

31993L0085

1993.10.18.

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK HIVATALOS LAPJA

L 259/1

A TANÁCS 93/85/EGK IRÁNYELVE**(1993. október 4.)****a burgonya gyűrűs rothadása elleni védekezésről**

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK TANÁCSA,

kórokozója; mivel ez a betegség előfordult a Közösség egyes területein és néhány fertőzési forrás még mindig létezik;

tekintettel az Európai Gazdasági Közösséget létrehozó szerződésre és különösen annak 43. cikkére,

mivel a burgonyatermesztés jelentős kockázattal jár a Közösségben, ha nem születnek hatékony intézkedések a betegség lokalizálására és elterjedésének meghatározására, előfordulása és elterjedése megakadályozására, és ha a betegség előfordul, elterjedése megakadályozására és – felszámolás céljával – az ellene való védekezésre;

tekintettel a Bizottság javaslatára ⁽¹⁾,tekintettel az Európai Parlament véleményére ⁽²⁾,mivel ennek biztosítására bizonyos intézkedéseket kell tenni a Közösségen belül; mivel a növények vagy növényi eredetű termékek károsító szervezeteinek a tagállamokba történő behurcolása elleni védekezési intézkedésekről szóló, 1976. december 21-i 77/93/EGK tanácsi irányelvben ⁽⁴⁾ meghatározottakon túlmenően a tagállamoknak szükség esetén képesnek kell lenniük további vagy szigorúbb intézkedések meghozatalára, feltéve hogy ez nem hátráltatja a burgonya Közösségen belüli szállítását; mivel ezekről az intézkedésekről tájékoztatni kell a többi tagállamot és a Bizottságot;tekintettel az Európai Gazdasági és Szociális Bizottság javaslatára ⁽³⁾,

mivel a burgonyatermesztés fontos helyet foglal el a Közösség mezőgazdaságában; mivel a burgonyatermést folyamatosan veszélyeztetik a károsító szervezetek;

mivel a burgonya gyűrűs rothadása elleni védekezéséről szóló, 1980. június 24-i 80/665/EGK tanácsi irányelv ⁽⁵⁾ meghatározza a tagállamok számára a burgonya gyűrűs rothadása elleni minimális intézkedéseket;

mivel a burgonyatermesztésnek e károsítók elleni védekezéssel nemcsak a termelési kapacitást lehet fenntartani, hanem növelhető a mezőgazdasági termelékenység is;

mivel azóta jelentős mértékben nőttek a burgonya gyűrűs rothadásával kapcsolatos ismeretek, és fejlődés történt a burgonya gyűrűs rothadás kórokozójának felismerésében;

mivel a károsító szervezeteknek egy tagállam területére történő behurcolása elleni védekezési intézkedések csak korlátozottan hatásosak, amennyiben ezek ellen a károsítók ellen nem védekeznek egyidejűleg és módszeresen a Közösség egész területén és nem akadályozzák meg elterjedésüket;

mivel a közösségi növény-egészségügyi rendszernek a Közösségre mint belső határok nélküli területre való alkalmazása szükségessé tette a 80/665/EGK irányelv néhány rendelkezésének átvizsgálását és felülvizsgálatát;

mivel a burgonyában kárt okozó egyik károsító a *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., a burgonya gyűrűs rothadás betegségének

mivel ezen átvizsgálás eredményeként a 80/665/EGK irányelv rendelkezései nem bizonyultak elégségesnek és további intézkedések meghatározása szükséges;

⁽¹⁾ HL C 93., 1993.4.2., 12. o.⁽²⁾ HL C 176., 1993.6.28., 210. o.⁽³⁾ HL C 161., 1993.6.14., 18. o.⁽⁴⁾ HL L 26., 1977.1.31., 20. o. A legutóbb a 92/103/EGK bizottsági irányelvvel (HL L 363., 1992.12.11., 1. o.) módosított irányelv.⁽⁵⁾ HL L 180., 1980.7.14., 30. o.

mivel ebben a helyzetben a 80/665/EGK irányelvet hatályon kívül kell helyezni és a szükséges intézkedéseket el kell fogadni;

mivel az intézkedéseknek figyelembe kell venniük elsősorban azt, hogy a betegség látens és észrevétlen maradhat mind a fejlődő növényekben, mind pedig a raktározott burgonyagumókban, és így csak a fertőzéstől mentes vetőburgonya előállításával és felhasználásával lehet ellene hatékonyan védekezni, és másodsorban azt, hogy a lokalizáláshoz rendszeres hivatalos felmérések szükségesek; mivel nem a kórokozónak a fejlődésben lévő növényben való elterjedése a legfontosabb tényező, hanem az, hogy a kórokozó árvalakésű burgonyanövényben áttelel, és ezek az egyik évszakról a másikra átvitt fertőzés legjelentősebb forrásai; mivel a kórokozó leginkább úgy terjed el, hogy a burgonya fertőzött burgonyával vagy olyan palántázó-, betakarító- és kezelőszközökkel vagy szállító- és tárolókonténerekkel érintkezik, amelyek korábban fertőzött burgonyával érintkeztek, és így megfertőződtek; mivel ezek a fertőzött tárgyak a fertőzést követően egy ideig még fertőzőek maradhatnak; mivel a kórokozó elterjedése csökkenthető vagy megelőzhető ezeknek a tárgyaknak a fertőtlenítésével; mivel a vetőburgonya bármilyen ilyen fertőzése a kórokozó elterjedésének súlyos veszélyével fenyeget;

mivel ezen általános intézkedések részletes meghatározása, valamint a tagállamok által hozott, a kórokozónak a területükre történő behurcolását megelőző, további vagy szigorúbb intézkedések meghatározása céljából kívánatos a szoros együttműködés a Bizottsággal a Növény-egészségügyi Állandó Bizottság (a továbbiakban: „a bizottság”) keretein belül,

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

1. cikk

Ez az irányelv a tagállamokban a burgonya gyűrűs rothadását okozó *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. (a továbbiakban: „a károsító”) ellen meghozandó intézkedésekre vonatkozik, azzal a céllal, hogy:

a) a károsítót lokalizálni lehessen, és meg lehessen határozni elterjedését;

b) meg lehessen előzni előfordulását és terjedését; és hogy

c) felfedezése esetén elterjedését meg lehessen előzni és a felszámolás céljával ellene védekezni lehessen.

2. cikk

(1) A tagállamok területükről származó burgonyagumókon, és szükség esetén a burgonyanövényeken (*Solanum tuberosum* L.) a károsítóra vonatkozó rendszeres hivatalos felméréseket végeznek, hogy megerősítsék annak hiányát.

Ezekhez a felmérésekhez burgonyagumók esetében, lehetőleg raktári tételből származó vetőburgonyából és más burgonyából kell mintát venni, és hatósági vagy hatóságilag felügyelt laboratóriumban, az I. mellékletben meghatározott, a károsítóra vonatkozó észlelő és diagnosztizáló módszer alapján kell megvizsgálni. Továbbá, amennyiben szükséges, további hatósági vagy hatóságilag felügyelt szemrevételezés végezhető más minták gumóinak felvágásával.

Növények esetén ezeket a felméréseket megfelelő módszerek szerint végzik, és a mintákat megfelelő hatósági vagy hatóságilag felügyelt vizsgálatoknak vetik alá.

A minták számát, származását, rétegzettségét és begyűjtésének idejét a 77/93/EGK irányelv értelmében illetékes hivatalos szervek határozzák meg megalapozott tudományos és statisztikai elvek, illetve a károsító biológiája alapján, figyelembe véve az érintett tagállam burgonyatermesztési rendszereit. Ezek részleteit évente eljuttatják a többi tagállamhoz és a Bizottsághoz, hogy a tagállamok között biztosítsák a károsító hiányának megerősítésére vonatkozó összehasonlítható biztosítékszinteket.

(2) Az (1) bekezdésben meghatározott hivatalos felmérések eredményeit évente legalább egyszer közlik a többi tagállammal és a Bizottsággal. A jelentésben szereplő adatok bizalmasak. Az adatok a 77/93/EGK irányelv 16a. cikkében szabályozott eljárásnak megfelelően nyújthatók be a Bizottsághoz.

(3) Az alábbi rendelkezéseket a 77/93/EGK irányelv 16a. cikkében szabályozott eljárásnak megfelelően kell meghozni:

– a fenti (1) bekezdésben meghatározott azon felmérések részletei, amelyeket a megalapozott tudományos és statisztikai elvek alapján kell elvégezni,

– a fenti (2) bekezdés szerinti jelentés részletei.

(4) Az alábbi rendelkezéseket a 77/93/EGK irányelv 16a. cikkében szabályozott eljárásnak megfelelően valósítják meg:

- a fenti (1) bekezdés harmadik albekezdése szerinti felmérések és vizsgálatok megfelelő módszere.

3. cikk

A tagállamok biztosítják, hogy a károsító feltételezett előfordulását vagy bizonyított jelenlétét a burgonyanövényen és gumókon, vagy a területükön betakarított, tárolt vagy forgalomba hozott gumókon a saját illetékes hivatalos szerveiknek jelentik.

4. cikk

(1) A feltételezett előfordulás esetén annak a tagállamnak az illetékes hivatalos szervei, amelyben ezen eseteket jelentették, biztosítják a hatósági vagy hatóságilag felügyelt laboratóriumi vizsgálatok elvégzését az I. melléklet szerinti módszer alapján, illetve a II. melléklet 1. pontja szerinti feltételeknek megfelelően a feltételezett előfordulás megerősítése vagy cáfolása céljából. Az előbbi esetre a II. melléklet 2. pontjában meghatározott követelmények vonatkoznak.

