

CLASSIFICACAO		RUBRICAS	EM CONTOS		REFERENCIA
ORGANICA	ECONOMICA		REFORÇOS OU INSCRICOES	ANULACOES	A AUTORIZAC. MINIS- TERIAL
CP*DI*SD	*FUNC. *CODIGO *A				
04	04	DIRECCAO-GERAL DOS SERVICOS TUTELARES DE MENORES			
	01	SERVICOS CENTRAIS			
	02.00.00	AQUISICAO DE BENS E SERVICOS CORRENTES			
	02.01.00	BENS DURADOUROS			
	1.03.0 02.01.04	MATERIAL DE CULTURA	-		25*
	02.02.00	BENS NAO DURADOUROS			
	1.03.0 02.02.05	ROUPAS E CALCAD	-		36*
	1.03.0 02.02.06	CONSUMOS DE SECRETARIA		239*	
	1.03.0 02.02.08	OUTROS BENS NAO DURADOUROS		100*	
	02.03.00	AQUISICAO DE SERVICOS			
	1.03.0 02.03.01	ENCARGOS DAS INSTALACOES	-		2*
	1.03.0 02.03.02	CONSERVACAO DE BENS	-		111*
	1.03.0 02.03.06	COMUNICACOES		4*	
	1.03.0 02.03.07	TRANSPORTES	-		47*
	1.03.0 02.03.08	REPRESENTACAO DOS SERVICOS	-		37*
	1.03.0 02.03.10	OUTROS SERVICOS	-		85*
	07.00.00	AQUISICAO DE BENS DE CAPITAL			
	07.01.00	INVESTIMENTOS			
	1.03.0 07.01.07	MATERIAL DE INFORMATICA	-		45*
	1.03.0 07.01.08	MAQUINARIA E EQUIPAMENTO		45*	
	02	QUADRO UNICO DOS SERVICOS EXTERNOS			
	01.00.00	DESPESAS COM O PESSOAL			
	01.02.00	ABONOS VARIAVEIS OU EVENTUAIS			
	1.03.0 01.02.02	MORAS EXTRAORDINARIAS		1 950*	
	01.02.05	OUTROS ABONOS EM NUMERARIO OU ESPECIE			
	1.03.0	A OUTROS ABONOS		200*	
	1.03.0	X ADICIONAL A REMUNERACAO			1 200*
	01.03.00	SEGURANCA SOCIAL			
	1.03.0 01.03.03	PRESTACOES COMPLEMENTARES	-		350*
	02.00.00	AQUISICAO DE BENS E SERVICOS CORRENTES			
	02.03.00	AQUISICAO DE SERVICOS			
	1.03.0 02.03.07	TRANSPORTES	-		400*
	1.03.0 02.03.10	OUTROS SERVICOS	-		200*
	05	GABINETE DE PLANEAMENTO E DE COORDENACAO DO COMBATE A DROGA			
	02.00.00	AQUISICAO DE BENS E SERVICOS CORRENTES			
	02.03.00	AQUISICAO DE SERVICOS			
	1.03.0 02.03.07	TRANSPORTES		350*	
	04.00.00	TRANSFERENCIAS CORRENTES			
	04.02.00	ADMINISTRACOES PRIVADAS			
	1.03.0 04.02.01	INSTITUICOES PARTICULARES	-		350*
TOTAL DO CAPITULO 04			20 458*	20 458*	
TOTAL DO MINISTERIO			28 451*	28 451*	

5.ª Delegação da Direcção-Geral da Contabilidade Pública, 13 de Dezembro de 1994. — A Directora, *Maria Evangelina Morais*.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA

Portaria n.º 140/95

de 9 de Fevereiro

A doença provocada pelo agente patogénico *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckerman *et* Kottoff) Davis *et al.*, vulgarmente designada por podridão anelar da batata, é um

factor de redução da produção da cultura da batateira e representa um risco para esta cultura não só no nosso país como também em todo o território comunitário, se não forem tomadas medidas de protecção eficazes.

