

31993L0085

18.10.1993.

EIROPAS KOPIENU OFICIĀLAIS VĒSTNESIS

L 259/1

PADOMES DIREKTĪVA 93/85/EEK
(1993. gada 4. oktobris)
par kartupeļu gaišās gredzenpuves kontroli

EIROPAS KOPIENU PADOME,

organismu ievēšanu kādas dalībvalsts teritorijā, būtu tikai ierobežota iedarbība;

ņemot vērā Eiropas Ekonomikas kopienas dibināšanas līgumu un jo īpaši tā 43. pantu,

tā kā viens no šiem kaitīgiem organismiem ir kartupeļu gaišās gredzenpuves izraisītājs *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Speckermann et Kotthoff) Davis et al.; tā kā šī slimība ir parādījusies dažās Kopienas daļās un vēl joprojām pastāv daži ierobežoti infekcijas perēkļi;

ņemot vērā Komisijas priekšlikumu ⁽¹⁾,

ņemot vērā Eiropas Parlamenta atzinumu ⁽²⁾,

tā kā kartupeļu audzēšana visā Kopienā ir ievērojami apdraudēta, ja netiks pieņemti efektīvi pasākumi, lai noteiktu šīs slimības atrašanās vietu un noteiktu tās izplatīšanās veidus, lai novērstu tās parādīšanos un izplatīšanos, un, ja tā ir konstatēta, lai novērstu un kontrolētu tās izplatīšanos ar mērķi likvidēt slimību;

ņemot vērā Ekonomikas un sociālo lietu komitejas atzinumu ⁽³⁾,

tā kā kartupeļu ražošana ieņem nozīmīgu vietu Kopienas lauksaimniecībā; tā kā kartupeļu ražu pastāvīgi apdraud kaitīgi organismi;

tā kā, lai šo panāktu, Kopienā jāveic konkrēti pasākumi; tā kā bez tam dalībvalstīm jābūt iespējai vajadzības gadījumā veikt papildu pasākumus vai stingrākus pasākumus ar nosacījumu, ka netiek kavēta kartupeļu aprīte Kopienā, ja vienīgi tādā mērā, kādā ir paredzēts Padomes 1976. gada 21. decembra Direktīvā 77/93/EEK par aizsardzības pasākumiem pret augiem un augu produktiem kaitīgu organismu ievēšanu un to izplatību Kopienā ⁽⁴⁾; tā kā par šādiem pasākumiem jāziņo citām dalībvalstīm un Komisijai;

tā kā, aizsargājot kartupeļu audzēšanu pret šādiem kaitīgiem organismiem, ne tikai ir jāuztur ražošanas jauda, bet arī jāpaliek lauksaimniecības produktivitāte;

tā kā, ja šādi organismi netiktu vienlaicīgi un metodiski kontrolēti visā Kopienā un ja netiktu novērsta to izplatīšanās, aizsardzības pasākumiem, kas paredzēti, lai novērstu kaitīgo

tā kā Padomes 1980. gada 24. jūnija Direktīvā 80/665/EEK par kartupeļu gaišās gredzenpuves kontroli ⁽⁵⁾ ir noteikti obligātie pasākumi, kurus dalībvalstīm jāveic pret kartupeļu gaišo gredzenpuvi;

⁽¹⁾ OV C 93, 2.4.1993., 12. lpp.

⁽²⁾ OV C 176, 28.6.1993., 210. lpp.

⁽³⁾ OV C 161, 14.6.1993., 18. lpp.

⁽⁴⁾ OV L 26, 31.1.1977., 20. lpp. Direktīva, kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Komisijas Direktīvu 92/103/EEK (OV L 363, 11.12.1992., 1. lpp.).

⁽⁵⁾ OV L 180, 14.7.1980., 30. lpp.

tā kā kopš tā laika ir notikušas nozīmīgas pārmaiņas kartupeļu gaišās gredzenpuves izpratnē un kartupeļu gaišās gredzenpuves izraisītāja atklāšanā;

tā kā Kopienas augu veselības režīma piemērošana Kopienā kā teritorijā bez iekšējām robežām ir izraisījusi dažu Direktīvas 80/665/EEK noteikumu pārskatīšanu;

tā kā šīs pārskatīšanas rezultātā Direktīvas 80/665/EEK noteikumi ir atzīti par nepietiekamiem, un ir nepieciešama turpmāka pasākumu specifikācija;

tā kā tādā gadījumā jāatceļ Direktīva 80/665/EEK un jānosaka nepieciešamie pasākumi;

tā kā šajos pasākumos jāņem vērā, pirmkārt, tas, ka šī slimība var būt latentā un var būt neatklāta gan kultūras augšanas laikā, gan uzglabājot bumbuļos, un tādējādi to var efektīvi novērst, tikai ražojot un izmantojot sēklas kartupeļus bez infekcijas, un, otrkārt, tas, ka tās noteikšanai ir nepieciešami oficiāli apsekojumi; tā kā slimības izraisītāja izplatīšanās kultūras augšanas laikā nav vissvarīgākais faktors, bet slimības izraisītājs var saglabāties pašizsējas kartupeļu augos ziemas laikā un tieši šie augi ir galvenais šīs infekcijas avots, ko tie pārnēsā no vienas sezonas līdz otrai; tā kā šīs slimības izplatīšanās notiek, galvenokārt, kartupeļiem saskaroties ar jau inficētiem kartupeļiem un ar stādīšanas, novākšanas un pārkraušanas iekārtām vai transportu un ar uzglabāšanas traukiem, kas tika inficēti ar šiem kaitīgiem organismiem, iepriekš saskaroties ar inficētiem kartupeļiem; tā kā šādi inficēti priekšmeti var būt infekciozi vēl kādu laiku pēc inficēšanās; tā kā var samazināt vai novērst šīs slimības izraisītāja izplatīšanos, dezinficējot šādus priekšmetus; tā kā jebkura šāda sēklas kartupeļu inficēšanās rada nopietnu slimības izraisītāja izplatīšanās risku;

tā kā, lai sīki izstrādātu šādus vispārīgus pasākumus, kā arī tādus stingrākus vai papildu pasākumus, ko veic dalībvalstis, lai novērstu šīs slimības izraisītāja ieviešanu to teritorijā, ir vēlams, lai dalībvalstis cieši sadarbotos ar Komisiju Pastāvīgajā augu veselības komitejā (še turpmāk – "Komiteja"),

IR PIENĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Šī direktīva attiecas uz pasākumiem, ko veiks dalībvalstis pret kartupeļu gaišās gredzenpuves izraisītāju *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kott-hoff) Davis et al. (še turpmāk – "organisms"), lai:

a) noteiktu organisma atrašanās vietu un tā izplatīšanos;

b) novērstu slimības parādīšanos un izplatīšanos; un

c) ja ir konstatēta slimība, novērstu un kontrolētu tās izplatīšanos ar mērķi to likvidēt.

2. pants

1. Dalībvalstis veic oficiālus, sistemātiskus apsekojumus, lai apstiprinātu, ka šā organisma nav tajos bumbuļos un, attiecīgā gadījumā, tajos kartupeļu augos (*Solanum tuberosum* L.), kuru izcelsme ir to teritorijā.

Veicot šos apsekojumus attiecībā uz kartupeļu bumbuļiem, ņem sēklas kartupeļu un citu kartupeļu paraugus, vēlams no glabātavas krājumiem, un pakļauj tos oficiālām vai oficiāli kontrolētām laboratoriskajām pārbaudēm, izmantojot I pielikumā paredzēto šā organisma noteikšanas un diagnostikas metodi. Bez tam attiecīgā gadījumā var veikt arī oficiālu vai oficiāli kontrolētu vizuālu pārbaudi, pārgriežot bumbuļus citiem paraugiem.

Attiecībā uz augiem, šos apsekojumus veic saskaņā ar atbilstošām metodēm, un paraugus pakļauj atbilstoši oficiāli vai oficiāli uzraudzītai kontrolei.

Paraugu ņemšanas skaitu, izcelsmi, sastāvu un ieguves secību lemj atbildīgās oficiālās iestādes, Direktīvas 77/93/EEK nozīmē, balstoties uz pamatotiem zinātnes un statistikas principiem, un uz šā organisma bioloģiju, un ņemot vērā attiecīgo dalībvalstu konkrētas kartupeļu ražošanas sistēmas. Sīkākas ziņas par to ik gadu iesniedz pārējām dalībvalstīm un Komisijai, lai dalībvalstu starpā nodrošinātu salīdzināmu nodrošinājuma pakāpi apliecinājumos par šā organisma neesamību.

2. Šā panta 1. punktā paredzēto oficiālo apsekojumu rezultātus paziņo pārējam dalībvalstīm un Komisijai vismaz reizi gadā. Šā paziņojuma sīkākas ziņas ir konfidenciālas. Tās var iesniegt Komitejai saskaņā ar Direktīvas 77/93/EEK 16.a pantā noteikto procedūru.

3. Saskaņā ar Direktīvas 77/93/EEK 16.a pantā noteikto procedūru var pieņemt šādus noteikumus par:

— iepriekšējā 1. punktā paredzēto, saskaņā ar pamatotiem zinātnes un statistikas principiem veicamo apsekojumu sīkākām ziņām,

— iepriekšējā 2. punktā paredzētā paziņojuma sīkākām ziņām.

4. Saskaņā ar Direktīvas 77/93/EEK 16.a pantā noteikto procedūru pieņem šādus noteikumus par:

— atbilstošu iepriekšējā 1. punkta trešajā daļā paredzēto apsekojumu un testēšanas metodi.

3. pants

Dalībvalstis nodrošina, lai to atbildīgajām oficiālajām iestādēm ziņo par aizdomām par šā organisma parādīšanos vai par apstiprinātu šā organisma klātbūtni kartupeļu augos un bumbuļos vai novāktos, uzglabājamos vai realizējamos kartupeļu bumbuļos to teritorijā.

4. pants

1. Ja ir aizdomas par šā organisma klātbūtni, to dalībvalstu atbildīgās oficiālās iestādes, kurām ir ziņots par šādiem gadījumiem, nodrošina, lai tiktu pabeigta oficiāla vai oficiāli kontrolēta laboratoriskā testēšana, izmantojot I pielikumā paredzēto metodi un saskaņā ar II pielikuma 1. punktā precizētajiem nosacījumiem, lai apstiprinātu vai noliegtu iespējamo šā organisma klātbūtni. Ja ir apstiprināta šā organisma klātbūtne, piemēro II pielikuma 2. punktā noteiktās prasības.

