

I

(Πράξεις για την ισχύ των οποίων απαιτείται δημοσίευση)

ΟΔΗΓΙΑ 98/57/ΕΚ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ

της 20ής Ιουλίου 1998

για τον έλεγχο του *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

ΤΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ,

Έχοντας υπόψη:

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

την πρόταση της Επιτροπής⁽¹⁾,

τη γνώμη του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου⁽²⁾,

τη γνώμη της Οικονομικής και Κοινωνικής Επιτροπής⁽³⁾,

Εκτιμώντας:

ότι ο επιβλαβής οργανισμός *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. ήταν προηγουμένως γνωστός ως *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith· ότι, κατά πάσα πιθανότητα, το *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. θα καταστεί το γενικώς αποδεκτό όνομα του οργανισμού· ότι η παρούσα οδηγία θα πρέπει να λάβει υπόψη την επιστημονική αυτή εξέλιξη·

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

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

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

ότι ένας από τους επιβλαβείς για την πατάτα και την τομάτα οργανισμούς είναι το *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., δηλαδή ο παθογόνος παράγοντας της φαιάς σήψης της πατάτας και της βακτηριακής μαρανσης της τομάτας· ότι η ασθένεια αυτή έχει εκδηλωθεί σε τμήματα της Κοινότητας και ότι υπάρχουν ακόμη ορισμένες εστίες μόλυνσης, περιορισμένης έκτασης·

ότι η καλλιέργεια πατάτας και τομάτας σε ολόκληρη την Κοινότητα εκτίθεται σε σημαντικό κίνδυνο εάν δεν ληφθούν αποτελεσματικά μέτρα σχετικά με τις καλλιέργειες αυτές, για τον εντοπισμό του οργανισμού αυτού και τον προσδιορισμό του τρόπου εξάπλωσής του, την πρόληψη της εμφάνισής και της μετάδοσής του και, σε περίπτωση διαπίστωσής του, για την πρόληψη της μετάδοσής και την καταπολέμησή του με σκοπό την εξάλειψή του·

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

ότι στα μέτρα αυτά πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι είναι αναγκαία η διεξαγωγή επίσημων συστηματικών ερευνών για τον εντοπισμό του παθογόνου· ότι οι έρευνες αυτές θα πρέπει να περιλαμβάνουν διαδικασίες επιθεώρησης και, κατά περίπτωση, διαδικασίες δειγματοληψίας και δοκιμών, δεδομένου ότι, σε ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, η ασθένεια μπορεί να παραμένει λανθάνουσα και να μην ανιχνεύεται στην πατάτα κατά το διάστημα της βλάστησης ή μέσα στους αποθηκευμένους κονδύλους πατάτας· ότι η μετάδοση του παθογόνου στα καλλιεργούμενα φυτά δεν είναι ο σημαντικότερος παράγοντας, αλλά ότι το παθογόνο μπορεί να μεταδοθεί από τα επιφανειακά ύδατα και ορισμένα άγρια φυτά της οικογένειας των σολανιδών, και

(¹) ΕΕ C 124 της 21.4.1997, σ. 12 και ΕΕ C 108 της 7.4.1998, σ. 85.

(²) ΕΕ C 14 της 19.1.1998, σ. 34.

(³) ΕΕ C 206 της 7.7.1997, σ. 57.

(⁴) ΕΕ L 26 της 31.1.1977, σ. 20· οδηγία όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 98/2/ΕΚ της Επιτροπής (ΕΕ L 15 της 21.1.1998, σ. 34).

συνεπώς η άρδευση καλλιεργειών πατάτας και τομάτας με μολυσμένο νερό εμπεριέχει τον κίνδυνο μόλυνσης αυτών των καλλιεργειών· ότι επίσης το παθογόνο μπορεί να υπάρχει, κατά τη διάρκεια του χειμώνα, σε αυτοφυή φυτά πατάτας και τομάτας τα οποία μπορεί να αποτελούν εστία μόλυνσης από την μία εποχή στην άλλη· ότι το παθογόνο μεταδίδεται επίσης δι' επαφής των πατατών με προσβεβλημένες πατάτες και με εργαλεία φύτευσης, συγκομιδής και επεξεργασίας ή με περιέκτες μεταφοράς και αποθήκευσης που έχουν μολυνθεί από προηγούμενη επαφή με προσβεβλημένες πατάτες·

ότι η εξάπλωση του παθογόνου μπορεί να μειωθεί ή να αποφευχθεί με την απολύμανση αυτών των αντικειμένων· ότι η τυχόν μόλυνση του πατατόσπορου αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για την εξάπλωση του παθογόνου· παρομοίως, η λανθάνουσα μόλυνση του πατατόσπορου αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για την εξάπλωση του παθογόνου και αυτό μπορεί να αποφευχθεί με τη χρησιμοποίηση πατατόσπορου που παράγεται στο πλαίσιο επισήμως εγκεκριμένου προγράμματος και ο οποίος έχει κριθεί απαλλαγμένος από τον οργανισμό μετά από δοκιμή·

ότι οι υφιστάμενες γνώσεις της βιολογίας και της επιδημιολογίας του *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. στις ευρωπαϊκές συνθήκες είναι ανεπαρκείς, και προβλέπεται η επανεξέταση των προτεινόμενων μέτρων στη διάρκεια διαφόρων εποχών· ομοίως, προβλέπεται η βελτίωση της διαδικασίας δοκιμών υπό το φως περαιτέρω έρευνας, ιδίως όσον αφορά την ευαισθησία και την εξειδίκευση των μεθόδων δοκιμής προκειμένου να επιλεγθούν και να τυποποιηθούν οι βέλτιστες διαθέσιμες μέθοδοι δοκιμής·

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

ΕΞΕΛΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Άρθρο 1

Η παρούσα οδηγία αφορά τα μέτρα που πρέπει να λαμβάνονται στα κράτη μέλη κατά του *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., παλαιότερον γνωστού ως *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, (εφεξής καλούμενο «ο οργανισμός») σε σχέση με τους ξενιστές του οργανισμού που αναφέρονται στο παράρτημα Ι τμήμα 1 (εφεξής καλούμενοι «καταχωρημένο φυτικό υλικό»), για:

- α) τον εντοπισμό του και τον προσδιορισμό της διασποράς του·
- β) την πρόληψη της εμφάνισης και της μετάδοσής του·

- γ) σε περίπτωση διαπίστωσής του, την πρόληψη της μετάδοσης και την καταπολέμησή του με σκοπό την εξάλειψή του.

Άρθρο 2

1. Τα κράτη μέλη πραγματοποιούν ετήσιες συστηματικές επίσημες μελέτες για τον οργανισμό στο καταχωρημένο φυτικό υλικό που προέρχεται από το έδαφός τους. Προκειμένου να προσδιοριστούν οι άλλες πιθανές εστίες μόλυνσης που απειλούν την παραγωγή του καταχωρημένου φυτικού υλικού, τα κράτη μέλη πραγματοποιούν αξιολόγηση του κινδύνου και, εκτός από την περίπτωση κατά την οποία ο οργανισμός έχει αναγνωρισθεί κατά την αξιολόγηση, διεξάγουν, στις περιοχές παραγωγής του καταχωρημένου φυτικού υλικού, στοχοθετημένες επίσημες μελέτες για τον οργανισμό σε φυτά άλλα από το καταχωρημένο φυτικό υλικό, συμπεριλαμβανομένων των άγριων ξενιστών της οικογένειας των σολανιδών, καθώς και στο επιφανειακό νερό που χρησιμοποιείται για άρδευση ή ψεκάσμο του καταχωρημένου φυτικού υλικού και στα υγρά απόβλητα που απορρίπτονται από εγκαταστάσεις βιομηχανικής μεταποίησης ή συσκευασίας του καταχωρημένου φυτικού υλικού και που χρησιμοποιούνται για άρδευση ή ψεκάσμο του καταχωρημένου φυτικού υλικού. Η έκταση αυτών των στοχοθετημένων μελετών καθορίζεται ανάλογα με τον διαπιστωμένο κίνδυνο. Τα κράτη μέλη μπορούν επίσης να διεξάγουν επίσημες μελέτες για τον οργανισμό σε άλλο υλικό, όπως υπόστρωμα βλάστησης, χώμα και στερεά απόβλητα από εγκαταστάσεις βιομηχανικής μεταποίησης ή συσκευασίας.

2. Οι επίσημες μελέτες που προβλέπονται στην παράγραφο 1 διενεργούνται:

- α) για το καταχωρημένο φυτικό υλικό, σύμφωνα με τις λεπτομέρειες που προβλέπονται στο σημείο 1 του τμήματος II του παραρτήματος I·
- β) για ξενιστές άλλους από το καταχωρημένο φυτικό υλικό, και για το νερό, συμπεριλαμβανομένων των υγρών αποβλήτων, σύμφωνα με τις κατάλληλες μεθόδους και, κατά περίπτωση, τα δείγματα λαμβάνονται και υποβάλλονται σε επίσημη ή υπό επίσημη εποπτεία εργαστηριακή δοκιμή·
- γ) κατά περίπτωση για άλλο υλικό, σύμφωνα με τις κατάλληλες μεθόδους.

Για τις μελέτες αυτές, οι περαιτέρω λεπτομέρειες των διαδικασιών εποπτείας και ο αριθμός, η προέλευση, η διαστρωμάτωση και ο χρόνος λήψης των δειγμάτων, καθορίζονται με απόφαση των αρμόδιων επίσημων φορέων κατά την έννοια της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ βάσει ορθών επιστημονικών και στατιστικών αρχών και της βιολογίας του οργανισμού, και λαμβανομένου υπόψη του συγκεκριμένου συστήματος παραγωγής του καταχωρημένου φυτικού υλικού και, κατά περίπτωση, άλλων φυτών ξενιστών στα οικεία κράτη μέλη.

3. Οι λεπτομέρειες και τα αποτελέσματα των επίσημων μελετών που προβλέπονται στην παράγραφο 1, κοινοποι-

ούνται κάθε χρόνο στα άλλα κράτη μέλη και την Επιτροπή σύμφωνα με τις διατάξεις του σημείου 2 του τμήματος II του παραρτήματος I. Οι κοινοποιήσεις αυτές υποβάλλονται έως την 1η Ιουνίου, εκτός από εκείνες για το πατατόσπορο που διατηρείται στο αγρόκτημα, οι οποίες υποβάλλονται έως την 1η Σεπτεμβρίου. Οι λεπτομέρειες και τα αποτελέσματα όσον αφορά τις καλλιέργειες θα αφορούν την παραγωγή του προηγούμενου έτους. Οι λεπτομέρειες των κοινοποιήσεων αυτών μπορούν να υποβάλλονται στην επιτροπή.

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

— οι κατάλληλες μέθοδοι για τις μελέτες και τις εργαστηριακές δοκιμές που προβλέπονται στην παράγραφο 2, πρώτο εδάφιο, στοιχείο β).

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

— οι κατάλληλες μέθοδοι για τις μελέτες που προβλέπονται στην παράγραφο 2, πρώτο εδάφιο, στοιχείο γ),

— περαιτέρω λεπτομέρειες για τις μελέτες που προβλέπονται στη παράγραφο 2, δεύτερο εδάφιο, προκειμένου να εξασφαλίζεται συγκρίσιμο επίπεδο ασφάλειας μεταξύ των κρατών μελών.

Άρθρο 3

Τα κράτη μέλη μερμινούν ώστε κάθε πιθανολογούμενη εμφάνιση ή διαπιστωμένη παρουσία του οργανισμού στο έδαφος τους, να ανακοινώνεται στους αρμόδιους επίσημους φορείς τους.

Άρθρο 4

1. Σε κάθε περίπτωση πιθανολογούμενης εμφάνισης, οι αρμόδιοι επίσημοι φορείς του οικείου κράτους μέλους εξασφαλίζουν τη διεξαγωγή επίσημης ή υπό επίσημη εποπτεία εργαστηριακής δοκιμής, είτε, για το καταχωρημένο φυτικό υλικό, με τη σχετική μέθοδο του παραρτήματος II και σύμφωνα με τους όρους του παραρτήματος III, σημείο 1, είτε, στις άλλες περιπτώσεις, με οποιαδήποτε άλλη επισήμως εγκεκριμένη μέθοδο, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ή να διαψευσθεί η πιθανολογούμενη εμφάνιση. Σε περίπτωση επιβεβαίωσης, εφαρμόζονται οι απαιτήσεις του παραρτήματος III, σημείο 2.

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

i) παρατηρήθηκαν διαγνωστικά συμπτώματα των ασθενειών που προκαλούνται από τον οργανισμό και ελήφθη θετικό αποτέλεσμα από τη δοκιμή ταχείας διάλογής που αναφέρεται στο παράρτημα II, τμήμα I, σημείο 1 και τμήμα II, είτε

ii) ελήφθη θετικό αποτέλεσμα από δοκιμή ή δοκιμές διάλογής, όπως ορίζεται στο παράρτημα II, τμήμα I, σημείο 2 και τμήμα III,

οι αρμόδιοι επίσημοι φορείς των κρατών μελών, σχετικά με την παραγωγή της χώρας τους:

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

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

γ) λαμβάνουν κατάλληλα πρόσθετα προληπτικά μέτρα, βάσει του επιπέδου του εκτιμώμενου κινδύνου, ιδίως σε σχέση με την παραγωγή του καταχωρημένου φυτικού υλικού και τη διακίνηση παρτίδων πατατόσπορου διαφορετικών από εκείνες που αναφέρονται στο στοιχείο α) και που παράγονται στον τόπο παραγωγής από τον οποίο έχουν ληφθεί τα δείγματα που αναφέρονται στο στοιχείο α), για την πρόληψη της μετάδοσης του οργανισμού.

3. Στις περιπτώσεις πιθανολογούμενης εμφάνισης κατά τις οποίες υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης του καταχωρημένου φυτικού υλικού ή του επιφανειακού νερού από ή σε άλλο/α κράτος/η μέλος/η, το κράτος μέλος στο οποίο αναφέρθηκε πιθανολογούμενη εμφάνιση κοινοποιεί αμέσως, ανάλογα με την έκταση του κινδύνου, τις λεπτομέρειες της πιθανολογούμενης εμφάνισης στο/α άλλο/α οικείο/α κράτος/η μέλος/η τα εν λόγω κράτη συνεργάζονται κατάλληλα. Το/α κράτος/η μέλος/η το/α οποία/α λαμβάνει/ουν την κοινοποίηση αυτή λαμβάνει/ουν προληπτικά μέτρα σύμφωνα με την παράγραφο 2, στοιχείο γ) και, ανάλογα με την περίπτωση, αναλαμβάνει/ουν κάθε περαιτέρω δράση, σύμφωνα με τις παραγράφους 1 και 2.

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

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

Άρθρο 5

1. Εάν από την επίσημη ή υπό επίσημη εποπτεία εργαστηριακή δοκιμή, είτε, για το καταχωρημένο φυτικό υλικό, με τη σχετική μέθοδο του παραρτήματος II, είτε, στις άλλες περιπτώσεις, με άλλη επισήμως εγκεκριμένη μέθοδο, επιβεβαιωθεί η παρουσία του οργανισμού σε δείγμα ληφθέν σύμφωνα με την παρούσα οδηγία, οι αρμόδιοι επίσημοι φορείς ενός κράτους μέλους, αφού λάβουν υπόψη τις ορθές επιστημονικές αρχές, τη βιολογία του οργανισμού και το συγκεκριμένο σύστημα παραγωγής, εμπορίας και μεταποίησης των ξενιστών του οργανισμού στο κράτος μέλος αυτό:

α) για το καταχωρημένο φυτικό υλικό:

i) θεσμοθετούν ελέγχους για τον προσδιορισμό της έκτασης και της ή των πρωτογενών εστιών μόλυνσης σύμφωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος IV, και διενεργούν πρόσθετες δοκιμές σύμφωνα με το άρθρο 4 παράγραφος 1, τουλάχιστον σε όλα τα κλωνικά σχετιζόμενα αποθέματα πατατόσπορου και

- ii) χαρακτηρίζουν ως μολυσμένο το καταχωρημένο φυτικό υλικό, τις αποστολές και/ή τις παρτίδες από τις οποίες λήφθηκε το δείγμα, καθώς και τα μηχανήματα, τα οχήματα, τους περιέκτες, τις αποθήκες ή τα τμήματα αυτών και κάθε άλλο αντικείμενο, συμπεριλαμβανομένων των υλικών συσκευασίας που χρησιμοποιήθηκαν για το καταχωρημένο φυτικό υλικό από το οποίο έχει ληφθεί το δείγμα· επίσης, χαρακτηρίζουν ως μολυσμένους, κατά περίπτωση, τους αγρούς, τις μονάδες προστατευόμενης φυτικής παραγωγής και τους τόπους παραγωγής από τους οποίους συγκομίστηκε το καταχωρημένο φυτικό υλικό και έχει ληφθεί το δείγμα· για τα δείγματα που λήφθηκαν κατά τη βλαστική περίοδο, πρέπει να χαρακτηρίζονται ως μολυσμένοι οι αγροί, οι τόποι παραγωγής και, κατά περίπτωση, οι μονάδες προστατευόμενης φυτικής παραγωγής από τις οποίες λήφθηκε το δείγμα και
- iii) προσδιορίζουν, σύμφωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος V, σημείο 1, την έκταση της πιθανής μόλυνσης δια επαφής πριν ή μετά τη συγκομιδή ή μέσω σχέσης της διαδικασίας παραγωγής, άρδευσης ή ψεκασμού ή μέσω κλωνικής σχέσης με τη συγκεκριμένη μόλυνση και
- iv) οριοθετούν μία ζώνη βάσει του χαρακτηρισμού της μόλυνσης που αναφέρεται στο σημείο ii), του προσδιορισμού της έκτασης της πιθανής μόλυνσης που αναφέρεται στο σημείο iii), και της πιθανής μετάδοσης του οργανισμού, σύμφωνα με τις διατάξεις του σημείου 2, στοιχείο i) του παραρτήματος V·
- β) για καλλιέργειες ξενιστών άλλων από εκείνους που αναφέρονται στο στοιχείο α) κατά τις οποίες η παραγωγή του καταχωρημένου φυτικού υλικού διατρέχει κίνδυνο:
- i) θεσμοθετούν ελέγχους σύμφωνα με το στοιχείο α), σημείο i) και
- ii) χαρακτηρίζουν ως μολυσμένους τους ξενιστές του οργανισμού από τους οποίους έχει ληφθεί το δείγμα και
- iii) προσδιορίζουν την έκταση της πιθανής μόλυνσης και οριοθετούν μία ζώνη σύμφωνα με το εδάφιο α), σημεία iii) και iv) αντίστοιχα, σε σχέση με την παραγωγή του καταχωρημένου φυτικού υλικού·
- γ) για το επιφανειακό νερό (συμπεριλαμβανομένων των απορρίψεων υγρών αποβλήτων από χώρους βιομηχανικής μεταποίησης ή συσκευασίας του καταχωρημένου φυτικού υλικού) και για τα άγρια φυτά της οικογένειας των σολανιδών, από τα οποία η παραγωγή του καταχωρημένου φυτικού υλικού διατρέχει κίνδυνο μέσω της άρδευσης ή του ψεκασμού με τα επιφανειακά ύδατα ή λόγω πλημμύρας από το επιφανειακό νερό:
- i) θεσμοθετούν ελέγχους, συμπεριλαμβανομένης της επίσημης μελέτης, σε κατάλληλες στιγμές, δειγμάτων από επιφανειακό νερό και, εφόσον υπάρχουν, από άγρια φυτά της οικογένειας των σολανιδών προκειμένου να προσδιοριστεί η έκταση της μόλυνσης και
- ii) χαρακτηρίζουν ως μολυσμένο το επιφανειακό νερό από το οποίο έχει ληφθεί το ή τα δείγματα λαμβάνοντας υπόψη την έκταση της μόλυνσης και τους

ελέγχους που διεξάγονται σύμφωνα με το σημείο i) και

- iii) προσδιορίζουν την έκταση της πιθανής μόλυνσης και οριοθετούν μια ζώνη βάσει του χαρακτηρισμού της μόλυνσης που αναφέρεται στο σημείο ii), και της πιθανής διάδοσης του οργανισμού, λαμβάνοντας υπόψη τις διατάξεις του σημείου 1 και του σημείου 2, στοιχείο ii) του παραρτήματος V.

