

31993L0085

18.10.1993

ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV

L 259/1

**SMERNICA RADY 93/85/EHS**  
**zo 4. októbra 1993**  
**na kontrolu baktériovej krúžkovitosti zemiaka**

RADA MINISTROV EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

riovú krúžkovitosť zemiakov; keďže toto ochorenie sa už v niektorých častiach spoločenstva vyskytlo a niektoré obmedzené zdroje nákazy sa ešte stále existujú;

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva, a najmä na jej článok 43,

so zreteľom na návrh Komisie <sup>(1)</sup>,

so zreteľom na stanovisko Európskeho parlamentu <sup>(2)</sup>,

keďže pokiaľ nebudú pri týchto plodinách prijaté účinné opatrenia na zistenie ohnísk a rozšírenia tejto choroby, aby sa zabránilo jej výskytu a zavlečeniu a aby sa po zistení jej výskytu zabránilo šíreniu a aby sa šírenie potlačalo s cieľom jej eradikácie, bude pestovanie zemiakov v celom spoločenstve naďalej výrazne ohrozené;

so zreteľom na stanovisko Hospodárskeho a sociálneho výboru <sup>(3)</sup>,

keďže produkcia zemiakov zaujíma v poľnohospodárstve spoločenstva dôležité miesto; keďže výška výnosov zemiakov je neustále ohrozovaná škodlivými organizmami;

keďže ochrana zemiakov a rajčiakov proti týmto škodlivým organizmom nesmeruje len k zachovaniu produkčnej kapacity, ale má podporiť aj rast produktivity poľnohospodárstva;

keďže členské štáty spoločenstva musia mať navyše možnosť v prípade potreby prijať ďalšie alebo prísnejšie opatrenia, a to za podmienok vylúčenia akéhokoľvek obmedzenia v obchode so zemiakmi v rámci spoločenstva, ak už neboli uvedené v ustanoveniach smernice Rady 77/93/EHS z 21. decembra 1976 o ochranných opatreniach proti zavlečeniu škodlivých organizmov a ich šíreniu <sup>(4)</sup>; keďže tieto opatrenia sa musia oznámiť ostatným členským krajinám spoločenstva a Komisii;

keďže preventívne ochranné opatrenia proti zavlečeniu škodlivých organizmov na územie ktoréhokoľvek členského štátu by mali iba obmedzený účinok, pokiaľ by sa súčasne a metodicky neuskutočňovala kontrola a prevencia proti rozšíreniu po celom spoločenstve;

keďže jedným zo škodlivých organizmov zemiakov a rajčiakov je *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicum* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., ktorý spôsobuje bakté-

keďže smernica Rady 80/665/EHS zo 24. júna 1980 na zvládnutie baktériovej krúžkovitosti zemiaka <sup>(5)</sup> stanovila minimálne opatrenia, ktoré sú členské štáty spoločenstva povinné prijať proti baktériovej krúžkovitosti zemiaka;

<sup>(1)</sup> Ú. v. ES C 93, 2.4.1993, s. 12.

<sup>(2)</sup> Ú. v. ES C 176, 28.6.1993, s. 210.

<sup>(3)</sup> Ú. v. ES C 161, 14.6.1993, s. 18.

<sup>(4)</sup> Ú. v. ES L 26, 31.1.1977, s. 20. Smernica novelizovaná smernicou Komisie 92/103/EHS (Ú. v. ES L 363, 11.12.1992, s. 1).

<sup>(5)</sup> Ú. v. ES L 180, 14.7.1980, s. 30.

keďže odvtedy došlo k významnému rozvoju poznatkov o baktériovej krúžkovitosti zemiaka a zisťovaní patogéna spôsobujúceho baktériovú krúžkovitosť zemiaka;

keďže použitie fytoosanitárneho režimu spoločenstva na jeho území, ako oblasti bez vnútorných hraníc, vyvolalo potrebu opäť preskúmať a revidovať ustanovenia smernice Rady 80/665/EHS;

keďže na základe výsledkov tohto skúmania sa zistilo, že ustanovenia smernice Rady 80/65/EHS už nevyhovujú a je potrebná ďalšia špecifikácia opatrení;

keďže v takejto situácii je potrebné zrušiť smernicu Rady 80/665/EHS a prijať potrebné opatrenia;

keďže pri prijímaní týchto opatrení treba po prvé zobrať do úvahy, že choroba môže ostať v latentnom štádiu a nepozorovaná ako v rastúcej plodine, tak aj v skladovaných hlúčach a možno tomu zabrániť len výrobou a použitím zemiakovej sadby bez výskytu infekcie a po druhé, že na určenie miesta jej výskytu sú potrebné systematické úradné prieskumy; keďže rozširovanie tohto patogéna v rastúcej plodine nie je najdôležitejším činiteľom, ale keďže tento patogén môže prezimovať v samovysadených rastlinách zemiaka, ktoré predstavujú hlavný zdroj pokračovania nákazy z jedného rastového obdobia do ďalšieho; keďže tento patogén sa šíri najmä kontamináciou zemiakov pri dotyku s napadnutými hlúčami a mechanizáciou pri sadení, zbere a pozberovej manipulácii, ako aj prevoznými a skladovacími kontajnermi, ktoré sa týmto organizmom kontaminovali pri predchádzajúcom styku s napadnutými hlúčami; keďže takto napadnuté predmety môžu istý čas od svojho napadnutia ostať infekčnými; keďže šírenie tohto patogéna možno obmedziť alebo mu možno dezinfekciou takýchto predmetov zabrániť; keďže takáto kontaminácia zemiakovej sadby predstavuje pri šírení patogéna hlavné riziko;

keďže pri stanovovaní podrobností takýchto všeobecných, ako aj prísnejších opatrení, prijatých zo strany členských krajín spoločenstva s cieľom zabrániť zavlečeniu tohto škodlivého organizmu na svoje územie, od členských krajín spoločenstva sa v rámci Stáleho výboru pre zdravie rastlín (ďalej len „výbor“) vyžaduje úzka spolupráca s Komisiou,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

#### Článok 1

Táto smernicou sa týka opatrení, ktoré treba prijať v rámci členských štátov spoločenstva proti *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicum* (Spieckermann et Kottthoff) Davis et al., pôvodcovi baktériovej krúžkovitosti zemiaka (ďalej len „organizmus“) s cieľom:

a) objaviť a určiť jeho výskyt a rozšírenie;

b) predchádzať jeho výskytu a rozšíreniu;

c) v prípade zistenia jeho výskytu, zabrániť jeho ďalšiemu výskytu a bojovať pri nemu s cieľom jeho eradikácie.

#### Článok 2

1. Členské štáty spoločenstva sú každoročne povinné vykonávať systematické úradné zisťovanie výskytu organizmov na hlúčach zemiakov (*Solanum tuberosum* L.) pochádzajúcich z ich územia, aby sa potvrdilo, že sa na nich tento organizmus vyskytuje.

Pre toto zisťovanie sa musia odoberať vzorky hlúč zemiakov ako sadbových, tak aj ostatného určenia, a to predovšetkým zo skladovaných partií, ktoré sú priamo úradne alebo pod úradným dozorom laboratórne testované, pri ktorom sa používajú postupy stanovené v prílohe I s cieľom zistiť prítomnosť a diagnostikovať tento organizmus. Navyše sa podľa potreby môžu na iných vzorkách vykonávať vizuálne prehliadky úradne alebo pod úradným dozorom, a to prezerávaním hlúč.

Na rastlinách sa tento prieskum má vykonávať primeranými postupmi a z nich odobraté vzorky sa musia testovať úradne alebo pod úradným dozorom.

O počte, pôvode, priestorovom rozložení a načasovaní odberu vzoriek musia zodpovedné úradné orgány v zmysle ustanovení smernice 77/93/EHS, a to podľa uznávaných vedeckých a štatistických zásad a podľa biológie tohto organizmu s tým, že sa bude brať ohľad na osobitosti systémov pestovania zemiakov príslušnej členskej štátu spoločenstva. Podrobnosti týchto prieskumov sa musia každoročne predkladať príslušným členským štátom spoločenstva a Komisii, aby sa tak zabezpečila porovnateľná úroveň istoty medzi členskými krajinami pri potvrdzovaní neprítomnosti tohto organizmu.

2. Výsledky úradného prieskumu sa podľa odseku 1 tohto článku musia najmenej jedenkrát ročne oznamovať ostatným členským štátom spoločenstva a Komisii. Podrobnosti súvisiace s týmto oznámením sú dôvernej povahy. V súlade s postupom stanoveným článkom 16a smernice 77/93/EHS sa môžu predložiť výboru.

3. V súlade s postupom stanoveným článkom 16a smernice 77/93/EHS by sa mali prijať nasledujúce ustanovenia:

— podrobnosti týkajúce sa prieskumu uvedeného v odseku 1 tohto článku, sa musia vykonávať podľa uznávaných vedeckých a štatistických zásad,

— podrobnosti vyššie uvedeného oznámenia v odseku 2 tohto článku.

4. V súlade s postupom stanoveným článkom 16a smernice 77/93/EHS sa musia prijať nasledujúce ustanovenia:

— primerané postupy na vykonávanie prieskumov a testovanie uvedené v treťom pododseku odseku 1 tohto článku.

### Článok 3

Členské štáty sú povinné zabezpečiť, aby sa v prípade podozrenia alebo potvrdeného výskytu tohto organizmu buď na rastlinách a hlúčach zemiakov, alebo na hlúčach skladovateľných a uvedených na trh na území pod ich správou, o tom podala správa zodpovedným úradným orgánom.

### Článok 4

1. V prípadoch podozrenia z výskytu sú zodpovedné úradné orgány toho členského štátu spoločenstva, kde sa takéto podozrenia vyskytli, povinné zabezpečiť úradné alebo pod úradným dozorom vykonané laboratorné testovanie, a to s použitím postupov stanovených prílohou I a za podmienok stanovených v bode 1 prílohy II, aby sa potvrdilo alebo vyvrátilo podozrenie na výskyt. V prvom prípade sa musia splniť požiadavky stanovené v bode 2 prílohy II.

