31993L0085

18.10.1993 *ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ* L 259/1

SMĚRNICE RADY 93/85/EHS

ze dne 4. října 1993

o ochraně proti bakteriální kroužkovitosti bramboru

RADA EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství, a zejména na článek 43 této smlouvy,

s ohledem na návrh Komise ([1]),

s ohledem na stanovisko Evropského parlamentu ([2]),

s ohledem na stanovisko Hospodářského a sociálního výboru ([3]),

vzhledem k tomu, že produkce brambor zaujímá významné místo v zemědělství Společenství; že výnos z této produkce je soustavně ohrožován škodlivými organismy;

vzhledem k tomu, že ochranou pěstování brambor proti těmto škodlivým organismům by měla nejen být zachována jejich produkční kapacita, ale také zvýšena zemědělská produktivita;

vzhledem k tomu, že ochranná opatření proti zavlékání škodlivých organismů do jednotlivých členských států by měla pouze omezený účinek, pokud by proti těmto organismům neexistovala souběžná a metodicky řízená ochrana v celém Společenství a nezamezovalo se jejich rozšiřování;

vzhledem k tomu, že jedním z nejnebezpečnějších škodlivých organismů pro brambory je *Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al.* ssp. *sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.*, původce bakteriální kroužkovitosti bramboru; že se tato choroba vyskytla v určitých částech Společenství a dosud existují některé menší zdroje choroby;

vzhledem k tomu, že dokud nebudou přijata účinná opatření k ochraně proti této chorobě a k zamezení jejího šíření, je pěstování brambor v celém Společenství trvale ohroženo;

vzhledem k tomu, že k dosažení tohoto cíle je nezbytné, aby Společenství přijalo některá opatření; že by kromě opatření uvedených ve směrnici Rady 77/93/EHS ze dne 21. prosince 1976 o ochranných opatřeních proti zavlékání organismů škodlivých rostlinám nebo rostlinným produktům do členských států ([4]) mělo být členským státům umožněno přijmout v případě potřeby doplňující nebo přísnější opatření, pokud jsou taková opatření nezbytná a nejsou překážkou obchodu s bramborami uvnitř Společenství; že tato opatření musí být oznámena ostatním členským státům a Komisi;

vzhledem k tomu, že směrnice Rady 80/665/EHS ze dne 24. června 1980 o ochraně proti bakteriální kroužkovitosti bramboru ([5]) stanovila minimální opatření, která mají členské státy učinit proti bakteriální kroužkovitosti bramboru;

([1]) Úř. věst. C 93, 2.4.1993, s. 12.
([2]) Úř. věst. C 176, 28.6.1993, s. 210.
([3]) Úř. věst. C 161, 14.6.1993, s. 18.
([4]) Úř. věst. L 26, 31.1.1977, s. 20. Směrnice naposledy pozměněná směrnicí Komise 92/103/EHS (Úř. věst. L 363, 11.12.1992, s. 1).
([5]) Úř. věst. L 180, 14. 7.1980, s. 30.

vzhledem k tomu, že od té doby byl v poznatcích o bakteriální kroužkovitosti bramboru a o zjišťování patogenů bakteriální kroužkovitosti bramboru učiněn výrazný pokrok;

vzhledem k tomu, že použití rostlinolékařského režimu Společenství pro Společenství jako prostor bez vnitřních hranic si vyžádalo přezkoumání a revizi některých ustanovení směrnice 80/665/EHS;

vzhledem k tomu, že v důsledku tohoto přezkoumání byla ustanovení směrnice 80/665/EHS shledána nedostatečnými a je nezbytné stanovená opatření dále upřesnit;

vzhledem k tomu, že by za této situace měla být zrušena směrnice 80/665/EHS a měla by být přijata nezbytná opatření;

vzhledem k tomu, že opatření musí přihlédnout ke skutečnosti, že choroba může zůstat skrytá a nepozorovaná jak v rostoucí plodině, tak i ve skladovaných hlízách, a může se jí účinně předcházet pouze pěstováním a používáním sadbových brambor, které jsou prosté infekce, a že pro určení ohnisek choroby jsou nezbytná pravidelná úřední šetření; že rozšíření patogenu v rostoucí plodině není nejdůležitějším faktorem, ale že patogen může přečkat zimu v bramborových rostlinách, které se vysemenily přirozeným způsobem (planě rostoucí rostliny), a ty jsou hlavním zdrojem choroby, která se přenáší z jednoho období do druhého; že se patogen většinou rozšiřuje při kontaktu brambor s napadenými bramborami a sázecím, sklízecím a manipulačním zařízením nebo dopravními a skladovacími kontejnery, které byly zamořeny při dřívějším kontaktu s napadenými bramborami; že tyto předměty mohou zůstat zamořenými po určitou dobu po tomto zamoření; že může být rozšíření patogenu sníženo nebo mu lze předejít dezinfekcí těchto předmětů; že každá takové zamoření sadbových brambor přináší velmi velké nebezpečí rozšíření patogenu;

vzhledem k tomu, že je žádoucí, aby členské státy úzce spolupracovaly s Komisí v rámci Stálého rostlinolékařského výboru (dále jen „výbor“) při stanovení podrobností těchto obecných, jakož přísnějších nebo doplňujících opatření, učiněných členskými státy na ochranu proti zavlečení patogenu na jejich území,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Směrnice se týká opatření, která mají být přijata členskými státy proti *Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al.* ssp. *sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.,* vyvolávající bakteriální kroužkovitost bramboru (dále jen „organismus“), aby:

a) se zjistilo ohnisko choroby a určilo její rozšíření;

b) se předešlo výskytu choroby a jejímu rozšíření; a

c) se v případě výskytu předešlo rozšíření a prováděla se ochranná opatření za účelem její eradikace.

Článek 2

1. Členské státy provádějí za účelem potvrzení nepřítomnosti organismu pravidelná úřední šetření organismu zaměřená na zjištění organismu na hlízách a v případě potřeby na rostlinách bramboru (*Solanum tuberosum L.*) pocházejících z jejich území.

Pro tato šetření se v případě hlíz odebírají vzorky sadbových i ostatních brambor, především ze skladovaných zásilek, a podrobují se úředním nebo úředně kontrolovaným laboratorním testům pomocí metody na zjištění a určení organismu uvedené v příloze I. Kromě toho může být v případě potřeby u ostatních vzorků provedena úřední nebo úředně kontrolovaná vizuální kontrola rozříznutím hlíz.

U rostlin se tato šetření provádějí podle odpovídajících metod a vzorky se podrobují příslušným úředním nebo úředně kontrolovaným testům.

O počtu, původu, složení a časovém rozvrhu při shromažďování vzorků rozhodnou příslušné úřední subjekty podle směrnice 77/93/EHS na základě uznávaných vědeckých a statistických zásad a biologie organismu a s přihlédnutím k zvláštním systémům produkce brambor příslušných členských států. Podrobnosti týkající se těchto šetření se předkládají ročně ostatním členským státům a Komisi, aby se zajistily srovnatelné úrovně záruk členských států pro potvrzení nepřítomnosti organismu.

2. Výsledky úředních šetření stanovených v odstavci 1 se oznamují nejméně jednou ročně ostatním členským státům a Komisi. Podrobnosti těchto oznámení jsou důvěrné. Mohou být předloženy výboru postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS.

3. Postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS mohou být přijata:

— pravidla pro šetření stanovená v odstavci 1, která se provádějí na základě uznávaných vědeckých a statistických zásad,

— pravidla pro oznámení uvedená v odstavci 2.

4. Postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS se přijmou tato ustanovení:

— vhodná metoda pro šetření a testy uvedené v odst. 1 třetím pododstavci.

Článek 3

Členské státy zajistí, aby bylo jakékoli podezření z výskytu nebo potvrzená přítomnost organismu v rostlinách bramboru a hlízách nebo v hlízách sklízených, skladovaných nebo uváděných na trh na jejich území sděleny příslušným úředním subjektům těchto členských států.

Článek 4

1. V případě podezření z výskytu zajistí příslušné úřední subjekty členského státu, ve kterém byly tyto případy ohlášeny, provedení úředních nebo úředně kontrolovaných laboratorních testů pomocí metody uvedené v příloze I a za podmínek uvedených v bodě 1 přílohy II, aby potvrdily nebo vyvrátily podezření z výskytu. Je-li potvrzena přítomnost organismu, použije se bod 2 přílohy II.

