

Αριθμός 769

Οι περί Μέτρων Προστασίας κατά της Εισαγωγής και Εξάπλωσης Οργανισμών Επιβλαβών για τα Φυτά και τα Φυτικά Προϊόντα (Μέτρα για την Καταπολέμηση της Κορυνοβακτηρίωσης της Πατάτας) Κανονισμοί του 2003, οι οποίοι εκδόθηκαν από το Υπουργικό Συμβούλιο σύμφωνα με το άρθρο 26 του περί Μέτρων Προστασίας κατά της Εισαγωγής και Εξάπλωσης Οργανισμών Επιβλαβών για τα Φυτά και τα Φυτικά Προϊόντα Νόμου του 2003, αφού κατατέθηκαν στη Βουλή των Αντιπροσώπων και εγκρίθηκαν από αυτή, δημοσιεύονται στην Επίσημη Εφημερίδα της Δημοκρατίας σύμφωνα με το εδάφιο (3) του άρθρου 3 του περί Καταθέσεως στη Βουλή των Αντιπροσώπων των Κανονισμών που Εκδίδονται με Εξουσιοδότηση Νόμου, Νόμου (Ν. 99 του 1989 όπως τροποποιήθηκε με το Ν. 227 του 1990).

Ο ΠΕΡΙ ΜΕΤΡΩΝ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ  
ΚΑΙ ΕΞΑΠΛΩΣΗΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΕΠΙΒΛΑΒΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΦΥΤΑ  
ΚΑΙ ΤΑ ΦΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΝΟΜΟΣ ΤΟΥ 2003

Κανονισμοί δυνάμει του άρθρου 26

Για σκοπούς εναρμόνισης με την πράξη της Ευρωπαϊκής Κοινότητας με τίτλο—

«Οδηγία 93/85/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 4ης Οκτωβρίου 1993 για την καταπολέμηση της κορυνοβακτηρίωσης της πατάτας (ΕΕ L 259 της 18.10.1993, σ.1)»,

147(Ι) του 2003. Το Υπουργικό Συμβούλιο, ασκώντας τις εξουσίες που χορηγούνται σ' αυτό με βάση το άρθρο 26 του περί Μέτρων Προστασίας κατά της Εισαγωγής και Εξάπλωσης Οργανισμών Επιβλαβών για τα Φυτά και τα Φυτικά Προϊόντα Νόμου του 2003, εκδίδει τους ακόλουθους Κανονισμούς.

Συνοπτικός  
τίτλος.

1. Οι παρόντες Κανονισμοί θα αναφέρονται ως οι περί Μέτρων Προστασίας κατά της Εισαγωγής και Εξάπλωσης Οργανισμών Επιβλαβών για τα Φυτά και τα Φυτικά Προϊόντα (Μέτρα για την Καταπολέμηση της Κορυνοβακτηρίωσης της Πατάτας) Κανονισμοί του 2003.

Ερμηνεία.

2.—(1) Για τους σκοπούς των παρόντων Κανονισμών—

«Νόμος» σημαίνει τον περί Μέτρων Προστασίας κατά της Εισαγωγής και Εξάπλωσης Οργανισμών Επιβλαβών για τα Φυτά και τα Φυτικά Προϊόντα Νόμο του 2003·

«οργανισμός» σημαίνει τον επιβλαβή οργανισμό *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann και Kotthoff) Davis et al. παθογόνο αίτιο που προκαλεί την κορυνοβακτηρίωση της πατάτας.

(2) Οποιοδήποτε όροι που περιέχονται στους παρόντες Κανονισμούς και δεν ερμηνεύονται διαφορετικά, έχουν την έννοια που αποδίδει ο Νόμος.

Πεδίο  
εφαρμογής.

3. Οι παρόντες Κανονισμοί αφορούν τα μέτρα για—

(α) Τον εντοπισμό του οργανισμού και τον προσδιορισμό της εξάπλωσής του,

(β) την πρόληψη της εμφάνισης και εξάπλωσης του οργανισμού, και

(γ) σε περίπτωση διαπίστωσης του οργανισμού, την πρόληψη της εξάπλωσης και την καταπολέμησή του με σκοπό την εκρίζωσή του.

Συστηματικός  
επίσημος  
έλεγχος.

4.—(1) Η Αρμόδια Αρχή πραγματοποιεί συστηματικές επίσημες εξετάσεις κονδύλων και εφόσον χρειάζεται, φυτών πατάτας (*Solanum tuberosum* L.) στους τόπους παραγωγής, στις αποθήκες ή άλλους χώρους, προκειμένου να διαπιστώσει την απουσία του οργανισμού.