(2) Az (1) bekezdés szerinti feltételezett előfordulás megerősítéséig vagy megcáfolásáig azokban a feltételezett előfordulási esetekben, amikor:

- a betegség feltételezett látható tünetei voltak láthatók; vagy
- az I. mellékletben meghatározott immunofluoreszcens teszt vagy egyéb megfelelő vizsgálat eredménye pozitív;

a tagállamok illetékes hivatalos szervei:

- megtiltják az összes olyan tételnek vagy szállítmánynak a mozgását, amelyekből a mintákat vették, kivéve ha ezeket ellenőrzésük alatt tartották, és feltéve hogy megállapítást nyert, hogy a károsító elterjedésének nincsen azonosítható kockázata;
- lépéseket tesznek a feltételezhető előfordulás forrásának felkutatására;
- a becsült kockázati szintet alapul véve további megfelelő óvintézkedéseket tesznek, hogy megakadályozzák a károsító elterjedését. Ezek az intézkedések kiterjedhetnek az összes gumó vagy növény szállításának ellenőrzésére a feltételezett előfordulással kapcsolatos helyiségekben vagy azokon kívül.

(3) Az alábbi rendelkezések a 77/93/EGK irányelv 16a. cikkében meghatározott eljárással összhangban fogadhatók el:

- a fenti (2) bekezdés c) pontjában hivatkozott intézkedések.

(4) Az alábbi rendelkezések a 77/93/EGK irányelv 16a. cikkében meghatározott eljárással összhangban fogadhatók el:

- a fenti (2) bekezdés ii. pontjában megállapított egyéb megfelelő vizsgálatok.

5. cikk

(1) Amennyiben az I. melléklet szerinti eljárást alkalmazó hatósági vagy hatóságilag felügyelt laboratóriumi vizsgálat megerősíti a gumók vagy a növények vagy a növényi részek mintájában a károsító jelenlétét, a tagállam illetékes hivatalos szervei, a megalapozott tudományos elvekre, a károsító biológijára és a tagállam termelési, marketing- és feldolgozási rendszereire tekintettel:

- fertőzöttnek nyilvánítják azokat a gumókat vagy növényeket, szállítmányokat és/vagy tételt, és gépeket, járműveket, edényeket, raktárakat vagy azok egységeit, illetve minden tárgyat, a csomagolóanyagokat is ideértve, amelyekből a mintát vették és amennyiben szükséges, azokat a termőhelye(ke)t és a táblá(ka)t, ahonnan a gumókat vagy növényeket betakarították;
- a III. melléklet 1. pontja rendelkezéseinek figyelembevételével megállapítják a fertőzés valószínűsíthető mértékét, amely a betakarítás előtti vagy utáni érintkezés miatt vagy amiatt jött létre, hogy termelési kapcsolat áll fenn a meghatározott fertőzéssel;
- a III. melléklet 2. pontjának rendelkezéseit figyelembe véve az a) pontban meghatározott fertőzés b) pont szerinti valószínűsíthető mértéke, és a károsító lehetséges elterjedése alapján egy övezetet jelölnek ki.

(2) A tagállamok a III. melléklet 3. pontjának rendelkezéseivel összhangban haladéktalanul értesítik a többi tagállamot és a Bizottságot bármilyen, az (1) bekezdés a) pontjában meghatározott fertőzésről és az (1) bekezdés c) pontja szerinti övezet kijelölésének részleteiről.

Ezen értesítés részletei bizalmasak. Az értesítések a 77/93/EGK irányelv 16a. cikkében meghatározott eljárással összhangban nyújthatók be a bizottsághoz.

(3) A (2) bekezdés szerinti értesítés és az abban szereplő adatok eredményeként, az értesítésben szereplő többi tagállam szükség esetén az (1) bekezdés a), b) és c) pontjával összhangban megállapítja a fertőzést, meghatározza a valószínűsíthető fertőzés mértékét és egy övezetet jelöl ki.

6. cikk

A tagállamok előírják, hogy amennyiben a gumókat vagy növényeket az 5. cikk (1) bekezdésének a) pontja szerint fertőzöttnek nyilvánították, a 4. cikk (1) bekezdése szerinti vizsgálatot kell végezni azokon a burgonyakészleteken, amelyek klonális rokonságban vannak a fertőzésben érintettekkel. A vizsgálatot annyi ilyen gumón és növényen végzik el, amennyi szükséges a fertőzés valószínűsíthető elsődleges forrásának és a fertőzés valószínűsíthető mértékének meghatározásához, lehetőleg a kockázat mértéke által meghatározott sorrendben.

A vizsgálatok eredményeként az 5. cikk (1) bekezdésének a), b) és c) pontjának megfelelő módon a fertőzés további meghatározására, a valószínűsíthető fertőzés mértékének megállapítására és övezetkijelölésre kerül sor.

7. cikk

(1) A tagállamok előírják, hogy az 5. cikk (1) bekezdésének a) pontja szerint fertőzöttnek nyilvánított gumók vagy növények nem ültethetők el, valamint az illetékes hivatalos szerveik ellenőrzésével:

- megsemmisítésre kerülnek, vagy
- a IV. melléklet 1. pontjának rendelkezéseivel összhangban levő, hatóságilag felügyelt intézkedéssel/intézkedésekkel valamilyen más módon ártalmatlanításra kerülnek, feltéve hogy megállapítást nyer, hogy a károsító elterjedésének nincs azonosítható kockázata.

(2) A tagállamok előírják, hogy az 5. cikk (1) bekezdésének b) pontja alapján valószínűsíthetően fertőzöttnek nyilvánított gumók vagy növények nem ültethetők el, és – a klonális rokonságban lévő készleteken elvégzendő 6. cikk szerinti vizsgálat eredményének sérelme nélkül – az illetékes hivatalos szerveik ellenőrzésével a IV. melléklet 2. pontjában meghatározott felhasználásra vagy ártalmatlanításra kerülnek olyan módon, hogy megállapítható, hogy a károsító elterjedésének nincs azonosítható kockázata.

(3) A tagállamok előírják, hogy az 5. cikk (1) bekezdésének a) pontja szerint fertőzöttnek vagy b) pontja alapján valószínűsíthetően fertőzöttnek nyilvánított bármilyen gép, jármű, edény, tároló vagy azok egységei, illetve bármilyen más tárgy, beleértve a csomagolóanyagot is, megsemmisítésre vagy tisztításra és fertőtlenítésre kerülnek az IV. melléklet 3. pontjában meghatározott megfelelő módszerekkel. A fertőtlenítés követően ezek a tárgyak nem minősülnek fertőzöttnek.

(4) Az (1), (2) és (3) bekezdés szerint végrehajtott intézkedések sérelme nélkül a tagállamok előírják, hogy az 5. cikk (1) bekezdésének c) pontja szerint kijelölt övezetben a IV. melléklet 4. pontja szerinti intézkedéssorozatot kell végrehajtani.

8. cikk

(1) A tagállamok előírják, hogy a vetőburgonyának meg kell felelnie a 77/93/EGK irányelv követelményeinek, és közvetlenül egy olyan, hatóságilag jóváhagyott programban megszerzett anyagból kell származnia, amelyet az I. melléklet által előírt hatósági vagy hatóságilag felügyelt vizsgálatban a károsítótól mentesnek találtak.

A fenti vizsgálatot:

- amennyiben a fertőzés érinti a vetőburgonya termelését, a kezdeti klónszelekció növényein,
- más esetekben pedig vagy a kezdeti klónszelekció növényein, vagy a vetőburgonya reprezentatív mintáin, vagy a korábbi szaporításokon

kell elvégezni.

(2) Az alábbi rendelkezéseket a 77/93/EGK irányelv 16a. cikkében meghatározott eljárással összhangban kell elfogadni:

- e cikk (1) bekezdése második albekezdésének első francia bekezdése végrehajtásának részletes szabályai,
- e cikk (1) bekezdése második albekezdésének második francia bekezdése szerinti reprezentatív mintákra vonatkozó szabályok.

9. cikk

A tagállamok megtiltják a károsító tartását és kezelését.

10. cikk

A 77/93/EGK irányelv rendelkezéseinek sérelme nélkül a tagállamok eltéréseket engedélyezhetnek ezen irányelv 6., 7. és 9. cikkében meghatározott intézkedésektől kísérleti vagy tudományos célú és fajtaszelekciós tevékenység céljából, feltéve hogy ezek az eltérések nem sértik a károsító ellenőrzését és nem fenyegetnek a károsító elterjedésével.

11. cikk

A tagállamok, ha szükséges, a károsító elleni védekezés kapcsán vagy elterjedésének megakadályozására további, illetve szigorúbb intézkedéseket fogadhatnak el, amennyiben azok összhangban vannak a 77/93/EGK irányelv rendelkezéseivel.

Az első albekezdésben említett további rendelkezések kiterjedhetnek annak előírására, hogy csak olyan vetőburgonya ültethető, amely hivatalos tanúsítvánnyal rendelkezik, vagy amelyet hivatalosan megvizsgáltak a tekintetben, hogy megfelelnek az előírt növény-egészségügyi követelményeknek. Ez utóbbi különösen arra az esetre vonatkozhat, mikor a termelők a saját birtokukon jogosultak a saját termésből származó vetőburgonya használatára, illetve egyéb olyan esetekre, amikor saját termelésű vetőburgonyát ültetnek.

Ezen intézkedések részleteiről tájékoztatják a többi tagállamot és a Bizottságot.

12. cikk

Ezen irányelv mellékleteinek módosításai a tudományos vagy technikai ismeretek fejlődésére való tekintettel a 77/93/EGK irányelv 16a. cikkében meghatározott eljárással összhangban fogadhatók el.

13. cikk

(1) A tagállamok legkésőbb 1993. november 15-ig elfogadják és kihirdetik azokat a rendelkezéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ennek az irányelvnek megfeleljenek. Erről haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot.

Amikor a tagállamok elfogadják ezeket az intézkedéseket, azokban hivatkozni kell erre az irányelvre, vagy azokhoz hivatalos kihirdetésük alkalmával ilyen hivatkozást kell fűzni. A hivatkozás módját a tagállamok határozzák meg.

A tagállamok ezeket a rendelkezéseket 1993. november 16-tól alkalmazzák.