2. Līdz 1. punktā minētās organisma klātbūtnes apstiprināšanai vai noliegšanai tad, ja ir aizdomas par tā parādīšanos, jo:

- i) vai nu ir novērotas šīs slimības iespējamās vizuālās pazīmes, vai nu
- ii) ir noteikts pozitīvs rezultāts, veicot imunofluorescences analīzi, kā paredzēts I pielikumā, vai veicot citu atbilstošu testu;

dalībvalstu atbildīgās oficiālās iestādes:

- a) aizliedz visu to krājumu vai sūtījumu apriti, no kuriem tika ņemti šie paraugi, izņemot gadījumus, kad tās kontrolē apriti un ar nosacījumu, ka ir noteikts, ka nepastāv nosakāms šā organisma izplatīšanās risks;
- b) veic pasākumus, lai izsekotu šīs iespējamās organisma klātbūtnes izcelsmi;
- c) ievieš atbilstošus papildu drošības pasākumus, kas pamatots ar paredzamā riska pakāpi, lai novērstu šā organisma izplatīšanos. Šajos pasākumos var iekļaut arī visu pārējo kartupeļu bumbuļu vai augu oficiālu aprites kontroli tajās telpās, kas ir saistītas ar aizdomām par organisma klātbūtni, vai ārpus tām.

3. Saskaņā ar Direktīvas 77/93/EEK 16.a pantā noteikto procedūru var pieņemt šādu noteikumu par:

— iepriekšējā 2. punkta c) apakšpunktā paredzētajiem pasākumiem.

4. Saskaņā ar Direktīvas 77/93/EEK 16.a pantā noteikto procedūru pieņem šādu noteikumu par:

— citu atbilstošu testu, kas paredzēts iepriekšējā 2. punkta ii) daļā.

5. pants

1. Ja oficiālā vai oficiāli kontrolētā laboratoriskajā pārbaudē, kurā izmanto I pielikumā paredzēto metodi, ir apstiprināta šā organisma klātbūtne kartupeļu bumbuļu, augu vai augu daļu paraugos, tad, ņemot vērā pamatotos zinātnes principus, kā arī šā organisma bioloģiju un konkrētas ražošanas, realizācijas un pārstrādes sistēmas attiecīgajā dalībvalstī, šīs dalībvalsts atbildīgās oficiālās iestādes:

- a) apzīmē kā inficētus tos kartupeļu bumbuļus vai augus, sūtījumu un/vai krājumu, iekārtas, transportlīdzekļus, traukus, glabātavas vai to vienības, un jebkuru citu priekšmetu, tostarp arī iepakojuma materiālu, no kuriem tika ņemts paraugs, un, attiecīgā gadījumā, to ražošanas vietu(–as) un tīrumu(–us), no kuriem tika novākti šie bumbuļi vai augi;
- b) ņemot vērā III pielikuma 1. punkta noteikumus, nosaka iespējamās inficēšanās mērogu, kas var notikt, saskaroties ar apzīmētu inficētu materiālu, pirms vai pēc novākšanas vai arī ražošanas procesa laikā;
- c) norobežo zonu, pamatojoties uz apzīmēto inficēšanos saskaņā ar a) apakšpunktu, iespējamās inficēšanās mēroga noteikšanu saskaņā ar b) apakšpunktu un iespējamo šā organisma izplatīšanās mērogu, ņemot vērā III pielikuma 2. punkta noteikumus.

2. Saskaņā ar III pielikuma 3. punkta noteikumiem dalībvalsts tūlīt ziņo pārējām dalībvalstīm un Komisijai par jebkuru apzīmētu inficētu materiālu saskaņā ar 1. punkta a) apakšpunktu un par noteiktā zonas norobežojuma sīkākām ziņām saskaņā ar 1. punkta c) apakšpunktu.

Šā paziņojuma sīkākas ziņas ir konfidenciālas. Tās var iesniegt Komitejai saskaņā ar Direktīvas 77/93/EEK 16.a pantā noteikto procedūru.

3. Pēc 2. punktā minētā paziņojuma un ņemot vērā tajā minētos faktorus, pārējās dalībvalstis, par kurām ir sīki izklāstīts šajā paziņojumā, pēc vajadzības apzīmē inficētu materiālu, nosaka iespējamās inficēšanās mērogu un norobežo zonu, attiecīgi, saskaņā ar 1. punkta a), b) vai c) apakšpunktu.

6. pants

Dalībvalstis nosaka, ka tad, ja kartupeļu bumbuļi vai augi ir apzīmēti kā inficēti saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu, veic testēšanu saskaņā ar 4. panta 1. punktu, pārbaudot tos kartupeļu krājumus, kas ir iesaistīti klonēšanā ar inficēšanos saistītajiem krājumiem. Testēšanu veic ar tādu bumbuļu vai augu skaitu, cik ir nepieciešams, lai noteiktu iespējamo primāro infekcijas avotu un iespējamās inficēšanās mērogu, vēlams, riska pakāpes dilstošā secībā.

Šis testēšanas rezultātā pēc vajadzības papildus apzīmē inficētu materiālu, nosaka iespējamās inficēšanās mērogu un norobežo zonu, attiecīgi saskaņā ar 5. panta 1. punkta a), b) vai c) apakšpunktu.

7. pants

1. Dalībvalstis nosaka, ka tad, ja kartupeļu bumbuļi vai augi ir apzīmēti kā inficēti saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu, tos nedrīkst stādīt, un tos dalībvalstu atbildīgo oficiālo iestāžu uzraudzībā:

— iznīcina vai

— citā veidā atbrīvojas no tiem, ņemot vērā oficiāli kontrolētus pasākumus, saskaņā ar IV pielikuma 1. punkta noteikumiem un ja vienīgi ir noteikts, ka nepastāv nosakāms šā organisma izplatīšanās risks.

2. Dalībvalstis nosaka, ka tad, ja kartupeļu bumbuļi vai augi ir apzīmēti kā iespējami inficēti saskaņā ar 5. panta 1. punkta b) apakšpunktu, tos nedrīkst stādīt, un, neierobežojot 6. pantā minēto ar klonēšanu saistītu krājumu testēšanas rezultātus, savu atbildīgo oficiālo iestāžu uzraudzībā tos, kā precizēts IV pielikuma 2. punktā, atbilstoši izmanto vai atbrīvojas no tiem tādā veidā, kādā ir noteikts, ka nepastāv nosakāms šā organisma izplatīšanās risks.

3. Dalībvalstis nosaka, ka tad, ja jebkuras iekārtas, transportlīdzekļi, trauki, glabātavas vai to vienības un jebkuri citi priekšmeti, tostarp arī iepakojuma materiāls, ir apzīmēti kā inficēti saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu vai ir noteikti kā iespējami inficēti saskaņā ar 5. panta 1. punkta b) apakšpunktu, tos iznīcina vai iztīra un dezinficē, izmantojot atbilstošas metodes, kas precizētas IV pielikuma 3. punktā. Pēc dezinfekcijas jebkurus šādus priekšmetus vairāk neuzskata par inficētiem.

4. Neierobežojot saskaņā ar 1., 2. un 3. punktu īstenotos pasākumus, dalībvalstis nosaka, ka saskaņā ar 5. panta 1. punkta c) apakšpunktu norobežotajā zonā īsteno pasākumu kopumu, kas precizēts IV pielikuma 4. punktā.

8. pants

1. Dalībvalstis nosaka, ka sēklas kartupeļi atbilst Direktīvas 77/93/EEK prasībām un tie ir tieši atvasināti no tāda materiāla, kas ir iegūts saskaņā ar oficiāli apstiprinātu programmu un kas ir atzīts oficiālā vai oficiāli uzraudzītā kontrolē, izmantojot I pielikumā noteikto metodi, par tādu, kurā nav šā organisma.

Iepriekšminēto testēšanu veic:

— gadījumos, kad inficēšanās ietekmē kartupeļu ražošanu, ar klonu sākumizlases augiem,

— pārējos gadījumos, ar klonu sākumizlases augiem vai ar reprezentatīviem pamata sēklas kartupeļu paraugiem vai iepriekšējo paaudžu paraugiem.

2. Saskaņā ar Direktīvas 77/93/EEK 16.a pantā noteikto procedūru var pieņemt šādus noteikumus:

— sīki izstrādātus piemērošanas noteikumus, kas minēti šā panta 1. punkta otrās daļas pirmajā ievilkumā,

— noteikumus par reprezentatīviem paraugiem, kas paredzēti šā panta 1. punkta otrās daļas otrajā ievilkumā.

9. pants

Dalībvalstis aizliedz šā kaitīga organisma uzglabāšanu un manipulācijas ar to.

10. pants

Neierobežojot Direktīvas 77/93/EEK noteikumus, dalībvalstis eksperimentālos vai pētnieciskos nolūkos un šķirņu selekcijas vajadzībām var pieļaut izņēmumus šīs direktīvas 6., 7. un 9. pantā minētajos pasākumos ar nosacījumu, ka šādi izņēmumi neskar šā organisma kontroli un nerada organisma izplatīšanās risku.

11. pants

Dalībvalstis var noteikt tādu papildu pasākumus vai stingrākus pasākumus, kādi var būt nepieciešami, lai apkarotu šo kaitīgo organismu un novērstu tā izplatīšanos, ciktāl šie pasākumi atbilst Direktīvas 77/93/EEK noteikumiem.

Pirmajā daļā minētajos papildu pasākumos var iekļaut noteikumus par to, ka drīkst stādīt tikai tādas sēklas kartupeļus, kas ir oficiāli sertificēti vai oficiāli kontrolēti attiecībā uz atbilstību nepieciešamajām fitosanitārajām normām. Šis pēdējais noteikums var īpaši attiekties uz tiem gadījumiem, kad lauksaimniekiem pašu saimniecībai atļauj izmantot tos sēklas kartupeļus, kurus viņi ir ieguvuši no pašu ražas, kā arī uz citiem gadījumiem, kad tiek stādīti pašražoti sēklas kartupeļi.

Par šo pasākumu sīkākām ziņām pavēsta pārējām dalībvalstīm un Komisijai.

12. pants

Šīs direktīvas pielikumu grozījumus pieņem, ņemot vērā sasniegumus zinātnes un tehnikas atziņās, saskaņā ar Direktīvas 77/93/EEK 16.a pantā noteikto procedūru.

13. pants

1. Līdz 1993. gada 15. novembrim dalībvalstis pieņem un publicē noteikumus, kas nepieciešami, lai izpildītu šīs direktīvas prasības. Dalībvalstis par tiem tūlīt informē Komisiju.

