

## I

(Säädökset, jotka on julkaistava)

## NEUVOSTON DIREKTIIVI 98/57/EY,

annettu 20 päivänä heinäkuuta 1998,

*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* -kasvintuhoojan torjunnasta

EUROOPAN UNIONIN NEUVOSTO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen ja erityisesti sen 43 artiklan,

ottaa huomioon komission ehdotuksen<sup>(1)</sup>,ottaa huomioon Euroopan parlamentin lausunnon<sup>(2)</sup>,ottaa huomioon talous- ja sosiaalikomitean lausunnon<sup>(3)</sup>,

sekä katsoo, että

haitallinen organismi *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* tunnettiin aikaisemmin nimellä *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith; nimeä *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* käytettäneen vastaisuudessa organismin yleisesti hyväksyttynä nimenä; tässä direktiivissä olisi tieteellinen kehitys otettava huomioon,

perunan- ja tomaatintuotannolla on tärkeä asema yhteisön maataloudessa; haitalliset organismit uhkaavat tomaatti- ja perunasatoa jatkuvasti,

perunan- ja tomaatinviljelyä näiltä haitallisilta organismeilta suojaamalla olisi tuotostason ylläpitämisen lisäksi myös parannettava maatalouden tuottavuutta,

haitallisten organismien jäsenvaltion alueelle kulkeutumisen estävillä suojatoimenpiteillä olisi ainoastaan rajallinen vaikutus, ellei näitä organismeja samanaikaisesti ja järjestelmällisesti torjuta koko yhteisössä ja niitä estetä leviämistä,

eräs perunan ja tomaatin haitallisista organismeista on *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, perunan tumman rengasmädän sekä perunan ja tomaatin bakteerilakastumistaudin aiheuttaja; tämän taudinaiheuttajan aiheuttamia tautipesäkkeitä on tavattu tietyillä yhteisön alueilla, ja joitakin rajoitettuja tartuntalähteitä on vielä olemassa,

perunan- ja tomaatinviljely on koko yhteisössä suuresti uhattuna, ellei näiden satokasvien osalta toteuteta tehokkaita toimenpiteitä tämän organismin paikallistamiseksi ja levinneisyyden määrittämiseksi, sen esiintymisen ja leviämisen estämiseksi ja, jos tautia löydetään, sen leviämisen estämiseksi ja torjumiseksi tarkoituksella hävittää se,

tietyjä toimenpiteitä on toteutettava yhteisössä tämän tavoitteen saavuttamiseksi; jäsenvaltioiden on lisäksi voitava toteuttaa lisätoimenpiteitä tai tiukempia toimenpiteitä, jos ne ovat tarpeen eivätkä aiheuta esteitä perunoiden ja tomaattien liikkumiselle yhteisössä, jollei kasvien tai kasviuotteiden haitallisten organismien yhteisöön kulkeutumisen ja yhteisössä leviämisen estämiseen liittyvistä suojatoimenpiteistä 21 päivänä joulukuuta 1976 annetussa neuvoston direktiivissä 77/93/ETY<sup>(4)</sup> toisin säädetä; nämä toimenpiteet on ilmoitettava muille jäsenvaltioille ja komissiolle,

toimenpiteissä on otettava huomioon se, että järjestelmälliset viralliset tutkimukset ovat tarpeen taudinaiheuttajan paikallistamiseksi; näihin tutkimuksiin olisi sisällytettävä tarkastusmenettelyt ja koska tietyissä ympäristöoloissa tauti voi kasvavissa perunoissa sekä varastoiduissa perunoissa jäädä piileväksi ja havaitsematta, niihin olisi sisällytettävä tarvittaessa näytteenotto- sekä testausmenettelyt; taudinaiheuttajan leviäminen kasvavissa perunoissa ja tomaateissa ei ole tärkein tekijä vaan taudinaiheuttaja voi levitä pintaveden sekä tiettyjen viljelmillä esiintyvien luonnonvaraisten koisokasvien välityksellä ja sen vuoksi peruna- ja tomaattisadon kastelu saastuneella vedellä muodostaa ilmeisen tartunnanvaaran näille sadoille; tau-

<sup>(1)</sup> EYVL C 124, 21.4.1997, s. 12 ja EYVL C 108, 7.4.1998, s. 85.

<sup>(2)</sup> EYVL C 14, 19.1.1998, s. 34.

<sup>(3)</sup> EYVL C 206, 7.7.1997, s. 57.

