

31993L0085

18.10.1993

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

L 259/1

DYREKTYWA RADY 93/85/EWG
z dnia 4 października 1993 r.
w sprawie zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka

RADA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

cieniowej ziemniaka; choroba ta pojawiła się w niektórych częściach Wspólnoty i nadal istnieją pewne ograniczone źródła infekcji;

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą, w szczególności jego art. 43,

uwzględniając wniosek Komisji ⁽¹⁾,

uwzględniając opinię Parlamentu Europejskiego ⁽²⁾,

istnieje poważne zagrożenie dla uprawy ziemniaka w całej Wspólnocie, jeśli nie podejmie się skutecznych środków dla zlokalizowania choroby i ustalenia jej przenoszenia, zapobieżenia jej wystąpieniu i rozprzestrzenieniu się oraz, w przypadku jej wykrycia, w celu zapobieżenia jej rozprzestrzenieniu się i kontrolowania mającego na celu jej zniszczenie;

uwzględniając opinię Komitetu Ekonomiczno-Społecznego ⁽³⁾,

a także mając na uwadze, co następuje:

produkcja ziemniaka zajmuje poważne miejsce w rolnictwie Wspólnoty; uprawy ziemniaka są stale zagrożone organizmami szkodliwymi;

poprzez ochronę upraw ziemniaka przed tymi szkodliwymi organizmami, powinno nie tylko utrzymać się zdolność produkcyjną, ale również zwiększyć wydajność produkcji rolnej;

środki ochronne zapobiegające wprowadzeniu organizmów szkodliwych w poszczególnych Państwach Członkowskich miałyby tylko ograniczony skutek przy braku jednoczesnej i systematycznej kontroli organizmów szkodliwych w całej Wspólnocie oraz przy braku ochrony przed ich rozprzestrzenianiem się;

jednym z organizmów szkodliwych ziemniaka jest *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., czynnik chorobotwórczy bakteriozy pierś

w celu osiągnięcia powyższego muszą być podjęte niektóre środki w obrębie Wspólnoty; dodatkowo, Państwa Członkowskie w razie potrzeby muszą być przygotowane do podjęcia dodatkowych lub zaostrzonych środków, pod warunkiem że nie stwarza to ograniczeń w przemieszczaniu ziemniaków w ramach Wspólnoty, z wyjątkiem przepisów ustanowionych w dyrektywie Rady 77/93/EWG z dnia 21 grudnia 1976 r. w sprawie środków ochronnych przed wprowadzaniem do Wspólnoty organizmów szkodliwych dla roślin lub produktów roślinnych ⁽⁴⁾; inne Państwa Członkowskie i Komisja muszą być powiadomione o takich środkach;

dyrektywa Rady 80/665/EWG z dnia 24 czerwca 1980 r. w sprawie zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka ⁽⁵⁾ ustanowiła minimalne środki, które podejmują Państwa Członkowskie przeciwko bakteriozie pierścieniowej;

⁽¹⁾ Dz.U. C 93 z 2.4.1993, str. 12.

⁽²⁾ Dz.U. C 176 z 28.6.1993, str. 210.

⁽³⁾ Dz.U. C 161 z 14.6.1993, str. 18.

⁽⁴⁾ Dz.U. L 26 z 31.1.1977, str. 20. Dyrektywa ostatnio zmieniona przez dyrektywę Komisji 92/103/EWG (Dz.U. L 363 z 11.12.1992, str. 1).

⁽⁵⁾ Dz.U. L 180 z 14.7.1980, str. 30.

od tamtego czasu, nastąpił znaczący rozwój w zakresie wiedzy na temat bakteriozy pierścieniowej i wykrywania czynników chorobotwórczych tej choroby;

stosowanie wspólnotowego systemu ochrony zdrowia roślin w odniesieniu do Wspólnoty jako obszaru bez granic wewnętrznych wymagało powtórnego zbadania i rewizji niektórych przepisów dyrektywy 80/665/EWG;

w wyniku takiego powtórnego badania, przepisy dyrektywy 80/665/EWG okazały się niewystarczające i niezbędne jest dalsza specyfikacja środków;

w takiej sytuacji, dyrektywa 80/665/EWG powinna być uchylona i niezbędne środki przyjęte;

środki powinny uwzględniać, po pierwsze to, że choroba może pozostawać w formie latentnej i być niezauważalna zarówno w uprawie jak i w składowanych bulwach i dlatego można jej skutecznie zapobiegać jedynie przez produkcję i uprawę sadzoniaków wolnych od infekcji, a po drugie to, że w celu jej wykrycia niezbędne jest przeprowadzanie systematycznych urzędowych badań; rozprzestrzenianie się czynnika chorobotwórczego w uprawie nie jest najbardziej znaczącym czynnikiem, jeśli jednak może on przetrwać zimę w z ziemniakach z samosiewu, stanowi główne źródło infekcji przenoszonej z sezonu na sezon; czynnik chorobotwórczy rozprzestrzenia się głównie poprzez skażenie ziemniaków w drodze kontaktu z zarażonymi ziemniakami oraz poprzez kontakt ze sprzętem do sadzenia, zbierania plonów, sprzętem do przenoszenia lub z pojemnikami do transportu i składowania, które zostały skażone poprzez wcześniejszy kontakt z zarażonymi ziemniakami; takie skażone przedmioty mogą pozostawać zainfekowane przez pewien czas od momentu skażenia; rozprzestrzenianie się czynnika chorobotwórczego może być ograniczane lub można mu zapobiegać poprzez dezynfekcję takich przedmiotów; każde takie skażenie sadzoniaków niesie ze sobą główne ryzyko rozprzestrzenienia się czynnika chorobotwórczego;

dla określenia szczegółów takich ogólnych środków, jak również zastrzonych i dodatkowych środków podjętych przez Państwa Członkowskie w celu zapobieżenia wprowadzeniu czynnika chorobotwórczego na ich terytorium, pożądana jest ścisła współpraca Państw Członkowskich z Komisją w ramach Stałego Komitetu ds. Zdrowia Roślin (zwanego dalej „Komitetem”),

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

Dyrektywa ta dotyczy środków, które podejmują Państwa Członkowskie przeciwko *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., przyczynie bakteriozy pierścieniowej ziemniaka (zwanej dalej „organizmem”), w celu:

a) zlokalizowania jej i ustalenia jej przenoszenia;

b) zapobieżenia jej pojawianiu się i rozprzestrzenieniu; oraz

c) w przypadku jej wykrycia, zapobieżenia rozprzestrzenieniu się oraz kontroli zmierzającej do jej zniszczenia.

Artykuł 2

1. Państwa Członkowskie prowadzą systematyczne urzędowe badania na obecność organizmu w bulwach oraz, w miarę potrzeby, w roślinach ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.), pochodzących z terytorium tych państw, w celu potwierdzenia nieobecności tego organizmu.

Dla tych badań, w przypadku bulw, mogą być pobierane próbki zarówno sadzoniaków, jak i innych ziemniaków, ze składowanych partii i poddanych urzędowej lub urzędowo nadzorowanej analizie laboratoryjnej z zastosowaniem metod określonych w załączniku I w celu wykrycia i zdiagnozowania tego organizmu. Dodatkowo, gdzie stosowne, można przeprowadzić urzędowe lub urzędowo nadzorowane badanie wzorkowe polegające na krojeniu bulw pochodzących z innych próbek.

W przypadku roślin, badania te przeprowadza się zgodnie z właściwymi metodami, a próbki poddaje się właściwej urzędowej lub urzędowo nadzorowanej analizie.

O liczbie, pochodzeniu, warstwowości i rozkładzie zbioru próbek decydują odpowiedzialne urzędowe organy w rozumieniu dyrektywy 77/93/EWG, w oparciu o stabilne zasady naukowe i statystyczne oraz życie biologiczne organizmu, uwzględniając określone systemy produkcji ziemniaka danych Państw Członkowskich. Dlatego szczegóły dotyczące powyższego przedkłada się corocznie innym Państwom Członkowskim i Komisji w celu osiągnięcia porównywalnych stopni pewności między Państwami Członkowskimi dla potwierdzenia nieobecności tego organizmu.

2. O wynikach urzędowych badań przewidzianych w ust. 1 powiadamia się inne Państwa Członkowskie i Komisję co najmniej raz w roku. Szczegóły tego powiadomienia są poufne. Mogą być one przedłożone Komitetowi zgodnie z procedurą ustanowioną w art. 16a dyrektywy 77/93/EWG.

3. Zgodnie z procedurą ustanowioną w art. 16a dyrektywy 77/93/EWG mogą być przyjęte następujące przepisy:

— szczegóły dotyczące badań określonych w ust. 1 powyżej, przeprowadzanych zgodnie ze stabilnymi zasadami naukowymi i statystycznymi,

— szczegóły powiadomienia określonego w ust. 2 powyżej.

4. Zgodnie z procedurą określoną w art. 16a dyrektywy 77/93/EWG mogą być przyjęte następujące przepisy:

— właściwe metody badań i analiz określone w ust. 1 akapit trzeci powyżej.

Artykuł 3

Państwa Członkowskie stanowią, że podejrzewane wystąpienie lub potwierdzona obecność organizmu w roślinach ziemniaka i bulwach lub bulwach zebranych, składowanych lub wprowadzonych do obrotu na ich terytorium zgłaszane jest właściwym organom.

Artykuł 4

1. W przypadkach podejrzewanego zakażenia, właściwe organy Państwa Członkowskiego, w którym powiadomiono o tych przypadkach, zapewniają przeprowadzenie urzędowej lub urzędowo nadzorowanej analizy laboratoryjnej, z zastosowaniem metod określonych w załączniku I i zgodnie z warunkami określonymi w załączniku II pkt 1, w celu potwierdzenia lub odrzucenia zakażenia. W razie potwierdzenia stosuje się wymagania ustanowione w załączniku II pkt 2.

