

II

(Besluiten waarvan de publikatie niet voorwaarde is voor de toepassing)

RAAD

RICHTLIJN 93/85/EEG VAN DE RAAD

van 4 oktober 1993

betreffende de bestrijding van aardappelringrot

DE RAAD VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap, inzonderheid op artikel 43,

Gezien het voorstel van de Commissie ⁽¹⁾,

Gezien het advies van het Europees Parlement ⁽²⁾,

Gezien het advies van het Economisch en Sociaal Comité ⁽³⁾,

Overwegende dat in de landbouwproductie van de Gemeenschap de aardappelproductie een belangrijke plaats inneemt; dat schadelijke organismen een constante bedreiging voor de opbrengsten in de aardappelteelt vormen;

Overwegende dat door de aardappelteelt tegen deze schadelijke organismen te beschermen, niet alleen de productiecapaciteit in stand wordt gehouden, maar tevens tot verhoging van de landbouwproductiviteit wordt bijgedragen;

Overwegende dat beschermende maatregelen om het binnenbrengen van schadelijke organismen op het grondgebied van een Lid-Staat te voorkomen, slechts een beperkt effect zouden sorteren indien geen maatregelen worden genomen om die organismen overal in de Gemeenschap gelijktijdig en systematisch onder controle te houden en verspreiding ervan te voorkomen;

Overwegende dat *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., het pathogene agens van aardappelringrot, voor aardappelen een van de schadelijke organismen is; dat deze ziekte in enkele delen van de Gemeenschap is opgetreden en dat er nog steeds enkele besmettingshaarden van geringe omvang zijn;

Overwegende dat deze ziekte voor de aardappelteelt, waar dan ook in de Gemeenschap, een aanzienlijk gevaar oplevert, indien geen adequate maatregelen worden genomen om de ziekte te lokaliseren en de verspreiding ervan te bepalen, om het optreden en de verspreiding ervan te voorkomen, en om, wanneer de ziekte eenmaal is aangekomen, ervoor te zorgen dat zij zich niet verder kan verspreiden en onder controle wordt gehouden met het oogmerk haar uit te roeien;

Overwegende dat daartoe binnen de Gemeenschap een aantal maatregelen dient te worden genomen; dat de Lid-Staten zo nodig aanvullende of strengere maatregelen moeten kunnen vaststellen, met dien verstande dat het verkeer van aardappelen binnen de Gemeenschap daarvan in geen enkel opzicht hinder mag ondervinden, tenzij bij maatregelen op grond van Richtlijn 77/93/EEG ⁽⁴⁾; dat van dergelijke maatregelen aan de andere Lid-Staten en aan de Commissie kennis dient te worden gegeven;

Overwegende dat in Richtlijn 80/665/EEG van de Raad van 24 juni 1980 betreffende de bestrijding van ringrot bij aardappelen ⁽⁵⁾ is bepaald welke maatregelen de Lid-Staten ter bestrijding van aardappelringrot op zijn minst dienen te nemen;

⁽¹⁾ PB nr. C 93 van 2. 4. 1993, blz. 12.

⁽²⁾ PB nr. C 176 van 28. 6. 1993, blz. 210.

⁽³⁾ PB nr. C 161 van 14. 6. 1993, blz. 18.

⁽⁴⁾ PB nr. L 26 van 31. 1. 1977, blz. 20. Richtlijn laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 92/103/EEG van de Commissie (PB nr. L 363 van 11. 12. 1992, blz. 1).

⁽⁵⁾ PB nr. L 180 van 14. 7. 1980, blz. 30.

Overwegende dat er zich wat de kennis van aardappelringrot en het opsporen van het pathogene agens van deze ziekte betreft, inmiddels significante ontwikkelingen hebben voorgedaan;

Overwegende dat, voor de toepassing van de communautaire regelgeving op fytosanitair gebied op de Gemeenschap als ruimte zonder binnengrenzen, sommige bepalingen van Richtlijn 80/665/EEG opnieuw moeten worden gezien en aangepast;

Overwegende dat bij dit heronderzoek is gebleken dat de bepalingen van Richtlijn 80/665/EEG ontoereikend zijn; dat het noodzakelijk is maatregelen nader te specificeren;

Overwegende dat Richtlijn 80/665/EEG derhalve dient te worden ingetrokken en de nodige maatregelen dienen te worden vastgesteld;

Overwegende dat daarbij ten eerste rekening dient te worden gehouden met het feit dat de ziekte zowel in de planten tijdens de groei als in knollen die worden bewaard, latent aanwezig en onopgemerkt kan blijven en derhalve alleen doeltreffend kan worden voorkomen door infectievrije pootaardappelen te telen en te gebruiken, en ten tweede met het feit dat systematische officiële onderzoeken moeten worden verricht om de ziekte te kunnen lokaliseren; dat de verspreiding van het pathogene agens tijdens de groei van het gewas niet de belangrijkste factor is, maar het pathogene agens wel kan overwinteren in in de bodem achtergebleven knollen die de belangrijkste haard vormen waardoor de ziekte zich in het daarop volgende seizoen opnieuw voordoet; dat het pathogene agens zich vooral verspreidt door contact met besmette aardappelen, of met poot-, oogst- of behandelingsmachines, of containers voor vervoer en opslag, die met besmette aardappelen in aanraking zijn geweest; dat besmette voorwerpen nog enige tijd na dergelijk contact besmettelijk blijven; dat verspreiding van het pathogene agens kan worden tegengegaan of voorkomen door dergelijke voorwerpen te desinfecteren; dat besmetting van pootaardappelen een groot risico voor verspreiding van het pathogene agens oplevert;

Overwegende dat het wenselijk is dat de Lid-Staten bij het uitwerken van de nadere bijzonderheden voor dergelijke algemene maatregelen en voor de door de Lid-Staten te treffen strengere of aanvullende maatregelen ter voorkoming van het binnenbrengen van het pathogene agens op hun grondgebied, nauw met de Commissie samenwerken binnen het Permanent Planteziektenkundig Comité, hierna het „Comité” genoemd,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

Deze richtlijn heeft betrekking op de in de Lid-Staten tegen *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., het agens dat aardappelringrot veroorzaakt, hierna „het organisme” genoemd, te nemen maatregelen:

- a) om het te lokaliseren en de verspreiding ervan te bepalen;
- b) om het optreden en de verspreiding te voorkomen; en
- c) indien het organisme wordt aangetroffen, verspreiding ervan te voorkomen en het onder controle te houden met het oog op uitroeiing ervan.

Artikel 2

1. De Lid-Staten verrichten systematisch officiële onderzoeken op aardappelknollen, of indien passend, op aardappelplanten (*Solanum tuberosum* L.) die van hun grondgebied afkomstig zijn, om de aanwezigheid dan wel de afwezigheid van het organisme vast te stellen.

Met het oog daarop worden voor wat betreft de knollen, van zowel pootaardappelen als van andere aardappelen, monsters genomen, bij voorkeur uit partijen die zijn opgeslagen; de monsters worden officieel of onder officieel toezicht in een laboratorium getest volgens de in bijlage I beschreven methode om het organisme op te sporen en te identificeren. In aanvulling daarop kunnen, waar passend, de monsters van andere knollen worden doorgesneden voor een officiële of onder officieel toezicht verrichte visuele keuring.

Voor planten worden deze onderzoeken verricht volgens passende methoden en worden de monsters officieel of onder officieel toezicht getest.

Hoeveel, waar en op welk tijdstip monsters worden genomen en hoe de samenstelling ervan dient te zijn, wordt op grond van deugdelijke wetenschappelijke en statistische beginselen en van de biologische eigenschappen van het organisme door de in Richtlijn 77/93/EEG bedoelde verantwoordelijke officiële instanties bepaald; daarbij wordt rekening gehouden met de voor de betrokken Lid-Staten specifieke teeltmethoden. Aan de andere Lid-Staten en aan de Commissie worden jaarlijks de bijzonderheden daarvan medegedeeld om te waarborgen dat voor de bevestiging dat het organisme niet voorkomt, de Lid-Staten gelijkwaardige niveaus van garantie bieden.

2. De uitkomsten van de in lid 1 bedoelde officiële onderzoeken worden ten minste eenmaal per jaar aan de andere Lid-Staten en aan de Commissie medegedeeld. De daarbij verstrekte gegevens zijn vertrouwelijk. Zij kunnen volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG aan het Comité worden voorgelegd.

3. Volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG kunnen bepalingen worden vastgesteld met betrekking tot:

- de in lid 1 bedoelde onderzoeken, die volgens deugdelijke wetenschappelijke en statistische beginselen moeten worden verricht;
- de in lid 2 bedoelde kennisgeving.

4. Volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG worden bepalingen vastgesteld ten aanzien van

- de passende methoden voor de onderzoeken en de tests als bedoeld in lid 1, derde alinea.

Artikel 3

De Lid-Staten waarborgen dat het vermoede optreden en de bevestigde aanwezigheid van het organisme in aardappelplanten en -knollen of op hun grondgebied geoogste opgeslagen of verhandelde knollen aan hun eigen verantwoordelijke officiële instanties wordt gemeld.

