

II

(Actos cuja publicação não é uma condição da sua aplicabilidade)

CONSELHO

DIRECTIVA 93/85/CEE DO CONSELHO

de 4 de Outubro de 1993

relativa à luta contra a podridão anelar da batata

O CONSELHO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia e, nomeadamente, o seu artigo 43º,

Tendo em conta a proposta da Comissão ⁽¹⁾,

Tendo em conta o parecer do Parlamento Europeu ⁽²⁾,

Tendo em conta o parecer do Comité Económico e Social ⁽³⁾,

Considerando que a produção da batata ocupa uma posição importante na agricultura da Comunidade; que o rendimento desta produção está constantemente ameaçado por organismos prejudiciais;

Considerando que a protecção da cultura da batata contra os organismos prejudiciais permite não só manter a capacidade produtiva, como igualmente aumentar a produtividade agrícola;

Considerando que as medidas de protecção destinadas a evitar a introdução de organismos prejudiciais no território de um Estado-membro terão apenas um efeito limitado caso esses organismos não sejam combatidos simultânea e metodicamente em toda a Comunidade e não seja evitada a sua propagação;

Considerando que um dos organismos prejudiciais à batateira é o *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann e Kotthoff) Davis et al., o agente patogénico da doença da podridão anelar da batata; que esta doença surgiu em algumas regiões da Comunidade e que ainda existem certos focos de infecção limitados;

Considerando que existe um risco considerável para a cultura da batata na Comunidade se não forem adoptadas medidas eficazes para localizar esta doença e determinar a sua distribuição, evitar o seu aparecimento e propagação e, quando a doença seja detectada, evitar a sua propagação e combatê-la tendo em vista a sua erradicação;

Considerando que, para atingir este objectivo, devem ser adoptadas determinadas medidas no âmbito da Comunidade; que, além disso, os Estados-membros devem poder tomar medidas adicionais ou mais rigorosas, quando necessário e desde que não sejam criados obstáculos à circulação da batata na Comunidade, sem prejuízo do disposto na Directiva 77/93/CEE do Conselho, de 21 de Dezembro de 1976, relativa às medidas de protecção contra a introdução nos Estados-membros de organismos prejudiciais às plantas e produtos vegetais ⁽⁴⁾; que essas medidas devem ser notificadas aos demais Estados-membros e à Comissão;

Considerando que a Directiva 80/665/CEE do Conselho, de 24 de Junho de 1980, relativa à luta contra a murchidão bacteriana da batateira ⁽⁵⁾, define medidas mínimas a adoptar pelos Estados-membros contra a podridão anelar;

⁽⁴⁾ JO nº L 26 de 31. 1. 1977, p. 20. Directiva com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 92/103/CEE da Comissão (JO nº L 363 de 11. 12. 1992, p. 1).

⁽⁵⁾ JO nº L 180 de 14. 7. 1980, p. 30.

⁽¹⁾ JO nº C 93 de 2. 4. 1993, p. 12.

⁽²⁾ JO nº C 176 de 28. 6. 1993, p. 210.

⁽³⁾ JO nº C 161 de 14. 6. 1993, p. 18.

Considerando que, desde então, se registaram progressos significativos no conhecimento da podridão anelar da batata e na detecção do agente patogénico dessa doença;

Considerando que a aplicação do regime fitossanitário comunitário à Comunidade enquanto espaço sem fronteiras internas exigirá o reexame e a revisão de algumas das disposições da Directiva 80/665/CEE;

Considerando que, na sequência desta análise, o disposto na Directiva 80/665/CEE foi julgado insuficiente, sendo necessário estabelecer medidas mais pormenorizadas;

Considerando que, neste contexto, se deve proceder à revogação da Directiva 80/665/CEE e à adopção das medidas necessárias;

Considerando que as medidas devem ter em conta, em primeiro lugar, que a doença pode permanecer latente e não ser detectada na cultura e nos tubérculos armazenados, sendo unicamente possível uma prevenção eficaz através da produção e utilização de batata de semente indemne de infecção e, em segundo lugar, que são necessárias prospecções oficiais sistemáticas a fim de proceder à sua localização; que a propagação do agente patogénico na batateira em crescimento não é o factor mais importante, mas que o agente patogénico pode persistir durante o Inverno nas plantas provenientes de tubérculos deixados no terreno (plantas espontâneas) e que estas constituem as principais causas da transmissão da infecção de uma campanha para a outra; que o agente patogénico é propagado, sobretudo, através da contaminação de batatas em contacto com batatas infectadas e com equipamento de plantação, arranque e manuseamento ou em recipientes de transporte e de armazenagem contaminados com o organismo devido a contactos anteriores com batatas infectadas; que esses objectos contaminados podem-se manter infecciosos durante algum tempo após contaminação; que a propagação do agente patogénico pode ser reduzida ou evitada através da desinfecção desses objectos; que a contaminação de batata de semente constitui um risco importante para a propagação do agente patogénico;

Considerando que, para a determinação dos pormenores das medidas gerais, bem como relativamente às medidas mais rigorosas ou adicionais adoptadas pelos Estados-membros tendo em vista evitar a introdução do agente patogénico no seu território, é desejável que os Estados-membros cooperem estreitamente com a Comissão no âmbito do Comité fitossanitário permanente, a seguir designado «comité»;

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1º

A presente directiva diz respeito às medidas a adoptar pelos Estados-membros contra o *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann e Kotthoff) Davis et al., o agente patogénico da podridão anelar da batata (a seguir designado «o organismo»), a fim de:

- a) O localizar e determinar a sua distribuição;
- b) Evitar o seu aparecimento e propagação;
- c) Quando detectado, evitar a sua propagação e combatê-lo com vista à sua erradicação.

Artigo 2º

1. Os Estados-membros procederão sistematicamente a prospecções oficiais do organismo em tubérculos e, sempre que apropriado, em plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.), originárias do seu território, com vista à confirmação da ausência do organismo.

Para efeitos destas prospecções, quando se tratar de tubérculos, serão colhidas amostras tanto de batatas de semente, como de outras batatas, de preferência provenientes de lotes em armazém, que serão submetidas a testes laboratoriais oficiais, ou realizados sob controlo oficial, utilizando o método referido no anexo I, para a detecção e diagnóstico do organismo. Além disso, quando adequado, poderá ser efectuada uma inspecção visual oficial, ou oficialmente controlada, através do corte de tubérculos noutras amostras.

Quando se tratar de plantas, estas prospecções serão efectuadas segundo métodos adequados e as amostras serão submetidas a testes adequados oficiais ou oficialmente controlados.

O número, origem, estratificação e calendário da colheita de amostras serão decididos pelos organismos oficiais responsáveis, na acepção da Directiva 77/93/CEE, com base em princípios científicos e estatísticos válidos e na biologia do organismo, e atendendo aos sistemas de produção de batata específicos dos Estados-membros em questão. Os pormenores respectivos serão apresentados anualmente aos demais Estados-membros e à Comissão, com vista a garantir níveis comparáveis de segurança entre os Estados-membros na confirmação da ausência do organismo.

2. Os resultados das pesquisas oficiais previstas no nº 1 serão notificados, pelo menos uma vez por ano, aos demais Estados-membros e à Comissão. Os detalhes desta notificação são confidenciais. Podem ser apresentados ao comité de acordo com o procedimento previsto no artigo 16ºA da Directiva 77/93/CEE.

3. De acordo com o procedimento previsto no artigo 16ºA da Directiva 77/93/CEE, podem ser adoptadas as seguintes disposições:

- as regras relativas às prospecções previstas no nº 1, a realizar de acordo com princípios científicos e estatísticos válidos,
- as regras relativas à notificação prevista no nº 2.

4. De acordo com o procedimento previsto no artigo 16ºA da Directiva 77/93/CEE, serão adoptadas as seguintes disposições:

- o método adequado para as prospecções e para os testes previstos no terceiro parágrafo do nº 1 do presente artigo.

Artigo 3º

Os Estados-membros assegurarão que seja comunicada aos respectivos organismos oficiais responsáveis a ocorrência suspeita ou a presença confirmada do organismo prejudicial em plantas de batateira e tubérculos ou em tubérculos colhidos, armazenados ou comercializados no seu território.

Artigo 4º

1. Em caso de ocorrência suspeita, os organismos oficiais responsáveis do Estado-membro em que foram registados estes casos devem assegurar a realização de testes laboratoriais oficiais, ou oficialmente controlados, utilizando o método previsto no anexo I e de acordo com as condições definidas no ponto 1 do anexo II, a fim de confirmar ou refutar a ocorrência suspeita. No primeiro caso, é aplicável o disposto no ponto 2 do anexo II.