(2) A tagállamok haladéktalanul közlik a Bizottsággal nemzeti joguknak azokat a rendelkezéseit, amelyeket az ezen irányelv által szabályozott területen fogadnak el. A Bizottság tájékoztatja erről a többi tagállamot.

14. cikk

A 80/665/EGK irányelv 1993. november 16-tól kezdődően hatályát veszti.

15. cikk

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

Kelt Luxembourgban, 1993. október 4-én.

a Tanács részéről
az elnök
W. CLAES

I. MELLÉKLET

A GYŰRŰS ROTHADÁS BAKTÉRIUM, A CLAVIBACTER MICHIGANENSIS (Smith) Davis et al. ssp. SEPEDONICUS (Spieckermann et Kotthof) Davis et al. KIMUTATÁSÁNAK ÉS A DIAGNÓZIS KÉSZÍTÉSÉNEK MÓDSZERE BURGONYAGUMÓKBAN

1. A burgonyagumó csúcsainak eltávolítása

- 1.1. Mosson meg 200 gumót folyó csapvíz alatt, és egy szokásos módon fertőtlenített szikével vagy burgonyahámozóval távolítsa el a gumók csúcsai körül található epidermiszt; a fertőtlenítés történhet úgy, hogy a hámozót 70 %-os etanolba mártja, majd lángba tartja.
- 1.2. A gumó csúcsairól egy késsel vagy burgonyahámozóval óvatosan válasszon le kúpos szövetdarabokat. A felesleges, edénynyalábrendszer nélküli szövetet minimalizálja. A gumók sarkait eltávolításuk után 24 órán belül fel kell dolgozni (lásd a 3. pontot) vagy $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on kell tartósítani két hétnél nem hosszabb időre.

2. A gyűrűs rothadás tüneteinek szemrevételezése

A csúcsok eltávolítása után keresztirányban vágja fel mindegyik gumót, és vizsgálja meg, hogy felfedezhető-e a gyűrűs rothadás tünete.

Szorítsa össze a gumókat és figyelje meg, hogy a macerált szövetek kipréselődnek-e az edénynyalábszövetből.

A legkorábbi tünet az, amikor a szövet enyhén üvegesedik vagy áttetszővé válik anélkül, hogy az edénynyalábrendszer körül meglágyulna, különösen a csúcsok közelében. A csúcsnál lévő edénynyalábgűrű színe a normálnál kissé sötétebb lehet. Az első azonnal felismerhető tünet az edénynyalábgűrű sárgás elszíneződése és az, ha a gumó enyhe összeszorításával az edényekből sajtyszerű anyag válik ki. Ez a váladék milliányi károsítót tartalmaz. Ebben a szakaszban az edénynyalábszövet már barnássá válhat. Először ezek a tünetek csak a gyűrű egy részére korlátozódhatnak, nem feltétlenül a csúcs közelében, aztán fokozatosan elterjednek az egész gyűrűre. Ahogy a fertőzés terjeszkedik, elpusztítja az edénynyalábszövetet; a külső kéreg elkülönülhet a belső kéregtől. A fertőzés előrehaladott fázisaiban repedések jelennek meg a gumón, amelyek gyakran vörösesbarnák a széleken. A tüneteket másodlagos gomba- vagy baktériumfertőzés fedheti el, és az előrehaladott gyűrűs rothadás tüneteit nehéz, hacsak nem lehetetlen megkülönböztetni a többi gumórothadástól.

3. Minták előkészítése a Gram-féle festési eljáráshoz, az immunofluoreszcens festési eljáráshoz (IF) és a padlizsánvizsgálathoz

- 3.1. Homogenizálja a gumók csúcsait, a teljes maceráció eléréséig, olyan oldószerben, amelyről ismeretes, hogy $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -nál alacsonyabb hőmérsékleten nem mérgező a *Corynebacterium sepedonicum*-ra (például 0,05 M foszfát puffertartalmú só oldat (PBS) pH 7,0); javasolt egy nem mérgező diszpergálószer hozzáadása és szükség lehet egy nem mérgező habzásgátló szerre (1. és 2. függelék). Kerülje a túlzott macerációt.
- 3.2. Az alábbi módszerek egyike segítségével vonja ki a károsítókat a homogén anyagból⁽¹⁾:
- A. a) Centrifugálja az anyagot legfeljebb 180 g-vel 10 percig.
b) A felül úszó anyagot centrifugálja legalább 4 000 g-vel 10 percig. Szűrje le és öntse ki az uszadékot.
- B. a) A macerált anyagot hagyja állni 30 percig, hogy a szövettörmelék leülepedjen. Az üledék felkavarása nélkül szűrje le a felül úszó anyagot.
b) Vákuumos vízszivattyú segítségével szűrje át a felül úszó anyagot zsugorított üvegszűrőn (No 2 = 40–100 μm) tartott szűrőpapírral (Whatman 1). Gyűjtse össze a szűrletet egy centrifugacsőbe. Mossa ki a szűrőt steril PBS-szel úgy, hogy a szűrlet maximum 35 ml térfogatú legyen.
c) Centrifugálja a szűrletet legalább 4 000 g-vel 20 percig.
- 3.3. Szuszpendálja a pelletet 0,01 M steril foszfát-pufferben (pH 7,2) (2. függelék), hogy összesen 1 ml folyadékot kapjon. Ossza két egyenlő részre, és az egyik részt tegye el referenciacélokra úgy, hogy lefagyaszta $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletre⁽²⁾ vagy liofilizálja. A másik részt felelje meg, az egyik részt használja az IF vizsgálathoz és a Gram-féle festési eljáráshoz, a másikat a padlizsánvizsgálathoz.

⁽¹⁾ A kivonás egyik alternatív módszerét Dinesen adja meg, 1984.

⁽²⁾ Bizonyított (Janse és Van Vaerenberg, 1987), hogy a fagyasztás csillapíthatja a *Corynebacterium sepedonicum* életképességét. A pellet 10 % glicerinben történő szuszpendálása megoldhatja ezt a problémát.

- 3.4. A fertőzés elkerüléséhez elengedhetetlen, hogy az összes pozitív *C. sepedonicum*-kontrollt és mintát külön kezelje. Ez vonatkozik az IF tárgylemezre és a padlizsánvizsgálatokra is.
4. *Gram-féle festési eljárás*
- 4.1. Készítse el a Gram-féle festett mintát az összes pelletoldathoz (5.2.1.) és minden olyan felvágott gumóhoz (2.), amelyen üvegedés, rothadás vagy egyéb valószínűsíthető tünetek mutatkoznak. A mintákat a megbetegedett szövetek széléről kell venni.
- 4.2. Készítsen Gram-féle festett mintát az ismert *C. sepedonicum*-tenyészetekhez, és amennyiben lehetséges, a természetesen fertőződött szövethez (5.1.).
- 4.3. Állapítsa meg, melyik minta tartalmaz jellegzetes Gram-pozitív corynebacterium sejteket. A *C. sepedonicum* sejtek rendszerint 0,8–1,2 µm hosszúak és 0,4–0,60 µm szélesek.

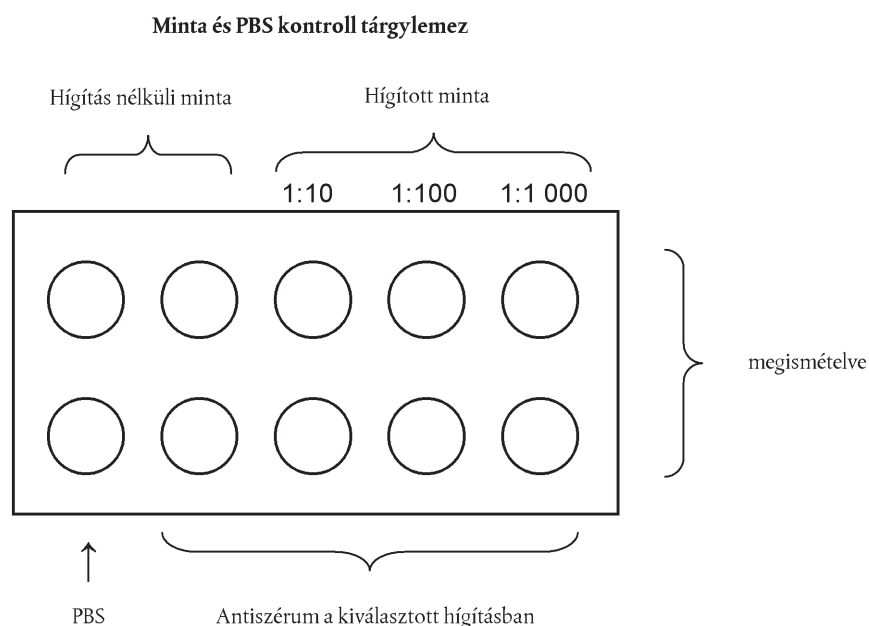
A megfelelő festési eljárás leírása a 3. függelékben található.

A természetes fertőzésekből vagy frissen izolált tenyészetekből készített preparátumokban gyakran a koccoid pálcikák túlsúlya figyelhető meg, amelyek rendszerint valamelyest kisebbek, mint a többi táptalajos tenyészetekből származó sejtek. A legtöbb táptalajon a *C. sepedonicum* sejtek többalakú corynebacterium pálcikák, amelyek különböző Gram-reakciót mutathatnak. A sejtek külön, az elhajló részre jellemző „könyökkel” párban, illetve esetenként csoportokban fordulnak elő, amelyeket gyakran rácsnak vagy kínai betűnek neveznek.

