ZBIERKA ZÁKONOV
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

Ročník 2004

Vyhlásené: 14. 02. 2004 Vyhlásená verzia v Zbierke zákonov Slovenskej republiky

Obsah tohto dokumentu má informatívny charakter.

70

NARIADENIE VLÁDY
Slovenskej republiky
z 21. januára 2004
o ochrane proti zavlečeniu baktériovej krúžkovitosti zemiaka

Vláda Slovenskej republiky podľa § 2 ods. 1 písm. k) zákona č. 19/2002 Z. z., ktorým sa ustanovujú podmienky vydávania aproximačných nariadení vlády Slovenskej republiky v znení zákona č. 207/2002 Z. z. a na vykonanie § 30b zákona Národnej rady Slovenskej republiky č. 285/1995 Z. z. o rastlinolekárskej starostlivosti v znení zákona č. 471/2001 Z. z. nariaďuje:

§ 1

(1) Toto nariadenie ustanovuje opatrenia na ochranu proti zavlečeniu baktériovej krúžkovitosti zemiaka [Clavibacter michiganensis (SMITH) DAVIS et al. subsp. sepedonicus (SPIECKERMANN et KOTTHOF) DAVIS et al.] (ďalej len „baktériová krúžkovitosť“).

(2) Pri výskyte baktériovej krúžkovitosti toto nariadenie ustanovuje opatrenia na

a) určenie miesta výskytu a rozsahu rozšírenia,

b) zamedzenie výskytu a ďalšiemu rozširovaniu,

c) jej obmedzenie s cieľom ju zničiť.

§ 2

(1) Ústredný kontrolný a skúšobný ústav poľnohospodársky (ďalej len „kontrolný ústav“) vykonáva prieskum výskytu baktériovej krúžkovitosti na hľuzách sadivových zemiakov a ostatných zemiakov dovážaných na územie Slovenskej republiky a na hľuzách a rastlinách zemiakov pestovaných a uvádzaných do obehu na území Slovenskej republiky.

(2) Pri prieskume kontrolný ústav zabezpečí odber vzoriek hľúz sadivových zemiakov a ostatných zemiakov, predovšetkým zo skladovaných dávok, ktoré testujú laboratóriá kontrolného ústavu postupmi ustanovenými v prílohe č. 1 častiach A až H.

(3) Kontrolný ústav môže podľa potreby vykonať aj vizuálne kontroly prerezávaním hľúz sadivových zemiakov a ostatných zemiakov.

(4) Na rastlinách sa prieskum vykonáva postupmi ustanovenými kontrolným ústavom. Vzorky testujú laboratóriá kontrolného ústavu alebo iné laboratóriá poverené kontrolným ústavom podľa uznávaných vedeckých a štatistických zásad a podľa biológie baktériovej krúžkovitosti, pričom sa berie ohľad na osobitosti systémov pestovania zemiakov na Slovensku.

(5) Výsledky prieskumu podľa odseku 1 oznamuje kontrolný ústav jedenkrát ročne Ministerstvu pôdohospodárstva Slovenskej republiky (ďalej len „ministerstvo“). Ministerstvo každoročne zasiela

výsledky prieskumu Komisii Európskeho spoločenstva a členským štátom. Podrobnosti súvisiace s týmto oznámením sú dôvernej povahy.

(6) Kontrolný ústav vydá metodický postup na vykonávanie prieskumu a testovanie baktériovej krúžkovitosti.

§ 3

(1) Kontrolný ústav okamžite informuje ministerstvo o podozrení alebo potvrdení výskytu baktériovej krúžkovitosti na hľuzách a rastlinách zemiakov alebo na hľuzách zemiakov skladovaných a uvádzaných do obehu na území Slovenskej republiky.

(2) Kontrolný ústav je povinný pri podozrení na výskyt baktériovej krúžkovitosti zabezpečiť laboratórne testovanie použitím postupov, ktoré sú uvedené v prílohe č. 1 častiach A až H, v súlade s podmienkami podľa prílohy č. 1 časti I bodu 1, aby sa podozrenie na výskyt baktériovej krúžkovitosti buď potvrdilo, alebo vyvrátilo. Do ukončenia laboratórnych testov musia byť splnené požiadavky podľa prílohy č. 1 časti I bodu 2.

(3) Ak ide o podozrenie na výskyt baktériovej krúžkovitosti alebo keď sa baktériová krúžkovitosť určila na základe pozitívneho výsledku imunofluorescenčného testu uvedeného v prílohe č. 1 alebo iného primeraného testu, kontrolný ústav je do potvrdenia alebo vyvrátenia podozrenia na výskyt baktériovej krúžkovitosti podľa odseku 1 povinný

a) zakázať premiestňovanie dávok alebo zásielok zemiakov, z ktorých sa vzorky odobrali, okrem prípadov, ktoré podliehajú kontrole kontrolného ústavu, aby nevzniklo žiadne nebezpečenstvo rozširovania baktériovej krúžkovitosti,

b) zistiť pôvod podozrivého výskytu,

c) prijať ďalšie preventívne opatrenia, aby sa zabránilo šíreniu baktériovej krúžkovitosti kontrolou premiestňovania hľúz v rámci výrobcu na základe vyhodnotenia nebezpečenstva.

§ 4

(1) Ak kontrolný ústav na základe laboratórneho testovania pri použití metódy podľa prílohy č. 1 potvrdí prítomnosť baktériovej krúžkovitosti vo vzorke hľúz, rastlín alebo ich častí, s ohľadom na uznané vedecké zásady, biológiu baktériovej krúžkovitosti a osobitne na výrobné, marketingové a spracovateľské systémy je povinný

a) označiť za kontaminované hľuzy alebo rastliny, zásielku alebo dávku, ako aj mechanizačné alebo dopravné prostriedky, kontajnery, sklady a ich časti, iné predmety vrátane obalového materiálu, z ktorých boli vzorky odobraté, a v prípade potreby aj miesto produkcie, z ktorého boli hľuzy alebo rastliny pozbierané,

b) v súlade s ustanoveniami prílohy č. 2 bodu 1 určiť rozsah pravdepodobnej kontaminácie v dôsledku styku s kontaminovaným rastlinným materiálom alebo prostredníctvom výrobnej spojitosti s označenou kontamináciou,

c) na základe označenej kontaminácie podľa písmena a), určenia rozsahu pravdepodobnej kontaminácie podľa písmena b), ako aj možného rozšírenia baktériovej krúžkovitosti podľa prílohy č. 2 bodu 2 vyznačiť bezpečnostné pásmo.

(2) Ministerstvo podľa ustanovení prílohy č. 2 bodu 3 je povinné ihneď oznámiť ostatným členským štátom a Komisii Európskeho spoločenstva akúkoľvek kontamináciu označenú podľa odseku 1 písm. a) a podrobnosti o vyznačení bezpečnostného pásma podľa odseku 1 písm. c). Podrobnosti súvisiace s týmto oznámením sú dôvernej povahy.

(3) Na základe oznámenia od iného členského štátu, že hrozí kontaminácia rastlinného

materiálu na území Slovenskej republiky z tohto členského štátu, kontrolný ústav vykoná prieskum podľa § 2, určí rozsah kontaminácie a vyznačí bezpečnostné pásmo.

§ 5

(1) Ak sú hľuzy alebo rastliny označené za kontaminované podľa § 4 ods. 1 písm. a), kontrolný ústav nariadi testovanie zásob zemiakov klonovo príbuzných s kontaminovaným materiálom. Testovanie sa musí vykonať na takom množstve hľúz alebo rastlín, ktoré sú potrebné na určenie pravdepodobného prvotného zdroja infekcie, pravdepodobného rozsahu kontaminácie a miery nebezpečenstva.

(2) Kontrolný ústav na základe výsledkov testovania vykoná ďalšie označenia kontaminácie, určí rozsah pravdepodobnej kontaminácie a vyznačí bezpečnostné pásmo podľa § 4 ods.1.