2. Kým sa potvrdí alebo vyvráti podozrenie na výskyt v zmysle odseku 1 sa v prípadoch podozrenia:

- i) keď sa na základe vizuálneho pozorovania zistili prejavy tohto ochorenia alebo
- ii) sa na základe pozitívneho výsledku imunofluorescenčného testu uvedeného v prílohe I, či iného primeraného testu toto ochorenie identifikovalo,

sú zodpovedné úradné orgány členských štátov spoločenstva povinné:

- a) zakázať pohyb partií alebo zásielok, z ktorých sa vzorky odobrali, okrem prípadov, že sa tak deje pod ich kontrolou, alebo že nedôjde k žiadnemu identifikovateľnému riziku šírenia tohto organizmu;
- b) podniknúť kroky na vysledovanie pôvodu podozrivého výskytu;
- c) na základe odhadnutej miery rizika zaviesť primerané dodatočné, preventívne opatrenia, aby sa zabránilo šíreniu tohto organizmu: medzi takéto opatrenia sa môže zaradiť úradná kontrola pohybu všetkých ostatných hlúč v rámci podniku alebo spojených z podozrenia z výskytu.

3. V súlade s postupom stanoveným článkom 16a smernice 77/93/EHS sa môžu prijať nasledujúce opatrenia:

— opatrenia, uvedené v predchádzajúcom odseku 2 c).

4. V súlade s postupom stanoveným článkom 16a smernice 77/93/EHS sa prijímajú nasledujúce opatrenia:

— iný primeraný test, uvedený v predchádzajúcom odseku 2 ii).

### Článok 5

1. Ak sa úradným alebo pod úradným dozorom vykonaným laboratorným testovaním pri použití metódy stanovenej prílohou I potvrdí prítomnosť tohto organizmu vo vzorke hlúč, rastlín alebo ich častí, sú zodpovedné úradné orgány členského štátu spoločenstva, vzhľadom na uznané vedecké zásady, biológiu tohto organizmu a osobitne výrobné, marketingové a spracovateľské systémy tohto členského štátu spoločenstva povinné:

- a) označiť za kontaminované hlúzy alebo rastliny, zásielku alebo partiu, ako aj mechanizačné či dopravné prostriedky, nádoby, sklady a ich jednotky, ako aj iné predmety vrátane obalového materiálu, z ktorého boli vzorky odobraté a ak je to potrebné, tak aj miesto produkcie a polia, z ktorých boli hlúzy či rastliny pozbierané;
- b) určiť rozsah pravdepodobnej kontaminácie počas predzberového a pozberového styku s kontaminovaným materiálom alebo vo výrobných linkách v súvislosti s ustanoveniami bodu 1 prílohy III;
- c) ohraničiť zónu kontaminácie v zmysle označenia uvedeného v odseku a), určenia rozsahu možnej kontaminácie v zmysle odseku b), ako aj možného rozšírenia tohto organizmu vzhľadom na bod 2 prílohy III.

2. Členské štáty spoločenstva v súlade s ustanoveniami bodu 3 prílohy III ihneď oznámia ostatným členským štátom a Komisii akúkoľvek kontamináciu označenú podľa odseku 1 a) a podrobnosti vyznačenia bezpečnostného pásma podľa odseku 1 c).

Podrobnosti, súvisiace s týmto oznámením, sú dôvernej povahy. Podľa postupov, určených článkom 16a smernice 77/93/EHS sa musia predložiť výboru.

3. V dôsledku oznámenia vykonaného podľa odseku 2 a v ňom uvedených podrobnosti ostatné, v oznámení uvedené členské krajiny podľa potreby a v súlade s ustanoveniami odseku 1 a), b) a c) označia kontamináciu, určia rozsah možnej kontaminácie a vyznačia bezpečnostné pásma.

## Článok 6

Členské štáty spoločenstva nariaďa, aby sa tam, kde boli v zmysle článku 5, odseku (1) a) hlúzy alebo rastliny označené v zmysle článku 4 (1) za kontaminované, vykonalo testovanie zásob zemiakov, klonovo príbuzných s tými, ktoré sú kontaminované. Toto testovanie sa musí vykonať na takých množstvách hlúz alebo rastlinách, aké sú na určenie pravdepodobného prvotného zdroja infekcie a pravdepodobného rozsahu kontaminácie potrebné, najlepšie stupeň rizika v rádomom vyjadrení.

V dôsledku výsledku testovania sa podľa potreby a v zmysle ustanovení článku 5 odseku (1) a), b) a c) musia vykonať ďalšie označenie kontaminácie, určiť rozsahu pravdepodobnej kontaminácie a vyznačiť bezpečnostné pásmo.

## Článok 7

1. Členské štáty spoločenstva sú povinné nariaďiť, aby sa hlúzy alebo rastliny, v zmysle článku 5 odseku (1) a) označené za kontaminované nevysádzali a že pod kontrolou ich zodpovedných úradných orgánov budú:

- zničené alebo
- iným spôsobom zlikvidované v zmysle úradných opatrení prijatých v súlade s ustanoveniami bodu 1 prílohy IV a pod podmienkou, že nepríde k žiadnemu identifikovateľnému riziku šírenia tohto organizmu.

2. Členské štáty spoločenstva ustanovia, aby sa hlúzy alebo rastliny, označené v zmysle článku 5 odsek (1) b) za pravdepodobne kontaminované, nevysádzali bez toho, aby boli dotknuté výsledky testovania, ktoré sú spomenuté v článku 6 ohľadom klonovo príbuzných rastlín a aby sa pod kontrolou príslušných zodpovedných úradných orgánov primeraným spôsobom využili alebo zlikvidovali, podľa ustanovenia v bode 2 prílohy IV, a to takým spôsobom, aby nevzniklo žiadne identifikovateľné riziko šírenia tohto organizmu.

3. Členské štáty spoločenstva ustanovia, aby sa akékoľvek mechanizačné či dopravné prostriedky, nádoby, sklady a ich jednotky, ako aj iné predmety vrátane obalového materiálu, ktoré boli v zmysle článku 5 (1) a) označené ako kontaminované alebo v zmysle článku 5 (1) b) za pravdepodobne kontaminované sa buď zničili, alebo umyli a dezinfikovali s použitím primeraných postupov, ktoré boli špecifikované v bode 3 prílohy IV. Po dezinfekcii sa už žiaden z takýchto predmetov nebude považovať za kontaminovaný.

4. Bez toho, aby boli dotknuté opatrenia, zavedené v zmysle odsekov 1, 2 a 3 tohto článku členské štáty spoločenstva ustanovia, aby sa v bezpečnostnom pásme vyznačenom podľa ustanovení článku 5 (1) c), uplatňoval rad opatrení, ktoré sú špecifikované v bode 4 prílohy IV.

## Článok 8

1. Členské štáty spoločenstva ustanovia, aby zemiaková sadba spĺňala požiadavky, stanovené smernicou 77/93/EHS a aby v priamej línii pochádzala z materiálu získaného v rámci schváleného programu, o ktorom sa v rámci úradného alebo pod úradným dozorom vykonaného testovania s použitím postupov stanovených prílohou I zistilo, že je bez výskytu tohto organizmu.

Vyššie spomenuté testovanie sa musí vykonať:

- v prípadoch, keď kontaminácia nepriaznivo vplyva na produkciu zemiakovej sadby na rastlinách počiatočného klonového výberu,
- v ostatných prípadoch buď na rastlinách počiatočného klonového výberu, alebo na reprezentatívnej vzorke základného alebo vyšších množiteľských stupňov zemiakovej sadby.

2. V súlade s postupom stanoveným článkom 16a smernice 77/93/EHS by sa mali prijať nasledujúce ustanovenia:

- podrobne vypracované pravidlá na použitie prvej zarážky druhého pododseku odseku 1 tohto článku,
- pravidlá vzhľadom na reprezentatívne vzorky, ako je to stanovené pod druhou zarážkou druhého pododseku odseku 1 tohto článku.

## Článok 9

Členské štáty spoločenstva zakážu držanie tohto organizmu a narábanie s ním.

## Článok 10

Bez toho, aby boli dotknuté ustanovenia smernice 77/93/EHS, môžu členské štáty spoločenstva schváliť zrušenie opatrení, uvedených v článkoch 6, 7 a 9 tejto smernice, a to pre pokusné a vedecké ciele, ako aj pre práce v odrodovom výbere a pod podmienkou, že takéto zrušenie nebude na ujmu boja proti tomuto organizmu a nevytvorí sa riziko šírenia tohto organizmu.

## Článok 11

Členské štáty spoločenstva môžu prijať takéto dodatočné alebo prísnejšie opatrenia vtedy, keď si to vyžiada boj proti tomuto organizmu, alebo aby sa zabránilo jeho rozširovaniu, pokiaľ sú v súlade s ustanoveniami smernice 77/93/EHS.

Dodatočné opatrenia, uvedené v prvom odseku tohto článku môžu obsahovať nariadenie, že sa môže vysádzať len uznaná zemiaková sadba, ktorá je buď úradne uznaná, alebo bola úradne prehliadnutá a spĺňa fyto-sanitárne požiadavky. Prehliadka by sa mala osobitne uplatniť len vtedy, keď majú farmári na svojich farmách povolené používať zemiakovú sadbu z ich vlastnej úrody a v iných prípadoch, keď sa vysádzajú sadbové zemiaky pochádzajúce z vlastnej výroby.

Podrobnosti týchto opatrení sa musia oznámiť ostatným členským štátom spoločenstva a Komisii.

#### Článok 12

Zmeny v prílohách k tejto smernici, ktoré treba vykonať v súvislosti s vývojom v oblasti vedecko - technických poznatkov sa musia schváliť v súlade s postupom, stanoveným článkom 16a smernice 77/93/EHS.

#### Článok 13

1. Od 15. novembra 1993 členské štáty spoločenstva prijímú a uverejnia ustanovenia, potrebné na zosúladenie s touto smernicou. Bezodkladne o tom budú informovať Komisiu.

Keď členské štáty prijímú tieto ustanovenia, musia v nich uviesť odkaz na túto smernicu alebo sa k nim takýto odkaz pripojí pri príležitosti ich úradného uverejnenia. Členské štáty stanovia spôsob vykonania tohto odkazu.

Členské štáty spoločenstva budú uplatňovať tieto ustanovenia od 16. novembra 1993.

2. Členské štáty spoločenstva bezodkladne informujú Komisiu o opatreniach štátu, ktoré prijímú v súlade s touto smernicou, v oblasti na ktorú sa vzťahuje táto smernica. Európska komisia o tom informuje ostatné členské štáty spoločenstva.

#### Článok 14

Týmto sa ruší smernica 80/665/EHS, a to s účinnosťou od 16. novembra 1993.

#### Článok 15

Táto smernica je určená členským štátom spoločenstva.