2. Consoante a confirmação ou a refutação da ocorrência suspeita nos termos do nº 1, quando a confirmação tiver sido identificada por meio de:

- i) Observação de sintomas visuais de diagnóstico suspeito da doença, ou
- ii) Realização de um teste positivo de imunofluorescência tal como consta do anexo I, ou outro teste positivo apropriado,

os organismos oficiais do Estado-membro deverão:

- a) Proibir a circulação de todos os lotes ou remessas dos quais tenham sido colhidas amostras, excepto sob o seu controlo e desde que se tenha concluído que não existe qualquer risco identificável de propagação do organismo;
- b) Adoptar medidas para determinar a origem da ocorrência suspeita;
- c) Adoptar medidas preventivas adicionais adequadas, com base no nível previsível de risco, a fim de evitar a propagação do organismo. Estas medidas podem incluir o controlo oficial da circulação de todos os outros tubérculos ou plantas dentro ou fora de instalações associadas à ocorrência suspeita.

3. De acordo com o procedimento previsto no artigo 16ºA da Directiva 77/93/CEE, podem ser adoptadas as seguintes disposições:

- as medidas referidas na alínea c) do nº 2 do presente artigo.

4. De acordo com o procedimento previsto no artigo 16ºA da Directiva 77/93/CEE, serão adoptadas as seguintes disposições:

- os outros testes adequados previstos na subalínea ii) do nº 2 do presente artigo.

Artigo 5º

1. Se os testes de laboratório oficiais, ou oficialmente controlados, utilizando o método previsto no anexo I, confirmarem a presença do organismo numa amostra de tubérculos, plantas ou partes de plantas, os organismos oficiais responsáveis de um Estado-membro, com base em princípios científicos válidos, na biologia do organismo e nos sistemas de produção, comercialização e transformação específicos desse Estado-membro:

- a) Declararão contaminados os tubérculos ou plantas, as remessas e/ou os lotes, a maquinaria, os veículos, os navios, os armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo material de embalagem, em que tiver sido colhida a amostra e, quando adequado, o local ou locais de produção e o(s) campo(s) onde tiverem sido colhidos os tubérculos ou plantas;
- b) Determinarão, tendo em conta o disposto no ponto 1 do anexo III, a extensão da contaminação provável por contacto pré ou pós-colheita ou por relação de produção com a contaminação declarada;
- c) Demarcarão uma zona com base na declaração de contaminação nos termos da alínea a), na determinação da extensão da contaminação provável nos termos da alínea b) e na possível propagação do organismo, tendo em conta o disposto no ponto 2 do anexo III.

2. Nos termos do disposto no ponto 3 do anexo III, os Estados-membros notificarão imediatamente os demais Estados-membros e a Comissão de qualquer contaminação declarada nos termos da alínea a) do nº 1 e dos pormenores respeitantes à demarcação da zona nos termos da alínea c) do nº 1.

Os detalhes desta notificação são confidenciais. Podem ser apresentados ao comité de acordo com o procedimento previsto no artigo 16ºA da Directiva 77/93/CEE.

3. Na sequência da notificação nos termos do nº 2 e dos elementos dela constantes, os demais Estados-membros mencionados na notificação, quando adequado, declararão a contaminação, determinarão a extensão da contaminação provável e demarcarão uma zona, nos termos das alíneas a), b) e c) do nº 1, respectivamente.

Artigo 6º

Se os tubérculos ou plantas tiverem sido declarados contaminados nos termos do nº 1, alínea a), do artigo 5º, os Estados-membros determinarão a realização de testes de acordo com o nº 1 do artigo 4º nas existências de batata com uma relação clonal com a batata contaminada. Os testes serão realizados no número de tubérculos ou plantas necessário para determinar a provável fonte primária de infecção e a extensão da contaminação provável, de preferência por ordem do grau de risco.

Na sequência dos testes, proceder-se-á, quando adequado, a outras declarações de contaminação, à determinação da extensão da contaminação provável e à demarcação de uma zona, nos termos do nº 1, alíneas a), b) e c), do artigo 5º, respectivamente.

Artigo 7º

1. Os Estados-membros determinarão que os tubérculos ou plantas declarados contaminados nos termos do nº 1, alínea a), do artigo 5º não possam ser plantados e que, sob controlo dos respectivos organismos oficiais responsáveis, sejam:

- destruídos, ou
- eliminados de outro modo, de acordo com medidas oficialmente controladas, nos termos do ponto 1 do anexo IV, desde que se tenha concluído não existir qualquer risco identificável de propagação do organismo.

2. Os Estados-membros determinarão que os tubérculos ou plantas considerados provavelmente contaminados nos termos do nº 1, alínea b), do artigo 5º não possam ser plantados e que, sem prejuízo dos resultados dos testes referidos no artigo 6º para as existências com relação clonal, sejam, sob controlo dos respectivos organismos oficiais responsáveis, alvo de utilização ou eliminação adequados, como especificado no ponto 2 do anexo IV, em condições que garantam a inexistência de qualquer risco identificável de propagação do organismo.

3. Os Estados-membros determinarão que toda a maquinaria, os veículos, os navios, os armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo o material de embalagem, declarados contaminados nos termos do nº 1, alínea a), do artigo 5º ou considerados provavelmente contaminados nos termos do nº 1, alínea b), do artigo 5º, sejam destruídos ou limpos e desinfectados segundo métodos adequados, como especificado no ponto 3 do anexo IV. Após a desinfecção, esses objectos deixarão de ser considerados contaminados.

4. Sem prejuízo das medidas aplicadas nos termos dos nºs 1, 2 e 3 do presente artigo, os Estados-membros determinarão que, na zona demarcada nos termos do nº 1, alínea c), do artigo 5º, seja aplicada uma série de medidas, como especificado no ponto 4 do anexo IV.

Artigo 8º

1. Os Estados-membros determinarão que a batata de semente satisfaça os requisitos da Directiva 77/93/CEE e seja proveniente, em linha directa, de material obtido no âmbito de um programa oficialmente aprovado, que tenha sido declarado indemne do organismo em testes oficiais, ou controlados oficialmente, utilizando o método constante do anexo I.

Aqueles testes devem ser realizados:

- quando a contaminação afectar a produção de batata de semente, nas plantas da selecção clonal inicial,
- nos restantes casos, tanto nas plantas da selecção clonal inicial como em amostras representativas de batata de semente de base ou de material de multiplicação anterior.

2. De acordo com o procedimento previsto no artigo 16ºA da Directiva 77/93/CEE, podem ser adoptadas as seguintes disposições:

- as modalidades de aplicação do disposto no segundo parágrafo, primeiro travessão, do nº 1,
- as normas relativas às amostras representativas previstas no segundo parágrafo, segundo travessão, do nº 1.

Artigo 9º

Os Estados-membros proibirão a posse e o manuseamento do organismo.

Artigo 10º

Sem prejuízo do disposto na Directiva 77/93/CEE, os Estados-membros podem autorizar derrogações às medidas referidas nos artigos 6º, 7º e 9º da presente directiva para fins experimentais ou científicos e para trabalho de selecção varietal, desde que estas derrogações não prejudiquem as medidas de luta contra o organismo nem provoquem qualquer risco de propagação deste.

Artigo 11º

Os Estados-membros podem adoptar medidas adicionais ou mais rigorosas, a fim de combater o organismo ou evitar a sua propagação, desde que sejam compatíveis com as disposições da Directiva 77/93/CEE.

As medidas adicionais a que se refere o parágrafo anterior podem incluir a prescrição de que as batatas de semente apenas sejam plantadas quando tenham sido oficialmente certificadas ou oficialmente inspeccionadas e obedeçam às normas fitossanitárias exigidas. Em especial, estas normas podem ser aplicáveis quando os agricultores tenham sido

autorizados a utilizar, na sua própria exploração, batata de semente obtida a partir da colheita própria e em outros casos em que sejam plantadas batatas de semente de produção própria.

O teor dessas medidas será notificado aos demais Estados-membros e à Comissão.

Artigo 12º

À luz da evolução dos conhecimentos científicos e técnicos, podem ser adoptadas alterações aos anexos da presente directiva, de acordo com o procedimento previsto no artigo 16ºA da Directiva 77/93/CEE.

Artigo 13º

1. Os Estados-membros adoptarão e publicarão, o mais tardar, até 15 de Novembro de 1993, as disposições necessárias para dar cumprimento à presente directiva. Do facto informarão imediatamente a Comissão.

Sempre que os Estados-membros adoptarem tais disposições, estas deverão incluir uma referência à presente directiva ou ser acompanhadas dessa referência aquando da sua publicação oficial. As regras relativas a esta referência serão adoptadas pelos Estados-membros.

