

# LANDESGESETZBLATT FÜR OBERÖSTERREICH

Jahrgang 1997

Ausgegeben und versendet am 24. Oktober 1997

70. Stück

- Nr. 122 Verordnung der o.ö. Landesregierung zur Bekämpfung von Nelkenwicklern  
Nr. 123 Verordnung der o.ö. Landesregierung zur Bekämpfung des Kartoffelkrebses  
Nr. 124 Verordnung der o.ö. Landesregierung zur Bekämpfung der Kartoffelnematoden  
Nr. 125 Verordnung der o.ö. Landesregierung zur Bekämpfung der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel

## Nr. 122

### Verordnung

#### der o.ö. Landesregierung vom 15. September 1997 zur Bekämpfung von Nelkenwicklern

Auf Grund des § 16 des O.ö. Kulturpflanzenschutzgesetzes, LGBl.Nr. 37/1951, in der Fassung des Landesgesetzes LGBl.Nr. 10/1955 wird verordnet:

#### § 1

##### Zweck

Diese Verordnung regelt die zur Verhinderung der Ausbreitung und zur Bekämpfung von Nelkenwicklern gebotenen Maßnahmen.

#### § 2

##### Begriffsbestimmungen

Nelkenwickler im Sinne dieser Verordnung sind der Mittelmeer-Nelkenwickler (*Cacocimorpha pronubana* Hbn.) und der Südafrikanische Nelkenwickler (*Epichoristodes acerbella* [Walk.] Diak.).

#### § 3

##### Anzeigepflicht

Das Auftreten und der begründete Verdacht des Auftretens von Nelkenwicklern ist vom Bewirtschafter (Eigentümer, Fruchtnießer, Pächter, sonstiger Bewirtschafter) des betroffenen Grundstückes unverzüglich der Bezirksverwaltungsbehörde anzuzeigen.

#### § 4

##### Schutzmaßnahmen

(1) Nelken dürfen nur in Verkehr gebracht werden, wenn sie nicht von Nelkenwicklern befallen sind.

(2) Von Nelkenwicklern befallene Kulturen von Nelken sind so zu behandeln, daß die von ihnen stammenden Nelken nicht mehr befallen sind, wenn sie in den Verkehr gebracht werden.

(3) Wenn Personen die in Abs. 1 und 2 enthaltenen Vorschriften außer acht lassen, hat die Bezirksverwaltungsbehörde die zur umgehenden Herstellung des den Vorschriften entsprechenden Zustandes erforderlichen Vorkehrungen dem Verpflichteten durch Bescheid aufzutragen oder bei Gefahr im Verzug unmittelbar anzuordnen und nötigenfalls gegen Ersatz der Kosten durch den Verpflichteten durchführen zu lassen.

## § 5

### Ausnahmen

(1) Die Landesregierung kann für wissenschaftliche Untersuchungen und Versuche sowie Züchtungsvorhaben Ausnahmen von den im § 4 Abs. 1 und 2 genannten Maßnahmen — erforderlichenfalls unter entsprechenden Auflagen — zulassen, soweit hiedurch die Bekämpfung des Nelkenwicklers nicht beeinträchtigt wird und keine Gefahr seiner Verschleppung entsteht.

(2) Die Landesregierung hat die Einhaltung eines Bescheides nach Abs. 1 einschließlich darin vorgeschriebener Auflagen mindestens einmal jährlich zu überprüfen.

## § 6

### Züchtungs-, Haltungs- und Manipulationsverbot

Das Züchten und Halten von Nelkenwicklern sowie das Arbeiten mit diesen Schadorganismen ist unbeschadet des § 15 Abs. 2 und 3 des O.ö. Kulturpflanzenschutzgesetzes verboten.

## § 7

### Schlußbestimmungen

(1) Diese Verordnung tritt mit Ablauf des Tages ihrer Kundmachung im Landesgesetzblatt für Oberösterreich in Kraft.

(2) Durch diese Verordnung wird die Richtlinie 74/647/EWG des Rates vom 9. Dezember 1974 zur Bekämpfung von Nelkenwicklern (ABl.Nr. L 352 vom 28.12.1974, S. 41) umgesetzt.

Für die o.ö. Landesregierung:

**Hofinger**

Landesrat

## Nr. 123

### Verordnung

#### der o.ö. Landesregierung vom 15. September 1997 zur Bekämpfung des Kartoffelkrebses

Auf Grund des § 16 des O.ö. Kulturpflanzenschutzgesetzes, LGBl.Nr. 37/1951, in der Fassung des Landesgesetzes LGBl.Nr. 10/1955 wird verordnet:

## § 1 Zweck

Diese Verordnung regelt die zur Feststellung, zur Verhinderung der Ausbreitung und zur Bekämpfung des Erregers des Kartoffelkrebses (*Synchytrium endobioticum* [Schilb.] Perc.) gebotenen Maßnahmen.

## § 2 Anzeigepflicht

Das Auftreten und der begründete Verdacht des Auftretens des Erregers des Kartoffelkrebses an Kartoffelpflanzen oder Kartoffelknollen ist vom Inhaber (Eigentümer, Fruchtnießer, Pächter, sonstiger Inhaber) unverzüglich der Bezirksverwaltungsbehörde anzuzeigen.

## § 3 Befallsgebiet und Sicherheitszone

(1) Bei einem Auftreten des Erregers des Kartoffelkrebses hat die Bezirksverwaltungsbehörde die befallene Fläche abzugrenzen (Befallsgebiet) und eine Sicherheitszone festzulegen, die groß genug ist, um den Schutz der benachbarten Gebiete zu gewährleisten, jedoch eine Entfernung von 300 m zum Befallsgebiet nicht überschreiten darf.

(2) Eine Anbaufläche gilt als befallen, wenn an mindestens einer Pflanze oder Knolle dieser Fläche Merkmale des Befalles mit Kartoffelkrebs festgestellt werden.

(3) Die Bezirksverwaltungsbehörde hat die Erklärung zum Befallsgebiet und zur Sicherheitszone erst dann aufzuheben, wenn ein Vorhandensein des Erregers des Kartoffelkrebses nicht mehr festgestellt werden kann.

## § 4 Schutzmaßnahmen

(1) Die Inhaber (Eigentümer, Fruchtnießer, Pächter, sonstige Inhaber) haben die Knollen und das Kraut von Kartoffeln befallener Flächen so zu behandeln, daß der Erreger des Kartoffelkrebses vernichtet wird; läßt sich die Herkunft der befallenen Knollen und des befallenen Krautes nicht mehr feststellen, ist die gesamte Partie, in der das kontaminierte pflanzliche Material gefunden wurde, zu behandeln.

(2) In einem Befallsgebiet dürfen

1. keine Kartoffeln angebaut werden sowie
2. keine zur Anpflanzung auf anderen Flächen bestimmte Pflanzen angebaut, eingeschlagen oder gelagert werden.

(3) In einer Sicherheitszone dürfen

1. nur solche Kartoffelsorten angebaut werden, die gegen den (die) nach amtlicher Untersuchung auf der befallenen Fläche festgestellten Pathotyp(en) des Erregers des Kartoffelkrebses resistent sind, sowie
2. Pflanzkartoffel nicht produziert werden.

(4) Eine Kartoffelsorte gilt gegen einen oder mehrere Pathotypen des Erregers des Kartoffelkrebses als resistent, wenn in einer amtlichen Prüfung festgestellt worden ist, daß nach einem Befall durch diesen Erreger keine Neuinfektionen auftreten.

(5) Wenn Personen die in Abs. 1 bis 3 enthaltenen Vorschriften außer acht lassen, hat die Bezirksverwaltungsbehörde die zur umgehenden Herstellung des den Vorschriften entsprechenden Zustandes erforderlichen Vorkehrungen dem Verpflichteten durch Bescheid aufzutragen oder bei Gefahr im Verzug unmittelbar anzuordnen

und nötigenfalls gegen Ersatz der Kosten durch den Verpflichteten durchführen zu lassen.

(6) Eine Untersuchung oder Prüfung gilt als amtlich, wenn sie von hiezu befähigten Anstalten des Bundes oder der Länder durchgeführt wurde.

## § 5 Ausnahmen

(1) Die Landesregierung kann für wissenschaftliche Untersuchungen und Versuche sowie für Züchtungsvorhaben Ausnahmen von den im § 4 Abs. 1 bis 3 genannten Maßnahmen — erforderlichenfalls unter entsprechenden Auflagen — zulassen, soweit hiedurch die Bekämpfung des Erregers des Kartoffelkrebses nicht beeinträchtigt wird und keine Gefahr seiner Verschleppung entsteht.

