II

(Nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

RAT

RICHTLINIE 93/85/EWG DES RATES

vom 4. Oktober 1993

zur Bekämpfung der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel

DER RAT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft, insbesondere auf Artikel 43,

auf Vorschlag der Kommission (1),

nach Stellungnahme des Europäischen Parlaments (2),

nach Stellungnahme des Wirtschafts- und Sozialausschusses (3),

in Erwägung nachstehender Gründe:

Die Kartoffelerzeugung nimmt in der Landwirtschaft der Gemeinschaft einen wichtigen Platz ein. Die Ernteerträge sind jedoch ständig durch Schadorganismen bedroht.

Mit dem Schutz des Kartoffelanbaus gegen diese Schadorganismen soll nicht nur die Produktionskapazität erhalten, sondern auch die Produktivität der Landwirtschaft gesteigert werden.

Die Schutzmaßnahmen gegen die Einschleppung von Schadorganismen in das Gebiet eines Mitgliedstaats wären nur von begrenzter Wirkung, wenn diese Schadorganismen nicht in der gesamten Gemeinschaft gleichzeitig systematisch bekämpft und nicht Maßnahmen zur Verhinderung ihrer Ausbreitung getroffen würden.

Einer der für die Kartoffel gefährlichen Schadorganismen ist Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., der Erreger der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel. Diese Krankheit ist in einigen Teilen der Gemeinschaft aufgetreten, und es gibt immer noch einige kleinere Befallsherde.

Der Kartoffelanbau in der gesamten Gemeinschaft ist in beträchtlichem Maße gefährdet, wenn nicht wirksame Maßnahmen getroffen werden, um den Krankheitsherd zu ermitteln, das Auftreten der Krankheit zu verhüten bzw. diese nach der Feststellung zu bekämpfen, um einer Verschleppung vorzubeugen bzw. die Krankheit zu tilgen.

Um dies sicherzustellen, müssen in der Gemeinschaft bestimmte Maßnahmen getroffen werden. Außerdem müssen die Mitgliedstaaten die Möglichkeit haben, notfalls zusätzliche oder strengere Maßnahmen zu treffen, sofern der innergemeinschaftliche Handel mit Kartoffeln nicht über das nach der Richtlinie 77/93/EWG des Rates vom 21. Dezember 1976 über Maßnahmen zum Schutz der Gemeinschaft gegen die Einschleppung und Ausbreitung von Schadorganismen der Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse (4) zulässige Maß hinaus behindert wird. Diese Maßnahmen sind den übrigen Mitgliedstaaten und der Kommission mitzuteilen.

Mit der Richtlinie 80/665/EWG des Rates vom 24. Juni 1980 zur Bekämpfung der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel (5) sind die von den Mitgliedstaaten gegen diese Krankheit zu treffenden Mindestmaßnahmen festgelegt worden.

(1) ABl. Nr. C 93 vom 2. 4. 1993, S. 12.
(2) ABl. Nr. C 176 vom 28. 6. 1993, S. 210.
(3) ABl. Nr. C 161 vom 14. 6. 1993, S. 18.
(4) ABl. Nr. L 26 vom 31. 1. 1977, S. 20. Richtlinie zuletzt geändert durch die Richtlinie 92/103/EWG der Kommission (ABl. Nr. L 363 vom 11. 12. 1992, S. 1).
(5) ABl. Nr. L 180 vom 14. 7. 1980, S. 30.

Seither hat es neue wichtige Erkenntnisse in bezug auf die bakterielle Ringfäule und die Ermittlung des Erregers der bakteriellen Ringfäule gegeben.

Zur Anwendung der gemeinschaftlichen Pflanzenschutzregelung in einer Gemeinschaft ohne Binnengrenzen war die Überprüfung und Neufassung einiger Vorschriften der Richtlinie 80/665/EWG erforderlich.

Dabei hat sich gezeigt, daß die Vorschriften der Richtlinie unzureichend sind und daß die Maßnahmen genauer umschrieben werden müssen.

Angesichts dessen sollte die Richtlinie 80/665/EWG aufgehoben und sollten die erforderlichen Maßnahmen erlassen werden.

Es muß berücksichtigt werden, daß der Erreger latent und unentdeckt sowohl in Feldbeständen als auch in eingelagerten Kartoffelknollen überleben und daher wirksam nur durch die Erzeugung und Verwendung von befallsfreien Pflanzkartoffeln bekämpft werden kann; zur Feststellung der Krankheit und zur Ermittlung ihres Ausgangspunktes sind darüber hinaus systematische amtliche Untersuchungen nötig. Die Ausbreitung des Erregers in Feldbeständen stellt nicht den wichtigsten Faktor dar, doch kann der Erreger im Durchwuchs überwintern, der damit die bedeutendste Infektionsquelle für die Übertragung von einer Vegetationsperiode zur nächsten darstellt. Die Verbreitung erfolgt hauptsächlich durch Kontakt mit befallenen Kartoffeln, mit Pflanz-, Ernte- und anderen Maschinen oder Geräten sowie mit Transport- oder Lagerbehältnissen, die durch früheren Kontakt mit befallenen Kartoffeln kontaminiert worden sind. Diese kontaminierten Gegenstände können während einer gewissen Zeit Träger von Krankheitserregern bleiben. Die Ausbreitung des Erregers kann durch Desinfizierung dieser Gegenstände eingedämmt oder verhindert werden. Die Kontamination von Pflanzkartoffeln stellt eine sehr große Gefahr im Hinblick auf die Verbreitung des Erregers dar.

Zur Festlegung der Einzelheiten dieser allgemeinen Maßnahmen sowie der strengeren oder zusätzlichen Maßnahmen, die von den Mitgliedstaaten getroffen werden können, um die Einschleppung des Erregers auf ihr Gebiet zu verhindern, empfiehlt es sich, daß die Mitgliedstaaten mit der Kommission in dem Ständigen Ausschuß für Pflanzenschutz, nachstehend „Ausschuß" genannt, eng zusammenarbeiten —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

Diese Richtlinie betrifft die in den Mitgliedstaaten zu treffenden Maßnahmen gegen Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicus (Spieckermann et Korthoff) Davis et al., den Erreger der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel (nachstehend „der Schadorganismus" genannt), mit denen folgendes erreicht werden soll:

a) Ermittlung des Ausgangspunktes der Krankheit und Feststellung ihrer Verbreitung,

b) Verhütung des Auftretens und der Ausbreitung bzw.

c) bei Befall Verhütung der Ausbreitung und Bekämpfung mit dem Ziel der Tilgung.

Artikel 2

(1) Die Mitgliedstaaten führen systematische amtliche Erhebungen über das Auftreten des Schadorganismus an Kartoffelknollen und erforderlichenfalls Kartoffelpflanzen (Solanum tuberosum L.) mit Ursprung auf ihrem Gebiet durch, um die Befallsfreiheit zu bestätigen.

Für diese Erhebungen werden im Fall von Kartoffelknollen Proben von Pflanzkartoffeln und anderen Kartoffeln, vorzugsweise aus eingelagerten Partien, entnommen und nach dem Verfahren des Anhangs I amtlichen oder amtlich überwachten Laboruntersuchungen zur Feststellung und Diagnose des Schadorganismus unterzogen. Zusätzlich kann gegebenenfalls eine amtliche oder amtlich überwachte Beschau nach Durchschneiden von Knollen aus anderen Proben vorgenommen werden.

Im Fall von Kartoffelpflanzen werden diese Erhebungen nach geeigneten Verfahren durchgeführt und die Proben amtlichen oder amtlich überwachten Untersuchungen unterzogen.

Anzahl, Herkunft und Zusammensetzung der Proben und der Entnahmezeitpunkt werden von den zuständigen amtlichen Stellen im Sinne der Richtlinie 77/93/EWG nach anerkannten wissenschaftlichen und statistischen Grundsätzen und nach Maßgabe der Biologie des Schadorganismus sowie unter Berücksichtigung der besonderen Kartoffelerzeugungssysteme der betreffenden Mitgliedstaaten festgelegt. Die diesbezüglichen Einzelheiten werden jährlich den übrigen Mitgliedstaaten und der Kommission mitgeteilt, um die Gleichwertigkeit der Garantien der Mitgliedstaaten in bezug auf die Befallsfreiheit zu gewährleisten.

(2) Die übrigen Mitgliedstaaten und die Kommission werden mindestens einmal jährlich über die Ergebnisse der in Absatz 1 genannten amtlichen Erhebungen unterrichtet. Die Einzelheiten dieser Unterrichtung sind vertraulich. Sie können dem Ausschuß nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG vorgelegt werden.

(3) Nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG können festgelegt werden:

— die Einzelheiten der in Absatz 1 vorgesehenen Erhebungen, die nach anerkannten wissenschaftlichen und statistischen Grundsätzen durchzuführen sind;

— die Einzelheiten der in Absatz 2 vorgesehenen Unterrichtung.

(4) Nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG wird folgendes festgelegt:

— das geeignete Verfahren für die Erhebungen und die Untersuchungen gemäß Absatz 1 Unterabsatz 3.

Artikel 3

Die Mitgliedstaaten sorgen dafür, daß jeglicher Verdacht des Auftretens des Schadorganismus in ihrem Hoheitsgebiet oder die Bestätigung eines solchen Verdachts bei Kartoffelpflanzen oder -knollen bzw. geernteten, eingelagerten oder vermarkteten Kartoffelknollen ihren hierfür zuständigen amtlichen Stellen gemeldet wird.

Artikel 4

(1) Bei Verdacht des Auftretens des Schadorganismus müssen die zuständigen amtlichen Stellen des Mitgliedstaats, in dem diese Verdachtsfälle gemeldet worden sind, gewährleisten, daß amtliche oder amtlich überwachte Laboruntersuchungen nach dem Verfahren des Anhangs I und in Anwendung der Vorschriften gemäß Anhang II Nummer 1 durchgeführt und abgeschlossen werden, um den Verdacht abzuklären. Bei Bestätigung des Verdachts gelten die Vorschriften gemäß Anhang II Nummer 2.