Os Estados-membros aplicarão estas disposições a partir de 16 de Novembro de 1993.

2. Os Estados-membros comunicarão imediatamente à Comissão todas as disposições de direito interno que adoptarem no domínio abrangido pela presente directiva. A Comissão informará do facto os demais Estados-membros.

Artigo 14º

A Directiva 80/665/CEE é revogada a partir de 16 de Novembro de 1993.

Artigo 15º

Os Estados-membros são os destinatários da presente directiva.

Feito no Luxemburgo, em 4 de Outubro de 1993.

Pelo Conselho

O Presidente

W. CLAES

ANEXO I

MÉTODO DE DETECÇÃO E DIAGNÓSTICO DA BACTÉRIA DA PODRIDÃO ANELAR, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SMITH DAVIS ET AL. SPP. *SEPEDONICUS* (SIECKERMANN et KOTTOPP), EM LOTES DE BATATA**1. Colheita de cones do hilo**

- 1.1. Lavar 200 tubérculos em água corrente e retirar a epiderme de cada tubérculo com um escalpelo ou um descascador desinfectados normalmente, ou seja, mergulhando em etanol a 70 % e passando pela chama.
- 1.2. Retirar cuidadosamente cones do hilo com um escalpelo. Tirar o mínimo possível de tecido não vascular. Os hilos devem ser tratados no espaço de 24 horas (ver ponto 3) ou conservados não mais de duas semanas a - 20°C.

2. Observação visual dos sintomas de podridão anelar

Depois de retirar os hilos, cortar transversalmente cada tubérculo e observar sintomas de podridão anelar.

Os primeiros sintomas observam-se na zona do hilo: os tecidos que envolvem o anel vascular estão ligeiramente vidrados ou translúcidos, sem podridão.

O anel vascular à volta do hilo pode ter uma cor ligeiramente mais escura do que o normal. O primeiro sintoma facilmente identificável é a coloração amarelada do anel vascular e, quando se pressiona suavemente o tubérculo, emerge um exsudado sob a forma de fitas. Esta exsudação contém milhões de bactérias. Nesta fase, o tecido vascular pode tornar-se acastanhado. Ao princípio, estes sintomas podem limitar-se a uma parte do anel, não necessariamente perto do hilo, e em seguida podem alargar-se gradualmente a todo o anel. À medida que a infecção progride, dá-se a destruição do tecido vascular, e o córtex externo pode separar-se do córtex interno. Nos estádios mais avançados da infecção, surgem fissuras na superfície do tubérculo, frequentemente castanho-avermelhadas nas margens. Os sintomas podem ser ocultados por infecções micóticas ou bacterianas e pode ser difícil, ou mesmo impossível, distinguir os sintomas da podridão anelar numa fase avançada de qualquer outra podridão dos tubérculos.

3. Preparação de amostras para coloração Gram, imunofluorescência (IF) e teste da beringela

- 3.1. Homogeneizar os hilos até à maceração completa (mas não em excesso) com um diluente não tóxico para o *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* [por exemplo, tampão fosfato (PBS) 0,05M pH 7,0] a uma temperatura inferior a 30 °C; é aconselhável a adição de um antifloculante não tóxico e, por vezes, é necessário adicionar agente antiespuma não tóxico (apêndices 1 e 2). Deve evitar-se uma maceração excessiva.
- 3.2. Extrair as bactérias do homogenizado por um dos seguintes métodos ⁽¹⁾:
 - A. a) Centrifugar durante 10 minutos a 180 G no máximo.
 - b) Centrifugar o sobrenadante durante 10 minutos a 4 000 G no mínimo. Decantar e desprezar o sobrenadante.
 - B. a) Deixar depositar o macerado durante 30 minutos. Decantar o sobrenadante sem levantar o «pellet».
 - b) Filtrar sob vácuo o sobrenadante através de papel de filtro (Whatman nº 1) colocado num filtro de vidro poroso (nº 2 = 40 – 100 µm). Recolher o filtrado num tubo de centrífuga. Lavar o filtro com PBS esterilizado até um volume máximo de filtrado de 35 ml.
 - c) Centrifugar o filtrado durante 20 minutos a 4 000 G no mínimo.
- 3.3. Suspende o «pellet» em PBS 0,01M pH 7,2 (apêndice 2) esterilizado até um volume total de cerca de 1 ml. Dividir em duas partes iguais e guardar uma parte para efeitos de referência, congelando-a a - 20 °C ⁽²⁾ ou liofilizando-a. Dividir a outra parte em duas, usando metade para o teste de imunofluorescência e a coloração Gram, e a outra metade para o teste da beringela.

⁽¹⁾ Um método de extracção alternativo é dado por Dinesen, 1984.

⁽²⁾ Há indicações (Janse e Van Vaerenberg, 1987) de que a congelação pode reduzir a viabilidade de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*. A suspensão do «pellet» em glicerol 10 % pode resolver este problema.

- 3.4. É indispensável que todos os controlos e amostras positivos de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* sejam tratados separadamente para evitar contaminações. O mesmo se aplica às lâminas de imunofluorescência e ao teste da beringela.

4. Coloração Gram

- 4.1. Preparar esfregaços para coloração Gram de todas as diluições do «pellet» (ponto 5.2.1) e para quaisquer porções de tubérculos cortados (ponto 2) que apresentem sintomas suspeitos, como translucidez ou podridão. As amostras devem ser retiradas da margem dos tecidos doentes.
- 4.2. Preparar esfregaços para coloração Gram de culturas conhecidas de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* e, se possível, de tecidos naturalmente infectados (ponto 5.1).
- 4.3. Determinar quais as amostras que contêm células corineformes típicas Gram positivas. Em geral, as células de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* têm 0,8 – 1,2 µm de comprimento e 0,4 – 0,6 µm de largura.

No apêndice 3 é indicado o processo de coloração.

As preparações feitas a partir de infecções naturais ou de culturas isoladas recentemente apresentam muitas vezes predominância de bastonetes cocóides que costumam ser ligeiramente mais pequenos do que as células provenientes de culturas em ágar mais velhas. Na maioria dos meios de cultura, as células *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* têm a forma de bastonetes pleomórficos e podem dar uma reacção Gram variável. Há células individuais, aos pares, com a forma de «cotovelo» típica da divisão e, ocasionalmente, em grupos irregulares muitas vezes denominados «palissadas» ou «caracteres chineses».

5. Método para testar a imunofluorescência (IF)

- 5.1. Utilizar anti-soro de uma estirpe conhecida de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* ATCC 33113 (NCPPB 2137) ou NCPPB 2140, que deve ter um título de IF superior a 1:600. Incluir um controlo de PBS na lâmina para determinar se o conjugado de imunoglobulina antioelho marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) se combina de forma não específica com células bacterianas. Deve ser utilizado *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* (ATCC 33113 (NCPPB 2137) NCPPB 2140 como controlo do antígeno homólogo numa lâmina separada. Sempre que possível, deve ser utilizado tecido naturalmente infectado (liofilizado ou congelado a -20 °C) como controlo semelhante na mesma lâmina (ver figura 2).

5.2. Protocolo

- 5.2.1. Preparar três séries de diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) do «pellet» final em água destilada (ver figura 2).
- 5.2.2. Pipetar um volume fixo suficiente para cobrir o poço (cerca de 25 µl) de cada diluição do «pellet» ou da suspensão de *C. michiganensis* ssp. (cerca de 10^6 células/ml) para os poços de uma lâmina de poços múltiplos tal como indicado na figura 1.