A necessidade de se proceder à transposição da Directiva do Conselho n.º 93/85/CEE, de 4 de Outubro, cujo conteúdo passa a ser direito interno através da presente portaria, e que exactamente diz respeito a esta luta, insere-se entre as medidas mínimas a adoptar pelos diversos Estados membros neste domínio.

Assim:

Manda o Governo, pelo Ministro da Agricultura, ao abrigo do disposto no n.º 1 do artigo 1.º do Decreto-Lei n.º 154/94, de 28 de Maio, o seguinte:

1.º A presente portaria diz respeito às medidas a adoptar tendo em vista não só a redução dos riscos de introdução do agente patogénico *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckerman *et* Kottoff) Davis *et al.*, causador da podridão anelar da batata, como também a evitar a sua propagação e a proceder à sua eventual erradicação no caso de a mesma vir a ser detectada no País.

2.º Qualquer pessoa que suspeite da presença da doença da podridão anelar da batata, quer durante a fase de produção da cultura, quer durante o armazenamento ou comercialização da batata, deve de imediato informar o serviço oficial de protecção das culturas da direcção regional de agricultura onde tal facto ocorra.

3.º Para cada ocorrência suspeita da doença, e na dependência da confirmação ou refutação da mesma através da realização de testes laboratoriais oficiais ou oficialmente controlados, utilizando o método previsto no anexo I à presente portaria, e de acordo com as condições definidas no n.º 1 do anexo II, fica interdita a circulação de todos os lotes ou remessas das quais tenham sido colhidas amostras.

4.º Confirmada a presença do organismo prejudicial numa amostra de tubérculos, plantas ou partes de plantas, através do método previsto no número anterior, é aplicável o disposto no n.º 2 do anexo II à presente portaria.

5.º Face à confirmação da presença do organismo nos termos do n.º 3.º, serão declarados contaminados os tubérculos ou plantas, as remessas e ou lotes, a maquinaria, os veículos, os navios, os armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo o material de embalagem em que tiver sido colhida a amostra e, quando adequado, ainda o local ou locais de produção e o campo ou campos onde tiverem sido colhidos os tubérculos ou plantas.

6.º Tendo em atenção o disposto no n.º 1 do anexo III à presente portaria, será ainda determinada a extensão da contaminação provável por contacto pré ou pós-colheita, ou por relação de produção com a contaminação que tiver sido declarada nos termos do número anterior.

7.º Com base na declaração de contaminação e na determinação da contaminação provável a que se referem os n.ºs 4.º e 5.º, deverá ser demarcada uma zona contaminada tendo em vista impedir a possível propagação do organismo prejudicial, que será determinada tendo em conta o disposto no n.º 2 do anexo III à presente portaria.

8.º Sempre que tenha sido emitida uma declaração de contaminação nos termos do n.º 5.º, deverão ser realizados testes nas existências de batata com uma relação clonal com a batata contaminada, determinando-se a provável fonte primária de infecção e a extensão da contaminação provável, de preferência por ordem do grau de risco, procedendo-se se necessário a novas declarações de contaminação, com as correspondentes determinação de contaminação provável e demarcação de zona contaminada.

9.º Logo que seja conhecida a extensão da contaminação declarada com base no disposto nos números

anteriores, será ordenada a destruição, sob controlo oficial, dos tubérculos ou dos vegetais declarados contaminados.

10.º Caso se tenha concluído não existir qualquer risco identificável de propagação do organismo prejudicial, poderão os tubérculos ou vegetais declarados contaminados ser eliminados de acordo com o estabelecido no n.º 1 do anexo IV à presente portaria.

11.º Os tubérculos ou plantas considerados provavelmente contaminados nos termos do n.º 6.º da presente portaria não poderão ser plantados e, sem prejuízo dos resultados dos testes referidos no n.º 8.º, só podem ser utilizados ou eliminados conforme especificado no n.º 2 do anexo IV, em condições que garantam a inexistência de qualquer risco identificável de propagação do organismo.