<sup>(4)</sup> EYVL L 26, 31.1.1977, s. 20, direktiivi sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna komission direktiivillä 98/2/EY (EYVL L 15, 21.1.1998, s. 34).

dinaiheuttaja voi myös talvehtia kasveissa, jotka ovat peräisin maahan jääneistä perunoista tai tomaateista ("ylivuotiset kasvit"), ja nämä voivat muodostaa saastuntalähteen kasvukaudesta toiseen; taudinaiheuttaja leviää myös, kun perunat joutuvat kosketuksiin saastuneiden perunoiden sekä istutus-, nosto- ja käsittelyvälineiden tai sellaisten kuljetuksessa ja varastoinnissa käytettyjen säiliöiden kanssa, jotka ovat saastuneet oltuaan aiemmin kosketuksissa saastuneiden perunoiden kanssa,

taudinaiheuttajan leviämistä voidaan vähentää tai se voidaan estää puhdistamalla nämä välineet; tällainen siemenperunoiden saastunta muodostaa suurimman taudinaiheuttajan leviämisvaaran; vastaavasti siemenperunoiden piilevä tartunta muodostaa pääasiallisen taudinaiheuttajan leviämisvaaran ja tämä voidaan estää käyttämällä virallisesti hyväksytyyn suunnitelman mukaisesti tuotettuja siemenperunoita, jolloin siemenperunat on kokeiden avulla todettu tartunnasta vapaiksi,

nykyinen tietämys *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* -taudinaiheuttajan biologiasta ja epidemiologiasta Euroopan oloissa on puutteellista ja on suunniteltu, että ehdotetut toimenpiteet on tarpeen tarkistaa usealla kasvukaudella; vastaavasti koemenettelyihin on suunniteltu parannuksia tulevaisuudessa tehtäviä tutkimuksia ajatellen erityisesti menetelmien herkkyyden ja spesifisyyden osalta, jotta voidaan valita ja standardoida käytettävissä olevista koemenetelmistä parhaat, ja

näitä yleisiä toimenpiteitä koskevia yksityiskohtaisia sääntöjä määritettäessä ja jäsenvaltioiden tämän taudinaiheuttajan alueelleen leviämisen estämiseksi toteuttamien tiukempien tai täydentävien toimenpiteiden osalta on suotavaa, että jäsenvaltiot toimivat komission kanssa tiiviissä yhteistyössä pysyvissä kasvinsuojelukomiteassa (jäljempänä 'komitea'),

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

### 1 artikla

Tämä direktiivi koskee toimenpiteitä, jotka on toteutettava jäsenvaltioissa *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* -taudinaiheuttajan, josta on aikaisemmin käytetty nimeä *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, (jäljempänä 'organismi') torjunnassa liitteessä I olevassa I jaksossa lueteltujen organismien isäntäkasvien (jäljempänä 'luettelossa oleva kasviaineisto') osalta:

- a) sen paikallistamiseksi ja sen levinneisyyden määrittämiseksi,
- b) sen esiintymisen ja leviämisen estämiseksi, ja

- c) jos sitä havaitaan, sen leviämisen estämiseksi ja sen torjumiseksi tarkoituksella hävittää se.

### 2 artikla

1. Jäsenvaltioiden on tehtävä vuosittain virallinen ja järjestelmällinen tutkimus organismin havaitsemiseksi niiden luettelossa olevien kasviaineistojen osalta, jotka ovat peräisin niiden alueelta. Luettelossa olevan kasviaineiston tuotantoa uhkaavien muiden mahdollisten saastuntalähteiden tunnistamiseksi jäsenvaltioiden on suoritettava riskien arviointi ja, jollei arvioinnissa ole todettu organismin leviämisen vaaraa, suoritettava luettelossa olevan kasviaineiston tuotantoalueilla kohdennettuja virallisia tutkimuksia, jotka koskevat organismin esiintymistä muissa kuin luettelossa olevan kasviaineiston kasveissa, luonnonvaraiset isäntäkasvina olevat koisokasvit mukaan luettuina, sekä luettelossa olevan kasviaineiston kasteluun tai sumutukseen käytettyä pintavettä ja luettelossa olevaa kasviaineistoa käsittelevien teollisten jalostus- tai pakkauslaitosten laskemia nestemäisiä jätteitä, joita käytetään luettelossa olevan kasviaineiston kasteluun tai sumutukseen. Näiden kohdennettujen tutkimusten laajuus on määritettävä tunnistetun riskin mukaisesti. Jäsenvaltioiden on myös tehtävä virallisia tutkimuksia, jotka koskevat organismin esiintymistä muussa aineistossa, kuten kasvualustassa, maaperässä tai teollisten jalostus- tai pakkauslaitosten kiinteissä jätteissä.

2. Edellä 1 kohdassa säädetyt viralliset tutkimukset on toteutettava:

- a) luettelossa olevan kasviaineiston osalta liitteessä I olevan II jakson 1 kohdassa määrättyjen yksityiskohtien mukaisesti, ja
- b) muiden kuin luettelossa olevassa kasviaineistossa esiintyvien isäntäkasvien ja veden osalta, nestemäiset jätteet mukaan lukien, asianmukaisten menetelmien mukaisesti ja tarvittaessa ottamalla näytteitä, jotka virallisesti tai virallisesti valvottuina tutkitaan laboratoriossa,
- c) tarvittaessa muun aineiston osalta asianmukaisten menetelmien mukaisesti.

