

DIREKTIVA SVETA 93/85/EGS

z dne 4. oktobra 1993

o obvladovanju krompirjeve obročkaste gnilobe

SVET EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti in zlasti člena 43 Pogodbe,

ob upoštevanju predloga Komisije¹,

ob upoštevanju mnenja Evropskega parlamenta²,

ob upoštevanju mnenja Ekonomsko-socialnega odbora³,

ker pridelava krompirja zavzema pomembno mesto v kmetijstvu Skupnosti; ker donos krompirja stalno ogrožajo škodljivi organizmi;

ker je treba z varstvom pridelave krompirja pred takšnimi škodljivimi organizmi ne samo ohraniti proizvodno zmogljivost temveč tudi povečati kmetijsko produktivnost;

ker bi imeli zaščitni ukrepi za preprečitev vnosa škodljivih organizmov na ozemlje države članice le omejen učinek, če se takšni organizmi ne bi istočasno in metodično zatirali v vsej Skupnosti in če se ne prepreči njihovo širjenje;

ker je eden izmed škodljivih organizmov za krompir bakterija *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., povzročiteljica krompirjeve obročkaste gnilobe; ker se je ta bolezen pojavila v nekaterih delih Skupnosti in še vedno obstajajo nekateri omejeni viri okužbe;

ker bo pridelava krompirja znatno ogrožena v vsej Skupnosti, če se ne sprejmejo učinkoviti ukrepi za določitev kraja te bolezni in njene razširjenosti, da se preprečita njeno pojavljanje in širjenje ter, če se odkrije, da se prepreči njeno širjenje in da se obvladuje z namenom izkoreninjenja;

ker je treba v Skupnosti sprejeti določene ukrepe, da se to zagotovi; ker mora biti državam članicam tudi omogočeno, da po potrebi sprejmejo dodatne ali strožje ukrepe, pod pogojem da to ne ovira pretoka krompirja v Skupnosti, razen kolikor to določa Direktiva Sveta 77/93/EGS z dne 21. decembra 1976 o zaščitnih ukrepih proti vnosu organizmov, škodljivih za rastline ali rastlinske proizvode, v Skupnost in proti njihovemu širjenju v Skupnosti⁴; ker je treba o takšnih ukrepih uradno obvestiti druge države članice in Komisijo;

¹ UL št. C 93, 2.4.1993, str. 12.

² UL št. C 176, 28.6.1993, str. 210.

³ UL št. C 161, 14.6.1993, str. 18.

⁴ UL št. 26, 31.1.1977, str. 20. Direktiva, nazadnje spremenjena z Direktivo Komisije 92/103/EGS (UL št. L 363, 11.12.1992, str. 1).

ker je Direktiva Sveta 80/665/EGS z dne 24. junija 1980 o zatiranju krompirjeve obročkaste gnilobe¹ določila minimalne ukrepe, ki bi jih morale države članice sprejeti proti krompirjevi obročkasti gnilobi;

ker je od takrat prišlo do bistvenega napredka pri razumevanju bolezni krompirjeve obročkaste gnilobe in odkrivanju povzročitelja krompirjeve obročkaste gnilobe;

ker je bilo treba za uporabo režima Skupnosti za zdravstveno varstvo rastlin v Skupnosti kot področju brez notranjih meja ponovno preučiti in revidirati nekatere določbe Direktive 80/665/EGS;

ker je bilo pri tej ponovni preučitvi ugotovljeno, da so določbe Direktive 80/665/EGS nezadostne in je potrebna dodatna opredelitev ukrepov;

ker je treba zato Direktivo 80/665/EGS razveljaviti in sprejeti potrebne ukrepe;

ker morajo ukrepi upoštevati, prvič, da lahko ostane bolezen latentna in neopažena tako v rastočih rastlinah kot tudi v uskladiščenih gomoljih in se zato lahko učinkovito preprečuje samo s pridelavo in uporabo neokuženega semenskega krompirja, ter drugič, da je za določitev kraja bolezni potrebna sistematična uradna raziskovanja; ker širjenje povzročitelja med rastočimi rastlinami ni najpomembnejši dejavnik, saj se lahko povzročitelj čez zimo ohrani v krompirjevih samosevcih, ki so glavni vir prenašanja okužbe iz ene sezone v drugo; ker se povzročitelj širi predvsem z okužbo krompirja prek stika z okuženim krompirjem in z opremo za sajenje, spravilo in obdelavo ali transportnimi in skladiščnimi vsebniki, ki so se okužili z organizmom pri predhodnem stiku z okuženim krompirjem; ker lahko takšni okuženi predmeti ostanejo kužni še nekaj časa po okužbi; ker se lahko širjenje povzročitelja zmanjša ali prepreči z razkuževanjem takšnih predmetov; ker vsaka taka okužba semenskega krompirja predstavlja veliko nevarnost razširitve povzročitelja;

ker je za določitev podrobnosti takšnih splošnih ukrepov in strožjih ali dodatnih ukrepov, ki jih sprejmejo države članice za preprečevanje vnosa povzročitelja na njihova ozemlja, zaželeno, da države članice tesno sodelujejo s Komisijo v okviru Stalnega odbora za zdravstveno varstvo rastlin (v nadaljnjem besedilu »odbor«),

SPREJEL NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Direktiva ureja ukrepe, ki jih morajo države članice sprejeti proti bakteriji *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., povzročiteljici krompirjeve obročkaste gnilobe (v nadaljnjem besedilu »organizem«), da se:

- (a) določi kraj in obseg njene razširjenosti;
- (b) prepreči njeno pojavljanje in širjenje; in
- (c) če se odkrije, prepreči njeno širjenje in da se obvladuje z namenom izkoreninjenja.

Člen 2

¹ UL št. L 180, 14.7.1980, str. 30.

1. Države članice izvajajo sistematične uradna raziskovanja za odkrivanje organizma v gomoljih in, kadar je primerno, v rastlinah krompirja (*Solanum tuberosum* L.), ki izvirajo iz njihovega ozemlja, za potrditev odsotnosti organizma.

Za ta raziskovanja se v primeru gomoljev odvzamejo vzorci tako semenskega krompirja kot tudi drugega krompirja, po možnosti iz uskladiščenih partij, in se pošljejo na uradno ali uradno nadzorovano laboratorijsko testiranje po metodi iz priloge I za odkrivanje in diagnosticiranje organizma. Poleg tega se lahko, kadar je to primerno, na drugih vzorcih opravi tudi uradni ali uradno nadzorovani vizualni pregled z rezanjem gomoljev.

V primeru rastlin se ta raziskovanja izvajajo v skladu z ustreznimi metodami in se vzorci pošljejo na ustrezno uradno ali uradno nadzorovano testiranje.

Število, izvor, stratifikacijo in čas odvzema vzorcev določijo odgovorni uradni organi v smislu Direktive 77/93/EGS na podlagi tehtnih znanstvenih in statističnih načel ter biologije organizma, in ob upoštevanju posameznih sistemov proizvodnje krompirja zadevnih držav članic. Te podrobnosti se enkrat letno predložijo drugim državam članicam in Komisiji, da se zagotovijo primerljive stopnje zanesljivosti med državami članicami za potrditev odsotnosti organizma.

2. O rezultatih uradnih raziskav iz odstavka 1 se vsaj enkrat letno uradno obvestijo druge države članice in Komisija. Podrobnosti tega obvestila so zaupne. Komisiji se lahko predložijo v skladu z postopkom iz člena 16a Direktive 77/93/EGS.

3. V skladu s postopkom iz člena 16a Direktive 77/93/EGS se lahko sprejmejo naslednje določbe:

- podrobnosti raziskovanj iz odstavka 1, ki se bodo izvajale v skladu s tehtnimi znanstvenimi in statističnimi načeli,
- podrobnosti obvestila iz odstavka 2.

4. V skladu s postopkom iz člena 16a Direktive 77/93/EGS se sprejmejo naslednje določbe:

- ustrezna metoda za raziskave in testiranja iz tretjega pododstavka odstavka 1.

Člen 3

Države članice zagotovijo, da se o domnevnem pojavu ali potrjeni navzočnosti organizma v rastlinah krompirja in gomoljih ter v pospravljenih, uskladiščenih ali trženih gomoljih na njihovem ozemlju poroča njihovim lastnim odgovornim uradnim organom.