Artikel 4

1. Indien het optreden van het organisme wordt vermoed, dienen de verantwoordelijke officiële instanties van de Lid-Staat waar dat geval wordt gemeld toe te zien op de volledige afwikkeling van het officiële of onder officieel toezicht verrichte laboratoriumonderzoek volgens de in bijlage I aangegeven methode en met inachtneming van het bepaalde in bijlage II, punt 1, ten einde het vermoede optreden van het organisme te bevestigen dan wel het tegenbewijs te kunnen melden. Indien blijkt dat het organisme is opgetreden, geldt het bepaalde in bijlage II, punt 2.

2. In afwachting van de bevestiging van het vermoede optreden of van het tegenbewijs, als bedoeld in lid 1, in de gevallen waarin:

- i) verdachte diagnostische visuele symptomen van de ziekte zijn waargenomen, of,
- ii) een positieve uitkomst van de immunofluorescentietest als beschreven in bijlage I of andere passende positieve testuitkomsten zijn verkregen,

dienen de verantwoordelijke officiële instanties van de Lid-Staten:

- a) te verbieden dat partijen of zendingen waarvan de monsters zijn genomen, worden verplaatst zolang over de vermoede besmetting nog geen uitsluitsel bestaat, tenzij de verplaatsing onder hun toezicht en mits is vastgesteld dat er voor de verspreiding van het organisme geen aanwijsbaar risico bestaat;
- b) het nodige te doen om de oorsprong van het vermoede optreden van het organisme te achterhalen;
- c) op grond van een risico-evaluatie passende aanvullende preventieve maatregelen vast te stellen om iedere vorm van verspreiding van het organisme te voorkomen, waaronder officieel toezicht op de verplaatsing van alle overige knollen of planten binnen of buiten het bedrijfsterrrein waaromtrent het vermoeden bestaat dat daar het organisme is opgetreden.

3. De volgende maatregelen kunnen worden vastgesteld volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG:

- de maatregelen als bedoeld in lid 2, onder c).

4. De volgende maatregelen worden vastgesteld volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG:

- de andere passende tests als bedoeld in lid 2, onder ii).

Artikel 5

1. Wanneer het officiële of onder officieel toezicht verrichte laboratoriumonderzoek waarbij de in bijlage I beschreven methode is toegepast, de aanwezigheid van het organisme in het monster van knollen, planten of plantedelen bevestigt, nemen de verantwoordelijke officiële instanties van een Lid-Staat, rekening houdend met deugdelijke wetenschappelijke beginselen, de biologische eigenschappen van het organisme en de in de Lid-Staten gebruikelijke teelt-, afzet- en behandelingsmethoden, de volgende maatregelen:

- a) de knollen of planten, de zending en/of de partij, alsmede de machines, het voer- of vaartuig, de opslagplaats, of delen daarvan en enig ander voorwerp, verpakkingsmateriaal inbegrepen, waaruit het monster werd genomen, en, in voorkomend geval, de plaats(en) van productie en het veld (de velden) waarop de knollen of planten zijn geoogst, worden besmet verklaard;
- b) rekening houdend met punt 1 van bijlage III, wordt de omvang bepaald van de waarschijnlijke besmetting hetzij door contact met de aangewezen besmettingsbron, vóór of na de oogst, hetzij door contact met de besmettingsbron via de teeltwijze;
- c) rekening houdend met punt 2 van bijlage III, wordt er een zone afgebakend, uitgaande van de besmetverklaring als bedoeld onder a), van de omvang van de waarschijnlijke besmetting als bedoeld onder b) en van de mogelijke verspreiding van het organisme.

2. De Lid-Staten geven op de in bijlage III, punt 3, vastgestelde wijze de andere Lid-Staten en de Commissie onverwijld kennis van elke besmetverklaring als bedoeld in lid 1, onder a), en verstrekken omtrent de zoneafbakening als bedoeld in lid 1, onder c), nadere bijzonderheden.

De daarbij verstrekte nadere gegevens zijn vertrouwelijk. Zij kunnen aan het Comité worden voorgelegd volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG.

3. Als gevolg van de in lid 2 bedoelde kennisgeving en de daarin vermelde gegevens wordt door de andere, in de kennisgeving vermelde Lid-Staten, zo nodig, overgegaan tot besmetverklaring(en), bepaling van de omvang van de waarschijnlijke besmetting en afbakening van een zone overeenkomstig het bepaalde in lid 1, onder, respectievelijk, de punten a), b) en c).

Artikel 6

De Lid-Staten bepalen dat, wanneer knollen of planten krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet zijn verklaard, de voorraden aardappelen die via het kloonmateriaal verwant zijn met de aardappelen waarin de besmetting is opgetreden, overeenkomstig artikel 4, lid 1, worden onderzocht. De onderzoeken worden verricht op zoveel knollen of planten als nodig om de waarschijnlijke primaire besmettingsbron vast te stellen en de omvang van de waarschijnlijke besmetting te bepalen, bij voorkeur in volgorde van de risicofactor.

Op grond van de uitkomsten van de onderzoeken wordt zo nodig nog overgegaan tot verdere besmetverklaringen, tot bepaling van de omvang van de waarschijnlijke besmetting en tot afbakening van een zone, overeenkomstig artikel 5, lid 1, onder, respectievelijk, de punten a), b) en c).

Artikel 7

1. De Lid-Staten bepalen dat de knollen of planten die krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet zijn verklaard, niet mogen worden gepoot of uitgeplant en dat die knollen of planten onder toezicht van de verantwoordelijke officiële instanties:

- worden vernietigd, of
- onder officieel toezicht op de in bijlage IV, punt 1, vastgestelde wijze, worden opgeruimd, mits wordt vastgesteld dat er geen aanwijsbaar risico voor verspreiding van het organisme bestaat.

2. De Lid-Staten bepalen dat knollen of planten waarvan overeenkomstig artikel 5, lid 1, onder b), is vastgesteld dat zij waarschijnlijk besmet zijn, niet mogen worden gepoot of uitgeplant en, onverminderd het resultaat van de in artikel 6 bedoelde onderzoeken betreffende verwant klonaal materiaal, onder toezicht van de verantwoordelijke officiële instanties overeenkomstig bijlage IV, punt 2, voor geëigend gebruik of adequate opruiming worden bestemd, mits is vastgesteld dat er voor verspreiding van het organisme geen aanwijsbaar risico bestaat.

3. De Lid-Staten bepalen dat machines, voer- of vaartuigen, opslagplaatsen, of delen daarvan, en andere voorwerpen, verpakkingsmateriaal inbegrepen, die overeenkomstig artikel 5, lid 1, onder a), besmet zijn verklaard of waarvan overeenkomstig artikel 5, lid 1, onder b), is vastgesteld dat zij waarschijnlijk besmet zijn, of wel worden vernietigd, of wel volgens de in bijlage IV, punt 3, beschreven adequate methoden worden gereinigd en gedesinfecteerd. Dergelijke voorwerpen worden na desinfectie niet langer als besmet beschouwd.

4. Onverminderd de maatregelen die krachtens de leden 1, 2 en 3 van dit artikel worden genomen, bepalen de Lid-Staten dat in de overeenkomstig artikel 5, lid 1, onder c), afgebakende zone een reeks maatregelen wordt genomen, zoals gespecificeerd in bijlage IV, punt 4.

Artikel 8

1. De Lid-Staten bepalen dat pootaardappelen moeten voldoen aan de in Richtlijn 77/93/EEG vervatte eisen en in rechte lijn moeten afstammen van in het kader van een officieel goedgekeurd programma verkregen materiaal dat bij officiële of onder officieel toezicht verrichte onderzoeken waarbij de in bijlage I bedoelde methode is gevolgd, vrij van het organisme is bevonden.

Bovenbedoelde onderzoeken worden verricht:

- op de planten die als basismateriaal voor het klonen hebben gediend, wanneer de besmetting betrekking heeft op de pootaardappelproductie;
- op de planten die als basismateriaal voor het klonen hebben gediend, of op representatieve monsters van het basispootgoed of op teeltmateriaal van aan het basispootgoed voorafgaande generaties, in de overige gevallen.

2. Volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG kunnen worden vastgesteld:

- de nadere toepassingsbepalingen van lid 1, tweede alinea, eerste streepje;
- de bepalingen betreffende de representatieve monsters als bedoeld in lid 1, tweede alinea, tweede streepje.

Artikel 9

De Lid-Staten verbieden het voorhanden hebben en het gebruik van het organisme.

Artikel 10

Onverminderd de bepalingen van Richtlijn 77/93/EEG, mogen de Lid-Staten toestaan dat voor experimenten, voor wetenschappelijke doeleinden of voor selectiewerkzaamheden wordt afgeweken van het bepaalde in de artikelen 6, 7 en 9 van deze richtlijn, op voorwaarde dat die afwijkingen geen afbreuk doen aan de bestrijding van het organisme en er geen risico voor verspreiding van het organisme ontstaat.

Artikel 11

De Lid-Staten mogen aanvullende of strengere maatregelen vaststellen wanneer dit nodig is om het organisme te bestrijden of om spreiding ervan te voorkomen, voor zover die maatregelen in overeenstemming zijn met het bepaalde in Richtlijn 77/93/EEG.