Figura 1

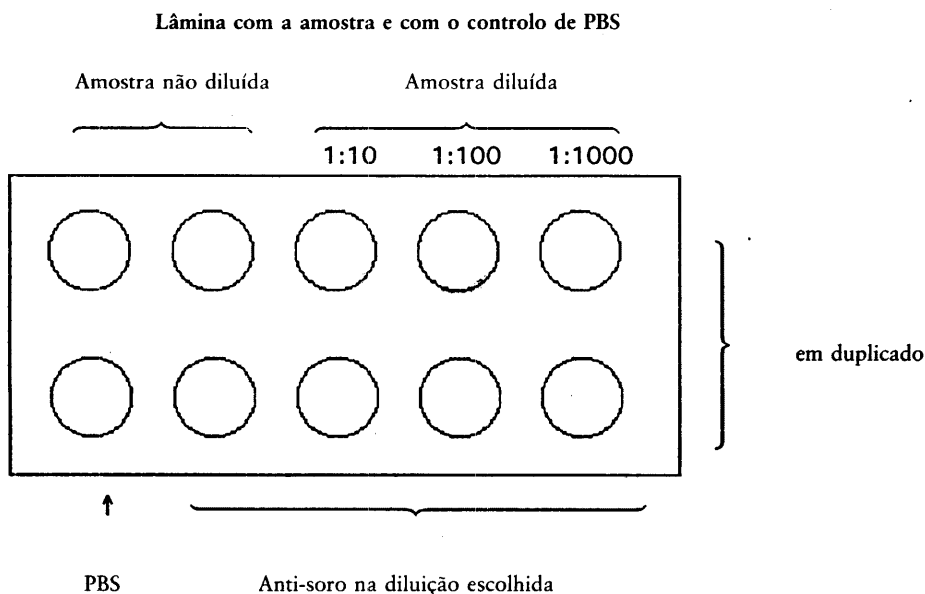
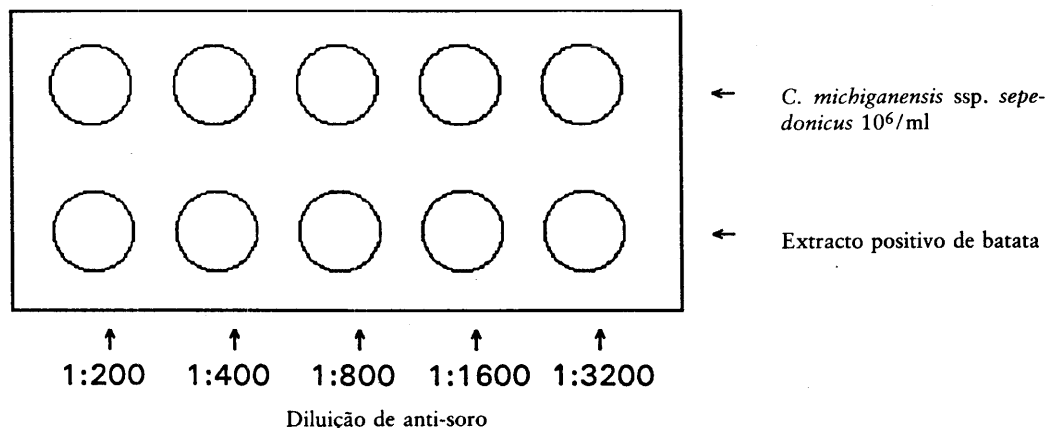


Figura 2

Lâmina de controlo positivo



- 5.2.3. Deixar secar ao ar a cerca de 37 °C e fixar com etanol a 95 % ou à chama.
- 5.2.4. Cobrir os poços com o volume apropriado de anti-soro *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* nas diluições recomendadas, em PBS 0,01M pH 7,2 (apêndice 2), como na figura 1. (Utilizar PBS para o controlo da FITC). A diluição de trabalho do anti-soro deve ser de cerca de metade do título de IF. Se forem incluídas outras diluições de anti-soro, devem ser preparadas lâminas separadas para cada diluição.
- 5.2.5. Incubar numa câmara húmida à temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 5.2.6. Lavar cuidadosamente com PBS 0,01M pH 7,2 durante 5 minutos, mudando três vezes o tampão.
- 5.2.7. Eliminar cuidadosamente a humidade em excesso.
- 5.2.8. Cobrir cada janela com conjugado de FITC, na diluição utilizado para determinar o título, e incubar numa câmara húmida, no escuro, à temperatura ambiente, durante 30 minutos.
- 5.2.9. Lavar como no ponto 5.2.6.
- 5.2.10. Juntar cerca de 5 – 10 µl de tampão fosfato com glicerol pH 7,6 (ou um líquido de montagem semelhante, de pH não inferior a 7,6) em cada poço e cobrir com uma lamela (apêndice 2).
- 5.2.11. Examinar ao microscópio equipado com lâmpada de epifluorescência e com os filtros adequados para trabalhar com FITC, com uma ampliação entre 400x e 1000x. Observar os poços em duplicado segundo dois diâmetros perpendiculares e ao longo de perímetro do poço.

Procurar células fluorescentes nos controlos positivos e determinar o seu título. Procurar células fluorescentes no poço de controlo FITC/PBS e, na sua ausência, observar os outros poços. Determinar, num mínimo de 10 campos de objectiva, o número médio de células fluorescentes morfológicamente típicas por campo, e calcular o número de células/ml de «pellet» não diluído (ver apêndice 4).

Há vários problemas inerentes ao teste de imunofluorescência.

- em «pellets» de batata é provável ocorrerem células fluorescentes com morfologia atípica e reacções cruzadas de bactérias saprófitas com tamanho e morfologia semelhantes ao *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Considerar unicamente as células fluorescentes de tamanho e morfologia típicas.

Devido à possibilidade de reacções cruzadas, deve-se voltar a analisar, com um anti-soro diferente, as amostras com reacção positiva no teste IF,

- o limite técnico de detecção deste método situa-se entre 10³ e 10⁴ células/ml de «pellet» não diluído. As amostras com número de células fluorescentes típicas/ml no limite de detecção são geralmente negativas para o *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*, mas podem ser submetidas ao teste da beringela.

Um teste de imunofluorescência é considerado negativo quando na amostra em questão não se encontrarem células fluorescentes morfológicamente típicas. As amostras serão consideradas «não contaminadas» com *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Não é necessário realizar o teste da beringela.

Um teste de imunofluorescência é considerado positivo quando na amostra em questão se encontrarem células fluorescentes morfológicamente típicas. As amostras para as quais o teste de imunofluorescência foi positivo com ambos os anti-soros são consideradas «potencialmente contaminadas» com *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

É necessário realizar o teste da beringela em todas as amostras consideradas «potencialmente contaminadas».

6. Teste da beringela

Para os pormenores da cultura, ver apêndice 5.

6.1. Distribuir o «pellet» do ponto 3.3 por 25 beringelas, no mínimo, no estágio de três folhas (apêndice 5) através de um dos métodos adiante indicados (pontos 6.2, 6.3 ou 6.4).

6.2. Inoculação por fenda I

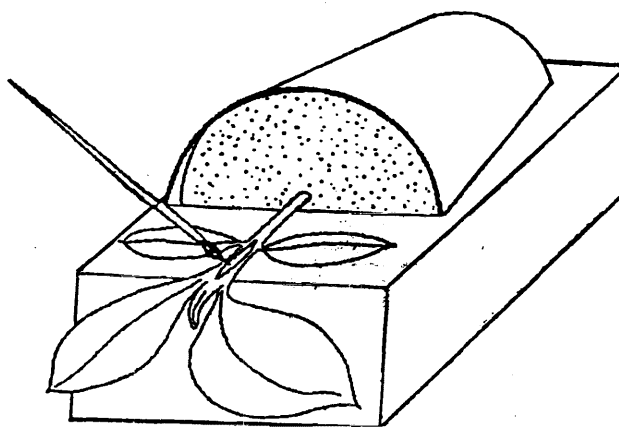
6.2.1. Colocar cada vaso na posição horizontal [um bloco de poliestireno com um buraco de 5 cm de profundidade x 10 cm de largura x 15 cm de comprimento (figura 3) convém para um vaso de 10 cm]. Deve colocar-se uma tira de papel de alumínio esterilizado entre o caule e o bloco para cada uma das amostras a testar. Segura-se a planta com um elástico à volta do bloco.

6.2.2. Com um escalpelo, fazer um corte longitudinal ou ligeiramente em diagonal de 0,5 – 1,0 cm de comprimento, com uma profundidade de cerca de três quartos do diâmetro do caule, entre os cotilédones e a primeira folha.

6.2.3. Manter a ferida aberta com a ponta da lâmina do escalpelo e aplicar o inóculo com um pincel muito fino embebido no «pellet». Distribuir o «pellet» pelas beringelas.

6.2.4. Selar o corte com vaselina esterilizada aplicada com uma seringa de 2 ml.

Figura 3



6.3. Inoculação por fenda II

6.3.1. Segurar a planta entre dois dedos, pipetar uma gota (cerca de 5 – 10 µl) do «pellet» no caule, entre os cotilédones e a primeira folha.

6.3.2. Utilizando um escalpelo esterilizado, fazer um corte em diagonal (num ângulo de cerca de 5°), com 1,0 cm de comprimento e com uma profundidade de cerca de 2/3 do diâmetro do caule, começando a partir da gota de «pellet».