5. Minta az IF vizsgálatra

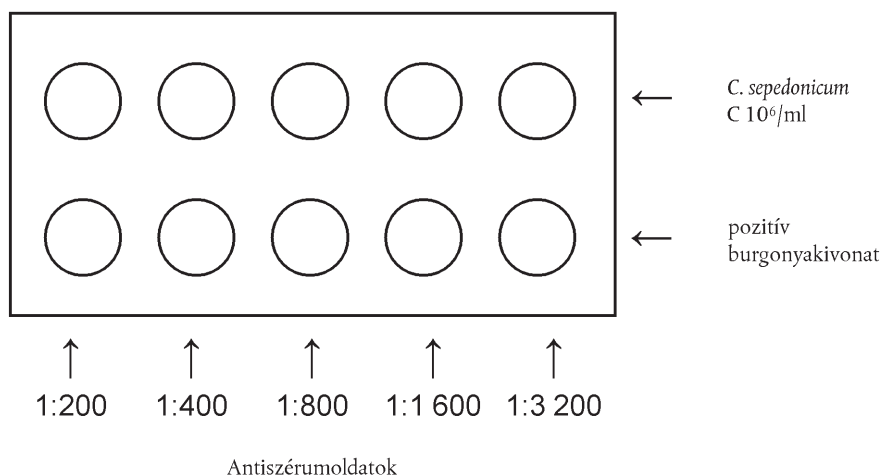
- 5.1. Adjon antiszérumot egy ismert *C. sepedonicum* törzshöz – ATCC 33113 (NCPBP 2137) vagy NCPBP 2140. Ennek az IF keverési aránya több mint 1:600. A tesztárgylemezre helyezzen egy PBS kontrollt is, hogy meg lehessen állapítani, hogy a konjugált nyúl antiszérum páros (FITC) konjugátum nem specifikusan keveredik-e a baktériumsejtekkel. Homológ antigén kontrollként a *Corynebacterium sepedonicum*-ot (ATCC 33113 (NCPBP 2137), NCPBP 2140) kell használni egy külön tárgylemezen. A természetesen fertőződött (lío-filizálással vagy – 20 °C-ra történt fagyasztással tartósított) szövetet, amikor lehetséges, hasonló kontrollként kell használni ugyanazon a tárgylemezen (2. ábra).
- 5.2. *Eljárás*
- 5.2.1. Készítsen az utolsó pelletből desztillált vízben három sorozat tízszeres oldatot (10^1 , 10^2 , 10^3) (1. ábra).
- 5.2.2. Az egyes pelletoldatokból vagy a *C. sepedonicum* szuszpenzióiból megközelítőleg 10^6 sejt/ml mennyiséget csöp-pentsen pipettával az 1. ábrán látható többpontos tárgylemezre, vagyis annyi mért, normál térfogatú folyadékot, amely elegendő az egyes ablakok lefedéséhez (megközelítőleg 25 µl).

1. ábra



2. ábra

Pozitív kontroll tárgylemezt



- 5.2.4. Fedje le megfelelően az ablakokat az ajánlott hígítású *C. sepedonicum* antiszérummal, 0,01 M PBS pH 7,2 (2. függelék), az 1. ábra szerint. (Az FITC kontrollhoz használjon PBS-t.) A használható antiszérum-hígítás megközelítőleg a fele az IF koncentrációnak. Amennyiben más antiszérum-koncentrációkat is használni fog, különálló tárgylemezeket kell készíteni minden használandó koncentrációhoz.
- 5.2.5. Inkubáljon nedves kamrában szobahőmérsékleten 30 percig.
- 5.2.6. Alaposan öblítsen 7,2 pH értékű 0,01 M PBS-oldattal. Öt percen keresztül háromszori cserével mosson 7,2 pH értékű 0,01 M PBS-oldattal.
- 5.2.7. Óvatosan távolítsa el a felesleges nedvességet.
- 5.2.8. Fedje le az egyes ablakokat a hígítási fok meghatározására használttal azonos hígítású FITC-vel és sötét, nedves kamrában szobahőmérsékleten 30 percig inkubáljon.
- 5.2.9. Öblítsen és mosson ugyanúgy, mint az előbb.
- 5.2.10. Adjon az egyes ablakokra 5–10 µl 0,1 M 7,6 pH értékű foszfát pufferelt glicerint (vagy hasonló, legalább 7,6 pH értékű ragasztót) és fedje le takaró üveglappal (2. függelék).
- 5.2.11. Egy epifluoreszcens fényforrással rendelkező és az FITC-vel való használathoz alkalmas szűrőkkel felszerelt mikroszkóppal vizsgálja meg a tárgylemezt. A 400–1 000-szeres nagyítás megfelelő. Pásztázzon végig az ablakok fölött két átmérő mentén derékszögben és az ablak kerülete mentén.

Vizsgálja meg a fluoreszkáló sejteket a pozitív kontrollban és határozza meg a koncentrációt. Vizsgálja meg a fluoreszkáló sejteket az FITC/PBS kontrollablakban, és amennyiben nem láthatók, lépjen tovább az ablakokra. Legalább 10 mikroszkóp látómezőnyi területen határozza meg az alaktanilag jellemző fluoreszkáló sejtek mezőnkénti középértékét és számítsa ki a hígítatlan pellet ml-enkénti számát. (4. függelék).

Az immunofluoreszcencia vizsgálat számos problémával jár.

- A burgonyapelletekben nagy valószínűséggel előfordul a fluoreszkáló sejtek háttér-populációja, amely atipikus alaktanilag jellemzőkkel rendelkezik, és keresztreakcióba lép olyan szaprofita baktériumokkal, amelyek mérete és alakja hasonló a *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*-éra. Csak a méretében és alaktanilag tipikus fluoreszkáló sejtekkel foglalkozzon.

A keresztreakciók lehetősége miatt a pozitív immunofluoreszcens tesztet mutató mintákat más antiszérummal is meg kell vizsgálni.

- Ennél a módszernél a kimutatás technikai korlátja a 10^3 – 10^4 sejt/ml hígítatlan pellet érték körül van. Azok a minták, amelyek az IF tipikus sejtekből a kimutatási határ körüli mennyiséget tartalmaznak a *C. m. spp. sepedonicum* tekintetében rendszerint negatív eredményt mutatnak, de elvégezhető rajtuk a padlizsánvizsgálat.

Az immunofluoreszcens teszt eredménye abban az esetben negatív, ha nem fordulnak elő alaktanilag tipikus fluoreszkáló sejtek. A minták ekkor *Clavibacter michiganensis* spp. *sepedonicus*-szal „nem fertőzött”-nek minősülnek.

A padlizsánvizsgálatra nincsen szükség.

Az immunofluoreszcens teszt eredménye abban az esetben pozitív, ha bármelyik mintán alaktanilag tipikus fluoreszkáló sejtek találhatók.

Azok a minták, ahol mindkét antiszérummal pozitív lett az immunofluoreszcens teszt eredménye, a *Clavibacter michiganensis* spp. *sepedonicus*-szal „valószínűsíthetően fertőzött”-nek minősülnek.

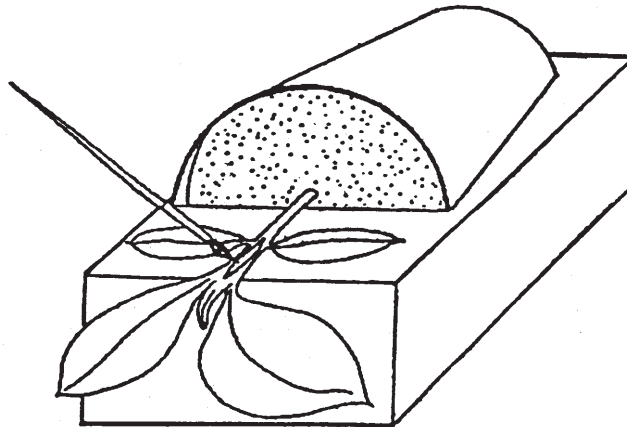
A padlizsánvizsgálat elvégzésére minden valószínűsíthetően fertőzöttnek minősülő minta esetében szükség van.

6. Padlizsánvizsgálat

A tenyészet adatait lásd az 5. függelékben.

- 6.1. Ossa szét a 3.3. pont szerinti pelletet legalább 25 darab 3 leveles stádiumban levő (5. függelék) padlizsánnövény között, az alábbi (6.2., 6.3. vagy 6.4.) módszerek valamelyikének felhasználásával:
- 6.2. *Hasításos beoltás I.*
 - 6.2.1. Támassza fel a cserepeket vízszintesen (kemény polisztirol tömb, amelynek valamelyik felületéből kivágtak egy 5 cm mély × 10 cm széles × 15 cm hosszú darabot (3. ábra) megfelelő egy 10 cm-es cseréphez). A polisztirol tömb és minden egyes vizsgált minta töve közé egy-egy steril alufólia csíkot kell helyezni. A növény rögzítéséhez egy, a polisztirol tömb köré csavart gumipánt használható.
 - 6.2.2. A sziklevek és az első levél között szikével készítsen egy hosszanti vagy kissé átlós 0,5–1,0 cm hosszú bevágást, amely megközelítőleg olyan mély, mint a szár átmérőjének háromnegyede.
 - 6.2.3. A szike pengéjének hegyével tartsa szétnyitva a vágást és egy, a pelletbe mártott szemkihúzó ecsettel vagy vékony festőecsettel kenje bele az oltóanyagot. A maradék pelletet ossza el a padlizsánok között.
 - 6.2.4. Egy 2 ml-es fecskendő segítségével a vágást zárja le steril vazelinnel.

3. ábra



- 6.3. *Hasításos beoltás II.*
 - 6.3.1. A növényt két ujj közé fogva pipettával cseppentsen egy csepp (megközelítőleg 5–10 µl) szuszpendált pelletet a sziklevek és az első levél közé.
 - 6.3.2. Egy steril szikét használva a pelletcsepptől kezdve készítsen egy 1,0 cm hosszú átlós vágást (megközelítőleg 5°-os szögben), amely olyan mély, mint a szár vastagságának kétharmada.
 - 6.3.3. Egy fecskendő segítségével zárja le a vágást steril vazelinnel.
- 6.4. *Fecskendő beoltás*
 - 6.4.1. A beoltást megelőzően egy napig ne öntözze a padlizsánt, hogy csökkentse a turgornyomást.