2. Do momentu potwierdzenia lub odrzucenia zakażenia zgodnie z ust. 1, w przypadkach podejrzanych gdzie:

- i) widoczne są podejrzane, diagnostyczne objawy choroby; lub
- ii) uzyskuje się pozytywne wyniki testu immunofluorescencyjnego określonego w załączniku I lub inne właściwe pozytywne testy;

właściwe organy Państw Członkowskich:

- a) zakazują przemieszania wszelkich partii lub przesyłek, z których pobrano próbki, z wyjątkiem przemieszania pod ich kontrolą i pod warunkiem że ustalono, iż nie istnieje możliwe do identyfikacji ryzyko rozprzestrzenienia się organizmu;
- b) podejmują kroki w celu określenia pochodzenia podejrzanego wystąpienia;
- c) wprowadzają właściwe dodatkowe środki ostrożności oparte o poziom oszacowanego ryzyka w celu zapobieżenia jakiegokolwiek rozprzestrzenieniu się organizmu. Środki te mogą obejmować urzędową kontrolę przemieszczania wszelkich innych bulw lub roślin wewnątrz lub poza zagrożonymi obiektami.

3. Zgodnie z procedurą ustanowioną w art. 16a dyrektywy 77/93/EWG, mogą być przyjęte następujące przepisy:

— środki określone w ust. 2 lit. c) powyżej.

4. Zgodnie z procedurą ustanowioną w art. 16a dyrektywy 77/93/EWG przyjmuje się następujące przepisy:

— inne właściwe analizy określone w ust. 2 ii) powyżej.

Artykuł 5

1. Jeśli urzędowa lub urzędowo nadzorowana analiza laboratoryjna z zastosowaniem metod podanych w załączniku I potwierdza obecność organizmu w próbkach bulw, roślin lub części roślin, właściwe organy Państwa Członkowskiego, uwzględniając przyjęte zasady naukowe, życie biologiczne organizmu i poszczególne systemy produkcji, handlu i wprowadzania do obrotu w tym Państwie Członkowskim:

- a) określają jako skażone bulwy lub rośliny, przesyłkę i/lub partię oraz maszynę, pojazd, statek, skład lub ich jednostki oraz wszelkie inne przedmioty łącznie z opakowaniami, z których pobrana była próbka oraz, w miarę potrzeby, miejsce(-a) produkcji i pole(-a), z których bulwy lub rośliny zostały zebrane;
- b) ustalają, biorąc pod uwagę przepisy załącznika III pkt 1, zasięg prawdopodobnego skażenia poprzez kontakt przed lub po zbiorze lub w cyklu produkcyjnym z określonym skażeniem;
- c) wyznaczają granice strefy na podstawie określenia skażenia zgodnie z lit. a), ustalenia rozmiaru prawdopodobnego skażenia zgodnie z lit. b) oraz możliwego rozprzestrzenienia się organizmu, uwzględniając przepisy załącznika III pkt 2.

2. Państwa Członkowskie niezwłocznie powiadamiają inne Państwa Członkowskie i Komisję, zgodnie z przepisami załącznika III pkt 3, o jakimkolwiek skażeniu określonym w ust. 1 lit. a) oraz podają szczegóły dotyczące rozgraniczenia strefy zgodnie z ust. 1 lit. c).

Szczegóły dotyczące tego powiadomienia są poufne. Mogą być one przedłożone Komitetowi zgodnie z procedurą ustanowioną w art. 16a dyrektywy 77/93/EWG.

3. W wyniku powiadomienia zgodnie z ust. 2 i elementów w nim podanych, inne Państwa Członkowskie wyszczególnione w tym powiadomieniu, o ile jest to właściwe, określają skażenie, rozmiar prawdopodobnego skażenia i wyznaczają granice strefy, zgodnie odpowiednio z ust. 1 lit. a), b) i c).

Artykuł 6

Państwa Członkowskie stanowią, że gdy skażenie bulw lub roślin zostają określone zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a), przeprowadza się badania ziemniaków, które są genetycznie powiązane z ziemniakami uznanymi za skażone. Analizy przeprowadza się na takich bulwach lub roślinach, które są konieczne do ustalenia prawdopodobnego pierwotnego źródła infekcji i rozmiaru prawdopodobnego skażenia w celu oceny stopnia ryzyka.

W wyniku testów, dalsze wyznaczanie skażenia, określanie zasięgu prawdopodobnego skażenia i wyznaczenie granic strefy, o ile jest to właściwe, przeprowadza się zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a), b) i c).

Artykuł 7

1. Państwa Członkowskie stanowią, że bulwy lub rośliny określone jako skażone zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a), nie mogą być sadzone i że pod kontrolą właściwych organów:

- niszczy się je, lub
- pozbywa się ich w inny sposób, z zastrzeżeniem urzędowo nadzorowanego środka (środków), zgodnie z przepisami załącznika IV pkt 1, pod warunkiem że ustalono, iż nie istnieje możliwe do identyfikacji ryzyko rozprzestrzenienia się organizmu.

2. Państwa Członkowskie stanowią, że bulwy lub rośliny określone jako skażone zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. b), nie mogą być sadzone i bez uszczerbku dla wyniku analizy określonej w art. 6 dotyczącej materiału matecznego, pod kontrolą właściwych organów oddaje się je do odpowiedniego użycia lub pozbywa się ich zgodnie z załącznikiem IV pkt 2, w taki sposób, aby nie istniało możliwe do identyfikacji ryzyko rozprzestrzenienia się organizmu.

3. Państwa Członkowskie stanowią, że maszyna, pojazd, statek, skład lub ich jednostki oraz wszelkie inne przedmioty łącznie z opakowaniami określone jako skażone zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a) lub określone jako prawdopodobnie skażone zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. b), są niszczone lub czyszczone i dezynfekowane z zastosowaniem właściwych metod jak określono w załączniku IV pkt 3. Po dezynfekcji, żaden z tych przedmiotów nie jest dłużej uznawany za skażony.

4. Bez uszczerbku dla środków wprowadzonych w życie zgodnie z ust. 1, 2 i 3, Państwa Członkowskie stanowią, że w strefie rozgraniczonej zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. c), wprowadza się w życie serie środków, jak określono w załączniku IV pkt 4.

Artykuł 8

1. Państwa Członkowskie stanowią, że sadzeniaki muszą spełniać wymagania dyrektywy 77/93/EWG oraz pochodzić w prostej linii z materiału uzyskanego zgodnie z urzędowo

zatwierdzonym programem i uznanego za wolny od tego organizmu na podstawie urzędowej lub urzędowo kontrolowanej analizy z zastosowaniem metody określonej w załączniku I.

Wyżej wymienioną analizę przeprowadza się:

- w przypadkach, gdy skażenie dotyka produkcji sadzeniaka, na roślinach w stadium początkowej selekcji genetycznej,
- w innych przypadkach, na roślinach w stadium początkowej selekcji genetycznej lub reprezentatywnych próbkach materiału matecznego ziemniak lub wcześniejszego materiału rozmnożeniowego.

2. Zgodnie z procedurą podaną w art. 16a dyrektywy 77/93/EWG, mogą być przyjęte następujące przepisy:

- szczegółowe zasady stosowania art. 16a ust. 1 akapit drugi tiret pierwsze,
- zasady dotyczące reprezentatywnych próbek określone w art. 16a ust. 1 akapit drugi tiret drugie.

Artykuł 9

Państwa Członkowskie zakazują przetrzymywania i przetwarzania organizmu.

Artykuł 10

Bez uszczerbku dla przepisów dyrektywy 77/93/EWG, Państwa Członkowskie mogą zatwierdzić odstępstwa od środków określonych w art. 6, 7 i 9 niniejszej dyrektywy do celów doświadczalnych lub naukowych oraz dla prac nad selekcją odmian, pod warunkiem że takie odstępstwa nie naruszają kontroli organizmu i nie tworzą ryzyka rozprzestrzenienia się organizmu.

Artykuł 11

Państwa Członkowskie mogą przyjąć takie dodatkowe lub zaostrzone środki, jakie mogą być wymagane do zwalczania organizmu lub do zapobieżenia jego rozprzestrzenieniu się, o ile są one zgodne z przepisami dyrektywy 77/93/EWG.

Dodatkowe środki wymienione w akapicie pierwszym mogą zawierać warunek, że tylko sadzeniaki, które są urzędowo zatwierdzone lub urzędowo kontrolowane dla sprawdzenia czy spełniają one normy zdrowia roślin mogą być sadzone. Ostatni warunek może mieć zastosowanie w szczególności w przypadku gdy rolnicy są upoważnieni do używania, w swoich własnych gospodarstwach rolnych, sadzeniaków uzyskanych z ich własnych zbiorów plonów oraz w innych przypadkach, gdy sadzone są sadzeniaki pochodzące z własnej produkcji.

Inne Państwa Członkowskie i Komisja powiadamiane są o szczegółach tych środków.

Artykuł 12

Zmiany załączników do niniejszej dyrektywy, których dokonuje się w świetle rozwoju wiedzy naukowej i technicznej, przyjmuje się zgodnie z procedurą ustaloną w art. 16a dyrektywy 77/93/EWG.

Artykuł 13

1. Do dnia 15 listopada 1993 r. Państwa Członkowskie przyjmą i opublikują przepisy niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy i niezwłocznie powiadomią o tym Komisję.

