31993L0085

18.10.1993 *EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA* L 259/1

NÕUKOGU DIREKTIIV 93/85/EMÜ, 4. oktoober 1993, kartuli ringmädaniku kontrolli kohta

EUROOPA ÜHENDUSTE NÕUKOGU,

võttes arvesse Euroopa Majandusühenduse asutamislepingut, eriti selle artiklit 43,

võttes arvesse komisjoni ettepanekut, ([1])

võttes arvesse Euroopa Parlamendi arvamust, ([2])

võttes arvesse majandus- ja sotsiaalkomitee arvamust ([3])

ning arvestades, et:

kartulikasvatusel on ühenduse põllumajanduses oluline koht; kahjulikud organismid ohustavad pidevalt kartuli saagikust;

kartulikasvatuse kaitsmine selliste kahjulike organismide eest peaks lisaks tootmismahu säilitamisele suurendama põllumajanduse tootlikkust;

liikmesriigi territooriumile kahjulike organismide toomise vastu võetavatel kaitsemeetmetel on üksnes piiratud mõju, kui selliste organismidevastu ei võidelda samal ajal ja metoodiliselt kogu ühenduses ega hoita ära nende levimist;

üks kartulile kahjulikke organisme on *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., kartuli ringmädaniku nakkusetekitaja; seda haigust on esinenud mõnes ühenduse osas ning siiani eksisteerib mõni nakkusallikas;

kogu ühenduses on kartulikasvatuse jaoks märkimisväärne oht, kui ei võeta meetmeid selle haiguse asukoha määratlemiseks ning leviku kindlaksmääramiseks, haigusjuhtude ja leviku vältimiseks ning, kui haigus avastatakse, haiguse leviku takistamiseks ja tõrjumiseks haiguse likvideerimise eesmärgil;

selle tagamiseks tuleb kogu ühenduses võtta teatavaid meetmeid; lisaks peavad liikmesriigid olema valmis võtma vajaduse korral lisameetmeid või rangemaid meetmeid, tingimusel et see ei takista kartulite liikumist ühenduse piires, välja arvatud nõukogu 21. detsembri 1976. aasta direktiivis 77/93/EMÜ (taimedele või taimsetele saadustele kahjulike organismide ühendusse kandumise ja seal levimise vastu võetavate kaitsemeetmete kohta) ([4]) sätestatud ulatuses; sellistest meetmetest tuleb teatada teistele liikmesriikidele ja komisjonile;

nõukogu 24. juuni 1980. aasta direktiivis 80/665/EMÜ (kartuli ringmädaniku kontrolli kohta) ([5]) on sätestatud miinimumnõuded, mida liikmesriigid peavad võtma kartuli ringmädaniku vastu;

([1]) EÜT C 93, 2.4.1993, lk 12.
([2]) EÜT C 176, 28.6.1993, lk 210.
([3]) EÜT C 161, 14.6.1993, lk 18.
([4]) EÜT L 26, 31.1.1977, lk 20. Direktiivi on viimati muudetud komisjoni direktiiviga 92/103/EMÜ (EÜT L 363, 11.12.1992, lk 1).
([5]) EÜT L 180, 14.7.1980, lk 30.

sellest ajast alates on toimunud oluline areng teadmistes kartuli ringmädaniku kohta ja kartuli ringmädaniku nakkusetekitaja kindlaksmääramisel;

ühenduse taimetervise korra kohaldamine ühenduses kui sisepiirideta alal on tekitanud vajaduse osa direktiivi 80/665/EMÜ sätetest uuesti läbi vaadata ja muuta;

kõnealuse läbivaatamise tulemusena on leitud, et direktiivi 80/665/EMÜ sätted ei ole piisavad ning meetmeid tuleb veel täpsustada;

selles olukorras tuleks direktiiv 80/665/EMÜ kehtetuks tunnistada ning vastu võtta vajalikud meetmed;

meetmete puhul tuleb arvestada esiteks, et haigus võib jääda varjatuks ja avastamata nii kasvavate kultuuride kui ladustatud mugulate puhul ning seega saab haigust tõhusalt vältida üksnes nakkuseta seemnekartuli tootmise ja kasutamise teel, ning teiseks, et haiguse asukoha määramiseks on vajalik korrapärane ametlik kontroll; nakkusetekitaja levik kasvavate kultuuride hulgas ei ole kõige olulisem tegur, vaid nakkusetekitaja võib püsida üle talve isekülvanud kartulitaimedes ning see on peamine nakkusallikas, mis kandub ühest hooajast teise; nakkusetekitaja levib peamiselt kartulite saastumisel kokkupuutes nakatunud kartulitega ning istutus-, saagikoristus- ja käitlemisseadmete või veo- ja ladustamismahutite kaudu, mis on saastunud nakkusetekitajaga eelmisest kontaktist nakatunud kartulitega; sellised saastunud objektid võivad mõnda aega pärast saastumist jääda nakkusohtlikeks; nakkusetekitaja levikut saab vähendada või vältida kõnealuste objektide desinfitseerimisega; seemnekartuli saastumine on peamine oht nakkusetekitaja levikul;

selliste üldmeetmete üksikasjade kindlaksmääramiseks ning liikmesriikide rangemate või lisameetmete jaoks, mida võetakse nakkusetekitaja oma territooriumile toomise vältimiseks, on soovitav, et liikmesriigid teevad komisjoniga tihedat koostööd alalise taimetervise komitee (edaspidi "komitee") raames,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Käesolevas direktiivis käsitletakse meetmeid, mida liikmesriigid peavad võtma kartuli ringmädaniku põhjustaja *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. (edaspidi "organismi") vastu, et:

a) määrata selle asukoht ja levik;

b) vältida selle esinemist ja levikut; ning

c) haiguse avastamise korral vältida selle levikut ja tõrjuda haigust likvideerimise eesmärgil.

Artikkel 2

1. Liikmesriigid viivad läbi korrapäraseid ametlikke uuringuid organismi leidmiseks oma territooriumilt pärit mugulatel ja vajaduse korral kartulitaimedel (*Solanum tuberosum* L.), et kinnitada organismi puudumist.

Nimetatud uuringuteks võetakse mugulate puhul proovid nii seemne- kui muudelt kartulitelt, soovitavalt ladustatud partiidest, ning proovidega tehakse katseid ametlikes või ametliku järelevalve all olevates laborites, kasutades organismi avastamiseks ja diagnoosimiseks I lisas esitatud meetodit. Lisaks võib vajaduse korral teha ametlikku või ametliku järelevalve all visuaalset kontrolli, lõigates muude proovide mugulaid.

Taimede puhul viiakse need uuringud läbi vastavalt asjakohastele meetoditele ning proovidega tehakse asjakohaseid ametlikke katseid või katseid ametliku järelevalve all.

Proovide arvu, päritolu, kihistamise ja aja otsustavad vastutavad ametiasutused direktiivis 77/93/EMÜ määratletud tähenduses usaldusväärsete teaduslike ja statistiliste põhimõtete ja organismi bioloogia alusel, võttes arvesse asjaomaseid kartulikasvatussüsteeme asjaomastes liikmesriikides. Üksikasjad selle kohta esitatakse igal aastal teistele liikmesriikidele ja komisjonile, et tagada samalaadne kindlusaste liikmesriikide vahel organismi puudumise kinnitamisel.

2. Lõikes 1 sätestatud ametlike uuringute tulemustest teatatakse vähemalt kord aastas teistele liikmesriikidele ja komisjonile. Sellise teate üksikasjad on konfidentsiaalsed. Need võib esitada komiteele direktiivi 77/93/EMÜ artiklis 16a sätestatud korras.

3. Direktiivi 77/93/EMÜ artiklis 16a sätestatud korras võib vastu võtta järgmised sätted:

— käesoleva artikli lõikes 1 sätestatud ja vastavalt usaldusväärsetele teaduslikele ja statistilistele põhimõtetele läbiviidavate uuringute üksikasjad,

— käesoleva artikli lõikes 2 sätestatud teate üksikasjad.

4. Direktiivi 77/93/EMÜ artiklis 16a sätestatud korras võetakse vastu järgmised sätted:

— käesoleva artikli lõike 1 kolmandas lõigus sätestatud uuringute ja katsete asjakohased meetodid.

Artikkel 3

Liikmesriigid tagavad, et organismi esinemise kahtlusest nende territooriumil kartulitaimedes ja mugulates või koristatud, ladustatud või turustatud mugulates või selle kinnitusest teatatakse nende vastutavale ametiasutusele.

Artikkel 4

1. Haiguse esinemise kahtluse korral tagavad liikmesriigi vastutavad ametiasutused, kuhu juhtumitest on teatatud, et viiakse läbi ametlik või ametliku järelevalve all tehtav laboratoorne kontroll, kasutades I lisas sätestatud meetodit ning vastavalt II lisa punktis 1 määratletud tingimustele, et kinnitada haiguse esinemise kahtlust või lükata see ümber. Esimesel juhul kohaldatakse II lisa punktis 2 sätestatud nõudeid.