De aanvullende maatregelen als bedoeld in de eerste alinea kunnen onder meer bestaan in het voorschrijven dat alleen pootaardappelen mogen worden gepoot die hetzij officieel gecertificeerd zijn, hetzij een officiële inspectie hebben ondergaan waaruit is gebleken dat zij aan de voorgeschreven fytosanitaire normen voldoen. De laatstgenoemde mogelijkheid kan met name van toepassing zijn in gevallen

waarin landbouwers op hun eigen gebruik mogen maken van pootaardappelen die zij uit hun eigen oogst hebben verkregen, alsmede in andere gevallen waarin zelf geproduceerde pootaardappelen worden gepoot.

Van de bijzonderheden van die maatregelen wordt aan de andere Lid-Staten en aan de Commissie kennis gegeven.

Artikel 12

De op grond van de stand van wetenschap of techniek in de bijlagen bij de onderhavige richtlijn aan te brengen wijzigingen worden vastgesteld volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG.

Artikel 13

1. Uiterlijk op 15 november 1993 dienen de Lid-Staten de bepalingen om aan deze richtlijn te voldoen aan te nemen en bekend te maken. Zij stellen de Commissie daarvan onverwijld in kennis.

Wanneer de Lid-Staten deze bepalingen aannemen, wordt in die bepalingen naar de onderhavige richtlijn verwezen of wordt hiernaar verwezen bij de officiële bekendmaking van die bepalingen. De regels voor deze verwijzing worden vastgesteld door de Lid-Staten.

De Lid-Staten passen deze bepalingen toe met ingang van 16 november 1993.

2. De Lid-Staten delen de Commissie onverwijld alle bepalingen van intern recht mede die zij op het onder deze richtlijn vallende gebied vaststellen. De Commissie stelt de andere Lid-Staten daarvan in kennis.

Artikel 14

Richtlijn 80/665/EEG wordt ingetrokken met ingang van 16 november 1993.

Artikel 15

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Luxemburg, 4 oktober 1993.

Voor de Raad

De Voorzitter

W. CLAES

BIJLAGE I

SCHEMA VOOR DE DETECTIE EN DIAGNOSE VAN DE RINGROTBACTERIE, CLAVIBACTER MICHIGANENSIS (SMITH) DAVIS ET AL. SSP. SEPEDONICUS (SPIECKERMANN ET KOTTHOFF) DAVIS ET AL. IN PARTIJEN AARDAPPELKNOLLEN

1. **Verwijdering van naveleindstukjes**
 - 1.1. Was 200 knollen in stromend leidingwater en verwijder de epidermis rond het naveleinde van elke knol met een regelmatig gedesinfecteerd scalpel of aardappelschilmes; het desinfecteren kan geschieden door het mes in 70 procent ethanol te dopen en te flamberen.
 - 1.2. Verwijder de kegelvormige weefselkernen voorzichtig met een mes of een aardappelschilmes van de naveleinden. Beperk de overmaat niet-vaatweefsel tot een minimum. Na verwijdering moeten de naveleinden binnen 24 uur (punt 3) worden verwerkt of ten hoogste twee weken bij -20°C worden bewaard.
2. **Visueel onderzoek naar ringrotsymptomen**

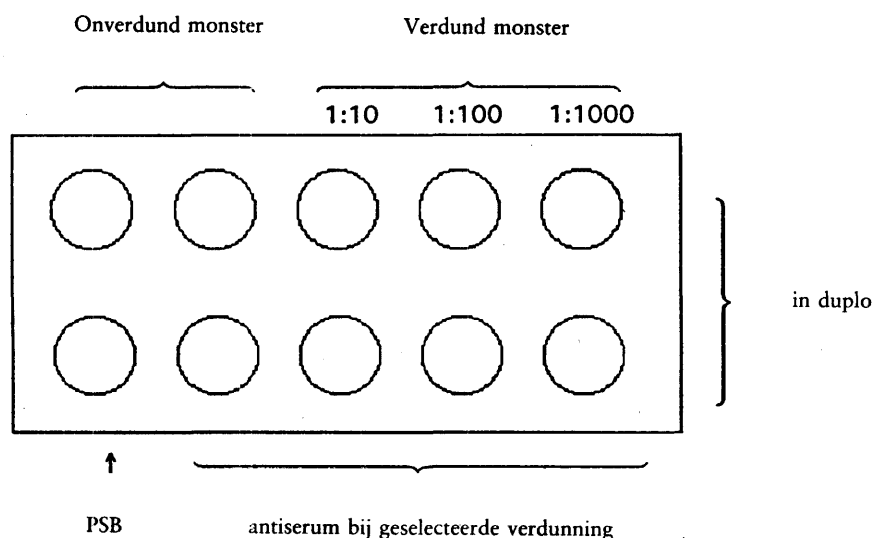
Nadat de naveleinden verwijderd zijn elke knol dwars doorsnijden en onderzoeken op symptomen van ringrot.

Druk de knollen samen en kijk of het vaatweefsel verweekte weefsels te zien geeft.

De eerste symptomen zijn een lichte glazigheid of doorschijnendheid van het weefsel, zonder verzachting rond het vaatstelsel, vooral bij de navel. De vaatring bij het naveleinde kan iets donkerder van kleur zijn dan normaal. Het eerste makkelijk te herkennen symptoom is een geelachtige verkleuring van de vaatring en kolommetjes van kaasachtig materiaal dat uit de vaten komt wanneer er zacht in de knol geknepen wordt. Deze afscheiding bevat miljoenen bacteriën. In dit stadium kan het vaatweefsel bruin worden. Aanvankelijk kunnen deze symptomen beperkt blijven tot een deel van de ring, dat overigens niet dicht bij het naveleinde hoeft te liggen waarna zij zich geleidelijk kunnen uitbreiden tot de hele ring. Naarmate de infectie voortschrijdt wordt het vaatweefsel vernietigd. De buitencortex kan loskomen van de binnencortex. In de gevorderde stadia van de infectie ontstaan er barsten op de oppervlakte van de knol, die vaak aan de randen roodachtig bruin zijn. Een secundaire aantasting door schimmels of bacteriën kan de symptomen camoufleren en het kan moeilijk, zo niet onmogelijk zijn, gevorderde ringrotsymptomen te onderscheiden van andere soorten knolrot.
3. **Voorbereiding van monsters voor Gramkleuring, immunofluorescentiekleuring (IF) en auberginetest**
 - 3.1. De naveleinden homogeniseren totdat zij net volledig zijn gemacereerd in een verdunningsmiddel waarvan bekend is dat het niet toxisch is voor de *Corynebacterium sepedonicum* (bij voorbeeld een 0,05 M fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) pH 7,0) bij een temperatuur van minder dan 30°C ; het is raadzaam een niet-toxisch middel tegen uitvlokken toe te voegen en ook kan een niet-toxisch antischuimmiddel nodig zijn (aanhangsels 1 en 2). Overmatige maceratie dient te worden vermeden.
 - 3.2. Extraheer bacteriën uit het homogene mengsel volgens één van de volgende methoden ⁽¹⁾:
 - A. a) Gedurende 10 minuten met ten hoogste 180 g centrifugeren.
 - b) De bovendrijvende vloeistof gedurende 10 minuten met ten minste 4 000 g centrifugeren. De bovendrijvende vloeistof verwijderen en weggooien.
 - B. a) Laat het maceraat gedurende 30 minuten staan om de weefselstukjes te laten bezinken. Verwijder de bovendrijvende vloeistof zonder het sediment te verstoren.
 - b) De bovendrijvende vloeistof filteren door filterpapier (Whatman nr. 1) in een filter van gesinterd glas (nr. 2 = $40\text{-}100\ \mu\text{m}$), met behulp van een waterpomp. Het filtraat opvangen in een centrifugebuis. Was het filter met steriel PBS tot een maximumvolume van het filtraat van 35 ml.
 - c) Het filtraat met ten minste 4 000 g gedurende 20 minuten centrifugeren.
 - 3.3. Suspendeer de pellet in steriele 0,01 M fosfaatbuffer pH 7,2 (aanhangel 2) zodat het totale volume ongeveer 1 ml wordt. Verdeel in twee gelijke delen en bewaar één deel voor vergelijking door het bij -20°C ⁽²⁾ in te vriezen of door lyofilisatie. Verdeel het andere deel in twee helften en gebruik de ene helft voor de IF-test en de Gramkleuring en de andere voor de auberginetest.