2. Až do potvrzení nebo vyvrácení podezření z výskytu podle odstavce 1, v případech, kdy byly zjištěny:

i) diagnostické vizuální příznaky choroby; nebo

ii) pozitivní reakce na imunofluorescenční test podle přílohy I nebo jiný odpovídající test;

příslušné úřední subjekty členských států:

a) zakážou pohyb všech partií nebo zásilek, ze kterých byly odebrány vzorky, s výjimkou partií nebo zásilek, které jsou pod jejich kontrolou, a u nichž bylo stanoveno, že neexistuje zjistitelné nebezpečí rozšíření organismu;

b) učiní nezbytná opatření, aby zjistily původ podezřelého výskytu;

c) zavedou vhodná doplňující bezpečnostní opatření založená na stupni odhadovaného nebezpečí, aby předešly jakémukoli rozšíření organismu. Mezi tato opatření může být zahrnuta úřední kontrola pohybu všech ostatních hlíz nebo rostlin v rámci prostor nebo mimo prostory spojené s podezřelým výskytem.

3. Postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS mohou být přijata tato ustanovení:

— ustanovení uvedená v odst. 2 písm. c).

4. Postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS se přijímají tato ustanovení:

— jiný odpovídající test stanovený v odst. 2 bodu ii).

Článek 5

1. Pokud úřední nebo úředně kontrolovaný laboratorní test pomocí metody uvedené v příloze I potvrdí přítomnost organismu ve vzorku hlíz, rostlin nebo částí rostlin, příslušné úřední subjekty členského státu na základě uznávaných vědeckých zásad, biologie organismu a zvláštních systémů produkce, uvádění na trh nebo zpracování v daném členském státě:

a) označí hlízy nebo rostliny, zásilku a/nebo partii, a zařízení, vozidlo, plavidlo, sklad nebo jejich jednotky a veškeré jiné předměty včetně obalového materiálu, z něhož byl vzorek odebrán, a v případě potřeby místo(a) produkce a pozemky, na nichž se hlízy nebo rostliny sklízely, za zamořené;

b) s přihlédnutím k bodu 1 přílohy III určí rozsah pravděpodobného zamoření, které vzniklo předsklizňovým nebo posklizňovým kontaktem s prvky označenými za zamořené nebo vztahem s nimi v rámci produkčního systému;

c) vymezí oblast na základě označení zamoření podle písmene a), určí rozsah pravděpodobného zamoření podle písmene b) a možného rozšíření organismu s přihlédnutím k bodu 2 přílohy III.

2. Členské státy neprodleně oznámí postupem podle bodu 3 přílohy III ostatním členským státům a Komisi jakékoli zamoření označené podle odst. 1 písm. a), jakož i podrobné informace o vymezení oblasti podle odst. 1 písm. c).

Podrobnosti tohoto oznámení jsou důvěrné. Mohou být předloženy výboru postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS.

3. V důsledku oznámení podle odstavce 2 a podle prvků v něm uvedených označí ostatní členské státy, které jsou v oznámení uvedeny, přiměřeným způsobem zamoření podle odst. 1 písm. a), stanoví rozsah pravděpodobného zamoření podle odst. 1 písm. b) a vymezí oblast podle odst. 1 písm. c).

Článek 6

Členské státy nařídí, aby se v případě označení hlíz nebo rostlin za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a) provedlo v souladu s čl. 4 odst. 1 testování zásob brambor klonově příbuzných zamořeným bramborám. Testování se provede na takovém množství hlíz nebo rostlin, které je potřeba ke stanovení prvotního zdroje choroby a rozsahu pravděpodobného zamoření, a zejména podle stupně nebezpečí.

V důsledku testování se v případě potřeby provede další označení zamoření podle čl. 5 odst. 1 písm. a), určení rozsahu pravděpodobného zamoření podle čl. 5 odst. 1 písm. b) a vymezení oblasti podle čl. 5 odst. 1 písm. c).

Článek 7

1. Členské státy nařídí, že hlízy nebo rostliny označené za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a) nesmí být sázeny a musí být pod kontrolou jejich příslušných úředních subjektů:

— zničeny nebo

— odstraněny jiným způsobem v rámci opatření prováděných pod úřední kontrolou v souladu s bodem 1 přílohy IV, pokud bylo stanoveno, že neexistuje zjistitelné nebezpečí rozšíření organismu

2. Členské státy nařídí, že se hlízy nebo rostliny označené jako pravděpodobně zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. b) nesmí sázet a musí být pod kontrolou příslušných úředních subjektů, aniž jsou dotčeny výsledky testů uvedených v článku 6 pro klonově příbuzné hlízy nebo rostliny, použity nebo odstraněny vhodným způsobem uvedeným v bodě 2 přílohy IV tak, aby mohlo být stanoveno, že neexistuje zjistitelné nebezpečí rozšíření organismu.

3. Členské státy nařídí, že každé zařízení, vozidlo, plavidlo, sklad nebo jejich jednotky a veškeré jiné předměty včetně obalového materiálu, které byly označeny za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a) nebo označeny za pravděpodobně zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. b), se buď zničí, nebo vyčistí a dezinfikují příslušnými metodami uvedenými v bodu 3 přílohy IV. Po vydezinfikování se takové předměty již nepovažují za zamořené.

4. Aniž jsou dotčena ustanovení provedená podle odstavců 1, 2 a 3, členské státy nařídí, aby byla v oblasti vymezené podle čl. 5 odst. 1 písm. c) provedena různá opatření podle bodu 4 přílohy IV.

Článek 8

1. Členské státy nařídí, že sadbové brambory musí splňovat požadavky směrnice 77/93/EHS a musí v přímé linii pocházet z materiálu získaného podle úředně schváleného programu, který byl při úředním nebo úředně kontrolovaném testu pomocí metody uvedené v příloze I shledán prostým organismu.

Uvedené testování se provádí:

— v případech, kdy se zamoření týká produkce sadbových brambor na rostlinách původního klonového výběru,

— v ostatních případech buď na rostlinách původního klonového výběru, nebo na reprezentativních vzorcích základní kategorie sadbových brambor nebo dřívějších stupňů množení.

2. Postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS mohou být přijata tato ustanovení:

— prováděcí pravidla k odst. 1 druhému pododstavci první odrážce,

— pravidla týkající se reprezentativních vzorků stanovených v odst. 1 druhém pododstavci tohoto článku.

Článek 9

Členské státy zakážou držení organismu a nakládání s ním.

Článek 10

Aniž jsou dotčena ustanovení směrnice 77/93/EHS, členské státy jsou oprávněny povolit odchylky od opatření uvedených v článcích 6, 7 a 9 této směrnice k pokusným nebo vědeckým účelům a k šlechtitelské práci, pokud tyto odchylky nejsou na újmu ochrany proti organismu a nevyvolávají nebezpečí jeho rozšíření.

Článek 11

Členské státy mohou přijmout doplňující nebo přísnější pravidla k ochraně proti organismu nebo k zabránění jeho rozšíření, pokud jsou tato opatření v souladu se směrnicí 77/93/EHS.

Doplňující opatření uvedená v prvním pododstavci mohou zahrnovat povinnost sázet pouze sadbové brambory, které jsou certifikované nebo úředně prověřené a které splňují požadované rostlinolékařské normy. Tyto rostlinolékařské normy lze použít zejména v případě, kdy jsou zemědělci ve svých podnicích oprávněni k používání sadbových brambor získaných z vlastní sklizně, jakož i v ostatních případech, kdy se sázejí sadbové brambory vypěstované producentem.

Podrobnosti o těchto opatřeních se oznamují ostatním členským státům a Komisi.

Článek 12

Změny příloh této směrnice na základě vývoje vědeckých nebo technických znalostí se přijmou postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS.

Článek 13

1. Členské státy přijmou a zveřejní ustanovení nezbytná pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 15. listopadu 1993. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Tato opatření přijatá členskými státy musí obsahovat odkaz na tuto směrnici nebo musí být takový odkaz učiněn při jejich úředním zveřejnění. Způsob odkazu si stanoví členské státy.

Členské státy použijí tato ustanovení ode dne 16. listopadu 1993.

2. Členské státy neprodleně sdělí Komisi znění všech ustanovení vnitrostátních právních předpisů, které přijmou v oblasti působnosti této směrnice. Komise o nich uvědomí ostatní členské státy.

Článek 14

Směrnice 80/665/EHS se zrušuje ode dne 16. listopadu 1993.

Článek 15

Tato směrnice je určena členským státům.

V Lucemburku dne 4. října 1993.

Za Radu

předseda

W. CLAES

PŘÍLOHA I

METODA PRO ZJIŠTĚNÍ A URČENÍ BAKTERIÁLNÍ KROUŽKOVITOSTI BRAMBORU, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS (Smith) Davis et al.* ssp. *SEPEDONICUS (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.* VE SVAZCÍCH BRAMBOROVÝCH HLÍZ

1. **Odstranění výkrojků z pupkové části hlízy**

1.1. Omyjte 200 hlíz pod tekoucí vodou a pomocí řádně vydezinfikovaného skalpelu nebo škrabky na brambory odstraňte epidermis okolo pupkového konce každé hlízy; dezinfekci lze provést tak, že se nástroj smočí v 70 % roztoku ethanolu a ožehne.