(2) Bis zur Abklärung des Verdachts im Sinne von Absatz 1 müssen bei Verdachtsfällen, bei denen

i) verdächtige sichtbare Symptome der Krankheit diagnostiziert wurden oder

ii) ein Immunfluoreszenztest gemäß Anhang I oder ein anderer geeigneter Test positiv ausgefallen ist,

die zuständigen amtlichen Stellen der Mitgliedstaaten

a) die Verbringung aller Partien oder Sendungen verbieten, aus denen die Proben entnommen worden sind, es sei denn, die Verbringung erfolgt unter ihrer Überwachung und es ist nachgewiesen worden, daß keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht;

b) Schritte unternehmen, um den Ursprung des vermuteten Befalls festzustellen;

c) auf der Grundlage einer Risikoeinschätzung weitere angemessene Vorsichtsmaßnahmen treffen, um eine Verschleppung des Schadorganismus zu verhindern; hierzu gehört unter Umständen auch die amtliche Kontrolle der Verbringung aller sonstigen Knollen oder Pflanzen innerhalb von oder aus Betrieben, die mit dem vermuteten Auftreten in Zusammenhang stehen.

(3) Nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG können festgelegt werden:

— die Maßnahmen gemäß Absatz 2 Buchstabe c).

(4) Nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG wird festgelegt:

— der andere geeignete Test gemäß Absatz 2 Ziffer ii).

Artikel 5

(1) Wird bei amtlichen oder amtlich überwachten Laboruntersuchungen, die nach dem Verfahren des Anhangs I durchgeführt werden, der Verdacht auf ein Vorhandensein des Schadorganismus in einer Probe von Knollen, Pflanzen oder Pflanzenteilen bestätigt, so müssen die zuständigen amtlichen Stellen eines Mitgliedstaats unter Berücksichtigung anerkannter wissenschaftlicher Grundsätze, der Biologie des Schadorganismus und der besonderen Produktions-, Vermarktungs- und Verarbeitungssysteme in dem betreffenden Mitgliedstaat

a) die Knollen oder Pflanzen, die Partie und/oder Sendung, die Geräte, Fahrzeuge, Schiffe, Lagerräume oder Teile davon und alle anderen Gegenstände einschließlich Verpackungsmaterial, aus denen die Probe entnommen wurde, sowie gegebenenfalls den (die) Produktionsort(e) und die Anbaufläche(n), in denen die Knollen oder Pflanzen geerntet wurden, für kontaminiert erklären;

b) unter Berücksichtigung von Anhang III Nummer 1 das Ausmaß der wahrscheinlichen, durch Kontakt vor oder nach Ernte oder durch produktionstechnische Berührungspunkte hervorgerufenen Kontamination bestimmen und

c) auf der Grundlage der Kontaminationserklärung gemäß Buchstabe a), der Bestimmung des Ausmaßes der wahrscheinlichen Kontamination gemäß Buchstabe b) und der möglichen Ausbreitung des Schadorganismus eine Zone (Sicherheitszone) unter Berücksichtigung von Anhang III Nummer 2 abgrenzen.

(2) Die Mitgliedstaaten unterrichten die übrigen Mitgliedstaaten und die Kommission gemäß Anhang III Nummer 3 unverzüglich über jede Kontaminationserklärung gemäß Absatz 1 Buchstabe a) und die Einzelheiten der Zonenabgrenzung gemäß Absatz 1 Buchstabe c).

Die Einzelheiten dieser Unterrichtung sind vertraulich. Sie können dem Ausschuß nach dem Verfahren des Artikel 16a der Richtlinie 77/93/EWG vorgelegt werden.

(3) Infolge der Unterrichtung gemäß Absatz 2 und der dabei mitgeteilten Einzelheiten geben andere darin genannte Mitgliedstaaten gegebenenfalls Kontaminationserklärungen gemäß Absatz 1 Buchstabe a) ab, bestimmen das Ausmaß der wahrscheinlichen Kontamination gemäß Absatz 1 Buchstabe b) und grenzen eine Sicherheitszone gemäß Absatz 1 Buchstabe c) ab.

Artikel 6

Für den Fall, daß Knollen oder Pflanzen gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) für kontaminiert erklärt worden sind, schreiben die Mitgliedstaaten vor, daß der Kartoffelbestand, der mit dem befallenen Bestand klonal verbunden ist, gemäß Artikel 4 Absatz 1 untersucht wird. Die Untersuchungen werden vorzugsweise nach Risikograd vorgenommen und erfassen so viele Knollen oder Pflanzen, wie nötig sind, um den wahrscheinlichen Ausgangspunkt und das Ausmaß der wahrscheinlichen Kontamination festzustellen.

Je nach Untersuchungsergebnis wird gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a), b) bzw. c) gegebenenfalls eine weitere Kontaminationserklärung vorgenommen, das Ausmaß der wahrscheinlichen Kontamination neu bestimmt und die Sicherheitszone neu abgegrenzt.

Artikel 7

(1) Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß Knollen oder Pflanzen, die gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) für kontaminiert erklärt worden sind, nicht angebaut werden dürfen und unter Kontrolle der zuständigen amtlichen Stellen

— entweder vernichtet oder

— im Rahmen einer amtlich überwachten Maßnahme oder amtlich überwachter Maßnahmen gemäß Anhang IV Nummer 1 auf andere Weise beseitigt werden, sofern nachweislich keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht.

(2) Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß Knollen oder Pflanzen, die gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe b) für wahrscheinlich kontaminiert erklärt worden sind, nicht angebaut werden dürfen und unbeschadet der Ergebnisse der in Artikel 6 genannten Untersuchung von klonal verbundenen Beständen unter Überwachung der zuständigen amtlichen Stellen einer geeigneten Verwendung oder Behandlung gemäß Anhang IV Nummer 2 zugeführt werden, sofern nachweislich keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht.

(3) Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß Geräte, Fahrzeuge, Schiffe, Lagerräume oder Teile davon und alle anderen Gegenstände einschließlich Verpackungsmaterial, die gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) für kontaminiert oder gemäß Buchstabe b) für wahrscheinlich kontaminiert erklärt worden sind, entweder vernichtet oder nach geeigneten Verfahren gemäß Anhang IV Nummer 3 gereinigt und desinfiziert werden müssen. Nach der Desinfizierung gelten diese Gegenstände als nicht mehr kontaminiert.

(4) Unbeschadet der Maßnahmen gemäß den Absätzen 1, 2 und 3 schreiben die Mitgliedstaaten für die Sicherheitszone gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe c) das Maßnahmenpaket gemäß Anhang IV Nummer 4 vor.

Artikel 8

(1) Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß Pflanzkartoffeln den Anforderungen der Richtlinie 77/93/EWG genügen und in direkter Linie von Pflanzenmaterial stammen müssen, das im Rahmen eines amtlich genehmigten Programms gewonnen und infolge von Untersuchungen, die entweder amtlich oder unter amtlicher Überwachung nach dem Verfahren des Anhangs I durchgeführt worden sind, als frei vom Schadorganismus befunden wurde.

Die vorgenannten Untersuchungen werden durchgeführt

— in den Fällen, in denen die Pflanzkartoffelerzeugung von der Kontamination betroffen ist, an den Pflanzen des klonalen Ausgangsmaterials;

— in anderen Fällen entweder an den Pflanzen des klonalen Ausgangsmaterials oder an repräsentativen Stichproben des Basispflanzguts oder früherer Generationen.

(2) Nach dem Verfahren des Artikel 16a der Richtlinie 77/93/EWG können festgelegt werden:

— die Durchführungsbestimmungen zu Absatz 1 Unterabsatz 2 erster Gedankenstrich und

— die Vorschriften betreffend die repräsentativen Stichproben gemäß Absatz 1 Unterabsatz 2 zweiter Gedankenstrich.

Artikel 9

Die Mitgliedstaaten verbieten das Halten des Schadorganismus sowie das Arbeiten mit diesem Schadorganismus.

Artikel 10

Unbeschadet der Bestimmungen der Richtlinie 77/93/EWG können die Mitgliedstaaten für wissenschaftliche Untersuchungen und Versuche sowie Züchtungsvorhaben Ausnahmen von den in den Artikeln 6, 7 und 9 der vorliegenden Richtlinie genannten Maßnahmen zulassen, soweit hierdurch die Bekämpfung des Schadorganismus nicht beeinträchtigt wird und keine Gefahr seiner Verschleppung entsteht.

Artikel 11

Die Mitgliedstaaten können erforderlichenfalls zusätzliche oder strengere Maßnahmen zur Bekämpfung des Schadorganismus oder zur Verhütung seiner Ausbreitung erlassen, sofern sie mit den Bestimmungen der Richtlinie 77/93/EWG in Einklang stehen.

Zu den zusätzlichen Maßnahmen nach Absatz 1 kann die Vorschrift gehören, daß nur Pflanzkartoffeln angebaut werden dürfen, die amtlich zertifiziert bzw. amtlich darauf untersucht worden sind, daß sie die erforderlichen Pflanzenschutzvorschriften erfüllen. Diese Vorschrift könnte ins-

besondere in Fällen Anwendung finden, bei denen Erzeuger in ihrem eigenen Betrieb Pflanzkartoffeln aus eigenem Anbau verwenden dürfen, sowie in anderen Fällen, in denen selbsterzeugte Pflanzkartoffeln angebaut werden.

Die Einzelheiten dieser Maßnahmen werden den übrigen Mitgliedstaaten und der Kommission mitgeteilt.

Artikel 12

Die aufgrund neuer wissenschaftlicher und technischer Erkenntnisse notwendig werdenden Änderungen der Anhänge dieser Richtlinie werden nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG vorgenommen.

Artikel 13

(1) Die Mitgliedstaaten erlassen und veröffentlichen bis zum 15. November 1993 die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften, um dieser Richtlinie nachzukommen. Sie unterrichten die Kommission unverzüglich davon.

Wenn die Mitgliedstaaten diese Vorschriften erlassen, nehmen sie in den Vorschriften selbst oder durch einen Hinweis bei der amtlichen Veröffentlichung auf diese Richtlinie Bezug. Die Mitgliedstaaten regeln die Einzelheiten der Bezugnahme.

Sie wenden diese Vorschriften ab 16. November 1993 an.

