II

(Πράξεις για την ισχύ των οποίων δεν απαιτείται δημοσίευση)

ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ

ΟΔΗΓΙΑ 93/85/ΕΟΚ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ

της 4ης Οκτωβρίου 1993

για την καταπολέμηση της κορυνοβακτηρίωσης της πατάτας

ΤΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

την συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας, και ιδίως το άρθρο 43,

την πρόταση της Επιτροπής [1],

την γνώμη του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου [2],

τη γνώμη της Οικονομικής και Κοινωνικής Επιτροπής [3],

Εκτιμώντας:

ότι η παραγωγή πατάτας κατέχει σημαντική θέση στη γεωργία της Κοινότητας· ότι η απόδοση της παραγωγής αυτής απειλείται διαρκώς από επιβλαβείς οργανισμούς·

ότι η προστασία της καλλιέργειας της πατάτας από αυτούς τους επιβλαβείς οργανισμούς είναι αναγκαία όχι μόνο για τη διατήρηση της απόδοσης, αλλά και για την αύξηση της παραγωγικότητας της γεωργίας·

ότι τα μέτρα προστασίας κατά της εισόδου επιβλαβών οργανισμών στο έδαφος ενός κράτους μέλους έχουν περιορισμένα μόνον αποτελέσματα εάν οι οργανισμοί αυτοί δεν ελέγχονται ταυτόχρονα και μεθοδικά σε ολόκληρη την Κοινότητα και εφόσον δεν λαμβάνονται μέτρα για την πρόληψη της μετάδοσής τους·

ότι ένας από τους επιβλαβείς για την πατάτα οργανισμούς είναι το Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., δηλαδή ο παθογόνος παράγοντας της κορυνοβακτηρίωσης της πατάτας· ότι η ασθένεια αυτή έχει εκδηλωθεί σε τμήματα της Κοινότητας και ότι υπάρχουν ακόμη ορισμένες εστίες μόλυνσης, περιορισμένης έκτασης·

ότι η καλλιέργεια πατάτας σε ολόκληρη την Κοινότητα εκτίθεται σε σημαντικό κίνδυνο εάν ληφθούν αποτελεσματικά μέτρα για τον εντοπισμό της ασθένειας και τον προσδιορισμό του τρόπου εξάπλωσης της, την πρόληψη της εμφάνισης και της μετάδοσής της και, σε περίπτωση διαπίστωσης της ασθένειας, για την πρόληψη της μετάδοσης και την καταπολέμηση της, με σκοπό την εξάλειψή της·

ότι, προκειμένου να επιτευχθεί ο σκοπός αυτός, πρέπει να θεσπιστούν ορισμένα μέτρα στην Κοινότητα· ότι, επιπλέον, τα κράτη μέλη πρέπει να μπορούν να λαμβάνουν πρόσθετα ή αυστηρότερα μέτρα, εφόσον κρίνονται αναγκαία και εφόσον δεν παρεμποδίζεται η διακίνηση της πατάτας στην Κοινότητα, εκτός των περιπτώσεων που καθορίζονται στην οδηγία 77/93/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 21ης Δεκεμβρίου 1976 περί των μέτρων προστασίας κατά της εισαγωγής στα κράτη μέλη επιβλαβών οργανισμών για τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα [4]· ότι τα εν λόγω μέτρα πρέπει να κοινοποιούνται στα άλλα κράτη μέλη και στην Επιτροπή·

ότι η οδηγία 80/665/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 24ης Ιουνίου 1980 περί της καταπολεμήσεως της κορυνοβακτηρίωσης της πατάτας [5], θεσπίζει τα στοιχειώδη μέτρα που πρέπει να λαμβάνουν τα κράτη μέλη κατά της κορυνοβακτηρίωσης της πατάτας·

---

(1) ΕΕ αριθ. C 93 της 2. 4. 1993, σ. 12.
(2) ΕΕ αριθ. C 176 της 28. 6. 1993, σ. 210.
(3) ΕΕ αριθ. C 161 της 14. 6. 1993, σ. 18.
(4) ΕΕ αριθ. L 26 της 31. 1. 1977, σ. 20. Οδηγία που τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 92/103/ΕΟΚ της Επιτροπής (ΕΕ αριθ. L 363 της 11. 12. 1992, σ. 1).
(5) ΕΕ αριθ. L 180 της 14. 7. 1980, σ. 30.

ότι, εν τω μεταξύ, έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικές εξελίξεις όσον αφορά την κατανόηση της κορυνοβακτηρίωσης της πατάτας και την ανίχνευση του παθογόνου της κορυνοβακτηρίωσης της πατάτας·

ότι, για να εφαρμοστεί το κοινοτικό φυτοϋγειονομικό καθεστώς στην Κοινότητα, που συνιστά χώρο χωρίς εσωτερικά σύνορα, πρέπει να επανεξεταστούν και να αναθεωρηθούν ορισμένες διατάξεις της οδηγίας 80/665/ΕΟΚ·

ότι, μετά την επανεξέταση αυτή, οι διατάξεις της οδηγίας 80/665/ΕΟΚ κρίθηκαν ανεπαρκείς και πρέπει να καθοριστούν λεπτομερέστερα τα σχετικά μέτρα·

ότι, κατά συνέπεια, η οδηγία 80/665/ΕΟΚ πρέπει να καταργηθεί και να ληφθούν τα αναγκαία μέτρα·

ότι τα μέτρα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη, πρώτον, το γεγονός ότι η ασθένεια μπορεί να παραμένει λανθάνουσα και να μην ανιχνεύεται στην πατάτα κατά το διάστημα της βλάστησης ή μέσα στους αποθηκευμένους κονδύλους και ότι, ως εκ τούτου, η ασθένεια μπορεί να προληφθεί αποτελεσματικά μόνο με την παραγωγή και τη χρησιμοποίηση μη προσβεβλημένου πατατόσπορου, και, δεύτερον, το γεγονός ότι είναι απαραίτητη η διεξαγωγή επίσημων συστηματικών ερευνών για τον εντοπισμό της ασθένειας· ότι η μετάδοση του παθογόνου στα καλλιεργούμενα φυτά δεν είναι ο σημαντικότερος παράγοντας, αλλά ότι το παθογόνο μπορεί να υπάρχει, κατά τη διάρκεια του χειμώνα, σε αυτοφυή φυτά πατάτας τα οποία αποτελούν την κυριότερη εστία μόλυνσης από την μία εποχή στη άλλη· ότι το παθογόνο μεταδίδεται κυρίως δι' επαφής με προσβεβλημένες πατάτες και με εργαλεία φύτευσης, συγκομιδής και επεξεργασίας ή με περιέκτες μεταφοράς και αποθήκευσης που έχουν μολυνθεί από προηγούμενη επαφή με προσβεβλημένες πατάτες· ότι αυτά τα μολυσμένα αντικείμενα είναι δυνατόν να παραμείνουν πηγές μολύνσεως επί ορισμένο χρονικό διάστημα μετά από τη μόλυνση τους· ότι η εξάπλωση του παθογόνου μπορεί να μειωθεί ή να αποφευχθεί με την απολύμανση αυτών των αντικειμένων· ότι η τυχόν μόλυνση του πατατόσπορου αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για την εξάπλωση του παθογόνου·

ότι, προκειμένου να καθοριστούν οι λεπτομέρειες αυτών των γενικών μέτρων καθώς και των αυστηρότερων ή πρόσθετων μέτρων που λαμβάνουν τα κράτη μέλη για την πρόληψη της εισόδου του παθογόνου στο έδαφός τους, είναι επιθυμητό τα κράτη μέλη να συνεργάζονται στενά με την Επιτροπή στο πλαίσιο της Μόνιμης Φυτοϋγειονομικής Επιτροπής, (που στο εξής αναφέρεται ως «επιτροπή»),

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Άρθρο 1

Η παρούσα οδηγία αφορά τα μέτρα που πρέπει να λαμβάνονται στα κράτη μέλη κατά του Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al ssp. sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., που είναι το αίτιο της κορυνοβακτηρίωσης της πατάτας (εφεξής καλούμενος «ο οργανισμός»), για:

α) τον εντοπισμό της ασθένειας και τον προσδιορισμό της διασποράς της,

β) την πρόληψη της εμφάνισης και μετάδοσής της και

γ) σε περίπτωση διαπίστωσης της, την πρόληψη της μετάδοσης και την καταπολέμησή της με σκοπό την εκρίζωσή της.

Άρθρο 2

1. Τα κράτη μέλη πραγματοποιούν συστηματικές επίσημες εξετάσεις κονδύλων και, εφόσον χρειάζεται, φυτών πατάτας (Solanum tuberosum L.) που προέρχονται από το έδαφός τους, προκειμένου να διαπιστώνουν την απουσία του οργανισμού από αυτά.

Για τη διενέργεια των εν λόγω εξετάσεων, στην περίπτωση κονδύλων, λαμβάνονται δείγματα πατατόσπορου και άλλων πατατών, κατά προτίμηση από αποθηκευμένες παρτίδες, και υποβάλλονται σε επίσημη ή υπό επίσημη εποπτεία εργαστηριακή ανάλυση με τη μέθοδο του παραρτήματος I για την ανίχνευση και διάγνωση του οργανισμού. Επιπλέον, μπορεί να διεξάγεται, κατά περίπτωση, επίσημη ή υπό επίσημη εποπτεία μακροσκοπική εξέταση κομμένων κονδύλων, από άλλα δείγματα.

Στην περίπτωση φυτών, οι εξετάσεις αυτές διενεργούνται με τις κατάλληλες μεθόδους, τα δε δείγματα υποβάλλονται σε κατάλληλη επίσημη ή υπό επίσημη εποπτεία ανάλυση.

Ο αριθμός, η προέλευση, η διαστρωμάτωση και ο χρόνος λήψης των δειγμάτων καθορίζεται με απόφαση των αρμόδιων επίσημων φορέων κατά την έννοια της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ, βάσει ορθών επιστημονικών και στατιστικών αρχών και της βιολογίας του οργανισμού, και λαμβανομένου υπόψη του συγκεκριμένου συστήματος παραγωγής, πατάτας στα οικεία κράτη μέλη. Οι σχετικές λεπτομέρειες διαβιβάζονται ετησίως στα άλλα κράτη μέλη και στην Επιτροπή, προκειμένου να εξασφαλίζεται συγκρίσιμο επίπεδο ασφάλειας μεταξύ των κρατών μελών όσον αφορά την επιβεβαίωση της απουσίας του οργανισμού.

2. Τα αποτελέσματα των επίσημων εξετάσεων που προβλέπονται στην παράγραφο 1 κοινοποιούνται τουλάχιστον μία φορά το χρόνο στα άλλα κράτη μέλη και στην Επιτροπή. Οι λεπτομέρειες της κοινοποίησης αυτής είναι εμπιστευτικές. Μπορούν να υποβάλλονται στην επιτροπή με τη διαδικασία του άρθρου 16α της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ.

3. Οι ακόλουθες διατάξεις μπορούν να θεσπίζονται με τη διαδικασία του άρθρου 16α της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ:

— οι λεποτομέρειες των εξετάσεων οι οποίες προβλέπονται στην παράγραφο 1 ανωτέρω και οι οποίες πρέπει να διενεργούνται βάσει ορθών επιστημονικών και στατιστικών αρχών,

— οι λεπτομέρειες της κοινοποίησης που προβλέπεται στην παράγραφο 2 ανωτέρω.

4. Οι ακόλουθες διατάξεις πρέπει να θεσπίζονται με τη διαδικασία του άρθρου 16α της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ:

— η κατάλληλη μέθοδος για τις εξετάσεις και τις αναλύσεις που προβλέπονται στην παράγραφο 1 τρίτο εδάφιο ανωτέρω.

Άρθρο 3

Τα κράτη μέλη μεριμνούν ώστε κάθε πιθανολογούμενη εμφάνιση ή διαπιστωμένη παρουσία του οργανισμού, σε φυτά ή κονδύλους πατάτας ή στους κονδύλους που έχουν συγκομισθεί, αποθηκευθεί ή τεθεί σε εμπορία στο έδαφός τους, να ανακοινώνεται στους αρμόδιους επίσημους φορείς τους.

Άρθρο 4

1. Σε περιπτώσεις πιθανολογούμενης εμφάνισης της ασθένειας, οι αρμόδιοι επίσημοι φορείς του κράτους μέλους στο οποίο έχουν αναφερθεί τα κρούσματα αυτά, εξασφαλίζουν τη διεξαγωγή επίσημης ή υπό επίσημη εποπτεία εργαστηριακής ανάλυσης, με τη μέθοδο του παραρτήματος I και σύμφωνα με τους όρους του παραρτήματος II σημείο 1, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ή να διαψευσθεί η πιθανολογούμενη εμφάνιση. Στην πρώτη περίπτωση, εφαρμόζονται οι απαιτήσεις του παραρτήματος II σημείο 2.