1.2. Pečlivě odstraňte nožem nebo škrabkou na brambory konické výkrojky pletiva z pupkové části konců brambor. Omezte na minimum nadbytečnou část pletiva nezahrnující cévní svazky. Po vykrojení by měly být výkrojky z pupkových konců zpracovány do 24 hodin (viz odstavec 3) nebo konzervovány při −20 °C po dobu nejdéle dvou týdnů.

2. **Vizuální vyšetření na přítomnost příznaků kroužkovitosti**

Po odebrání výkrojků z pupkových konců rozřízněte každou hlízu napříč a prohlédněte, zda vykazuje příznaky kroužkovitosti.

Zmáčkněte hlízy a sledujte, zda z vodivých pletiv vystupuje macerovaná hmota.

Nejranějšími příznaky jsou slabá sklovitost nebo průsvitnost pletiva bez měknutí v okolí cévního systému, zejména blízko pupku. Prstenec svazků cévních na pupkovém konci hlízy může mít nepatrně tmavší zbarvení než normálně. Prvním dobře identifikovaným příznakem je žlutavé zabarvení prstence cévních svazků a při jemném zmáčknutí hlízy vystupují z cév sloupky sýrové hmoty. Tento exsudát obsahuje milióny bakterií. V tomto stadiu mohou vodivá pletiva hnědnout. Zpočátku mohou být tyto příznaky omezeny na jednu část prstence, nemusí se vyskytovat jen blízko pupkové části a mohou se postupně šířit na celý prstenec. S postupem infekce dochází k destrukci vodivých pletiv: vnější korová část se v tomto místě může oddělit od vnitřní korové části. V pokročilých stadiích infekce se objevují na povrchu hlízy praskliny, často s červenohnědými okraji. Druhotná houbová nebo bakteriální infekce může příznaky maskovat a může být obtížné, ne-li nemožné, rozlišit pokročilé příznaky kroužkovitosti od jiných hnilob bramboru.

3. **Příprava vzorků pro Gramovo barvení, imunofluorescenci (IF) a test na lilku vejcoplodém**

3.1. Homogenizujeme pupkové konce hlíz až do úplné macerace v kapalině netoxické pro *Corynebacterium sepedonicum* (např. 0,05 M fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku (PBS) pH 7,0) při teplotě nižší než 30 °C; lze doporučit přidání netoxického prostředku proti vločkování (deflokulant) a netoxický protipěnový prostředek (dodatky 1 a 2). Neměla by se připustit nadměrná macerace.

3.2. Bakterie z homogenátu extrahujte jedním z následujících postupů ([1]):

A. a) Odstřeďujte při nejvýše 180 g po dobu 10 minut.

b) Odstřeďujte supernatant při zrychlení nepřesahujícím 4 000 g po dobu 10 min. Dekantujte a odstraňte supernatant.

B. a) Nechte macerát stát 30 min., aby se usadila drť pletiv. Dekantujte supernatant, aniž by se rozvířil sediment.

b) Supernatant přefiltrujte přes filtrační papír (Whatman No 1) umístěný v sintrovaném skleněném filtru (č. 2 = 40–100 μm) pomocí vodní vývěvy. Filtrát seberte do centrifugačních zkumavek. Filtr promyjte sterilním PBS až do maximálního objemu filtrátu 35 ml.

c) Odstřeďujtefiltrát při nejméně 4 000 g po dobu 20 minut.

3.3. Suspendujte peletu ve sterilním 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,2 (Dodatek 2), abyste získali celkový objem přibližně 1 ml. Suspenzi rozdělte na dvě stejné části a jednu část uschovejte pro účely srovnávání (referenční vzorek) zmrazením při −20 °C ([2]) nebo lyofilizací. Druhou část suspenze rozdělte na dvě poloviny. Jednu použijte na IF test a barvení podle Grama, druhou pro test na lilku vejcoplodém.

([1]) Alternativní metoda extrakce uvádí Dinesen, 1984.

([2]) Existuje důkaz (Janse a Vaerenberg, 1987), že zmražení může snížit životnost *Corynebacterium sepedonicum*. Tento problém lze vyřešit suspendováním pelety v 10 % roztoku glycerolu.

3.4. Je nezbytně nutné, aby se se všemi pozitivními kontrolami a vzorky *C. sepedonicum* zacházelo odděleně, aby se předešlo zamoření. To se týká i sklíček na IF testy a testů na lilku vejcoplodém.

4. *Gramovo zbarvení*

4.1. Připravte Gramovo barvení pro všechna ředění pelety (5.2.1) a pro veškeré rozříznuté hlízy (2), které vykazují sklovitost, hnitít nebo jiné podezřelé příznaky. Vzorky by měly být odebrány z okraje napadených pletiv.

4.2. Připravte Gramovo barvení pro známé kultury *C. sepedonicum*, a pokud je to možné pro pletivo infikované přirozenou cestou (5.1).

4.3. Určete, které vzorky obsahují typické gramopozitivní koryneformní buňky. Buňky *C. sepedonicum* jsou obvykle 0,8 až 1,2 µm dlouhé a 0,4 až 0,6 µm široké.

Vhodná metoda barvení je uvedena v dodatku 3.

Preparáty z přirozených infekcí nebo z čerstvě izolovaných kultur často převládají kokovité tyčinky, které jsou poněkud menší než buňky ze starších agarových kultur. Buňky *C. sepedonicum* jsou na většině živých médií pleomorfními koryneformními tyčinkami a mohou vykazovat proměnlivou reakci podle Gramai. Buňky jsou jednotlivé, ve dvojicích s charakteristickými zahnutími do „V" nebo „Y" typickým pro dělení kroutivým ohybem a příležitostně v nepravidelných skupinách často označovaných jako palisády a čínská písmena.

5. **Schéma pro IF test**

5.1. Použijte antisérum proti známému kmenu *C. sepedonicum* kroužkovitosti - ATCC33113 (NCPPB 2137) nebo NCPPB 2140. Toto antisérum by mělo mít větší IF titr než 1: 600. Zařaďte jednu kontrolu PBS na testovací podložní sklíčko ke stanovení, zda nedojde k nespecifické kombinaci bakteriálních buněk s konjugátem fluorescenčního isothiokyanátu a antikráličího imunoglobulinu (FITC). *Corynebacterium sepedonicum* (ATCC 33113, NCPPB 2137, NCPPB 2140) by se měla použít jako homologická kontrola antigenů na jiném podložním sklíčku. Na stejném podložním sklíčku by se měla jako paralelní kontrola používat přirozeně infikovaná pletiva (uchovávaná lyofilizací nebo zmrazením při –20 °C) (obr. 2).

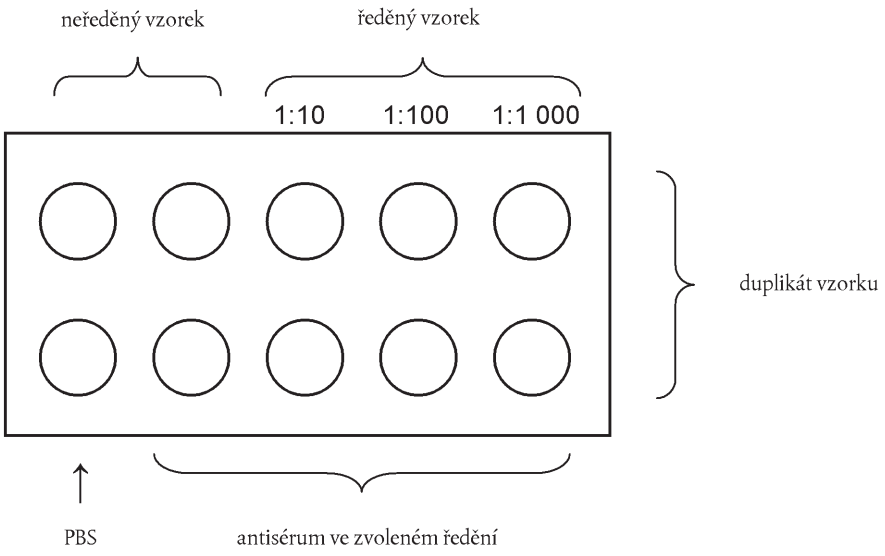
5.2. *Postup*

5.2.1. Připravte řadu tři desetinásobných ředění (10^1,10^2,10^3) výsledné pelety v destilované vodě (obr. 1).

5.2.2. Do jamek vícejamkového sklíčka napipetujte z každého ředění pelety nebo suspenze *C. sepedonicum* (přibližně 10^6 buněk/ml) změřený standardní objem dostačující k naplnění jamky (přibližně 25 ml) (obr. 1)