2. Τα κράτη μέλη κοινοποιούν αμέσως, σύμφωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος V, σημείο 3, στα άλλα κράτη μέλη και την Επιτροπή κάθε μόλυνση που προσδιορίζεται βάσει της παραγράφου 1, στοιχείο α), σημείο ii) και της παραγράφου 1, στοιχείο γ), σημείο ii), καθώς και τις λεπτομέρειες της οριοθέτησης ζώνης βάσει της παραγράφου 1, στοιχείο α), σημείο iv) και, κατά περίπτωση, της παραγράφου 1 στοιχείο γ), σημείο iii). Οι λεπτομέρειες της κοινοποίησης δυνάμει της παρούσας παραγράφου μπορούν να υποβάλλονται στην επιτροπή.

Ταυτόχρονα, τα κράτη μέλη υποβάλλουν στην Επιτροπή την πρόσθετη κοινοποίηση που προβλέπεται στο σημείο 4 παραρτήματος V. Οι λεπτομέρειες της κοινοποίησης δυνάμει του παρόντος εδαφίου υποβάλλονται αμέσως στα μέλη της επιτροπής.

3. Βάσει της κοινοποίησης σύμφωνα με την παράγραφο 2 και των κοινοποιούμενων στοιχείων, τα άλλα κράτη μέλη που αναφέρονται στην κοινοποίηση διενεργούν έλεγχο σύμφωνα με την παράγραφο 1, στοιχείο α), σημείο i) και, κατά περίπτωση, την παράγραφο 1, στοιχείο γ), σημείο i) και αναλαμβάνουν ενδεχομένως περαιτέρω δράση, σύμφωνα με τις παραγράφους 1 και 2.

Άρθρο 6

1. Τα κράτη μέλη ορίζουν ότι το καταχωρημένο φυτικό υλικό που έχει χαρακτηριστεί ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο ii), δεν μπορεί να φυτεύεται και ότι πρέπει, υπό τον έλεγχο και την έγγραφη των αρμόδιων επίσημων φορέων τους, να υπόκειται σε μια από τις διατάξεις του παραρτήματος VI, σημείο 1 κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού.

2. Τα κράτη μέλη ορίζουν ότι απαγορεύεται η φύτευση του καταχωρημένου φυτικού υλικού που έχει χαρακτηριστεί ως πιθανώς μολυσμένο βάσει του άρθρου 5, παράγραφος 1, σημείο α), στοιχείο iii), και στοιχείο γ), σημείο iii), συμπεριλαμβανομένου του καταχωρημένου φυτικού υλικού για το οποίο έχει εντοπιστεί κίνδυνος και το οποίο έχει παραχθεί σε τόπους παραγωγής που έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανώς μολυσμένοι σύμφωνα με το άρθρο 5, παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο iii), και ότι πρέπει υπό τον έλεγχο των αρμόδιων επίσημων φορέων, να χρησιμοποιείται ή να διατίθεται καταλλήλως, όπως ορίζεται στο παράρτημα VI, σημείο 2, κατά τρόπο ώστε να διασφαλίζεται ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού.

3. Τα κράτη μέλη ορίζουν ότι τα μηχανήματα, τα οχήματα, οι περιέκτες, οι αποθήκες ή τα τμήματα αυτών, και κάθε άλλο αντικείμενο, συμπεριλαμβανομένων των υλικών συσκευασίας, που έχουν χαρακτηριστεί μολυσμένα βάσει

του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο ii) ή που έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανώς μολυσμένα βάσει του άρθρου 5, παράγραφος 1, στοιχεία α), σημείο iii) και στοιχείο γ), σημείο iii), πρέπει να καταστρέφονται ή να απολυμαίνονται με κατάλληλες μεθόδους όπως ορίζεται στο παράρτημα VI, σημείο 3. Μετά την απολύμανση, τα αντικείμενα αυτά παύουν να θεωρούνται μολυσμένα.

4. Με την επιφύλαξη των μέτρων που εφαρμόζονται σύμφωνα με τις παραγράφους 1, 2 και 3, τα κράτη μέλη ορίζουν ότι, για τη ζώνη που οριοθετείται βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο iv) και στοιχείο γ), στοιχείο iii), εφαρμόζονται ορισμένα μέτρα, όπως καθορίζεται στο παράρτημα VI, σημεία 4.1. και 4.2. Οι λεπτομέρειες των μέτρων αυτών κοινοποιούνται ετησίως στα άλλα κράτη μέλη και την Επιτροπή. Οι λεπτομέρειες της κοινοποίησης αυτής μπορούν να υποβάλλονται στην επιτροπή.

Άρθρο 7

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

Η προαναφερόμενη δοκιμή πραγματοποιείται από ένα κράτος μέλος:

- α) στις περιπτώσεις που έχουν επιβεβαιωθεί ευρήματα του οργανισμού στην παραγωγή πατατοσπόρου του,
 - i) με δοκιμή των προηγούμενων γενεών, συμπεριλαμβανομένης της αρχικής κλωνικής επιλογής, και με συστηματική δοκιμή των βασικών κλώνων πατατόσπορου, ή
 - ii) στις περιπτώσεις κατά τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι δεν υπάρχει κλωνική σχέση, με δοκιμή όλων των βασικών κλώνων πατατόσπορου ή προηγούμενων γενεών, συμπεριλαμβανομένης της αρχικής κλωνικής επιλογής·
- β) στις λοιπές περιπτώσεις, είτε σε κάθε φυτό της αρχικής κλωνικής επιλογής ή σε αντιπροσωπευτικά δείγματα του βασικού πατατόσπορου ή των προηγούμενων γενεών.

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

- οι λεπτομερείς κανόνες εφαρμογής της παραγράφου 1, δεύτερο εδάφιο, στοιχείο α),
- οι κανόνες που αφορούν τα αντιπροσωπευτικά δείγματα που προβλέπονται στην παράγραφο 1, δεύτερο εδάφιο, στοιχείο β).

Άρθρο 8

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

Άρθρο 9

Με την επιφύλαξη των διατάξεων της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ, τα κράτη μέλη μπορούν να επιτρέπουν παρεκκλίσεις από τα μέτρα που αναφέρονται στα άρθρα 6 και 8 της παρούσας οδηγίας, σύμφωνα με τις διατάξεις της οδηγίας 95/44/ΕΚ για πειραματικούς ή επιστημονικούς σκοπούς, καθώς και για εργασίες ποικιλιακής επιλογής⁽¹⁾.

Άρθρο 10

Τα κράτη μέλη μπορούν να θεσπίζουν, όσον αφορά τη δική τους παραγωγή, τα πρόσθετα ή αυστηρότερα μέτρα που απαιτούνται για την καταπολέμηση του οργανισμού ή για την πρόληψη της μετάδοσής του, υπό την προϋπόθεση ότι τα μέτρα αυτά συμμορφώνονται με τις διατάξεις της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ.

Ο λεπτομέρειες των μέτρων αυτών κοινοποιούνται στα άλλα κράτη μέλη και την Επιτροπή. Ο λεπτομέρειες της κοινοποίησης αυτής μπορούν να υποβάλλονται στην επιτροπή.

Άρθρο 11

Οι τροποποιήσεις των παραρτημάτων της παρούσας οδηγίας, με γνώμονα τις εξελίξεις των επιστημονικών ή τεχνικών γνώσεων, θεσπίζονται με τη διαδικασία του άρθρου 16α της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ. Για τις μεθόδους που ορίζονται στο παράρτημα II και τα μέτρα των παραγράφων 4.1 και 4.2 του παραρτήματος VI της παρούσας οδηγίας, η Επιτροπή καταρτίζει έκθεση επανεξέτασης των εν λόγω μεθόδων και μέτρων βάσει της κτηθείσας πείρας, και την υποβάλει στην επιτροπή πριν από την 1η Ιανουαρίου 2002.

Άρθρο 12

1. Τα κράτη μέλη θέτουν σε ισχύ τις απαιτούμενες νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις για να συμμορφωθούν με την παρούσα οδηγία από τις 21 Αυγούστου 1999. Ενημερώνουν αμέσως την Επιτροπή σχετικά.

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

2. Τα κράτη μέλη ανακοινώνουν αμέσως στην Επιτροπή τις βασικές διατάξεις εθνικού δικαίου τις οποίες θεσπίζουν στον τομέα τον οποίο διέπει η παρούσα οδηγία. Η Επιτροπή ενημερώνει σχετικά τα λοιπά κράτη μέλη.

⁽¹⁾ ΕΕ L 184 της 3.8.1995, σ. 34· οδηγία όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 97/46/ΕΚ της Επιτροπής (ΕΕ L 204 της 31.7.1997, σ. 43).

Άρθρο 13

Βρυξέλλες, 20 Ιουλίου 1998.

Η παρούσα οδηγία αρχίζει να ισχύει την ημέρα της δημοσίευσής της στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*.

Άρθρο 14

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Για το Συμβούλιο

Ο Πρόεδρος

W. MOLTERER

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΤΜΗΜΑ Ι

Κατάλογος ξενιστών του *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. όπως ορίζονται στο άρθρο 1

Φυτά, (συμπεριλαμβανομένων των κονδύλων) άλλα από τον πραγματικό σπόρο του *Solanum tuberosum* L.

πατάτα

Φυτά, άλλα από τα φυτά και τους σπόρους του *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw.

τομάτα

ΤΜΗΜΑ ΙΙ

Μελέτες

1. Οι επίσημες μελέτες που αναφέρονται στο άρθρο 2 παράγραφος 2, στοιχείο α), διεξάγονται βάσει της βιολογίας του οργανισμού και των συγκεκριμένων συστημάτων παραγωγής του οικείου κράτους μέλους και πρέπει να περιλαμβάνουν:
 - i) όσον αφορά την πατάτα,
 - σε κατάλληλες στιγμές, μακροσκοπική επιθεώρηση των καλλιεργούμενων φυτών, ή/και δειγματοληψία από τους σπόρους και άλλες πατάτες κατά τη βλαστική περίοδο ή στην αποθήκη. Τα δείγματα αυτά υποβάλλονται σε επίσημο ή υπό επίσημη εποπτεία μακροσκοπικό έλεγχο κομμένων κονδύλων,
 - και
 - στην περίπτωση του πατατόσπορου και, κατά περίπτωση, για άλλες πατάτες, επίσημες ή υπό επίσημη εποπτεία εργαστηριακές δοκιμές με τη μέθοδο του παραρτήματος ΙΙ,
 - ii) όσον αφορά την τομάτα,
 - μακροσκοπική επιθεώρηση, σε κατάλληλες στιγμές, τουλάχιστον των καλλιεργούμενων φυτών που προορίζονται για μεταφύτευση για επαγγελματική χρήση.
2. Η κοινοποίηση των επίσημων μελετών που αναφέρονται στο άρθρο 2, παράγραφος 3, πρέπει να περιλαμβάνει:
 - i) στην περίπτωση των μελετών για την πατάτα,
 - την εκτιμώμενη συνολική καλλιεργούμενη έκταση, σε εκτάρια, πατατόσπορου και άλλης πατάτας,
 - τη διαστρωμάτωση ανά κατηγορία σπόρου και πατάτες εμπορίου, και, κατά περίπτωση, ανά περιοχή,
 - τον αριθμό και το χρόνο λήψης των δειγμάτων,
 - τον αριθμό μακροσκοπικών ελέγχων στον αγρό,
 - τον αριθμό (και το μέγεθος του δείγματος) των μακροσκοπικών ελέγχων κονδύλων,
 - ii) στην περίπτωση των μελετών, τουλάχιστον, για τα καλλιεργούμενα φυτά τομάτας που προορίζονται για μεταφύτευση για επαγγελματική χρήση,
 - τον εκτιμώμενο συνολικό αριθμό φυτών,
 - τον αριθμό των μακροσκοπικών ελέγχων,
 - iii) στην περίπτωση των μελετών που αφορούν ξενιστές άλλους από την πατάτα και την τομάτα, συμπεριλαμβανομένων των άγριων φυτών της οικογένειας των σολανιδών,
 - το είδος,
 - τον αριθμό και το χρόνο λήψης των δειγμάτων,
 - την περιοχή/ποτάμι δειγματοληψίας, κατά περίπτωση,
 - τη μέθοδο ανάλυσης,
 - iv) στην περίπτωση των μελετών σχετικά με το νερό και τις απορρίψεις υγρών αποβλήτων από εγκαταστάσεις βιομηχανικής μεταποίησης ή συσκευασίας,
 - τον αριθμό και το χρόνο λήψης των δειγμάτων,
 - την περιοχή/το ποτάμι/την τοποθεσία των εγκαταστάσεων δειγματοληψίας, κατά περίπτωση,
 - τη μέθοδο ανάλυσης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

ΣΧΗΜΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΟΥ RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL.

ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ

Στο παρόν σχήμα περιγράφονται οι διάφορες διαδικασίες για:

- i) τη διάγνωση της καστανής σήψης σε κονδύλους πατάτας και της βακτηριακής μάρανσης σε φυτά πατάτας και τομάτας,
- ii) την ανίχνευση της *Ralstonia solanacearum* σε δείγματα κονδύλων πατάτας,
- iii) την αναγνώριση του *Ralstonia solanacearum*.

Στα προσάρτηματα παρέχονται λεπτομέρειες για την παρασκευή των χρησιμοποιούμενων για τις δοκιμές υλικών, δηλαδή θρεπτικών υποστρωμάτων, ρυθμιστικών διαλυμάτων, διαλυμάτων, αντιδραστηρίων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΜΗΜΑ I:	Εφαρμογή του σχήματος δοκιμών	9
	1. Διάγνωση της καστανής σήψης σε κονδύλους πατάτας και της βακτηριακής μάρανσης σε φυτά πατάτας και τομάτας	9
	2. Ανίχνευση και ταυτοποίηση του <i>Ralstonia solanacearum</i> σε δείγματα κονδύλων πατάτας	11
ΤΜΗΜΑ II:	Διάγνωση της καστανής σήψης σε κονδύλους πατάτας και της βακτηριακής μάρανσης σε φυτά πατάτας και τομάτας	13
	1. Συμπτώματα	13
	2. Δοκιμή/ές ταχείας διαλογής	13
	3. Διαδικασία απομόνωσης	14
	4. Δοκιμή/ές επιβεβαίωσης	14
ΤΜΗΜΑ III:	Ανίχνευση και ταυτοποίηση της <i>Ralstonia solanacearum</i> σε δείγματα κονδύλων πατάτας	17
	1. Προετοιμασία του δείγματος για τη δοκιμή	17
	2. Δοκιμή ανοσοφθορισμού (IF)	18
	3. Δοκιμή ενζυματικής ανοσοαπορρόφησης (ELISA)	20
	4. Δοκιμή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR TM)	20
	5. Δοκιμή επιλεκτικής απομόνωσης επί στερεού υποστρώματος	22
	6. Βιοδοκιμή	23
	7. Δοκιμές εμπλουτισμού	23
	8. Δοκιμή παθογένειας	23
	<i>Προσάρτημα 1:</i> Θρεπτικά υλικά για την απομόνωση και καλλιέργεια της <i>Ralstonia solanacearum</i>	24
	<i>Προσάρτημα 2:</i> Υλικά για την προετοιμασία του δείγματος δοκιμής	25
	<i>Προσάρτημα 3:</i> Υλικά για τη δοκιμή IF	26
	<i>Προσάρτημα 4:</i> Προσδιορισμός του βαθμού μόλυνσης στη δοκιμή IF	27
	<i>Προσάρτημα 5:</i> Υλικά για τη δοκιμή ELISA	28
	<i>Προσάρτημα 6:</i> Υλικά για τη δοκιμή PCR	29
	<i>Προσάρτημα 7:</i> Υλικά για τη δοκιμή επιλεκτικής απομόνωσης επί στερεού θρεπτικού υποστρώματος και δοκιμές εμπλουτισμού	29
	Βιβλιογραφία	30

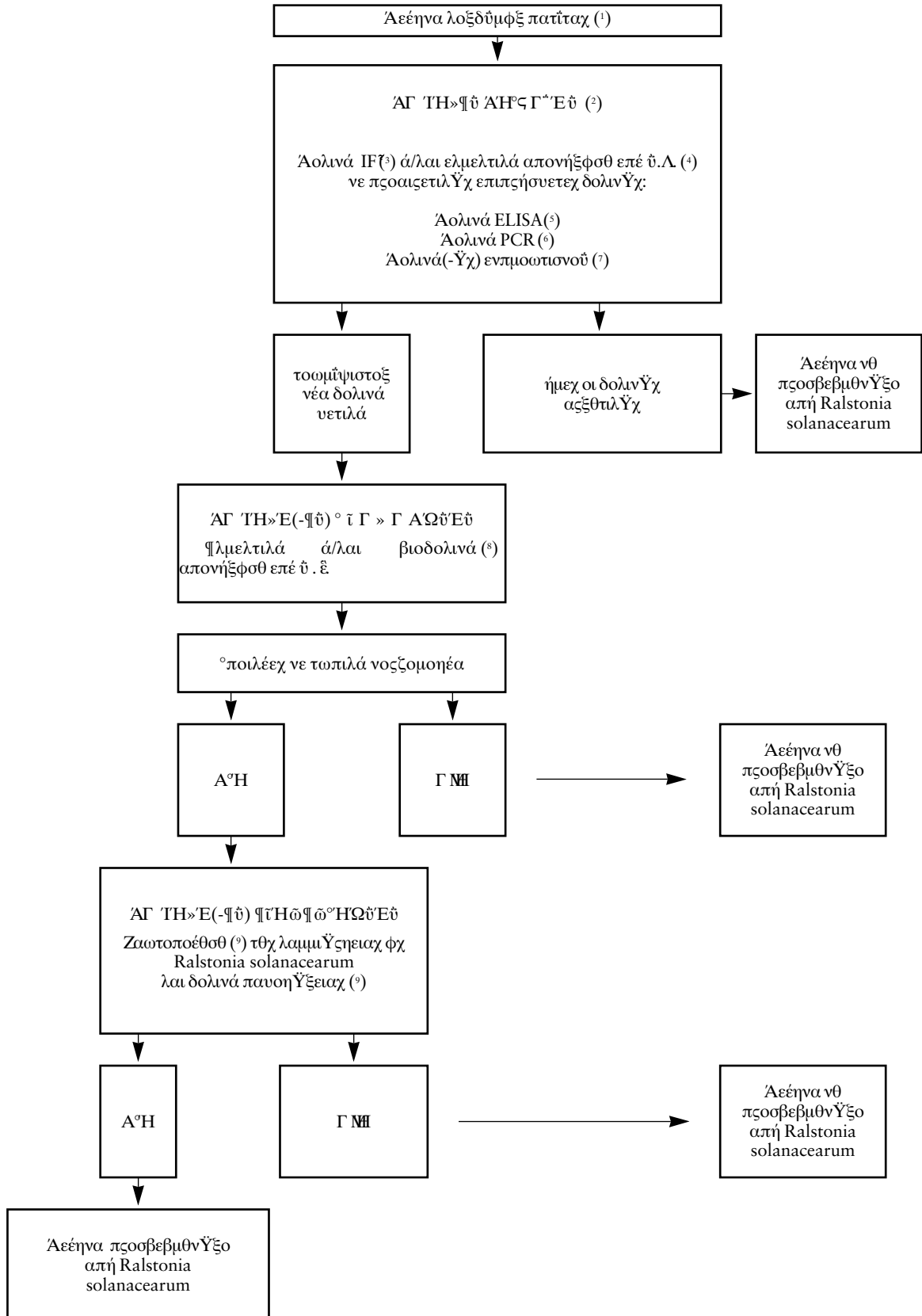
Παραπομπές διαγράμματος:

- (¹) Περιγραφή των συμπτωμάτων δίδεται στο μέρος II.1.
- (²) Οι δοκιμές ταχείας διαλογής διευκολύνουν την προκαταρκτική διάγνωση.
Κατάλληλες δοκιμές είναι:
— η δοκιμή εκκρίσεων του αγγειώδους ιστού του στελέχους (μέρος II.2),
— η δοκιμή για πολύ-β-υδροξυβουτυρικά κοκκία (μέρος II.2),
— η δοκιμή IF (μέρος III.2),
— η δοκιμή ELISA (μέρος III.3),
— η δοκιμή PCR (μέρος III.4).
- (³) Αν και η απομόνωση του παθογόνου αιτίου με τη διαδικασία διαδοχικών αραιώσεων επί στερεού υποστρώματος από ιστούς με τυπικά συμπτώματα είναι άμεση, η καλλιέργεια μπορεί να αποτύχει αν βρισκόμαστε σε προχωρημένα στάδια μόλυνσης. Σαπροφυτικά βακτήρια που αναπτύσσονται σε προσβεβλημένο ιστό μπορεί να επικαλύψουν ή να εμποδίσουν την ανάπτυξη του παθογόνου στο υλικό απομόνωσης. Εάν η δοκιμή απομόνωσης είναι αρνητική, αλλά υπάρχουν τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας, τότε η διαδικασία απομόνωσης πρέπει να επαναληφθεί, κατά προτίμηση με εκλεκτική απομόνωση επί στερεού υποστρώματος.
- (⁴) Αξιόπιστη ταυτοποίηση μίας καθαρής καλλιέργειας *Ralstonia solanacearum* επιτυγχάνεται με μία τουλάχιστον από τις δοκιμές που παρατίθενται στο μέρος II.4.1 σε συνδυασμό με μία δοκιμή παθογένειας (μέρος II.4.3). Ο προσδιορισμός του στελέχους είναι προαιρετικός, συνιστάται όμως να γίνεται σε κάθε νέο περιστατικό.

2. **Ανίχνευση και ταυτοποίηση του *Ralstonia solanacearum* σε δείγματα κονδύλων πατάτας**

Η διαδικασία αποσκοπεί στην ανίχνευση μολύνσεων σε λανθάνουσα μορφή σε κονδύλους πατάτας με μία ή, κατά προτίμηση, περισσότερες δοκιμές διαλογής οι οποίες, εφόσον είναι θετικές επιβεβαιώνονται με την απομόνωση του παθογόνου οργανισμού, ακολουθεί δε, στην περίπτωση απομόνωσης τυπικών αποικιών, ταυτοποίηση μιας καθαρής καλλιέργειας ως καλλιέργειας *Ralstonia solanacearum*.

Διάγραμμα ροής της διαδικασίας



Παραπομπές διαγράμματος:

(1) Μέγεθος δείγματος

Το κανονικό μέγεθος δείγματος είναι 200 κόνδυλοι. Η δοκιμασία όμως μπορεί να εφαρμοσθεί και για δείγματα μικρότερα των 200 κονδύλων.

(2) Δοκιμή(-ές) ανίχνευσης

Για την ανίχνευση της *Ralstonia solanacearum* μπορεί να μην αρκεί από πλευράς ευαισθησίας ή αξιοπιστίας η πραγματοποίηση μιας μόνον δοκιμής σε ένα δείγμα. Συνεπώς, συνιστάται να πραγματοποιούνται περισσότερες από μία δοκιμές, οι οποίες θα πρέπει να βασίζονται κατά προτίμηση σε διαφορετικές βιολογικές αρχές.

(3) Δοκιμή ανοσοφθορισμού (IF)

Η δοκιμή ανοσοφθορισμού είναι μία καλά καθιερωμένη δοκιμή διαλογής. Το γεγονός αυτό συνιστά πλεονέκτημα σε σχέση με άλλες δοκιμές που δεν έχουν ακόμη αναπτυχθεί πλήρως ή δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί η εγκυρότητά τους. Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται για πολλά άλλα καθορισμένα βακτήρια, όπως την *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*. Βάσει των καθορισμένων παραμέτρων ανάγνωσης της μεθόδου, αυτή είναι μία ευαίσθητη δοκιμή [όριο ευαισθησίας 10^3 - 10^4 κύτταρα ανά ml εκχυλίματος ιζήματος πατάτας].

Η ποιότητα του αντιορού αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της δοκιμής. Αποδεκτοί είναι μόνον αντιοροί με υψηλό τίτλο (κατ' ελάχιστον 2000 για τον αρχικό αντιορό), όλες δε οι δοκιμές πρέπει να πραγματοποιούνται με τον τίτλο του αντιορού ή μία αραίωση κάτω του τίτλου. Προτιμάται η έμμεση μέθοδος. Η άμεση μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί εάν το επίπεδο ευαισθησίας και εξειδίκευσης της δοκιμής είναι ισοδύναμο με εκείνο της έμμεσης μεθόδου.

Η δοκιμή IF έχει το πλεονέκτημα της υποκειμενικής ερμηνείας της μορφολογίας χρώσεως των κυττάρων και της έντασης του φθορισμού, χαρακτηριστικά που παρέχουν στοιχεία σχετικά με την εξειδίκευση της αντίδρασης. Αποτελεί σύνηθες φαινόμενο η εμφάνιση μη ειδικής θετικής αντίδρασης (cross-reaction) ορολογικά σχετιζόμενων βακτηρίων, που προέρχονται από το έδαφος ή σχετίζονται με ιστούς πατάτας και έχουν μορφολογία κυττάρων εκείνη του *Ralstonia solanacearum*. Η δοκιμή IF μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως η αποκλειστική δοκιμή διαλογής, αν και σε περιπτώσεις υποψίας μη εκλεκτικών αντιδράσεων μπορεί να γίνει μια επιπρόσθετη δοκιμή διαλογής που βασίζεται σε διαφορετική βιολογική αρχή. Σ' αυτές τις περιπτώσεις η πιο κατάλληλη δοκιμή είναι η εκλεκτική απομόνωση επί στερεού θρεπτικού υποστρώματος.

(4) Εκλεκτική απομόνωση επί στερεού υποστρώματος

Με το τροποποιημένο υλικό SMSA και τη μεθοδολογία εξέτασης που εξιδικεύεται σ' αυτή τη μέθοδο, αυτή συνιστά μία ευαίσθητη και εκλεκτική δοκιμή για το *Ralstonia solanacearum*. Το αποτέλεσμα λαμβάνεται 3-6 ημέρες μετά την προετοιμασία του δείγματος. Το παθογόνο λαμβάνεται απ' ευθείας στην καλλιέργεια και μπορεί να ταυτοποιηθεί εύκολα. Για την πλήρη εκμείλιξη των δυνατοτήτων της, η δοκιμή απαιτεί να γίνεται προσεκτική προετοιμασία των τεμαχίων ιστού λαμβανομένων από το σημείο πρόσφυσης του στολινίου για την αποφυγή δευτερογενών βακτηρίων σχετιζόμενων με τους κονδύλους πατάτας που είναι ανταγωνιστές του *Ralstonia solanacearum* στο θρεπτικό υπόστρωμα και μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού.

Ορισμένα βακτηριακά στελέχη μπορεί να αναπτυχθούν πολύ λίγο καθώς τα συστατικά του υποστρώματος μπορεί να επηρεάσουν τον οργανισμό-στόχο. Χρειάζεται επίσης προσοχή ώστε το *Ralstonia solanacearum* να διαφοροποιείται από τυχόν άλλα βακτήρια που μπορεί να αναπτυχθούν στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η εκλεκτική απομόνωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αποκλειστική δοκιμή διαλογής με την προϋπόθεση ότι σε περιπτώσεις που υπάρχει υποψία παρεμπόδισης της ανάπτυξης του *Ralstonia solanacearum* από άλλα βακτήρια επί των τρυβλίων, και προκύπτει αρνητικό αποτέλεσμα, το δείγμα επανεξετάζεται χρησιμοποιώντας διαφορετική δοκιμή για την επικύρωση ή απόρριψη της διάγνωσης. Στις περιπτώσεις αυτές, η δοκιμή IF είναι η καταλληλότερη.

(5) Δοκιμή ELISA

Η δοκιμή ELISA είναι εν γένει λιγότερο ευαίσθητη από τη δοκιμή IF (όριο ευαισθησίας 10^4 - 10^5 κύτταρα ανά ml εκχυλίματος ιζήματος πατάτας). Η δοκιμή είναι φθηνή και γρήγορη, είναι όμως εν γένει πιο επιρρεπής στην εμφάνιση εσφαλμένων θετικών (μη ειδικών θετικών αντιδράσεων) αποτελεσμάτων και εσφαλμένων αρνητικών (παρεμπόδιση από φυσολογικά μόρια στο εκχύλισμα πατάτας) αποτελεσμάτων. Οι απαιτήσεις από πλευράς εξειδίκευσης του αντιορού είναι εξαιρετικά μεγάλες. Η δοκιμή ELISA δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αποκλειστική δοκιμή εξέτασης.

(6) Δοκιμή PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

Η ανίχνευση με PCR είναι πολύ ευαίσθητη. Αν και σε ένα δείγμα είναι δυνατόν να ανιχνευθεί ακόμη και ένα μεμονωμένο μόριο DNA, η δοκιμή παρεμποδίζεται εύκολα από διάφορα συστατικά του εκχυλίματος του φυτού ή του κονδύλου που οδηγούν σε εσφαλμένο αρνητικό αποτέλεσμα. Ορισμένες καλλιτρογόμενες ποικιλίες πατάτας περιέχουν περισσότερους παρεμποδιστές από άλλες. Χρειάζεται επομένως οι παρεμποδιστές αυτοί να απομακρύνονται. Η παρεμπόδιση μπορεί να μειωθεί με αραίωση αλλά έτσι αραιώνονται και οι πληθυσμοί του *Ralstonia solanacearum*. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται σε όλα τα στάδια ετοιμασίας του δείγματος και της δοκιμής για να αποκλείεται τυχόν μόλυνση που θα μπορούσε να οδηγήσει σε εσφαλμένα θετικά αποτελέσματα. Γι' αυτό η άμεση PCR δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως η αποκλειστική δοκιμή εξέτασης.

(7) Δοκιμή εμπλουτισμού

Επιδίδοντας δείγματα εκχυλίματος ιζήματος πατάτας σε ένα ημικλεκτικό θρεπτικό ζωμό, όπως ο τροποποιημένος SMSA, μπορούμε να επιτύχουμε τον πολλαπλασιασμό του *Ralstonia solanacearum*. Το σημαντικότερο ίσως στην περίπτωση αυτή είναι ότι έτσι αραιώνονται και οι εν δυνάμει παρεμποδιστές της δοκιμής ELISA ή PCR. Έτσι, η *Ralstonia solanacearum* σε εμπλουτισμένο ζωμό μπορεί να ανιχνευθεί με τις μεθόδους IF, ELISA και PCR. Συνιστούμε να μη γίνεται άμεση απομόνωση επί στερεού υποστρώματος από τους εμπλουτισμένους ζωμούς. Οι μέθοδοι αυτές εμπλουτισμού δεν έχουν δοκιμαστεί επισταμένως. Περιλαμβάνονται στο παρόν γιατί έχουν καλές προοπτικές. Εντούτοις, λόγω της σχετικής έλλειψης εμπειριών, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποκλειστικές μέθοδοι ανιχνεύσεως.

(8) Βιοδοκιμή

Η βιοδοκιμή χρησιμοποιείται για την απομόνωση του *Ralstonia solanacearum* από ιζήματα εκχυλισμάτων πατάτας κατόπιν εκλεκτικού εμπλουτισμού σε ένα φυτό ξενιστή και μπορεί να γίνει σε φυτά τομάτας ή μελιτζάνας. Η δοκιμή απαιτεί άριστες συνθήκες επώασης όπως καθορίζονται στη μέθοδο αυτή, κατά πάσα πιθανότητα, τυχόν βακτήρια που δρουν παρεμποδιστικά έναντι του *Ralstonia solanacearum* σε SMSA δεν δρουν παρεμβατικά στη δοκιμή αυτή.

(9) Δοκιμή(-ές) επιβεβαίωσης

Αξιόπιστη ταυτοποίηση καθαρής καλλιέργειας *Ralstonia solanacearum* επιτυγχάνεται με μία τουλάχιστον από τις δοκιμές που παρατίθενται στο μέρος Π.4.1 σε συνδυασμό με μία δοκιμή παθογένειας (μέρος Π.4.3). Ο χαρακτηρισμός του στελέχους είναι προαιρετικός, αλλά συστήνεται για κάθε νέα περίπτωση.

ΤΜΗΜΑ II

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΚΑΣΤΑΝΗΣ ΣΗΨΗΣ ΣΕ ΚΟΝΔΥΛΟΥΣ ΠΑΤΑΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΑΡΑΝΣΗΣ ΣΕ ΦΥΤΑ ΠΑΤΑΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΜΑΤΑΣ**1. Συμπτώματα****1.1. Συμπτώματα στην πατάτα**

Στο φυτό της πατάτας στο αρχικό στάδιο της ασθένειας εμφανίζεται μαρασμός των φύλλων προς την κορυφή του φυτού σε υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της ημέρας με ανάληψη κατά τη διάρκεια της νύχτας. Σύντομα ο μαρασμός καθίσταται μη αναστρέψιμος και οδηγεί στο θάνατο του φυτού. Ο αγγειώδης ιστός σε εγκαρσίως κομμένα στελέχη από μαραμμένα φυτά μπορεί να γίνει καστανός, από δε την κομμένη επιφάνεια εκρέει, ή μπορεί να εξέλθει εύκολα συμπιέζοντας την, ένα γαλακτώδες εξίδρωμα. Όταν ένα κομμένο στέλεχος τοποθετηθεί κατακόρυφα μέσα σε νερό, από τις αγγειώδεις δέσμες εκρέουν κλωστές γλοιώδους υγρού.

Στον κόνδυλο της πατάτας οι κόνδυλοι πρέπει να κόβονται εγκαρσίως κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου. Στο αρχικό στάδιο της ασθένειας εμφανίζεται ένας υαλώδους όψεως, κίτρινος προς ανοικτό καστανό, μεταχρωματισμός του αγγειώδους δακτυλίου από τον οποίο εκρέει αυθόρμητα μετά λίγα λεπτά ή μετά από ελαφρά πίεση με τους αντίχειρες στο φλοιό κοντά στην κομμένη επιφάνεια, ένα υπόλευκο εξίδρωμα. Αργότερα, ο αγγειακός μεταχρωματισμός καθίσταται εντονότερα καστανός και η νέκρωση μπορεί να επεκταθεί στον παρεγχυματώδη ιστό. Σε προκεχωρημένα στάδια της ασθένειας, η μόλυνση εκδηλώνεται εξωτερικά από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου και τους οφθαλμούς και εμφανίζονται στην επιδερμίδα ερυθροκάστανες, ελαφρώς βαθουλωμένες κηλίδες από τις οποίες μπορεί να εκρέει βακτηριακό εξίδρωμα προκαλώντας την προσκόλλησή σωματιδίων του εδάφους.

1.2. Συμπτώματα στην τομάτα

Στο φυτό της τομάτας: Το πρώτο ορατό σύμπτωμα είναι η έλλειψη σπαργής στα νεαρά φύλλα. Υπό περιβαλλοντικές συνθήκες που είναι ευνοϊκές για το παθογόνο (θερμοκρασία εδάφους 25°C, ατμόσφαιρα κορεσμένη σε υγρασία), μέσα σε λίγες μέρες εμφανίζεται επιναστία και μαρασμός της μιας πλευράς ή και ολόκληρου του φυτού, στη συνέχεια δε πλήρης κατάρρευση του φυτού. Υπό λιγότερο ευνοϊκές συνθήκες (θερμοκρασία εδάφους κάτω των 21°C), αναπτύσσεται μεγάλος αριθμός τυχαίων ριζών επί του στελέχους. Ενίοτε, κατά μήκος του στελέχους, εμφανίζεται λιπαρό νήμα που αποτελεί ένδειξη της νέκρωσης του αγγειακού συστήματος. Σε εγκάρσιες τομές του στελέχους, από τους καστανόχρωμα μεταχρωματισμένους αγγειακούς ιστούς εκρέουν σταγόνες λευκού ή υποκίτρινου βακτηριακού εξιδρώματος.

2. Δοκιμές ταχείας διαλογής

Οι δοκιμές ταχείας διαλογής διευκολύνουν την προκαταρκτική διάγνωση. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες δοκιμές:

Δοκιμή εκκρίσεων από το στέλεχος

Η παρουσία *Ralstonia solanacearum* σε μαραμμένα στελέχη πατάτας μπορεί να εκτιμηθεί με την ακόλουθη απλή προκαταρκτική δοκιμή:

Κόβουμε το στέλεχος πάνω ακριβώς από το έδαφος. Τοποθετούμε την κομμένη επιφάνεια σε ποτήρι ζέσεως με νερό. Λίγο μετά, από τις αγγειώδεις δέσμες αρχίζει να τρέχει αυθόρμητα με μορφή κλωστών ένα βακτηριακό γλοιώδες έκκριμα. Κανένα από τα βακτήρια που προκαλούν αδροβακτηρίωση σε φυτά της πατάτας, δεν εμφανίζει το φαινόμενο αυτό.

Ανίχνευση πολυ-β-υδροξυβουτυρικών (PHB) κοκκίων

Τα κοκκία PHB στα κύτταρα του *Ralstonia solanacearum* καθίστανται ορατά διά χρώσεως με Nile Blue A ή με Sudan Black B.

Παρασκευάζουμε επίχρισμα του εξιδρώματος ή του αιωρήματος του ιστού σε αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου ή επίχρισμα 48ωρης καλλιέργειας σε YPGA ή SPA (προσάρτημα 1). Παρασκευάζουμε επίσης επίχρισμα στελέχους βιοποικιλίας 2, φυλής 3, ως θετικούς μάρτυρες, και αν θεωρηθεί χρήσιμο ένα επίχρισμα ετερολόγου στελέχους, ως αρνητικό μάρτυρα.