12.º Toda a maquinaria, veículos, navios, armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo o material de embalagem que tenham sido declarados contaminados ou considerados provavelmente contaminados nos termos do disposto nos n.ºs 5.º e 6.º da presente portaria, serão destruídos ou limpos e desinfectados, de acordo com o n.º 3 do anexo IV.

13.º Sem prejuízo das medidas aplicadas nos termos dos números anteriores, nas zonas que tenham sido oficialmente demarcadas como contaminadas serão adoptadas as medidas especificadas no n.º 4 do anexo IV da presente portaria.

14.º É proibida a plantação de qualquer material vegetal suspeito de contaminação ou declarado contaminado, a menos que seja concedida pelo Instituto de Protecção da Produção Agro-Alimentar (IPPAA) uma autorização oficial específica para o efeito, tendo em conta destinar-se a fins experimentais ou científicos e para trabalho de selecção varietal.

15.º Só é permitida a plantação de batata-semente desde que:

- a) Sejam satisfeitas as exigências estabelecidas na Portaria n.º 344/94, de 1 de Junho;
- b) O material vegetal seja proveniente, em linha directa, de material obtido no âmbito de um programa de certificação oficialmente aprovado e que tenha sido declarado isento em testes oficiais ou controlados oficialmente, utilizando o método previsto no anexo I.

16.º Os testes referidos no número anterior devem ser realizados:

- a) Quando a contaminação afectar a produção de batata-semente, dos vegetais da selecção clonal inicial;
- b) Nos restantes casos, tanto nas plantas da selecção clonal inicial como em amostras representativas da batata-semente de base ou de material de multiplicação anterior.

17.º Os serviços responsáveis pela protecção das culturas das direcções regionais de agricultura, deverão notificar o IPPAA de qualquer suspeita da presença da doença, bem como das acções levadas a efeito em cumprimento do disposto na presente portaria.

18.º Com base nas disposições da Directiva do Conselho n.º 93/85/CEE, de 4 de Outubro, e tendo em vista a aplicação das necessárias medidas de protecção fitossanitária, será criado a nível oficial um programa

de acção que permita a caracterização da situação da doença no País.

Ministério da Agricultura.

Assinada em 16 de Janeiro de 1995.

Pelo Ministro da Agricultura, *Álvaro dos Santos Amaro*, Secretário de Estado da Agricultura.

ANEXO I

Método de detecção e diagnóstico da bactéria da podridão anelar, *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kottoff), 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 desinfectado 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 vinte e quatro horas (v. n.º 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 n.ºs 1 e 2). Deve evitar-se uma maceração excessiva.

3.2 — Extrair as bactérias do homogenizado por um dos seguintes métodos (1):

A)

- Centrifugar durante dez minutos a 180 G no máximo.
- Centrifugar o sobrenadante durante dez minutos a 4000 G no mínimo. Decantar e desprezar o sobrenadante.

B)

- Deixar depositar o macerado durante trinta minutos. Decantar o sobrenadante sem levantar o *pellet*.
- Filtrar sob vácuo o sobrenadante através de papel de filtro (Whatman n.º 1) colocado num filtro de vidro poroso (n.º 2 = $40\ \mu\text{m}$ - $100\ \mu\text{m}$). Recolher o filtrado num tubo de centrífuga. Lavar o filtro com PBS esterilizado até um volume máximo de filtrado de 35 ml.
- Centrifugar o filtrado durante vinte minutos a 4000 G no mínimo.

3.3 — Suspender o *pellet* em PBS 0,01 M pH 7,2 (apêndice n.º 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.

3.4 — É indispensável que todos os controlos e amostras positivos de *Clavibacter 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* (n.º 5.2.1) e para quaisquer porções de tubérculos cortados (n.º 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 *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* e, se possível, de tecidos naturalmente infectados (n.º 5.1).