2. Μέχρις ότου επιβεβαιωθεί ή διαψευσθεί η πιθανολογούμενη εμφάνιση της ασθένειας σύμφωνα με την παράγραφο 1, στις περιπτώσεις πιθανολογούμενης εμφάνισης κατά τις οποίες, είτε

i) παρατηρήθηκαν ύποπτα μακροσκοπικά διαγνωστικά συμπτώματα της ασθένειας, είτε

ii) ελήφθη θετικό αποτέλεσμα από δοκιμή ανοσοφθορισμού, όπως ορίζεται στο παράρτημα I, ή από άλλη κατάλληλη δοκιμή,

οι αρμόδιοι επίσημοι φορείς των κρατών μελών:

α) απαγορεύουν τη διακίνηση όλων των παρτίδων ή αποστολών από τις οποίες έχουν ληφθεί τα δείγματα, εκτός εάν διακινούνται υπό τον έλεγχό τους και με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν ενέχουν εμφανή κίνδυνο μετάδοσης του οργανισμού,

β) λαμβάνουν μέτρα προς εξακρίβωση της προέλευσης της πιθανολογούμενης εμφάνισης,

γ) λαμβάνουν κατάλληλα πρόσθετα προληπτικά μέτρα, βάσει του επιπέδου του εκτιμώμενου κινδύνου, για την πρόληψη της μετάδοσης του οργανισμού. Τα μέτρα αυτά μπορούν να περιλαμβάνουν τον επίσημο έλεγχο της διακίνησης όλων των άλλων κονδύλων ή φυτών εντός ή εκτός του χώρου που έχει σχέση με την πιθανολογούμενη εμφάνιση.

3. Η ακόλουθη διάταξη μπορεί να θεσπίζεται με τη διαδικασία του άρθρου 16α της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ:

— τα μέτρα που αναφέρονται στην παράγραφο 2 στοιχείο γ) ανωτέρω.

4. Η ακόλουθη διάταξη πρέπει να θεσπίζεται με τη διαδικασία του άρθρου 16α της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ:

— η άλλη κατάλληλη δοκιμή που προβλέπεται στην παράγραφο 2 σημείο ii) ανωτέρω.

Άρθρο 5

1. Εάν από την επίσημη ή υπό επίσημη εποπτεία εργαστηριακή ανάλυση με τη χρησιμοποίηση της μεθόδου που ορίζεται στο παράρτημα I επιβεβαιωθεί η παρουσία του οργανισμού σε δείγμα κονδύλων, φυτών, ή μερών φυτών, οι αρμόδιοι επίσημοι φορείς ενός κράτους μέλους, αφού λάβουν υπόψη τις ορθές επιστημονικές αρχές, τη βιολογία του οργανισμού και το συγκεκριμένο σύστημα παραγωγής, εμπορίας και μεταποίησης στο κράτος μέλος αυτό:

α) χαρακτηρίζουν ως μολυσμένους τους κονδύλους ή τα φυτά, τις αποστολές ή/και τις παρτίδες και τα μηχανήματα, τα οχήματα, τους περιεκτές, τις αποθήκες ή τα τμήματα αυτών και κάθε άλλο αντικείμενο, συμπεριλαμβανομένων των υλικών συσκευασίας, από τα οποία έχει ληφθεί το δείγμα, και, κατά περίπτωση, το ή τα σημεία παραγωγής και τον ή τους αγρούς από τους οποίους συγκομίστηκαν οι κόνδυλοι ή τα φυτά,

β) προσδιορίζουν, λαμβάνοντας υπόψη τις διατάξεις του παραρτήματος III σημείο 1, την έκταση της πιθανής μόλυνσης δι' επαφής πριν ή μετά τη συγκομιδή ή μέσω σχέσης της διαδικασίας παραγωγής με τη συγκεκριμένη μόλυνση,

γ) οριοθετούν μια ζώνη βάσει του χαρακτηρισμού μολυσμένων αντικειμένων που αναφέρεται στο στοιχείο α), του προσδιορισμού της έκτασης της πιθανής μόλυνσης που αναφέρεται στο στοιχείο β) και της πιθανής μετάδοσης του οργανισμού, λαμβάνοντας υπόψη τις διατάξεις του σημείου 2 του παραρτήματος III.

2. Τα κράτη μέλη κοινοποιούν αμέσως, σύμφωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος III σημείο 3, στα άλλα κράτη μέλη και στην Επιτροπή, κάθε μόλυνση που προσδιορίζεται βάσει παραγράφου 1 στοιχείο α), καθώς και τις λεπτομέρειες της οριοθέτησης ζώνης βάσει της παραγράφου 1 στοιχείο γ).

Οι λεπτομέρειες της κοινοποίησης αυτής είναι εμπιστευτικές. Μπορούν να υποβάλλονται στην Επιτροπή με τη διαδικασία του άρθρου 16α της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ.

3. Βάσει της κοινοποίησης σύμφωνα με την παράγραφο 2 και των κοινοποιούμενων στοιχείων, τα άλλα κράτη μέλη που αναφέρονται στην κοινοποίηση, κατά περίπτωση, χαρακτηρίζουν τα μολυσμένα αντικείμενα, προσδιορίζουν την έκταση της πιθανής μόλυνσης και οριοθετούν μια ζώνη, σύμφωνα με την παράγραφο 1 στοιχεία α), β) και γ), αντίστοιχα.

Άρθρο 6

Τα κράτη μέλη ορίζουν ότι, εάν κόνδυλοι ή φυτά έχουν χαρακτηρισθεί ως μολυσμένα βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α), η ανάλυση, σύφωνα με το άρθρο 4 παράγραφος 1, διενεργείται σε αποθέματα πατάτας που έχουν κλωνική σχέση με τα μολυσμένα. Η ανάλυση πραγματοποιείται για όσους κόνδυλους ή φυτά απαιτείται προκειμένου να προσδιορισθεί η πιθανή πηγή της μόλυνσης και η έκταση της πιανής μόλυνσης, κατά προτίμηση σε τάξη μεγέθους κινδύνου.

Βάσει της ανάλυσης, κατά περίπτωση, χαρακτηρίζονται ως μολυσμένα και άλλα αντικείμενα, προσδιορίζεται η έκταση της πιθανής μόλυνσης και οριοθετείται ζώνη, βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχεία α), β) και γ), αντίστοιχα.

Άρθρο 7

1. Τα κράτη μέλη ορίζουν ότι απαγορεύεται η καλλιέργεια των κονδύλων ή φυτών που έχουν χαρακτηρισθεί ως μολυσμένα βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) και ότι οι κόνδυλοι ή τα φυτά αυτά πρέπει, υπό τον έλεγχο των αρμόδιων επίσημων φορέων:

— να καταστρέφονται ή

— να διατίθενται με άλλο τρόπο, μέσω επισήμως εποπτευόμενων μέτρων, σύμωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος IV σημείο 1, εφόσον έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης τους οργανισμού.

2. Τα κράτη μέλη ορίζουν ότι απαγορεύεται η καλλιέργεια των κονδύλων ή φυτών που έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανώς μολυσμένα βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο β) και ότι οι κόνδυλοι ή τα φυτά αυτά πρέπει, με την επιφύλαξη του αποτελέσματος των αναλύσεων που αναφέρονται στο άρθρο 6 για τα αποθέματα που έχουν κλωνική σχέση μεταξύ τους, υπό τον έλεγχο των αρμόδιων επίσημων φορέων, να χρησιμοποιούνται ή να διατίθενται όπως ορίζεται στο παράρτημα IV σημείο 2, κατά τρόπον ώστε να διασφαλίζεται ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού.

3. Τα κράτη μέλη ορίζουν ότι τα μηχανήματα, τα οχήματα, οι περιέκτες, οι αποθήκες ή τα τμήματα αυτών, και κάθε άλλο αντικείμενο, συμπεριλαμβανομένων των υλικών συσκευασίας, που έχουν χαρακτηρισθεί μολυσμένα βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) ή που έχουν χαρακτηρισθεί ως πιθανώς μολυσμένα βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο β) πρέπει να καταστρέφονται ή να καθαρίζονται και να απολυμαίνονται με κατάλληλες μεθόδους όπως ορίζεται στο παράρτημα IV σημείο 3. Μετά την απολύμανση, τα αντικείμενα αυτά παύουν να θεωρούνται μολυσμένα.

4. Με την επιφύλαξη των μέτρων που εφαρμόζονται σύμφωνα με τις παραγράφους 1, 2 και 3, τα κράτη μέλη ορίζουν ότι, για τη ζώνη που οριοθετείται βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο γ), εφαρμόζονται ορισμένα μέτρα, όπως καθορίζεται στο παράρτημα IV σημείο 4.

Άρθρο 8

1. Τα κράτη μέλη ορίζουν ότι ο πατατόσπορος πρέπει να πληροί τις απαιτήσεις της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ και να προέρχεται απευθείας από υλικό το οποίο παράγεται στο πλαίσιο επισήμως εγκεκριμένου προγράμματος και το οποίο έχει κριθεί απαλλαγμένο από τον οργανισμό μετά από επίσημη ή υπό επίσημη εποπτεία ανάλυση με τη μέθοδο που ορίζεται στο παράρτημα I.

Η προαναφερόμενη ανάλυση πραγματοποιείται:

— στις περιπτώσεις που η μόλυνση επηρεάζει την παραγωγή πατατόσπορου, στα φυτά της αρχικής κλωνικής επιλογής,

— στις άλλες περιπτώσεις, είτε στα φυτά της αρχικής κλωνικής επιλογής είτε σε αντιπροσωπευτικά δείγματα του βασικού πατατόσπορου ή προγενέστερων αναπαραγωγών.

2. Οι ακόλουθες διατάξεις μπορούν να θεσπίζονται με τη διαδικασία του άρθρου 16α της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ:

— οι λεπτομερείς κανόνες εφαρμογής της παραγράφου 1 δεύτερο εδάφιο πρώτη περίπτωση του παρόντος άρθρου,

— οι κανόνες που αφορούν τα αντιπροσωπευτικά δείγματα που προβλέπονται στην παράγραφο 1 δεύτερο εδάφιο δεύτερη περίπτωση του παρόντος άρθρου.

Άρθρο 9

Τα κράτη μέλη απαγορεύουν την κατοχή και τη διακίνηση του οργανισμού.

Άρθρο 10

Με την επιφύλαξη των διατάξεων της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ, τα κράτη μέλη μπορούν να επιτρέπουν παρεκκλίσεις από τα μέτρα που αναφέρονται στα άρθρα 6, 7 και 9 της παρούσας οδηγίας για πειραματικούς ή επιστημονικούς σκοπούς καθώς και για εργασίες ποικιλιακής επιλογής, εφόσον οι παρεκκλίσεις αυτές δεν επηρεάζουν την καταπολέμηση του οργανισμού και δεν δημιουργούν κίνδυνο μετάδοσής του.

Άρθρο 11

Τα κράτη μέλη μπορούν να θεσπίζουν τα πρόσθετα ή αυστηρότερα μέτρα που απαιτούνται για την καταπολέμηση του οργανισμού ή για την πρόληψη της μετάδοσής του, υπό την προϋπόθεση ότι τα μέτρα αυτά δεν αντιβαίνουν προς τις διατάξεις της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ.

Στα πρόσθετα μέτρα που αναφέρονται στο πρώτο εδάφιο μπορεί να περιλαμβάνεται η υποχρέωση φύτευσης μόνον επισήμως πιστοποιημένου πατατόσπορου ή πατατόσπορου που έχει ελεγχθεί επισήμως και πληροί τις απαιτούμενες φυτοϋγειονομικές προδιαγραφές. Η χρήση επισήμως ελεγμένου πατατόσπορου επιτρέπεται ιδίως στην περίπτωση που

οι γεωργοί μπορούν να χρησιμοποιούν, στην εκμετάλλευσή τους, πατατόσπορο που προέρχεται από τη συγκομιδή τους ή σε άλλες περιπτώσεις κατά τις οποίες φυτεύεται πατατόσπορος ο οποίος παράγεται από τον ίδιο τον καλλιεργητή.

Οι λεπτομέρειες των μέτρων αυτών κοινοποιούνται στα άλλα κράτη μέλη και την Επιτροπή.

Άρθρο 12

Οι τροποποιήσεις των παραρτημάτων της παρούσας οδηγίας, με γνώμονα τις εξελίξεις των επιστημονικών ή τεχνικών γνώσεων, θεσπίζονται με τη διαδικασία του άρθρου 16α της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ.