- (α) 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, δύναται να διεξάγεται κατά περίπτωση, επίσημη ή υπό επίσημη εποπτεία μακροσκοπική εξέταση κομμένων κονδύλων, από άλλα δείγματα.
- (β) στην περίπτωση των φυτών, οι εξετάσεις αυτές διενεργούνται με τις κατάλληλες μεθόδους, τα δε δείγματα υποβάλλονται σε κατάλληλη επίσημη ή υπό επίσημη εποπτεία ανάλυση.
- (γ) ο αριθμός, η προέλευση, η κατανομή και ο χρόνος λήψης των δειγμάτων καθορίζονται με απόφαση της Αρμόδιας Αρχής, βάσει ορθών επιστημονικών και στατιστικών αρχών και της βιολογίας του οργανισμού, και λαμβανομένου υπόψη του συγκεκριμένου συστήματος παραγωγής πατάτας στη Δημοκρατία. Οι σχετικές λεπτομέρειες διαβιβάζονται ετησίως στα κράτη μέλη και στην Επιτροπή, προκειμένου να εξασφαλίζεται συγκρίσιμο επίπεδο ασφάλειας μεταξύ των κρατών μελών όσον αφορά την επιβεβαίωση της απουσίας του οργανισμού.

Επίσημη εργαστηριακή μέθοδος.

Παράρτημα I.

(2) Τα αποτελέσματα των επίσημων εξετάσεων που προβλέπονται στην παράγραφο (1) κοινοποιούνται τουλάχιστο μία φορά το χρόνο στα κράτη μέλη και στην Επιτροπή. Οι λεπτομέρειες της κοινοποίησης αυτής είναι εμπιστευτικές.

5. 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 έδαφος της Δημοκρατίας, πρέπει να ανακοινώνεται στην Αρμόδια Αρχή.

Ανακοίνωση πιθανολογούμενης εμφάνισης ή διαπιστωμένης παρουσίας του οργανισμού.

6.—(1) Σε περίπτωση πιθανολογούμενης εμφάνισης του οργανισμού, η Αρμόδια Αρχή, στην οποία έχουν αναφερθεί τα κρούσματα αυτά, εξασφαλίζει 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.

Μέτρα σε περίπτωση πιθανολογούμενης εμφάνισης του οργανισμού. Παράρτημα I. Παράρτημα II.

(2) Μέχρις ότου επιβεβαιωθεί ή διαψευσθεί η πιθανολογούμενη εμφάνιση του οργανισμού, σύμφωνα με την παράγραφο (1), στις περιπτώσεις πιθανολογούμενης εμφάνισης κατά τις οποίες, είτε παρατηρήθηκαν ύποπτα μακροσκοπικά διαγνωστικά συμπτώματα του οργανισμού, είτε λήφθηκε θετικό αποτέλεσμα από δοκιμή ανοσοφθορισμού, όπως ορίζεται στο Παράρτημα I, ή από άλλη κατάλληλη δοκιμή, η Αρμόδια Αρχή—

Παράρτημα I.

- (α) Απαγορεύει τη διακίνηση όλων των παρτίδων ή αποστολών από τις οποίες έχουν ληφθεί τα δείγματα, εκτός εάν διακινούνται υπό τον έλεγχο της και με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν ενέχουν εμφανή κίνδυνο εξάπλωσης του οργανισμού.
- (β) λαμβάνει μέτρα για την εξακρίβωση της προέλευσης της πιθανολογούμενης εμφάνισης.

- (γ) λαμβάνει 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.

Επιβεβαίωση παρουσίας του οργανισμού σε κονδύλους ή φυτά.  
Λήψη μέτρων.  
Παράρτημα Ι.

7.—(1) Εάν από την επίσημη ή υπό επίσημη εποπτεία εργαστηριακή ανάλυση με τη χρησιμοποίηση της επίσημης μεθόδου που ορίζεται στο Παράρτημα Ι, επιβεβαιωθεί η παρουσία του οργανισμού σε δείγμα κονδύλων, φυτών, ή μερών φυτών, η Αρμόδια Αρχή αφού λάβει υπόψη τις ορθές επιστημονικές αρχές, τη βιολογία του οργανισμού και το συγκεκριμένο σύστημα παραγωγής, εμπορίας και μεταποίησης—

- (α) Χαρακτηρίζει ως προσβεβλημένους τους κονδύλους ή τα φυτά, τις αποστολές, τις παρτίδες και τα μηχανήματα, τα οχήματα, εμπορευματοκιβώτια, 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 ο ή οι αγροί από τους οποίους συγκομίστηκαν οι κόνδυλοι ή τα φυτά·

Παράρτημα ΙΙΙ.

- (β) προσδιορίζει, λαμβάνοντας υπόψη τις διατάξεις του Παραρτήματος ΙΙΙ, σημείο 1, την έκταση της πιθανής προσβολής διά της επαφής, πριν ή μετά τη συγκομιδή ή μέσω σχέσης της διαδικασίας παραγωγής με τη συγκεκριμένη προσβολή·

- (γ) οριοθετεί μία ζώνη βάσει του χαρακτηρισμού προσβεβλημένων αντικειμένων που αναφέρονται στην υποπαράγραφο (α), του προσδιορισμού της έκτασης της πιθανής προσβολής που αναφέρεται στην υποπαράγραφο (β), και της πιθανής εξάπλωσης του οργανισμού λαμβάνοντας υπόψη τις διατάξεις του σημείου 2 του Παραρτήματος ΙΙΙ.