Kad dalībvalstis pieņem minētos noteikumus, tajos iekļauj atsauci uz šo direktīvu, vai arī šādu atsauci pievieno to oficiālai publikācijai. Dalībvalstis nosaka procedūru, saskaņā ar kuru izdarāma šāda atsaucē.

Dalībvalstis piemēro šos noteikumus no 1993. gada 16. novembra.

2. Dalībvalstis tūlīt dara Komisijai zināmas visas savu tiesību aktu normas, ko tās pieņem jomā, uz kuru attiecas šī direktīva. Komisija par tām informē pārējās dalībvalstis.

14. pants

Ar šo no 1993. gada 16. novembra ir atcelta Direktīva 80/665/EEK.

15. pants

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

Luksemburgā, 1993. gada 4. oktobrī

Padomes vārdā —
priekšsēdētājs
W. CLAES

I PIELIKUMS

KARTUPEĻU BUMBUĻU KRĀJUMU GAIŠĀS GREDZENPUVES IZRAISĪTĀJAS BAKTĒRIJAS CLAVIBACTER MICHIGANENSIS (Smith) Davis et al. ssp. SEPEDONICUS (Spieckermann et Kotthof) Davis et al. NOTEIKŠANAS UN DIAGNOSTIKAS METODE**1. Stolona pamata serdes izņemšana**

- 1.1. Nomazgāt 200 kartupeļu bumbuļus tekošā krāna ūdenī un katram bumbulim ar pastāvīgi dezinficējamu skalpeli vai kartupeļu mizojamo nazi noņemt mizu ap stolona pamatu; dezinfekciju var veikt, iemērcot nazi 70 % etilspirtā un dezinficējot to ar liesmu.
- 1.2. Uzmanīgi izgriezt koniskus audu gabalus no stolona pamatiem ar parasto vai kartupeļu mizojamo nazi. Pēc iespējas censties izgriezt mazāk bumbuļa mīkstuma. Pēc izgriešanas stolona pamatus jāpārstrādā 24 stundu laikā (sk. 3. punktu) vai jāuzglabā ne vairāk kā divas nedēļas – 20 °C temperatūrā.

2. Kartupeļu gaišās gredzenpuves pazīmju vizuālā pārbaude

Pēc stolona pamata izgriešanas katru bumbuļi pārgriezt šķērsām un apskatīt, vai ir gaišās gredzenpuves pazīmes.

Saspiež bumbuļus un apskatīt, vai no vadaudiem neizspiežas macerējušies audi.

Agrīnās slimības pazīmes ir viegls audu stiklainums vai caurspīdīgums ap vadaudu sistēmu bez audu mīkstināšanas, jo īpaši tuvāk stolona pamatam. Vadaudu gredzena krāsa pie stolona pamata var būt nedaudz tumšāka nekā parasti. Pirmā viegli nosakāmā pazīme ir vadaudu gredzena dzeltenīgā krāsa un, viegli saspiežot bumbuļi, sierveida masas stabiņu izdalīšanās no bumbuļa vadiem. Šis eksudāts satur miljonus baktēriju. Šajā slimības stadijā vadaudi var kļūt brūnganāki. Sākumā šīs pazīmes var būt vērojamas tikai vienā vadaudu gredzena daļā, kas nav obligāti tuvu stolona pamatam, bet turpmāk var pakāpeniski izplatīties uz visu vadaudu gredzenu. Infekcijai izplatoties, notiek vadaudu sairšana; ārējais mizas slānis var atdalīties no iekšējā mizas slāņa. Vēlīnajās slimības stadijās bumbuļu virsmā parādās plaisas, kuru krāsa to malās bieži ir sarkanīgi brūna. Sekundāra sēnišu vai baktēriju invāzija var apslēpt slimības pazīmes, un tādēļ var būt grūti, pat neiespējami, atšķirt kartupeļu gaišās gredzenpuves vēlīnās stadijas pazīmes no citas bumbuļu puves.

3. Paraugu sagatavošana Grama krāsojumam, imunofluorescences analīzei (IF) un baklažānu testam

- 3.1. Sasmalcināt stolonu pamatus tādā atšķaidītājā, kas ir zināms kā netoksisks pret *Corynebacterium sepedonicum* (piemēram, 0,05 M fosfātu buferšķīdums (PBS) pH 7,0), temperatūrā, kas mazāka par 30 °C grādiem, un līdz brīdim, kamēr tikko tiks panākta to pilnīga macerācija; ir ieteicams pievienot netoksisku deflokulantu, kā arī var būt nepieciešams pievienot netoksisku pretputošanas līdzekli (1. un 2. papildinājums). Ir jāizvairās no pārmērīgas macerācijas.
- 3.2. Ekstrahēt baktērijas no šā viendabīgā šķidrums, izmantojot vienu no šādām metodēm ⁽¹⁾:
 - A. a) Centrifugēšana – ne vairāk par 180 g 10 minūtēs.
 - b) Virsslāņa (uzpeldējuma) centrifugēšana – ne vairāk par 4 000 g 10 minūtēs. Virsslāni dekantēt un izliet.
 - B. a) Ļaut macerātam pastāvēt 30 minūtes, lai nogulsnētos audu atliekas. Virsslāni dekantēt, nejaucot nogulsnes.
 - b) Filtrēt šo virsslāni caur filtrpapīru (Vatmans Nr. 1), kas ievietots keramikā stikla filtrā (Nr. 2 = 40-100µm), izmantojot ūdens vakuumsūkni. Savākt šo filtrātu centrifūgas tūbiņā. Izmazgāt filtru ar sterilu fosfātu buferšķīdumu (PBS) līdz maksimālam filtrāta tilpumam – 35 ml.
 - c) Filtrātu centrifugēt – ne vairāk par 4 000 g 20 minūtēs.
- 3.3. Suspendēt ekstrakta koncentrātu sterilā 0,01 M fosfātu buferšķīdumā pH 7,2 (2. papildinājums), lai sasniegtu aptuvenu kopēju tilpumu ap 1 ml. Sadalīt divās daļās un vienu daļu paturēt pārskata nolūkiem, iesaldējot to -20 °C ⁽²⁾ vai liofilizējot. Otru daļu sadalīt pusēs, vienu pusi izmantojot imunofluorescences analīzei (IF) un Grama krāsojumam, bet otru – baklažānu testam.

⁽¹⁾ Alternatīvo ekstrakcijas metodi piedāvā Dinesens (Dinesen), 1984.

⁽²⁾ Ir pierādījumi (Janse un van Veenbergs (Janse & Van Vaerenberg), 1987), ka minētā iesaldēšana var samazināt *Corynebacterium sepedonicum* dzīvotspēju. Šo problēmu var atrisināt, izmantojot ekstrakta koncentrāta suspensiju 10 % glicerīnā.

- 3.4. Obligāti nodrošināt to, lai visas *C. sepedonicum* pozitīvās kontroles un paraugi tiktu izdalīti atsevišķi, lai novērstu inficēšanos. Tas attiecas uz IF analīzēm un baklažānu testiem.
4. *Gram krāsojums*
- 4.1. Sagatavot Grama krāsojuma kodnes visiem ekstrakta koncentrātiem (5.2.1.) un visiem tiem sagrieztiem bumbuljiem (2.), kam ir stiklainuma, puves vai citas aizdomīgas pazīmes. Paraugi jāņem no inficēto audu malas.
- 4.2. Sagatavot Grama krāsojuma kodnes zināmām *C. sepedonicum* kultūrām un, ja iespējams, arī dabiski inficētiem audiem (5.1.).
- 4.3. Noteikt, kuri paraugi satur tipiskas Gram-pozitīvās korinebaktēriju formas šūnas. Parasti *C. sepedonicum* šūnas ir 0,8 līdz 1,2 μm garas un 0,4 līdz 0,60 μm platas.

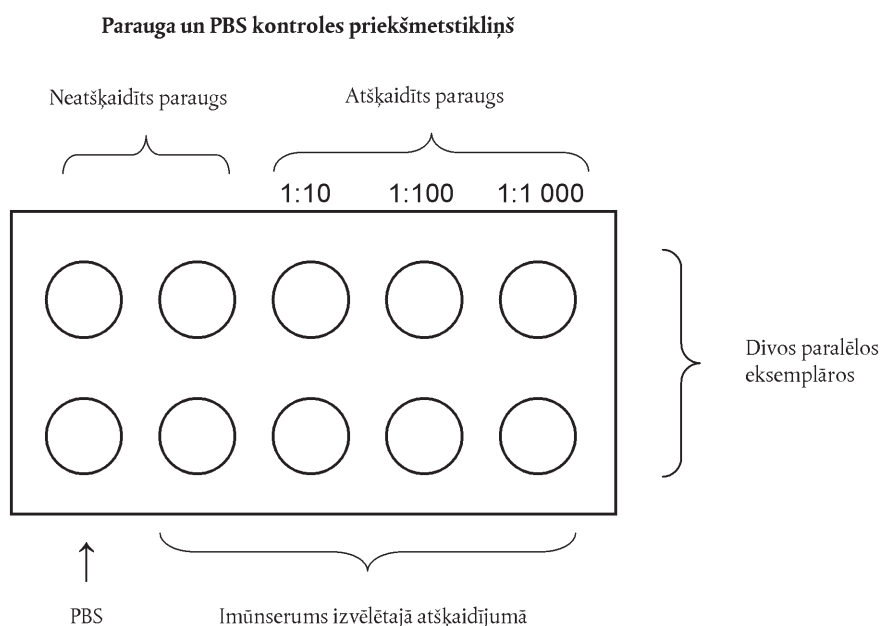
Atbilstoša reakcijas veikšanas procedūra ir norādīta 3. papildinājumā.

Preparātos no dabiski inficētiem audiem vai nesēn izolētām kultūrām bieži dominē kokveidīgas nūjiņas, kas parasti ir nedaudz mazākas par citām šūnām no vecākajām agarkultūrām. Vairumā gadījumu *C. sepedonicum* šūnas barotnē ir daudzveidīgas korinebaktēriju formas nūjiņas, un tās var dot dažādu reakciju Grama krāsojumā. Šūnas ir novērojamas atsevišķi pa vienai un pa pāriem, ar tipiskiem "elkoņiem", kas ir raksturīgi korinebaktēriju formas grupai, un dažos gadījumos arī neregulārajās grupās, kuras bieži dēvē par "stāvkoku žogiem" un "ķīniešu burtiem".