V Luxemburgu 4. októbra 1993

Za Radu  
predseda  
W.CLAES



## PRÍLOHA I

**METODIKA URČOVANIA PRÍTOMNOSTI A DIAGNOSTIKA BAKTÉRIE, KTORÁ SPÔSOBUJE KRÚŽKOVITOSŤ ZEMIAKA, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SMITH, DAVIS ET AL. SEPEDONICUM (SPIECKERMANN ET KOTTHOFF) DAVIS ET AL.* NA ZEMIAKOVÝCH HLÚZÁCH****1. Príprava vzorky – odrezávanie pupkových koncov hlúz**

- 1.1. Pod tečúcou vodou umyjeme 200 zemiakových hlúz a dezinfikovaným skalpelom alebo škrabkou na zemiaky odstránime epidermu okolo pupkových koncov každej z hlúz; dezinfekciu možno vykonať ponorením škrabky do 70 % etanolu a vypálením nad plameňom.
- 1.2. Opatrne nožom alebo škrabkou na zemiaky opatrne z pupkových koncov odoberieme kužeľovité výrezky. Necievne pletivo má byť čo najmenšie. Odobraté pupkové konce treba spracovať v priebehu 24 hodín (pozri odsek 3) alebo zakonzervovať pri teplote - 20 °C, nie dlhšie ako dva týždne.

**2. Vizualne hodnotenie príznakov baktériovej krúžkovitosti zemiaka**

Po odstránení pupkových koncov každú z hlúz priečne prerežeme a hľadáme príznaky baktériovej krúžkovitosti zemiaka.

Hľuzy stlačíme a pozorujeme, či z cievnych pletív vytekajú macerované pletivá.

Najskoršími príznakmi je jemná sklovitosť alebo priesvitnosť pletív bez zhmáknutého okolia cievnych zväzkov, osobitne v blízkosti pupkových koncov. Sfarbenie prstenca cievnych zväzkov na pupkových koncoch môže byť mierne tmavšie. Prvými identifikovateľnými príznakmi je žltkasté sfarbenie prstenca cievnych zväzkov a vytekajúce baktériové slizy syrovitej konzistencie z ciev po jemnom stlačení hľuzy. Výlučok obsahuje milióny baktérií. V tomto štádiu môže prichádzať k hneďnutiu cievneho pletiva. Tieto príznaky sa najprv môžu obmedzovať na jednu časť prstenca, nevyhnutne to však nemusí byť pri pupkových koncoch a hneďnutie sa postupne môže rozširovať na celý prstenec cievnych zväzkov. S postupujúcou infekciou prichádza k rozkladu cievnych pletív, vonkajšia vrstva zásobného pletiva sa môže oddeľovať od vnútornej. V neskorších štádiách infekcie sa na povrchu hlúz objavujú priehlbiny, ktoré majú často červeno-hnedé sfarbenie okrajov. Druhotné napadnutie hlúz hubami a baktériami môže tieto príznaky prekryť a rozlíšenie pokročilejších štádií tohto ochorenia od ostatných hubových a baktériových ochorení sa môže sťažiť, ba až znemožniť.

**3. Príprava vzoriek na farbenie podľa Grama, imunofluorescenčné farbenie a baklažánový test**

- 3.1. Pupkové konce zhomogenizujeme až po dosiahnutie úplnej macerácie v rozpúšťadle, netoxickom pre *Corynebacterium sepedonicum*, (napríklad 0,05 M fosforečnanom tlmivom roztoku NaCl (PBS) s hodnotou pH 7,0) a pri teplote nižšej ako 30 °C. Pridaním netoxického, protipenivého prípravku (dodatok 1 a 2) by sa malo zabrániť nadmernej macerácii.
- 3.2. Baktérie z homogenátu vylúhujeme jedným z nasledujúcich spôsobov<sup>(1)</sup>:
  - A. a) Homogenát odstredíme najviac pri 180 g počas 10 minút.
    - b) Na povrchu plávajúci podiel odstredíme najmenej pri 4 000 g počas 10 minút, dekantujeme a odstránime.
  - B. a) Macerát necháme stáť počas 30 minút, aby sa zvyšok pletív mohol usadiť. Plávajúci podiel opatrne dekantujeme tak, aby sme nenarušili usadeninu.
    - b) Plávajúci podiel s pomocou vodnej vývevy prefiltrujeme cez filtračný papier (Whatman No 1) vložený v lieviku z kremičitého skla (č. 2 = 40 – 100 µm). Filtrát pozbierame do centrifugačnej skúmavky, filter premyjeme sterilným PBS na maximálny filtračný objem 35 ml.
    - c) Filtrát odstredíme pri najmenej 4 000 g počas 20 minút.
- 3.3. Pelet rozptýlime v sterilnom 0,01 M fosforečnanom tlmivom roztoku s hodnotou pH 7,2 (dodatok 2) tak, aby sme dosiahli celkový objem asi 1 ml. Rozdelíme ho na dve rovnaké časti, jednu z nich si ponecháme ako referenčnú pri - 20 °C<sup>(2)</sup> alebo v lyofilizovanej forme. Druhú časť ďalej rozdelíme na dve časti, z ktorých jednu použijeme pre IF test a na farbenie Gramovým farbivom a druhú pre baklažánový test.

<sup>(1)</sup> Alternatívny postup extrakcie uviedol Dinesen, 1984.

<sup>(2)</sup> Je dokázané (Jansen and Van Vaerenberg, 1987), že zmrazovaním sa môže znížiť životaschopnosť *Corynebacterium sepedonicum*. Rozptýlením peletu v 10 % glycerole sa tomuto problému možno vyhnúť.

- 3.4. Je nutné, aby sa všetky pozitívne kontroly a vzorky *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* ošetrovali oddelene, aby sme zabránili kontaminácii. Toto platí pre podložné sklíčka pre IF test a baklažánový test.
4. *Farbenie podľa Grama*
- 4.1. Pripravíme si farbenie podľa Grama pre všetky riedenia pelet (5.2.1) a pre všetky rozrezané hľuzy (2) vykazujúce sklovitosť, hnilobu alebo iné podozrivé príznaky. Vzorky by sa mali odobrať z okraja napadnutého pletiva.
- 4.2. Pripravíme si farbenie podľa Grama pre známe kultúry *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* a podľa možnosti pre prirodzene infikované pletivá (5.1).
- 4.3. Stanovíme, ktoré vzorky obsahujú typické, Gram pozitívne koryneformné baktérie. Všeobecne sú bunky *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* dlhé 0,8 až 1,2  $\mu\text{m}$  a 0,4 až 0,6  $\mu\text{m}$  široké.

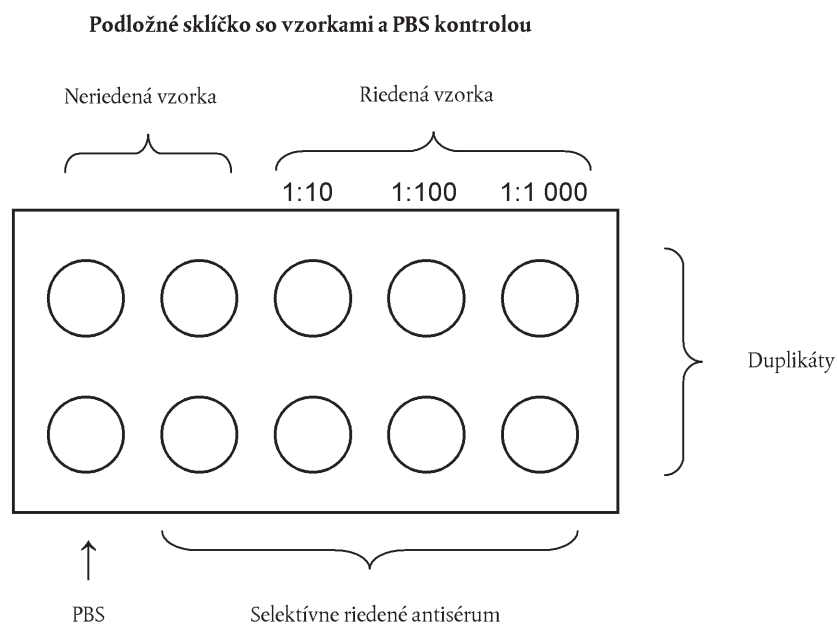
Vhodný postup farbenia je uvedený v dodatku 3.

Preparáty z prirodzených infekcií a nedávno izolovaných kultúr často vykazujú prevládanie tyčinkovitých foriem, ktoré sú zvyčajne menšie ako bunky pochádzajúce z agarových kultúr. Na väčšine kultúrnych médií sú bunky *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* rôzneho kyjovitého tvaru a ich reakcia na Gramovo farbivo môže byť rôzna. Bunky sú jednotlivé, v pároch s charakteristickými „ohnutiami“ typickými pre ohnuté delenie a občas v nepravidelných skupinách často popisovaných ako palisády a čínske listy.

## 5. Schéma pre IF test

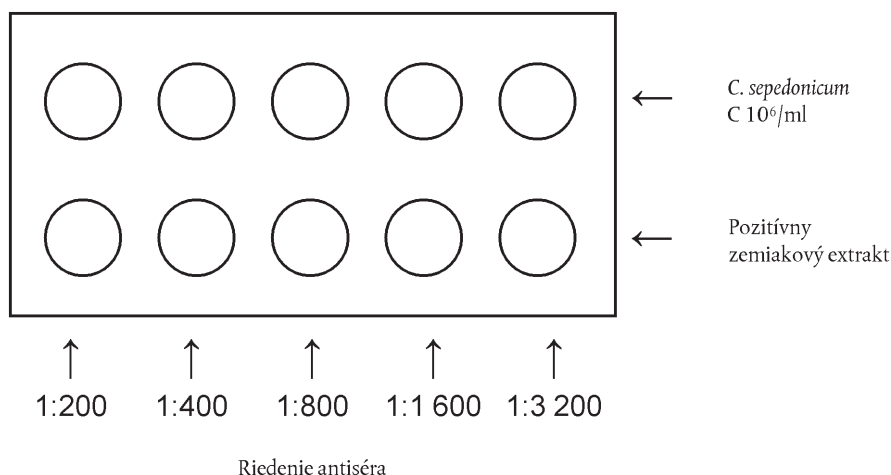
- 5.1. Použijeme antisérum pre známe kmene *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* – ATCC 33113 (NCPBP 2137) alebo NCPBP 2140, ktorého titer by mal byť vyšší ako 1:600. Na testovacom podložnom sklíčku použijeme jednu kontrolu s PBS, aby sa stanovilo, či sa imunoglobínový konjugát izotiokyánan fluorescínu (FITC) nešpecificky spája s bunkami baktérií. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* [ATCC 33113 (NCPBP 2137), NCPBP 2140] by sa na osobitnom sklíčku mal použiť ako homologická antigénová kontrola. Tam, kde je to možné, by sa mali použiť prirodzene infikované pletivá (udržiavané v lyofilizovanej forme alebo zmrazené pri - 20 °C) ako podobná kontrola na rovnakom podložnom sklíčku (obrázok 2).
- 5.2. *Postup*
- 5.2.1. Pripravíme si tri série desaťnásobného nariadenia (101, 102, 103) finálneho peletu v destilovanej vode (obrázok 1).
- 5.2.2. Do testovacích jamiek podložného sklíčka napipetujeme nameraný štandardný objem, dostatočný na zaliatie každej z jamiek (asi 25  $\mu\text{l}$ ) všetkých riedení peletu alebo suspenzie *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* (asi 106 buniek.ml<sup>-1</sup>) tak, ako je to znázornené na obrázku 1.