Παράρτημα ΙΙΙ.

Παράρτημα ΙΙΙ. (2) Η Αρμόδια Αρχή κοινοποιεί αμέσως, σύμφωνα με τις διατάξεις του Παραρτήματος ΙΙΙ, σημείο 3, στα κράτη μέλη και στην Επιτροπή κάθε προσβολή που προσδιορίζεται βάσει της υποπαράγραφου (α), παραγράφου (1) καθώς και τις λεπτομέρειες της οριοθέτησης ζώνης βάσει της υποπαράγραφου (γ), της παραγράφου (1). Οι λεπτομέρειες της κοινοποίησης αυτής είναι εμπιστευτικές.

(3) Βάσει της κοινοποίησης σύμφωνα με την παράγραφο (2) και των κοινοποιούμενων στοιχείων, η Αρμόδια Αρχή χαρακτηρίζει τα προσβεβλημένα αντικείμενα και προσδιορίζει την έκταση της πιθανής προσβολής και οριοθετεί μια ζώνη, σύμφωνα με τις υποπαράγραφους (α), (β) και (γ) αντίστοιχα, της παραγράφου (1).

Προσδιορισμός πηγής και έκτασης της προσβολής.  
Εκτίμηση κινδύνου.

8.—(α) Εάν οι κόνδυλοι ή τα φυτά έχουν χαρακτηρισθεί ως προσβεβλημένα βάσει της υποπαράγραφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7, η ανάλυση, σύμφωνα με την παράγραφο (1) του Κανονισμού 6, διενεργείται σε αποθέματα πατάτας που έχουν κλωνική σχέση με τα προσβεβλημένα. Η ανάλυση πραγματοποιείται για όσους κονδύλους ή φυτά απαιτείται προκειμένου να προσδιοριστεί η πιθανή πηγή της προσβολής και η έκταση της πιθανής προσβολής, κατά προτίμηση σε τάξη μεγέθους κινδύνου.

(β) Βάσει της ανάλυσης, κατά περίπτωση, χαρακτηρίζονται ως προσβεβλημένα και άλλα αντικείμενα, προσδιορίζεται η έκταση της πιθανής προσβολής και οριοθετείται ζώνη, βάσει των υποπαράγραφων (α), (β), και (γ) αντίστοιχα της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7.

9.—(1) Απαγορεύεται η καλλιέργεια των κονδύλων ή φυτών που έχουν χαρακτηριστεί ως προσβεβλημένα βάσει της υποπαραγράφου (α), της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7. Οι κόνδυλοι ή τα φυτά αυτά πρέπει υπό τον έλεγχο της Αρμόδιας Αρχής—

Επίσημα μέτρα για διάθεση κονδύλων ή φυτών που χαρακτηρίστηκαν ως προσβεβλημένα.

(α) Να καταστρέφονται, ή

(β) να διατίθενται με άλλο τρόπο, μέσω επισήμως εποπτευόμενων μέτρων, σύμφωνα με τις διατάξεις του Παραρτήματος IV, σημείο 1, εφόσον έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος εξάπλωσης του οργανισμού.

Παράρτημα IV.

(2) Απαγορεύεται η καλλιέργεια των κονδύλων ή φυτών που έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανώς προσβεβλημένα βάσει της υποπαραγράφου (β), της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7, και οι κόνδυλοι ή τα φυτά αυτά πρέπει, με την επιφύλαξη του αποτελέσματος των αναλύσεων που αναφέρονται στον Κανονισμό 8 για τα αποθέματα που έχουν κλωνική σχέση μεταξύ τους, υπό τον έλεγχο της Αρμόδιας Αρχής να χρησιμοποιούνται ή να διατίθενται όπως ορίζεται στο Παράρτημα IV, σημείο 2, κατά τρόπον ώστε να διασφαλίζεται ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος εξάπλωσης του οργανισμού.

Παράρτημα IV.

(3) Τα μηχανήματα, τα οχήματα, τα εμπορευματοκιβώτια, οι αποθήκες ή τα τμήματα αυτών, και κάθε άλλο αντικείμενο, συμπεριλαμβανομένων των υλικών συσκευασίας που έχουν χαρακτηριστεί προσβεβλημένα βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7, ή που έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανώς προσβεβλημένα βάσει της υποπαραγράφου (β) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7, καταστρέφονται ή καθαρίζονται και απολυμνίζονται με κατάλληλες μεθόδους όπως ορίζεται στο Παράρτημα IV, σημείο 3. Μετά την απολύμανση, τα αντικείμενα αυτά παύουν να θεωρούνται προσβεβλημένα.

Παράρτημα IV.