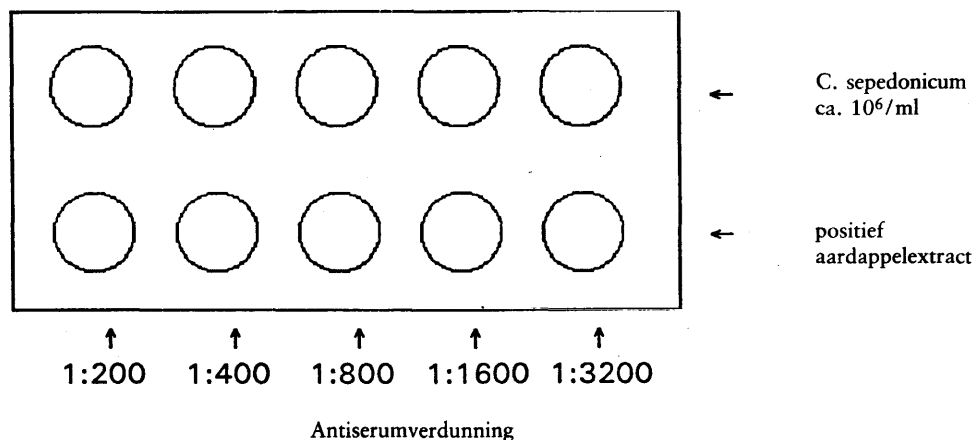
⁽¹⁾ Een andere extractiemethode is te vinden in Dinesen, 1984.

⁽²⁾ Er zijn aanwijzingen (Janse en Van Vaerenberg, 1987) dat bevrozing de levensvatbaarheid van *Corynebacterium sepedonicum* kan aantasten. Dit probleem kan worden opgelost door de pellet in 10 % glycerol te suspenderen.



Figuur 2

Objectglas voor positieve controle



- 5.2.3. Drogen aan de lucht bij ongeveer 37 °C en fixeren met 95 % ethanol of door flamberen.
- 5.2.4. Bedek de juiste vensters met *C. sepedonicum*-antiserum bij de aanbevolen verdunningen, 0,01 M PBS pH 7,2 (aanhangel 2), als in figuur 1. (Gebruik PBS voor de FITC-controle.) De werkverdunding van het antiserum moet ongeveer de helft van die van de IF-titer zijn. Indien andere antiserumverdundingen in de test moeten worden opgenomen, moeten voor elke verdunding afzonderlijke objectglaasjes worden gebruikt.
- 5.2.5. Gedurende 30 minuten in een vochtige ruimte bij kamertemperatuur incuberen.
- 5.2.6. Zorgvuldig met 0,01 M PBS pH 7,2 afspoelen. Gedurende 5 minuten wassen in drie verse hoeveelheden 0,01 M PBS pH 7,2.
- 5.2.7. Zorgvuldig de overmaat aan vocht verwijderen.
- 5.2.8. Bedek elk venster met FITC-conjugaat bij dezelfde verdunning die gebruikt wordt om de titer te bepalen en incubeer 30 minuten in een donkere, vochtige ruimte bij kamertemperatuur.
- 5.2.9. Afspoelen en wassen als boven.
- 5.2.10. Breng ongeveer 5-10 µl of 0,1 M fosfaatgebufferde glycerine pH 7,6 (of een soortgelijk inbedmiddel met een pH van ten minste 7,6) aan op elk venster en bedek het met een dekglasje (aanhangel 2).
- 5.2.11. Onderzoek met een microscoop voorzien van een epifluorescerende lichtbron en filters die geschikt zijn voor het werken met FITC. Een vergroting van 400-1 000 is geschikt. Bekijk de herhalingen van de vensters langs twee diameters in een rechte hoek en rond de omtrek.

Kijk uit naar fluorescerende cellen in de positieve controles en bepaal de titer. Zoek naar fluorescerende cellen in het FITC/PBS-controlevenster en bekijk, bij afwezigheid daarvan, de testvensters. Bepaal in minstens 10 microscoopvelden het gemiddelde aantal morfologisch typische fluorescerende cellen per veld en bereken het aantal per milliliter niet verdunde pellet (aanhangel 4).

Aan de immunofluorescentietest zijn verschillende problemen verbonden.

- In aardappelpellets zitten vaak achtergrondpopulaties van fluorescerende cellen met atypische morfologie en kruisreagerende saprofytische bacteriën die qua grootte en morfologie lijken op *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Besteed alleen aandacht aan fluorescerende cellen met een typische grootte en morfologie.

Vanwege de mogelijkheid van kruisreacties moeten monsters waarvan de immunofluorescentietest positief uitvalt, opnieuw getest worden met een ander antiserum.

- De technische detectiegrens van deze methode ligt tussen 10³ en 10⁴ cellen per milliliter niet-verdunde pellet. Monsters met aantallen IF-typische cellen op de detectiegrens geven gewoonlijk een negatief resultaat voor *C. m. ssp. sepedonicus*, maar kunnen onderworpen worden aan auberginetests.

Een immunofluorescentietest is negatief wanneer in een monster geen morfologisch typische fluorescerende cellen worden aangetroffen.

Deze monsters worden beschouwd als „niet besmet” met *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

De auberginetest is niet nodig.

Een immunofluorescentietest is positief wanneer in een monster fluorescerende cellen met een typische morfologie worden aangetroffen.

Monsters waarvan de immunofluorescentietest met beide antisera positief uitvalt, worden beschouwd als „mogelijk besmet” met *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Voor alle monsters die als mogelijk besmet worden beschouwd, moet de auberginetest worden uitgevoerd.

6. Auberginetest

Voor kweekdetails, zie aanhangsel 5.

- 6.1. Verspreid de pellet uit punt 3.3 over minstens 25 aubergines in bladstadium 3 (aanhangsel 5) volgens een van onderstaande methoden (6.2, 6.3 of 6.4).

6.2. Snedebeënting I

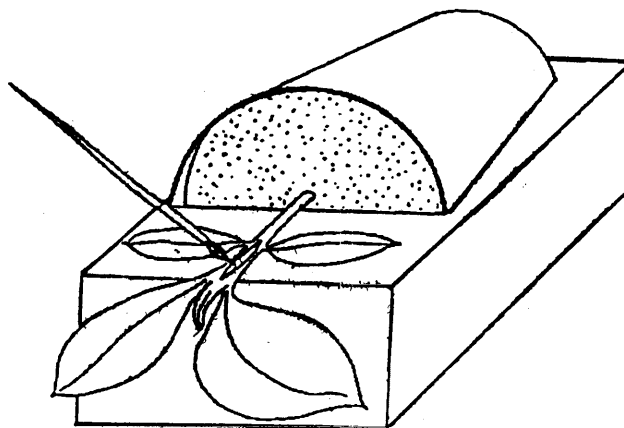
- 6.2.1. Ondersteun elke pot horizontaal (een blok geëxpandeerd polystyreen waaruit aan de bovenkant een stuk van 5 cm diep, 10 cm breed en 15 cm lang is verwijderd (figuur 3), volstaat voor een pot van 10 cm). Bij elk getest monster moet tussen de stengel en het blok een strook steriele aluminiumfolie worden geplaatst. De plant kan met een elastiek rond het blok op zijn plaats gehouden worden.

- 6.2.2. Maak met een scalpel in de lengte, of ietwat schuin, een snede van 0,5-1,0 cm lang en ongeveer driekwart van de doorsnee van de stengel diep, tussen de zaadlobben en het eerste blad.

- 6.2.3. Houd de snede open met de punt van het scalpel en strijk het inoculum erin met een eyeliner of met een penseel waarop de pellet is aangebracht. Verdeel het restant van de pellet over de aubergines.

- 6.2.4. Stop de snede dicht met steriele vaseline uit een injectieampul van 2 ml.

Figuur 3



6.3. Snedebeënting II

- 6.3.1. Houd de plant tussen twee vingers en pipetteer een druppel (ongeveer 5-10 μ l) van de gesuspenderde pellet op de stengel tussen de zaadlobben en het eerste blad.

- 6.3.2. Maak met een steriel scalpel vanaf de pelletdruppel een diagonale snede (met een hoek van ongeveer 5°) van 1,0 cm lang en ongeveer 2/3 van de stengeldikte diep.

- 6.3.3. Stop de snede dicht met steriele vaseline uit een injectieampul.

6.4. Injectiebeënting

- 6.4.1. Geef de aubergines gedurende een dag vóór de beënting geen water om de turgor te verminderen.

- 6.4.2. Beënt de auberginestengels net boven de zaadlobben met een injectiespuit voorzien van een hypodermische naald (niet minder dan 23G). Verdeel de pellets over de aubergines.
- 6.5. Beënt 25 planten met een bekende cultuur van *C. sepedonicum* en, waar mogelijk, natuurlijk geïnfecteerd knolweefsel (punt 5.1) volgens dezelfde beëntingsmethode (punt 6.2, 6.3 of 6.4).
- 6.6. Beënt 25 planten met steriel 0,05 M PBS volgens dezelfde beëntingsmethode (punt 6.2, 6.3 of 6.4).
- 6.7. Incubeer de planten 40 dagen onder geschikte omstandigheden (aanhangel 5). Zoek na acht dagen regelmatig naar symptomen. Tel het aantal planten met symptomen. *C. sepedonicum* doet auberginebladeren verwelken; dit kan beginnen als een marginale of intraveneuze slapheid. Verwelkt weefsel kan eerst donkergroen of gevlekt zijn, maar verbleekt voordat het necrotisch wordt. Intraveneuze verwelkte plekken zien er vaak vettig en waterig uit. Necrotisch weefsel heeft vaak een helder gele rand. De planten behoeven niet dood te gaan; hoe langer het duurt voordat de symptomen zich voordoen, des te groter de overlevingskans. De planten kunnen over de infectie heengroeien. Vatbare jonge aubergines zijn veel gevoeliger voor lage populaties *C. sepedonicum* dan oudere planten; vandaar de noodzaak om planten in of net vóór bladstadium 3 te gebruiken.