Obrázok 1



Obrázok 2

## Pozitívne kontrolné sklíčko



- 5.2.4. Príslušné testovacie jamky zalejeme antisérom *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* v odporúčaných riedeniach, 0,01 M roztokom PBS s hodnotou pH 7,2 (dodatok 2) tak, ako je to znázornené na obrázku 1. (Pre FITC kontrolku použijeme PBS.) Pracovné riedenie antiséra by malo mať približne polovičnú hodnotu toho, ako IF titer. Ak sa zahrnú aj iné riedenia antisér, malo by sa pre každé jedno riedenie pripraviť osobitné podložné sklíčko.
- 5.2.5. Podložné sklíčka pri laboratórnej teplote inkubujeme vo vlhkej komôrke počas 30 minút.
- 5.2.6. Podložné sklíčka pozorne opláchneme 0,01 M roztokom PBS s hodnotou pH 7,2 a päť minút ich umývame v troch kúpeľoch 0,01 M roztoku PBS s pH hodnotou 7,2.
- 5.2.7. Nadbytočnú vlhkosť opatrne odstránime.
- 5.2.8. Každú testovaciu jamku zalejeme FITC konjugátom s rovnakým riedením, aké sa použilo na stanovenie titra a pri laboratórnej teplote inkubujeme v tmavej, vlhkej komôrke počas 30 minút.
- 5.2.9. Podložné sklíčka opláchneme a umývame vyššie uvedeným spôsobom.
- 5.2.10. Do každej testovacej jamky pridáme asi 5 až 10  $\mu$ l fosforečnanmi tlmeneho glycerínu s hodnotou pH 7,6 (alebo podobnú kryciu látku s hodnotou pH najmenej 7,6) a prikryjeme krycím sklíčkom (dodatok 2).
- 5.2.11. Preparát preskúmame epifluorescenčným mikroskopom a filtrami, určenými na práce s FITC. Vhodné je 400 - až 1 000 - násobné zväčšenie. Testovacie jamky prezeráme pozdĺž dvoch na seba kolmých osí a po obvode.

V pozitívnych kontrolách hľadáme fluoreskujúce bunky a stanovíme titer. V kontrolnej testovacej jamke FITC/PBS pozorujeme fluoreskujúce bunky, a ak sa tam nenachádzajú, pokračujeme na testovaných testovacích jamkách. V najmenej 10 mikroskopických políčkach stanovíme priemerný počet fluoreskujúcich buniek s typickou morfológiou a vypočítame ich počet na 1 ml neriedeného peletu (dodatok 4).

Pri vykonávaní imunofluorescenčných testov sa stretávame s niektorými problémami.

- V peletoch zo zemiakového extraktu sa môžu nachádzať na pozadí populácie fluoreskujúcich buniek s netypickou morfológiou, podobnou *Clavibacter michiganensis*, ssp. *sepedonicum*. Mali by sme počítať len fluoreskujúce bunky s typickým tvarom a veľkosťou.

Vzhľadom na možnosť vedľajších reakcií by sa vzorky s pozitívnym výsledkom imunofluorescenčného testu mali podrobiť opätovnému testovaniu s použitím iného antiséra.

- Technické obmedzenie detekčných možností tohto postupu sa nachádza medzi  $10^3$  a  $10^4$  buniek na 1 ml neriedeného peletu. Vzorky s počtom IF typických buniek na hraniciach detekčného limitu pre *Clavibacter michiganensis*, ssp. *sepedonicum* sú zvyčajne negatívne, ale môžu sa podrobiť baklažánovému testu.



Výsledok imunofluorescenčného testu sa považuje za negatívny pre každú vzorku, kde sa nezistili typické, fluoreskujúce bunky. Vzorky sa považujú za „nekontaminované“ *Clavibacter michiganensis*, ssp. *sepedonicum*.

Baklažánový test sa nevyžaduje.

Imunofluorescenčný test sa považuje za pozitívny v prípade akejkoľvek vzorky, pokiaľ sa v nej zistia morfológicky typické fluoreskujúce bunky.

Vzorky, kde sa s obidvoma antisérmi dosiahol pozitívny výsledok imunofluorescenčného testu, sa musia považovať za „potenciálne kontaminované“ *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum*.

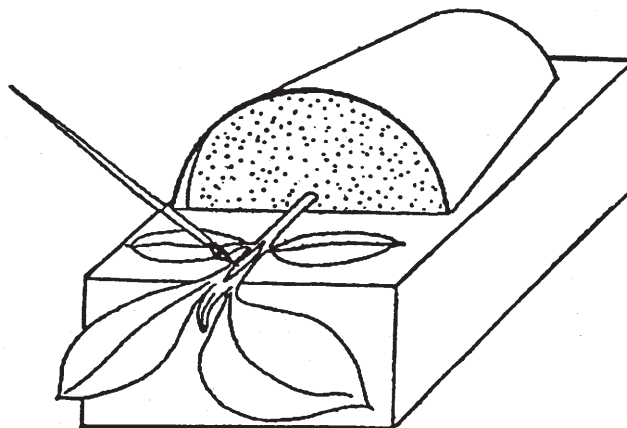
Pri všetkých vzorkách považovaných za potenciálne kontaminované sa vyžaduje vykonanie baklažánového testu.

## 6. Baklažánový test

Ohľadom podrobností o pestovaní rastlín na test pozri dodatok 5.

- 6.1. Pelety, pripravené podľa 3.3 nanesieme jedným z nižšie uvedených postupov (6.2, 6.3 alebo 6.4) na najmenej 25 rastlín baklažánu v rastovej fáze 3 (dodatok 5).
- 6.2. *Naočkovanie pozdĺžneho rezu I*
  - 6.2.1. Každú nádobku zaistíme vo vodorovnej polohe podložkou. Vhodným materiálom pre nádobku s priemerom 10 cm je blok z expandovaného polystyrénu s otvorom 5 (h) x 10 (š) x 15 (d) cm. Vhodné je vložiť pás hliníkovej fólie medzi stonku každej rastliny baklažánu a upevniť každú rastlinu gumičkou, ovinutou okolo polystyrénu.
  - 6.2.2. Skalpelom urobíme do stoniek baklažánov, medzi kľúčne a prvý pravý list, pozdĺžny rez, dlhý 0,5 až 1,0 cm, do hĺbky asi  $\frac{3}{4}$  hrúbky stonky.
  - 6.2.3. Špičkou skalpelu podržíme rez otvorený a jemným štetcom nanesieme očkovaciu látku (pelet) do ranky. Po naočkovaní všetkých rastlín rozdelíme zvyšok očkovacej látky pomedzi ne.
  - 6.2.4. Rez uzavrieme sterilnou vazelínou z 2 ml injekčnej striekačky.

Obrázok 3



- 6.3. *Naočkovanie pozdĺžneho rezu II*
  - 6.3.1. Rastlinu baklažánu uchopíme medzi dva prsty a napipetujeme kvapku (asi 5 až 10  $\mu$ l) rozptýleného peletu na stonku medzi kľúčne listy a prvý pravý list.
  - 6.3.2. Skalpelom urobíme do stonky priečny (asi pod uhlom 5°) a 1 cm dlhý rez, približne do hĺbky  $\frac{1}{3}$  hrúbky stonky, počnúc pri kvapke očkovacej látky.
  - 6.3.3. Rez uzavrieme sterilnou vazelínou z injekčnej striekačky.
- 6.4. *Naočkovanie injekčnou striekačkou*
  - 6.4.1. Rastliny baklažánu deň pre očkovaním nepolievame, aby sme znížili ich vnútorné napätie.

- 6.4.2. Baklažány očkujeme injekčnou striekačkou vybavenou hypodermickou ihlou (najmenej 23 G), zvyšok očkovacej látky rozdelíme medzi rastliny.
- 6.5. Známod kultúrou *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* a podľa možnosti pletivom z prirodzene infikovaných hlúz (5.1) rovnakým postupom (6.2, 6.3 a 6.4) naočkujeme 25 rastlín baklažánu.
- 6.6. Sterilným 0,05 M PBS naočkujeme 25 rastlín baklažánu, a to rovnakým postupom (6.2, 6.3 a 6.4).
- 6.7. Rastliny inkubujeme vo vhodných podmienkach (dodatok 5) počas 40 dní. Pravidelne, každých osem dní kontrolujeme príznaky ochorenia. Počítame počet rastlín s vyvinutými príznakmi. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* spôsobuje vädnutie baklažánu, ktoré môže začať buď okrajovým, alebo medzižilovým ochabnutím. Vädnúce pletivá sa najprv sfarbujú do tmavozelena alebo sa na nich vytvárajú škvrny, pred odumieraním často blednú. Medzižilové vädnutie má často žlté okraje. Rastliny nevyhnutne nemusia odumrieť, čím sú pri prejavení sa príznakov tohto ochorenia staršie, tým majú väčšiu šancu na prežitie. Rastliny môžu infekciu prerásť. Mladšie rastliny baklažánu sú aj voči menším populáciám *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* oveľa citlivejšie ako staršie. Preto je treba použiť rastliny pred dosiahnutím rastovej fázy 3.

Vädnutie môže byť taktiež vyvolané aj populáciami iných baktérií či húb, ktoré sú v pletivách hlúz zemiaka prítomné, ako sú *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*, *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata*, ako aj populáciami saprofytických baktérií. Takéto vädnutie sa od vädnutia spôsobeného *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* dá odlišiť, pretože dochádza k rýchlemu vädnutiu celých listov a celých rastlín.