4.3 — Determinar quais as amostras que contêm células corineformes típicas Gram positivas. Em geral as células de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* têm $0,8\ \mu\text{m}$ - $1,2\ \mu\text{m}$ de comprimento e $0,4\ \mu\text{m}$ - $0,6\ \mu\text{m}$ de largura.

No apêndice n.º 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 *Clavibacter 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 *Clavibacter 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 anticorpo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) se combina de forma não específica com células bacterianas. Deve ser utilizado *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* ATCC 33113 (NCPPB 2137) ou 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 (v. 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 (v. figura 2).

5.2.2 — Pipetar um volume fixo suficiente para cobrir o poço (cerca de $25\ \mu\text{l}$) de cada diluição do *pellet* ou da suspensão de *Clavibacter 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

Lâmina com a amostra e com o controlo de PBS

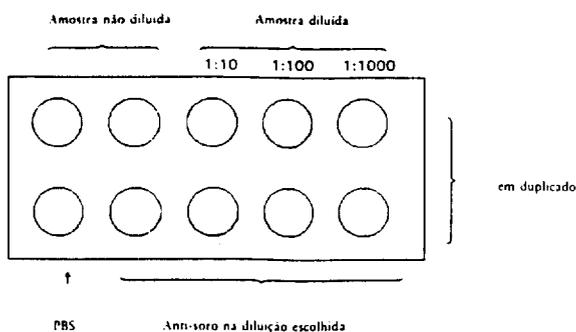
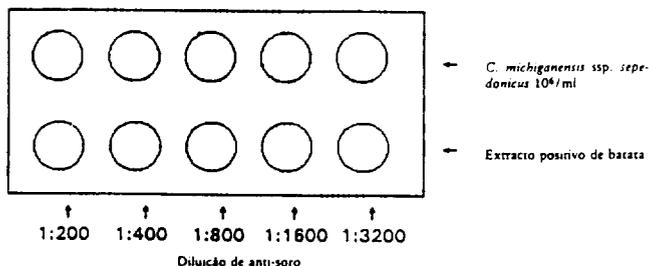


FIGURA 2

Lâmina de controlo positivo



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

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

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 *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* nas diluições recomendadas, em PBS 0,01M pH 7,2 (apêndice n.º 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 trinta minutos.

5.2.6 — Lavar cuidadosamente com PBS 0,01M pH 7,2 durante cinco 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 utilizada para determinar o título, e incubar numa câmara húmida, no escuro, à temperatura ambiente, durante trinta minutos.

5.2.9 — Lavar como no n.º 5.2.6.

5.2.10 — Juntar cerca de 5-10µl 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 n.º 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 400 vezes e 1000 vezes. Observar os poços em duplicado segundo dois diâmetros perpendiculares e ao longo do 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, calcular o número de células/ml de *pellet* não diluído (v. apêndice n.º 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 *Clavibacter 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, v. apêndice n.º 5.

6.1 — Distribuir o *pellet* do n.º 3.3 por 25 beringelas, no mínimo, no estágio de três folhas (apêndice n.º 5) através de um dos métodos adiante indicados (n.ºs 6.2, 6.3 ou 6.4).

6.2 — Inoculação por fenda I:

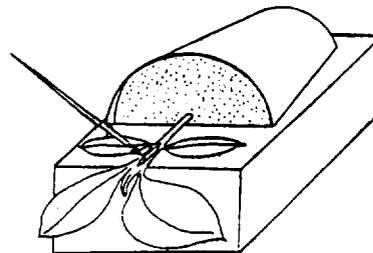
6.2.1 — Colocar cada vaso na posição horizontal [um bloco de poliuretano com um buraco de 5 cm de profundidade × 10 cm de largura × 15 cm de comprimento (figura 3) convém para um vaso de 10 cm]. Deve colocar-se uma tira de papel de alumínio esterilizado entre o caule e o bloco para cada uma das amostras a testar. Segurar 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 cm-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 inoculo 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 5µl-10µl) 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 dois terços 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 *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* e, se possível, com tecido tubercular infectado naturalmente (n.º 5.1) segundo o mesmo método de inoculação (n.ºs 6.2, 6.3 ou 6.4).

