

31993L0085

1993 10 18

EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS

L 259/1

TARYBOS DIREKTYVA 93/85/EEB**1993 m. spalio 4 d.****dėl bulvių žiedinio puvinio kontrolės**

EUROPOS BENDRIJŲ TARYBA,

metu ir metodiškai nebus kontroliuojami visoje Bendrijoje ir nebus užkirstas kelias jiems išplisti;

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį, ypač į jos 43 straipsnį,

kadangi vienas iš kenksmingų organizmų bulvėse yra *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kothhoff) Davis et al., patogeninis bulvių žiedinio puvinio ligos sukėlėjas; kadangi ši liga buvo užregistruota kai kuriose Bendrijos vietose ir tam tikrų ribotų ligos židinių vis dar esama;atsižvelgdama į Komisijos pasiūlymą ⁽¹⁾,atsižvelgdama į Europos Parlamento nuomonę ⁽²⁾,

kadangi visoje Bendrijoje išlieka gana didelis pavojus bulvių pasėliams, jeigu nebus imtasi veiksmingų priemonių aptikti šią ligą ir nustatyti jos išplitimą, užkirsti kelią jai atsirasti ir išplisti, o ją aptikus – užkirsti kelią jos plitimui ir kontroliuoti, siekiant ją išnaikinti;

atsižvelgdama į Ekonomikos ir socialinių reikalų komiteto nuomonę ⁽³⁾,

kadangi bulvių auginimas užima svarbią vietą Bendrijos žemės ūkyje; kadangi bulvių derliui grėsmę nuolat kelia kenksmingi organizmai;

kadangi, to siekiant, Bendrijoje reikia imtis tam tikrų priemonių; kadangi be to, jeigu reikia, valstybės narės privalo imtis papildomų arba griežtesnių priemonių, su sąlyga, kad nebus trukdoma bulvių siuntų judėjimui Bendrijoje, išskyrus atvejus, numatytus 1976 m. gruodžio 21 d. Tarybos direktyvoje 77/93/EEB dėl apsaugos priemonių, skirtų apsaugoti nuo augalams arba augaliniams produktams kenksmingų organizmų įvežimo į valstybes nares ⁽⁴⁾; kadangi tokios priemonės turi būti praneštos kitoms valstybėms narėms ir Komisijai;

kadangi, apsaugant bulvių augalus nuo tokių kenksmingų organizmų, ne tik bus išlaikytas gamybinis našumas, bet ir padidės žemės ūkio produktyvumas;

kadangi 1980 m. birželio 24 d. Tarybos direktyvoje 80/665/EEB dėl bulvių žiedinio puvinio kontrolės ⁽⁵⁾ nustatytos būtinausios priemonės, kurių valstybės narės turi imtis nuo bulvių žiedinio puvinio;⁽¹⁾ OL C 93, 1993 4 2, p. 12.⁽²⁾ OL C 176, 1993 6 28, p. 210.⁽³⁾ OL C 161, 1993 6 14, p. 18.⁽⁴⁾ OL L 26, 1977 1 31, p. 20. Direktyva su paskutiniais pakeitimais, padarytais Komisijos direktyva 92/103/EEB (OL L 363, 1992 12 11, p. 1).⁽⁵⁾ OL L 180, 1980 7 14, p. 30.

kadangi nuo to laiko supratimas apie bulvių žiedinio puvinio ligą ir bulvių žiedinio puvinio patogeno nustatymas iš esmės pasikeitė;

kadangi Bendrijos augalų sveikatos priežiūros režimo taikymas Bendrijai kaip teritorijai be vidaus sienų lėmė būtinybę dar kartą išnagrinėti ir persvarstyti kai kurias Direktyvos 80/665/EEB nuostatas;

kadangi, atlikus tokių pakartotinių nagrinėjimų, nustatyta, kad Direktyvos 80/665/EEB nuostatos yra nepakankamos ir dėl to reikia tiksliau apibrėžti priemones;

kadangi, esant tokiai padėčiai, Direktyva 80/665/EEB turėtų būti panaikinta ir patvirtintos reikiamos priemonės;

kadangi tokiose priemonėse turi būti atsižvelgta, pirma, kad liga gali būti latentinė ir nepastebėta augančiuose pasėliuose bei sandėliuojamuose stiebagumbiuose ir todėl efektyviai jai užkirsti kelią galima tik auginant ir vartojant sėklines neužkrėtas bulves, ir, antra, kad norint aptikti ligą reikalingi sistemingi oficialūs tyrimai; kadangi patogeno išplitimas augančiuose pasėliuose nėra svarbiausias veiksnys, tačiau kadangi patogenas gali išlikti per žiemą savaime sudygusiuose bulvių augaluose, tai yra pagrindinis infekcijos šaltinis, plintantis sezonas po sezono; kadangi patogenas daugiausiai plinta bulvėms liečiantis su apkrėstomis bulvėmis bei su sodinimo, kasimo ir apdorojimo įrenginiais arba vežimo bei sandėliavimo talpyklomis, kurie buvo organizmo apkrėsti jų ankstesnio sąlyčio metu su apkrėstomis bulvėmis; kadangi tokie užkrėsti objektai po tokio užkrėtimo gali kurį laiką išlikti užkrečiančiais; kadangi patogeno plitimą galima sumažinti arba sustabdyti tokius objektus dezinfekuojant; kadangi bet koks panašus sėklinių bulvių užkrėtimas kelia didžiulį patogeno išplitimo pavojų;

kadangi, valstybėms narėms nustatant tokių bendrųjų priemonių detales, taip pat ir tvirtinant griežtesnes ar papildomas priemones, skirtas apsaugoti nuo patogeno įvežimo į jų teritoriją, pageidautina, kad valstybės narės glaudžiai bendradarbiautų su Komisija Augalų sveikatos nuolatiniam komitete (toliau Komitetas),

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

1 straipsnis

Šia direktyva numatomos priemonės, kurių turi imtis valstybės narės nuo *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. sp. *sepedonicus* (Speckermann et Kothoff) Davis et al., bulvių žiedinio puvinio sukėlėjo (toliau bakterija) norint:

a) ją aptikti ir nustatyti jos išplitimą;

b) užkirsti kelią jai atsirasti ir išplisti ir

c) aptikus ją, užkirsti kelią jai plisti ir kontroliuoti, stengiantis ją išnaikinti.

2 straipsnis

1. Valstybės narės atlieka sistemingus oficialius tyrimus, ieškant bakterijos stiebagumbiuose ir, kur tikslinga, bulvių augaluose (*Solanum tuberosum* L.), auginamuose jų teritorijoje, norėdamos įsitikinti, ar tokios bakterijos nėra.

Šiems tyrimams, imant stiebagumbių mėginius oficialiam ar oficialiai prižiūrimam laboratoriniam tyrimui, tikrinamos sėklinės ir kitos bulvės, pageidautina iš sandėliuojamų partijų, taikant metodą bakterijai aptikti ir diagnozuoti, apibūdintą I priede. Be to, kur tikslinga, galima atlikti oficialų arba oficialiai prižiūrimą vizualinį kitų mėginių patikrinimą perpjaujant stiebagumbius.

Su augalais šiuos tyrimus reikia atlikti taikant tam tikrus metodus ir mėginiai tiriami atitinkamais oficialiais arba oficialiai prižiūrimais tyrimais.

Mėginių skaičių, kilmę, stratifikaciją ir jų ėmimo laiką nustato atsakingosios oficialios įstaigos, kaip apibrėžta Direktyvoje 77/93/EEB, remdamosi pagrįstais moksliniais ir statistiniais principais bei bakterijos biologija ir atsižvelgdamos į konkrečių valstybių narių bulvių auginimo tradicijas. Todėl tyrimų detalės kasmet pateikiamos kitoms valstybėms narėms ir Komisijai, norint užtikrinti panašų valstybių narių gebėjimo užtikrinti, kad bakterija neaptikta, lygį.

2. Oficialių tyrimų, numatytų 1 dalyje, rezultatai mažiausiai kartą per metus pranešami kitoms valstybėms narėms ir Komisijai. Šio pranešimo detalės yra konfidencialios. Jos gali būti pateikiamos Komitetui Direktyvos 77/93/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka.

3. Direktyvos 77/93/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka gali būti priimtos tokios nuostatos:

— tyrimų, nurodytų anksčiau pateiktoje 1 dalyje, detalės nustatomos remiantis tvirtais moksliniais ir statistiniais principais,

— pranešimo, nurodyto anksčiau pateiktoje 2 dalyje, detalės.

4. Direktyvos 77/93/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka priimamos tokios nuostatos:

— reikiamas tyrimų ir patikrinimų, nurodytų anksčiau pateiktos 1 dalies trečioje pastraipoje, metodas.

3 straipsnis

Valstybės narės užtikrina, kad apie įtariamą ar patvirtintą bakterijos buvimą bulvių augaluose ir stiebagumbiuose, arba nukastuose, laikomuose ar parduotuose jų teritorijoje stiebagumbiuose būtų pranešama jų pačių atsakingosioms oficialioms įstaigoms.

4 straipsnis

1. Įtariamo buvimo atvejais atsakingosios oficialios valstybės narės, kurioje apie tokius atvejus buvo informuota, įstaigos užtikrina oficialų arba oficialiai prižiūrimą laboratorinį tyrimą, taikant metodą, nustatytą I priede, ir pagal sąlygas, nurodytas II priedo 1 punkte, norint patvirtinti arba paneigti įtariamą buvimą. Pirmuoju atveju taikomi reikalavimai, nustatyti II priedo 2 punkte.