Direktiivin 77/93/ETY mukaiset toimivaltaiset viranomaiset vahvistavat näitä tutkimuksia varten tarkastusmenettelyjä koskevat täydentävät yksityiskohtaiset säännöt sekä näytteiden lukumäärän, alkuperän ja sen, mistä kohdin perunakerroksia näytteet otetaan, sekä näytteenoton ajoituksen perusteltujen tieteellisten ja tilastollisten periaatteiden ja organismin biologian mukaisesti sekä ottaen huomioon kyseisen jäsenvaltion erityisen, luettelossa olevan kasviaineiston ja tarvittaessa muiden organismien isäntäkasvien tuotantojärjestelmät.

3. Edellä 1 kohdassa tarkoitettuja virallisia tutkimuksia koskevat yksityiskohtaiset säännöt sekä tutkimusten

tulokset on ilmoitettava muille jäsenvaltioille ja komissiolle vuosittain liitteessä I olevan II jakson 2 kohdan säännösten mukaisesti. Nämä ilmoitukset on jätettävä 1 päivään kesäkuuta mennessä lukuun ottamatta siemenperunoina käytettyjä perunoita koskevia ilmoituksia, jotka on jätettävä 1 päivään syyskuuta mennessä. Satoa koskevat tiedot ja tulokset suhteutetaan edellisen vuoden tuotantoon. Näitä ilmoituksia koskevat tiedot voi jättää komitean käsiteltäväksi.

4. Seuraava säännös on annettava direktiivin 77/93/ETY 16 a artiklassa säädettyä menettelyä noudattaen:

— edellä 2 kohdan ensimmäisen alakohdan b alakohdassa tarkoitettujen tutkimusten ja laboratoriokokeiden asianmukaiset menetelmät.

5. Seuraavat säännökset voidaan antaa direktiivin 77/93/ETY 16 a artiklassa säädettyä menettelyä noudattaen:

— edellä 2 kohdan ensimmäisen alakohdan c alakohdassa tarkoitettujen tutkimusten asianmukaiset menetelmät,

— edellä 2 kohdan toisessa alakohdassa tarkoitettujen tutkimusten täydentävät yksityiskohtaiset säännöt, jotta kullakin jäsenvaltiolla olisi keskenään vertailukelpoiset takeet.

### 3 artikla

Jäsenvaltioiden on huolehdittava siitä, että organismin epäilty tai varmistettu esiintyminen niiden alueella ilmoitetaan jäsenvaltioiden omille toimivaltaisille viranomaisille.

### 4 artikla

1. Kunkin epäillyn esiintymistapauksen osalta kyseisen jäsenvaltion toimivaltaisten viranomaisten on varmistettava, että viralliset tai virallisesti valvotut laboratoriotutkimukset tehdään käyttämällä luettelossa olevan kasviaineiston osalta liitteessä II esitettyä asianmukaista menetelmää liitteessä III olevassa 1 kohdassa mainittujen edellytysten mukaisesti tai kaikissa muissa tapauksissa käyttämällä jotain muuta virallisesti hyväksyttyä menetelmää mainitun esiintymisen varmistamiseksi tai epäilyn kumoamiseksi. Jos esiintyminen varmistetaan, on sovellettava liitteessä III olevassa 2 kohdassa määrättyjä vaatimuksia.

2. Ennen kuin 1 kohdassa tarkoitettu epäilty esiintyminen on varmistunut tai kumottu, kussakin epäilyssä esiintymistapauksessa, jossa on todettu:

- i) organismin aiheuttamia taudinoreita sekä saatu positiivinen tulos liitteessä II olevan I jakson 1 kohdassa ja II jaksossa määritellyssä nopeassa seulontakokeessa (-kokeissa) tai
- ii) positiivinen tulos liitteessä II olevan I jakson 2 kohdassa ja III jaksossa määritety(i)ssä seulontakokeessa (-kokeissa),

jäsenvaltioiden toimivaltaisten viranomaisten on niiden oman tuotannon osalta:

- a) kiellettävä kaikkien sellaisten satokasvien ja niiden mukuloiden, erien tai lähetysten liikkuminen, joista on otettu näytteitä, paitsi jos ne liikkuvat heidän valvontansa alaisina ja jos on todennettu, ettei organismin tunnistettavaa leviämiskaavaa ole olemassa;
- b) toteutettava tarvittavat toimenpiteet epäillyn esiintymisen alkuperän jäljittämiseksi;
- c) otettava käyttöön sopivia arvioidun riskin asteen mukaisia lisävarotoimenpiteitä organismin leviämisen estämiseksi, erityisesti luettelossa olevan kasviaineiston tuotannon sekä muiden kuin a kohdassa tarkoitettujen sillä tuotantopaikalla tuotettujen siemenperunaerien liikkumisen osalta, josta a kohdassa tarkoitettut näytteet on otettu.