Αφήνουμε να ξηρανθούν. Περνάμε μερικές φορές γρήγορα την κάτω πλευρά της αντικειμενοφόρου πλάκας μέσα από φλόγα μέχρι να προσηλωθεί το επίχρισμα.

Δοκιμή Nile Blue

1. Περιλούζουμε το προσηλωμένο επίχρισμα με 1% υδατικό διάλυμα Nile Blue A και το αφήνουμε για επώαση επί 10 λεπτά στους 55°C.
2. Αποστραγγίζουμε το διάλυμα χρώσεως, πλένουμε την πλάκα για λίγο προσεκτικά με ρέον νερό της βρύσης και απομακρύνουμε την περίσσεια του νερού με απορροφητικό χαρτί.
3. Περιλούζουμε το επίχρισμα με 8% υδατικό διάλυμα οξικού οξέος και το αφήνουμε για επώαση επί 1 λεπτό σε θερμοκρασία εργαστηρίου.
4. Ξεπλένουμε ελαφρά με ρέον νερό της βρύσης και το στεγνώνουμε με απορροφητικό χαρτί.
5. Ξαναρίχνουμε μία σταγόνα νερό και τοποθετούμε μία καλυπτρίδα.
6. Εξετάζουμε το χρωσμένο επίχρισμα με μικροσκόπιο επιφθορισμού στα 450 nm με ελαιοκαταδυτικό φακό σε μεγέθυνση 1 000 x.

Εφόσον υπάρχουν κοκκία PHB αυτά φθορίζουν με λαμπρό πορτοκαλί χρώμα. Τα κοκκία παρατηρούνται επίσης και σε κανονικό φως για να ελεγχθεί αν είναι ενδοκυτταρικά και αν η κυτταρική μορφολογία είναι η τυπική μορφολογία του *Ralstonia solanacearum*.

Δοκιμή Sudan Black

1. Περιλούζουμε το προσηλωμένο επίχρισμα με διάλυμα 0,3% Sudan Black B σε 70% αιθανόλη και το αφήνουμε για επώαση επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία εργαστηρίου.
2. Αποστραγγίζουμε το διάλυμα χρώσεως, ξεπλένουμε για λίγο με νερό της βρύσης και απομακρύνουμε την περίσσεια του νερού με απορροφητικό χαρτί.
3. Βυθίζουμε το επίχρισμα για μικρό χρονικό διάστημα σε ξυλόλη και το στεγνώνουμε με απορροφητικό χαρτί.

Προσοχή! Η ξυλόλη είναι επιβλαβής, γι' αυτό πρέπει να εργαζόμαστε σε απαγωγό εστία.

4. Περιλούζουμε το επίχρισμα με 0,5% (β/ο) υδατικό διάλυμα σαφρανίνης και το αφήνουμε για 10 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία εργαστηρίου.

Προσοχή! Η σαφρανίνη είναι επιβλαβής, γι' αυτό πρέπει να εργαζόμαστε σε απαγωγό εστία.

5. Ξεπλένουμε ήπια με ρέον νερό της βρύσης, στεγνώνουμε με απορροφητικό χαρτί και τοποθετούμε μία καλυπτρίδα.
6. Εξετάζουμε το χρωσμένο επίχρισμα σε φωτομικροσκόπιο με ελαιοκαταδυτικό φακό και με κλίμακα μεγέθυνσης 1 000 x.
Τα κοκκία PHB στα κύτταρα της *Ralstonia solanacearum* εμφανίζονται χρωσμένα μπλε-μαύρα. Το κυτταρικό τοίχωμα εμφανίζεται με ροζ χρώση.

Άλλες δοκιμές

Άλλες κατάλληλες δοκιμές διαλογής είναι η δοκιμή IF (μέρος III.2) η δοκιμή ELISA (μέρος III.3) και η δοκιμή PCR (μέρος III.4).

3. Διαδικασία απομόνωσης

- 3.1. Λαμβάνεται ξίδρωμα ή τμήματα μεταχρωματισμένου ιστού από τον αγγειώδη δακτύλιο του κονδύλου πατάτας ή τις αγγειώδεις δέσμες του στελέχους πατάτας ή τοματάς. Παρασκευάζεται αιώρημα των ανωτέρω σε μικρό όγκο αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού ή σε 50 mM φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος. Το αιώρημα αφήνεται για 5-10 λεπτά πάνω στον πάγκο.

- 3.2. Παρασκευάζονται σειρές δεκαπλών αραιώσεων του αιωρήματος π.χ. 1/10 και 1/100 ή περισσότερες αν θεωρηθεί απαραίτητο.

- 3.3. Συγκεκριμένη ποσότητα του αιωρήματος και των αραιώσεων μεταφέρεται σε γενικής χρήσης θρεπτικό υπόστρωμα (NA, YPGA και SPA, προσάρτημα 1) ή/και σε υπόστρωμα του Kelman με tetrazolium (προσάρτημα 1) ή/και σε εκλεκτικό υπόστρωμα SMSA (προσάρτημα 7) και απλώνεται ή εξαπλώνεται γραμμωτά με κατάλληλη τεχνική αραιώσεως επί του υποστρώματος. Αν θεωρηθεί χρήσιμο, προετοιμάζονται ξεχωριστά τρυβλία από κάθε υπόστρωμα με αραιωμένο αιώρημα καλλιέργειας παθογόνου στελέχους *Ralstonia solanacearum* βιοποιικιλίας 2, φυλής 3 που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας.

- 3.4. Τα τρυβλία επωάζονται 3 ημέρες στους 28°C. Η επώαση μπορεί να παραταθεί στις 6 ημέρες, αν η ανάπτυξη είναι αργή, αλλά οι αποικίες επί SMSA συχνά γίνονται μη τυπικές και νεκρώνονται.

Στα γενικής χρήσεως θρεπτικά υποστρώματα οι παθογόνες απομονώσεις *Ralstonia solanacearum* αναπτύσσουν μαργαριτώδους χροιάς λευκές, επίπεδες, ακανόνιστες και ρευστώδεις αποικίες που εμφανίζουν συχνά χαρακτηριστικές σπείρες.

Σε υπόστρωμα Kelman με tetrazolium, τυπικές αποικίες παθογόνων απομονώσεων του *Ralstonia solanacearum* είναι κρεμώδεις, επίπεδες, με ακανόνιστο περιθώριο και υδαρείς με αματέρρυθρες ελικώσεις στο κέντρο. Μη παθογόνες απομονώσεις του *Ralstonia solanacearum* αναπτύσσουν βουτυρώδεις έντονα ερυθρές αποικίες.

Στο SMSA, τυπικές αποικίες παθογόνων απομονώσεων του *Ralstonia solanacearum* αναπτύσσουν γαλακτώδους χροιάς λευκές, επίπεδες, ακανόνιστες στο περιθώριο και ρευστώδεις αποικίες με αματέρρυθρα κέντρα.

Οι μη παθογόνες μορφές *Ralstonia solanacearum* αναπτύσσουν λιγότερο ρευστώδεις αποικίες, οι οποίες στο SMSA εμφανίζονται τελείως ροζ προς ερυθρές.

- 3.5. Οι αποικίες με χαρακτηριστική μορφολογία καθαρίζονται με εκ νέου καλλιέργεια σε γενικής χρήσεως θρεπτικό υπόστρωμα. Πρέπει να αποφεύγονται επανειλημμένες εκ νέου καλλιέργειες γιατί αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της παθογένειας.

4. Δοκιμη(-ές) επιβεβαίωσης

- 4.1. *Ταυτοποίηση του Ralstonia solanacearum*

Η ταυτοποίηση καθαρών καλλιεργειών του *Ralstonia solanacearum* γίνεται με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

Θρεπτικές και ενζυματικές δοκιμές

Σημείωση: Να περιλαμβάνονται κατάλληλα στελέχη ως μάρτυρες σε κάθε δοκιμή.

Η *Ralstonia solanacearum* παρουσιάζει ή όχι εν γένει τις ακόλουθες φαινοτυπικές ιδιότητες:

Φθορίζουσα χρωστική	-
Έγλειστα PHB	+
Δοκιμή οξειδωσης/ζύμωσης (O/F)	O+/F-
Κατάλαση	+
Οξειδάση Kovacs	+
Αναγωγή νιτρικών	+
Χρησιμοποίηση κιτρικών	+
Ανάπτυξη σε 40 °C	-
Ανάπτυξη σε 1 % NaCl	+
Ανάπτυξη σε 2 % NaCl	-
Διυδρολάση αργινίνης	-
Ρευστοποίηση ζελατίνης	-
Υδρόλυση αμύλου	-
Υδρόλυση αισκουλίνης	-
Παραγωγή levan	-

Υλικά και μέθοδοι παρέχονται στην εργασία των Lelliott & Stead (1987).

Δοκιμή IF

Παρασκευάζουμε αιώρημα 10⁶ κυττάρων ανά ml από την καλλιέργεια και ένα θετικό μάρτυρα. Παρασκευάζουμε επίσης μία σειρά αραιώσεων του αντιπορού στο διπλάσιο. Εφαρμόζουμε τη διαδικασία IF (μέρος III.2). Ο τίτλος IF της καλλιέργειας πρέπει να είναι ισοδύναμος με εκείνον του θετικού μάρτυρα.

Δοκιμή ELISA

Παρασκευάζουμε αιώρημα >10⁶ κυττάρων ανά ml από την καλλιέργεια και ένα θετικό μάρτυρα. Εφαρμόζουμε τη διαδικασία ELISA (μέρος III.3). Ο τίτλος ELISA της καλλιέργειας πρέπει να είναι ισοδύναμος με εκείνον του θετικού μάρτυρα.

Δοκιμή PCR

Παρασκευάζουμε αιώρημα 10⁶ κυττάρων ανά ml από την καλλιέργεια και ένα θετικό μάρτυρα. Εφαρμόζουμε τη διαδικασία PCR (μέρος III.4). Το προϊόν PCR της καλλιέργειας πρέπει να έχει το ίδιο μέγεθος και μορφή REA με εκείνα του θετικού μάρτυρα.

Φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH)

Παρασκευάζουμε αιώρημα 10⁶ κυττάρων ml από την καλλιέργεια και ένα θετικό μάρτυρα. Εφαρμόζουμε τη διαδικασία FISH (van Beuningen *et al.*, 1995) χρησιμοποιώντας τον εκκινητή (primer) PCR OLI-1 (Seal *et al.*, 1993). Η καλλιέργεια πρέπει να εμφανίζει την ίδια αντίδραση με το θετικό μάρτυρα.

Προφίλ πρωτεϊνών

Οι μετουσιωμένες ολοκυτταρικές πρωτεΐνες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου — PAGE (Stead, 1992a).

Προφίλ σε λιπαρά οξέα (FAP)

Αναπτύσσουμε την καλλιέργεια και ένα στέλεχος θετικού μάρτυρα για 48 ώρες στους 28°C σε trypticase soy agar και εφαρμόζουμε τη διαδικασία FAP (Janse, 1991, Stead, 1992a, Stead, 1992b). Το προφίλ λιπαρών οξέων της καλλιέργειας πρέπει να είναι ίδιο με εκείνο του θετικού μάρτυρα. Στις καθορισμένες συνθήκες, τα χαρακτηριστικά λιπαρά οξέα είναι 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH και 18:1 2OH.

4.2. Χαρακτηρισμός στελέχους

Ο χαρακτηρισμός του στελέχους είναι προαιρετικός αλλά συστήνεται για κάθε νέα περίπτωση, χρησιμοποιώντας τουλάχιστον μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

Χαρακτηρισμός βιοποικιλίας

H *Ralstonia solanacearum* διαχωρίζεται σε βιοποικιλίες βάσει της ικανότητάς της να παράγει οξύ από τρεις εξοξολακόλες και τρία σάκχαρα (Hayward, 1964 & 1994).

	Βιοποικιλία				
	1	2	3	4	5
Χρήση:					
— μαλτόζης	-	+	+	-	+
— λακτόζης	-	+	+	-	+
— κελλοβιόζης	-	+	+	-	+
— μαννιτόλης	-	-	+	+	+
— σορβιτόλης	-	-	+	+	-
— δουλκιτόλης	-	-	+	+	-

Με πρόσθετες δοκιμές, η βιοποικιλία 2 μπορεί να διαφοροποιηθεί σε υποφαινοτύπους (Hayward, 1994):

	Βιοποικιλία 2	Βιοποικιλία 2-A	Βιοποικιλία 2-T
Χρήση τρεαλόζης	-	+	+
Χρήση ινοσιτόλης	+	-	+
Χρήση D-ριβόζης	-	-	+
Πηκτινολυτική δράση	μικρή	μικρή	μεγάλη

Προσδιορισμός φυλής

H φυλή (Buddenhagen *et al.*, 1962) μπορεί να προσδιορισθεί με βάση μία δοκιμή παθογένειας σε φυτά τομάτας ή μελιτζάνας και σε φυτά καπνού και με μία αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) σε φύλλα καπνού (Lozano και Sequeira, 1970):

	Φυλή (*)		
	1	2	3
Αντίδραση σε:			
— φυτά τομάτας/μελιτζάνας	μαρασμός	μη αντίδραση	μαρασμός
— φυτά καπνού	μαρασμός	μη αντίδραση	μη αντίδραση
— φύλλα καπνού	νέκρωση (48 ώρες) και μαρασμός (7-8 ημ.)	HP (12-24 ώρες)	χλώρωση (2-8 ημέρες)

(*) Η φυλή 4 (παθογόνος στο ginger και μερικούς άλλους ξενιστές) και η φυλή 5 (παθογόνος στη μουριά μόνο) δεν περιλαμβάνονται.

Ο χαρακτηρισμός της φυλής με τις δοκιμές παθογένειας ή υπερευαισθησίας σε καπνό, δεν είναι ίσως πολύ αξιόπιστος και αντ' αυτών μπορεί να προκύψει από τη βιοποικιλία και το φυσικό ξενιστή προέλευσης.

Το γενωμικό αποτύπωμα

H μοριακή διαφοροποίηση των στελεχών στο σύμπλοκο *Ralstonia solanacearum* μπορεί να γίνει με:

Ανάλυση RFLP (Cook *et al.*, 1989)

Επαναληπτική αλληλουχία PCR [REP-, ERIC- & BOX-PCR (Louws *et al.*, 1995· Smith *et al.*, 1995)].

4.3.

Δοκιμή παθογένειας

H δοκιμή αυτή αποσκοπεί στην επιβεβαίωση της διάγνωσης του *Ralstonia solanacearum* και την εκτίμηση της παθογένειας των καλλιέργειών που ταυτοποιούνται ως *Ralstonia solanacearum*.

Παρασκευάζουμε μόλυσμα με 10^6 κύτταρα ανά ml από την καλλιέργεια και ένα θετικό στέλεχος μάρτυρα. Μολύνουμε 5-10 φυτά τομάτας ή μελιτζάνας στο τρίτο κατά προτίμηση πραγματικό στάδιο φυλλοφορίας (μέρος ΠΙ.6). Αφήνουμε για επώαση μέχρι 2 εβδομάδες σε θερμοκρασία 22-28°C και υψηλή σχετική υγρασία με καθημερινό πότισμα. Παρατηρούμε αν εμφανίζονται συμπτώματα μαρασμού ή/και επινασία, χλώρωση ή νανισμός.

Απομονώνουμε από φυτά που παρουσιάζουν συμπτώματα, ως ακολούθως:

— αφαιρούμε ένα μέρος ιστού από το στέλεχος, 2 cm πάνω από το σημείο μόλυνσης,

— τεμαχίζουμε τους ιστούς και παρασκευάζουμε αιώρημα σε ένα μικρό όγκο αποστειρωμένου, αποσταγμένου νερού ή σε 50 mM φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολούθως γίνεται εξάπλωση επί στερεού θρεπτικού υποστρώματος, επώαση και έλεγχος παρουσίας τυπικών αποικιών του *Ralstonia solanacearum*.

ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ RALSTONIA SOLANACEARUM ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΟΝΔΥΛΩΝ ΠΑΤΑΤΑΣ

Σημείωση: Το κανονικό μέγεθος δείγματος είναι 200 κόνδυλοι. Η δοκιμασία όμως μπορεί να εφαρμοσθεί και για δείγματα μικρότερα των 200 κονδύλων.

1. Προετοιμασία του δείγματος για δοκιμή

Σημείωση: Το εκχυλισμένο ίζημα πατάτας που λαμβάνεται με τη διαδικασία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση της *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Εφόσον κριθεί σκόπιμο, μπορούν να γίνουν και οι εξής προκαταρκτικές εργασίες:

- i) το δείγμα επωάζεται στους 25-30°C για διάστημα μέχρι 2 εβδομάδες για την ενθάρρυνση πολλαπλασιασμού τυχόν χαμηλών πληθυσμών *Ralstonia solanacearum*
- ii) οι κόνδυλοι πλένονται κάτω από ρέον νερό της βρύσης με κατάλληλα απολυμαντικά και απορρυπαντικά. Οι κόνδυλοι στεγνώνουν στον αέρα.

1.1. Με ένα καθαρό και απολυμασμένο νυστέρι ή ειδικό μαχαίρι λαχανικών, αφαιρείται η επιδερμίδα γύρω από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου του κόνδυλου έτσι ώστε να φανούν πρώτα οι αγγειώδεις ιστοί. Αποκόπτουμε με προσοχή ένα μικρό κώνο (διάμετρος 3-5 mm) αγγειώδους ιστού από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου κάθε κόνδυλου. Προσοχή ώστε η αφαιρούμενη ποσότητα μη αγγειώδους ιστού να είναι η ελάχιστη δυνατή. Συνέχιση της διαδικασίας για κάθε κόνδυλο του δείγματος.

Σημείωση: Στο στάδιο αυτό οι κόνδυλοι μπορούν να εξεταστούν μακροσκοπικά (μέρος ΙΙ.1). Κάθε κόνδυλος με συμπτώματα ή έντονη σήψη αφήνεται παράμερα και εξετάζεται χωριστά (μέρος ΙΙ).

1.2. Οι κώνοι ιστών συλλέγονται μέσα σε ένα κλειστό δοχείο. Κατά προτίμηση, οι κώνοι από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου πρέπει να υποβάλλονται σε κατεργασία αμέσως. Εάν αυτό δεν είναι δυνατόν, αποθηκεύονται για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο από 24 ώρες, ή στους 4°C για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από 72 ώρες.

1.3. Οι κώνοι από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου υποβάλλονται σε κατεργασία με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

i) Οι κώνοι μεταφέρονται σε κατάλληλο δοχείο.

Προστίθεται ικανή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος διαβροχής (προσάρτημα 2) ώστε να καλυφθούν οι κώνοι.

Οι κώνοι θρυματίζονται σε ένα **Waring-Blender** (μίξερ) ή με **Ultra Thurrax** μέχρι πλήρους ομοιογενοποίησης. Πρέπει να αποφεύγεται η υπερβολική ομοιογενοποίηση.

Αφήνουμε το προϊόν να διαβραχεί για 15-30 λεπτά.

ii) Οι κώνοι μεταφέρονται σε κατάλληλο δοχείο.

Προστίθεται ικανή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος διαβροχής ώστε να καλυφθούν οι κώνοι.

Το δοχείο τοποθετείται σε περιστροφικό αναδευτήρα.