(2) Die Mitgliedstaaten teilen der Kommission unverzüglich alle innerstaatlichen Rechtsvorschriften mit, die sie auf dem unter diese Richtlinie fallenden Gebiet erlassen. Die Kommission setzt die anderen Mitgliedstaaten davon in Kenntnis.

Artikel 14

Die Richtlinie 80/665/EWG wird zum 16. November 1993 aufgehoben.

Artikel 15

Diese Richtlinie ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

Geschehen zu Luxemburg am 4. Oktober 1993.

Im Namen des Rates

Der Präsident

W. CLAES

ANHANG I

VERFAHREN ZUR ERMITTLUNG UND IDENTIFIZIERUNG DES RINGFÄULEBAKTERIUMS CLAVIBACTER MICHIGANENSIS (SMITH) DAVIS ET AL. SSP. SEPEDONICUS (SPIEKERMANN ET KOTTHOFF) DAVIS ET AL. IN EINHEITEN VON KARTOFFELKNOLLEN

1. **Entnahme von Gewebeproben am Nabelende**

1.1. 200 Knollen unter fließendem Leitungswasser waschen; sodann mit einem ordnungsgemäß desinfizierten Skalpell oder Kartoffelschäler die Epidermis um das Nabelende jeder Knolle entfernen; die Desinfektion kann durch Eintauchen des Kartoffelschälers in 70%iges Äthanol und durch Abflammen erfolgen.

1.2. Mit einem Messer oder einem Kartoffelschäler sorgfältig kegelförmige Gewebestücke aus den Nabelenden herausschneiden. Dabei ist darauf zu achten, daß vor allem vaskuläres Gewebe erfaßt wird. Die Nabelenden sollten, sobald sie entfernt sind, innerhalb von 24 Stunden verarbeitet (Abschnitt 3) oder höchstens 2 Wochen lang bei – 20 °C aufbewahrt werden.

2. **Visuelle Prüfung der Ringfäulesymptome**

Nach dem Entfernen der Nabelenden jede Knolle quer durchschneiden und auf Ringfäulesymptome untersuchen.

Druck auf die Knollen ausüben und feststellen, ob aus dem Gefäßbündel mazeriertes Gewebe austritt.

Die frühesten Symptome bestehen in einer leichten Glasigkeit oder Durchsichtigkeit des Gewebes ohne Erweichung um das Gefäßsystem herum, insbesondere in der Nähe des Nabelendes. Der Gefäßbündelring am Nabelende kann eine leicht dunklere Färbung als üblich aufweisen. Das erste ohne weiteres erkennbare Symptom besteht darin, daß der Gefäßbündelring gelblich gefärbt ist und, wenn auf die Knolle ein leichter Druck ausgeübt wird, aus den Gefäßen in Form kleiner Säulen eine käsige Substanz austritt. Diese Exsudation enthält Millionen von Bakterien. In diesem Stadium kann sich eine Braunfärbung des Gefäßgewebes entwickeln. Diese Symptome können zunächst auf einen Teil des Rings, der sich nicht unbedingt in der Nähe des Nabelendes befinden muß, beschränkt sein und sich dann allmählich auf den gesamten Ring ausdehnen. Mit fortschreitender Infektion wird das Gefäßgewebe zerstört, die Rindenzone kann vom inneren Gewebe getrennt werden. In fortgeschrittenen Stadien der Infektion erscheinen auf der Oberfläche der Knolle Risse, die an den Rändern oft eine gelblich-braune Färbung aufweisen. Sekundärer Pilz- oder Bakterienbefall kann die Symptome verschleiern, und es ist dann vielleicht schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, die Symptome einer fortgeschrittenen Ringfäule von anderen Knollenfäulen zu unterscheiden.

3. **Zubereitung von Proben für die Gram-Färbung, die Immunfluoreszenz-Färbung (IF) und den Eierfruchttest**

3.1. Die Nabelenden werden unterhalb 30 °C gerade bis zur vollständigen Mazerierung homogenisiert. Die Mazeration kann mit Hilfe eines für *Corynebacterium sepedonicum* nichttoxischen Verdünnungsmittels erzielt werden (z.B. 0,05 M phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,0); die Zugabe eines nichttoxischen Verflüssigungsmittels ist anzuraten, und es kann sich als notwendig erweisen, ein nichttoxisches Schaumverhütungsmittel zu verwenden (Anlagen 1 und 2). Eine zu starke Mazeration sollte vermieden werden.

3.2. Die Bakterien werden durch eines der folgenden Verfahren [1] aus dem Homogenat extrahiert:

A. a) Bei höchstens 180 g 10 Minuten lang zentrifugieren.

b) Den Überstand bei höchstens 4 000 g 10 Minuten lang zentrifugieren. Den Überstand abgießen und entfernen.

B. a) Das Mazerat 30 Minuten lang stehen lassen, damit die Gewebestücke sich absetzen können. Den Überstand abgießen, ohne daß der Satz aufgerührt wird.

b) Den Überstand durch Filterpapier (Whatman Nr. 1) in einen gesinterten Glasfilter (Nr. 2 = 40 bis 100 µm) unter Verwendung einer Wasservakuumpumpe filtrieren. Das Filtrat in einem Zentrifugenröhrchen sammeln. Den Filter mit sterilem PBS bis auf ein Filtratvolumen von maximal 35 ml spülen.

c) Das Filtrat bei höchstens 4 000 g 20 Minuten lang zentrifugieren.

3.3. Das Pellet in sterilem 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,2 (Anlage 2) suspendieren, so daß ein Gesamtvolumen von etwa 1 ml erreicht wird. In zwei gleiche Teile teilen und einen Teil nach Einfrieren auf – 20 °C [2] oder nach Gefriertrocknung zu Referenzzwecken aufbewahren. Den anderen Teil in zwei Hälften teilen, deren eine für den IF-Test und die Gram-Färbung und deren andere für den Eierfruchttest verwendet wird.

---

[1] Ein alternatives Gewinnungsverfahren wird von Dinesen, 1984, angegeben.

[2] Es gibt Anzeichen dafür (Janse und Van Vaerenberg, 1987), daß das Einfrieren die Lebensfähigkeit von Corynebacterium sepedonicum verringert. Mit einer Suspension des Pellets in 10%igem Glyzerin läßt sich dieses Problem lösen.

3.4. Alle positiven *C.-sepedonicum*-Kontrollen und -proben müssen unbedingt getrennt behandelt werden, damit eine Kontamination vermieden wird. Dies gilt für IF-Objektträger und Eierfruchttests.

4. **Gram-Färbung**

4.1. Gram-Färbetests für alle Pellet-Verdünnungen (Abschnitt 5.2.1) sowie für alle aufgeschnittenen Knollen (Abschnitt 2), die Glasigkeit, Fäulnis oder andere verdächtige Symptome aufweisen, zubereiten. Die Proben sollten vom Rande der erkrankten Gewebe genommen werden.

4.2. Gram-Färbetests für bekannte *C.-sepedonicum*-Kulturen und, wenn möglich, für natürlich infiziertes Gewebe zubereiten (Abschnitt 5.1).

4.3. Bestimmen, welche Proben typische Gram-positive coryneforme Zellen enthalten. Im allgemeinen sind *C.-sepedonicum*-Zellen 0,8 bis 1,2 µm lang umd 0,4 bis 0,6 µm breit.

Ein geeignetes Färbungsverfahren wird in Anlage 3 gegeben.

Präparate aus natürlich infizierten Kulturen oder erst vor kurzer Zeit isolierten Kulturen weisen häufig ein Vorherrschen kokkenähnlicher Stäbchen auf, die in der Regel ein wenig kleiner sind als die Zeilen von älteren Agarkulturen. Auf den meisten Kulturmedien sind *C.-sepedonicum*-Zellen vielgestaltige coryneforme Stäbchen, die eine variable Gram-Reaktion zeigen können. Die Zellen erscheinen einzeln, paarweise, mit den für eine winklige Teilung typischen „Ellbogen", und gelegentlich in unregelmäßigen Gruppen und ähneln dann chinesischen Buchstaben.

5. **Schema für den IF-Test**

5.1. Antiserum für einen bekannten Stamm von *C. sepedonicum* verwenden: ATCC 33113 (NCPPB 2137) oder NCPPB 2140. Es sollte einen IF-Titer von mehr als 1:600 haben. Eine PBS-Kontrolle auf dem Testobjektträger einbeziehen, um zu bestimmen, inwieweit sich das Fluorescein-Isothiozyanat-Konjugat (FITC) auch nichtspezifisch mit Bakterienzellen verbindet. *Corynebacterium sepedonicum* (ATCC 33113 (NCPPB 2137), NCPPB 2140) sollte als homologe Antigenkontrolle auf einem gesonderten Objektträger verwendet werden. In natürlicher Weise infiziertes Gewebe (das durch Gefriertrocknung oder Einfrieren auf −20 °C haltbar gemacht wurde) sollte möglichst als eine gleichartige Probe auf demselben Objektträger verwendet werden (Abbildung 2).

5.2. *Verfahren*

5.2.1. Drei aufeinanderfolgende Zehnfachverdünnungen (10^1, 10^2, 10^3) des restlichen Pellets in destilliertem Wasser zubereiten (Abbildung 1).

5.2.2. Pro Feld eines Multi-Objektträgers wie in Abbildung 1 ein bestimmtes, für die Bedeckung des Fensters ausreichendes Standardvolumen (circa 25 µl) jeder Pellet-Verdünnung oder *C.-sepedonicum*-Suspension (circa 10^6 Zellen/ml) pipettieren.