(4) Με την επιφύλαξη των μέτρων που εφαρμόζονται σύμφωνα με τις παραγράφους (1), (2) και (3), για τη ζώνη που οριοθετείται βάσει της υποπαραγράφου (γ), της παραγράφου (1), του Κανονισμού 7, εφαρμόζονται ορισμένα μέτρα, όπως καθορίζεται στο Παράρτημα IV, σημείο 4.

Παράρτημα IV.

10. Ο πατατόσπορος πρέπει να πληροί τις απαιτήσεις του Νόμου και να προέρχεται απευθείας από υλικό το οποίο παράγεται στο πλαίσιο επισήμως εγκεκριμένου προγράμματος, να έχει κριθεί απαλλαγμένο από τον οργανισμό μετά από επίσημη ή υπό επίσημη εποπτεία ανάλυση, σύμφωνα με τη μέθοδο που ορίζεται στο Παράρτημα I.

Προέλευση του πατατόσπορου.

Παράρτημα I.

Η προαναφερόμενη ανάλυση πραγματοποιείται—

(i) Στις περιπτώσεις που η προσβολή επηρεάζει την παραγωγή πατατόσπορου, στα φυτά της αρχικής κλωνικής επιλογής,

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

11. Απαγορεύεται η κατοχή και η διακίνηση του οργανισμού στη Δημοκρατία.

Απαγόρευση κατοχής και διακίνησης του οργανισμού.

12. Με την επιφύλαξη των διατάξεων του Νόμου, η Αρμόδια Αρχή δύναται να επιτρέψει εξαιρέσεις από τα μέτρα που αναφέρονται στους Κανονισμούς 8, 9 και 11 για πειραματικούς ή επιστημονικούς σκοπούς, καθώς και για εργασίες επιλογής ποικιλιών, εφόσον οι εξαιρέσεις αυτές δεν επηρεάζουν την καταπολέμηση του οργανισμού και δε δημιουργούν κίνδυνο εξάπλωσής του.

Εξαιρέσεις.

Λήψη  
πρόσθετων  
μέτρων.

13.—(1) Η Αρμόδια Αρχή δύναται να λάβει πρόσθετα ή αυστηρότερα μέτρα για την καταπολέμηση του οργανισμού ή για την πρόληψη της εξάπλωσής του, υπό την προϋπόθεση ότι τα μέτρα αυτά δεν αντιβαίνουν προς τις διατάξεις του Νόμου.

(2) Στα πρόσθετα μέτρα που αναφέρονται στην παράγραφο (1) δύναται να περιλαμβάνεται και η υποχρέωση φύτευσης μόνο 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 δύναται 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.

(3) Οι λεπτομέρειες των μέτρων αυτών κοινοποιούνται στα κράτη μέλη και την Επιτροπή.

Εναρξη της  
ισχύος των  
παρόντων  
Κανονισμών.

14. Οι παρόντες Κανονισμοί ισχύουν από την ημερομηνία δημοσίευσής τους στην Επίσημη Εφημερίδα της Δημοκρατίας.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι**  
**(Κανονισμοί 6, 7 και 10)**

**ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ**  
***GLAVIBACTER MICHIGANENSIS* ssp *SEPEDONICUS***

Μέθοδος ανίχνευσης και διάγνωσης του βακτηρίου της κορυνοβακτηρίωσης *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., σε παρτίδες κονδύλων πατάτας.

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 περισσειας του μη αγγειώδους ιστού στο ελάχιστο. Μετά την αφαίρεσή τους, τα δείγματα πρέπει να υποβάλλονται στη σχετική επεξεργασία εντός 24 ωρών (βλέπε σημείο 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 εγκάρσιως 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' ό τι 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 ενίοτε 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 προσβολής οδηγεί σε καταστροφή του αγγειώδους ιστού, ενδέχεται δε να παρατηρηθεί και αποκόλληση του εξωτερικού φλοιού από τον εσωτερικό. Σε προχωρημένα στάδια της προσβολής, 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 στο *C.sepetonicum* (π.χ. 0,5 M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος (PBS) pH 7,0) σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει του 30°C. Συνιστάται η προσθήκη ενός αντιπροϊοντικού, και, ενδεχομένως, ενός αντιαφριστικού υλικού (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: (σημείωση: μια εναλλακτική μέθοδος εξαγωγής των βακτηρίων δίδεται υπό του Dinesen, 1984).

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

3.4. Ο χειρισμός όλων των θετικών μαρτύρων του *C. sepedonicum* και των δειγμάτων πρέπει οπωσδήποτε να γίνεται χωριστά, ώστε να αποφεύγεται η αλληλοπροσβολή. 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 περιμετρο των προσβεβλημένων ιστών.

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



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

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. sepeidonicum*) 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 ενίοτε σε ακανόνιστες ομάδες που περιγράφονται συχνά ως "φράχτες" ή "κινέζικα γράμματα".