- 6.4.2. Egy (23 G-nél nem kisebb) injekciós tűvel ellátott fecskendő segítségével oltsa be a padlizsánt közvetlenül a sziklevelek felett. Ossa szét a pelletet a padlizsánok között.
- 6.5. Oltson be 25 növényt egy ismert *C. sepedonicum*-tenyészettel, és amennyiben lehetséges, a természetesen fertőződött gumók szövetét (5.1.) is ugyanazzal az oltási módszerrel (6.2., 6.3. vagy 6.4.).
- 6.6. Oltson be 25 növényt 0,05 M steril PBS-szel ugyanazzal az oltási módszerrel (6.2., 6.3. vagy 6.4.).
- 6.7. 40 napon keresztül megfelelő körülmények között inkubálja a növényeket (5. függelék). Nyolc nap múlva ellenőrizze rendszeresen a tüneteket. Számolja meg azokat a növényeket, amelyeken jelentkeznek a tünetek. A *C. sepedonicum* a levelek hervadását okozza a padlizsánon, amely a szélek, illetve az érközi rész lágyulásával kezdődik. A hervadt szöveten kezdetben sötétzöld vagy márványos foltok találhatóak, de ez nekrotizálódás előtt halványul. Az érközi hervadás gyakran zsíros, vízáztatta megjelenésű. A nekrotikus szövet szélei gyakran világossárgák. A növények nem feltétlenül pusztulnak el; minél hosszabb idő alatt fejlődnek ki a tünetek, annál nagyobb a túlélési esély. A növények kiheverhetik a fertőzést. A sérülékeny fiatal padlizsán érzékenyebb a *C. sepedonicum* alacsony populációjára, mint az idősebb, ezért van szükség arra, hogy a 3 leveles fázisban levő vagy közvetlenül az előtt álló növényeket használjunk.

A hervadást a gumó pelletben jelen lévő más baktériumok vagy gombák is kiválthatják. Ezek az *Erwinia carotovora*, subsp. *carotovora* és *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata*, valamint a szaprofita baktériumok nagy populációi. A hervadás tünetei megkülönböztethetők a *C. sepedonicum* által okozott hervadástól, mivel egész levelek vagy az egész növény hervad el gyorsan.

- 6.8. Végezze el a Gram-féle festési módszert (4.) minden tüneteket mutató padlizsánon a növényről származó hervadt levélszövetek és szárszövetek felhasználásával és izolálja megfelelő táptalajon (7.). 70 %-os etanollal letörölve fertőtleníse a padlizsán leveleinek és szárainak felületét.
- 6.9. Bizonyos körülmények között, különösen ha a növekedési feltételek nem optimálisak, lehetséges, hogy a *C. sepedonicum* látens fertőzőként él a padlizsánban, még a 40 napos inkubálást követően is. Az ilyen fertőzések az inkubált növényekben a fejlődés leállítását és az életerő hiányát okozhatják. Amennyiben az IF vizsgálat pozitívnak minősül, esetleg további vizsgálatokra lehet szükség. Ezért az összes padlizsán tesztnövény növekedési mértékét össze kell hasonlítani a 0,05 M steril PBS-szel beoltott kontrollal és figyelemmel kell kísérni az üvegház környezeti feltételeit.

A további vizsgálatok az alábbi ajánlások figyelembevételével alkalmazhatók:

- 6.9.1. metssze be a szárazakat az oltás alatt és távolítsa el a leveleket;
- 6.9.2. zúzza össze a szárazakat 0,05 M 7,0 pH értékű PBS-ben a 3.1–3.2. szerint;
- 6.9.3. a pellet felét használja a Gram-féle festési módszerhez (4.) és az IF vizsgálatához (5.);
- 6.9.4. amennyiben a Gram-féle festési módszer és vagy az IF vizsgálat eredménye pozitív, a pellet másik felével végezzen további padlizsánvizsgálatot (6.). Használjon egy ismert *C. sepedonicum*-tenyészetet és 0,05 M steril PBS kontrollokat. Amennyiben a következő vizsgálatokban nem figyelhetők meg a tünetek, akkor a minta negatívnak minősül.

7. *A C. sepedonicum* izolálása

A diagnózist csak akkor lehet megerősíteni, ha sikerült izolálni és azonosítani a *C. sepedonicum*-ot (8.). Habár a *C. sepedonicum* kényes, a tüneteket mutató szövetből izolálni lehet. Mivel azonban a gyorsan növekvő szaprofita baktériumok hamar túlszaporodják, ezért a közvetlenül a gumószövet pelletből (3.3.) nem ajánlatos izolálni. A padlizsán kiváló szelektív táptalajt nyújt a *C. sepedonicum* növekedéséhez, és kiváló megerősítő gazdaviszsgálatot tesz lehetővé.

Minden szimptomatikus burgonyagumóból és padlizsánból izolátumokat kell készíteni (4., 6.). Amennyiben szükséges, a padlizsánszárazakat a 3. és a 6.9. pont szerint össze kell zúzni.

7.1. Fessen fel szuszpenziócsíkokat valamelyik alábbi táptalajra (a képletet lásd a 6. függelékben):

dextrózt tartalmazó táptalaj (csak szubkultúrákhoz),

élesztőt, peptont, glükózt tartalmazó táptalaj,

élesztőt, dextrózt tartalmazó táptalaj,

élesztőkivonatot, ásványi sókat tartalmazó táptalaj.

Végezzen inkubálást 21 °C hőmérsékleten 20 napon keresztül.

A *C. sepedonicum* lassan növekszik, rendszerint tűhegynyi, krémszínű, domború kolóniákat alkot 10 napon belül.

A tisztaság meghatározásához ismételje meg a felfestést.

A szubkultúráknál javul a növekedési sebesség. A tipikus kolóniák krémfehérek vagy elefántcsontszínűek, kerek, simák, kiemelkednek, kupola alakúak, nyálkásan folyósak, szélük ép és rendszerint 1–3 mm átmérőjűek.

Azonosítás

Számos Gram-pozitív corynebacterium – a *C. sepedonicum*-hoz hasonlóan koloniális jellegű – baktérium elkülöníthető az egészséges vagy megbetegedett burgonyából és padlizsánból. Ebben a környezetben a *C. sepedonicum*-ot az alábbi vizsgálatokkal kell azonosítani:

IF vizsgálat (5.1.),

padlizsánvizsgálat,

táptalaj és fiziológiai vizsgálatok (7. függelék),

- oxidációs/fermentációs vizsgálat (O/F),
- oxidázvizsgálat,
- növekedés 37 °C hőmérsékleten,
- ureáztermelés,
- aesculin-hidrolízis,
- keményítő-hidrolízis,
- 7 %-os nátrium-klorid oldat tűrése,
- indolvizsgálat,
- katalázvizsgálat,
- H₂S-termelés,
- citrátfelhasználás,
- zselatin-hidrolízis,
- savas alak: glicerin, laktóz, ramnóz és szalicin,
- Gram-féle festési módszer.

Az összes ilyen vizsgálatához ismert *C. sepedonicum*-kontrollt kell használni. A tápanyag- és fiziológiai vizsgálatokat agaros táptalajon fejlődött szubkultúrák inokulum felhasználásával kell elvégezni. Az alaki összehasonlítást agaros dextróz táptalajon kell elvégezni.

Az IF vizsgálatához a sejtpopulációkat 10⁶ sejt/ml-re kell beállítani. Az IF töménységnek meg kell egyeznie az ismert *C. sepedonicum* kultúráéval.

A padlizsánvizsgálathoz a sejtpopulációkat 10⁷ sejt/ml-re kell beállítani. A padlizsánvizsgálathoz, vizsgált károsítónként tíz padlizsánt és újra az ismert *C. sepedonicum* tenyészet és steril víz kontrollokat kell használni; tiszta kultúrákkal tipikus hervadás 20 napon belül érhető el, de azokat a növényeket, amelyek ez után az idő után nem mutatnak tüneteket, összesen 30 napon keresztül a padlizsán fejlődését elősegítő hőmérsékleten, de legfeljebb 30 °C-on kell inkubálni (5. függelék). Amennyiben 30 nap múlva nem jelentkeznek a tünetek, a tenyészet nem nyilvánítható a *Corynebacterium sepedonicum* kórokozó formájának.

Vizsgálat	<i>C. sepedonicum</i>
O/F	Inert, vagy kissé oxidáló
Oxidáz	–
Kataláz	+
Nitrátredukció	–
Ureázaktivitás	–
H ₂ S-termelés	–
Indoltermelés	–
Citráthasznosítás	–
Keményítő-hidrolízis	– vagy gyenge
Növekedés 37 °C hőmérsékleten	–
Növekedés 7 %-os NaCl oldatban	–
Zselatin-hidrolízis	–
Aesculin-hidrolízis	+
Savas alak:	
– glicerinből	–
– laktózból	– vagy gyenge
– ramnózból	–
– szalicinből	–

1. függelék

A MACERÁCIÓS OLDAT KÉSZÍTÉSE LELLIOTT ÉS SELLAR AJÁNLÁSA SZERINT (1976)

D C szilícium habzágátló MS A vegyület (Hopkins & Williams Ltd, Cat. No 9964 – 25, Chadwell Heath, Essex, England)	10 ml
Lubrol W pelyhek (ICI Ltd)	0,5 g
Tetra-nátrium pirofoszfát	1 g
0,05 M foszfát pufferelt 7,0 pH-értékű sóoldat (2. függelék)	1 liter

2. függelék

PUFFEREK**0,05 M foszfát pufferelt 7,0 pH-értékű sóoldat**

Ez a puffer a gumószövetek macerációjához használható (2.1.)