Verwelking kan ook veroorzaakt worden door populaties van andere bacteriën of schimmels in de pellet van knolweefsel. Bij voorbeeld *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* en *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var *foveata*, alsmede grote populaties saprofytische bacteriën. Dergelijke verwelkingen onderscheiden zich van die veroorzaakt door de *C. sepedonicum* doordat hele bladeren of hele planten snel verwelken.

- 6.8. Maak een Gramkleuring (punt 4) voor alle partijen aubergines met symptomen; gebruik daarbij delen van verwelkt bladweefsel en stengelweefsel van de planten en isoleer op geschikte voedingsbodems (punt 7). Desinfecteer de oppervlakte van de auberginebladeren en stengels door bestrijken met 70 % ethanol.
- 6.9. In bepaalde gevallen, met name wanneer de groeiomstandigheden niet optimaal zijn, kan *C. sepedonicum* zelfs na 40 dagen bebroeding als latente infectie in aubergines voorkomen. Dergelijke infecties kunnen leiden tot afremming van de groei en slapheid van de beënte planten. Indien de IF-test positief beschouwd wordt, kan het nodig geacht worden om verder te testen. Daarom is het noodzakelijk de groeisnelheden van alle testaubergines te vergelijken met steriel 0,05 M PBS-beënte controleplanten en de omstandigheden in de kas te controleren.

Voor de vervolgtests wordt het volgende aanbevolen:

- 6.9.1. Snijd de stengels af boven de beëntingsplaats en verwijder de bladeren.
- 6.9.2. Macereer de stengels 0,05 M PBS pH 7,0, zoals in de punten 3.1 en 3.2.
- 6.9.3. Gebruik de helft van de pellets om een Gramkleuring (punt 4) en een IF-test (punt 5) uit te voeren.
- 6.9.4. Gebruik de andere helft om nog een auberginetest (punt 6) uit te voeren indien de Gramkleuring en/of de IF-tests positief uitvallen. Gebruik een bekende *C. sepedonicum*-cultuur en steriele 0,05 M PBS controle. Indien bij de volgttest geen symptomen worden waargenomen, moet het monster als negatief worden beschouwd.

7. Isolatie van *sepedonicum*

De diagnose kan alleen worden bevestigd indien *C. sepedonicum* wordt geïsoleerd en zo wordt geïdentificeerd (punt 8). Hoewel *C. sepedonicum* een moeilijk kweekbaar organisme is, kan het geïsoleerd worden uit weefsel dat de symptomen vertoont. Hij kan echter overwoekerd worden door snelgroeiende saprofytische bacteriën en daarom wordt niet aanbevolen hem rechtstreeks uit de pellet van knolweefsel (punt 3.3) te isoleren. Aubergines vormen een voortreffelijk selectief verrijkingsmedium voor de groei *C. sepedonicum* en bieden de mogelijkheid van een uitstekende gastheertest ter bevestiging.

Isolatie moet plaatsvinden uit alle aardappelknollen en aubergines die symptomen vertonen (punten 4 en 6). Zo nodig moeten auberginestengels worden gemacereerd overeenkomstig de punten 3 en 6.9.

7.1. Strijk suspensies op een van de volgende media: (formules in aanhangsel 6)

Nutriënt dextroseagar (alleen voor subcultuur)

Gist-pepton-glucoseagar

Nutriënt gist-dextroseagar

Gistextract-minerale-zoutenagar.

Tot 20 dagen bij 21 °C incuberen.

C. sepedonicum groeit langzaam en brengt meestal binnen 10 dagen minuscule, romige, koepelvormige kolonies voort.

Opnieuw bestrijken om de zuiverheid vast te stellen.

De groeisnelheden worden verbeterd met een subcultuur. Typische kolonies zijn romig wit of ivoorkeurig, afgerond, glad, hoog, convex, slijmachtig-vloeibaar, hebben gave randen en zijn gewoonlijk 1-3 mm in doorsnee.

Identificatie

Veel Grampositieve corynevormige bacteriën met koloniekekenmerken die lijken op die van de *C. sepedonicum* kunnen worden geïsoleerd uit gezonde of zieke aardappelen en aubergines. In deze context moet *C. sepedonicum* met de volgende tests worden geïdentificeerd:

IF-test (punt 5.1);

auberginetest;

voedings- en fysiologische tests (aangangsel 7):

- oxidatie/fermentatietest (O/F),
- oxydasereactie,
- groei bij 37 °C,
- ureaseproductie,
- aesculinehydrolyse,
- zetmeelhydrolyse,
- tolerantie van 7 % natriumchlorideoplossing,
- indoolreactie,
- katalasereactie,
- H₂S-productie,
- citraatassimilatie,
- gelatinehydrolyse,
- zuur uit: glycerol, lactose, rhamnose en salicine,
- Gramkleuring.

Alle tests moeten een controle met bekend *C. sepedonicum* omvatten. Voedingstest en fysiologische tests moeten worden uitgevoerd met inocula van nutriënte agarsubculturen. Morfologische vergelijkingen moeten worden gemaakt aan de hand van nutriënte dextroseagarculturen.

Voor de IF-test moeten de celpopulaties worden ingesteld op 10⁶-cellen/ml. De IF-titer moet ongeveer gelijk zijn aan die van de bekende *C. sepedonicum*-cultuur.

Voor de auberginetest moeten de celpopulaties worden ingesteld op ongeveer 10⁷-cellen/ml. Auberginetests moeten worden uitgevoerd met 10 planten voor elk van de testorganismen, waarbij weer controles worden gebruikt van bekende *C. sepedonicum*-culturen en steriel water; met zuivere culturen moet binnen 20 dagen typische verwelking optreden, maar planten die daarna geen symptomen vertonen, moeten 30 dagen worden geïncubeerd bij temperaturen die de groei van aubergines bevorderen, maar 30 °C niet overschrijden (aangangsel 5). Indien er na 30 dagen geen symptomen zijn, kan de cultuur niet worden bevestigd als een pathogene vorm van *Corynebacterium sepedonicum*.

<i>Test</i>	<i>C. sepedonicum</i>
O/F	Inert of zwak oxidatief
Oxidase	-
Katalase	+
Nitraatreductie	-
Ureaseactiviteit	-
H ₂ S-vorming	-
Indoolvorming	-
Citraatassimilatie	-
Zetmeelhydrolyse	- of zwak
Groei bij 37 °C	-
Groei in 7 % NaCl	-
Gelatinehydrolyse	-
Esculinehydrolyse	+
Zuur uit:	
— Glycerol	-
— Lactose	- of zwak
— Rhamnose	-
— Salicine	-

*Aanhangsel 1***SAMENSTELLING MACERATIEVLOEISTOF, AANBEVOLEN DOOR LELLIOTT EN SELLAR, 1976**

D C siliconen antischuim MS A mengsel (Hopkins & Williams Ltd, Cat. nr. 9964 – 25, Chadwell Heath, Essex, England)	10 ml
Lubrol W vlokken (ICI Ltd)	0,5 g
Tetranatriumpyrofosfaat	1 g
0,05 M fosfaatgebufferde zoutoplossing pH 7,0 (aanhangsel 2)	1 liter

*Aanhangsel 2***BUFFERS****0,05 M fosfaatgebufferde zoutoplossing pH 7,0**

Deze buffer kan worden gebruikt voor de maceratie van knolweefsel (2.1)

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
NaCl	8,0 g
Gedistilleerd water aanvullen tot	1 liter

0,01 M fosfaatgebufferde zoutoplossing pH 7,2

Deze buffer wordt gebruikt voor het verdunnen van antisera en het wassen van IF-objectglazen

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Gedistilleerd water aanvullen tot	1 liter

0,1 M fosfaatgebufferde zoutoplossing pH 7,6

Deze buffer wordt gebruikt als inbedmiddel om de fluorescentie bij de IF-test te versterken

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3,2 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
Glycerol	50 ml
Gedistilleerd water	100 ml

*Aanhangsel 3***GRAMKLEURINGWERKWIJZE (GEWIJZIGD VOLGENS HUCKER) (DOETSCH, 1981)****Kristalvioletooplossing**

2 g kristalviolet oplossen in 20 ml 95 % ethanol.

0,8 g ammoniumoxalaat oplossen in 80 ml gedistilleerd water.

De twee oplossingen mengen.

Lugoljodium

Jodium	1 g
--------	-----

Kaliumjodide	2 g
--------------	-----

Gedistilleerd water	300 ml
---------------------	--------

De vaste stoffen samen vermalen met stamper en vijzel. Toevoegen aan het water en in een gesloten vat schudden om op te lossen.

Safranine tegenkleuringoplossing

Voorraadoplossing:

Safranine O	2,5 g
-------------	-------

95 % ethanol	100 ml
--------------	--------

Mengen en bewaren.

1:10 verdunnen om een werkoplossing te verkrijgen.