Abbildung 1

Objektträger für Proben und PBS-Kontrolle

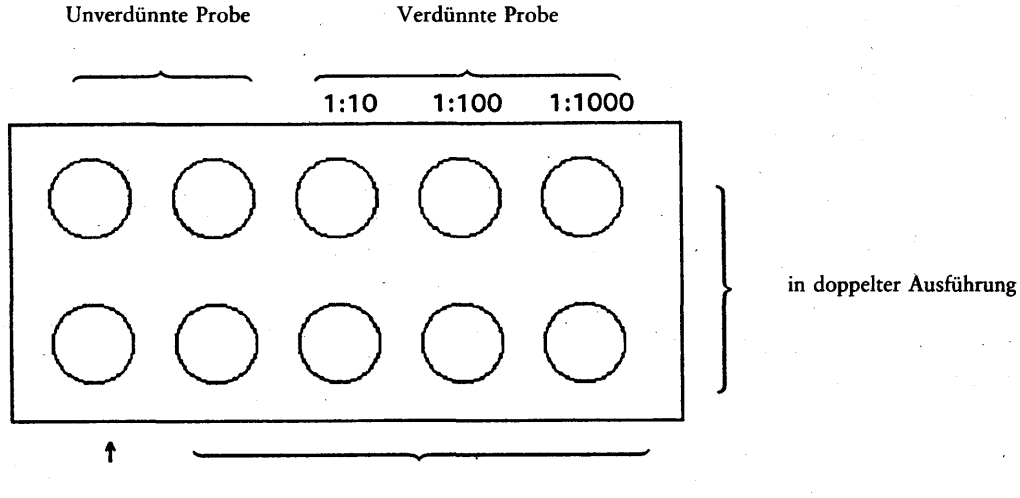
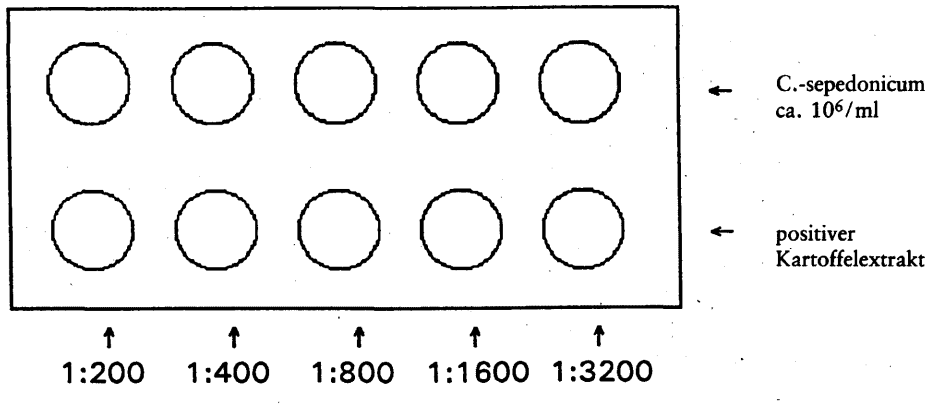


Abbildung 2

Positiver Kontrollobjektträger



5.2.3. Bei etwa 37 °C lufttrocknen lassen und mit 95%igem Äthanol oder durch Abflammen fixieren.

5.2.4. Die entsprechenden Felder mit *C.-sepedonicum*-Antiserum in den empfohlenen Verdünnungen (0,01 M PBS pH 7,2; Anlage 2), wie in Abbildung 1 gezeigt, bedecken. (PBS auch für die FITC-Kontrolle verwenden.) Die zur Arbeit verwendete Verdünnung des Antiserums sollte etwa halb so groß wie der IF-Titer sein. Sollen andere Antiserum-Verdünnungen einbezogen werden, so sollten gesonderte Objektträger für jede zu verwendende Verdünnung vorbereitet werden.

5.2.5. Objektträger in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur 30 Minuten lang bebrüten.

5.2.6. Sorgfältig mit 0,01 M PBS pH 7,2 spülen. Dreimal jeweils fünf Minuten lang mit 0,01 M PBS pH 7,2 waschen.

5.2.7. Sorgfältig die überschüssige Flüssigkeit entfernen.

5.2.8. Jedes Feld mit FITC-Konjugat in derselben Verdünnung bedecken, die verwendet wurde, um den Titer zu bestimmen, und in einer dunklen feuchten Kammer bei Raumtemperatur 30 Minuten lang bebrüten.

5.2.9. Spülen und waschen wie oben.

5.2.10. Etwa 5 bis 10 µl 0,1 M phosphatgepuffertes Glycerin ph 7,6 (oder ein ähnliches Einbettungsmittel mit einem ph-Wert von nicht weniger als 7,6) auf jedes Feld applizieren und mit einem Deckglas abdecken (Anlage 2).

5.2.11. Mit einem Mikroskop prüfen, das mit einer epifluoreszenten Lichtquelle und für die Arbeit mit FITC-geeigneten Filtern ausgerüstet ist. Eine 400- bis 1 000-fache Vergrößerung ist angemessen. Jedes Feld in zwei rechtwinklig zueinanderstehenden Durchmessern sowie am Feldrand entlang mikroskopisch untersuchen.

Fluoreszierende Zellen in den positiven Kontrollen beobachten und den Titer bestimmen. Fluoreszierende Zellen im FITC/PBS-Kontrollfeld suchen und, wenn keine solchen Zellen zu finden sind, zu den Testfeldern übergehen. In mindestens zehn Mikroskopierfeldern die durchschnittliche Anzahl morphologisch typischer fluoreszierender Zellen je Feld bestimmen und die Anzahl im unverdünnten Pellet (je ml) berechnen (Anlage 4).

Beim Immunfluoreszenz-Test ergeben sich mehrere Probleme:

— Hintergrundpopulationen fluoreszierender Zellen mit atypischer Morphologie und kreuzreagierender saprophytischer Bakterien mit einer Größe und Morphologie, die *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicum* ähnlich sind, kommen vielfach in Kartoffelpellets vor. Zu berücksichtigen sind nur fluoreszierende Zellen mit typischer Größe und Morphologie.

Wegen der Möglichkeit von Kreuzreaktionen sollten Proben mit einem positiven Immunfluoreszenz-Ergebnis mit einem anderen Antiserum erneut getestet werden.

— Die technische Ermittlungsgrenze dieser Methode liegt zwischen 10^3 und 10^4 Zellen je ml unverdünnten Pellets. Proben mit einer Anzahl von IF-typischen Zellen an der Ermittlungsgrenze sind bei *C.m.* ssp. *sepedonicum* in der Regel negativ, können aber für den Eierfruchttest verwendet werden.

Ein Immunfluoreszenztest wird für jede Probe als negativ bezeichnet, wenn keine morphologisch typischen fluoreszierenden Zellen gefunden werden. Die Proben gelten als „nicht mit *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* kontaminiert" .

Der Eierfruchttest ist nicht erforderlich.

Ein Immunfluoreszenztest wird als positiv bezeichnet, wenn in der entsprechenden Probe morphologisch typische fluoreszierende Zellen gefunden werden. Proben, bei denen mit beiden Antiseren ein positiver Immunfluoreszenztest festgestellt worden ist, gelten als *„potentiell* mit *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus kontaminiert"*.

Der Eierfruchttest ist bei allen Proben erforderlich, die als potentiell kontaminiert gelten.

6. **Eierfruchttest**

Zu den Einzelheiten der Kultur siehe Anlage 5.

6.1. Das Pellet im Sinne von Abschnitt 3.3 wird auf mindestens 25 Eierfrüchte im Blattstadium 3 (Anlage 5) verteilt, und zwar nach einer der nachstehenden Methoden (Abschnitte 6.2, 6.3 oder 6.4).

6.2. *Schlitzinokulation I*

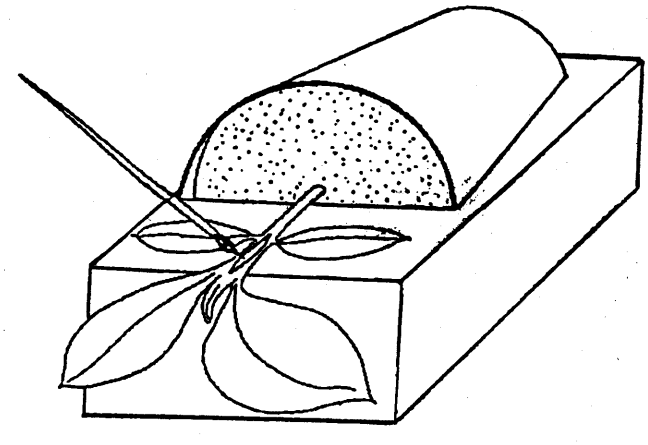
6.2.1. Töpfe waagerecht fixieren (Block aus expandiertem Polystrol mit einer ca. 5 cm tiefen, 10 cm breiten und 15 cm langen Aushöhlung aus der Oberfläche (Abbildung 3), reicht für einen 10-cm-Topf aus). Ein Streifen steriler Aluminiumfolie sollte zwischen dem Stengel und dem Block für jede getestete Probe plaziert werden. Die Eierfrucht kann durch ein um den Block geschlungenes Gummiband festgehalten werden.

6.2.2. Mit einem Skalpell wird zwischen den Keimblättern und dem ersten Blatt ein 0,5 bis 1,0 cm langer und etwa drei Viertel des Stengeldurchmessers tiefer Längsschnitt oder leicht diagonaler Schnitt durchgeführt.

6.2.3. Den Schlitz mit der Spitze der Skalpellschneide offenhalten und den Impfstoff mit einem — mit dem Pellet behafteten — feinen Pinsel in den Schlitz hineinstreichen. Den Rest des Pellets auf die Eierfrüchte verteilen.

6.2.4. Schnitt mit steriler Vaseline aus einem 2-ml-Spritzenzylinder versiegeln.

Abbildung 3



6.3. *Schlitzinokulation II*

6.3.1. Die Eierfrucht zwischen zwei Fingern halten, einen Tropfen (etwa 5 bis 10 µl) des suspendierten Pellets auf den Stengel zwischen den Keimblättern und dem ersten Blatt pipettieren.

6.3.2. Mit einem sterilen Skalpell von dem Pelletttropfen aus diagonal (in einem Winkel von etwa 5°) einen 1,0 cm langen und etwa zwei Drittel der Stengeldicke tiefen Schlitz schneiden.

6.3.3. Den Schnitt mit steriler Vaseline aus einem Spritzenzylinder versiegeln:

6.4. *Spritzenimpfung*

6.4.1. Eierfrüchte einen Tag vor der Impfung nicht wässern, damit der Turgor verringert wird.

6.4.2. Mit einer Spritze, die mit einer hypodermischen Nadel (nicht weniger als 23 G) versehen ist, die Stengel der Eierfrucht direkt über den Keimblättern beimpfen. Das Pellet auf die Eierfrüchte verteilen.