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
NaCl	8,0 g
Desztillált víz, felöntve	1 literre

0,01 M foszfát pufferelt 7,2 pH-értékű sóoldat

Ez a puffer az antiszérumok hígítására és az IF tárgylemezek mosására szolgál

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
Desztillált víz, felöntve	1 literre

0,1 M foszfát pufferelt 7,6 pH-értékű glicerin

Ez a puffer az IF vizsgálat során a fluoreszcencia javítására szolgál

Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ 2 H ₂ O	0,15 g
Glicerin	50 ml
Desztillált víz	100 ml

3. függelék

GRAM-FÉLE FESTÉSI MÓDSZER (HUCKER VÁLTOZATA) (DOETSCH, 1981)**Kristályibolya-oldat**

Oldjon fel 2 g kristályibolyát 20 ml 95 %-os etanolban.

Oldjon fel 0,8 g ammónium-oxalátot 80 ml desztillált vízben.

Keverje össze a két oldatot.

Lugol-féle jóddoldat

Jód	1 g
Kálium-jodid	2 g
Desztillált víz	300 ml

Őrölje meg együtt a szilárd anyagokat egy mozsárban, mozsártörővel. Adja hozzá a vizet és egy zárt tartályban addig keverje, míg fel nem oldódnak.

Szafranin ellenszínező oldat

Törzsoldat:

Szafranin O	2,5 g
95 %-os etanol	100 ml

Keverje össze és tárolja.

Hígítás munkaoldathoz: 1:10.

Színezési eljárás

1. Készítsen kenetet, szárítsa meg és fixálja hővel.
2. Áztassa a tárgylemezt kristályibolya-oldatba egy percig.
3. Mossa le rövid ideig csapvízben.
4. Áztassa Lugol-féle jóddoldatba egy percig.
5. Mossa le csapvízben és itassa le.
6. Színtelenítse cseppenként adagolt 95 %-os etanolban, amíg további színváltozás már nem történik, vagy finom keverés mellett mérítse be 30 másodpercre.
7. Mossa le csapvízben és itassa le.
8. Áztassa szafraninoldatba 10 másodpercre.
9. Mossa le csapvízben és itassa le.

A Gram-pozitív baktériumok ibolyakékre színeződnek; a Gram-negatív baktériumok rózsaszínes vörösré.

4. függelék

AZ IF-POZITÍV SEJTEK POPULÁCIÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA

A többpontos tárgylemez ablakának felülete (S)

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

ahol D = az ablak átmérője.

Az objektív mező felülete (s)

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

ahol d = a mező átmérője

A d meghatározása vagy közvetlen méréssel, vagy az alábbi képletek segítségével:

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

ahol i = mező együttható (az okulár típusától függ, és értéke: 8–24),

K = cső együttható (1 vagy 1,25)

G = az objektív nagyítása (100 ×, 40 × stb.),

$$\text{a (2) szerinti } d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$$

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

Számolja meg a tipikus fluoreszcens sejtek számát mezőnként (c).

Számolja ki a tipikus fluoreszcens sejtek számát ablaknként (C).

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

Számolja ki a tipikus fluoreszcens sejtek számát a pellet ml-enként (N).

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

ahol y = az ablakon lévő pellet térfogata,

ahol F = a pellet hígítási tényezője.

5. függelék

PADLIZSÁNTENYÉSZET

Vessen padlizsánmagokat (*Solanum melongena* cv. Black Beauty) pasztőrözött vetőmagkomposztba. Ültesse át a teljesen kifejlődött sziklevellél rendelkező (10–14 nap) palántákat pasztőrözött komposztba.

Használja a 3 leveles fázisban lévő padlizsánt, amikor kettő, de háromnál semmiképpen sem több levél már teljesen kiterült.

A padlizsánt üvegházban kell tartani az alábbi környezeti körülmények között:

nappal hossza: 14 óra, vagy – ha az hosszabb, akkor – a természetes nappal hossza;

hőmérséklet: nappal: 21–24 °C

éjszaka: 15 °C

MEGJEGYZÉS: A *C. sepedonicum* nem növekszik a 30 °C-t meghaladó hőmérsékleteken. Amennyiben az éjszakai hőmérséklet nem esik 15 °C alá, akkor kromofórkárosodás (ezüstelhalás) következhet be.

A Sciaridae lárvák okozta gyökérvárosodás megelőzhető megfelelő rovarirtó szer alkalmazásával.

A padlizsán cv. Black Beauty az alábbi helyekről szerezhető be:

1. AB Hammenhögs, Frö,
270 50 Hammenhög,
Svédország;
 2. HURST Seeds Ltd,
Avenue Road,
Witham,
Essex CM8 2DX,
Anglia;
 3. ASGRO Italia Sp A,
Corso Lodi, 23,
Milánó;
 4. KÜPPER
Mitteldeutsche Samen GmbH;
Hessenring 22;
D-37269 Eschwege.
-

6. függelék

A C. SEPEDONICUM TENYÉSZTÉSÉRE ÉS ELKÜLÖNÍTÉSÉRE SZOLGÁLÓ TÁPTALAJ**Vizes táptalaj (NA)**

Difco bacto táptalaj desztillált vízben a gyártó által előírt mennyiségben. Sterilizálja autoklávban 121 °C-on 15 percen keresztül.

Dextrózt tartalmazó táptalaj (NDA)

Difco bacto táptalaj 1 % D(+) glükóz (monohidrát) tartalommal. Sterilizálja autoklávban 115 °C-on hőmérsékleten 20 percen keresztül.

Élesztőt, peptont, glükózt tartalmazó táptalaj (YPGA)

Difco bacto élesztőkivonat (No 0127)	5 g
Difco bacto pepton (No 0118)	5 g
D(+)-glükóz (monohidrát)	10 g
Difco bacto tisztított táptalaj (No 0560)	15 g
Desztillált víz	1 liter

Sterilizáljon 0,5 liter térfogatú táptalajt autoklávban 115 °C hőmérsékleten 20 percen keresztül.

Élesztőkivonatot, ásványi sókat tartalmazó táptalaj (YGM)

Difco bacto élesztőkivonat	2,0 g
D(+)-glükóz (monohidrát)	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,005 g
Difco bacto finomított táptalaj	18 g
Desztillált víz	1 liter

Sterilizáljon 0,5 liter térfogatú táptalajt autoklávban 115 °C hőmérsékleten 20 percen keresztül.

7. függelék

A C. SEPEDONICUM AZONOSÍTÁSÁRA SZOLGÁLÓ TÁPANYAG- ÉS FIZIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK

Minden táptalajt 21 °C-on inkubálni kell és hat nap múlva meg kell vizsgálni. Amennyiben nem fordul elő növekedés, akkor folytassa az inkubálást legfeljebb 20 napig.

– **Oxidatív és erjesztő vizsgálat** (Hugh & Leifson, 1953), O/F vizsgálat.

Alap táptalaj:

KCl	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
Difco bacto pepton	1,0 g
Difco bacto tisztított táptalaj	3 g
D(+)-glükóz (monohidrát)	10,0 g
Dibróm-timolszulfonftalein	0,03 g
Desztillált víz	1 liter

Keverje össze és 1N KOH segítségével állítsa be a pH-értékét 7,0–7,2-re.

Ossza el 16 mm × 100 mm (12 ml térfogatú) Pyrex tenyésztőcsövekben 5 és 10 ml-es adagokban.

Szterilizálja autoklávban 115 °C hőmérsékleten 10 percen keresztül.

Minden tenyészetből töltsön az 5 ml-es és a 10 ml-es csövekbe. Adjon steril körülmények között 1–2 ml steril folyékony paraffint a 10 ml-es csövekbe. Végezzen inkubálást.

Pozitív reakció:

Cső	Szín	Értelmezés
Nyitott	Sárga	Erjesztés
Zárt	Sárga	
Nyitott	Sárga	Oxidációs
Zárt	Kékeszöld	
Nyitott	Zöldes	Oxidációs vagy inert
Zárt	Kékeszöld	

– **Oxidázvizsgálat** (Kovács, 1956)

Kovács-féle oxidázreagens:

tetrametil-parafeniléndiamin dihidroklorid (BDH No 30386) 1 %-os vizes oldata desztillált vízben.

Ezt a reagenst 1 ml adagokban frissen kell készíteni, de barna üvegpalackban is lehet tárolni, 5 °C hőmérsékleten 1–4 hétig.

Tegyén egy csepp reagenst egy tiszta Petri-csészében lévő szűrőpapírra. Egy platinakanál segítségével azonnal kenjen rá a táptalajon lévő vizsgálati tenyészetből.

Pozitív reakció: lila elszíneződés kialakulása 10 másodpercen belül. A 10–30 másodperces tenyészetek gyengén pozitívak.

MEGJEGYZÉS: Feltétlenül használjon platinakanalat és NA tenyészeteket, mivel a vasmaradványok vagy a táptalaj magas cukortartalma téves pozitív eredményeket adhat.

– **Savtermelés laktózból, ramnózból, szalicinből és glicerinnél**

Készítsen Hugh & Leifson-féle O/F táptalajt a glukóz nélkül. Ossa el 5 ml-es adagokként csövekben. Szterilizálja őket autoklávban 115 °C hőmérsékleten 10 percen keresztül. Az olvadt alaphoz 45 °C hőmérsékleten steril körülmények között adjon hozzá 0,5 ml-t glicerin, laktóz, ramnóz vagy szalicin 10 %-os filter sterilizált vizes oldatot. Óvatosan keverje össze.

Pozitív reakció: a színváltozás kékeszöldről sárgára savképződést jelent.

– **Katalázvizsgálat**

Tegyén egy csepp (30 térfogategység) hidrogén-peroxidot egy tiszta tárgylemezre és platinakanállal emulgeáljon vele egy kanálnyi a tenyészetből.

Pozitív reakció: a cseppben az oxigénbuborékok képződése a kataláz jelenlétét jelzi.

– **Nitrátreduktáz tevékenység és denitrifikálás** (Bradbury, 1970)

Táptalaj:

KNO ₃ (nitritmentes)	1 g
Difco bacto élesztőkivonat	1 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Desztillált víz	1 liter

Töltsön ki 10 ml térfogatú anyagot 20 ml-es üvegekbe. Sterilizálja autoklávban 121 °C hőmérsékleten 15 percen keresztül.