Przepisy przyjęte przez Państwa Członkowskie zawierają odniesienie do niniejszej dyrektywy lub odniesienie takie towarzyszy ich urzędowej publikacji. Metody dokonywania takiego odniesienia określane są przez Państwa Członkowskie.

Państwa Członkowskie stosują niniejsze przepisy od dnia 16 listopada 1993 r.

2. Państwa Członkowskie niezwłocznie przekażą Komisji wszystkie przepisy prawa krajowego przyjęte w dziedzinach objętych niniejszą dyrektywą. Komisja informuje o tym pozostałe Państwa Członkowskie.

Artykuł 14

Dyrektywa 80/665/EWG traci moc z dniem 16 listopada 1993 r.

Artykuł 15

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Luksemburgu, dnia 4 października 1993 r.

W imieniu Rady

W. CLAES

Przewodniczący

ZAŁĄCZNIK I

METODA WYKRYWANIA I DIAGNOZOWANIA BAKTERIOZY PIERŚCIENIOWEJ ZIEMNIAKA *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (Smith) Davis et al. ssp. *SEPEDONICUS* (Spieckermann et Kotthof) Davis et al. W PARTIACH BULW ZIEMNIAKA**1. Pobieranie rdzeni części przystolonowych**

- 1.1. Umyć 200 bulw pod wodą bieżącą i usunąć skórkę wokół piętki każdej bulwy, posługując się każdorazowo dezynfekowanym skalpelem lub skrobaczką do ziemniaków; narzędzia można dezynfekować przez zanurzenie w 70 % alkoholu etylowym i opalenie.
- 1.2. Za pomocą noża lub skrobaczki do ziemniaków wyciąć ostrożnie z piątek tkankę rdzenia w postaci stożka. Nadmiar tkanki innej niż przewodząca ograniczyć do minimum. Po pobraniu tkanki piątek należy poddać ją badaniom w ciągu 24 godzin (patrz ust. 3) lub przechowywać w temperaturze -20 °C, nie dłużej jednak niż dwa tygodnie.

2. Badanie wzrokowe na obecność objawów bakteriozy pierścieniowej

Po usunięciu piątek każdą bulwę przekroić poprzecznie i zbadać na obecność objawów bakteriozy pierścieniowej ziemniaka.

Ścisnąć bulwę i sprawdzić, czy z wiązek przewodzących nie wydostają się zmacerowane tkanki.

Do najwcześniejszych objawów, obserwowanych szczególnie w pobliżu piątek, należą nieznaczna szklistość lub przejrzystość tkanek, bez rozmiękczenia wokół wiązek przewodzących. Pierścień wiązek przewodzących w piętce może być nieznacznie ciemniejszy niż normalnie. Pierwszym łatwym do rozpoznania objawem jest przebarwienie pierścienia wiązek przewodzących na żółtawo. Po lekkim ściśnięciu bulwy z naczyń wydostają się „słupki” serowatej masy. Wyciek ten zawiera miliony bakterii. W tym stadium można obserwować brązowienie wiązek przewodzących. Początkowo objawy te mogą być ograniczone do jednej części pierścienia, niekoniecznie w pobliżu piętki i mogą rozszerzać się stopniowo na cały pierścień. W miarę rozszerzania się infekcji dochodzi do zniszczenia wiązek przewodzących; kora zewnętrzna może oddzielać się od wewnętrznej. W zaawansowanym stadium infekcji na powierzchni bulwy pojawiają się spęknięcia, które często mają czerwonawo-brązowe brzegi. Wtórna infekcja bakteryjna czy grzybowa może maskować objawy i dlatego odróżnienie zaawansowanego stadium infekcji bakteriozy pierścieniowej od innych zgnilizn może być trudne, a nawet niemożliwe.

3. Przygotowanie prób do barwienia Grama, barwienia immunofluorescencyjnego (IF) oraz testu oberzynowego

- 3.1. Piętki homogenizować, aż do momentu uzyskania maceratu, w środku nietoksycznym dla *Corynebacterium sepedonicum* (na przykład 0,05 M bufor fosforanowy (PBS) pH 7,0), w temperaturze poniżej 30 °C; zaleca się dodanie nietoksycznego środka rozdrabniającego oraz nietoksycznego środka zapobiegającego powstawaniu piany (dodatki 1 i 2). Należy unikać nadmiernej maceracji.
- 3.2. Bakterie ekstrahować z homogenatu jedną z następujących metod ⁽¹⁾:
 - A. a) Odwirować przy obrotach nie większych niż 180 g przez 10 minut.
 - b) Płyn znad osadu odwirować przy obrotach nie mniejszych niż 4 000 g przez 10 minut. Płyn znad osadu zdekantować i usunąć.
 - B. a) Macerat odstawić na 30 minut w celu osadzenia się resztek roślinnych. Płyn znad osadu zdekantować bez naruszania osadu.
 - b) Płyn znad osadu przefiltrować przez bibułę filtracyjną (Whatman nr 1) umieszczoną na filtrze szklanym (nr 2 = 40–100 µm), z zastosowaniem wodnej pompy próżniowej. Filtrat zebrać do probówki wirówkowej. Filtr przemyć sterylnym buforem PBS do maksymalnej objętości filtratu 35 ml.
 - c) Filtrat odwirować przy obrotach nie mniejszych niż 4 000 g przez 20 minut.
- 3.3. Osad zawiesić w sterylnym buforze fosforanowym 0,01 M o pH 7,2 (dodatek 2) do całkowitej objętości około 1 ml. Podzielić na dwie równe części, jedną z nich pozostawić jako odniesienie zamrażając w temperaturze -20 °C ⁽²⁾ lub liofilizując. Pozostałą część podzielić na połowę, jedną użyć do testu IF i barwienia Grama, drugą do testu oberzynowego.

⁽¹⁾ Alternatywną metodę ekstrakcji podaje Dinesen, 1984 r.

⁽²⁾ Istnieje dowód na to (Janse i Vaerenbergh, 1987 r.), że zamrażanie może obniżyć żywotność *Corynebacterium sepedonicum*. Problemu tego można uniknąć zawieszając osad w 10 % glicerolu.

- 3.4. Istotne jest, że wszystkie pozytywne kontrole *C. sepedonicum* i próbki traktuje się oddzielnie w celu uniknięcia kontaminacji. Odnosi się to do preparatów IF oraz testu oberzynowego.
4. *Barwienie Grama*
- 4.1. Przygotować preparaty Grama ze wszystkich rozcieńczeń osadu (5.2.1.) i ze wszystkich bulw (2), które na przekroju wykazują szklistość, zgniliznę czy inne podejrzone objawy. Próbkę należy pobierać z brzegu porażonych chorobą tkanek.
- 4.2. Przygotować preparaty Grama z określonej kultury *C. sepedonicum* oraz, w miarę możliwości, z naturalnie zarażonych tkanek (5.1.).
- 4.3. Ustalić, które próbki zawierają typowe, gramodatnie maczugowate komórki. Komórki *C. sepedonicum* mają długość 0,8 do 1,2 μm i szerokość 0,4 do 0,6 μm .

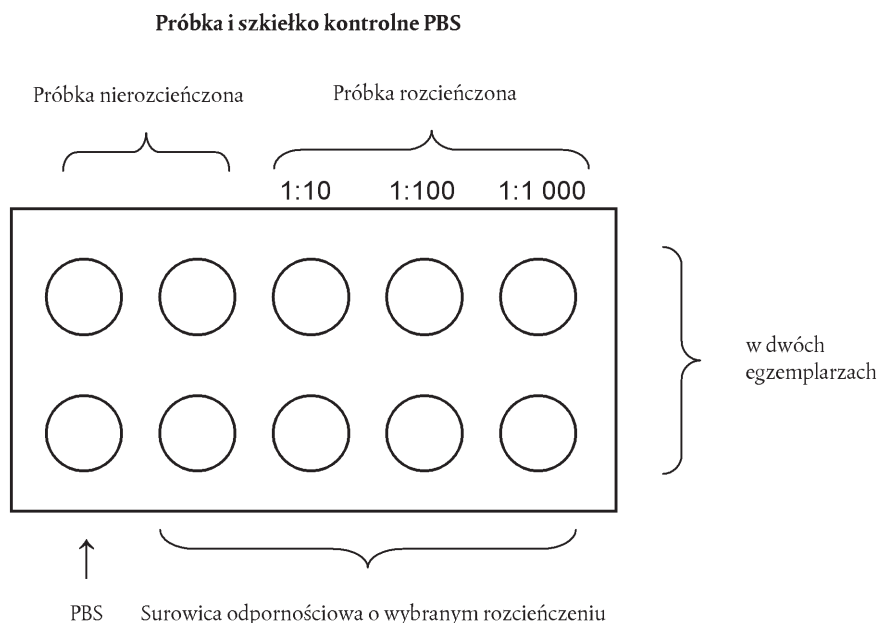
Właściwa procedura barwienia jest podana w dodatku 3.

Preparaty z naturalnie zarażonych tkanek lub świeżo wyizolowanych kultur wykazują często dominację kokoidalnych pałeczek, które są zwykle nieznacznie mniejsze niż komórki starszych kultur wyhodowanych na agarze. Na większości podłoży hodowlanych komórki *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* są pleomorficznymi, maczugowatymi pałeczkami i mogą wykazywać zmienność w reakcji Grama. Komórki występują pojedynczo, układają się w pary z charakterystycznym wygięciem, co ma związek z ich podziałem, czasami tworzą nieregularne grupy przypominające palisady lub chińskie litery.