2. Laukiant, kol bus patvirtintas arba paneigtas įtariamasis paplitimas pagal 1 dalį, tais atvejais, kai paplitimas įtariamasis ir kai:

- i) įtariami diagnozuojami vizualiniai ligos simptomai pama-tomi arba
- ii) gauti teigiami imunofluorescencinio tyrimo, kaip aprašyta I priede, arba kito tinkamo tyrimo rezultatai,

atsakingosios valstybių narių institucijos:

- a) uždraudžia visų partijų ar siuntų, iš kurių buvo paimti mėginiai, judėjimą, išskyrus atvejus, kai tai yra jų kontroliuojama ir su sąlyga, kad buvo imtasi priemonių, jog nėra pavojaus bakterijai išplisti;
- b) imasi priemonių nustatyti pirminį paplitimo šaltinį;
- c) pagal įvertinto pavojaus lygį taiko reikiamas papildomas atsargumo priemones, siekiant užkirsti kelią bakterijai išplisti. Šioms priemonėms gali būti priskiriama oficiali visų kitų stiebagumbių arba augalų, esančių patalpose ar už patalpų ribų, kur buvo įtariama liga, judėjimo kontrolė.

3. Direktyvos 77/93/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka gali būti patvirtinta:

— priemonės, minimos anksčiau minimos 2 dalies c punkte.

4. Direktyvos 77/93/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka gali būti patvirtinta:

— kitas tinkamas tyrimas, nurodytas anksčiau minimos 2 dalies ii punkte.

5 straipsnis

1. Jeigu oficialiu ar oficialiai prižiūrimu laboratorijos patikrinimu, taikant metodą, nurodytą I priede, patvirtinamas bakterijos buvimas stiebagumbių, augalų ar augalų dalių mėginiuose, valstybės narės atsakingosios institucijos, atsižvelgdamos į pagrįstus mokslinius principus, bakterijos biologiją ir konkrečias gamybos, prekybos ir perdirbimo sistemas toje valstybėje narėje:

- a) laiko užkrėstais stiebagumbius ar augalus, siuntą ir (arba) partiją, įrenginį, transporto priemonę, laivą, sandėlį ar jo dalis ir bet kokius kitus objektus, įskaitant pakuotę, iš kur buvo paimtas mėginys ir, kur tikslinga, auginimo vietą (-as) bei lauką (-us), kur tie stiebagumbiai ar augalai buvo nukasti;
- b) atsižvelgdamos į III priedo 1 punkto nuostatas, nustato galimo užkrėtimo mastą per užkrėstos produkcijos sąlygtį su gamybos linija iki derliaus nuėmimo arba po jo;
- c) remdamosi nustatytu užkrėtimu pagal a punktą, galimu užkrėtimo masto nustatymu pagal b punktą, ir galimu bakterijos išplitimu, atsižvelgiant į III priedo 2 punkto nuostatas, paženkliną teritorijos ribas.

2. Pagal III priedo 3 punkto nuostatas valstybės narės nedelsdamos praneša kitoms valstybėms narėms ir Komisijai apie bet kokį užkrėtimą, nustatytą pagal 1 dalies a punktą ir teritorijos ribų paženklinimo detales pagal 1 dalies c punktą.

Šio pranešimo detalės yra konfidencialios. Jas galima pateikti Komitetui Direktyvos 77/93/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka.

3. Po šio pranešimo pagal 2 dalį ir minėtas jos sudėtines dalis, kitos valstybės narės, išvardytos pranešime, prireikus nustato užkrėtimą, galimo užkrėtimo mastą ir paženkliną teritorijos ribas atitinkamai pagal 1 dalies a, b ir c punktus.

6 straipsnis

Valstybės narės nurodo, kad nustaćius, jog stiebagumbiai arba augalai buvo užkrėsti pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą, bulvių, kurios klonavimu susiję su užkrėstomis bulvėmis, atsargos būtų patikrintos pagal 4 straipsnio 1 dalį. Patikrinamas toks stiebagumbių ar augalų kiekis, kokio reikia pirmiam infekcijos šaltiniui ir galimo užkrėtimo mastui nustatyti, pageidautina, pagal rizikos laipsnį.

Po šio patikrinimo, prireikus nustatomas užkrėtimas, galimo užkrėtimo mastas ir paženklinama užkrėsta teritorija atitinkamai pagal 5 straipsnio 1 dalies a, b ir c punktus.

7 straipsnis

1. Valstybės narės nurodo, kad stiebagumbiai ar augalai, nustatyti užkrėstais pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą, negali būti sodinami ir, kad atsakingosioms institucijoms kontroliuojant:

- jie būtų sunaikinami arba
- jie būtų šalinami kitais būdais, naudojantis oficialiai prižiūrima priemone (-ėmis) pagal IV priedo 1 punkto nuostatas, su sąlyga, kad yra užtikrinama, jog nebus didelio pavojaus bakterijai išplisti.

2. Valstybės narės nurodo, kad stiebagumbiai ar augalai, nustatyti gali būti užkrėsti pagal 5 straipsnio 1 dalies b punktą, negali būti sodinami ir, nepažeidžiant patikrinimo, minimo 6 straipsnyje dėl su klonavimu susijusių atsargų, rezultatų, kontroliuojant atsakingosioms oficialioms įstaigoms būtų atitinkamai panaudojami arba šalinami kaip nurodyta IV priedo 2 punkte, tokiu būdu, kad nekiltų rimto pavojus bakterijai išplisti.

3. Valstybės narės nurodo, kad bet koks įrenginys, transporto priemonė, laivas, sandėlis ar jo dalys ir bet kokie kiti objektai, įskaitant pakuotę, nustatyti užkrėstais pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą, arba nustatyti galintys būti užkrėsti pagal 5 straipsnio 1 dalies b punktą, būtų sunaikinami arba valomi ir dezinfekuojami, taikant reikiamus metodus, nurodytus IV priedo 3 punkte. Atlikus dezinfekciją, bet kurie iš šių objektų daugiau nėra laikomi užkrėstais.

4. Nepažeidžiant priemonių, įgyvendintų pagal 1, 2 ir 3 dalis, valstybės narės nurodo, kad teritorijoje, paženklintoje pagal 5 straipsnio 1 dalies c punktą, būtų įgyvendintos priemonės, kaip numatyta IV priedo 4 punkte.

8 straipsnis

1. Valstybės narės nurodo, kad sėklinės bulvės atitiktų Direktyvos 77/93/EEB reikalavimus ir būtų tiesiogiai išvestos iš gautos pagal oficialiai patvirtintą programą medžiagos, kurioje bakterija nebuvo aptikta, atlikus oficialų arba oficialiai prižiūrimą patikrinimą, taikant metodą, nustatytą I priede.

Anksčiau minimas patikrinimas atliekamas:

- tais atvejais, kai užkrėtimas paveikia sėklinių bulvių auginimą, pradinio klonavimo selekcijos augaluose,
- kitais atvejais, pradinio klonavimo selekcijos augaluose arba tipiniuose elitinių sėklinių bulvių arba ankstesnių dauginimų mėginiuose.

2. Direktyvos 77/93/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka gali būti patvirtinama:

- išsamios šio straipsnio 1 dalies antrosios pastraipos pirmosios įtraukos taikymo taisyklės,
- taisyklės, skirtos tipiniams mėginiams, numatytiems šio straipsnio 1 dalies antrosios pastraipos antroje įtraukoje.

9 straipsnis

Valstybės narės uždraudžia laikyti ir naudoti bakteriją.

10 straipsnis

Nepažeisdamos Direktyvos 77/93/EEB nuostatų, valstybės narės gali leisti eksperimentiniais ar moksliniais tikslais ir veislių selekcijos darbui nukrypti nuo priemonių, minimų šios Direktyvos 6, 7 ir 9 straipsniuose, jei tokios nukrypti leidžiančios nuostatos nepažeidžia bakterijos kontrolės ir nekyla pavojaus bakterijai išplisti.

11 straipsnis

Valstybės narės gali patvirtinti tokias papildomas arba griežtesnes priemones, kurių gali prireikti kovai su bakterija arba užkirsti kelią jai plisti, jeigu jos atitinka Direktyvos 77/93/EEB nuostatas.

Papildomos priemonės, minimos pirmoje pastraipoje, gali apimti nurodymą sodinti tik tas sėklinės bulves, kurios yra oficialiai sertifikuotos arba oficialiai patikrintos tam, kad atitiktų reikalaujamus augalų sveikatos standartus. Pastarieji visų pirma gali būti taikomas tada, kai ūkininkams leidžiama jų pačių ūkiuose sodinti sėklinės bulves, kurias jie patys nukasė arba išaugino.

Išsami informacija apie tokias priemones pateikiama kitoms valstybėms narėms ir Komisijai.

12 straipsnis

Šios direktyvos priedų pakeitimai, kurie bus atlikti plėtojantis mokslinėms ir techninėms žinioms, priimami Direktyvos 77/97/EEB 16a straipsnyje nustatyta tvarka.

13 straipsnis

1. Valstybės narės priima ir paskelbia nuostatas, kurios, įsigaliojusios iki 1993 m. lapkričio 15 d., įgyvendina šią direktyvą. Apie tai jos nedelsdamos praneša Komisijai.

Valstybės narės, tvirtindamos šias nuostatas, daro jose nuorodą į šią direktyvą arba tokia nuoroda daroma jas oficialiai skelbiant. Nuorodos darymo tvarką nustato valstybės narės.

Valstybės narės šias nuostatas taiko nuo 1993 m. lapkričio 16 d.

2. Valstybės narės pateikia Komisijai šios direktyvos taikymo srityje priimtų nacionalinės teisės aktų pagrindinių nuostatų tekstus. Apie tai Komisija praneša kitoms valstybėms narėms.

14 straipsnis

Direktyva 80/665/EEB panaikinama nuo 1993 m. lapkričio 16 d.

15 straipsnis

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

Priimta Liuksemburge, 1993 m. spalio 4 d.

