soluté iodo-ioduré de Lugol, 0,5 ml de réactif A et 0,5 ml de réactif B. Si le milieu ne devient pas rougeâtre, ajouter environ 50 mg de poudre de zinc. Observer la couleur.

Réaction positive:	*Couleur*	
	Stade 1	Stade 2
pas de réduction du nitrate	incolore	rouge
réduction du nitrate en nitrite (uniquement réductase des nitrates)	rouge	—
réduction du nitrate au-delà du stade du nitrite (dénitrification — réductase des nitrates et nitrites)	inclolore	incolore

— **Production d'uréase** (Lelliott, 1966)

Milieu de culture:

Base de gélose avec urée d'Oxoid (CM53)	2,4 g
Eau distillée	95 ml

Stériliser à l'autoclave à 115 °C pendant 20 minutes. Refroidir jusqu'à 50 °C la base fondue et ajouter aseptiquement 5 ml de solution aqueuse d'urée à 40 % (Oxoid SR20) stérilisée par filtration. Bien mélanger.

Répartir dans des tubes stériles (16 × 100 mm) à raison de 6 ml par tube et laisser prendre dans les tubes inclinés.

Réaction positive: le milieu, de couleur jaune orangé, vire au rouge cerise ou au rose magenta s'il y a eu activité uréasique.

Utilisation du citrate (Christensen) (Skerman, 1967)

Base de gélose avec citrate (Merck 2503)	23 g
Eau distillée	1 l

Mélanger et dissoudre en chauffant. Répartir à raison de 6 ml par tube, comme pour le milieu du test de production d'uréase. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes et laisser prendre les tubes inclinés.

Réaction positive: l'utilisation du citrate est indiquée par un changement de la couleur du milieu qui de l'oranges vire au rouge.

— **Production d'hydrogène sulfuré** (Ramamurthi, 1959)

Milieu:

Tryptone de Difco Bacto (n° 0123)	10 g
K_2HPO_4	1 g
NaCl	5 g
Eau distillée	1 l

Dissoudre et répartir dans des tubes de 16 × 100 mm à raison de 6 ml par tube. Stériliser à l'autoclave à 115 °C pendant 10 minutes.

Inoculer et suspendre aseptiquement un papier à l'acétate de plomb (Merck 9511) au rebord du tube. Le maintenir avec le couvercle. Laisser incuber jusqu'à 20 jours.

Réaction positive: la production de H_2S à partir de tryptone est indiquée par l'apparition sur le papier de test d'une coloration noir-brun.

— **Production d'indole** (Ramamurthi, 1959)

Milieu:

identique à celui du test de H_2S.

Enlever le papier à l'acétate de plomb, ajouter 1 à 2 ml d'éther éthylique et secouer légèrement. Laisser décanter (5 minutes). Ajouter doucement 0,5 ml de réactif de Kovacs (Merck 9293) à l'intérieur du tube incliné.

Réaction positive: la présence d'indole est indiquée par l'apparition d'une coloration rouge dans la couche jaune entre la phase éther et la phase aqueuse.

— **Croissance à 37 °C** (Ramamurthi, 1959)

Milieu:

Bouillon de culture de Difco Bacto (n° 0003)	8 g
Eau distillée	1 l

Mélanger, dissoudre et répartir dans des tubes à raison de 6 ml par tube.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Inoculer et laisser incuber à 37 °C.

Réaction positive: croissance

— **Croissance dans du chlorure de sodium à 7 %** (Ramamurthi, 1959)

Milieu:

Bouillon de culture de Difco Bacto	8g
NaCl	70 g
Eau distillée	1 l

Mélanger, dissoudre et répartir dans des tubes à raison de 6 ml par tube.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

— **Réaction positive:** croissance.

— **Hydrolyse de la gélatine** (Lelliott, Billing & Hayward, 1966)

Milieu:

Gélatine de Difco Bacto (n° 0143)	120 g
Eau distillée	1 l

Mélanger, dissoudre en chauffant et répartir dans des tubes à raison de 6 ml par tube.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Réaction positive: liquéfaction de la gélatine même en maintenant la température à 5 °C pendant 30 minutes.

— **Hydrolyse de l'amidon**

Milieu:

Gélose nutritive de Difco Bacto (fondue)	1 l
Amidon soluble de Difco Bacto (n° 0178)	2 g

Mélanger et stériliser à l'autoclave à 115 °C pendant 10 minutes.