Člen 4

1. V primeru domnevnega pojava organizma odgovorni uradni organi države članice, v kateri so bili ti primeri prijavljeni, zagotovijo dokončanje uradnih ali uradno nadzorovanih laboratorijskih testiranj z uporabo metode iz priloge I in v skladu s pogoji, določenimi v točki 1 Priloge II, da se domnevni pojav organizma potrdi ali ovrže. V prvem primeru se uporabijo zahteve iz točke 2 Priloge II.

2. Do potrditve ali ovržbe domnevnega pojava organizma iz odstavka 1 v tistih primerih suma navzočnosti organizma, pri katerih:

(i) so bila opažena sumljiva diagnostična vizualna znamenja bolezni; ali

(ii) je bil imunofluorescenčni test, kakor ga določa priloga I, oziroma drug ustrezeni test pozitiven, odgovorni uradni organi držav članic:

(a) prepovejo premeščanje vseh partij ali pošiljk, iz katerih so bili vzeti vzorci, razen pod njihovim nadzorom in pod pogojem da je bilo ugotovljeno, da ni nobene nevarnosti za širjenje organizma;

(b) sprejmejo ukrepe za izsleditev izvora domnevnega pojava organizma;

(c) uvedejo ustrezne dodatne varnostne ukrepe na podlagi stopnje ocenjene nevarnosti, zato da se prepreči kakršno koli širjenje organizma. Ti ukrepi lahko vključujejo uradno obvladovanje premeščanja vseh drugih gomoljev ali rastlin znotraj ali izven posestev, ki so povezana z domnevnim pojavom.

3. V skladu s postopkom iz člena 16a Direktive 77/93/EGS se lahko sprejme naslednja določba:

– ukrepi iz odstavka 2(c).

4. V skladu s postopkom iz člena 16a Direktive 77/93/EGS se sprejme naslednja določba:

– kak drug ustrezen test, predviden v odstavku 2(ii);

Člen 5

1. Če uradno ali uradno nadzorovano laboratorijsko testiranje z uporabo metode iz Priloge I potrdi navzočnost organizma v vzorcu gomoljev, rastlin ali delov rastlin, odgovorni uradni organi države članice ob upoštevanju tehtnih znanstvenih načel, biologije organizma in posebnih pridelovalnih, tržnih in predelovalnih sistemov v tej državi članici:

(a) določijo za okužene gomolje ali rastline, pošiljko oziroma partijo ter stroje, vozilo, posodo, skladišče ali njihove dele in katere koli druge predmete vključno s pakirnim materialom, iz katerih je bil vzorec odvzet, in, kadar je primerno, mesto(-a) pridelave in polje(-a), kjer so bili gomolji ali rastline pospravljeni s polja;

(b) ob upoštevanju določb točke 1 Priloge III ugotovijo obseg verjetne okužbe prek dotikov pred pravilom in po njem ali prek povezave pridelave z določenim virom okužbe;

(c) razmejijo območje na podlagi določitve okužbe iz (a), ugotovljenega obsega verjetne okužbe iz (b) in možnega širjenja organizma ob upoštevanju določb točke 2 Priloge III.

2. Države članice v skladu z določbami točke 3 Priloge III takoj uradno obvestijo druge države članice in Komisijo o vseh določenih okužbah iz odstavka 1(a) in podrobnostih o razmejitvi območja iz odstavka 1(c).

Podrobnosti tega obvestila so zaupne. Lahko se predložijo odboru v skladu s postopkom iz člena 16a Direktive 77/93/EGS.

3. Na podlagi obvestila iz odstavka 2 in v njem navedenih podatkov druge države članice, navedene v obvestilu, ustrezno določijo okužbo, ugotovijo obseg verjetne okužbe in razmejijo območje v skladu z odstavkom 1(a), (b) in (c).

Člen 6

Države članice predpišejo, da kadar so bili gomolji ali rastline krompirja določeni za okužene v skladu s členom 5(1)(a), se testiranje v skladu s členom 4(1) opravi tudi na tistih zalogah krompirja, ki so klonsko sorodne okuženim. Testiranje se opravi na tolikšnem številu takih gomoljev ali rastlin, kot je potrebno za določitev verjetnega prvotnega izvora okužbe in obsega verjetne okužbe, če je mogoče glede na stopnjo nevarnosti.

Na podlagi testiranja se opravijo dodatna določitev okužbe, ugotovitev obsega verjetne okužbe in razmejitev območja, v skladu s členom 5(1)(a), (b) oziroma (c).

Člen 7

1. Države članice predpišejo, da se gomolji ali rastline, določeni za okužene v skladu s členom 5(1)(a), ne smejo saditi in da se pod nadzorom odgovornih uradnih organov:

– uničijo, ali

– kako drugače odstranijo z uradno nadzorovanim(-i) ukrepom(-i) in v skladu s točko 1 Priloge IV, če je dokazano, da ne predstavljajo nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma.

2. Države članice predpišejo, da se gomolji ali rastline, ki so določene za verjetno okužene v skladu s členom 5(1)(b), ne smejo saditi in da se brez poseganja v rezultate testiranja iz člena 6 za klonsko sorodne zaloge, pod nadzorom njihovih odgovornih uradnih organov ustrezno uporabijo ali odstranijo, kakor je določeno v točki 2 Priloge IV, tako da je zagotovljeno, da ne predstavljajo nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma.

3. Države članice predpišejo, da se kakršni koli stroji, vozila, posode, skladišča ali njihovi deli in kateri koli drugi predmeti vključno s pakirnim materialom, ki so določeni za okužene v skladu s členom 5(1)(a) ali za verjetno okužene v skladu s členom 5(1)(b), bodisi uničijo bodisi očistijo in razkužijo z uporabo ustreznih metod, kakor je določeno v točki 3 Priloge IV. Po razkuževanju ti predmeti ne veljajo več za okužene.

4. Brez poseganja v ukrepe, izvedene v skladu z odstavki 1, 2 in 3, države članice predpišejo, da se na območju, razmejenem v skladu z členom 5(1)(c), izvede vrsta ukrepov, določenih v točki 4 Priloge IV.

Člen 8

1. Države članice predpišejo, da mora semenski krompir izpolnjevati zahteve Direktive 77/93/EGS in izvirati neposredno iz materiala, pridobljenega v okviru uradno odobrenega programa, za katerega je bilo z uradnim ali uradno nadzorovanim testiranjem po metodi iz priloge I ugotovljeno, da ni okužen z organizmom.

Zgoraj navedeno testiranje se opravi:

- kadar okužba vpliva na pridelavo semenskega krompirja, na rastlinah začetne klonske selekcije,
- v drugih primerih bodisi na rastlinah začetne klonske selekcije bodisi na reprezentativnih vzorcih osnovnega semenskega krompirja ali krompirja prejšnjih množitev.

2. V skladu s postopkom iz člena 16a Direktive 77/93/EGS se lahko sprejmejo naslednje določbe:

- podrobna pravila uporabe prve alineje drugega pododstavka odstavka 1 tega člena,
- pravila v zvezi z reprezentativnimi vzorci iz druge alineje drugega pododstavka odstavka 1 tega člena.

Člen 9

Države članice prepovejo posedovanje organizma ali kakršno koli ravnanje z njim.

Člen 10

Brez poseganja v določbe Direktive 77/93/EGS lahko države članice dovolijo odstopanje od ukrepov iz členov 6, 7 in 9 te direktive za raziskovalne ali znanstvene namene in zaradi sortne selekcije, pod pogojem da takšna odstopanja ne posegajo v obvladovanje organizma in ne povzročijo nobene nevarnosti za širjenje organizma.

Člen 11

Države članice lahko sprejmejo dodatne ali strožje ukrepe, ki so lahko potrebni za zatiranje organizma ali preprečevanje njegovega širjenja, če so skladni z določbami Direktive 77/93/EGS.

Dodatni ukrepi iz prvega pododstavka lahko vključujejo navodilo, da je dovoljeno saditi le semenski krompir, ki je bodisi uradno potrjen bodisi uradno pregledan in ustreza predpisanim standardom zdravstvenega varstva rastlin. Slednje se lahko uporablja zlasti v primeru, ko je kmetom dovoljeno, da na svojem gospodarstvu uporabljajo semenski krompir, ki so ga pridobili iz lastnega pridelka, in v drugih primerih sajenja semenskega krompirja lastne pridelave.

O podrobnostih teh ukrepov se uradno obvestijo druge države članice in Komisija.

Člen 12

Spremembe prilog k tej direktivi, potrebne glede na napredek znanstvenega ali tehničnega znanja, se sprejmejo v skladu s postopkom iz člena 16a Direktive 77/93/EGS.