Άρθρο 13

1. Τα κράτη μέλη εκδίδουν και δημοσιεύουν, έως τις 15 Νοεμβρίου 1993 το αργότερο, τις αναγκαίες διατάξεις προκειμένου να συμμορφωθούν με την παρούσα οδηγία. Πληροφορούν αμέσως την Επιτροπή σχετικά.

Οι διατάξεις αυτές, όταν θεσπίζονται από τα κράτη μέλη, αναφέρονται στην παρούσα οδηγία ή συνοδεύονται από παρόμοια αναφορά κατά την επίσημη δημοσίευσή τους. Οι λεπτομερείς διατάξεις για την αναφορά αυτή καθορίζονται από τα κράτη μέλη.

Τα κράτη μέλη εφαρμόζουν τις διατάξεις αυτές από τις 16 Νοεμβρίου 1993.

2. Τα κράτη μέλη ανακοινώνουν στην Επιτροπή το κείμενο των διατάξεων εσωτερικού δικαίου, τις οποίες θεσπίζουν στον τομέα που διέπεται από την παρούσα οδηγία. Η Επιτροπή πληροφορεί σχετικά τα άλλα κράτη μέλη.

Άρθρο 14

Η οδηγία 80/665/ΕΟΚ καταργείται από τις 16 Νοεμβρίου 1993.

Άρθρο 15

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κρατή μέλη.

Λουξεμβούργο, 4 Οκτωβρίου 1993.

Για το Συμβούλιο

Ο Πρόεδρος

W. CLAES

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ ΤΗΣ ΚΟΡΥΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΣΗΣ, ΣΕ ΠΑΡΤΙΔΕΣ ΚΟΝΔΥΛΩΝ ΠΑΤΑΤΑΣ CLAVIBACTER MICHIGANENSIS (SMITH) DAVIS ET AL. SSP. SEPEDONICUS (SPRIECKERMANN ET KOTTHOFF) DAVIS ET AL.

1. **Αφαίρεση κώνων από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου**

1.1. 200 κόνδυλοι πλένονται με νερό της βρύσης και αφαιρείται η επιδερμίδα γύρω από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου κάθε κονδύλου με νυστέρι ή κοινό αποφλοιωτή πατάτας που απολυμαίνονται τακτικά· η απολύμανση μπορεί να επιτευχθεί με εμβάπτιση του εργαλείου σε αιθανόλη 70 % και διέλευσή του από φλόγα.

1.2. Με μαχαίρι ή αποφλοιωτή, αφαιρούνται από τα σημεία πρόσφυσης των στολονίων των κονδύλων κώνοι ιστού με διατήρηση της περίσσειας του μη αγγειώδους ιστού στο ελάχιστο. Μετά την αφαίρεσή τους, τα δείγματα πρέπει να υποβάλλονται στη σχετική επεξεργασία εντός 24 ωρών (βλέπε παράγραφο 3) ή να διατηρούνται στους 20°C επί δύο εβδομάδες το πολύ.

2. **Μακροσκοπική εξέταση για συμπτώματα κορυνοβακτηρίωσης**

Μετά τη αφαίρεση των κώνων από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου, κάθε κόνδυλος κόβεται εγκαρσίως και εξετάζεται για την παρουσία συμπτωμάτων της κορυνοβακτηρίωσης.

Οι κόνδυλοι συμπιέζονται και ελέγχεται η έξοδος διαλυτοποιημένων ιστών από τον αγγειώδη ιστό.

Τα αρχικά συμπτώματα συνίστανται σε ελαφρώς υαλώδη μορφή ή σε ελαφρή διαφάνεια του ιστού, χωρίς μείωση της σκληρότητας, γύρω από το σύστημα των αγγείων, ιδίως κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου. Ο δακτύλιος των αγγείων κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου ενδέχεται να είναι ελαφρώς πιο σκουρόχρωμος απ' ότι συνήθως. Το πρώτο σαφές σύμπτωμα είναι ο υποκίτρινος χρωματισμός του δακτυλίου των αγγείων και το τυρώδες εξίδρωμα που εξέρχεται από τα αγγεία όταν συμπιέζονται ελαφρώς. Το εξίδρωμα αυτό περιέχει εκατομμύρια βακτηρίων. Στο στάδιο αυτό εμφανίζεται ενίστε και καστανόχρωμος χρωματισμός του αγγειώδους ιστού. Αρχικά, τα συμπτώματα αυτά εμφανίζονται σε ένα μόνον τμήμα του δακτυλίου των αγγείων και όχι απαραίτητα κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου, στη συνέχεια δε ενδέχεται να επεκταθούν σ' ολόκληρο το δακτύλιο. Η επέκταση της μόλυνσης οδηγεί σε καταστροφή του αγγειώδους ιστού, ενδέχεται δε να παρατηρηθεί και αποκόλληση του εξωτερικού φλοιού από τον εσωτερικό. Σε προχωρημένα στάδια της μόλυνσης, εμφανίζονται στην επιφάνεια του κονδύλου ρωγμές, τα χείλη των οποίων είναι συχνά καστανοκόκκινα. Οι δευτερογενείς μολύνσεις από μύκητες ή βακτήρια καλύπτουν ενίοτε τα συμπτώματα αυτά και συχνά είναι δύσκολο, αν όχι αδύνατο; να διακριθούν τα προχωρημένου σταδίου συμπτώματα της κορυνοβακτηρίωσης από άλλες σήψεις των κονδύλων.

3. **Προετοιμασία των δειγμάτων για χρώση κατά Gram, χρώση ανοσοφθορισμού (IF) και δοκιμή σε φυτά μελιτζάνας**

3.1 Οι κώνοι από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου των κονδύλων ομογενοποιούνται μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης σε υγρό διάλυσης το οποίο δεν είναι τοξικό *Corynebacterium sepedonicum* [π.χ. 0,5 M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος (PBS) pH 7,0] σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους 30°C· συνιστάται η προσθήκη κάποιου αντικροκιδωτικού, και, ενδεχομένως, ενός αντιαφριστικού παράγοντα (προσαρτήματα 1 και 2). Πρέπει να αποφεύγεται η υπερβολική διαλυτοποίηση.

3.2. Τα βακτήρια εξάγονται από τον ομογενοποιημένο ιστό με μια από τις ακόλουθες μεθόδους (1):

A. α) Φυγοκέντρηση σε 180 g το πολύ επί 10 λεπτά.

β) Φυγοκέντρηση του υπερκείμενου υγρού σε 4 000 g τουλάχιστον επί 10 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό μεταγγίζεται και απορρίπτεται.

B. α) Ο διαλυτοποιημένος ιστός διατηρείται ακίνητος επί 300 λεπτά προκειμένου να κατακαθίσουν τα τεμαχίδια ιστών. Το υπερκείμενο υγρό μεταγγίζεται προσεκτικά χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα.

β) Το υπερκείμενο υγρό διηθείται μέσω διηθητικού χάρτου (Whatmann Nº 1) που στηρίζεται σε φίλτρο εσμυρισμένης υάλου (Nº 2 = 40 = 100 μm) με τη χρήση υδραντλίας κενού. Το διήθημα συλλέγεται σε σωλήνα φυγοκέντρου. Το φίλτρο πλένεται με αποστειρωμένο PBS μέχρις ανωτάτου όγκου διηθήματος 35 ml.

γ) Το διήθημα φυγοκεντρείται σε 4 000 g τουλάχιστον επί 20 λεπτά.

3.3. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 0,01 M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος, pH 7,2 (προσάρτημα 2) μέχρι συνολικού όγκου περίπου 1 ml. Το αιώρημα διαιρείται σε δύο ίσα μέρη, από τα οποία το ένα διατηρείται για λόγους αναφοράς με κατάψυξη στους −20°C (2) ή με λυοφιλίωση. Το άλλο μέρος διαιρείται σε δύο ίσα μέρη από τα οποία το ένα χρησιμοποιείται για τη δοκιμή ανοσοφθορισμού και τη χρώση κατά Gram και το άλλο για τη δοκιμή σε φυτά μελιτζάνας.

(1) Μια εναλλακτική μέθοδος εξαγωγής των βακτηρίων δίδεται υπό του Dinesen, 1984.

(2) Υπάρχουν ενδείξεις (Janse and Van Vaerenbergh, 1987) ότι η κατάψυξη ενδέχεται να μειώνει τη βιωσιμότητα του Corynebacterium sepedonicum. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με αναδιάλυση του ιζήματος σε διάλυμα γλυκερίνης 10 %.

3.4. Ο χειρισμός όλων των θετικών μαρτύρων του *C. sepedonicum* και των δειγμάτων πρέπει οπωσδήποτε να γίνεται χωριστά, ώστε να αποφεύγεται η αλληλομόλυνση. Το ίδιο ισχύει και για τις αντικειμενοφόρους της δοκιμής ανοσοφθορισμού και για τις δοκιμές επί φυτών μελιτζάνας.

4. **Χρώση κατά Gram**

4.1. Παρασκευάζονται χρώσεις κατά Gram για όλες τις αραιώσεις του ιζήματος (5.2.1) και όλους τους κομμένους κονδύλους (2) που εμφανίζουν υαλώδη μορφή, σήψη ή άλλα ύποπτα συμπτώματα. Τα δείγματα πρέπει να λαμβάνονται από την περίμετρο των προσβεβλημένων ιστών.

4.2. Παρασκευάζονται χρώσεις κατά Gram για γνωστές καλλιέργειες *C. sepedonicum* και, εν δυνατόν, για φυσικώς μολυσμένους ιστούς (5.1).

4.3. Προσδιορίζονται το δείγματα που περιέχουν τυπικά, θετικά κατά Gram ροπαλόμορφα κύτταρα. Κατά κανόνα, τα κύτταρα του *C. sepedonicum* έχουν μήκος 0,8-1,2 μm και πλάτος 0,4-0,6 μm.

Μια κατάλληλη μέθοδος χρώσης εκτίθεται στο προσάρτημα 3.

Τα παρασκευάσματα από φυσικές μολύνσεις ή από προσφάτως απομονωμένες καλλιέργειες εμφανίζουν συχνά μεγάλο αριθμό κοκκοειδών ραβδίων που είναι συνήθως ελαφρώς μικρότερα από τα κύτταρα που προέρχονται από παλαιότερες καλλιέργειες επί άγαρ. Στα περισσότερα θρεπτικά υποστρώματα, τα κύτταρα του *C. sepedonicum* είναι πλειομορφικά ροπαλόμορφα ραβδία και δεν αντιδρούν ομοιόμορφα στη αντίδραση Gram. Τα κύτταρα είναι είτε μεμονωμένα, είτε σε ζεύγη με χαρακτηριστικούς «αγκώνες» που υποδηλώνουν τη διαίρεση με κάμψη, είτε ενίστε σε ακανόνιστες ομάδες που περιγράφονται συχνά ως «φράχτες» ή «κινεζικά γράμματα».

5. **Μέθοδος για τη δοκιμή ανοσοφθορισμού**

5.1. Πρέπει να χρησιμοποιείται αντιορρός έναντι ενός γνωστού στελέχους του *C. sepedonicum* ATCC 33113 (NCPPB 2137) ή NCPPB 2140. Ο τίτλος ανοσοφθορισμού του αντιορρού πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 : 600. Η αντικειμενοφόρος πρέπει να περιλαμβάνει και ένα μάρτυρα PBS για να ελέγχεται αν το σύμπλοκο ισοθειοκυανικής φλουορεϊσίνης και αντι-ανοσοσφαιρίνης κουνελιού (FITC) συνδέεται μη επιλεκτικά με βακτηριακά κύτταρα. Σε διαφορετική αντικειμενοφόρο πρέπει να χρησιμοποιείται *Corynebacterium sepedonicum* (ATCC 33113 (NCPPB 2137), NCPPB 2140) ως μάρτυρας ομόλογου αντιγόνου. Ως παρόμοιοι μάρτυρες πρέπει να χρησιμοποιούνται, όποτε είναι δυνατόν, στην ίδια αντικειμενοφόρο, φυσικώς μολυσμένοι ιστοί (που διατηρούνται με λυοφιλίωση ή κατάψυξη στους $-20°C$) (βλέπε εικόνα 2).