Verser dans les boîtes. Inoculer les boîtes par tâches.

Après une croissance suffisante (10 à 20 jours), prélever une partie du produit et le plonger dans du soluté iodo-ioduré de Lugol.

Réaction positive: des zones claires sous ou autour de la croissance bactérienne indiquent qu'il y a eu hydrolyse de l'amidon. Le reste du milieu reste pourpre.

— **Hydrolyse de l'esculine** (Sneath & Collins, 1974)

Milieu:

Peptone de Difco Bacto	10 g
Esculine	1 g
Citrate de fer (Merck 3862)	0,05 g
Citrate de sodium	1 g
Eau distillée	1 l

Dissoudre en mélangeant et répartir dans des tubes à raison de 6 ml par tube.

Stériliser à l'autoclave à 115 °C pendant 10 minutes.

Le milieu est clair, avec une fluorescence bleuâtre

Réaction positive: l'hydrolyse de l'esculine est révélée par le virage au brun et la disparition de la fluorescence. Pour la contrôler, utiliser une lampe à rayonnement ultraviolet.

RÉFÉRENCES

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 for 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 Van Vaerenbergh, J. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections *(Corynebacterium sepedonicum)* in potato. EPPO Bull., n° 17, 1987, p. 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., Billing, E. and Hayward, A. C., 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470-489.

Lelliott, R. A., and Sellar, P. W., 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 p.

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

ANNEXE II

1. Dans tous les cas d'apparition suspectée pour laquelle on a constaté, au test d'immunofluorescence pratiqué selon la méthode décrite à l'annexe I, une réaction positive devant être confirmée ou infirmée par l'achèvement de cette méthode, il convient de garder et de conserver dans des conditions appropriées jusqu'à l'achèvement de la méthode en question:

   — tous les tubercules ou plantes faisant partie de l'échantillon, dans la mesure du possible,

   — tout extrait résiduel et les lames supplémentaires préparées en vue des tests d'immunofluorescence.

2. En cas de confirmation de la présence de l'organisme, il convient de garder et de conserver dans des conditions appropriées, pendant au moins un mois après la procédure de notification prévue à l'article 5 paragraphe 2:

   — les éléments visés su point 1,

   — un échantillon d'aubergine infecté par l'inoculation d'extrait de tubercule ou de plante

   et

   — la culture isolée de l'organisme.

ANNEXE III

1. Pour déterminer l'étendue de la contamination probable visée à l'article 5 paragraphe 1 point b), il convient de prendre en considération les éléments suivants:

   — les tubercules ou les plantes cultivés en un lieu de production déclaré contaminé en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point a),

   — le(s) lieu(x) de production ou les installations ayant, dans le système de production, un lien avec les tubercules ou les plantes qui ont été déclarés contaminés en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point a), y compris ceux partageant l'équipement et les installations de production directement ou par le biais d'un entrepreneur commun,

   — les tubercules ou les plantes produits dans le(s) lieu(x) de production visé(s) au tiret précédent, ou présents dans ledit (lesdits) lieu(x) pendant la période où les tubercules ou plantes déclarés contaminés en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point a) étaient présents dans les installations ou les lieux de production visés au premier tiret,

   — les entrepôts centraux où sont manipulées des pommes de terre provenant des lieux de production susvisés,

   — tout matériel, véhicule, récipient, entrepôt ou partie de ceux-ci, ainsi que tout autre objet, y compris l'emballage, qui peut, au cours des douze mois précédents ou à tout autre moment approprié, avoir été en contact avec les tubercules ou plantes déclarés contaminés en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point a),

   — tout tubercule ou plante entreposé dans ou en contact avec un des éléments ou objets visés au tiret précédent, avant le nettoyage et la désinfection de ceux-ci

   et

   — à la suite des tests visés à l'article 6, les tubercules ou les plantes ayant la même origine clonale que les tubercules ou les plantes qui ont été déclarés contaminés en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point a) et pour lesquels les tests indiquent qu'une contamination est probable.

2. Pour déterminer la propagation possible visée à l'article 5 paragraphe 1 point c), il convient de prendre en considération les éléments suivants:

   — la proximité des autres lieux de production où sont cultivées des pommes de terre ou d'autres plantes hôtes,

   — l'origine commune des stocks de pommes de terre de semence.