§ 6

Kontrolný ústav nariadi, aby sa

a) nevysádzali hľuzy alebo rastliny označené za kontaminované podľa § 4 ods. 1 písm. a) a pod jeho kontrolou boli zničené alebo iným spôsobom zlikvidované podľa prílohy č. 3 bodu 1 s podmienkou, že nedôjde k žiadnemu identifikovateľnému nebezpečenstvu rozšírenia baktériovej krúžkovitosti,

b) nevysádzali hľuzy alebo rastliny označené za pravdepodobne kontaminované podľa § 4 ods. 1 písm. b) a bez dotknutia sa výsledkov testovania podľa § 5 pre klonovo príbuzné rastliny boli primeraným spôsobom využité alebo zlikvidované podľa prílohy č. 3 bodu 2, a to takým spôsobom, aby nedošlo k žiadnemu identifikovateľnému nebezpečenstvu rozšírenia baktériovej krúžkovitosti,

c) buď zničili, alebo umyli a dezinfikovali použitím primeraných postupov podľa prílohy č. 3 bodu 3 mechanizačné alebo dopravné prostriedky, kontajnery, sklady a ich časti, ako aj iné predmety vrátane obalového materiálu, ktoré boli označené za kontaminované podľa § 4 ods. 1 písm. a) alebo za pravdepodobne kontaminované podľa § 4 ods. 1 písm. b); po dezinfekcii sa už žiaden z takýchto predmetov nepovažuje za kontaminovaný,

d) prijali opatrenia podľa prílohy č. 3 bodu 4 v bezpečnostnom pásme vyznačenom podľa § 4 ods. 1 písm. c).

§ 7

(1) Šľachtiteľ[1]) je povinný deklarovať, že sadivové zemiaky v priamej línii a počiatočného klonového výberu pochádzali z materiálu získaného v rámci schváleného šľachtiteľského programu a že sú bez výskytu baktériovej krúžkovitosti na základe testovania podľa prílohy č. 1.

(2) Šľachtiteľ je povinný vykonať testovanie,

a) ak kontaminácia nepriaznivo vplýva na produkciu sadivových zemiakov na rastlinách počiatočného klonového výberu,

b) v ostatných prípadoch buď na rastlinách počiatočného klonového výberu, alebo na reprezentatívnej vzorke základného množiteľského stupňa alebo vyšších množiteľských stupňov sadivových zemiakov.

§ 8

Kontrolný ústav vykonáva systematicky laboratórne testovanie na výskyt baktériovej krúžkovitosti sadivových zemiakov z dovozu a z uznávacieho konania[2]) v kategóriách základného a certifikovaného sadiva.

§ 9

(1) Zakazuje sa udržiavať baktériovú krúžkovitosť a narábať s ňou.

(2) Ustanovenie odseku 1 sa nevzťahuje na dovoz, prevoz, prechovávanie alebo akúkoľvek manipuláciu s bakteriálnou krúžkovitosťou na vedecké, výskumné alebo šľachtiteľské účely, ktoré upravuje osobitný predpis.[3])

§ 10

Ministerstvo môže všeobecne záväzným právnym predpisom ustanoviť ďalšie podrobnosti na ochranu proti zavlečeniu baktériovej krúžkovitosti.

§ 11

Týmto nariadením sa transponuje právny akt Európskych spoločenstiev uvedený v prílohe č. 4.

§ 12

Toto nariadenie nadobúda účinnosť 15. februára 2004.

v z. Pál Csáky v. r.

Príloha č. 1

k nariadeniu vlády č. 70/2004 Z. z.

Časť A

Metodika určovania prítomnosti baktérie a diagnostika baktérie, ktorá spôsobuje baktériovú krúžkovitosť [Clavibacter michiganensis (SMITH) DAVIS et al. subsp. sepedonicus (SPIECKERMANN et KOTTHOF) DAVIS et al.]

1. Príprava vzorky – vyrezávanie pupkových koncov hľúz

1.1 Vodou sa umyje 200 zemiakových hľúz a dezinfikovaným skalpelom alebo škrabkou na zemiaky sa odstráni epidermis okolo pupkových koncov každej z hľúz; dezinfekciu náradia možno vykonať jeho ponorením do 70 % etanolu a nad plameňom.

1.2 Nožom alebo škrabkou na zemiaky sa opatrne odoberú z pupkových koncov kužeľovité výrezky. Necievne pletivo má byť čo najmenšie. Pupkové konce sa po odobratí ihneď namočia do maceračného pufra (40 ml) 0,05 mol.l^{-1} PBS s tweenom. Takto pripravená vzorka sa vytrepáva 4 hod. pri 20 – 22 °C alebo 16 – 24 hod. pri 4 °C a spracuje v priebehu 24 hodín (pozri odsek 3) alebo zakonzervuje pri teplote –20 °C po čas nie dlhší ako dva týždne.

2. Vizuálne hodnotenie príznakov baktériovej krúžkovitosti

2.1 Po odstránení pupkových koncov sa každá z hľúz priečne prereže a hľadajú sa príznaky baktériovej krúžkovitosti.

2.2 Hľuzy sa stlačia a pozorujú, či z cievnych pletív vytekajú macerované pletivá.

Najskoršími príznakmi sú jemná sklovitosť alebo priesvitnosť pletív bez zmäknutého okolia cievnych zväzkov, osobitne v blízkosti pupkových koncov. Sfarbenie prstenca cievnych zväzkov na pupkových koncoch môže byť mierne tmavšie. Prvými identifikovateľnými príznakmi je žltkasté sfarbenie prstenca cievnych zväzkov a vytekanie baktériového slizu syrovitej konzistencie z ciev po jemnom stlačení hľuzy. Výlučok obsahuje milióny baktérií. V tomto štádiu môže dochádzať k hnednutiu cievneho pletiva. Tieto príznaky sa najprv môžu obmedzovať na jednu časť prstenca, nevyhnutne to však nemusí byť pri pupkových koncoch a hnednutie sa postupne môže rozširovať na celý prstenec cievnych zväzkov. S postupujúcou infekciou dochádza k rozkladu cievnych pletív, vonkajšia vrstva zásobného pletiva sa môže oddeľovať od vnútornej vrstvy. V neskorších štádiách infekcie sa na povrchu hľúz objavujú priehlbiny, ktoré majú často červenohnedé sfarbenie okrajov. Druhotné napadnutie hľúz hubami a baktériami môže tieto príznaky prekryť a odlišovanie pokročilejších štádií baktériovej krúžkovitosti od ostatných hubových a baktériových ochorení je ťažké, dokonca až nemožné.

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

3.1 Pupkové konce sa zhomogenizujú až do dosiahnutia úplnej macerácie v rozpúšťadle netoxickom pre Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus [napr. 0,05 mol.l^{-1} vo fosforečnanovom tlmivom roztoku (PBS) s hodnotou pH 7,0 a pri teplote nižšej ako 30 °C]. Pridaním netoxického, protiflokulačného a netoxického, protipenivého prípravku uvedeného v častiach B a C by sa malo zabrániť nadmernej macerácii.

3.2 Baktérie z homogenátu sa vylúhujú jedným z nasledujúcich spôsobov:

3.2.1 a) Homogenát sa centrifuguje pri najviac 180 g 10 minút.

b) Získaný supernatant sa centrifuguje pri najmenej 4 000 g 20 minút. Nový supernatant sa odstráni.

3.2.2 a) Macerát sa nechá stáť 30 minút, aby sa zvyšok pletív mohol usadiť. Supernatant sa zleje bez zvírenia sedimentu.

b) Supernatant pomocou vodnej vývevy sa prefiltruje cez filtračný papier (Whatman No. 1) vložený do lievika z fritového skla (č. 2 = 40 – 100 mm). Filtrát sa pozbiera do centrifugačnej skúmavky, filter sa premyje sterilným PBS na maximálny filtračný objem 35 ml.

c) Filtrát sa centrifuguje pri najmenej 4 000 g 20 minút.

3.3 Pelet sa suspenduje v sterilnom 0,01 mol.l^{-1} fosforečnanovom tlmivom roztoku s hodnotou

pH 7,2 podľa časti C tak, aby sa dosiahol celkový objem cca 1 ml. Rozdelí sa na dve rovnaké časti, z ktorých jedna sa uchová zamrazením pri –20 °C alebo lyofilizáciou a ako referenčná vzorka. Je dokázané (Jansen and van Vaerenberg, 1987), že zmrazovaním sa môže znížiť životaschopnosť Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus. Suspendovaním peletu v 10 % glycerole sa tomuto problému možno vyhnúť. Druhá časť sa rozdelí na dve časti, z ktorých jedna sa použije pre IF test a na farbenie podľa Grama a druhá pre baklažánový test.