Člen 13

1. Do 15. novembra 1993 države članice sprejmejo in objavijo vse predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo. O tem takoj obvestijo Komisijo.

Države članice se v sprejetih predpisih sklicujejo na to direktivo ali pa sklic nanjo navedejo ob njihovi uradni objavi. Način sklicevanja določijo države članice.

Države članice uporabljajo te predpise od 16. novembra 1993.

2. Države članice Komisiji takoj predložijo vse predpise nacionalne zakonodaje, sprejete na področju, ki ga ureja ta direktiva. Komisija o tem obvesti druge države članice.

Člen 14

Direktiva 80/665/EGS se razveljavi z veljavnostjo od 16. novembra 1993.

Člen 15

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Luksemburgu, 4. oktobra 1993

Za Svet

Predsednik

W. CLAES

PRILOGA I

METODA ZA ODKRIVANJE IN DIAGNOSTICIRANJE BAKTERIJE KROMPIRJEVE OBROČKASTE GNILOBE, *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., V PARTIJAH GOMOLJEV KROMPIRJA

1. Odvzem vzorcev v območju konice stolona

1.1 Pod tekočo vodovodno vodo operemo 200 gomoljev in s pravilno razkuženim skalpelom ali lupilnikom za krompir odstranimo povrhnjico okoli konice stolona (hiluma) vsakega gomolja; razkuževanje lahko opravimo tako, da lupilnik pomočimo v 70 % etanol in ga izpostavimo plamenu.

1.2 Z nožem ali lupilnikom za krompir pazljivo izrežemo stožčaste tkivne stržene v območjukonic stolonov. Presežnega nevaskularnega tkiva naj bo čim manj. Po odstranitvi je treba konice stolonov obdelati v 24 urah (glej odstavek 3) ali jih konzervirati pri temperaturi – 20 °C za največ dva tedna.

2. Vizualni pregled za odkrivanje simptomov obročkaste gnilobe

Po odstranitvi konic stolonov vsak gomolj prečno prerežemo in preverimo morebitno navzočnost simptomov obročkaste gnilobe.

Gomolje stisnemo in pregledamo, ali se iz vaskularnega tkiva iztisne macerirano tkivo.

Prvi simptomi so rahel steklast videz ali prosojnost tkiva brez omehčanja okoli vaskularnega sistema, predvsem v bližinikonice stolona. Vaskularni obroček na konici stolona je lahko rahlo temnejše barve kot ponavadi. Prvi lahko prepoznavni simptom predstavlja rumenkasto obarvan vaskularni obroček in če gomolj rahlo stisnemo, se iz žil pcedijo majhne količine siraste mase. Ta izcedek vsebuje na milijone bakterij. V tej fazi se lahko vaskularno tkivo obarva rjavo. Ti simptomi so lahko sprva omejeni le na del obročka, ki ni nujno v bližini popka, in se lahko postopoma razširijo na celoten obroček. Z napredovanjem okužbe se pojavi uničenje vaskularnega tkiva; zunanji korteks se lahko oddvoji od notranjega korteksa. V poznejših fazah okužbe se na površini gomolja pojavijo razpoke, ki so ob robu pogosto rdečkastorjave barve. Sekundarni napad gliv ali bakterij lahko prikrije simptome in tako oteži ali onemogoči razločevanje simptomov obročkaste gnilobe v poznem stadiju od ostalih gnilob gomoljev.

3. Priprava vzorcev za barvanje po Gramu, barvanje za imunofluorescenco (IF) in test na jajčevcu

3.1 Konice stolonov homogeniziramo do popolne maceracije v razredčilu, ki za *Corynebacterium sepedonicum* ni strupen (na primer 0,05 M fosfatni pufer s soljo (PBS) pH 7,0), pri temperaturi pod 30 °C; priporoča se dodatek nestrupenega deflokulanta in lahko bo potrebno tudi nestrupeno protipenilno sredstvo (dodatka 1 in 2). Izogniti se je treba prekomerni maceraciji.

3.2 Iz homogenata ekstrahiramo bakterije po eni izmed naslednjih metod¹:

A. (a) Centrifugiramo 10 minut pri največ 180 g.

¹ Alternativno metodo ekstrakcije podaja Dinesen, 1984.

(b) Supernatant centrifugiramo 10 minut pri najmanj 4000 g. Supernatant oddekaniramo in zavržemo.

B. (a) Macerat pustimo stati 30 minut, da se delci tkiva usedejo. Pazljivo oddekaniramo supernatant, ne da bi mešali usedlino.

(b) Supernatant prefiltriramo skozi filtrirni papir (Whatman št. 1) na filtru iz sintranega stekla (št. 2 = 40-100 µm) z uporabo vodne vakuumske črpalke. Filtrat zberemo v centrifugirki. Filter speremo s sterilnim PBS do maksimalne prostornine filtrata 35 ml.

(c) Filtrat centrifugiramo 20 minut pri najmanj 4000 g.

3.3 Peleto suspendiramo v sterilnem 0,01 M fosfatnem pufru pH 7,2 (dodatek 2) tako, da bo skupna prostornina približno 1 ml. Razdelimo na dva enaka dela in enega shranimo za referenčne namene, tako da ga zamrzemo pri temperaturi – 20 °C¹ ali liofiliziramo. Drugi del razdelimo na pol in eno polovico uporabimo za test IF in barvanje po Gramu, drugo polovico pa za test na jajčevcu.

3.4 Bistvenega pomena je, da se vse *C. sepedonicum* pozitivne kontrole in vzorci obdelujejo ločeno, da se prepreči okužba. To velja za objektna stekelca IF in teste na jajčevcu.

4. Barvanje po Gramu

4.1 Pripravimo preparate, barvane po Gramu, za vse razredčine pelete (5.2.1) in za vse razrezane gomolje (2), ki kažejo prosojnost, gnilobo ali druge sumljive simptome. Vzorce odvezamemo z roba obolelega tkiva.

4.2 Pripravimo preparate, barvane po Gramu, za znane kulture bakterije *C. sepedonicum* in, če je mogoče, za naravno okuženo tkivo (5.1).

4.3 Določimo, kateri vzorci vsebujejo tipične grampozitivne korineformne celice. Ponavadi so celice bakterije *C. sepedonicum* dolge 0,8 do 1,2 µm in široke 0,4 do 0,60 µm.

Ustrezni postopek barvanja je naveden v dodatku 3.

Preparati naravno okuženega tkiva ali pred kratkim izoliranih kultur pogosto kažejo prevladujoče število kokoidnih paličk, ki so ponavadi malo manjše od celic starejših kultur v agarju. V večini gojišč kultur so celice *C. sepedonicum* pleomorfne korineformne paličke in lahko različno reagirajo po Gramu. Celice so posamične, v parih s »komolci«, značilnimi za ukrivljeno delitev, in včasih v neenotnih skupkih, ki jih pogosto imenujemo palisade in kitajske pismenke.

5. Shema testa IF

5.1 Uporabimo antiserum za znani sev bakterije *C. sepedonicum* – ATCC 33113 (NCPBP 2137) ali NCPBP 2140. Titer IF antiseruma naj bo večji od 1:600. Vključimo eno kontrolo PBS na testno objektno stekelce, da bi ugotovili, če se konjugat fluorescein-izotiocianata in antikunčjega imunoglobulina (FITC) nespecifično kombinira z bakterijskimi celicami. *Corynebacterium sepedonicum* (ATCC 33113 (NCPBP 2137), NCPBP 2140) uporabimo za homologne antigenske kontrole na drugem objektnem stekelcu. Če je mogoče, uporabimo naravno okuženo tkivo

¹ Dokazano je (Janse in Van Vaerenberg, 1987), da zmrzovanje lahko zmanjša možnosti preživetja bakterije *Corynebacterium sepedonicum*. Tej težavi se izognemo s suspendiranjem pelete v 10-odstotni raztopini glicerola.

(ohranjeno z liofilizacijo ali zamrznitvijo pri temperaturi – 20 °C) kot podobno kontrolo na istem objektnem stekelcu (slika 2).

5.2 Postopek

5.2.1 Pripravimo serijo treh desetkratnih razredčin (10^1 , 10^2 , 10^3) končne pelete v destilirani vodi (slika 1).

5.2.2 S pipeto kanemo odmerjen standardni volumen vsake razredčine pelete, ki zadostuje za pokritje okenca (približno 25 μ l), na okenca objektnega stekelca z več okenci, kakor kaže slika 1.