6.3.3. Selar o corte com vaselina esterilizada aplicada com uma seringa.

6.4. Inoculação por seringa

6.4.1. Não regar as beringelas no dia anterior à inoculação para reduzir a turgescência.

- 6.4.2. Inocular os caules das beringelas imediatamente acima dos cotilédones, utilizando uma seringa com uma agulha hipodérmica (não inferior a 23 G). Distribuir o «pellet» pelas beringelas.
- 6.5. Inocular 25 plantas com uma cultura conhecida de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* e, se possível, com tecido tubercular infectado naturalmente (ponto 5.1) segundo o mesmo método de inoculação (pontos 6.2, 6.3 ou 6.4).
- 6.6. Inocular 25 plantas com PBS 0,05M esterilizado, segundo o mesmo método de inoculação (pontos 6.2, 6.3 ou 6.4).
- 6.7. Incubar as plantas nas condições adequadas (apêndice 5) durante 40 dias. Ao fim de oito dias, examinar regularmente para detectar quaisquer sintomas. Contar o número de plantas que apresentam sintomas. *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* causa a murchidão das folhas da beringela, que pode começar sob a forma de flacidez das margens ou entre as nervuras. O tecido murcho pode inicialmente apresentar-se verde escuro ou manchado, mas torna-se mais pálido antes de se tornar necrótico. A murchidão entre as nervuras apresenta muitas vezes um aspecto simultaneamente hidrópico e oleoso. O tecido necrosado apresenta muitas vezes margens de um amarelo vivo. As plantas não morrem forçosamente; quanto mais longo for o período antes do aparecimento dos sintomas, maior é a probabilidade de sobrevivência. As plantas podem sobreviver à infecção. As beringelas jovens são muito mais sensíveis a populações baixas de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* do que as plantas mais velhas, pelo que é necessário utilizar plantas no estágio fenológico de três folhas ou imediatamente anterior.

A murchidão pode também ser induzida por outras bactérias ou fungos presentes no «pellet», tais como *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* e *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata*, assim como grandes populações de bactérias saprófitas. Estas murchidões podem distinguir-se da causada por *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* porque as folhas inteiras, ou a planta inteira, murcham rapidamente.

- 6.8. Preparar esfregaços para coloração Gram (ponto 4) para todos os lotes de beringela que apresentem sintomas, utilizando secções de tecido foliar murcho e do caule das plantas e isolar em meio nutritivo adequado (ponto 7). Desinfectar a superfície das folhas e caules das beringelas passando com etanol a 70 %.
- 6.9. Em certas circunstâncias, especialmente quando as condições de cultivo não são as óptimas, é possível que *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* exista como infecção latente nas beringelas mesmo depois de uma incubação de 40 dias. Tais infecções podem eventualmente resultar na paragem do crescimento e em falta de vigor das plantas infectadas. Se o teste IF é considerado positivo, pode entender-se necessário fazer mais testes. É pois essencial comparar as taxas de crescimento de todas as beringelas testadas com o controlo inoculado com PBS 0,05M esterilizado e controlar as condições ambientais da estufa.

Recomenda-se o seguinte método para testes adicionais:

- 6.9.1. Cortar os caules acima do ponto de inoculação e retirar as folhas.
- 6.9.2. Macerar os caules em PBS 0,05M 5 pH 7,0, como em 3.1 e 3.2.
- 6.9.3. Utilizar metade do «pellet» para fazer a coloração Gram (ponto 4) e para o teste IF (ponto 5).
- 6.9.4. Utilizar a outra metade para realizar o teste da beringela (ponto 6) se a coloração Gram e/ou o teste IF forem positivos. Fazer controlos com uma cultura conhecida de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* e com PBS 0,05M esterilizado. Se não se observarem sintomas no teste seguinte, a amostra deve ser considerada negativa.

7. Isolamento de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*

O diagnóstico só pode ser confirmado com o isolamento e identificação de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* (ponto 8). Embora *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* seja um organismo de cultura difícil, pode ser isolado a partir de tecidos sintomáticos. No entanto, como as bactérias saprófitas podem crescer mais rapidamente, não se recomenda fazer isolamento directamente a partir do «pellet» obtido do tubérculo (ponto 3.3). As beringelas constituem um excelente meio selectivo para o crescimento de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* e também proporcionaram um excelente teste de patogenicidade.

Os isolamentos devem ser feitos a partir de todos os tubérculos de batata e de beringela com sintomas (pontos 4, 6). A maceração dos caules de beringela, quando necessária, deve ser efectuada como em 3 e 6.9.

- 7.1. Fazer um riscado das suspensões num dos seguintes meios (as fórmulas são dadas no apêndice 6):

Ágar nutritivo com dextrose (só para a subcultura),

Ágar com peptona, levedura e glucose,

Ágar nutritivo de levedura e dextrose,

Ágar com extracto de levedura e sais minerais.

Incubar a 21 °C durante 20 dias pelo menos.

C. michiganensis ssp. *sepedonicus* cresce devagar e produz normalmente em dez dias colónias pontiformes e esbranquiçadas.

Voltar a fazer um riscado para verificar a pureza.

As taxas de crescimento melhoram com uma subcultura. As colónias típicas são bege esbranquiçadas ou cor de marfim, redondas, lisas, salientes, convexas, com um aspecto entre o mucoso e o fluido, com margens inteiras e, normalmente, com 1 a 3 mm de diâmetro.

Identificação

A partir de batatas e beringelas sãs ou doentes podem isolar-se bactérias corineformes Gram-positivas, formando colónias com características semelhantes às de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*, o qual deve ser identificado através dos seguintes testes:

Teste IF (ponto 5.1);

Teste da beringela;

Testes bioquímicos e fisiológicos (apêndice 7):

- teste da oxidação/fermentação (O/F),
- crescimento a 37 °C,
- produção de urease,
- hidrólise da esculina,
- hidrólise do amido,
- tolerância de uma solução de NaCl a 7 %,
- teste do indole,
- teste da catalase,
- produção de H₂S,
- utilização de citrato,
- hidrólise da gelatina,
- produção de ácido a partir de glicerol, lactose, ramnose e salicilina,
- coloração Gram.

Todos os testes devem incluir um controlo com uma estirpe conhecida de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Todos os testes bioquímicos e fisiológicos devem ser feitos utilizando inóculos a partir de subculturas em ágar nutritivo. As comparações morfológicas devem ser feitas em culturas em ágar nutritivo com dextrose.

Para o teste IF, a concentração bacteriana deve ser ajustada a 10⁶ células/ml. O título de IF deve ser semelhante ao da cultura da estirpe conhecida de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Para o teste da beringela, a concentração bacteriana deve ser ajustada a 10⁷ células/ml. Os testes da beringela devem ser realizados utilizando 10 plantas para cada um dos organismos a testar, utilizando sempre controlos com uma cultura conhecida de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* e água esterilizada; com culturas puras deve observar-se a murchidão típica no período de 20 dias, mas as plantas que não apresentem sintomas ao fim desse período devem ser incubadas durante 30 dias a temperaturas convenientes para a beringela mas não excedendo 30°C (apêndice 5). Se ao fim de 30 dias não se observarem quaisquer sintomas, não se pode confirmar que a cultura seja uma forma patogénica de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Teste	<i>C. michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>
O/F	Inerte ou fracamente oxidativa
Oxidase	-
Catalase	+
Redução de nitratos	-
Produção de urease	-
Produção de sulfureto (H ₂ S)	-
Produção de indole	-
Utilização de citrato	-
Hidrólise do amido	- ou fraca
Crescimento a 37 °C	-
Crescimento em NaCl a 7 %	-
Hidrólise da gelatina	-
Hidrólise da esculina	+
Produção de ácido a partir de:	
— glicerol	-
— lactose	- ou fraca
— ramnose	-
— salicina	-

*Apêndice 1***FÓRMULA DO TAMPÃO DE MACERAÇÃO RECOMENDADO POR LELLIOTT E SELLAR, 1976**

DC silicone antifoam MS A compound (Hopkins & Williams Ltd, Cat. No 9964 – 25, Chadwell Heath, Essex, England)	10 ml
Flocos de lubrol W (ICI Ltd)	0,5 g
Pirofosfato tetrassódico	1 g
Tampão fosfato PBS 0,05 M pH 7,0 (apêndice 2)	1 l

*Apêndice 2***TAMPÕES****Tampão fosfato (PBS) 0,05 M pH 7,0**

Este tampão pode ser utilizado na maceração dos cones (ponto 2.1)

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
NaCl	8,0 g
Água destilada até perfazer	1 l

Tampão fosfato (PBS) 0,01 M pH 7,2

Este tampão é utilizado na diluição dos anti-soros e na lavagem das lâminas de imunofluorescência

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Água destilada até perfazer	1 l

Tampão fosfato com glicerol 0,1 M pH 7,6

Este tampão é utilizado como líquido de montagem para aumentar a fluorescência no teste de imunofluorescência

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

Apêndice 3

COLORAÇÃO GRAM (MODIFICAÇÃO DE HUCKER) (DOETSCH, 1981)

Solução de violeta cristal

Dissolver 2 g de violeta cristal em 20 ml de etanol a 95 %.