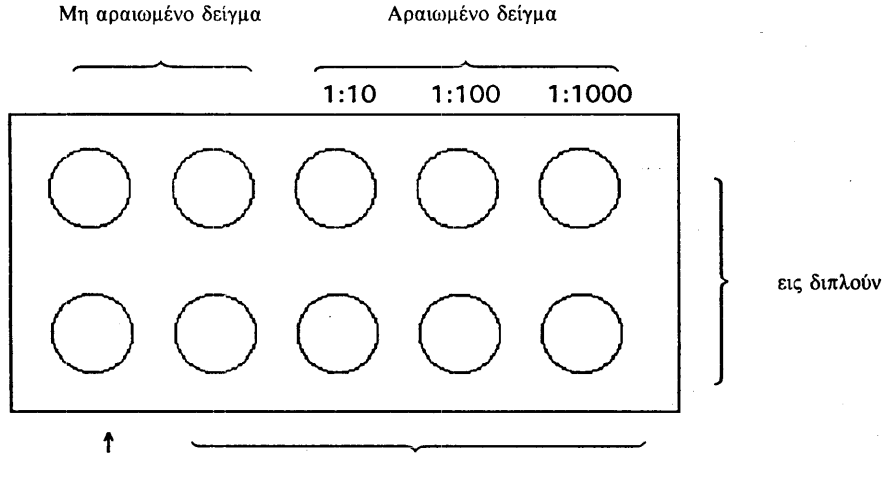
5.2. **Διαδικασία**

5.2.1. Ετοιμάζονται τρεις διαδοχικές 10πλές αραιώσεις (10^1, 10^2, 10^3) του τελικού ιζήματος σε απεσταγμένο νερό (βλέπε εικόνα 1).

5.2.2. Προστίθεται ένας μετρημένος ορισμένος όγκος υγρού αρκετός για να καλυφθεί το φατνίο (περίπου 25 μl) από κάθε αραίωση ιζήματος ή κάθε αιωρήματος *C. sepedonicum* (περίπου 10^6 κύτταρα/ml) στα φατνία μιας πολυφατνιακής αντικειμενοφόρου, όπως εμφαίνεται στην εικόνα 1.

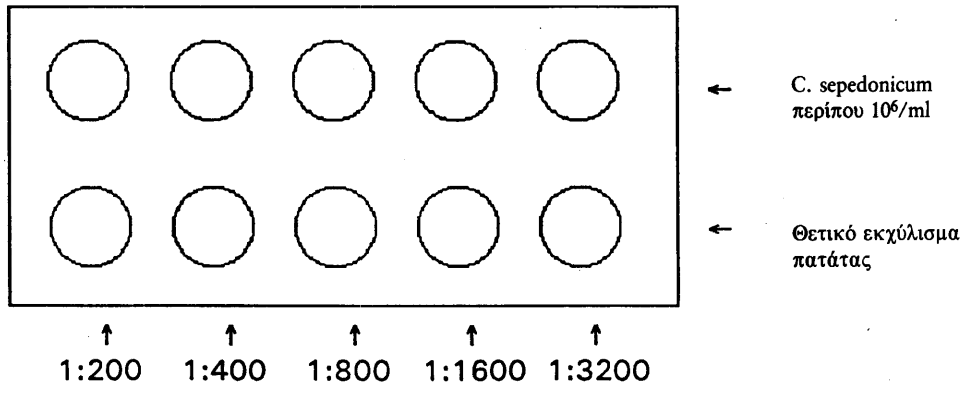
Εικόνα 1

Αντικειμενοφόρος δειγμάτων και μάρτυρα PBS



Εικόνα 2

Αντεικειμενοφόρος θετικού μάρτυρα



Αραίωση αντιορρού

5.2.3. Οι αντικειμενοφόροι ξηραίνονται στον αέρα στους 37°C περίπου και προσηλώνονται με αιθανόλη 95 % ή με φλόγα.

5.2.4. Στα κατάλληλα φατνία της αντικειμενοφόρου προστίθεται αντιορρός *C. sepedonicum* στην κατάλληλη αραίωση, σε 0,01 M PBS pH 7,2 προσάρτημα 2), όπως εμφαίνεται στην εικόνα 1. (Για το μάρτυρα του FITC πρέπει να χρησιμοποιείται PBS). Η αραίωση εργασίας του αντιορρού πρέπει να είναι περίπου το ήμιου του τίτλου ανοσοφθορισμού. Αν πρόκειται να περιληφθούν και άλλες αραιώσεις αντιορρού, για κάθε αραίωση πρέπει να χρησιμοποιείται διαφορετική αντικειμενοφόρος.

5.2.5. Οι αντικειμενοφόροι επωάζονται σε υγρή ατμόσφαιρα, σε θερμοκρασία δωματίου, επί 30 λεπτά.

5.2.6. Οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται προσεκτικά με 0,01 M PBS pH 7,2 και πλένονται επί 5 λεπτά με τρεις αλλαγές του 0,01 M PBS pH 7,2.

5.2.7. Το πλεονάζον νερό αφαιρείται προσεκτικά.

5.2.8. Κάθε φατνίο καλύπτεται με σύμπλοκο FITC στην ίδια αραίωση με εκείνη που χρησιμοποιείται για την τιτλοδότηση και η αντικειμενοφόρος επωάζεται σε σκοτεινό, υγρό θάλαμο, σε θερμοκρασία δωματίου, επί 30 λεπτά.

5.2.9. Οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται και πλένονται όπως προηγουμένως.

5.2.10. Σε κάθε φατνίο προστίθενται περίπου 5 – 10 μl φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος γλυκερίνης 0,1 M pH 7,6 (ή άλλου παρόμοιου υλικού έγκλεισης με pH τουλάχιστον 7,6), στη συνέχεια δε τα φατνία καλύπτονται με καλυπτρίδες προσάρτημα 2).

5.2.11. Οι αντικειμενοφόροι εξετάζονται με μικροσκόπιο εφοδιασμένο με φωτεινή πηγή επιφθορισμού και κατάλληλα φίλτρα για την εργασία με FITC. Η κατάλληλη μεγέθυνση είναι 400-1 000. Τα φατνία εξετάζονται κατά δύο κάθετες διαμέτρους και κατά την περίμετρό τους.

Παρατηρούνται τα φθορίζοντα κύτταρα στους θετικούς μάρτυρες και προσδιορίζεται ο τίτλος τους. Εξετάζεται η παρουσία φθορίζόντων κυττάρων στο φατνίο του μάρτυρα FITC/PBS και, εάν δεν υπάρχουν, συνεχίζεται η εξέταση στα φατνία της δοκιμής. Προσδιορίζεται, σε δέκα τουλάχιστον οπτικά πεδία μικροσκοπίου, ο μέσος αριθμός των μορφολογικώς τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά οπτικό πεδίο και υπολογίζεται ο αριθμός ανά ml μη αραιωμένου ιζήματος (βλέπε προσάρτημα 4).

Η δοκιμή ανοσοφθορισμού παρουσιάζει διάφορα εγγενή προβλήματα.

— Τα ίζήματα ιστών πατάτας περιέχουν συχνά πληθυσμούς φθορίζοντων κυττάρων μη τυπικής μορφολογίας καθώς και μη ειδικώς αντιδρώντα σαπροφυτικά βακτήρια όμοιου μεγέθους και μορφολογίας με το *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη μόνον τα φθορίζοντα κύτταρα με τυπικό μέγεθος και μορφολογία.

  Λόγω της πιθανότητας μη ειδικής θετικής αντίδρασης, τα δείγματα που αντιδρούν θετικά στη δοκιμή ανοσοφθορισμού πρέπει να εξετάζονται εκ νέου, με διαφορετικό αντιορρό.

— Το τεχνικό όριο ανίχνευσης με τη μέθοδο αυτή είναι μεταξύ 10^3 και 10^4 κύτταρα ανά ml μη αραιωμένου ιζήματος. Τα δείγματα, των οποίων ο αριθμός τυπικών φθοριζόντων κυττάρων κατά τη δοκιμή ανοσοφθορισμού βρίσκεται στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου, είναι συνήθως αρνητικά για το *C. m.* ssp. *sepedonicus*, αλλά μπορούν να υποβάλλονται στη δοκιμή σε φυτά μελιτζάνας.

  Η δοκιμή ανοσοφθορισμού χαρακτηρίζεται αρνητική για κάθε δείγμα στο οποίο δεν ανευρίσκονται μορφολογικώς τυπικά φθορίζοντα κύτταρα.

Το δείγμα αυτό θεωρείται ως «μη μολυσμένο» με *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Η διενέργεια δοκιμής σε φυτό μελιτζάνας δεν απαιτείται.

Η δοκιμή ανοσοφθορισμού χαρακτηρίζεται θετική για κάθε δείγμα στο οποίο ανευρίσκονται μορφολογικώς τυπικά φθορίζοντα κύτταρα.

Τα δείγματα που αντιδρούν θετικά με τους δύο αντιορρούς στη δοκιμή ανοσοφθορισμού θεωρούνται ως «*δυνητικά μολυσμένα*» με *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Για όλα τα δυνητικά μολυσμένα δείγματα απαιτείται η διενέργεια δοκιμής σε φυτό μελιτζάνας.

6. **Δοκιμή σε φυτά μελιτζάνας**

Για τον τρόπο καλλιέργειας, βλέπε προσάρτημα 5.

6.1. Το ίζημα από το σημείο 3.3 κατανέμεται μεταξύ 25 τουλάχιστον φυτών μελιτζάνας στο στάδιο φυλλοφορίας 3 (προσάρτημα 5) με μία από τις ακόλουθες τρεις μεθόδους (6.2, 6.3 ή 6.4).

6.2. Μόλυνση σχισμής I

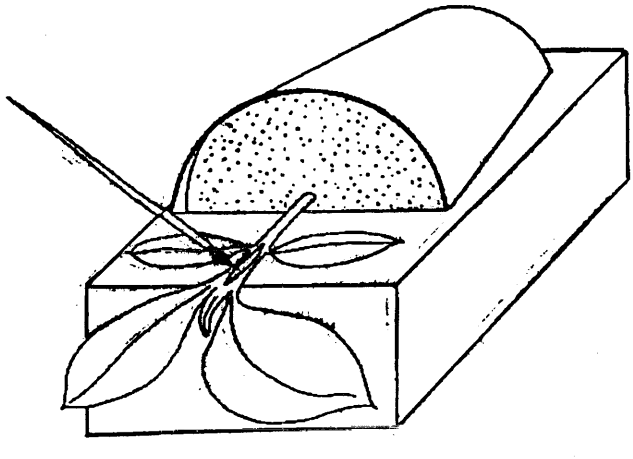
6.3.1. Κάθε γλάστρα τοποθετείται σε οριζόντια θέση (για γλάστρες των 10 cm μπορεί να χρησιμοποιείται ένα κομμάτι αφρώδους πολυστυρενίου από τη μια επιφάνεια του οποίου έχει αφαιρεθεί ένα κομμάτι βάθους 5 cm, πλάτους 10 cm (εικόνα 3). Γαι κάθε ελεγχόμενο δείγμα, πρέπει να τοποθετείται ένα φύλλο αποστειρωμένου αλουμινόχαρτου μεταξύ του μίσχου και του πολυστυρενίου. Το φυτό μπορεί να συγκρατείται στη θέση του με έναν ελαστικό ιμάντα ο οποίος περιβάλλει το κομμάτι του πολυστυρενίου.

6.2.2. Με ένα νυστέρι, γίνεται μια διαμήκης ή ελαφρώς διαγώνια τομή, μήκους 0,5-1.0 cm και βάθους ίσου προς τα 3/4 περίπου της διαμέτρου του στελέχους, μεταξύ των κοτυληδόνων και του πρώτου φύλλου.

6.2.3. Η τομή διατηρείται ανοικτή με την άκρη της λεπίδας του νυστεριού και το μόλυσμα εισάγεται στην τομή με ένα μικρό πινέλο. Το υπόλοιπο ίζημα κατανέμεται μεταξύ των φυτών μελιτζάνας.

6.2.4. Η τομή καλύπτεται με αποστειρωμένη βαζελίνη, χρησιμοποιώντας μια σύριγγα των 2 ml.

Εικόνα 3



6.3. Μόλυνση σχισμής II

6.3.1. Το φυτό συγκρατείται με δύο δάκτυλα και μια σταγόνα (περίπου 5-10 ml) του αιωρήματος του ιζήματος προστίθεται επί του στελέχους, μεταξύ των κοτυληδόνων και του πρώτου φύλλου.

6.3.2. Με ένα αποστειρωμένο νυστέρι, πραγματοποιείται στο στέλεχος μια διαγώνια (κατά 5° περίπου) τομή, μήκους 1,0 cm και μήκους ίσου προς τα 2/3 περίπου της διαμέτρου του στελέχους, αρχίζοντας από τη σταγόνα του ιζήματος.

6.3.3. Η τομή καλύπτεται με αποστειρωμένη βαζελίνη από μια σύριγγα.

6.4. Μόλυνση με σύριγγα

6.4.1. Τα φυτά μελιτζάνας δεν ποτίζονται κατά την προηγούμενη του εμβολιασμού, προκειμένου να μειωθεί η πίεση σπαργής.