Slika 1

Objektno stekelce z vzorcem in kontrolo PBS

VSTAVITI SLIKO:

undiluted sample = nerazredčeni vzorec

diluted sample = razredčeni vzorec

in duplicate = podvojeno

PBS = PBS

antiserum at selected dilution = izbrana razredčitev antiseruma

Slika 2

Objektno stekelce pozitivne kontrole

VSTAVITI SLIKO:

C. sepedonicum = *C. sepedonicum*

C 10^6 /ml = C 10^6 /ml

Positive potato extract = pozitivni ekstrakt krompirja

antiserum dilution = razredčine antiseruma

5.2.3 Posušimo na zraku pri temperaturi približno 37 °C in fiksiramo s 95-odstotno raztopino etanola ali nad plamenom.

5.2.4 Ustrezna okenca prekrijemo z antiserumom *C. sepedonicum* v predpisanih razredčitvah, 0,01 M PBS pH 7,2 (dodatek 2), kakor kaže slika 1. (Za kontrolo FITC uporabimo PBS). Delovna razredčitev antiseruma naj bo približno polovica titra IF. Kadar vključimo druge razredčitve antiseruma, pripravimo ločena objektna stekelca za vsako uporabljeno razredčitev.

5.2.5 Inkubiramo v vlažni komori pri sobni temperaturi 30 minut.

5.2.6 Pazljivo splaknemo z 0,01 M PBS pH 7,2. Spiramo pet minut, pri čemer trikrat zamenjamo 0,01 M PBS pH 7,2.

5.2.7 Pazljivo odstranimo odvečno vlago.

5.2.8 Vsako okence prekrijemo s konjugatom FITC enake razredčitve kot za določitev titra in inkubiramo v temni vlažni komori pri sobni temperaturi 30 minut.

5.2.9 Splaknemo in speremo kakor prej.

5.2.10 Na vsako okence nanese približno 5 do 10 μ l 0,1 M fosfatnega pufru z glicerinom pH 7,6 (ali podobnega prekrivnega pufru s pH najmanj 7,6) in pokrijemo s krovnim stekelcem (dodatek 2).

5.2.11 Pregledamo z mikroskopom, opremljenim z virom epifluorescentne svetlobe in filtri, ki so primerni za delo s FITC. Primerna povečava je od 400- do 1000-kratna. Okenca ponovitev pregledamo po črtah dveh pravokotnih premerov in po obodu.

Poiščemo fluorescentne celice pri pozitivnih kontrolah in določimo titer. Poiščemo fluorescentne celice v okencu kontrole FITC/PBC in, če jih ni, nadaljujemo s testnimi okenci. Na najmanj 10 mikroskopskih poljih določimo povprečno število morfološko tipičnih fluorescentnih celic na polje in izračunamo število celic na ml nerazredčene pelete (dodatek 4).

Z imunofluorescenčnim testom so povezne številne težave:

– V krompirjevih peletah se bodo verjetno pojavile populacije fluorescentnih celic ozadja z atipično morfologijo in navzkrižno reagirajoče saprofitske bakterije, ki so po velikosti in morfologiji podobne bakteriji *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Upoštevamo samo fluorescentne celice tipične velikosti in morfologije.

Zaradi možnosti navzkrižnih reakcij je treba vzorce, pozitivne na imunofluorescenčni test, ponovno testirati z drugim antiserumom.

– Tehnična meja detekcije za to metodo je med 10^3 in 10^4 celic na ml nerazredčene pelete. Vzorci s številom tipičnih celic IF na meji detekcije so ponavadi negativni za *C. m.* ssp. *sepedonicus*, vendar se na njih lahko opravi test na jajčevcu.

Imunofluorescenčni test je negativen pri vsakem vzorcu, ki ne vsebuje morfološko tipičnih fluorescentnih celic. Vzorci se štejejo kot »neokuženi« z bakterijo *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Test na jajčevcu ni potreben.

Imunofluorescenčni test je pozitiven pri vsakem vzorcu, ki vsebuje morfološko tipične fluorescentne celice.

Vzorci, pri katerih je bil imunofluorescenčni test pozitiven z obema antiserumoma, se štejejo za »potencialno okužene« z bakterijo *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Za vse vzorce, ki se štejejo za potencialno okužene, je potreben test na jajčevcu.

6. Test na jajčevcu

Za podrobnosti o kulturi glej dodatek 5.

6.1 Peleto iz 3.3 razdelimo med najmanj 25 jajčevcev v stadiju olistanosti 3 (dodatek 5) po eni od naslednjih metod (6.2, 6.3 ali 6.4).

6.2 Inokulacija v zarezo I

6.2.1 Vsak lonček podpremo v vodoravni legi (kvader ekspaniranega polistirena, pri katerem je z ene površine odstranjen 5 cm globok × 10 cm širok × 15 cm dolg kos (slika 3), je primeren za 10 cm lonček). Med steblo in kvader položimo trak sterilne aluminijaste folije za vsak testiran vzorec. Rastlino lahko pritrdimo na kvader z gumijastim trakom.

6.2.2 S skalpelom naredimo med kličnima listoma in prvim listom vzdolžno ali rahlo diagonalno zarezo, dolgo 0,5 do 1,0 cm in globoko približno tri četrtine premera stebela.

6.2.3 S konico skalpela držimo zarezo odprto in s tankim čopičem, premočenim s peleto, premažemo notranjost zareze z inokulumom. Preostanek pelete razdelimo med jajčevce.

6.2.4 Zarezo zapremo s sterilnim vazelinom iz 2-mililitrske brizgalke.

Slika 3

VSTAVITI SLIKO

6.3 Inokulacija v zarezo II

6.3.1 Rastlino držimo med prstoma in s pipeto kanemo kapljico (približno 5 do 10 µl) suspendirane pelete na steblo med kličnima listoma in prvim listom.

6.3.2 S sterilnim skalpelom naredimo diagonalno (pod kotom približno 5 °) zarezo, dolgo 1,0 cm in globoko približno 2/3 debeline stebela, ki se začne pri kapljici pelete.

6.3.3 Zarezo zapremo s sterilnim vazelinom iz brizgalke.

6.4 Inokulacija z brizgalko

6.4.1 Dan pred inokulacijo jajčevcev ne zalivamo, da se zmanjša turgor.

6.4.2 Stebla jajčevcev tik nad kličnima listoma inokuliramo z brizgalko s hipodermično iglo (najmanj 23G). Peleto porazdelimo med jajčevce.

6.5 Petindvajset rastlin inokuliramo z znano kulturo bakterije *C. sepedonicum*, kadar je mogoče, naravno okuženim tkivom gomolja (5.1), tako da pri vseh uporabimo isto metodo inokulacije (6.2, 6.3 ali 6.4).

6.6 Petindvajset rastlin inokuliramo s sterilnim 0,05 M PBS, tako da pri vseh uporabimo isto metodo (6.2, 6.3 ali 6.4).

6.7 Rastline 40 dni inkubiramo v ustreznih pogojih (dodatek 5). Redno, vsakih 8 dni, jih pregledujemo, če so se pojavili simptomi. Preštejemo število rastlin, ki kažejo simptome. *C. sepedonicum* povzroča uvelost listov jajčevcev, ki se lahko začne kot obrobna ali medžilna mlahavost. Uvelo tkivo je lahko sprva temno zeleno ali lisasto, vendar zbledi, preden postane nekrotično. Uvelo območje med žilami ima pogosto masten in kot z vodo prepojen videz. Nekrotično tkivo ima pogosto živo rumen rob. Ni nujno, da rastline odmrejo; daljše kot je obdobje pred razvojem simptomov, večja je možnost preživetja. Rastline lahko okužbo prebolijo. Dovzetni

mladi jajčevci so veliko bolj občutljivi na manjše populacije bakterije *C. sepedonicum* kakor starejše rastline, zato moramo uporabiti rastline v stadiju olistanosti 3 ali tik pred njim.

Uvelost lahko povzročijo tudi populacije drugih bakterij ali gliv, navzočih v peleti tkiva gomolja. Mednje spadajo *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata* in tudi velike populacije saprofitskih bakterij. Takšno uvelost lahko ločimo od uvelosti, ki jo povzroča *C. sepedonicum*, ker hitro ovenijo celi listi ali cele rastline.