2. Kuni haiguse esinemise kahtluse kinnitamiseni või ümberlükkamiseni lõike 1 alusel sellistel esinemise kahtluste juhtudel, kus:

i) on nähtud visuaalseid sümptomeid, mis annavad aluse haiguse diagnoosimise kahtluseks, või

ii) on saadud I lisas määratletud immunofluorestsentskatse või muu asjakohase katse positiivne tulemus,

liikmesriikide vastutavad ametiasutused:

a) keelavad kõikide nende partiide või saadetiste liikumise, kust proovid on võetud, välja arvatud liikumine nende kontrolli all ja tingimusel, et on kindlaks tehtud organismi leviku identifitseeritava ohu puudumine;

b) võtavad meetmed kahtlustatava haiguse esinemise päritolu tuvastamiseks;

c) kehtestavad asjakohased täiendavad ettevaatusabinõud vastavalt eeldatavale ohule, et vältida organismi levikut. Need meetmed võivad hõlmata kõikide muude mugulate või taimede liikumise ametlikku kontrolli haiguse esinemise kahtlusega seotud tööruumides või neist väljaviimisel.

3. Direktiivi 77/93/EMÜ artiklis 16a ettenähtud korras võib vastu võtta järgmise sätte:

— lõike 2 punktis c osutatud meetmed.

4. Direktiivi 77/93/EMÜ artiklis 16a sätestatud korras võetakse vastu järgmine säte:

— käesoleva artikli lõike 2 punktis ii sätestatud muu asjakohane katse.

Artikkel 5

1. Kui ametlik või ametliku järelevalve all tehtav laboratoorne kontroll, kasutades I lisas sätestatud meetodit, kinnitab organismi olemasolu mugulate, taimede või taimede osade proovis, siis liikmesriigi vastutavad ametiasutused, võttes arvesse usaldusväärseid teaduslikke põhimõtteid, organismi bioloogiat ning asjakohaseid tootmis-, turustamis- ja töötlemissüsteeme selles liikmesriigis:

a) tunnistavad saastunuks mugulad või taimed, saadetise ja/või partii ning seadme, sõiduki, laeva, lao või nende osad ning mis tahes muud objektid, sealhulgas pakkematerjali, millest proov on võetud, ning vajaduse korral tootmiskoha(d) ning põllu(d), kust mugulad või taimed on koristatud;

b) määravad III lisa punkti 1 sätteid arvesse võttes kindlaks tõenäolise saaste ulatuse koristamisele eelneva või järgneva kontakti kaudu või saastunuks tunnistatud tootmisahela kaudu;

c) piiritlevad tsooni punkti a alusel saastunuks tunnistamise, punkti b alusel tõenäolise saastamise ulatuse määramise ja organismi võimaliku leviku põhjal, võttes arvesse III lisa punkti 2 sätteid.

2. Liikmesriigid teavitavad viivitamata teisi liikmesriike ja komisjoni vastavalt III lisa punkti 3 sätetele mis tahes saastumisest, mis on kinnitatud vastavalt lõike 1 punktile a, ning piiritletud tsooni üksikasjadest lõike 1 punkti c alusel.

Sellise teate üksikasjad on konfidentsiaalsed. Need võib esitada komiteele direktiivi 77/93/EMÜ artiklis 16a sätestatud korras.

3. Lõike 2 alusel saadetud teate ning selles nimetatud üksikasjade tulemusel määravad teised teates määratletud liikmesriigid vastavalt vajadusele kindlaks saastumise, tõenäolise saastumise ulatuse ning piiritlevad tsooni vastavalt lõike 1 punktidele a, b ja c.

Artikkel 6

Liikmesriigid näevad ette, et kui mugulad või taimed on tunnistatud saastunuks artikli 5 lõike 1 punkti a alusel, viiakse vastavalt artikli 4 lõikele 1 läbi katsed kartulivarudega, mis on samast kloonist kui saastunud kartulid. Katsed tehakse nii paljude selliste mugulate või taimedega, kui on vaja tõenäolise esmase nakkusallika ja tõenäolise saastumise ulatuse määramiseks, soovitavalt riskiastme järjekorras.

Katsete tulemusel määratakse kindlaks saastumine, tõenäoline saastumise ulatus ja piiritletakse tsoonid vastavalt artikli 5 lõike 1 punktidele a, b ja c.

Artikkel 7

1. Liikmesriigid näevad ette, et mugulaid või taimi, mis on tunnistatud saastunuks artikli 5 lõike 1 punkti a alusel, ei või maha panna ega istutada ning et vastutavate ametiasutuste kontrolli all need:

— hävitatakse, või

— kõrvaldatakse muul viisil vastavalt ametliku järelevalve all olevale meetmele või olevatele meetmetele kooskõlas IV lisa punkti 1 sätetega, tingimusel et tehakse kindlaks, et ei ole organismi leviku identifitseeritavat ohtu.

2. Liikmesriigid näevad ette, et mugulaid ja taimi, mille puhul on kindlaks tehtud, et need on tõenäoliselt saastunud vastavalt artikli 5 lõike 1 punktile b, ei või maha panna ega istutada ning, ilma et see piiraks artiklis 6 osutatud samast kloonist pärit varudega tehtud katsete tulemusi, kasutatakse neid või kõrvaldatakse need vastutavate ametiasutuste kontrolli all IV lisa punktis 2 määratletud viisil, nii et on tagatud organismi leviku identifitseeritava ohu puudumine.

3. Liikmesriigid näevad ette, et mis tahes seadmed, sõiduk, laev, ladu või nende osad ning mis tahes muud objektid, sealhulgas pakkematerjal, mis on artikli 5 lõike 1 punkti a alusel tunnistatud saastunuks või mille puhul on kindlaks tehtud, et need on artikli 5 lõike 1 punkti b alusel tõenäoliselt saastunud, hävitatakse või puhastatakse ja desinfitseeritakse, kasutades IV lisa punktis 3 määratletud asjakohaseid meetodeid. Pärast desinfitseerimist ei käsitata selliseid objekte enam saastununa.

4. Ilma et see piiraks lõigete 1, 2 ja 3 alusel rakendatud meetmete kohaldamist, näevad liikmesriigid ette, et artikli 5 lõike 1 punkti c alusel piiritletud tsoonis rakendatakse IV lisa punktis 4 määratletud meetmeid.

Artikkel 8

1. Liikmesriigid näevad ette, et seemnekartul peab vastama direktiivi 77/93/EMÜ nõuetele ning olema pärit otse ametlikult kinnitatud programmi alusel saadud materjalist, mille kohta on I lisas sätestatud meetodit kasutades ametlike või ametliku järelevalve all tehtud katsete käigus leitud, et see on organismist vaba.

Eespool nimetatud katse tehakse:

— esmase kloonaretuse teel saadud taimedega juhtudel, kus saastumine mõjutab seemnekartuli toodangut,

— muudel juhtudel kas esmase kloonaretuse teel saadud taimedega või eliitseemnekartulit või varasemat paljundusmaterjali esindavate proovidega.

2. Direktiivi 77/93/EMÜ artiklis 16a sätestatud korras võib vastu võtta järgmised sätted:

— käesoleva artikli lõike 1 teise lõigu esimese taande üksikasjalikud rakenduseeskirjad,

— eeskirjad käesoleva artikli lõike 1 teise lõigu teises taandes ettenähtud esindavate proovide kohta.

Artikkel 9

Liikmesriigid keelavad organismi hoidmise ja käitlemise.

Artikkel 10

Ilma et see piiraks direktiivi 77/93/EMÜ sätete kohaldamist, võivad liikmesriigid lubada erandeid käesoleva direktiivi artiklites 6, 7 ja 9 osutatud meetmetest katsete ja teaduslike eesmärkide puhul ning sordivaliku alase töö puhul, tingimusel et sellised erandid ei piira organismi kontrolli ega tekita organismi leviku ohtu.

Artikkel 11

Liikmesriigid võivad vastu võtta selliseid lisameetmeid või rangemaid meetmeid, mis on vajalikud organismiga võitlemiseks või selle leviku vältimiseks niivõrd, kuivõrd need on kooskõlas direktiivi 77/93/EMÜ sätetega.

Esimeses lõigus nimetatud lisameetmed võivad hõlmata ettekirjutust, et võib maha panna üksnes seemnekartulit, mille vastavus ettenähtud taimetervise standarditele on kas ametlikult sertifitseeritud või seda on ametlikult kontrollitud. Viimast võib kohaldada eriti juhul, kui põllumajandustootjal on lubatud oma põllumajandusettevõttes kasutada seemnekartulit, mille ta on saanud oma saagist, ning teistel juhtudel, kui pannakse maha enda toodetud seemnekartulit.

Nende meetmete üksikasjadest teavitatakse teisi liikmesriike ja komisjoni.

Artikkel 12

Käesoleva direktiivi lisade muudatused, mis tehakse teaduse ja tehnika arengut silmas pidades, võetakse vastu direktiivi 77/93/EMÜ artiklis 16a sätestatud korras.

Artikkel 13

1. Liikmesriigid võtavad vastu ja avaldavad käesoleva direktiivi täitmiseks vajalikud sätted 15. novembriks 1993. Liikmesriigid teatavad neist viivitamata komisjonile.

Kui liikmesriigid võtavad vastu need õigusaktid, lisavad nad nendesse õigusaktidesse või nende õigusaktide ametliku avaldamise korral nende juurde viite käesolevale direktiivile. Sellise viitamise viisi näevad ette liikmesriigid.

Liikmesriigid kohaldavad neid meetmeid alates 16. novembrist 1993.

2. Liikmesriigid edastavad komisjonile viivitamata siseriiklike õigusaktide teksti, mille nad käesoleva direktiiviga reguleeritavas valdkonnas vastu võtavad. Komisjon teavitab sellest teisi liikmesriike.

Artikkel 14

Direktiiv 80/665/EMÜ tunnistatakse kehtetuks alates 16. novembrist 1993.