5. Imunofluorescences (IF) analīzes shēma

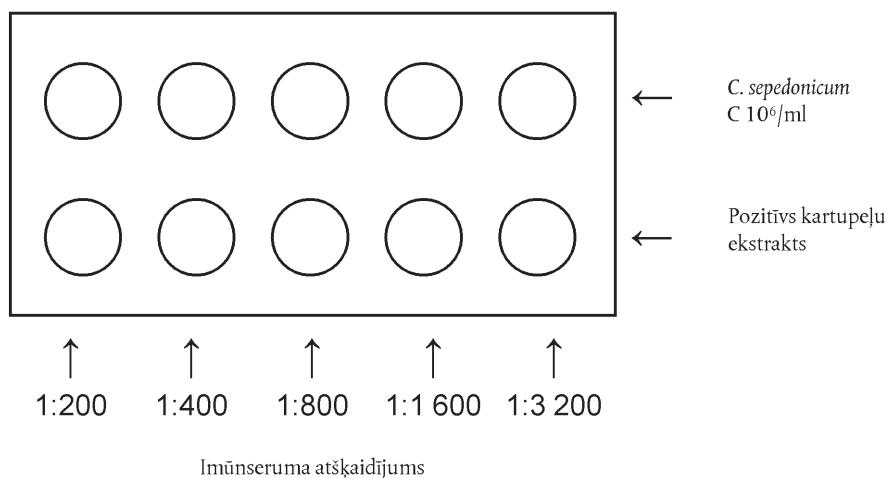
- 5.1. Zināmam *C. sepedonicum* celmam izmantot imūnserumu - ATCC 33113 (NCPPB 2137) vai NCPPB 2140. Tam jābūt IF titram, kas lielāks par 1:600. Iekļaut vienu PBS kontroli uz testa priekšmetstikliņa, lai noteiktu, vai fluoresceīna izotiocianāta prettrušu imunoglobulīna konjugāts (FITC) nespecifiski savienojas ar baktēriju šūnām. *Corynebacterium sepedonicum* (ATCC 33113 (NCPPB 2137), NCPPB 2140) jāizmanto kā homologisku antigēnu kontroli uz atsevišķa priekšmetstikliņa. Dabiski inficētus audus (kurus uzglabā, liofilizējot vai iesaldējot – 20 °C grādos) pēc iespējas jāizmanto kā līdzīgu kontroli uz tā paša priekšmetstikliņa (2. attēls).
- 5.2. *Procedūra*
- 5.2.1. Sagatavot trīs gala ekstrakta koncentrāta atšķaidījumus (10^1 , 10^2 , 10^3), pēc kārtas desmit reizes atšķaidot šķīdumu destilētā ūdenī (1. attēls).
- 5.2.2. Uz daudzpriekšmetstikliņa lodziņiem ievadīt ar pipeti izmērītu katra ekstrakta koncentrāta vai *C. sepedonicum* suspensijas (apmēram 10^6 šūnas/ml) standarta tilpumu, kas ir pietiekams, lai pārklātu lodziņu (apmēram 25 μl), kā parādīts 1. attēlā.

1. attēls



2. attēls

Pozitīvā kontroles priekšmetstikliņa aina



- 5.2.4. Pārklāt attiecīgus lodziņus ar *C. sepedonicum* imūnserumu rekomendējamā atšķaidījumā, 0,01 M PBS pH 7,2 (2. papildinājums), kā parādīts 1. attēlā. (FITC kontrolei izmantot fosfātu buferšķīdumu (PBS)). Imūnseruma darba atšķaidījumam jābūt apmēram pusei no IF titra atšķaidījuma. Ja ir paredzēts iekļaut citus imūnseruma atšķaidījumus, katram izmantojamam atšķaidījumam jā sagatavo atsevišķi priekšmetstikliņi.
- 5.2.5. Priekšmetstikliņu 30 minūtes novietot inkubācijai mitrā kamerā ar apkārtējās vides temperatūru.
- 5.2.6. Rūpīgi noskalot ar 0,01 M PBS pH 7,2. Mazgāt trīs reizes pa piecām minūtēm ar fosfātu buferšķīdumu 0,01 M pH 7,2, katru reizi mainot šķīdumu.
- 5.2.7. Rūpīgi noslaucīt lieko mitrumu.
- 5.2.8. Katru lodziņu pārklāt ar FITC konjugātu tādā pašā atšķaidījumā, kāds ir izmantots, lai noteiktu titru, un 30 minūtes novietot to inkubācijai mitrā kamerā ar apkārtējās vides temperatūru.
- 5.2.9. Noskalot un izmazgāt tādā veidā, kā ir minēts iepriekš.
- 5.2.10. Uz katra lodziņa uzlikt apmēram 5 līdz 10 μ l fosfātu glicerīna buferšķīduma 0,1 M pH 7,6 (vai līdzīgu saistvielu ar pH līmeni ne mazāku par 7,6) un pārklāt ar segstikliņu (2. papildinājums).
- 5.2.11. Apskatīt ar mikroskopu, kas aprīkots ar epifluorescentās gaismas avotu un filtriem, kas piemēroti izmeklēšanai ar FITC. Ir piemērots palielinājums 400 līdz 1 000 reizes. Katru lodziņu skenēt šķērsām divos perpendikulāros diametros un ap lodziņu perimetriem.

Piezīmēt fluorescējošās šūnas pozitīvajās kontrolēs un noteikt titru. Piezīmēt fluorescējošās šūnas FITC/PBS kontrolēs lodziņā un, ja to nav, pāriet pie testa lodziņiem. Vismaz 10 mikroskopa redzes laukos noteikt morfoloģiski tipisko fluorescējošo šūnu vidējo skaitu vienā laukā un aprēķināt šo šūnu skaitu 1 ml neatšķaidīta ekstrakta koncentrātā (4. papildinājums).

Var rasties vairākas problēmas, veicot imunofluorescences analīzi.

- Kartupeļu ekstrakta koncentrātā var rasties fluorescējošo šūnu fona populācijas ar atipisku morfoloģiju un savstarpēji reaģējošas saprofitās baktērijas, kuru izmērs un morfoloģija ir līdzīga *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* izmēram un morfoloģijai. Ņemt vērā tikai fluorescējošās šūnas ar tipisku izmēru un morfoloģiju.

Lai izvairītos no iespējamām savstarpējām reakcijām, paraugi ar pozitīvu imunofluorescences analīzes rezultātu jāpārbauda atkārtoti ar citu imūnserumu.

- Šīs metodes tehniskas noteikšanas robežas atrodas starp 10^3 un 10^4 šūnām uz 1 ml neatšķaidīta ekstrakta koncentrāta. Paraugi ar IF tipisko šūnu skaitu šajās noteikšanas robežās parasti ir negatīvi pret *C. m. ssp. sepedonicus*, bet tos var pārbaudīt ar baklažānu testu.

Negatīvs imunofluorescences analīzes rezultāts ir noteikts jebkuram paraugam tad, ja nav atrastas morfoloģiski tipiskas fluorescējošas šūnas. Šos paraugus uzskata par "neinficētiem" ar *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Baklažānu tests nav nepieciešams.

Positīvs imunofluorescences analīzes rezultāts ir noteikts jebkuram paraugam tad, ja ir atrastas morfoloģiski tipiskas fluorescējošas šūnas.

Šos paraugus, attiecībā uz kuriem ir noteikts pozitīvs imunofluorescences analīzes rezultāts ar abiem imūnserumiem, uzskata par "potenciāli inficētiem" ar *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

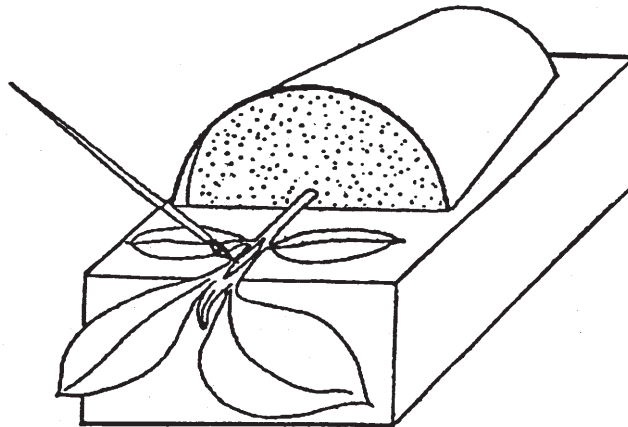
Baklažānu tests ir obligāts visiem tiem paraugiem, kurus uzskata par potenciāli inficētiem.

6. Baklažānu tests

Kultūras sīkākas ziņas sk. 5. papildinājumā.

- 6.1. Šā pielikuma 3.3 punktā minēto ekstrakta koncentrātu sadalīt starp 25 baklažānu augiem 3. lapas stadijā (5. papildinājums), izmantojot vienu no turpmāk izklāstītajām metodēm (6.2., 6.3. vai 6.4.).
- 6.2. *I inokulācija ar šķēlumu*
 - 6.2.1. Katru trauku novietot horizontāli (10 cm lielam traukam ir atbilstošs putu polistirola bloks ar no vienas virsmas noņemtu gabalu 5 cm dziļumā × 10 cm platumā × 15 cm garumā (3. attēls)). Katram pārbaudāmajam paraugam starp tā stublāju un polistirola bloku jānovieto sterilu alumīnija foliju. Augu var nostiprināt ar gumijas joslu ap polistirola bloku.
 - 6.2.2. Ar skalpeli izdarīt 0,5 līdz 1,0 cm garu un apmēram trīs ceturtdaļas no stublāja diametra dziļu griezumumu garenvirzienā vai nedaudz pa diagonāli starp dīgļlapām un pirmo lapu.
 - 6.2.3. Ar skalpeļa smaili paturēt šo šķēlumu atvērtu un ievadīt tajā inokulātu ar kontūrzīmuli vai otiņu, kas piepildīti ar ekstrakta koncentrātu. Sadalīt atlikušo ekstrakta koncentrātu starp baklažānu augiem.
 - 6.2.4. Cieši noslēgt griezumumu ar sterilu vazelīnu no 2 ml šļirces cilindra.

3. attēls



- 6.3. *II inokulācija ar šķēlumu*
 - 6.3.1. Pieturot augu ar diviem pirkstiem, uz stublāja starp dīgļlapām un pirmo lapu ievadīt ar pipeti vienu pilieni suspēdēta ekstrakta koncentrāta (apmēram 5 līdz 10 μl).
 - 6.3.2. Ar sterilu skalpeli izdarīt diagonālu (aptuveni 5° leņķī) griezumumu, 1,0 cm garu un apmēram 2/3 no stublāja diametra dziļu, griezumumu sākot no ekstrakta koncentrāta piliena punkta.
 - 6.3.3. Cieši noslēgt griezumumu ar sterilu vazelīnu no šļirces cilindra.
- 6.4. *Inokulācija ar šļirci*
 - 6.4.1. Baklažānu augus nelaistīt vienu dienu līdz inokulācijas sākumam, lai samazinātu turgora spiedienu.