6.6 — Inocular 25 plantas com PBS 0,05M esterilizado, segundo o mesmo método de inoculação (n.ºs 6.2, 6.3 ou 6.4).

6.7 — Incubar as plantas nas condições adequadas (apêndice n.º 5) durante 40 dias. Ao fim de oito dias, examinar regularmente para detectar quaisquer sintomas. Contar o número de plantas que apresentem sintomas. *Clavibacter 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 *Clavibacter 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 *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* porque as folhas inteiras, ou a planta inteira, murcham rapidamente.

6.8 — Preparar esfregaços para coloração Gram (n.º 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 (n.º 7). Desinfetar 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 ótimas, é possível que *Clavibacter 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 (n.º 4) e para o teste IF (n.º 5).

6.9.4 — Utilizar a outra metade para realizar o teste da beringela (n.º 6) se a coloração Gram e ou o teste IF forem positivos. Fazer controlos com uma cultura conhecida de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* e com PBS 0,05 M esterilizado. Se não se observarem sintomas no teste seguinte, a amostra deve ser considerada negativa.

7 — Isolamento de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*: O diagnóstico só pode ser confirmado com o isolamento e identificação de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (n.º 8). Embora *Clavibacter 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 (n.º 3.3). As beringelas constituem um excelente meio selectivo para o crescimento de *Clavibacter 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 (n.º 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 n.º 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.

Clavibacter michiganensis ssp. *sepedonicus* cresce devagar e produz normalmente em 10 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 fluído, com margens inteiras e, normalmente, com 1 mm 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 *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, o qual deve ser identificado através dos seguintes testes:

- Teste IF (n.º 5.1);
- Teste da beringela;
- Testes bioquímicos e fisiológicos (apêndice n.º 7):
 - Teste de oxidação/fermentação (O/F);
 - Crescimento a 37°C;
 - Produção de urease;
 - Hidrólise de esculina;
 - Hidrólise do amido;
 - Tolerância de uma solução de NaCl a 7%;
 - Teste do indol;
 - Teste da catalase;
 - Produção do H₂S;
 - Utilização de citrato;
 - Hidrólise da gelatina;
 - Produção de ácido a partir de glicerol, lactose, rarnose e salicilina;
 - Coloração Gram.

Todos os testes devem incluir um controlo com uma estirpe conhecida de *Clavibacter 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 *Clavibacter 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 *Clavibacter 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 n.º 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>Clavibacter 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 indol	-
Utilização de citrato	-
Hidrólise do amido	- ou fraca
Crescimento a 37°C	-
Crescimento em NaCl a 7%	-
Hidrólise de gelatina	-
Hidrólise de esculina	+
Produção de ácido a partir de:	
— Glicerol	-
— Lactose	- ou fraca
— Rarnose	-
— Salicina	-

APÊNDICE N.º 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 n.º 2): 1 l.

APÊNDICE N.º 2

Tampões

Tampão fosfato (PBS) 0,05 M pH 7,0

Este tampão pode ser utilizado na maceração dos cones (n.º 2.1).

Na₂HPO₄: 4,26 g.
KH₂PO₄: 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.

Na₂HPO₄. 12H₂O: 2,7 g.
NaH₂PO₄. 2H₂O: 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.

Na₂HPO₄. 12H₂O: 3,2 g.
NaH₂PO₄. 2H₂O: 0,15 g.
Glicerol: 50 ml.
Água destilada: 100 ml.

APÊNDICE N.º 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 trinta segundos.
- 7 — Lavar em água corrente e secar com papel absorvente.
- 8 — Cobrir com solução de safranina durante dez 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 N.º 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:

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

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 vezes, 40 vezes, etc.)