Artikkel 15

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Luxembourg, 4. oktoober 1993

Nõukogu nimel

eesistuja

W. CLAES

I LISA

RINGMÄDANIKU BAKTERI *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (Smith) Davis et al. ssp. *SEPEDONICUS* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. KARTULIMUGULATE PARTIIDES AVASTAMISE JA DIAGNOOSIMISE MEETOD

1. **Mugula basaalse tipu eraldamine**

1.1. 200 mugulat pestakse jooksva kraanivee all ning iga mugula basaalse tipu ümbert eemaldatakse epidermis, kasutades korrapäraselt desinfitseeritud skalpelli või kartulikoorijat; desinfitseerida võib koorijat 70 % etanooli kastes ning leegi kohal kuumutades.

1.2. Noa või kartulikoorijaga eemaldatakse ettevaatlikult koonusekujulised koetükid mugula basaalsest tipust. Liigse muu koe kui juhtkoe hulk hoitakse miinimumtasemel. Pärast eemaldamist tuleb basaalseid tippe töödelda 24 tunni jooksul (vaata lõige 3) või konserveerida –20 °C juures kuni kaks nädalat.

2. **Ringmädaniku sümptomite visuaalne kontroll**

Pärast basaalsete tippude eemaldamist lõigatakse iga mugul põigiti pooleks ning vaadatakse, kas on ringmädaniku sümptomeid.

Mugulaid pigistatakse ning vaadatakse, kas pehmitatud kude eraldub juhtkoest.

Esimesed sümptomid on koe kerge klaasistumine või poolläbipaistvus ilma pehmenemiseta juhtkoe ümbruses, eriti basaalse tipu lähedal. Juhtkoe ring basaalses tipus võib olla veidi tumedama värvusega kui tavaliselt. Esimene kindlalt identifitseeritav sümptom on, kui juhtkoe ring on kollaka värvusega ning kui mugula kergel pigistamisel ilmuvad soontest juustulaadse aine sambad. See eritis sisaldab miljoneid baktereid. Sellel etapil võib tekkida juhtkoe pruunistumine. Esialgu võivad need sümptomid olla üksnes ühes ringi osas ning ei pruugi olla basaalse tipu lähedal ning võivad järk-järgult laieneda kogu ringile. Haiguse süvenedes juhtkude hävib; koore välimine osa võib eralduda sisemisest. Haiguse lõppjärgus ilmuvad mugula pinnale praod, mis on sageli äärtest punakaspruunid. Teise seenhaiguse või bakteri levik võib sümptomeid varjata ning võib olla raske või isegi võimatu eristada lõppjärgus ringmädaniku sümptomeid teistest mugula mädanikest.

3. **Proovide ettevalmistamine Grami järgi värvimiseks, immunofluorestsentsuuringuks ja baklažaanikatseks**

3.1. Basaalsed tipud homogeniseeritakse temperatuuril alla 30 °C, kuni saavutatakse täielik leotis lahjendusvedelikus, mis ei ole teadaolevalt mürgine *Corynebacterium sepedonicum*'ile (nt 0,05 M fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahus pH tasemega 7,0); soovitatav on lisada mittetoksilist deflokulanti ning võib olla vaja lisada mittetoksilist vahutamisvastast ainet (1. ja 2. liide). Tuleks vältida liigset ligunemist.

3.2. Bakterid eraldatakse homogenaadist ühe järgmise meetodi abil. ([1])

A. a) Kuni 180 g tsentrifuugitakse 10 minutit.

b) Vähemalt 4 000 g supernatanti tsentrifuugitakse 10 minutit. Supernatant dekanteeritakse ja eraldatakse.

B. a) Leotisel lastakse 30 minutit seista, et koejäänused settiksid. Supernatant dekanteeritakse sadet puutumata.

b) Supernatant filtreeritakse läbi filterpaberi (Whatman nr 1), mida hoitakse paagutatud klaasfiltris (nr 2 = 40–100 µm), kasutades veejugapumpa. Filtraat kogutakse tsentrifuugiküvetti. Filter pestakse steriilses fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahuses filtraadi maksimumruumalani 35 ml.

c) Vähemalt 4 000 g filtraati tsentrifuugitakse 20 minutit.

3.3. Pellet suspendeeritakse steriilses 0,01 M fosfaatpuhvris pH tasemega 7,2 (2. liide) lõppruumalani ligikaudu 1 ml. Segu jagatakse kaheks osaks ning üks osa jäetakse kontrollimise jaoks alles, külmutades seda –20 °C ([2]) juures või lüofiliseerides. Teine osa jagatakse pooleks, kasutades üht poolt immunofluorestsentsuuringuks ja Grami järgi värvimiseks ning teist baklažaanikatseks.

([1]) Alternatiivse ekstraheerimise meetodi on esitanud Dinesen (1984).
([2]) Tõendatud on (Janse & Van Vaerenberg, 1987), et külmumine võib vähendada *Corynobacterium sepedonicum*'i elujõulisust. Seda probleemi aitab lahendada pelleti lahustamine 10 % glütseroolis.

3.4. Kõiki positiivseid *C.sepedonicum*'i kontrolle ja proove tuleb käsitleda eraldi, et vältida saastumist. Seda tuleb järgida immunofluorestsentsuuringu objektiklaaside ja baklažaanikatse korral.

4. **Grami järgi värvimine**

4.1. Grami järgi värvimine valmistatakse ette kõikide pelleti lahuste jaoks (5.2.1) ning kõikide lõigatud mugulate (2) jaoks, mis on klaasjad, mädanenud või muude kahtlaste sümptomitega. Proovid tuleks võtta haigestunud kudede äärtest.

4.2. Grami järgi värvimine valmistatakse ette teadaolevate *C. sepedonicum*'i kultuuride jaoks ning võimaluse korral looduslikult nakatunud koe (5.1) jaoks.

4.3. Määratakse kindlaks, millised proovid sisaldavad tüüpilisi Grami positiivseid korüneformseid rakke. Üldiselt on *C. sepedonicum*'i rakud 0,8–1,2 µm pikad ning 0,4–0,60 µm laiad.

Nõuetekohane värvimise protseduur on esitatud 3. liites.

Infektsioossetest materjalidest või värskelt isoleeritud kultuuridest valmistatud preparaatides nähakse sageli kerajaid pulkbaktereid, mis on tavaliselt veidi väiksemad kui bakterirakud teistest agarkultuuridest. Enamikul mikroobide söötmetel on *C.sepedonicum*'i rakud erineva ebakorrapärase kujuga korüneformsed (nuiakujulised) pulkbakterid, mis värvuvad Grami järgi vahelduvalt. Rakud esinevad kas üksikult või paarikaupa, asetsedes peale paljunemist nurgeti ja vahetevahel ebakorrapärastes gruppides, mis meenutavad palisaade ja hieroglüüfe.

5. **Immunofluorestsentsuuringu kava**

5.1. Kasutatakse *C.sepedonicum*'i tuntud tüve antiseerumit ATCC 33113 (NCPPB 2137) või NCPPB 2140. Selle immunofluorestsentstiiter peab olema suurem kui 1: 600. Katse objektiklaasile tehakse üks fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahuse kontroll, et määrata, kas fluorestseiinisotiotsüanaadi jänesevastane immunoglobuliini konjugaat kombineerub bakterirakkudega mittespetsiifiliselt. *Corynebacterium sepedonicum*'i (ATCC 33113 (NCPPB 2137), NCPPB 2140) tuleks kasutada homoloogilise antigeeni kontrolliks eraldi objektiklaasil. Võimaluse korral tuleks kasutada looduslikult nakatunud kude (mida on säilitatud lüofiliseerituna või külmutatuna – 20 °C juures) samalaadseks kontrolliks samal objektiklaasil (joonis 2).

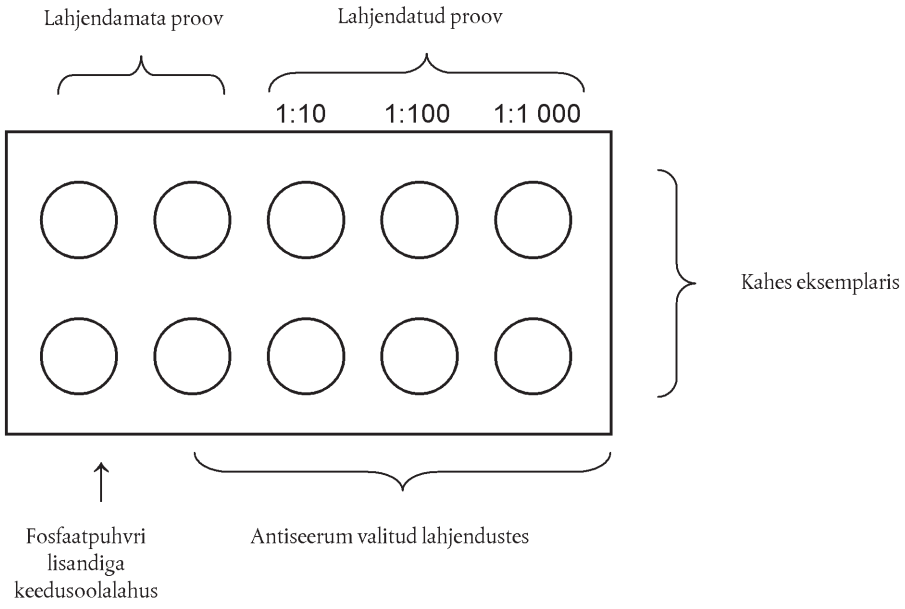
5.2. *Analüüsi käik*

5.2.1. Valmistatakse ette kolm järjestikust lõpliku pelleti kümnekordset lahust (10^1, 10^2, 10^3) destilleeritud vees (joonis 1).