Tarybos vardu

Pirmininkas

W. CLAES

I PRIEDAS

BAKTERINIO ŽIEDINIO PUVINIO SUKĖLĖJO CLAVIBACTER MICHIGANENSIS (Smith) Davis et al. ssp. SEPEDONICUS (Spieckermann et Kotthof) Davis et al. NUSTATYMO IR DIAGNOZAVIMO BULVIŲ STIEBAGUMBIŲ PARTIJOSE METODIKA**1. Kūgio formos audinių gabaliukų išėmimas**

- 1.1. Nuplaunama 200 stiebagumbių po tekančiu vandeniu ir pašalinamas epidermis, esantis apie kiekvieno stiebagumbio viršūnę, naudojant nuolat dezinfekuojamą skalpelį arba bulvių skutimo peilį; dezinfekuoti galima pamerkus peilį į 70 % etanolį ir uždegus.
- 1.2. Atsargiai skalpeliu arba bulvių skutimo peiliu išpjunami kūgio formos audinio gabaliukai iš stiebagumbio viršūnės. Nevaskuliarinio audinio turi būti kiek galima mažiau. Atskirti mėginiai turi būti apdoroti per 24 valandas (žr. 3 dalį) arba laikomi –20 °C temperatūroje ne ilgiau kaip dvi savaites.

2. Vizualinė apžiūra ieškant žiedinio puvinio simptomų

Atskyrus mėginius, kiekvienas stiebagumbis perpjaunamas skersai ir apžiūrima, ar nėra žiedinio puvinio simptomų.

Stiebagumbis suspaudžiamas ir apžiūrima, kaip atrodo išsiskiriančios iš vaskuliarinio audinio sultys.

Pirminiai simptomai yra tam tikras audinio skaidrumas arba peršviečiamumas, neminkštėjimas aplink vaskuliarinę sistemą, ypač prie viršūnės. Vaskuliarinis žiedas prie viršūnės gali būti šiek tiek tamsesnės spalvos negu paprastai. Pirmasis lengvai nustatomas simptomas – vaskuliarinis žiedas yra gelsvas, o švelniai paspaudus gumbą iš indų pradeda sunktis į sūrio konsistenciją panaši medžiaga. Šioje besisunkiančioje medžiagoje yra milijonai bakterijų. Šioje stadijoje vaskuliarinis audinys gali paruduoti. Iš pradžių šie simptomai gali būti matomi tik vienoje žiedo dalyje, nebūtinai prie viršūnės, ir palaipsniui gali išplisti visame žiede. Užkratui plintant, žūva vaskuliarinis audinys; išorinė žievės dalis gali atsiskirti nuo vidinės žievės. Vėlesnėse infekcijos stadijose stiebagumbio paviršiuje atsiranda įtrūkimų, kurių pakraščiai dažnai būna raudonai rudi. Antrinė grybinė arba bakterinė invazija gali užmaskuoti simptomus ir gali būti sunku, netgi neįmanoma, atskirti vėlyvuosius žiedinio puvinio simptomus nuo kitų stiebagumbių puvinį.

3. Mėginių paruošimas dažyti Gramo būdu, imunofluorescenciniam (IF) dažymui ir baklažano testui

- 3.1. Mėginiai homogenizuojami iki visiško maceravimo tirpiklyje, kuris nebūtų toksiškas *Corynebacterium sepedonicum* (pavyzdžiui, 0,05 M fosfatiniame buferiniame valgomosios druskos tirpale (PBS) pH 7,0) mažesnėje negu 30 °C temperatūroje; rekomenduojama taip pat įpilti netoksiško deflokulianto, taip pat gali prireikti netoksiško priešpučio (1 ir 2 priedėliai). Reikėtų vengti per ilgo maceravimo.
- 3.2. Bakterijos iš homogenizuoto tirpalo išskiriamos vienu iš nurodytų būdų ⁽¹⁾:
 - A. a) Centrifuguojama 10 minučių, esant 180 g.
 - b) Gautas centrifugatas 10 minučių centrifuguojamas esant ne mažiau kaip 4000 g. Dekantuojama, centrifugatas išpilamas.
 - B. a) Leidžiama maceratui pastovėti 30 minučių, kol audinių dalelės nusėda. Skystis dekantuojamas nesudrumstus nuosėdų.
 - b) Skystis filtruojamas perliejant per filtravimo popierių (*Whatman* Nr. 1), įdėtą į stiklo filtrą (Nr. 2 = 40–100µm), naudojant vakuuminį vandens siurbį. Filtratas surenkamas į centrifugos vamzdį. Filtras išplaukamas steriliu PBS, kol susidarys ne daugiau kaip 35 ml filtrato.
 - c) Filtratas centrifuguojamas 20 minučių, esant ne mažiau kaip 4 000 g.
- 3.3. Granulė suspenduojama steriliame 0,01 M fosfato buferiniame tirpale pH 7,2 (2 priedėlis), kad visas kiekis sudarytų maždaug 1 ml. Padalijama į dvi lygias dalis, viena dalis atidedama kaip pamatinė – užšaldoma iki –20 °C ⁽²⁾ arba panaudojant liofilizaciją. Likusioji dalis padalijama pusiau – viena pusė IF testui ir Gramo dažymui, kita – baklažano testui.

⁽¹⁾ Alternatyvų išskyrimo metodą 1984 m. pateikė Dinesen.

⁽²⁾ Įrodyta (Jane ir Van Vaerenberg, 1987), kad šaldant mažėja *Corynebacterium sepedonicum* gyvybingumas. Kad to neatsitiktų, granulė laikoma 10 % glicerolio tirpale.

- 3.4. Siekiant išvengti užkrėtimo, visi teigiami *C. sepedonicum* mėginiai ir bandymai turi būti tiriami atskirai. Tai taikoma IF skaidrėms ir baklažano testams.
4. *Dažymas pagal Gramą*
- 4.1. Mėginiai iš stiebagumbių (2), kuriuose matyti skaidrumas, puvimas ar koks nors kitas įtartinas simptomas, bei jų skiedinių (5.2.1) paruošiami dažyti pagal Gramą. Mėginius reikia imti nuo apkrėstų audinių pakraščių.
- 4.2. Iš žinomos *C. sepedonicum* kultūros ir, jeigu įmanoma, natūraliai apkrėsto audinio (5.1) paruošiami tepinėliai dažyti pagal Gramą.
- 4.3. Nustatoma, kuriuose mėginiuose yra būdingų gramteigiamų *coryneform* ląstelių. Paprastai *C. sepedonicum* ląstelės būna 0,8–1,2µm ilgio ir 0,4–0,60µm pločio.

Teisinga spalvinimo tvarka yra pateikiama 3 priedėlyje.

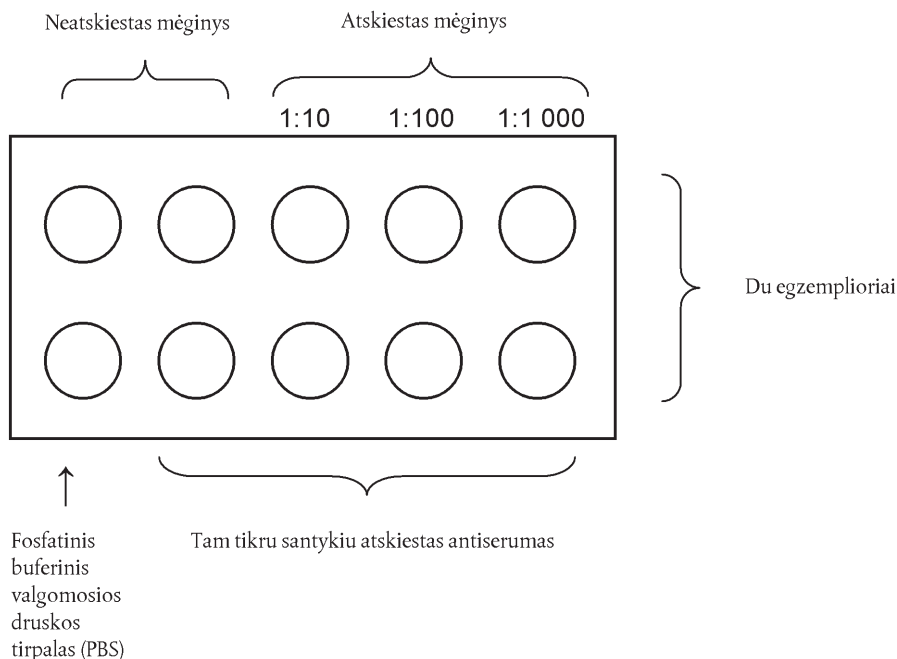
Natūralios infekcijos arba neseniai išskirtų kultūrų preparatuose dažnai vyrauja kokinės ląstelių grandinės, kurios paprastai yra šiek tiek mažesnės, negu ląstelės iš kitų agarų kultūrų. Daugumoje kultūrų terpių *C. sepedonicum* ląstelės būna pleomorfines *coryneform* lazdelės ir gali nulemti skirtingą Gramo reakciją. Ląstelės yra pavienės, poromis su būdingomis „alkūnėmis“, tipiškoms lenkiamajam dalijimuisi, o kartais netaisyklingomis grupėmis, dažnai vadinamomis tvorelėmis arba kinų hieroglifais.

5. IF tyrimo schema

- 5.1. Naudojamas antiserumas *C. sepedonicum* padermei – ATCC 33113 (NCPBP 2137), arba NCPBP 2140. Jis turi turėti IF titrą, didesnį kaip 1:600. Atliekamas vienas kontrolinės skaidrės PBS tyrimas, norint nustatyti, ar fluoresceino izotiocianato *anti-rabbit* imunoglobulininis junginys (FITC) nesijunia su bakterijų ląstelėmis. *Corynebacterium sepedonicum* (ATCC 33113 (NCPBP 2137), NCPBP 2140) reikia atlikti kontrolinį homologinį antigeno tyrimą naudojant atskirą skaidrę. Natūraliai užkrėstas audinys (palaikomas liofilizacijos būdu arba užšaldytas iki -20 °C) turi būti naudojamas, kai įmanoma, kaip panašus kontrolinis tos pačios skaidrės tyrimas (2 pav.).
- 5.2. *Darbo eiga*
- 5.2.1. Galutinė granulė nuosekliai 3 kartus dešimteriopai (10¹, 10², 10³) praskiedžiama distiliuotame vandenyje (1 pav.).
- 5.2.2. Pipete užlašinamas išmatuoto standartinio kiekvieno granulės tirpalo arba *C. sepedonicum* suspensijos (maždaug 10⁶ ląstelės/ml) kiekis, kurio pakanka uždengti langelį (maždaug 25 µl) į daugiataškės skaidrės langelius kaip parodyta 1 pav.