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

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

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;

F = factor de diluição do pellet.

APÊNDICE N.º 5**Cultura de beringela**Semear beringelas (*Solanum melongena* da variedade Black Beauty) em tabuleiros com substracto esterilizado. O transplante das plântu-

las 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 duas delas mas não as três completamente expandidas.

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

Fotoperíodo: mínimo de catorze horas;

Temperatura:

Diurna: 21°C-24°C;

Nocturna: 15°C.

N.B.: *Clavibacter 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 Hammenhögs Frö, 270 50 Hammenhög, 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 Eschwegw.

APÊNDICE N.º 6**Meios de cultura utilizados para isolamento e crescimento de *Clavibacter 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 vinte minutos.

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

Bacto extracto de levedura da Difco (n.º 0127): 5 g.

Bacto peptona da Difco (n.º 0118): 5 g.

D-glucose mono-hidratada: 10 g.

Bacto ágar purificado da Difco (n.º 0560): 15 g.

Água destilada: 1 l.

Esterilizar volumes de ½ litro de meio em autoclave a 155°C durante vinte 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_2HPO_4 : 0,25 g. KH_2PO_4 : 0,25 g. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,1 g. $MnSO_4 \cdot H_2O$: 0,015 g.

NaCl: 0,05 g.

 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,005 g.

Bacto ágar purificado da Difco: 18 g.

Água destilada: 1 l.

Esterilizar volumes de ½ litro de meio em autoclave a 115°C durante vinte minutos.

APÊNDICE N.º 7**Testes bioquímicos e fisiológicos para a identificação de *Clavibacter 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 de oxidação de fermentação (Hugh & Lelison, 1963) — Teste O/F

Meio base:

KCl: 0,2 g.

 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,2 g. $NH_4H_2PO_4$: 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 mm x 100 mm (12 ml de capacidade).

Esterilizar em autoclave a 115°C durante dez minutos.

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

Reacção positiva.

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

Teste da oxidase (Kovacs, 1956)

Reagente da oxidase de Kovacs:

Solução aquosa de dicloridreto de tetrametil-p-fenilenodiamina 1% (BDH n.º 30 386) 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 uma a quatro 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 dez segundos. As culturas com tempos de reacção de dez a trinta segundos são fracamente positivas.

N. B.: É essencial utilizar uma ansa de plantina 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, ramosa, salicilina e glicérol

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 dez minutos. Deixar arrefecer até 45°C e adicionar assepticamente 0,5 ml de soluções aquosas a 10% de glicérol, lactose, ramnose ou salicilina, esterilizadas por filtração. Misturar cuidadosamente.

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

Teste de catalase

Colocar uma gota de peróxido de hidrogénio (30 vol) numa lâmina limpa e emulsionar a cultura bacteriana com 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:

KNO₃ (sem nitritos): 1 g.
 Bacto extracto de levedura da Difco: 1 g.
 K₂HPO₄: 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:

H₂SO₄: 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.

	Cor da reacção	
	Fase 1	Fase 2
<i>Reacção positiva:</i>		
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 (Lellott, 1966)

Meio base:

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

Esterilizar em autoclave a 155°C durante vinte 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 mm x 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) (Skorpan, 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 quinze 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 (n.º 0123): 10 g.
 K₂HPO₄: 1 g.
 NaCl: 5 g.
 Água destilada: 1 l.

Dissolver e distribuir o meio em volumes de 6 ml em tubos de 16 mm x 100 mm. Esterilizar em autoclave a 115°C durante dez 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 pelos 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 indol (Ramamurthi, 1958)

Meio:

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

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

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

Crescimento a 37°C (Ramamurthi, 1968)

Meio:

Bacto caldo nutritivo da Difco (n.º 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 quinze minutos.

Inocular e incubar 37°C.

Reacção positiva: existência de crescimento bacteriano.