6.4.2. Τα στελέχη των φυτών μελιτζάνας μολύνονται ακριβώς πάνω από τις κοτυληδόνες με μια σύριγγα με υποδερμική βελόνα (τουλαχιστον 23G). Το ίζημα κατανέμεται μεταξύ των φυτών μελιτζάνας.

6.5. Με την ίδια μέθοδο μόλυνσης (6.2, 6.3 ή 6.4), μολύνονται 25 φυτά μελιτζάνας με γνωστή καλλιέργεια *C. sepedonicum* και, ει δυνατόν, με φυσικώς μολυσμένο ιστό κονδύλων (5.1).

6.6. Με την ίδια μέθοδο μόλυνσης (6.2, 6.3 ή 6.4), μολύνονται 25 φυτά μελιτζάνας με αποστειρωμένο 0,05 M PBS.

6.7. Τα φυτά επωάζονται στις κατάλληλες συνθήκες (προσάρτημα 5) επί 40 ημέρες και ελέγχονται τακτικά για συμπτώματα από την όγδοη ημέρα. Καταμετρούνται τα φυτά που εμφανίζουν συμπτώματα. Στη μελιτζάνα, το *C. sepedonicum* προκαλεί μαρασμό των φύλλων, ο οποίος μπορεί να αρχίσει ως έλλειψη σπαργής στην περίμετρο των φύλλων ή μεταξύ των νευρώσεων. Οι μαραμένοι ιστοί ενδέχεται να είναι αρχικά βαθυπράσινοι ή μωσαϊκόμορφοι, αλλά στη συνέχεια γίνονται χλωρωτικοί πριν νεκρωθούν. Συχνά, οι μαραμένοι ιστοί μεταξύ των νευρώσεων έχουν λιπώδη και βρεγμένη εμφάνιση. Η περίμετρος των νεκρωτικών ιστών είναι συχνά έντονα κίτρινη. Τα φυτά δεν νεκρώνονται πάντοτε· όσο μεγαλύτερη είναι η περίοδος πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα επιβίωσης. Τα φυτά είναι δυνατόν να επιζήσουν της μόλυνσης. Τα ευπαθή νεαρά φυτά μελιτζάνας είναι πολύ πιο ευαίσθητα σε χαμηλούς πληθυσμούς του *C. sepedonicum* από τα ηλικιωμένα φυτά και γι' αυτό πρέπει να χρησιμοποιούνται φυτά ακριβώς ή λίγο πριν από το στάδιο φυλλοφορίας 3.

Μαρασμοί μπορεί επίσης να προκληθούν από πληθυσμούς άλλων βακτηρίων ή μυκήτων που υπάρχουν στο ίζημα ιστών κονδύλων, όπως, π.χ. το *Erwinia carotovora*, subsp. *carotovora* και *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata*, καθώς και υψηλούς πληθυσμούς σαπροφυτικών βακτηρίων. Τέτοιοι μαρασμοί μπορούν να διακριθούν από το μαρασμό που οφείλεται στο *C. sepedonicum* από το γεγονός ότι μαραίνονται γρήγορα ολόκληρα φύλλα ή ολόκληρα φυτά.

6.8. Παρασκευάζεται χρώση κατά Gram (4.) για όλες τις παρτίδες φυτών μελιτζάνας που εμφανίζουν συμπτώματα. Προς το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται τομές μαραμένου ιστού από τα φύλλα και το στέλεχος και γίνεται απομόνωση σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (7.). Η επιφάνεια των φύλλων και των στελεχών των φυτών μελιτζάνας απολυμαίνεται με σφουγγάρι εμποτισμένο με 70 % αιθανόλη.

6.9. Υπό ορισμένες συνθήκες, ιδίως δε όταν οι συνθήκες ανάπτυξης δεν είναι άριστες, το *C. sepedonicum* μπορεί να υπάρχει ως λανθάνουσα μόλυνση στα φυτά μελιτζάνας ακόμη και μετά από επώαση 40 ημερών. Η μόλυνση αυτή ενδέχεται να οδηγήσει σε νανισμό και καχεξία των μολυσμένων φυτών. Εάν η αντίδραση στην δοκιμή ανοσοφθορισμού θεωρηθεί θετική, ίσως κριθεί αναγκαίο να γίνουν περαιτέρω δοκιμές. Είναι, επομένως, ουσιώδες να συγκρίνεται ο ρυθμός ανάπτυξης όλων των μολυσμένων φυτών με το ρυθμό ανάπτυξης μαρτύρων μολυσμένων με αποστειρωμένο 0,05 M PBS, και να ελέγχεται το περιβάλλον του θερμοκηπίου.

Συστάσεις για περαιτέρω δοκιμές:

6.9.1. Κόβονται τα στελέχη πάνω από το σημείο μόλυνσης και αφαιρούνται τα φύλλα.

6.9.2. Τα στελέχη διαλυτοποιούνται σε 0,05 M PBS pH 7,0, όπως αναφέρεται στα σημεία 3.1 έως 3.2.

6.9.3. Χρησιμοποιείται το ήμισυ του ιζήματος για μια χρώση κατά Gram (4.) και για μια δοκιμή ανοσοφθορισμού (5).

6.9.4. Εάν χρώση κατά Gram ή/και η δοκιμή ανοσοφθορισμού δώσουν θετικά αποτελέσματα, χρησιμοποιείται το άλλο ήμισυ του ιζήματος για την πραγματοποίηση περαιτέρω δοκιμής σε φυτά μελιτζάνας Ως μάρτυρες πρέπει να χρησιμοποιούνται γνωστή καλλιέργεια *C. sepedonicum* και αποστειρωμένο 0,05 M PBS. Εάν δεν παρατηρηθούν συμπτώματα στην περαιτέρω δοκιμή, το δείγμα πρέπει να θεωρείται αρνητικό.

7. **Απομόνωση του C. sepedonicum**

Η διάγωση μπορεί να επιβεβαιωθεί μόνον με την απομόνωση και την ταυτοποίηση του *C. sepedonicum* (8). Μολονότι το *C. sepedonicum* είναι απαιτητικός οργανισμός, είναι δυνατόν να απομονώθει από ιστούς που παρουσιάζουν συμπτώματα. Ωστόσο, το βακτήριο αυτό μπορεί να καλυφθεί από σαπροφυτικά βακτήρια ταχύτερης ανάπτυξης και, για το λόγο αυτό, δεν συνιστάται η απομόνωση απευθείας από το ίζημα ιστών κονδύλου (3.3). Τα φυτά μελιτζάνας αποτελούν εξαιρετικό υπόστρωμα επιλεκτικού εμπλουτισμού για την ανάπτυξη του *C. sepedonicum* και προσφέρουν εξαιρετική δοκιμή επιβεβαίωσης στον ξενιστή.

Οι απομονώσεις πρέπει να πραγματοποιούνται από όλους τους κονδύλους πατάτας και φυτά μελιτζάνας που εμφανίζουν συμπτώματα (4, 6). Όταν απαιτείται, η διαλυτοποίηση των στελεχών των φυτών μελιτζάνας πρέπει να γίνεται όπως αναφέρεται στα σημεία 3 και 6.9.

7.1. Τα αιωρήματα διασπείρονται γραμμωτά σε ένα από τα ακόλουθα θρεπτικά υποστρώματα (η σύνθεση των υποστρωμάτων δίδεται στο προσάρτημα 6):

Nutrient dextrose agar (μόνον για υποκαλλιέργεια)

Yeast peptone glucose agar

Nutrient yeast dextrose agar

Yeast extract mineral salts agar.

Η καλλιέργεια επωάζεται στους 21°C μέχρι 20 ημέρες.

Η ανάπτυξη του *C. sepedonicum* είναι βραδεία, οι δε αποικίες είναι συνήθως χρώματος κρεμ, υπερυψωμένες, μεγέθους μύτης καρφίτσας μετά από δέκα ημέρες.

Επαναδιασπείρονται γραμμωτά για να εξασφαλιστεί η καθαρότητα.

Ο ρυθμός ανάπτυξης βελτιώνεται με υποκαλλιέργειες. Οι τυπικές αποικίες είναι χρώματος κρεμ-λευκού ή ελεφαντίνου, στρογγυλές, λείες, υπερυψωμένες, θολωτές, βλεννώδεις-ρευστές, με πλήρη περίμετρο και με διάμετρο 1-3 mm συνήθως.

Ταυτοποίηση

Από υγιή ή ασθενή φυτά πατάτας και μελιτζάνας είναι δυνατόν να απομονωθούν διάφορα θετικά κατά Gram ροπαλόμορφα βακτήρια των οποίων οι αποικίες μοιάζουν με τις αποικίες του *C. sepedonicum*. Συνεπώς, το *C. sepedonicum* πρέπει να αναγνωρίζεται με μία από τις ακόλουθες δοκιμές:

Δοκιμή ανοσοφθορισμού (5.1)·

Δοκιμή σε φυτά μελιτζάνας·

Τροφικές και φυσιολογικές δοκιμές (προσάρτημα 7):

— Δοκιμή οξείδωσης/ζύμωσης (O/F),

— Δοκιμή οξειδάσης,

— Ανάπτυξη στους 37°C,

— Παραγωγή ουρεάσης,

— Υδρόλυση αισκουλίνης,

— Υδρόλυση αμύλου,

— Αντοχή σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 7 %,

— Δοκιμή ινδόλης,

— Δοκιμή καταλάσης,

— Παραγωγή υδροθείου,

— Χρησιμοποίηση κιτρικών ιόντων,

— Υδρόλυση ζελατίνης,

— Παραγωγή οξέως από: γλυκερίνη, λακτόζη, ραμνόζη ή σαλικίνη,

— Χρώση κατά Gram.

Όλες οι δοκιμές πρέπει να περιλαμβάνουν ως μάρτυρα ένα γνωστό *C. sepedonicum*. Οι τροφικές και φυσικολογικές δοκιμές πρέπει να διενεργούνται με μόλυσμα από υποκαλλιέργειες σε nutrient agar. Οι μορφολογικές συγκρίσεις πρέπει να γίνονται από καλλιέργειες σε nutrient dextrose agar.

Για τη δοκιμή ανοσοφθορισμού, η συγκέντρωση των κυττάρων πρέπει να προσαρμόζεται στα 10^6 κύτταρα/ml. Ο τίτλος της δοκιμής ανοσοφθορισμού πρέπει να είναι παρόμοιος με τον τίτλο της γνωστής καλλιέργειας του *C. sepedonicum*.

Για τη δοκιμή σε φυτά μελιτζάνας, η συγκέντρωση των κυττάρων πρέπει να προσαρμόζεται σε 10^7 κύτταρα/ml περίπου. Οι δοκιμές σε φυτά μελιτζάνας πρέπει να διενεργούνται με 10 φυτά για καθένα από τους ελεγχόμενους οργανισμούς και με γνωστή καλλιέργεια *C. sepedonicum* και αποστειρωμένο νερό ως μάρτυρες· με τις καθαρές καλλιέργειες, ο τυπικός μαρασμός παρατηρείται εντός 20 ημερών, αλλά τα φυτά που δεν εμφανίζουν συμπτώματα μέσα στην περίοδο αυτή πρέπει να επωάζονται επί 30 συνολικά ημέρες σε θερομοκρασίες που ευνοούν την ανάπτυξη των φυτών μελιτζάνας χωρίς να υπερβαίνουν του 30°C (βλέπε προσάρτημα 5). Εάν δεν εμφανιστούν συμπτώματα εντός 30 ημερών, η καλλιέργεια δεν μπορεί να επαληθευθεί ως παθογόνος μορφή του *C. sepedonicum*.