3.4 Je nutné, aby sa všetky pozitívne kontroly a vzorky Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus spracúvali oddelene a aby sa zabránilo kontaminácii. To platí pre podložné sklíčka pre IF test a baklažánový test.

4. Farbenie podľa Grama

4.1 Pripraví sa farbenie podľa Grama pre všetky riedenia peletov (bod 5.2.1) a pre všetky rozrezané hľuzy (bod 2) vykazujúce sklovitosť, hnilobu alebo iné podozrivé príznaky. Vzorky by sa mali odobrať z okraja napadnutého pletiva.

4.2 Pripraví sa farbenie podľa Grama pre známe kultúry Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus a podľa možnosti pre prirodzene infikované pletivá (bod 5.1).

4.3 Stanoví sa, ktoré hľuzy obsahujú typické, Gram pozitívne koryneformné baktérie. Všeobecne sú bunky Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus dlhé 0,8 – 1,2 mm a až 0,6 mm široké.

4.4 Vhodný postup na farbenie je uvedený v časti D. Bunky Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus (CMS) sú 0,8 – 1,2 mm dlhé a 0,4 – 0,6 mm široké. Preparáty z prirodzených infekcií alebo v súčasnosti izolovaných kultúr často ukazujú predominanciu kokoidných tyčiniek, ktoré sú obyčajne o niečo menšie ako bunky z agarových kultúr. Na väčšine médií CMS bunky sú pleomorfné tyčinky koryneformného tvaru a môžu dávať rozdielne reakcie podľa Grama. Bunky sú jednobunkové, s charakteristickými ohnutiami typickými pre ohnuté delenie a občas v nepravidelných skupinách často opisovaných ako palisády a čínske znaky.

5. Schéma pre IF test

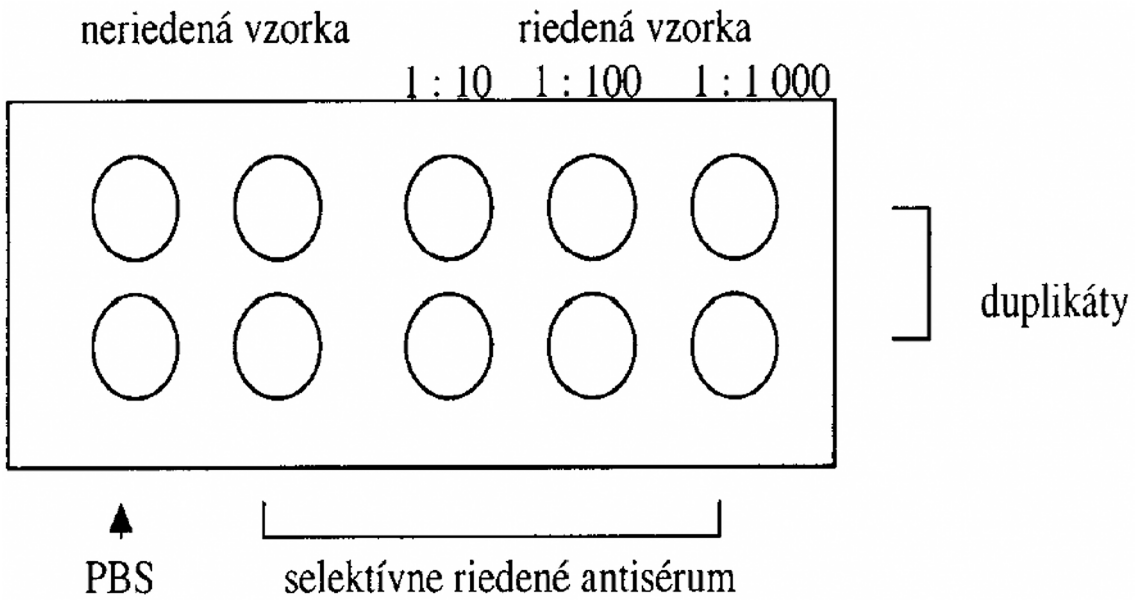
5.1 Použije sa antisérum pre známe kmene Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus – ATCC 33113 (NCPPB 2137) alebo NCPPB 2140, ktorého titer by mal byť vyšší ako 1 : 600. Na testovacom podložnom sklíčku sa použije jedna kontrola s PBS, aby sa stanovilo, či sa imunoglobínový konjugát izotiokyanan fluoresceínu (FITC) nešpecificky spája s bunkami baktérií. Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus – ATCC 33113 (NCPPB 2137) alebo NCPPB 2140 by sa na osobitnom sklíčku mala použiť ako homologická antigénová kontrola. Tam, kde je to možné, mali by sa použiť prirodzene infikované pletivá (udržiavané v lyofilizovanej forme alebo zmrazené pri –20 °C) ako podobná kontrola na rovnakom podložnom sklíčku (obr. 2).

5.2 Postup

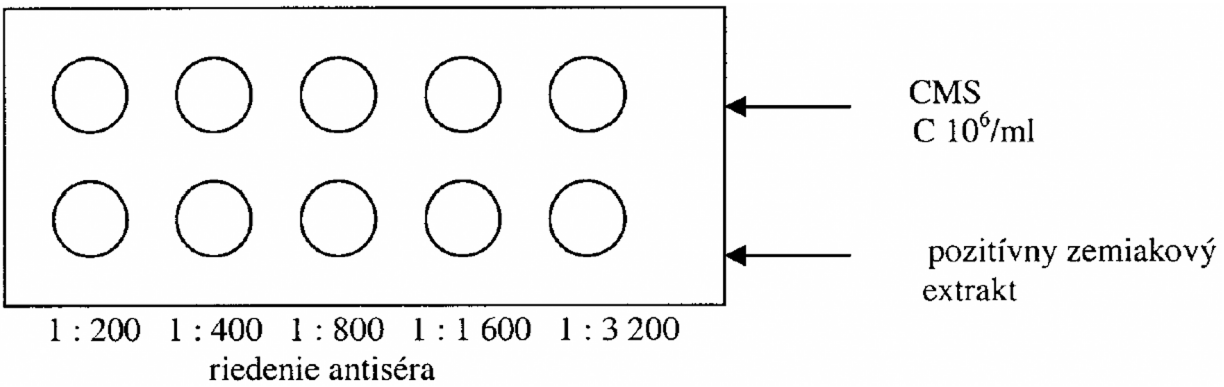
5.2.1 Pripravia sa tri série desaťnásobného nariedenia (10^1, 10^2, 10^3) finálneho peletu v destilovanej vode (obr. 1).

5.2.2 Do testovacích jamiek podložného sklíčka sa napipetuje nameraný štandardný objem, dostatočný na zaliatie každej z jamiek (asi 25 µl) všetkých riedení peletu alebo suspenzie Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus (asi 106 buniek x ml^{-1}) tak, ako je to znázornené na obr. 1.

Obr. 1: Podložné sklíčko so vzorkami a PBS kontrolou



Obr. 2: Pozitívne kontrolné sklíčko



5.2.3 Príslušné testovacie jamky sa zalejú odporúčanými riedeniami antiséra Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus riedeného 0,01 mol.l^{-1} roztokom PBS s hodnotou pH 7,2 uvedenou v časti C tak, ako je to znázornené na obr. 1. (Pre FITC kontrolu použijeme PBS.) Pracovné riedenie antiséra by malo mať približne polovičnú hodnotu toho, akú mal IF titer. Ak sa zahrnú aj iné riedenia antiséra, malo by sa pre každé jedno riedenie pripraviť osobitné podložné sklíčko.

5.2.4 Podložné sklíčka pri laboratórnej teplote sa inkubujú vo vlhkej komôrke 30 minút.

5.2.5 Podložné sklíčka sa pozorne opláchnu 0,01 mol.l^{-1} roztokom PBS s hodnotou pH 7,2 a 5 minút sa umývajú v troch kúpeľoch 0,01 mol.l^{-1} roztoku PBS s hodnotou pH 7,2.

5.2.6 Nadbytočná vlhkosť sa opatrne odstráni.

5.2.7 Každá testovacia jamka sa zaleje FITC konjugátom s rovnakým riedením, aké sa použilo na stanovenie titra, a pri laboratórnej teplote sa inkubuje v tmavej, vlhkej komôrke 30 minút.