5. Schemat testu IF

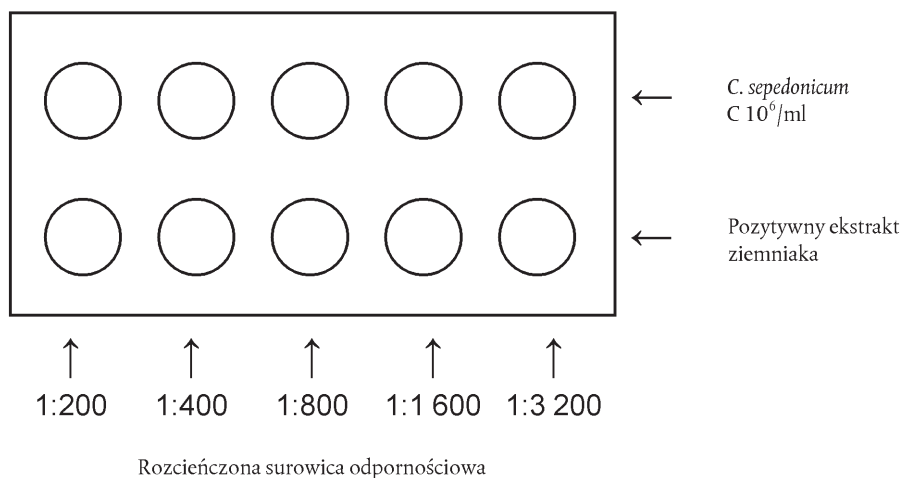
- 5.1. Stosować surowicę na określony szczep *C. sepedonicum* - ATCC 33113 (NCPBP 2137) lub NCPBP 2140. Powinna ona posiadać miano roztworu IF powyżej 1:600. W preparacie testowym uwzględnić kontrolę PBS w celu sprawdzenia, czy koniugat izotiocyanianu fluoresceiny przeciw immunoglobulinom króliczym (FITC) nie łączy się niespecyficznie z komórkami bakterii. Na oddzielnym szkiełku należy zastosować kulturę *Corynebacterium sepedonicum* (ATCC 33113 (NCPBP 2137) lub NCPBP 2140) jako kontrolę homologicznego antygeny. W miarę możliwości, jako podobną kontrolę na to samo szkiełko należy nanieść naturalnie zainfekowane tkanki (zachowane w formie zliofilizowanej lub zamrożone w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) (rysunek 2).
- 5.2. *Procedura*
- 5.2.1. Przygotować trzy seryjne dziesięciokrotne rozcieńczenia (10^1 , 10^2 , 10^3) ostatecznego osadu w wodzie destylowanej (rysunek 1).
- 5.2.2. Na okienka wielopunktowego szkiełka nanieść za pomocą pipety odmierzoną standardową objętość każdego rozcieńczenia osadu lub zawiesiny *C. sepedonicum* (średnio 10^1 komórek/ml), wystarczającą do pokrycia okienka (średnio 25 μl), jak pokazano na rysunku 1.

Rysunek 1



Rysunek 2

Pozytywne szkiełko kontrolne



- 5.2.4. Właściwe okienka pokryć surowicą na *C. sepedonicum* rozcieńczoną według zaleceń 0,01 M PBS o pH 7,2 (dodatek 2), jak pokazano na rysunku 1. (Użyć PBS jako kontrolę FITC). Rozcieńczenie robocze surowicy powinno stanowić średnio połowę miana roztworu IF. Jeśli mają być uwzględnione inne rozcieńczenia surowicy, dla każdego rozcieńczenia należy przygotować oddzielne preparaty.
- 5.2.5. Inkubować w wilgotnej kamerze w temperaturze otoczenia przez 30 minut.
- 5.2.6. Spłukać ostrożnie 0,01 M PBS o pH 7,2. Moczyć trzy razy po 5 minut w 0,01 M PBS o pH 7,2.
- 5.2.7. Ostrożnie usunąć nadmiar wilgoci.
- 5.2.8. Każde okienko pokryć koniugatem FITC w takim rozcieńczeniu, jakie było stosowane do określania miana roztworu i inkubować w ciemnej, wilgotnej kamerze w temperaturze otoczenia, przez 30 minut.
- 5.2.9. Spłukać i moczyć jak poprzednio.
- 5.2.10. Na każde okienko nanieść średnio 5 do 10 μ l 0,1 M buforu fosforanowo-glicerynowego o pH 7,6 (lub podobny utrwalacz o pH nie niższym niż 7,6) i przykryć szkiełkiem nakrywkowym (dodatek 2).
- 5.2.11. Przeglądać w mikroskopie zaopatrzonym w źródło światła epifluorescencyjnego i filtry odpowiednie do pracy z FITC. Właściwe jest powiększenie 400 do 1 000. Okienka powtórzeń przeglądać w poprzek dwóch średnic pod kątem prostym oraz wokół obwodu okienka.

Poszukać fluoryzujących komórek w kontrolach pozytywnych i określić miano roztworu. Szukać fluoryzujących komórek w okienku kontrolnym FITC/PBS i, jeśli ich brak, przejść do przeglądania okienek z badaną próbką. W minimum 10 polach mikroskopu określić średnią liczbę morfologicznie typowych, fluoryzujących komórek w polu widzenia i obliczyć ich ilość w mililitrze nierozcieńczonego osadu (dodatek 4).

Z testem immunofluorescencji związanych jest kilka problemów.

- Istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia w osadzie z ziemniaka populacji fluoryzujących komórek o nietypowej morfologii oraz dających reakcje krzyżowe bakterii saprofitycznych, o wymiarach i morfologii podobnych do *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, widocznych w tle obrazu mikroskopowego. Należy brać pod uwagę tylko fluoryzujące komórki o typowych wymiarach i morfologii.

Ze względu na możliwość występowania reakcji krzyżowych, próbki w przypadku których uzyskano pozytywne wyniki testu immunofluorescencyjnego powinny być poddane powtórnym badaniom z zastosowaniem innej surowicy.

- Techniczna granica wykrywalności w tej metodzie zawiera się w granicach 10^5 - 10^6 komórek na mililitr nierozcieńczonego osadu. Próby, w których stwierdza się ilość typowych komórek IF na granicy wykrywalności, są zwykle wolne od *C. m. ssp. sepedonicus*, ale mogą być poddane testowi oberzynowemu.

Negatywne wyniki testu immunofluorescencyjnego uzyskuje się w odniesieniu do każdej próbki, w której nie stwierdza się morfologicznie typowych fluoryzujących komórek. Próbki takie należy uznać za „nieskażone” przez *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Test oberżynowy nie jest wymagany.

pozytywny wynik testu immunofluorescencyjnego stwierdza się w przypadku próbek, w których obecne są morfologicznie typowe, fluoryzujące komórki.

Próbki, w przypadku, których określa się jako pozytywny wynik testu immunofluorescencyjnego z zastosowaniem obydwu surowic, powinny być uznane za „potencjalnie skażone” przez *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

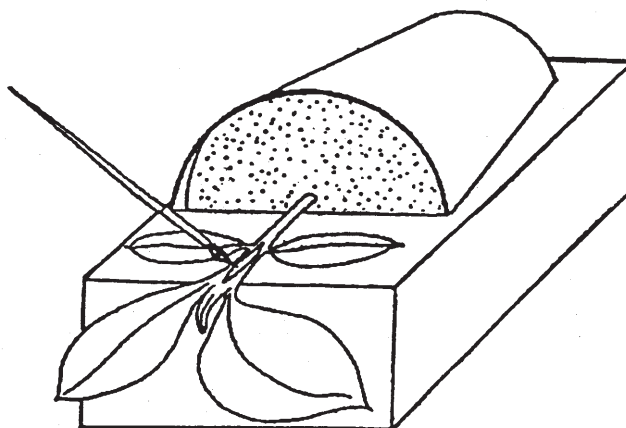
Test oberżynowy jest wymagany dla wszystkich próbek uznanych za potencjalnie skażone.

6. Test oberżynowy

Szczegóły uprawy, patrz dodatek 5.

- 6.1. Rozdzielić osad z pkt 3.3., między co najmniej 25 roślin oberżyny w stadium 3 liści (dodatek 5), za pomocą jednej z metod podanych poniżej (6.2., 6.3. lub 6.4.).
- 6.2. *Inokulacja poprzez nacięcie na łodydze I*
 - 6.2.1. Każdą doniczkę umieścić poziomo (dla doniczki o średnicy 10 cm odpowiedni jest bloczek z polistyrenu z wydrążonym z jednej strony miejscem o głębokości 5 cm, szerokości 10 cm i długości 15 cm (rysunek 3)). Między łodygą a bloczkiem, dla każdej badanej próbki, należy umieścić pasek sterylnej folii aluminiowej. Roślinę można przytrzymać w miejscu za pomocą gumowej opaski nałożonej wokół bloczka.
 - 6.2.2. Za pomocą skalpela, między liścieniami i pierwszym liściem, wykonać podłużne lub lekko ukośne nacięcie o długości 0,5–1,0 cm i głębokości średnio trzy czwarte średnicy łodygi.
 - 6.2.3. Trzymając szparę otwartą za pomocą końca ostrza skalpela, wprowadzić do niej inokulum delikatnym pędzelkiem zamoczonym w osadzie. Pozostały osad rozdzielić między rośliny oberżyny.
 - 6.2.4. Ranę zabezpieczyć sterylną wazeliną z 2 ml strzykawki.

Rysunek 3



- 6.3. *Inokulacja poprzez nacięcie na łodydze II*
 - 6.3.1. Trzymając roślinę między dwoma palcami, nanieść na łodygę kroplę (średnio 5 do 10 ml) zawiesiny osadu w miejscu między liścieniami i pierwszym liściem.
 - 6.3.2. Za pomocą sterylnego skalpela wykonać podłużne (pod kątem około 5°) nacięcie, o długości 1,0 cm i głębokości średnio 2/3 grubości łodygi, rozpoczynając od miejsca naniesienia kropli osadu.
 - 6.3.3. Ranę zabezpieczyć sterylną wazeliną ze strzykawki.
- 6.4. *Inokulacja za pomocą strzykawki*
 - 6.4.1. Nie podlewać roślin oberżyny przez jeden dzień przed inokulacją w celu obniżenia ciśnienia turgorowego.