3. Jos epäiltyjen esiintymistapausten yhteydessä uhkana on luettelossa olevan kasviaineiston tai pintaveden saastuminen toisesta jäsenvaltiosta (-valtioista) tai toiseen jäsenvaltioon (-valtioihin), jäsenvaltion, jossa epäillyt esiintymistapaukset on todettu, on ilmoitettava viipymättä tunnistetun riskin mukaisesti mainittua epäiltyä esiintymistapausta koskevat yksityiskohtaiset tiedot kyseiselle toiselle jäsenvaltiolle (-valtioille), ja mainittujen jäsenvaltioiden on oltava asianmukaisessa yhteistyössä. Jäsenvaltion (-valtioiden) jo(i)lle asiasta on ilmoitettu, on otettava käyttöön 2 kohdan c alakohdan mukaisia varotoimenpiteitä sekä toteutettava tarvittaessa muita lisätoimenpiteitä 1 ja 2 kohdan mukaisesti.

4. Seuraava säännös voidaan antaa direktiivin 77/93/ETY 16 a artiklassa säädettyä menettelyä noudattaen:

— edellä 2 kohdan c alakohdassa tarkoitettujen toimenpiteet.

### 5 artikla

1. Jos virallisten tai virallisesti valvottujen liitteessä II kuvattua asianmukaista menetelmää käyttäen suoritettujen, luettelossa olevaa kasviaineistoa koskevien laboratoriotutkimusten tai kaikissa muissa tapauksissa jonkin muun virallisesti hyväksytytyn menetelmän perusteella varmistuu, että organismi esiintyy tämän direktiivin mukaisesti otetussa näytteessä, jäsenvaltion toimivaltaisten viranomaisten on, ottaen huomioon perustellut tieteelliset periaatteet, organismin biologian ja tässä jäsenvaltiossa käytössä olevat organismin isäntäkasvien erityiset tuotanto-, kaupanpitämis- ja jalostusjärjestelmät:

- a) luettelossa olevan kasviaineiston osalta:
  - i) suoritettava tutkimukset saastunnan laajuuden ja alkuperäisen lähteen (lähteiden) määrittämiseksi liitteessä IV olevien säännösten mukaisesti ja vähintään kaikkia samasta kloonista polveutuvia siemenperunaeria koskevat 4 artiklan 1 kohdan mukaiset täydentävät kokeet, ja

- ii) ilmoitettava saastuneiksi luettelossa oleva kasviaineisto, lähetys ja/tai erä, josta näyte otettiin, sekä välineet, ajoneuvo, säiliö, varasto tai sen osat ja kaikki muut kohteet, pakkaukset mukaan lukien, jotka ovat olleet kosketuksissa luettelossa olevan kasviaineiston kanssa, josta näyte on otettu; saastuneiksi on ilmoitettava tarvittaessa myös pelto (pellot), katteen alla kasvatettujen satokasvien tuotantoyksikkö (-yksiköt) sekä tuotantopaikka (-paikat), jo(i)sta luettelossa oleva kasviaineisto on korjattu ja josta näyte on otettu; kasvukaudella otettujen näytteiden osalta saastuneiksi on ilmoitettava pelto (pellot), tuotantopaikka (-paikat) ja tarvittaessa katteen alla kasvatettujen satokasvien tuotantoyksikkö (-yksiköt), josta näyte on otettu; ja
- iii) määritettävä liitteessä V olevan 1 kohdan säännösten mukaisesti todennäköinen saastunnan laajuus kosketuksen kautta saastuneiksi ilmoitettujen kohteiden kanssa ennen tai jälkeen sadonkorjuun tai näiden kohteiden kanssa tuotanto-, kastelu- tai sumutusjärjestelmässä olevien yhteyksien tai samasta kloonista polveutumisen kautta; ja
- iv) rajoitettava alue ii kohdassa tarkoitettujen saastuntailmoituksen, iii kohdassa tarkoitettujen todennäköisen saastunnan laajuuden määrittämisen ja organismin mahdollisen leviämisen perusteella liitteessä V olevan 2 kohdan i alakohdan säännösten mukaisesti.
- b) muiden kuin a alakohdassa mainittujen isäntäkasvien sadon osalta, jossa luettelossa olevan kasviaineiston tuotannossa on tunnistettu riskejä:
- i) suoritettava tutkimukset a alakohdan i alakohdan mukaisesti;
- ii) ilmoitettava saastuneiksi ne organismin isäntäkasvit, joista näyte on otettu; ja
- iii) määritettävä todennäköinen saastunta ja rajoitettava alue a alakohdan iii ja iv alakohdan mukaisesti luettelossa olevan kasviaineiston tuotannon osalta.
- c) pintaveden (mukaan lukien luettelossa olevaa kasviaineistoa käsittelevien teollisten jalostus- ja pakkauslaitosten nestemäiset jätepäästöt) sekä viljelmillä esiintyvien luonnonvaraisten isäntäkasvina olevien koisokasvien osalta, joissa luettelossa olevan kasviaineiston tuotannossa on tunnistettu riskejä pintavedellä tapahtuvan kastelun, sumutuksen tai pintaveden tulvimisen vuoksi:
- i) suoritettava sopivina ajankohtina pintavesinäytteitä ja mahdollisia luonnonvaraisia isäntäkasvina olevia koisokasveja koskevat tutkimukset, virallinen tutkimus mukaan luettuna, saastunnan laajuuden määrittämiseksi;
- ii) ilmoitettava saastuneiksi pintavesi, josta näyte (näytteet) on otettu, soveltuvassa laajuudessa ja i alakohdan mukaisen tutkimuksen perusteella; ja

- iii) määritettävä todennäköinen saastunta ja rajoitettava alue ii alakohdassa tarkoitettujen saastuntailmoituksen ja organismin mahdollisen leviämisen perusteella ottaen huomioon liitteessä V olevan 1 kohdan ja 2 kohdan ii alakohdan määräykset.