5.2.8 Podložné sklíčka sa opláchnu a umývajú uvedeným spôsobom.

5.2.9 Do každej testovacej jamky sa pridá asi 5 až 10 µl fosforečnanmi tlmeného glycerínu s hodnotou pH 7,6 (alebo podobná krycia látka s hodnotou pH najmenej 7,6) a prikryje sa krycím sklíčkom podľa časti C.

5.2.10 Preparát sa preskúma epifluorescenčným mikroskopom a filtrami určenými na práce s FITC. Vhodné je 400- až 1 000-násobné zväčšenie. Testovacie jamky sa prezerajú pozdĺž dvoch na seba kolmých osí a po obvode.

V pozitívnych kontrolách sa hľadajú fluoreskujúce bunky a stanoví sa titer. V kontrolnej

testovacej jamke FITC/PBS sa pozorujú fluoreskujúce bunky, a ak sa tam nenachádzajú, pokračuje sa na testovaných testovacích jamkách. Najmenej v 10 mikroskopických políčkach sa stanoví priemerný počet fluoreskujúcich buniek s typickou morfológiou a vypočíta sa ich počet na 1 ml neriedeného peletu podľa časti E.

Pri vykonávaní imunofluorescenčných testov sa možno stretnúť s nasledujúcimi problémami:

V peletoch zo zemiakového extraktu sa môžu nachádzať na pozadí populácie fluoreskujúcich buniek s netypickou morfológiou podobnou Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus. Mali by sa počítať len fluoreskujúce bunky s typickým tvarom a veľkosťou.

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

Technické obmedzenie detekčných možností tohto postupu sa nachádzajú medzi 103 a 104 buniek na 1 ml neriedeného peletu. Vzorky s počtom IF typických buniek na hraniciach detekčného limitu pre Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus sú zvyčajne negatívne, ale môžu sa podrobiť baklažánovému testu.

Výsledok imunofluorescenčného testu sa považuje za negatívny pre každú vzorku, v ktorej sa nenašli typické fluoreskujúce bunky. Vzorky sa musia považovať za „nekontaminované“ Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus.

Baklažánový test sa nevyžaduje.

Vzorky, v ktorých sa s obidvoma antisérami dosiahol pozitívny výsledok imunofluorescenčného testu, musia sa považovať za „čiastočne nekontaminované“ Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus.

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

6. Baklažánový test

6.1 Pelety pripravené podľa bodu 3.3 sa nanesú jedným z ďalej uvedených postupov (body 6.2, 6.3 alebo 6.4) najmenej na 25 rastlín baklažánu v rastovej fáze 3 podľa časti F.

6.2 Naočkovanie pozdĺžneho rezu I

6.2.1 Každá nádobka sa zaistí vo vodorovnej polohe podložkou. (Dobrým materiálom pre nádobku s priemerom 10 cm je blok z expandovaného polystyrénu s otvorom 5 (h)x10(š)x15(d) cm.) Vhodné je vložiť pás hliníkovej fólie medzi stonku každej rastliny baklažánu a každú rastlinu upevniť gumičkou ovinutou okolo polystyrénu.

6.2.2 Skalpelom sa urobí do stoniek baklažánov medzi klíčne listy a prvý pravý list pozdĺžny rez dlhý 0,5 až 1,0 cm do hĺbky asi hrúbky stonky.

6.2.3 Špičkou skalpela sa podrží otvorený rez a jemným štetcom sa nanesie očkovacia látka (pelet) do ranky. Po naočkovaní všetkých rastlín sa zvyšok očkovacej látky rozdelí medzi rastliny.

6.2.4 Rez sa uzavrie sterilnou vazelínou z 2 ml injekčnej striekačky.

6.3 Naočkovanie pozdĺžneho rezu II

6.3.1 Rastlina baklažánu sa uchopí medzi dva prsty a napipetuje sa kvapka (asi 5 až 10 µl) supendovaného peletu na stonku medzi klíčne listy a prvý pravý list.

6.3.2 Skalpelom sa urobí do stonky priečny (asi pod uhlom 5°) a 1 cm dlhý rez približne do hĺbky hrúbky stonky, počnúc pri kvapke očkovacej látky.

6.3.3 Rez sa uzavrie sterilnou vazelínou z 2 ml injekčnej striekačky.

6.4 Naočkovanie injekčnou striekačkou

6.4.1 Rastliny baklažánu sa deň pred očkovaním nepolievajú, aby sa znížilo ich vnútorné napätie.

6.4.2 Baklažány sa očkujú injekčnou striekačkou vybavenou hypodermickou ihlou (najmenej 23 G), zvyšok očkovacej látky sa rozdelí medzi rastliny.

6.5 Známou kultúrou Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus a podľa možnosti pletivom z prirodzene infikovaných hľúz (bod 5.1) rovnakým postupom (body 6.2, 6.3 a 6.4) sa naočkuje 25 rastlín baklažánu.

6.6 Sterilným 0,05 mol.l^{-1} PBS sa naočkuje 25 rastlín baklažánu, a to rovnakým postupom (body 6.2, 6.3 a 6.4).

6.7 Rastliny sa inkubujú vo vhodných podmienkach podľa časti F 40 dní. Pravidelne, každých osem dní sa kontrolujú príznaky baktériovej krúžkovitosti. Počíta sa počet rastlín s vyvinutými príznakmi. Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus spôsobuje vädnutie baklažánu, ktoré sa môže začať buď okrajovým, alebo medzižilovým ochabnutím. Vädnúce pletivá sa najprv sfarbujú do tmavozelena alebo sa na nich vytvárajú škvrny, pred odumieraním často blednú. Medzižilové vädnutie má často žlté okraje. Rastliny nevyhnutne nemusia odumrieť, čím sú pri prejavení sa príznakov baktériovej krúžkovitosti staršie, tým majú väčšiu šancu na prežitie. Rastliny môžu infekciu prerásť. Mladšie rastliny baklažánu sú aj voči menším populáciám Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus oveľa citlivejšie ako staršie. Preto treba použiť rastliny pred dosiahnutím rastovej fázy 3.

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

6.8 Pre všetky šarže rastlín baklažánu s prejavom príznakov baktériovej krúžkovitosti sa pripraví farbenie podľa Grama (bod 4), a to použitím zvädnutých listových a stonkových pletív z rastlín a izolátov z vhodného živného média (bod 7). Povrch listov baklažánu sa dezinfikuje 70 % etanolom.

6.9 Za určitých podmienok, najmä keď rastové podmienky nie sú optimálne, môže Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus v rastlinách baklažánu prežívať v podobe latentnej infekcie až 40 dní po naočkovaní. Možným dôsledkom takýchto infekcií môže byť zakrpatenie a strata životaschopnosti naočkovaných rastlín. Ak sa výsledok IF testu považuje za pozitívny, je nevyhnutné ďalšie testovanie. Preto je dôležité porovnávať rýchlosť rastu všetkých rastlín baklažánu s kontrolnými rastlinami naočkovanými sterilným 0,05 mol.l^{-1} roztokom PBS a sledovať klimatické podmienky v skleníku.

Na ďalšie testovanie sa odporúča nasledujúce:

6.9.1 Stonky sa nad miestom očkovania odrežú a odstránia sa z nich listy.

6.9.2 Stonky sa macerujú v 0,05 mol.l^{-1} roztoku PBS s hodnotou pH 7,0 tak, ako je to uvedené v bodoch 3.1 a 3.2.

6.9.3 Jedna polovica peletu sa použije na farbenie podľa Grama (bod 4) a IF testu (bod 5).

6.9.4 Ak sú výsledky Gramovho farbenia a IF testu pozitívne, použije sa druhá polovica peletu na vykonanie ďalšieho baklažánového testu (bod 6). Použijú sa známe kultúry Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus a kontrolné rastliny so sterilným 0,05 mol.l^{-1} roztokom PBS. Ak sa príznaky po ďalších testoch nepozorujú, vzorka sa musí považovať za negatívnu.

7. Izolácia Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus

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

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

7.1 Suspenzia sa nanesie na jedno z nasledujúcich médií (recepty sú uvedené v častiach B až H):

živná dextrózová pôda (len pre subkultúry),

kvasnicovo-glukózová peptónová živná pôda,

kvasnicovo-dextrózová živná pôda,

kvasnicová živná pôda s výluhom minerálnych solí.