6.5. 25 Eierfrüchte mit einer bekannten *C.-sepedonicum*-Kultur beimpfen und, soweit möglich, aus natürlich infiziertem Knollengewebe (Abschnitt 5.1) nach derselben Inokulationsmethode (Abschnitt 6.2, 6.3 oder 6.4) beimpfen.

6.6. 25 Eierfrüchte mit sterilem 0,05 M PBS nach derselben Impfmethode (Abschnitt 6.2, 6.3 oder 6.4) beimpfen.

6.7. Die Eierfrüchte unter geeigneten Bedingungen (Anlage 5) 40 Tage lang inkubieren. Nach 8 Tagen regelmäßig auf Symptome prüfen. Die Anzahl der Eierfrüchte mit Symptomen zählen. *C. sepedonicum* verursacht ein Welken der Eierfruchtblätter, das mit einer Schlaffheit der Blätter an den Rändern oder zwischen den Blattnerven beginnen kann. Welkes Gewebe kann zunächst dunkelgrün oder gesprenkelt aussehen, wird aber dann, bevor es nekrotisch wird, blasser. Welke Stellen zwischen den Blattnerven haben häufig ein schmieriges, wassergetränktes Aussehen. Nekrotisches Gewebe hat oft einen hellgelben Rand. Die Eierfrüchte sterben nicht unbedingt ab; je länger es dauert, bis die Symptome auftreten, desto größer ist die Überlebenschance. Die Eierfrüchte können die Infektion überstehen. Anfällige junge Eierfrüchte sind gegenüber niedrigen Populationen von *C. sepedonicum* empfindlicher als ältere Eierfrüchte; deshalb sollten Eierfrüchte im oder gerade vor dem Blattstadium 3 verwendet werden.

Das Welken kann auch durch Population anderer Bakterien oder Pilze hervorgerufen werden, die sich in dem Pellet von Knollengewebe befinden. Dazu gehören *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* und *E. carotovora* subsp. *atrospetica, Phoma exigua* var. *foveata* sowie große Populationen saprophytischer Bakterien. Eine solche Welke ist von der durch *C. sepedonicum* verursachten Welke zu unterscheiden, da ganze Blätter oder ganze Pflanzen rasch welken.

6.8. Eine Gram-Färbung (Abschnitt 4) von allen Einheiten aus Eierfrüchten mit Symptomen zubereiten, Teile verwelkten Blattgewebes und Stengelgewebes von Eierfrüchten voneinander isoliert auf entsprechende Nährmedien bringen (Abschnitt 7). Eine Oberflächendesinfektion der Eierfruchtblätter und -stengel durch Abreiben mit 70%igem Äthanol vornehmen.

6.9. Unter bestimmten Umständen — insbesondere dann, wenn die Wachstumsbedingungen nicht optimal sind — kann es vorkommen, daß *C. sepedonicum* als latente Infektion selbst nach einer Bebrütung von 40 Tagen innerhalb der Eierfrüchte weiterbesteht. Derartige Infektionen können bei den geimpften Eierfrüchten möglicherweise zu einer Verkümmerung und zu Wachstumsschwäche führen. Erweist sich der IF-Test als positiv, so kann es erforderlich sein, den Test fortzusetzen. Es ist daher wesentlich, die Wachstumsgeschwindigkeit aller Eierfruchttestpflanzen mit den mit sterilem 0,05 M PBS beimpften Kontrollproben zu vergleichen und die Umweltbedingungen des Treibhauses zu beobachten.

Für die Fortsetzung des Test wird folgendes empfohlen:

6.9.1. Die Stengel oberhalb der Impfstelle abschneiden und die Blätter entfernen.

6.9.2. Die Stengel — wie in den Abschnitten 3.1 und 3.2 beschrieben — in 0,05 M PBS pH 7,0 mazerieren.

6.9.3. Mit dem halben Pellet eine Gram-Färbung (Abschnitt 4) und einen IF-Test (Abschnitt 5) durchführen.

6.9.4. Mit der anderen Hälfte einen erneuten Eierfruchttest (Abschnitt 6) durchführen, wenn die Gram-Färbung und/oder die IF-Tests positiv sind. Eine bekannte *C.-sepedonicum*-Kultur und sterile 0,05 M PBS Kontrollen verwenden. Werden in dem anschließenden Test keine Symptome beobachtet, muß die Probe als negativ angesehen werden.

7. **Isolierung von *C. sepedonicum***

Die Diagnose kann nur bestätigt werden, wenn *C. sepedonicum* isoliert und damit identifiziert wird (Abschnitt 8). Obwohl *C. sepedonicum* ein anspruchsvoller Organismus ist, kann es von dem Gewebe, das die betreffenden Symptome aufweist, isoliert werden. Es kann jedoch in seinem Wachstum von rasch wachsenden saprophytischen Bakterien überholt werden; deshalb sind Isolierungen direkt aus dem Pellet aus Knollengewebe (Abschnitt 3.3) nicht zu empfehlen. Eierfrüchte bilden ein ausgezeichnetes selektives Anreicherungsmedium für das Wachstum von *C. sepedonicum* und liefern auch einen ausgezeichneten bestätigenden Wirtstest.

Isolierungen sollten von allen Kartoffelknollen und Eierfrüchten mit den entsprechenden Symptomen vorgenommen werden (Abschnitte 4 und 6). Ist eine Mazeration von Eierfruchtstengeln erforderlich, so sollte sie so ausgeführt werden, wie dies in den Abschnitten 3 und 6.9 beschrieben ist.

7.1. Suspensionen auf eines der folgenden Medien aufstreichen (die Formeln werden in Anlage 6 angegeben):

Dextrose-Nähragar (nur für Weiterkultur),

Hefe-Pepton-Glukose-Agar,

Hefe-Dextrose-Nähragar,

Hefeextrakt-Mineralsalz-Agar.

Bis zu 20 Tagen bei 21 °C bebrüten.

C. sepedonicum wächst langsam und bildet in der Regel innerhalb von 10 Tage winzige cremefarbige kuppelförmige Kolonien.

Wiederausstreichen, um Reinkultur herzustellen.

Die Wachstumsgeschwindigkeit verbessert sich bei der Weiterkultur. Typische Kolonien sind cremig-weiß oder elfenbeinfarben, abgerundet, glatt, erhöht, konvexgewölbt, schleimig-flüssig, mit ganzen Rändern und einem Durchmesser von in der Regel 1 bis 3 mm.

Identifizierung

Viele Gram-positive coryneforme Bakterien, deren Kolonien ähnliche Eigenschaften haben wie die von *C. sepedonicum*, lassen sich aus gesunden oder kranken Kartoffeln und Eierfrüchten isolieren. In diesem Zusammenhang muß *C. sepedonicum* durch folgende Tests identifiziert werden:

IF-Test (Abschnitt 5.1),

Eierfruchttest,

Nähr- und physiologische Tests (Anlage 7):

— Oxidations-/Fermentationstest (O/F),

— Oxidasetest,

— Wachstum bei 37 °C,

— Ureaseproduktion,

— Aesculinhydrolyse,

— Stärkehydrolyse,

— Toleranz von 7%iger Kochsalzlösung,

— Indoltest,

— Katalasetest,

— H_2S-Produktion,

— Citratverwendung,

— Gelatinehydrolyse,

— Säure von Glycerin, Lactose, Rhamnose und Salizin,

— Gram-Färbung.

Alle Tests sollten eine bekannte *C.-sepedonicum*-Kontrolle einschließen, Nährtests und physiologische Tests sollten mit Inoculum von Nähragar-Kulturen durchgeführt werden. Morphologische Vergleiche sollten auf Dextrose-Nähragar-Kulturen durchgeführt werden.

Beim IF-Test sollten die Zellpopulationen auf ca. 10^6 Zellen pro ml eingestellt werden. Der IF-Titer sollte dem der bekannten *C.-sepedonicum*-Kultur gleich sein.

Für den Eierfruchttest sollten die Zellpopulationen auf etwa 10^7 Zellen pro ml eingestellt werden. Bei den Eierfruchttests sollten für jede Testvariante 10 Eierfrüchte verwendet werden, wobei wieder eine bekannte *C.-sepedonicum*-Kultur und sterile Wasserkontrollen verwendet werden sollten; bei reinen Kulturen müßte die typische Welke innerhalb von 20 Tagen erreicht werden, jedoch sollten Eierfrüchte, die nach dieser Zeit keinerlei Symptome aufweisen, insgesamt 30 Tage lang bei einer Temperatur bebrütet werden, die das Wachstum der Eierfrüchte begünstigt, jedoch 30 °C nicht übersteigt (Anlage 5). Treten nach 30 Tagen noch immer keine Symptome auf, so kann nicht bestätigt werden, daß es sich bei der Kultur um eine pathogene Form von *Corynebacterium sepedonicum* handelt.

Test	*C. sepedonicum*
O/F	Inert oder schwach oxidierend wirkend
Oxidase	–
Katalase	+
Nitratreduktion	–
Ureaseaktivität	–
H_2S-Produktion	–
Indolproduktion	–
Citratverwendung	–
Stärkehydrolyse	– oder schwach
Wachstum bei 37 °C	–
Wachstum in 7%iger Kochsalzlösung	–
Gelatinehydrolyse	–
Aesculinhydrolyse	+
Säure von:	
— Glycerin	–
— Lactose	– oder schwach
— Rhamnose	–
— Salizin	–

Anlage 1

VON LELLIOTT UND SELLAR, 1976, EMPFOHLENE FORMULIERUNG FÜR DIE MAZERATIONS-FLÜSSIGKEIT

D-C-Silikon-Antischaum-MS-A-Verbindung (Hopkins & Williams Ltd, Cat. No 9964 – 25, Chadwell Heath, Essex, England)	10 ml
Lubrol-W-Flocken (ICI Ltd)	0,5 g
Tetranatriumpyrophosphat	1 g
0,05 M phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,0 (Anlage 2)	1 l

Anlage 2

PUFFER

0,05 M phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,0

Dieser Puffer kann für die Mazeration von Knollengewebe verwendet werden (Abschnitt 2.1).

