

393L0085

18.10.93

EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI

N:o L 259/1

NEUVOSTON DIREKTIIVI 93/85/ETY,

annettu 4 päivänä lokakuuta 1993,

perunan vaalean rengasmädän torjunnasta

EUROOPAN YHTEISÖJEN NEUVOSTO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamis-
sopimuksen, ja erityisesti sen 43 artiklan,

ottaa huomioon komission ehdotuksen⁽¹⁾,

ottaa huomioon Euroopan parlamentin lausunnon⁽²⁾,

ottaa huomioon talous- ja sosiaalikomitean lausunnon⁽³⁾,

sekä katsoo, että

perunantuotannolla on tärkeä asema yhteisön maataloudessa; haitalliset organismit uhkaavat tuotosta jatkuvasti,

perunanviljelyn suojaaminen näiltä haitallisilta organismeilta mahdollistaa paitsi tuotostason ylläpitämisen myös maatalouden tuottavuuden kasvun,

suojoitimenpiteillä haitallisten organismien jonkin jäsen-
valtion alueelle kulkeutumisen estämiseksi olisi ainoastaan rajoitettu vaikutus, ellei näitä organismeja samanaikaisesti ja järjestelmällisesti torjuttaisi koko yhteisössä ja niiden leviämistä estettäisi tarvittavin toimenpitein,

yksi perunan haitallisista organismeista on *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., perunan vaalean rengasmädän aiheuttaja; tätä tautia on tavattu tietyissä yhteisön osissa, ja joitakin rajoitettuja tartuntalähteitä on vielä olemassa,

perunanviljely koko yhteisössä on suuresti uhattuna, ellei toteuteta tehokkaita toimenpiteitä tämän taudin paikallistamiseksi ja levinneisyyden määrittämiseksi, sen esiintymisen ja leviämisen estämiseksi, ja jos tautia löydetään, sen leviämisen estämiseksi, torjumiseksi ja hävittämiseksi,

tietyjä toimenpiteitä on toteutettava yhteisössä tämän tavoitteen saavuttamiseksi; jäsenvaltioiden on lisäksi voitava toteuttaa lisätoimenpiteitä tai tiukempia toimenpiteitä, jos ne ovat tarpeen eivätkä aiheuta esteitä perunoiden liikkumiselle yhteisössä, jollei kasvien tai kasvituotteiden haitallisten organismien yhteisöön kulkeutumisen ja yhteisössä leviämisen estämiseen liittyvistä suojoitimenpiteistä 21 päivänä joulukuuta 1976 annetussa neuvoston direktiivissä

77/93/ETY⁽⁴⁾ toisin säädetä; nämä toimenpiteet on ilmoitettava muille jäsenvaltioille ja komissiolle,

perunan vaalean rengasmädän torjunnasta 24 päivänä kesäkuuta 1980 annetussa neuvoston direktiivissä 80/665/ETY⁽⁵⁾ säädetään jäsenvaltioiden vähimmäistoimenpiteiden toteuttamisesta perunan vaalean rengasmädän torjumiseksi,

tämän jälkeen perunan vaalea rengasmätä -taudin ja -taudinaiheuttajan tuntemus on huomattavasti lisääntynyt,

yhteisön kasvinsuojelujärjestelmän soveltaminen yhteisössä, joka on alue ilman sisärajoja, edellyttää direktiivin 80/665/ETY tiettyjen säännösten käsittelyä uudelleen ja muuttamista,

Tämä uudelleen käsittely on osoittanut, että direktiivin 80/665/ETY säännökset ovat riittämättömät ja on tarpeen tämentää toteutettavia toimenpiteitä.

tässä tilanteessa direktiivi 80/665/ETY on kumottava ja tarvittavat toimenpiteet toteutettava,

toimenpiteissä on otettava huomioon ensiksi se, että tauti voi jäädä piileväksi, jolloin sitä ei löydetä kasvavista perunoista eikä varastossa olevista perunoista, ja että sitä voidaan tämän vuoksi torjua tehokkaasti ainoastaan tuottamalla ja käyttämällä saastunnasta vapaita siemenperunoita, ja toiseksi se, että järjestelmälliset viralliset tutkimukset ovat tarpeen sen paikallistamiseksi; taudinaiheuttajan leviäminen kasvaviin perunoihin ei ole tärkein tekijä, vaan taudinaiheuttaja voi talvehtia kasveissa, jotka ovat peräisin maahan jääneistä perunoista ("itse levinneet kasvit"), ja nämä muodostavat vuodesta toiseen pääasiallisen saastuntalähteen; taudinaiheuttaja leviää pääasiassa, kun perunat joutuvat kosketuksiin saastuneiden perunoiden ja istutus-, nosto- ja käsittelyvälineiden tai sellaisten kuljetuksessa ja varastoinnissa käytettyjen säiliöiden kanssa, jotka ovat saastuneet oltuaan aiemmin kosketuksissa saastuneiden perunoiden kanssa; nämä saastuneet välineet voivat aiheuttaa tartuntaa tietyn ajan tällaisesta saastunnasta alkaen; taudinaiheuttajan leviämistä voidaan vähentää tai se voidaan estää desinfioimalla nämä välineet; tällainen siemenperunoiden saastunta muodostaa suurimman taudinaiheuttajan leviämisvaaran,

⁽¹⁾ EYVL N:o C 93, 2.4.1993, s. 12

⁽²⁾ EYVL N:o C 176, 28.6.1993, s. 210

⁽³⁾ EYVL N:o C 161, 14.6.1993, s. 18

⁽⁴⁾ EYVL N:o L 26, 31.1.1977, s. 20. Direktiivi sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna komission direktiivillä 92/103/ETY (EYVL N:o L 363, 11.12.1992, s. 1)

⁽⁵⁾ EYVL N:o L 180, 14.7.1980, s. 30

yleisiä toimenpiteitä koskevien yksityiskohtaisten sääntöjen vahvistamisen osalta ja kaikkien jäsenvaltioiden tämän taudinaiheuttajan alueelleen leviämisen estämiseksi toteuttamien tiukempien tai täydentävien toimenpiteiden osalta on suotavaa, että jäsenvaltiot toimivat komission kanssa tiiviissä yhteistyössä pysyvässä kasvinsuojelukomiteassa (jäljempänä 'komitea'),

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Tämä direktiivi koskee toimenpiteitä, jotka on toteutettava jäsenvaltioissa perunan vaalean rengasmädän aiheuttajan, *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., (jäljempänä 'organismi') torjunnassa:

- a) sen paikallistamiseksi ja sen levinneisyyden määrittämiseksi,
 - b) sen esiintymisen ja leviämisen estämiseksi,
- ja
- c) jos sitä löydetään, sen leviämisen estämiseksi, torjumiseksi ja hävittämiseksi.

2 artikla

1 Jäsenvaltioiden on toteutettava viralliset järjestelmälliset tutkimukset organismin niiden alueelta lähtöisin olevissa perunoissa ja tarvittaessa kasveissa (*Solanum tuberosum* L.) esiintymisen varalta sen varmistamiseksi, että organismia ei esiinny.

Näitä tutkimuksia varten mukuloiden osalta otetaan siemenperunoista ja muista perunoista mieluiten varastossa olevista eristä näytteitä, jotka testataan virallisesti tai virallisen valvonnan alaisena laboratoriossa liitteessä I kuvatun organismin havaitsemista ja määrittystä koskevan menetelmän mukaisesti. Tarvittaessa voidaan suorittaa virallinen tai virallisesti valvottu silmämääräinen tarkastus muista näytteistä halkaisemalla mukulat.

Kasvien osalta nämä tutkimukset suoritetaan asianmukaisin menetelmin, ja näytteet testataan asianmukaisesti virallisesti tai virallisen valvonnan alaisena.

Direktiivin 77/93/ETY mukaiset toimivaltaiset viranomaiset vahvistavat näytteiden lukumäärän, alkuperän ja sen mistä kohdin perunakerroksia näytteet otetaan sekä näytteenoton ajoituksen asiallisten tieteellisten ja tilastollisten periaatteiden ja organismin biologian mukaisesti sekä kyseisen jäsenvaltion erityisten perunan tuotantojärjestelmien perusteella. Tähän liittyvät yksityiskohtaiset säännöt on toimitettava tiedoksi muille jäsenvaltioille ja komissiolle vuosittain, jotta kullakin jäsenvaltiolla olisi keskenään vertailukelpoiset takeet sen varmistamisesta, ettei organismia esiinny.

2 Edellä 1 kohdassa tarkoitettujen virallisten tutkimusten tulokset on ilmoitettava muille jäsenvaltioille ja komis-

sioille vähintään kerran vuodessa. Tämän ilmoituksen yksityiskohdat ovat luottamuksellisia. Komitea voi käsitellä asiaa direktiivin 77/93/ETY 16 a artiklassa säädettyä menettelyä noudattaen.

3 Seuraavat säännökset voidaan antaa direktiivin 77/93/ETY 16 a artiklassa säädettyä menettelyä noudattaen:

— yksityiskohtaiset säännöt edellä 1 kohdassa säädetystä asiallisten tieteellisten ja tilastollisten periaatteiden mukaisesti suoritettavista tutkimuksista,

— yksityiskohtaiset säännöt edellä 2 kohdassa säädetystä ilmoituksesta.

4 Seuraavat säännökset annetaan direktiivin 77/93/ETY 16 a artiklassa säädettyä menettelyä noudattaen:

— edellä 1 kohdan kolmannessa alakohdassa tarkoitettujen tutkimusten ja kokeiden asianmukainen menetelmä.

3 artikla

Jäsenvaltioiden on huolehdittava, että organismin epäilty tai varmistettu esiintyminen kasvavilla tai korjatuilla, varastoiduilla tai kaupan pidetyillä perunoilla niiden alueella ilmoitetaan niiden toimivaltaisille viranomaisille.

4 artikla

1 Sen jäsenvaltion, jossa epäillyt esiintymistapaukset on ilmoitettu, toimivaltaisten viranomaisten on varmistettava, että laboratoriotestaus on suoritettu virallisesti tai virallisen valvonnan alaisena liitteessä I kuvaillun menetelmän mukaisesti ja liitteessä II olevassa 1 kohdassa lueteltujen edellytysten mukaisesti mainitun esiintymisen varmistamiseksi tai epäilyn kumoamiseksi. Jos organismin esiintyminen varmistuu, sovelletaan liitteessä II olevan 2 kohdan säännöksiä.