2. Jäsenvaltioiden on ilmoitettava viipymättä muille jäsenvaltioille ja komissiolle liitteessä V olevassa 3 kohdassa määrättyä menettelyä noudattaen kaikki 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan ja 1 kohdan c alakohdan ii alakohdan mukaisesti ilmoitetut saastunnat sekä 1 kohdan a alakohdan iv alakohdassa ja soveltuvin osin 1 kohdan c alakohdan iii alakohdassa tarkoitettujen alueen rajoittamista koskevat yksityiskohtaiset tiedot. Tämän kohdan mukaisissa ilmoituksissa olevat yksityiskohtaiset tiedot voidaan jättää komitean käsiteltäväksi.

Jäsenvaltioiden on samanaikaisesti toimitettava komissiolle liitteessä V olevassa 4 kohdassa mainitut lisäilmoitukset. Tämän kohdan mukaisissa ilmoituksissa olevat yksityiskohtaiset tiedot on jätettävä välittömästi komitean käsiteltäväksi.

3. Edellä 2 kohdassa tarkoitettujen ilmoituksen ja siinä mainittujen seikkojen perusteella muiden ilmoituksessa mainittujen jäsenvaltioiden on tehtävä tutkimus 1 kohdan a alakohdan i alakohdan ja soveltuvin osin 1 kohdan c alakohdan i alakohdan mukaisesti ja toteutettava tarvittaessa lisätoimia 1 ja 2 kohdan mukaisesti.

## 6 artikla

1. Jäsenvaltioiden on määrättävä, että 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitettua luettelossa olevaa kasviaineistoa ei saa istuttaa ja että siihen on toimivaltaisten viranomaisten valvonnassa ja hyväksymänä sovellettava liitteessä VI olevan 1 kohdan säännöksiä siten, että varmistetaan, ettei minkäänlaista tunnistettavaa organismin leviämisaaraa ole olemassa.

2. Jäsenvaltioiden on määrättävä, että 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iii alakohdan sekä c alakohdan iii alakohdan mukaisesti todennäköisesti saastuneeksi ilmoitettua luettelossa olevaa vaaralliseksi tunnistettua kasviaineistoa mukaan lukien 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iii alakohdan mukaisesti todennäköisesti saastuneeksi määritetyillä tuotantopaikoilla tuotettu kasviaineisto, ei saa istuttaa ja että se käytetään tai hävitetään asianmukaisella tavalla liitteessä VI olevan 2 kohdan mukaisesti jäsenvaltioiden toimivaltaisten viranomaisten valvonnassa varmistaen, ettei tunnistettavaa organismin leviämisaaraa ole.

3. Jäsenvaltioiden on määrättävä, että 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneiksi ilmoitetut tai 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iii alakohdan sekä c alakohdan iii alakohdan mukaisesti todennäköisesti saastuneiksi ilmoitetut välineet, ajoneu-

vot, säiliöt, varastot tai niiden osat sekä kaikki muut kohteet, pakkaukset mukaan lukien, on tuhottava tai puhdistettava liitteessä VI olevassa 3 kohdassa tarkoitettuja asianmukaisia menetelmiä käyttäen. Puhdistuksen jälkeen näitä kohteita ei enää pidetä saastuneina.

4. Jäsenvaltioiden on määrättävä, että liitteessä VI olevassa 4.1 ja 4.2 kohdassa määritellyt eri toimenpiteet on toteutettava 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iv alakohdan ja c alakohdan iii alakohdan mukaisesti rajoitetulla alueella, sanotun kuitenkin rajoittamatta 1, 2 ja 3 kohdan mukaisesti toteutettavia toimenpiteitä. Näitä toimenpiteitä koskevat yksityiskohtaiset tiedot on ilmoitettava vuosittain muille jäsenvaltioille ja komissiolle. Tässä ilmoituksessa olevat yksityiskohtaiset tiedot voidaan jättää komitean käsiteltäviksi.

#### 7 artikla

1. Jäsenvaltioiden on määrättävä, että siemenperunoiden on täytettävä direktiivin 77/93/ETY vaatimukset ja niiden on polveuduttava suoraan peruna-aineistosta, joka on saatu virallisesti hyväksytyä suunnitelmaa noudattaen ja joka on virallisesti tai virallisesti valvotussa liitteessä II esitettyä asianmukaista menetelmää käyttäen suoritettussa tutkimuksessa todettu kyseisestä organismista vapaaksi.