6.8 Pripravimo po Gramu obarvane preparate (4) za vse serije jajčevcev, ki kažejo simptome, pri čemer uporabimo dele uvelega listnega tkiva ter stebelnega tkiva rastlin, in izoliramo na primernem hranilnem gojišču (7). Površino listov in stebel jajčevca razkužimo tako, da jih obrišemo z 70-odstotnim etanolom.

6.9 V določenih okoliščinah, zlasti če pogoji rasti niso optimalni, lahko *C. sepedonicum* obstaja kot latentna okužba v jajčevcih celo po 40 dnevni inkubaciji. Takšne okužbe lahko v inokuliranih rastlinah povzročijo upočasnitev rasti in hiranje. Če je test IF pozitiven, se lahko šteje, da je potrebno nadaljnje testiranje. Zato je bistvenega pomena, da primerjamo stopnje rasti vseh testiranih rastlin jajčevca s kontrolami, inokuliranimi s sterilnim 0,05 M PBS, in spremljamo razmere v rastlinjaku.

Priporočila za nadaljnje testiranje so:

6.9.1 stebela odrežemo nad mestom inokulacije in odstranimo liste;

6.9.2 stebela maceriramo v 0,05 M PBS pH 7,0, kakor je navedeno v 3.1 in 3.2;

6.9.3 polovico pelete uporabimo za barvanje po Gramu (4) in test IF (5);

6.9.4 drugo polovico uporabimo za izvedbo dodatnega testa na jajčevcu (6), če so testi barvanja po Gramu in/ali IF pozitivni. Uporabimo znano kulturo bakterije *C. sepedonicum* in kontrole s sterilnim 0,05 M PBS. Če v naknadnem testu ne opazimo simptomov, moramo vzorec šteti kot negativen.

7. Izolacija bakterije *C. sepedonicum*

Diagnoza se lahko potrdi le, če se *C. sepedonicum* izolira in identificira (8). Čeprav je *C. sepedonicum* zahteven organizem, ga lahko izoliramo iz simptomatičnega tkiva. Lahko pa ga prerasejo hitro rastoče saprofitske bakterije, zato se ne priporoča izolacija neposredno iz pelete tkiva gomolja (3.3). Jajčevci nudijo odlično selektivno obogateno gojišče za rast bakterije *C. sepedonicum* in predstavljajo tudi odlične gostitelje za potrditveni test.

Izolacijo je treba opraviti na vseh simptomatičnih gomoljih krompirja in jajčevcih (4, 6). Kadar je potrebna maceracija stebel jajčevcev, jo je treba izvesti kakor v 3. in 6.9.

7.1 Suspenzije razmažemo na enega izmed naslednjih gojišč (sestava je navedena v dodatku 6):

hranilni agar z dekstrozo (samo za precepljene kulture),

agar s kvasom, peptonom in glukozo,

hranilni agar s kvasom in dekstrozo,

agar s kvasnim ekstraktom in mineralnimi solmi.

Inkubiramo pri temperaturi 21 °C do 20 dni.

C. sepedonicum raste počasi in ponavadi proizvede pikaste, kremaste, kupolaste kolonije v 10 dneh.

Precepimo na novo gojišče, da dobimo čisto kulturo.

Stopnja rasti se s precepljanjem izboljša. Značilne kolonije so smetanasto bele ali slonokoščene barve, zaokrožene, gladke, izbočeno kupolaste, sluzasto tekoče konsistence z gladkimi robovi in ponavadi s premerom 1 do 3 mm.

Identifikacija

Iz zdravih ali obolelih krompirjev in jajčevcev se lahko izolirajo mnoge grampozitivne korineformne bakterije, katerih kolonije kažejo podobne značilnosti kot kolonije bakterije *C. sepedonicum*. Glede na to je treba *C. sepedonicum* identificirati z naslednjimi testi:

test IF (5.1),

test na jajčevcu,

hranilni in fiziološki testi (dodatek 7),

– oksidacijski/fermentacijski test (O/F),

– oksidazni test,

– rast pri 37 °C,

– proizvodnja ureaze,

– hidroliza eskulina,

– hidroliza škroba,

– toleranca za 7-odstotno raztopino natrijevega klorida,

– test proizvodnje indola,

– katalazni test,

– proizvodnja H₂S,

– izraba citrata,

– hidroliza želatine,

– kislina iz: glicerola, laktoze, ramnoze in salicina,

– barvanje po Gramu.

Vsi testi morajo vključevati kontrolo z znano bakterijo *C. sepedonicum*. Pri hranilnih in fizioloških testih je treba uporabiti inokulum iz precepljenih kultur na hranilnem agarju. Morfološke primerjave je treba opraviti na kulturah na hranilnem agarju z dekstrozo.

Za test IF je treba gostoto populacije celic uravnati na 10^6 celic/ml. Titer IF mora biti podoben titru kulture znane bakterije *C. sepedonicum*.

Za test na jajčevcu je treba populacije celic uravnati na 10^7 celic/ml. Teste na jajčevcu je treba opraviti na 10 rastlinah za vsak testni organizem, pri čemer spet uporabimo kontrole z znano kulturobakterije *C. sepedonicum* in sterilno vodo; pri čistih kulturah bi morala biti značilna uvelost dosežena v 20 dneh, vendar je treba rastline, ki po tem obdobju ne kažejo simptomov, inkubirati za skupaj 30 dni pri temperaturah, ki omogočajo rast jajčevcev, vendar ne presegajo $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (dodatek 5). Če se po 30 dneh simptomi ne pokažejo, se ne da potrditi, da je kultura patogena oblika bakterije *Corynebacterium sepedonicum*.

Test	<i>C. sepedonicum</i>
O/F	inerten ali šibko oksidativen
Oksidaza	–
Katalaza	+
Redukcija nitrata	–
Ureazna aktivnost	–
Proizvodnja H_2S	–
Proizvodnja indola	–
Uporaba citrata	–
Hidroliza škroba	– ali šibka
Rast pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$	–
Rast v 7 % NaCl	–
Hidroliza želatine	–
Hidroliza eskulina	+
Kislina iz:	
– glicerola	–
– laktoze	– ali šibka
– ramnoze	–
– salicina	–

Dodatek 1

SESTAVA MACERACIJSKE TEKOČINE, KI JO PRIPOROČATA LELLIOTT IN SELLAR, 1976

D C silikonska protipenilna MS A spojina (Hopkins & Williams Ltd, Cat. No 9964 – 25, Chadwell Heath, Essex, Anglija)	10 ml
kosmiči Lubrol W (ICI Ltd)	0,5 g
tetranatrijev pirofosfat	1 g
0,05 M fosfatni pufer s soljo pH 7,0 (dodatek 2)	1 liter

Dodatek 2

PUFRI

0,05 M fosfatni pufer s solmi pH 7,0

Ta pufer se lahko uporablja za maceracijo tkiva gomolja (2.1)

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
NaCl	8,0 g
destilirana voda do	1 litra

0,01 M fosfatni pufer s solmi pH 7,2

Ta pufer se uporablja za redčenje antiserumov in spiranje objektnih stekelc za IF

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
destilirana voda do	1 litra

0,1 M fosfatni pufer z glicerinom pH 7,6

Ta pufer se uporablja kot prekrivni pufer za ojačitev fluorescence pri testu IF

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	0,15 g
Glicerol	50 ml
destilirana voda	100 ml

Dodatek 3

POSTOPEK BARVANJA PO GRAMU (HUCKERJEVA PRILAGODITEV) (DOETSCH, 1981)

Raztopina kristal vijoličnega

2 g kristal vijoličnega raztopimo v 20 ml 95-odstotnega etanola.

0,8 g amonijevega oksalata raztopimo v 80 ml destilirane vode.

Raztopini zmešamo.

Lugolova raztopina

jod	1 g
kalijev jodid	2 g
destilirana voda	300 ml

Trdne snovi skupaj stremo v terilnici. Dodamo jih vodi in mešamo, dokler se ne raztopijo v zaprti posodi.

Raztopina za nasprotno barvanje s safraninom

Založna raztopina:

Safranin O	2,5 g
95 % etanol	100 ml

Zmešamo in shranimo.

Razredčimo v razmerju 1 : 10, da dobimo delovno raztopino.

Postopek barvanja

1. Pripravimo razmaze, posušimo na zraku in fiksiramo s segrevanjem.
2. Objektne stekelca za 1 minuto zalijemo z raztopino kristal vijoličnega.
3. Na hitro speremo z vodovodno vodo.
4. Za 1 minuto zalijemo z Lugolovo raztopino.
5. Operemo z vodovodno vodo in popivnemo do suhega.
6. Razbarvamo s 95-odstotnim etanolom, ki ga dodajamo po kapljicah, dokler ni razbarvanje popolno, ali vanj za 30 sekund potopimo razmaz in rahlo tresemo.