- 6.8. Pre všetky šarže rastlín baklažánu s prejavom príznakov tohto ochorenia si pripravíme farbenie podľa Grama (4), a to použitím zvädnutých listových a stonkových pletív z rastlín a izolátov z vhodného živného média (7). Povrch listov baklažánu dezinfikujeme 70 %-ným etanolom.
- 6.9. Za určitých podmienok, najmä keď rastové podmienky nie sú optimálne, môže *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* v rastlinách baklažánu prežívať v podobe latentnej infekcie až 40 dní po naočkovaní. Možným dôsledkom takýchto infekcií môže byť zakrpatenie a strata životaschopnosti naočkovaných rastlín. Ak sa výsledok IF testu považuje za pozitívny, je nevyhnutné ďalšie testovanie. Preto je dôležité porovnávanie rýchlosti rastu všetkých rastlín baklažánu s kontrolou naočkovanou sterilným 0,05 M PBS a sledovať klimatické podmienky v skleníku.

Pre ďalšie testovanie sa odporúča nasledujúce:

- 6.9.1. stonky nad miestom očkovania odrežeme a odstránime z nich listy;
- 6.9.2. stonky macerujeme v 0,05 M roztoku PBS s hodnotou pH 7,0 tak, ako je to uvedené v 3.1 a 3.2;
- 6.9.3. jednu polovicu peletu použijeme na vykonanie farbenia podľa Grama (4) a IF testu (5);
- 6.9.4. keď sú výsledky Gramovho farbenia a IF testu pozitívne, použijeme druhú polovicu peletu na vykonanie ďalšieho baklažánového testu (6). Použijeme známe kultúry *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* a kontroly so sterilným 0,05 M roztokom PBS. Ak sa príznaky v ďalších testoch nepozorujú, vzorka sa musí považovať za negatívnu.

## 7. Izolácia baktérií *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum*

Diagnózu možno potvrdiť len vtedy, keď sa *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* izoluje a určí (8). Hoci je *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* organizmom citlivým, možno ho izolovať z pletív vykazujúcich príznaky ochorenia. Môžu ho však prerásť rýchlorastúce saprofytické baktérie, a preto sa priama izolácia (3.3) z peletu pochádzajúceho z hlúz zemiaka neodporúča. Rastliny baklažánu sú pre rast *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* výborné selektívne obohacovacie médium a taktiež ako hostiteľ umožňuje vynikajúce potvrdzovacie testy.

Izoláciu možno urobiť zo všetkých hlúz zemiaka a rastlín baklažánu, ktoré vykazujú príznaky (4, 6). V prípade potreby možno maceráciu stoniek rastlín baklažánu vykonať podľa postupov uvedených v bodoch 3 a 6.9.

- 7.1. Suspenziu naniesieme na jedno z nasledujúcich médií (recepty sú uvedené v dodatku 6):

živný dextrózový agar (len pre subkultúry),

kvasnicovo-glukózový peptónový agar,

živný kvasnicovo-dextrózový agar,

kvasnicový agar s výluhom minerálnych solí.

Inkubujeme počas až 20 dní pri teplote 21 °C.

*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* rastie pomaly, zvyčajne v priebehu 10 dní vytvára bodové, smotanovo sfarbené a kupolovité kolónie.

Kultúru opätovným rozterom prečistíme.

Subkultúrou možno rýchlosť rastu zlepšiť. Typické kolónie sú smotanovo až slonovinovobiele sfarbené, okrúhle, na povrchu hladké, kupolovito vyhnuté, majú hubovo-roztekavú konzistenciu s uceleným okrajom a zvyčajne majú priemer od 1 do 3 mm.

#### Určovanie

Zo zdravých alebo napadnutých zemiakov a baklažánov možno izolovať mnohé Gram pozitívne tyčinkovo-kýjakovité baktérie s charakteristikou kolónií, ktorá je podobná kolóniám *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum*. V tejto súvislosti je preto potrebné vykonanie nasledujúcich testov:

IF test (5.1),

baklažánový test,

nutričný a fyziologický test (dodatok 7),

- oxidačno-fermentačný test (O/F),
- oxidázový test,
- rast pri 37 °C,
- tvorba ureázy,
- hydrolýza eskulínu,
- hydrolýza škrobu,
- tolerancia voči 7 %-nému roztoku chloridu solného,
- indolový test,
- katalázový test,
- tvorba H<sub>2</sub>S,
- využitie citranov,
- hydrolýza želatíny,
- kyselina z: glycerolu, laktózy, ramnózy a salicínu,
- farbenie podľa Grama.

Všetky testy by mali obsahovať známe kontroly s *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum*. V nutričných a fyziologických testoch by sa mali použiť očkovacie látky zo subkultúr, vypestovaných na živných agaroch. Morfológické porovnávanie by sa malo vykonávať s kultúrami vypestovanými na živných dextrózových agaroch.

Pre IF testy by všetky populácie mali byť upravené na 10<sup>6</sup> buniek/ml. Titer IF by mal byť blízky titru známej kultúry *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum*.

Pre baklažánový test by všetky populácie mali byť upravené na 10<sup>7</sup> buniek/ml. Baklažánové testy by sa mali vykonávať s použitím 10 rastlín na každý testovací organizmus oproti známej kultúre *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* a sterilnej kontrole s čistou vodou. Pri použití čistých kultúr by sa vädnutie malo dosiahnuť v priebehu 20 dní, rastliny, ktoré nevykazujú príznaky, by sa po tomto čase mali inkubovať pri teplotách vedúcich k rastu baklažánu, ale nižších ako 30 °C, celkovo 30 dní (dodatok 5). Ak sa po 30 dňoch príznaky tohto ochorenia neprejavajú, kultúra sa nemôže potvrdiť za patogénnu formu *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum*.

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Test                    | <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>Sepedonicum</i> |
| O/F                     | inertná alebo slabo oxidatívna                           |
| oxidázový               | -  |
| katalázový              | +  |
| redukcia dusičnanov     | -  |
| aktivita ureázy         | -  |
| tvorba H <sub>2</sub> S | -  |
| tvorba indolu           | -  |
| využitie citranov       | -  |
| hydrolýza škrobu        | - alebo slabá  |
| rast pri 37 °C          | -  |
| rast v 7 % NaCl         | -  |
| hydrolýza želatíny      | -  |
| hydrolýza eskulínu      | +  |
| Kyselina z:             |  |
| - glycerolu             | -  |
| - laktózy               | - alebo slabá  |
| - ramnózy               | -  |
| - salicínu              | -  |

---

## Dodatok 1

**PRÍPRAVA MACERAČNÉHO ROZTOKU PODĽA ODPORÚČANIA LELLIOTTA A SELLARA, 1976**

|   |       |
|---|-------|
| Protipenivý prípravok DC silicone antifoam MS A (Hopkins & Williams Ltd, Cat. No 9964-25 Chadwell Heath, Essex, Anglicko) | 10 ml |
| Vložky Lubrol W (ICI Ltd)   | 0,5 g |
| Pyrofosforečnan štvorsodný  | 1 g   |
| 0,05 M NaCl, tlméný fosforečnanmi, pH 7,0 (dodatok 2)   | 1 l   |

## Dodatok 2

**TLMIVÉ ROZTOKY (PUFRE)****Tlmivý roztok: 0,05 M fosforečnanový pufer NaCl, pH 7,0**

Tento tlmivý roztok možno použiť pre macerovanie pletív zemiakových hlúz (2.1).

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 4,26 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 2,72 g |
| NaCl                             | 8,0 g  |
| Destilovaná voda do              | 1 l    |

**Tlmivý roztok: 0,01 M fosforečnanový pufer NaCl, pH 7,2**

Tento tlmivý roztok sa používa na riedenie antiséra a umývanie IF podložných sklíčok.

|  |       |
|--|-------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O | 2,7 g |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O  | 0,4 g |
| NaCl   | 8,0 g |
| Destilovaná voda do                                    | 1 l   |

**0,1 M fosforečnanový pufer s glycerínom, pH 7,6**

Tento tlmivý roztok sa používa na zvýšenie fluorescencie ako krycia kvapalina na testovacích jamkách podložného sklíčka pri IF teste.

|  |        |
|--|--------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O | 3,2 g  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O  | 0,15 g |
| Glycerol   | 50 ml  |
| Destilovaná voda                                       | 100 ml |

## Dodatok 3

**POSTUP PRE FARBENIE PODĽA GRAMA (UPRAVENÉ HUCKEROM) (DOETSCH, 1981)****Roztok kryštálovej violely**

V 20 ml 95 %-ného etanolu rozpustíme 2 g kryštálovej violely.

V 80 ml destilovanej vody rozpustíme 0,8 g oxalanu amónneho.

Obidva roztoky zmiešame.

**Jódová tinktúra podľa Lugola**

|                  |        |
|------------------|--------|
| Jód              | 1 g    |
| Jodid draselný   | 2 g    |
| Destilovaná voda | 300 ml |

Obidve chemikálie zmiešame, spolu ich rozotrieme v trecej miske. Pridáme do destilovanej vody, nádobu uzavrieme a premiešame.

**Safranínový odfarbovací roztok**

Roztok safranínu:

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Safranin O      | 2,5 g  |
| 95 % -ný etanol | 100 ml |

Zmes premiešame a odložíme.

Pred použitím zriedime v pomere 1:10 na pracovnú koncentráciu.

**Postup pri farbení**

1. Pripravíme si rozter, fixujeme ho sušením na vzduchu a teplom.
2. Podložné sklíčko zalejeme roztokom kryštálovej violely na 1 minútu.
3. Krátko umývame pod tečúcou vodou z vodovodu.
4. Na minútu zalejeme jódovou tinktúrou podľa Lugola.
5. Opäť omyjeme pod tečúcou vodou z vodovodu a vysušíme pijavým papierom.
6. Odfarbujeme buď kvapkaním 95 %-ného etanolu až dotedy, kým sa nevyučuje farbivo, alebo ponorením a miernym miešaním v ňom.
7. Omyjeme pod tečúcou vodou a osušíme pijavým papierom.
8. Zalejeme na 10 sekúnd safranínom.
9. Opäť omyjeme pod tečúcou vodou a osušíme pijavým papierom.

Gram pozitívne baktérie majú fialovo-modré, Gram negatívne baktérie majú ružovo-červené sfarbenie.



## Dodatok 4

## URČOVANIE POPULÁCIE IF POZITÍVNYCH BUNIEK

Plocha  $S$  jednej testovacej jamky na viacjamkovom podložnom sklíčku:

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

kde  $d$  = priemer poľa objektívu.