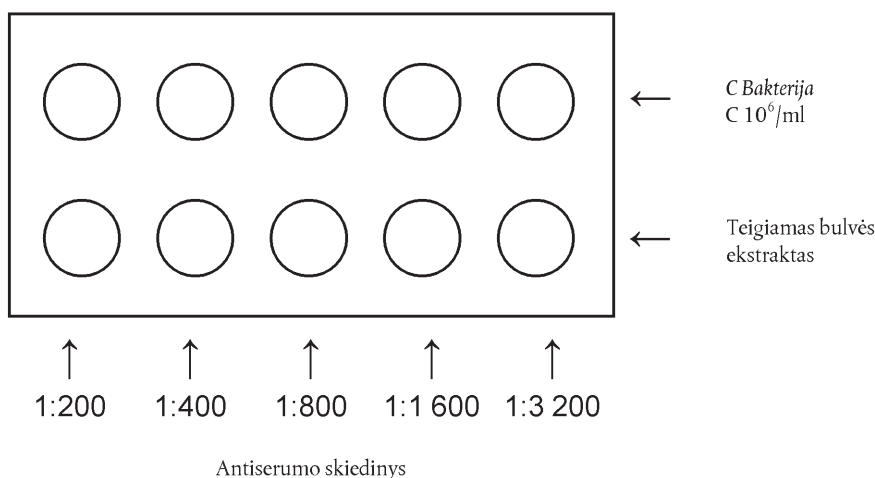
1 pav.

Mėginio ir PBS kontrolinė skaidrė



2 pav.

Teigiama kontrolinė skaidrė



- 5.2.4. Atitinkami langeliai padengiami *C. sepedonicum* antiserumu rekomenduojamais skiediniais, 0,01 M PBS pH 7,2 (2 priedėlis) kaip parodyta 1 paveikslėlyje. (Naudojamas PBS FITC kontrolei.) Darbinis serumo skiedinys turi sudaryti maždaug pusę IF titro. Jeigu norima naudoti kitus antiserumo skiedinius, reikia paruošti atskiras skaidres kiekvienam naudojamam skiediniui.
- 5.2.5. Inkubuojama drėgnoje kameroje aplinkos temperatūroje 30 minučių.
- 5.2.6. Gerai praskalaujama 0,01 M PBS pH 7,2. Plaunama penkias minutes tris kartus vis nauju kiekiu 0,01 M PBS pH 7,2.
- 5.2.7. Kruopščiai pašalinamas drėgmės perteklius.
- 5.2.8. Kiekvienas langelis padengiamas FITC junginiu tame pačiame skiedinyje, naudojamame nustatyti titrą ir inkubuojama 30 minučių tamsioje drėgnoje kameroje aplinkos temperatūroje.
- 5.2.9. Praskalaujama ir išplaunama kaip anksčiau.
- 5.2.10. Į kiekvieną langelį įlašinama maždaug 5–10 µl 0,1 M fosfatų buferuoto glicerino pH 7,6 (arba panašaus tirpalo, kurio pH ne mažesnis kaip 7,6) ir uždengiama dengiamuoju stiklu (2 priedėlis).
- 5.2.11. Apžiūrima mikroskopu su epifluorescenciniu šviesos šaltiniu ir filtrais, tinkamais darbui su FITC. Tinkamas didinimas yra 400–1000 kartų. Replikuoti langeliai Nuskaitomi dviem diametrais stačiais kampais ir aplink langelio perimetrus.

Ieškoma fluorescuojančių ląstelių teigiamuose kontroliniuose mėginiuose ir nustatomas titras. Ieškoma fluorescuojančių ląstelių FITC/PBS kontroliniame langelyje ir, jeigu ten jų nėra, pereinama prie tiriamųjų langelių. Mažiausiai dešimtyje mikroskopo laukų nustatomas vidutinis morfologiškai tipiškų fluorescuojančių ląstelių skaičius viename lauke ir apskaičiuojamas jų skaičius vienam ml nepraskiestos granulės (4 priedėlis).

Yra keletas problemų, būdingų imunofluorescenciniam tyrimui.

- Bulvių granulėse gali atsirasti foninių fluorescuojančių ląstelių populiacijų, turinčių netipiską morfologiją, ir susikryžminančių saprofitinių bakterijų, kurių dydis ir morfologija yra panašūs į *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Atkreipiamas dėmesys tik į tipiško dydžio ir morfologijos fluorescuojančias ląsteles.

Dėl sukryžminimo reakcijos galimybės mėginius, kurių imunofluorescencinis tyrimas yra teigiamas, reikia dar kartą iširti, naudojant kitą antiserumą.

- Šio metodo techninė aptikimo riba yra nuo 10^3 iki 10^4 ląstelių vienam ml nepraskiestos granulės. Mėginiai su IF tipiškais ląstelių skaičiais, esant aptikimo ribai, paprastai yra neigiami *C. m. ssp. sepedonicus*, tačiau juos galima iširti baklažano testu.

Neigiamas imunofluorescencinis tyrimas yra nustatomas bet kuriam mėginiui, kuriame neaptiktos morfologiškai tipiškos fluorescuojančios ląstelės. Mėginiai laikomi neužkrėsti *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Baklažano testo atlikti nereikia.

Teigiamas imunofluorescencinis tyrimas yra nustatomas bet kuriam mėginiui, kuriame aptiktos morfologiškai tipiškos fluorescuojančios ląstelės.

Mėginiai, kuriems nustatomas teigiamas imunofluorescencinis tyrimas, naudojant abu antiserumus, laikomi potencialiai užkrėsti *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

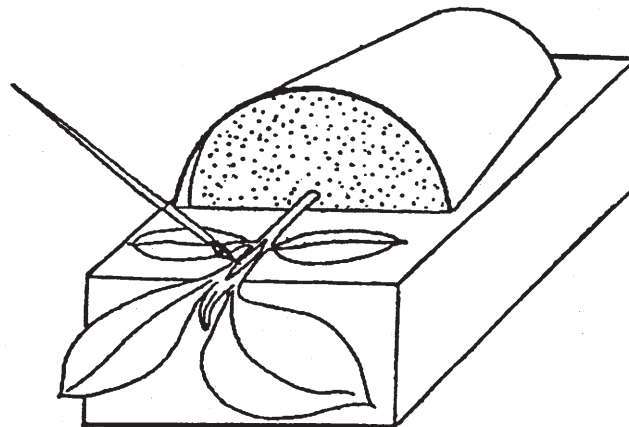
Baklažano testą reikia atlikti visiems mėginiams, kurie laikomi potencialiai užkrėsti.

6. Baklažano testas

Išsamiau apie kultūras, žiūrėkite 5 priedėlį.

- 6.1. Granulė padalijama, kaip aprašyta 3.3 punkte, mažiausiai 25 baklažanams, kai yra trečio lapelio stadija (5 priedėlis), taikant vieną toliau pateiktų metodų (6.2, 6.3 arba 6.4).
- 6.2. *Inokuliacija į įpjovą (I)*
 - 6.2.1. Kiekvienas vazonėlis pastatomas horizontaliai (išplėsto polistirolų blokas, iš kurio vieno paviršiaus pašalintas 5 cm gylio, 10 cm pločio ir 15 cm ilgio gabalas (3 pav.) atitinka 10 cm vazonėlį (3 pav.). Kiekvienam tiriamam mėginiui tarp stiebo ir bloko turi būti įstatyta sterilus aliuminio folijos juostelė. Augalą galima prilaikyti gumine juosta apjuosus bloką.
 - 6.2.2. Skalpelio padaroma išilginė arba šiek tiek įstriža 0,5–1,0 cm ilgio ir maždaug trijų ketvirčių stiebo skersmens gylio įpjova tarp sėklaskilčių ir pirmojo lapelio.
 - 6.2.3. Įpjova praplečiama skalpelio geležtės smaigaliu, nuo granulės inokuliantas imamas ir tepamas kosmetiniu peštuku arba plonu dailininko teptuku. Likusi granulė paskirstoma ant visų baklažanų.
 - 6.2.4. Naudojant 2 ml švirkštą, įpjova užtepama steriliu vazelinu.

3 pav.



- 6.3. *Inokuliacija į įpjovą (II)*
 - 6.3.1. Laikant augalą tarp dviejų pirštų, granulės suspensijos lašas (maždaug 5–10 µl) pipete užlašinamas ant stiebo tarp sėklaskilčių ir pirmojo lapelio.
 - 6.3.2. Steriliu skalpelio padaroma išilginė (maždaug 5° kampu) 1,0 cm ilgio ir maždaug 2/3 stiebo storio gylio įpjova, pradedant įpjovą nuo granulės suspensijos lašo.
 - 6.3.3. Naudojantis švirkštu įpjova užtepama steriliu vazelinu.
- 6.4. *Inokuliacija švirkštu*
 - 6.4.1. Nelaistyti baklažanų vieną dieną prieš inokuliaciją, kad būtų sumažintas turgoro spaudimas.