7. Operemo z vodovodno vodo in popivnamo do suhega.

8. Za 10 sekund zalijemo z raztopino safranina.

9. Operemo z vodovodno vodo in popivnamo do suhega.

Grampozitivne bakterije se obarvajo vijoličasto-modro; gramnegativne bakterije se obarvajo rožnato-rdeče.

Dodatek 4

DOLOČITEV POPULACIJE IF POZITIVNIH CELIC

Površina (S) okenca objektnega stekla z več okenci

VSTAVITI ENAČBO (1)

kjer je D = premer okenca.

Površina(-e) polja objektivna

VSTAVITI ENAČBO (2)

kjer je d = premer polja.

Vrednost d izračunamo bodisi z neposrednim merjenjem bodisi po naslednje enačbi:

VSTAVITI ENAČBO (3)

kjer je i = koeficient polja (odvisen od vrste okularja in znaša od 8 do 24),

K = koeficient tubusa (1 ali 1,25),

G = povečava (100×, 40× itd.) objektivna,

iz (2) VSTAVITI ENAČBO

iz (3) VSTAVITI ENAČBO (4)

Določimo število značilnih fluorescentnih celic na polje (c).

Izračunamo število značilnih fluorescentnih celic na okence (C).

VSTAVITI ENAČBO

Izračunamo število značilnih fluorescentnih celic na ml pelete (N)

VSTAVITI ENAČBO

kjer je y = prostornina pelete na okence,

F = faktor razredčitve pelete.

Dodatek 5

KULTURA JAJČEVCEV

Semena jajčevca (*Solanum melongena*, cv. Black Beauty) posejemo v pasteriziran kompost za seme. Sejance s popolnoma razvitima kličnima listoma (10 do 14 dni) presadimo v pasteriziran kompost za sajenje v lončke.

Uporabimo jajčevce v stadiju olistanosti 3, ko sta popolnoma odprta dva lista, vendar ne več kot trije.

Jajčevce gojimo v rastlinjaku v naslednjih pogojih:

dolžina dneva:	14 ur ali naravna dolžina dneva, če je ta daljša;
temperatura:	dan: 21 do 24 °C,
	noč: 15 °C.

OPOMBA: C. sepedonicum ne bo rasel pri temperaturah > 30 °C. Če nočne temperature ne padejo do 15 °C, se lahko pojavijo kromoforne poškodbe (srebrnkasta nekroza).

Poškodbe korenin, ki jih povzročajo ličinke mrtvaških mušic (Sciaridae), se lahko izognemo z uporabo ustreznega insekticida.

Jajčevci cv. Black Beauty se lahko naročijo pri:

1. AB Hammenhögs Frö,
270 50 Hammenhög,
Švedska;

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

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

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

Dodatek 6

GOJIŠČA ZA RAST IN IZOLACIJO BAKTERIJE *C. sepedonicum*

Hranilni agar (NA)

Hranilni agar Difco bacto v destilirani vodi, pripravljen po navodilih proizvajalca. Steriliziramo 15 minut v avtoklavu pri 121 °C.

Hranilni agar z dekstrozo (NDA)

Hranilni agar Difco bacto, ki vsebuje 1 % D(+)-glukoze (monohidrat). Steriliziramo 20 minut v avtoklavu pri 115 °C.

Agar s kvasom, peptonom in glukozo (YPGA)

kvasni ekstrakt Difco bacto (št. 0127)	5 g
pepton Difco bacto (št. 0118)	5 g
D(+)-glukoza (monohidrat)	10 g
prečiščeni agar Difco bacto (št. 0560)	15 g
destilirana voda	1 liter

Po 0,5 litra gojišča steriliziramo 20 minut v avtoklavu pri 115 °C.

Gojišče s kvasnim ekstraktom in mineralnimi solmi (YGM)

kvasni ekstrakt Difco bacto	2 g
D(+)-glukoza (monohidrat)	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,005 g
prečiščeni agar Difco bacto	18 g
destilirana voda	1 liter

Po 0,5 litra gojišča steriliziramo 20 minut v avtoklavu pri 115 °C.

Dodatek 7

HRANILNI IN FIZIOLOŠKI TESTI ZA IDENTIFIKACIJO BAKTERIJE *C. sepedonicum*

Vsa gojišča moramo inkubirati pri 21 °C in pregledati čez 6 dni. Če do rasti ni prišlo, inkubiramo naprej do največ 20 dni.

– **Oksidacijski in fermentacijski test** (Hugh & Leifson, 1953) – test O/F.

Osnovno gojišče:

KCl	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
pepton Difco bacto	1,0 g
prečiščeni agar Difco bacto	3,0 g
D(+)-glukoza (monohidrat)	10,0 g
bromtimol modro	0,03 g
destilirana voda	1 liter

Zmešamo in z 1 N KOH uravnamo pH-vrednost na 7,0 do 7,2.

Po 5 ml in 10 ml gojišča porazdelimo v epruvete za kulture Pyrex 16 mm × 100 mm (kapaciteta 12 ml).

Steriliziramo 10 minut v avtoklavu pri 115 °C.

Vsako kulturo inokuliramo z vbodom v epruveti s po 5 ml in 10 ml gojišča. V epruveto z 10 ml gojišča aseptično dodamo 1 do 2 ml sterilnega tekočega parafina. Inkubiramo.

Pozitivna reakcija:

V TABELO VSTAVITI ZAVITE OKLEPAJE

Epruveta	Barva	Razlaga
Odprta	Rumena	Fermentativna
Zaprta	Rumena	
Odprta	Rumena	Oksidativna
Zaprta	Modro-zelena	
Odprta	Zelenkasta	Oksidativna ali inertna
Zaprta	Modro-zelena	

– **Oksidazni test** (Kovacs, 1956)

Oksidazni reagent po Kovacsu:

1-odstotna raztopina tetrametil-parafenilendiamin-dihidroklorida (BDH št. 30386) v destilirani vodi.

Pripravimo po 1 ml svežega reagenta, ali pa ga shranimo v rjavi stekleni steklenici pri 5 °C za 1 do 4 tedne.

Na filtrirni papir v čisti petrijevki naneseemo kapljico reagenta. S platinasto zanko takoj naneseemo del testne kulture iz hranilnega agarja.

Pozitivna reakcija: razvoj vijolične obarvanosti v 10 sekundah. Kulture, ki se obarvajo v 10 do 30 sekundah, so šibko pozitivne.

OPOMBA: Nujno moramo uporabiti platinasto zanko in kulture NA, ker lahko sledi železa ali visoka vsebnost sladkorja v rastnem gojišču dajo lažne pozitivne rezultate.

– **Proizvodnja kisline iz laktoze, ramnoze, salicina, glicerola**

Pripravimo gojišče Hugh & Leifson O/F brez glukoze. Porazdelimo po 5 ml v epruvete. Steriliziramo 10 minut v avtoklavu pri 115 °C. Staljeni osnovi pri 45 °C aseptično dodamo 0,5 ml s filtriranjem sterilizirane 10-odstotne vodne raztopine bodisi glicerola, laktoze, ramnoze ali salicina. Pazljivo premešamo.

Pozitivna reakcija: sprememba barve iz modro-zelene v rumeno pomeni proizvodnjo kisline.

– **Katalazni test**

Kapljico vodikovega peroksida (volumen 30) kanemo na čisto objektno stekelce in emulgiramo s platinasto zanko, napolnjeno s kulturo.

Pozitivna reakcija: nastajanje kisikovih mehurčkov v kapljici pomeni navzočnost katalaze.

– **Aktivnost nitrat-reduktaze in denitrifikacija** (Bradbury, 1970)

Gojišče za kulture:

KNO ₃ (brez nitrita)	1 g
kvasni ekstrakt Difco bacto	1 g
K ₂ HPO ₄	5 g
destilirana voda	1 liter

Razdelimo na dele po 10 ml v 20 ml stekleničke. Steriliziramo 15 minut v avtoklavu pri 121 °C.

Reagent A:

H ₂ SO ₄	8 g
5 N očetna kislina	1 liter

Reagent B:

naftilamin	5 g
5 N očetna kislina	1 liter

Inokuliramo nitratno gojišče v dveh ponovitvah. Po 10 in 20 dneh testiramo z dodatkom ene kapljice Lugolove raztopine, 0,5 ml reagenta A in 0,5 ml reagenta B. Če gojišče ne postane rdečkasto, dodamo približno 50 mg cinkovega prahu. Opazujemo barvno reakcijo.