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
NaCl	8,0 g
Destilliertes Wasser auf	1 l

0,01 M phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,2

Dieser Puffer wird für die Verdünnung von Antiseren und das Waschen von IF-Objektträgern verwendet.

Na_2HPO_4: 12 H_2O	2,7 g
NaH_2PO_4: 2 H_2O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destilliertes Wasser auf	1 l

0,1 M phosphatgepuffertes Glycerin pH 7,6

Dieser Puffer wird als Einbettungsmittel zur Erhöhung der Fluoreszenz im IF-Test verwendet.

Na_2HPO_4: 12 H_2O	3,2 g
NaH_2PO_4: 2 H_2O	0,15 g
Glycerin	50 ml
Destilliertes Wasser	100 ml

Anlage 3

GRAM-FÄRBEVERFAHREN (HUCKERS MODIFIZIERUNG) (DOETSCH, 1981)

Kristallviolett-Lösung

2 g Kristallviolett in 20 ml 95 %igem Äthanol auflösen.

0,8 g Ammoniumoxalat in 80 ml destilliertem Wasser auflösen.

Die beiden Lösungen mischen.

Lugols Jodlösung

Jod	1 g
Kaliumjodid	2 g
Destilliertes Wasser	300 ml

Die festen Stoffe mit einem Stößel im Mörser zerreiben. Zum Wasser hinzufügen und umrühren, so daß sie sich in einem geschlossenen Behältnis auflösen.

Safranin-Gegenfärbelösung

Stammlösung:

Safranin O	2,5 g
95%iges Äthanol	100 ml

Mischen und Lagern.

Im Verhältnis 1:10 verdünnen, um eine Arbeitslösung zu erhalten.

Färbeverfahren

1. Luftgetrocknete und hitzefixierte Ausstriche zubereiten.
2. Objektträger 1 Minute lang mit Kristallviolettlösung spülen.
3. Kurz mit Leitungswasser abwaschen.
4. 1 Minute lang mit Lugols Jod überspülen.
5. Mit Leitungswasser abspülen und trockenlöschen.
6. Mit tropfenweise hinzugefügtem 95%igem Äthanol entfärben, bis keine weitere Farbe mehr entfernt wird, oder 30 Sekunden lang unter leichtem Rühren eintauchen.
7. In Leitungswasser abspülen und trockenlöschen.
8. 10 Sekunden lang mit Safraninlösung überspülen.
9. Mit Leitungswasser abspülen und trockenlöschen.

Gram-positive Bakterien färben sich violettblau; Gram-negative Bakterien färben sich rosarot.

Anlage 4

BESTIMMUNG DER POPULATION VON IF-POSITIVEN ZELLEN

Fläche eines Feldes eines Mehrfachobjektträgers

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

wobei D = Durchmesser des Gesamtfeldes.

Fläche des Objektivfeldes

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

wobei d = Durchmesser des Objektivfeldes.

d entweder durch direktes Messen oder aufgrund der folgenden Formeln ermitteln:

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

wobei i = Feldkoeffizient (hängt vom Okulartyp ab und variiert zwischen 8 und 24),
K = Tubuskoeffizient (1 oder 1,25),
G = (100fache, 40fache usw.) Vergrößerung des Objektivs.

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

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

Zählen: Anzahl der typischen fluoreszierenden Zellen je Feld (c)

Berechnen: Anzahl der typischen fluoreszierenden Zellen je Gesamtfeld (C)

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

Berechnen: Anzahl der typischen fluoreszierenden Zellen je ml Pellet (N)

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

wobei y = Volumen des Pellets auf dem Objektträgerfeld,
F = Pellet-Verdünnungsfaktor.

Anlage 5

EIERFRUCHTKULTUR

Eierfruchtsamen *(Solanum melongena*, Sorte Black Beauty) in pasteurisierte Saaterde säen. Sämlinge mit voll entfalteten Keimblättern (10 bis 14 Tage) in pasteurisierte Topferde umsetzen.

Eierfrüchte im Blattstadium 3 verwenden, wenn zwei, aber nicht mehr als drei Blätter vollständig entfaltet sind.

Die Eierfrüchte sollten in einem Treibhaus gezogen werden, das die folgenden Umweltbedingungen aufweist:

Tageslänge: 14 Stunden oder natürliche Tageslänge, wenn größer;

Temperatur: am Tag: 21 bis 24 °C,
in der Nacht: 15 °C.

NB: *C. sepedonicum* wächst nicht bei Temperaturen oberhalb 30 °C. Wenn die Nachttemperaturen nicht auf 15 °C fallen, kann ein Chromophorschaden (silbrige Necrose) auftreten.

Wurzelschäden, die durch die Larven der Sciaridmücke hervorgerufen werden, lassen sich durch ein geeignetes Insektizid beheben.

Die Eierfrucht der Sorte Black Beauty kann unter folgenden Adressen bezogen werden:

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

Anlage 6

MEDIEN FÜR DAS WACHSTUM UND DIE ISOLIERUNG VON C. SEPEDONICUM

Nähragar (NA)

Difco-Bacto-Nähragar in destilliertem Wasser in der vom Hersteller angegebenen Rezeptur. 15 Minuten lang bei 121 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

Dextrose-Nähragar (NDA)

Difco-Bacto-Nähragar, der 1 % D(+)-Glucose (Monohydrat) enthält. 20 Minuten lang bei 115 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

Hefe-Pepton-Glucose-Agar (YPGA)

Difco-Bacto-Hefeextrakt (Nummer 0127)	5 g
Difco-Bacto-Pepton (Nummer 0118)	5 g
D(+)-Glucose (Monohydrat)	10 g
Difco-Bacto-Agar (gereinigt) (Nummer 0560)	15 g
Destilliertes Wasser	1 l

1/2 Litervolumen des Mediums 20 Minuten lang bei 115 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

Medium aus Hefeextrakt und Mineralsalzen (YGM)

Difco-Bacto-Hefeextrakt	2,0 g
D(+)-Glucose (Monohydrat)	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,015 g
NaCl	0,05 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,005 g
Difco-Bacto-Agar (gereinigt)	18 g
Destilliertes Wasser	1 l

1/2 Litervolumen des Mediums 20 Minuten lang bei 115 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

Anlage 7

NÄHRTESTS UND PHYSIOLOGISCHE TESTS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON C. SEPEDONICUM

Alle Medien sollten bei 21 °C inkubiert und nach 6 Tagen geprüft werden. Ist kein Wachstum erfolgt, bis zu 20 Tagen inkubieren.

— **Oxidations- und Fermentationstest** (Hugh & Leifson, 1953) — O/F-Test

Basalmedium:

KCl	0,2 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2 g
$NH_4H_2PO_4$	1,0 g
Difco-Bacto-Pepton	1,0 g
Difco-Bacto-Agar (gereinigt)	3,0 g
D(+)-Glucose (Monohydrat)	10,0 g
Bromothymol blau	0,03 g
Destilliertes Wasser	1 l

Mischen und auf pH 7,0 bis 7,2 einstellen, mit 1N KOH.

In Pyrex-Kulturröhrchen (16 mm × 100 mm, Kapazität 12 ml) in Volumen von 5 ml und 10 ml verteilen.

Zehn Minuten lang bei 115 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

Stichbeimpfung in 5-ml- und 10-ml-Zylindern für jede Kultur. Aseptisch 1 bis 2 ml steriles flüssiges Paraffin in den 10-ml-Zylinder hinzugeben. Bebrüten.

Positive Reaktion:

Zylinder	Farbe	Deutung
offen geschlossen	gelb gelb	Gärung bewirkend
offen geschlossen	gelb blaugrün	Oxidation bewirkend
offen geschlossen	grünlich blaugrün	Oxidation bewirkend oder inert

— **Oxidasetest** (Kovacs, 1956)

Kovacs' Oxidase-Reagens:

1%ige wäßrige Lösung von Tetramethyl-Paraphenylendiamin-Dihydrochlorid (BDH Nummer 30386) in destilliertem Wasser.

Dieses Reagens sollte frisch in einer Menge von 1 ml zubereitet werden oder kann 1 bis 4 Wochen lang bei 5 °C in einer braunen Glasflasche aufbewahrt werden.

Einen Tropfen des Reagens in einer sauberen Petrischale auf Filterpapier geben. Sofort mit Hilfe einer Platinöse ein wenig von der Testkultur aus dem Nähragar verreiben.

Positive Reaktion: Entwicklung einer Purpurfärbung innerhalb von zehn Sekunden. Kulturen, bei denen die Färbung 10 bis 30 Sekunden braucht, sind schwach positiv.

NB: Es ist wichtig, daß eine Platinöse und NA-Kulturen verwendet werden, da Spuren von Eisen oder ein hoher Zuckergehalt im Wachstumsmedium falsche positive Ergebnisse zur Folge haben können.

— **Säureproduktion aus Lactose, Rhamnose, Salizin, Glycerin**

Hugh & Leifson's O/F-Medium ohne die Glucose zubereiten. In 5 Millilitervolumen in Röhrchen verteilen. Zehn Minuten lang bei 115 °C durch Autoklavieren sterilisieren. Zur geschmolzenen Basis bei 45 °C 0,5 ml filtersterilisierte 10%ige wäßrige Lösungen von Glycerin oder Lactose oder Rhamnose oder Salizin aseptisch hinzufügen. Sorgfältig mischen.

Positive Reaktion: Ein Farbwechsel von Blaugrün nach Gelb zeigt die Produktion von Säure an.

— **Katalasetest**

Einen Tropfen Hydrogenperoxid (Volumen 30) auf einen sauberen Objektträger geben und unter Verwendung einer Platinöse mit einer Öse voll Kultur emulsifizieren.

Positive Reaktion: Entstehung von Sauerstoffblasen in den Tropfen zeigt das Vorhandensein von Katalase an.