(2) Die Landesregierung hat die Einhaltung eines Bescheides nach Abs. 1 einschließlich darin vorgeschriebener Auflagen mindestens einmal jährlich zu überprüfen.

## § 6 Züchtungs-, Haltungs- und Manipulationsverbot

Das Züchten und Halten des Erregers des Kartoffelkrebses sowie das Arbeiten mit diesem Schadorganismus ist unbeschadet des § 15 Abs. 2 und 3 des O.ö. Kulturpflanzenschutzgesetzes verboten.

## § 7 Schlußbestimmungen

(1) Diese Verordnung tritt mit dem der Kundmachung im Landesgesetzblatt für Oberösterreich folgenden Tag in Kraft. Gleichzeitig tritt die Verordnung der o.ö. Landesregierung vom 16. August 1956 über die Bekämpfung des Kartoffelkrebses, LGBl.Nr. 32/1956, außer Kraft.

(2) Durch diese Verordnung wird die Richtlinie 69/464/EWG des Rates vom 8. Dezember 1969 zur Bekämpfung des Kartoffelkrebses (ABl.Nr. L 323 vom 24.12.1969, S. 1) umgesetzt.

Für die o.ö. Landesregierung:

**Hofinger**  
Landesrat

## Nr. 124 Verordnung der o.ö. Landesregierung vom 15. September 1997 zur Bekämpfung der Kartoffelnematoden

Auf Grund des § 16 des O.ö. Kulturpflanzenschutzgesetzes, LGBl.Nr. 37/1951, in der Fassung des Landesgesetzes LGBl.Nr. 10/1955 wird verordnet:

## § 1 Zweck

Diese Verordnung regelt die zur Feststellung, zur Verhinderung der Ausbreitung und zur Bekämpfung von Kartoffelnematoden (*Globodera rostochiensis* [Willenweber] Behrens und *Globodera pallida* [Stone] Behrens) gebotenen Maßnahmen.

## § 2 Begriffsbestimmungen

(1) Pflanzkartoffeln im Sinne dieser Verordnung sind Knollen oder Teile der Art *Solanum tuberosum* L., welche

zur Erzeugung von Kartoffeln zum Zwecke der Anpflanzung angebaut werden.

(2) Konsumkartoffeln im Sinne dieser Verordnung sind Knollen oder Teile der Art *Solanum tuberosum* L., welche für die Erzeugung von Kartoffeln für andere Zwecke als die der Saatgutvermehrung angebaut werden.

(3) Eine Kartoffelsorte ist im Sinne dieser Verordnung resistent gegen einen oder mehrere Pathotypen der Kartoffelnematoden, wenn in einer amtlichen Prüfung festgestellt worden ist, daß beim Anbau dieser Sorte die Population des betreffenden Pathotypen jährlich auf natürliche Weise zurückgeht.

(4) Eine Prüfung oder Untersuchung gilt im Sinne dieser Verordnung als amtlich, wenn sie von hiezu befähigten Anstalten des Bundes oder der Länder durchgeführt wurde.

### § 3

#### Anzeigepflicht

Das Auftreten und der begründete Verdacht des Auftretens von Kartoffelnematoden im Boden, an Pflanzen oder Knollen ist vom Bewirtschafter (Eigentümer, Fruchtnießer, Pächter, sonstiger Bewirtschafter) des betroffenen Grundstückes unverzüglich der Bezirksverwaltungsbehörde anzuzeigen.

### § 4

#### Befallsgebiet

(1) Wird auf einer Anbaufläche ein Auftreten von Kartoffelnematoden festgestellt, hat die Bezirksverwaltungsbehörde die befallene Fläche abzugrenzen (Befallsgebiet).

(2) Eine Anbaufläche gilt als befallen, wenn an mindestens einer Pflanze, einer Kartoffelknolle oder einer Bodenprobe dieser Fläche Kartoffelnematoden festgestellt werden.

(3) Die Bezirksverwaltungsbehörde hat die Erklärung zum Befallsgebiet erst dann aufzuheben, wenn eine frühestens zu Beginn der Anbausaison des Folgejahres vorgenommene amtliche Bodenuntersuchung zu keinem Befallsnachweis führt.

### § 5

#### Pflanzkartoffelanbau

Vor dem Anbau von Pflanzkartoffeln hat der Bewirtschafter (Eigentümer, Fruchtnießer, Pächter, sonstiger Bewirtschafter) des betroffenen Grundstückes durch eine amtliche Bodenuntersuchung feststellen zu lassen, daß die vorgesehene Anbaufläche keinen Befall mit Kartoffelnematoden aufweist. Diese Bodenuntersuchung darf höchstens zwei Vegetationsperioden zurückliegen. Während dieses Zeitraumes sind die Flächen frei von Wirtspflanzen der Kartoffelnematoden zu halten. Wirtspflanzen sind Kartoffeln, Tomaten (*Lycopersicon esculentum*), Auberginen (*Solanum melongena*) und andere — auch wildwachsende — Nachtschattengewächse (*Solanum*-Arten).

### § 6

#### Schutzmaßnahmen

(1) In einem Befallsgebiet dürfen

1. keine Kartoffeln, Tomaten (*Lycopersicon esculentum*), Auberginen (*Solanum melongena*) oder andere Nachtschattengewächse (*Solanum*-Arten) angebaut sowie

2. keine zur Anpflanzung auf anderen Flächen bestimmte Pflanzen angebaut, eingeschlagen oder gelagert werden.

(2) In einem Befallsgebiet haben die Bewirtschafter (Eigentümer, Fruchtnießer, Pächter, sonstige Bewirtschafter) des betroffenen Grundstückes wildwachsende Wirtspflanzen der Kartoffelnematoden mit dem Ziel der Vernichtung zu bekämpfen.

(3) Wenn Personen die in Abs. 1 und 2 enthaltenen Vorschriften außer acht lassen, hat die Bezirksverwaltungsbehörde die zur umgehenden Herstellung des den Vorschriften entsprechenden Zustandes erforderlichen Vorkehrungen dem Verpflichteten durch Bescheid aufzutragen oder bei Gefahr im Verzug unmittelbar anzuordnen und nötigenfalls gegen Ersatz der Kosten durch den Verpflichteten durchführen zu lassen.

### § 7

#### Ausnahmen

(1) Die Landesregierung kann für wissenschaftliche Untersuchungen und Versuche sowie Züchtungsvorhaben Ausnahmen von den im § 6 Abs. 1 und 2 genannten Maßnahmen — erforderlichenfalls unter entsprechenden Auflagen — zulassen.

(2) Abweichend vom Verbot des § 6 Abs. 1 Z. 1 dürfen in einem Befallsgebiet Konsumkartoffeln angebaut werden, sofern

1. diese gegen die auf den nematodenbefallenen Flächen vorhandenen Arten und Pathotypen von Kartoffelnematoden resistent sind oder
2. der Boden befallsmindernd entseucht wurde, wobei eine chemische Entseuchung mit zugelassenen Nematiziden nur erfolgen kann, wenn gleichzeitig nematodenresistente Kartoffelsorten angebaut werden.

(3) Durch die Ausnahmen gemäß Abs. 1 und 2 darf die Bekämpfung der Kartoffelnematoden nicht beeinträchtigt werden und keine Gefahr ihrer Verschleppung entstehen. Die Landesregierung hat die Einhaltung eines Bescheides nach Abs. 1 einschließlich darin vorgeschriebener Auflagen mindestens einmal jährlich zu überprüfen.

### § 8

#### Züchtungs-, Haltungs- und Manipulationsverbot

Das Züchten und Halten von Kartoffelnematoden sowie das Arbeiten mit diesen Schadorganismen ist unbeschadet des § 15 Abs. 2 und 3 des O.ö. Kulturpflanzenschutzgesetzes verboten.

### § 9

#### Schlußbestimmungen

(1) Diese Verordnung tritt mit Ablauf des Tages ihrer Kundmachung im Landesgesetzblatt für Oberösterreich in Kraft.

(2) Durch diese Verordnung wird die Richtlinie 69/465/EWG des Rates vom 8. Dezember 1969 zur Bekämpfung des Kartoffelnematoden (ABI.Nr. L 323 vom 24.12.1969, S. 3) umgesetzt.

Für die o.ö. Landesregierung:

**Hofinger**  
Landesrat

**Nr. 125****Verordnung****der o.ö. Landesregierung vom 15. September 1997  
zur Bekämpfung der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel**

Auf Grund des § 16 des O.ö. Kulturpflanzenschutzgesetzes, LGBl.Nr. 37/1951, in der Fassung des Landesgesetzes LGBl.Nr. 10/1955 wird verordnet:

**§ 1****Zweck**

Diese Verordnung regelt die im Zusammenhang mit dem Auftreten der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel (Erreger: *Clavibacter michiganensis* [Smith] Davis et al. ssp. *sepedonicus* [Spieckermann et Kotthoff] Davis et al., nachfolgend Schadorganismus genannt) gebotenen Maßnahmen. Die Maßnahmen betreffen

1. die Ermittlung des Ausgangspunktes der Krankheit und die Feststellung ihrer Verbreitung,
2. die Verhinderung des Auftretens und der Ausbreitung sowie
3. bei Befall die Bekämpfung mit dem Ziel der Tilgung.