2 Ennen kuin 1 kohdassa tarkoitettu epäilty esiintyminen on varmistunut tai kumottu, niissä epäillyn esiintymisen tapauksissa, joissa on todettu:

i) silmämääräisesti määritettyjä oireita, jotka antavat aiheutta epäillä tautia

tai

ii) positiivinen reaktio liitteessä I täsmennetyssä immuno fluoresenssikokeessa tai muussa asianmukaisessa kokeessa,

jäsenvaltioiden toimivaltaisten viranomaisten on:

a) kiellettävä kaikkien sellaisten erien tai lähetysten liikuminen, joista on otettu näytteitä, elleivät ne liiku heidän valvontansa alaisina ja ellei organismin tunnistettavaa leviämisaavaa ole olemassa;

b) toteutettava tarvittavat toimenpiteet epäillyn esiintymisen alkuperän jäljittämiseksi;

c) otettava käyttöön sopivia arvioidun vaaran asteen mukaisia lisävarotoimenpiteitä organismin leviämisen

estämiseksi. Näihin toimenpiteisiin voi kuulua kaikkien muiden mukuloiden ja kasvien liikkumisen virallinen valvonta sellaisen laitoksen sisällä tai laitoksesta, jolla on yhteyttä epäiltyyn esiintymiseen.

3 Seuraavia toimenpiteitä voidaan toteuttaa direktiivin 77/93/ETY 16 a artiklassa säädettyä menettelyä noudattaen:

— edellä 2 kohdan c alakohdassa tarkoitettujen toimenpiteet.

4 Seuraavat toimenpiteet toteutetaan direktiivin 77/93/ETY 16 a artiklassa säädettyä menettelyä noudattaen:

— muut sopivat 2 kohdan ii alakohdassa säädetty kokeet.

5 artikla

1 Jos virallisesti tai virallisen valvonnan alaisena liitteessä I kuvatus menetelmän mukaisesti suoritettujen laboratoriokokeiden varmistavat organismin esiintyvän mukula-, kasvi- tai kasvinosanäytteenä, jäsenvaltion toimivaltaisten viranomaisten on, ottaen huomioon perustellut tieteelliset periaatteet, organismin biologian ja tässä jäsenvaltiossa käytössä olevat erityiset tuotanto-, kaupanpitämis- ja jalostusjärjestelmät:

- a) ilmoitettava saastuneiksi mukulat tai kasvit, lähetys ja/tai erä sekä välineet, ajoneuvo, säiliö, varasto tai sen osat ja kaikki muut kohteet, pakkaukset mukaan lukien, joista näyte on otettu, mutta tarvittaessa myös tuotantopaikka (paikat) ja pelto (pellot), josta mukulat tai kasvit on korjattu;
- b) määritettävä, ottaen huomioon liitteessä III olevan 1 kohdan säännökset, todennäköinen saastunnan laajuus kosketuksen kautta saastuneiksi ilmoitettujen kohteiden kanssa ennen tai jälkeen sadonkorjuun tai yhteyden kautta näiden kohteiden kanssa tuotantojärjestelmässä;
- c) rajoitettava alue a kohdassa tarkoitettujen saastuntailmoituksen, b kohdassa tarkoitettujen todennäköisen saastunnan laajuuden määrittämisen ja organismin mahdollisen leviämisen perusteella, ottaen huomioon liitteessä III olevan 2 kohdan säännökset.

2 Jäsenvaltioiden on ilmoitettava viipymättä muille jäsenvaltioille ja komissiolle liitteessä III olevassa 3 kohdassa säädettyä menettelyä noudattaen kaikki 1 kohdan a alakohdan mukaisesti ilmoitetut saastunnat sekä yksityiskohtaiset 1 kohdan c alakohdassa tarkoitettujen alueen rajoittamista koskevat tiedot.

Tämän ilmoituksen yksityiskohdat ovat luottamuksellisia. Komitea voi käsitellä asiaa direktiivin 77/93/ETY 16 a artiklassa säädettyä menettelyä noudattaen.

3 Edellä 2 kohdassa tarkoitettujen ilmoituksen ja siinä mainittujen tekijöiden jälkeen muiden ilmoituksessa tarkoitettujen jäsenvaltioiden on tarvittaessa ilmoitettava saastunnasta, määritettävä saastunnan todennäköinen laajuus ja rajoitettava alue 1 kohdan a, b ja c alakohdan mukaisesti.

6 artikla

Jäsenvaltioiden on säädettävä, että kun mukulat tai kasvit on ilmoitettu saastuneiksi 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti, 4 artiklan 1 kohdassa tarkoitettujen kokeiden tehdään kaikkien niiden perunavarastojen osalta, joiden perunat polveutuvat samasta kloonista kuin saastuneiden perunavarastojen perunat. Kokeet tehdään alkuperäisen todennäköisen saastuntalähteen ja saastunnan todennäköisen laajuuden määrittämisen kannalta tarvittavalle määrälle mukuloita tai kasveja, mieluiten vaaran suuruuden mukaisesti.

Kokeiden jälkeen tehdään tarvittaessa uudelleen saastuntailmoitus, määritetään todennäköinen saastunnan laajuus ja rajoitetaan alue 5 artiklan 1 kohdan a, b ja c alakohdan mukaisesti.

7 artikla

1 Jäsenvaltioiden on säädettävä, että 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti saastuneiksi ilmoitettuja mukuloita tai kasveja ei voida istuttaa ja että ne on niiden toimivaltaisten viranomaisten valvonnassa:

— tuhottava

tai

— hävitettävä muulla tavoin virallisen valvonnan alaisena toimenpiteenä liitteessä IV olevan 1 kohdan mukaisesti, edellyttäen, että on todettu, ettei minkäänlaista tunnistettavaa organismin leviämistä ole olemassa.

2 Jäsenvaltioiden on säädettävä, että todennäköisesti saastuneiksi 5 artiklan 1 kohdan b alakohdan mukaisesti ilmoitettuja mukuloita tai kasveja ei voida istuttaa ja että ne, niiden perunavarastojen perunoiden osalta, jotka polveutuvat samasta kloonista kuin saastuneet perunat, käytetään tai hävitetään asianmukaisella tavalla liitteessä IV olevan 2 kohdan mukaisesti niiden toimivaltaisten viranomaisten valvonnassa siten, että varmistetaan, ettei tunnistettavaa organismin leviämistä ole, sanotun kuitenkaan rajoittamatta 6 artiklassa tarkoitettujen kokeiden tulosten soveltamista.

3 Jäsenvaltioiden on säädettävä, että 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti saastuneiksi ilmoitetut tai 5 artiklan 1 kohdan b alakohdan mukaisesti todennäköisesti saastuneina pidetyt välineet, ajoneuvot, säiliöt, varastot tai näiden osat sekä kaikki muut kohteet, pakkaukset mukaan lukien, on tuhottava tai puhdistettava ja desinfioidava liitteessä IV olevassa 3 kohdassa tarkoitettuja asianmukaisia menetelmiä käyttäen. Desinfiointin jälkeen näitä kohteita ei enää pidetä saastuneina.

4 Jäsenvaltioiden on säädettävä, että liitteessä IV olevassa 4 kohdassa määritellyt eri toimenpiteet on toteutettava 5 artiklan 1 kohdan c alakohdan mukaisesti rajoitetulla alueella, sanotun kuitenkaan rajoittamatta 1, 2 ja 3 kohdan mukaisesti toteutettujen toimenpiteiden toteuttamista.

8 artikla

1 Jäsenvaltioiden on säädettävä, että siemenperunoiden on täytettävä direktiivin 77/93/ETY vaatimukset ja polveuduttava suoraan aineistosta, joka on saatu virallisesti hyväksytyyn suunnitelman mukaisesti ja joka on ilmoitettuvapaaksi kyseisestä organismista virallisesti tai virallisen valvonnan alaisena liitteessä I kuvaillun menetelmän mukaisesti suoritetuissa kokeissa.

Edellä mainitut kokeet suoritetaan:

- siinä tapauksessa, että saastunta koskee siemenperunan tuotantoa, alkuperäisestä kloonista valituista kasveista,
- muissa tapauksissa joko alkuperäisestä kloonista valituista kasveista tai edustavista perussiemenperunan tai aikaisempien sukupolvien siemenperunan näytteistä.

2 Seuraavat säännökset voidaan antaa direktiivin 77/93/ETY 16 a artiklassa säädetyn menettelyn mukaisesti:

- yksityiskohtaiset säännöt 1 kohdan toisen alakohdan ensimmäisen luetelmakohdan soveltamisesta,
- edellä 1 kohdan toisen alakohdan toisen luetelmakohdan tarkoitettuja edustavia näytteitä koskevat säännöt.

9 artikla

Jäsenvaltioiden on kiellettävä organismin hallussapito ja käsittely.

10 artikla

Jäsenvaltiot voivat myöntää poikkeuksia tämän direktiivin 6, 7 ja 9 artiklaan kokeellisia tai tieteellisiä tarkoituksia tai lajikevalintatyötä varten, jos nämä poikkeukset eivät haittaa organismin torjuntatoimenpiteitä eivätkä aiheuta minkäänlaista tämän organismin leviämistä, sanotun kuitenkaan rajoittamatta direktiivin 77/93/ETY säännösten soveltamista.

11 artikla

Jäsenvaltiot voivat toteuttaa lisätoimenpiteitä tai tiukempia toimenpiteitä, jotka ovat tarpeen organismin torjumiseksi tai sen leviämisen estämiseksi, jos ne noudattavat direktiivin 77/93/ETY säännöksiä.

Ensimmäisessä alakohdassa tarkoitettuihin lisätoimenpiteisiin voi kuulua velvoite istuttaa ainoastaan virallisesti varmennettuja tai sellaisen virallisen tarkastuksen alaisia siemenperunoita, jonka tarkoituksena on varmistaa

kasvinsuojeluvaatimusten noudattaminen. Tätä jälkimmäistä mahdollisuutta voidaan soveltaa erityisesti niissä tapauksissa, joissa viljelijöillä on lupa käyttää tilallaan siemenperunoita, jotka ovat lähtöisin niiden omasta sadosta sekä muissa tapauksissa, joissa istutetaan viljelijän tuottamaa siemenperunaa.

Näiden toimenpiteiden yksityiskohdat on ilmoitettava muille jäsenvaltioille ja komissiolle.

12 artikla

Tämän direktiivin liitteisiin tieteellisen tai teknisen tietämyksen lisääntymisen vuoksi tehtävät muutokset annetaan direktiivin 77/93/ETY 16 a artiklassa säädetyn menettelyn mukaisesti.

13 artikla

1 Jäsenvaltioiden on 15 päivään marraskuuta 1993 mennessä annettava ja julkaistava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät säännökset. Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

Näissä jäsenvaltioiden antamissa säännöksissä on viitattava tähän direktiiviin tai niihin on liitettävä tällainen viittaus niitä virallisesti julkaistaessa. Jäsenvaltioiden on säädettävä siitä, miten viittaukset tehdään.

Jäsenvaltioiden on sovellettava näitä säännöksiä 16 päivästä marraskuuta 1993.