Το περιεχόμενο αφήνεται να επωαστεί σε 50-100 rpm για 4 ώρες στους 20-22°C ή για 16-24 ώρες στους 4°C.

iii) Οι κώνοι μεταφέρονται σε ένα ανθεκτικό σάκο διαβροχής μίας χρήσης (π.χ. σάκκο **Stomacher** με διαστάσεις 105 mm × 150 mm, αποστειρωμένο με ακτινοβολία).

Οι κώνοι συνθλίβονται προσεκτικά με ένα κατάλληλο εργαλείο, π.χ. σφυρί, μέχρι πλήρους ομοιογενοποίησης.

Προστίθεται ικανή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος διαβροχής για την επικάλυψη των συνθλιμμένων κώνων και το υγρό διαβροχής αφήνεται να κατακαθίσει για 15-30 λεπτά της ώρας.

1.4. Τα βακτήρια εξάγονται από τους κατεργασμένους κώνους με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

i) Το υγρό διαβροχής μεταγγίζεται απαλά μέσα σε σωλήνα φυγοκέντρησης αφήνοντας τυχόν υπολείμματα ιστού μέσα στο δοχείο ή τον σάκο. Εφόσον το μεταγγιζόμενο υγρό διαβροχής εμφανίζεται θολό φυγοκεντρείται με ταχύτητα όχι μεγαλύτερη από 180 xg για 10 λεπτά σε θερμοκρασία κάτω από τους 10°C.

Το μεταγγισθέν υγρό διαβροχής ή το υπερκείμενο υγρό από το πρώτο στάδιο φυγοκέντρησης φυγοκεντρείται με ταχύτητα 7 000 xg για 15 λεπτά ή με ταχύτητα 10 000 xg για 10 λεπτά σε θερμοκρασία μικρότερη από τους 10°C.

Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται προσέχοντας να μη διαταραχθεί το ίζημα.

ii) Το υγρό διαβροχής διηθείται μέσω φίλτρου με μέγεθος πόρων 40-100 μm. Η διήθηση ενισχύεται με αντλία κενού.

Το διήθημα συλλέγεται σε ένα σωλήνα φυγοκέντρησης.

Το φίλτρο πλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα διαβροχής.

Το διήθημα φυγοκεντρείται με ταχύτητα 7 000 xg για 15 λεπτά ή με ταχύτητα 10 000 xg για λεπτά σε θερμοκρασία μικρότερη από τους 10°C.

Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται προσέχοντας να μη διαταραχθεί το ίζημα.

- 1.5. Το ζήτημα αναδιαλύεται σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος του ζιήματος (προσάρτημα 2). Το αιώρημα διαιρείται σε δύο ίσα μέρη και κάθε μέρος μεταφέρεται σε ένα μικροφιαλίδιο. Το ένα μικροφιαλίδιο χρησιμοποιείται για τη δοκιμή. Το υπόλοιπο από το εκχύλισμα αυτό διατηρείται κατά τη διάρκεια της δοκιμής στους 4°C.

Στο άλλο μικροφιαλίδιο προστίθεται αποστειρωμένη γλυκερίνη σε τελική συγκέντρωση 10-25% (V/V). Ανακατεύεται με στροβιλισμό (vortex). Αποθηκεύεται στους -18°C (εβδομάδες) ή στους -70°C (μήνες).

2. Δοκιμή ανοσοφθορισμού (IF)

Χρησιμοποιείται αντιορός για *Ralstonia solanacearum*, κατά προτίμηση για φυλή 3, βιοποιικιλία 2. Ο τίτλος προσδιορίζεται σε αιώρημα 10⁶ κυττάρων ανά ml από το ομόλογο στέλεχος *Pseudomonas solanacearum* με κατάλληλη αραιώση συμπλόκου ισοθειοκυανικής φθορείσίνης (FITC), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο πρωτογενής αντιορός πρέπει να έχει τίτλο IF τουλάχιστον 1:2 000.

Χρησιμοποιούνται πολυφατνιακές αντικειμενοφόροι πλάκες μικροσκοπίου με 10 κατά προτίμηση φατνία διαμέτρου τουλάχιστον 6 mm.

Σε κάθε αντικειμενοφόρο περιλαμβάνεται μάρτυρας συμπλόκου FITC. Αν τυχόν στο μάρτυρα FITC παρατηρηθούν θετικά κύτταρα η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται συμπεριλαμβάνοντας και το μάρτυρα PBS.

Παρασκευάζονται ξεχωριστά ως θετικοί μάρτυρες αντικειμενοφόροι με αιώρημα 10⁶ κυττάρων ανά ml από στέλεχος *Pseudomonas solanacearum* κατάλληλης φυλής/βιοποιικιλίας (π.χ. φυλής 3, βιοποιικιλίας 2). Σε κάθε σειρά δοκιμών χρησιμοποιείται μία αντικειμενοφόρος.

- 2.1. Οι προς δοκιμή αντικειμενοφόροι ετοιμάζονται με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

- i) Σε περίπτωση ζιήμάτων με μικρή σχετικά ποσότητα αμύλου:

Σε μία σειρά φατνίων, φέρεται μετρημένος με σιφόνιο συγκεκριμένος όγκος (15 μl είναι αρκετός για φατνία με διάμετρο 6 mm — ο όγκος κλιμακώνεται προς τα άνω για μεγαλύτερα φατνία) του αιωρήματος του ζιήματος. Η άλλη σειρά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείγμα εις διπλούν ή για ένα δεύτερο δείγμα όπως φαίνεται στην εικόνα 1.

- ii) Σε περίπτωση άλλων ζιήμάτων:

Παρασκευάζονται δεκαπλές αραιώσεις, δηλαδή 1/10, 1/100 και 1/1 000 του αιωρήματος του ζιήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα ζιήματος. Σε μία σειρά φατνίων, φέρεται μετρημένος με σιφόνιο συγκεκριμένος όγκος (15 μl είναι αρκετός για φατνία με διάμετρο 6 mm — ο όγκος κλιμακώνεται προς τα άνω για μεγαλύτερα φατνία) του αιωρήματος του ζιήματος από κάθε αραιώση. Η άλλη σειρά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείγμα εις διπλούν ή για ένα δεύτερο δείγμα όπως φαίνεται στην εικόνα 2.

- 2.2. Το περιεχόμενο των φατνίων αφήνεται να ξηρανθεί. Τα βακτηριακά κύτταρα στην αντικειμενοφόρο προσηλώνονται με θέρμανση, με φλόγα ή με 95% αιθανόλη.

2.3. Διαδικασία IF

- i) Σύμφωνα με την ετοιμασία της αντικειμενοφόρου στο σημείο 2.1.i):

Παρασκευάζεται μία σειρά αραιώσεων του αντιορού στο διπλάσιο σε ρυθμιστικό διάλυμα για IF (προσάρτημα 3):

1/4 του τίτλου (T/4), 1/2 του τίτλου (T/2), ο τίτλος (T) και το διπλάσιο του τίτλου (2T).

- ii) Σύμφωνα με την ετοιμασία της αντικειμενοφόρου στο σημείο 2.1.ii):

Παρασκευάζεται η αραιώση εργασίας (WD) του αντιορού σε ρυθμιστικό διάλυμα για IF. Αραιώση εργασίας είναι η αραιώση του αντιορού που εμφανίζει την καλύτερη εξειδίκευση και είναι συνήθως το μισό του τίτλου.

Εικόνα 1

Ετοιμασία της αντικειμενοφόρου δοκιμής σύμφωνα με τα σημεία 2.1.i) και 2.3.i)

Καθορισμένη αραιώση αιωρήματος ζιήματος

(T = τίτλος)

	FITC	T/4	T/2	T	2T	⇒ Αραιώσεις αντιορού
Δείγμα 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Δείγμα 1 εις διπλούν ή δείγμα 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Εικόνα 2

Ετοιμασία της αντιικεμενοφόρου δοκιμής σύμφωνα με τα σημεία 2.1.ii) και 2.3.ii)

	FITC		Καθορισμένη αραιώση αντιορού			⇒ Δεκαδική αραιώση ιζήματος
	Μη αραιωμένο	Μη αραιωμένο	1/10	1/100	1/1 000	
Δείγμα 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Δείγμα 1 εις διπλούν ή δείγμα 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

- 2.3.1. Οι αντιικεμενοφόροι τοποθετούνται πάνω σε ένυγρο απορροφητικό χαρτί.
Τα φατνία δοκιμής καλύπτονται με την ή τις αραιώσεις του αντιορού. Στα φατνία FITC φέρεται PBS. Ο όγκος του χρησιμοποιούμενου στα φατνία αντιορού πρέπει να είναι ισοδύναμος με τον όγκο του χρησιμοποιούμενου εκχυλίσματος.
- 2.3.2. Οι αντιικεμενοφόροι τοποθετούνται κάτω από ένα κάλυμμα και επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- 2.3.3. Τα σταγονίδια του αντιορού απομακρύνονται με ένα ελαφρό τίνιγμα από την αντιικεμενοφόρο και οι αντιικεμενοφόροι ξεπλένονται προσεκτικά με ρυθμιστικό διάλυμα IF. Πλύση επί 5 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα-Tween IG και ακολούθως επί 5 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα IF (προσάρτημα 3).
Η περίσσεια του υγρού απομακρύνεται προσεκτικά.
- 2.3.4. Οι αντιικεμενοφόροι τοποθετούνται πάνω σε ένυγρο απορροφητικό χαρτί.
Τα φατνία δοκιμής και το φατνίο του FITC καλύπτονται με την αραιώση του συμπλόκου FITC που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του τίτλου. Ο όγκος του χρησιμοποιούμενου στα φατνία συμπλόκου πρέπει να είναι ίδιος με τον όγκο του χρησιμοποιούμενου αντιορού.
- 2.3.5. Οι αντιικεμενοφόροι τοποθετούνται κάτω από ένα κάλυμμα και επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- 2.3.6. Τα σταγονίδια του συμπλόκου τινάζονται μακριά από την αντιικεμενοφόρο και οι αντιικεμενοφόροι ξεπλένονται και πλένονται όπως προηγουμένως (2.3.3). Η περίσσεια του νερού απομακρύνεται προσεκτικά.
- 2.3.7. Σε κάθε φατνίο φέρονται με σιφόνιο 5-10 μl φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος γλυκερίνης 0,1M (προσάρτημα 3) ή παρομοίου ρευστού και τα φατνία καλύπτονται με μία καλυπτρίδα.

2.4. Ανάγνωση της δοκιμής IF

Οι αντιικεμενοφόροι δοκιμής εξετάζονται σε μικροσκόπιο επιφθορισμού με φίλτρα κατάλληλα για την διέγερση του FITC, με ελαιοκαταδυτικό φακό και με μεγέθυνση 50-1 000. Τα φατνία εξετάζονται κατά μήκος δύο καθέτων διαμέτρων και κατά την περιμέτρω τους. Πρώτα ελέγχεται η αντιικεμενοφόρος του θετικού μάρτυρα. Τα κύτταρα πρέπει να είναι πλήρως χρωσμένα με λαμπρό φθορισμό.

Σημείωση: Σε περίπτωση αποτυχίας, η δοκιμή επαναλαμβάνεται.

Τίνεται ανάγνωση αντιικεμενοφόρων δοκιμής.

Ελέγχεται κατ' αρχάς ότι δεν υπάρχουν φθορίζοντα κύτταρα στα φατνία των μαρτύρων FITC. Αν υπάρχουν φθορίζοντα κύτταρα στο φατνίο FITC αυτό δείχνει μη ειδική σύζευξη του συμπλόκου, αυτοφθορισμό ή επιμόλυνση.

Σημείωση: Στις περιπτώσεις αυτές, η δοκιμή επαναλαμβάνεται.

Εξετάζεται αν υπάρχουν φθορίζοντα κύτταρα με τη χαρακτηριστική μορφολογία της *Pseudomonas solanacearum* στα φατνία δοκιμής. Η ένταση του φθορισμού πρέπει να είναι ίδια με εκείνη του θετικού μάρτυρα με ίδια αραιώση αντιορού. Κύτταρα με ατελή χρώση ή με ασθενή φθορισμό δεν πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, εκτός κι αν υπάρχουν πολλά τέτοια κύτταρα (βλέπε ερμηνεία αποτελεσμάτων της δοκιμής IF).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής IF

- Εφόσον σε ένα δείγμα δεν ανευρίσκονται λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με χαρακτηριστική μορφολογία, η δοκιμή IF είναι αρνητική.
- Εφόσον σε ένα δείγμα βρίσκονται λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με χαρακτηριστική μορφολογία, προσδιορίζεται ο μέσος αριθμός κυττάρων ανά πεδίο μικροσκοπίου και υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων (N) ανά ml του αναδιαλυμένου ιζήματος (προσάρτημα 4).

Ένας πληθυσμός 10^3 περίπου ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος, θεωρείται το όριο ανίχνευσης της δοκιμής IF:

- σε δείγματα με $N > 10^3$ κύτταρα ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος, η δοκιμή IF θεωρείται θετική,
- σε δείγματα με $N > 10^3$ κύτταρα ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος, η δοκιμή IF μπορεί να θεωρηθεί ως θετική.

- iii) Αν παρατηρηθούν μεγάλοι αριθμοί ($N > 10^5$ κύτταρα ανά ml) κυττάρων με ατελή ή ασθενή φθορισμό, με τον τίτλο του αντιορού, πρέπει να πραγματοποιείται μία δεύτερη δοκιμή:
- είτε μία δοκιμή βασισμένη σε μία διαφορετική βιολογική αρχή,
 - ή επανάληψη της δοκιμής IF, με ένα δεύτερο αντιορό ή με 10 φορές αραιωμένο ίζημα.

3. Δοκιμή ELISA

(βασίζεται στην εργασία των Robinson-Smith et al., 1995)

Χρησιμοποιείται αντιορός για *Ralstonia solanacearum*, κατά προτίμηση έναντι φυλής 3, βιοποικιλίας 2. Ο τίτλος προσδιορίζεται σε αιώρημα 10^6 κυττάρων ανά ml από το ομόλογο στέλεχος *Pseudomonas solanacearum*.

Συνιστάται η χρήση μικρότιτλων πλακών NUNC Polysorp.

Περιλαμβάνεται ένας αρνητικός μάρτυρας εκχυλίσματος πατάτας και ένας μάρτυρας από ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα αλατιού (PBS).

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται αιώρημα $> 10^6$ κυττάρων ανά ml από στέλεχος *Ralstonia solanacearum* κατάλληλης φυλής/βιοποικιλίας. Η δοκιμή γίνεται με ταυτόσημο τρόπο με εκείνη του ή των δειγμάτων αλλά διαχωρίζεται σαφώς από τα δείγματα στη πλάκα.

- 3.1. 100-200 μ l του αιωρήματος του ιζήματος φέρονται με σιφόνιο σε ένα μικροφιαλίδιο και θερμαίνονται για 4 λεπτά στους 100°C . Κατόπιν το μικροφιαλίδιο τοποθετείται σε πάγο.
- 3.2. Προστίθεται ίσος όγκος ανθρακικού ρυθμιστικού διαλύματος επικάλυψης διπλής ιοντικής ισχύος (προσάρτημα 5) και το περιεχόμενο ανακατεύεται σε συσκευή vortex.
- 3.3. Σε δύο τουλάχιστον φατνία της μικρότιτης πλάκας φέρονται από 100 μ l του ανωτέρω διαλύματος και επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C ή όλη τη νύκτα στους 4°C .
- 3.4. Η πλάκα τινάζεται ελαφρά για να απομακρυνθούν τα εκχυλίσματα από τα φατνία. Τα φατνία πλένονται τρεις φορές με PBS-Tween (προσάρτημα 5), αφήνοντας το τελευταίο διάλυμα πλυσίματος στα φατνία για 5 λεπτά τουλάχιστον.
- 3.5. Παρασκευάζεται η κατάλληλη αραιώση αντιορού *Ralstonia solanacearum* σε ρυθμιστικό διάλυμα δεσμεύσεως (προσάρτημα 5). Στα φατνία φέρονται 100 μ l αραιώσεως αντιορού.
Επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C .
- 3.6. Η πλάκα τινάζεται ελαφρά για να απομακρυνθεί ο αντιορός από τα φατνία και τα φατνία πλένονται όπως και προηγουμένως (σημείο 3.4).
- 3.7. Παρασκευάζεται η κατάλληλη αραιώση συμπλόκου αλκαλικής φωσφατάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα δεσμεύσεως. Φέρονται στα φατνία 100 μ l από αυτή και επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C .
- 3.8. Η πλάκα τινάζεται ελαφρά για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του συμπλόκου από τα φατνία και τα φατνία πλένονται όπως και προηγουμένως (σημεία 3.4 και 3.6).
- 3.9. Παρασκευάζεται διάλυμα υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης (προσάρτημα 5). Φέρονται στα φατνία 100 μ l από αυτό και ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά έως 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία εργαστηρίου.
- 3.10. Διαβάζεται η απορρόφηση στα 409 nm.

Ερμηνεία της δοκιμής ELISA

Η δοκιμή ELISA είναι αρνητική εάν η οπτική πυκνότητα (O.D) του δείγματος είναι $< 2 \times \text{O.D}$ του αρνητικού μάρτυρα.

Η δοκιμή ELISA είναι θετική εάν η οπτική πυκνότητα (O.D) του δείγματος είναι $> 2 \times \text{O.D}$ του αρνητικού μάρτυρα.

4. Δοκιμή PCR

(βασίζεται στην εργασία των Seal et al., 1993)

Σημείωση: Κατά τη διάρκεια της παρασκευής του δείγματος καθώς και των υπόλοιπων εργασιών για τη δοκιμή PCR, πρέπει να χρησιμοποιούνται ογκομετρικά ακροστόμια (pipette tips) με φίλτρο.

Παρασκευάζεται αιώρημα 10^6 κυττάρων ανά ml από στέλεχος *Ralstonia solanacearum* φυλής 3, βιοποικιλίας 2 ως θετικός μάρτυρας. Η δοκιμή γίνεται με ταυτόσημο τρόπο με εκείνη του ή των δειγμάτων.

- 4.1. 100 μ l του αιωρήματος του ιζήματος φέρονται με σιφόνιο σε ένα μικροφιαλίδιο.
Εναλλακτικώς, 90 μ l του αιωρήματος μεταφέρονται σε μικροφιαλίδιο περιέχον 10 μ l NaOH 0,5M. Το περιεχόμενο του φιαλιδίου ανακατεύεται αναποδογυρίζοντας επανειλημμένα πάνω-κάτω το μικροφιαλίδιο.