5.2.2. Pipetitakse mõõdetud standardkogus, millest piisab iga pelletilahuse akna (ligikaudu 25 µl) katmiseks või *C. sepedonicum*'i suspensiooniga (ligikaudu 10^6 rakku ml kohta) mitmekohalise objektiklaasi akende katmiseks vastavalt joonisele 1.

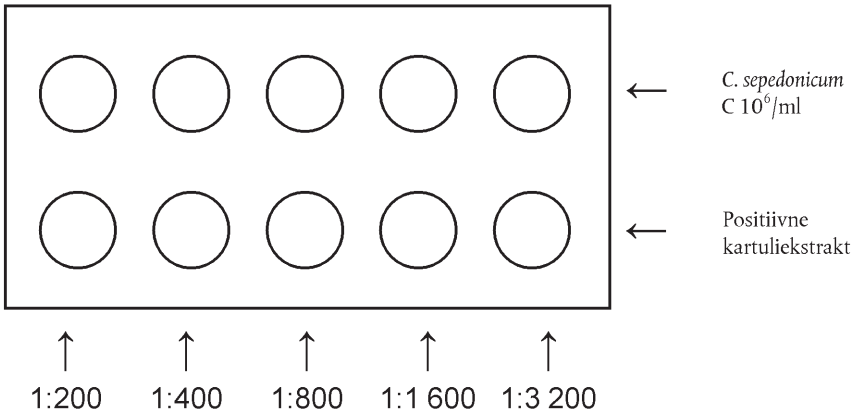
1. Joonis

Proov ja fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahuse kontrollobjektiklaas



2. Joonis

Positiivne kontroll-objektiklaas



5.2.4. Asjakohased aknad kaetakse *C. sepedonicum*'i antiseerumi soovitatavate lahjendustega 0,01 M fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahusega pH tasemega 7,2 (2. liide) vastavalt joonisele 1. (Fluorestseiinisotiotsüanaadi kontrolliks kasutatakse fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahust.) Antiseerumi töölahus peaks olema ligikaudu pool immunofluorestsentstiitri omast. Kui kasutatakse muid antiseerumi lahjendusi, tuleks iga kasutatava lahjenduse jaoks ette valmistada eraldi objektiklaasid.

5.2.5. Proovi inkubeeritakse niiskes ruumis ümbritseva õhu temperatuuril 30 minutit.

5.2.6. Loputatakse hoolikalt 0,01 M fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahusega pH tasemega 7,2. Pestakse viis minutit 0,01 M fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahuses pH tasemega 7,2, vahetades seda kolm korda.

5.2.7. Liigne niiskus eemaldatakse hoolikalt.

5.2.8. Iga aken kaetakse fluorestseiinisotiotsüanaadi konjugaadiga samas lahjenduses, mida on kasutatud tiitri määramiseks, ning inkubeeritakse 30 minutit pimedas niiskes ruumis ümbritseva õhu temperatuuril.

5.2.9. Loputatakse ja pestakse vastavalt eespool kirjeldatule.

5.2.10. Igasse aknasse pannakse ligikaudu 5–10 ml 0,1 M fosfaatpuhvri lisandiga glütseriini pH tasemega 7,6 (või samalaadsesse kattevedelikku pH tasemega vähemalt 7,6) ning kaetakse katteklaasiga (2. liide).

5.2.11. Vaadatakse mikroskoobiga, millel on epifluorestsentsvalgusallikas ja fluorestseiinisotiotsüanaadiga töötamiseks sobivad filtrid. Sobiv on 400 – 1 000kordne suurendus. Paralleelsed aknad skaneeritakse üle kahe diameetri täisnurkade all ja ümber akna perimeetrite.

Leitakse fluorestseerivad rakud positiivse kontrolli puhul ning määratakse tiiter. Leitakse fluorestseerivad rakud fluorestseiinisotiotsüanaadiga/fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahusega kontrollaknast ning, kui neid ei esine, jätkatakse katseakendega. Määratakse vähemalt kümnel mikroskoobiväljal morfoloogiliselt tüüpiliste fluorestseerivate rakkude keskmine arv välja kohta ning arvutatakse rakkude arv lahjendamata pelleti milliliitri kohta (4. liide).

Immunofluorestsentskatse puhul on mitmeid probleeme.

— Kartulipelletis ilmuvad tõenäoliselt ebatüüpilise morfoloogiaga fluorestseerivate rakkude taustpopulatsioonid ning *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*'ega sarnase suuruse ja morfoloogiaga ristuvalt reageerivad saprofüütbakterid. Arvesse võetakse üksnes tüüpilise suuruse ja morfoloogiaga fluorestseerivaid rakke.

  Ristuvate reaktsioonide võimaluse tõttu tuleks immunofluorestsentsuuringu positiivse tulemusega proovidega teha uus katse, kasutades erinevat antiseerumit.

— Avastamise tehniline piir selle meetodi puhul on 10^3–10^4 rakku ühe milliliitri lahjendamata pelleti kohta. Avastamiskünnisel oleva tüüpiliste fluorestseerivate rakkude arvuga proovid on tavaliselt *C. m.* ssp. *sepedonicus*'e suhtes negatiivsed, kuid nendega võib teha baklažaanikatse.

Immunofluorestsentsuuringu tulemus on negatiivne iga proovi puhul, millest ei leita morfoloogiliselt tüüpilisi fluorestseerivaid rakke. Proovid ei ole nakatunud *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*'ega.

Baklažaanikatset ei ole vaja teha.

Immunofluorestsentsuuringu tulemus on positiivne iga proovi puhul, millest leitakse morfoloogiliselt tüüpilisi fluorestseerivaid rakke.

Proovid, mille puhul on immunofluorestsentsuuringu tulemus positiivne mõlema antiseerumiga, võivad olla nakatunud *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*'ega.

Baklažaanikatse tuleb teha kõikide proovidega, mis võivad olla nakatunud.

6. **Baklažaanikatse**

Andmed kultuuri kohta on 5. liites.

6.1. Punktis 3.3 osutatud pellet jaotatakse 25 vähemalt 3. leheetapil baklažaani vahel (5. liide) ühe meetodi abil järgmisena esitatutest (6.2, 6.3 või 6.4).

6.2. *Inokulatsioon sisselõike kaudu I*

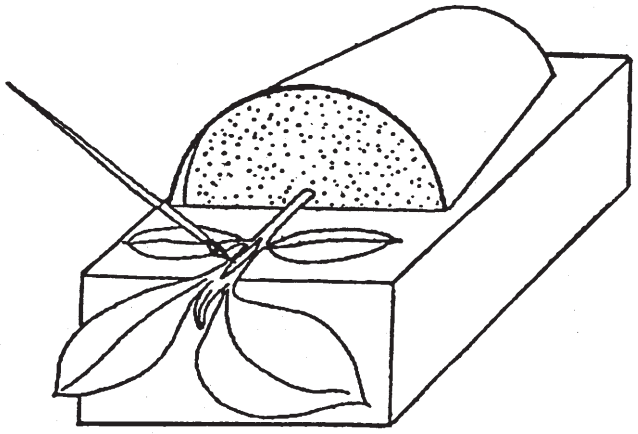
6.2.1. Iga pott asetatakse horisontaalselt (10 × 15 cm vahtpolüstüreenplaadi sisse, mille sügavus on 5 cm ning mille ühelt küljelt (joonis 3) on eemaldatud kiht, et mahutada 10 cm pott). Iga proovi puhul asetatakse varre ja plaadi vahele steriilne alumiiniumfooliumi riba. Taime võib hoida paigal plaadi ümber kinnitatud kummiribaga.

6.2.2. Skalpelliga tehakse idulehtede ja esimese lehe vahele pikisuunas või veidi diagonaalselt 0,5–1,0 cm lõige, mille sügavus on ligikaudu kolmveerand varre diameetrit.

6.2.3. Sisselõiget hoitakse lahti skalpelli tera otsaga ning sellesse viiakse pelletisse kastetud pliiatsiga või peene pintsliga inokulaat. Ülejäänud pellet jaotatakse baklažaanide vahel.

6.2.4. Sisselõige kaetakse 2 ml süstla abil steriilse vaseliiniga.

3. Joonis



6.3. *Inokulatsioon sisselõike kaudu II*

6.3.1. Taime kahe sõrme vahel hoides pipetitakse suspendeeritud pelleti tilk (ligikaudu 5–10 µl) varrele idulehtede ja esimese lehe vahele.

6.3.2. Steriilse skalpelliga tehakse 1 cm pikkune diagonaalne sisselõige (ligikaudu 5° nurga all), mille sügavus on ligikaudu 2/3 varre paksusest, alustades sisselõiget pelleti tilgutamise kohast.

6.3.3. Sisselõige kaetakse süstla abil steriilse vaseliiniga.

6.4. *Inokulatsioon süstla abil*

6.4.1. Baklažaane ei tohi kasta üks päev enne inokulatsiooni, et vähendada raku siserõhku.

6.4.2. Baklažaanide varsi inokuleeritakse idulehtede kohalt hüpodermilise nõelaga süstlaga (vähemalt 23G). Pellet jaotatakse baklažaanide vahel.

6.5. 25 taime inokuleeritakse teadaoleva *C. sepedonicum*'i kultuuriga ning võimaluse korral looduslikult nakatunud mugula kude (5.1) sama inokulatsioonimeetodiga (6.2, 6.3 või 6.4).