- 6.4.2. Baklažānu stublājus inokulēt uzreiz virs dīgļlapām, izmantojot šļirci ar adatu zemādas injekcijām (ne mazāku par 23G). Sadalīt ekstrakta koncentrātu starp baklažānu augiem.
- 6.5. Inokulēt 25 augus ar zināmu *C. sepedonicum* kultūru un, ja iespējams, ar dabiski inficētiem bumbuļa audiem (5.1.), izmantojot to pašu inokulācijas metodi (6.2., 6.3. vai 6.4.).
- 6.6. Inokulēt 25 augus ar sterilu 0,05 M PBS, izmantojot to pašu inokulācijas metodi (6.2., 6.3. vai 6.4.)
- 6.7. Augus 40 dienas novietot inkubācijai atbilstošos apstākļos (5. papildinājums). Pēc astoņām dienām regulāri pārbaudīt, vai augiem nav slimības pazīmju. Saskaitīt augus ar slimības pazīmēm. *C. sepedonicum* izraisa baklažānu lapu vīšanu, kas var sākties kā ņenganums lapu malās vai starp lapas dzīslām. Savītušiem audiem sākotnēji var būt tumši zaļa krāsa vai plankumi, bet pirms atmiršanas tie kļūst bālāki. Savītuši audi starp lapas dzīslām bieži izskatās kā taukaini un it kā piepildīti ar ūdeni. Atmirušiem audiem bieži ir spoži dzeltena robežlīnija. Nav obligāti, ka augi ir pavisam gājuši bojā; jo ilgāks ir periods, kad neparādās slimības pazīmes, jo lielāka ir augu izdzīvošanas iespēja. Augi var izturēt infekciju. Pret mikroorganismiem uzņēmīgi jauni baklažānu augi ir daudz jutīgāki pret mazām *C. sepedonicum* populācijām nekā vecāki baklažānu augi, tādēļ ir nepieciešams izmantot augus 3. lapas stadijā vai tikko pirms tās.

Vīšanu var izraisīt arī citu baktēriju vai sēnīšu populācijas, kas var būt bumbuļu audu ekstrakta koncentrātā. Tās var būt *Erwinia carotovora*, *subsp. carotovora* un *E. carotovora subsp. atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata*, kā arī plašas saprofito baktēriju populācijas. Šāda veida vīšanu var atšķirt no *C. sepedonicum* izraisītās vīšanas, tā kā veselas lapas vai pat veseli augi vīst ļoti ātri.

- 6.8. Sagatavot Grama krāsojumam (4.) visas to baklažānu augu partijas, kurām ir slimības pazīmes, izmantojot šo augu savītušos lapu audus un stublāja audus, un nodalīt tās piemērotajā barotnē (7.). Dezinficēt baklažānu lapu virsmas un stublājus, notīrot tos ar 70 % etilspirtu.
- 6.9. Dažos apstākļos, jo īpaši tad, ja audzēšanas apstākļi nav optimāli, ir iespējams, ka *C. sepedonicum* var saglabāties baklažānu augos kā latentā infekcija pat pēc 40 dienu inkubācijas. Šāda veida infekcija var iespējami izraisīt inokulēto augu augšanas kavēšanu un pazeminātu dzīvotspēju. Ja ir noteikts pozitīvs IF analīzes rezultāts, var būt nepieciešams turpināt testēšanu. Tādēļ ir būtiski salīdzināt visu testējamo baklažānu augu augšanas rādītājus ar kontrolparaugiem, kas inokulēti ar sterilu 0,05 M PBS, un pārraudzīt siltumnīcas vides apstākļus.

Ieteikumi turpmākajai testēšanai ir šādi:

- 6.9.1. Nogrieziet stublājus virs inokulācijas vietas un noņemiet lapas;
- 6.9.2. Izmērcēt stublājus 0,05 M PBS pH 7,0 šķīdumā, kā noteikts 3.1. līdz 3.2. punktā;
- 6.9.3. Pusi no ekstrakta koncentrāta izmantot Grama krāsojuma (4.) un IF analīzes (5.) veikšanai;
- 6.9.4. Otro koncentrāta pusi izmantot turpmākajiem baklažānu testiem (6.), ja Grama krāsojums un/vai IF analīze ir pozitīvi. Izmantot zināmu *C. sepedonicum* kultūru un sterilas 0,05M PBS kontroles. Ja turpmākajos testos nav novērotas slimības pazīmes, paraugu jāuzskata par paraugu ar negatīvu rezultātu.

7. *C. sepedonicum* nodalīšana

Diagnozi var apstiprināt tikai tad, ja *C. sepedonicum* ir nodalīts un ir identificēts kā tāds (8.). Kaut gan *C. sepedonicum* ir izvēlīgs organisms, to var nodalīt no audiem ar inficēšanās pazīmēm. Tomēr to var nomākt ātri attīstošās saprofitās baktērijas, un tādēļ nav ieteicams to nodalīt tieši no bumbuļu audu ekstrakta koncentrāta (3.3.). Baklažānu augi dod teicamu selektīvu barotni *C. sepedonicum* attīstībai, kā arī dod teicamu iespēju veikt apstiprinājuma testu saimniekauga noteikšanai.

Organismu nodala no visiem kartupeļu bumbuļiem un baklažāniem ar slimības pazīmēm (4., 6.). Vajadzības gadījumā baklažānu stublājus izmērcē tāda veidā, kā ir noteikts 3. un 6.9. punktā.

7.1. Suspensiju uzklāt uz vienas no šādām vidēm: (formulas ir norādītas 6. pielikumā):

kultivēts dekstrozes agars (tikai subkulturāi),

rauga peptona glikozes agars,

kultivēts rauga dekstrozes agars,

rauga ekstrakta minerālšāļu agars.

Novietot inkubācijai 21 °C grādos uz laiku līdz 20 dienām.

C. sepedonicum ir lēni augošs organisms, kas parasti 10 dienās veido niecīgi mazas (kā adatas smaile) krēmkrāsas kupolveidīgas kolonijas.

Atkārtoti uzklāt, lai izveidotu tīrkultūru.

Augšanas rādītājus uzlabo ar subkulturā. Tipiskas kolonijas ir krēmbaltā vai ziloņkaula krāsā, noapaļotas, gludas, paaugstinātas, ar izliektu kupolveidīgu formu, gļotaini šķidrās, ar veselām malām un parasti 1 līdz 3 mm diametrā.

Identificēšana

Daudzas Gram-pozitīvās korinebaktērijas, kurām koloniju raksturīgās īpašības ir līdzīgas *C. sepedonicum*, var tikt nodalītas no veselīem vai slimiem kartupeļiem un baklažānu augiem. Šajā sakarā *C. sepedonicum* jāidentificē ar šādiem testiem:

IF analīze (5.1.),

baklažānu tests,

barības testi un fizioloģiskie testi (7. pielikums),

— oksidācijas/fermentācijas (O/F) tests,

— oksidāzes tests,

— pieaugums 37°C grādos,

— ureāzes izstrāde,

— eskulīna hidrolīze,

— cietes hidrolīze,

— tolerance pret 7 % nātrija hlorīda šķīdumu,

— indola tests,

— katalāzes pārbaude,

— H₂S izstrāde,

— citrāta patēriņš,

— želatīna hidrolīze,

— skābe no: glicerīna, laktozes, ramnozes un salicīna,

— Grama krāsojums.

Visos testos iekļauj zināmu *C. sepedonicum* kontroli. Barības testi un fizioloģiskie testi jāveic, izmantojot inokulētus no kultivēta agara subkulturām. Morfoloģiskie salīdzinājumi jāveic ar kultivēta dekstrozes agara subkulturām.

Attiecībā uz IF analīzi, šūnu populācijas jāpielāgo rādītājam - 10⁶ šūnas/1 ml. IF titram jābūt līdzīgam zināmas *C. sepedonicum* kultūras titram.

Attiecībā uz baklažānu testu, šūnu populācijas jāpielāgo rādītājam - apmēram 10⁷ šūnas/1 ml. Baklažānu testus jāveic, katram testējamam organismam izmantojot 10 augus, pie tam atkal izmantojot zināmu *C. sepedonicum* kultūru un sterila ūdens kontroles; attiecībā uz tīrkultūrām, tipiska vīšana jāpanāk 20 dienās, un augi, kuriem nav slimības pazīmju pēc šā laika jānovieto inkubācijai kopumā 30 dienas, temperatūrās, kas sekmē baklažānu attīstību, bet kas nepārsniedz 30 °C grādus (5. papildinājums). Ja arī pēc 30 dienām augiem nav slimības pazīmju, šo kultūru nevar apstiprināt kā *Corynebacterium sepedonicum* patogēnu formu.

Tests	<i>C. sepedonicum</i>
O/F	Inerta vai vāji oksidatīva
Oksidāze	–
Katalāze	+
Nitrātu samazinājums	–
Ureāzes aktivitāte	–
H ₂ S izstrāde	–
Indola izstrāde	–
Citrāta patēriņš	–
Cietes hidrolīze	– vai vāja
Pieaugums 37 °C	–
Pieaugums 7 % NaCl	–
Želatīna hidrolīze	–
Eskulīna hidrolīze	+
Skābe no:	
– Glicerīna	–
– Laktozes	– vai vāja
– Ramnozes	–
– Salicīna	–

1. papildinājums

MACERĀCIJAS ŠĶIDRUMA FORMULA, KO IETEICA LEILOTS UN SELARS (LELLIOTT & SELLAR), 1976

DC silikona pretputu līdzekļa MS A maisījums (<i>Hopkins & Williams Ltd, Cat. No 9964 -25, Chadwell Heath, Essex, England</i>)	10 ml
Lubrola W pārslas (ICI Ltd)	0,5 g
Nātrija pirofosfāts	1 g
0,05 M fosfāta buferšķīdums (PBS) pH 7,0 (2. papildinājums)	1 litrs

2. papildinājums

BUFERVIELAS**0,05 M fosfātu buferšķīdums pH 7,0**

Šo buferšķīdumu var izmantot bumbuļu audu macerācijai (2.1.)