- 4.2. Το φιαλίδιο θερμαίνεται για 4 λεπτά στους 100°C και κατόπιν απομακρύνεται αμέσως πάνω σε πάγο.
- 4.3. Παρασκευάζονται δύο τουλάχιστον δεκαδικές αραιώσεις, π.χ. 1/10 και 1/100, ή περισσότερες αν θεωρηθεί απαραίτητο, σε αποστειρωμένο απεσταγμένο ή υπέρ καθαρό νερό (UPW).
- 4.4. Παρασκευάζεται το μείγμα αντίδρασης PCR (προσάρτημα 6) προσθέτοντας σε αποστειρωμένο φιαλίδιο τα παρακάτω συστατικά με την ακόλουθη σειρά:

Για όγκο αντίδρασης 50 μ l

Συστατικό	Ποσότητα	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο απεσταγμένο ή UPW	30,8 μ l-33,8 μ l	—
10 x ρυθμιστικό διάλυμα PCR	5,0 μ l	1x
d-ATP	1,0 μ l	0,2 mM
d-CTP	1,0 μ l	0,2 mM
d-GTP	1,0 μ l	0,2 mM
d-TTP	1,0 μ l	0,2 mM
Εκκινητής OLI-1 (20 μ M)	2,5 μ l	1 μ M
Εκκινητής Y-2 (20 μ M)	2,5 μ l	1 μ M
Taq πολυμεράση (5U/ μ l)	0,2 μ l	1,0 U
Συνολικός όγκος	45 μ l—48 μ l	

Για περισσότερες αντιδράσεις

Υπολογίζεται η ποσότητα κάθε συστατικού για τον απαιτούμενο αριθμό αντιδράσεων.

Τα συστατικά αναμειγνύονται και 45 μ l-48 μ l του μείγματος μεταφέρονται σε αποστειρωμένα φιαλίδια PCR.

Τα φιαλίδια με το μείγμα αντίδρασης PCR διατηρούνται σε πάγο.

Για όγκο 25 μ l

Η ποσότητα των συστατικών μειώνεται αναλογικά.

- 4.5. Σύνθεση PCR
- 4.5.1. Προαιρετικό! Τα φιαλίδια με το βρασμένο δείγμα και τον θετικό μάρτυρα υποβάλλονται σε παλμική φυγοκέντρωση. Προστίθενται, με την καθοριζόμενη σειρά, 2-5 μ l του ή των δειγμάτων, υδατικού μάρτυρα και θετικού μάρτυρα στα φιαλίδια με το μείγμα αντίδρασης PCR. Τα φιαλίδια τοποθετούνται στο θερμικό μπλόκ στη μονάδα θέρμανσης του θερμικού κυκλοποιητή DNA.
- 4.5.2. Ακολουθείται το εξής πρόγραμμα:
- 1 κύκλος από:
- 2 λεπτά στους 96°C: μετουσίωση του αρχικού DNA
- 50 κύκλοι από:
- 20 δευτερόλεπτα στους 94°C: μετουσίωση
 - 20 δευτερόλεπτα στους 68°C: προσκόλληση εκκινητών
 - 30 δευτερόλεπτα στους 72°C: επέκταση αντιγράφου
- 1 κύκλος από:
- 10 λεπτά στους 72°C: περαιτέρω επέκταση
- 1 κύκλος συνιστάμενος σε:
- διατήρηση στους 4°C
- Σημείωση: Οι παράμετροι αυτές ισχύουν για θερμικό κυκλοποιητή DNA Perkin Elmer 9600. Άλλοι θερμικοί κυκλοποιητές μπορεί να απαιτούν επέκταση ορυκτελαίου στα φιαλίδια PCR ή/και τροποποίηση της διάρκειας των σταδίων ii), iii) και iv) στο πρόγραμμα σύνθεσης.
- 4.5.3. Τα φιαλίδια απομακρύνονται από τον θερμικό κυκλοποιητή. Το προϊόν PCR αναλύεται. Εάν αυτό δεν γίνει αμέσως, τα φιαλίδια αποθηκεύονται στους 4°C για χρήση την ίδια μέρα ή στους -18°C για αργότερα.
- 4.6. Ανάλυση του προϊόντος PCR
- Τα τμήματα DNA PCR ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αναρόξης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.
- 4.6.1. Παρασκευάζεται κατάλληλη πηκτή αναρόξης βράζοντας ήπια ποσότητα αναρόξης σε tris-οξεικό ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (TAE).

- 4.6.2. Η τηγμένη αгарόζη ψύχεται στους 50-60 °C, χύνεται στο καλούπι της μονάδας ηλεκτροφόρησης και εισάγεται η χτένα. Η πηκτή αφήνεται να στερεοποιηθεί.
- 4.6.3. Απομακρύνεται η χτένα. Η πηκτή βυθίζεται σε ΤΑΕ έτσι ώστε ίσα-ίσα να καλύπτεται (2-3 mm) από το ρυθμιστικό διάλυμα.
- 4.6.4. 3 μ l ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης φέρονται πάνω σε παραφίλμ. Προστίθενται 12 μ l του προϊόντος PCR από τα δείγματα, το θετικό μάρτυρα ή τον υδατικό μάρτυρα και αναμειγνύονται με ελαφρά αναρρόφηση στο ογκομετρικό ακροστόμιο πριν από την φόρτωση στην πηκτή. Οι αναφερόμενοι όγκοι μπορούν να τροποποιηθούν προκειμένου να προσαρμοστούν στη χωρητικότητα των φατνίων στην πηκτή αгарόζης.
- 4.6.5. Η φόρτωση γίνεται με προσοχή στα φατνία της πηκτής. Σε ένα τουλάχιστον φατνίο φέρεται για λόγους αναφοράς κατάλληλος ιχνηθέτης DNA.
- 4.6.6. Συνδέονται τα καλώδια στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και την πηγή τροφοδοσίας. Εφαρμόζεται τάση 5-8 V/cm μέχρις ότου το μέτωπο του ιχνηλάτη δείκτη φθάσει στο 1 cm από το άκρο της πηκτής.
- 4.6.7. Διακόπτεται η τροφοδοσία ρεύματος. Τα καλώδια αποσυνδέονται από τη μονάδα ηλεκτροφόρησης, απομακρύνεται με προσοχή η πηκτή και εμβαπτίζεται σε βρωμιούχο αιθίδιο για 30-45 λεπτά.
Σημείωση: Όταν χρησιμοποιούμε βρωμιούχο αιθίδιο, πρέπει να φορούμε πάντοτε γάντια γιατί είναι ισχυρό μεταλλαξιογόνο.
- 4.6.8. Ακολουθεί αποχρωματισμός σε απεσταγμένο νερό για 10-15 λεπτά.
- 4.6.9. Το ή τα συνθετικά τμήματα DNA εμφανίζονται με υπεριώδη ακτινοβολία. Το προϊόν PCR του *Ralstonia solanacearum* με εκκινητές OLI-1 και Y-2 έχει μήκος 288 bp. Συγκρίνεται σε σχέση με τον ιχνηθέτη DNA και τον θετικό μάρτυρα.
Σημείωση: Ο υδατικός μάρτυρας πρέπει σε κάθε περίπτωση να είναι αρνητικός. Εάν είναι θετικός, η δοκιμή επαναλαμβάνεται.
- 4.6.10. Η πηκτή, εφόσον χρειάζεται για το αρχείο, φωτογραφίζεται.
- 4.6.11. Η αυθεντικότητα του συνθετικού τμήματος DNA επιβεβαιώνεται με ανάλυση με ένζυμο περιορισμού (REA).
- 4.7. Ανάλυση με περιοριστικό ένζυμο (REA)
- 4.7.1. 8,5 μ l από το προϊόν PCR (σημείο 4.5.3) μεταφέρονται σε νέο μικροφιαλίδιο. Προστίθεται 1 μ l 10 x ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου και 0,5 μ l ένζυμο περιορισμού *Ava*II.
- 4.7.2. Αναμειγνύονται με ήπια αναρρόφηση στο ακροστόμιο. Εάν στα τοιχώματα του φιαλιδίου παραμείνουν σταγόνες, φυγοκεντρείται σε παλμική μικροφυγόκεντρο. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 37 °C.
- 4.7.3. Το τμήμα DNA που υέστη πέψη αναλύεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης όπως προηγούμενος (σημείο 4.6).
Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής PCR
Η δοκιμή PCR είναι αρνητική εφόσον δεν ανιχνεύεται το χαρακτηριστικό τμήμα 288 bp και το τμήμα ανιχνεύεται στο θετικό μάρτυρα *Ralstonia solanacearum*.
Η δοκιμή PCR είναι θετική εάν το τμήμα 288 bp ανιχνεύεται και η ανάλυση REA του συνθετικού τμήματος είναι ίδια με εκείνη του θετικού μάρτυρα *Ralstonia solanacearum*.
5. **Εκλεκτική απομόνωση επί στερεού υποστρώματος**
(βασίζεται στην εργασία των Elphinstone et al., 1996)
- 5.1. Η δοκιμή πραγματοποιείται με κατάλληλη τεχνική αραιώσεων επί στερεού υποστρώματος, π.χ.:
- Παρασκευάζονται δύο τουλάχιστον δεκαδικές αραιώσεις, συγκεκριμένα 1/10 και 1/100 ή περισσότερες αν θεωρηθεί χρήσιμο, του αιωρήματος του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος. Συγκεκριμένος όγκος (50-100 μ l) του αιωρήματος και κάθε αραιώσης μετρημένος με σιφόνιο φέρεται σε τροποποιημένο εκλεκτικό υπόστρωμα SMSA (προσάρτημα 7) και απλώνεται με μία γυάλινη ράβδο σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος.
Εφόσον κρίνεται σκόπιμο, πραγματοποιείται γραμμική εξάπλωση αραιώσης, 10 μ l αναδιαλυμένου ιζήματος περνώντας κάθε φορά τη βελόνα από φλόγα.
 - Συγκεκριμένος όγκος (50-100 μ l) του αιωρήματος μετρημένος με σιφόνιο μεταφέρεται σε τροποποιημένο εκλεκτικό υπόστρωμα SMSA και απλώνεται με μία γυάλινη ράβδο σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος. Η ράβδος σύρεται γραμμωτά σε δύο ακόμη τροποποιημένα τρυβλία SMSA χωρίς να την περάσουμε από φλόγα.
- 5.2. Αιώρημα 10⁶ κυττάρων ανά ml από παθογόνο στέλεχος *Ralstonia solanacearum* φυλής 3, βιοποικιλίας 2 που παίζει ρόλο θετικού μάρτυρα εξαπλώνεται, με την ίδια τεχνική, σε μία σειρά ξεχωριστών τρυβλίων τροποποιημένου SMSA.
- 5.3. Τα τρυβλία επωάζονται στους 28 °C. Μετά 3 ημέρες ξεκινά η ανάγνωση των τρυβλίων. Εάν το αποτέλεσμα είναι αρνητικό, αφήνονται να επωαστούν ακόμη μέχρι 6 ημέρες. Οι παθογόνες απομονώσεις *Ralstonia solanacearum* αναπτύσσουν γαλακτώδους χροιάς λευκές, επίπεδες, ακανόνιστες και ρευστώδεις αποικίες με διάκριτα ερυθρά προς το πορφυρούν κέντρα που εμφανίζουν εσωτερικές ραβδώσεις ή ελικώσεις.
- 5.4. Οι αποικίες με χαρακτηριστική μορφολογία καθαρίζονται με εκ νέου καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα γενικής χρήσεως (προσάρτημα 1).

- 5.5. Οι καθαρές καλλιέργειες ταυτοποιούνται (μέρος Π.4.1) και οι καλλιέργειες της *Ralstonia solanacearum* επιβαιώνονται με μία δοκιμή παθογένειας (μέρος Π.4.3).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής (εκλεκτικής απομόνωσης επί στερεού υποστρώματος)

Η δοκιμή είναι αρνητική εάν δεν απομονωθούν αποικίες βακτηρίων μετά 6 ημέρες ή εάν δεν απομονωθούν χαρακτηριστικές αποικίες *Pseudomonas solanacearum* υπό την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχουν υπόνοιες για παρεμπόδιση από αποικίες άλλων βακτηρίων και χαρακτηριστικές αποικίες της *Ralstonia solanacearum* απομονώνονται από τους θετικούς μάρτυρες.

Η δοκιμή είναι θετική εάν απομονωθούν χαρακτηριστικές αποικίες *Ralstonia solanacearum*.

6. Βιοδοκιμή

(βασίζεται στην εργασία του Janse, 1988)

- 6.1. Χρησιμοποιούνται 10 προς δοκιμή ευαίσθητα σπορόφυτα τομάτας ή μελιτζάνας ευρισκόμενα στο στάδιο του 3ου πραγματικού φύλλου για κάθε δείγμα. Τα φυτά δεν ποτίζονται για 24 ώρες πριν από τη μόλυνση.
- 6.2. 100 μl του αιωρήματος του ιζήματος κατανέμονται μεταξύ των πειραματοφύτων. Τα στελέχη μολύνονται μεταξύ των κοτυληδόνων και σε ένα ή περισσότερα άλλα σημεία.
- 6.3. 10 σπορόφυτα μολύνονται με την ίδια τεχνική με αιώρημα 10⁶ κυττάρων ανά ml από παθογόνο στέλεχος *Pseudomonas solanacearum* φυλής 3, βιοποικιλίας 2 για να χρησιμεύσουν ως θετικός μάρτυρας και με ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος για να χρησιμεύσουν ως αρνητικός μάρτυρας. Τα φυτά θετικοί μάρτυρες, διαχωρίζονται από τα άλλα φυτά προς αποφυγή επιμολύνσεων.
- 6.4. Τα σπορόφυτα αφήνονται να αναπτυχθούν για 4 εβδομάδες σε θερμοκρασία 22-28°C με καθημερινό πότισμα και υψηλή σχετική υγρασία. Παρατηρούμε αν θα παρουσιαστούν συμπτώματα μαρασμού, επιναστίας, χλώρωσης ή/και νανισμού.
- 6.5. Από τα προσβεβλημένα φυτά γίνεται απομόνωση (μέρος II). Ταυτοποιούνται οι καθαρές καλλιέργειες με χαρακτηριστική μορφολογία (μέρος Π.4.1) και οι καλλιέργειες της *Ralstonia solanacearum* επιβεβαιώνονται με δοκιμή παθογένειας (μέρος Π.4.3).
- 6.6. Αν θεωρηθεί χρήσιμο, ελέγχεται η απουσία μόλυνσης σε παρτίδες πειραματοφύτων που δεν παρουσιάζουν ένδειξη μόλυνσης. Από κάθε φυτό αφαιρείται τμήμα του στελέχους μήκους 1 cm από σημείο ευρισκόμενο σε απόσταση 2 cm πάνω από το σημείο μόλυνσης. Οι ιστοί ομοιογενοποιούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα διαβροχής. Εκτελείται δοκιμή απομόνωσης με την τεχνική των αραιώσεων σε στερεό υπόστρωμα (μέρος III.5.1). Εάν η δοκιμή αποδειχθεί θετική, οι καθαρές καλλιέργειες με χαρακτηριστική μορφολογία ταυτοποιούνται (μέρος Π.4.1) και οι καλλιέργειες *Ralstonia solanacearum* επιβεβαιώνονται με δοκιμή παθογένειας (μέρος Π.4.3).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της βιοδοκιμής

Η βιοδοκιμή είναι αρνητική αν τα φυτά δοκιμής δεν είναι προσβεβλημένα από *Ralstonia solanacearum* υπό τον όρο ότι η *Ralstonia solanacearum* ανιχνεύεται στους θετικούς μάρτυρες.

Η βιοδοκιμή είναι θετική αν τα φυτά δοκιμής είναι προσβεβλημένα από *Ralstonia solanacearum*.

7. Δοκιμή εμπλουτισμού

(βασίζεται στην εργασία των Elphinstone et al., 1996)

- 7.1. 100 μl του αιωρήματος του ιζήματος μεταφέρονται σε 3 ml τροποποιημένου ζωμού SMSA (προσάρτημα 7).
- 7.2. Επώζονται για 48 ώρες, εν πάση δε περιπτώσει όχι περισσότερο από 72 ώρες, στους 28°C διατηρώντας το καπάκι του σωλήνα προσαρμοσμένο χαλαρά για να αερίζονται.
- 7.3. Το καπάκι σφίγγεται και ακολουθεί ανάδευση σε συσκευή vortex. Λαμβάνεται κατάλληλη ποσότητα για τη δοκιμή IF (μέρος III.2), τη δοκιμή ELISA (μέρος III.3) ή/και τη δοκιμή PCR (μέρος III.4).

8. Δοκιμή παθογένειας

Αναφέρεται στο μέρος Π.4.3.

Προσάρτημα 1

Θρεπτικά υλικά για την απομόνωση και καλλιέργεια της *Ralstonia solanacearum***Nutrient Agar (NA)**

Nutrient Agar (Difco)	23 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Παρασκευάζονται ποσότητες ½ λίτρου από το θρεπτικό υλικό σε φιάλες 1 λίτρου.

Διαλύονται τα συστατικά.

Το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Ακολουθεί ψύξη μέχρι τους 50 °C και κατανέμεται σε τρυβλία.

Yeast-Peptone-Glucose-Agar (YPGA)

Yeast Extract (Difco)	5 g
Bacto Peptone (Difco)	5 g
D(+) γλυκόζη (μονοϋδροξική)	10 g
Bacto Agar (Difco)	15 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Παρασκευάζονται ποσότητες ½ λίτρου από το θρεπτικό υλικό σε φιάλες 1 λίτρου.

Διαλύονται τα συστατικά.

Το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Ακολουθεί ψύξη μέχρι τους 50 °C και κατανέμεται σε τρυβλία.

Sucrose Peptone Agar (SPA)

Σακχαρόζη	20 g
Πεπτόνη	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Bacto-Agar (Difco)	15 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Παρασκευάζονται ποσότητες ½ λίτρου από το θρεπτικό υλικό σε φιάλες 1 λίτρου.

Διαλύονται τα συστατικά και ρυθμίζεται το pH σε μία τιμή από 7,2 έως 7,4, αν είναι απαραίτητο.

Το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Ακολουθεί ψύξη μέχρι τους 50 °C και κατανέμεται σε τρυβλία.

Θρεπτικό υλικό Kelman's tetrazolium

Casamino acids (Difco)	1 g
Bacto Peptone (Difco)	10 g
Δεξτρόζη	5 g
Bacto Agar (Difco)	15 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Παρασκευάζονται ποσότητες ½ λίτρου από το θρεπτικό υλικό σε φιάλες 1 λίτρου.

Διαλύονται τα συστατικά.

Το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Ακολουθεί ψύξη μέχρι τους 50 °C.

Προστίθεται υδατικό διάλυμα χλωριούχου τριφαινυλο-τετραζολίου (Sigma), το οποίο έχει αποστειρωθεί με διήθηση από φίλτρο, ώστε να ληφθεί τελική συγκέντρωση 50 mg ανά λίτρο.

Το σύνολο κατανέμεται σε τρυβλία.

Προσάρτημα 2

Υλικά για την προετοιμασία του δείγματος δοκιμής

Ρυθμιστικό διάλυμα διαβροχής: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 50 mM, pH 7,0

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για τη διαβροχή ιστών.

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Διαλύονται τα συστατικά και ελέγχεται η τιμή του pH. Κατανέμονται κατάλληλες ποσότητες ανάλογα με τις ανάγκες.

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής PCR συνιστάται η προσθήκη διαλύματος poly vinyl pyrrolidone-40 000 (PVP-40) 5% προκειμένου να περιοριστεί η παρεμπόδιση της σύνθεσης DNA λόγω της παρουσίας αρωματικών μορίων στο εκχύλισμα.

Για τη διαβροχή των τεμαχίων των ιστών των γεωμύλων, συνιστάται η προσθήκη αντιοξειδωτικού, αντιαφριστικού παράγοντα ή αντιοξειδωτικού με την εφαρμογή της διαδικασίας ομογενοποίησης Waring Blender ή Ultra Thurrax.