- 6.4.2. Baklažanų augalai inokuliuojami tiesiai virš sėklaskilčių švirkštu su poodine adata (ne mažesne kaip 23G). Granulė paskirstoma baklažanams.
- 6.5. Žinoma *C. sepedonicum* kultūra ir, kur įmanoma, natūraliai užkrėstas stiebagumbių audinys (5.1) įterpiamas į 25 augalus, taikant tą patį inokuliacijos metodą (6.2, 6.3 arba 6.4).
- 6.6. Sterilus 0,05 M PBS įterpiamas į 25 augalus, taikant tą patį inokuliacijos metodą (6.2, 6.3 arba 6.4).
- 6.7. Augalai tinkamomis sąlygomis (5 priedėlis) inkubuojami 40 dienų. Kas aštuonias dienas reguliariai tikrinama, ar neišryškės simptomų. Suskaičiuojamas augalų, kuriuose atsirado simptomų, skaičius. *C. sepedonicum* baklažanams sukelia lapų vytimą – iš pradžių kraštuose ir tarp gyslų. Suvytęs audinys iš pradžių gali būti tamsiai žalias arba margas, tačiau prieš nekrozuodamas pašviesėja. Vytimo vietos tarp gyslų dažnai atrodo tarsi būtų šlapios riebaus skysčio dėmės. Nekrotinio audinio pakraščiai dažnai būna ryškiai geltoni. Augalai nebūtinai žūva; kuo ilgesnis laikotarpis iki pasirodant pirmiesiems simptomams, tuo didesnė galimybė, kad augalas išgyvens. Augalai gali įveikti infekciją. Jauni baklažanų augalai daug jautresni mažoms *C. sepedonicum* populiacijoms negu vyresni augalai, todėl reikia naudoti augalus, kai yra trečio lapelio stadija arba prieš pat ją.

Vytimą taip pat gali sukelti kitų bakterijų arba grybų populiacijos stiebagumbio audinio granulėje. Tai gali būti *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ir *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata*, o taip pat ir didelės saprofitinių bakterijų populiacijos. Tokį apvytimą galima atskirti nuo *C. sepedonicum* sukkelto vytimo, kadangi visi lapai arba visi augalai greitai vysta.

- 6.8. Paruošiami Gramo mėginiai (4) visoms baklažanų, kuriuose atsirado simptomų, partijoms, panaudojant suvytusią lapų audinių ir stiebų audinių dalis ir išskiriami tinkamoje maistinių medžiagų terpėje (7). Baklažanų lapų ir stiebų paviršius dezinfekuojamas, nušluostant 70 % etanoliu.
- 6.9. Esant tam tikroms aplinkybėms, ypač kai augimo sąlygos nėra pačios geriausios, gali būti, kad *C. sepedonicum* įgis latentinės infekcijos formą baklažanuose net po 40 dienų inkubacijos. Dėl tokios infekcijos inokuliuoti augalai gali nustoti augti ir prarasti energiją. Jeigu IF testas laikomas teigiamu, galima nuspręsti tirti toliau. Todėl labai svarbu palyginti visų tiriamų baklažanų augalų augimo tempus steriliaus 0,05 M PBS kontroline inokuliacija ir stebėti šiltnamio aplinkos sąlygas.

Tolesnio tyrimo rekomendacijos yra tokios:

- 6.9.1. Stiebai virš inokuliuotos vietos nupjaunami, lapai pašalinami.
- 6.9.2. Stiebai maceruojami 0,05 M PBS pH 7,0, kaip aprašyta 3.1–3.2 punktuose.
- 6.9.3. Dažyti Gramo būdu (4) ir IF testui (5) panaudojama pusė granulės.
- 6.9.4. Likusi pusė panaudojama kitam baklažano testui (6), jeigu dažymo Gramo būdu ir (arba) IF testai teigiami. Panaudojama žinoma *C. sepedonicum* kultūra ir sterili 0,05 M PBS kontrolė. Jeigu kitame teste simptomai nepasitėbimi, mėginys turi būti laikomas neigiamu.

7. *C. sepedonicum* išskyrimas

Diagnozę galima patvirtinti tik tada, jeigu *C. sepedonicum* yra išskiriama ir nustatoma (8). Nors *C. sepedonicum* yra sudėtinga bakterija, ją galima išskirti nuo simptominio audinio. Nepaisant to, ją gali užgožti greitai augančios saprofitinės bakterijos ir todėl išskyrimas tiesiai nuo stiebagumbio audinio granulės (3.3.) nerekomenduojamas. Baklažanai yra puiki selektyvi mitybinė terpė *C. sepedonicum* augti ir taip pat su jais galima puikiai atlikti patvirtinamąjį (bakterijos) šeimininko testą.

Išskirti reikia nuo visų, turinčių būdingus simptomus, bulvių stiebagumbių ir baklažanų (4, 6). Kai reikia, atliekamas baklažanų stiebų maceravimas, kaip nurodyta 3 ir 6.9 punktuose.

- 7.1. Suspensijos sėjamos ant vienos iš išvardytų terpių: (formulės pateiktos 6 priedelyje):
- maistingo dekstrozės agaro (tik subkultūrai),
 - mielių peptono gliukozės agaro,
 - maistinio mielių dekstrozės agaro,
 - mielių ekstrakto mineralinių druskų agaro.

Inkubuojama 21 °C temperatūroje iki 20 dienų.

C. sepedonicum auga lėtai, paprastai išauga į segtuko smaigalio, kremines, skliautines kolonijas per 10 dienų.

Dar kartą sėjama, stengiantis gauti gryną kultūrą.

Subkultūroje augimo tempai spartesni. Tipiškos kolonijos būna kreminės baltos arba dramblio kaulo spalvos, apskritos, lygios, iškilios, išgaubtos skliautinės, gleivių skystumo, lygiais kraštais ir paprastai 1–3 mm skersmens.

Identifikavimas

Iš sveikų arba užkrėstų bulvių ir baklažanų galima išskirti daugelį gramteigiamų *coryneform* bakterijų, kurių kolonijiniai tipai panašūs į *C. sepedonicum*. Todėl *C. sepedonicum* reikia nustatyti tokiais testais:

IF testas (5.1),

baklažano testas,

maistinių medžiagų ir fiziologiniai testai (7 priedėlis),

- oksidacijos/fermentacijos testas (O/F),
- oksidazės testas,
- augimas 37 °C temperatūroje,
- ureazės gamyba,
- eskulino hidrolizė,
- krakmolo hidrolizė,
- pakantumas 7 % natrio chlorido tirpalui,
- indolo testas,
- katalazės testas,
- H₂S gamyba,
- citrato įsisavinimas,
- želatinos hidrolizė,
- rūgštis iš: glicerino, laktozės, ramnozės ir salicino,
- dažymas pagal Gramą.

Visi testai apima žinomą *C. sepedonicum* kontrolę. Maistinių medžiagų ir fiziologinius testus reikia atlikti naudojantis inokuliantais iš maistinių agaro subkultūrų. Morfologinius palyginimus reikia atlikti iš maistinių dekstrozės agaro kultūrų.

IF testui ląstelių populiacijos turi būti sureguliuotos iki 10⁶ ląstelių/ml. IF titras turi būti panašus į žinomą *C. sepedonicum* kultūrą.

Baklažano testui ląstelių populiacijos turi būti sureguliuotos iki 10⁷ ląstelių/ml. Baklažano testus reikia atlikti su 10 augalų kiekvienam iš testuojamų organizmų vėl naudojant žinomą *C. sepedonicum* kultūrą ir sterilaus vandens kontrolę; su grynomis kultūromis paprastai turi nuvysti per 20 dienų, tačiau augalai, kuriuose simptomų neaptinkama praėjus šiam laikui, turi būti inkubuojami iš viso 30 dienų temperatūroje, sudarančioje sąlygas baklažanams augti, tačiau neviršijančioje 30 °C (5 priedėlis). Jeigu po 30 dienų simptomų nėra, negali būti patvirtinta, kad kultūra yra patogeninė *Corynebacterium sepedonicum* forma.

Bandymas	C. sepedonicum
O/F	inertiška arba silpnai oksidacinė
Oksidazė	–
Katalazė	+
Nitratų redukcija	–
Ureazės veikla	–
H ₂ S gamyba	–
Indolo gamyba	–
Citrato įsisavinimas	–
Krakmolo hidrolizė	– arba silpna
Augimas esant 37°	–
Augimas 7 % NaCl	–
Želatinos hidrolizė	–
Eskulino hidrolizė	+
Rūgštis iš:	
– Glicerolio	–
– Laktozės	– arba silpna
– Ramnozės	–
– Salicino	–

1 priedėlis

MACERAVIMO SKYSČIO SUDĖTIS, REKOMENDUOJAMA PAGAL LELLIOTT IR SELLAR, 1976

D C silikoninis priešputis MS A mišinys (Hopkins & Williams Ltd, Cat. Nr. 9964-25, Chadwell Heath, Essex, England)	10 ml
Lubrol W drožlės (ICI Ltd)	0,5 g
Tetranatrio pirofosfatas	1 g
0,05 M fosfatinis buferinis druskos tirpalas pH 7,0 (2 priedėlis)	1 litras

2 priedėlis

BUFERINIAI TIRPALAI

0,05 M fosfatinis buferinis druskos tirpalas pH 7,0

Šį buferinį tirpalą galima naudoti stiebagumbių audiniams maceruoti (2.1)

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
NaCl	8,0 g
Distiliuotas vanduo iki	1 litro

0,01 M fosfatinis buferinis druskos tirpalas pH 7,2

Šis buferis tirpalas naudojamas antiserumui praskiesti ir plauti IF skaidres

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Distiliuotas vanduo iki	1 litro

0,1 M fosfatinis buferinis glicerolis pH 7,6

Šis buferinis tirpalas naudojamas kaip pagrindas sustiprinti fluorescenciją IF teste

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
Glicerinas	50 ml
Distiliuotas vanduo	100 ml

3 priedėlis

DAŽYMAS GRAMO BŪDU (HUKERIO MODIFIKACIJA) (DOETSCH, 1981 m.)**Kristalvioletino tirpalas**

Ištirpinami 2 g kristalvioletino 20 ml 95 % etanolio.