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
NaCl	8,0 g
Destilēts ūdens līdz	1 litram

0,01 M fosfātu buferšķīdums pH 7,2

Šo buferšķīdumu izmanto imūnsērumu atšķaidīšanai un IF priekšmetstikliņu mazgāšanai

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
Destilēts ūdens līdz	1 litram

0,1 M fosfātu glicerīna buferšķīdums pH 7,6

Šo buferšķīdumu izmanto kā saistvielu, lai pastiprinātu fluorescenci IF analīzē

Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ 2 H ₂ O	0,15 g
Glicerīns	50 ml
Destilēts ūdens	100 ml

3. papildinājums

GRAMA KRĀSOJUMA PROCEDŪRA (HAKERA (HUCKER) MODIFIKĀCIJA) (DOČS (DOETSCH), 1981)**Kristālvioletā šķīdums**

Izšķīdināt 2 g kristālvioletā 20 mililitros 95 % etilspirta.

Izšķīdināt 0,8 g amonija oksolāta 80 mililitros destilētā ūdens.

Samaisīt šos divus šķīdumus.

Lugola joda šķīdums

Jods	1 g
Kālija jodīds	2 g
Destilēts ūdens	300 ml.

Cietvielas sasmalcināt kopā piestalā ar piestu. Iebērt ūdenī un samaisīt, lai tie izšķīstu slēgtā traukā.

Safranīna šķīdums

Standartšķīdums:

Safranīns O	2,5 g
95 % etilspirts	100 ml.

Samaisīt un uzglabāt.

Atšķaidīt: 1:10, lai iegūtu darba šķīdumu.

Reakcijas procedūra

1. Sagatavot ar sausu gaisu izžāvētas un termiski fiksētas uztriepes.
2. Priekšmetstikliņu uz vienu minūti pārklāt ar kristālvioleto šķīdumu.
3. Ātri izmazgāt ar ūdensvada ūdeni.
4. Uz vienu minūti pārklāt to ar Lugola joda šķīdumu.
5. Izmazgāt ar ūdensvada ūdeni un nosusināt.
6. Atkrāsot to ar 95 % etilspirtu, pievienojot spirtu pa pilieniem, kamēr krāsas vairs nenoņemsies, vai ieliekot to etilspirtā 30 sekundes un viegli pamaisot.
7. Izmazgāt ar ūdensvada ūdeni un nosusināt.
8. Uz 10 sekundēm pārklāt to ar safranīna šķīdumu.
9. Izmazgāt ar ūdensvada ūdeni un nosusināt.

Gram-pozitīvo baktēriju reakcija ir violeti zila. Gram-negatīvo baktēriju reakcija ir rozīgi sarkana.

4. papildinājums

IF - POZITĪVO ŠŪNU POPULĀCIJAS NOTEIKŠANA

Daudzpriekšmetstikliņa lodziņa platība (S)

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

kur D = lodziņa diametrs.

Redzamības lauka platība(-as)

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

kur d = redzamības lauka diametrs.

Aprēķināt d vērtību ar tiešu mērījumu vai ar šādām formulām:

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

kur i = redzamības lauka koeficients (atkarīgs no okulāra tipa un variējas no 8 līdz 24),

K = tūbiņas koeficients (1 vai 1,25),

G = objektīva palielinājums (100×, 40× utt.),

$$\text{no (2) } d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$$

$$\text{no (3) } d = \sqrt{\frac{4 \times \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4}}{\pi}} = \frac{i}{GK} \quad (4)$$

Saskaitīt tipisko fluorescējošo šūnu skaitu vienā redzamības laukā (c).

Aprēķināt tipisko fluorescējošo šūnu skaitu vienā lodziņā (C).

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

Aprēķināt tipisko fluorescējošo šūnu skaitu 1 ml ekstrakta koncentrāta (N)

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

kur y = ekstrakta koncentrāta tilpums lodziņā,

kur F = ekstrakta koncentrāta atšķaidījuma faktors.

5. papildinājums

BAKLAŽĀNU KULTŪRA

Iesēt baklažānu (*Solanum melongena* cv. *Black Beauty*) sēklas pasterizētā sēklaudzēšanas kompostā. Pārstādīt sēklaudžus ar pilnībā izplaukušām dīgļlapām (10 līdz 14 dienas) pasterizētā trauku kompostā.

Izmantot baklažāna augus 3. lapas stadijā, kad ir pilnībā izplaukušas divas, bet ne vairāk kā trīs lapas.

Baklažāna augus audzē siltumnīcā ar šādiem vides apstākļiem:

dienas ilgums: 14 stundas vai dabīgs dienas ilgums, ja ilgāks,

temperatūra: dienā: 21 līdz 24 °C,

naktī: 15 °C.

NB: *C. sepedonicum* neaug temperatūrās >30 °C. Ja nakts temperatūra nepazemināsies līdz 15 °C, var parādīties hromofora kaitējums (sudrabainā nekroze).

Sakņu sistēmas kaitējumu, ko izraisa sēņoņiņi kāpuri (*Sciariidae*), var novērst, izmantojot atbilstošu insekticīdu.

Baklažānu šķirnes cv. *Black Beauty* var iegādāties no:

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

6. papildinājums

BAROTNE C. SEPEDONICUM AUDZĒŠANAI UN NODALĪŠANAI

Kultivēts agars (NA)

Difco Bacto kultivēts agars destilētā ūdenī ražotāja norādītajā koncentrācijā. Sterilizēt autoklāvā 15 minūtes 121 °C temperatūrā.

Kultivēts dekstrozes agars (NDA)

Difco Bacto kultivēts agars, kas satur 1 % D(+) glikozes (monohidrāta). Sterilizēt autoklāvā 20 minūtes 115 °C temperatūrā.

Rauga peptona glikozes agars (YPGA)

<i>Difco Bacto</i> rauga ekstrakts (Nr. 0127)	5 g
<i>Difco Bacto</i> peptons (Nr. 0118)	5 g
D(+)-glikoze (monohidrāts)	10 g
<i>Difco bacto</i> attīrīts agars (Nr. 0560)	15 g
Destilēts ūdens	1 litrs

Substrātu 0,5 litru tilpumos sterilizēt autoklāvā 20 minūtes 115 °C temperatūrā.

Rauga ekstrakta minerālsāļu barotne (YGM)

<i>Difco Bacto</i> rauga ekstrakts	2,0 g
D(+)-glikoze (monohidrāts)	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
<i>Difco Bacto</i> attīrīts agars	18 g
Destilēts ūdens	1 litrs

Substrātu 0,5 litru tilpumos sterilizēt autoklāvā 20 minūtes 115 °C temperatūrā.

7. papildinājums

BARĪBAS TESTI UN FIZIOLOĢISKIE TESTI *C. SEPEDONICUM* IDENTIFICĒŠANAI

Visas barotnes novieto inkubācijai 21 °C temperatūrā un apskata pēc sešām dienām. Ja nav novērots pieaugums, novietot inkubācijai 20 dienas.

— **Oksidācijas un fermentācijas tests** (Hjū un Leifsons (*Hugh & Leifson*)), 1953) - O/F-tests.

Bazālā barotne:

KCl	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
<i>Difco Bacto</i> peptons	1,0 g
<i>Difco Bacto</i> attīrīts agars	3,0 g
D(+)-glikoze (monohidrāts)	10,0 g
Bromtimolzilais	0,03 g
Destilēts ūdens	1 litrs

Samaisīt un ar 1N KOH panākt pH 7,0 līdz 7,2.

Sadalīt 5 ml un 10 ml tilpumos pa Pyrex stikla kultūru tūbiņās (16 mm × 100 mm, tilpība 12 ml).

Sterilizēt autoklāvā 10 minūtes 115 °C temperatūrā.

Iešļircināt inokulātu 5 ml un 10 ml tūbiņās katrai kultūrai. Aseptiski pievienot 1 līdz 2 ml sterila šķidra parafina 10 ml tūbiņā. Novietot inkubācijai.

Tūbiņa	Krāsa	Interpretācija
Atklāta	Dzeltena	Fermentatīva
Slēgta	Dzeltena	
Atklāta	Dzeltena	Oksidatīva
Slēgta	Zilgani zaļa	
Atklāta	Zaļgana	Oksidatīva vai inerta
Slēgta	Zilgani zaļa	

— **Oksidāzes tests** (Kovačs (*Kovacs*), 1956)

Kovača oksidāzes reaģents:

Tetrametilparafenilēndiamīna dihidrohlorīda (BDH Nr. 30386) 1 % ūdens šķīdums destilētā ūdenī.

Šim reaģentam jābūt svaigi gatavotam ar tilpumu 1 ml vai arī to var uzglabāt 1 līdz 4 nedēļas tumša stikla pudelē 5 °C temperatūrā.

Vienu pilienu reaģenta iepilināt uz filtrpapīra tīrajā Petri platē. Nekavējoties ar platīna cilpu ieziest nedaudz testējamās kultūras no kultivēta agara.

Pozitīvā reakcija: 10 sekundēs parādās purpursarkans krāsojums. Kultūras ar krāsojuma parādīšanās laiku 10 līdz 30 sekundēm ir vāji pozitīvas.

NB: Ir būtiski izmantot tieši platīna cilpu un kultivēta agara kultūras, tā kā dzelzs pēdas vai augsts cukura saturs barotnē var dod kļūdainus pozitīvus rezultātus.

— **Skābes izstrāde no laktozes, ramnozes, salicīna, glicerīna**

Sagatavot Hjū un Leifsona (*Hugh & Leifson*) O/F substrātu bez glikozes. Sadalīt tūbiņās pa 5 ml katrā. Sterilizēt autoklāvā 10 minūtes 115 °C temperatūrā. Izkausētai bāzei 45 °C temperatūrā aseptiski pievienot 0,5 ml 10 % glicerīna, laktozes, ramnozes vai salicīna ūdens šķīdumā, kas sterilizēts filtrējot. Uzmanīgi samaisīt.

Pozitīvā reakcija: krāsas maiņa no zilgani zaļas uz dzeltenu norāda uz skābes producēšanu.

— **Katalāzes pārbaude**

Vienu pilieni ūdeņraža peroksīda (30 tilp.) iepilināt uz tīra priekšmetstikliņa un emulgēt ar pilnu cilpu kultūras, izmantojot platīna cilpu.

Pozitīvā reakcija: skābekļa burbuļu izdalīšanās pilienā norāda uz katalāzes klātbūtni.

— **Nitrātu reduktāzes aktivitāte un denitrifikācija** (Bredberijs (*Bradbury*), 1970)

Barotne:

KNO ₃ (bez nitrātiem)	1 g
<i>Difco Bacto</i> rauga ekstrakts	1 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Destilēts ūdens	1 litrs

Sadalīt 20 ml pudelītēs pa 10 ml katrā. Sterilizēt autoklāvā 15 minūtes 121 °C temperatūrā.