**§ 2****Überwachung**

(1) Die Landwirtschaftskammer für Oberösterreich als Pflanzenschutzstelle (§ 7 Abs. 1 des O.ö. Kulturpflanzenschutzgesetzes) hat systematische Erhebungen über das Auftreten des Schadorganismus an Kartoffelknollen und erforderlichenfalls Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.) durchzuführen.

(2) Im Fall von Kartoffelknollen werden für diese Erhebungen Proben von Pflanzkartoffeln und anderen Kartoffeln, vorzugsweise aus eingelagerten Partien, entnommen und nach dem Verfahren des Anhangs I amtlichen Laboruntersuchungen zur Feststellung und Diagnose des Schadorganismus unterzogen. Zusätzlich kann gegebenenfalls eine amtliche Beschau nach Durchschneiden von Knollen aus anderen Proben vorgenommen werden.

(3) Im Fall von Kartoffelpflanzen werden diese Erhebungen nach geeigneten Verfahren durchgeführt und die Proben amtlichen Laboruntersuchungen unterzogen.

(4) Anzahl, Herkunft und Zusammensetzung der Proben und der Entnahmekzeitpunkt werden von der Landwirtschaftskammer für Oberösterreich im Sinne der Richtlinie 77/93/EWG nach anerkannten wissenschaftlichen und statistischen Grundsätzen und nach Maßgabe der Biologie des Schadorganismus sowie unter Berücksichtigung der Kartoffelerzeugungssysteme des Landes festgelegt.

(5) Die Landesregierung ist mindestens einmal jährlich bis zum 31. März des Folgejahres über die Ergebnisse der im Abs. 1 genannten Erhebungen einschließlich der Einzelheiten der Beprobung gemäß Abs. 4 zu unterrichten.

**§ 3****Anzeigepflicht**

Das Auftreten und jeglicher Verdacht des Auftretens des Schadorganismus an Kartoffelpflanzen oder Kartoffelknollen ist vom Inhaber (Eigentümer, Fruchtnießer, Pächter, sonstiger Inhaber) unverzüglich der Bezirksverwaltungsbehörde anzuzeigen.

**§ 4****Maßnahmen bei Verdacht des Auftretens**

(1) Bei Verdacht des Auftretens des Schadorganismus hat die Behörde amtliche Laboruntersuchungen nach den Verfahren der Anhänge I und II Z. 1 zu veranlassen. Bei Bestätigung gelten die Vorschriften gemäß Anhang II Z. 2.

(2) Werden bei einer Untersuchung gemäß Abs. 1 verdächtige sichtbare Symptome der Krankheit diagnostiziert oder ist ein Immunfluoreszenztest gemäß Anhang I oder ein anderer geeigneter Test positiv ausgefallen, hat die Behörde bis zur Abklärung des Verdachts

1. die Verbringung aller Partien oder Sendungen zu verbieten, aus denen die Proben entnommen worden sind, es sei denn, die Verbringung erfolgt unter ihrer Überwachung und es ist nachgewiesen worden, daß keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht,
2. Schritte zu unternehmen, um den Ursprung des vermuteten Befalls festzustellen,
3. auf der Grundlage einer Risikoeinschätzung weitere angemessene Vorsichtsmaßnahmen zu treffen, um eine Verschleppung des Schadorganismus zu verhindern; hiezu gehört unter Umständen auch die amtliche Kontrolle der Verbringung aller sonstigen Knollen oder Pflanzen innerhalb von oder aus Betrieben, die mit dem vermuteten Auftreten in Zusammenhang stehen.

**§ 5****Kontaminationserklärung; Sicherheitszone**

Wird bei amtlichen Laboruntersuchungen, die nach dem Verfahren des Anhangs I durchgeführt werden, der Verdacht auf ein Vorhandensein des Schadorganismus in einer Probe von Knollen, Pflanzen oder Pflanzenteilen bestätigt, hat die Behörde unter Berücksichtigung anerkannter wissenschaftlicher Grundsätze, der Biologie des Schadorganismus und der besonderen Produktions-, Vermarktungs- und Verarbeitungssysteme des Landes

1. die Knollen oder Pflanzen, die Partie und/oder Sendung, die Geräte, Fahrzeuge, Schiffe, Lagerräume oder Teile davon und alle anderen Gegenstände einschließlich Verpackungsmaterial, aus denen die Probe entnommen wurde, sowie gegebenenfalls den(die) Produktionsort(e) und die Anbaufläche(n), in denen die Knollen oder Pflanzen geerntet wurden, für kontaminiert zu erklären; eine Partie und/oder Sendung, ein Gerät, ein Fahrzeug usw. gilt als kontaminiert, wenn der Schadorganismus an einer einzigen Kartoffelpflanze oder Kartoffelknolle nachgewiesen wird;
2. das Ausmaß der wahrscheinlichen, durch Kontakt vor oder nach der Ernte oder durch produktionstechnische Berührungspunkte hervorgerufenen Kontamination unter Berücksichtigung von Anhang III Z. 1 zu bestimmen und
3. auf der Grundlage der Kontaminationserklärung gemäß Z. 1, der Bestimmung des Ausmaßes der wahrscheinlichen Kontamination gemäß Z. 2 und der möglichen Ausbreitung des Schadorganismus eine Sicherheitszone unter Berücksichtigung von Anhang III Z. 2 abzugrenzen.

**§ 6****Feststellung des Ausgangspunktes**

(1) Für den Fall, daß Knollen oder Pflanzen gemäß § 5 Z. 1 für kontaminiert erklärt worden sind, hat die Behörde

zu veranlassen, daß der Kartoffelbestand, der mit dem befallenen Bestand klonal verbunden ist, gemäß § 4 Abs. 1 untersucht wird. Die Untersuchungen werden vorzugsweise nach Risikograd vorgenommen und erfassen so viele Knollen oder Pflanzen, wie nötig sind, um den wahrscheinlichen Ausgangspunkt und das Ausmaß der wahrscheinlichen Kontamination festzustellen.

(2) Je nach Untersuchungsergebnis hat die Behörde gemäß § 5 Z. 1, 2 und 3 gegebenenfalls eine weitere Kontaminationserklärung vorzunehmen, das Ausmaß der wahrscheinlichen Kontamination neu zu bestimmen und die Sicherheitszone neu abzugrenzen.

## § 7

### Schutzmaßnahmen

(1) Knollen oder Pflanzen, die gemäß § 5 Z. 1 für kontaminiert erklärt worden sind, dürfen nicht angebaut werden und sind unter Kontrolle der Landwirtschaftskammer für Oberösterreich als Pflanzenschutzstelle

— entweder zu vernichten oder

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

(2) Knollen oder Pflanzen, die gemäß § 5 Z. 2 für wahrscheinlich kontaminiert erklärt worden sind, dürfen nicht angebaut werden und sind unbeschadet der Ergebnisse der im § 6 genannten Untersuchung von klonal verbundenen Beständen unter Kontrolle der Landwirtschaftskammer für Oberösterreich als Pflanzenschutzstelle einer geeigneten Verwendung oder Behandlung gemäß Anhang IV Z. 2 zuzuführen, sofern nachweislich keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht.

(3) Geräte, Fahrzeuge, Schiffe, Lagerräume oder Teile davon und alle anderen Gegenstände einschließlich Verpackungsmaterial, die gemäß § 5 Z. 1 für kontaminiert oder gemäß Z. 2 für wahrscheinlich kontaminiert erklärt worden sind, sind entweder zu vernichten oder nach geeigneten Verfahren gemäß Anhang IV Z. 3 zu reinigen und zu desinfizieren. Nach der Desinfizierung gelten diese Gegenstände als nicht mehr kontaminiert.

(4) Unbeschadet der in Abs. 1 bis 3 genannten Maßnahmen gilt für die Sicherheitszone (§ 5 Z. 3) das Maßnahmenpaket gemäß Anhang IV Z. 4.

(5) Wenn Personen die in Abs. 1 bis 4 enthaltenen Vorschriften außer acht lassen, hat die Bezirksverwaltungsbehörde die zur umgehenden Herstellung des den Vorschriften entsprechenden Zustandes erforderlichen Vorkehrungen dem Verpflichteten durch Bescheid aufzutragen oder bei Gefahr im Verzug unmittelbar anzuordnen und nötigenfalls gegen Ersatz der Kosten durch den Verpflichteten durchführen zu lassen.