2 Jäsenvaltioiden on toimitettava tässä direktiivissä tarkoitetuista kysymyksistä antamansa kansalliset säännökset komissiolle viipymättä. Komission on ilmoitettava tästä muille jäsenvaltioille.

14 artikla

Kumotaan direktiivi 80/665/ETY 16 päivästä marraskuuta 1993.

15 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Luxemburgissa 4 päivänä lokakuuta 1993.

Neuvoston puolesta

Puheenjohtaja

W. CLAES

LIITE I

MENETELMÄ PERUNAN VAALEAN RENGASMÄDÄN AIHEUTTAVAN *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (SMITH) DAVIS ET AL. SSP. *SEPEDONICUS* (SPIECKERMANN ET KOTTHOFF) DAVIS ET AL. BAKTEERIN LÖYTÄMISEKSI JA MÄÄRITTÄMISEKSI PERUNAERISTÄ

1 Näytteenotto tyvestä

- 1.1 Jüoksevan veden alla pestään 200 mukulaa ja kunkin mukulan tyvi kuoritaan leikkausveitsellä tai kuorimaveitsellä, joka desinfioidaan säännöllisesti; desinfiointi voi tapahtua kastamalla kuorimaveitsi 70 %:seen etanoliin ja liekittämällä se.
- 1.2 Otetaan huolellisesti kartiomaisia kappaleita tyven solukosta leikkausveitsellä tai perunan kuorimaveitsellä. Pidetään suonia sisältämättömän solukon osuus mahdollisimman pienenä. Kartiot on käsiteltävä 24 tunnin kuluessa (kohta 3) niiden ottamisesta tai säilytettävä -20 °C:ssa korkeintaan kahden viikon ajan.

2 Silmämääräinen perunan vaalean rengasmädän oireiden tarkastelu

Näytteenoton jälkeen kukin mukula leikataan halki poikittain ja tarkastellaan perunan vaalean rengasmädän oireiden esiintymistä.

Mukuloita painetaan ja katsotaan, tihkuuko suonia sisältävästä solukosta mädäntynyttä solukkoa.

Ensimmäiset oireet ovat erityisesti kannan lähellä olevan solukon lievä lasimaisuus tai läpikuultavuus ilman että suoniston ympärys olisi pehmennyt. Kannassa oleva suonirengas voi olla väriltään hieman tavanomaista tummempi. Ensimmäiset oireet, jotka voidaan selvästi tunnistaa ovat suonirenkaan keltävä väri ja se, että mukulaa kevyesti painettaessa suonista tulee ulos juustomaista ainetta. Tämä tihkuva erite sisältää miljoonia bakteereita. Tässä vaiheessa voi esiintyä suonisolukon ruskettumista. Ensi vaiheessa näiden oireiden esiintyminen voi rajoittua ainoastaan osaan rengasta, eikä välttämättä lähimpänä kantaa olevaan osaan, ennen kuin ne leviävät asteittain koko renkaaseen. Saastunnan leviämisen myötä suonisolukot tuhoutuvat. Ulkokuori voi erottua sisäkuoresta. Saastunnan myöhemmissä vaiheissa mukulan pintaan ilmestyy reunoiltaan usein punaisenuskeita halkeamia. Jonkin toisen taudinaiheuttajan, sienen tai bakteerin, aiheuttama samanaikainen saastunta voi peittää oireet, jolloin voi olla vaikeaa, jollei mahdotonta, erottaa perunan vaalean rengasmädän myöhempiä oireita muista perunan pilaajista.

3 Näytteiden esikäsittely Gram-värystä, immunofluoresenssikoetta (IF) ja munakoisokoetta varten

- 3.1 Kannasta otetut kartiot homogenoidaan laimennosliuoksessa, joka ei ole toksista *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerille (esimerkiksi 0,05 M fosfaattipuskuriliuoksessa (PBS), jonka pH on 7,0) alle 30 °C lämpötilassa, kunnes täydellinen homogenoituminen on juuri tapahtunut; on suositeltavaa lisätä ei-toksista dispergointiainetta ja voi olla tarpeen lisätä ei-toksista vaahdonestoainetta (lisäys 1 ja 2). On tarpeen välttää liiallista jauhautumista.
- 3.2 Eristetään bakteeri homogenoidusta liuoksesta yhdellä seuraavista menetelmistä⁽¹⁾:
- A. a) sentrifugoidaan enintään kiihtyvyydellä 180 g 10 minuutin ajan;
- b) sentrifugoidaan pinnalle jäävä neste vähintään kiihtyvyydellä 4 000 g 10 minuutin ajan; dekantoidaan, sitten poistetaan pinnalle jäävä neste.
- B. a) annetaan massan seistä 30 minuutin ajan, jotta solukon jäännökset laskeutuisivat; dekantoidaan pinnalle jäävä neste liikuttamatta pohjasakkaa;
- b) suodatetaan pinnalle jäävä neste lasisinterisuodattimeen (n:o 2 = 40–100 µm) asetetun suodatinpaperin (Whatman n:o 1) läpi vesi-imun avulla; kaadetaan suodos sentrifugointiputkeen; pestään suodatin steriilillä fosfaattipuskuriliuoksella niin, että suodosta tulee enintään 35 ml;
- c) sentrifugoidaan suodos vähintään kiihtyvyydellä 4 000 g 20 minuutin ajan.
- 3.3 Suspendoidaan pohjasakka (konsentroituu uute) steriiliin 0,01 M fosfaattipuskuriliuokseen, jonka pH on 7,2 (lisäys 2), kunnes saadaan noin 1 ml konsentroitua uutetta. Jaetaan se kahteen yhtä suureen osaan ja säilytetään toinen osa vertailua varten pakastamalla -20 °C:seen⁽²⁾ tai kylmäkuivaamalla. Jaetaan toinen osa kahteen yhtä suureen osaan, joista toinen on tarkoitettu immunofluoresenssikoetta ja Gram-värystä varten ja toinen munakoisokoetta varten.
- 3.4 Saastunnan välttämiseksi on ehdottoman tärkeää käsitellä näytteet ja *C. m. subsp. sepedonicus* positiiviset vertailunäytteet toisistaan erillään sekä immunofluoresenssikokeen että munakoisokokeen osalta.

⁽¹⁾ Dinesen on esittänyt toisen uuttomenetelmän v. 1984.

⁽²⁾ On osoitettu (Janse et Van Vaerenbergh, 1987), että pakastus voi heikentää *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin elinvoimaa. Tämän ongelman voi ratkaista käyttämällä glyserolin 10-prosenttista liuosta konsentroidun uutteen suspendoinnissa.

4 Gram-värjäys

- 4.1 Valmistetaan Gram-värjäys kaikille konsentroidun uutteen laimennoksille (5.2.1 kohta) ja kaikille halkaisuille mukuloille (2 kohta), joissa on lasimaisuutta, mätää tai jotakin muuta epäilyttävää oiretta. Näytteet on otettava sairaiden solukoiden reunasta.
- 4.2 Valmistetaan Gram-värjäys tunnetuille *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin kasvustoille, ja jos mahdollista luonnollisesti saastuneille solukoille (5.1 kohta).
- 4.3 Määritetään, mitkä näytteet sisältävät tyypillisiä nuijanmuotoisia grampositiivisia soluja. Yleensä *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin solut ovat 0,8–1,2 µm pitkiä ja 0,4–0,6 µm leveitä.

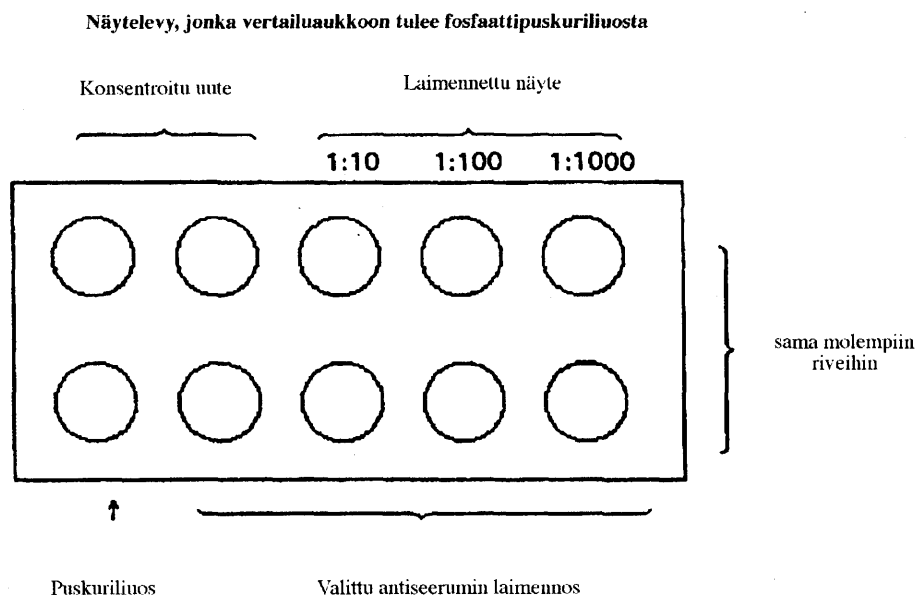
Asianmukainen Gram-värjäysmenetelmä on esitetty lisäyksessä 3.

Luonnollisesti saastuneista solukoista tai äskettäin eristetyistä kasvustoista valmistetuissa näytteissä on usein valtaosa kokkisauvabakteereja, jotka ovat yleensä hieman pienempiä kuin vanhemmista agarkasvustoista lähtöisin olevat solut. Suurimmassa osassa kasvualustoja *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin solut ovat nuijamaisia pleomorfisia sauvoja, jotka voivat reagoida eri tavoin Gram-värjäyksessä. Solut ovat erillisiä, pareittain sauvabakteerien luokalle tyypillisine "kyynärpäineen", tai joskus epäsäännöllisissä ryhmissä, joita luonnehditaan usein säleaidoiksi ja kiinalaisiksi kirjoitusmerkeiksi.