Crescimento em NaCl a 7% (Ramamurthi, 1968)

Meio:

Bacto caldo nutritivo da Difco: 8 g.
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 quinze minutos.

Reacção positiva: existência de crescimento bacteriano.

Hidrólise da gelatina (Lelliott, Billing & Hayward, 1966)

Meio:

Bacto gelatino da Difco (n.º 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 quinze minutos.

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

Hidrólise do amido

Meio:

Bacto ágar nutritivo da Difco (liquefeito): 1 l.
Bacto amido solúvel da Difco (n.º 0178): 2 g.

Misturar e esterilizar em autoclave a 115°C durante dez 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 dez 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.*, n.º 17, 1987, pp. 1-10.
- KOVACS, N., 1956: «Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction», *Nature*, Lond., 178, 703.
- LELLIOTT, R. A., 1966: «The plant pathogenic coryneform bacteria», *J. appl. Bact.*, 29, 114-118.
- LELLIOTT, R. A., BILLING, E., and HAYWARD, A. C., 1966: «A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads», *J. appl. Bact.*, 29, 470-489.
- LELLIOTT, R. A., and SELLAR, P. W., 1976: «The detection of latent ring rot [*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et 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.
- SKERMAN, V. B. D., 1967: *A guide to the identification of the genera of bacteria*, 2.ª 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 n.º 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 n.º 2 do artigo 5.º

ANEXO III

1 — Os elementos a considerar de determinação da extensão da contaminação provável nos termos do n.º 1, alínea b), do artigo 5.º incluirão:

- Tubérculos ou plantas cultivadas no local de produção declarado contaminado nos termos do n.º 1, alínea a), do artigo 5.º;
- Local ou locais de produção ou instalações com alguma relação de produção com os tubérculos ou plantas declarados contaminados nos termos do n.º 1, alínea a), do artigo 5.º, 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 n.º 1, alínea a), do artigo 5.º 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 n.º 1, alínea a), do artigo 5.º, nos 12 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 6.º, os tubérculos ou plantas com a mesma origem clonal que os tubérculos ou plantas que possam ser declarados contaminados nos termos do n.º 1, alínea a), do artigo 5.º e sobre os quais investigações efectuadas indiquem a existência de probabilidade de contaminação.

2 — Os elementos de determinação da possível propagação nos termos do n.º 1, alínea c), do artigo 5.º 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 n.º 2, primeiro parágrafo, do artigo 5.º incluirão:

- Para qualquer remessa ou lote de batatas declarado contaminado, os certificados exigidos nos artigos 7.º e 8.º da Directiva n.º 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 n.º 1 do artigo 7.º respeitantes ao escoamento dos tubérculos ou plantas declarados contaminados nos termos do n.º 1, alínea a), do artigo 5.º 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 desinfeção das zonas de armazenagem e de 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 n.º 1, alínea b), do artigo 5.º e a que se refere o n.º 2 do artigo 7.º, 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 desinfeção; 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 desinfeção dos objectos referidos no n.º 3 do artigo 7.º 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 n.º 1, alínea c), do artigo 5.º e a que se refere o n.º 4 do artigo 7.º incluirá as seguintes acções:

4.1 — Nos locais de produção declarados contaminados nos termos do n.º 1, alínea a), do artigo 5.º, quer:

- a) Num campo declarado contaminado nos termos do n.º 1, alínea a), do artigo 5.º:

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 prospeção oficial, nos termos do n.º 1 do artigo 2.º;
- No 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 prospeção oficial nos termos do n.º 1 do artigo 2.º 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 prospeção oficial nos termos do n.º 1 do artigo 2.º;

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 aparecimento 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 prospeção oficial nos termos do n.º 1 do artigo 2.º;
 - 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 n.º 1, alínea a), do artigo 5.º 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 n.º 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 te-

nha 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 desinfecção 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 n.º 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 desinfecção da maquinaria e dos armazéns das referidas instalações, consoante for apropriado, utilizando métodos adequados, tal como disposto no n.º 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 prospeção oficial nos termos do n.º 1 do artigo 2.º;