## § 8

### Zuständigkeit; amtliche Laboruntersuchungen

(1) Behörde im Sinne dieser Verordnung ist die Bezirksverwaltungsbehörde. Erstreckt sich eine Maßnahme über den Bereich eines Verwaltungsbezirkes hinaus, ist dies die Landesregierung.

(2) Eine Laboruntersuchung gilt als amtlich, wenn sie von hiezu befähigten Anstalten des Bundes oder der Länder durchgeführt wurde.

## § 9

### Ausnahmen

(1) Die Landesregierung kann für wissenschaftliche Untersuchungen und Versuche sowie Züchtungsvorhaben Ausnahmen von den in §§ 6 und 7 Abs. 1 bis 4 dieser Verordnung genannten Maßnahmen — erforderlichenfalls unter entsprechenden Auflagen — zulassen, soweit hiedurch die Bekämpfung des Schadorganismus nicht beeinträchtigt wird und keine Gefahr seiner Verschleppung entsteht.

(2) Die Landesregierung hat die Einhaltung eines Bescheides nach Abs. 1 einschließlich darin vorgeschriebener Auflagen mindestens einmal jährlich zu überprüfen.

## § 10

### Züchtungs-, Haltungs- und Manipulationsverbot

Das Züchten und Halten des Schadorganismus sowie das Arbeiten mit diesem ist unbeschadet des § 15 Abs. 2 und 3 des O.ö. Kulturpflanzenschutzgesetzes verboten.

## § 11

### Berichte der Landesregierung

(1) Die Landesregierung übermittelt dem Bundesminister für Land- und Forstwirtschaft einmal jährlich — bis zum 30. April des Jahres hinsichtlich des vorangegangenen Jahres —

1. die Ergebnisse der Untersuchungen, die gemäß § 2 durchgeführt wurden;
2. die Einzelheiten betreffend die Anzahl, Herkunft und Zusammensetzung der Proben, die gemäß § 2 untersucht wurden;
3. die Einzelheiten über die gemäß Anhang IV Z. 4.2 durchgeführten Maßnahmen sowie die Registriernummern der Erzeugerbetriebe, der gemeinsamen Lagerhäuser und Versandzentren in der Sicherheitszone.

(2) Die Landesregierung unterrichtet den Bundesminister für Land- und Forstwirtschaft unverzüglich über

1. jedes bestätigte Auftreten des Schadorganismus gemäß § 5 Z. 1,
2. die Einzelheiten der Abgrenzung von Sicherheitszonen gemäß § 5 Z. 3,
3. alle anderen Einzelheiten gemäß Anhang III Z. 3 und
4. die Maßnahmen gemäß Anhang IV Z. 1 zweiter Gedankenstrich.

## § 12

### Schlußbestimmungen

(1) Diese Verordnung tritt nach Ablauf des Tages ihrer Kundmachung im Landesgesetzblatt für Oberösterreich in Kraft.

(2) Durch diese Verordnung wird die Richtlinie 93/85/EWG des Rates vom 4. Oktober 1993 zur Bekämpfung der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel (ABI.Nr. L 259 vom 18.10.1993, S. 1) umgesetzt.

Für die o.ö. Landesregierung:

**Hofinger**  
Landesrat

**Anhänge I—IV**

## Anhang I

### VERFAHREN ZUR ERMITTLUNG UND IDENTIFIZIERUNG DES RINGFÄULE-BAKTERIUMS *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (SMITH) DAVIS ET AL. SSP. *SEPEDONICUS* (SPIEKERMANN ET KOTTHOFF) DAVIS ET AL. IN EINHEITEN VON KARTOFFELKNOLLEN

#### 1. Entnahme von Gewebeproben am Nabelende

- 1.1 200 Knollen unter fließendem Leitungswasser waschen; sodann mit einem ordnungsgemäß desinfizierten Skalpell oder Kartoffelschäler die Epidermis um das Nabelende jeder Knolle entfernen; die Desinfektion kann durch Eintauchen des Kartoffelschälers in 70%iges Äthanol und durch Abflammen erfolgen.
- 1.2 Mit einem Messer oder einem Kartoffelschäler sorgfältig kegelförmige Gewebestücke aus den Nabelenden herausschneiden. Dabei ist darauf zu achten, daß vor allem vaskuläres Gewebe erfaßt wird. Die Nabelenden sollten, sobald sie entfernt sind, innerhalb von 24 Stunden verarbeitet (Abschnitt 3) oder höchstens 2 Wochen lang bei -20 °C aufbewahrt werden.

#### 2. Visuelle Prüfung der Ringfäulesymptome

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

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

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

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

- 3.1 Die Nabelenden werden unterhalb 30 °C gerade bis zur vollständigen Mazerierung homogenisiert. Die Mazeration kann mit Hilfe eines für *Corynebacterium sepedonicum*

nichttoxischen Verdünnungsmittels erzielt werden (z.B. 0,05 M phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,0); die Zugabe eines nichttoxischen Verflüssigungsmittels ist anzuraten, und es kann sich als notwendig erweisen, ein nichttoxisches Schaumverhütungsmittel zu verwenden (Anlagen 1 und 2).

Eine zu starke Mazeration sollte vermieden werden.

- 3.2 Die Bakterien werden durch eines der folgenden Verfahren <sup>(1)</sup> aus dem Homogenat extrahiert:
- A
    - a) Bei höchstens 180 g 10 Minuten lang zentrifugieren.
    - b) Den Überstand bei höchstens 4 000 g 10 Minuten lang zentrifugieren. Den Überstand abgießen und entfernen.
  - B
    - a) Das Mazerat 30 Minuten lang stehen lassen, damit die Gewebestücke sich absetzen können. Den Überstand abgießen, ohne daß der Satz aufgerührt wird.
    - b) Den Überstand durch Filterpapier (Whatman Nr. 1) in einen gesinterten Glasfilter (Nr.2 = 40 bis 100 µm) unter Verwendung einer Wasservakuumpumpe filtrieren. Das Filtrat in einem Zentrifugenröhrchen sammeln. Den Filter mit sterilem PBS bis auf ein Filtratvolumen von maximal 35 ml spülen.
    - c) Das Filtrat bei höchstens 4 000 g 20 Minuten lang zentrifugieren.
- 3.3 Das Pellet in sterilem 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,2 (Anlage 2) suspendieren, so daß ein Gesamtvolumen von etwa 1 ml erreicht wird. In zwei gleiche Teile teilen und einen Teil nach Einfrieren auf -20 °C <sup>(2)</sup> oder nach Gefriertrocknung zu Referenzzwecken aufbewahren. Den anderen Teil in zwei Hälften teilen, deren eine für den IF-Test und die Gram-Färbung und deren andere für den Eierfruchttest verwendet wird.
- 3.4 Alle positiven *C.-sepedonicum*-Kontrollen und -proben müssen unbedingt getrennt behandelt werden, damit eine Kontamination vermieden wird. Dies gilt für IF-Objektträger und Eierfruchttests.

#### 4. Gram-Färbung

- 4.1 Gram-Färbetests für alle Pellet-Verdünnungen (Abschnitt 5.2.1) sowie für alle aufgeschnittenen Knollen (Abschnitt 2), die Glasigkeit, Fäulnis oder andere verdächtige Symptome aufweisen, zubereiten. Die Proben sollten vom Rande der erkrankten Gewebe genommen werden.
- 4.2 Gram-Färbetests für bekannte *C.-sepedonicum*-Kulturen und, wenn möglich, für natürlich infiziertes Gewebe zubereiten (Abschnitt 5.1).
- 4.3 Bestimmen, welche Proben typische Gram-positive coryneforme Zellen enthalten. Im allgemeinen sind *C.-sepedonicum*-Zellen 0,8 bis 1,2 µm lang und 0,4 bis 0,6 µm breit.

Ein geeignetes Färbungsverfahren wird in Anlage 3 gegeben.

- <sup>(1)</sup> Ein alternatives Gewinnungsverfahren wird von Dinesen, 1984, angegeben.
- <sup>(2)</sup> Es gibt Anzeichen dafür (Janse und Van Vaerenberg, 1987), daß das Einfrieren die Lebensfähigkeit von *Corynebacterium sepedonicum* verringert. Mit einer Suspension des Pellets in 10%igem Glycerin läßt sich dieses Problem lösen.