5 Immunofluoresenssikokeet

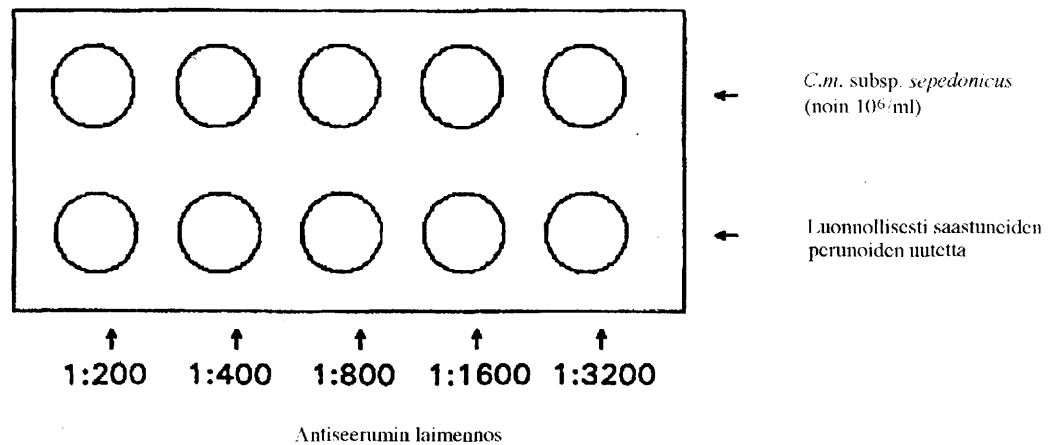
- 5.1 Käytetään tunnetun *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerikannan antiseerumia ATCC 33113 (NCPPB 2137) tai NCPPB 2140. Sen immunofluoresenssipitoisuuden on oltava vähintään 1:600. Lisätään fosfaattipuskuriliuosta koelevylle vertailua varten sen määrittämiseksi, yhtyykö fluoreseiinisisotiosyanaatin (FITC) kanssa konjugoitunut kaniinin vastainen immunoglobuliini epäspesifisesti bakteerisoluihin. *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteeria [ATCC 33113 (NCPPB 2137), NCPPB 2140] on käytettävä homologisena vertailuantigeeninä erillisellä levyllä. Luonnollisesti saastunutta solukkoa (kylmäkuivaamalla tai pakastamalla -20 °C:ssa säilytettyä) olisi mahdollisuuksien mukaan käytettävä vertailua varten samalla levyllä (kuva 2).
- 5.2 *Menettely*
- 5.2.1 Valmistetaan kolmen laimennoksen sarja kymmenen peräkkäisillä kerrannaisilla (10¹, 10² ja 10³) lopullisesta konsentroidusta uutteesta tislattuun veteen (kuva 1).
- 5.2.2 Monireikäisen levyn aukkoihin pipetoidaan aukon peittämiseen riittävä vakiomäärä (noin 25 µl) kutakin konsentroidun uutteen laimennosta tai *C. m. subsp. sepedonicus* -suspensiota (noin 10⁶ solua/ml), kuten kuvassa 1 on esitetty.

Kuva 1



Kuva 2

Positiivinen vertailulevy



- 5.2.3 Annetaan kuivua noin 37 °C ilmassa ja kiinnitetään 95 % etanolilla tai liekillä.
- 5.2.4 Peitetään kuvan 1 mukaiset aukot suositetuissa määräsuhhteissa 0,01 M fosfaattipuskuriliuoksella, jonka pH on 7,2 (lisäys 2) laimennetulla (työskentelyliuos) *C. m. subsp. sepedonicus* antiseerumilla (käytetään fosfaattipuskuriliuosta vertailun vuoksi FITC:tä varten). Antiseerumin työskentelyliuoksen pitoisuuden tulisi olla suunnilleen puolet immunofluoresenssin pitoisuudesta. Jos muita antiseerumin laimennoksia on käytettävä, on tarpeen valmistaa kullekin käytettävälle laimennokselle erilliset levyt.
- 5.2.5 Annetaan inkuboitua 30 minuuttia kosteassa kammiossa huoneenlämmössä.
- 5.2.6 Huuhdotaan huolellisesti 0,01 M fosfaattipuskuriliuoksella, jonka pH on 7,2. Tehdään kolme perättäistä 5 minuutin pesua 0,01 M fosfaattipuskuriliuoksella, jonka pH on 7,2. Vaihetaan joka kerran pesuliuosta.
- 5.2.7 Poistetaan huolellisesti kaikki ylimääräinen kosteus.
- 5.2.8 Peitetään kukin aukko FITC-konjugaatilla samana laimennoksena, jota käytettiin pitoisuuden määrittämisessä, ja annetaan inkuboitua 30 minuuttia kosteassa pimeässä kammiossa huoneenlämmössä.
- 5.2.9 Huuhdotaan ja pestään kuten edellä.
- 5.2.10 Lisätään noin 5–10 µl 0,1 M fosfaattipuskuroitua glyseroliliuosta, jonka pH on 7,6 (tai vastaavaa, jonka pH on vähintään 7,6), kuhunkin aukkoon ja peitetään peitelevyllä (lisäys 2).
- 5.2.11 Tutkitaan mikroskoopilla, joka on varustettu epifluoresoivalla valonlähteellä ja FITC:n kanssa työskentelyyn mukautetuilla suodattimilla. Sopiva suurennos on 400–1 000-kertainen. Tutkitaan kukin aukko kohtisuorasti kahden halkaisijan suuntaisesti ja pitkin aukon kehää.

Etsitään fluoresoivat solut positiivisista vertailukohdista ja määritetään pitoisuus. Etsitään fluoresoivat solut FITC-puskurivertailusta, ja jos niitä ei ole, tutkitaan näyteaukot. Määritetään vähintään 10 mikroskooppikentästä morfologisesti tyypillisten fluoresoivien solujen keskimääräinen lukumäärä kenttää kohden ja lasketaan näiden solujen lukumäärä konsentroidun uutteen laimentamatonta millilitraa kohden (lisäys 4).

Immunofluoresenssikokeisiin liittyy tiettyjä ongelmia.

- Saprofyttien bakteerien populaatioissa voi näkyä morfologisesti epätyypillisiä fluoresoivia soluja, jotka voivat reagoida ristiin. Toiset voivat olla kooltaan ja morfologialtaan samanlaisia kuin *C. m. subsp. sepedonicus*. Ainoastaan ne fluoresoivat solut, jotka ovat kooltaan ja morfologialtaan tyypillisiä, on otettava huomioon.
- Ristiin reagoimisen mahdollisuuden vuoksi immunofluoresenssikokeessa positiivisesti reagoivat näytteet olisi testattava uudelleen eri antiseerumilla.
- Tämän menetelmän tekninen havaitsemisraja on 10^3 – 10^4 solua konsentroidun uutteen laimentamatonta millilitraa kohden. Ne näytteet, joiden tyypillisten fluoresoivien solujen lukumäärä on havaitsemisrajalla, ovat yleensä vailla *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteeria, mutta ne voidaan testata munakoisokokeella.

Immunofluoresenssikoe on negatiivinen kaikkien niiden näytteiden osalta, joista ei ole löydetty yhtään morfologisesti tyypillistä fluoresoivaa solua. Näitä näytteitä on pidettävä *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin "saastuttamattomina".

Niitä ei ole tarpeen testata munakoisokokeella.

Immunofluoresenssikoe on positiivinen kaikkien niiden näytteiden osalta, joista on löydetty morfologisesti tyypillisiä fluoresoivia soluja.

Näytteitä, joiden osalta immunofluoresenssikoe on molempien antiseerumien osalta positiivinen on pidettävä *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin "mahdollisesti saastuttamina".

Munakoisokoe on tarpeen suorittaa kunkin mahdollisesti saastuneen näytteen osalta.

6 Munakoisokoe

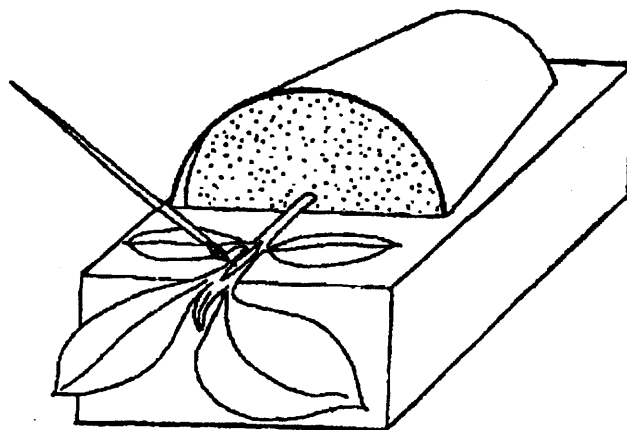
Viljelyn yksityiskohdista tarkemmin ks. lisäys 5.

- 6.1 Levitetään 3.3 kohdan mukaista konsentroitua uutetta vähintään 25:1 kolmilehtiasteella olevan (lisäys 5) munakoison väliin yhdellä jäljempänä esitellyistä menetelmistä (6.2, 6.3 tai 6.4 kohta).

6.2 Inokulointi viiltämällä I

- 6.2.1 Kukin ruukku asetetaan vaakasuoraan tuen päälle [solupolystyreenikappale, jonka pinnasta on poistettu 5 cm syvä, 10 cm leveä ja 15 cm pitkä pala (kuva 3), sopii 10 cm:n ruukulle]. Jokaiselle testattavalle näytteelle on asetettava steriili alumiinifoliokaistale varren ja polystyreenikappaleen väliin. Kasvi voidaan tukea paikoilleen kappaleen ympäri kulkevalla kuminauhalla.
- 6.2.2 Leikkausveitsellä tehdään sirkkalehtien ja ensimmäisen kasvulehden väliin pitkittäinen tai hieman vinosti poikittainen 0,5–1 cm pitkä viilto, jonka syvyys on noin kolme neljänestä varren halkaisijasta.
- 6.2.3 Pidetään viilto avoimena leikkausveitsen terän kärjellä ja levitetään inokulaatti konsentroituuun uutteeseen kastetulla siveltimellä. Levitetään loput konsentroidusta uutteesta munakoisojen väliin.
- 6.2.4 Suljetaan viilto steriilillä vaseliinilla 2 ml:n ruiskua käyttäen.

Kuva 3



6.3 Inokulointi viiltämällä II

- 6.3.1 Pidetään kasvia kahden sormen välissä ja tiputetaan pipetillä pisara (noin 5–10 µl) konsentroitua uutetta suspensiona varren päälle sirkkalehtien ja ensimmäisen kasvulehden väliin.
- 6.3.2 Steriilillä leikkausveitsellä tehdään konsentroidun uutteen pisarasta lähtien vinosti poikittainen (noin 5 asteen kulmassa) 1 cm viilto, jonka syvyys on noin kaksi kolmannesta varren paksuudesta.
- 6.3.3 Suljetaan viilto steriilillä vaseliinilla ruiskua käyttäen.
- 6.4 Inokulointi injektoimalla
- 6.4.1 Munakoisoja ei kastella inokulointia edeltävän vuorokauden aikana, jotta nestejännitys vähenisi.