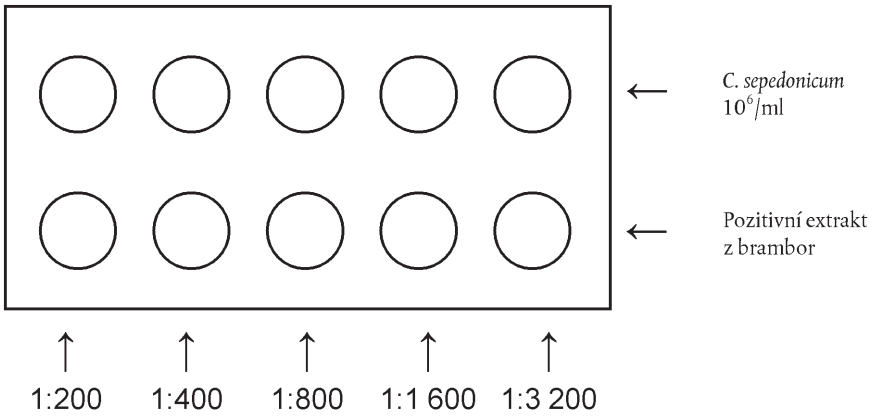
Obrázek 1

Sklíčko se vzorkem a kontrolním fosfátovým pufrem (PBS)



Obrázek 2

Sklíčko s pozitivní kontrolou



5.2.4. Zaplňte příslušné jamky antisérem *C. sepedonicum* v doporučených ředěních roztokem 0,01 M PBS pH 7,2 (Dodatek 2), jak je uvedeno na obrazku 1 (Použijte PBS pro kontrolu FITC). Pracovní ředění antiséra by mělo mít přibližně polovinu titru IF. Jestliže se má pracovat s jinými ředěními antiséra, měla by se připravit pro každé ředění, s nímž se má pracovat, samostatná sklíčka.

5.2.5. Inkubujte ve vlhké komůrce při pokojové teplotě po dobu 30 minut.

5.2.6. Pečlivě opláchněte roztokem 0,01 M PBS pH 7,2. Promývejte po dobu pěti minut ve třech vždy vyměněných roztocích 0,01 M PBS pH 7,2.

5.2.7. Pečlivě odstraňte přebytečnou vlhkost.

5.2.8. Do každé jamky přidáme konjugát FITC ve zředění používaném ke stanovení titru a necháme inkubovat ve tmavé vlhké komůrce při pokojové teplotě po dobu 30 minut.

5.2.9. Opláchněte a omývejte jako v předcházejícím případě.

5.2.10. Do každé jamky přidejte přibližně 5 – 10 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,6 s glycerinem (nebo podobnou látkou o pH neklesajícím pod 7,6) a přikryjeme krycím sklíčkem (Dodatek 2).

5.2.11. Prohlédněte pod mikroskopem, vybaveným zdrojem epifluorescenčního světla a filtry vhodnými pro práci s FITC. Vhodné je zvětšení od 400 do 1 000. Pečlivě prohlédneme jamky v přímkách jdoucích v pravých úhlech středem a po obvodu jamky.

Pozorujte fluoreskující buňky v pozitivních kontrolách a určete titr. Pozorujte fluoreskující buňky v jamce s kontrolou FITC/PBS a pokud se zde nevyskytují, přejděte k jamkám testovacích vzorků. V nejméně 10 mikroskopových polích určete průměrný počet morfologicky typických fluoreskujících buněk v jednom poli a vypočítejte jejich počet na 1 ml neředěné pelety (dodatek 4).

Existuje několik problémů podstatných pro imunofluorescenční test.

— V peletách bramboru se pravděpodobně vyskytnou doprovodné populace fluoreskujících buněk s atypickou morfologií a křížově reagující saprofytické bakterie s rozměry a morfologií podobnou *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. V úvahu bereme pouze fluoreskující buňky s typickou velikostí a morfologií.

Vzhledem k možnosti křížových reakcí by měly být vzorky s pozitivním imunofluorescenčním testem opětovně testovány pomocí odlišného antiséra.

— Technický limit zjištění touto metodou je mezi 10^3 a 10^4 buněk/ml neředěné pelety. Vzorky s počtem IF typických buněk na hranici detekčního limitu jsou obvykle pro *C. m.* ssp. *sepedonicus* negativní, ale mohou být postoupeny do testu na lilku vejcoplodém.

Imunofluorescenční test se považuje za negativní u kteréhokoliv vzorku, kde nebyly nalezeny morfologicky typické fluoreskující buňky. Vzorky se považují za „nezamořené“ *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Test na lilku není požadován.

Imunofluorescenční test se považuje za pozitivní u kteréhokoliv vzorku, kdebyly nalezeny morfologicky typické fluoreskující buňky.

Vzorky, u kterých byl pozitivní imunofluorescenční test u obou užitých antisér, se považují za *„pravděpodobně zamořené“ Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*.

Test na lilku je požadován pro všechny vzorky považované za pravděpodobně zamořené

6. **Test na lilku vejcoplodém**

Podrobnosti o pěstování jsou uvedeny v dodatku 5.

6.1. Peletu podle 3.3. rozdělíme mezi alespoň 25 rostlin lilku vejcoplodého ve fázi tří listů (dodatek 5) jednou z níže uvedených metod (6.2, 6.3 nebo 6.4).

6.2. *Inokulace zářezemI*

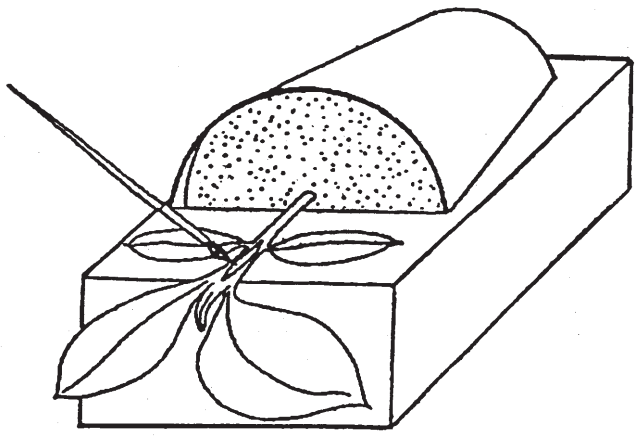
6.2.1. Každý květináč horizontálně podepřeme (pro 10 cm květináč je vhodný blok pěnového polystyrénu s vyhloubenou částí o rozměrech 5 cm hloubky, 10 cm šířky a 15 cm délky, viz obr. 3). Pro každý testovaný vzorek by se měl mezi stonek a blok umístit proužek sterilní hliníkové fólie. Rostlinu je možno fixovat na místě gumovým páskem kolem bloku.

6.2.2. Pomocí skalpelu proveďte mezi děložními lístky a prvním pravým listem podélný nebo mírně úhlopříčný řez dlouhý 0,5 až 1,0 cm a hluboký přibližně jako tři čtvrtiny průměru stonku.

6.2.3. Držte zářez otevřený pomocí špičky čepele skalpelu a naneste do něj inokulum štětečkem na oční linky nebo jemným malířským štětečkem namočeným do pelety. Rozdělte zbytek pelety mezi všechny testovací rostliny lilku.

6.2.4. Překryjte řez sterilní vazelínou aplikovanou 2 ml injekční stříkačkou.

Obrázek 3



6.3. *Inokulace zářezem II*

6.3.1. Držte rostlinu dvěma prsty, na stonek napipetujte mezi děložními lístky a prvním pravým listem kapku (přibližně 5 až 10 µl) suspendované pelety.

6.3.2. Pomocí sterilního skalpelu udělejte sešikmený zářez (v úhlu přibližně 5°), dlouhý 1,0 cm a hluboký přibližně jako 2/3 tloušťky stonku, přičemž s řezem začneme v místě kapky suspendované pelety.

6.3.3. Zakryjte řez sterilní vazelínou z injekční stříkačky.

6.4. *Inokulace injekční stříkačkou*

6.4.1. Nezalévejte lilky den před inokulací, aby se snížilo vnitřní napětí buňky (turgor).

6.4.2. Stonky lilku vejcoplodého inokulujte těsně nad děložními lístky pomocí injekční stříkačky s podkožní jehlou (ne méně než 23G). Peletu rozdělte mezi testovací rostliny lilku vejcoplodého.

6.5. Inokulujte 25 rostlin stejnou inokulační metodou (6.2, 6.3 nebo 6.4) známou kulturou *C. sepedonicum*a a v případě potřeby i pletivem z přirozeně infikovaných hlíz bramboru (5.1).