Plocha  $s$  poľa objektívu

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

Hodnotu  $d$  = stanovíme buď priamym meraním,

alebo na základe nasledujúcich vzorcov:

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

kde:  $i$  = koeficient poľa (závisí na type okuláru mikroskopu a môže mať hodnotu od 8 do 24),

$K$  = tubusový koeficient (1 alebo 1,25);

$G$  = (100-násobné, 40-násobné a pod.) zväčšenie objektívu.

Zo vzťahu (2):  $d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$

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

Zistíme počet typických fluoreskujúcich buniek v jednom poli  $c$ .

Vypočítame počet typických fluoreskujúcich buniek v celom poli  $C$ .

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

Vypočítame počet typických fluoreskujúcich buniek na jeden ml peletu ( $N$ ).

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

kde  $y$  = objem peletu na testovacej jamke podložného sklíčka,

kde  $F$  = zriedovací faktor peletu.

## Dodatok 5

**PESTOVANIE RASTLÍN BAKLAŽÁNU NA TEST**

Osivo baklažánu (*Solanum melongena*, odroda Black Beauty) vysejeme do pasterizovaného kompostu. Semenáče s plne vyvinutými klíčovými listami (10 až 14 dní staré) presadíme do kvetináčov s pasterizovaným kompostom.

Rastliny baklažánov používame v rastovej fáze 3, keď sú plne rozvinuté dva, najviac však tri pravé listy.

Baklažány by sa mali pestovať v skleníkoch pri zachovaní nasledujúcich klimatických podmienok:

dĺžka dňa: 14 hodín alebo prirodzená dĺžka dňa

teplota: cez deň 21 až 24 °C  
v noci 15 °C

**UPOZORNENIE:** *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* nebude rásť pri teplotách vyšších ako 30 °C. Ak nočné teploty neklesajú pod 15 °C, môže prísť k poškodeniu chromofórov (striebřistá nekróza).

Korene môžu poškodzovať larvy *Sciaridae*, predchádzame tomu použitím vhodných insekticídov.

Osivo baklažánu, odrody Black Beauty možno získať od:

1. AB Hammenhögs Frö,  
270 50 Hammenhög,  
Švédsko;
  2. HURST Seeds Ltd.,  
Avenue Road,  
Witham,  
Essex CM8 2DX,  
Veľká Británia;
  3. ASGRO Italia Sp A,  
Corso Lodi 23,  
Milan,  
Taliansko;
  4. KÜPPER  
Mitteldeutsche Samen GmbH;  
Hessenring 22;  
D-37169 Eschewege,  
Nemecko.
-

## Dodatok 6

**MÉDIÁ PRE RAST A IZOLÁCIU CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SSP. SEPEDONICUM****Živný agar (NA)**

Živný agar Difco bacto v destilovanej vode, dávkovanie podľa výrobcu. Sterilizuje sa v autokláve pri 121 °C 15 minút.

**Živný dextrózový agar (NDA)**

Živný agar Difco bacto s obsahom 1 % monohydrátu D(+) glukózy. Sterilizujeme ho v autokláve pri 115 °C počas 20 minút.

**Kvasnicovo-peptónovo-glukózový agar (YPGA)**

|   |      |
|---|------|
| Difco bacto kvasnicový výluh (č. 0127)  | 5 g  |
| Difco bacto peptón (č. 0118)            | 5 g  |
| Monohydrát D(+) glukózy                 | 10 g |
| Difco bacto purifikovaný agar (č. 0560) | 15 g |
| Destilovaná voda                        | 1 l  |

V autokláve 20 minút sterilizujeme 0,5 l celkového objemu média pri 115 °C.

**Kvasnicový výluh s obsahom minerálnych solí (YGM)**

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| Difco bacto kvasnicový výluh         | 2,0 g   |
| Monohydrát D(+) glukózy              | 2,5 g   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0,25 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0,25 g  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,1 g   |
| MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O  | 0,015 g |
| NaCl                                 | 0,05 g  |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,005 g |
| Difco bacto purifikovaný agar        | 18 g    |
| Destilovaná voda                     | 1 l     |

V autokláve 20 minút sterilizujeme 0,5 l celkového objemu média pri 115 °C.

---

## Dodatok 7

**NUTRIČNÉ A FYZIOLOGICKÉ TESTY NA IDENTIFIKÁCIU *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUM***

Všetky médiá by sa mali inkubovať pri 21 °C po šiestich dňoch by sa mali preskúšať. Ak nebudú rásť, inkubujeme ďalších 20 dní.

— **Oxidatívne a fermentatívne testy** (Hugh & Leifson, 1953) – O/F test

Základné médium:

|  |        |
|--|--------|
| KCl  | 0,2 g  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O           | 0,2 g  |
| NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1,0 g  |
| Difco bacto peptón (č. 0118)                   | 1,0 g  |
| Čistený Difco bacto agar                       | 3,0 g  |
| Monohydrát D(+) glukózy                        | 10,0 g |
| Brómtymolová modrá                             | 0,03 g |
| Destilovaná voda                               | 1 l    |

Jednotlivé zložky zmiešame a hodnotu pH upravíme 1 N KOH na 7,0 – 7,2.

Rozdelíme do kultivačných skúmaviek Pyrex s rozmermi 16 mm x 100 ml s objemom 12 ml po 5 ml a 10 ml.

Sterilizujeme v autokláve počas 10 minút pri 115 °C.

Každú kultúru naočkujeme očkovacou ihlou do 5ml a 10 ml skúmaviek. Do skúmaviek s nameraným objemom 10 ml skúmavky asepticky pridáme 1 ml až 2 ml sterilného kvapalného parafínu a inkubujeme.

Pozitívne reakcie

| Skúmavka | Sfarbenie    | Reakcia                  |
|----------|--------------|--------------------------|
| otvorená | žlté         | fermentatívna            |
| uzavretá | žlté         |                          |
| otvorená | žlté         | oxidatívna               |
| uzavretá | modro-zelené |                          |
| otvorená | zelené       | oxidatívna alebo inertná |
| uzavretá | zeleno-modré |                          |

— **Oxidázový test** (Kovacs, 1956)

Kovacsovo oxidázové činidlo:

1 %-ný roztok tetrametyl-parafenyldiamín-dichloridu (BDH č. 30386) v destilovanej vode.

Toto činidlo by malo byť čerstvé v objemoch 1 ml a možno ho skladovať v sklenej hnedej fľaši pri 5 °C počas 1 až 4 týždňov.

Na filtračný papier v Petriho miske kvapneme kvapku činidla. Ihneď na papier platinovým očkom natrieme niektorú z kultúr, vypestovaných na agare.

*Pozitívna reakcia:* v priebehu 10 sekúnd sa vyvinie purpurovočervené sfarbenie, kultúry s časom 10 až 30 sekúnd majú reakciu slabou pozitívnu.

**UPOZORNENIE:** Je potrebné použiť platinové očko a kultúry zo živného agaru (NA), keďže už stopy železa alebo obsah vyšších cukrov v rastovom médiu môžu dať falošné pozitívne výsledky.

— **Vytváranie kyseliny z laktózy, ramnózy, salicínu a glycerolu**

Prípravíme O/F médium podľa Hugh & Leifsona bez glukózy. Rozlejeme do 5 ml skúmaviek. Sterilizujeme v autokláve počas 10 minút pri teplote 115 °C. Do roztopenej hmoty pri 45 °C asepticky pridáme 0,5 ml prefiltrovaného vodného roztoku glycerolu, laktózy, ramnózy alebo salicínu. Opatrne premiešame.

*Pozitívna reakcia:* zmena sfarbenia z modrozeleného na žlté naznačuje vytváranie kyseliny.

— **Katalázový test**

Na čisté podložné sklíčko kvapneme kvapku 30 % peroxidu vodíka a emulzifikujeme s kultúrou, pridanou platinovým očkom.

*Pozitívna reakcia:* vytváranie kyslíka (bublínky) v kvapke naznačuje prítomnosť katalázy.

— **Aktivita nitrát-reduktázy a denitrifikácia** (Bradbury, 1970)

Kultivačné médium:

|   |     |
|---|-----|
| KNO <sub>3</sub> (bez obsahu dusitanov) | 1 g |
| Difco bacto kvasnicový výluh            | 1 g |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>         | 5 g |
| Destilovaná voda                        | 1 l |

Objemy po 10 ml rozlejeme do skúmaviek s obsahom 20 ml a sterilizujeme v autokláve pri 121 °C počas 15 minút.

Činidlo A:

|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 8 g |
| 5N kyselina octová             | 1 l |

Činidlo B:

|                    |     |
|--------------------|-----|
| Naftylamín         | 5 g |
| 5N kyselina octová | 1 l |

Dusičnanové médium naočkujeme v dvoch opakovaniach. Testujeme po 10 a 20 dňoch, a to pridaním kvapky jódovej tinktúry podľa Lugola, 0,5 ml činidla A a 0,5 ml činidla B. Ak médium nenadobúda červenú farbu, pridáme asi 50 mg práškového zinku a pozorujeme farebnú reakciu.

| <i>Pozitívna reakcia</i>   | <i>Farebná reakcia</i> |           |
|--|------------------------|-----------|
|  | Štádium 1              | Štádium 2 |
| žiadna redukcia dusičnanov   | bez farby              | červená   |
| redukcia dusičnanov až na dusitany (len nitrát-reduktáza)                | červená                | -         |
| redukcia dusičnanov až za dusitany (nitrát-reduktáza a nitrit-reduktáza) | bez farby              | bez farby |

— **Tvorba ureázy** (Lelliott, 1966)

Základné médium:

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Agar na báze močoviny | 2,4 g |
| Destilovaná voda      | 95 ml |

Sterilizujeme v autokláve počas 20 minút pri teplote 115 °C. Roztopenú bázu schladíme na 50 °C a septicky pridáme 5 ml 40 %-ného vodného roztoku močoviny (Oxford SR20), prefiltrovaného cez sterilizovaný filter. Dobre premiešame.

Rozdelíme na 6 ml objemy do sterilných skúmaviek (16 x 100 mm), skloníme a necháme usadiť.

*Pozitívna reakcia:* po aktivácii ureázy žltó-oranžové médium nadobudne čerešňovo-červené alebo červeno-ružové sfarbenie.

**Využitie citranov** (Christensen) (Skerman, 1967)

|                       |      |
|-----------------------|------|
| Agar na báze citranov | 23 g |
| Destilovaná voda      | 1 l  |

Zamiešame a zohrievaním rozpustíme. Rozdelíme na 6 ml objemy, ako pre močovinné médium vyššie. Sterilizujeme v autokláve pri 121 °C počas 15 minút, nakloníme a necháme usadiť.