Lubrol flakes	0,5 g ανά λίτρο
DC silicone antifoam	1,0 ml ανά λίτρο
Πυροφωσφορικό τετρανάτριο	1,0 g ανά λίτρο

Το υλικό αυτό αποστειρώνεται ξεχωριστά σε αυτόκαυστο. Ακολουθεί προσθήκη (στο υλικό διαβροχής), έως ότου ληφθεί η επιθυμητή συγκέντρωση.

Ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 10 mM, pH 7,2

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για τον επανασηματισμό αιωρήματος και την αραίωση των ιζημάτων των κώνων του σημείου πρόσφυσης του στολονίου των γεωμύλων.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Διαλύονται τα συστατικά και ελέγχεται η τιμή του pH. Κατανέμονται κατάλληλες ποσότητες ανάλογα με τις ανάγκες.

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

*Προσάρτημα 3***Υλικά για τη δοκιμή IF**

Ρυθμιστικό διάλυμα IF: φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 10 mM (PBS), pH 7,2

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για την αραίωση των αντιορών.

Na₂HPO₄·12 H₂O 2,7 g

NaH₂PO₄·2 H₂O 0,4 g

NaCl 8,0 g

Αποσταγμένο νερό 1 λίτρο

Διαλύονται τα συστατικά και ελέγχεται η τιμή του pH. Κατανέμονται κατάλληλες ποσότητες ανάλογα με τις ανάγκες.

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Ρυθμιστικό διάλυμα IF-Tween

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για το πλύσιμο των πλακών. Προστίθεται 0,1 % Tween 20 στο ρυθμιστικό διάλυμα IF.

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

Αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται ως ρευστό προσήλωσης στα φατνία της πλάκας της IF για την ενίσχυση του φθορισμού.

Na₂HPO₄·12 H₂O 3,2 g

NaH₂PO₄·2 H₂O 0,15 g

Γλυκερίνη 50 ml

Αποσταγμένο νερό 100 ml

Προσάρτημα 4

Προσδιορισμός του βαθμού μόλυνσης στη δοκιμή IF

Εμβαδόν (S) του φατνίου μιας πολυφατνιακής αντικεμενοφόρου:

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

όπου D = διάμετρος του φατνίου (1)

Εμβαδόν (s) του οπτικού πεδίου του αντικεμενικού:

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

όπου d = διάμετρος του οπτικού πεδίου. (2)

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

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

όπου i = συντελεστής πεδίου (εξαρτάται από τον τύπο του προσοφθαλμίου και κυμαίνεται μεταξύ 8 και 24),

K = συντελεστής σωλήνα (1 ή 1,25),

G = μεγθυντική ισχύς του αντικεμενικού (100×, 40× κ.λπ.)

από τον (2)

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

από τον (3)

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

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

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

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

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

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

όπου y = όγκος ιζήματος στο φατνίο

F = υντελεστής αραιώσης του ιζήματος.

Προσάρτημα 5

Υλικά για τη δοκιμή ELISA

Ανθρακικό ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης, διπλής ισχύος, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Διαλύονται τα συστατικά και ελέγχεται η τιμή του pH. Κατανέμονται κατάλληλες ποσότητες ανάλογα με τις ανάγκες.

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Αν το εκχύλισμα περιέχει μεγάλο ποσοστό αρωματικών μορίων, μπορεί να προστεθεί, ως αντιοξειδωτικό,θειώδες νάτριο σε τελική συγκέντρωση 0,2%.

Φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 10 × (PBS), pH 7,4

NaCl	80 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	29 g
KCl	2 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Διαλύονται τα συστατικά και ελέγχεται η τιμή του pH. Κατανέμονται κατάλληλες ποσότητες ανάλογα με τις ανάγκες.

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων-Tween (PBS-T)

10 × PBS	100 ml
10% Tween 20	5 ml
Αποσταγμένο νερό	895 ml

Ρυθμιστικό διάλυμα φραγμού (αντισωμάτων) (πρέπει να έχει παρασκευαστεί πρόσφατα)

10 × PBS	10 ml
Polyvinylpyrrolidone-44000 MWT (PVP-44)	2 g
10% Tween 20	0,5 g
Γάλα σε σκόνη	0,5 g
Αποσταγμένο νερό	έως 100 ml

Διάλυμα υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης, pH 9,8

Διαθανολαμίνη	97 ml
Αποσταγμένο νερό	800 ml

Αναμιγνύονται και ρυθμίζεται η τιμή του pH 9,8 με πυκνό HCl.

Συμπληρώνεται αποσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1 λίτρου.

Προστίθενται 0,2 g MgCl₂.

Διαλύονται 2 δισκία υποστρώματος φωσφατάσης των 5 mg (Sigma) ανά 15 ml διαλύματος.

Προσάρτημα 6

Υλικά για τη δοκιμή PCR

Ακολουθία ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών:

Εκκινητής OLI-1 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

Εκκινητής Y-2 5'CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Για τα υλικά βλέπε την εργασία των Seal et al. (1993).

Προσάρτημα 7

Υλικά για την εκλεκτική απομόνωση επί στερεού θρεπτικού υποστρώματος και δοκιμές εμπλουτισμού

Εκλεκτικό θρεπτικό υλικό SMSA (Engelbrecht 1994, όπως τροποποιήθηκε από τον Elphinstone et al., 1996)

Βασικό θρεπτικό υλικό

Casamino acids (Difco)	1 g
Bacto peptone (Difco)	10 g
Γλυκερίνη	5 ml
Άγαρ (Difco)	15 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Παρασκευάζονται ποσότητες ½ λίτρου από το θρεπτικό υλικό σε φιάλες 1 λίτρου.

Διαλύονται τα συστατικά και ελέγχεται η τιμή του pH. Πριν από την αποστείρωση σε αυτόκαυστο ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6,5, αν κρίνεται απαραίτητο. Η *Ralstonia solanacearum* δεν αναπτύσσεται σωστά στο θρεπτικό υλικό, αν το pH είναι μεγαλύτερο του 7,0. Το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Ακολουθεί ψύξη μέχρι τους 50 °C.

Προστίθενται τα ακόλουθα συστατικά (όλα της Sigma) ώστε αν ληφθούν οι προδιαγεγραμμένες τελικές συγκεντρώσεις.

Crystal violet	5 mg ανά λίτρο		
Θειική πολυμυξίνη B	100 mg ανά λίτρο	(περίπου 600 000 μονάδες)	Sigma P-1004
Βακιτρακίνη(*)	25 mg ανά λίτρο	(περίπου 1 250 μονάδες)	Sigma P-0125
Χλωραμφενικόλη	5 mg ανά λίτρο		Sigma C-3175
Πενικιλίνη-G	0,5 mg ανά λίτρο	(περίπου 825 μονάδες)	Sigma P-3032
Άλατα τετραζολίου	50 mg ανά λίτρο		

Τα συστατικά διαλύονται σε αιθανόλη 70% μέχρι να ληφθούν οι τελικές συγκεντρώσεις για τον όγκο του θρεπτικού υλικού που πρόκειται να παρασκευασθεί. Ορισμένα συστατικά, όπως η πολυμυξίνη B και η χλωραμφενικόλη απαιτούν ελαφρά θέρμανση και ανάδευση.

Ζωμός SMSA (Elphinstone et al., 1996)

Παρασκευάζεται όπως και το SMSA εκλεκτικό υλικό, αλλά παραλείπεται το άγαρ. Κατανέμεται σε ποσότητες των 3 ml σε σωλήνες Universal μίας χρήσης των 30 ml.

(*) Αν χρειάζεται, είναι δυνατό, αυξάνοντας τη συγκέντρωση της βακιτρακίνης σε 300 ppm, να περιορισθεί η επιμόλυνση από σαπροφυτικά βακτηρίδια χωρίς να μειωθεί η ανάκτηση της *Ralstonia solanacearum*.

Βιβλιογραφία

- Buddenhagen, I.W.; Sequeira, L. and Kelman, A., 1962, Description of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52, 726.
- Cook, D.; Elizabeth B. and Sequeira L., 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2, 113-121.
- Dinesen I.G. and DeBoer, S.H., 1995. Extraction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from composite samples of potato tubers. *American Potato Journal* 72, 133-142.
- Elphinstone, J.G.; Hennessy, J.; Wilson, J. and Stead, D.E., 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26.
- Engelbrecht, M.C., 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5.
- Hayward, A.C., 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27, 265-277.
- Hayward, A.C., 1994. Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: *Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (eds. A.C. Hayward and G.L. Hartman) CAB International Oxford, 127-135.
- Janse, J.D., 1988. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *EPPO Bulletin* 18, 343-351.
- Janse, J.D., 1991. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14, 335-345.
- Kelman, A., 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 64, 293-695.
- Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants.* (T.F. Preece ed.) Blackwell Scientific Publications, Oxford. 216 p.
- Louws, F.J.; Fulbright, D.W.; Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85, 528-536.
- Lozano, J.C. and Sequeira, L., 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology* 60, 838.
- Mirza, M.S.; Rademaker, J.W.L.; Janse, J.D. and Akkermans, A.D.L., 1993, Specific 16S ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 1029-1034.
- Robinson-Smith, A.; Jones, P.; Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D., 1995. Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67-79.
- Seal, S.E.; Jackson, L.A.; Young, J.P.W. and Daniels, M.J., 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *P. syzygii*, *P. pickettii* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology* 139, 1587-1594.
- Smith, J.J.; Offord, L.C.; Holderness, M. and Saddler, G.S., 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 4262-4268.
- Stead, D.E., 1992a. Techniques for detecting and identifying plant pathogenic bacteria. In: *Techniques for rapid detection of plant pathogens* (eds. J.M. Duncan and L. Torrance). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 76-111.
- Stead, D.E., 1992b. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 281-295.
- Van Beuningen, A.; Derks, H. and Janse J.D., 1995. Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with special attention to fluorescent *in-situ* hybridisation (FISH) using a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe. *Züchtungsforschung* 2, 266-269.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

1. Για κάθε πιθανολογούμενη εμφάνιση για την οποία υπάρχει θετικό αποτέλεσμα από την ή τις μαζικές δοκιμές, για μεν το καταχωρημένο φυτικό υλικό, με τη μέθοδο του παραρτήματος ΙΙ, για δε όλες τις άλλες περιπτώσεις, με οποιαδήποτε άλλη επισήμως εγκεκριμένη μέθοδο, και για την οποία αναμένεται επιβεβαίωση ή διάψευση με την εν λόγω μέθοδο, παρακρατούνται και φυλάσσονται καταλλήλως:
 - στο μέτρο του δυνατού, η παρτίδα, ή μέρος της παρτίδας (από την οποία έχει ληφθεί το δείγμα) στην αρχική της συσκευασία με την ετικέτα,
 - στο μέτρο του δυνατού, κάθε εναπομένον τμήμα των δειγμάτων,
 - κάθε εναπομένον εκχύλισμα και υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την ή τις μαζικές δοκιμές π.χ. αντικεμενοφόροι ανοσοφθορισμούκαι
 - όλη η σχετική τεκμηρίωση,μέχρι την ολοκλήρωση της εν λόγω μεθόδου.
2. Σε περίπτωση επιβεβαίωσης της παρουσίας του οργανισμού, παρακρατείται και φυλάσσεται καταλλήλως:
 - το υλικό που αναφέρεται στην παράγραφο 1 και
 - ένα δείγμα του μολυσμένου υλικού τομάτας ή μελιτζάνας το οποίο έχει εμβολιαστεί με εκχύλισμα κονδύλου ή φυτού, κατά περίπτωση και
 - η απομενωμένη καλλιέργεια του οργανισμού,για τουλάχιστον ένα μήνα μετά τη διαδικασία κοινοποίησης βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 2.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Τα στοιχεία των ελέγχων που αναφέρονται στο άρθρο 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο i), περιλαμβάνουν κατά περίπτωση:

i) τους τόπους παραγωγής,

- όπου καλλιεργούνται ή έχουν καλλιεργηθεί πατάτες που έχουν κλωνική σχέση με τις μολυσμένες από τον οργανισμό πατάτες,
- όπου καλλιεργούνται ή έχουν καλλιεργηθεί τομάτες που έχουν την ίδια προέλευση με τις μολυσμένες από τον οργανισμό τομάτες,
- όπου καλλιεργούνται ή έχουν καλλιεργηθεί πατάτες ή τομάτες οι οποίες υπόκεινται σε επίσημο έλεγχο λόγω της πιθανολογούμενης εμφάνισης του οργανισμού,
- όπου καλλιεργούνται ή έχουν καλλιεργηθεί πατάτες που έχουν κλωνική σχέση με πατάτες που καλλιεργούνται σε μολυσμένους από τον οργανισμό τόπους,
- όπου καλλιεργούνται πατάτες ή τομάτες οι οποίοι γειτνιάζουν με μολυσμένους τόπους παραγωγής, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χρησιμοποιούν τον ίδιο εξοπλισμό και εγκαταστάσεις παραγωγής απευθείας ή μέσω κοινού αναδόχου,
- που χρησιμοποιούν επιφανειακό νερό για άρδευση ή ψεκάσμο από πηγές για τις οποίες έχει επιβεβαιωθεί ή πιθανολογείται ότι έχουν μολυνθεί από τον οργανισμό,
- που χρησιμοποιούν επιφανειακό νερό για άρδευση ή ψεκάσμο από πηγή που χρησιμοποιείται από κοινού με τόπους παραγωγής για τις οποίους έχει επιβεβαιωθεί ή πιθανολογείται ότι έχουν μολυνθεί από τον οργανισμό,
- που πλημμυρίζουν ή έχουν πλημμυρίσει με επιφανειακό νερό για το οποίο έχει επιβεβαιωθεί ή πιθανολογείται ότι έχει μολυνθεί από τον οργανισμό

και

ii) το επιφανειακό νερό το οποίο χρησιμοποιήθηκε για άρδευση ή ψεκάσμο στον ή τους αγρούς ή στον ή τους τόπους παραγωγής για τις οποίες έχει επιβεβαιωθεί ότι είναι μολυσμένοι από τον οργανισμό ή το οποίο πλημμύρισε τους εν λόγω αγρούς ή τόπους παραγωγής.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

1. Το στοιχείο του προσδιορισμού της έκτασης της πιθανής μόλυνσης βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο iii) και του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο γ), σημείο iii), περιλαμβάνουν, κατά περίπτωση:
 - το καταχωρημένο φυτικό υλικό που παράγεται σε τόπο παραγωγής χαρακτηρισμένο ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α), σημείο ii),
 - τον ή τους τόπους παραγωγής που συνδέονται με το καταχωρημένο φυτικό υλικό που έχει χαρακτηριστεί ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α), σημείο ii), συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χρησιμοποιούν τον ίδιο εξοπλισμό και εγκαταστάσεις παραγωγής απευθείας ή μέσω κοινού αναδόχου,
 - το καταχωρημένο φυτικό υλικό που παράγεται στον ή τους τόπους παραγωγής που αναφέρονται στην προηγούμενη περίπτωση, ή που υπήρχε στον ή τους τόπους παραγωγής κατά την ίδια περίοδο κατά την οποία το καταχωρημένο φυτικό υλικό που χαρακτηρίστηκε ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο ii), υπήρχε στους τόπους παραγωγής που αναφέρονται στην πρώτη περίπτωση,
 - τις αποθήκες που διακινούν το καταχωρημένο φυτικό υλικό προέλευσης των ανωτέρω τόπων παραγωγής,
 - κάθε μηχανήμα, όχημα, περιέκτης, αποθήκη ή μονάδα αυτών και κάθε άλλο αντικείμενο, συμπεριλαμβανομένων των υλικών συσκευασίας, που ενδέχεται να έχουν έλθει σε επαφή με το καταχωρημένο φυτικό υλικό χαρακτηρισμένο ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), στοιχείο ii),
 - κάθε καταχωρημένο φυτικό υλικό που έχει αποθηκευτεί ή ήλθε σε επαφή, με οποιαδήποτε κατασκευή ή αντικείμενο που απαριθμείται στην προηγούμενη περίπτωση, πριν από τον καθαρισμό και την απολύμανση αυτών των κατασκευών και αντικειμένων,
 - βάσει των αποτελεσμάτων των ελέγχων και των δοκιμών που διενεργούνται σύμφωνα με το άρθρο 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο i), για τις πατάτες, τους κονδύλους ή φυτά με αδελφική ή γονική κλωνική σχέση, και, για τις τομάτες, τα φυτά της ίδιας προέλευσης, με το καταχωρημένο φυτικό υλικό που χαρακτηρίστηκε ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο ii), και τα οποία, μολονότι ενδέχεται να έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα κατά τις δοκιμές ανίχνευσης του οργανισμού, κρίνεται πιθανόν να είναι μολυσμένα λόγω κλωνικής σχέσης,
 - τον ή τους τόπους παραγωγής του καταχωρημένου φυτικού υλικού που αναφέρεται στην προηγούμενη περίπτωση,
 - τον ή τους τόπους παραγωγής καταχωρημένου φυτικού υλικού που χρησιμοποιούν νερό για άρδευση ή ψεκασμό το οποίο έχει χαρακτηριστεί ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο ii), σημείο ii),
 - το καταχωρημένο φυτικό υλικό που έχει παραχθεί σε αγρούς οι οποίοι έχουν πλημμυρίσει με επιφανειακό νερό για το οποίο έχει επιβεβαιωθεί ότι έχει μολυνθεί από τον οργανισμό.
2. Ο προσδιορισμός της πιθανής μετάδοσης που αναφέρεται στο άρθρο 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο iv) και το άρθρο 5, παράγραφος 1, στοιχείο γ), σημείο iii), περιλαμβάνει:
 - i) στις περιπτώσεις βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο iv), τα ακόλουθα στοιχεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη:
 - τη γειτνίαση άλλων τόπων παραγωγής όπου καλλιεργείται το καταχωρημένο φυτικό υλικό,
 - τη συνήθη παραγωγή και χρησιμοποίηση του συγκεκριμένου αποθέματος πατατόσπορου,
 - τους τόπους παραγωγής που χρησιμοποιούν επιφανειακό νερό για άρδευση ή ψεκασμό του καταχωρημένου φυτικού υλικού σε περιπτώσεις κατά τις οποίες υπάρχει ή υπήρξε κίνδυνος απορροών επιφανειακού νερού από καλλιεργήσιμα εδάφη που έχουν χαρακτηριστεί ως μολυσμένα βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο ii), ή πλημμύρας των εδαφών αυτών από επιφανειακό νερό,
 - ii) στις περιπτώσεις κατά τις οποίες το επιφανειακό νερό χαρακτηρίστηκε ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο γ), σημείο ii):
 - τον ή τους τόπους παραγωγής του καταχωρημένου φυτικού υλικού που γειτνιάζουν ή που υπάρχει κίνδυνος να πλημμυρίσουν με επιφανειακό νερό χαρακτηρισμένο ως μολυσμένο,
 - οποιαδήποτε μη συρρέουσα αρδευτική λεκάνη που συνδέεται με το επιφανειακό νερό που έχει χαρακτηριστεί ως μολυσμένο.