— **Nitrase-Reduktase-Aktivität von Denitrifizierung** (Bradbury, 1970)

Kulturmedium:

KNO_3 (nitritfrei)	1 g
Difco-Bacto-Hefeextrakt	1 g
K_2HPO_4	5 g
Destilliertes Wasser	1 l

In Volumen von 10 ml in 20-ml-Flaschen verteilen. 15 Minuten lang bei 121 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

Reagens A:

H_2SO_4	8 g
5N-Essigsäure	1 l

Reagens B:

Naphtylamin	5 g
5N-Essigsäure	1 l

Zwei parallele Impfungen des Nitratmediums vornehmen. Test nach 10 und 20 Tagen, und zwar durch Hinzufügen eines Tropfens Lugols Jodlösung, von 0,5 ml Reagens A und von 0,5 ml Reagens B. Färbt sich das Medium nicht rötlich, etwa 50 mg Zinkpulver hinzufügen. Die Farbreaktion beachten.

Positive Reaktion:	*Farbreaktion*	
	Stadium 1	Stadium 2
Keine Reduktion von Nitrat	farblos	rot
Reduktion von Nitrat bis zu Nitrit (nur Nitratreduktase)	rot	—
Reduktion von Nitrat über Nitrit hinaus (Denitrifizierung — Nitrat- und Nitritreduktase)	farblos	farblos

— **Ureaseproduktion** (Lelliott, 1966)

Basismedium:

Oxoid-Harnstoff-Agarbasis (CM53)	2,4 g
Destilliertes Wasser	95 ml

20 Minuten lang bei 115 °C durch Autoklavieren sterilisieren. Die geschmolzene Basis auf 50 °C abkühlen und 5 ml filtersterilisierter 40%iger wäßriger Harnstofflösung (Oxoid SR20) aseptisch hinzufügen. Gut mischen.

In Volumen von 6 ml in sterilen Röhrchen (16 × 100 mm) verteilen und in schräger Position fest werden lassen.

Positive Reaktion: Das gelb-orangefarbene Medium entwickelt eine kirschrote oder magentarosafarbene Färbung, wenn Urease-Aktivität aufgetreten ist.

— **Verwendung von Citrat** (Christensen) (Skerman, 1967)

Citrat-Agar-Basis (Merck 2503)	23 g
Destilliertes Wasser	1 l

Mischen und durch Erwärmung auflösen. In Volumen von 6 ml verteilen wie beim Harnstoffmedium. 15 Minuten lang bei 121 °C durch Autoklavieren sterilisieren und in schräger Position fest werden lassen.

Positive Reakion: Die Verwendung von Zitrat wird durch einen Wechsel der Färbung des Mediums von orangefarben zu rot angezeigt.

— **Hydrogensulphiproduktion** (Ramamurthi, 1959)

Medium:

Difco-Bacto-Trypton (Nr. 0123)	10 g
K_2HPO_4	1 g
NaCl	5 g
Destilliertes Wasser	1 l

Auflösen und in Volumen von 6 ml in Röhrchen von 16 × 100 mm verteilen. 10 Minuten lang bei 115 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

Beimpfen und von der Tülle des Röhrchens einen Bleiacetatpapierstreifen (Merck 9511) aspetisch in das Innere plazieren. Mit dem Stopfen befestigen. Bis zu 20 Tagen inkubieren.

Positive Reaktion: H_2S-Produktion aus Trypton wird durch Entwicklung einer schwarz-braunen Färbung des Testpapiers angezeigt.

— **Indolproduktion** (Ramamurthi, 1959)

Medium:

Wie beim H_2S-Test.

Bleiacetatpapier entfernen, 1 bis 2 ml Diäthyläther hinzufügen und leicht schütteln. Warten, bis die Schichten sich getrennt haben (5 Minuten). 0,5 ml Kovacs' Reagens (Merck 9293) vorsichtig in das Schrägröhrchen hineingießen.

Positive Reaktion: Das Vorhandensein von Indol wird durch die Entwicklung einer roten Farbe in der gelben Schicht zwischen der Ätherfraktion und der wäßrigen Fraktion angezeigt.

— **Wachstum bei 37 °C** (Ramamurthi, 1959)

Medium:

Difco-Bacto-Nährmedium (Nr. 0003)	8 g
Destilliertes Wasser	1 l

Mischen, Auflösen und in Volumen von 6 ml in Röhren verteilen.

15 Minuten lang bei 121 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

Impfen und bei 37 °C bebrüten.

Positive Reaktion: auf Wachstum achten.

— **Wachstum in 7%iger Kochsalzlösung** (Ramamurthi, 1959)

Medium:

Difco-Bacto-Nährmedium	8 g
NaCl	70 g
Destilliertes Wasser	1 l

Mischen, Auflösen und in Volumen von 6 ml in Röhrchen verteilen.

15 Minuten lang bei 121 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

Positive Reaktion: auf Wachstum achten.

— **Gelatine-Hydrolyse** (Lelliott, Billing & Hayward, 1966)

Medium:

Difco-Bacto-Gelatine (Nr. 0143)	120 g
Destilliertes Wasser	1 l

Mischen, durch Erwärmen auflösen und in Volumen von 6 ml in Röhrchen verteilen.

15 Minuten lang bei 121 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

Positive Reaktion: Verflüssigung der Gelatine selbst dann, wenn 30 Minuten lang bei 5 °C gehalten.

— **Stärkehydrolyse**

Medium:

Difco-Bacto-Nähragar (geschmolzen)	1 l
Difco-Bacto-Stärke (löslich) (Nr. 0178)	2 g

Mischen, 10 Minuten lang bei 115 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

Petrischalen ausgießen, punkt-inokulieren.

Wenn (nach 10 bis 20 Tagen) ein gutes Wachstum erfolgt ist, Teil der Kulturen entfernen und diese mit Lugols Jodlösung bedecken.

Positive Reaktion: Stärkehydrolyse wird angezeigt durch klare Zonen unter den bakteriellen Kulturen oder um sie herum; der Rest des Mediums färbt sich purpur.

— **Aesculin-Hydrolase-Aktivität** (Sneath & Collins, 1974)

Medium:

Difco-Bacto-Pepton	10 g
Aesculin	1 g
Ferriccitrat (Merck 3862)	0,05 g
Natriumcitrat	1 g
Destilliertes Wasser	1 l

Mischen, um aufzulösen, und in Volumen von 6 ml in Röhrchen verteilen. 10 Minuten lang bei 115 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

Das Medium ist klar, fluoresziert aber bläulich.

Positive Reaktion: Aesculinhydrolyse wird angezeigt durch die Entwicklung einer braunen Farbe und gleichzeitiges Verschwinden der Fluoreszenz. Dies läßt sich mit einer Ultraviolettlampe nachprüfen.

BIBLIOGRAPHIE

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 F. Leifson, 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 Van Vaerenbergh, J. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections *(Corynebacterium sepedonicum)* in potato. EPPO Bull. N° 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, E. and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470-489.

Lelliott R. A., and P. W. Sellar, 1976. The detection of latent ring rot *(Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 (2), 101-106.

Ramamurthi C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 p.

Skerman V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.

Sneath P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of a *Pseudomonas* working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481-527.

ANHANG II

1. In jedem Verdachtsfall, bei dem ein nach dem Verfahren des Anhangs I durchgeführter Immunfluoreszenztest positiv ausgefallen ist, und bis zu seiner endgültigen Abklärung nach Abschluß dieses Verfahrens sollten

   — falls möglich, alle Knollen oder Pflanzen der Stichprobe und

   — der restliche Extrakt sowie alle zusätzlich für die Immunfluoreszenzanalyse vorbereiteten Objektträger

   aufbewahrt und auf angemessene Weise konserviert werden, bis das betreffende Verfahren abgeschlossen ist.

2. Bei Bestätigung des Auftretens des Schadorganismus sollten

   — die unter Nummer 1 genannten Materialien,

   — eine Probe des durch Inokulation mit einem Knollen- oder Pflanzenextrakt infizierten Eierfruchtmaterials sowie

   — die isolierte Erregerkultur

   bis mindestens einen Monat nach Abschluß des Unterrichtungsverfahrens gemäß Artikel 5 Absatz 2 aufbewahrt und konserviert werden.

ANHANG III

1. Die bei der Bestimmung des Ausmaßes der wahrscheinlichen Kontamination gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe b) zu berücksichtigenden Faktoren umfassen

   — Knollen oder Pflanzen, die an einem Erzeugungsort angebaut worden sind, der gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) für kontaminiert erklärt wurde;

   — Erzeugungsorte oder Betriebe, die produktionstechnisch mit den gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) für kontaminiert erklärten Knollen oder Pflanzen in Berührung kommen, einschließlich Erzeugungsorte oder Betriebe, die Geräte und Anlagen über Maschinenringe oder einen gemeinsamen Subunternehmer gemeinsam nutzen;

   — Knollen oder Pflanzen, die an den Erzeugungsorten im Sinne des zweiten Gedankenstrichs erzeugt worden sind oder zu der Zeit an diesen Erzeugungsorten vorhanden waren, als sich auch die gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) für kontaminiert erklärten Knollen oder Pflanzen in den Betrieben oder Erzeugungsorten im Sinne des ersten Gedankenstrichs befanden;

   — Sammellager mit Kartoffeln aus vorgenannten Erzeugungsorten;

   — Geräte, Fahrzeuge, Schiffe, Lagerräume oder Teile davon und alle anderen Gegenstände einschließlich Verpackungsmaterial, die mit den gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) für kontaminiert erklärten Knollen oder Pflanzen im Verlauf der vorangegangenen zwölf Monate in Berührung gekommen sein können, oder soweit dies angebracht ist;

   — Knollen oder Pflanzen, die vor dem Reinigen und Desinfizieren der vorgenannten Räumlichkeiten oder Gegenstände darin gelagert worden bzw. damit in Berührung gekommen sind, und

   — als Ergebnis der Untersuchung nach Artikel 6 Knollen oder Pflanzen, die klonal mit gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) für kontaminiert erklärten Knollen oder Pflanzen verbunden sind und bei denen die Untersuchungen auf eine wahrscheinliche Kontamination schließen lassen.

2. Die bei der Bestimmung der möglichen Ausbreitung gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe c) zu berücksichtigenden Faktoren umfassen

   — die Nähe anderer Erzeugungsorte, an denen Kartoffeln oder andere Wirtspflanzen angebaut werden;

   — die Einheitlichkeit der Pflanzkartoffelvorräte.