6.6. Inokulujte 25 rostlin sterilním 0,05 M PBS stejnou inokulační metodou (6.2, 6.3 nebo 6.4).

6.7. Nechte inokulovat rostliny ve vhodných podmínkách (dodatek 5) po dobu 40 dní. Pravidelně po osmi dnech prověřujte přítomnost příznaků. Spočítejte rostliny vykazující příznaky. *C. sepedonicum* působí u lilku vejcoplodého vadnutí listů, které může začít jako okrajová nebo mezižilková ochablost (ztráta turgoru). Zvadlé pletivo může zprvu být tmavozelené nebo strakaté, ale než znekrotizuje, zesvětlí. Povadlá místa mezi žilnatinou mívají často mastně vodnatý vzhled. Nekrotická pletiva mívají často jasně žlutý okraj. Rostliny vždy neodumírají; čím déle trvá období do vyvinutí příznaků, tím je větší naděje na přežití. Rostliny mohou infekci odrůst. Náchylné mladé rostliny lilku vejcoplodého jsou mnohem citlivější vůči nízkým koncentracím *C. sepedonicum* než starší rostliny, proto je nezbytné používat rostliny ve fázi tří listů a nebo krátce před ní.

Vadnutí mohou také způsobovat populace jiných bakterií nebo hub přítomných v peletě z pletiv hlízy. Patří k nim *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* a *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata*, jakož i velké koncentrace saprofytických bakterií. Tyto případy vadnutí lze odlišit od případů způsobených kroužkovitostí, jelikož rychle vadnou celé listy nebo celé rostliny.

6.8. Připravte Gramovo barvení (4) pro všechny partie lilku vejcoplodého vykazující příznaky napadení. Použijte části zvadlých listových pletiv a pletivo ze stonků rostlin a izolujte je na vhodných živných médiích (7). Listy a stonky lilku vejcoplodého dezinfikujte povrchově otřením 70 % ethanolem.

6.9. Za určitých okolností, zejména pokud nejsou růstové podmínky optimální, se může stát, že *C. sepedonicum* zůstává jako latentní infekce v rostlinách lilku vejcoplodého dokonce i po 40 denní inkubací. Takové infekce mohou mít případně za následek zakrnělost a ztrátu vitality inokulovaných rostlin. Pokud je IF test považován za pozitivní, může být považováno za nezbytné další testovat. Je proto důležité porovnávat rychlost růstu všech testovacích rostlin lilku vejcoplodého s kontrolami inokulovanými sterilním 0,05 M PBS a sledovat podmínky prostředí ve skleníku.

Pro další testování se stanoví tato doporučení:

6.9.1. Odřízněte stonky nad místem inokulace a odstraňte listy.

6.9.2. Macerujte stonky v roztoku 0,05 M PBS s pH 7,0, jak je uvedeno v bodech 3.1 až 3.2.

6.9.3. Použijte polovinu pelety k provedení Gramova barvení (4) a testu IF (5).

6.9.4. Použijte druhou polovinu pelety k provedení dalšího testu na lilku vejcoplodém (6), pokud je Gramovo barvení a/nebo IF test pozitivní. Jako kontroly použijte známou kulturu *C. sepedonicum* a sterilní 0,05 M PBS. Pokud v následující testu nejsou příznaky napadení pozorovány, považuje se vzorek za negativní.

7. **Izolace C. sepedonicum**

Diagnóza může být potvrzena pouze tehdy, je-li *C. sepedonicum* izolována a takto identifikována (8). Ačkoliv je *C. sepedonicum* náročným organismem, je možno ji izolovat z pletiv projevujících příznaky napadení. Mohou ji však přerůst rychle rostoucí saprofytické bakterie, a proto se nedoporučují provádět izolaci přímo z pelety pletiva hlízy (3.3). Lilek vejcoplodý je výtečným selektivním obohacovacím živným médiem pro růst *C. sepedonicum* a zároveň je také vhodný pro použití k potvrzujícímu testu pomocí hostitelské rostliny.

Izolace by se měly provádět ze všech hlíz bramboru a rostlin lilku vejcoplodého vykazující příznaky napadení (4.6). Kde je to nezbytné, je třeba provést maceraci stonků lilku jako v bodech 3. a 6.9.

7.1. Rozetřete suspenzi na jedno z následujících médií: (složení uvedena v dodatku 6):

živný dextrózový agar (pouze pro subkultury),

kvasničný pepton glukózový agar,

živný kvasničný dextrózový agar,

agar z kvasničného extraktu s minerálními solemi

Inkubujte po dobu maximálně 20 dní při teplotě 21 °C

C. sepedonicum pomalu roste a obvykle vytváří za 10 dnů kolonie velikosti špendlíkové hlavičky, vyklenuté, smetanově zbarvené.

Pro zaručení čistoty kultury znovu rozetřete

U subkultur se zlepšuje rychlost růstu. Typické kolonie jsou smetanově bílé nebo barvy slonoviny, jsou okrouhlé, hladké, vyvýšené, konvexně vyklenuté, slizovitě tekuté, s rovnými okraji a obvykle mají v průměru 1–3 mm

Identifikace

Ze zdravých i nemocných brambor a lilku je možné izolovat mnohé grampozitivní koryneformní bakterie se znaky kolonií podobnými jako u kroužkovitosti. V této souvislosti musí být kroužkovitost identifikována následujícími testy:

IF test (5.1),

test na lilku vejcoplodém,

nutriční a fyziologické testy (dodatek 7),

— oxidačněfermentační testy (O/F),

— oxidasový test,

— růst při 37 °C,

— tvorba ureasy,

— hydrolýza eskulinu,

— hydrolýza škrobu,

— tolerance k 7 % roztoku NaCl,

— indolový test,

— katalasový test,

— tvorba H_2S,

— využití citrátu,

— hydrolýza želatiny,

— tvorba kyseliny z: glycerolu, laktosy, rhamnosy a salicinu,

— Gramovo barvení.

Všechny testy by měly zahrnovat kontrolu se známým kmenem *C. sepedonicum*. Nutriční a fyziologické testy by měly být provedeny s inokulem ze subkultur na živým agaru. Morfologická srovnání by se měla provádět z kultur z živného dextrosového agaru.

Pro IF test by hustota populace buněk měla být upravena na 10^6 buněk/ml. IF titr by měl být podobný známé kultuře *C. sepedonicum*.

Pro test na lilku vejcoplodém by měla být hustota populace buněk upravena na 10^7 buněk/ml. Testy na lilku vejcoplodém by měly zahrnovat 10 rostlin pro každý testovaný organismus, opět za použití kontrol tvořených známou kulturou *C. sepedonicum* a sterilní vodou. U čistých kultur by mělo během 20 dnů nastat typické vadnutí, avšak rostliny, které nevykazují žádné příznaky napadení po této době, je nutno inkubovat celkem 30 dní při teplotách příznivých pro růst lilku, ale nepřesahujících 30 °C (dodatek 5). Jestliže se po 30 dnech příznaky napadení nevyskytují, nemůže být kultura považována za patogenní formu *Corynebacterium sepedonicum*.

Test	C. sepedonicum
O/F	inertní nebo slabě oxidační
Oxidasa	–
Katalasa	+
Redukce nitrátů	–
Aktivitat ureasy	–
Tvorba H2S	–
Tvorba indolu	–
Využívání citrátu	–
Hydrolýza škrobu	– nebo slabá
Růst při 37 °C	–
Růst v 7 % NaCl	–
Hydrolýza želatiny	–
Hydrolýza eskulinu	+
Tvorba kyseliny z:	
– glycerolu	–
– laktosy	– nebo slabá
– rhamnosy	–
– salicinu	–

Dodatek 1

SLOŽENÍ MACERAČNÍHO ROZTOKU DOPORUČENÉ LELLIOTEM A SELLAREM, 1976

D C silikonový protipěnivý prostředek MS A (Hopkins & Williams Ltd., kat. č. 9964-25, Chadwell Heath, Essex, England)	10 ml
vločky Lubrol W (ICI Ltd)	0,5 g
pyrofosforečnan čtyřsodný	1 g
0,05 M fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku (PBS) pH 7,0 (dodatek 2)	1 litr

Dodatek 2

PUFRY

0,05 M PBS pH 7,0

Tento pufr může být použit pro maceraci pletiv hlíz (2.1.)

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
NaCl	8,0 g
destilovaná voda nejvýše	1 litr

0,01 M PBS pH 7,2

Tento pufr se používá pro ředění antiséra a omývání sklíček pro IF

$Na_2HPO_4 12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4 2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
destilovaná voda nejvýše	1 litr

0,01 M fosfátový pufr s glycerinem pH 7,6

Tento pufr se používá v IF testu jako krycí tekutina na podloužní sklíčko ke zvýšení fluorescence

$Na_2HPO_4 12H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4 2H_2O$	0,15 g
glycerol	50 ml
destilovaná voda	100 ml

Dodatek 3

GRAMOVO BARVENÍ V HUCKEROVĚ MODIFIKACI (DOETSCH, 1981)

Roztok krystalové violeti

Rozpusťte 2 g krystalové violeti v 20 ml 95 % ethanolu.