Kleuringprocedure

1. Preparaten voorbereiden, drogen aan de lucht en thermisch fixeren.
2. Objectglas gedurende 1 minuut bedekken met kristalvioletooplossing.
3. Kort spoelen met kraanwater.
4. Gedurende 1 minuut bedekken met lugoljodium.
5. Spoelen met kraanwater en drogen met filtreerpapier.
6. Ontkleuren met druppelsgewijs toegevoegde 95 % ethanol tot de ontkleuring stopt, of onder zacht schudden 30 seconden ondergedompeld houden.
7. Spoelen met kraanwater en drogen met filtreerpapier.
8. Bedekken met safranineoplossing gedurende 10 seconden.
9. Spoelen met kraanwater en drogen met filtreerpapier.

Grampositieve bacteriën kleuren violetblauw; Gramnegatieve bacteriën kleuren rozerood.

Aanhangsel 4

BEPALING VAN EEN POPULATIE VAN IF-POSITIEVE CELLEN

Oppervlakte (S) van het venster van een objectglas met meerdere vensters

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

waarin D = diameter van het venster.

Oppervlakte (S) van het objectiefveld

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

waarin d = diameter van het veld.

Bepaal d door rechtstreekse meting of door berekening aan de hand van de volgende formule:

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

waarin i = veldcoëfficiënt (hangt af van het type oculair en varieert van 8 tot 24),

K = buiscoëfficiënt (1 of 1,25),

G = vergrotingsfactor (100×, 40× enz.) van het objectief.

$$\text{Uit (2) volgt } d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$$

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

Tel het aantal typische fluorescerende cellen per veld (c).

Bereken het aantal typische fluorescerende cellen per venster (C).

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

Bereken het aantal typische fluorescerende cellen per ml pellet (N)

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

waarin y = volume van het pellet op het venster,

waarin F = pelletverdunningsfactor.

*Aanhangsel 5***HET KWEKEN VAN DE AUBERGINEPLANT**

Zaai zaad van aubergineplanten (*Solanum melongena* cv. Black Beauty) in gepasteuriseerde zaaigrond. Zaailingen met volledig ontwikkelde zaadlobben (10-14 dagen) overpoten in gepasteuriseerde potgrond.

Gebruik aubergineplanten in bladstadium 3 wanneer twee maar niet meer dan drie bladen volledig ontvouwen zijn.

Aubergineplanten moeten worden gekweekt in een kas met de volgende omgevingsomstandigheden:

daglengte: 14 uur of natuurlijke daglengte indien groter;

temperatuur: overdag 21-24 °C,

's nachts 15 °C.

NB: *C. sepedonicum* groeit niet bij temperaturen hoger dan 30 °C. Indien de nachttemperatuur niet tot 15 °C daalt, kan chromofoorschade (zilverige necrose) optreden.

Wortelschade veroorzaakt door sciaralarven kan worden verholpen door toepassing van een geschikt insecticide.

Aubergine cv. Black Beauty is verkrijgbaar bij:

1. AB Hammenhögs Frö
270 50 Hammenhög
Zweden
2. Hurst Seeds Ltd
Avenue Road
Witham
Essex CM8 2DX
Engeland
3. Asgro Italia SpA
Corso Lodi, 23
Milano
Italië
4. Küpper
Mitteldeutsche Samen GmbH
Hessenring 22
D-37269 Eschwege

*Aanhangsel 6***MEDIA VOOR HET KWEKEN EN ISOLEREN VAN C. SEPEDONICUM****Nutriënt agar (NA)**

Difco Bacto Nutrient Agar in gedistilleerd water volgens voorschriften van de fabrikant. Gedurende 15 minuten steriliseren in autoclaaf bij 121 °C.

Dextrose nutriënt agar (NDA)

Difco Bacto Nutrient Agar met 1 % D(+) -glucose (monohydraat). Steriliseren in autoclaaf bij 115 °C gedurende 20 minuten.

Gist-pepton/glucose agar (YPGA)

Difco Bacto gistextract (nr. 0127)	5 g
Difco Bacto pepton (nr. 0118)	5 g
D(+) -glucose (monohydraat)	10 g
Difco Bacto gezuiverde agar (nr. 0560)	15 g
Gedistilleerd water	1 liter

Mediumvloeistof in porties van een halve liter gedurende 20 minuten steriliseren in autoclaaf bij 115 °C.

Gistextract-minerale-zoutenmedium (YGM)

Difco Bacto gistextract	2,0 g
D(+) -glucose (monohydraat)	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
Difco Bacto gezuiverde agar	18 g
Gedistilleerd water	1 liter

Mediumvloeistof in porties van een halve liter gedurende 20 minuten steriliseren in autoclaaf bij 115 °C.

Aanhangsel 7

VOEDINGSTESTS EN FYSIOLOGISCHE TESTS VOOR DE IDENTIFICATIE VAN *C. SEPEDONICUM*

Alle media moeten bij 21 °C worden geïncubeerd en na 6 dagen worden onderzocht. Indien geen groei is opgetreden, incuberen tot maximaal 20 dagen.

— Oxydatieve en fermentatieve reactie (Hugh & Leifson), 1953) – O/F-test

Basismedium:

KCl	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
Difco Bacto-pepton	1,0 g
Difco Bacto gezuiverde agar	3,0 g
D(+) -glucose (monohydraat)	10,0 g
Broomthymolblauw	0,03 g
Gedistilleerd water	1 liter

Mengen en PH-waarde op 7,0 – 7,2 instellen met 1N KOH.

Afvullen in Pyrex-kweekbuizen 16 mm × 100 mm (inhoud 12 ml) à 5 ml en 10 ml per buis.

Steriliseren in autoclaaf bij 115 °C gedurende 10 minuten.

Voor elke kweek buizen van 5 ml en 10 ml beënten met diepe, rechte steek. Op aseptische wijze 1 tot 2 ml steriele vloeibare paraffine toevoegen aan de 10 ml-buis. Incuberen.

Positieve reactie:

Buis	Kleur	Interpretatie
Open Gesloten	geel } geel }	fermentatief
Open Gesloten	geel } blauwgroen }	oxydatief
Open Gesloten	groenachtig } blauwgroen }	oxydatief of inert

— Oxydasetest (Kovacs, 1956)

Kovacs'oxydase-reagens:

1 % waterige oplossing van tetramethyl-parafenylenediamine-dihydrochloride (BDH nr. 30386) in gedistilleerd water.

Dit reagens moet vers worden aangemaakt in hoeveelheden van 1 ml of kan bij 5 °C 1 tot 4 weken worden bewaard in een bruine glazen fles.

Breng een druppel van het reagens op filterpapier in een schone petrischaal. Onmiddellijk een deel van de testkweek van voedingsagar afstrijken met een platina entoog.

Positieve reactie: binnen 10 seconden violetkleuring. Preparaten waarbij de kleuring 10 tot 30 seconden duurt, zijn zwak positief.

NB: Het is zeer belangrijk een platina entoog en NA-preparaten te gebruiken, omdat ijzersporen of een hoog suikergehalte in het groeimedium kunnen leiden tot valse positieve resultaten.

— Zuurvorming uit lactose, rhamnose, salicine, glycerol

Bereid het O/F-medium van Hugh & Leifson zonder de glucose. Afvullen in reageerbuizen in porties van 5 ml. Steriliseren in autoclaaf bij 115 °C gedurende 10 minuten. Aan het gesmolten basismedium bij 45 °C op aseptische wijze 0,5 ml van een filter gesteriliseerde 10 % waterige oplossing van glycerol, lactose, rhamnose of salicine toevoegen. Voorzichtig mengen.

Positieve reactie: kleurverandering van blauwgroen naar geel wijst op zuurvorming.

— Katalasereactie

Breng een druppel waterstofperoxide (30 %-vol.) op een schoon objectglas en emulgeer een entoog met bacterie culture met behulp van een platina entoog.

Positieve reactie: de vorming van zuurstofbellen in de druppel wijst op de aanwezigheid van katalase.

— Nitraatreductaseactiviteit en denitrificatie (Bradbury, 1970)

Kweekmedium:

KNO ₃ (nitrietvrij)	1 g
Difco Bacto gistextract	1 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Gedistilleerd water	1 liter

Afvullen à 10 ml in flessen van 20 ml. Steriliseren in autoclaaf bij 121 °C gedurende 15 minuten.

Reagens A:

H ₂ SO ₄	8 g
5N azijnzuur	1 liter

Reagens B:

naftylamine	5 g
5N azijnzuur	1 liter

Het nitraatmedium in duplo beënten. Testen na 10 en 20 dagen door toevoeging van 1 druppel lugoljodium, 0,5 ml reagens A en 0,5 ml reagens B. Als het medium niet roodachtig kleurt, ongeveer 50 mg zinkstof toevoegen. Sla de kleurreactie gade.

*Positieve reactie:**Kleurreactie*

	Fase 1	Fase 2
Geen nitraatreductie	kleurloos	rood
Reductie van nitraat tot nitriet (alleen nitraatreductase)	rood	—
Reductie van nitraat verder dan nitriet (denitrificatie — nitraat- en nitrietreductase)	kleurloos	kleurloos

— Ureasevorming (Lelliott, 1966)

Basismedium:

Oxoid ureum agar basis (CM53)	2,4 g
Gedistilleerd water	95 ml

Steriliseren in autoclaaf bij 115 °C gedurende 20 minuten. Het gesmolten basismedium afkoelen tot 50 °C en op aseptische wijze 5 ml van in een filter gesteriliseerde 40 % waterige ureumoplossing (Oxoid SR20) toevoegen. Goed mengen.