3. Die Einzelheiten der Unterrichtung gemäß Artikel 5 Absatz 2 Unterabsatz 1 umfassen

   — für jede für kontaminiert erklärte Kartoffelsendung oder -partie gegebenenfalls die in den Artikeln 7 und 8 der Richtlinie 77/93/EWG vorgeschriebenen Zeugnisse sowie die Paß- oder Registrierungsnummer;

   — bei Pflanzkartoffelvorräten und, falls möglich, auch in allen anderen Fällen den Sortennamen;

   — die für die Kontaminationserklärung und die Sicherheitszonenabgrenzung ausschlaggebenden Faktoren;

   — Angaben über das Vorhandensein von Extrakt, vorbereiteten Objektträgern für die Immunfluoreszenzanalyse, infiziertem Eierpflanzenmaterial und einer isolierten Erregerkultur aus der Untersuchung, mit der das Auftreten des Schadorganismus bestätigt wurde.

ANHANG IV

1. Als Maßnahmen im Sinne der in Artikel 7 Absatz 1 genannten amtlich überwachten Maßnahmen zur Beseitigung von Knollen oder Pflanzen, die gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) für kontaminiert erklärt wurden, gelten

   — die Verwendung zur industriellen Verarbeitung, d.h. sofortige Lieferung auf direktem Wege an einen Verarbeitungsbetrieb mit angemessenen Abfallbeseitigungsanlagen, bei dem nachweislich keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht und der über ein System zur Desinfizierung der Lagerbereiche und der den Betrieb verlassenden Fahrzeuge verfügt;

   — andere Maßnahmen, sofern nachweislich keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht; diese Maßnahmen sind der Kommission und den übrigen Mitgliedstaaten mitzuteilen.

2. Bei der in Artikel 7 Absatz 2 genannten geeigneten Verwendung oder Behandlung von gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe b) für wahrscheinlich kontaminiert erklärten Knollen oder Pflanzen, unter Überwachung seitens der zuständigen amtlichen Stellen der Mitgliedstaaten, handelt es sich um

   — die Verwendung als Speise- oder Wirtschaftskartoffeln, die in Verpackungen zur unmittelbaren Lieferung und Verwendung ohne Umpacken aufgemacht und für eine solche unmittelbare Lieferung und Verwendung bestimmt sind;

   — die Verwendung als Speise- oder Wirtschaftskartoffeln für die industrielle Verarbeitung, die zur unmittelbaren und sofortigen Lieferung an einen Verarbeitungsbetrieb mit angemessenen Abfallbeseitigungsanlagen und Desinfektionseinrichtungen bestimmt sind;

   — eine andere Verwendung, sofern nachweislich keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht.

3. Als angemessene Verfahren zum Reinigen und Desinfizieren aller in Artikel 7 Absatz 3 genannten Gegenstände gelten Verfahren, bei denen nachweislich keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht und die unter Aufsicht des amtlichen Pflanzenschutzdienstes des betreffenden Mitgliedstaats angewendet werden.

4. Das in Artikel 7 Absatz 4 genannte Maßnahmenpaket, das in der gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe c) abgegrenzten Sicherheitszone anzuwenden ist, umfaßt folgendes:

4.1. In den gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) für kontaminiert erklärten Erzeugungsorten:

   a) Bei einer gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) für kontaminiert erklärten Anbaufläche wird entweder wie folgt verfahren:

      i) — Zumindestens in den drei auf das Jahr der Kontaminationserklärung folgenden Anbaujahren werden
         — Maßnahmen getroffen, um den Durchwuchs und andere natürliche Wirtspflanzen auszurotten, und
         — keine Kartoffelknollen, Kartoffelpflanzen, echte Kartoffelsaat oder andere, natürliche Wirtspflanzen oder Pflanzen, bei denen die Gefahr besteht, daß der Schadorganismus überleben oder sich verbreiten kann, angebaut, bis sich die Anbaufläche in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Anbaujahren als frei von Durchwuchs erwiesen hat.

      — In der ersten Kartoffelernteperiode, die auf den vorgenannten Zeitraum folgt, werden amtlich zertifizierte Pflanzkartoffeln ausschließlich für die Erzeugung von Speise- oder Wirtschaftskartoffeln angebaut, und es wird eine amtliche Erhebung gemäß Artikel 2 Absatz 1 durchgeführt.

      — In der Kartoffelernteperiode, die auf die im vorstehenden Gedankenstrich genannte Zeitspanne im Zuge einer geeigneten Fruchtfolge folgt, werden amtlich zertifizierte Pflanzkartoffeln entweder zur Pflanz- oder zur Speise- oder Wirtschaftskartoffelerzeugung angebaut und eine amtliche Erhebung gemäß Artikel 2 Absatz 1 durchgeführt;

      oder es wird wie folgt verfahren:

      ii) — Es werden in den vier auf das Jahr der Kontaminationserklärung folgenden Anbaujahren
         — Maßnahmen getroffen, um den Durchwuchs und andere natürliche Wirtspflanzen auszurotten, und
         — die Anbauflächen brachgelegt oder in Dauergrünland umgewandelt, das in jedem Jahr häufig kurz gemäht oder als Intensivweide genutzt und in diesem Zustand gehalten wird.

      — In der ersten Kartoffelernteperiode, die auf den im vorstehenden Gedankenstrich genannten Zeitraum folgt, werden amtlich zertifizierte Pflanzkartoffeln entweder zur Pflanz- oder zur Speise- oder Wirtschaftskartoffelerzeugung angebaut, und es wird eine amtliche Erhebung gemäß Artikel 2 Absatz 1 durchgeführt.

b) Für die anderen Anbauflächen gilt folgendes:

— In dem auf die Kontaminationserklärung folgenden Anbaujahr werden

— entweder keine Kartoffelknollen, Kartoffelpflanzen oder echte Kartoffelsaat oder andere natürliche Wirtspflanzen angepflanzt bzw. gesät und gegebenenfalls Maßnahmen getoffen, um den Durchwuchs auszurotten,

— amtlich zertifizierte Pflanzkartoffeln ausschließlich für die Speise- oder Wirtschaftskartoffelerzeugung angebaut, sofern sich die zuständigen amtlichen Stellen davon überzeugt haben, daß die Gefahr von Durchwuchs und anderen natürlichen Wirtspflanzen des Schadorganismus beseitigt ist.

— Zumindest in den zwei auf das vorgenannte Anbaujahr folgenden Anbaujahren werden nur amtlich zertifizierte Pflanzkartoffeln entweder zur Pflanz- oder zur Speise- oder zur Wirtschaftskartoffelerzeugung angebaut.

— In jedem der vorgenannten Anbaujahre werden Maßnahmen getroffen, um den Durchwuchs und natürliche Wirtspflanzen auszurotten, und amtliche Erhebungen gemäß Artikel 2 Absatz 1 durchgeführt.

— Werden auf diesen Anbauflächen in dem auf die Kontaminationserklärung folgenden Anbaujahr amtlich zertifizierte Pflanzkartoffeln zur Speise- oder Wirtschaftskartoffelerzeugung angebaut, so werden die Pflanzen zu geeigneter Zeit inspiziert und Durchwuchs auf den Erreger hin untersucht.

c) In bezug auf die für kontaminiert erklärte(n) Anbaufläche(n) werden unmittelbar nach der Kontaminationserklärung gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) und in jedem folgenden Anbaujahr einschließlich der ersten zulässigen Kartoffelanbauperiode gemäß Buchstabe a) alle Geräte und Lagerräume am Erzeugungsort, die zur Kartoffelerzeugung genutzt werden, gegebenenfalls nach geeigneten Verfahren gemäß Nummer 3 gereinigt und desinfiziert.

d) In Produktionssystemen, bei denen das gesamte Nährsubstrat ausgetauscht werden kann,

— dürfen Knollen, Pflanzen oder echter Samen nur angepflanzt bzw. gesät werden, wenn die Produktionseinheit amtlich überwachten Maßnahmen unterworfen ist, um den Schadorganismus zu tilgen und das gesamte Kartoffel- oder sonstige Solanacea-Material zu entfernen — wobei zumindest auch das Kultursubstrat vollständig ausgetauscht wird und die Produktionseinheit und alle Geräte gereinigt und desinfiziert werden — und die zuständigen amtlichen Stellen die Kartoffelerzeugung anschließend wieder genehmigt haben, und

— müssen die erzeugten Kartoffeln von amtlich zertifizierten Pflanzkartoffeln oder von Miniknollen oder Mikropflanzen aus erprobten Quellen stammen.

4.2. Innerhalb der abgegrenzten Sicherheitszone müssen die Mitgliedstaaten unbeschadet der Maßnahmen gemäß Nummer 4.1

a) unmittelbar nach der Kontaminationserklärung und für mindestens drei Vegetationsperioden

— dafür sorgen, daß Betriebe, in denen Kartoffelknollen angebaut, gelagert oder behandelt werden, und Betriebe, die Maschinen mieten, von den zuständigen amtlichen Stellen überwacht werden;

— vorschreiben, daß die Maschinen und Lagerräume in diesen Betrieben gegebenenfalls gemäß den in Absatz 3 genannten Verfahren gereinigt und desinfiziert werden;

— vorschreiben, daß in dieser Zone ausschließlich zertifizierte Pflanzkartoffeln angebaut werden;

— vorschreiben, daß geerntete Pflanzkartoffeln in allen Betrieben der Sicherheitszone von Speise- oder Wirtschaftskartoffeln getrennt gehalten werden;

— eine amtliche Erhebung gemäß Artikel 2 Absatz 1 durchführen;

b) gegebenenfalls ein Programm aufstellen, um alle Pflanzkartoffelbestände nach angemessener Zeit auszutauschen.

Die gemäß Nummer 4.2 durchgeführten Maßnahmen sowie die Registriernummern der Erzeugerbetriebe, gemeinsamen Lagerhäuser und Versandzentren in der Sicherheitszone werden den übrigen Mitgliedstaaten und der Kommission jährlich mitgeteilt.