A reagens:

H ₂ SO ₄	8 g
5N ecetsav	1 liter

B reagens:

naftil-amin	5 g
5N ecetsav	1 liter

Oltsa be a táptalajt két példányban. Végezzen vizsgálatot 10 és 20 nap múlva, egy csepp Lugol-féle jódoldat, 0,5 ml A reagens és 0,5 ml B reagens hozzáadásával. Ha a táptalaj nem válik vörössé, adjon hozzá további 50 mg cinkport. Figyelje meg a színreakciót.

<i>Pozitív reakció:</i>	<i>Színreakció</i>	
	1. fokozat	2. fokozat
Nincsen nitrátredukció	színtelen	vörös
Nitrát redukciója nitritté (csak nitrátredukció)	vörös	–
Nitrát redukciója nitriten túl (denitrifikálás: nitrát- és nitritredukció)	színtelen	színtelen

– **Ureáztermelés** (Lelliott, 1966)

Alapanyag:

Oxoidos karbamid táptalaj alapanyag (CM53)	2,4 g
Desztillált víz	95 ml

Sterilizálja autoklávban 115 °C hőmérsékleten 20 percen keresztül. Hűtse le az olvadt alapanyagot 50 °C hőmérsékletre és steril körülmények között adjon hozzá 5 ml karbamid vizes oldatot (Oxoid SR20). Keverje jól el.

Mérjen ki 6 ml-es adagokat steril kémcsövekbe (16 × 100 mm) és hagyja lejtősen összeállni.

Pozitív reakció: a sárgás-narancs anyag meggyvörös vagy bíborrózsaszín elszíneződést mutat, amennyiben ureázaktivitás figyelhető meg.

Citrátfelhasználás (Christensen) (Skerman, 1967)

Citrátos táptalaj alapanyag (Merck 2503)	23 g
Desztillált víz	1 liter

Keverje el és melegítve oldja fel. Töltsön ki 6 ml-es adagokat, mint a karbamid táptalaj esetében. Sterilizálja autoklávban 121 °C hőmérsékleten 15 percen keresztül, majd hagyja lejtősen összeállni.

Pozitív reakció: a citrátfelhasználást az jelzi, hogy a táptalaj színe narancssárgáról vörösre változik.

– **Hidrogénszulfid-termelés** (Ramamurthi, 1959)

Táptalaj:

Difco bacto tripton (No 0123)	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NaCl	5 g
Desztillált víz	1 liter

Oldja fel és töltsön ki 6 ml-es adagokat 16 mm × 100 mm csövekbe. Sterilizálja autoklávban 115 °C hőmérsékleten 10 percen keresztül.

Oltsa be és aseptikusan függesszen egy ólompapírt (Merck 9511) a kémcső szájába, rögzítse dugóval. Végezzen inkubálást legfeljebb 20 napig.

Pozitív reakció: A triptonból történő H₂S képződést a tesztpapír fekete-barna elszíneződése jelzi.

– **Indoltermelés** (Ramamurthi, 1959)

Táptalaj:

mint a H₂S vizsgálatnál.

Távolítsa el az ólompapírt és adjon hozzá 1–2 ml dietil-étert, és óvatosan rázza meg. Hagyja szétválni a rétegeket (5 perc). Adjon hozzá óvatosan 0,5 ml Kovács-reagenst a megdöntött kémcső oldalán végigöntve.

Pozitív reakció: az indol jelenlétét az éter és a vizes részek közötti sárga réteg vörös elszíneződése jelzi.

– **Növekedés 37 °C hőmérsékleten** (Ramamurthi, 1959)

Táptalaj:

Difco bacto húsleves (No 0003)	8 g
Desztillált víz	1 liter

Keverje el, oldja fel és töltsön ki 6 ml-es mennyiségeket kémcsövekbe.

Sterilizálja autoklávban 121 °C hőmérsékleten 15 percen keresztül.

Oltsa be és inkubálja 37 °C hőmérsékleten.

Pozitív reakció: figyelje meg a növekedést.

– **Növekedés 7 % nátriumkloridban** (Ramamurthi, 1959)

Táptalaj:

Difco bacto húsleves	8 g
NaCl	70 g
Desztillált víz	1 liter

Keverje el, oldja fel és töltsön ki 6 ml-es mennyiségeket kémcsövekbe.

Sterilizálja autoklávban 121 °C hőmérsékleten 15 percen keresztül.

Pozitív reakció: figyelje meg a növekedést.

– **Zselatin-hidrolízis** (Lelliott, Billing és Hayward, 1966)

Táptalaj:

Difco bacto zselatin (No 0143)	120 g
Desztillált víz	1 liter

Melegítéssel keverje el oldja fel és, töltsön ki 6 ml-es adagokat kémcsövekbe.

Sterilizálja autoklávban 121 °C hőmérsékleten 15 percen keresztül.

Pozitív reakció: a zselatin cseppfolyósodása még akkor is, ha 30 percen keresztül 5 °C-os hőmérsékleten tartja.

– **Keményítő-hidrolízis**

Táptalaj:

Difco bacto táptalaj (megolvasztva)	1 liter
Difco bacto oldható keményítő (No 0178)	2 g

Keverje össze, sterilizálja autoklávban 115 °C hőmérsékleten 10 percen keresztül.

Öntse ki tányérra. Tegyen oltóanyagot a tányérokra.

Megfelelő mértékű növekedést követően (10–20 nap), távolítsa el a növekedett részt és öblítse le Lugol-féle jóddal.

Pozitív reakció: a keményítő hidrolízisét a baktériumnövekedés alatti vagy körülötte tiszta területek jelzik; a táptalaj többi része lila elszíneződést vesz fel.

– **Aesculin hidroláz aktivitás** (Sneath és Collin, 1974)

Táptalaj:

Difco bacto pepton	10 g
Aesculin	1 g
Vas-citrát	0,05 g
Nátrium-citrát	1 g
Desztillált víz	1 liter

Keveréssel oldja fel és töltsön ki 6 ml-es adagokat kémcsövekbe. Sterilizálja autoklávban 115 °C hőmérsékleten 10 percen keresztül.

A táptalaj tiszta, de kékesen fluoreszkál.

Pozitív reakció: az aesculin hidrolízisét a barnás szín megjelenése és ezzel egyidejűleg a fluoreszkálás megszűnése jelzi. Ez ultraibolya lámpával ellenőrizhető.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. *Rev. Pl. Path.*, 49, 213–218.
- Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. *EPPO Bull.* 14 (2), 147–152.
- Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: *Manual of methods for general bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, 21–23.
- Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J. Bact.*, 66, 24–26.
- Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. *EPPO Bull.*, 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 Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. *EPPO Bull.*, 6 (2), 101–106.
- Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. *Mem. Cornell agric. Exp. Sta.*, 366, 52 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 reproducibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, 481–527.

II. MELLÉKLET

1. Minden feltételezhető előfordulás esetén, mikor az I. mellékletben meghatározott módszer alapján pozitív immunofluoreszcens tesztet végeztek, és az említett módszer megerősítése vagy cáfolata folyamatban van, akkor:
 - amennyiben lehetséges, az összes olyan gumót vagy növényt, amelyből mintát vettek, és
 - az összes fennmaradó kivonatot és az elkészített immunofluoreszcens tárgylemezeketaz eljárás befejezéséig vissza kell tartani, és megfelelően tartósítani kell.
2. A károsító jelenlétének pozitív megerősítése esetén:
 - az (1) bekezdés által meghatározott anyagokat, és
 - a gumó- vagy a növénykivonattal beoltott fertőzött padlizsán egy mintáját, és
 - a károsító izolált tenyészetétvissza kell tartani, és megfelelően tartósítani kell legalább az 5. cikk (2) bekezdése szerinti értesítési eljárást követő egy hónapig.

III. MELLÉKLET

1. Az 5. cikk (1) bekezdésének b) pontja szerinti feltételezhető fertőzés mértékének meghatározása során az alábbi elemeket kell figyelembe venni:
 - az 5. cikk (1) bekezdésének a) pontja szerint fertőzöttnek nyilvánított termőhelyen termesztett gumók vagy növények,
 - az 5. cikk (1) bekezdésének a) pontja szerint fertőzöttnek nyilvánított gumókkal vagy növényekkel valamilyen termelési kapcsolatban lévő termőhely(ek) vagy helyiségek, beleértve azokat, amelyek közvetlenül vagy közös szállítón keresztül közös termelészközöket vagy termelőlétesítményeket használnak,
 - az előző francia bekezdés szerinti terület(ek)en termelt gumók vagy növények vagy olyan gumók vagy növények, amelyek megtalálhatóak voltak az előző francia bekezdés szerinti helyiségekben, amikor az 5. cikk (1) bekezdésének a) pontja szerint fertőzöttnek nyilvánították a gumókat és növényeket,
 - a fenti termőhelyekről származó burgonyát kezelő központi raktárak,
 - bármilyen gép, jármű, edény, tároló vagy annak részei, illetve bármely olyan tárgy, beleértve a csomagolóanyagot, amely a megelőző 12 hónap során vagy bármikor máskor kapcsolatba kerülhetett az 5. cikk (1) bekezdésének a) pontja szerint fertőzöttnek nyilvánított gumókkal vagy növényekkel,
 - bármilyen – az előző francia bekezdésben felsorolt bármely szerkezetben vagy tárgyban tárolt vagy azokkal érintkezésben állt – gumó vagy növény, ezen szerkezetek és tárgyak tisztítását és fertőtlenítését megelőzően, és
 - a 6. cikk szerinti vizsgálat alapján az 5. cikk (1) bekezdésének a) pontja szerint fertőzöttnek minősített gumókkal vagy növényekkel azonos klonális eredetű gumók vagy növények, amelyek esetében a vizsgálat a fertőzés lehetőségét eredményezi.
2. Az 5. cikk (1) bekezdésének c) pontja szerinti lehetséges elterjedés az alábbiakat foglalja magában:
 - burgonyát vagy más gazdanövényt termőhelyek környezetében,
 - a vetőburgonya-készleteket.
3. Az 5. cikk (2) bekezdése első albekezdése szerinti értesítésnek az alábbiakat kell tartalmazni:
 - bármely fertőzöttnek minősített burgonyaszállítmány vagy -tétel esetén a 77/93/EGK irányelv 7. vagy 8. cikke szerinti bizonyítványok, az útlevel- vagy regisztrációs szám, ha szükséges,
 - a vetőburgonya-készletek különböző nevei, a többi esetben is, amennyiben lehetséges,
 - a minősített fertőzés és a kijelölt övezet elemeinek leírása,
 - a rendelkezésre álló előállított, preparált immunofluoreszcens teszt tárgylemezein, fertőzött padlizsánanyag és a károsítónak abban a vizsgálatban izolált tenyészet, amelynek eredményeképpen a károsító jelenlétét pozitívan megerősítették.