Δοκιμή	*C. sepedonicum*
O/F	Αδρανές ή ελαφρώς οξειδωτικό
Οξειδάση	–
Καταλάση	+
Αναγωγή νιτρικών ιόντων	–
Ενεργότητα ουρεάσης	–
Παραγωγή υδροθείου	–
Παραγωγή ινδόλης	–
Χρησιμοποίηση κιτρικών ιόντων	–
Υδρόλυση αμύλου	– ή ασθενής
Ανάπτυξη στους 37 °C	–
Ανάπτυξη σε 7 % NaCl	–
Υδρόλυση ζελατίης	–
Υδρόλυση αισκουλίνης	+
Παραγωγή οξέως από:	–
— γλυκερίνη	–
— λακτόζη	– ή ασθενής
— ραμνόζη	–
— σαλικίνη	–

Προσάρτημα 1

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΥΓΡΟΥ ΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΟΠΩΣ ΣΥΝΙΣΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΥΣ LELLIOT ΚΑΙ SELLAR, 1976

D C silicone antifoam MS A compound (Hopkins & Williams Ltd, Cat. nr. 9964 – 25, Chadwell Heath, Essex, England)	10 ml
Lubrol W flakes (ICI Ltd)	0,5 g
Πυροφωσφορικό τετρανάτριο	1 g
0,05 M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος pH 7,0 (προσάρτημα 2)	1 l

---

Προσάρτημα 2

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

0,05 M φωσφορικό διάλυμα άλατος, pH 7,0

Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα μπορεί να χρησιμοποιείται για την διαλυτοποίηση ιστών κονδύλων (2.1)

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
NaCl	8,0 g
Απεσταγμένο νερό μέχρι	1 l

0,01 M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος, pH 7,2

Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα χρησιμοποιείται για την αραίωση των αντιορρών και το πλύσιμο των πλακών της δοκιμής ανοφθροσιμού

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2,7 g
$Na_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Απεσταγμένο νερό μέχρι	1 l

0,1 M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα γλυκερίνης, pH 7,6

Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα χρησιμοποιείται ως υλικό έγκλεισης για την ενίσχυση του φθορισμού κατά τη δοκιμή ανοσοφθορισμού

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	3,2 g
$Na_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0,15 g
Γλυκερείνη	50 ml
Απεσταγμένο νερό	100 ml

Προσάρτημα 3

ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ GRAM (ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ HUCKER)(DOETSCH, 1981)

Διάλυμα crystal violet

Διαλύονται 2 g crystal violet σε 20 ml αιθανόλης 95 %.

Διαλύονται 0,8 g οξαλικού αμωνίου σε 80 ml απεσταγμένου νερού.

Αναμειγνύονται τα δύο διαλύματα.

Ιώδιο του Lugol

Ιώδιο	1 1
Ιωδιούχο κάλιο	2 g
Απεσταγμένο νερό	300 ml

Τα στερεά κονιοποιούνται σε ιγδίο, προστίθενται στο νερό και αναδεύονται εντός κλειστού δοχείου μέχρις ότου διαλυθούν.

Μεταχρωστικό διάλυμα σαφρανίνης

Μητρικό διάλυμα:

Σαφρανίνη O	2,5 g
Αιθανόλη 95 %	100 ml

Αναμειγνύονται και αποθηκεύονται.

Για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας, το μητρικό διάλυμα αραιώνεται 1 : 10.

Διαδικασία χρώσης

1. Το δείγμα εξαπλούται ως λεπτό φιλμ στην αντικειμενοφόρο, ξημαίνεται στον αέρα και προσηλώνεται με θερμότητα.
2. Η αντικειμενοφόρος καλύπτεται πλήρως, επί 1 λεπτό, με διάλυμα crystal violet.
3. Η αντικειμενοφόρος πλένεται σύντομα με νερό της βρύσης.
4. Η αντικειμενοφόρος καλύπτεται πλήρως με ιώδιο του Lugol επί 1 λεπτό.
5. Η αντικειμενοφόρος πλένεται με νερό της βρύσης και στεγνώνεται με διηθητικό χαρτί.
6. Στην αντικειμενοφόρο προστίθεται στάγδην αιθανόλη 95 % μέχρι να παύσει η αφαίρεση χρώματος ή η αντικειμενοφόρος εμβαπτίζεται, με ελαφρή ανάδευση, σε αιθανόλη 95 % επί 30 δευτερόλεπτα.
7. Η αντικειμενοφόρος πλένεται με νερό της βρύσης και στεγνώνεται με διηθητικό χαρτί.
8. Η αντικειμενοφόρος καλύπτεται πλήρως με διάλυμα σαφρανίνης επί 10 δευτερόλεπτα.
9. Η αντικειμενοφόρος πλένεται με νερό της βρύσης και στεγνώνεται με διηθητικό χαρτί.

Τα θετικά κατά Gram βακτήρια εμφανίζουν ιώδη-κυανό χρωματισμό. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια εμφανίζουν ρόδινο-ερυθρό χρωματισμό.

Προσάρτημα 4

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΟΥ ΑΝΤΙΔΡΟΥΝ ΘΕΤΙΚΑ ΣΤΗ ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Εμβαδόν (S) του φατνίου μιας πολυφατνιακής αντικειμενοφόρου

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

όπου D = διάμετρος του φατνίου

Εμβαδόν (s) του οπτικού πεδίου του αντικειμενικού

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

όπου d = διάμετρος του οπτικού πεδίου.

Το d υπολογίζεται είτε με απευθείας μέτρηση είτε με τους ακόλουθους τύπους:

$$s = \frac{\pi i^2}{G^2K^2x4} \quad (3)$$

όπου i = συντελεστής πεδίου (εξαρτάται από τον τύπο του προσοφθαλμίου και κυμαίνεται μεταξύ 8 και 24),
K = συντελεστής σωλήνα (1 ή 1,25),
G = μεγεθυντική ισχύς του αντικειμενικού (100x, 40x κλπ.).

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

από τον (3) $d = \sqrt{\frac{4 \times \frac{\pi i^2}{G^2K^2x4}}{\pi}} = \frac{i}{GK}$ (4)

Μετράται ο αριθμός των τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά πεδίο (c).

Υπολογίζεται ο αριθμός των τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά φατνίο (c).

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

Υπολογίζεται ο αριθμός τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά ml ιζήματος (N)

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

όπου y = όγκος ιζήματος στο φατνίο
F = συντελεστής αραίωσης του ιζήματος.

Προσαρτημα 5

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΦΥΤΩΝ ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ

Σπόροι μελιτζάνας *(Solanum melongena* cv. Black Beauty) σπέρνονται σε παστεριωμένο υπόστρωμα. Μετά την πλήρη έκπτυξη των κοτυληδόνων (10-14 ημέρες), τα φυτάρια μεταφυτεύονται σε γλάστρες με παστεριωμένο υπόστρωμα.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται φυτά στο στάδιο φυλλοφορίας 3, όταν έχουν πλήρως ανοίξει δύο, αλλά όχι περισσότερα από τρία φύλλα.

Τα φυτά μελιτζάνας πρέπει να καλλιεργούνται σε θερμοκήπιο υπό τις ακόλουθες συνθήκες:

Μήκος ημέρας: 14 ώρες ή φυσικό μήκος ημέρας, αν είναι μεγαλύτερο

Θερμοκρασία: την ημέρα 21-24°C,

τη νύχτα 15°C.

Σημείωση: Το *C. sepedonicum* δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασία >30°C. Εάν, τη νύχτα, η θερμοκρασία δεν κατέρχεται στους 15°C, ενδέχεται να συμβεί καταστροφή των χρωμοφόρων (αργυρόχρους νέκρωσις).

Η καταστροφή των ριζών από προνύμφες των Sciaridae μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση του κατάλληλου εντομοκτόνου.

Προμηθευτές φυτών μελιτζάνας Black Beauty:

1. AB Hammenhögs Frö
   270 50 Hammenhög
   Σουηδία
2. HURST Seeds Ltd
   Avenue Road
   Witham
   Essex GM8 2DX
   Αγγλία
3. ASGRO Italia Sp.A.
   Corso Lodi, 23
   Milano
4. KÜPPER
   Mitteldeutsche Samer GmbH
   Hessenring 22,
   D-27269 Eschwege

Προσάρτημα 6

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ C. SEPEDONICUM

Nutrient agar (NA)

Difco Bacto Nutrient Agar σε απεσταγμένο νερό, στην αναλογία που συνιστά ο κατασκευαστής. Αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Nitrient dextrose agar (NDA)

Difco Bacto Nutrient Agar με 1 % D(+) γλυκόζη (μονούδρική). Αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 115°C επί 20 λεπτά.

Yeast peptone glucose agar (YPGHA)

Difco Bacto Yeast Extract (no 0127)	5 g
Difco Bacto Peptone (no 0118)	5 g
D(+) γλυκόζη (μονοϋδρική)	10 g
Difco Bacto Purified Agar (no 0560)	15 g
Απεσταγμένο νερό	1 l

Το υπόστρωμα αποστειρώνεται σε παρτίδες του 1/2 λίτρου, σε αυτόκλειστο, στους 115°C επί 20 λεπτά.

Yeast extract mineral salts medium (YGM)

Difco Bacto Yeast Extract	2,0 g
D(+)-γλυκόζη (μονοϋδρική)	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4 . H_2O$	0,015 g
NaCl	0,05 g
$FeSO_4 . 7H_2O$	0,005 g
Difco Bacto Purified Agar	18 g
Απεσταγμένο νερό	1 l

Το υπόστρωμα αποστειρώνεται σε παρτίδες του 1/2 λίτρου, σε αυτόκλειστο, στους 115°C επί 20 λεπτά.

Προσάρτημα 7

ΤΡΟΦΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ C. SEPEDONICUM

Όλα τα υποστρώματα πρέπει να επωάζονται στους 21 °C και να εξετάζονται ύστερα από έξι ημέρες. Εάν το βακτήριο δεν έχει αναπτυχθεί, η επώαση συνεχίζεται για 20 ημέρες συνολικά.

— **Δοκιμή οξείδωσης και ζύμωσης** (Hugh and Leifson), 1953) – Δοκιμή O/F

Βασικό υπόστρωμα:

KCl	0,2 g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0,2 g
$NH_4H_2PO_4$	1,0 g
Difco Bacto Peptone	1,0 g
Difco Bacto Purified Agar	3,0 g
D(+) γλυκόζη (μονοϋδρική)	10,0 g
Κυανούν της βρωμοθυμόλης	0,03 g
Απεσταγμένο νερό	1 l

Τα συστατικά αναμειγνύονται και το pH ρυθμίζεται στο 7,0-7,2 με 1NKOH.

Το διάλυμα κατανέμεται, ανά 5 και 10 ml, σε δοκιμαστικούς σωλήνες Pyrex διαστάσεων 16 mm × 100 mm (χωρητικότητα 12 ml).

Αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 115°C επί δέκα λεπτά.

Για κάθε καλλιέργεια μολύνονται σωλήνες με 5 και με 10 ml υποστρώματος. Στον σωλήνα με τα 10 ml προστίθενται ασηπτικά 1-2 ml αποστειρωμένης υγρής παραφίνης. Οι σωλήνες επωάζονται.

Θετική αντίδραση:

Σωλήνας	*Χρωματισμός*	*Ερμηνεία*
Ανοικτός Κλειστός	Κίτρινος Κίτρινος	Ζύμωση
Ανοικτός Κλειστός	Κίτρινος Κυανοπράσινος	Οξείδωση
Ανοικτός Κλειστός	Υποπράσινος Κυανοπράσινος	Οξείδωση ή αδρανής

— **Δοκιμή οξειδάσης** (Kovacs, 1956)

Αντιδραστήριο οξειδάσης του Kovacs:

Υδρατικό διάλυμα 1 % διυδροχλωριούχου τετραμεθυλο παραφαινυλενοδιαμίνης (BDH No 30386) σε απεσταγμένο νερό.

Το αντιδραστήριο αυτό πρέπει να παρασκευάζεται πρόσφατα σε όγκο 1 ml ή μπορεί να αποθηκεύεται σε καστανόχρωμες γυάλινες φιάλες στους 5°C επί 1 έως 4 εβδομάδες.

Σε ένα κομμάτι διηθητικού χαρτιού σε καθαρό τρυβλίο Petri τοποθετείται μια σταγόνα αντιδραστηρίου. Αμέσως μετά, εξαπλούται στο αντιδραστήριο αυτό ένα μέρος της ελεγχόμενης καλλιέργειας από Nutrient Agar (NA) με τη χρήση μικροβιολογικής βελόνης από σύρμα λευκοχρύσου.

Θετική αντίδραση: εντός δέκα δευτερολέπτων εμφανίζεται ιώδης χρωματισμός. Οι καλλιέργειες οι οποίες εμφανίζουν το χρωματισμό αυτό εντός 10-30 δευτερολέπτων είναι ασθενώς θετικές.

Σημείωση: Πρέπει οπωσδήποτε να χρησιμοποιείται βακτηριολογική βελόνη από σύρμα λευκοχρύσου και καλλιέργειες επί NA, γιατί τα ίχνη σιδήρου και η υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα δίνουν ψευδή θετικά αποστελέσματα.

— **Παραγωγή οξέως από λακτόζη, ραμνόζη, σαλικίνη ή γλυκερίνη**

Παρασκευάζεται υπόστρωμα Hugh and Leifson O/F χωρίς τη γλυκόζη το οποίο κατανέμεται, ανά 5 ml, σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 115°C επί δέκα λεπτά. Όταν το λυωμένο υπόστρωμα έχει θερμοκρασία 45°C, προστίθενται ασηπτικά 0,5 ml υδατικού διαλύματος 10 % γλυκερίνης, λακτόζης, ραμνόζης ή σαλικίνης, το οποίο έχει αποστειρωθεί με διήθηση, και το μείγμα αναμειγνύεται προσεκτικά.