In hoeveelheden van 6 ml afvullen in steriele buizen (16 × 100 mm), in schuine stand wegzetten zodat er zich een flink bodempje vormt.

Positieve reactie: het geeloranjekleurige medium vertoont een kersenrode of magentaroze verkleuring indien ureaseactiviteit is opgetreden.

— Citraatassimilatie (Christensen) (Skerman, 1967)

Citraat agar basis (Merck 2503)	23 g
Gedistilleerd water	1 liter

Mengen en oplossen door te verwarmen. Verdelen in hoeveelheden van 6 ml als voor het ureummedium. Steriliseren in autoclaaf bij 121 °C gedurende 15 minuten en in schuine stand wegzetten.

Positieve reactie: citraatassimilatie wordt aangetoond door een kleurverandering in het medium van oranje naar rood.

— **Waterstofsulfidevorming (Ramamurthi, 1959)**

Medium:

Difco Bacto trypton (nr. 0123)	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NaCl	5 g
Gedistilleerd water	1 liter

Oplossen en afvullen in porties van 6 ml in buizen van 16 × 100 mm. Steriliseren in autoclaaf bij 115 °C gedurende 10 minuten.

Beënten en op aseptische wijze een loodacetaatstripje (Merck 9511) met behulp van de dop van de buis in de buis klemmen. Incubeer tot 20 dagen.

Positieve reactie: H₂S-vorming uit trypton wordt aangetoond door een zwartbruine verkleuring van het testpapier.

— **Indoolvorming (Ramamurthi, 1959)**

Medium:

Als voor H₂S-test.

Verwijder het loodacetaatstripje, voeg 1 — 2 ml diëthylether toe en schud voorzichtig. Laagscheiding laten optreden (5 minuten). Voorzichtig 0,5 ml Kovacs-reagens (Merck 9293) bijschenken langs de binnenwand van de schuingeplaatste buis.

Positieve reactie: de aanwezigheid van indool wordt aangetoond door roodvorming in de gele laag tussen de ether- en de waterfractie.

— **Groei bij 37 °C (Ramamurthi, 1959)**

Medium:

Difco Bacto Nutrient Broth (nr. 0003)	8 g
Gedistilleerd water	1 liter

Mengen, oplossen en afvullen in buizen in porties van 6 ml.

Steriliseren in autoclaaf bij 121 °C gedurende 15 minuten.

Beënten en incuberen bij 37 °C.

Positieve reactie: controleren op groei.

— **Groei in 7 % natriumchloride (Ramamurthi, 1959)**

Medium:

Difco Bacto Nutrient Broth	8 g
NaCl	70 g
Gedistilleerd water	1 liter

Mengen, oplossen en afvullen in buizen in porties van 6 ml.

Steriliseren in autoclaaf bij 121 °C gedurende 15 minuten.

Positieve reactie: controleren op groei.

— **Gelatine hydrolyse (Lelliott, Billing & Hayward, 1966)**

Medium:

Difco Bacto gelatine (nr. 0143)	120 g
Gedistilleerd water	1 liter

Mengen, oplossen door te verwarmen en afvullen in buizen in porties van 6 ml.

Steriliseren in autoclaaf bij 121 °C gedurende 15 minuten.

Positieve reactie: gelatine wordt vloeibaar en blijft dat, ook wanneer zij 30 minuten op 5 °C wordt gehouden.

— Zetmeelhydrolyse

Medium:

Difco Bacto voedingsagar (gesmolten)	1 liter
--------------------------------------	---------

Difco Bacto oplosbaar zetmeel (nr. 0178)	2 g
--	-----

Mengen, steriliseren in autoclaaf bij 115 °C gedurende 10 minuten.

Platen gieten. Platen plaatselijk beënten.

Na het optreden van flinke groei (10 — 20 dagen), een deel van de groei verwijderen en overgieten met lugoljodium.

Positieve reactie: zetmeelhydrolyse wordt aangetoond door heldere zones onder of rond de bacteriegroei; de rest van het medium kleurt paars.

— Esculinehydrolaseactiviteit (Sneath & Collins, 1974)

Medium:

Difco Bacto pepton	10 g
--------------------	------

Esculine	1 g
----------	-----

Ferricitraat (Merck 3862)	0,05 g
---------------------------	--------

Natriumcitraat	1 g
----------------	-----

Gedistilleerd water	1 liter
---------------------	---------

Mengen om op te lossen en afvullen in buizen in porties van 6 ml.

Steriliseren in autoclaaf bij 115 °C gedurende 10 minuten.

Het medium is helder, maar vertoont een blauwe fluorescentie.

Positieve reactie: esculinehydrolyse wordt aangetoond door het ontstaan van een bruine kleur en het verdwijnen van de fluorescentie. Dit kan worden gecontroleerd met behulp van een UV-lamp.

LITERATUURVERWIJZINGEN

- Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. *Rev. Pl. Path.*, 49, 213-218.
- Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. *EPPO Bull.* 14 (2), 147-152.
- Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: *Manual of methods for general bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
- Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J. Bact.*, 66, 24-26.
- Janse, J. D. and Van Vaerenbergh, J. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. *EPPO Bull.*, n° 17, 1987, p. 1-10.
- Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature, Lond.*, 178, 703.
- Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. *J. appl. Bact.*, 29, 114-118.
- Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. appl. Bact.*, 29, 470-489.
- Lelliott, R. A., and P. W. Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. *EPPO Bull.*, 6 (2), 101-106.
- Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the *Corynebacteria*. *Mem. Cornell agric. Exp. Sta.*, 366, 52 p.
- Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
- Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproducibility between laboratories: report of a *Pseudomonas* working party. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, 481-527.

BIJLAGE II

1. Voor elk vermoed optreden waarvoor een immunofluorescentietest volgens de in bijlage I beschreven methode een positieve uitkomst heeft opgeleverd en waarvoor de bevestiging of het tegenbewijs door de voltooiing van genoemde methode nog wordt afgewacht, moeten
 - voor zover dat mogelijk is, alle knollen en planten van het monster, en
 - het resterende extract en de daarbij gemaakte immunofluorescentiepreparaten,worden behouden en op een adequate wijze geconserveerd totdat het onderzoek volgens genoemde methode is afgerond.
 2. Ingeval de aanwezigheid van het organisme wordt bevestigd, wordt gedurende ten minste één maand na de kennisgeving krachtens artikel 5, lid 2, van deze richtlijn het volgende behouden en adequaat geconserveerd:
 - het in lid 1 genoemde materiaal; en
 - een monster van het met de knol of het plantenextract besmette auberginemateriaal; en
 - de geïsoleerde cultuur van het organisme.
-

BIJLAGE III

1. Voor het bepalen van de omvang van de waarschijnlijke besmetting als bedoeld in artikel 5, lid 1, onder b), moet rekening worden gehouden met de volgende elementen:
 - knollen of planten die zijn geteeld op de krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet verklaarde plaats van productie;
 - productieplaats(en) of bedrijfsterreinen met contact in produktiewijze met krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet verklaarde knollen of planten, met inbegrip van die bedrijven waar gereedschap of faciliteiten rechtstreeks of via een gemeenschappelijke contractpartner gezamenlijk wordt of worden gebruikt;
 - knollen of planten die op de in het tweede streepje bedoelde productieplaats(en) zijn geproduceerd of op dergelijke productieplaats(en) aanwezig waren in de periode waarin de krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet verklaarde knollen of planten op in de in het eerste streepje bedoelde bedrijfsterreinen of productieplaatsen aanwezig waren;
 - centrale opslagplaatsen waar aardappelen afkomstig van de bovengenoemde productieplaatsen worden opgeslagen;
 - machines, voer- of vaartuigen, opslagplaatsen, of delen daarvan, en alle andere voorwerpen, verpakkingsmateriaal inbegrepen, die gedurende de voorafgaande twaalf maanden of in de relevante periode met krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet verklaarde knollen of planten in contact kunnen zijn geweest;
 - knollen of planten die zijn opgeslagen in of in contact zijn geweest met de in het voorgaande streepje genoemde gebouwen of voorwerpen voordat deze waren gereinigd en gedesinfecteerd; en
 - op grond van de uitkomsten van de in artikel 6 bedoelde onderzoeken, knollen of planten van dezelfde kloon als krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet verklaarde knollen of planten en waarvoor onderzoek aangeeft dat besmetting waarschijnlijk is.
2. Bij het bepalen van de mogelijke verspreiding als bedoeld in artikel 5, lid 1, onder c), wordt rekening gehouden met:
 - de nabijheid van andere productieplaatsen van aardappelen en andere gastplanten;
 - het feit dat de pootaardappelen al dan niet iets gemeenschappelijks hebben.
3. De in artikel 5, lid 2, eerste alinea, bedoelde kennisgeving moet de volgende gegevens bevatten:
 - voor elke besmet verklaarde verzending of partij aardappelen: de in de artikelen 7 en 8 van Richtlijn 77/93/EEG bedoelde certificaten, het paspoort of het registratienummer, naar gelang van het geval;
 - voor pootaardappelvoorraden, en indien mogelijk, ook in alle andere gevallen: de naam van het ras;
 - de gegevens van de besmetverklaring en de zoneafbakening;
 - de beschikbaarheid van extract, de gemaakte immunofluorescentiepreparaten, besmet auberginemateriaal en geïsoleerde cultuur van het organisme, afkomstig van het onderzoek op grond waarvan de aanwezigheid van het organisme is bevestigd.