3. Les modalités de la notification visée à l'article 5 paragraphe 2 premier alinéa comprennent:

   — pour tout envoi ou lot de pommes de terre déclaré contaminé, les certificats prescrits aux articles 7 ou 8 de la directive 77/93/CEE, le numéro de passeport ou d'enregistrement, selon le cas,

   — la dénomination variétale pour les stocks de pommes de terre de semence et, si possible, dans tous les autres cas,

   — une description des éléments de la contamination déclarée et de la zone délimitée,

   — l'existence d'un extrait, de lames préparées en vue de tests d'immunofluorescence, d'un échantillon d'aubergine infectée et d'une culture isolée de l'organisme provenant du test par lequel la présence de l'organisme a été confirmée.

ANNEXE IV

1. Les mesures sous contrôle officiel visées à l'article 7 paragraphe 1 pour l'élimination de tubercules ou de plantes déclarés contaminés en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point a) sont:

   — la transformation industrielle par livraison directe et immédiate à une entreprise de transformation disposant d'installations appropriées d'élimination des déchets dont il a été établi qu'elles ne présentaient aucun risque identifiable de propagation de l'organisme, ainsi que d'un système permettant de désinfecter les aires de stockage et les véhicules quittant l'entreprise,

   — d'autres mesures, pour autant qu'il soit établi qu'elles ne présentent pas de risque identifiable de propagation de l'organisme; ces mesures doivent être notifiées à la Commission et aux autres États membres.

2. L'utilisation ou l'élimination appropriée, sous le contrôle des organismes officiels responsables des États membres, des tubercules ou des plantes considérés comme probablement contaminés en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point b) et visés à l'article 7 paragraphe 2, comportent:

   — leur utilisation en tant que pommes de terre de conservation destinées à la consommation, en emballages prévus pour une livraison et une utilisation directes ne nécessitant aucun réemballage, et destinées à une telle livraison et utilisation directes

   ou

   — leur utilisation en tant que pommes de terre de conservation destinées à la transformation industrielle après livraison directe et immédiate à une entreprise de transformation disposant d'installations appropriées d'élimination des déchets et de désinfection

   ou

   — une quelconque autre utilisation ou élimination, pour autant qu'il soit établi qu'il n'existe pas de risque identifiable de propagation de l'organisme.

3. Les méthodes appropriées de nettoyage et de désinfection des objets visés à l'article 7 paragraphe 3 sont celles dont il a été établi qu'elles ne présentaient aucun risque identifiable de propagation de l'organisme; elles sont appliquées sous la surveillance des organismes officiels responsables des États membres.

4. Les mesures à mettre en œuvre par les États membres dans la zone délimitée établie en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point c) et visées à l'article 7 paragraphe 4 comprennent les mesures suivantes:

4.1. sur les lieux de production déclarés contaminés vertu de l'article 5 paragraphe 1 point a):

   a) dans un champ déclaré contaminé en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point a):

      i) — pendant au moins les trois campagnes suivant la campagne de la contamination déclarée:
         — des mesures sont prises en vue d'éliminer les plantes de pommes de pommes de terre spontanées et les autres plantes hôtes de l'organisme spontanément présentes,
         — aucun tubercule, plante ou graine de pommes de terre, aucune autre plante hôte de l'organisme spontanément présente et aucune culture pour laquelle il existe un risque identifié de survie ou de propagation de l'organisme n'est planté ni semé tant qu'il n'a pas été constaté, pendant deux campagnes consécutives au moins, que le champ ne contient pas de plantes de pommes de terre spontanées,

      — durant la première saison de récolte des pommes de terre suivant la période indiquée au tiret précédent, des pommes de terre de semence officiellement certifiées sont plantées exclusivement en vue de la production de pommes de terre de conservation et des recherches officielles sont effectuées conformément à l'article 2 paragraphe 1,

      — durant la saison de récolte des pommes de terre suivant celle visée au tiret précédent et après un cycle approprié de rotation, des pommes de terre de semence officiellement certifiées sont plantées pour la production de semence ou de pommes de terre de conservation et des recherches officielles sont effectuées conformément à l'article 2 paragraphe 1,

      ou

      ii) — pendant les quatre campagnes suivant celle de la contamination déclarée:
         — des mesures sont prises en vue d'éliminer les plantes de pommes de terre spontanées et les autres plantes hôtes de l'organisme spontanément présentes

         et

         — le champ est mis et maintenu soit en jachère nue soit en pâturage permanent et, dans ce cas, il est fréquemment fauché ras ou mis en pâturage intensif,