Jäsenvaltion on tehtävä edellä mainitut tutkimukset:

- a) jos niiden omassa siemenperunan tuotannossa on varmistettuja havaintoja organismista,
  - i) tutkimalla aikaisempien sukupolvien siemenperunat, alkuperäinen kloonivalinta mukaan luettuna, ja testaamalla järjestelmällisesti kaikki perussiemenerunat, tai
  - ii) jos on osoitettu, että kyseessä ei ole samasta kloonista polveutuminen, testaamalla kaikki perussiemenerunoiden kloonit tai aikaisempien sukupolvien siemenperunat, alkuperäisen kloonivalinnan testaaminen mukaan luettuna, ja
- b) muissa tapauksissa joko jokaiselle alkuperäisestä kloonista valitulle kasville tai perussiemenerunan tai aikaisempien sukupolvien siemenperunan edustaville näytteille.

2. Seuraavat säännökset voidaan antaa direktiivin 77/93/ETY 16 a artiklassa säädetyn menettelyn mukaisesti:

- yksityiskohtaiset säännöt 1 kohdan toisen alakohdan a alakohdan soveltamisesta,
- 1 kohdan toisen alakohdan b alakohdassa tarkoitettuja edustavia näytteitä koskevat säännöt.

#### 8 artikla

Jäsenvaltioiden on kiellettävä organismin hallussapito ja käsittely.

#### 9 artikla

Jäsenvaltiot voivat myöntää poikkeuksia tämän direktiivin 6 ja 8 artiklaan direktiivin 95/44/EY säännösten mukaisesti kokeellisia tai tieteellisiä tarkoituksia tai lajikevalintatyötä varten<sup>(1)</sup>, sanotun kuitenkin rajoittamatta direktiivin 77/93/ETY säännösten soveltamista.

#### 10 artikla

Jäsenvaltiot voivat toteuttaa oman tuotantonsa osalta lisätoimenpiteitä tai tiukempia toimenpiteitä, jotka ovat tarpeen organismin torjumiseksi tai sen leviämisen estämiseksi, jos nämä toimenpiteet ovat direktiivin 77/93/ETY säännösten mukaisia.

Näitä toimenpiteitä koskevat yksityiskohtaiset tiedot on ilmoitettava muille jäsenvaltioille ja komissiolle. Tässä ilmoituksessa olevat yksityiskohtaiset tiedot voidaan jättää komitean käsiteltäviksi.

#### 11 artikla

Tämän direktiivin liitteisiin tieteellisen tai teknisen tietämyksen lisääntymisen vuoksi tehtävät muutokset tehdään direktiivin 77/93/ETY 16 a artiklassa säädettyä menettelyä noudattaen. Tämän direktiivin liitteessä II esitettyjen menetelmien sekä liitteessä VI olevassa 4.1 ja 4.2 kohdassa säädettyjen toimenpiteiden osalta komissio laatii kertomuksen, jossa näitä menetelmiä ja toimenpiteitä tarkistetaan saadun kokemuksen perusteella, ja kertomus toimitetaan komitealle ennen 1 päivää tammikuuta 2002.

#### 12 artikla

1. Jäsenvaltioiden on saatettava voimaan tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset 21 päivästä elokuuta 1999 lukien. Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

Näissä jäsenvaltioiden antamissa säädöksissä on viitattava tähän direktiiviin tai niihin on liitettävä tällainen viittaus, kun ne virallisesti julkaistaan. Jäsenvaltioiden on säädettävä siitä, miten viittaukset tehdään.

2. Jäsenvaltioiden on välittömästi toimitettava tässä direktiivissä tarkoitetuista kysymyksistä antamansa keskeiset kansalliset säännökset komissiolle. Komissio ilmoittaa tästä muille jäsenvaltioille.

<sup>(1)</sup> EYVL L 184, 3.8.1995, s. 34, direktiivi sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna komission direktiivillä 97/46/EY (EYVL L 204, 31.7.1997, s. 43).

*13 artikla*

Tehty Brysselissä 20 päivänä heinäkuuta 1998.

Tämä direktiivi tulee voimaan päivänä, jona se julkaistaan *Euroopan yhteisöjen virallisessa lehdessä*.

*14 artikla*

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

*Neuvoston puolesta*

W. MOLTERER

*Puheenjohtaja*

## LIITE I

## I JAKSO

**Luettelo 1 artiklassa tarkoitetuista *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* -kasvintuhoajan isäntäkasveista**

<i>Solanum tuberosum</i> L. -lajin kasvit (mukulat mukaan luettuina), varsinaisia siemeniä lukuun ottamatta	Peruna
<i>Lycopersicon lycopersicum</i> (L.) Karsten ex Farw. -lajin kasvit hedelmiä ja siemeniä lukuun ottamatta	Tomaatti