*Pozitívna reakcia:* využitie citranov má za následok zmenu sfarbenia média z oranžového na červené.

— **Tvorba sírovodíka (Ramamurthi, 1959)**

Médium:

|                                 |      |
|---------------------------------|------|
| Difco bacto tryptón (č. 0123)   | 10 g |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1 g  |
| NaCl                            | 5 g  |
| Destilovaná voda                | 1 l  |

Zložky rozpustíme a roztok rozdelíme na 6 ml objemy do skúmaviek 16 x 100 mm. Sterilizujeme v autokláve počas 10 minút pri teplote 115 °C.

Naočkujeme a asepticky suspendujeme papier s obsahom octanu olovnatého (Merck 9511), udržiavame prikryté a inkubujeme počas 20 dní.

*Pozitívna reakcia:* tvorbu H<sub>2</sub>S z tryptónu nám signalizuje čiernohnedé sfarbenie papiera.

— **Tvorba indolu (Ramamurthi, 1959)**

Médium:

rovnaké ako pre H<sub>2</sub>S.

Odstránime papier s octanom olovnatým a pridáme 1 až 2 ml éteru a jemne potrasíme. Necháme vrstvy, aby sa oddelili (päť minút). Opatrne pridáme 0,5 ml Kovacsovho činidla (Merck 9293) tak, aby stekalo po povrchu usadeniny.

*Pozitívna reakcia:* prítomnosť indolu nám signalizuje vývoj červeného sfarbenia v žltej vrstve medzi éterom a vodnými frakciami.

— **Rast pri 37 °C (Ramamurthi, 1959)**

Médium:

|                                    |     |
|------------------------------------|-----|
| Živný roztok Difco bacto (č. 0003) | 8 g |
| Destilovaná voda                   | 1 l |

Zamiešame, rozpustíme a rozlejeme do 6 ml skúmaviek.

Sterilizujeme počas 15 minút v autokláve pri teplote 121 °C.

Naočkujeme a inkubujeme pri 37 °C.

*Pozitívna reakcia:* sledujeme rast.

— **Rast v 7 %-nom roztoku chloridu sodného (Ramamurthi, 1959)**

Médium:

|                                    |      |
|------------------------------------|------|
| Živný roztok Difco bacto (č. 0003) | 8 g  |
| NaCl                               | 70 g |
| Destilovaná voda                   | 1 l  |

Zamiešame, rozpustíme a rozlejeme do 6 ml skúmaviek.

Sterilizujeme počas 15 minút v autokláve pri teplote 121 °C.

*Pozitívna reakcia:* sledujeme rast.

— **Hydrolyza želatíny (Lelliott, Billing & Hayward, 1966)**

Médium:

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| Želatína Difco bacto (č. 0143) | 120 g |
| Destilovaná voda               | 1 l   |

Zamiešame, rozpustíme a rozlejeme do 6 ml skúmaviek.

Sterilizujeme počas 15 minút v autokláve pri teplote 121 °C.

*Pozitívna reakcia:* skvapalňovanie želatíny aj pri 5 °C po 30 minútach.



— **Hydrolyza škrobu**

Médium:

|                                       |     |
|---------------------------------------|-----|
| Živný agar Difco bacto (roztopený)    | 1 l |
| Rozpustný škrob Difco bacto (č. 0178) | 2 g |

Zmiešame a počas 10 minút v autokláve sterilizujeme pri 115 °C.

Rozlejeeme na platničky, bodovo naočkujeme.

Po dobrom raste (10 až 20 dní) časť prírastku odstránime a zalejeeme jódovou tinktúrou podľa Lugola.

*Pozitívna reakcia:* hydrolyza škrobu je signalizovaná čírymi plochami pod a okolo baktériovej kultúry, ostatok média ostáva purpurový.

— **Aktivita eskulín-hydrolázy (Sneath & Collins, 1974)**

Médium:

|                    |        |
|--------------------|--------|
| Peptón Difco bacto | 10 g   |
| Eskulín            | 1 g    |
| Citran železitý    | 0,05 g |
| Citran sodný       | 1 g    |
| Destilovaná voda   | 1 l    |

Zložky zmiešame, aby sa rozpustili a roztok po objemoch 6 ml rozdelíme do skúmaviiek. Sterilizujeme počas 10 minút v autokláve pri 115 °C.

Médium je číre, má však modrú fluorescenciu.

*Pozitívna reakcia:* hydrolyzu eskulínu dokazuje vývoj hnedého sfarbenia, spolu s miznutím fluorescencie, čo sa kontroluje pod ultrafialovou lampou.

## REFERENCIE

Bradbury, J. F., 1970, Izolácia a predbežné štúdium baktérií z rastlín (*Isolation and preliminary study of bacteria from plants*), Rev. Pl. Path., 49, 213-218.

Dinesen, I. G., 1984, Získavanie a diagnóza *Corynebacterium sepedonicum* z chorých hlúz zemiaka (Extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers), EPPO Bull. 14 (2), 147-152.

Doetsch, R. N., 1981 Postupy pri určovaní svetelnou mikroskopiou (*Determinative methods of light microscopy*) In: Príručka všeobecných bakteriologických postupov (*Manual of methods for general bacteriology*), American Society for Microbiology, Washington, 21-23.

Hugh, R. & Leifson, F., 1953, Taxonomický význam fermentatívneho metabolizmu glycidov u rôznych Gram-negatívnych baktérií oproti oxidatívneho (*Taxonomix significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria*), J. Bact., 66, 24-26.

Janse, J. D. & van Vaerenberg, J. Výklad postupu ES pre odhalenie latentných infekcií krúžkovitosti (*Corynebacterium sepedonicum*) na zemiakoch (The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato, EPPO Bull., 17, 1987, 1-10.

Kovacs, N., 1956, Identifikácia *Pseudomonas pyocyanea* s pomocou oxidázovej reakcie (*Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidaze reaction*), Nature, Lond., 178, 703.

Lelliot, R. A., 1966, Koryneformné baktérie, patogénne pre rastliny (*The plant pathogenic coryneform bacteria*), J. appl. Bact., 29, 114-118.

Lelliot, R. A., Billing, E. Hayward a A.C., 1966, Určovacia schéma pre fluoreskujúce baktérie rodu *Pseudomonas*, patogénne pre rastliny (*Determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonas*), J. appl. Bact., 29, 470-489.

Lelliot, R. A. & P. W. Sellar, 1976, Odhalenie prítomnosti latentnej krúžkovitosti *Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) v skladovaných zemiakoch (*Detection of latent ring rot (Corynebacterium sepedonicum) (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.*), EPPO Bull., 6 (2), 101-106.

Ramamurthi, C. S., 1959, Porovnávacie štúdie niektorých Gram-pozitívnych baktérií, patogénnych pre rastliny, a ich vzťah k baktériám rodu *Corynebacterium* (*Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria*), Mem. Cornell. agric. Exp. Sta., 366, 52 s.

Skerman, V. B. D., 1967, Príručka na určovanie rodov baktérií, 2. vyd. (*A guide to the identification of the genera of bacteria*, 2<sup>nd</sup> ed.), William and Wilkins Company, Baltimore.

Sneath, P. H. A. & Collins, V. G., 1974, Štúdium reprodukčných testov medzi laboratóriami: skupina pre *Pseudomonas* (*A study in test reproductibility between laboratories: report of Pseudomonas*), Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481-527.

## PRÍLOHA II

1. V prípade každého podozrivého výskytu získaného z výsledkov imunofluorescenčného testu, vykonaného podľa postupu v prílohe I, pri ktorých sa očakáva potvrdenie alebo vyvrátenie tvrdenia po dokončení postupu, mali by sa uchovať alebo primerane zakonzervovať:
    - všetky hľuzy alebo rastliny, z ktorých sa odoberali vzorky, ak je to možné a
    - akýkoľvek zostávajúci výluh a dodatočne pripravené podložné sklíčka z imunofluorescenčného testu, až kým sa tento postup neukončí.
  2. V prípade pozitívneho potvrdenia tohto organizmu, mali by sa uchovať alebo primeraným spôsobom zakonzervovať:
    - materiály uvedené v bode 1 a
    - vzorka infikovaných rastlín baklažánu naočkovaných výluhom z hľúz alebo rastlín a
    - izolované kultúry tohto organizmu,a to počas najmenej jedného mesiaca po oznámení vykonanom podľa článku 5 odsek (2).
-

## PRÍLOHA III

1. Pri stanovení pravdepodobného rozsahu kontaminácie podľa článku 5 odsek (1) b) by sa mali zväziť nasledujúce prvky:
  - hľuzy a rastliny pestované na mieste produkcie označenom v zmysle článku 5 odsek (1) a) za kontaminované,
  - miesta produkcie alebo budovy, výrobným spôsobom spojené s hľuzami alebo rastlinami, označenými v zmysle článku 5 odsek (1) a) za kontaminované vrátane tých, ktoré s nimi užívajú spoločnú mechanizáciu alebo výrobné zariadenia, a to buď priamo, alebo prostredníctvom spoločného dodávateľa,
  - hľuzy alebo rastliny vypestované v miestach produkcie, spomenutých v predchádzajúcom odseku alebo nachádzajúce sa na takýchto miestach produkcie v období, keď sa v budovách alebo na miestach produkcie nachádzali hľuzy alebo rastliny označené v zmysle článku 5 odsek (1) a) za kontaminované,
  - ústredné sklady, v ktorých dochádza k manipulácii so zemiakmi, z vyššie spomenutých miest produkcie,
  - akákoľvek mechanizácia, vozidlo, nádoba, sklad alebo ich jednotka a akýkoľvek iný predmet vrátane obalového materiálu, ktorý sa mohol dostať do styku s hľuzami alebo rastlinami označenými v zmysle článku 5 odsek (1) a) za kontaminované, a to v priebehu predchádzajúcich 12 mesiacov alebo počas obdobia, keď by sa mohol prejavíť ich vplyv,
  - akékoľvek hľuzy alebo rastliny, ktoré sa skladovali alebo sa dostali do styku so stavbami alebo predmetmi, uvedenými v predchádzajúcom odseku, a to pred ich vyčistením alebo dezinfekciou,
  - zahŕňa na základe testovania v zmysle článku 6, hľuzy alebo rastliny rovnakého klonového pôvodu ako hľuzy alebo rastliny označené v zmysle článku 5, odsek (1) a) za kontaminované, ktorých vyšetrenie naznačuje ich pravdepodobnú kontamináciu.
2. Pri stanovení pravdepodobného rozšírenia podľa článku 5 odsek (1) c) by sa mali zväziť nasledujúce prvky:
  - blízkosť iných miest produkcie, v ktorých sa pestujú zemiaky alebo iné hostiteľské rastliny,
  - spoločné užívanie zásob zemiakovej sadby.
3. Podrobnosti oznámenia uvedeného v prvom odstavci článku 5 (2), musia obsahovať nasledujúce:
  - pre akúkoľvek zásielku alebo partiu zemiakov označenú za kontaminovanú, osvedčenia predpísané článkom 7 alebo 8 smernice 77/93/EHS, rastlinný pas alebo registračné číslo,
  - pri zásobách zemiakovej sadby meno odrody, ak je to možné vo všetkých prípadoch,
  - popis základných údajov predmetnej kontaminácie a vyznačenie bezpečnostného pásma,
  - dostupnosť výluhu, pripravených preparátov na podložných sklíčkach pre imunofluorescenčné testy, infikovaný rastlinný materiál baklažánov a izolovanú kultúru tohto organizmu z tých testov, kde sa dospelo k pozitívnemu potvrdeniu tohto organizmu.