Inkubuje sa až 20 dní pri teplote 21 °C.

Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus rastie pomaly, zvyčajne v priebehu 10 dní vytvára bodové, smotanovo sfarbené a kupolovité kolónie.

Kultúra sa opätovným rozterom prečistí.

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

8. Určovanie

8.1 Zo zdravých alebo napadnutých zemiakov a baklažánov možno izolovať mnohé Gram pozitívne tyčinkovo-kyjakovité baktérie s charakteristikou kolónií, ktorá je podobná kolóniám Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus. V tejto súvislosti je preto potrebné vykonať tieto testy:

IF test (bod 5.1),

baklažánový test,

nutričný a fyziologický test uvedený v časti H,

oxidačno-fermentačný test (O/F),

oxidázový test,

rast pri 37 °C,

tvorba ureázy,

hydrolýza eskulínu,

hydrolýza škrobu,

tolerancia voči 7 % roztoku chloridu sodného,

indolový test,

katalázový test,

tvorba H_2S,

využitie citranov,

hydrolýza želatíny,

kyselina z glycerolu, laktózy, ramnózy a salicínu,

farbenie podľa Grama.

Všetky testy by mali obsahovať známe pôdy. Morfologické porovnávanie by sa malo vykonávať s kultúrami vypestovanými na dextrózových živných pôdach.

8.2 Pre IF testy by všetky populácie mali byť upravené na 106 buniek x 1 ml^{-1}. Titer IF by mal byť blízky titru známej kultúry Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus.

Pre baklažánový test by všetky populácie mali byť upravené na 107 buniek x 1 ml^{-1}. Baklažánové testy by sa mali vykonávať s použitím 10 rastlín na každý testovací organizmus oproti známej kultúre Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus a sterilnej kontrole s čistou vodou. Pri použití čistých kultúr by sa vädnutie malo dosiahnuť v priebehu 20 dní, rastliny, ktoré nevykazujú príznaky, by sa po tomto čase mali inkubovať pri teplotách vedúcich k rastu baklažánu, ale nižších ako 30 °C, celkovo 30 dní podľa časti F. Ak sa po 30 dňoch príznaky baktériovej krúžkovitosti neprejavia, kultúra sa nemôže uznať za patogenickú formu Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus.

Test	*Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*
O/F	inertná alebo slabo oxidatívna
oxidázový	-

katalázový	+
redukcia dusičnanov	-
aktivita ureázy	-
tvorba H_2S	-
tvorba indolu	-
využitie citranov	-
hydrolýza škrobu	- alebo slabá
rast pri 37 °C	-
rast v 7 % NaCl	-
hydrolýza želatíny	-
hydrolýza eskulínu	-
kyselina z	
glycerolu	-
laktózy	-
ramnózy	-
salicínu	-

Časť B

Príprava maceračného roztoku podľa odporúčania Lelliotta a Sellara, 1976

Protipenivý prípravok DC silicone antifoam MS A (Hopkins & Williams, Ltd., Cat. No 9964-25, Chadwell Heath, Essex, Anglicko)	10 ml
Vločky Lubrol W (ICI Ltd)	0,5 g
Pyrofosforečnan štvorsodný	1g
0,05 $mol.l^{-1}$ fosforečnanový tlmivý roztok, pH 7,0 (časť C)	1 l

Časť C

Tlmivé roztoky (pufre)

1. Tlmivý roztok: 0,05 $mol.l^{-1}$ fosforečnanový pufer, pH 7,0

Tento tlmivý roztok možno použiť na macerovanie pletív zemiakových hľúz (bod 2.1).

$Na_2HPO_4 . 12 H_2O$	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
NaCl	8,0 g
Destilovaná voda do	1 l
Tween	1 ml/1 l roztoku

2. Tlmivý roztok: 0,01 $mol.l^{-1}$ fosforečnanový pufer NaCl, pH 7,2

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

$Na_2HPO_4 . 12 H_2O$	2,7 g
$KH_2PO_4 . 2 H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destilovaná voda do	1 l

3. Tlmivý roztok: 0,1 $mol.l^{-1}$ fosforečnanový pufer s glycerolom, pH 7,6

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

$Na_2HPO_4 . 12 H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4 . 2 H_2O$	0,15g

Glycerol	50 ml
Destilovaná voda	100 ml

Časť D

Postup pri farbení podľa Grama (Huckerova modifikácia) (Doetsch, 1981)

Roztok kryštálovej violete

V 20 ml 95 % etanolu sa rozpustia 2 g kryštálovej violete.

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

Obidva roztoky sa zmiešajú.

Lugolov roztok

Jód	1 g
Jodid draselný	2 g
Destilovaná voda	300 ml

Obidve chemikálie sa zmiešajú a spolu sa rozotrú v trecej miske. Pridajú sa do destilovanej vody, nádoba sa uzavrie a roztok sa premieša.

Safranínový odfarbovací roztok

Roztok safranínu:

Safranín O	2,5 g
95 % etanol	100 ml

Zmes sa premieša a odloží. Pred použitím sa zriedi v pomere 1:10 na pracovnú koncentráciu.

Postup pri farbení

1. Pripraví sa rozter, fixuje sa sušením na vzduchu a teplom.
2. Podložné sklíčko sa zaleje roztokom kryštálovej violete na 1 minútu.
3. Krátko sa umýva pod tečúcou vodovodnou vodou.
4. Zaleje sa na 1 min. Lugolovým roztokom.
5. Opäť sa umyje pod tečúcou vodovodnou vodou a vysuší sa pijavým papierom.
6. Odfarbuje sa buď kvapkaním 95 % etanolu až dovtedy, kým sa nevylučuje farbivo, alebo ponorením a miernym miešaním v ňom.
7. Umyje sa pod tečúcou vodovodnou vodou a osuší sa pijavým papierom.
8. Na čas 10 sekúnd sa zaleje safranínom.
9. Opäť sa umyje pod tečúcou vodovodnou vodou a osuší sa pijavým papierom.

Gram pozitívne baktérie majú fialovomodré sfarbenie, Gram negatívne baktérie ružovočervené sfarbenie.

Časť E

Určovanie populácie IF pozitívnych buniek

1. Plocha S jednej testovacej jamky na viacjamkovom podložnom sklíčku:

(vzorec č. 1)

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

pričom D = priemer testovacej jamky.

2. Plocha s poľa objektívu:

(vzorec č. 2)

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

kde d = priemer poľa objektívu.

3. Hodnota d sa stanoví buď priamym meraním, alebo na základe nasledujúcich vzorcov:

(vzorec č. 3)

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

kde i = koeficient poľa (závisí od typu okulára mikroskopu a môže mať hodnotu od 8 do 24),

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

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

Zo vzorca č. 2

$$d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$$

Zo vzorca č. 3

$$d = \sqrt{\frac{4 \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 . 4}}{\pi}} = \frac{i}{GK}$$

4. Zistí sa počet typických fluoreskujúcich buniek v jednom poli c.

5. Vypočíta sa počet typických fluoreskujúcich buniek v celom poli C.

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

6. Vypočíta sa počet typických fluoreskujúcich buniek na 1 ml peletu (N).

$$N = C\frac{1\,000}{y}F$$

kde y = objem peletu na testovacej jamke podložného sklíčka,

F = zrieďovací faktor peletu.

Časť F

Pestovanie rastlín baklažánu na test

Osivo baklažánu (Solanum melongena, odroda Black Beauty) sa vyseje do pasterizovaného kompostu. Semenáčky s plne vyvinutými klíčnymi listami (10 až 14 dní staré) sa presadia do kvetináčov s pasterizovaným kompostom.

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

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

dĺžka dňa: 14 hodín alebo prirodzená dĺžka dňa

teplota: cez deň 21 až 24 °C,

cez noc 15 °C.

UPOZORNENIE: Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus nebude rásť pri teplotách vyšších ako 30 °C. Ak nočné teploty neklesajú pod 15 °C, môžu sa poškodiť chromofory (striebristá nekróza).

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

Osivo baklažánu (odrody Black Beauty) možno získať od

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

Časť G

Živné pôdy pre rast a izoláciu Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus

1. Živná pôda (NA)

Živný agar Difco bacto v destilovanej vode, dávkovanie podľa výrobcu. Sterilizuje sa v autokláve 10 minút pri teplote 121 °C.