- 6.4.2. Inokulować łodygi oberżyny poniżej liścieni za pomocą strzykawki z igłą do iniekcji podskórnej (nie mniejszej niż 23 G). Osad rozdzielić między rośliny oberżyny.
- 6.5. Inokulować 25 roślin określoną kulturą *C. sepedonicum* i, w miarę możliwości, naturalnie zarażoną tkanką ziemniaka (5.1.), za pomocą tej samej metody inokulacji (6.2., 6.3. lub 6.4.).
- 6.6. Inokulować 25 roślin sterylnym 0,05 M PBS za pomocą tej samej metody inokulacji (6.2., 6.3. lub 6.4.).
- 6.7. Rośliny inkubować we właściwych warunkach (dodatek 5) przez 40 dni. Po ośmiu dniach regularnie badać na obecność objawów. Policzyć rośliny wykazujące objawy. *C. sepedonicum* powoduje wędnięcie liści oberżyny, które może rozpoczynać się od brzegowego lub międzynerwowego wiotczenia. Zwiędnięte tkanki mogą być początkowo ciemnozielone lub plamiste, lecz zanim ulegną nekrozie stają się jaśniejsze. Wędnące tkanki między nerwami są często uwodnione. Tkanki nekrotyczne mają często jasnożółty brzeg. Rośliny nie zawsze zamierają; im dłuższy okres poprzedzający wystąpienie objawów, tym większa szansa na przeżycie. Rośliny mogą pokonać infekcję. Podatne, młode rośliny oberżyny są bardziej wrażliwe na *C. sepedonicum* o niskiej populacji niż rośliny starsze, stąd konieczność stosowania roślin w stadium 3 liści lub nieco młodszych.

Sprawcą wędnięcia mogą być również populacje innych bakterii lub grzybów zasiedlających tkanki bulwy. Do nich należą *Erwinia carotovora*, subsp. *carotovora* i *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata*, jak również duże populacje bakterii saprofitycznych. Tego typu wędnięcie można łatwo odróżnić od powodowanego przez *C. sepedonicum*, ponieważ w pierwszym przypadku gwałtownie wędną całe liście lub całe rośliny.

- 6.8. Przygotować preparaty Grama (4) dla wszystkich partii oberżyny wykazujących objawy, wykorzystując do tego przekroje przez tkankę zwiędniętego liścia lub łodygi rośliny oraz dokonać izolacji na odpowiednim podłożu odżywczym (7). Liście i łodygi oberżyny zdezynfekować powierzchniowo poprzez przetarcie 70 % alkoholem etylowym.
- 6.9. W niektórych okolicznościach, w szczególności, gdy warunki uprawy nie są optymalne, istnieje możliwość występowania *C. sepedonicum* jako infekcji latentnej w oberżynie, nawet po 40-dniowej inkubacji. Infekcje takie mogą prowadzić do zahamowania wzrostu i braku wigoru inokulowanych roślin. Jeśli wynik testu IF uznany jest jako pozytywny, może być konieczne przeprowadzenie dalszych analiz. Dlatego też istotne jest dokonanie porównania tempa wzrostu wszystkich badanych roślin oberżyny z roślinami kontrolnymi inokulowanymi sterylnym 0,05 M PBS oraz sprawdzenie warunków środowiska w szklarni.

Zalecenia dotyczące dalszych analiz są następujące:

- 6.9.1. odciąć łodygi powyżej miejsca inokulacji i usunąć liście;
- 6.9.2. łodygi zmacerować w 0,05 M PBS o pH 7,0, jak w pkt 3.1.-3.2.;
- 6.9.3. połowę osadu użyć do wykonania barwienia Grama (4) i testu IF (5);
- 6.9.4. drugą połowę użyć do przeprowadzenia dalszego testu oberżynowego (6), jeśli uzyska się wyniki pozytywne barwienia Grama i/lub testu IF.

7. Izolacja *C. sepedonicum*

Diagnozę można potwierdzić tylko wówczas, gdy dokona się izolacji i identyfikacji *C. sepedonicum* (8). Chociaż *C. sepedonicum* jest wymagającym organizmem, można go wyizolować z tkanek wykazujących objawy chorobowe. Jednakże może on być zagłuszany przez szybciej rosnące bakterie saprofityczne i dlatego nie zaleca się bezpośredniej izolacji z osadu uzyskanego z tkanek ziemniaka (3.3.) Doskonałą selektywną pożywką wzbogacającą dla hodowli *C. sepedonicum* jest oberżyna, stanowi ona również idealną roślinę testową do badania patogenności.

Izolacji należy dokonać ze wszystkich wykazujących objawy bulw ziemniaka i roślin oberżyny (4, 6). Macerację łodyg oberżyny, o ile jest to konieczne, należy wykonać jak podano w pkt 3. i 6.9.

7.1. Zawiesinę posiać na jedno z następujących podłoży: (receptura podana jest w dodatku 6):

agar odżywczy z glukozą (tylko do przeszczepiania),

agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy,

agar odżywczy z wyciągiem drożdżowym i glukozą,

agar mineralny z ekstraktem drożdżowym.

Inkubować w temperaturze 21°C do 20 dni.

C. sepedonicum jest organizmem wolno rosnącym, zwykle wytwarza w ciągu 10 dni kremowe, wypukłe kolonie wielkości łebka od szpilki.

Przesiać w celu uzyskania czystej kultury.

Tempo wzrostu poprawia się przez przeszczepianie. Typowe kolonie są kremowo-białe, gładkie, wzniesione, wypukłe, śluzowato-płynne, całoobrzegie i zwykle mają średnicę od 1 do 3 mm.

Identyfikacja

Ze zdrowych lub porażonych chorobą ziemniaków i oberżyny można wyizolować wiele gramdodatnich, maczugowatych bakterii, wytwarzających kolonie podobne do tych produkowanych przez *C. sepedonicum*. Z tego względu trzeba dokonać identyfikacji *C. sepedonicum* w oparciu następujące testy:

test IF (5.1.),

test oberżynowy,

testy biochemiczne i fizjologiczne (dodatek 7),

— test oksydacyjno-fermentacyjny (O/F),

— test na obecność oksydazy,

— wzrost w temperaturze 37 °C,

— produkcja ureazy,

— hydroliza eskuliny,

— hydroliza skrobi,

— tolerancja w stosunku do 7 % roztworu chlorku sodu,

— produkcja indolu,

— test na obecność katalazy,

— produkcja H₂S,

— wykorzystanie cytrynianu,

— hydroliza żelatyny,

— wytwarzanie kwasu z: glicerolu, laktozy, ramnozy i salicyny,

— barwienie Grama.

W każdym teście należy uwzględnić określoną kontrolę *C. sepedonicum*. W testach biochemicznych i fizjologicznych należy wykorzystywać kultury wyhodowane na agarze odżywczym. Porównania morfologiczne wykonuje się na kulturach wyrosłych na agarze odżywczym z glukozą.

W teście IF populację komórek należy ustalić na poziomie 10¹ komórek/ml. Miano roztworu IF powinno być podobne do uzyskanego w przypadku określonej kultury *C. sepedonicum*.

W teście oberżynowym populację komórek należy ustalić na poziomie 10² komórek/ml. W testach oberżynowych należy stosować 10 roślin dla każdego badanego organizmu, stosując kontrole w postaci określonej kultury *C. sepedonicum* oraz sterylnej wody; w przypadku czystych kultur typowe objawy więdnienia uzyskuje się w ciągu 20 dni, lecz rośliny niewykazujące objawów po upływie tego czasu należy inkubować do końca 30-dniowego okresu w temperaturze korzystnej dla uprawy oberżyny, lecz nieprzekraczającej 30 °C (dodatek 5). Jeśli po 30 dniach objawy nie wystąpią, kultura nie może być uznana za patogeniczną formę *Corynebacterium sepedonicum*.

Test	C. sepedonicum
O/F	Obojętna lub słabo utleniająca
Oksydaza	-
Kataliza	+
Redukcja azotanów	-
Aktywność urazy	-
Produkcja H ₂ S	-
Produkcja indolu	-
Wykorzystanie cytrynianu	-
Hydroliza skrobi	- lub słaba
Wzrost w temperaturze 37 °C	-
Wzrost w obecności 7 % NaCl	-
Hydroliza żelatyny	-
Hydroliza eskuliny	+
Produkcja kwasu z:	
- Glicerolu	-
- Laktozy	- lub słaba
- Ramnozy	-
- Salicyny	-

Dodatek 1

SKŁAD PŁYNU DO MACERACJI WEDŁUG LELLIOTTA I SELLARA, 1976 r.

D C silicone antifoam MS A compound (Hopkins & Williams Ltd, Cat. nr 9964-25, Chadwell Heath, Essex, England) - środek przeciwpieniący	10 ml
Lubrol w płatkach (ICI Ltd)	0,5 g
Pirofosforan czterosodowy	1 g
0,05 M bufor fosforanowy pH 7,0 (dodatek 2)	1 litr

Dodatek 2

BUFORY

0,05 M bufor fosforanowy pH 7,0

Bufer stosowany do maceracji tkanek ziemniaka (2.1)

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
NaCl	8,0 g
Woda destylowana do	1 litr

0,01 M bufor fosforanowy pH 7,6

Bufer stosowany do rozcieńczania surowic i płukania preparatów w metodzie IF.