## 5. Μέθοδος για τη δοκιμή ανοσοφθορισμού.

5.1. Πρέπει να χρησιμοποιείται αντιορός έναντι ενός γνωστού στελέχους του (*C. sepeidonicum*) ATCC 33113 (NCPB 2137) ή NCPB 2140. Ο τίτλος ανοσοφθορισμού του αντιορού πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 : 600. Η αντικειμενοφόρος πρέπει να περιλαμβάνει και ένα μάρτυρα PBS για να ελέγχεται αν το σύμπλοκο ισοθιοκυανικής φλουορεΐσίνης και αντι-ανοσοσφαιρίνης κουνελίου (FITC) συνδέεται μη επιλεκτικά με βακτηριακά κύτταρα. Σε διαφορετική αντικειμενοφόρο πρέπει να χρησιμοποιείται (*C. sepeidonicum*) (ATCC 33113 (NCPB 2137), NCPB 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).

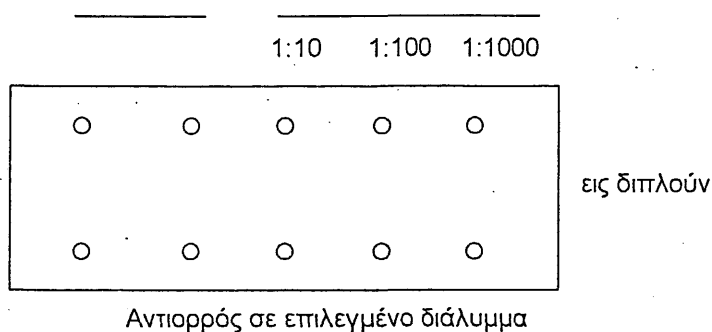
### 5.2. Διαδικασία.

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

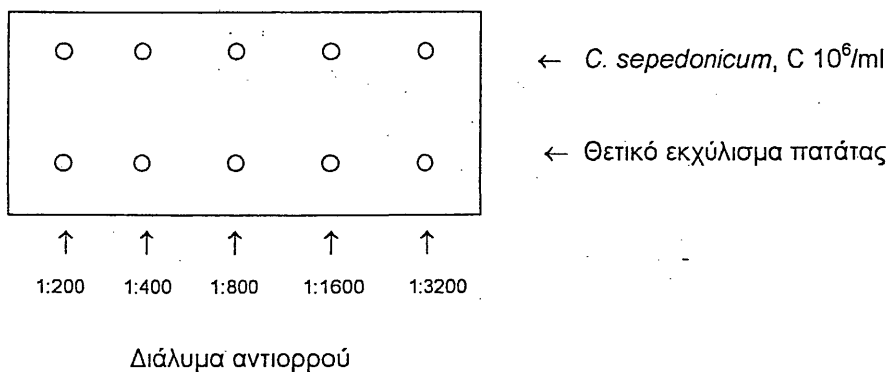
Εικόνα 1. Δείγμα και PBS αντικειμενοφόρος πλάκα

Αδιάλυτο δείγμα

Διαλυμένο δείγμα.



Εικόνα 2. Θετική αντικειμενοφόρος πλάκα



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

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 φαντρία της αντικειμενοφόρου προστίθεται αντιορρός (*C. serpedonicum*) στην κατάλληλη αραιώση, σε 0,01 M PBS pH 7,2 (προσάρτημα 2), όπως εμφανίζεται στην εικόνα 1. (Για το μάρτυρα του FITC πρέπει να χρησιμοποιείται PBS). Η αραιώση εργασίας του αντιορρού πρέπει να είναι περίπου το ήμισυ του τίτλου ανοσοφθορισμού. Αν πρόκειται να περιληφθούν και άλλες αραιώσεις αντιορρού, για κάθε αραιώση 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 φαντρίο καλύπτεται με σύμπλοκο FITC στην ίδια αραιώση 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 φαντρίο προστίθενται περίπου 5-10 μl φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος γλυκερίνης 0,1 M pH 7,6 (ή άλλου παρόμοιοι υλικού έγκλεισης με pH τουλάχιστον 7,6), στη συνέχεια δε τα φαντρία 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 φαντρία εξετάζονται κατά δύο κάθετες διαμέτρους και κατά την περιμέτρο τους.

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

Η δοκιμή ανοσοφθορισμού παρουσιάζει διάφορα εγγενή προβλήματα.

- Τα ίζηματα ιστών πατάτας περιέχουν συχνά πληθυσμούς φθορίζοντων κυττάρων μη τυπικής μορφολογίας καθώς και μη ειδικώς αντιδρώντα σαπροφυτικά βακτήρια όμοιου μεγέθους και μορφολογίας με το *C. sepedonicum*. 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 αντιορό.