Dissolver 0,8 g de oxalato de amónio em 80 ml de água destilada.

Misturar as duas soluções.

Solução de Lugol

Iodo	1 g
------	-----

Iodeto de potássio	2 g
--------------------	-----

Água destilada	300 ml
----------------	--------

Triturar num almofariz o iodo e o iodeto de potássio. Adicionar água e agitar num recipiente fechado até à dissolução.

Solução de safranina para contraste**Solução concentrada:**

Safranina O	2,5 g
-------------	-------

Etanol a 95 %	100 ml
---------------	--------

Misturar e guardar

Solução de trabalho:

Diluir a solução concentrada em água na proporção de 1:10.

Processo de coloração

1. Preparar esfregaços em lâminas de vidro, secar ao ar e fixar pelo calor.
2. Cobrir a lâmina com solução de violeta cristal durante um minuto.
3. Lavar rapidamente com água corrente.
4. Cobrir com solução de Lugol durante um minuto.
5. Lavar com água corrente e secar com papel absorvente.
6. Descorar com etanol a 95 % em gotas até que este saia incolor, ou mergulhar em etanol com agitação suave durante 30 segundos.
7. Lavar em água corrente e secar com papel absorvente.
8. Cobrir com solução de safranina durante 10 segundos.
9. Lavar com água corrente e secar com papel absorvente.

As bactérias Gram-positivas coram de azul-violeta e as Gram-negativas de vermelho-rosado.

Apêndice 4

DETERMINAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS COM IMUNOFLUORESCÊNCIA

Área (S) de cada poço da lâmina de poços múltiplos

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

Em que D = diâmetro do poço.

Área (s) do campo da objectiva

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

Em que d = diâmetro do campo.

Calcular d quer por medição directa quer através das seguintes fórmulas:

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

Em que i = coeficiente de campo (depende do tipo de ocular e varia entre 8 e 24),

K = coeficiente do tubo (1 ou 1,25),

G = ampliação da objectiva (100×, 40×, etc.)

$$\text{de (2): } d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$$

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

Contar: número de células fluorescentes típicas por campo (c).

Calcular: número de células fluorescentes típicas por poço (C).

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

Calcular: número de células fluorescentes típicas por ml de «pellet» (N)

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

Em que y = volume de «pellet» no poço

Em que F = factor de diluição do «pellet».

Apêndice 5

CULTURA DE BERINGELA

Semear beringelas (*Solanum melongena* da variedade Black Beauty) em tabuleiros com substracto esterilizado. O transplante das plântulas faz-se quando os cotilédones estão completamente expandidos (10 a 14 dias) para vasos esterilizados com substracto para cultura igualmente esterilizado.

A inoculação faz-se quando as beringelas se encontram no estado fenológico de 3 folhas, com 2 delas mas não as 3 completamente expandidas.

As beringelas devem ser cultivadas em estufa, nas seguintes condições ambientais:

Fotoperíodo: mínimo de 14h
Temperatura: diurna: 21°C-24°C
nocturna: 15°C

NB: *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* não cresce a temperaturas superiores a 30°C. Se a temperatura nocturna não descer a 15°C, podem ocorrer nas folhas necroses prateadas.

Os estragos causados por larvas de dípteros da família Sciaridae nas raízes podem ser evitados aplicando um insecticida adequado.

A variedade Black Beauty de beringela pode ser obtida de:

1. AB Hammenhøgs Frø
270 50 Hammenhøg
Sweden
2. Hurst Seeds Ltd
Avenue Road
Witham
Essex CM8 2DX
England
3. ASGRO Italia SpA
Corso Lodi, 23
Milan
4. Küpper
Mitteldeutsche Sament GmbH
Hesseuring 22,
D-37269 Eschwege

Apêndice 6

MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA ISOLAMENTO E CRESCIMENTO DE *CLARIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUS***Ágar nutritivo (NA)**

Bacto ágar nutritivo da Difco, que se dissolve em água destilada segundo a proporção indicada pelo fabricante. Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Ágar nutritivo com dextrose (NDA)

Bacto ágar nutritivo da Difco com 1 % de D-glucose mono-hidratada. Esterilizar em autoclave a 115 °C durante 20 minutos.

Ágar com extracto de levedura, peptona e glucose (YPGA)

Bacto extracto de levedura da Difco (nº 0127)	5 g
Bacto peptona da Difco (nº 0118)	5 g
D-glucose mono-hidratada	10 g
Bacto ágar purificado da Difco (nº 0560)	15 g
Água destilada	1 litro

Esterilizar volumes de 1/2 litro de meio em autoclave a 115 °C durante 20 minutos.

Extracto de levedura e sais minerais (YGM)

Bacto extracto de levedura da Difco	2,0 g
D-glucose mono-hidratada	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
Bacto ágar purificado da Difco	18 g
Água destilada	1 l

Esterilizar volumes de 1/2 litro de meio em autoclave a 115 °C durante 20 minutos.

Apêndice 7

TESTES BIOQUÍMICOS DE FISIOLÓGICOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE *CLARIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUS*

Todos os meios devem ser incubados a 21 °C e examinados ao fim de seis dias. Se não houver crescimento, incubar pelo menos 20 dias.

— Teste da oxidação de fermentação (Hugh & Leifson, 1953) — Teste O/F

Meio base:

KCl	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
Bacto peptona da Difco	1,0 g
Bacto ágar purificado da Difco	3,0 g
D-glucose mono-hidratada	10,0 g
Azul de bromotimol	0,03 g
Água destilada	1 l

Misturar e ajustar o pH a 7,0–7,2 com KOH 1N.

Distribuir o meio em volumes de 5 ml e de 10 ml em tubos de ensaio de Pyrex de 16 x 100 mm (12 ml de capacidade).

Esterilizar em autoclave a 115 °C durante 10 minutos.

Inocular por picada tubos de 5 ml e de 10 ml para cada cultura. Adicionar assepticamente 1–2 ml de parafina líquida esterilizada aos tubos de 10 ml. Incubar.

Reacção positiva.

Tubo	Cor	Interpretação
Aerobiose Anaerobiose	Amarelo } Amarelo }	Fermentativa
Aerobiose Anaerobiose	Amarelo } Azul-esverdeado }	Oxidativa
Aerobiose Anaerobiose	Esverdeado } Azul-esverdeado }	Oxidativa ou inerte

— Teste da oxidase (Kovacs, 1956)

Reagente da oxidase de Kovacs:

Solução aquosa de dicloridreto de tetrametil-p-fenilenodiamina 1 % (BDH nº 30386) em água destilada.

Este reagente deve ser preparado em volumes de 1 ml para uso imediato ou pode ser guardado em frascos castanhos a 5 °C durante 1 a 4 semanas.

Colocar uma gota de reagente em papel de filtro numa caixa de Petri limpa. Imediatamente a seguir, com uma ansa de platina, pôr em contacto o crescimento bacteriano procedente de NA.

Reacção positiva: desenvolvimento de uma coloração púrpura em 10 segundos. As culturas com tempos de reacção de 10 a 30 segundos são fracamente positivas.

NB: É essencial utilizar uma ansa de platina e culturas em NA porque quaisquer vestígios de ferro ou um elevado teor de açúcar podem originar falsos resultados positivos.

— Produção de ácido a partir de lactose, ramnose, salicilina e glicerol

Preparar meio de Hugh & Leifson O/F sem glucose. Distribuir o meio em volumes de 5 ml em tubos de ensaio. Esterilizar em autoclave a 115 °C durante 10 minutos. Deixar arrefecer até 45 °C e adicionar assepticamente 0,5 ml de soluções aquosas a 10 % de glicerol, lactose, ramnose ou salicilina, esterilizadas por filtração. Misturar cuidadosamente.

Reacção positiva: a viragem do azul-esverdeado para o amarelo indica produção de ácido.

— Teste da catalase

Colocar uma gota de peróxido de hidrogénio (30 vol) numa lâmina limpa e emulsionar a cultura bacteriana com o auxílio de uma ansa de platina.

Reacção positiva: a produção de bolhas de oxigénio na gota indica a presença de catalase.