## II JAKSO

## Tutkimukset

1. Edellä 2 artiklan 2 kohdan a alakohdassa tarkoitettujen virallisten tutkimusten on perustuttava organismin biologiaan sekä kyseisen jäsenvaltion erityisiin tuotantojärjestelmiin ja niihin on kuuluttava:
  - i) perunan osalta,
    - kasvavien perunoiden silmämääräinen tarkastus sopivina ajankohtina ja/tai näytteenotto sekä siemenistä että muista perunoista kasvukauden aikana tai varastossa. Näille näytteille tehdään virallisesti tai virallisesti valvottu silmämääräinen tarkastus halkaisemalla mukulat, ja
    - siemenperunoiden ja tarvittaessa muiden perunoiden osalta virallinen tai virallisesti valvottu laboratoriotutkimus liitteessä II esitettyä menetelmää käyttäen;
  - ii) tomaatin osalta,
    - ainakin uudelleenistutettavaksi ammattikäyttöön tarkoitettujen kasvavien tomaattien silmämääräinen tarkastus sopivina ajankohtina.
2. Edellä 2 artiklan 3 kohdassa tarkoitettuun virallisia tutkimuksia koskevaan ilmoitukseen on kuuluttava:
  - i) perunoita koskevien tutkimusten osalta:
    - siemenperunoiden ja muiden perunoiden viljelmän arvioitu kokonaispinta-ala hehtaareina,
    - luokittelu siemenperunaluokkiin ja ruokaperunaan, sekä tarvittaessa alueisiin,
    - tutkimusta varten otettujen näytteiden lukumäärä ja näytteenoton ajoitus,
    - silmämääräisten tarkastusten lukumäärä pellolla,
    - mukuloiden silmämääräisten tarkastusten lukumäärä (ja näytteen koko);
  - ii) ainakin uudelleenistutettavaksi ammattikäyttöön tarkoitettuja kasvia tomaatteja koskevien tutkimusten osalta:
    - kasvien arvioitu kokonaismäärä,
    - silmämääräisten tarkastusten lukumäärä;
  - iii) muita isäntäkasveja kuin perunoita ja tomaatteja, luonnonvaraiset isäntäkasvina olevat koisokasvit mukaan luettuina, koskevien tutkimusten osalta:
    - lajit,
    - otettujen näytteiden lukumäärä ja näytteenoton ajoitus,
    - alue/joki, josta näytteet otetaan (tarvittaessa),
    - analyysimenetelmä;
  - iv) vesiä ja teollisten jalostus- tai pakkauslaitosten nestemäisiä jätteitä koskevien tutkimusten osalta:
    - otettujen näytteiden lukumäärä ja näytteenoton ajoitus,
    - alue/joki/laitokset, joista näytteet otetaan (tarvittaessa),
    - analyysimenetelmä.

## LIITE II

TUTKIMUSMENETELMÄ *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI ET AL.  
-KASVINTUHOOJAN MÄÄRITTÄMISEKSI, TOTEAMISEKSI JA TUNNISTAMISEKSI

## TUTKIMUSMENETELMÄN SOVELTAMISALA

Esitetty menetelmä kuvaa eri menettelyjä, jotka koskevat:

- i) tumman rengasmädän määrittystä perunan mukuloista ja bakteerilakastumistaudin määrittystä perunan ja tomaatin kasveista,
- ii) *Ralstonia solanacearum* -kasvintuhoojan toteamista perunan mukuloista otetuista näytteistä,
- iii) *Ralstonia solanacearum* -kasvintuhoojan tunnistamista.

Lisäyksissä esitetään yksityiskohtaisesti tutkimusaineistojen, so. kasvualustojen, puskurien, liuosten, reagenssien valmistelu.

## SISÄLTÖ:

I JAKSO: Tutkimusmenetelmän soveltaminen .....	9
1. Tumman rengasmädän määrittys perunan mukuloista ja bakteerilakastumistaudin määrittys perunan ja tomaatin kasveista .....	9
2. <i>Ralstonia solanacearum</i> -kasvintuhoojan toteaminen ja tunnistaminen perunan mukuloista otetuista näytteistä .....	11
II JAKSO: Tumman rengasmädän määrittys perunan mukuloista ja bakteerilakastumistaudin määrittys perunan ja tomaatin kasveista .....	13
1. Oireet .....	13
2. Nopea seulontakoe (-kokeet) .....	13
3. Eristämismenettely .....	14
4. Varmistuskoe (-kokeet) .....	14
III JAKSO: <i>Ralstonia solanacearum</i> -kasvintuhoojan toteaminen ja tunnistaminen perunan mukuloista otetuista näytteistä .....	17
1. Näytteen esikäsittely koetta varten .....	17
2. Immunofluoresenssi (IF) -testi .....	18
3. Enzyme linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) -testi .....	20
4. Polymeerasiketjureaktio (PCR <sup>TM</sup> ) -testi .....	20
5. Laimennussarja valikoivalle alustalle .....	22
6. Biotesti .....	23
7. Rikastustestit .....	23
8. Patogeenisystesti .....	23
Lisäys 1: Ravintoalusta <i>Ralstonia solanacearum</i> -kasvintuhoojan eristämistä ja viljelyä varten ....	24
Lisäys 2: Aineistot näytteen esikäsittelyä varten .....	25
Lisäys 3: Aineistot IF-testiä varten .....	26
Lisäys 4: Kontaminaatioasteen määrittys IF-testillä .....	27
Lisäys 5: Aineistot ELISA-testiä varten .....	28
Lisäys 6: Aineistot PCR-testiä varten .....	29
Lisäys 7: Aineistot valikoivalle alustalle tehtävää laimennussarjaa ja rikastustestiä (-testejä) varten	29
Viitteet .....	30