A reaģents:

H ₂ SO ₄	8 g
5N etiķskābe	1 litrs

B reaģents:

naftilamīns	5 g
5N etiķskābe	1 litrs

Izdarīt divas paralēlas nitrātu barotnes inokulācijas. Pārbaudīt pēc 10 un 20 dienām, pievienojot vienu pilieni Lugola joda šķīduma, 0,5 ml A reaģenta un 0,5 ml B reaģenta. Ja substrāts nekļūst sarkanīgs, pievienot apmēram 50 mg cinka pulvera. Novērot krāsas reakciju.

Pozitīvā reakcija:

Krāsas reakcija:

	1. pakāpe	2. pakāpe
Nav nitrāta redukcijas	bezkrāsas	sarkana
Nitrāta redukcija līdz nitrītam (tikai nitrāta reduktāze)	sarkana	–
Nitrāta redukcija tālāk par nitrītu (denitrifikācija – nitrāta un nitrīta reduktāze)	bezkrāsas	bezkrāsas

— **Ureāzes izstrāde** (Leliots (*Lelliott*), 1966)

Bazālā barotne:

<i>Oxoid</i> urīnvielas agara bāze (CM53)	2,4 g
Destilēts ūdens	95 ml

Sterilizēt autoklāvā 20 minūtes 115 °C temperatūrā. Atdzesēt izkausēto bāzi līdz 50 °C un aseptiski pievienot 5 ml 40 % urīnvielas ūdens šķīduma, kas sterilizēts filtrējot (*Oxoid* SR20). Labi samaisīt.

Sadalīt sterilās tūbiņās (16 × 100 mm) pa 6 ml katrā un novietot slīpi.

Pozitīvā reakcija: dzeltenīgi oranžs substrāts maina krāsu uz ķiršu sarkano vai fuksīna sārto, ja notiek ureāzes parādīšanās.

Citrāta patēriņš (Kristensens (*Christensen*)) (Skermens (*Skerman*), 1967)

Citrāta agara bāze (<i>Merck</i> 2503)	23 g
Destilēts ūdens	1 litrs

Samaisīt un karsējot izšķīdināt. Sadalīt pa 6 ml tilpumos, kā urīnvielas substrātu. Sterilizēt autoklāvā 15 minūtes 121 °C temperatūrā un novietot slīpi.

Pozitīvā reakcija: uz citrāta patēriņu norāda substrāta krāsas maiņa no oranžās uz sarkano.

— **Sērūdeņraža izstrāde** (Ramamurtijs (*Ramamurthi*), 1959)

Barotne:

<i>Difco Bacto</i> triptons (Nr. 0123)	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NaCl	5 g
Destilēts ūdens	1 litrs.

Izšķīdināt un sadalīt 16 × 100 mm tūbiņās pa 6 ml katrā. Sterilizēt autoklāvā 10 minūtes 115 °C temperatūrā.

Inokulēt un no tūbiņas malas aseptiski ielikt iekšā ar svina acetātu piesūcinātu papīru (*Merck* 9511). Uzglabāt ar aizbāzni. Novietot inkubācijai uz laiku līdz 20 dienām.

Pozitīvā reakcija: uz H₂S izstrādi no triptona norāda testa papīra krāsas maiņa uz melni brūnu.

— **Indola izstrāde** (Ramamurtijs (*Ramamurthi*), 1959)

Barotne:

Kā H₂S testam.

Noņemt ar svina acetātu piesūcinātu papīru. Pievienot 1 līdz 2 ml dietilētera un viegli sakratīt. Ļaut slāņiem atdalīties (piecas minūtes). Slīpajā tūbiņā uzmanīgi pievienot 0,5 ml Kovača reaģenta (*Merck* 9293).

Pozitīvā reakcija: uz indola klātbūtni norāda sarkanās krāsas parādīšanās dzeltenajā slānī starp ēteri un ūdens frakcijām.

— **Pieaugums 37 °C temperatūrā** (Ramamurtijs (*Ramamurthi*), 1959)

Barotne:

<i>Difco Bacto</i> kultivēts buljons (Nr. 0003)	8 g
Destilēts ūdens	1 litrs

Samaisīt, izšķīdināt un sadalīt tūbiņās pa 6 ml katrā.

Sterilizēt autoklāvā 15 minūtes 121 °C temperatūrā.

Inokulēt un novietot inkubācijai 37 °C temperatūrā.

Pozitīvā reakcija: novērot pieaugumu.

— **Pieaugums 7 % nātrija hlorīdā** (Ramamurtijs (*Ramamurthi*), 1959)

Barotne:

<i>Difco Bacto</i> kultivēts buljons	8 g
NaCl	70 g
Destilēts ūdens	1 litrs

Samaisīt, izšķīdināt un sadalīt tūbiņās pa 6 ml katrā.

Sterilizēt autoklāvā 15 minūtes 121 °C temperatūrā.

Pozitīvā reakcija: novērot pieaugumu.

— **Želatīna hidrolīze** (Leliots, Bilings un Heivords (*Lelliott, Billing & Hayward*), 1966)

Barotne:

<i>Difco Bacto</i> želatīns (Nr. 0143)	120 g
Destilēts ūdens	1 litrs

Samaisīt, karsējot izšķīdināt un sadalīt tūbiņās pa 6 ml katrā.

Sterilizēt autoklāvā 15 minūtes 121 °C temperatūrā.

Pozitīvā reakcija: želatīna sašķīdināšana pat tad, ja uztur 30 minūtes 5 °C temperatūrā.

— **Cietes hidrolīze**

Barotne:

<i>Difco Bacto</i> kultivēts agars (izkausēts)	1 litrs
<i>Difco Bacto</i> šķīstošā ciete (Nr. 0178)	2 g

Samaisīt, sterilizēt autoklāvā 10 minūtes 115 °C temperatūrā.

Izliet uz platēm. Inokulēt plates.

Pēc tā, kad ir novērots labs pieaugums (10 līdz 20 dienas), daļu kultūras pieauguma noņem un pārklāt to ar Lugola joda šķīdumu.

Poziīvā reakcija: uz cietes hidrolīzi norāda tīras zonas zem vai ap baktēriju pieaugumu; pārējā barotnes daļa ir purpura krāsā.

— **Eskulina hidrolāzes aktivitāte** (Snīzs un Kolins (*Sneath & Collins*), 1974)

Barotne:

<i>Difco Bacto</i> peptons	10 g
Eskulīns	1 g
Dzelzs citrāts (<i>Merck</i> 3862)	0,05 g
Nātrija citrāts	1 g
Destilēts ūdens	1 litrs

Samaisīt, kamēr izšķīst, un sadalīt tūbiņās pa 6 ml katrā. Sterilizēt autoklāvā 10 minūtes 115 °C temperatūrā.

Substrāts ir tīrs, bet ar zilganu fluorescenci.

Poziīvā reakcija: uz eskulina hidrolīzi norāda brūnās krāsas parādīšanās un fluorescences izzušanu. To var pārbaudīt, izmantojot ultravioleto spuldzi.

ATSAUCES

- 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 EK method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. *EPPO Bull.*, Nr. 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 reproductibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, 481-527.

II PIELIKUMS

1. Katrā iespējamās organisma klātbūtnes gadījumā, kad ir noteikta pozitīva imunofluorescences analīze saskaņā ar I pielikumā paredzēto metodi un ir gaidāma apstiprināšana vai noliegšana, kamēr pabeidz minēto metodi, jāpatur un attiecīgi jāuzglabā:
 - kad vien iespējams, visi bumbuļi vai augi, no kuriem ņemti paraugi, un
 - jebkādas ekstrakta koncentrāta paliekas un papildus sagatavotie imunofluorescences priekšmetstikliņi, līdz minētās metodes pabeigšanai.
 2. Ja ir pozitīvi apstiprināta šā organisma klātbūtne, jāpatur un attiecīgi jāuzglabā:
 - 1. punktā norādītais materiāls un
 - inficētā baklažānu materiāla paraugs, kas ir inokulēts ar bumbuļu vai augu ekstraktu, un
 - šā organisma nodalītā kultūra,vismaz vienu mēnesi pēc paziņošanas procedūras saskaņā ar 5. panta 2. punktu.
-

III PIELIKUMS

1. Lai noteiktu iespējamās inficēšanās mērogu saskaņā ar 5. panta 1. punkta b) apakšpunktu, izskata šādus faktorus:
 - bumbuļus vai augus, kas audzēti tādā ražošanas vietā, kas apzīmēta kā inficēta saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu,
 - ražošanas vietu(-as) vai telpas, kas kaut kāda ražošanas procesā saistītas ar bumbuļiem vai augiem, kuri apzīmēti kā inficēti saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu, tostarp tieši vai ar apakšuzņēmēju starpniecību izmantojamo koplietošanas ražošanas aprīkojumu un iekārtas,
 - bumbuļus vai augus, kas ražoti iepriekšējā ievilkumā minētajā(-ās) ražošanas vietā(-ās) vai kas atradās šādā(-ās) ražošanas vietā(-ās) tajā laika posmā, kad tie bumbuļi vai augi, kuri apzīmēti kā inficēti saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu, atradās pirmajā ievilkumā minētajās telpās vai ražošanas vietās,
 - centrālās glabātavas, kas rīkojas ar kartupeļiem no iepriekšminētajām ražošanas vietām,
 - jebkuras iekārtas, transportlīdzekļus, traukus, glabātavas, vai to vienības, un jebkurus citus priekšmetus, tostarp arī iepakojuma materiālu, kas iepriekšējo 12 mēnešu laikā vai jebkurā citā attiecīgajā termiņā varēja nonākt saskarē ar bumbuļiem vai augiem, kuri apzīmēti kā inficēti saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu,
 - visus bumbuļus vai augus, kas uzglabājās vai nonāca saskarē ar jebkurām iepriekšēja ievilkumā minētajām telpām vai priekšmetiem pirms šādu telpu un priekšmetu tīrīšanas un dezinfekcijas,
 - kā arī, saskaņā ar 6. pantu veiktās pārbaudes rezultātā, tos bumbuļus vai augus, kuriem ir kopīga klonu izcelsme ar tiem bumbuļiem un augiem, kas ir apzīmēti kā inficēti saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu, un attiecībā uz kuriem izpēte rāda, ka ir iespējama inficēšanās.
 2. Lai noteiktu iespējamās infekcijas izplatīšanās mērogu saskaņā ar 5. panta 1. punkta c) apakšpunktu, izskata šādus faktorus:
 - tuvumu citām ražošanas vietām, kurās audzē kartupeļus vai citus saimniekaugus,
 - sēklas kartupeļu krājumu vienveidību.
 3. Saskaņā ar 5. panta 2. punktu paredzētajos paziņojumos sīki apraksta:
 - attiecībā uz jebkuru kartupeļu sūtījumu vai krājumu, kas ir apzīmēts kā inficēts, Direktīvas Nr. 77/93/EEK 7. vai 8. pantā noteiktos sertifikātus, un, attiecīgi, pasi vai reģistrācijas numuru,
 - attiecībā uz sēklas kartupeļu krājumiem un pēc iespējas arī visos citos gadījumos - kultūras šķirnes nosaukumu,
 - apzīmētā inficētā materiāla elementu un zonas norobežojuma faktoru apraksts,
 - datus par ekstrakta, imunofluorescences analīzei sagatavoto priekšmetstikliņu, inficētā baklažānu materiāla un šā organisma nodalītās kultūras pieejamību, kas iegūti testēšanā, kurā ir pozitīvi apstiprināta šā organisma klātbūtne.
-