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

## 5. Schema für den IF-Test

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

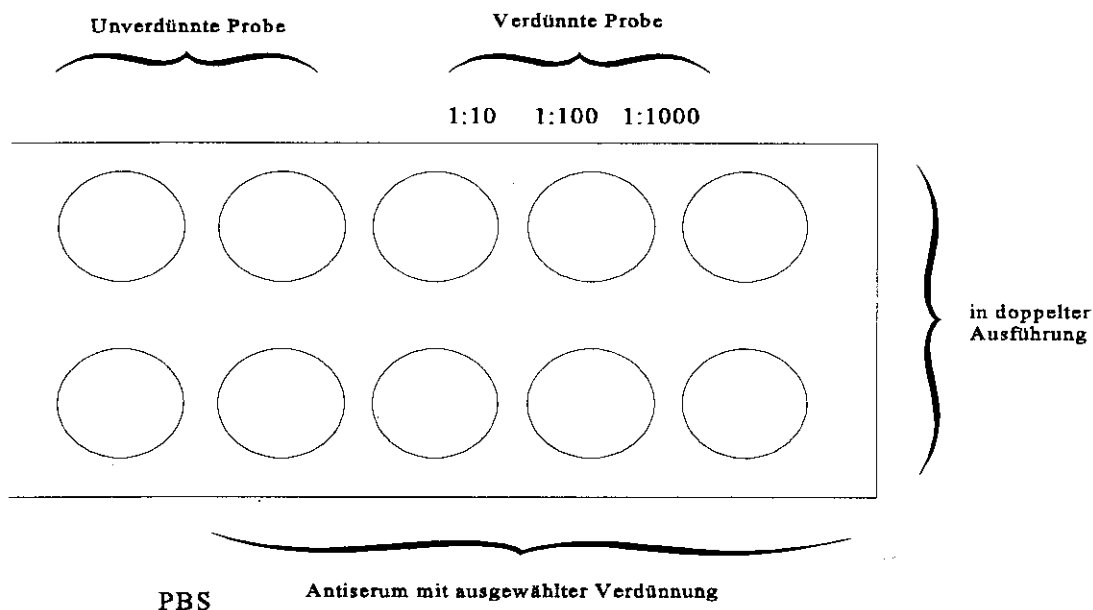
## 5.2 Verfahren

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

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

Abbildung 1

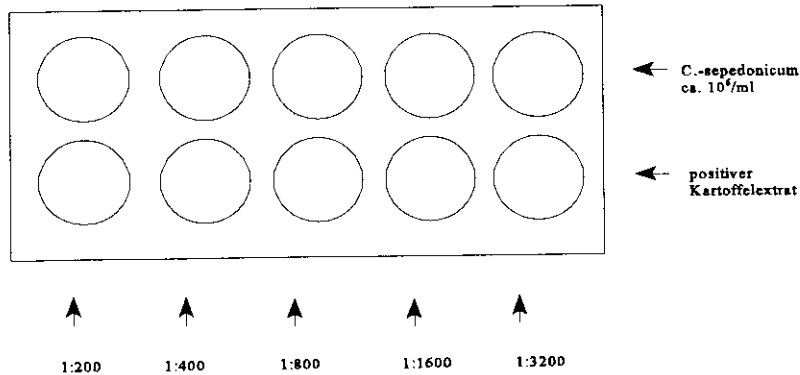
Objektträger für Proben und PBS-Kontrolle





## Abbildung 2

## Positiver Kontrollobjektträger



## Antiserumverdünnung

- 5.2.3 Bei etwa 37 °C lufttrocknen lassen und mit 95%igem Äthanol oder durch Abflammen fixieren.
- 5.2.4 Die entsprechenden Felder mit *C.-sepedonicum*-Antiserum in den empfohlenen Verdünnungen (0,01 M PBS pH 7,2; Anlage 2), wie in Abbildung 1 gezeigt, bedecken. (PBS auch für die FITC-Kontrolle verwenden.) Die zur Arbeit verwendete Verdünnung des Antiserums sollte etwa halb so groß wie der IF-Titer sein. Sollen andere Antiserum-Verdünnungen einbezogen werden, so sollten gesonderte Objektträger für jede zu verwendende Verdünnung vorbereitet werden.
- 5.2.5 Objektträger in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur 30 Minuten lang bebrüten.
- 5.2.6 Sorgfältig mit 0,01 M PBS pH 7,2 spülen. Dreimal jeweils fünf Minuten lang mit 0,01 M PBS pH 7,2 waschen.
- 5.2.7 Sorgfältig die überschüssige Flüssigkeit entfernen.
- 5.2.8 Jedes Feld mit FITC-Konjugat in derselben Verdünnung bedecken, die verwendet wurde, um den Titer zu bestimmen, und in einer dunklen feuchten Kammer bei Raumtemperatur 30 Minuten lang bebrüten.
- 5.2.9 Spülen und waschen wie oben.
- 5.2.10 Etwa 5 bis 10 µl 0,1 M phosphatgepuffertes Glycerin pH 7,6 (oder ein ähnliches Einbettungsmittel mit einem pH-Wert von nicht weniger als 7,6) auf jedes Feld applizieren und mit einem Deckglas abdecken (Anlage 2).

- 5.2.11 Mit einem Mikroskop prüfen, das mit einer epifluoreszenten Lichtquelle und für die Arbeit mit FITC-geeigneten Filtern ausgerüstet ist. Eine 400- bis 1000-fache Vergrößerung ist angemessen. Jedes Feld in zwei rechtwinklig zueinanderstehenden Durchmessern sowie am Feldrand entlang mikroskopisch untersuchen.

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

Beim Immunfluoreszenz-Test ergeben sich mehrere Probleme:

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

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

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

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

Der Eierfruchttest ist nicht erforderlich.

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

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

## 6. Eierfruchttest

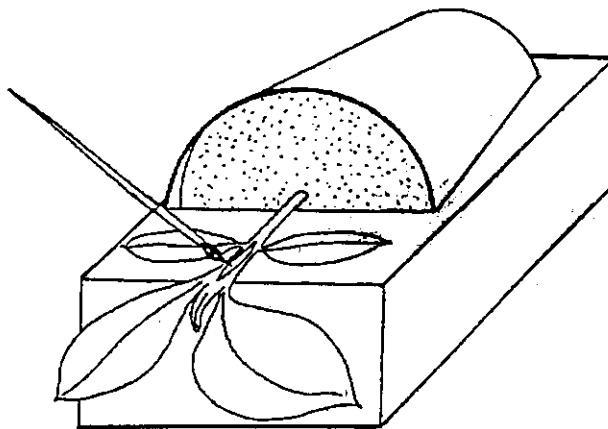
Zu den Einzelheiten der Kultur siehe Anlage 5.

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

## 6.2 *Schlitzinokulation I*

- 6.2.1 Töpfe waagrecht fixieren (Block aus expandiertem Polystrol mit einer ca. 5 cm tiefen, 10 cm breiten und 15 cm langen Aushöhlung aus der Oberfläche (Abbildung 3), reicht für einen 10-cm-Topf aus). Ein Streifen steriler Aluminiumfolie sollte zwischen dem Stengel und dem Block für jede getestete Probe plaziert werden. Die Eierfrucht kann durch ein um den Block geschlungenes Gummiband festgehalten werden.
- 6.2.2 Mit einem Skalpell wird zwischen den Keimblättern und dem ersten Blatt ein 0,5 bis 1,0 cm langer und etwa drei Viertel des Stengeldurchmessers tiefer Längsschnitt oder leicht diagonalen Schnitt durchgeführt.
- 6.2.3 Den Schlitz mit der Spitze der Skalpellschneide offenhalten und den Impfstoff mit einem - mit dem Pellet behafteten - feinen Pinsel in den Schlitz hineinstreichen. Den Rest des Pellets auf die Eierfrüchte verteilen.
- 6.2.4 Schnitt mit steriler Vaseline aus einem 2-ml-Spritzenzylinder versiegeln.

*Abbildung 3*



## 6.3 *Schlitzinokulation II*

- 6.3.1 Die Eierfrucht zwischen zwei Fingern halten, einen Tropfen (etwa 5 bis 10  $\mu$ l) des suspendierten Pellets auf den Stengel zwischen den Keimblättern und dem ersten Blatt pipettieren.
- 6.3.2 Mit einem sterilen Skalpell von dem Pellettropfen aus diagonal (in einem Winkel von etwa 5°) einen 1,0 cm langen und etwa zwei Drittel der Stengeldicke tiefen Schlitz schneiden.
- 6.3.3 Den Schnitt mit steriler Vaseline aus einem Spritzenzylinder versiegeln.
- ## 6.4 *Spritzenimpfung*
- 6.4.1 Eierfrüchte einen Tag vor der Impfung nicht wässern, damit der Turgor verringert wird.