— Redução de nitratos e desnitrificação (Bradbury, 1970)

Meio de cultura:

KNO ₃ (sem nitritos)	1 g
Bacto extracto de levedura da Difco	1 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Água destilada	1 l

Distribuir o meio em volumes de 10 ml em frascos de 20 ml. Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Reagente A:

H ₂ SO ₄	8 g
Ácido acético 5N	1 l

Reagente B:

Naftilamina	5 g
Ácido acético 5N	1 l

Inocular em duplicado o meio de nitrato. Testar ao fim de 10 e de 20 dias adicionando 1 gota de solução de Lugol, 0,5 ml de reagente A e 0,5 ml de reagente B. Se o meio não ficar avermelhado, adicionar cerca de 50 mg de zinco em pó. Observar a cor da reacção.

Reacção positiva:

	Cor da reacção	
	Fase 1	Fase 2
Não redução dos nitratos	incolor	vermelho
Redução de nitratos a nitritos (só redução de nitratos)	vermelho	—
Redução de nitratos para além de nitritos (desnitrificação, nitrato e nitritos reduzidos)	incolor	incolor

— Produção de urease (Lelliott, 1966)

Meio base

Ágar base de ureia da Oxoid (CM53)	2,4 g
Água destilada	95 ml

Esterilizar em autoclave a 155 °C durante 20 minutos. Arrefecer o meio fundido até 50 °C e adicionar assepticamente 5 ml de solução aquosa de ureia 40 % (Oxoid SR20) esterilizada por filtração. Misturar bem.

Distribuir o meio em volumes de 6 ml em tubos esterilizados (16 × 100 mm) e deixar solidificar em plano ligeiramente inclinado.

Reacção positiva: o meio alaranjado passa a vermelho-cereja ou magenta-rosa se tiver havido produção de urease.

— Utilização de citrato (Christensen) (Skerman, 1967)

Meio:

Ágar base de citrato da Merck (Merck 2503)	23 g
Água destilada	1 l

Misturar e dissolver aquecendo. Distribuir o meio em volumes de 6 ml tal como para o meio com ureia. Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos e deixar solidificar em plano inclinado.

Reacção positiva: a utilização de citrato é indicada por uma mudança de cor do meio de laranja para vermelho.

— **Produção de sulfureto de hidrogénio** (Ramamurthi, 1959)**Meio:**

Bacto triptona da Difco (nº 0123)	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NaCl	5 g
Água destilada	1 l

Dissolver e distribuir o meio em volumes de 6 ml em tubos de 16 × 100 mm. Esterilizar em autoclave a 115 °C durante 10 minutos.

Após a inoculação, suspender assepticamente um papel de acetato de chumbo (Merck 9511) no tubo de ensaio e segurá-lo com a tampa. Incubar durante pelo menos 20 dias.

Reacção positiva: a produção de H₂S a partir de triptona é indicada pelo desenvolvimento de uma coloração preto-acastanhada no papel de ensaio.

— **Produção de indole** (Ramamurthi, 1959)**Meio:**

O meio base é o utilizado para o teste da produção de sulfureto de hidrogénio.

Retirar o papel de acetato de chumbo, adicionar 1-2 ml de éter dietílico e agitar suavemente. Deixar separar as duas camadas (5 minutos). Adicionar 0,5 ml de reagente de Kovacs (Merck 9293) cuidadosamente ao longo das paredes do tubo inclinado.

Reacção positiva: a presença de indole é indicada pelo desenvolvimento de uma coloração vermelha na zona amarela entre o éter e a fracção aquosa.

— **Crescimento a 37 °C** (Ramamurthi, 1959)**Meio:**

Bacto caldo nutritivo da Difco (nº 0003)	8 g
Água destilada	1 l

Misturar, dissolver e distribuir o meio em volumes de 6 ml por tubos de ensaio.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Inocular e incubar 37 °C.

Reacção positiva: existência de crescimento bacteriano.

— **Crescimento em NaCl a 7 %** (Ramamurthi, 1959)**Meio:**

Bacto caldo nutritivo da Difco	8g
NaCl	70 g
Água destilada	1 l

Misturar, dissolver e distribuir o meio em volumes de 6 ml por tubos de ensaio.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

— **Reacção positiva:** existência de crescimento bacteriano.— **Hidrólise da gelatina** (Lelliott, Billing & Hayward, 1996)**Meio:**

Bacto gelatino da Difco (nº 0143)	120 g
Água destilada	1 l

Misturar, dissolver e distribuir o meio em volumes de 6 ml por tubos de ensaio.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Reacção positiva: liquefacção da gelatina, mesmo depois de o tubo ter estado 30 minutos a 5 °C.

— Hidrólise do amido

Meio:

Bacto ágar nutritivo da Difco (liquefeito)	1 l
Bacto amido solúvel da Difco (nº 0178)	2 g

Misturar e esterilizar em autoclave a 115 °C durante 10 minutos.

Preparar placas e inoculá-las pontualmente.

Depois de um bom crescimento (10 a 20 dias) retirar parte da cultura e cobrir o meio com solução de Lugol.

Reacção positiva: a hidrólise do amido é indicada pelo aparecimento de zonas claras por baixo e à volta do crescimento bacteriano. O resto do meio cora de vermelho-púrpura.

— Hidrólise da esculina (Sneath & Collins, 1974)

Meio:

Bacto peptona da Difco	10 g
Esculina	1 g
Citrato férrico (Merck 3862)	0,05 g
Citrato de sódio	1 g
Água destilada	1 l

Misturar até dissolver e distribuir o meio em volumes de 6 ml por tubos. Esterilizar em autoclave a 115 °C durante 10 minutos

O meio é translúcido mas tem uma fluorescência azulada.

Reacção positiva: a hidrólise da esculina é indicada pelo desenvolvimento de uma coloração castanha com desaparecimento da fluorescência, o que pode ser observado utilizando uma lâmpada de ultravioleta.

REFERÊNCIAS

- 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 *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* 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 (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*) in potato. *EPPO Bull.*, nº 17, 1987, p.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 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 p.p.
- Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
- Sneath, P. H. A. and Collins, V. G., 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, 481-527.

ANEXO II

1. Para cada ocorrência suspeita relativamente à qual tenha sido realizado um teste de imunofluorescência com resultados positivos, de acordo com o método comunitário estabelecido no anexo I, e na pendência da confirmação ou refutação através do método referido, deve-se proceder à retenção e conservação adequada de:
 - todos os tubérculos ou plantas sujeitos a amostragem, quando possível, e
 - qualquer extracto que reste e das lâminas suplementares preparadas para imunofluorescência, até à conclusão das análises do método referido.
2. Em caso de confirmação da presença do organismo, deve-se proceder à retenção e à conservação adequada:
 - do material referido no nº 1,
 - de uma amostra conservada de material de beringela infectado, inoculado com o extracto do tubérculo ou da planta, e
 - da cultura pura do organismo,durante pelo menos um mês após a notificação nos termos do nº 2 do artigo 5º

ANEXO III

1. Os elementos a considerar de determinação da extensão da contaminação provável nos termos do nº 1, alínea b), do artigo 5º incluirão:
 - tubérculos ou plantas cultivadas no local de produção declarado contaminado nos termos do nº 1, alínea a), do artigo 5º,
 - local ou locais de produção ou instalações com alguma relação de produção com os tubérculos ou plantas declarados contaminados nos termos do nº 1, alínea a), do artigo 5º, incluindo aqueles que partilham equipamento e instalações de produção directamente ou através de um contratante comum,
 - tubérculos ou plantas produzidos no local ou locais de produção referido(s) no travessão anterior ou presentes nesse local de produção durante o período em que os tubérculos ou plantas declarados contaminados nos termos do nº 1, alínea a), do artigo 5º se encontravam nas instalações ou locais de produção referidos no primeiro travessão,
 - armazéns centrais que manuseiem batatas provenientes dos citados locais de produção,
 - toda a maquinaria, veículos, recipientes, armazéns, ou respectivas partes, e quaisquer outros objectos, incluindo o material de embalagem, que possam ter estado em contacto com tubérculos ou plantas declarados contaminados nos termos do nº 1, alínea a), do artigo 5º, nos doze meses anteriores ou no prazo apropriado,
 - todos os tubérculos ou plantas armazenados em, ou em contacto com, quaisquer estruturas ou objectos constantes do travessão anterior, antes da limpeza e desinfecção dessas estruturas ou objectos,
 - na sequência dos testes realizados nos termos do artigo 6º, os tubérculos ou plantas com a mesma origem clonal que os tubérculos ou plantas que possam ser declarados contaminados nos termos do nº 1, alínea a), do artigo 5º e sobre os quais investigações efectuadas indiquem a existência de probabilidade de contaminação.
2. Os elementos de determinação da possível propagação nos termos do nº 1, alínea c), do artigo 5º incluirão:
 - a proximidade de outros locais de produção de batatas ou de outras plantas-hospedeiras;
 - as existências de batata de semente que sejam comuns.
3. Os pormenores da notificação a que se refere o nº 2, primeiro parágrafo, do artigo 5º incluirão:
 - para qualquer remessa ou lote de batatas declarado contaminado, os certificados exigidos nos artigos 7º e 8º da Directiva 77/93/CEE, o passaporte ou número de registo, consoante o caso,
 - o nome da variedade das existências de batata de semente e, se possível, em todos os outros casos,
 - a descrição dos elementos relativos à declaração de contaminação e à demarcação da zona,
 - a disponibilidade de extracto, de lâminas preparadas para imunofluorescência, de material de beringelas infectadas e de uma cultura pura do organismo proveniente do teste que tenha confirmado a presença do organismo.