Θετική αντίδραση: Η μεταβολή του χρωματισμού από κυανοπράσινο σε κίτρινο υποδηλώνει την παραγωγή οξέως.

— **Δοκιμή καταλάσης**

Σε μια καθαρή αντικειμενοφόρο, τοποθετείται μια σταγόνα υπεροξειδίου του υδρογόνου (30 όγκων) στην οποία γαλακτωματοποιείται μια ποσότητα καλλιέργειας, με τη βοήθεια βακτηριολογικής βελόνης από σύρμα λευκοχρύσου.

Θετική αντίδραση: Η παραγωγή φυσσαλίδων οξυγόνου στη σταγόνα υποδηλώνει την παρουσία καταλάσης.

— **Ενεργότητα αναγωγάσης των νιτρικών ιόντων και απονιτροποίηση** (Bradbury, 1970)

Καλλιεργητικό υπόστρωμα:

KNO_3 (χωρίς νιτρώδη ιόντα)	1 g
Difco Bacto Yeast Extract	1 g
K_2HPO_4	5 g
Απεσταγμένο νερό	1 l

Το υπόστρωμα κατανέμεται, ανά 10 ml, σε φιάλες των 20 ml και αποστειρώνεται σε αυτόκλειστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Αντιδραστήριο A:

H_2SO_4	8 g
Οξικό οξύ 5 N	1 l

Αντιδραστήριο B:

ναφθυλαμίνη	5 g
οξικό οξύ 5 N	1 l

Το υπόστρωμα νιτρικών ιόντων μολύνεται εις διπλούν και ελέγχεται ύστερα από 10 και 20 ημέρες με την προσθήκη μιας σταγόνας ιωδίου του Lugol, 0,5 ml αντιδραστηρίου A και 0,5 ml αντιδραστηρίου B. Αν το υπόστρωμα δεν εμφανίσει κοκκινωπό χρωματισμό, προστίθεται 50 mg περίπου σκόνης ψευδαργύρου και ελέγχεται η μεταβολή του χρώματος.

Θετική αντίδραση:	*Αντίδραση χρωματισμού*	
	Φάση 1	Φάση 2
Μη αναγωγή νιτρικών ιόντων	Άχρωμο	Κόκκινο
Αναγωγή νιτρικών ιόντων μέχρι τα νιτρώδη (μόνον αναγωγάση των νιτρικών αλάτων)	Κόκκινο	—
Αναγωγή των νιτρικών αλάτων πέραν των νιτρωδών (απονιτροποίηση — αναγωγάση νιτρικών και νιτρωδών ιόντων)	Άχρωμο	Άχρωμο

— **Παραγωγή συρεάσης** (Lelliott, 1966)

Βασικό υπόστρωμα:

Oxoid Urea Agar Base (CM53)	2,4 g
Απεσταγμένο νερό	95 ml

Αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 115 °C επί 20 λεπτά. Όταν η θερμοκρασία του λυωμένου υποστρώματος φθάσει του 50 °C, προστίθενται ασηπτικά 5 ml υδατικού διαλύματος συρίας 40 % (Oxoid SR20), το οποίο έχει αποστειρωθεί με διήθηση μέσω βακτηριολογικού φίλτρου και το μείγμα αναμειγνύεται καλά.

Το μείγμα κατανέμεται, ανά 6 ml, σε αποστειρωμένους σωλήνες (16 × 100 mm) και αφήνεται να στερεοποιηθεί υπό κλίση, με αρκετή ποσότητα υποστρώματος στον πυθμένα του σωλήνα.

Θετική αντίδραση: Το κιτρινο-πορτοκαλί υπόστρωμα εμφανίζει έντονο κόκκινο ή ιώδη χρωματισμό εάν υπάρχει ενεργότητα συρεάσης.

Χρησιμοποίηση κιτρικών ιόντων (Christensen) (Skerman, 1967)

Citrate agar base (Merck 2503)	23 g
Απεσταγμένο νερό	1 l

Τα συστατικά αναμειγνύονται και θερμαίνονται για να διαλυθούν, στη συνέχεια δε κατανέμονται, ανά 6 ml, όπως για το υπόστρωμα ουρίας. Αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 121 °C επί 15 λεπτά. Μετά την αποστείρωση, το υπόστρωμα αφήνεται να στερεοποιηθεί υπό κλίση.

Θετική αντίδραση: Η χρησιμοποίηση των κιτρικών ιόντων υποδηλώνεται με τη μεταβολή του χρώματος του υποστρώματος από πορτοκαλί σε κόκκινο.

— **Παραγωγή υδροθείου** (Ramamurthi, 1959)

Υπόστρωμα:

Difco Bacto tryptone (No 0123)	10 g
K_2HPO_4	1 g
NaCl	5 g
Απεσταγμένο νερό	1 l

Τα συστατικά διαλύονται και κατανέμονται, ανά 6 ml, σε σωλήνες 16 × 100 mm. Αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 115°C επί δέκα λεπτά.

Το υπόστρωμα μολύνεται και, από το χείλος του σωλήνα, αναρτάται μια λωρίδα δοκιμαστικού χάρτου οξικού μολύβδου (Merck 9511), η οποία συγκρατείται στη θέση της με το πώμα του σωλήνα. Επώαση μέχρι 20 ημέρες.

Θετική αντίδραση: Η παραγωγή υδροθείου από την τρυπτόνη υποδηλώνεται με τον μαυροκάστανο χρωματισμό του δοκιμαστικού χάρτου.

— **Παραγωγή ινδόλης** (Ramamurthi, 1959)

Υπόστρωμα:

Όπως για τη δοκιμή υδροθείου.

Αφαιρείται η λωρίδα δοκιμαστικού χάρτου οξικού μολύβδου, προστίθενται 1-2 ml διαιθυλαιθέρα, ο σωλήνας αναδεύεται προσεκτικά και αφήνεται ήρεμος για να διαχωριστούν οι φάσεις (5 λεπτά). Προστίθενται προσεκτικά 0,5 ml αντιδραστηρίου του Kovacs (Merck 9293) κατά μήκος του εσωτερικού τοιχώματος του κεκλιμένου σωλήνα.

Θετική αντίδραση: Η παρουσία ινδόλης υποδηλώνεται με την εμφάνιση κόκκινου χρώματος στην κίτρινη στοιβάδα μεταξύ των φάσεων αιθέρα και νερού.

— **Ανάπτυξη στους 37°C** (Ramamurthi, 1959)

Υπόστρωμα:

Difco Bacto Nutrient Broth (No 0003)	8 g
Αποστειρωμένο νερό	1 l

Τα συστατικά αναμειγνύονται για να διαλυθούν και κατανέμονται, ανά 6 ml, σε σωλήνες.

Αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Μόλυνση και επώαση στους 37°C.

Θετική αντίδραση: Ανάπτυξη βακτηρίων.

— **Ανάπτυξη σε 7 % γλωριούχο νάτριο** (Ramamurthi, 1959)

Υπόστρωμα:

Difco Bacto Nutrient Broth	8 g
NaCl	70 g
Απεσταγμένο νερό	1 l

Τα συστατικά αναμειγνύονται για να διαλυθούν και κατανέμονται, ανά 6 ml, σε σωλήνες.

Αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Θετική αντίδραση: Ανάπτυξη βακτηρίων.

— *Υδρόλυση ζελατίνης* (Lelliot, Billing and Hayward, 1966)

Υπόστρωμα:

Difco Bacto Gelatin (No 0143)	120 g
Απεσταγμένο νερό	1 l

Το συστατικά αναμειγνύονται, διαλύονται με θέρμανση και κατανέμονται, ανά 6 ml, σε σωλήνες.

Αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Θετική αντίδραση: Υγροποίηση της ζελατίνης, ακόμη και στους 5°C επί 30 λεπτά.

— **Υδρόλυση αμύλου**

Υπόστρωμα:

Difco Bacto Nutrient Agar (λυωμένο)	1 l
Difco Bacto Soluble Starch (No 0178)	2 g

Τα συστατικά αναμειγνύονται και αποστειρώνονται σε αυτόκλειστο στους 115°C επί δέκα λεπτά.

Το υπόστρωμα κατανέμεται σε τρυβλία, τα οποία στη συνέχεια μολύνονται κατά κηλίδες.

Μετά την πλήρη ανάπτυξη των βακτηρίων (10-20 ημέρες), αφαιρείται μέρος των αναπτυχθέντων βακτηρίων και η επιφάνεια του τρυβλίου καλύπτεται πλήρως με ιώδιο του Lugol.

Θετική αντίδραση: Η υδρόλυση του αμύλου υποδηλώνεται από τις άχρωμες ζώνες που σχηματίζονται κάτω και γύρω από τα αναπτυσσόμενα βακτήρια· το υπόλοιπο υπόστρωμα έχει ιώδη χρωματισμό.

— **Ενεργότητα υδρολάσης της αισκουλίνης** (Sneath and Collins, 1974)

Υπόστρωμα:

Difco Bacto Peptone	10 g
Αισκουλίνη	1 g
Κιτρικός σίδηρος (Merck 3862)	0,05 g
Κιτρικό νάτριο	1 g
Απεσταγμένο νερό	1 l

Τα συστατικά αναμειγνύονται για να διαλυθούν και το μείγμα κατανέμεται, ανά 6 ml, σε σωλήνες. Αποστείρωση σε αυτόκλειστο στους 115°C επί δέκα λεπτά.

Το υπόστρωμα είναι άχρωμο, αλλά παρουσιάζει κυανωπό φθορισμό.

Θετική αντίδραση: Η υδρόλυση της αισκουλίνης υποδηλώνεται με την εμφάνιση καστανού χρώματος και την εξαφάνιση του φθορισμού, γεγονός το οποίο ελέγχεται με λαμπτήρα υπεριωδών ακτίνων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213-218.

Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147-152.

Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.

Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24-26.

Janse, J. D. and Van Vaerenbergh, J. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections *(Corynebacterium sepedonicum)* in potato. EPPO Bull., No.º 17, 1987, σ. 1-10.

Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.

Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114-118.

Lelliott, R. A., E. Billing and A.C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470-489.

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

Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 55 σ.

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

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

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

1. Για κάθε πιθανολογούμενη εμφάνιση για την οποία υπάρχει θετική αντίδραση στη δοκιμή ανοσοφθορισμού σύμφωνα με τη μέθοδο που ορίζεται στο παράρτημα I και για την οποία αναμένεται επιβεβαίωση ή διάψευση με την εν λόγω μέθοδο, παρακρατούνται και φυλάσσονται κατάλληλα:

   — όλοι οι κόνδυλοι ή τα φυτά της δειγματοληψίας, όταν είναι εφικτό και

   — κάθε εναπομένον εκχύλισμα και αντικειμενοφόρος ανοσοφθορισμού,

   μέχρι του πέρατος της εν λόγω μεθόδου.

2. Σε περίπτωση επιβεβαίωσης της παρουσίας του οργανισμού, παρακρατείται και φυλάσσεται καταλλήλως:

   — το υλικό που αναφέρεται στην παράγραφο 1,

   — ένα δείγμα του μολυσμένου υλικού μελιτζάνας το οποίο έχει εμβολιαστεί με εκχύλισμα κονδύλου ή φυτού, και

   — η απομονωμένη καλλιέργεια του οργανισμού,

   για τουλάχιστον ένα μήνα μετά τη διαδικασία κοινοποίησης βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 2.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III

1. Τα στοιχεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τον προσδιορισμό της έκτασης της πιθανής μόλυνσης βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο β), περιλαμβάνουν:

   — τους κονδύλους ή τα φυτά που παράγονται σε περιοχή παραγωγής χαρακτηρισμένη ως μολυσμένη βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α),

   — την περιοχή παραγωγής ή τους χώρους των οποίων μέρος της παραγωγής συνδέεται με τους κονδύλους ή τα φυτά, που έχουν χαρακτηρισθεί ως μολυσμένα βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α), συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χρησιμοποιούν τον ίδιο εξοπλισμό και εγκαταστάσεις παραγωγής απευθείας ή μέσω κοινού αναδόχου,

   — τους κονδύλους ή τα φυτά που παράγονται στην ή τις περιοχές που αναφέρονται στην προηγούμενη περίπτωση, ή που υπήρχαν σ' αυτούς τους χώρους ή περιοχές παραγωγής κατά την περίοδο κατά την οποία, οι κόνδυλοι ή τα φυτά που χαρακτηρίζονται ως μολυσμένα βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) υπήρχαν στους χώρους ή περιοχές παραγωγής που αναφέρονται στην πρώτη περίπτωση,

   — τις κεντρικές αποθήκες που διακινούν πατάτες προέλευσης των ανωτέρω περιοχών παραγωγής,

   — κάθε μηχάνημα, όχημα, σκάφος, αποθήκη ή μονάδα αυτών και κάθε άλλο αντικείμενο, συμπεριλαμβανομένων των υλικών συσκευασίας, που ενδέχεται να έχουν έλθει σε επαφή με κονδύλους ή φυτά χαρακτηρισμένα ως μολυσμένα βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α), κατά τους τελευταίους δώδεκα μήνες ή όποτε κρίνεται σκόπιμο,

   — κάθε κόνδυλο ή φυτό που έχει αποθηκευθεί ή ήλθε σε επαφή, με οποιαδήποτε κατασκευή ή αντικείμενο που απαριθμείται στην προηγούμενη περίπτωση, πριν από τον καθαρισμό ή την απολύμανση αυτών των κατασκευών και αντικειμένων και

   — βάσει των αποτελεσμάτων των αναλύσεων που διενεργούνται σύμφωνα με το άρθρο 6, κονδύλους ή φυτά της ίδιας κλωνικής προέλευσης με τους κονδύλους ή τα φυτά που χαρακτηρίζονται ως μολυσμένα βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α), για τα οποία κρίνεται, βάσει αναλύσεων, ότι είναι πιθανώς μολυσμένα.