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
Woda destylowana do	1 litr

0,1 M bufor fosforanowo-glicerynowy pH 7,6

Bufer stosowany do rozcieńczania surowic i płukania preparatów w metodzie IF.

Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ 2 H ₂ O	0,15 g
Glicerol	50 ml
Woda destylowana	100 ml

Dodatek 3

METODA BARWIENIA GRAMA (MODYFIKACJA HUCKERA) (DOETSCH, 1981 R.)**Roztwór fioletu krystalicznego**

2 g fioletu krystalicznego rozpuścić w 20 ml 95 % alkoholu etylowego

0,8 g kwaśnego węglanu sodu rozpuścić w 80 ml wody destylowanej.

Zmieszać obydwie roztwory.

Płyn Lugola

Jod	1 g
Jodek potasu	2 g
Woda destylowana	300 ml

Substancje stałe rozdrobnić razem w moździerzu. Dodać wodę i wymieszać w zamkniętym pojemniku do rozpuszczenia.

Roztwór barwnika kontrastowego - safraniny

Roztwór podstawowy:

Safranina O	2,5 g
95 % alkoholu etylowego	100 ml

Zmieszać i składować.

W celu uzyskania roztworu roboczego rozcieńczyć w stosunku 1:10.

Procedura barwienia

1. Przygotować rozmaz, wysuszyć na powietrzu i utrwalić termicznie.
2. Preparat zalać fioletem krystalicznym na jedną minutę.
3. Szybko przepłukać wodą z kranu.
4. Zalać płynem Lugola na jedną minutę.
5. Przepłukać wodą z kranu i osuszyć bibułą.
6. Odbarwiać 95 % alkoholem etylowym dodawanym kroplami aż do momentu, gdy rozmaz przestanie uwalniać barwnik lub zanurzyć w alkoholu na 30 sekund lekko poruszając preparatem.
7. Przepłukać wodą z kranu i osuszyć bibułą.
8. Zalać roztworem safraniny na 10 sekund.
9. Przepłukać wodą z kranu i osuszyć bibułą.

Bakterie gram-dodatnie barwią się na kolor niebiesko-fioletowy, bakterie gram-ujemne na różowo-czerwony.

Dodatek 4

**OKREŚLANIE POPULACJI KOMÓREK BARWIĄCYCH SIĘ DODATNIO W TEŚCIE IMMUNOFLUORESCEN-
CYJNYM**

Powierzchnia (S) okienka na szkiełku wielopunktowym

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

Gdzie D = średnica okienka.

Powierzchnia s) pola widzenia obiektywu

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

gdzie d = średnica pola widzenia.

Określić d zarówno na podstawie bezpośredniego pomiaru, jak i według następującego wzoru:

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

gdzie i = współczynnik pola (zależy od typu okularu i zawiera się w granicach od 8 do 24),

K = współczynnik tubusa (1 lub 1,25),

G = powiększenie 100x, 40x itd. obiektywu,

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

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

Określić liczbę typowych fluoryzujących komórek w polu widzenia c).

Określić liczbę typowych fluoryzujących komórek w okienku (C).

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

Określić ilość typowych fluoryzujących komórek w ml osadu (N)

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

gdzie y = objętość osadu naniesionego na okienko,

gdzie F = współczynnik rozcieńczenia osadu.

Dodatek 5

UPRAWA OBERŻYNY

Nasiona oberżyny (*Solanum melongena* cv. Black Beauty) wysiać do pasteryzowanego kompostu stosowanego dla nasion. Siewki z pełni rozwiniętymi liścieniami (10 do 14 dni) przesadzić do pasteryzowanego kompostu doniczkowego.

Do badań używać oberżynę w stadium 3 liści, gdy dwa, lecz nie więcej niż trzy liście są w pełni rozwinięte.

Oberżynę należy hodować w szklarni w następujących warunkach środowiska:

długość dnia: 14 godzin lub naturalna długość dnia, w przypadku dnia dłuższego;

temperatura: dzień: 21–24 °C,

noc: 15 °C.

Uwaga: *C. sepedonicum* nie rośnie w temperaturach >30 °C. Jeżeli temperatura nocą nie spada do 15 °C, może wystąpić uszkodzenie chromatoforów (srebrzystość).

Uszkodzeniom korzeni przez larwy ziemiórek można zapobiec przez zastosowanie odpowiedniego insektycydu.

Nasiona oberżyny cv. Black Beauty można uzyskać:

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

Dodatek 6

PODŁOŻA DO HODOWLI I IZOLACJI C. SEPEDONICUM**Agar odżywczy (NA)**

Agar odżywczy (prod. Difco bacto) rozpuścić w wodzie destylowanej według proporcji podanych przez producenta. Sterylizować w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut.

Agar odżywczy z glukozą (NDA)

Agar odżywczy z glukozą (prod. Difco bacto) zawierający 1 % D(+) glukozy (monohydrat). Sterylizować w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 20 minut.

Agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy (YPGA)

Wyciąg drożdżowy (prod. Difco bacto) (nr 0127)	5 g
Pepton (prod. Difco bacto) (nr 0118)	5 g
D (+) - glukoza (monohydrat)	10 g
Agar oczyszczony (prod. Difco bacto) (nr 0560)	15 g
Woda destylowana	1 litr

Pożywkę o objętości 0,5 litra sterylizować w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 20 minut.

Pożywka mineralna z wyciągiem drożdżowym (YGM)

Wyciąg drożdżowy (prod. Difco bacto)	2,0 g
D(+) - glukoza (monohydrat)	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
Agar oczyszczony (prod. Difco bacto)	18 g
Woda destylowana	1 litr

Pożywkę o objętości 0,5 litra sterylizować w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 20 minut.

Dodatek 7

BIOCHEMICZNE I FIZJOLOGICZNE TESTY DO IDENTYFIKACJI C. SEPEDONICUM

Wszystkie podłoża powinny być inkubowane w temperaturze 21 °C i przeglądane po sześciu dniach. W przypadku braku wzrostu, inkubować dalej do 20 dni.

— Test oksydacyjno-fermentacyjny (Hugh i Leifson, 1953 r.) - test O/F.

Podłoże podstawowa:

KCl	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ H ₂ P04	1,0 g
Pepton (prod. Difco bacto)	1,0 g
Agar oczyszczony (prod. Difco bacto)	3,0 g
D(+) glukoza (monohydrat)	10,0 g
Błękit bromotymolowy	0,03 g
Woda destylowana	1 litr

Zmieszać i ustalić pH na poziomie 7,0–7,2 za pomocą 1N KOH.

Rozdzielić po 5 ml i 10 ml do probówek bakteryjnych o wymiarach 16 mm x 100 mm (objętość 12 ml).

Sterylizować w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 10 minut.

Każdą kulturą inokulować podłoże w 5 ml i 10 ml probówkach metodą nakłucia. Do probówki 10 ml dodać aseptycznie 1–2 ml sterylnej, ciekłej parafiny. Inkubować.

Reakcja pozytywna:

Probówka	Kolor	Interpretacja
Otwarta	Żółty	Fermentacyjny
Zamknięta	Żółty	
Otwarta	Żółty	Oksydacyjny
Zamknięta	Niebiesko - zielony	
Otwarta	Zielonkawy	Oksydacyjny lub obojętny
Zamknięta	Niebiesko - zielony	

— Test na obecność oksydazy (Kovacs, 1956 r.)

Odczynnik Kovacs:

1 % roztwór dichlorowodorek tetrametyloparafenylenodiaminy (BDH nr 30386) w wodzie destylowanej.

Odczynnik ten powinien być świeżo sporządzony w objętościach 1 ml lub może być przechowywany w ciemnej, szklanej butelce w temperaturze 5 °C przez 1–4 tygodni.

Kroplę odczynnika nanieść na bibułę filtracyjną w czystej szalce Petriego. Niezwłocznie pobrać badaną kulturę z agaru odżywczego za pomocą platynowej ezy.

Reakcja pozytywna: pojawienie się purpurowego zabarwienia w ciągu 10 sekund. Reakcja taka uzyskana w ciągu 10–30 sekund daje wynik słabo dodatni.

Uwaga: Istotne jest stosowanie platynowej ezy i kultur z agaru odżywczego, gdyż śladowe ilości żelaza lub duża zawartość cukru w podłożu wzrostowym może wpływać fałszywie na pozytywne wyniki.

— Produkcja kwasu z laktozy, ramnozy, salicyny, glicerolu

Przygotować podłoże O/F Hugh & Leifsona bez glukozy. Rozlać do probówek po 5 ml. Sterylizować w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 10 minut. Do płynnego podłoża podstawowego o temperaturze 45 °C dodać aseptycznie przez filtr 0,5 ml 10 % roztworu wodnego glicerolu lub laktozy lub ramnozy lub salicyny. Ostrożnie wymieszać.

Reakcja pozytywna: zmiana zabarwienia z niebiesko-zielonego na żółte wskazuje na produkcję kwasu.

— Test na obecność katalazy

Kroplę nadtlenu wodoru (30 objętości) umieścić na czystym szkiełku przedmiotowym, emulgować z kulturą bakterii za pomocą platynowej ezy.

Reakcja pozytywna: wydzielanie się pęcherzyków gazu wskazuje na obecność katalazy.

— Aktywność reduktazy azotanowej i denitryfikacja (Bradbury, 1970 r.)

Podłoże hodowlane:

KNO ₃ (bez azotynu)	1 g
Wyciąg drożdżowy (prod. Difco bacto)	1 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Woda destylowana	1 litr

Rozlać po 10 ml do 20 ml butelek. Sterylizować w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut.