- 6.4.2 Mit einer Spritze, die mit einer hypodermischen Nadel (nicht weniger als 23 G) versehen ist, die Stengel der Eierfrucht direkt über den Keimblättern beimpfen. Das Pellet auf die Eierfrüchte verteilen.
- 6.5 25 Eierfrüchte mit einer bekannten *C. sepedonicum*-Kultur beimpfen und, soweit möglich, aus natürlich infiziertem Knollengewebe (Abschnitt 5.1) nach derselben Inokulationsmethode (Abschnitt 6.2, 6.3 oder 6.4) beimpfen.
- 6.6 25 Eierfrüchte mit sterilem 0,05 M PBS nach derselben Impfmethode (Abschnitt 6.2, 6.3 oder 6.4) beimpfen.
- 6.7 Die Eierfrüchte unter geeigneten Bedingungen (Anlage 5) 40 Tage lang inkubieren. Nach 8 Tagen regelmäßig auf Symptome prüfen. Die Anzahl der Eierfrüchte mit Symptomen zählen. *C. sepedonicum* verursacht ein Welken der Eierfruchtblätter, das mit einer Schlaffheit der Blätter an den Rändern oder zwischen den Blattnerven beginnen kann. Welkes Gewebe kann zunächst dunkelgrün oder gesprenkelt aussehen, wird aber dann, bevor es nekrotisch wird, blasser. Welche Stellen zwischen den Blattnerven haben häufig ein schmieriges, wassergetränktes Aussehen. Nekrotisches Gewebe hat oft einen hellgelben Rand. Die Eierfrüchte sterben nicht unbedingt ab; je länger es dauert, bis die Symptome auftreten, desto größer ist die Überlebenschance. Die Eierfrüchte können die Infektion überstehen. Anfällige junge Eierfrüchte sind gegenüber niedrigen Populationen vom *C. sepedonicum* empfindlicher als ältere Eierfrüchte; deshalb sollten Eierfrüchte im oder gerade vor dem Blattstadium 3 verwendet werden.

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

- 6.8 Eine Gram-Färbung (Abschnitt 4) von allen Einheiten aus Eierfrüchten mit Symptomen zubereiten, Teile verwelkten Blattgewebes und Stengelgewebes von Eierfrüchten voneinander isoliert auf entsprechende Nährmedien bringen (Abschnitt 7). Eine Oberflächendesinfektion der Eierfruchtblätter und -stengel durch Abreiben mit 70%igem Äthanol vornehmen.
- 6.9 Unter bestimmten Umständen - insbesondere dann, wenn die Wachstumsbedingungen nicht optimal sind - kann es vorkommen, daß *C. sepedonicum* als latente Infektion selbst nach einer Bebrütung von 40 Tagen innerhalb der Eierfrüchte weiterbesteht. Derartige Infektionen können bei den geimpften Eierfrüchten möglicherweise zu einer Verkümmerng und zu Wachstumsschwäche führen. Erweist sich der IF-Test als positiv, so kann es erforderlich sein, den Test fortzusetzen. Es ist daher wesentlich, die Wachstumsgeschwindigkeit aller Eierfruchttestpflanzen mit den mit sterilem 0,05 M PBS beimpften Kontrollproben zu vergleichen und die Umweltbedingungen des Treibhauses zu beobachten.

Für die Fortsetzung des Tests wird folgendes empfohlen:

- 6.9.1 Die Stengel oberhalb der Impfstelle abschneiden und die Blätter entfernen.
- 6.9.2 Die Stengel - wie in den Abschnitten 3.1 und 3.2 beschrieben - in 0,05 M PBS pH 7,0 mazerieren.
- 6.9.3 Mit dem halben Pellet eine Gram-Färbung (Abschnitt 4) und einen IF-Test (Abschnitt 5) durchführen.
- 6.9.4 Mit der anderen Hälfte einen erneuten Eierfruchttest (Abschnitt 6) durchführen, wenn die Gram-Färbung und/oder die IF-Tests positiv sind. Eine bekannte *C.-sepedonicum*-Kultur und sterile 0,05 M PBS Kontrollen verwenden. Werden in dem anschließenden Test keine Symptome beobachtet, muß die Probe als negativ angesehen werden.

## 7. Isolierung von *C. sepedonicum*

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

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

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

Dextrose-Nähragar (nur für Weiterkultur),  
Hefe-Pepton-Glukose-Agar,  
Hefe-Dextrose-Nähragar,  
Hefeextrakt-Mineral Salz-Agar.

Bis zu 20 Tagen bei 21 °C bebrüten.

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

Wiederausstreichen, um Reinkultur herzustellen.

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

### *Identifizierung*

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

IF-Test (Abschnitt 5.1),

Eierfruchttest,

Nähr- und physiologische Tests (Anlage 7):

- Oxidations-/Fermentationstest (O/F),
- Oxidasetest,
- Wachstum bei 37 °C,
- Ureaseproduktion,
- Aesculinhydrolyse,
- Stärkehydrolyse,
- Toleranz von 7%iger Kochsalzlösung,
- Indoltest,
- Katalasetest,
- H<sub>2</sub>S-Produktion,
- Citratverwendung,
- Gelatinehydrolyse,
- Säure von Glycerin, Lactose, Rhamnose und Salizin,
- Gram-Färbung.

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

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

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

| Test                              | <i>C. sepedonicum</i>                 |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| O/F                               | Inert oder schwach oxidierend wirkend |
| Oxidase                           | -                                     |
| Katalase                          | +                                     |
| Nitratreduktion                   | -                                     |
| Ureaseaktivität                   | -                                     |
| H <sub>2</sub> S-Produktion       | -                                     |
| Indolproduktion                   | -                                     |
| Citratverwendung                  | -                                     |
| Stärkehydrolyse                   | - oder schwach                        |
| Wachstum bei 37 °C                | -                                     |
| Wachstum in 7%iger Kochsalzlösung | -                                     |
| Gelatinehydrolyse                 | -                                     |
| Aesculinhydrolyse                 | +                                     |
| Säure von:                        |                                       |
| - Glycerin                        | -                                     |
| - Lactose                         | - oder schwach                        |
| - Rhamnose                        | -                                     |
| - Salizin                         | -                                     |

## Anlage 1

**VON LELLIOTT UND SELLAR, 1976, EMPFOHLENE FORMULIERUNG FÜR DIE MAZERATIONSFLÜSSIGKEIT**

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

## Anlage 2

**PUFFER**

0,05 M phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,0

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

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Na <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  |
| Destilliertes Wasser auf         | 1 l    |

0,01 M phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,2

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

|  |       |
|--|-------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 12 H <sub>2</sub> O | 2,7 g |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 2 H <sub>2</sub> O  | 0,4 g |
| NaCl   | 8,0 g |
| Destilliertes Wasser auf                               | 1 l   |

0,1 M phosphatgepuffertes Glycerin pH 7,6

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

|  |        |
|--|--------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 12 H <sub>2</sub> O | 3,2 g  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 2H <sub>2</sub> O   | 0,15 g |
| Glycerin   | 50 ml  |
| Destilliertes Wasser                                   | 100 ml |



## Anlage 3

**GRAM-FÄRBEVERFAHREN (HUCKERS MODIFIZIERUNG) (DOETSCH, 1981)****Kristallviolett-Lösung**

2 g Kristallviolett in 20 ml 95%igem Äthanol auflösen.  
 0,8 g Ammoniumoxalat in 80 ml destilliertem Wasser auflösen.  
 Die beiden Lösungen mischen.

**Lugols Jodlösung**

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Jod                  | 1 g    |
| Kaliumjodid          | 2 g    |
| Destilliertes Wasser | 300 ml |

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

**Safranin-Gegenfärbelösung**

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Stammlösung:    |        |
| Safranin O      | 2,5 g  |
| 95%iges Äthanol | 100 ml |

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

**Färbeverfahren**

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

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

## Anlage 4

**BESTIMMUNG DER POPULATION VON IF-POSITIVEN ZELLEN**

Fläche eines Feldes eines Mehrfachobjektträgers

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

wobei D = Durchmesser des Gesamtfeldes.

Fläche des Objektivfeldes

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

wobei d = Durchmesser des Objektivfeldes.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Anlage 5

**EIERFRUCHTKULTUR**

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

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

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

Tageslänge: 14 Stunden oder natürliche Tageslänge, wenn größer;

Temperatur: am Tag: 21 bis 24 °C,

in der Nacht: 15 °C.