6.6. Sama inokulatsioonimeetodiga (6.2, 6.3 või 6.4) inokuleeritakse 25 taime steriilse 0,05 M fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahusega.

6.7. Taimi inkubeeritakse nõuetekohastes tingimustes (5. liide) 40 päeva. Sümptomeid kontrollitakse regulaarselt kaheksa päeva tagant. Loetakse üle sümptomitega taimed. *C.sepedonicum* põhjustab lehtede närbumist, mis võib alata leheservade või leheroodude vahelise osa lõtvusena. Närbunud kude võib alguses olla tumeroheline või laiguline, kuid muutub kahvatumaks enne suremist. Leheroodude vahelise ala närbunud kohad on rasvase ja lödise välimusega. Surnud koel on sageli erekollane serv. Taimed ei pruugi olla hukkunud; mida pikem on periood enne sümptomite tekkimist, seda suurem on ellujäämise võimalus. Taimed võivad infektsioonist välja kasvada. Haigustele vastuvõtlikud noored baklažaanid on *C. sepedonicum*'i väheste populatsioonide suhtes palju tundlikumad kui vanemad taimed, seega tuleb kasutada taimi 3. leheetapil või vahetult enne seda.

Närbumist võivad põhjustada ka mugula koe pelletis olevate muude bakterite või seente populatsioonid. Need hõlmavad *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ja *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata*, samuti saprofüütbakterite ulatuslikke populatsioone. Sellist närbumist on võimalik eristada *C. sepedonicum*'i põhjustatud närbumisest, kuna terved lehed või taimed närbuvad kiiresti.

6.8. Kõik baklažaanipartiid, millel on sümptomeid, valmistatakse ette Grami järgi värvimiseks (4), kasutades taimedelt võetud närbunud lehe ja varre koe osasid, ning isoleeritakse sobivale toitekeskkonnale (7). Baklažaani lehed ja varred desinfitseeritakse pindmiselt, pühkides neid 70 % etanooliga.

6.9. Teatavatel tingimustel, eriti kui kasvutingimused ei ole optimaalsed, võib olla võimalik, et *C. sepedonicum* eksisteerib varjatud nakkusena baklažaanis isegi pärast 40päevast inkubeerimist. Sellised nakkused võivad põhjustada inokuleeritud taimede kasvu ja elujõu vähenemist. Kui immunoflourestsentsuuringut käsitatakse positiivsena, võib olla vaja teha veel uuringuid. Seepärast võib olla vaja võrrelda kõikide katsealuste baklažaanitaimede kasvumäärasid steriilse 0,05 M fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahusega inokuleeritud prooviga ning jälgida kasvuhoone keskkonnatingimusi.

Soovitused täiendavateks katseteks on järgmised:

6.9.1. varred lõigatakse inokuleerimispaiga kohalt ning lehed eemaldatakse;

6.9.2. varsi leotatakse 0,05 M fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahuses pH tasemega 7,0 vastavalt punktidele 3.1 ja 3.2;

6.9.3. pool pelletist kasutatakse Grami järgi värvimiseks (4) ja immunofluorestsentsuuringuks (5);

6.9.4. teine pool kasutatakse täiendava baklažaanikatse (6) jaoks, kui Grami järgi värvimise ja/või immunofluorestsentsuuringu tulemused on positiivsed. Kasutatakse teadaolevat *C. sepedonicum*'i kultuuri ja steriilseid 0,05 M fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahuse proove. Kui täiendaval katsel ei avastata sümptomeid, tuleb proovi käsitada negatiivsena.

7. ***C. sepedonicum'i* isoleerimine**

Diagnoosi saab kinnitada üksnes siis, kui *C. sepedonicum* on isoleeritud ja seega kindlaks tehtud (8). Kuigi *C. sepedonicum* on nõudlik organism, saab seda isoleerida sümptomaatilisest koest. Seda saab siiski välja kasvatada kiiresti kasvavate saprofüütbakterite abil ning seega ei ole soovitav isoleerimine otse mugula koe pelletist (3.3). Baklažaanid on väga hea selektiivsööde *C. sepedonicum*'i kasvamiseks ning peremeestaime kontrollkatse jaoks.

Isoleerida tuleb kõik sümptomaatilised kartulimugulad ja baklažaanid (4, 6). Baklažaanide varte leotamine tuleb vajadusel läbi viia vastavalt punktidele 3 ja 6.9.

7.1. Ühele järgmistest söötmeliikidest kanda suspensiooni triipudena (valemid on esitatud 6. liites):

glükoostoiteagar (üksnes subkultuuri jaoks),

pärmiekstraktiga glükoospeptoonagar,

pärmiekstraktiga glükoostoiteagar,

pärmiekstrakti ja mineraalsooladega agar.

Inkubeeritakse 21 °C juures kuni 20 päeva.

C. sepedonicum kasvab aeglaselt, tekitades tavaliselt 10 päeva jooksul nööpnõelapeasuuruseid, kreemjaid, kuplikujulisi kolooniaid.

Puhtuse saavutamiseks kanda uuesti.

Kasvumäärad paranevad subkultuuriga. Tüüpilised kolooniad on kreemjad või elevandiluu värvi, ümmargused, siledad, kõrgemad, kumera kupli kujuga, limased-vedelad, tervete servadega ning tavaliselt läbimõõduga 1–3 mm.

Identifitseerimine

Paljud Grami järgi positiivsed korüneformsed bakterid, mille kolooniate omadused on sarnased *C. sepedonicum*'i omadega, võib eraldada tervetest või haigestunud kartulitest ja baklažaanidest. Sellisel juhul tuleb *C. sepedonicum* kindlaks teha järgmiste katsetega:

immunofluorestsentsuuring (5.1),

baklažaanikatse,

toite- ja füsioloogilised katsed (7. liide),

— oksüdatsiooni/fermentatsiooni katse,

— oksüdaasikatse,

— kasv 37 °C juures,

— ureaasi tekkimine,

— eskuliini hüdrolüüs,

— tärklise hüdrolüüs,

— 7 % naatriumkloriidilahuse taluvus,

— indoolikatse,

— katalaasikatse,

— H_2S tootmine,

— tsitraadi kasutamine,

— želatiini hüdrolüüs,

— happed: glütseroolist, laktoosist, ramnoosist ja salitsiinist,

— Grami järgi värvimine.

Kõik katsed peaksid hõlmama teadaoleva *C. sepedonicum*'i kontrolli. Toite- ja füsioloogilised katsed tuleks teha, kasutades agarsöötme subkultuuride inokulaate. Glükoostoiteagari kultuuridelt tuleks teha morfoloogilisi võrdlusi.

Immunofluorestsentsuuringu jaoks tuleks kohandada rakupopulatsioone 10^6 rakuni milliliitri kohta. Immunofluorestsentstiiter peaks olema samasugune kui teadaoleva *C. sepedonicum*'i kultuuri puhul.

Baklažaanikatse jaoks tuleks kohandada rakupopulatsioone umbes 10^7 rakuni milliliitri kohta. Baklažaanikatsed tuleks teha 10 taimega iga katseorganismi puhul, kasutades jällegi teadaolevat *C. sepedonicum*'i kultuuri ja steriilse veega kontrollproovi; puhaste kultuuridega peaks tüüpiline närbumine toimuma 20 päeva jooksul, kuid taime, millel ei ole selle aja järel sümptomeid, tuleks inkubeerida kokku 30 päeva temperatuuril, mis soosib baklažaanide kasvu, kuid kuni 30 °C juures (5. liide). Kui 30 päeva pärast ei ole sümptomeid, ei saa kultuuri pidada *Corynobacterium sepedonicum*'i patogeenseks vormiks.

Katse	*C. sepedonicum*
Oksüdatsiooni/fermentatsiooni katse	Inertne või nõrgalt oksüdatiivne
Oksüdaas	–
Katalaas	+
Nitraatide redutseerimine	–
Ureaasi aktiivsus	–
H2S tekkimine	–
Indooli tekkimine	–
Tsitraadi kasutamine	–
Tärklise hüdrolüüs	puudub või nõrk
Kasv 37° juures	–
Kasv 7 % NaCl-s	–
Želatiini hüdrolüüs	–
Eskuliini hüdrolüüs	+
Happed järgmistest ainetest:	
– glütserool	–
– laktoos	puudub või nõrk
– ramnoos	–
– salitsiin	–

1. liide

MATSERATSIOONIVEDELIKU TEKKIMINE (SOOVITANUD LELLIOTT JA SELLAR, 1976)

DC silikooniga vahutamisvastane MS A ühend (Hopkins & Williams Ltd, Cat. No 9964–25, Chadwell Heath, Essex, England)	10 ml
Lubrol W helbed (ICI Ltd)	0,5 g
Tetranaatriumpürofosfaat	1 g
0,05 M fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahus, pH 7,0 (2. liide)	1 liiter

2. liide

PUHVRID

0,05 M fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahus pH 7,0

Seda puhvrit kasutatakse mugulakoe leotamiseks (2.1)

Na2HPO4	4,26 g
KH2PO4	2,72 g
NaCl	8,0 g
Destilleeritud vesi	kuni 1 liiter

0,01 M fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahus, pH 7,2

Seda puhvrit kasutatakse antiseerumi lahjendamiseks ja immunofluorestsentsuuringu objektiklaaside pesemiseks

Na2HPO4 ·12 H2O	2,7 g
NaH2PO4 · 2 H2O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destilleeritud vesi	kuni 1 liiter

0,1 M fosfaatpuhvri lisandiga glütserool pH 7,6

Seda puhvrit kasutatakse kattevedelikuna fluorestseerivuse suurendamiseks immunofluorestsentsuuringul

Na2HPO4 ·12 H2O	3,2 g
NaH2PO4 · 2 H2O	0,15 g
Glütserool	50 ml
Destilleeritud vesi	100 ml

3. liide

GRAMI JÄRGI VÄRVIMINE (HUCKERI MUUDATUS) (DOETSCH, 1981)

Kristallvioleti lahus

2 g kristallvioletti lahustatakse 20 ml 95 % etanoolis.