Odczynnik A:

H ₂ SO ₄	8 g
5 N kwas octowy	1 litr

Odczynnik B

naftyloamina	5 g
5 N kwas octowy	1 litr

Podłoże azotanowe inokulować w dwóch powtórzeniach. Zbadać po 10 i 20 dniach przez dodanie jednej kropli płynu Lugola, 0,5 ml odczynnika A i 0,5 ml odczynnika B. Jeśli podłoże nie zmieni barwy na czerwonawą, dodać 50 mg sproszkowanego cynku. Obserwować reakcję barwną.

<i>Reakcja pozytywna:</i>	<i>Reakcja barwna</i>	
	Etap 1	Etap 2
Brak redukcji azotanów	bezbarna	czerwona
Redukcja azotanów do azotynów (tylko reduktaza azotanowa)	czerwona	-
Redukcja azotanów i azotynów (denitryfikacja – reduktaza azotanowa i azotynowa)	bezbarna	bezbarna

— **Produkcja ureazy** (Lelliott, 1966 r.)

Podłoże podstawowe:

Pożywka mocznikowa na bazie agaru (prod. Oxoid) (CM53)	2,4 g
Woda destylowana	95 ml

Sterylizować w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 20 minut. Podłoże podstawowe schłodzić do temperatury 50 °C i dodać aseptycznie przez filtr 5 ml 40 % roztworu wodnego mocznika (Oxoid SR20). Dokładnie wymieszać.

Rozlać po 6 ml do sterylnych probówek (16 x 100 mm) i pozostawić do zastygnięcia w postaci skosów.

Reakcja pozytywna: w przypadku aktywności ureazy, żółto-pomarańczowe podłoże zmienia barwę na wiśniowo-czerwoną lub karmazynowo-różową.

Wykorzystanie cytrynianu (Christensen) (Skerman, 1967 r.)

Cytrynian na bazie agaru (Merck 2503)	23 g
Woda destylowana	1 litr

Wymieszać i rozpuścić przez podgrzanie. Rozlać po 6 ml, tak jak w przypadku podłoża z mocznikiem. Sterylizować w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut i pozostawić do zastygnięcia w postaci skosów.

Reakcja pozytywna: na wykorzystanie cytrynianu wskazuje zmiana zabarwienia podłoża z pomarańczowego na czerwone.

— Produkcja siarkowodoru (Ramamurthi, 1959 r.)

Podłoże

Trypton (prod. Difco bacto) (nr 0123)	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NaCl	5 g
Woda destylowana	1 litr

Rozpuścić i rozlać po 6 ml do probówek (16 x 100 ml). Sterylizować w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 10 minut.

Zaszczepić podłoże i z brzegu probówki zawiesić aseptycznie papierek nasycyony octanem ołowiowym (Merck 9511). Zamocować za pomocą nakrywki. Inkubować do 20 dni.

Reakcja pozytywna: dowodem na produkcję H₂S z tryptonu jest przebarwienie papierka testowego na kolor czarno-brązowy.

— **Produkcja indolu** (Ramamurthi, 1959 r.)

Podłoże:

Jak w teście na wytwarzanie H₂S.

Usunąć papierek nasycyony octanem ołowiu, dodać 1–2 ml eteru etylowego i delikatnie wstrząsnąć. Odstawić dla rozdzielenia warstw (pięć minut). Dodać 0,5 ml odczynnika Kovacs (Merck 9293) wpuszczając go do wnętrza przechylonej probówki.

Reakcja pozytywna: na obecność indolu wskazuje pojawienie się czerwonej barwy w żółtej warstwie między eterem i frakcjami wodnymi.

— Wzrost w temperaturze 37 °C (Ramamurthi, 1959 r.)

Podłoże

Pożywka bulionowa (prod. Difco bacto) (nr 0003)	8 g
Woda destylowana	1 litr

Zmieszać, rozpuścić i rozlać do probówek po 6 ml.

Sterylizować w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut.

Inokulować i inkubować w temperaturze 37 °C.

Reakcja pozytywna: wzrost bakterii.

— Wzrost w obecności 7 % chlorku sodu (Ramamurthi, 1959 r.)

Podłoże

Pożywka bulionowa (prod. Difco bacto)	8 g
NaCl	70 g
Woda destylowana	1 litr

Zmieszać, rozpuścić i rozlać do probówek po 6 ml.

Sterylizować w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut.

Reakcja pozytywna: wzrost bakterii.

— **Hydroliza żelatyny** (Lelliott, Billing i Hayward, 1966 r.)

Podłoże

Żelatyna (prod. Difco bacto) (nr 0143)	120 g
Woda destylowana	1 litr

Zmieszać, rozpuścić przez podgrzanie i rozlać do probówek po 6 ml.

Sterylizować w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut.

Reakcja pozytywna: topnienie żelatyny, nawet w przypadku utrzymywania temperatury 5 °C przez 30 minut.

— Hydroliza skrobi

Podłoże

Agar odżywczy (prod. Difco bacto) (płynny)	1 litr
Skrobia rozpuszczalna (prod. Difco bacto) (nr 0178)	2 g

Wymieszać, sterylizować w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 10 minut.

Rozlać do płytek. Płytki inokulować punktowo.

Po uzyskaniu dobrego wzrostu bakterii (10–20 dni), usunąć pewną ich ilość z pożywki i płytkę zalać płynem Lugola.

Reakcja pozytywna: o hydrolizie skrobi świadczą strefy przejaśnienia wokół kolonii bakterii; pozostała część pożywki barwi się na purpurowo.

— **Aktywność hydrolazy eskuliny** (Sneath i Collins, 1974 r.)

Podłoże

Pepton (prod. Difco bacto)	10 g
Eskulina	1 g
Cytrynian żelazowy (Merck 3862)	0,05 g
Cytrynian sodowy	1 g
Woda destylowana	1 litr

Wymieszać w celu rozpuszczenia i rozlać do probówek po 6 ml. Sterylizować w autoklawie w temperaturze 115 °C przez 10 minut.

Pożywka jest przezroczysta, ma jednak niebieskawą fluorescencję.

Reakcja pozytywna: dowodem na hydrolizę eskuliny jest pojawienie się brązowego zabarwienia łącznie z zanikiem fluorescencji. Można to sprawdzić stosując lampę ultrafioletową.

ODNIESIENIA

- 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 WE methods 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 i A.C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. appl. Bact.*, 29, 470–489.
- Lelliott, R.A. i 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. i V.G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, 481–527.

ZAŁĄCZNIK II

1. Dla każdego podejrzanego wystąpienia, w odniesieniu do którego uzyskano pozytywne wyniki testu immunofluorescencyjnego, zgodnie z metodą wymienioną w załączniku I i oczekuje się potwierdzenia lub obalenia tego wyniku po zakończeniu wszystkich badań według opisanej metody, należy zachować i odpowiednio zakonserwować:
 - w miarę możliwości, wszystkie bulwy lub próbki roślin, oraz
 - wszelki pozostały ekstrakt i dodatkowo przygotowane preparaty immunofluorescencyjne, do momentu zakończenia danych metod.
 2. W przypadku potwierdzenia wyniku pozytywnego należy zachować i odpowiednio zakonserwować:
 - materiał określony w ust. 1, oraz
 - próbkę zarażonego materiału roślinnego oberżyny, zainokulowanego ekstraktem z bulwy lub z rośliny, oraz
 - kulturę wyizolowanego organizmu.przez co najmniej jeden miesiąc po procedurze powiadomienia, zgodnie z art. 5 ust. 2.
-

ZAŁĄCZNIK III

1. Czynniki brane pod uwagę przy ustalaniu rozmiaru prawdopodobnego skażenia, zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. b), obejmują:
 - bulwy lub rośliny w miejscu produkcji określonym jako skażone, zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a),
 - miejsce(-a) produkcji lub obiekty związane z produkcją bulw czy roślin, określone jako skażone zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a), łącznie z tymi wspólnie użytkującymi sprzęt i urządzenia do produkcji, bezpośrednio lub poprzez wspólnych kontrahentów,
 - bulwy lub rośliny produkowane w miejscu(-ach) określonych w tiret poprzednim lub występujące w takim miejscu(-ach) produkcji w okresie, gdy bulwy lub rośliny, określone jako skażone zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a) występowały w obiektach lub miejscach produkcji określonych w tiret pierwszym,
 - główne składy, gdzie przechowywane są ziemniaki pochodzące z miejsc produkcji wymienionych powyżej,
 - każda maszyna, pojazd, statek, skład lub ich jednostki oraz wszelkie inne przedmioty, łącznie z opakowaniami, które mogły mieć kontakt z bulwami czy roślinami określonymi jako skażone zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a), podczas ostatnich 12 miesięcy lub gdzie tylko ma to zastosowanie,
 - wszelkie bulwy lub rośliny składowane lub mające kontakt z jakimikolwiek budowlami lub przedmiotami wymienionymi w tiret poprzednim, przed czyszczeniem i dezynfekcją tych budowli i przedmiotów, oraz
 - obejmują, jako wynik analizy prowadzonej na mocy art. 6, bulwy lub rośliny mające takie same genetyczne pochodzenie, co bulwy lub rośliny zakreślone jako skażone zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a) i w odniesieniu do których badania wskazują na prawdopodobieństwo wystąpienia skażenia.
 2. Elementy brane pod uwagę przy określaniu możliwego rozprzestrzenienia, zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. c), obejmują:
 - bliskość innych miejsc produkcji, gdzie uprawia się ziemniaki lub inne rośliny żywicielskie,
 - wspólność pochodzenia zasobów sadzeniaka.
 3. Szczegóły powiadomienia określone w art. 5 ust. 2 akapit pierwszy obejmują:
 - dla jakiegokolwiek przesyłki lub partii ziemniaka określonej jako skażona, świadectwa określone w art. 7 lub 8 dyrektywy 77/93/EWG, paszport lub numer rejestracyjny, o ile jest to właściwe,
 - nazwę odmiany zasobów sadzeniaka oraz, w miarę możliwości, w każdym innym przypadku,
 - opis elementów określonego skażenia i rozgraniczenia strefy,
 - dostępność ekstraktu, przygotowanych preparatów immunofluorescencyjnych, zarażonego materiału roślinnego oberżyny i wyizolowanej kultury organizmu, pochodzących z analiz, w których uzyskano potwierdzenie pozytywnego wyniku.
-