      — durant la première saison de récolte des pommes de terre suivant la période visée au tiret précédent, des pommes de terre de semence officiellement certifiées sont plantées pour la production de semence ou de pommes de terre de conservation et des recherches officielles sont effectuées conformément à l'article 2 paragraphe 1;

b) dans les autres champs:

— au cours de la campagne suivant la contamination déclarée:

— ou bien aucun tubercule, plante ou graine de pommes de terre, et aucune autre plante hôte de l'organisme spontanément présente n'est planté ni semé et des mesures sont prises en vue d'éliminer les plantes spontanées, le cas échéant,

— ou bien des pommes de terre de semence officiellement certifiées peuvent être plantées exclusivement en vue de la production de pommes de terre de conservation, à condition que les organismes officiels compétents acquièrent la certitude que le risque constitué par les plantes de pommes de terre spontanées et les autres plantes hôtes de l'organisme spontanément présentes a été éliminé,

— pendant au moins les deux campagnes suivant celle visée au tiret précédent, seules des pommes de terre de semence officiellement certifiées sont plantées, en vue de la production de semence ou de pommes de terre de conservation,

— au cours de chacune des campagnes visées aux points précédents, des mesures sont prises pour éliminer les plantes spontanées de pommes de terre et les plantes hôtes de l'organisme spontanément présentes et des recherches officielles sont effectuées conformément à l'article 2 paragraphe 1,

— lorsque des pommes de terre de semence officiellement certifiées sont plantées pour la production de pommes de terre de conservation au cours de la campagne suivant celle de la contamination déclarée, la récolte sur pied est inspectée à des moments appropriés et des plantes spontanées sont soumises à des tests visant à détecter la présence de l'organisme;

c) immédiatement après la déclaration de la contamination en vertu de l'article 5 paragraphe 1 point a) et au cours de chacune des campagnes suivantes, jusques et y compris la première saison de culture des pommes de terre autorisée selon les modalités exposées au point a) dans les champs déclarés contaminés, tout le matériel et les installations de stockage présents sur le lieu de production et impliqués dans la production de pommes de terre sont nettoyés et désinfectés en tant que de besoin par des méthodes appropriées, conformément au point 3;

d) dans les systèmes de production permettant le remplacement total du milieu de culture:

— aucun tubercule, plante ou graine n'est planté ni semé sauf si l'unité de production a été soumise à des mesures sous contrôle officiel visant à l'élimination de l'organisme et de toute pomme de terre ou autre végétal de la famille des solanacées, y compris au moins le remplacement complet du milieu de culture ainsi que le nettoyage et la désinfection de l'unité de production et de tout l'équipement, et si elle a par la suite été agréée pour la production de pommes de terre par les organismes officiels responsables,

— la production de pommes de terre est issue de pommes de terre de semence officiellement certifiées ou de minitubercules ou de microplantes provenant de sources testées.

4.2. À l'intérieur de la zone délimitée, sans préjudice des mesures énumérées au point 4.1, les États membres:

a) immédiatement après la contamination déclarée et pendant au moins trois périodes de végétation:

— font surveiller par leurs organismes officiels responsables les installations pratiquant la culture, le stockage et la manutention de tubercules de pommes de terre, ainsi que les locaux des entreprises exploitant sous contrat du matériel utilisé dans le secteur de la pomme de terre,

— exigent, en tant que de besoin, le nettoyage et la désinfection du matériel et des entrepôts de ces installations, par les méthodes appropriées visées au point 3,

— exigent que seules des semences certifiées soient plantées pour toutes les cultures de pommes de terre dans ladite zone,

— exigent, dans toutes les entreprises de la zone, la manutention séparée des pommes de terre de semence et des pommes de terre de conservation,

— procèdent à des recherches officielles conformément à l'article 2 paragraphe 1;

b) établissent, en tant que de besoin, un programme de remplacement de tous les stocks de pommes de terre de semence sur une période appropriée.

Les mesures mises en œuvre en vertu du point 4.2 ainsi que les numéros d'enregistrement des producteurs, des entrepôts collectifs et des centres d'expédition situés dans la zone délimitée sont notifiés chaque année aux autres États membres et à la Commission.