Rozpusťte 0,8 g šťavelanu amonného v 80 ml destilované vody.

Smíchejte oba roztoky.

Lugolův jódový roztok

jód	1 g
jodid draselný	2 g
destilovaná voda	300 ml

Společně pevné látky rozetřete pomocí tloučku v misce. Nasypte do vody a míchejte v uzavřené nádobě do rozpuštění.

Šafránový roztok proti skvrnám

Zásobní roztok:

šafrán O	2,5 g
95 % ethanol	100 ml

Zamíchejte a uložte.

Ředění: 1:10 pro přípravu pracovního roztoku

Postup barvení:

1. Připravte roztěry, vysušte na vzduchu a fixujte zahřátím.
2. Zalijte sklíčko roztokem krystalové violeti a nechejte 1 minutu působit.
3. Krátce omyjte pod tekoucí vodou.
4. Zalijte Lugolovým jódovým roztokem a nechejte působit po dobu jedné minuty.
5. Opláchněte pod tekoucí vodou a vysušte savým papírem.
6. Odbarvěte pomocí po kapkách přidávaného 95 % ethanolu tak dlouho, pokud se vyplavuje barvivo, nebo ponořte za jemného pohybování do ethanolu na dobu 30 sekund.
7. Opláchněte pod tekoucí vodou a vysušte savým papírem.
8. Zalijte na dobu 10 s safraninovým roztokem.
9. Opláchněte pod tekoucí vodou a vysušte savým papírem

Grampozitivní bakterie se barví fialově modře, gramnegativní bakterie se barví růžově červeně.

Dodatek 4

STANOVENÍ KONCENTRACE IF POZITIVNÍCH BUNĚK

Plocha (S) jednoho pole na podloním sklíčku s více jamkami

$$= \frac{\pi D2}{4} \quad (1)$$

kde D = průměr pole.

Plocha (s) pole objektivu

$$= \frac{\pi d2}{4} \quad (2)$$

kde d = průměr pole objektivu

Vypočítejte d buď přímým měřením, nebo z následujícího vzorce:

$$s = \frac{\pi i2}{G2K2\times 4} \quad (3)$$

kde i = koeficient pole (závisí na typu okuláru mikroskopu a pohybuje se v rozmezí od 8 do 24),

K = tubusový koeficient (1 nebo 1,25),

G = zvětšení objektivu (100 ×, 40 × atd.),

$$z\,(2)\ d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$$

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

Vypočítejte počet typických fluoreskujících buněk v jednou pozorovacím poli (c).

Vypočítejte počet typických fluoreskujících buněk v jamce (C).

$$C = c\,\frac{S}{s}$$

Vypočítejte počet typických fluoreskujících buněk na 1 ml pelety (N)

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

kde: y = objem pelety v jamce,

kde F = zřeďovací faktor pelety

Dodatek 5

PĚSTOVÁNÍ LILKU VEJCOPLODÉHO

Vysejte semena lilku vejcoplodého (*Solanum melongena* cv. Black Beauty) do pasterizovaného výsevného kompostu. Přepichujte semenáčky s plně rozvinutými děložními lístky (10 až 14 dní) do pasterizovaného hrnkovacího kompostu.

Použijte rostliny ve fázi 3 listů, kdy mají dva, ale ne více než tři plně rozvinuté pravé listy.

Lilek by se měl pěstovat ve skleníku za následujících podmínek:

délka dne:: 14 hodin nebo přirozená délka dne, pokud je delší;

teplota: - den: 21 až 24 °C,

- noc: 15 °C

Poznámka: C. sepedonicum nebude růst při teplotách > 30 °C. Pokud noční teploty neklesnou na 15 °C, může dojít k poškození chromozomů (stříbřitá nekróza).

Poškození kořenů larvami smutnic se lze zabránit/vyhnout užitím vhodného insekticidu.

Osivo lilku vejcoplodého odrůdy Black Beauty lze získat od:

1. AB Hammenhögs Frö,
   270 50 Hammenhögs,
   Švédsko;
2. HURST Seeds Ltd,
   Avenue Road,
   Witham,
   Essex CM8 2DX,
   Anglie;
3. ASGRO Italia Sp A,
   Corso Lodi, 23,
   Milan;
4. KÜPPER
   Mitteldeutsche Samen GmbH;
   Hessenring 22;
   D-37269 Eschwege.

Dodatek 6

MÉDIA PRO RŮST A IZOLACI *C. SEPEDONICUM*

Živný agar (NA)

Difco bacto živný agar v destilované vodě podle instrukcí výrobce. Sterilizujte v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Živný dextrosový agar (NDA)

Difco bacto živný agar obsahující 1 % D(+) glukózy (monohydrátu). Sterilizujte v autoklávu při 115 °C po dobu 20 minut.

Kvasniční pepton glukózový agar (YPGA)

Difco bacto kvasniční extrakt (č. 0127)	5 g
Difco bacto pepton (č. 0118)	5 g
D(+)-glukóza (monohydrát)	10 g
Difco bacto čištěný agar (č. 0560)	15 g
destilovaná voda	1 litr

Sterilizujte 0,5 litru objemy média v autoklávu při 115 °C po dobu 20 minut.

Médium s kvasničným extraktem a minerálními solemi (YGM)

Difco bacto kvasniční extrakt	2,0 g
D(+)-glukóza (monohydrát)	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 čištěný agar	18 g
destilovaná voda	1 litr

Sterilizujte 0,5 litru objemy média v autoklávu při 115 °C po dobu 20 minut.

Dodatek 7

NUTRIČNÍ A FYZIOLOGICKÉ TESTY PRO IDENTIFIKACI *C. SEPEDONICUM*

Veškeré média by se měla inkubovat při 21 °C a po šesti dnech by měly být vyhodnocena. Pokud nedošlo k žádnému růstu, inkubujte po dobu nejvýše 20 dní.

— **Oxidačně fermentační test** (Hugh & Leifson), 1953 – O/F test.

Základní médium:

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 čištěný agar	3,0 g
D(+)-glukóza (monohydrát)	10,0 g
bromothymolová modř	0,03 g
destilovaná voda	1 litr

Smíchejte a upravte pomocí 1N KOH pH na 7,0 až 7,2.

Rozdělte do kultivačních zkumavek Pyrex 16 mm x 100 mm (objem 12 ml) po 5 ml a 10 ml.

Sterilizujte v autoklávu při 115 °C po dobu 10 minut.

Vpichem naočkujte 5 ml a 10 ml zkumavky každou kulturou. Asepticky přidejte do 10 ml zkumavky 1 až 2 ml sterilního tekutého parafínu a inkubujte.

Pozitivní reakce:

Zkumavka	Zbarvení	Interpretace
otevřená	žluté	fermentační
zavřená	žluté	
otevřená	žluté	oxidační
zavřená	modro-zelené	
otevřeno	zelenavé	oxidační nebo inertní
zavřená	modro-zelené	

— **Oxidasový test** (Kovacs, 1956)

Kovacsovo oxidasové činidlo:

1 % vodní roztok tetramethylparafenylendiamin- dihydrochloridu (BDH č. 30386) v destilované vodě.

Toto činidlo by mělo být čerstvě připravováno 1 ml objemech nebo může být uchováváno v lahvi z hnědého skla při 5 °C po dobu 1 až 4 týdnů.

Kápněte jednu kapku činidla na filtrační papír v čisté Petriho misce. Ihned pomocí platinové kličky rozetřete některou z testovaných kultur z živného agaru.

Pozitivní reakce: během 10 sekund se vyvine purpurové zbarvení. Kultury vybarvující se během 10 až 30 sekund jsou slabě pozitivní.

Poznámka: Je důležité používat platinové kličky a NA kultury (kultury z živného agaru), protože stopy železa nebo vysoký obsah cukru v živném růstovém médiu mohou způsobit falešné pozitivní výsledky.

— Výroba kyseliny z laktosy, rhamnosy, salicinu, glycerolu

Připravte Hugh & Leifsonův O/F médium bez glukózy. Rozdělte do zkumavek po 5 ml. Sterilizujte v autoklávu při teplotě 115 °C po dobu 10 minut. K roztavenému základu při 45 °C přidejte asepticky 0,5 ml filtrací sterilizovaného 10 % vodního roztoku glycerolu, laktosy, rhamnosy nebo salicinu. Pečlivě promíchejte.

Pozitivní reakce: změna zbarvení modrozeleného na žluté indikuje tvorbu kyseliny.

— **Katalasový test**

Kápněte kapku peroxidu vodíku (objem 30) na čisté podložní sklíčko a pomocí platinové kličky vytvoříme emulzi se zkoumanou kulturou.