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

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

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

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

## Anlage 6

**MEDIEN FÜR DAS WACHSTUM UND DIE ISOLIERUNG VON C. SEPEDONICUM****Nähragar (NA)**

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

**Dextrose-Nähragar (NDA)**

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

**Hefe-Pepton-Glucose-Agar (YPGA)**

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

½ Litervolumen des Mediums 20 Minuten lang bei 115 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

**Medium aus Hefeextrakt und Mineralsalzen (YGM)**

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| Difco-Bacto-Hefeextrakt               | 2,0 g   |
| D(+)-Glucose (Monohydrat)             | 2,5 g   |
| K <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-Agar (gereinigt)          | 18 g    |
| Destilliertes Wasser                  | 1 l     |

½ Litervolumen des Mediums 20 Minuten lang bei 115 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

## Anlage 7

**NÄHRTESTS UND PHYSIOLOGISCHE TESTS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON C. SEPEDONICUM**

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

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

Basalmedium:

|  |        |
|--|--------|
| KCl  | 0,2 g  |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O         | 0,2 g  |
| NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1,0 g  |
| Difco-Bacto-Pepton                             | 1,0 g  |
| Difco-Bacto-Agar (gereinigt)                   | 3,0 g  |
| D( + )-Glucose (Monohydrat)                    | 10,0 g |
| Bromothymol blau                               | 0,03 g |
| Destilliertes Wasser                           | 1 l    |

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

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

Zehn Minuten lang bei 115°C durch Autoklavieren sterilisieren.

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

*Positive Reaktion:*

| Zylinder             | Farbe                    | Deutung                           |
|----------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| offen<br>geschlossen | gelb }<br>gelb }         | Gärung bewirkend                  |
| offen<br>geschlossen | gelb }<br>blaugrün }     | Oxidation bewirkend               |
| offen<br>geschlossen | grünlich }<br>blaugrün } | Oxidation bewirkend<br>oder inert |

- **Oxidasetest (Kovacs, 1956)**

Kovacs' Oxidase-Reagens:

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

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

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

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

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

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

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

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

- **Katalasetest**

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

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

- **Nitratreduktase-Aktivität von Denitrifizierung (Bradbury, 1970)**

Kulturmedium:

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| KNO <sub>3</sub> (nitritfrei)   | 1 g |
| Difco-Bacto-Hefeextrakt         | 1 g |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 5 g |
| Destilliertes Wasser            | 1 l |

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

**Reagens A:**

|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 8 g |
| 5N-Essigsäure                  | 1 l |

**Reagens B:**

|               |     |
|---------------|-----|
| Naphtylamin   | 5 g |
| 5N-Essigsäure | 1 l |

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

*Positive Reaktion:*

|   | Farbreaktion |           |
|---|--------------|-----------|
|   | Stadium 1    | Stadium 2 |
| Keine Reduktion von Nitrat  | farblos      | rot       |
| Reduktion von Nitrat bis zu Nitrit<br>(nur Nitratreduktase)                                     | rot          | -         |
| Reduktion von Nitrat über Nitrit hinaus<br>(Denitrifizierung- Nitrat- und Nitrit-<br>reduktase) | farblos      | farblos   |

**- Ureaseproduktion (Lelliott, 1966)**

Basismedium:

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| Oxoid-Harnstoff-Agarbasis (CM 53) | 2,4 g |
| Destilliertes Wasser              | 95 ml |

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

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

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

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

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

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

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

- **Hydrogensulphproduktion** (Ramamurthi, 1959)

Medium:

|                                 |      |
|---------------------------------|------|
| Difco-Bacto-Trypton (Nr. 0123)  | 10 g |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1 g  |
| NaCl                            | 5 g  |
| Destilliertes Wasser            | 1 l  |

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

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

*Positive Reaktion:* H<sub>2</sub>S-Produktion aus Trypton wird durch Entwicklung einer schwarz-braunen Färbung des Testpapiers angezeigt.

- **Indolproduktion** (Ramamurthi, 1959)

Medium:

Wie beim H<sub>2</sub>S-Test.

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

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

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

Medium:

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

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

15 Minuten lang bei 121 °C durch Autoklavieren sterilisieren. Impfen und bei 37 °C bebrüten.

*Positive Reaktion:* auf Wachstum achten.



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

Medium:

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

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

15 Minuten lang bei 121 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

*Positive Reaktion:* auf Wachstum achten.

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

Medium:

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

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

15 Minuten lang bei 121 °C durch Autoklavieren sterilisieren.

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

- **Stärkehydrolyse**

Medium:

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

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

Petrischalen ausgießen, punkt-inokulieren.

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

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

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

Medium:

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

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

Das Medium ist klar, fluoresziert aber bläulich.

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

## BIBLIOGRAPHIE

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

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

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

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

Janse J. D. and Van Vaerenbergh, J. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull. N° 17, 1987, pp. 1-10.

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

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

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

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

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

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

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

## ANHANG II

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

- falls möglich, alle Knollen oder Pflanzen der Stichprobe und
- der restliche Extrakt sowie alle zusätzlich für die Immunfluoreszenzanalyse vorbereiteten Objektträger

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

2. Bei Bestätigung des Auftretens des Schadorganismus sollten

- die unter Z. 1 genannten Materialien,
- eine Probe des durch Inokulation mit einem Knollen- oder Pflanzenextrakt infizierten Eierfruchtmaterials sowie
- die isolierte Erregerkultur

bis mindestens einen Monat nach Abschluß des Unterrichtsverfahrens gemäß Artikel 5 Absatz 2 der Richtlinie 93/85/EWG aufbewahrt und konserviert werden.

### ANHANG III

1. Die bei der Bestimmung des Ausmaßes der wahrscheinlichen Kontamination gemäß § 5 Z.2 zu berücksichtigenden Faktoren umfassen
  - Knollen oder Pflanzen, die an einem Erzeugungsort angebaut worden sind, der gemäß § 5 Z. 1 für kontaminiert erklärt wurde;
  - Erzeugungsorte oder Betriebe, die produktionstechnisch mit den gemäß § 5 Z.1 für kontaminiert erklärten Knollen oder Pflanzen in Berührung kommen, einschließlich Erzeugungsorte oder Betriebe, die Geräte und Anlagen über Maschinenringe oder einen gemeinsamen Subunternehmer gemeinsam nutzen;
  - Knollen oder Pflanzen, die an den Erzeugungsorten im Sinne des zweiten Gedankenstrichs erzeugt worden sind oder zu der Zeit an diesen Erzeugungsorten vorhanden waren, als sich auch die gemäß § 5 Z.1 für kontaminiert erklärten Knollen oder Pflanzen in den Betrieben oder Erzeugungsorten im Sinne des ersten Gedankenstrichs befanden;
  - Sammellager mit Kartoffeln aus vorgenannten Erzeugungsorten;
  - Geräte, Fahrzeuge, Schiffe, Lagerräume oder Teile davon und alle anderen Gegenstände einschließlich Verpackungsmaterial, die mit den gemäß § 5 Z.1 für kontaminiert erklärten Knollen oder Pflanzen im Verlauf der vorangegangenen zwölf Monate in Berührung gekommen sein können, oder soweit dies angebracht ist;
  - Knollen oder Pflanzen, die vor dem Reinigen und Desinfizieren der vorgenannten Räumlichkeiten oder Gegenstände darin gelagert worden bzw. damit in Berührung gekommen sind, und
  - als Ergebnis der Untersuchung nach § 6 Knollen oder Pflanzen, die klonal mit gemäß § 5 Z.1 für kontaminiert erklärten Knollen oder Pflanzen verbunden sind und bei denen die Untersuchungen auf eine wahrscheinliche Kontamination schließen lassen.
  
2. Die bei der Bestimmung der möglichen Ausbreitung gemäß § 5 Z.3 zu berücksichtigenden Faktoren umfassen
  - die Nähe anderer Erzeugungsorte, an denen Kartoffeln oder andere Wirtspflanzen angebaut werden;
  - die Einheitlichkeit der Pflanzkartoffelvorräte.
  
3. Die Einzelheiten der Unterrichtung gemäß § 11 Absatz 2 Z.3 umfassen
  - für jede für kontaminiert erklärte Kartoffelsendung oder -partie gegebenenfalls die in den Artikeln 7 und 8 der Richtlinie 77/93/EWG vorgeschriebenen Zeugnisse sowie die Paß- oder Registrierungsnummer;

- bei Pflanzkartoffelvorräten und, falls möglich, auch in allen anderen Fällen den Sortennamen;
- die für die Kontaminationserklärung und die Sicherheitszonenabgrenzung ausschlaggebenden Faktoren;
- Angaben über das Vorhandensein von Extrakt, vorbereiteten Objektträgern für die Immunfluoreszenzanalyse, infiziertem Eierpflanzenmaterial und einer isolierten Erregerkultur aus der Untersuchung, mit der das Auftreten des Schadorganismus bestätigt wurde.