2. Živná dextrózová pôda (NDA)

Živný agar Difco bacto s obsahom 1 % monohydrátu D(+) glukózy. Sterilizuje sa v autokláve 20 minút pri teplote 115 °C.

3. Kvasnicovo-glukózová peptónová živná pôda (YPGA)

Difco bacto kvasnicový výluh (č. 0127)	5g
Difco bacto peptón (č. 0118)	5g
Monohydrát D (+) glukózy	10 g
Difco bacto purifikovaný	15 g

agar (č. 0560)	
Destilovaná voda	1 l

Sterilizuje sa v autokláve 20 minút 0,5 l celkového objemu média pri teplote 115 °C.

4. Kvasnicová živná pôda s výluhom minerálnych solí (YGM)

Difco bacto kvasnicový výluh	2,0 g
Monohydrát D (+) glukózy	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.H_2O$	0,015 g
NaCl	0,05 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Difco bacto purifikovaný agar	18 g
Destilovaná voda	1 l

Sterilizuje sa v autokláve 20 minút 0,5 l celkového objemu média pri teplote 115 °C.

Časť H

Nutričné a fyziologické testy na identifikáciu Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus

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

1. Oxidačno-fermentačný test (Hugh & Leifson, 1953) – O/F test

Základné médium:

KCl	0,2 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,2 g
$NH_4H_2PO_4$	1,0 g
Difco bacto peptón (č. 0118)	1,0 g
Difco bacto čistený agar	3,0 g
Monohydrát D (+) glukózy	10,0 g
Brómtymolová modrá	0,03 g
Destilovaná voda	1 l

Jednotlivé zložky sa zmiešajú a hodnota pH sa upraví 1 $mol.l^{-1}$ KOH na 7,0 – 7,2.

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

Sterilizuje sa v autokláve 10 minút pri teplote 115 °C.

Každá kultúra sa naočkuje očkovacou ihlou do 5 ml a 10 ml skúmaviek. Do skúmaviek s nameraným objemom 10 ml skúmavky asepticky sa pridá 1 ml až 2 ml sterilného kvapalného parafínu a inkubuje sa.

Pozitívne reakcie:

Skúmavka	Sfarbenie	Reakcia
otvorená	žlté	fermentatívna
uzavretá	žlté	
otvorená	žlté	oxidatívna
uzavretá	modrozelené	
otvorená	zelené	oxidatívna alebo inertná
uzavretá	zelenomodré	

2. Oxidázový test (Kovacs, 1956)

Kovacsovo oxidázové činidlo:

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

Toto činidlo by sa malo robiť čerstvé v objemoch 1 ml a možno ho skladovať v sklenej hnedej fľaši pri 5 °C 1 týždeň až 4 týždne.

Na filtračný papier v Petriho miske sa kvapne kvapka činidla. Ihneď na papier platinovým očkom sa natrie niektorá z kultúr vypestovaných na agare.

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

UPOZORNENIE: treba použiť platinové očko a kultúry zo živnej pôdy (NA), keďže už stopy železa alebo obsah vyšších cukrov v živnej pôde môže dať falošné pozitívne výsledky.

3. Vytváranie kyseliny z laktózy, ramnózy, salicínu a glycerolu

Pripraví sa O/F médium podľa Hugh & Leifsona bez glukózy. Rozleje sa do 5 ml skúmaviek: sterilizuje sa v autokláve 10 minút pri teplote 115 °C. Do roztopenej hmoty pri 45 °C asepticky sa pridá 0,5 ml prefiltrovaného vodného roztoku glycerolu, laktózy, ramnózy alebo salicínu. Opatrne sa premieša.

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

4. Katalázový test

Na čisté podložné sklíčko sa kvapne kvapka 30 % peroxidu vodíka a emulzifikuje sa s kultúrou pridanou platinovým očkom.

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

5. Aktivita nitrát-reduktázy a denitrifikácia (Bradbury, 1970)

Kultivačné médium:

KNO_3 (bez obsahu dusitanov)	1g
Difco bacto kvasnicový výluh	1g
K_2HPO_4	5g
Destilovaná voda	1 l

Objemy po 10 ml sa rozlejú do skúmaviek s obsahom 20 ml a sterilizujú sa v autokláve 15 minút pri teplote 121 °C.

Činidlo A:

H_2SO_4	8 g
5 N kyselina octová	1 l

Činidlo B:

Naftylamín	5 g
5 N kyselina octová	1 l

Dusičnanové médium sa naočkuje v dvoch opakovaniach. Testuje sa po 10 a 20 dňoch, a to pridaním kvapky Lugolovho roztoku, 0,5 ml činidla A a 0,5 ml činidla B. Ak médium nenadobúda červenú farbu, pridá sa asi 50 mg práškového zinku a pozoruje sa farebná reakcia.

Pozitívna reakcia	Farebná reakcia	
Žiadna redukcia dusičnanov	bez farby	červená
Redukcia dusičnanov až na dusitany (len nitrát - reduktáza)	červená	-
Redukcia dusičnanov až za dusitany (nitrát-reduktáza a nitrit-reduktáza)	bez farby	bez farby

6. Tvorba ureázy

Základné médium:

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

Sterilizuje sa v autokláve 20 minút pri teplote 115 °C. Roztopená báza sa schladí na 50 °C a asepticky sa pridá 5 ml 40 % vodného roztoku močoviny (Oxford SR20) prefiltrovaného cez sterilizovaný filter. Dobre sa premieša.

Rozdelí sa na 6 ml objemy do sterilných skúmaviek (16 x 100 mm), skloní sa a nechá sa usadiť.

Pozitívna reakcia: po aktivácii ureázy žltooranžové médium nadobudne čerešňovočervené alebo červenoružové sfarbenie.

Využitie citranov (Christensen) (Skerman, 1967)

Agar na báze citranov	23 g
Destilovaná voda	1 l

Zamieša sa a zohrievaním sa rozpustí. Rozdelí sa na 6 ml objemy ako pre uvedené močovinové médium. Sterilizuje sa v autokláve 15 minút pri teplote 121 °C, nakloní sa a nechá sa usadiť.

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

7. Tvorba sírovodíka

Médium:

Difco bacto tryptón (č. 0123)	10 g
K_2HPO_4	1g
NaCl	5g
Destilovaná voda	1 l

Zložky sa rozpustia a roztok sa rozdelí na 6 ml objemy do skúmaviek 16 x 100 mm. Sterilizuje sa v autokláve 10 minút pri teplote 115 °C.

Naočkuje sa a asepticky sa suspenduje papier s obsahom octanu olovnatého (Merck 9511), udržiava sa prikryté a inkubuje sa 20 dní.

Pozitívna reakcia: tvorbu H_2S z tryptónu signalizuje čiernohnedé sfarbenie papiera.

8. Tvorba indolu (Ramamurthi, 1959)

Médium:

Rovnaké ako pre H_2S.

Odstráni sa papier s octanom olovnatým a pridá sa 1 až 2 ml éteru a jemne sa potrasie. Vrstvy sa nechajú oddeliť (5 minút). Opatrne sa pridá 0,5 ml Kovacsovho činidla (Merck 9293) tak, aby stekalo po povrchu usadeniny.

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

9. Rast pri 37 °C (Ramamurthi, 1959)

Médium:

Živný bujón Difco bacto (č. 0003)	8g
Destilovaná voda	1 l

Zamieša sa, rozpustí a rozleje sa do 6 ml skúmaviek.

Sterilizuje sa v autokláve 15 minút pri teplote 121 °C.

Naočkuje sa a inkubuje sa pri teplote 37 °C.

Pozitívna reakcia: sledujeme rast.

10. Rast v 7 % roztoku chloridu sodného

Médium:

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

Zamieša sa, rozpustí a rozleje sa do 6 ml skúmaviek.

Sterilizuje sa v autokláve 15 minút pri teplote 121 °C.

Pozitívna reakcia: sledujeme rast.

11. Hydrolýza želatíny

Médium:

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

Zamieša sa, rozpustí a rozleje sa do 6 ml skúmaviek.

Sterilizuje sa v autokláve 15 minút pri teplote 121 °C.