Pozitivní reakce: tvorba bublinek kyslíku v kapce indikuje přítomnost katalasy.

— **Aktivita nitrátreduktázy a denitrifikace** (Bradbury, 1970)

Kultivační médium:

KNO_3 (prostý dusitanu)	1 g
Difco bacto kvasniční extrakt	1 g
K_2HPO_4	5 g
destilovaná voda	1 litr

Rozdělte po 10 ml do 20 ml lahviček. Sterilizujte v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Činidlo A:

H_2SO_4	8 g
5N kyselina octová	1 litr

Činidlo B:

naftylamin	5 g
5N kyselina octová	1 litr

Naočkujte nitrátové médium ve dvou opakováních. Zkontrolujte po 10 a 20 dnech přidáním jedné kapky Lugolova jodového činidla, 0,5 ml činidla A a 0,5 ml činidla B. Pokud se médium nezbarví do červena, přidejte přibližně 50 mg zinkového prášku. Sledujte barevnou reakci.

Pozitivní reakce:	*Barevná reakce*	
	Stadium 1	Stadium 2
Žádná redukce dusičnanu	bezbarvá	červená
Redukce dusičnanu i dusitanu (pouze nitrátreduktáza)	červená	–
Snížení dusičnanu mimo dusitan (denitrifikace – nitrit a nitrát)	bezbarvá	bezbarvá

— **Tvorba ureasy** (Lelliott, 1966)

Základní médium:

základ pro oxoid močovinový agar (CM53)	2,4 g
destilovaná voda	95 ml

Sterilizujte v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Zchlaďte roztavený základ na 50 °C a asepticky přidejte 5 ml filtrací sterilizovaného 40 % vodního roztoku močoviny (Oxoid SR20). Řádně promíchejte.

Rozdělte po 6 ml do sterilních zkumavek (16 × 100 mm) a nechte ustát v šikmé poloze na vhodné podložce.

Pozitivní reakce: za přítomnosti aktivní ureasy se žlutooranžové médium barví třešňově červeně nebo fuchsinově (zelenožlutě) růžově.

Využívání citrátu (Christensen) (Skerman, 1947)

základ citrátového agaru (Merck 2503)	23 g
destilovaná voda	1 litr

Rozpusťte mícháním za současného zahřívání. Rozdělte po 6 ml jako u močovinového média. Sterilizujte v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a nechte ustát v šikmé poloze.

Pozitivní reakce: využívání citrátu se projeví změnou barvy média z oranžové na červenou.

— **Tvorba sirovodíku** (Ramamurthi, 1959)

Médium:

Difco bacto trypton (č. 0123)	10 g
K_2HPO_4	1 g
NaCl	5 g
destilovaná voda	1 litr

Rozpusťe a rozdělte po 6 ml do zkumavek 16 x 100 mm. Sterilizujte v autoklávu při teplotě 115 °C po dobu 10 minut.

Inokulujte a od okraje zkumavky asepticky zavěste papírek s octanem olovnatým (Merck 9511). Papírek upevněte na místě víčkem. Inkubujte po dobu nejvýše 20 dní.

Pozitivní reakce: tvorba sirovodíku (H_2S) z tryptonu se projeví vývojem černohnědého zbarvení testovacího papírku.

— **Tvorba indolu** (Ramamurthi, 1959)

Médium:

Jako u testu na H_2S.

Odstraňte papírek s octanem olovnatým a přidejte 1 až 2 ml diethyleteru a jemně protřepejte. Nechejte chvíli stát (pět minut) k oddělení vrstev. Po stěně nakloněné zkumavky přidejte opatrně 0,5 ml činidla podle Kovacse (Merck 9293).

Pozitivní reakce: Přítomnost indolu se projeví vývojem červeného zbarvení ve žluté vrstvě mezi etherovou a vodní frakcí.

— **Růst při 37 °C** (Ramamurthi, 1959)

Médium:

Difco bacto živný bujón (č. 0003)	8 g
destilovaná voda	1 litr

Rozmíchejte, rozpusťte a rozdělte po 6 ml do zkumavek.

Sterilizujte v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Inokulujte a inkubujte při teplotě 37 °C.

Pozitivní reakce: projevy růstu.

— **Růst v 7 % chloridu sodném** (Ramamurthi, 1959)

Médium:

Difto bacto živný bujón (č. 0003)	8 g
NaCl	70 g
destilovaná voda	1 litr

Rozmíchejte, rozpusťte a rozdělte po 6 ml do zkumavek.

Sterilizujte v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Pozitivní reakce: projevy růstu.

— **Hydrolýza želatiny** (Lelliott, Biling & Hayward, 1966)

Médium:

Difto bacto želatina (č. 0143)	120 g
destilovaná voda	1 litr

Rozmíchejte, rozpusťte a rozdělte po 6 ml do zkumavek.

Sterilizujte v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Pozitivní reakce: želatina se stává tekutou, i když je uchovávána při teplotě 5 °C po dobu 30 minut.

— **Hydrolýza škrobu**

Médium:

Difco bacto živný agar (roztavený)	1 litr
Difco bacto rozpustný škrob (č. 0178)	2 g

Rozmíchejte a sterilizujte v autoklávu při teplotě 115 °C po dobu 10 minut.

Rozlijte na plotny. Inokulujte plotny bodově.

Po dosažení dobrého růstu (10 až 20 dní), odeberte část narostlé kultury a přelijte Lugolovým jodovým roztokem.

Pozitivní reakce: hydrolýza škrobu se projeví čirými zónami pod vyrostlými koloniemi bakterií nebo kolem nich, zbývající médium se barví purpurově.

— **Aktivita hydrolázy eskulinu** (Sneath & Collins, 1974)

Médium:

Difco bacto pepton	10 g
eskulin	1 g
citronan železitý (Merck 3862)	0,05 g
citronan sodný	1 g
destilovaná voda	1 litr

Zamíchejte až do rozpuštění a rozdělte po 6 ml do zkumavek. Sterilizujte v autoklávu při teplotě 115 °C po dobu 10 minut.

Médium je čiré, ale fluoreskuje do modra.

Pozitivní reakce: hydrolýza eskulinu se projeví vznikem hnědé barvy společně s mizením fluorescence. Toto lze prověřit pomocí ultrafialové (UV) lampy.

ODKAZY

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 *Conybacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147–152.

Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. V: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21–23.

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

Janse, J. D. a J Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Conybacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull., č. 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 a A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470–489.

Lelliott, R. A. a P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Conybacterium sepedonicum* (Spiek.et Kotth.) Skapt. Et. Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 odst. 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. 2. Edd., William and Wilkins Company, Baltimore.

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

PŘÍLOHA II

1. Při každém podezření z výskytu, pro který byla imunofluorescenčním testem uvedeným v příloze I zjištěna pozitivní reakce a dokončením této metody by mělo být podezření potvrzeno nebo vyvráceno, je třeba až do dokončení dané metody zadrženy a vhodným způsobem konzervovány:

   — všechny hlízy nebo rostliny, které jsou součástí vzorku, a

   — jakýkoli zbývající výluh a dodatečně připravená imunofluorescenční sklíčka.

2. V případě potvrzení organismu by měly být zadrženy a vhodným způsobem konzervovány:

   — materiál uvedený v odstavci 1 a

   — vzorek napadeného materiálu lilku vejcoplodého naočkovaného hlízou nebo rostlinným výluhem a

   — izolované kultury organismu,

   nejméně do jednoho měsíce od oznamovacího postupu podle čl. 5 odst. 2.