2. Τα στοιχεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τον προσδιορισμό της πιθαναλογούμενης μετάδοσης που αναφέρεται στο άρθρο 5 παράγραφος 1 στοιχείο γ) περιλαμβάνουν:

   — τη γειτνίαση άλλων χώρων ή εγκαταστάσεων παραγωγής όπου καλλιεργούνται πατάτες ή άλλα φυτά ξενιστές,

   — τη διάδοση του συγκεκριμένου αποθέματος πατατόσπορου.

3. Οι λεπτομέρειες της κοινοποίησης που αναφέρεται στο άρθρο 5 παράγραφος 2 πρώτο εδάφιο περιλαμβάνουν:

   — για κάθε αποστολή ή παρτίδα πατάτας που έχουν χαρακτηρισθεί ως μολυσμένα, κατά περίπτωση, τα πιστοποιητικά που ορίζονται στα άρθρα 7 ή 8 της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ, το διαβατήριο ή τον αριθμό μητρώου,

   — την ονομασία της ποικιλίας για τα αποθέματα πατατόσπορου και, όπου είναι δυνατό, για όλες τις άλλες περιπτώσεις,

   — περιγραφή των στοιχείων της προσδιορισθείσας μόλυνσης και της οριοθέτησης της ζώνης,

   — την ύπαρξη εκχυλίσματος, έτοιμων αντικειμενοφόρων ανοσοφθορισμού, μολυσμένων φυτών μελιτζάνας και μιας απομονωμένης καλλιέργειας του οργανισμού από την ανάλυση με την οποία επιβεβαιώθηκε η παρουσία του οργανισμού.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

1. Τα επισήμως εποπτευόμενα μέτρα που αναφέρονται στο άρθρο 7 παράγραφος 1 για τη διάθεση των κονδύλων ή φυτών που έχουν χαρακτηρισθεί ως μολυσμένα βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) είναι τα ακόλουθα:

   — η χρήση για βιομηχανική μεταποίηση μέσω απευθείας και άμεσης παράδοσης σε μεταποιητική μονάδα με κατάλληλες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων για τις οποίες έχει διαπιστωθεί ότι δεν ενέχουν εμφανή κίνδυνο μετάδοσης του οργανισμού και με σύστημα απολύμανσης των χώρων αποθήκευσης και των αναχωρούντων οχημάτων, ή

   — άλλα μέτρα, με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού· τα μέτρα αυτά πρέπει να κοινοποιούνται στην Επιτροπή και στα άλλα κράτη μέλη.

2. Η κατάλληλη χρήση ή διάθεση κονδύλων ή φυτών που έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανώς μολυσμένα βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο β) και αναφέρονται στο άρθρο 7 παράγραφος 2, υπό τον έλεγχο των αρμόδιων επίσημων φορέων των κρατών μελών, είναι η ακόλουθη:

   — χρήση ως πατάτες εμπορίου για την κατανάλωση, συσκευασμένες για άμεση παράδοση και χρήση χωρίς νέα συσκευασία, και που προορίζονται για τέτοιου είδους άμεση παράδοση και χρήση ή

   — χρήση ως πατάτες εμπορίου για βιομηχανική μεταποίηση, που προορίζονται για απευθείας και άμεση παράδοση σε μεταποιητική μονάδα με κατάλληλες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων και απολύμανσης, ή

   — άλλη χρήση ή διάθεση, με την προϋποθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού.

3. Οι κατάλληλες μέθοδοι καθαρισμού και απολύμανσης των αντικειμένων που αναφέρονται στο άρθρο 7 παράγραφος 3 είναι αυτές για τις οποίες έχει διαπιστωθεί ότι δεν ενέχουν εμφανή κίνδυνο μετάδοσης του οργανισμού και εφαρμόζονται υπό την εποπτεία των αρμόδιων επίσημων φορέων των κρατών μελών.

4. Η σειρά μέτρων που εφαρμόζουν τα κράτη μέλη στη ζώνη που οριοθετείται βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο γ) και αναφέρεται στο άρθρο 7 παράγραφος 4 περιλαμβάνει:

4.1. Σε περιοχές παραγωγής που χαρακτηρίζονται ως μολυσμένες βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α),

   α) σε αγρό που χαρακτηρίζεται ως μολυσμένος βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α), είτε

      i) — κατά τη διάρκεια τουλάχιστον τριών καλλιεργητικών ετών μετά το έτος της προσδιορισθείσας μόλυνσης,

         — λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και άλλων αυτοφυών φυτών που είναι ξενιστές του οργανισμού και

         — δεν φυτευονται κόνδυλοι, φυτά ή πραγματικοί σπόροι, ή άλλα αυτοφυή φυτά που είναι ξενιστές του οργανισμού, ή φυτά τα οποία ενέχουν εμφανή κίνδυνο επιβίωσης ή μετάδοσης του οργανισμού, μέχρις ότου ο αγρός κριθεί απαλλαγμένος από αυτοφυή φυτά πατάτας για δύο τουλάχιστον συναπτά καλλιεργητικά έτη,

      — κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση, φυτεύεται επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος για παραγωγή πατάτας εμπορίου μόνον και πραγματοποιείται επίσημη εξέταση, όπως καθορίζεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1,

      — κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση και σύμφωνα με ένα κατάλληλο σύστημα αμειψισποράς, φυτεύεται επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος για παραγωγή είτε πατατόσπορου είτε πατάτας εμπορίου και πραγματοποιείται επίσημη εξέταση όπως καθορίζεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1 ή

      ii) — κατά τα τέσσερα καλλιεργητικά έτη μετά την περίοδο της προσδιορισθείσας μόλυνσης,

         — λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και άλλων αυτοφυών φυτών που είναι ξενιστές του οργανισμού και

         — ο αγρός διατηρείται είτε χέρσος είτε ως μόνιμος βοσκότοπος στον οποίο, η βλάστηση κόβεται συχνά και χαμηλά ή ο οποίος χρησιμοποιείται για εντατική βόσκηση,

      — κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση, φυτεύεται επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος για παραγωγή είτε πατατόσπορου είτε πατάτας εμπορίου και πραγματοποιείται επίσημη εξέταση, όπως καθορίζεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1·

β) σε άλλους αγρούς,

— κατά το καλλιεργητικό έτος μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση

— είτε δεν φυτεύονται κόνδυλοι, φυτά ή πραγματικοί σπόροι πατάτας ή άλλα αυτοφυή φυτά που είναι ξενιστές του οργανισμού και, κατά περίπτωση, λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας, είτε

— φυτεύεται επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος αποκλειστικά για παραγωγή πατάτας εμπορίου, εφόσον οι αρμόδιοι επίσημοι φορείς κρίνουν ότι έχει εξαλειφθεί ο κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού από αυτοφυή φυτά πατάτας ή άλλα αυτοφυή φυτά που είναι ξενιστές του οργανισμού,

— τουλάχιστον για τα δύο πρώτα καλλιεργητικά έτη μετά το καθοριζόμενο στην προηγούμενη περίπτωση, φυτεύεται μόνον επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος, για παραγωγή είτε πατατόσπορου είτε πατάτας εμπορίου,

— για κάθε καλλιεργητικό έτος που αναφέρεται στις προηγούμενες περιπτώσεις, λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και των αυτοφυών φυτών που είναι ξενιστές του οργανισμού, και πραγματοποιείται επίσημη εξέταση όπως καθορίζεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1,

— όταν φυτεύεται επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος για την παραγωγή πατάτας εμπορίου κατά το καλλιεργητικό έτος που ακολουθεί την καθορισθείσα μόλυνση, τα καλλιεργούμενα φυτά επιθεωρούνται την κατάλληλη στιγμή, τα δε τυχόν αυτοφυή φυτά πατάτας υποβάλλονται σε ανάλυση για την ανίχνευση του οργανισμού·

γ) αμέσως μετά το χαρακτηρισμό μολυσμένων αντικειμένων σύμφωνα με το άρθρο 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) και για κάθε επόμενο καλλιεργητικό έτος μέχρι και την πρώτη επιτρεπόμενη καλλιεργητική περίοδο πατάτας στον ή τους αγρούς που έχουν χαρακτηρισθεί μολυσμένοι, όπως περιγράφεται στην παράγραφο α), καθαρίζονται και απολυμαίνονται κατάλληλα όλα τα μηχανήματα και οι αποθηκευτικοί χώροι στον χώρο παραγωγής, που έχουν σχέση με την παραγωγή της πατάτας, με τις κατάλληλες μεθόδους, όπως ορίζεται στο σημείο 3·

δ) στα συστήματα παραγωγής όπου είναι δυνατή η πλήρης αντικατάσταση του υποστρώματος βλάστησης,

— δεν φυτεύονται κόνδυλοι, φυτά ή πραγματικοί σπόροι παρά μόνον εάν στη μονάδα παραγωγής εφαρμόζονται επισήμως εποπτευόμενα μέτρα για την εξάλειψη του οργανισμού και την απομάκρυνση όλων των πατατών ή άλλου υλικού σολανώδους, συμπεριλαμβανομένης, τουλάχιστον, μιας πλήρους αντικατάστασης του υποστρώματος βλάστησης και του καθαρισμού και της απολύμανσης της μονάδας παραγωγής και όλου του εξοπλισμού, και, στη συνέχεια έχει χορηγηθεί άδεια για παραγωγή πατάτας από τους αρμόδιους επίσημους φορείς και

— η παραγωγή πατάτας γίνεται από επισήμως πιστοποιημένο πατατόσπορο ή από μικροκονδύλους ή μικροκονδύλους ή μικροφυτά που προέρχονται από ελεγχθείσες πηγές.

4.2. Εντός της οριοθετημένης ζώνης, με την επιφύλαξη των μέτρων που περιγράφονται στο σημείο 4.1, τα κράτη μέλη:

α) αμέσως, και για τρεις τουλάχιστον καλλιεργητικές περιόδους μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση:

— εξασφαλίζουν, μέσω των αρμόδιων επίσημων φορέων τους, την εποπτεία των χώρων που καλλιεργούν, αποθηκεύουν ή διακινούν κονδύλους πατάτας, καθώς και των χώρων στους οποίους λειτουργούν, βάσει σύμβασης, μηχανήματα για τις πατάτες,

— απαιτούν, κατά περίπτωση, καθαρισμό και απολύμανση των μηχανημάτων και των αποθηκών των χώρων αυτών με τις κατάλληλες μεθόδους, όπως ορίζεται στο σημείο 3,

— απαιτούν τη φύτευση αποκλειστικά πιστοποιημένου πατατόσπορου για όλες τις καλλιέργειες πατάτας της ζώνης αυτής,

— απαιτούν τη χωριστή διακίνηση των αποθεμάτων συγκομισθέντος πατατόσπορου και πατάτας εμπορίου για όλες τις εγκαταστάσεις της ζώνης,

— διενεργούν επίσημη εξέταση όπως περιγράφεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1·

β) καταρτίζουν, κατά περίπτωση, πρόγραμμα αντικατάστασης όλων των αποθεμάτων πατατόσπορου σε εύθετο χρονικό διάστημα.

Τα μέτρα που εφαρμόζονται βάσει του σημείου 4.2, μαζί με τους αριθμούς μητρώου των παραγωγών, των συνεταιριστικών αποθηκών και των κέντρων αποστολής εντός της οριοθετημένης ζώνης, κοινοποιούνται ετησίως στα άλλα κράτη μέλη και την Επιτροπή.