BIJLAGE IV

1. Onder de in artikel 7, lid 1, van deze richtlijn bedoelde opruiming onder officieel toezicht van de krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet verklaarde knollen of planten wordt verstaan:
 - rechtstreekse en onverwijld levering, voor industriële verwerking, aan verwerkende bedrijven die over adequate afvalverwijderingsinstallaties beschikken waarvoor is vastgesteld dat er voor verspreiding van het organisme geen aanwijsbaar risico bestaat, en die over een systeem beschikken om de opslagruimten en de uitgaande voertuigen te desinfecteren, of
 - andere maatregelen, op voorwaarde dat is vastgesteld dat er voor verspreiding van het organisme geen aanwijsbaar risico bestaat; van deze maatregelen moet aan de Commissie en aan de andere Lid-Staten kennis worden gegeven.
2. Het in artikel 7, lid 2, bedoelde geëigende gebruik, respectievelijk de daar bedoelde adequate opruiming onder toezicht van de verantwoordelijke officiële instanties van de Lid-Staten, van knollen of planten waarvan krachtens artikel 5, lid 1, onder b), is bepaald dat zij waarschijnlijk besmet zijn, omvat:
 - het gebruik als consumptieaardappelen, verpakt voor rechtstreekse aflevering en voor gebruik zonder verdere ompakking, en bestemd voor die rechtstreekse aflevering en dat rechtstreekse gebruik;
 - het gebruik als aardappelen bestemd voor industriële verwerking, en bestemd voor rechtstreekse en onverwijld aflevering aan een verwerkend bedrijf met adequate afvalverwijderingsinstallaties en desinfectiesystemen, of
 - enig ander gebruik, respectievelijk enige andere opruiming, op voorwaarde dat wordt vastgesteld dat er voor verspreiding van het organisme geen aanwijsbaar risico bestaat.
3. Als adequate methoden voor het reinigen en desinfecteren van de in artikel 7, lid 3, bedoelde voorwerpen gelden die waarvan is vastgesteld dat er voor verspreiding van het organisme geen aanwijsbaar risico bestaat, en die onder toezicht van de verantwoordelijke officiële instanties van de Lid-Staten worden toegepast.
4. Onder de in artikel 7, lid 4, bedoelde maatregelen die door de Lid-Staten in de krachtens artikel 5, lid 1, onder c), afgebakende zones moeten worden uitgevoerd, zijn begrepen:
 - 4.1. op krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet verklaarde productieplaatsen:
 - a) op een krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet verklaard veld:
 - i) — gedurende ten minste de drie vegetatiejaren volgende op die waarin de besmetverklaring gedaan is:
 - maatregelen om in de bodem achtergebleven aardappelplanten en andere natuurlijke waardplanten van het organisme te elimineren, en
 - verbod om aardappelknollen, aardappelplanten of aardappelzaad, of andere natuurlijke waardplanten van het organisme, of gewassen waarvoor een aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme daarop kan overleven en zich van daaruit verder kan verspreiden, aan te planten zolang het veld niet gedurende ten minste twee opeenvolgende vegetatiejaren vrij is bevonden van achtergebleven aardappelplanten;
 - in de eerste teeltperiode volgende op de in het eerste streepje aangegeven periode, aanplant van officieel gecertificeerde pootaardappelen uitsluitend voor de productie van consumptieaardappelen, vergezeld van een officieel onderzoek als bedoeld in artikel 2, lid 1;
 - in de teeltperiode volgende op de in het voorgaande streepje bedoelde teeltperiode en volgens een passende wisselcyclus, aanplant van officieel gecertificeerde pootaardappelen voor de productie van pootaardappelen of consumptieaardappelen, vergezeld van een officieel onderzoek als bedoeld in artikel 2, lid 1, of
 - ii) — gedurende vier vegetatiejaren volgende op dat van de besmetverklaring:
 - maatregelen om in de bodem achtergebleven aardappelplanten en andere natuurlijke waardplanten van het organisme te elimineren, en
 - volledige braaklegging van het veld of bestemming van het veld tot blijvend grasland dat frequent kort wordt gemaaid of intensief wordt begraaud;
 - in de eerste teeltperiode voor aardappelen volgende op de in het eerste streepje genoemde periode, aanplant van officieel gecertificeerde pootaardappelen voor de productie van pootaardappelen of consumptieaardappelen, en het doen van een officieel onderzoek als bedoeld in artikel 2, lid 1;

- b) op andere velden:
- in het vegetatiejaar volgende op dat van de besmetverklaring:
 - verbod om aardappelknollen, aardappelplanten, aardappelzaad, of andere natuurlijke gastplanten van het organisme aan te planten, en, in voorkomend geval, maatregelen om in de bodem achtergebleven aardappelplanten te elimineren; of
 - eventueel aanplant van officieel gecertificeerde pootaardappelen uitsluitend voor de produktie van consumptieaardappelen, mits ten overstaan van de verantwoordelijke officiële instanties is aangetoond dat de risico's voor in de bodem achtergebleven aardappelplanten en andere natuurlijke gastplanten van het organisme geëlimineerd zijn;
 - gedurende ten minste twee vegetatiejaren volgende op het in het vorige streepje bedoelde jaar, aanplant van uitsluitend gecertificeerde pootaardappelen voor de produktie van pootaardappelen of consumptieaardappelen;
 - in elke, in bovenstaande streepjes genoemde vegetatiejaren, maatregelen om in de bodem achtergebleven en natuurlijke gastplanten van het organisme te elimineren, vergezeld van een officieel onderzoek als bedoeld in artikel 2, lid 1;
 - wanneer officieel gecertificeerde pootaardappelen voor de produktie van consumptieaardappelen zijn geplant wordt in het vegetatiejaar volgend op de besmetverklaring de oogst tijdens de groei op geschikte momenten gekeurd en worden in de bodem achtergebleven aardappelplanten op het organisme getest;
- c) onmiddellijk na de besmetverklaring krachtens artikel 5, lid 1, onder a), en in alle daaropvolgende vegetatiejaren tot en met de eerste voor aardappelen toegestane teelt op (een) besmet verklaard(e) veld(en), als bedoeld in punt a), reiniging en desinfectie volgens adequate methoden als aangegeven in punt 3 van deze bijlage van alle machines en opslaginstallaties op de plaats van produktie die voor aardappelen zijn gebruikt;
- d) in produktiesystemen waarin het teeltmedium volledig kan worden vervangen:
- verbod om knollen, planten of aardappelzaad aan te planten tenzij de produktie-eenheid aan onder officieel toezicht genomen maatregelen is onderworpen om het organisme te vernietigen en alle aardappelmateriaal of materiaal van Solanaceae te verwijderen, waarbij op zijn minst het teeltmedium volledig wordt vervangen en de produktie-eenheid en alle gereedschappen en machines worden gereinigd en gedesinfecteerd, en de verantwoordelijke officiële instanties hierna toestemming hebben verleend om opnieuw aardappelen te produceren, en
 - gebruik bij de aardappelproduktie van officieel gecertificeerde pootaardappelen, of miniknollen of microplanten van getoetste bronnen;

4.2. in de afgebakende zones moeten de Lid-Staten, onverminderd de in punt 4.1 genoemde maatregelen:

- a) onmiddellijk, en gedurende ten minste drie vegetatieperioden na de besmetverklaring:
- ervoor zorgen dat hun verantwoordelijke officiële instanties toezicht houden op bedrijfsterreinen of -gebouwen waar aardappelknollen worden geteeld, opgeslagen of behandeld en op bedrijven waar contractueel aardappelmachines worden gebruikt;
 - bepalen dat machines en opslagplaatsen op dergelijke bedrijven worden gereinigd en gedesinfecteerd volgens de in punt 3 van deze bijlage aangegeven adequate methoden;
 - bepalen dat in die zone uitsluitend gecertificeerde pootaardappelen voor de aardappelteelt mogen worden gebruikt;
 - bepalen dat op alle bedrijven in de zone geoogste pootaardappelvoorraden gescheiden worden gehouden van die van consumptieaardappelen;
 - een officieel onderzoek verrichten als omschreven in artikel 2, lid 1, van deze richtlijn;
- b) indien relevant een programma opstellen om de pootaardappelvoorraden binnen een passende termijn volledig te vervangen.

Van de krachtens punt 4.2 genomen maatregelen worden de andere Lid-Staten en de Commissie jaarlijks in kennis gesteld. Daarbij worden ook de registratienummers van producenten, collectieve opslagplaatsen en verzendingscentra in de afgebakende zone vermeld.