IV PIELIKUMS

1. Saskaņā ar 7. panta 1. punktu oficiāli kontrolētie pasākumi, lai atbrīvotos no tiem bumbuļiem vai augiem, kas ir apzīmēti kā inficēti saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu, ir šādi:
 - rūpnieciskās pārstrādes izmantošana, tieši un tūlīt tos piegādājot pārstrādes rūpnīcā ar atbilstošām atkritumu apglabāšanas iekārtām, attiecībā uz ko ir noteikts, ka nav nosakāma šā organisma izplatīšanās riska, un ar glabāšanas zonu un aizbraucamo transporta līdzekļu dezinfekcijas sistēmu, vai
 - citi pasākumi ar nosacījumu, ka ir noteikts, ka nav nosakāma šā organisma izplatīšanās riska; par šādiem pasākumiem ziņo Komisijai un pārējām dalībvalstīm.
2. Saskaņā ar 7. panta 2. punktu paredzētā atbilstošā izmantošana vai atbrīvošanās no tiem bumbuļiem un augiem, kas apzīmēti kā iespējami inficēti saskaņā ar 5. panta 1. punkta b) apakšpunktu, dalībvalstu atbildīgo oficiālo iestāžu uzraudzībā, ir šāda:
 - izmantot tos kā galda kartupeļus patēriņam, kas ir iepakoti un gatavi tiešai piegādei un izmantošanai bez pārsaiņošanas un kas ir arī paredzēti šāda veida tiešai piegādei un izmantošanai, vai
 - izmantot tos kā galda kartupeļus rūpnieciskai pārstrādei, kas ir paredzēti tiešai un tūlītējai piegādei pārstrādes rūpnīcā ar atbilstošām atkritumu apglabāšanas un dezinfekcijas iekārtām, vai
 - cita veida izmantošana vai atbrīvošanās no tiem ar nosacījumu, ka ir konstatēts, ka nav nosakāms šā organisma izplatīšanās risks.
3. Saskaņā ar 7. panta 3. punktu paredzētās atbilstošās tīrīšanas un dezinficēšanas metodes ir tās, attiecībā uz kurām ir konstatēts, ka nav nosakāms šā organisma izplatīšanās risks, un tās veic dalībvalstu atbildīgo oficiālo iestāžu uzraudzībā.
4. Saskaņā ar 7. panta 4. punktu paredzēto pasākumu kopums, ko dalībvalstīm jāīsteno norobežotajā teritorijā, kas izveidota saskaņā ar 5. panta 1. punkta c) apakšpunktu, ir šāds:
 - 4.1. Ražošanas vietās, kas apzīmētas kā inficētas saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu:
 - a) tīrumā, kas apzīmēts kā inficēts saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu, vai nu:
 - i) — vismaz trīs augšanas gadu laikā pēc apzīmētās inficēšanās gada,
 - īsteno pasākumus, lai likvidētu pašizsējas kartupeļu augus un citus šā organisma dabiskā izplatībā atrodamus saimniekaugus, un
 - nedrīkst stādīt tos kartupeļu bumbuļus, augus vai īstās sēklas, vai citus šā organisma dabiskā izplatībā atrodamus saimniekaugus, vai kultūras, attiecībā uz ko pastāv nosakāms šā organisma izdzīvošanas vai izplatīšanās risks, kamēr vismaz divu secīgu augšanas gadu laikā minētais tīrums nebūs brīvs no pašizsējas kartupeļu augiem,
 - pirmajā kartupeļu ražas sezonā pēc iepriekšējā ievilkumā precizētā perioda stāda oficiāli sertificētus sēklas kartupeļus tikai galda kartupeļu ražošanai un veic oficiālu apsekojumu, kā sīki noteikts 2. panta 1. punktā,
 - kartupeļu ražas sezonās, kas seko aiz iepriekšējā ievilkumā precizētās sezonas un pēc atbilstošā augu maiņas cikla, stāda oficiāli sertificētus sēklas kartupeļus, kas paredzēti sēklas vai galda kartupeļu ražošanai, un veic oficiālu apsekojumu, kā sīki noteikts 2. panta 1. punktā; vai nu
 - ii) — četru augšanas gadu laikā pēc apzīmētās inficēšanās gada,
 - īsteno pasākumus, lai likvidētu pašizsējas kartupeļu augus un citus šā organisma dabiskā izplatībā atrodamus saimniekaugus, un
 - šo tīrumu aizlaiž atmatā vai paredz pastāvīgajām ganībām, to bieži pļaujot tuvu zemei vai arī paredzot intensīvajām ganībām, un uztur kā tādu,
 - pirmajā kartupeļu ražas sezonā pēc iepriekšējā ievilkumā precizētā perioda stāda oficiāli sertificētus sēklas kartupeļus, kas paredzēti sēklas vai galda kartupeļu ražošanai, un veic oficiālu apsekojumu, kā sīki noteikts 2. panta 1. punktā,

- b) citos tīrumos:
- augšanas gadā, kas seko aiz apzīmētās inficēšanās gada:
 - nedrīkst stādīt kartupeļu bumbuļus, augus vai īstās sēklas, vai citus šā organisma dabiskā izplatībā atrodamus saimniekaugus, un, atbilstoši, jāīsteno pasākumi, lai likvidētu pašizsējas kartupeļu augus, vai
 - drīkst stādīt oficiāli sertificētus sēklas kartupeļus tikai galda kartupeļu ražošanai ar nosacījumu, ka atbildīgās oficiālās iestādes ir apmierinātas ar pierādījumu, ka ir novērsts risks, kas nāk no pašizsējas kartupeļu augiem un citiem šā organisma dabiskā izplatībā atrodamiem saimniekaugiem,
 - vismaz divu gadu laikā pēc iepriekšējā ievilkumā precizētā perioda stāda tikai oficiāli sertificētus sēklas kartupeļus, kas paredzēti sēklas vai galda kartupeļu ražošanai,
 - katrā no iepriekšējos ievilkumos minētajiem augšanas gadiem īsteno pasākumus, lai likvidētu pašizsējas kartupeļu augus un šā organisma dabiskā izplatībā atrodamus saimniekaugus, kā arī veic oficiālu apsekojumu, kā sīki noteikts 2. panta 1. punktā,
 - ja augšanas gadā, kas seko aiz apzīmētās inficēšanās gada, stāda oficiāli sertificētus sēklas kartupeļus galda kartupeļu ražošanai, attiecīgajā laikā pārbauda kultūru tās augšanas periodā, kā arī pašizsējas kartupeļu augus testē uz šā organisma klātbūtni;
- c) saskaņā ar 5. panta 1. punkta a) apakšpunktu tūlīt pēc inficēšanās apzīmējuma un katrā secīgajā augšanas gadā līdz pirmajai atļautajai kartupeļu ražas sezonai, to ieskaitot, tīrumā(-os), kas apzīmēts(-i) kā inficēts(-i), kā sīki izklāstīts a) apakšpunktā, visas iekārtas, mehānismus un glabātavas ražošanas vietā, kas ir iesaistīti kartupeļu ražošanā, atbilstoši tīra un dezinficē, izmantojot attiecīgas metodes, kā noteikts 3. punktā;
- d) tajās ražošanas sistēmās, kur ir iespējams pilnīgi aizstāt audzēšanas substrātu,
- nedrīkst stādīt bumbuļus, augus vai īstās sēklas, kamēr ražošanas vienība nepakļaujas oficiāli uzraudzītiem pasākumiem, lai novērstu šo organismu un likvidētu visus kartupeļu vai citus naktenču dzimtas augu materiālus, tostarp, vismaz pilnīgi nomainot audzēšanas substrātu, kā arī tīrot un dezinficējot šo ražošanas vienību un visas iekārtas, un kamēr pēc tam netiks saņemts atbilstīgo oficiālo iestāžu apstiprinājums kartupeļu ražošanai, un
 - kartupeļus ražo no oficiāli sertificētiem sēklas kartupeļiem vai no maziem bumbuļiem, vai mikro augiem, kuru izcelsme ir pārbaudītajos avotos;
- 4.2. neierobežojot pasākumus, kas sīki izklāstīti saskaņā ar 4.1. punktu, dalībvalstis:
- a) tūlīt un vismaz trīs augšanas sezonu laikā pēc apzīmētās inficēšanās:
- nodrošina, lai atbildīgās oficiālās iestādes uzraudzītu telpas, kur audzē, glabā vai pārkrauj kartupeļu bumbuļus, kā arī tās telpas, kurās saskaņā ar līgumu strādā iekārtas vai mehānismi, kas saistīti ar kartupeļiem,
 - pieprasa, lai šādās telpās atbilstoši tīra un dezinficē iekārtas, mehānismus un glabātavas, izmantojot attiecīgās metodes, kā precizēts 3. punktā,
 - pieprasa, lai šajā teritorijā stādītu tikai sertificētas sēklas visām kartupeļu kultūrām,
 - pieprasa, lai visās telpās šajā teritorijā atsevišķi pārkrautu novāktus sēklas kartupeļus un galda kartupeļus,
 - veic oficiālu apsekojumu, kā sīki noteikts 2. panta 1. punktā;
- b) attiecīgā gadījumā izveido programmu visu sēklas kartupeļu krājumu aizstāšanai attiecīgajā laika posmā.
- Par pasākumiem, kurus īsteno saskaņā ar 4.2. punktu, kopā ar norobežotajā teritorijā esošo ražotāju, kolektīvo glabātavu un noliktavu, un izplatīšanas centru reģistrācijas numuriem, ik gadu ziņo parējām dalībvalstīm un Komisijai.