- Το τεχνικό όριο ανίχνευσης με τη μέθοδο αυτή είναι μεταξύ 103 και 104 κύτταρα ανά ml μη αραιωμένου ιζήματος. Τα δείγματα, των οποίων ο αριθμός τυπικών φθορίζοντων κυττάρων κατά τη δοκιμή ανοσοφθορισμού βρίσκεται στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου, είναι συνήθως αρνητικά για το (*C. sepedonicum*), 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 *C. sepedonicum*. 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 αντιορούς στη δοκιμή ανοσοφθορισμού θεωρούνται ως "δυνητικά προσβεβλημένα" με *C. sepedonicum*. Για όλα τα δυνατικά προσβεβλημένα 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. Προσβολή σχισμής I

6.2.1. 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

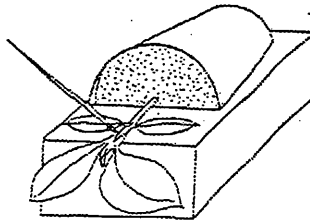
cm και μήκους 15 cm (εικόνα 3). Για κάθε ελεγχόμενο δείγμα, πρέπει να τοποθετείται ένα φύλλο αποστειρωμένου αλουμινοχάρτου μεταξύ του μίσχου και του πολυστυρενίου. Το φυτό μπορεί να συγκρατείται στη θέση του με έναν ελαστικό ιμάντα ο οποίος περιβάλλει το κομμάτι του πολυστυρενίου.

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. Προσβολή 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 (με κλίση 5° περίπου) τομή, μήκους 1,0 cm και βάθους 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. Προσβολή 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 προσβολής (6.2, 6.3 ή 6.4), μολύνονται 25 φυτά μελιτζάνας με γνωστή καλλιέργεια (*C. sepedonicum*) και, εάν είναι δυνατόν, με φυσικώς μολυσμένο ιστό κονδύλων (5.1).

6.6. Με την ίδια μέθοδο προσβολής (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 προσβολής. 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 των τριών φύλλων.

Μαρασμοί μπορεί επίσης να προκληθούν από πληθυσμούς άλλων βακτηρίων ή μυκήτων που υπάρχουν στο ίζημα ιστών κονδύλων, όπως, π.χ. το *Erwinia carotovora*, ssp. *carotovora* και *E. carotovora* ssp. *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 προσβολή στα φυτά μελιτζάνας ακόμη και μετά από επώαση 40 ημερών. Η προσβολή 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 προσβολής 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 διάγνωση μπορεί να επιβεβαιωθεί μόνον με την απομόνωση και την ταυτοποίηση του *C. sepedonicum* (8). Μολονότι το *C. sepedonicum* είναι απαιτητικός οργανισμός, είναι δυνατόν να απομονωθεί 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.

Προσδιορισμός.

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 οξειδωσης/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. m.s.* Οι τροφικές και φυσιολογικές 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<sup>6</sup> 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<sup>7</sup> 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 θερμοκρασίες 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 ζελατίνης -
- 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	4,26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2,72 g

NaCl .....	8,0 g
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 ανοσοφθορισμού

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 12H <sub>2</sub> O .....	2,7 g
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 2H <sub>2</sub> O .....	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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 12H <sub>2</sub> O .....	3,2 g
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 2H <sub>2</sub> O .....	0,15 g
Γλυκερίνη .....	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 g
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 Ο .....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 εξαπλώνεται ως λεπτό φιλμ στην αντικειμενοφόρο, ξηραίνεται 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

$$S = \frac{\pi D^2}{4}$$

όπου D = διάμετρος του φατνίου

Εμβαδόν (s) του οπτικού πεδίου

$$s = \frac{\pi d^2}{4}$$

όπου d = διάμετρος του οπτικού πεδίου.

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

$$s = \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4}$$

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.).

$$\text{από τον τύπο } d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$$

$$\text{από τον τύπο } d = \sqrt{\frac{4 \cdot \pi i^2}{G^2 K^2 \times 4}} = \frac{i}{GK}$$

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)

$$N = C \frac{1000}{Y} F$$

όπου y= όγκος ιζήματος στο φαντίο

F= συντελεστής αραίωσης του ιζήματος.

### Προσάρτημα 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 φυτά μεταφυτεύονται σε γλάστρες με παστεριωμένο υπόστρωμα. Πρέπει να χρησιμοποιούνται φυτά στο στάδιο του τρίτου φύλλου, 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 Hammenhoegs Froe

270 50 Hammenhoeg

Σουηδία

2. HURST Seeds Ltd

Avenue Road

Witham

Essex GM8 2DX

Αγγλία

3. ASGRO Italia Sp.A.

Corso Lodi, 23

Milano

## 4. KUePPER

Mitteldeutsche Samer GmbH

Hessenring 22,

D-27269 Eschwege

**Προσάρτημα 6. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ 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.

**Nutrient dextrose agar (NDA)**

Difco Bacto Nutrient Agar με 1 % D(+) γλυκόζη (μονοϋδρική). 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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 0,25 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 0,25 g

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O ..... 0,1 g

MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O ..... 0,015 g

NaCl ..... 0,05 g

FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O ..... 0,005 g

Difco Bacto 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 οξειδωσης και ζύμωσης (Hugh and Leifson), 1953) - Δοκιμή O/F

Βασικό υπόστρωμα:

KCl .....0,2 g

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O .....0,2 g

NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....1,0 g

Difco Bacto 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 1N KOH.