PŘÍLOHA III

1. Pro určení rozsahu pravděpodobného zamoření podle čl. 5 odst. 1 písm. b) je třeba zohlednit tyto činitele:
   — hlízy nebo rostliny pěstované v místě produkce označeném za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a),
   — místo(a) produkce nebo zařízení, které mají v rámci produkčního systému vztah k hlízám nebo rostlinám označeným za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a), včetně těch, které mají společné pěstitelské zařízení a vybavení přímo nebo prostřednictvím společného smluvního partnera,
   — hlízy nebo rostliny pěstované v místě(ech) produkce uvedeném(ých) v předchozí odrážce nebo nacházející se v takovém(ých) místě(ech) produkce během období, kdy se hlízy nebo rostliny označené za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a) nacházely v takovém zařízení nebo místech produkce uvedených v první odrážce,
   — ústřední sklady skladující brambory z uvedených míst produkce,
   — jakékoli zařízení, vozidlo, plavidlo, sklad nebo jejich jednotky a jakékoli jiné předměty včetně obalového materiálu, které mohly přijít do styku s hlízami nebo rostlinami označenými za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a) během předcházejících 12 měsíců nebo jiného odpovídajícího období,
   — jakékoli hlízy nebo rostliny, které se skladují nebo jsou v kontaktu s jakýmikoli stavbami nebo předměty vyjmenovanými v předcházející odrážce před čištěním a dezinfekcí těchto předmětů nebo staveb, a
   — v důsledku testů uvedených v článku 6 hlízy nebo rostliny, které mají stejný klonový původ jako hlízy nebo rostliny označené za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a) a u nichž testy označily zamoření za pravděpodobné.
2. Pro stanovení možného rozšíření podle čl. 5 odst. 1 písm. c) je třeba zohlednit tyto činitele:
   — blízkost ostatních míst produkce, kde se pěstují brambory nebo jiné hostitelské rostliny,
   — společný původ zásob sadbových brambor.
3. Podrobnosti oznámení uvedeného v čl. 5 odst. 2 prvním pododstavci zahrnují:
   — osvědčení stanovená v článcích 7 nebo 8 směrnice 77/93/EHS, pas nebo podle potřeby evidenční číslo pro každou zásilku nebo partii brambor označenou za zamořenou,
   — název odrůdy pro zásoby sadbových brambor a v případě potřeby ve všech ostatních případech,
   — činitele označeného zamoření a vymezené oblasti,
   — existence výluhu, připravených imunofluorescenčních sklíček, materiálu napadených lilků vejcoplodých a izolované kultury organismu z testu, při kterém bylo organismu potvrzen.

PŘÍLOHA IV

1. Úředně kontrolovaná opatření uvedená v čl. 7 odst. 1 a týkající se zacházení s hlízami nebo rostlinami označenými za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a), jsou:

— využívána při průmyslovém zpracování prostřednictvím přímé a okamžité dodávky na zpracovatelský závod s příslušným zařízením na zpracování odpadu, u kterého bylo stanoveno, že v něm neexistuje zjistitelné nebezpečí rozšíření organismu, a se systémem dezinfekce skladovacích prostor a odvozových vozidel, nebo

— jiná opatření, pokud bylo stanoveno, že neexistuje zjistitelné nebezpečí rozšíření organismu; tato opatření se oznamují Komisi a ostatním členským státům.

2. Použití nebo příslušnými úředními subjekty členských států úředně kontrolované odstranění hlíz nebo rostlin označených za pravděpodobně zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. b) a uvedených v čl. 7 odst. 2 zahrnuje:

— jejich použití jako konzumních brambor určených ke spotřebě, balených pro přímou dodávku a použití, které nevyžadují změnu obalu, a určených pro takovou přímou dodávku a použití, nebo

— jejich použití jako konzumních brambor určených k průmyslovému zpracování po přímé a okamžité dodávce zpracovatelskému závodu s vhodným zařízením na odstranění odpadu, nebo

— jiné přiměřené využití nebo odstranění, pokud je stanoveno, že neexistuje zjistitelné nebezpečí rozšíření organismu.

3. Příslušnými metodami pro čištění a dezinfekci předmětů uvedených v čl. 7 odst. 3 se rozumějí takové metody, u kterých bylo stanoveno, že neexistuje zjistitelné nebezpečí rozšíření organismu, a tyto metody se použijí pod kontrolou příslušných úředních subjektů členských států.

4. Opatření, která mají členské státy provést uvnitř vymezené oblasti podle čl. 5 odst. 1 písm. c) a uvedené v čl. 7 odst. 4, zahrnují:

4.1. v místech produkce označených za zamořená podle čl. 5 odst. 1 písm. a):

a) v poli označeném za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a):

i) — během nejméně tří pěstitelských let následujících po roce označení zamoření,

— se přijmou opatření na odstranění planě rostoucích rostlin bramboru a ostatních planě rostoucích hostitelských rostlin organismu, a

— se nesázejí žádné bramborové hlízy, rostliny ani pravá semena či jiné planě rostoucí hostitelské rostliny organismu, případně plodiny, pro které existuje zjištěné nebezpečí přežití nebo rozšíření organismu, dokud není po dobu nejméně dvou po sobě následujících pěstitelských let stanoveno, že je pozemek prostý planě rostoucích rostlin bramboru,

— v prvním sklizňovém období brambor následujícím po období upřesněném v předchozí odrážce se sázejí pouze certifikované sadbové brambory pro pěstování jako konzumní brambory a provede se úřední šetření podle čl. 2 odst. 1,

— v sklizňovém období brambor následujícím po období uvedeném v předchozí odrážce a následujícím po příslušném rotačním cyklu se certifikované sadbové brambory použijí buď na sadbu, nebo jako konzumní brambory a provede se úřední šetření podle čl. 2 odst. 1; nebo

ii) — během čtyř pěstitelských let následujících po roce označení zamoření,

— se přijmou opatření na odstranění planě rostoucích rostlin bramboru a ostatních planě rostoucích hostitelských rostlin organismu, a

— pozemek se ponechá a udržuje ladem nebo jako stálá pastvina s častým nízkým sečením nebo intenzivní pastvou,

— v prvním sklizňovém období brambor následujícím po období uvedeném v předchozí odrážce se certifikované brambory použijí buď na sadbu, nebo pro pěstování jako konzumní brambory a provede se úřední šetření podle čl. 2 odst. 1;

b) na ostatních pozemcích:

— v pěstitelském roce následujícím po označení zamoření:

— se žádné bramborové hlízy, rostliny ani pravá semena nebo jiné planě rostoucí hostitelské rostliny nesázejí a podle potřeby se provedou opatření na odstranění planě rostoucích rostlin bramboru, nebo

— se certifikované sadbové brambory mohou sázet pouze jako konzumní za podmínky, že jsou příslušné úřední subjekty nabyly jistoty, že nebezpečí spojené s planě rostoucími rostlinami bramboru a ostatními planě rostoucími hostitelskými rostlinami organismu bylo odstraněno,

— po dobu nejméně dvou pěstitelských let následujících po roce uvedeném v předchozí odrážce se sázejí pouze certifikované sadbové brambory na sadbu nebo jako konzumní brambory,

— v každém pěstitelském roce uvedeném v předchozí odrážce se provedou opatření na odstranění planě rostoucích rostlin bramboru a planě rostoucích hostitelských rostlin organismu a provede se úřední šetření podle čl. 2 odst. 1,

— pokud se certifikované sadbové brambory sázejí jako konzumní brambory v pěstitelském roce následujícím po označení zamoření, rostoucí plodina se v přiměřených lhůtách kontroluje a planě rostoucí rostliny se testují na přítomnost organismu;

c) neprodleně po označení zamoření podle čl. 5 odst. 1 písm. a) a v každém z následujících pěstitelských roků až do prvního povoleného sklizňového období brambor a včetně tohoto období na pozemku(cích) označeném(ých) za zamořený(é), jak je uvedeno pod písmenem a), se veškeré stroje a skladovací prostory v místě produkce vyčistí a dezinfikují podle potřeby a pomocí příslušných metod podle bodu 3;

d) v systémech produkce, kde je možné úplně nahradit pěstební substrát,

— se nesázejí žádné hlízy, rostliny ani pravá semena, dokud nebyla produkce podrobena úředně sledovaným opatřením na odstranění organismu a nebyly odstraněny všechny brambory nebo jiný lilkovitý materiál včetně přinejmenším celkové výměny pěstebního substrátu a vyčištění a dezinfekce produkční jednotky a veškerého zařízení a dokud následně nebyl příslušnými úředními subjekty udělen souhlas k pěstování brambor, a

— se brambory pěstují z certifikovaných sadbových brambor nebo z minihlíz či mikrorostlin získaných z testovaných zdrojů.

4.2. Aniž je dotčen bod 4.1, členské státy uvnitř vymezené oblasti:

a) neprodleně po označení zamoření a po dobu nejméně tří pěstitelských období:

— zajistí vlastními příslušnými úředními subjekty kontrolu zařízení, ve kterých se pěstují nebo skladují bramborové hlízy nebo se s těmito hlízami nakládá, jakož i prostor, které pronajímají mechanizaci používanou k produkci brambor,

— vyžadují vyčištění a dezinfekci zařízení a skladů v těchto prostorách podle potřeby a pomocí příslušných metod podle bodu 3,

— vyžadují, aby k výsadbě všech porostů bramboru uvnitř této oblasti byla použita jen certifikovaná sadba,

— vyžadují ve všech prostorách uvnitř oblasti oddělené nakládání se sklizenými zásobami sadby od nakládání s konzumními bramborami,

— provádí úřední šetření podle čl. 2 odst. 1;

b) vytvoří v případě potřeby program na náhradu všech zásob sadbových brambor po přiměřenou dobu.

Opatření provedená podle bodu 4.2 se spolu s registračními čísly producentů, společných skladů a středisek odeslání uvnitř vymezené oblasti oznamují každý rok ostatním členským státům a Komisi.