Pozitivna reakcija:

Barvna reakcija

Stopnja 1

Stopnja 2

Ni redukcije nitrata	brezbarvna	rdeča
Redukcija nitrata do nitrita (samo nitrat-reduktaza)	rdeča	–
Redukcija nitrata naprej od nitrita (denitrifikacija – nitrat- in nitrit-reduktaza)	brezbarvna	brezbarvna

– **Proizvodnja ureaze** (Lelliott, 1966)

Osnovno gojišče:

agarna osnova z ureo Oxoid (CM53)	2,4 g
destilirana voda	95 ml

Steriliziramo 20 minut v avtoklavu pri 115 °C. Staljeno osnovo ohladimo do 50 °C in aseptično dodamo 5 ml s filtriranjem sterilizirane 40-odstotne vodne raztopine uree (Oxoid SR20). Dobro premešamo.

Razdelimo po 6 ml v sterilne epruvete (16 × 100 mm), epruvete nagnemo in pustimo v tem položaju, da se gojišče strdi.

Pozitivna reakcija: rumeno-oranžno gojišče se obarva češnjevo rdeče ali škrlatno roza, če je prišlo do aktivnosti ureaze.

– **Izraba citrata** (Christensen) (Skerman, 1967)

agarna osnova s citratom (Merck 2503)	23 g
destilirana voda	1 liter

Zmešamo in raztopimo s segrevanjem. Razdelimo na dele po 6 ml kakor za gojišče z ureo. Steriliziramo 15 minut v avtoklavu pri 121 °C in pustimo, da se gojišče strdi v nagnjenem položaju.

Pozitivna reakcija: izrabo citrata se pokaže sprememba barve gojišča iz oranžne v rdečo.

– **Proizvodnja vodikovega sulfida** (Ramamurthi, 1959)

Gojišče:

tripton Difco bacto (št. 0123)	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NaCl	5 g
destilirana voda	1 liter.

Raztopimo in razdelimo po 6 ml v epruvete 16 × 100 mm. Steriliziramo 10 minut v avtoklavu pri 115 °C.

Inokuliramo in z ustja epruvete aseptično obesimo papir s svinčevim acetatom (Merck 9511). Papir pritrdimo z zamaškom. Inkubiramo do 20 dni.

Pozitivna reakcija: Proizvodnjo H₂S iz triptona pokaže rjavo-črna obarvanost testnega papirja.

– **Proizvodnja indola** (Ramamurthi, 1959)

Gojišče:

Kot za test H₂S.

Odstranimo papir s svinčevim acetatom, dodamo 1 do 2 ml dietiletra in rahlo pretresemo. Počakamo, da se plasti ločijo (pet minut). V nagnjeno epruveto pazljivo dodamo 0,5 ml reagenta po Kovacsu (Merck 9293).

Pozitivna reakcija: navzočnost indola pokaže nastanek rdeče barve v rumeni plasti med etrsko in vodno frakcijo.

– **Rast pri 37 °C** (Ramamurthi, 1959)

Gojišče:

hranilni bujon Difco bacto (št. 0003)	8 g
destilirana voda	1 liter

Zmešamo, raztopimo in razdelimo po 6 ml v epruvete.

Steriliziramo 15 minut v avtoklavu pri 121 °C.

Inokuliramo in inkubiramo pri 37 °C.

Pozitivna reakcija: rast.

– **Rast v 7- odstotnem natrijevem kloridu** (Ramamurthi, 1959)

Gojišče:

hranilni bujon Difco bacto	8 g
NaCl	70 g
destilirana voda	1 liter

Zmešamo, raztopimo in razdelimo po 6 ml v epruvete.

Steriliziramo 15 minut v avtoklavu pri 121 °C.

Pozitivna reakcija: rast.

– **Hidroliza želatine** (Lelliott, Billing & Hayward, 1966)

Gojišče:

želatina Difco bacto (št. 0143)	120 g
destilirana voda	1 liter

Zmešamo, raztopimo s segrevanjem in razdelimo po 6 ml v epruvete.

Steriliziramo 15 minut v avtoklavu pri 121 °C.

Pozitivna reakcija: utekočinjenje želatine celo po 30 minutah pri temperaturi 5 °C.

– Hidroliza škroba

Gojišče:

hranilni agar Difco bacto (staljen)	1 liter
topni škrob Difco bacto (št. 0178)	2 g

Zmešamo in steriliziramo 10 minut v avtoklavu pri 115 °C.

Razlijemo na plošče. Plošče točkasto inokuliramo.

Ko nastane dobra razrast (10 do 20 dni), odstranimo del kulture in jo zalijemo z Lugolovo raztopino.

Pozitivna reakcija: hidrolizo škroba pokažejo čista območja pod ali okoli bakterijske rasti; preostalo gojišče se obarva vijolično.

– Aktivnost eskulin-hidrolaze (Sneath & Collins, 1974)

Gojišče:

pepton Difco bacto	10 g
eskulin	1 g
železov citrat (Merck 3862)	0,05 g
natrijev citrat	1 g
destilirana voda	1 liter

Zmešamo, da se raztopi, in razdelimo po 6 ml v epruvete. Steriliziramo 10 minut v avtoklavu pri 115 °C.

Gojišče je bistro, vendar modrikasto fluorescira.

Pozitivna reakcija: hidrolizo eskulina pokaže nastanek rjave barve skupaj z izginotjem fluorescence. To lahko preverimo z uporabo ultravijolične svetilke.

VIRI

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 J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull., št. 17, 1987, str. 1-10.

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

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

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

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

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

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

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

PRILOGA II

1. Za vsak domnevni pojav, pri katerem je bil imunofluorescenčni test v skladu s postopkom iz Priloge I pozitiven in katerega potrditev ali ovržba bo mogoča šele ob zaključku omenjene metode, je treba zadržati in primerno konzervirati:

- vse vzorce gomoljev ali rastlin, kadar je le mogoče, in
- kateri koli preostali ekstrakt in dodatno pripravljene preparate imunofluorescenčnega testa, do zaključka omenjene metode.

2. Če se potrdi navzočnost organizma, je treba zadržati in primerno konzervirati:

- material, naštet v odstavku 1, in
- vzorec materiala okuženega jajčevca, ki je bil inokuliran z ekstraktom iz gomoljev ali rastlin, in
- izolirano kulturo organizma,

dokler ne preteče najmanj en mesec po uradnem obvestilu v skladu s členom 5(2).

PRILOGA III

1. Dejavniki, ki jih je treba upoštevati pri določanju obsega verjetne okužbe v skladu s členom 5(1)(b), vključujejo:

- gomolje ali rastline, pridelane na mestu pridelave, ki je bilo določeno za okuženo v skladu s členom 5(1)(a),
- mesto(-a) pridelave ali posestva, kakor koli povezana s pridelovanjem gomoljev ali rastlin, določenih za okužene v skladu s členom 5(1)(a), vključno s tistimi, za katere so se neposredno ali preko skupnega izvajalca uporabljali ista oprema in prostori,
- gomolje ali rastline, ki so bile pridelane na mestu(-ih) pridelave iz prejšnje alinee ali so bili na tem mestu(-ih) pridelave navzoči v času, ko so bili na posestvih ali mestih pridelave iz prve alinee prisotni gomolji ali rastline, določene za okužene v skladu s členom 5(1)(a),
- osrednja skladišča, kjer je bil krompir z zgoraj navedenih mest pridelave,
- vse stroje, vozilo, posodo, skladišče ali njihove dele in vse druge predmete, vključno s pakirnim materialom, ki so morda prišli v stik z gomolji ali rastlinami, določenimi za okužene v skladu s členom 5(1)(a), v obdobju zadnjih 12 mesecev ali kadar koli je ustrezno,
- vsi gomolji ali rastline, uskladiščene v ali v stiku s katerimi koli objekti ali predmeti iz prejšnje alinee pred čiščenjem in razkuževanjem teh objektov in predmetov, in
- glede na rezultate testiranja v skladu s členom 6, gomolje ali rastline, ki imajo isto klonsko poreklo kakor gomolji ali rastline, določene za okužene v skladu s členom 5(1)(a), in za katere preiskave kažejo, da so verjetno okužene.