- 6.4.2 Inokulointi tehdään ruiskulla, joka on varustettu hypodermisellä neulalla (vähintään 23G), munakoison varsiin juuri sirkkalehtien yläpuolelle. Konsentroidu uute levitetään munakoisojen väliin.
- 6.5 Samalla inokulointimenetelmällä (6.2, 6.3 tai 6.4 kohta) inokuloidaan 25 kasvia tunnetulla *C. m. subsp. sepedonicus*-viljelmällä, ja jos mahdollista luonnollisesti saastuneen mukulan uutteella (5.1 kohta).
- 6.6 Samalla inokulointimenetelmällä (6.2, 6.3 tai 6.4 kohta) inokuloidaan 25 kasvia steriilillä 0,05 M fosfaattipuskuriliuoksella.
- 6.7 Annetaan kasvien inkuboitua 40 päivää sopivissa olosuhteissa (lisäys 5). Ensimmäisten 8 päivän jälkeen tutkitaan säännöllisesti oireiden esiintymisen paljastamiseksi. Lasketaan, kuinka monessa kasvissa esiintyy oireita. *C. m. subsp. sepedonicus*-bakteeri aiheuttaa munakoisolla lehtien lakastumista, joka voi alkaa lehdenreunojen tai lehtisuonien välisen osan velttoutuena. Aluksi lakastunut solukko voi muuttua tummanvihreäksi tai täplikkääksi, mutta se vaaleenee ennen kuin se muuttuu nekroottiseksi. Lehtisuonien välinen lakastuminen näyttää usein rasvaiselta ja turvonneelta. Nekroottisessa solukossa on usein kirkkaan keltainen reuna. Kasvit eivät välttämättä kuole. Mitä pitemmälle oireiden esiintyminen viivästyy, sitä suurempi mahdollisuus kasveilla on jäädä henkiin. Kasvit voivat selvitä tartunnasta. Nuoret herkat munakoisot reagoivat paljon voimakkaammin heikkoihin *C. m. subsp. sepedonicus*-populaatioihin kuin vanhemmat kasvit, mikä selittää sen, että on tarpeen käyttää kolmilehtiasteella olevia tai sen lähes saavuttaneita kasveja.
- Lakastuminen voi myös olla muiden mukulasolukon konsentroidussa uutteen esiintyvien bakteerien tai sienten populaatioiden aiheuttamaa. Näitä ovat esimerkiksi *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ja *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata* sekä saprofyyttisten bakteerien voimakkaat populaatiot. Nämä lakastumiset erottuvat *C. m. subsp. sepedonicus*-bakteerin aiheuttamista lakastumisista, koska niissä kokonaiset lehdet tai kasvit kuivuvat nopeasti.
- 6.8 Valmistetaan Gram-värijäys (4 kohta) kaikille munakoisoerille, joissa esiintyy oireita, käyttäen solukon osia lakastuneista lehdistä tai kasvien varsista, ja eristetään sopivalle ravintoalustalle (7 kohta). Desinfoidaan munakoisojen lehtien ja varsien pinta pyyhkimällä ne 70 % etanolilla.
- 6.9 Tietyissä olosuhteissa, erityisesti jos viljelyolot eivät ole optimaaliset, *C. m. subsp. sepedonicus*-bakteeri voi esiintyä munakoisoissa piilevänä saastuntana jopa 40 päivän inkuboinnin jälkeen. Tällainen saastunta voi aiheuttaa inokuloiduissa kasveissa kasvun hidastumista ja elinvoiman puutetta. Jos immunofluoresenssikokeen tulosta pidetään positiivisena, voidaan arvioida, että on tarpeen jatkaa kokeita. Tuolloin on tärkeää verrata kaikkien munakoisokokeen kasvien ja steriilillä 0,05 M fosfaattipuskuriliuoksella inokuloitujen vertailunäytteiden kasvulukuja ja valvoa kasvihuoneen ympäristöoloja.
- Kokeita jatkettaessa suositetaan seuraavaa.
- 6.9.1 Leikataan varret inokulointikohdan yläpuolelta ja poistetaan lehdet.
- 6.9.2 Murskataan varret 0,05 M fosfaattipuskuriliuokseen, jonka pH on 7,0, 3.1 ja 3.2 kohdan mukaisesti.
- 6.9.3 Käytetään puolet konsentroidusta uutteen Gram-värijäkseen (4 kohta) ja immunofluoresenssikokeeseen (kohta 5).
- 6.9.4 Käytetään toinen puoli uuden munakoisokokeen suorittamiseen (kohta 6), jos reaktio Gram-värijäyksessä ja/tai immunofluoresenssikokeessa on positiivinen. Käytetään vertailuksi tunnettua *C. m. subsp. sepedonicus*-viljelmää ja steriiliä 0,05 M fosfaattipuskuriliuosta. Jos oireita ei esiinny näissä täydentävissä kokeissa, näytettä pidetään negatiivisena.
- 7 ***C. m. subsp. sepedonicus*-bakteerin eristäminen**
- Määrittäminen voidaan varmistaa ainoastaan eristämällä ja tunnistamalla (kohta 8) *C. m. subsp. sepedonicus*-bakteeri. Vaikka on kyse vaikeasti eristettävästä organismista, on mahdollista saada se erilleen solukosta, jossa esiintyy saastunnan oireita. Nopeasti kasvavat saprofyyttiset bakteerit voivat kuitenkin tukahduttaa sen, minkä vuoksi ei ole suotavaa eristää sitä suoraan mukulasolukon konsentroidusta uutteen (saadaan 3.3 kohdasta). Munakoisot ovat erinomainen valikoiva lisääntymisympäristö *C. m. subsp. sepedonicus*-viljelmälle, ja niitä isäntäkasvina käyttäen voidaan toteuttaa erinomainen varmistuskoe.
- Eristykset tehdään kaikista perunoista ja munakoisoista, joissa esiintyy oireita (4 ja 6 kohta). Tarvittaessa munakoisojen varret on murskattava 3 ja 6.9 kohdassa kuvattua menetelmää noudattaen.
- 7.1 Levitetään yhdelle seuraavista alustoista suspensiota juovina (menettelytavat lisäyksessä 6):
dekstroosiravintoagaralusta (ainoastaan uudelleen istutuksille),
hiiva-, peptoni- ja glukoosiagaralusta,
hiiva- ja dekstroosiravintoagaralusta,
hiivauute- ja mineraalisuola-agaralusta.
- Annetaan inkuboitua 20 päivää 21 °C:ssa.

C. m. subsp. sepedonicus -bakteeri kasvaa hitaasti ja tuottaa tavallisesti 10 päivässä neulanpään kokoisia ja muotoisia, kermanvärisiä, kuperia kasvustoja.

Levitetään uudelleen juovina puhtaiden viljelmien saamiseksi.

Kasvu nopeutuu uudelleen istutettaessa. Tyypilliset kasvustot ovat väriltään kermanvalkoisia tai norsunluunvärisiä, pyöreitä, sileitä, kohoavia, kuperia, rakenteeltaan limaisesta nestemäiseen, reunoiltaan säännöllisen muotoisia ja halkaisijaltaan yleensä 1–3 mm.

Tunnistaminen

Monet grampositiiviset sauvamaiset bakteerit, joiden kasvustojen ominaispiirteet vastaavat *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin ominaispiirteitä, voidaan eristää terveistä tai sairaista perunoista tai munakoisoista. Tässä yhteydessä on mahdollista tunnistaa *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteeri seuraavien kokeiden avulla:

immunofluoresenssikoe (5.1 kohta),

munakoisokoe,

ravintokokeet ja fysiologiset kokeet (lisäys 7):

- hapettumis/käymiskoe (O/F),
- oksidaasikoe,
- kasvu 37 °C:ssa,
- ureaasin tuotanto,
- eskuliinin hydrolyysi,
- tärkkelyksen hydrolyysi,
- 7 % natriumkloridiliuoksen sietokyky,
- indolikoe,
- katalaasikoe,
- H₂S:n tuotanto,
- sitraatin käyttö,
- gelatiinin hydrolyysi,
- hapon muodostus glyserolista, laktoosista, ramnoosista ja salisiinista,
- Gram-värijäys.

Kuhunkin kokeeseen on kuuluttava tunnettu *C. m. subsp. sepedonicus* -kanta vertailua varten. Ravintokokeet ja fysiologiset kokeet on tehtävä inokulaatilla, joka on lähtöisin ravintoagarliuokseen uudelleen istutetuista kasvustoista. Morfologiset vertailut on tehtävä dekstroosiravintoagarliuoksen kasvustoilla.

Immunofluoresenssikoetta varten solupopulaatioiden pitoisuudeksi on saatettava 10⁶ solua/ml. Immunofluoresenssipitoisuuden on oltava sama kuin tunnetun *C. m. subsp. sepedonicus* -viljelmän.

Munakoisokoetta varten solupopulaatioiden pitoisuudeksi on saatettava noin 10⁷ solua/ml. Nämä kokeet on tehtävä 10 kasvilla kunkin testattavan organismin osalta; myös näissä käytetään tunnettua *C. m. subsp. sepedonicus* -viljelmää ja steriiliä vettä vertailua varten. Puhtailla viljelmillä tyypillisen lakastumisen olisi ilmaannuttava 20 päivässä, mutta niillä kasveilla, joilla ei esiinny oireita tämän ajanjakson päätyttyä, tulisi jatkaa inkubointia 30 päivään saakka lämpötiloissa, jotka ovat suotuisat munakoison kasvulle, mutta eivät ylitä 30 °C:tta (lisäys 5). Jos oireita ei ole ilmaantunut 30 päivän jälkeen, ei voida vakuuttua siitä, että olisi kyse *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin patogeenisen muodon kasvustosta.

<i>Koe</i>	<i>C. m. subsp. sepedonicus</i>
hapettumis/käymiskoe(O/F)	inertti tai heikosti hapettava
oksidaasikoe	–
katalaasikoe	+
nitraattipelkistys	–
ureaasiaktiivisuus	–
H ₂ S:n tuotanto	–
indolin tuotanto	–
sitraatin käyttö	–

tärkkelyksen hydrolyysi	- tai heikko
kasvu 37 °C:ssa	-
kasvu 7 % NaCl:ssa	-
gelatiinin hydrolyysi	-
eskuliinin hydrolyysi	+
Hapot:	
— glyserolista	-
— laktoosista	- tai heikko
— ramnoosista	-
— salisiinista	-

*Lisäys 1***LELLIOTTIN JA SELLARIN 1976 SUOSITTAMA HOMOGENOINTILIUKSEN OHJE**

DC - silikoni - vaahdonesto - MS A -yhdiste (Hopkins & Williams Ltd., Cat n° 9964-25, Chadwell Heath, Essex, Englanti)	10 ml
Lubrol W -hiutaleita (ICI Ltd)	0,5 g
Tetranatriumpyrofosfaatti	1 g
0,05 M fosfaattipuskuriliuos, jonka pH on 7,0 (lisäys 2)	1 l

*Lisäys 2***PUSKURILIUKSET****0,05 M fosfaattipuskuriliuos, jonka pH on 7,0**

Tätä puskuriliuosta voidaan käyttää mukulasolukon homogenointiin (2.1 kohta).