Το διάλυμα κατανέμεται, ανά 5 και 10 ml, σε δοκιμαστικούς σωλήνες Pyrex διαστάσεων 16 mm x 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 και επωάζεται.

Θετική αντίδραση:

Σωλήνας	Χρώμα	Ερμηνεία
Ανοικτός	Κίτρινο	} Ενζυματική
Κλειστός	Κίτρινο	



Ανοικτός Κλειστός	Κίτρινο Μπλε-πράσινο	} }	Οξειδωτική
Ανοικτός Κλειστός	Πράσινο Μπλε –Πράσινο	} }	Οξειδωτική ή αδρανής

#### - Αντίδραση οξειδάσης (Konacs, 1956)

Αντίδραση οξειδάσης του Konacs:

Υδατικό διάλυμα 1 % διυδροχλωριούχου τετραμέθυλο παραφαιλυενοδιαμίνης (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 αποτελέσματα.

#### - 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 υπερόξειδίου του υδρογόνου (30 όγκων) στην οποία γαλακτοματοποιείται μια ποσότητα καλλιέργειας, με τη βοήθεια βακτηριολογικής βελόνης από σύρμα λευκοχρύσου.

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

#### - Ενεργότητα αναγωγής των νιτρικών ιόντων και απονιτροποίηση (Bradbury, 1970)

Καλλιεργητικό υπόστρωμα:

KNO <sub>3</sub> (χωρίς νιτρώδη ιόντα).....	1 g
Difco Bacto Yeast Extract.....	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	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 <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	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 αναγωγή των νιτρικών αλάτων)	κόκκινο	-
Αναγωγή των νιτρικών αλάτων πέραν των νιτρωδών (απονιτροποίηση – αναγωγή νιτρικών και νιτρωδών ιόντων)	άχρωμο	άχρωμο

#### - Παραγωγή ουρεάσης (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 ουρίας 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 x 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 ουρεάσης.

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 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g
NaCl .....	5 g
Απεσταγμένο νερό .....	1 l

Τα συστατικά διαλύονται και κατανέμονται, ανά 6 ml, σε σωλήνες 16 x 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 αντιδραστήριου 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. Προσβολή και επώαση στους 37°C.

Θετική αντίδραση: Ανάπτυξη βακτηρίων.

**- Ανάπτυξη σε 7 % χλωριούχο 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 συστατικό αναμειγνύεται, διαλύεται 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
Κίτρικός σίδηρος (Merck 3862) .....	0,05 g
Κίτρικό 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.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ**  
**(Κανονισμός 6)**

**ΟΡΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ**

1. Για κάθε πιθανολογούμενη εμφάνιση για την οποία υπάρχει θετική αντίδραση στη δοκιμή ανοσοφθορισμού σύμφωνα με τη μέθοδο που ορίζεται στο Παράρτημα Ι και για την οποία αναμένεται επιβεβαίωση ή διάψευση για 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 τη συμπλήρωση της μεθόδου αυτής.

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

- το υλικό που αναφέρεται στο σημείο 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 της κοινοποίησης βάσει της παραγράφου (2) του Κανονισμού 7.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ****(Κανονισμός 7)****ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΥΠΟΨΗ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ  
ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ**

1. Τα στοιχεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τον προσδιορισμό της έκτασης της πιθανής προσβολής βάσει της υποπαραγράφου (β) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7 περιλαμβάνουν:

- Τους κονδύλους ή τα φυτά που παράγονται σε περιοχή παραγωγής χαρακτηρισμένη ως μολυσμένη βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7,

- την περιοχή παραγωγής ή τους χώρους των οποίων μέρος της παραγωγής συνδέεται με τους κονδύλους ή τα φυτά, που έχουν χαρακτηριστεί ως προσβεβλημένα βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χρησιμοποιούν τον ίδιο εξοπλισμό και εγκαταστάσεις παραγωγής απευθείας ή μέσω κοινού αναδόχου,

- τους κονδύλους ή τα φυτά που παράγονται στην ή στις 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 προσβεβλημένα βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7 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 προσβεβλημένα βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του



Κανονισμού 7, 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 καθορισμό ή την απολύμανση αυτών των κατασκευών και αντικειμένων, και

- βάσει των αποτελεσμάτων των αναλύσεων που διενεργούνται σύμφωνα με τον Κανονισμό 8, κονδύλους ή φυτά της ίδιας κλωνικής προέλευσης με τους κονδύλους ή τα φυτά που χαρακτηρίζονται ως προσβεβλημένα βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7, για τα οποία κρίνεται, βάσει αναλύσεων, ότι είναι πιθανώς προσβεβλημένα.