## ANHANG IV

1. Als Maßnahmen im Sinne der in § 7 Absatz 1 genannten amtlich überwachten Maßnahmen zur Beseitigung von Knollen oder Pflanzen, die gemäß § 5 Z.1 für kontaminiert erklärt wurden, gelten
  - die Verwendung zur industriellen Verarbeitung, d.h. sofortige Lieferung auf direktem Wege an einen Verarbeitungsbetrieb mit angemessenen Abfallbeseitigungsanlagen, bei dem nachweislich keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht und der über ein System zur Desinfizierung der Lagerbereiche und der den Betrieb verlassenden Fahrzeuge verfügt;
  - andere Maßnahmen, sofern nachweislich keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht.
2. Bei der in § 7 Absatz 2 genannten geeigneten Verwendung oder Behandlung von gemäß § 5 Z.2 für wahrscheinlich kontaminiert erklärten Knollen oder Pflanzen, unter Überwachung seitens der zuständigen amtlichen Stellen, handelt es sich um
  - die Verwendung als Speise- oder Wirtschaftskartoffeln, die in Verpackungen zur unmittelbaren Lieferung und Verwendung ohne Umpacken aufgemacht und für eine solche unmittelbare Lieferung und Verwendung bestimmt sind;
  - die Verwendung als Speise- oder Wirtschaftskartoffeln für die industrielle Verarbeitung, die zur unmittelbaren und sofortigen Lieferung an einen Verarbeitungsbetrieb mit angemessenen Abfallbeseitigungsanlagen und Desinfektionseinrichtungen bestimmt sind;
  - eine andere Verwendung, sofern nachweislich keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht.
3. Als angemessene Verfahren zum Reinigen und Desinfizieren aller in § 7 Absatz 3 genannten Gegenstände gelten Verfahren, bei denen nachweislich keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht und die unter Aufsicht der Landwirtschaftskammer für Oberösterreich als Pflanzenschutzstelle angewendet werden.
4. Das in § 7 Absatz 4 genannte Maßnahmenpaket, das in der gemäß § 5 Z.3 abgegrenzten Sicherheitszone anzuwenden ist, umfaßt folgendes:
  - 4.1 In den gemäß § 5 Z.1 für kontaminiert erklärten Erzeugungsorten:
    - a) Bei einer gemäß § 5 Z.1 für kontaminiert erklärten Anbaufläche wird entweder wie folgt verfahren:
      - i) - Zumindestens in den drei auf das Jahr der Kontaminationserklärung folgenden Anbaujahren werden
        - Maßnahmen getroffen, um den Durchwuchs und andere natürliche Wirtspflanzen auszurotten, und
        - keine Kartoffelknollen, Kartoffelpflanzen, echte Kartoffelsaat oder andere, natürliche Wirtspflanzen oder Pflanzen, bei denen die

Gefahr besteht, daß der Schadorganismus überleben oder sich verbreiten kann, angebaut, bis sich die Anbaufläche in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Anbaujahren als frei von Durchwuchs erwiesen hat.

- In der ersten Kartoffelernteperiode, die auf den vorgenannten Zeitraum folgt, werden amtlich zertifizierte Pflanzkartoffeln ausschließlich für die Erzeugung von Speise- oder Wirtschaftskartoffeln angebaut, und es wird eine amtliche Erhebung gemäß § 2 Absatz 1 durchgeführt.
- In der Kartoffelernteperiode, die auf die im vorstehenden Gedankenstrich genannte Zeitspanne im Zuge einer geeigneten Fruchtfolge folgt, werden amtlich zertifizierte Pflanzkartoffeln entweder zur Pflanz- oder zur Speise- oder Wirtschaftskartoffelerzeugung angebaut und eine amtliche Erhebung gemäß § 2 Absatz 1 durchgeführt;

oder es wird wie folgt verfahren:

- ii) - Es werden in den vier auf das Jahr der Kontaminationserklärung folgenden Anbaujahren
    - Maßnahmen getroffen, um den Durchwuchs und andere natürliche Wirtspflanzen auszurotten, und
    - die Anbauflächen brachgelegt oder in Dauergrünland umgewandelt, das in jedem Jahr häufig kurz gemäht oder als Intensivweide genutzt und in diesem Zustand gehalten wird.
  - In der ersten Kartoffelernteperiode, die auf den im vorstehenden Gedankenstrich genannten Zeitraum folgt, werden amtlich zertifizierte Pflanzkartoffeln entweder zur Pflanz- oder zur Speise- oder Wirtschaftskartoffelerzeugung angebaut, und es wird eine amtliche Erhebung gemäß § 2 Absatz 1 durchgeführt.
- b) Für die anderen Anbauflächen gilt folgendes:
- In dem auf die Kontaminationserklärung folgenden Anbaujahr werden
    - entweder keine Kartoffelknollen, Kartoffelpflanzen oder echte Kartoffelsaat oder andere natürliche Wirtspflanzen angepflanzt bzw. gesät und gegebenenfalls Maßnahmen getroffen, um den Durchwuchs auszurotten,
    - amtlich zertifizierte Pflanzkartoffeln ausschließlich für die Speise- oder Wirtschaftskartoffelerzeugung angebaut, sofern sich die Behörde davon überzeugt hat, daß die Gefahr von Durchwuchs und anderen natürlichen Wirtspflanzen des Schadorganismus beseitigt ist.
  - Zumindest in den zwei auf das vorgenannte Anbaujahr folgenden Anbaujahren werden nur amtlich zertifizierte Pflanzkartoffeln entweder zur Pflanz- oder zur Speise- oder zur Wirtschaftskartoffelerzeugung angebaut.
  - In jedem der vorgenannten Anbaujahre werden Maßnahmen getroffen, um den Durchwuchs und natürliche Wirtspflanzen auszurotten, und amtliche Erhebungen gemäß § 2 Absatz 1 durchgeführt.
  - Werden auf diesen Anbauflächen in dem auf die Kontaminationserklärung folgenden Anbaujahr amtlich zertifizierte Pflanzkartoffeln zur Speise- oder Wirtschaftskartoffelerzeugung angebaut, so werden die Pflanzen zu geeigneter Zeit inspiziert und Durchwuchs auf den Erreger hin untersucht.

- c) In bezug auf die für kontaminiert erklärte(n) Anbaufläche(n) werden unmittelbar nach der Kontaminationserklärung gemäß § 5 Z.1 und in jedem folgenden Anbaujahr einschließlich der ersten zulässigen Kartoffelanbauperiode gemäß Buchstabe a alle Geräte und Lagerräume am Erzeugungsort, die zur Kartoffelerzeugung genutzt werden, gegebenenfalls nach geeigneten Verfahren gemäß Z.3 gereinigt und desinfiziert.
- d) In Produktionssystemen, bei denen das gesamte Nährsubstrat ausgetauscht werden kann,
- dürfen Knollen, Pflanzen oder echter Samen nur angepflanzt bzw. gesät werden, wenn die Produktionseinheit amtlich überwachten Maßnahmen unterworfen ist, um den Schadorganismus zu tilgen und das gesamte Kartoffel- oder sonstige Solanacea-Material zu entfernen - wobei zumindest auch das Kultursubstrat vollständig ausgetauscht wird und die Produktionseinheit und alle Geräte gereinigt und desinfiziert werden - und die Behörde die Kartoffelerzeugung anschließend wieder genehmigt hat, und
  - müssen die erzeugten Kartoffeln von amtlich zertifizierten Pflanzkartoffeln oder von Miniknollen oder Mikropflanzen aus erprobten Quellen stammen.

4.2. Innerhalb der abgegrenzten Sicherheitszone muß die Behörde unbeschadet der Maßnahmen gemäß Z. 4.1

- a) unmittelbar nach der Kontaminationserklärung und für mindestens drei Vegetationsperioden
- dafür sorgen, daß Betriebe, in denen Kartoffelknollen angebaut, gelagert oder behandelt werden, und Betriebe, die Maschinen mieten, überwacht werden;
  - vorschreiben, daß die Maschinen und Lagerräume in diesen Betrieben gegebenenfalls gemäß den in Z.3 genannten Verfahren gereinigt und desinfiziert werden;
  - vorschreiben, daß in dieser Zone ausschließlich zertifizierte Pflanzkartoffeln angebaut werden;
  - vorschreiben, daß geerntete Pflanzkartoffeln in allen Betrieben der Sicherheitszone von Speise- oder Wirtschaftskartoffeln getrennt gehalten werden;
  - eine amtliche Erhebung gemäß § 2 Absatz 1 veranlassen;
- b) gegebenenfalls ein Programm aufstellen, um alle Pflanzkartoffelbestände nach angemessener Zeit auszutauschen.