0,8 g ammooniumoksalaati lahustatakse 80 ml destilleeritud vees.

Kaks lahust segatakse.

Lugoli jood

Jood	1 g
Kaaliumjodiid	2 g
Destilleeritud vesi	300 ml

Ained purustatakse koos uhmris uhmrinuiaga. Lisatakse vette ja segatakse suletud nõus kuni lahustumiseni.

Safraniini kontrastvärvilahus

Põhilahus:

Safraniin O	2,5 g
95 % etanool	100 ml

Segatakse ja jäetakse seisma.

Lahjendatakse 1: 10 töölahuse saamiseks.

Värvimine

1. Valmistatakse äiged, kuivatatakse õhu käes ja kinnitatakse kuumutades.
2. Objektiklaasi ujutatakse kristallvioleti lahuses üks minut.
3. Pestakse kiiresti kraanivee all.
4. Ujutatakse Lugoli joodis üks minut.
5. Pestakse kraaniveega ja kuivatatakse kuivatuspaberiga.
6. Värvitustatakse 95 % etanooliga, mis lisatakse tilkhaaval, kuni kogu värv on eemaldunud, või leotatakse veidi loksutades 30 sekundit.
7. Pestakse kraaniveega ja kuivatatakse kuivatuspaberiga.
8. Ujutatakse safraniinilahuses 10 sekundit.
9. Pestakse kraaniveega ja kuivatatakse kuivatuspaberiga.

Grampositiivsed bakterid värvuvad lillakassinisteks; gramnegatiivsed bakterid värvuvad roosakaspunaseks.

4. liide

IMMUNOFLUORESTSENTSUURINGUS POSITIIVSETE RAKKUDE POPULATSIOONI MÄÄRAMINE

Mitmekohalise objektiklaasi aknavälja pindala (S)

$$= \frac{\pi D2}{4} \quad (1)$$

kus D = akna diameeter.

Objektiivi pindala(d)

$$= \frac{\pi d2}{4} \quad (2)$$

kus d = objektiivi diameeter.

d saadakse kas otsesel mõõtmisel või järgmiste valemite abil:

$$s = \frac{\pi i2}{G2K2 \times 4} \quad (3)$$

kus i = välja koefitsient (sõltub okulaari tüübist ja on 8– 24),
K = toru koefitsient (1 või 1,25),
G = objektiivi suurendus (100 ×, 40 × jne),

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

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

Loendatakse tüüpiliste fluorestseerivate rakkude arv välja kohta (c).

Arvutatakse tüüpiliste fluorestseerivate rakkude arv akna kohta (C).

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

Arvutatakse tüüpiliste fluorestseerivate rakkude arv milliliitri pelleti kohta (N).

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

kus y = pelleti maht aknas,

kus F = pelleti lahjendusfaktor.

5. liide

BAKLAŽAANI KULTUUR

Baklažaani (*Solanum melongena* cv. Black Beauty) seemned külvatakse pastöriseeritud külvikomposti. Täielikult avanenud idulehtedega (10–14 päeva) seemikud istutatakse ümber pastöriseeritud istutuskomposti.

Kasutatakse 3. leheetapil baklažaane, mille kaks või kolm lehte on täielikult lahti rullunud.

Baklažaanid peaksid olema kasvatatud kasvuhoones järgmistel keskkonnatingimustel:

päeva pikkus:: 14 tundi või looduslik päevapikkus, kui see on pikem;

temperatuur:	päeval	21–24 °C,
	öösel	15 °C.

NB: C. sepedonicum ei kasva temperatuuril üle 30 °C. Kui öine temperatuur ei lange 15 °C-ni, võib tekkida kromofoor-kahjustus (hõbelehisus).

Leinasääsklaste vastsete tekitatud juurekahjustust saab kõrvaldada asjakohase insektitsiidi kasutamisega.

Baklažaane sordist "Black Beauty" saab järgmistest kohtadest:

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

6. liide

C. SEPEDONICUM'I KASVU JA ISOLEERIMISE SÖÖDE

Toiteagar

DifcoBacto agarsööde destilleeritud vees tootja valmistatud kontsentratsiooniga. Steriliseeritakse autoklaavimisel 121 °C juures 15 minutit.

Glükoostoiteagar

Difco Bacto agarsööde, mis sisaldab 1 % D(+)-glükoosi (monohüdraat). Steriliseeritakse autoklaavimisel 115 °C juures 20 minutit.

Pärmiekstraktiga glükoospeptoonagar

Difco Bacto pärmiekstrakt (nr 0127)	5 g
Difco Bacto peptoon (nr 0118)	5 g
D(+)-glükoos (monohüdraat)	10 g
Difco Bacto puhastatud agar (nr 0560)	15 g
Destilleeritud vesi	1 liiter

0,5liitrised söötme koguseid steriliseeritakse autoklaavimisel 115 °C juures 20 minutit.

Pärmisekstrakti mineraalsoolade keskkond

Difco Bacto pärmiekstrakt	2,0 g
D(+)-glükoos (monohüdraat)	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 puhastatud agar	18 g
Destilleeritud vesi	1 liiter

0,5-liitriseid söötme koguseid steriliseeritakse autoklaavimisel 115 °C juures 20 minutit.

7. liide

TOITE- JA FÜSIOLOOGILISED KATSED *C. SEPEDONICUM*'I KINDLAKSTEGEMISEKS

Kõiki keskkondi tuleks inkubeerida 21 °C juures ja kontrollida kuue päeva pärast. Kui kasvu ei ole, inkubeeritakse kuni 20 päeva.

— **Oksüdatsiooni ja fermentatsiooni katse** (Hugh & Leifson, 1953)

Põhisööde:

KCl	0,2 g
MgSO4 ·7H2O	0,2 g
NH4H2PO4	1,0 g
Difco Bacto peptoon	1,0 g
Difco Bacto puhastatud agar	3,0 g
D(+)-glükoos (monohüdraat)	10,0 g
Bromotümoolsinine	0,03 g
Destilleeritud vesi	1 liiter

Segatakse ja pH-tase reguleeritakse 1N KOH-ga vahemikku 7,0–7,2.

Jaotatakse 5 ml ja 10 ml kaupa 16 × 100 mm (mahuga 12 ml) Pyrexi torudesse.

Steriliseeritakse autoklaavimisel 115 °C juures 10 minutit.

Inokulaat asetatakse iga kultuuri puhul 5 ml ja 10 ml torudesse. 10 ml torusse lisatakse aseptiliselt 1–2 ml steriilset vedelat parafiini. Inkubeeritakse.

Positiivne reaktsioon:

Toru	Värv	Tõlgendamine
Avatud	Kollane	Fermentatiivne
Suletud	Kollane	
Avatud	Kollane	Oksüdatiivne
Suletud	Sinakas-roheline	
Avatud	Rohekas	Oksüdatiivne või inertne
Suletud	Sinakas-roheline	

— **Oksüdaasikatse** (Kovacs, 1956)

Kovacsi oksüdaasireaktiiv:

1 % tetrametüül-parafenüleendiamiin-dihüdrokloriid (BDH nr 30386) vesilahus destilleeritud vees.

See reaktiiv peaks olema värskelt valmistatud 1 ml koguste kaupa ning seda saab säilitada pruunis klaaspudelis 5 °C juures 1–4 nädalat.

Üks tilk reaktiivi tilgutatakse filterpaberile puhtas Petri tassis. Agarsöötmelt hõõrutakse plaatinast aasaga kiiresti osa katsekultuurist.

Positiivne reaktsioon: purpurse värvuse ilmumine 10 sekundi jooksul. Kultuurid, mille puhul värvus tekib 10–30 sekundi jooksul, on nõrgalt positiivsed.

NB: Oluline on kasutada plaatinast aasa ja agarsöötme kultuure, kuna raua jäljed või kasvukeskkonna kõrge suhkrusisaldus võivad anda ekslikult positiivseid tulemusi.

— **Happe saamine laktoosist, ramnoosist, salitsiinist, glütseroolist**

Valmistatakse ilma glükoosita Hugh & Leifsoni oksüdatsiooni-fermentatsiooni sööde. See jaotatakse 5 ml kaupa torudesse. Steriliseeritakse autoklaavimisel 115 °C juures 10 minutit. Sulanud põhjale lisatakse 45 °C juures aseptiliselt 0,5 ml filtriga steriliseeritud glütseriini, laktoosi, ramnoosi või salitsiini 10 % vesilahust. Segatakse hoolikalt.

Positiivne reaktsioon: värvuse muutumine sinakasrohelisest kollaseks näitab happe tekkimist.

— Katalaasikatse

Üks tilk vesinikperoksiidi (30 %) tilgutatakse puhtale objektiklaasile ja emulgeeritakse aasatäie kultuuriga, kasutades plaatinast aasa.

Positiivne reaktsioon: hapnikumullide tekkimine tilgas näitab katalaasi olemasolu.