2. Τα στοιχεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τον προσδιορισμό της πιθανολογούμενης μετάδοσης που αναφέρεται στην υποπαραγράφο (γ) παράγραφο (1) στον Κανονισμό 7 περιλαμβάνουν:

- Τη γεινίαση 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 στην υποπαραγράφο (α) παράγραφο (2) στον Κανονισμό 7 περιλαμβάνουν:

- Για κάθε αποστολή ή παρτίδα πατάτας που έχουν χαρακτηριστεί ως προσβεβλημένα, κατά περίπτωση, τα πιστοποιητικά που ορίζονται στα άρθρα 10 και 11 του Νόμου,

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

- περιγραφή των στοιχείων της προσδιορισθείσας προσβολής 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

(Κανονισμός 9)

#### ΕΠΙΣΗΜΑ ΜΕΤΡΑ ΓΙΑ ΔΙΑΘΕΣΗ ΤΩΝ ΚΟΝΔΥΛΩΝ Η ΦΥΤΩΝ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΘΕΙ ΩΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΑ

1. Τα επισήμως εποπτευόμενα μέτρα που αναφέρονται στην παράγραφο (1) του Κανονισμού 9 για τη διάθεση των κονδύλων ή των φυτών που έχουν χαρακτηριστεί ως προσβεβλημένα βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7 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 προσβεβλημένα βάσει της υποπαραγράφου (β) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7 και αναφέρονται στον Κανονισμό 9 παράγραφος (2), υπό τον έλεγχο της Αρμόδιας Αρχής 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 προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού.

3. Οι κατάλληλες μέθοδοι καθαρισμού και απολύμανσης των αντικειμένων που αναφέρονται στην παράγραφο (3) στον Κανονισμό 9 παράγραφος 3 είναι αυτές για τις οποίες έχει διαπιστωθεί ότι δεν ενέχουν εμφανή κίνδυνο μετάδοσης του οργανισμού και εφαρμόζονται υπό την εποπτεία της Αρμόδιας Αρχής.

4. Η σειρά μέτρων που εφαρμόζονται στη ζώνη που οριοθετείται βάσει της υποπαραγράφου (γ) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7 και αναφέρεται στον Κανονισμό 9 παράγραφος (4) περιλαμβάνει:

4.1. Σε περιοχές παραγωγής που χαρακτηρίζονται ως μολυσμένες βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7,

(α) σε αγρό που χαρακτηρίζεται ως μολυσμένος βάσει της υποπαραγράφου (α) της παραγράφου (1) του Κανονισμού 7, είτε :

(i) – κατά τη διάρκεια τουλάχιστον τριών καλλιεργητικών ετών μετά το έτος της προσδιορισθείσας προσβολής,

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

- δεν φυτεύονται 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 στην παράγραφο (1), στον Κανονισμό 4,

- 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 στην παράγραφο (1), στον Κανονισμό 4, ή

(ii) - κατά τα τέσσερα καλλιεργητικά έτη μετά την περίοδο της προσδιορισθείσας προσβολής,

- 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 στην παράγραφο (1), στον Κανονισμό 4

(β) σε άλλους αγρούς,

- κατά το καλλιεργητικό έτος μετά την προσδιορισθείσα προσβολή,

- 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 εξαιρεθεί 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 στην παράγραφο (1), στον Κανονισμό 4,

- όταν φυτεύεται επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος για την παραγωγή πατάτας εμπορίου κατά το καλλιεργητικό έτος που ακολουθεί την καθορισθείσα προσβολή, 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 την υποπαράγραφο (α), της παραγράφου (1), του Κανονισμού 7 και για κάθε επόμενο καλλιεργητικό έτος μέχρι και την πρώτη επιτρεπόμενη καλλιεργητική περίοδο πατάτας στον ή τους αγρούς που έχουν χαρακτηριστεί μολυσμένοι, όπως περιγράφεται στο σημείο (α) καθορίζονται 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 την Αρμόδια Αρχή, και

- η παραγωγή πατάτας γίνεται από επισήμως πιστοποιημένο πατατόσπορο ή από μακροκονδύλους 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:

(α) Αμέσως, και για τρεις τουλάχιστον καλλιεργητικές περιόδους μετά την προσδιορισθείσα προσβολή:

- Εξασφαλίζεται, μέσω της Αρμόδιας Αρχής η εποπτεία των χώρων που καλλιεργούνται, αποθηκεύονται ή διακινούνται κόνδυλοι πατάτας, καθώς και των χώρων στους οποίους λειτουργούν, βάσει σύμβασης, μηχανήματα για τις πατάτες,

- απαιτείται, κατά περίπτωση, καθαρισμός και απολύμανση των μηχανημάτων και των αποθηκών των χώρων αυτών με τις κατάλληλες μεθόδους, όπως ορίζεται στο σημείο 3,

- απαιτείται η φύτευση αποκλειστικά πιστοποιημένου πατατόσπορου για όλες τις καλλιέργειες πατάτας της ζώνης αυτής,

- απαιτείται η χωριστή διακίνηση των αποθεμάτων συγκομισθέντος πατατόσπορου και πατάτας εμπορίου για όλες τις εγκαταστάσεις της ζώνης,

- διενεργείται επίσημη εξέταση όπως περιγράφεται στην παράγραφος (1) στον Κανονισμό 4

(β) καταρτίζεται, 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 κράτη μέλη και στην Επιτροπή.