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

12. Hydrolýza škrobu

Médium:

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

Zamieša sa a sterilizuje sa v autokláve 10 minút pri teplote 115 °C.

Rozleje sa na platničky, bodovo sa naočkuje.

Po dobrom raste (10 až 20 dní) časť prírastku sa odstráni a zaleje sa jódovou tinktúrou podľa Lugola.

Pozitívna reakcia: hydrolýza škrobu je signalizovaná čírymi plochami pod baktériovou kultúrou a okolo nej, ostatok živnej pôdy ostáva purpurový.

13. Aktivita eskulín-hydrolázy (Sneath & Collins, 1974)

Médium:

Difco bacto peptón	10 g
Eskulín	1g
Citran železitý	0,05 g
Citran sodný	1g
Destilovaná voda	1 l

Zložky sa zmiešajú, aby sa rozpustili a roztok sa po objemoch 6 ml rozdelí do skúmaviek. Sterilizuje sa v autokláve 10 minút pri teplote 115 °C.

Médium je číre, má však modrú fluorescenciu.

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

Časť I

Uchovávanie a skladovanie vzoriek

1. Každá podozrivá vzorka, v ktorej bol identifikovaný pozitívny výsledok imunofluorescenčného testu vykonaného podľa postupu uvedeného v častiach A až H, pričom sa po ukončení testovania očakáva buď potvrdenie, alebo nepotvrdenie pozitívneho testu, musí byť zadržaná alebo primerane zakonzervovaná až do ukončenia laboratórneho testovania, a to

a) ak je možné, všetky hľuzy alebo rastliny, z ktorých sa odoberali vzorky,

b) akýkoľvek zostávajúci pelet a dodatočne pripravené podložné sklíčka pre imunofluorescenčný test.

2. V prípade pozitívneho potvrdenia tohto organizmu v teste musia byť zadržané alebo primeraným spôsobom zakonzervované najmenej jeden mesiac po postupe oznamovania:

a) materiály uvedené v odseku 1,

b) vzorka infikovaných rastlín baklažánu naočkovaných peletom z hľúz alebo rastlín,

c) izolované kultúry baktériovej krúžkovitosti.

Príloha č. 2
k nariadeniu vlády č. 70/2004 Z. z.

Podrobnosti na určenie pravdepodobnej kontaminácie a možného šírenia baktériovej krúžkovitosti

1. Určenie pravdepodobného rozsahu kontaminácie prvkov podľa § 4 ods. 1 písm. b) zahŕňa:
a) hľuzy a rastliny pestované na mieste produkcie, označené podľa § 4 ods. 1 písm. a) za kontaminované,
b) miesto produkcie alebo budovy, výrobným spôsobom spojené s hľuzami alebo rastlinami označenými podľa § 4 ods. 1 písm. a) za kontaminované vrátane tých, ktoré používajú spoločnú mechanizáciu alebo výrobné zariadenia, a to buď priamo, alebo prostredníctvom spoločného dodávateľa,
c) hľuzy alebo rastliny vypestované na miestach produkcie podľa odseku 1 písm. b) alebo nachádzajúce sa na miestach produkcie v období, keď sa v budovách alebo na miestach produkcie nachádzali hľuzy alebo rastliny označené podľa § 4 ods. 1 písm. a) za kontaminované,
d) sklady, kde dochádza k manipulácii so zemiakmi z miest produkcie,
e) mechanizáciu, vozidlo, kontajner, sklad alebo jeho časť a akýkoľvek iný predmet vrátane obalového materiálu, ktorý mohol prísť do styku s hľuzami alebo rastlinami označenými podľa § 4 ods. 1 písm. a) za kontaminované, a to v priebehu predchádzajúcich 12 mesiacov alebo počas obdobia, keď by sa mohol prejaviť ich vplyv,
f) hľuzy alebo rastliny, ktoré sa skladovali alebo boli v styku so stavbami alebo s predmetmi uvedenými v písmene e), a to pred ich vyčistením alebo dezinfekciou,
g) na základe testovania podľa § 5 hľuzy alebo rastliny rovnakého klonového pôvodu ako hľuzy alebo rastliny označené podľa § 4 ods. 1 písm. a) za kontaminované a pri ktorých je riziko pravdepodobnej kontaminácie.

2. Pri určení pravdepodobného rozšírenia podľa § 4 ods. 1 písm. c) sa posudzujú nasledujúce prvky:
a) blízkosť iných miest produkcie, kde sa pestujú zemiaky alebo iné hostiteľské rastliny,
b) spoločné užívanie zásob sadivových zemiakov.

3. Pri oznamovaní pozitívneho nálezu iným krajinám správa musí obsahovať údaje o
a) zásielke alebo dávke zemiakov označených za kontaminované, predpísaný fytocertifikát, rastlinný pas alebo registračné číslo,
b) zásobách sadivových zemiakov, názov odrody, ak je to možné vo všetkých prípadoch,
c) predmetnej kontaminácii a vyznačenie bezpečnostného pásma,
d) dostupnosti peletu, pripravených preparátoch na podložných sklíčkach pre imunofluorescenčné testy, infikovaný rastlinný materiál baklažánov a izolovanú kultúru baktérií z testov, podľa ktorých sa dospelo k pozitívnemu potvrdeniu baktériovej krúžkovitosti.

Príloha č. 3
k nariadeniu vlády č. 70/2004 Z. z.

Opatrenia proti rozširovaniu baktériovej krúžkovitosti

1. Opatrenia uvedené v § 6 písm. a) vykonané pod dohľadom kontrolného ústavu s cieľom zničiť hľuzy alebo rastliny označené podľa § 4 ods. 1 písm. a) za kontaminované musia byť nasledujúce:
a) priemyselné spracovanie, a to priamou a bezprostrednou dodávkou spracovateľskému závodu vybavenému primeraným odpadovým hospodárstvom, pre ktoré sa stanovilo, že neexistuje žiadne identifikovateľné nebezpečenstvo rozširovania baktériovej krúžkovitosti a ktoré je vybavené systémom dezinfekcie skladovacích priestorov a odchádzajúcich vozidiel,
b) iné s podmienkou, že sa stanovilo, že neexistuje žiadne identifikovateľné nebezpečenstvo rozširovania baktériovej krúžkovitosti.

2. Primeraným využitím alebo likvidáciou hľúz alebo rastlín označených podľa § 4 ods. 1 písm. b) za pravdepodobne kontaminované podľa § 6 písm. b) vykonaných pod dohľadom kontrolného ústavu sa rozumie:
a) použitie zemiakov ako konzumných zabalených na priame dodanie a použitie bez opätovného vybalenia a ich určenie na priame dodanie a použitie alebo
b) použitie na priemyselné spracovanie a ich určenie na priame a bezprostredné dodanie spracovateľskému závodu vybavenému primeraným odpadovým hospodárstvom a možnosťami na dezinfekciu, alebo
c) niektorý iný spôsob použitia alebo likvidácie s podmienkou, že sa stanoví, že neexistuje identifikovateľné nebezpečenstvo rozširovania baktériovej krúžkovitosti.

3. Primeraným postupom čistenia a dezinfekcie predmetov podľa § 6 písm. c) sa rozumejú tie predmety, pre ktoré je stanovené, že neexistuje identifikovateľné nebezpečenstvo rozširovania baktériovej krúžkovitosti a že sa použije pod dohľadom kontrolného ústavu.