## PRÍLOHA IV

1. V článku 7 (1) uvedené opatrenia vykonané pod úradným dozorom s cieľom zničiť hľuzy alebo rastliny označené v zmysle článku 5 (1) a) za kontaminované, musia byť:
  - priemyselne spracované, a to priamou a bezprostrednou dodávkou spracovateľskému závodu vybavenému primeraným odpadovým hospodárstvom, pre ktoré sa stanovilo, že neexistuje žiadne identifikovateľné riziko šírenia tohto organizmu, ktoré je vybavené systémom dezinfekcie skladovacích priestorov a odchádzajúcich vozidiel,
  - iné, a to pod podmienkou, že sa stanovilo, že neexistuje žiadne identifikovateľné riziko šírenia tohto organizmu; takéto opatrenia sa musia oznámiť Európskej komisii a ostatným členským štátom spoločenstva.
2. Primeraným a pod kontrolou zodpovedných úradných orgánov členského štátu spoločenstva vykonaným využitím alebo likvidáciou hľúz alebo rastlín označených v zmysle článku 5 odsek (1) b) za pravdepodobne kontaminované, o ktorých pojednáva článok 7 odsek (2) sa rozumie:
  - použitie zemiakov ako konzumných, zabalených a priamo dodaných na použitie bez opätovného vybalenia alebo
  - použitie na priemyselné spracovanie a ich určenie na priame a bezprostredné dodanie spracovateľskému závodu vybavenému primeraným odpadovým hospodárstvom a možnosťami na dezinfekciu, alebo
  - niektorý iný spôsob použitia alebo likvidácie pod podmienkou, že sa stanoví, že neexistuje identifikovateľné riziko šírenia tohto organizmu.
3. Pod primeraným postupom čistenia a dezinfekcie predmetov, o ktorých pojednáva článok 7 odsek (3), sa rozumie ten, pre ktorý je stanovené, že neexistuje identifikovateľné riziko šírenia tohto organizmu a že sa použije pod dohľadom zodpovedných úradných orgánov členského štátu spoločenstva.
4. Do radu opatrení, ktoré členské štáty spoločenstva v rámci bezpečnostného pásma vyznačeného v zmysle článku 5 odsek (1) c), o ktorom pojednáva článok 7 odsek (4) je zahrnuté nasledujúce:
  - 4.1. na miestach produkcie označených v zmysle článku 5 odsek (1) a) za kontaminované:
    - a) na poli označenom v zmysle článku 5 odsek (1) a) za kontaminované, buď:
      - i) — v priebehu najmenej troch rokov pestovania po roku označenej kontaminácie,
        - sa musia prijať opatrenia na likvidáciu samovysadených zemiakových rastlín a iných, prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín tohto organizmu a
        - nesmú sa vysádzať žiadne hľuzy, rastliny a pravé semená zemiaka alebo iných, prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín tohto organizmu alebo iných plodín, pri ktorých existuje identifikovateľné riziko prežitia či šírenia tohto organizmu, kým toto pole nie je bez výskytu samovysadených rastlín zemiaka počas aspoň dvoch po sebe nasledujúcich pestovateľských rokov,
      - v prvom roku pestovania zemiakov, nasledujúcom po období uvedenom pod predchádzajúcou zarážkou, sa smie vysádzať len úradne uznanú zemiakovú sadbu a z neho pochádzajúce zemiaky určia len na spotrebu či priemyselné spracovanie a musí sa vykonávať úradný prieskum, podrobne popísaný článkom 2 odsek (1),
      - v roku pestovania zemiakov nasledujúcom po období uvedenom pod predchádzajúcou zarážkou a po primeranom oševnom postupe sa smie vysádzať len úradne uznaná zemiaková sadba a z nej pochádzajúce zemiaky smú byť určené buď na výrobu sadby, alebo na spotrebu či priemyselné spracovanie a musí sa vykonávať úradný prieskum podrobne popísaný článkom 2 odsek (1) alebo
    - ii) — počas štyroch pestovateľských rokov nasledujúcich po roku, keď sa vyskytla kontaminácia,
      - sa musia prijať opatrenia na likvidáciu samovysadených rastlín zemiaka a iných, prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín tohto organizmu a
      - toto pole sa musí ponechať či udržiavať úhorom alebo ako trvalý pasienok s častou nízkou kosbou, alebo intenzívnym spásaním,
    - v roku pestovania zemiakov nasledujúcom po období uvedenom pod predchádzajúcou zarážkou a po primeranom oševnom postupe sa smie vysádzať len úradne uznaná zemiaková sadba a z nej pochádzajúce zemiaky smú byť určené buď na výrobu sadby, alebo na spotrebu, či priemyselné spracovanie a musí sa vykonávať úradný prieskum, podrobne popísaný článkom 2 odsek (1);

- b) na ostatných poliach:
- počas pestovateľského roku nasledujúceho po roku označenej kontaminácie:
    - sa buď nesmú vysádzať žiadne hľuzy, rastliny a pravé semená zemiaka alebo iných, prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín tohto organizmu a musia sa prijať opatrenia na likvidáciu samovysadených rastlín zemiaka, alebo
    - sa smie vysádzať len úradne uznaná zemiaková sadba a z nej pochádzajúce zemiaky sa smú použiť len na spotrebu alebo priemyselné spracovanie, a to pod podmienkou, že zodpovedným úradným orgánom sa uspokojivým spôsobom dokáže odstránenie rizika objavenia sa samovysadených rastlín zemiaka druhých, prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín tohto organizmu,
  - počas najmenej dvoch rokov nasledujúcich po období, popísanom pod predchádzajúcou zarážkou, sa smie vysádzať len úradne uznaná zemiaková sadba a z nej pochádzajúce zemiaky smú byť určené ako na výrobu sadby, tak aj na spotrebu či priemyselné spracovanie,
  - v každom z pestovateľských rokov popísaných pod predchádzajúcimi zarážkami sa musia prijať opatrenia na odstránenie samovysadených rastlín zemiaka alebo iných, prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín tohto organizmu a musí sa vykonávať úradný prieskum podrobne popísaný článkom 2 odsek (1),
  - v prípade vysádzania úradne uznannej zemiakovej sadby učenej na spotrebu alebo priemyselné spracovanie, v pestovateľskom roku nasledujúcom po roku označenej kontaminácie pestovaná plodina sa v primeranom čase musí prehliadať a samovysadené rastliny zemiaka musia byť testované na prítomnosť tohto organizmu;
- c) bezprostredne po označenej kontaminácii v zmysle článku 5 odsek (1) a) a v každom z nasledujúcich pestovateľských rokov až po obdobie roku prvého povoleného pestovania zemiakov na poli označenom v zmysle písm. a) tohto odseku za kontaminované, sa všetka mechanizácia a skladovacie priestory v mieste produkcie alebo v jeho rámci zapojené do výroby zemiakov, podľa potreby musia podľa primeraných postupov uvedených v odseku 3 tejto prílohy, očistiť a dezinfikovať;
- d) v tých výrobných systémoch, v ktorých je možné úplne nahradenie pestovateľského substrátu,
- sa nesmú vysádzať žiadne hľuzy, rastliny alebo semená, okrem prípadu, že sa výrobná jednotka podrobila pod úradným dohľadom vykonaným opatreniam eliminácie tohto organizmu a odstránenia akéhokoľvek rastlinného materiálu, patriaceho do rodu zemiak alebo čelade ľulkovitých vrátane aspoň úplnej výmeny pestovateľského substrátu, vyčistenia a dezinfekcie výrobnéj jednotky a všetkého vybavenia a že tejto výrobnéj jednotke bol zo strany zodpovedných úradných orgánov udelený súhlas na pestovanie zemiakov a
  - produkcia zemiakov sa musí uskutočňovať z úradne uznannej zemiakovej sadby alebo z minihlúz, príp. minirastlín pochádzajúcich z testovaných zdrojov;
- 4.2. v rámci vyznačeného bezpečnostného pásma, bez ujmy na opatreniach podrobne opísaných v odseku 4.1 tejto prílohy, sú členské štáty spoločnosti povinné:
- a) bezprostredne po označenej kontaminácii a v priebehu najmenej troch vegetačných období po nej nasledujúcich:
- zabezpečiť zo strany svojich zodpovedných úradných orgánov dozor nad podnikmi pestujúcimi zemiaky a skladujúcimi zemiakové hľuzy a manipulujúcimi s nimi, ako aj podnikmi poskytujúcimi zemiakársku mechanizáciu dodávateľským spôsobom,
  - vyžadovať, aby sa podľa primeraných postupov čistila a dezinfikovala zemiakárska mechanizácia a podľa potreby aj jej skladovacie priestory tak, ako je to uvedené v odseku 3 tejto prílohy,
  - vyžadovať, aby sa v rámci tohto pásma vysádzala len úradne uznaná zemiaková sadba,
  - vyžadovať, aby sa vo všetkých podnikoch v rámci tohto pásma s hľuzami zemiaka, určenými na ďalšie vysádzanie, narábalo oddelene od ostatných,
  - v zmysle článku 2 odsek (1) vykonávať úradné prieskumy;
- b) v priebehu primeraného obdobia a podľa potreby zaviesť program výmeny všetkého sadbového materiálu zemiaka.
- Opatrenia zavedené v zmysle odseku 4.2 tejto prílohy, spolu s registráciou čísiel výrobcov, spoločných skladov a rozvozných stredísk v rámci vyznačeného bezpečnostného pásma, sa každoročne musia oznamovať ostatným členským štátom spoločnosti a Komisii.
-