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
NaCl	8,0 g
Tislattua vettä, kunnes liuosta on	1 l

0,01 M fosfaattipuskuriliuos, jonka pH on 7,2

Tätä puskuriliuosta käytetään antiseerumien laimennukseen ja immunofluoresenssin koelevyjen pesuun.

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Tislattua vettä, kunnes liuosta on	1 l

Fosfaattipuskuroitu 0,1 M glyseroliliuos, jonka pH on 7,6

Tätä puskuriliuosta käytetään tehostamaan fluoresenssia immunofluoresenssikokeessa.

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	0,15 g
Glyserolia	50 ml
Tislattua vettä	100 ml

Lisäys 3

GRAM-VÄRJÄYKSEN MENETTELY (HUCKERIN MUUNNOS) (DOETSCH, 1981)**Kristalliviolettiliuos**

Liuetetaan 2 g kristalliviolettiä 20 ml:aan 95 % etanolia.

Liuetetaan 0,8 g ammoniumoksaalia 80 ml:aan tislattua vettä.

Sekoitetaan nämä kaksi liuosta.

Lugolin jodi-jodidiliuos

Jodia	1 g
Kaliumjodidia	2 g
Tislattua vettä	300 ml

Jauhetaan kiinteät aineet yhdessä huhmaassa. Lisätään vesi ja sekoitetaan aineiden liuottamiseksi suljetussa astiassa.

Väriävä safraniiniliuos

Kantaliuos:

Safraniini 0	2,5 g
Etanoli 95 %	100 ml

Sekoitetaan ja varastoidaan.

Laimennetaan suhteessa 1:10 työskentelyliuoksen saamiseksi.

Värijäysmenettely

- 1 Tehdään sivelykoe, kuivataan ilmassa ja kiinnitetään lämmöllä.
- 2 Upotetaan levy kristalliviolettiliuokseen 1 minuutiksi.
- 3 Pestään nopeasti juoksevalla vedellä.
- 4 Upotetaan Lugolin jodi-jodidiliuokseen 1 minuutiksi.
- 5 Pestään juoksevalla vedellä ja kuivataan imupaperilla.
- 6 Poistetaan väri lisäämällä pisara kerrallaan 95 % etanolia, kunnes väri ei enää muutu, tai upottamalla etanoliin 30 sekunniksi kevyesti ravistaen.
- 7 Pestään juoksevalla vedellä ja kuivataan imupaperilla.
- 8 Upotetaan safraniiniliuokseen 10 sekunniksi.
- 9 Pestään juoksevalla vedellä ja kuivataan imupaperilla.

Grampositiiviset bakteerit ovat väriltään sinivioletteja; gramnegatiiviset bakteerit värjättyvät ruusunpunaisesta punaiseen.

Lisäys 4

IMMUNOFLUORESENSSIKOKEESSA POSITIIVISTEN SOLUJEN POPULAATION MÄÄRITYS

Moniaukkaisen levyn yhden aukon pinta-ala (S):

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

jossa D = aukon halkaisija.

Näkökentän pinta-ala (s):

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

jossa d = näkökentän halkaisija.

Lasketaan kentän halkaisija (d) suoraan mittaamalla tai soveltaen seuraavia kaavoja:

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

jossa i = kentän kerroin (8–24 okulaarin tyyppin mukaan),

K = putken kerroin (1 tai 1,25),

G = objektiivin suurennos (100-kertainen, 40-kertainen jne.).

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

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

Lasketaan tyypillisten fluoresoivien solujen määrä kenttää kohden (c).

Lasketaan tyypillisten fluoresoivien solujen määrä aukkoa kohden (C).

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

Lasketaan tyypillisten fluoresoivien solujen määrä konsentroidun uutteen millilitraa kohti (N):

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

jossa y = konsentroidun uutteen määrä (tilavuus) aukossa,

F = konsentroidun uutteen laimennoskerroin.

Lisäys 5

MUNAKOISOJEN VILJELY

Kylvetään munakoisojen siemeniä (*Solanum melongena* cv. Black Beauty) pastöroidulle kylvöalustalle. Istutetaan kylvötaimet uudelleen pastöroituun istutusalueeseen, kun sirkkalehdet ovat täysin kehittyneet (10–14 päivää).

Käytetään munakoisoja kolmilehtiasteella, kun vähintään kaksi mutta enintään kolme lehteä on täysin auennut.

Munakoisot on viljeltävä kasvihuoneessa seuraavissa olosuhteissa:

päivän pituus: 14 tuntia tai luonnollinen päivän pituus, jos se on tätä pitempi,

päivälämpötila: 21–24 °C,

yölämpötila: 15 °C.

HUOM: *C. m.* subsp. *sepedonicus* -bakteeri ei kehity yli 30 °C lämpötiloissa. Jos yölämpötila ei laske 15 °C:seen, hopeanvärisiä nekrooseja voi esiintyä.

Sopivalla hyönteismyrkyllä voidaan estää skiariditoukkien aiheuttamat tuhot juuristossa.

Lajikkeen Black Beauty munakoisoja voi tilata:

1 AB Hammenhögs Frö
270 50 Hammenhög
Ruotsi

2 Hurst Seeds Ltd.
Avenue Road
Witham
Essex CM8 2DX
Englanti

3 ASGRO Italia SpA
Corso Lodi 23
Milano

4 KÜPPER
Mitteldeutsche Samen GmbH
Hessenring 22
D-37269 Eschwege

Lisäys 6

CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SUBSP. SEPEDONICUS -BAKTEERIN KASVATUKSESSA JA ERISTÄMISESSÄ KÄYTETTÄVÄ ALUSTA**Ravintoagaralusta**

Difco Bacto -ravintoagaralusta tislatussa vedessä valmistajan ilmoittamana pitoisuutena. Steriloidaan autoklaavissa 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Ravintoagaralusta dekstroosilla

Difco Bacto -ravintoagaralusta, joka sisältää 1 % d-glukoosia (monohydraatti). Steriloidaan autoklaavissa 115 °C:ssa 20 minuutin ajan.

Hiiwa-, peptoni- ja glukoosiagaralusta

Difco bacton hiivauutetta (n:o 0127)	5 g
Difco bacton peptonia (n:o 0118)	5 g
D-glukoosia (monohydraatti)	10 g
Difco bacton puhdistettua agaralustaa (n:o 0560)	15 g
Tislattua vettä	1 l

Steriloidaan puolen litran erissä autoklaavissa 115 °C:ssa 20 minuutin ajan.

Hiivauute- ja mineraalisuolakasvatusalusta

Difco bacton hiivauutetta	2,0 g
D-glukoosia (monohydraatti)	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,005 g
Difco bacton puhdistettua agaralustaa	18 g
Tislattua vettä	1 l

Steriloidaan puolen litran erissä autoklaavissa 115 °C:ssa 20 minuutin ajan.

Lisäys 7

RAVINTOKOKEET JA FYSIOLOGISET KOKEET *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *SEPEDONICUS* -BAKTEERIN TUNNISTAMISEKSI

Kaikki alustat on inkuboitava 21 °C:ssa ja tutkittava 6 päivän jälkeen. Jos minkäänlaista kasvua ei havaita, annetaan inkuboitua 20 päivään saakka.

— **Hapettumis- ja käymiskoe (O/F) (Hugh & Leifson, 1953)**

Kasvualusta:

KCl	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
Difco bacton peptoni	1,0 g
Difto bacton puhdistettu agaralusta	3,0 g
D-glukoosi (monohydraatti)	10,0 g
Bromitymolisininen	0,03 g
Tislattua vettä	1 l

Sekoitetaan ja säädetään 1 N KOH:lla pH:ksi 7,0–7,2.

Jaetaan 16 mm × 100 mm:n (tilavuus 12 ml) Pyrex-kasvatusputkiin, 5 ja 10 ml kuhunkin.

Steriloidaan autoklaavissa 115 °C:ssa 10 minuutin ajan.

Inokuloidaan kutakin viljelmää pistämällä syvään 5 ml ja 10 ml putkiin. Lisätään aseptisesti 1–2 ml steriiliä nestemäistä parafiinia 10 ml putkiin. Annetaan inkuboitua.

Positiivinen reaktio:

Putki	Väri	Tulkinta
avonainen suljettu	keltainen } keltainen }	käyminen
avonainen suljettu	keltainen } sinivihreä }	hapettuminen
avonainen suljettu	vihertävä } sinivihreä }	hapettuminen tai inertti

— **Hapettumiskoe (Kovacs, 1956)**

Kovacsin reagenssi hapettumiskoetta varten:

Tislattuun veteen tehty 1 % tetrametyyli-parafenyleenidiamiini-dihydrokloridin (BDH nr 30386) vesiliuos.

Reagenssin on oltava äskettäin 1 ml:n määrinä valmistettua tai sitä voidaan varastoida ruskeassa lasipullossa 5 °C:ssa 1–4 viikkoa.

Puhtaaseen petrimaljaan pannaan pisara reagenssia suodatinpaperin päälle. Levitetään välittömästi tälle hiukan koeviljelmää ravintoagaralustalta platinasilmukan avulla.

Positiivinen reaktio: purppuraväri ilmaantuminen 10 sekunnin kuluessa. Viljelmiä, joihin purppuraväri ilmaantuu 10–30 sekunnin kuluessa, pidetään heikosti positiivisina.

HUOM: On tärkeää käyttää platinasilmukkaa ja ravintoagaralustan viljelmiä, koska pienet rautajännökset tai kohonneet sokkeripitoisuudet viljelyalustalla voivat aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia.

— **Hapon muodostus laktoosista, ramnoosista, salisiinista ja glyserolista**

Valmistetaan kasvatusalustaa ilman glukoosia Hugh & Leifsonin hapetus- ja käymiskoetta varten. Jaetaan sitä putkiin 5 ml kuhunkin. Steriloidaan autoklaavissa 115 °C:ssa 10 minuutin ajan. Sulaneeseen 45 °C:een jäähtyneeseen massaan lisätään aseptisesti 0,5 ml suodattamalla steriloitua 10 % glyserolin, laktoosin, ramnoosin tai salisiinin vesiliuosta. Sekoitetaan huolellisesti.

Positiivinen reaktio: sinivihreästä keltaiseen muuttuva väri osoittaa hapon muodostumista.

— **Katalaasikoe**

Asetetaan pisara vetyperoksidia (30 volyymiä) puhtaalle levylle ja emulgoidaan platinasilmukallinen kasvustoa.

Positiivinen reaktio: happikuplien muodostuminen pisarassa osoittaa katalaasin esiintymisen.