2. Dejavniki, ki se upoštevajo pri določitvi možnega širjenja v skladu s členom 5(1)(c), vključujejo:

- bližino drugih mest pridelave, kjer se prideluje krompir ali druge gostiteljske rastline,
- skupni izvor zalog semenskega krompirja.

3. Podrobnosti uradnega obvestila iz prvega pododstavka člena 5(2) vključujejo:

- za katero koli pošiljko ali partijo krompirja, ki je bila določena za okuženo, fitosanitarna spričevala, predpisana v členu 7 ali 8 Direktive 77/93/EGS, in če je ustrezno, številko rastlinskega potnega lista ali registrsko številko,
- pri semenskem krompirju ime sorte, in kadar je mogoče, tudi v vseh ostalih primerih,
- opis elementov določene okužbe in razmejitve območja,
- dostop do ekstrakta, pripravljenih preparatov za imunofluorescenco, okuženega tkiva jajčevcev in izolirane kulture organizma iz testa, s katerim je bila okužba potrjena.

PRILOGA IV

1. Uradno nadzorovani ukrepi iz člena 7(1) za odstranitev gomoljev ali rastlin, določenih za okužene v skladu s členom 5(1)(a) so:

– uporaba v industrijski predelavi z neposredno in takojšnjo dostavo v predelovalni obrat z ustrezno opremo za odstranjevanje odpadkov, za katero je dokazano, da ne predstavlja nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma, in sistemom za razkuževanje skladiščnih prostorov in odhodnih vozil, ali

– drugi ukrepi, če je bilo dokazano, da ne predstavljajo nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma; o takšnih ukrepih se uradno obvestijo Komisija in druge države članice.

2. Ustrezna uporaba ali odstranitev gomoljev ali rastlin, določenih za verjetno okužene v skladu s členom 5(1)(b) in navedenih v členu 7(2), pod nadzorom odgovornih uradnih organov držav članic, je:

– uporaba kot jedilni krompir za prehrano, pakiran za neposredno dobavo in uporabo brez prepakiranja ter namenjen takšni neposredni dobavi in uporabi, ali

– uporaba kot jedilni krompir za industrijsko predelavo, namenjen za neposredno in takojšnjo dostavo v predelovalni obrat, ki mora imeti ustrezno opremo za odstranjevanje odpadkov in razkuževanje, ali

– drug način uporabe ali odstranitve, če je dokazano, da ne predstavlja nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma.

3. Ustrezne metode za čiščenje in razkuževanje predmetov iz člena 7(3) so metode, za katere je bilo dokazano, da ne predstavljajo nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma, in ki se izvedejo pod nadzorom odgovornih uradnih organov držav članic.

4. Vrsta ukrepov, ki jih izvedejo države članice na razmejenem območju, določenem v skladu s členom 5(1)(c) in navedenem v členu 7(4), vključuje:

4.1 na mestih pridelave, določenih za okužene v skladu s členom 5(1)(a):

(a) na polju, ki je bilo v skladu s členom 5(1)(a) določeno za okuženo, bodisi

(i) – v najmanj treh rastnih letih, ki sledijo letu določene okužbe,

– se izvedejo ukrepi za odstranjevanje krompirjevih samosevcev in drugih samoniklih gostiteljskih rastlin organizma, in

– se ne sadijo gomolji, rastline ali seme krompirja ali druge samonikle gostiteljske rastline organizma, ali poljščine, pri katerih je bila dokazana nevarnost preživetja ali prenašanja organizma, dokler ni polje brez krompirjevih samosevcev najmanj dve zaporedni rastni leti,

– v prvi sezoni pridelave krompirja, ki sledi obdobju iz prejšnje alineje, se sadi uradno certificirani semenski krompir le za pridelavo jedilnega krompirja in se izvede uradna raziskava iz člena 2(1);

– v sezoni pridelovanja krompirja, ki sledi obdobju iz prejšnje alinee, in ob upoštevanju ustreznega kolobarja, se sadi uradno certificirani semenski krompir za pridelavo bodisi semenskega bodisi jedilnega krompirja in se izvede uradna raziskava iz člena 2(1);

ali

(ii) – v štirih rastnih letih, ki sledijo letu določene okužbe,

– se izvedejo ukrepi za odstranjevanje krompirjevih samosevcev in drugih samoniklih gostiteljskih rastlin organizma, in

– se polje vzdržuje bodisi v prahi bodisi kot trajni pašnik s pogosto nizko košnjo ali intenzivno pašo,

– v prvi sezoni pridelovanja krompirja, ki sledi obdobju iz prejšnje alinee, se sadi uradno certificirani semenski krompir za pridelavo bodisi semenskega bodisi jedilnega krompirja in se izvede uradna raziskava iz člena 2(1);

(b) na drugih poljih:

– v rastnem letu, ki sledi določeni okužbi:

– se ne sadijo gomolji, rastline ali semena krompirja ali drugih naravno pojavljajočih se gostiteljskih rastlin organizma in se izvedejo ukrepi za odstranjevanje krompirjevih samosevcev, kjer je to ustrezno, ali

– se lahko sadi uradno certificirani semenski krompir le za pridelavo jedilnega krompirja, če se odgovornim uradnim organom dokaže, da je bila nevarnost krompirjevih samosevcev in drugih samoniklih gostiteljskih rastlin organizma odpravljena,

– v obdobju najmanj dveh rastnih let, ki sledi obdobju iz prejšnje alinee, se sadi le uradno certificirani semenski krompir za pridelavo bodisi semenskega bodisi jedilnega krompirja,

– v vsakem od rastnih let iz prejšnjih alinej se izvedejo ukrepi za odstranjevanje krompirjevih samosevcev in samoniklih gostiteljskih rastlin organizma in uradna raziskava iz člena 2(1),

– kadar se v rastnem letu, ki sledi določeni okužbi, sadi uradno certificirani semenski krompir za pridelavo jedilnega krompirja, se nasad med rastjo pregleduje v ustreznih časovnih obdobjih, krompirjevi samosevci pa se testirajo glede navzočnosti organizma;

(c) takoj po določitvi okužbe v skladu s členom 5(1)(a) in v vsakem naslednjem rastnem letu vse do vključno prve sezone, ko je dovoljena pridelava krompirja na polju(-ih), določenem(-ih) za okuženo(-e), kakor je opredeljeno v odstavku (a), se vsi stroji in skladiščni prostori na mestu pridelave, ki so vključeni v pridelavo krompirja, ustrezno očistijo in razkužijo z uporabo ustreznih metod, navedenih v točki 3;

(d) pri pridelovalnih sistemih, kjer je mogoče v celoti zamenjati substrat,

– se ne sadijo gomolji, rastline ali pravo seme, razen če se na pridelovalni enoti izvedejo uradno nadzorovani ukrepi za izkoreninjenje organizma in odstranijo kakršni koli deli krompirja ali drugih

razhudnikovk, vključno z najmanj celotno zamenjavo rastnega substrata ter očiščenjem in razkužitvijo pridelovalne enote in vse opreme, in če so nato odgovorni uradni organi odobrili pridelavo krompirja, in

– se krompir prideluje iz uradno certificiranega semenskega krompirja ali minigomoljev ali mikro-rastlin, pridobljenih iz testiranih virov;

4.2 znotraj razmejenega območja in brez poseganja v ukrepe iz točke 4.1, države članice:

(a) takoj in za vsaj tri rastne sezone po ugotovljeni okužbi:

– zagotovijo nadzor posestev, ki pridelujejo, skladiščijo ali obdelujejo krompir, vključno s posestvi, ki pogodbeno upravljajo s stroji za obdelavo krompirja, preko svojih odgovornih uradnih organov

– zahtevajo čiščenje in razkuževanje strojev in skladišč na takšnih posestvih, kjer je to ustrezno, z uporabo ustreznih metod iz točke 3,

– zahtevajo izključno uporabo uradno certificiranega semenskega krompirja za pridelovanje krompirja znotraj tega območja,

– zahtevajo, da se mora na vseh posestvih znotraj tega območja zaloge pospravljenega semenskega krompirja hraniti in dodelovati ločeno od jedilnega krompirja,

– izvajajo uradno raziskavo iz člena 2(1);

(b) kadar je primerno, izdelajo program za zamenjavo celotnih zalog semenskega krompirja v ustreznem časovnem obdobju.

Druge države članice in Komisija se vsako leto uradno obvestijo o izvedenih ukrepih v skladu s točko 4.2, skupaj z registrskimi številkami pridelovalcev, skupnih skladišč in odpremnih centrov znotraj razmejenega območja.