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 n.º 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.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Portaria n.º 141/95

de 9 de Fevereiro

A requerimento da COFAC — Cooperativa de Formação e Animação Cultural, C. R. L., entidade titular do Instituto Superior de Matemática e Gestão — ISMAG, em Lisboa, reconhecido como estabelecimento de ensino superior através da Portaria n.º 808/89, de 12 de Setembro;

Instruído e organizado o respectivo processo em conformidade com o preceituado no n.º 1 do artigo 57.º e n.ºs 1 e 2 do artigo 59.º do Estatuto do Ensino Superior Particular e Cooperativo, aprovado pelo Decreto-Lei n.º 16/94, de 22 de Janeiro;

Tendo em consideração os critérios estipulados para a apreciação dos pedidos de funcionamento de cursos conferentes de grau de licenciado;

Em cumprimento do disposto no n.º 2 do artigo 30.º do Estatuto acima referido;

Ao abrigo do n.º 2 do artigo 2.º do Decreto-Lei n.º 16/94, de 22 de Janeiro, e nos termos do artigo 64.º do Estatuto aprovado pelo mesmo diploma:

Manda o Governo, pela Ministra da Educação, o seguinte:

1.º É autorizado o funcionamento do curso de Ciências da Comunicação e da Cultura (ramos: Comunica-

ção; Animação e Gestão Cultural) no Instituto Superior de Matemática e Gestão — ISMAG, em Lisboa, nas instalações sitas na Colina do Sol (Alfornelos).

2.º É aprovado o plano de estudos do curso referido no número anterior, conforme anexo à presente portaria.

3.º É reconhecido o grau de licenciado pela conclusão do curso autorizado pelo presente diploma.

4.º O acesso ao curso de Ciências da Comunicação e da Cultura ministrado no ISMAG, em Lisboa, está sujeito às condições legalmente fixadas para o ensino superior, sem prejuízo dos requisitos específicos estabelecidos no regulamento interno do estabelecimento de ensino.

5.º Para o ano lectivo de 1994-1995 é fixado em 100 o número de vagas para a matrícula e inscrição no curso a que se refere a presente portaria.

6.º A autorização e reconhecimento estabelecidos neste diploma não prejudicam, sob pena de revogação, a obrigação do cumprimento de eventuais adaptações ou correcções que sejam determinadas pelo Ministério da Educação, quer em resultado da análise que fundamentou a presente portaria, quer no âmbito das acções previstas no artigo 75.º do Estatuto do Ensino Superior Particular e Cooperativo, aprovado pelo Decreto-Lei n.º 16/94, de 22 de Janeiro.

Ministério da Educação.

Assinada em 6 de Janeiro de 1995.

Pela Ministra da Educação, *Pedro Lynce de Faria*, Secretário de Estado do Ensino Superior.

ANEXO

Curso de Ciências da Comunicação e da Cultura (ramos: Comunicação; Animação e Gestão Cultural)

Nome da disciplina	Tipo	Carga horária semanal	
		Aulas teóricas	Aulas práticas
1.º ano			
1.º semestre			
Teorias Sociais para a Comunicação	Semestral	3	—
História dos Meios de Comunicação	Semestral	3	—
Teorias da Comunicação	Semestral	3	—
Semiologia Geral	Semestral	3	—
Matemática e Estatística para a Comunicação	Semestral	1,5	3
2.º semestre			
Modelos de Comunicação	Semestral	3	—
Comunicação Interpessoal	Semestral	3	—
Introdução ao Pensamento Contemporâneo	Semestral	3	—
Técnicas de Expressão Escrita Informática	Semestral	1,5	3
2.º ano			
1.º semestre			
Arte, Cultura e Comunicação	Semestral	3	—
Direito e Deontologia da Comunicação Social	Semestral	3	—
Metodologias de Análise do Texto	Semestral	1,5	3