4. Kontrolný ústav v rámci bezpečnostného pásma vyznačeného podľa § 4 ods. 1 písm. c) na mieste produkcie, ktorým je každé miesto alebo súbor polí fungujúcich ako jedna produkčná poľnohospodárska jednotka, môže prijať nasledujúce špecifické opatrenia podľa § 6 písm. d):
4.1 na poli označenom podľa § 4 ods. 1 písm. a) za kontaminované
4.1.1 v priebehu najmenej troch rokov pestovania po roku označenej kontaminácie
4.1.1.1 sa musia prijať opatrenia na likvidáciu samovysadených rastlín zemiaka a iných, prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín baktériovej krúžkovitosti,
4.1.1.2 nesmú sa vysádzať žiadne hľuzy, rastliny a pravé semená zemiaka alebo iných, prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín baktériovej krúžkovitosti alebo iných plodín, pri ktorých existuje identifikovateľné nebezpečenstvo prežitia alebo rozširovania baktériovej krúžkovitosti dovtedy, kým miesto produkcie a hon nie sú bez výskytu samovysadených rastlín zemiaka počas aspoň dvoch po sebe nasledujúcich pestovateľských rokov,
4.1.1.3 v prvom roku pestovania zemiakov nasledujúcom po období uvedenom v predchádzajúcom odseku sa môžu vysádzať len uznané (certifikované) sadivové zemiaky a z nich pochádzajúce zemiaky môžu byť určené len na spotrebu alebo priemyselné spracovanie a musí sa vykonávať prieskum podrobne opísaný v § 2 ods. 1,
4.1.1.4 v roku pestovania zemiakov nasledujúcom po období uvedenom v predchádzajúcom odseku a po primeranom osevnom postupe sa môžu vysádzať len uznané (certifikované) sadivové zemiaky a z nich pochádzajúce zemiaky môžu byť určené buď na výrobu sadivových zemiakov, alebo na spotrebu alebo priemyselné spracovanie a musí sa vykonávať prieskum podrobne opísaný v § 2 ods. 1, alebo
4.1.2 počas štyroch pestovateľských rokov nasledujúcich po roku, keď bola označená kontaminácia,
4.1.2.1 musia sa prijať opatrenia na likvidáciu samovysadených rastlín zemiaka a iných, prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín baktériovej krúžkovitosti a
4.1.2.2 toto miesto produkcie a hon sa musia ponechať či udržiavať ako úhor alebo trvalý pasienok s častou nízkou kosbou alebo intenzívnym spásaním,

4.1.2.3 v roku pestovania zemiakov nasledujúcom po období uvedenom v predchádzajúcom odseku a po primeranom osevnom postupe sa môžu vysádzať len uznané (certifikované) sadivové zemiaky a z nich pochádzajúce zemiaky môžu byť určené buď na výrobu sadivových zemiakov, alebo na spotrebu alebo priemyselné spracovanie a musí sa vykonávať prieskum podrobne opísaný v § 2 ods. 1;
4.2 na ostatných miestach produkcie
4.2.1 počas pestovateľského roku nasledujúceho po roku označenej kontaminácie
4.2.1.1 buď sa nesmú vysádzať žiadne hľuzy, rastliny a pravé semená zemiaka alebo iných, prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín baktériovej krúžkovitosti a musia sa prijať opatrenia na likvidáciu samovysadených rastlín zemiaka, alebo
4.2.1.2 sa môžu vysádzať len uznané (certifikované) sadivové zemiaky a z nich pochádzajúce zemiaky sa môžu použiť len na spotrebu alebo priemyselné spracovanie pod podmienkou, že kontrolnému ústavu sa uspokojivým spôsobom dokáže odstránenie nebezpečenstva objavenia sa samovysadených rastlín zemiaka a iných, prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín baktériovej krúžkovitosti,
4.2.2 počas najmenej dvoch rokov nasledujúcich po období pod bodom 4.2.1 sa môžu vysádzať len uznané (certifikované) sadivové zemiaky a z nich pochádzajúce zemiaky môžu byť určené buď na výrobu sadivových zemiakov, alebo na spotrebu, prípadne na priemyselné spracovanie,
4.2.3 v každom z pestovateľských rokov opísaných v predchádzajúcich odsekoch sa musia prijať opatrenia na odstránenie samovysadených rastlín zemiaka alebo iných, prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín baktériovej krúžkovitosti a musí sa vykonávať prieskum podrobne opísaný v § 2 ods. 1,
4.2.4 v prípade vysádzania uznaných (certifikovaných) sadivových zemiakov učených na spotrebu alebo priemyselné spracovanie v pestovateľskom roku nasledujúcom po roku označenej kontaminácie rastlinný materál sa v primeranom období musí prehliadať a samovysadené rastliny zemiaka musia byť testované na prítomnosť baktériovej krúžkovitosti.
5. Bezprostredne po označenej kontaminácii podľa § 4 ods. 1 písm. a) a v každom z nasledujúcich pestovateľských rokov až po obdobie roku prvého povoleného pestovania zemiakov na mieste produkcie alebo hone označenom podľa odseku 4 písm. a) za kontaminované sa mechanizácia a skladovacie priestory v mieste produkcie alebo honu zapojené do výroby zemiakov podľa potreby musia na základe primeraných postupov uvedených v bode 3 očistiť a dezinfikovať.
6. Vo výrobných systémoch, v ktorých možno úplne nahradiť pestovateľský substrát,
6.1 nesmú sa vysádzať žiadne hľuzy, rastliny ani semená okrem prípadu, keď sa miesto produkcie podrobí opatreniam pod dohľadom kontrolného ústavu a vykoná sa eliminácia baktériovej krúžkovitosti a odstráni sa akýkoľvek rastlinný materiál patriaci do rodu zemiak alebo do čeľade ľuľkovité vrátane úplnej výmeny pestovateľského substrátu, vyčistenia a dezinfekcie miesta produkcie a technického vybavenia dovtedy, kým kontrolný ústav nevydá povolenie na pestovanie zemiakov,
6.2 produkcia zemiakov sa musí vyrábať z uznaných (certifikovaných) sadivových zemiakov alebo z minihľúz, prípadne minirastlín pochádzajúcich z testovaných zdrojov.
7. V rámci vyznačeného bezpečnostného pásma bez ohľadu na opatrenia uvedené v bodoch 4 až 6 je kontrolný ústav povinný
7.1 bezprostredne po označenej kontaminácii a v priebehu najmenej troch vegetačných období nasledujúcich po nej
7.1.1 zabezpečiť zo strany svojich zodpovedných úradných orgánov dozor nad podnikmi, ktoré pestujú zemiaky, skladujú zemiakové hľuzy a manipulujú s nimi, ako aj nad podnikmi poskytujúcimi zemiakarsku mechanizáciu dodávateľským spôsobom,
7.1.2 vyžadovať, aby sa podľa primeraných postupov čistila a dezinfikovala zemiakarska mechanizácia a podľa potreby aj jej skladovacie priestory tak, ako je to uvedené v bode 3,
7.1.3 vyžadovať, aby sa v rámci tohto pásma vysádzali len uznané (certifikované) sadivové zemiaky,
7.1.4 vyžadovať, aby sa vo všetkých podnikoch v rámci tohto pásma s hľuzami zemiaka určenými na ďalšie vysádzanie narábalo oddelene od ostatných,
7.1.5 podľa § 2 ods. 1 vykonávať prieskumy,
7.2 v priebehu primeraného obdobia a podľa potreby zaviesť program kompletnej výmeny sadivových zemiakov.

Príloha č. 4
k nariadeniu vlády č. 70/2004 Z. z.
Zoznam transponovaných právnych aktov

Týmto nariadením sa transponuje Smernica Rady 93/85/EHS o kontrole baktériovej krúžkovitosti zemiaka.
Smernica Rady je preložená do slovenského jazyka; do úradného prekladu v slovenskom jazyku možno nahliadnuť v sídle Inštitútu pre aproximáciu práva Úradu vlády Slovenskej republiky, Námestie slobody 1/21, Bratislava.

1) § 2 písm. g) zákona č. 132/1989 Zb. o ochrane práv k novým odrodám rastlín a plemenám zvierat v znení neskorších predpisov.
§ 9 zákona Národnej rady Slovenskej republiky č. 291/1996 Z. z. o odrodách a osivách v znení neskorších predpisov.

2) § 2 ods. 17 zákona Národnej rady Slovenskej republiky č. 291/1996 Z. z. v znení neskorších predpisov.

3) Nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 69/2004 Z. z., ktorým sa ustanovujú podmienky na dovoz a premiestňovanie určitých škodlivých organizmov, rastlín, rastlinných produktov a iných predmetov na vedecké, výskumné alebo šľachtiteľské účely.

Vydavateľ Zbierky zákonov Slovenskej republiky, správca obsahu a prevádzkovateľ právneho a informačného portálu Slov-Lex dostupného na webovom sídle www.slov-lex.sk je
Úrad vlády Slovenskej republiky, Námestie slobody 1, 813 70 Bratislava,
tel.: 02 888 91 131, e-mail: helpdesk@slov-lex.sk.