Ištirpinama 0,8 g amonio oksalato 80 ml distiliuoto vandens.

Šie du tirpalai sumaišomi.

Lugolio jodas

Jodas	1 g
Kalio jodidas	2 g
Distiliuotas vanduo	300 ml.

Kietosios medžiagos kartu sutrinamos grūstuve. Supilama į vandenį ir uždarame inde išmaišoma, kad ištirtų.

Safranino kontražymo tirpalas

Pradinis tirpalas:

Safraninas O	2,5 g
95 % etanolis	100 ml.

Sumaišoma ir laikoma.

Praskiedžiama: 1:10 norint gauti darbinį tirpalą.

Dažymo procedūra

1. Paruošti tepinėliai išdžiovinami ore, po to pakaitinti fiksuojami.
 2. Skaidrė pamerkiama į kristalvioletino tirpalą vienai minutei.
 3. Perliejama vandeniu iš čiaupo.
 4. Pamerkiama į Lugolio jodą vienai minutei.
 5. Perliejama vandeniu iš čiaupo ir sausai išdžiovinama.
 6. Išblukinama, lašinant 95 % etanolį, kol spalva nebebluks arba atsargiai maišant pamerkiama 30 sekundžių.
 7. Nuplaunama vandeniu iš čiaupo ir sausai išdžiovinama.
 8. Pamerkiama į safranino tirpalą 10 sekundžių.
 9. Nuplaunama vandeniu iš čiaupo ir sausai išdžiovinama.
- Gramteigiamos bakterijos nusidažo rausvai mėlyna spalva; Gramneigiamos bakterijos nusidažo rausvai raudona spalva.
-

4 priedėlis

IF-TEIGIAMŲ LĄSTELIŲ POPULIACIJOS NUSTATYMAS

Daugiataškės skaidrės langelio paviršiaus plotas (S)

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

čia D = langelio skersmuo.

Objektyvo lauko paviršiaus plotas (-ai)

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

čia d = lauko skersmuo.

d apskaičiuojamas tiesiogiai išmatuojant arba pagal pateiktą formulę:

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

čia i = lauko koeficientas (priklauso nuo okuliario tipo ir kinta nuo 8 iki 24),

K = okuliario koeficientas (1 arba 1,25),

G = objektyvo didinimas (100 x, 40 x ir t. t.)

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

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

Suskaičiuojamas tipišku fluorescuojančių ląstelių skaičius lauke c).

Apskaičiuojamas tipišku fluorescuojančių ląstelių skaičius langelyje C).

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

Apskaičiuojamas tipišku fluorescuojančių ląstelių skaičius viename ml granulės (N).

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

čia y = granulės tūris langelyje,

čia F = granulės skiedimo koeficientas.

5 priedėlis

BAKLAŽANO KULTŪRA

Baklažano (*Solanum melongena* cv. *Black Beauty*) sėklos pasodinamos pasterizuotame sėklų komposte. Daigai su visiškai išsiskleidusiomis sėklaskiltėmis (nuo 10 iki 14 dienų) persodinami į vazonėlį su pasterizuotu kompostu.

Baklažanai panaudojami, kai yra trečio lapelio stadija ir kai du, bet ne daugiau kaip trys lapeliai bus visiškai išsiskleidę.

Baklažanai turi būti auginami šiltnamyje esant tokioms aplinkos sąlygoms:

dienos ilgumas:: 14 valandų arba natūralus dienos ilgumas, jeigu diena ilgesnė;

temperatūra: dieną: nuo 21 iki 24 °C,

- naktį 15 °C.

NB: *C. sepedonicum* neaugs, jei temperatūra >30 °C. Jeigu temperatūra naktį nenukrenta iki 15 °C, gali būti pažeistas chlorofilo trūkumas (sidabriška nekrozė).

Šaknų pažeidimų, kuriuos sukelia *sciarid* lervos galima išvengti panaudojus tinkamą insekticidą.

Baklažanus cv. *Black Beauty* galima įsigyti:

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

6 priedėlis

TERPĖS, SKIRTOS *C. SEPEDONICUM* AUGINTI IR IŠSKIRTI**Mitybinis agaras (NA)**

Difco bacto mitybinis agaras distiliuotame vandenyje pagal gamintojo koncentracijas. Sterilizuojama autoklave 121 °C temperatūroje 15 minučių.

Mitybinis gliukozės agaras (NDA)

Difco bacto mitybinis agaras, kurio sudėtyje yra 1 % D(+) gliukozės (monohidrato). Sterilizuojama autoklave 20 minučių 115 °C temperatūroje.

Mielių-peptono-gliukozės agaras (YPGA)

<i>Difco bacto</i> mielių ekstraktas (Nr. 0127)	5 g
<i>Difco bacto</i> peptonas (Nr. 0118)	5 g
D (+) gliukozė (monohidratas)	10 g
<i>Difco bacto</i> išgrynintas agaras (Nr. 0560)	15 g
Distiliuotas vanduo	1 litras

0,5 litro tūrio terpė sterilizuojama autoklave 20 minučių 115 °C temperatūroje.

Mielių ekstrakto mineralinių druskų terpė (YGM)

<i>Difco bacto</i> mielių ekstraktas	2,0 g
D (+) gliukozė (monohidratas)	2,0 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
MgSO ₄ ·H ₂ O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 g
<i>Difco bacto</i> išgrynintas agaras	18 g
Distiliuotas vanduo	1 litras

0,5 litro tūrio terpė sterilizuojama autoklave 20 minučių 115 °C.

7 priedėlis

MAISTO MEDŽIAGŲ IR FIZIOLOGINIAI TESTAI C. SEPEDONICUM NUSTATYTI

Visos terpės turi būti inkubuojamos 21 °C temperatūroje ir tikrinamos po šešių dienų. Jeigu augimas nepastebimas, inkubuojama iki 20 dienų.

— **Oksidacijos ir fermentacijos testas** (Hugh ir Leifson), 1953) - O/F testas.

Pagrindinė terpė:

KCl	0,2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
Difco bacto peptonas	1,0 g
Difco bacto išgrynintas agaras	3,0 g
D (+) gliukozė (monohidratas)	10,0 g
Bromtimolo mėlis	0,03 g
Distiliuotas vanduo	1 litras

Sumaišoma su 1N KOH ir nustatoma, kad pH būtų nuo 7,0 iki 7,2.

Padalijama į Pyrex kultūrų auginimo 16 mm x 100 mm (12 ml talpos) mėgintuvėlius po 5 ml ir 10 ml.

Sterilizuojama autoklave 10 minučių 115 °C temperatūroje.

Užsėjama 5 ml ir 10 ml mėgintuvėlius kiekvienai kultūrai. Aseptiškai pridedama 1–2 ml sterilus skysto parafino į 10 ml mėgintuvėlį. Inkubuojama.

Teigiama reakcija:

Mėgintuvėlis	Spalva	Aiškinimas
Atviras	Geltona	Fermentacinė
Uždaras	Geltona	
Atviras	Geltona	Oksidacinė
Uždaras	Mėlynai žalia	
Atviras	Žalsva	Oksidacinė arba inertiška
Uždaras	Mėlynai žalia	

— **Oksidazės testas** (Kovacs, 1956 m.)

Kovacs oksidazės reagentas:

1 % vandeninis tetrametil-parafenilenediamino-dihidrochlorido (BDH Nr. 30386) tirpalas distiliuotame vandenyje.

Šis reagentas turi būti ką tik pagamintas po 1 ml arba jį galima laikyti rudo stiklo butelyje 5 °C temperatūroje nuo 1 iki 4 savaičių.

Lašas reagento užlašinamas ant filtrinio popieriaus švarioje Petri lėkštelėje. Nedelsiant, naudojantis platinine kilpele, nutrinama šiek tiek tiriamosios kultūros nuo mitybinio agarų.

Teigiama reakcija: nusidažo purpurine spalva per 10 sekundžių. Kultūros, nusidažančios per 10–30 sekundžių, yra silpnai teigiamos.

NB: Ypač svarbu naudoti platininę kilpelę ir NA kultūras, kadangi geležies pėdsakai arba didelis cukraus kiekis augimo terpėje gali parodyti neteisingus teigiamus rezultatus.

— Rūgšties gamyba iš laktozės, ramnozės, salicino, glicerolio

Paruošiama Hugh ir Leifson oksidacinė ir fermentinė terpė be gliukozės. Padalijama po 5 ml į mėgintuvėlius. Sterilizuojama autoklave 10 minučių 115 °C temperatūroje. Į išlydytą 45 °C bazę aseptiškai pridedama 0,5 ml filtru sterilizuoto 10 % vandeninio glicerolio, laktozės, ramnozės arba salicino tirpalų. Gerai išmaišoma.

Teigiama reakcija: spalvos pasikeitimas iš mėlynai žalios į geltoną rodo, kad gaminasi rūgštis.

— Katalazės testas

Vandenilio peroksido lašas (30 %) užlašinamas ant švarios skaidrės, emulsija gaunama įdėjus pilną platininę kilpele kultūros, ją maišant.

Teigiama reakcija: deguonies burbuliukų susidarymas laše rodo katalazės buvimą.

— Nitratų reduktazės veikla ir denitrifikacija (Bradbury, 1970 m.)

Kultūrinė terpė:

KNO ₃ (be nitritų)	1 g
<i>Difco bacto</i> mielių ekstraktas	1 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Distiliuotas vanduo	1 litras

Padalijama po 10 ml į 20 ml buteliukus. Sterilizuojama autoklave 15 minučių 121 °C temperatūroje.

Reagentas A:

H ₂ SO ₄	8 g
5N acto rūgštis	1 litras

Reagentas B:

naftilaminas	5 g
5N acto rūgštis	1 litras

Nitrato terpė užsėjama du kartus. Patikrinama po 10 ar 20 dienų, įlašinant vieną lašą Lugolio jodo, 0,5 ml reagento A ir 0,5 ml reagento B. Jeigu terpė neparausta, papildomai panaudojama 50 mg cinko miltelių. Stebima spalvos reakcija.