ZAŁĄCZNIK IV

1. Urzędowo nadzorowane środki określone w art. 7 ust. 1 mające na celu pozbywanie się bulw czy roślin określonych jako skażone zgodnie z art. 5 ust. 1 są:
 - wykorzystywane w przetwórstwie przemysłowym przez bezpośrednie i natychmiastowe dostarczenie do zakładu przetwórczego posiadającego odpowiednie możliwości usuwania odpadów, w odniesieniu do których stwierdzono, że nie istnieje możliwe do identyfikacji ryzyko rozprzestrzenienia się organizmu oraz wyposażonego w system dezynfekcji powierzchni do składowania i opuszczających pojazdów, lub
 - innymi środkami, pod warunkiem ustalenia, że nie istnieje możliwe do zidentyfikowania ryzyko rozprzestrzenienia organizmu; Komisja i inne Państwa Członkowskie powiadamiane są o takich środkach.
2. Właściwe wykorzystanie lub pozbywanie się bulw czy roślin określonych jako prawdopodobnie skażone zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. b) i określonych w art. 7 ust. 2, pod kontrolą odpowiedzialnych urzędowych organów Państw Członkowskich, jest następujące:
 - wykorzystanie jako ziemniaki towarowe przeznaczone do konsumpcji, pakowane w sposób gotowy do bezpośredniego dostarczenia i użycia bez rozpakowywania i przeznaczone do takiego bezpośredniego dostarczenia i użycia, lub
 - wykorzystanie jako ziemniaki towarowe przeznaczone do przetwórstwa przemysłowego i przeznaczone do bezpośredniego i natychmiastowego dostarczenia do zakładu przetwórczego posiadającego właściwe urządzenia do usuwania odpadów i dezynfekcji, lub
 - jakkolwiek inny sposób wykorzystania lub pozbywania się, pod warunkiem uznania, że nie istnieje możliwe do identyfikacji ryzyko rozprzestrzenienia się organizmu.
3. Właściwe metody czyszczenia i dezynfekcji przedmiotów określonych w art. 7 ust. 3, są takie w odniesieniu do których uznaje się, że nie istnieje możliwe do zidentyfikowania ryzyko rozprzestrzenienia organizmu oraz są one stosowane pod nadzorem odpowiedzialnych urzędowych organów Państw Członkowskich.
4. Serie środków, które wprowadzają Państwa Członkowskie w ramach rozgraniczonej strefy, ustanowionej zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. c) i określonej w art. 7 ust. 4 są następujące:
 - 4.1. w miejscach produkcji określonych jako skażone, zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a):
 - a) na polu określonym jako skażone, zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a), albo
 - i) — podczas co najmniej trzech lat uprawy następujących po roku, w którym określono skażenie,
 - podejmuje się środki w celu wyeliminowania samosiewów roślin i innych występujących naturalnie roślin żywicielskich organizmu, oraz
 - nie należy sadzić żadnych bulw ziemniaka, roślin czy nasion ani innych występujących naturalnie roślin żywicielskich organizmu ani upraw, co do których istnieje możliwe do identyfikacji ryzyko przeżycia lub rozprzestrzenienia się organizmu, aż do momentu uznania pola za wolne od samosiewów roślin ziemniaka przez co najmniej dwa następujące po sobie lata uprawy,
 - w pierwszym sezonie uprawy ziemniaka następującym po okresie określonym w tiret poprzednim, sadzi się urzędowo kwalifikowany materiał siewny ziemniaków tylko na produkcję ziemniaków towarowych i prowadzi się urzędowe badanie, jak określono w art. 2 ust. 1;
 - w sezonie uprawy ziemniaka następującym po tym, określonym w tiret poprzednim oraz po zastosowaniu właściwego zmianowania, należy sadzi się urzędowo kwalifikowany materiał siewny ziemniaków, na produkcję nasion, jak i ziemniaków towarowych i prowadzi się urzędowe badanie, jak określono w art. 2 ust. 1; lub
 - ii) — podczas czterech lat uprawy następujących po roku, w którym stwierdzono skażenie,
 - należy podjąć środki w celu wyeliminowania samosiewów roślin ziemniaka i innych występujących naturalnie roślin żywicielskich organizmu, oraz
 - pole należy albo wyłączyć z uprawy albo przeznaczyć na pastwisko trwałe, stosując często niskie koszenie lub intensywny wypas,
 - w pierwszym sezonie uprawy ziemniaka następującym po okresie określonym w tiret poprzednim, urzędowo kwalifikowane sadzeniaki sadzi się na produkcję nasion, jak i ziemniaków towarowych i prowadzi się urzędowe badanie, jak określono w art. 2 ust. 1;

- b) na innych polach:
- w roku uprawy następującym po tym, w którym określono skażenie:
 - nie sadi się żadnych bulw ziemniaka, roślin ani nie wysiewa się nasion ani innych występujących naturalnie roślin żywicielskich organizmu oraz podejmuje się środki w celu wyeliminowania samosiewów roślin ziemniaka, o ile to właściwe, lub
 - urzędowo kwalifikowany materiał siewny ziemniaków można sadzić tylko na produkcję ziemniaków towarowych, pod warunkiem że urzędowe odpowiedzialne organy są zapewnione, iż ryzyko występowania samosiewów roślin ziemniaka i innych występujących naturalnie roślin żywicielskich organizmu zostało wyeliminowane,
 - przez co najmniej dwa lata uprawy ziemniaka następujące po okresie ustalonym w tiret poprzednim, sadi się wyłącznie urzędowo kwalifikowany materiał siewny ziemniaków na produkcję nasion, jak i ziemniaków towarowych,
 - w każdym roku uprawy określonym w tiret poprzednim, podejmuje się środki w celu wyeliminowania samosiewów roślin ziemniaka i innych występujących naturalnie roślin żywicielskich organizmu oraz prowadzi się urzędowe badanie, jak określono w art. 2 ust. 1;
 - jeśli w roku uprawy następującym po tym, w którym określono skażenie, sadi się urzędowo kwalifikowany materiał siewny ziemniaków na produkcję ziemniaków towarowych, uprawę kontroluje się w właściwych terminach, a samosiewy roślin ziemniaka bada się na obecność organizmu;
- c) niezwłocznie po określeniu skażenia, zgodnie z art. 5 ust. 1 lit.a), oraz w każdym następnym roku uprawy aż do pierwszego dozwolonego sezonu i łącznie z nim, na polu(-ach) określonych jako skażone, jak wymieniono w lit. a), oczyszcza się i dezynfekuje wszystkie maszyny i urządzenia do magazynowania w miejscu produkcji oraz związane z produkcją ziemniaka, o ile jest to właściwe i przy zastosowaniu właściwych metod, jak określono w pkt 3;
- d) w tych systemach produkcji, gdzie możliwe jest całkowite zastąpienie podłoża uprawowego,
- sadi się żadnych bulw, roślin ani nie wysiewa się nasion chyba że jednostka produkcyjna została poddana urzędowo nadzorowanym środkom w celu wyeliminowania organizmu i usunięcia wszelkich ziemniaków lub innego materiału roślin psiankowatych, łącznie z co najmniej całkowitą zmianą podłoża uprawowego oraz oczyszczeniem i dezynfekcją jednostki produkcyjnej i całego sprzętu, a następnie odpowiedzialne urzędowe organy udzieliły zezwolenia na produkcję ziemniaka, oraz
 - produkcja ziemniaka prowadzona jest w oparciu o urzędowo kwalifikowany materiał siewny, minibulwy lub mikrorośliny pozyskane z badanych źródeł;
- 4.2. w ramach rozgraniczonej strefy, bez uszczerbku dla środków określonych w pkt 4.1, Państwa Członkowskie:
- a) niezwłocznie, i przez co najmniej trzy sezony uprawy po stwierdzeniu skażenia:
- zapewniają nadzór swoich odpowiedzialnych urzędowych organów nad obiektami, w których uprawia się, składa lub przenosi bulwy ziemniaka, łącznie z lokalami, które korzystają z maszyn związanych z produkcją ziemniaka zgodnie z umową,
 - wymagają czyszczenia i dezynfekcji maszyn i składów w takich obiektach, o ile to właściwe i przy zastosowaniu właściwych metod, jak określono w pkt 3,
 - wymagają sadzenia wyłącznie urzędowo kwalifikowanego materiału siewnego w odniesieniu do wszystkich upraw w ramach tej strefy,
 - wymagają oddzielnego przenoszenia zebranych zasobów nasion do tych zasobów towarowych we wszystkich obiektach w ramach tej strefy,
 - przeprowadzają urzędowe badania, jak określono w art. 2 ust. 1;
- b) ustanawiają program, w miarę potrzeby, zastąpienia wszystkich zasobów sadzeniaków w ciągu właściwego terminu.
- Inne Państwa Członkowskie i Komisja powiadamiane są corocznie o środkach wprowadzonych na mocy pkt 4.2., razem z numerami rejestracyjnymi producentów, zbiorowych magazynów i centrów wysyłkowych w ramach rozgraniczonej strefy.