— **Nitraadi reduktaasi aktiivsus ja denitrifikatsioon** (Bradbury, 1970)

Sööde:

KNO3 (nitritivaba)	1 g
Difco Bacto pärmiekstrakt	1 g
K2HPO4	5 g
Destilleeritud vesi	1 liiter

Jaotatakse 10 ml kogusteks 20 ml pudelitesse. Steriliseeritakse autoklaavimisel 121 °C juures 15 minutit.

Reaktiiv A:

H2SO4	8 g
5N äädikhape	1 liiter

Reaktiiv B:

naftüülamiin	5 g
5N äädikhape	1 liiter

Nitraatsööde nakatatakse kahes eksemplaris. Katse tehakse 10 ja 20 päeva järel, lisades ühe tilga Lugoli joodi, 0,5 ml reaktiivi A ja 0,5 ml reaktiivi B. Kui sööde ei muutu punakaks, lisatakse ligikaudu 50 mg tsinkpulbrit. Jälgitakse värvi muutumist.

Positiivne reaktsioon	*Värvi muutumine*	
	1. etapp	2. etapp
Nitraadi reduktsioon puudub	värvitu	punane
Nitraadi reduktsioon kuni nitritini (üksnes nitraadi reduktaas)	punane	—
Nitraadi reduktsioon nitritist edasi (denitrifikatsioon – nitraadi ja nitriti reduktaas)	värvitu	värvitu

— **Ureaasi tekkimine** (Lelliott, 1966)

Põhisööde:

Oxoidi uurea agarsööde (CM53)	2,4 g
Destilleeritud vesi	95 ml

Steriliseeritakse autoklaavimisel 115 °C juures 20 minutit. Sulanud põhi jahutatakse 50 °C-ni ja lisatakse aseptiliselt 5 ml filtriga steriliseeritud uurea 40 % vesilahust (Oxoid SR20). Segatakse hästi.

Jaotatakse 6 ml kogusteks steriilsetesse torudesse (16 × 100 mm) ja lastakse seista kaldus asendis.

Positiivne reaktsioon: kollakasoranž sööde muutub kirsipunaseks või fuksiinpunaseks, kui on tekkinud ureaasi aktiivsus.

Tsitraadi kasutamine (Christensen) (Skerman, 1967)

Tsitraat-agarsööde (Merck 2503)	23 g
Destilleeritud vesi	1 liiter

Segatakse ja lahustatakse kuumutades. Jaotatakse 6 ml kogusteks nagu uurea söötme puhul. Steriliseeritakse autoklaavimisel 121 °C juures 15 minutit ja lastakse seista kaldus asendis.

Positiivne reaktsioon: tsitraadi kasutamist näitab söötme värvuse muutumine oranžist punaseks.

— **Vesiniksulfiidi tekkimine** (Ramamurthi, 1959)

Sööde:

Difco Bacto trüptoon (nr 0123)	10 g
K2HPO4	1 g
NaCl	5 g
Destilleeritud vesi	1 liiter

Lahustatakse ja jaotatakse 6 ml kogusteks 16 × 100 mm torudesse. Steriliseeritakse autoklaavimisel 115 °C juures 10 minutit.

Nakatatakse ja aseptiliselt riputatakse toru suust pliiatsetaatpaber (Merck 9511). Hoitakse kaanega paigal. Inkubeeritakse kuni 20 päeva.

Positiivne reaktsioon: H_2S tekkimist trüptoonist näitab katsepaberi värvumine mustjaspruuniks.

— **Indooli tekkimine** (Ramamurthi, 1959)

Sööde:

nagu H_2S katse puhul.

Pliiatsetaatpaber eemaldatakse ning lisatakse 1–2 ml dietüüleetrit ja loksutatakse õrnalt. Lastakse kihtidel eralduda (viis minutit). Lisatakse hoolikalt 0,5 ml Kovacsi reaktiivi (Merck 9293) kaldus torusse.

Positiivne reaktsioon: indooli tekkimist näitab eetri ja vee vahelise kollase kihi värvumine punaseks.

— **Kasv 37 °C juures** (Ramamurthi, 1959)

Sööde:

Difco Bacto toitepuljong (nr 0003)	8 g
Destilleeritud vesi	l liiter

Segatakse, lahustatakse ja jaotatakse 6 ml kogustena torudesse.

Steriliseeritakse autoklaavimisel 121 °C juures 15 minutit.

Nakatatakse ja inkubeeritakse 37 °C juures.

Positiivne reaktsioon: jälgitakse kasvu.

— **Kasv 7 % naatriumkloriidis** (Ramamurthi, 1959)

Sööde:

Difco Bacto toitepuljong	8 g
NaCl	70 g
Destilleeritud vesi	1 liiter

Segatakse, lahustatakse ja jaotatakse 6 ml kogustena torudesse.

Steriliseeritakse autoklaavimisel 121 °C juures 15 minutit.

Positiivne reaktsioon: jälgitakse kasvu.

— **Želatiini hüdrolüüs** (Lelliott, Billing & Hayward, 1966)

Sööde:

Difco Bacto želatiin (nr 0143)	120 g
Destilleeritud vesi	1 liiter

Segatakse, lahustatakse kuumutades ja jaotatakse 6 ml kogustena torudesse.

Steriliseeritakse autoklaavimisel 121 °C juures 15 minutit.

Positiivne reaktsioon: želatiini vedeldumine, isegi kui hoida 30 minutit 5 °C juures.

— Tärklise hüdrolüüs

Sööde:

Difco Bacto agarsööde (sulatatud)	l liiter
Difco Bacto lahustuv tärklis (nr 0178)	2 g

Segatakse ja steriliseeritakse autoklaavimisel 115 °C juures 10 minutit.

Valatakse plaatidele. Plaadid nakatatakse.

Pärast piisava kasvu ilmumist (10–20 päeva pärast), eemaldatakse osa kasvust ja ujutatakse üle Lugoli joodiga.

Positiivne reaktsioon: tärklise hüdrolüüsi näitavad selged piirkonnad bakterite kasvu all või ümber; ülejäänud sööde värvub purpurseks.

— **Eskuliini hüdrolaasi aktiivsus** (Sneath & Collins, 1974)

Sööde:

Difco Bacto peptoon	10 g
Eskuliin	1 g
Raudtsitraat (Merck 3862)	0,05 g
Naatriumtsitraat	1 g
Destilleeritud vesi	1 liiter

Segatakse lahustumiseni ja jaotatakse 6 ml kogustena torudesse. Steriliseeritakse autoklaavimisel 115 °C juures 10 minutit.

Sööde on selge, kuid see fluorestseerib sinakalt.

Positiivne reaktsioon: eskuliini hüdrolüüsi näitab pruuni värvuse tekkimine ja fluorestseerimise kadumine. Seda saab kontrollida ultraviolettlambiga.

VIITED

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

II LISA

1. Iga haigusjuhtumi kahtluse korral, mille puhul on saadud immunofluorestsentsuuringu positiivne tulemus vastavalt I lisas esitatud meetodile ning oodatakse kõnealuse meetodi abil kinnitust või ümberlükkamist, tuleks alles hoida ja nõuetekohaselt säilitada:

   — võimaluse korral kõik mugulad või taimed, millelt proov on võetud, ning

   — ülejäänud ekstraktid ja täiendavad ettevalmistatud immunofluorestsentsuuringu objektiklaasid,

   kuni kõnealuse meetodi lõpuleviimiseni.

2. Organismi olemasolu kinnituse puhul tuleks alles hoida ja nõuetekohaselt säilitada:

   — lõikes 1 määratletud materjal, ning

   — mugula- või taimeekstraktiga nakatatud baklažaani proov, ning

   — organismi isoleeritud kultuur

   vähemalt ühe kuu jooksul pärast teatamist vastavalt artikli 5 lõikele 2.

III LISA

1. Tõenäolise saastumise ulatuse määramisel vastavalt artikli 5 lõike 1 punktile b tuleb kontrollida järgmisi objekte:
   — tootmiskohas kasvatatud mugulad või taimed, mis on tunnistatud saastunuks vastavalt artikli 5 lõike 1 punktile a,
   — tootmiskoht või -kohad või mugulate või taimede kasvatamisega seotud ruumid, mis on tunnistatud saastunuks vastavalt artikli 5 lõike 1 punktile a, sealhulgas ruumid, milles kasutatakse tootmisseadmeid või -vahendeid otse või ühise tööettevõtja kaudu,
   — eelmises taandes osutatud tootmiskohas või -kohtades kasvatatud või sellises tootmiskohas või -kohtades olevad mugulad või taimed ajavahemikul, kui vastavalt artikli 5 lõike 1 punktile a saastunuks tunnistatud mugulad või taimed olid esimeses taandes osutatud ruumides või tootmiskohtades,
   — kesklaod, mis käitlevad eespool nimetatud tootmiskohtadest pärit kartuleid,
   — mis tahes masinad, sõidukid, laevad, laod või nende osad või mis tahes muud objektid, sealhulgas pakkematerjal, mis võivad olla kokku puutunud vastavalt artikli 5 lõike 1 punktile a saastunuks tunnistatud mugulate või taimedega eelneva 12 kuu jooksul või kui see on asjakohane,
   — kõik mugulad või taimed, mida on hoitud eelmises taandes loetletud objektide sees või nendega kokkupuutes enne nende objektide puhastamist ja desinfitseerimist, ning
   — artikli 6 alusel tehtud katsete järel mugulad või taimed, mis on samast kloonist kui artikli 5 lõike 1 punkti a alusel saastunuks tunnistatud mugulad või taimed ning mille kohta uuringud näitavad, et saastumine on tõenäoline.
2. Võimaliku leviku määramisel vastavalt artikli 5 lõike 1 punktile c tuleb arvesse võtta järgmisi asjaolusid:
   — muude kartuli või muude peremeestaimede kasvatuskohtade lähedust,
   — seemnekartuliladude ühist kasutamist.
3. Artikli 5 lõike 2 esimeses lõigus osutatud teates esitatud andmed hõlmavad:
   — iga saastunuks tunnistatud kartulisaadetise või -partii direktiivi 77/93/EMÜ artiklis 7 või 8 ettenähtud sertifikaate, vastavalt vajadusele passi- või registreerimisnumbrit,
   — seemnekartuliladude puhul ja võimaluse korral kõikidel muudel juhtudel sordi nimetust,
   — määratud saastumise asjaolude kirjeldust ja tsooni piiritlemist,
   — ekstrakti, ettevalmistatud immunolfuorestsentsuuringu objektiklaaside, nakatatud baklažaani ja isoleeritud organismi kultuuri kättesaadavust katse puhul, mille järel on organismi olemasolu kinnitatud.