ANEXO IV

1. As medidas sob controlo oficial a que se refere o nº 1 do artigo 7º respeitantes ao escoamento dos tubérculos ou plantas declarados contaminados nos termos do nº 1, alínea a), do artigo 5º consistirão:
 - na utilização para transformação industrial através de entrega directa e imediata a uma unidade de transformação com meios adequados de eliminação de resíduos, relativamente aos quais se tenha concluído pela não existência de qualquer risco identificável de propagação do organismo, e com um sistema de desinfecção das zonas de armazenagem e dos veículos de transporte
 - ou
 - noutras medidas, desde que se tenha concluído que não existe qualquer risco identificável de propagação do organismo; essas medidas devem ser notificadas à Comissão e aos demais Estados-membros.
2. A adequada utilização ou eliminação de tubérculos ou plantas considerados provavelmente contaminados nos termos do nº 1, alínea b), do artigo 5º e a que se refere o nº 2 do artigo 7º, sob controlo dos organismos oficiais responsáveis dos Estados-membros, consistirão:
 - na utilização como batata de consumo, embalada para entrega e utilização directa, sem mudança de embalagem, e destinada a essa entrega e utilização directa
 - ou
 - na utilização como batata de consumo para transformação industrial e destinada a entrega directa e imediata a uma unidade de transformação com os meios adequados de eliminação de resíduos e desinfecção
 - ou
 - noutras utilizações ou destinos, desde que se tenha concluído que não apresentam qualquer risco identificado de propagação do organismo.
3. Os métodos adequados de limpeza e desinfecção dos objectos referidos no nº 3 do artigo 7º devem ser aqueles relativamente aos quais se concluiu que não existe qualquer risco identificável de propagação do organismo, devendo ser utilizados sob controlo dos organismos oficiais responsáveis dos Estados-membros.
4. A série de medidas a aplicar pelos Estados-membros na zona demarcada estabelecida nos termos do nº 1, alínea c), do artigo 5º e a que se refere o nº 4 do artigo 7º incluirá as seguintes acções:
 - 4.1. Nos locais de produção declarados contaminados nos termos do nº 1, alínea a), do artigo 5º, quer:
 - a) Num campo declarado contaminado nos termos do nº 1, alínea a), do artigo 5º:
 - i) — durante, pelo menos, os três anos de cultura seguintes ao da declaração de contaminação:
 - a adopção de medidas destinadas a eliminar as plantas de batata espontâneas e outras plantas hospedeiras naturais do organismo e
 - a proibição de plantar tubérculos, plantas ou sementes verdadeiras de batata, ou outras plantas que possam ser um hospedeiro natural do organismo, ou culturas relativamente às quais exista um risco identificado de sobrevivência ou de propagação do organismo, até que a parcela seja considerada isenta de plantas de tubérculos deixados no terreno (plantas espontâneas), durante pelo menos dois anos de cultura consecutivos,
 - no primeiro período de colheita de batata seguinte ao período especificado no travessão anterior, serão plantadas batatas de semente, oficialmente certificadas, apenas para produção de batata de consumo, e efectuada uma prospecção oficial, nos termos do nº 1 do artigo 2º,
 - na período de colheita de batata seguinte ao referido no travessão anterior e após um ciclo de rotação adequado, serão plantadas batatas de semente oficialmente certificadas, tanto para a produção de batata de semente como de batata de consumo, e efectuada uma prospecção oficial nos termos do nº 1 do artigo 2º da presente directiva,
 - quer:
 - ii) — durante os quatro anos de cultura seguintes ao da declaração de contaminação:
 - a adopção de medidas destinadas a eliminar as plantas de tubérculos deixados no terreno (plantas espontâneas) e outras plantas hospedeiras naturais do organismo e
 - a colocação e manutenção do campo em pousio ou em pastagem permanente com pastoreio intensivo ou com cortes curtos frequentes,
 - no primeiro período de colheita de batata seguinte ao período especificado no travessão anterior, serão plantadas batatas de semente oficialmente certificadas, tanto para produção de batata de semente como de batata de consumo, e efectuada uma prospecção oficial nos termos do nº 1 do artigo 2º;

b) Nos demais campos:

- durante o ano de cultura seguinte à declaração de contaminação:
 - não serão plantados tubérculos, plantas ou sementes verdadeiras nem qualquer outra planta que possa constituir um hospedeiro natural do organismo e serão adoptadas medidas destinadas a eliminar as plantas espontâneas de batata, consoante for adequado, ou
 - podem ser plantadas batatas de semente oficialmente certificadas, apenas para a produção de batata de consumo, desde que os organismos oficiais responsáveis obtenham a garantia de que foi eliminado o risco do aparacimento de plantas de batata espontâneas e outras plantas hospedeiras naturais do organismo,
 - durante pelo menos os dois anos de cultura seguintes àquele a que se refere o travessão anterior, será unicamente plantada batata de semente oficialmente certificada para a produção quer de batata de semente quer de batata de consumo,
 - durante cada um dos anos de cultura referidos nos travessões anteriores, serão tomadas medidas para eliminar as plantas de batata espontâneas e as plantas-hospedeiras naturais do organismo e efectuada uma prospecção oficial nos termos do nº 1 do artigo 2º,
 - sempre que sejam plantadas batatas de semente oficialmente certificadas para a produção de batata de consumo no ano de cultura seguinte ao da declaração de contaminação, a plantação será inspecionada em datas apropriadas e a existência do organismo será testada nas plantas de batata espontâneas;
- c) Imediatamente após a declaração de contaminação nos termos do nº 1, alínea a), do artigo 5º e durante todos os anos de cultura seguintes à primeira colheita admissível de batata no campo declarado contaminado, como especificado na alínea a), toda a maquinaria e instalações de armazenagem existentes no local de produção e ligadas à produção de batata serão limpas e desinfectadas, de modo adequado e utilizando métodos apropriados, nos termos do ponto 3;
- d) Nos sistemas de produção em que seja possível a substituição completa do meio de cultura:
- não serão plantados tubérculos, plantas ou sementes verdadeiras, a não ser que a unidade de produção tenha sido sujeita a medidas oficialmente controladas destinadas a eliminar o organismo e a retirar quaisquer batatas ou outro material de Solanáceas, incluindo, pelo menos, uma mudança completa do meio de cultura e a limpeza e desinfectação da unidade de produção e de todo o equipamento, e, em seguida, que os organismos oficiais responsáveis tenham concedido a aprovação para a produção de batata, e
 - a produção de batata será realizada a partir de batata de semente oficialmente certificada ou de microtubérculos ou de microplântulas provenientes de fontes testadas.

4.2. Na zona demarcada, sem prejuízo das medidas a que se refere o ponto 4.1, os Estados-membros:

- a) Imediatamente após a declaração de contaminação e durante pelo menos três anos de cultura:
- controlarão, através dos organismos oficiais responsáveis, as explorações que cultivem, armazenem ou manuseiem tubérculos de batata, assim como as explorações que utilizem para o efeito maquinaria em regime de contratação,
 - exigirão a limpeza e desinfectação da maquinaria e dos armazéns das referidas instalações, consoante for apropriado, utilizando métodos adequados, tal como disposto no ponto 3,
 - exigirão que, em todas as culturas de batata dessa zona, seja exclusivamente utilizada batata de semente certificada,
 - exigirão que as existências de batata de semente e de batata de consumo colhidas na zona sejam manuseadas separadamente,
 - realizarão uma prospecção oficial nos termos do nº 1 do artigo 2º;
- b) Estabelecerão, quando adequado, um programa de substituição de todas as existências de batata de semente durante um período de tempo adequado.

As medidas aplicadas nos termos do ponto 4.2 e os números de registo dos produtores, armazéns colectivos e centros de distribuição da zona demarcada serão notificados anualmente aos demais Estados-membros e à Comissão.