3. Οι λεπτομέρειες της κοινοποίησης που αναφέρεται στο άρθρο 5 παράγραφος 2, πρώτο εδάφιο, περιλαμβάνουν:
- την ημερομηνία κοινοποίησης της πιθανολογούμενης εμφάνισης βάσει του άρθρου 4 και τις ημερομηνίες των δειγματοληψιών και της επιβεβαίωσης της παρουσίας του οργανισμού βάσει του άρθρου 5, κατά περίπτωση,
 - περιγραφή των στοιχείων της προσδιορισθείσας μόλυνσης και της οριοθέτησης της ζώνης.
4. Οι λεπτομέρειες της πρόσθετης κοινοποίησης που αναφέρεται στο άρθρο 5 παράγραφος 2, δεύτερο εδάφιο, περιλαμβάνουν:
- για κάθε αποστολή ή παρτίδα πατάτας που έχει χαρακτηριστεί ως μολυσμένη, κατά περίπτωση, τα πιστοποιητικά που ορίζονται στα άρθρα 7 και 8 της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ, τον αριθμό διαβατηρίου ή τον αριθμό μητρώου του πατατοπαραγωγού, της συνεταριστικής αποθήκης και του κέντρου αποστολής,
 - για κάθε αποστολή ή παρτίδα τομάτας που έχει χαρακτηριστεί ως μολυσμένη, τα πιστοποιητικά που ορίζονται στα άρθρα 7 ή 8 της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ και τον αριθμό διαβατηρίου, σύμφωνα με τον κατάλογο του παραρτήματος V, μέρος Α, τμήμα Ι σημείο 2.2 της οδηγίας 77/93/ΕΟΚ,
 - την ονομασία και την κατηγορία της ποικιλίας για τα αποθέματα πατατόσπορου και, όπου είναι δυνατό, για όλες τις άλλες περιπτώσεις,
 - οποιαδήποτε άλλη πληροφορία για το επιβεβαιωθέν κρούσμα την οποία απαιτεί η Επιτροπή.
-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

1. Όσον αφορά το άρθρο 6 παράγραφος 1, οι διατάξεις είναι οι εξής:
 - καύση ή
 - χρήση ως ζωοτροφή μετά από θερμική επεξεργασία ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος επιβίωσης του οργανισμού ή
 - με εις βάθος ταφή σε τοποθεσία διάθεσης στην οποία δεν υπάρχει κίνδυνος διήθησης σε γεωργικά εδάφη ή επαφής με πηγές νερού που μπορούν να χρησιμοποιούνται για άρδευση γεωργικών εδαφών ή
 - βιομηχανική μεταποίηση μέσω απευθείας και άμεσης παράδοσης σε μεταποιητική μονάδα με επισήμως εγκεκριμένες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων οι οποίες ανταποκρίνονται στις διατάξεις του παραρτήματος VII της παρούσας οδηγίας ή
 - άλλα μέτρα, με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού· τα μέτρα αυτά πρέπει να κοινοποιούνται αμέσως στην Επιτροπή και τα άλλα κράτη μέλη.
2. Η κατάλληλη χρήση ή διάθεση του καταχωρημένου φυτικού υλικού που αναφέρεται στο άρθρο 6 παράγραφος 2, υπό τον έλεγχο των αρμόδιων επίσημων φορέων του ή των οικείων κρατών μελών, με την κατάλληλη συνεργασία μεταξύ των αρμόδιων επίσημων φορέων ώστε να εξασφαλίζεται πάντοτε ο έλεγχος αυτός και με την έγκριση του αρμόδιου επίσημου φορέα του κράτους μέλους στο οποίο συσκευάζονται ή μεταποιούνται οι πατάτες όσον αφορά τις εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων που αναφέρονται στην πρώτη και τη δεύτερη περίπτωση, είναι η ακόλουθη:
 - i) για τους κονδύλους πατάτας,
 - χρήση ως πατάτες εμπορίου για κατανάλωση και συσκευασμένες σε χώρους με κατάλληλες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων, έτοιμες για άμεση παράδοση και χρήση χωρίς νέα συσκευασία, και που προορίζονται για τέτοιου είδους άμεση παράδοση και χρήση ή
 - χρήση ως πατάτες εμπορίου για βιομηχανική μεταποίηση, που προορίζονται για απευθείας και άμεση παράδοση σε μεταποιητική μονάδα με κατάλληλες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων ή
 - άλλη χρήση ή διάθεση, με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού, και εφόσον έχει χορηγηθεί έγκριση των προαναφερόμενων υπεύθυνων επίσημων φορέων. Τα μέτρα αυτά κοινοποιούνται αμέσως στην Επιτροπή και τα λοιπά κράτη μέλη,
 - ii) για άλλα μέρη των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των υπολειμμάτων βλαστών και φυλλώματος,
 - καταστροφή ή
 - άλλη χρήση ή διάθεση, με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού· τα μέτρα αυτά πρέπει να κοινοποιούνται στην Επιτροπή και τα άλλα κράτη μέλη.
3. Οι κατάλληλες μέθοδοι απολύμανσης των αντικειμένων που αναφέρονται στο άρθρο 6 παράγραφος 3 πρέπει να είναι ο καθαρισμός και, κατά περίπτωση, η απολύμανση, έτσι ώστε να μην υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού και πρέπει να εφαρμόζονται υπό την εποπτεία των αρμόδιων επίσημων φορέων των κρατών μελών.
4. Η σειρά μέτρων που εφαρμόζουν τα κράτη μέλη στην ή τις ζώνες που οριοθετούνται βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο iv) και στοιχείο γ), σημείο iii), και αναφέρονται στο άρθρο 6 παράγραφος 4, περιλαμβάνει:
 - 4.1. Σε τόπους παραγωγής που χαρακτηρίζονται ως μολυσμένοι βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο ii):
 - α) σε αγρό ή μονάδα με προστατευμένες καλλιέργειες που χαρακτηρίζονται ως μολυσμένες βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο ii), είτε

- i) κατά τη διάρκεια τουλάχιστον τεσσάρων καλλιεργητικών ετών μετά το έτος της προσδιορισθείσας μόλυνσης,
- λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και τομάτας και άλλων ξενιστών του οργανισμού συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων της οικογένειας των σολανιδών και
 - δεν φυτεύονται:
 - κόνδυλοι ή φυτά πατάτας,
 - φυτά και σπόροι τομάτας,
 - ανάλογα με τη βιολογία του οργανισμού,
 - άλλοι ξενιστές,
 - φυτά του είδους **Brassica**, στα οποία υπάρχει εμφανής κίνδυνος επιβίωσης του οργανισμού,
 - καλλιέργειες στις οποίες υπάρχει εμφανής κίνδυνος εξάπλωσης του οργανισμού,
 - κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας ή τομάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση, και υπό την προϋπόθεση ότι ο αγρός είναι απαλλαγμένος από αυτοφυή φυτά τομάτας και πατάτας και άλλα φυτά ξενιστές συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων της οικογένειας των σολανιδών, πρέπει για δύο τουλάχιστον συναπτά καλλιεργητικά έτη πριν τη φύτευση,
 - στην περίπτωση της πατάτας, να φυτεύεται επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος μόνο για παραγωγή πατάτας εμπορίου και,
 - να διεξάγεται επίσημη έρευνα συμπεριλαμβανομένων των δοκιμών, όπως προβλέπεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1,
 - κατά την καλλιεργητική περίοδο πατάτας ή τομάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση και σύμφωνα με ένα κατάλληλο σύστημα αμειψισποράς, φυτεύεται, στην περίπτωση της πατάτας, επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος για παραγωγή είτε πατατόσπορου είτε πατάτας εμπορίου και, στην περίπτωση της πατάτας και τομάτας, πραγματοποιείται επίσημος έλεγχος όπως καθορίζεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1 ή
- ii) κατά τα πέντε καλλιεργητικά έτη μετά την περίοδο της προσδιορισθείσας μόλυνσης,
- λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και τομάτας και άλλων ξενιστών του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων της οικογένειας των σολανιδών και
 - ο αγρός διατηρείται, κατά τα πρώτα τρία έτη, είτε χέρσος είτε με σιτηρά ανάλογα με τον προσδιορισθέντα κίνδυνο, είτε ως μόνιμος βοσκότοπος στον οποίο η βλάστηση κόβεται συχνά και χαμηλά ή ο οποίος χρησιμοποιείται για εντατική βόσκηση ή ως χορτονομή για παραγωγή σπόρων· η φύτευση κατά τα ακόλουθα δύο έτη πραγματοποιείται με φυτά που δεν είναι ξενιστές του οργανισμού για τα οποία δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος επιβίωσης ή διάδοσης του οργανισμού,
 - κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας ή τομάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση,
 - στην περίπτωση της πατάτας, φυτεύεται επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος για παραγωγή είτε πατατόσπορου είτε πατάτας εμπορίου,και διεξάγεται επίσημη μελέτη, συμπεριλαμβανομένων δοκιμών, όπως καθορίζεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1·
- β) σε άλλους αγρούς:
- κατά το καλλιεργητικό έτος μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση:
 - είτε δεν φυτεύονται κόνδυλοι ή φυτά πατάτας, ή άλλα φυτά ξενιστές του οργανισμού, και λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και τομάτας και άλλων ξενιστών, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων της οικογένειας των σολανιδών ή
 - στην περίπτωση των κονδύλων πατάτας, φυτεύεται επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος για παραγωγή πατάτας εμπορίου μόνο, υπό την προϋπόθεση ότι οι αρμόδιοι επίσημοι φορείς κρίνουν ότι έχει εξαλειφθεί ο κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού από αυτοφυή φυτά πατάτας και τομάτας ή άλλους ξενιστές του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων της

οικογένειας των σολανιδών. Τα καλλιεργούμενα φυτά επιθεωρούνται την κατάλληλη στιγμή, τα δε τυχόν αυτοφυή φυτά πατάτας υποβάλλονται σε δοκιμή για την ανίχνευση του οργανισμού· επιπλέον, για τις πατάτες πρέπει να ελέγχονται οι συγκομιζόμενοι κόνδυλοι,

- κατά το πρώτο καλλιεργητικό έτος μετά το καθοριζόμενο στην προηγούμενη περίπτωση,
 - στην περίπτωση της πατάτας, φυτεύεται μόνον επίσημος πιστοποιημένος πατατόσπορος για παραγωγή είτε πατατόσπορου είτε πατάτας εμπορίου,
 - τουλάχιστον για το δεύτερο καλλιεργητικό έτος μετά το καθοριζόμενο στην πρώτη περίπτωση,
 - στην περίπτωση της πατάτας, φυτεύεται μόνον επίσημος πιστοποιημένος πατατόσπορος ή πατατόσπορος που έχει παραχθεί υπό επίσημο έλεγχο με επίσημο πιστοποιημένο πατατόσπορο για παραγωγή είτε πατατόσπορου είτε πατάτας εμπορίου,
 - για κάθε καλλιεργητικό έτος που αναφέρεται στις προηγούμενες περιπτώσεις, λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και τομάτας και άλλων ξενιστών του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων της οικογένειας των σολανιδών, και πραγματοποιείται επίσημη μελέτη όπως καθορίζεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1, και διεξάγεται έλεγχος των κονδύλων στις περιπτώσεις κατά τις οποίες ο πατατόσπορος φυτεύεται για την παραγωγή πατατόσπορου·
- γ) αμέσως μετά το χαρακτηρισμό μολυσμένων αντικειμένων σύμφωνα με το άρθρο 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο ii), και για κάθε επόμενο καλλιεργητικό έτος, μέχρι και την πρώτη επιτροπόμενη καλλιεργητική περίοδο πατάτας ή τομάτας στον ή τους αγρούς που έχουν χαρακτηριστεί μολυσμένοι, όπως περιγράφεται στο στοιχείο α):
- καθαρίζονται και, κατά περίπτωση, απολυμαίνονται κατάλληλα όλα τα μηχανήματα και οι αποθηκευτικοί χώροι του τόπου παραγωγής που έχουν σχέση με την παραγωγή πατάτας και τομάτας, με τις κατάλληλες μεθόδους, όπως ορίζεται στο σημείο 3,
 - εφαρμόζονται κατάλληλοι επίσημοι έλεγχοι των προγραμματίων άρδευσης και ψεκασμού, συμπεριλαμβανομένης της απαγόρευσης αυτών, προκειμένου να αποφευχθεί η διάδοση του οργανισμού·
- δ) στις μονάδες προστατευμένης παραγωγής που έχουν χαρακτηριστεί ως μολυσμένες, βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο ii), όπου είναι δυνατή η πλήρης αντικατάσταση του υποστρώματος βλάστησης,
- δεν φυτεύονται κόνδυλοι ή φυτά, ή ξενιστές του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων των φυτών και σπόρων τομάτας, παρά μόνο εάν στη μονάδα παραγωγής εφαρμόζονται επίσημα εποπτευόμενα μέτρα για την εξάλειψη του οργανισμού και την απομάκρυνση όλων των ξενιστών, συμπεριλαμβανομένων, τουλάχιστον, της πλήρους αντικατάστασης του υποστρώματος βλάστησης και του καθορισμού και, κατά περίπτωση, της απολύμανσης της μονάδας παραγωγής και όλου του εξοπλισμού, και, στη συνέχεια έχει χορηγηθεί άδεια για παραγωγή πατάτας ή τομάτας από τους αρμόδιους επίσημους φορείς και
 - η παραγωγή πατάτας γίνεται από επίσημο πιστοποιημένο πατατόσπορο ή από μικροκονδύλους ή μικροφυτά που προέρχονται από ελεγμένες πηγές,
 - εφαρμόζονται κατάλληλοι επίσημοι έλεγχοι των προγραμματίων άρδευσης και ψεκασμού, συμπεριλαμβανομένης της απαγόρευσης αυτών, προκειμένου να αποφευχθεί η διάδοση του οργανισμού.
- 4.2. Εντός της οριοθετημένης ζώνης, με την επιφύλαξη των μέτρων που περιγράφονται στο σημείο 4.1, τα κράτη μέλη:
- α) αμέσως, και για τρία τουλάχιστον καλλιεργητικά έτη μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση:
- αα) στις περιπτώσεις κατά τις οποίες η οριοθετημένη ζώνη έχει χαρακτηριστεί βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο iv),
- εξασφαλίζουν, μέσω των αρμόδιων επίσημων φορέων τους, την εποπτεία των χώρων όπου καλλιεργούνται, αποθηκεύονται ή διακινούνται κόνδυλοι πατάτας ή τομάτες, καθώς και των χώρων στους οποίους λειτουργούν, βάσει σύμβασης, μηχανήματα για την παραγωγή πατάτας ή τομάτας,
 - απαιτούν, κατά περίπτωση, καθαρισμό και απολύμανση των μηχανημάτων και των αποθηκών των χώρων αυτών με τις κατάλληλες μεθόδους, όπως ορίζεται στο σημείο 3,

- απαιτούν τη φύτευση αποκλειστικά πιστοποιημένου σπόρου ή σπόρου που έχει παραχθεί υπό επίσημο έλεγχο για όλες τις καλλιέργειες πατάτας της ζώνης αυτής, και δοκιμή, μετά τη συγκομιδή, του πατατόσπορου που παράγεται σε τόπους παραγωγής που έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανώς μολυσμένοι, σύμφωνα με το άρθρο 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο iii),
 - απαιτούν τη χωριστή διακίνωση των αποθεμάτων συγκομισθέντος πατατόσπορου και πατάτας εμπορίου για όλες τις εγκαταστάσεις της ζώνης,
 - διενεργούν επίσημη μελέτη, όπως περιγράφεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1,
- αβ) στις περιπτώσεις κατά τις οποίες το επιφανειακό νερό έχει χαρακτηριστεί ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο γ), σημείο ii), ή περιλαμβάνεται στα στοιχεία για πιθανή διάδοση του οργανισμού, σύμφωνα με το παράρτημα V, σημείο 2,
- διενεργούν ετήσια μελέτη την κατάλληλη στιγμή, συμπεριλαμβανομένης της δειγματοληψίας του επιφανειακού νερού και των κατάλληλων ξενιστών της οικογένειας των σολανιδών στις σχετικές πηγές επιφανειακού νερού και διεξάγουν δοκιμές
 - για το καταχωρημένο φυτικό υλικό, με τη σχετική μέθοδο του παραρτήματος II ή
 - στις λοιπές περιπτώσεις, με άλλη επίσημα εγκεκριμένη μέθοδο,
 - εφαρμόζουν επίσημους ελέγχους των προγραμμάτων άρδευσης και ψεκασμού, συμπεριλαμβανομένης της απαγόρευσης χρήσης του νερού που έχει χαρακτηριστεί ως μολυσμένο για την άρδευση και το ψεκασμό του καταχωρημένου φυτικού υλικού, και, κατά περίπτωση, άλλων ξενιστών προκειμένου να αποφευχθεί η διάδοση του οργανισμού. Η απαγόρευση αυτή επανεξετάζεται βάσει των αποτελεσμάτων της προαναφερόμενης ετήσιας έρευνας,
 - στις περιπτώσεις κατά τις οποίες οι απορρίψεις υγρών αποβλήτων είναι μολυσμένες, εφαρμόζουν επίσημους ελέγχους για τη διάθεση των αποβλήτων από χώρους βιομηχανικής μεταποίησης ή συσκευασίας του καταχωρημένου φυτικού υλικού·
- β) καταρτίζουν, κατά περίπτωση, προγράμματα αντικατάστασης όλων των αποθεμάτων πατατόσπορου σε εύθετο χρονικό διάστημα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII

Οι επίσημες εγκεκριμένες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων που αναφέρονται στο παράρτημα VI, παράγραφος 1, τέταρτο εδάφιο, συμμορφώνονται με τις ακόλουθες διατάξεις προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος διάδοσης του οργανισμού:

i) απόβλητα από την επεξεργασία πατάτας και τομάτας (συμπεριλαμβανομένων των απορρίψεων πατατών, φλοιού πατάτας και τοματών) και οποιοδήποτε άλλο στερεό απόβλητο που προέρχεται από πατάτες και τομάτες πρέπει να απομακρύνεται, είτε

— με εις βάθος ταφή σε τοποθεσία διάθεσης, στην οποία δεν υπάρχει κίνδυνος διήθησης σε γεωργικά εδάφη ή επαφής με πηγές νερού που μπορούν να χρησιμοποιούνται για άρδευση γεωργικών εδαφών. Τα απόβλητα μεταφέρονται απευθείας στην τοποθεσία υπό συνθήκες περιορισμού, έτσι ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος απώλειας των αποβλήτων ή

— με καύση,

ii) υγρά απόβλητα επεξεργασίας: πριν από τη διάθεσή τους, τα υγρά απόβλητα του περιλαμβάνουν αιωρούμενα στερεά στοιχεία υποβάλλονται σε διαδικασίες διήθησης ή καθίζησης για την απομάκρυνση αυτών των στερεών στοιχείων. Η διάθεση των στερεών αυτών στοιχείων γίνεται με τους τρόπους που προβλέπονται στο σημείο i).

Τα υγρά απόβλητα πρέπει είτε:

— να θερμαίνονται τουλάχιστον σε 70°C επί τουλάχιστον 30 λεπτά πριν από τη διάθεσή τους ή

— να διατίθενται με άλλο τρόπο που έχει εγκριθεί επίσημα και υπό επίσημο έλεγχο, ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος επαφής των αποβλήτων με γεωργικά εδάφη ή πηγές νερού που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για άρδευση γεωργικών εδαφών. Οι λεπτομέρειες αυτές πρέπει να κοινοποιούνται στα άλλα κράτη μέλη και την Επιτροπή.