— **Nitraattien pelkistymisen aktiivisuus ja denitrifikaatio (Bradbury, 1970)**

Kasvualusta:

KNO ₃ (nitriittejä sisältämätön)	1 g
Difco bacton hiivauutetta	1 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Tislattua vettä	1 l

Jaetaan 20 ml pulloihin 10 ml kuhunkin. Steriloidaan autoklaavissa 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Reagenssi A:

H ₂ SO ₄	8 g
Etikkahappoa 5 N	1 l

Reagenssi B:

Naftyyliamiinia	5 g
Etikkahappoa 5 N	1 l

Inokuloidaan kaksi samanlaista nitraattialustaa. Testataan 10 ja 20 päivän kuluttua lisäämällä pisara Lugolin jodi-jodidiliuosta, 0,5 ml reagenssia A ja 0,5 ml reagenssia B. Jos alusta ei muutu punertavaksi, lisätään noin 50 mg sinkkijauhetta. Tarkkaillaan väriä.

Positiivinen reaktio:

	Väri	
	Vaihe 1	Vaihe 2
ei nitraattien pelkistymistä	väritön	punainen
nitraattien pelkistyminen nitriiteiksi (ainoastaan nitraattien pelkistyminen)	punainen	–
nitraattien pelkistyminen nitriiteistä eteenpäin (denitrifikaatio nitraattien ja nitriittien pelkistyminen)	väritön	väritön

— **Ureaasin tuotanto (Lelliott, 1966)**

Kasvatusalusta:

Oxoid-urea-agaralustaa (CM53)	2,4 g
Tislattua vettä	95 ml

Steriloidaan autoklaavissa 115 °C:ssa 20 minuutin ajan. Jäähdytetään sulanut massa 50 °C:seen ja lisätään aseptisesti 5 ml suodattamalla steriloitua urean 40 % vesiliuosta (Oxoid SR20). Sekoitetaan hyvin.

Jaetaan steriileihin putkiin (16 × 100 mm) 6 ml kuhunkin ja annetaan asettua kallistetuissa putkissa.

Positiivinen reaktio: väriltään oranssinkeltainen alusta muuttuu kirsikanpunaiseksi tai roosaksi, jos ureaasin aktiivisuutta esiintyy.

Sitraatin käyttö (Christensen) (Skerman, 1967)

Sitraatti-agaralustaa (Merck 2503)	23 g
Tislattua vettä	1 l

Sekoitetaan ja liuotetaan kuumentamalla. Jaetaan putkiin 6 ml kuhunkin kuten ureaasin tuotanto -kokeessa. Steriloidaan autoklaavissa 121 °C:ssa 15 minuutin ajan ja annetaan asettua kallistetuissa putkissa.

Positiivinen reaktio: sitraatin käyttöä osoittaa alustan värin vaihtuminen oranssista punaiseksi.

— **Rikkivedyntuotanto (Ramamurthi, 1959)**

Alusta:

Difco bacton tryptonia (n:o 0123)	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g

NaCl	5 g
Tislattua vettä	1 l

Liuetetaan ja jaetaan 16 × 100 mm putkiin 6 ml kuhunkin putkeen. Steriloidaan autoklaavissa 115 °C:ssa 10 minuutin ajan.

Inokuloidaan ja ripustetaan aseptisesti lyijyasetaattipaperi (Merck 9511) putken reunalle. Kiinnitetään paikoilleen korkin avulla. Annetaan inkuboitua 20 päivää.

Positiivinen reaktio: mustanruskean värityksen ilmaantuminen koepaperiin osoittaa H₂S:n muodostumista tryptonista.

— **Indolin tuotanto** (Ramamurthi, 1959)

Alusta:

samanlainen kuin H₂S-kokeessa.

Poistetaan lyijyasetaattipaperi, lisätään 1–2 ml etyylietteriä ja ravistetaan kevyesti. Annetaan kerrosten erottua (5 minuuttia). Lisätään varovasti 0,5 ml Kovacsin reagenssia (Merck 9293) kallistetun putken reunaa pitkin.

Positiivinen reaktio: punaisen värityksen ilmaantuminen keltaiseen kerrokseen eetteri- ja vesifaasin välille osoittaa indolin esiintymisen.

— **Kasvu 37 °C:ssa** (Ramamurthi, 1959)

Alusta:

Difco bacton ravinnelientä (n:o 0003)	8 g
Tislattua vettä	1 l

Sekoitetaan, liuetetaan ja jaetaan 6 ml kuhunkin putkeen.

Steriloidaan autoklaavissa 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Inokuloidaan ja annetaan inkuboitua 37 °C:ssa.

Positiivinen reaktio: kasvu

— **Kasvu 7 % natriumkloridissa** (Ramamurthi, 1959)

Alusta:

Difco bacton ravinnelientä	8 g
NaCl	70 g
Tislattua vettä	1 l

Sekoitetaan, liuetetaan ja jaetaan 6 ml kuhunkin putkeen.

Steriloidaan autoklaavissa 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Positiivinen reaktio: kasvu.

— **Gelatiinin hydrolyysi** (Lelliott, Billing & Hayward, 1966)

Alusta:

Difco bacton gelatiinia (n:o 0143)	120 g
Tislattua vettä	1 l

Sekoitetaan, liuetetaan kuumentamalla ja jaetaan putkiin 6 ml kuhunkin.

Steriloidaan autoklaavissa 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Positiivinen reaktio: gelatiini liukenee, vaikka lämpötila pidetään 5 °C:ssa 30 minuutin ajan.

— **Täykkelyksen hydrolyysi**

Alusta:

Difco bacton ravintoagaralustaa (sulatettu)	1 l
Difco bacton liukoista täykkelystä (n:o 0178)	2 g

Sekoitetaan ja steriloidaan autoklaavissa 115 °C:ssa 10 minuutin ajan.

Kaadetaan maljoihin. Inokuloidaan maljat täplittäin.

Riittävän kasvun jälkeen (10–20 päivää) otetaan osa tuotteesta ja upotetaan se Lugolin jodi-jodidiliuokseen.

Positiivinen reaktio: selvät vyöhykkeet bakteerikasvun alla tai ympärillä osoittavat, että tarkkelyksen hydrolyysiä on tapahtunut. Muu osa alustasta pysyy purppuranvärisenä.

— **Eskuliinin hydrolyysi** (Sneath & Collins, 1974)

Alusta:

Difco bacton peptonia	10 g
Eskuliinia	1 g
Rautasitraattia (Merck 3862)	0,05 g
Natriumsitraattia	1 g
Tislattua vettä	1 l

Liuetetaan sekoittaen ja jaetaan 6 ml kuhunkin putkeen.

Steriloidaan autoklaavissa 115 °C:ssa 10 minuutin ajan.

Alusta on kirkas, ja siinä on sinertävä fluoresenssi.

Positiivinen reaktio: eskuliinin hydrolyysiä osoittaa ruskean värin kehittyminen ja fluoresenssin häviäminen. Asian varmistamiseksi käytetään ultraviolettivaloa.

VIITTEET

- Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. *Rev. Pl. Path.*, 49, 213-218.
- Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. *EPPO Bull.* 14 (2), 147-152.
- Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: *Manual of methods for general bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
- Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J. Bact.*, 66, 24-26.
- Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. *EPPO Bull.*, No 17, 1987, pp. 1-10.
- Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature, Lond.*, 178, 703.
- Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. *J. appl. Bact.*, 29, 114-118.
- Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. appl. Bact.*, 29, 470-489.
- Lelliott, R. A. and P. W. Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Koth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. *EPPO Bull.*, 6 (2), 101-106.
- Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. *Mem. Cornell agric. Exp. Sta.*, 366, 52 pp.
- Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
- Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, 481-527.

LIITE II

- 1 Kaikissa epäillyissä esiintymistapauksissa, joissa on liitteessä I kuvatun menetelmän mukaisesti suoritettussa immunofluoresenssikokeessa todettu positiivinen reaktio, joka on varmistettu tai kumottu tällä menetelmällä, olisi säilytettävä ja varastoitava asianmukaisissa olosuhteissa kyseisen menetelmän loppuun saattamiseen asti:
 - kaikki mukulat tai kasvit, joista näyte on otettu, jos se on mahdollista,
 - ylimääräinen uute ja lisälevyt, jotka on valmistettu immunofluoresenssikokeita varten.
 - 2 Niissä tapauksissa, joissa organismin esiintyminen on varmistunut, olisi säilytettävä ja varastoitava asianmukaisissa olosuhteissa vähintään yhden kuukauden ajan 5 artiklan 2 kohdassa säädetyn ilmoitusmenetelyn jälkeen:
 - 1 kohdassa tarkoitettu aineisto,
 - munakoisonäyte, joka on saastutettu inokuloimalla mukula- tai kasviuutetta ja
 - organismin eristetty viljelmä.
-

LIITE III

- 1 Edellä 5 artiklan 1 kohdan b alakohdassa tarkoitettujen todennäköisen saastunnan laajuuden määrittämiseksi olisi otettava huomioon seuraavat tekijät:
 - mukulat tai kasvit, jotka on viljelty 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitetulla tuotantopaikalla,
 - tuotantopaikka (-paikat) tai tilat, jotka ovat tuotantojärjestelmässä yhteydessä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti saastuneiksi ilmoitettuihin mukuloihin tai kasveihin, mukaan lukien sellaiset mukulat tai kasvit, jotka joutuvat tekemisiin samojen välineiden tai tuotantotilojen kanssa välittömästi tai yhteisen yrittäjän välityksellä,
 - mukulat tai kasvit, jotka on tuotettu edellisessä luettelamakohdassa tarkoitettulla tuotantopaikalla (-paikoilla), tai jotka ovat mainituilla (mainituilla) paikalla (paikoilla) aikana, jolloin 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti saastuneiksi ilmoitetut mukulat tai kasvit olivat ensimmäisessä luettelamakohdassa tarkoitetuissa tiloissa tai tuotantopaikoissa.
 - keskusvarastot, joissa edellä mainituilta tuotantopaikoilta lähtöisin olevia perunoita on käsitelty,
 - kaikki laitteistot, ajoneuvot, säiliöt, varastot tai näiden osat sekä kaikki muut kohteet, mukaan lukien pakkaukset, jotka ovat voineet 12 edeltäneen kuukauden aikana tai muuna sopivana aikana olla kosketuksissa 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti saastuneiksi ilmoitettujen mukuloiden tai kasvien kanssa,
 - kaikki mukulat tai kasvit, jotka on varastoitu johonkin edellisessä luettelamakohdassa tarkoitetuista esineistä tai jotka ovat kosketuksissa sellaisen kanssa ennen kyseisten esineiden puhdistamista ja desinfiointia ja
 - 6 artiklassa tarkoitettujen kokeiden jälkeen mukulat tai kasvit, jotka ovat samaa kloonialkuperää kuin 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti saastuneiksi ilmoitetut mukulat ja kasvit, joiden osalta kokeet osoittavat, että saastunta on todennäköinen.
- 2 Edellä 5 artiklan 1 kohdan c alakohdassa tarkoitettujen mahdollisen leviämisen määrittämiseksi olisi otettava huomioon seuraavat tekijät:
 - muiden sellaisten tuotantopaikkojen läheisyys, joilla viljellään perunaa tai muita isäntäkasveja,
 - siemenperunoiden yhteinen alkuperä.
- 3 Yksityiskohtaisiin sääntöihin 5 artiklan 2 kohdan ensimmäisessä alakohdassa tarkoitettua ilmoittamisesta on kuuluttava:
 - kaikkien saastuneiksi ilmoitettujen perunalähetysten tai -erien osalta direktiivin 77/93/ETY 7 tai 8 artiklassa säädetyt todistukset, passin numero tai rekisterinumero, tapauksesta riippuen,
 - lajikenimitys siemenperunavarastojen osalta, ja jos mahdollista, myös kaikissa muissa tapauksissa,
 - ilmoitetun saastunnan tiedot ja rajoitetun alueen kuvaus,
 - maininta mahdollisesti saatavilla olevasta uutteesta, immunofluoresenssikokeita varten valmistetuista levyistä, saastuneesta munakoisonäytteestä ja kokeesta, jolla organismin esiintyminen on varmistettu, lähtöisin olevan organismin eristetystä viljelmästä.