IV. MELLÉKLET

1. Az 5. cikk (1) bekezdésének a) pontja szerint fertőzöttnek minősített gumók vagy növények megsemmisítésére szolgáló, a 7. cikk (1) bekezdés szerinti hatóságilag felügyelt intézkedések az alábbiak lehetnek:
 - felhasználás ipari feldolgozásra közvetlen vagy közvetett szállítással egy megfelelő hulladéklerakó létesítményekkel rendelkező feldolgozóüzembe, amelyről megállapították, hogy ott a károsító elterjedésének nincs azonosítható kockázata, és amely rendelkezik egy, a tárolóhelyeket és az induló járműveket fertőtlenítő rendszerrel, vagy
 - egyéb intézkedések, feltéve hogy megállapították, hogy a károsító elterjedésének nincs azonosítható kockázata; ezekről az intézkedésekről értesíteni kell a Bizottságot és a többi tagállamot.
2. Az 5. cikk (1) bekezdésének b) pontja szerint feltehetően fertőzöttnek minősített és a 7. cikk (2) bekezdésében említett gumók vagy növények megfelelő felhasználása vagy ártalmatlanítása a tagállamok illetékes hivatalos szerveinek felügyelete mellett az alábbiak:
 - felhasználás fogyasztásra szánt áruburgonyaként, közvetlen szállításra kész csomagolásban és átsomagolás nélküli és ilyen közvetlen szállításra vagy felhasználásra szánva, vagy
 - felhasználás ipari feldolgozásra szánt áruburgonyaként, közvetlen és azonnali szállításra egy megfelelő hulladék-megsemmisítő és fertőtlenítő létesítményekkel rendelkező üzembe, vagy
 - egyéb más felhasználás vagy ártalmatlanítás, feltéve hogy megállapították, hogy a károsító elterjedésének nincs azonosítható kockázata.
3. A 7. cikk (3) bekezdésében meghatározott tárgyak tisztításának és fertőtlenítésének azok a megfelelő módszerei, amelyekről megállapították, hogy a károsító elterjedésének nincs azonosítható kockázata, és amelyeket a tagállamok illetékes hivatalos szerveinek felügyelete alatt végeznek.
4. Az 5. cikk (1) bekezdésének c) pontjában kijelölt és a 7. cikk (4) bekezdésben meghatározott övezetben a tagállamok által végrehajtandó intézkedéssorozat az alábbiakat tartalmazza:
 - 4.1. az 5. cikk (1) bekezdésének a) pontja szerint fertőzöttnek nyilvánított termőhelyeken:
 - a) egy, az 5. cikk (1) bekezdésének a) pontja szerint fertőzöttnek nyilvánított táblán:
 - i. – a fertőzés megállításának évét követően legalább három vegetációs periódus során,
 - intézkedéseket hoznak az árvakelésű burgonyanövények és a károsító egyéb természetes gazdanövényeinek megsemmisítésére, és
 - nem ültetnek olyan burgonyagumót, -növényt vagy valódi magot, vagy a károsító egyéb természetesen megtalálható gazdanövényeit, vagy olyan haszonnövényeket, amelyeknél a károsító túlélésének és elterjedésének azonosítható kockázata áll fenn addig, ameddig a terület két egymást követő vegetációs perióduson keresztül árvakelésű burgonyától mentes nem lesz,
 - az előző francia bekezdésben meghatározott időszakot követő első burgonyatermő évszakban hivatalos tanúsítvánnyal rendelkező vetőburgonyát vetnek áruburgonya-termesztési célra és a 2. cikk (1) bekezdésében részletezett hivatalos felmérést lefolytatják,
 - az előző francia bekezdésben meghatározott időszakot követő burgonyatermő évszakban, és megfelelő vetésváltást követően hivatalos tanúsítvánnyal rendelkező vetőburgonyát vetnek vetőgumó- vagy áruburgonya-termesztési célra és lefolytatják a 2. cikk (1) bekezdésében részletezett hivatalos felmérést; vagy
 - ii. – a megállapított fertőzés évét követő négy vegetációs periódus során:
 - intézkedéseket hoznak az árvakelésű burgonyanövény és a károsító egyéb természetes gazdanövényeinek megsemmisítésére, és
 - a táblát ugaron hagyják, vagy állandó legelőként művelik gyakori tarvágással vagy intenzív legeltetéssel,
 - az előző francia bekezdésben meghatározott időszakot követő burgonyatermő évszakban hivatalos bizonyítvánnyal rendelkező vetőburgonyát vetnek vetőgumó- vagy áruburgonya-termesztési célra és lefolytatják a 2. cikk (1) bekezdésében részletezett hivatalos felmérést;

- b) egyéb táblákon:
- a megállapított fertőzést követő vegetációs periódus idején:
 - vagy nem ültetnek burgonyagumót, -növényt vagy valódi magot, vagy a károsító egyéb természetesen megtalálható gazdanövényeit, vagy olyan haszonnövényeket, amelyek esetében a károsító túlélésének és elterjedésének azonosítható kockázata áll fenn, és intézkedéseket hoznak az árvakelésű burgonyanövények és a károsító egyéb természetes gazdanövényeinek megsemmisítésére, vagy
 - hivatalos tanúsítvánnyal rendelkező vetőburgonyát ültethetnek kizárólag áruburgonya-termesztési célra, azzal a feltétellel, hogy az illetékes hivatalos szervek meggyőződnek arról, hogy az árvakelésű burgonyának és a károsító egyéb természetesen megtalálható gazdanövényeinek megszűnt a veszélye,
 - az előző francia bekezdésben meghatározott időszakot követően legalább két vegetációs perióduson keresztül csak hivatalos tanúsítvánnyal rendelkező vetőburgonya ültethető vetőgumó- vagy áruburgonya-termesztési célokra,
 - az előző francia bekezdésekben meghatározott vegetációs periódusok mindegyikében intézkedéseket hoznak az árvakelésű burgonyanövények és a károsító egyéb természetes gazdanövényeinek megsemmisítésére és lefolytatják a 2. cikk (1) bekezdésében részletezett hivatalos felmérést,
 - amennyiben a meghatározott fertőzést követő vegetációs periódusban hivatalos tanúsítvánnyal rendelkező vetőburgonyát ültettek áruburgonya-termesztési célokra, akkor a fejlődő termést megfelelő időközönként vizsgálják, az árvakelésű burgonyát vizsgálják a károsító előfordulása szempontjából;
- c) az 5. cikk (1) bekezdésének a) pontja szerinti fertőzés meghatározását követően azonnal, és az egymást követő vegetációs periódusok mindegyikében, beleértve az első szabad burgonyatermés évszakát, az a) bekezdés szerinti fertőzöttnek nyilvánított táblákon minden ott található és a burgonyatermesztésben részt vevő gépet és tárolólétesítményt, amennyiben szükséges, a 3. pont által meghatározott módszerek segítségével megtisztítanak és fertőtlenítenek;
- d) azokban a termelési rendszerekben, ahol lehetséges a táptalaj teljes cseréje:
- burgonyagumó, -növény vagy valódi mag addig nem ültethető, ameddig a termelő egységben a hatóságilag felügyelt intézkedéseket végre nem hajtották a károsító megsemmisítésére és az összes burgonyaféle eltávolítására, amibe beletartozik legalább a táptalaj teljes cseréje és a termelőegység, illetve annak összes berendezésének tisztítása és fertőtlenítése, valamint ezt követően az illetékes hivatalos szervek engedélyt nem adtak a burgonya termelésére, és
 - burgonyát természeteni megengedett hivatalos tanúsítvánnyal rendelkező vetőburgonyából vagy vizsgált forrásból származó minigumókból vagy mikropalántákból lehet;
- 4.2. a kijelölt övezeten belül a 4.1. pont szerinti rendelkezések sérelme nélkül a tagállamok:
- a) haladéktalanul, és a fertőzés meghatározását követően legalább három vegetációs periódusban:
- illetékes hivatalos szerveik útján biztosítják a burgonyagumókat nevelő, tároló vagy kezelő helyiségek, illetve a szerződés alapján burgonyafeldolgozó gépeket üzemeltető helyiségek felügyeletét,
 - szükség szerint ezekben a helyiségekben előírják a gépek és a raktárak tisztítását és fertőtlenítését a 3. pont szerinti megfelelő módszerek használatával,
 - az övezeten belül burgonyatermesztés esetén előírják, hogy kizárólag hivatalos tanúsítvánnyal rendelkező vetőburgonya ültethető,
 - az övezeten belül minden helyiségben előírják a betakarított vetőburgonya-készletek és az áruburgonya-készletek elkülönített kezelését,
 - lefolytatják a 2. cikk (1) bekezdése szerinti hivatalos felmérést;
- b) amennyiben szükséges, programot készítenek az összes vetőburgonya-készlet cseréjére a megfelelő időszakon keresztül.
- A 4.2. szerint végrehajtott intézkedésekről, az övezeten belüli termelők regisztrációs számairól, a gyűjtő- és szállítási központokról évente értesítik a többi tagállamot és a Bizottságot.