Teigiama reakcija:

Spalvos reakcija

	1 stadija	2 stadija
Nitratas nesiredukoja	bespalvė	raudona
Nitratas redukuojasi iki nitrito (tik nitrato reduktazė)	raudona	–
Nitrato redukavimas labiau nei iki nitrito (denitrifikacija - nitrato ir nitrito reduktazė)	bespalvė	bespalvė

— Ureazės gamyba (Lelliott, 1966 m.)

Pagrindinė terpė:

Oksoidinė karbamido agaro bazė (CM53)	2,4 g
Distiliuotas vanduo	95 ml

Sterilizuojama autoklave 20 minučių 115 °C temperatūroje. Išsilydžiusi bazė atvėsinama iki 50 °C temperatūros ir aseptiškai pridedama 5ml filtru sterilizuoto 40 % vandeninio karbamido tirpalo (Oksoidas SR20). Gerai išmaišoma.

Padalijama po 6 ml į sterilius mėgintuvėlius (16 x 100 mm), jie laikomi nuožulniu kampu, kad dugnas būtų užpildytas.

Teigiama reakcija: jeigu yra ureazės aktyvumas, geltonai oranžinė terpė įgauna vyšnios raudonumo arba fuksino rausvumo spalvą.

Citrato įsisavinimas (Christensen) (Skerman, 1967 m.)

Citrato agaro bazė (Merck 2503)	23 g
Distiliuotas vanduo	1 litras

Sumaišoma ir ištirpinama kaitinant. Padalijama po 6 ml, kaip ir karbamido terpė. Sterilizuojama autoklave 15 minučių 121 °C temperatūroje, laikoma nuožulniu kampu.

Teigiama reakcija: citrato įsisavinimą parodo terpės spalvos pasikeitimas iš oranžinės į raudoną.

— Vandenilio sulfido gamyba (Ramamurthi, 1959 m.)

Terpė:

Difco bacto triptonas (Nr. 0123)	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NaCl	5 g
Distiliuotas vanduo	1 litras

Ištirpinama ir padalijama po 6 ml į 16 x 100 mm mėgintuvėlių. Sterilizuojama autoklave 10 minučių 115 °C temperatūroje.

Užsėjama ir prie mėgintuvėlio krašto steriliai pritvirtinamas švino acetato popierius (Merck 9511). Pritvirtinama dangteliu. Inkubuojama iki 20 dienų.

Teigiama reakcija: H₂S gamybą iš triptono parodo indikatorinio popieriaus nusidažymas juosvai ruda spalva.

— **Indolo gamyba** (Ramamurthi, 1959 m.)

Terpė:

Kaip ir H₂S testui.

Išimamas švino acetato popierius, įpilama 1–2 ml dietileterio ir atsargiai pakratoma. Palaukiama (penkias minutes) kol atsiskirs sluoksniai. Atsargiai įdedama 0,5 ml Kovacs reagento (Merck 9293) į nuožulniai paverstą mėgintuvėlį.

Teigiama reakcija: indolo buvimą parodo geltonojo sluoksnio tarp eterio ir vandeninių frakcijų nusidažymas raudona spalva.

— Augimas 37 °C temperatūroje (Ramamurthi, 1959 m.)

Terpė:

Difco bacto mitybinė terpė (Nr. 0003)	8 g
Distiliuotas vanduo	1 litras

Sumaišoma, ištirpinama ir padalijama po 6 ml į mėgintuvėlius.

Sterilizuojama autoklave 15 minučių 121 °C temperatūroje.

Apsėjama ir inkubuojama 37 °C.

Teigiama reakcija: žiūrima, ar auga.

— Augimas 7 % natrio chloride (Ramamurthi, 1959 m.)

Terpė:

Difco bacto mitybinis tirpalas	8 g
NaCl	70 g
Distiliuotas vanduo	1 litras

Sumaišoma, ištirpinama ir padalijama po 6 ml į mėgintuvėlius.

Sterilizuojama autoklave 15 minučių 121 °C temperatūroje.

Teigiama reakcija: žiūrima, ar auga.

— **Želatinos hidrolizė** (Lelliott, Billing ir Hayward, 1966 m.)

Terpė:

Difco bacto želatina (Nr. 0143)	120 g
Distiliuotas vanduo	1 litras

Sumaišoma, ištirpinama kaitinant ir padalijama po 6 ml į mėgintuvėlius.

Sterilizuojama autoklave 121 °C temperatūroje 15 minučių.

Teigiama reakcija: želatinos suskystėjimas, netgi 30 minučių laikant 5 °C temperatūroje.

— Krakmolo hidrolizė

Terpė:

<i>Difco bacto</i> mitybinis agaras (išlydytas)	1 litras
<i>Difco bacto</i> tirpus krakmolas (Nr. 0178)	2 g

Sumaišoma, sterilizuojama autoklave 10 minučių 115 °C temperatūroje.

Lėkštelės pripildomos. Taškiniu būdu užsėjama lėkštelėse.

Kai gerai paauga (nuo 10 iki 20 dienų), dalis pašalinama ir praplaunama Lugolio jodu.

Teigiama reakcija: krakmolo hidrolizę parodo skaidrios zonos po arba aplink bakterijų augimą; likusi terpės dalis nusidažiusi purpurine spalva.

— **Eskulino hidrolazė** (Sneathas ir Collinsas, 1974 m.)

Terpė:

Difco bacto peptonas	10 g
Eskulinas	1 g
Geležies III citratas (Merck 3862)	0,05 g
Natrio citratas	1 g
Distiliuotas vanduo	1 litras

Išmaišoma, kad ištirtų ir padalijama po 6 ml į mėgintuvėlius. Sterilizuojama autoklave 10 minučių 115 °C temperatūroje.

Terpė yra skaidri, bet melsvai fluorescuojanti.

Teigiama reakcija: eskulino hidrolizę parodo nusidažymas ruda spalva ir fluorescencijos išnykimas. Tai galima patikrinti ultravioletine lempa.

NUORODOS

- 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. V: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21–23.
- Hugh, R a 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. a J Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. *EPPO Bull.*, č. 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 a A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. appl. Bact.*, 29, 470–489.
- Lelliott, R. A. a P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. Et. Burkh.) in potato stocks. *EPPO Bull.*, 6 odst. 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. 2. Edd., William and Wilkins Company, Baltimore.
- Sneath, P. H. A. a V. G. Collins, 1974. A study in test reproducibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, 481–527.

II PRIEDAS

1. Kiekvienu įtariamu atveju, kai buvo užfiksuotas teigiamas imunofluorescencinis testas, taikomas metodas, nurodytas I priede ir laukiama patvirtinimo arba paneigimo, užbaigus minėtą tyrimą, reikia atskirti ir tinkamai užkonservuoti:
 - visus tirtus stiebagumbius ir augalus, jeigu įmanoma, ir
 - visus likusius ekstraktus ir papildomai paruoštas imunofluorescencines skaidres,kol tyrimas minimu metodu bus baigtas.
 2. Jeigu bakterijos buvimas patvirtinamas, reikia atskirti ir tinkamai užkonservuoti:
 - visą medžiagą, minėtą 1 dalyje, ir
 - užkrėstos baklažanų medžiagos mėginį, kuris buvo inokuliuotas stiebagumbio arba augalo ekstraktu, ir
 - išskirtą bakterijos kultūrą,trumpiausiai vieną mėnesį po pranešimo procedūros pagal 5 straipsnio 2 dalį.
-

III PRIEDAS

1. Nustatant galimo užkrėtimo mastą pagal 5 straipsnio 1 dalies b punktą, reikia atsižvelgti į:
 - stiebagumbius ir augalus, auginamus vietoje, kuri nustatyta užkrėsta pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą,
 - auginimo vietą (-as) arba patalpas, kuriose yra gamybos grandis, susijusi su stiebagumbiais ir augalais, kuri nustatyta užkrėsta pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą, įskaitant tas, kur dalijamasi gamybos įranga ir priemonėmis tiesiogiai ar per tą patį rangovą,
 - stiebagumbius arba augalus, auginamus auginimo vietoje (-se), kuri (-os) minima (-os) ankstesnėje įtraukoje, arba esančius tokioje (-se) auginimo vietoje (-se), laikotarpiu, kai stiebagumbiai ir augalai, nustatyti apkrėstais pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą, buvo auginimo vietose arba gamybiniuose pastatuose, kaip minima pirmojoje įtraukoje,
 - centrinius sandėlius, kuriuose laikomos bulvės iš anksčiau minėtų auginimo vietų,
 - bet kokią techniką, transporto priemonę, laivą, saugyklą arba jo dalis ir kitus objektus, įskaitant pakuotę, kurie galėjo turėti sąlytį su stiebagumbiais arba augalais, nustatytais apkrėstais pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą per praėjusį 12 mėnesių laikotarpį arba kur taikytina,
 - bet kokius stiebagumbius arba augalus, laikomus arba turėjusius sąlytį su bet kokiais struktūromis ar objektais, minėtais ankstesniojoje įtraukoje, iki tokių struktūrų ar objektų dezinfekavimo, ir
 - taip pat, atlikus tyrimą pagal 6 straipsnį, stiebagumbius arba augalus, kurių klonavimo kilmė tokia pati kaip ir stiebagumbių arba augalų, nustatytų apkrėstais pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą ir kurių užkrėtimo galimybę nurodo atlikti tyrimai.
 2. Nustatant galimą išplitimą pagal 5 straipsnio 1 dalies c punktą pat reikia atsižvelgti į:
 - tai, ar arti yra kitos vietos, kuriose auginamos bulvės arba kitos perdirbimo įmonės,
 - sėklinių bulvių kilmę.
 3. Informavimo smulkmenoms, minimoms 5 straipsnio 2 dalies pirmojoje pastraipoje, priskiriama:
 - kiekvienai bulvių siuntai ar partijai, kuri laikoma užkrėsta – pažymėjimai, nurodyti Direktyvos 77/93/EEB 7 ir 8 straipsniuose, pasas ar registracijos numeris, kaip priimta,
 - sėklinių bulvių atsargų veislių pavadinimai ir, jeigu įmanoma, visi kiti atvejai,
 - nustatyto užkrėtimo objektų apibūdinimas ir teritorijų ribų paženklinimas,
 - galimybė gauti ekstraktą, paruoštas imunofluorescencines skaidres, apkrėstą baklažanų medžiagą ir išskirtą bakterijos kultūrą iš testo, kurio metu nustatytas ir patvirtintas bakterijos buvimas.
-