IV LISA

1. Artikli 7 lõikes 1 osutatud ametlikud järelevalvemeetmed artikli 5 lõike 1 punkti a alusel saastunuks tunnistatud mugulate või taimede puhul on:

— tööstuslikuks töötlemiseks kasutamine otsese ja vahetu tarnimisega töötlevasse tehasesse, kus on asjakohane jäätmete kõrvaldamise süsteem, mille puhul on kindlaks tehtud, et ei ole organismi leviku identifitseeritavat ohtu, ning ladustamispiirkondade ja väljuvate sõidukite desinfitseerimise süsteem, või

— muud meetmed, tingimusel et on kindlaks tehtud, et ei ole organismi leviku identifitseeritavat ohtu; sellistest meetmetest tuleb teatada komisjonile ja teistele liikmesriikidele.

2. Artikli 5 lõike 1 punkti b alusel tõenäoliselt saastunuks tunnistatud ja artikli 7 lõikes 2 osutatud mugulate või taimede kasutamine või kõrvaldamine liikmesriikide vastutavate ametiasutuste kontrolli all on:

— kasutamine tarbimiseks ettenähtud söögikartulina, mis on valmis pakendatud otsetarnimiseks ja kasutamiseks ümberpakendamata ning ette nähtud selliseks otsetarnimiseks ja kasutamiseks, või

— kasutamine tööstuslikuks töötlemiseks ettenähtud söögikartulina, mis tuleb otse ja vahetult tarnida töötlemisettevõttesse, kus on nõuetekohased jäätmete kõrvaldamise ja desinfitseerimisseadmed, või

— muu kasutamine või kõrvaldamine, tingimusel et ei esine organismi leviku identifitseeritavat ohtu.

3. Artikli 7 lõikes 3 osutatud objektide puhastamise ja desinfitseerimise asjakohased meetodid on need, mille puhul on kindlaks tehtud, et ei ole organismi leviku identifitseeritavat ohtu, ja mida kasutatakse liikmesriikide vastutavate ametiasutuste järelevalve all.

4. Liikmesriikide rakendatavad meetmed artikli 5 lõike 1 punktis c kehtestatud ja artikli 7 lõikes 4 osutatud piiritletud tsoonis on järgmised.

4.1. Artikli 5 lõike 1 punkti a alusel saastunuks tunnistatud tootmiskohtades:

a) artikli 5 lõike 1 punkti a alusel saastunuks tunnistatud põllul, kas

i) — vähemalt kolme kasvatusaasta jooksul pärast saastunuks tunnistamise aastat,

— võetakse meetmed isekülvanud kartulitaimede ja muude organismi looduslikult leitud peremeestaimede kõrvaldamiseks, ning

— kartulimugulaid, -taimi või seemneid ega muid looduslikult leitud organismi peremeestaimi või põllukultuure, mille puhul on organismi säilimise või leviku identifitseeritav oht, ei panda maha, istutata ega külvata, kuni on leitud, et põllul ei ole isekülvanud kartulitaimi vähemalt kahe järjestikuse kasvatusaasta jooksul,

— esimesel kartulikasvatushooajal, mis järgneb eelmises taandes määratletud ajavahemikule, pannakse ametlikult sertifitseeritud seemnekartul maha üksnes söögikartuli tootmiseks ja viiakse läbi artikli 2 lõikes 1 määratletud ametlik kontroll,

— eelmises taandes osutatud kartulikasvatushooajale ja asjakohasele külvikordade tsüklile järgneval hooajal pannakse ametlikult sertifitseeritud seemnekartul maha kas seemne- või söögikartuli tootmiseks ning viiakse läbi artikli 2 lõikes 1 määratletud ametlik kontroll, või

ii) — saastunuks tunnistamise aastale järgneva nelja kasvatusaasta jooksul

— võetakse meetmed isekülvanud kartulitaimede ja muude organismi looduslikult leitud peremeestaimede kõrvaldamiseks, ning

— põldu hoitakse kesa all või pikaajalise kultuurkarjamaana, mida sagedasti madalalt niidetakse või kasutatakse intensiivselt karjatamiseks,

— esimesel kartulikasvatushooajal, mis järgneb eelmises taandes määratletud ajavahemikule, pannakse ametlikult sertifitseeritud seemnekartul maha kas seemne- või söögikartuli tootmiseks ja viiakse läbi artikli 2 lõikes 1 määratletud ametlik kontroll;

b) muudel põldudel:

— saastunuks tunnistamise aastale järgneval kasvatusaastal:

— vastavalt vajadusele kas ei panda maha, istutata ega külvata kartulimugulaid, taimi või seemneid või muid organismi looduslikult leitud peremeestaimi ning võetakse meetmed isekülvanud kartulitaimede kõrvaldamiseks, või

— pannakse maha ametlikult sertifitseeritud seemnekartulit üksnes söögikartuli tootmiseks, tingimusel, et vastutavad ametiasutused on kindlaks teinud, et isekülvanud kartulitaimede ja muude organismi looduslikult leitud peremeestaimede oht on kõrvaldatud,

— vähemalt kahe kasvatusaasta jooksul, mis järgnevad eelmises taandes määratletud kasvatusaastale, pannakse maha üksnes ametlikult sertifitseeritud seemnekartulit kas seemne- või söögikartuli tootmiseks,

— eelmistes taanetes osutatud igal kasvatusaastal võetakse meetmed isekülvanud kartulitaimede ja organismi looduslikult leitud peremeestaimede kõrvaldamiseks ning viiakse läbi artikli 2 lõikes 1 määratletud ametlik kontroll,

— kui ametlikult sertifitseeritud seemnekartul pannakse söögikartuli tootmiseks maha kasvatusaastal, mis järgneb saastunuks tunnistamise aastale, kontrollitakse kasvavaid kultuure ettenähtud ajavahemike järel ja isekülvanud kartulitaimedega tehakse katseid organismi leidmiseks;

c) vahetult artikli 5 lõike 1 punkti a alusel tunnistatud saastumise järel ja igal järgneval kasvatusaastal kuni esimese lubatud kartulikasvatushooajani, kaasa arvatud sel esimesel hooajal, tuleb saastunuks tunnistatud põllul või põldudel vastavalt lõikes a määratletule kõik tootmiskohas ja kartulitootmises kasutatavad masinad ja ladustamisseadmed nõuetekohaselt puhastada ja desinfitseerida, kasutades asjakohaseid meetodeid, mis on määratletud punktis 3;

d) nende tootmissüsteemide puhul, kus on võimalik kasvusubstraadi täielik asendamine,

— võib mugulaid, taimi ja seemneid maha panna, istutada ja külvata üksnes siis, kui tootmisüksuses on ametliku järelevalve all võetud meetmeid organismi kõrvaldamiseks ja mis tahes kartuli- ja muude maavitsaliste taimede kõrvaldamiseks, sealhulgas vähemalt täielik kasvusubstraadi asendamine ning tootmisüksuse ja kõikide seadmete puhastamine ja desinfitseerimine, ning vastutavad ametiasutused on seejärel kartulikasvatuse heaks kiitnud, ning

— kasvatatakse kartuleid ametlikult sertifitseeritud seemnekartulist või väikestest mugulatest või mikrotaimedest, mis on saadud kontrollitud allikatest.

4.2. Ilma et see piiraks punktis 4.1 määratletud meetmeid, peavad liikmesriigid piiritletud tsoonis:

a) viivitamata ja vähemalt kolme kasvatushooaja jooksul pärast saastunuks tunnistamist:

— tagama oma vastutavate ametiasutuste järelevalve kartulimugulate kasvatus-, ladustamis- või käitlemisruumide üle ning lepingu alusel kasutatavate kartulikasvatusseadmete ruumide üle,

— nõudma seadmete ja ladude puhastamist ja desinfitseerimist sellistes ruumides vastavalt vajadusele ning kasutades asjakohaseid meetodeid, mis on määratletud punktis 3,

— nõudma üksnes sertifitseeritud seemne mahapanekut kõikide selles tsoonis olevate kartulikultuuride puhul,

— nõudma, et koristatud seemnevarusid hoitakse söögikartulist eraldi kõikides ruumides selles tsoonis,

— viima läbi ametlikud uuringud, mis on määratletud artikli 2 lõikes 1;

b) kehtestama vajaduse korral programmi kõikide seemnekartuli varude asendamiseks asjakohase ajavahemiku jooksul.

Punkti 4.2 alusel rakendatud meetmed koos tootjate, laomajandite ja lähetuskeskuste registreerimisnumbritega piiritletud tsoonis teatatakse igal aastal teistele liikmesriikidele ja komisjonile.