LIITE IV

- 1 Edellä 7 artiklan 1 kohdassa tarkoitettujen virallisesti valvotut toimenpiteet 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti saastuneiksi ilmoitettujen mukuloiden tai kasvien poistamiseksi ovat:
 - teollinen käsittely toimittamalla suoraan ja välittömästi sellaiselle käsittelylaitokselle, jolla on käytettävissään asianmukaiset jätteidenhävitystilat ja -laitteet, joista on todettu, että minkäänlaista tunnistettavaa organismin leviämisaaraa ei ole, sekä järjestelmä, jolla varastotilat ja laitoksesta lähtevät ajoneuvot voidaan desinfioida,
 - muut toimenpiteet, joista ei todeta olevan tunnistettavaa organismin leviämisaaraa; nämä toimenpiteet on ilmoitettava komissiolle ja muille jäsenvaltioille.
- 2 Jäsenvaltioiden vastuussa olevien viranomaisten valvomaan asianmukaista 5 artiklan 1 kohdan b alakohdan mukaisesti todennäköisesti saastuneina pidettyjen mukuloiden tai kasvien 7 artiklan 2 kohdassa tarkoitettua käyttöä tai hävittämistä on:
 - niiden käyttö kulutukseen tarkoitettuina varastoperunoina, suoraan toimitukseen ja käyttöön valmiissa pakkauksissa, jotka eivät edellytä minkäänlaista uudelleen pakkaamista ja jotka on tarkoitettu suoraan toimitukseen ja käyttöön tai
 - niiden käyttö teolliseen käsittelyyn tarkoitettuina varastoperunoina, jotka toimitetaan suoraan ja välittömästi sellaiselle käsittelylaitokselle, jolla on käytettävissään asianmukaiset jätteidenhävitys- ja desinfiointitilat ja -laitteet tai
 - mikä tahansa muu käyttö tai hävittäminen, joka ei aiheuta tunnistettavaa organismin leviämisaaraa.
- 3 Asianmukaisten 7 artiklan 3 kohdassa tarkoitettujen kohteiden puhdistus- ja desinfiointimenetelmien on oltava sellaisia, joiden ei ole todettu aiheuttavan minkäänlaista tunnistettavaa organismin leviämisaaraa; niitä on käytettävä jäsenvaltioiden vastuussa olevien viranomaisten valvonnassa.
- 4 Jäsenvaltioiden 5 artiklan 1 kohdan c alakohdan mukaisesti toteamalla rajoitetulla alueella toteuttamiin ja 7 artiklan 4 kohdassa tarkoitettuihin toimenpiteisiin on kuuluttava seuraavat toimenpiteet:
 - 4.1 saastuneiksi 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti ilmoitetuilla tuotantopaikoilla:
 - a) saastuneeksi 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti ilmoitetulla pellolla:
 - i) — ilmoitettua saastunutta seuraavien vähintään kolmen markkinointivuoden aikana:
 - toteutetaan toimenpiteitä itsestään leviävien perunakasvien ja muiden itsestään kylväytyvien organismin isäntäkasvien hävittämiseksi,
 - yhtäkään perunan mukulaa, kasvia tai siementä, muuta itsestään kylväytyvää organismin isäntäkasvia eikä viljelystä, josta aiheutuu tunnistettavaa organismin säilymis- tai leviämisaaraa, ei istuteta eikä kylvetä kunnes on todettu vähintään kahden perättäisen markkinointivuoden aikana, että pellolla ei ole itsestään levinneitä perunakasveja,
 - edellisessä luetelmakohdassa tarkoitettua kautta seuraavan ensimmäisen perunoiden korjuukauden aikana virallisesti varmennettuja siemenperunoita istutetaan ainoastaan varastoperunoiden tuottamiseksi ja virallisia tutkimuksia suoritetaan 2 artiklan 1 kohdan mukaisesti,
 - edeltävässä luetelmakohdassa tarkoitettua kautta seuraavan perunoiden korjuukauden aikana ja sopivan viljelykierron jälkeen virallisesti varmennettuja siemenperunoita istutetaan siemenen tai varastoperunan tuottamiseksi ja virallisia tutkimuksia suoritetaan 2 artiklan 1 kohdan mukaisesti, tai
 - ii) — ilmoitettua saastunutta seuraavien neljän markkinointivuoden aikana:
 - toteutetaan toimenpiteitä itsestään leviävien perunakasvien ja muiden itsestään kylväytyvien organismin isäntäkasvien hävittämiseksi ja
 - pelto jätetään joko avokesannolle, jota pidetään yllä, tai pysyväksi laitumeksi, jolloin sitä joko niitetään usein ja matalaan tai laidunnetaan intensiivisesti,
 - edeltävässä luetelmakohdassa tarkoitettua kautta seuraavan ensimmäisen perunoiden korjuukauden aikana virallisesti varmennettuja siemenperunoita istutetaan siemenen tai varastoperunan tuottamiseksi ja virallisia tutkimuksia suoritetaan 2 artiklan 1 kohdan mukaisesti;

b) muilla pelloilla:

— todettua saastunutta seuraavan markkinointivuoden aikana:

- yhtään perunan mukulaa, kasvia tai siementä tai muuta itsestään kylväytyvää organismin isäntäkasvia ei istuteta tai kylvetä ja tarvittaessa toteutetaan toimenpiteitä itsestään kylväytyvien kasvien hävittämiseksi, tai
- istutetaan virallisesti varmennettuja siemenperunoita ainoastaan varastoperunan tuottamiseksi, jos toimivaltaisilla viranomaisilla on varmuus siitä, että itsestään levinneistä perunakasveista ja muista itsestään kylväytyvistä organismin isäntäkasveista ei ole vaaraa,

— edellisessä luetelmakohdassa tarkoitettua kautta seuraavien vähintään kahden markkinointivuoden aikana istutetaan ainoastaan virallisesti varmennettuja siemenperunoita siemenen tai varastoperunan tuottamiseksi,

— edellisissä kohdissa tarkoitettujen kunkin markkinointivuoden aikana toteutetaan toimenpiteitä itsestään levinneiden perunakasvien ja itsestään kylväytyvien organismin isäntäkasvien hävittämiseksi ja virallisia tutkimuksia suoritetaan 2 artiklan 1 kohdan mukaisesti,

— kun virallisesti varmennettua siemenperunaa istutetaan varastoperunan tuottamiseksi todettua saastunutta seuraavan markkinointivuoden aikana, kasvustot tarkastetaan sopivina ajankohtina ja itsestään kylväytyneet kasvit testataan organismin esiintymisen selvittämiseksi;

c) välittömästi 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisen saastunnan toteamisen jälkeen ja kaikkien seuraavien markkinointivuosien aikana ensimmäiseen a kohdassa esitettyjen yksityiskohtaisten sääntöjen mukaisesti hyväksytyyn perunan viljelykauteen asti ja kyseinen kausi mukaan lukien saastuneiksi todetuilla pelloilla kaikki aineisto ja tuotantopaikan varastotilat, jotka ovat yhteydessä perunan tuotantoon, puhdistetaan ja desinfioidaan tarvittaessa sopivin menetelmin 3 kohdan mukaisesti;

d) niissä tuotantojärjestelmissä, joissa kasvualueen vaihtaminen kokonaan on mahdollista:

- mukuloita, kasveja tai siemeniä saa istuttaa tai kylvää ainoastaan, jos tuotantoyksikkö on virallisessa valvonnassa olevien sellaisten toimenpiteiden alainen, joiden tarkoituksena on organismin ja kaikkien perunoiden tai muiden koisokasvien heimon kuuluvien kasvien hävittäminen, mukaan lukien vähintään kasvualueen vaihtaminen kokonaan sekä tuotantoyksikön ja kaikkien välineiden puhdistus ja desinfiointi, ja jos vastuussa olevat viranomaiset ovat tämän seurauksena hyväksyneet sen perunan tuotantoon,
- perunoita tuotetaan virallisesti varmennetuista siemenperunoista tai testatuista lähteistä lähtöisin olevista minimukuloista tai mikrokasveista.

4.2 Rajoittamatta 4.1 kohdassa lueteltujen toimenpiteiden soveltamista, jäsenvaltioiden on rajoitettuna alueen sisällä:

a) todetun saastunnan jälkeen ja vähintään kolmen kasvukauden ajan viipymättä:

- määrättävä vastuussa olevat viranomaiset valvomaan tiloja, joissa harjoitetaan perunan mukuloiden viljelyä, varastointia tai käsittelyä, sekä niiden yritysten tiloja, jotka käyttävät perunantuotannossa laitteita sopimuksen perusteella,
- vaadittava tarvittaessa näiden tilojen välineiden ja varastojen puhdistusta ja desinfiointia 3 kohdassa tarkoitetuilla asianmukaisilla menetelmillä,
- vaadittava, että ainoastaan varmennettua siementä istutetaan kyseisen alueen kaikilla viljelmillä,
- vaadittava, että kaikissa alueen yrityksissä siemenperuna ja varastoperuna käsitellään erillään,
- toteutettava viralliset tutkimukset 2 artiklan 1 kohdan mukaisesti;

b) laadittava tarvittaessa ohjelma kaikkien siemenperunavarastojen korvaamiseksi sopivan ajanjakson kuluessa.

Edellä olevan 4.2 kohdan mukaisesti toteutettavat toimenpiteet sekä tuottajien, rajoitetulla alueella sijaitsevien yhteisvarastojen ja lähetyskeskusten rekisterinumero on ilmoitettava vuosittain muille jäsenvaltioille ja komissiolle.