IV PRIEDAS

1. Oficialiai prižiūrimos priemonės, minimos 7 straipsnio 1 dalyje, stiebagumbiams ar augalams, kurie nustatyti apkrėstais remiantis 5 straipsnio 1 dalies a punktu, sunaikinti, yra tokios:
 - panaudojimas pramoniniam perdirbimui tiesiai ir skubiai pristatant į perdirbimo cechą, kuriame yra atliekų sunaikinimo įrenginiai, nustačius, kad nėra bakterijos išplitimo pavojaus ir kur yra sandėliavimo zonų bei išvykstančių transporto priemonių dezinfekavimo sistema, arba
 - kitos priemonės, jeigu užtikrinama, kad nėra bakterijos išplitimo pavojaus; apie tokias priemones turi būti pranešta Komisijai ir kitoms valstybėms narėms.
2. Tinkamas stiebagumbių arba augalų, kurie nustatyti galimai apkrėstais remiantis 5 straipsnio 1 dalies b punktu, kaip minėta 7 straipsnio 2 dalyje, panaudojimas arba sunaikinimas, kontroliuojant atsakingosioms oficialioms valstybių narių įstaigoms, yra:
 - jų naudojimas kaip prekinių, žmonėms vartoti skirtų bulvių, supakuotų tiesioginiam pristatymui ir naudojimui neperpakuojant ir skirtų tiesiogiai pristatyti ir suvartoti,
 - jų naudojimas kaip prekinių, pramoniniam perdirbimui skirtų bulvių ir skirtų tiesiogiai ir neatidėliotinai pristatyti į perdirbimo įmonę, kurioje yra tinkami atliekų šalinimo ir dezinfekavimo įrenginiai, arba
 - kitas tinkamas panaudojimas ar sunaikinimas, nustačius, kad nėra bakterijos išplitimo pavojaus.
3. Tinkamais objektų, minimų 7 straipsnio 3 dalyje, valymo ir dezinfekavimo metodais laikomi tie, kurie nekelia bakterijos išplitimo pavojaus ir taikomi prižiūrint atsakingoms oficialioms valstybių narių įstaigoms.
4. Priemonės, kurias valstybės narės įgyvendina pažymėtoje teritorijoje, nustatytoje pagal 5 straipsnio 1 dalies c punktą ir minimoje 7 straipsnio 4 dalyje, sudaro:
 - 4.1. Auginimo vietose, kurios laikomos užkrėstomis, remiantis 5 straipsnio 1 dalies a punktu:
 - a) lauke, kuris laikomas užkrėstu pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą, arba
 - i) — mažiausiai trejus auginimo metus, einančius po tų, kuriais buvo nustatytas užkrėtimas,
 - Imamasi priemonių, stengiantis išnaikinti savaime augančius bulvių augalus ir kitus natūraliai aptiktus bakterijos šeimininkus, ir
 - jokie stiebagumbiai, augalai, sėklos ar kiti natūraliai aptikti bakterijos šeimininkai ar kiti augalai, keliantys bakterijos išlikimo ar išplitimo pavojų, negali būti sodinami, kol lauke bus aptinkami savaime augantys bulvių augalai mažiausiai dvejus auginimo metus paeiliui,
 - pirmąjį bulvių auginimo sezoną, einantį po ankstesnėje įtraukoje apibūdinto laikotarpio, oficialiai sertifikuotos sėklinės bulvės sodinamos tikrai prekybai, be to, atliekamas oficialus tyrimas, kaip apibūdinta 2 straipsnio 1 dalyje,
 - bulvių auginimo sezoną, einantį po ankstesnėje įtraukoje minimo sezono ir pasibaigus atitinkamam sėjomainos ciklui, oficialiai sertifikuotos sėklinės bulvės sodinamos sėkloms arba prekybai, taip pat atliekamas oficialus tyrimas, kaip apibūdinta 2 straipsnio 1 dalyje, arba
 - ii) — ketverius auginimo metus po tų, kuriais buvo nustatytas užkrėtimas,
 - imamasi priemonių, stengiantis išnaikinti savaime sudygstančius bulvių augalus ir kitus natūraliai aptiktus bakterijos šeimininkus, ir
 - laukas paliekamas pūdymui arba daugiametei ganyklai, kuri dažnai visiškai nupjaunama arba intensyviai ganoma,
 - pirmąjį bulvių auginimo sezoną, einantį po ankstesnėje įtraukoje apibūdinto laikotarpio, oficialiai sertifikuotos sėklinės bulvės sodinamos sėklai arba prekybai, be to, atliekamas oficialus tyrimas, kaip apibūdinta 2 straipsnio 1 dalyje;

- b) kituose laukuose:
- auginimo metais, einančiais po tų metų, kuriais buvo nustatytas užkrėtimas:
 - jokie stiebagumbiai, augalai, tikrosios sėklos ar kiti natūraliai aptikti bakterijos šeimininkai negali būti sodinami ir imamasi priemonių, stengiantis išnaikinti savaime augančius bulvių augalus, kaip tinkama, arba
 - oficialiai sertifikuotos sėklinės bulvės gali būti sodinamos tikrai prekybai, su sąlyga, kad atsakingosioms oficialioms įstaigoms įrodoma, kad savaime sudygstančių bulvių augalų ir kitų natūraliai aptiktų bakterijos šeimininkų pavojus pašalintas,
 - mažiausiai du auginimo metus po tų, kurie apibūdinti ankstesnėje įtraukoje, tikrai oficialiai sertifikuotos sėklinės bulvės sodinamos sėklai arba prekybai,
 - kiekvienais auginimo metais, minėtais ankstesnėse įtraukose, imamasi priemonių, stengiantis išnaikinti savaime sudygstančius bulvių augalus ir kitus natūraliai aptiktus bakterijos šeimininkus, be to, atliekamas oficialus tyrimas, kaip apibūdinta 2 straipsnio 1 dalyje,
 - tais atvejais, jei oficialiai sertifikuotos sėklinės bulvės sodinamos prekybai, auginimo metais, einančiais po tų, kuriais buvo aptiktas užkrėtimas, augančios bulvės tikrinamos nustatytais laiko tarpais, o savaime sudygantys bulvių augalai tikrinami, ar jie neužkrėsti bakterija;
- c) nustačius užkrėtimą pagal 5 straipsnio 1 dalies a punktą ir kiekvienais po to einančiais auginimo metais įskaitant pirmąjį leistiną bulvių derliaus sezoną, lauke (-uose), kuris (-ie) buvo nustatytas (-i) užkrėstu (-ais), kaip apibūdinta a punkte, visi mechanizmai ir sandėliavimo įranga auginimo vietoje ir susijusi su bulvių produkcija, yra tinkamai valoma ir dezinfekuojama atitinkamais metodais, kaip nurodyta 3 dalyje;
- d) tose gamybos sistemose, kur galima visiškai pakeisti auginimo terpę,
- jokie stiebagumbiai, augalai ar tikrosios sėklos nesodinami, kol gamybos įmonėje nebus imtasi oficialiai prižiūrimų priemonių, skirtų išnaikinti bakteriją ir pašalinti visą bulvių ar kitą bulvinių šeimos medžiagą, tarp jų bent jau visiškai pakeisti auginamąją terpę, išvalyti ir dezinfekuoti gamybos įmonę bei visą įrangą ir paskui iš atsakingųjų oficialių įstaigų gauti leidimą bulvių produkcijai, ir
 - bulvės auginamos iš oficialiai sertifikuotų sėklinių bulvių arba iš mikrogumbų ar augalų, gautų pradinio dauginimo būdu.
- 4.2. Pažymėtoje teritorijoje, nepažeisdamos priemonių, apibūdintų 4.1 dalyje, valstybės narės:
- a) nedelsdamos ir mažiausiai tris auginimo sezonus po nustatyto užkrėtimo:
- užtikrina, kad jų atsakingosios oficialios įstaigos prižiūrėtų vietas ir patalpas, kur auginami, laikomi ir apdorojami bulvių stiebagumbiai, taip pat patalpas, kur bulvių apdorojimo mašinomis dirbama pagal sutartį,
 - reikalauja tokiose vietose esančias mašinas ir sandėlius valyti ir dezinfekuoti, kaip nustatyta ir taikant atitinkamus metodus, kaip nurodyta 3 dalyje,
 - reikalauja sodinti tik sertifikuotą sėklą auginant visas bulves toje teritorijoje,
 - reikalauja, kad būtų atskirai apdorojamas nukastų bulvių derlius ir tos bulvės, kurios buvo laikomos visuose toje teritorijoje esančiuose sandėliuose,
 - atlieka oficialų tyrimą, kaip nustatyta 2 straipsnio 1 dalyje;
- b) prireikus sudaro visų sėklinių bulvių atsargų pakeitimo programą per reikiamą laikotarpį.
- Apie priemones, įgyvendintas pagal 4.2 dalį, taip pat augintojų, bendrų saugyklų ir paskirstymo centrų pažymėtoje teritorijoje registracijos numerius, kasmet pranešti kitoms valstybėms narėms ir Komisijai.
-