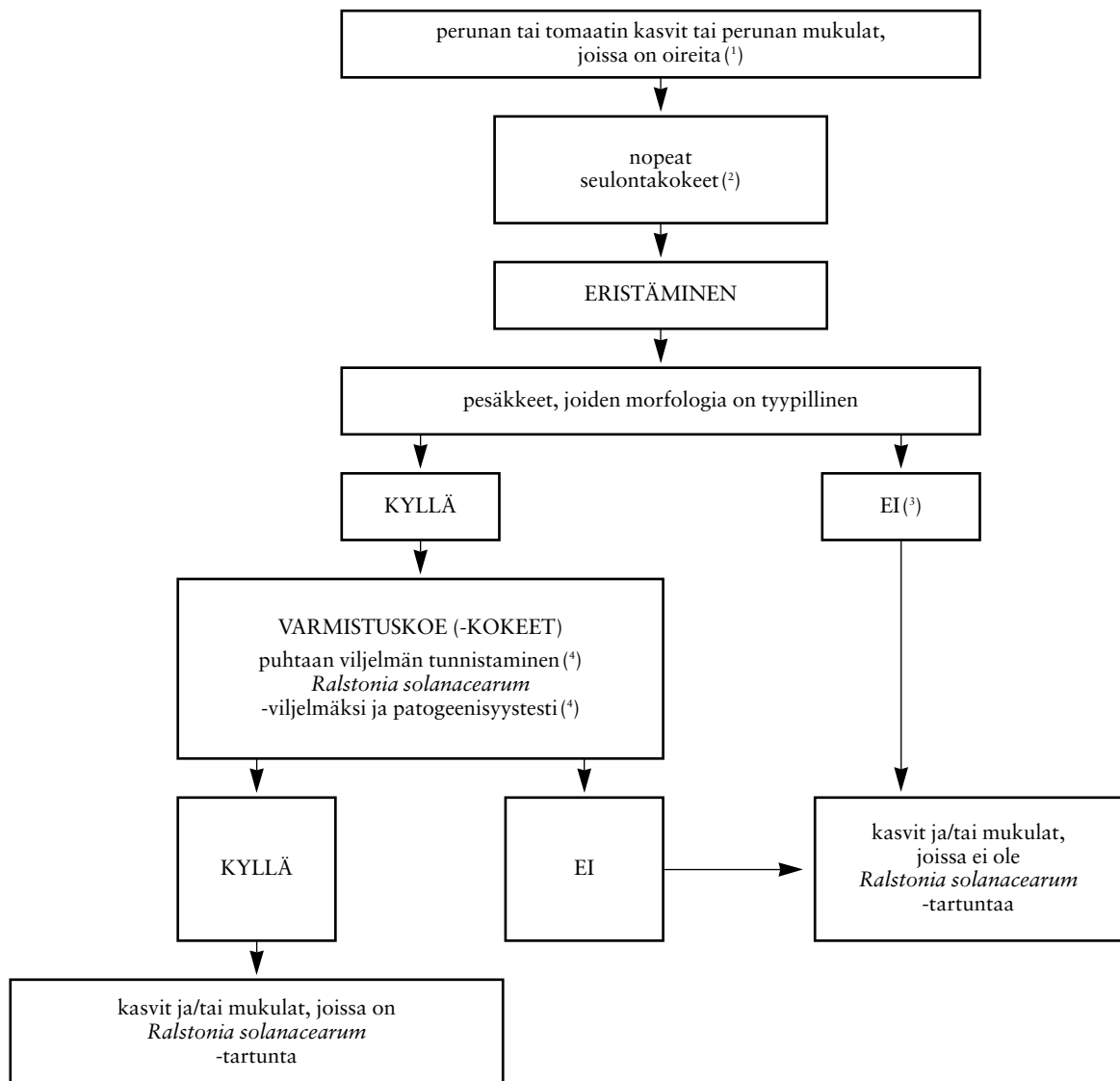
## I JAKSO

## TUTKIMUSMENETELMÄN SOVELTAMINEN

## 1. Tumman rengasmädän määrittys perunan mukuloista ja bakteerilakastumistaudin määrittys perunan ja tomaatin kasveista

Testimenetelmä on tarkoitettu perunan mukuloille, joiden oireet ovat tyypillisiä tummalle rengasmädälle tai antavat aiheita epäillä tätä tautia, ja perunan ja tomaatin kasveille, joiden oireet ovat tyypillisiä bakteerilakastumistaudille tai antavat aiheita epäillä tätä tautia. Siihen kuuluu nopea seulontatesti, taudinaiheuttajan eristäminen infektoituneesta johtosolukosta määrittäjäalustalle ja, jos tulos on positiivinen, viljelmän tunnistaminen *Ralstonia solanacearum* -kasvintuhoajaksi.

## Etenemiskaavio



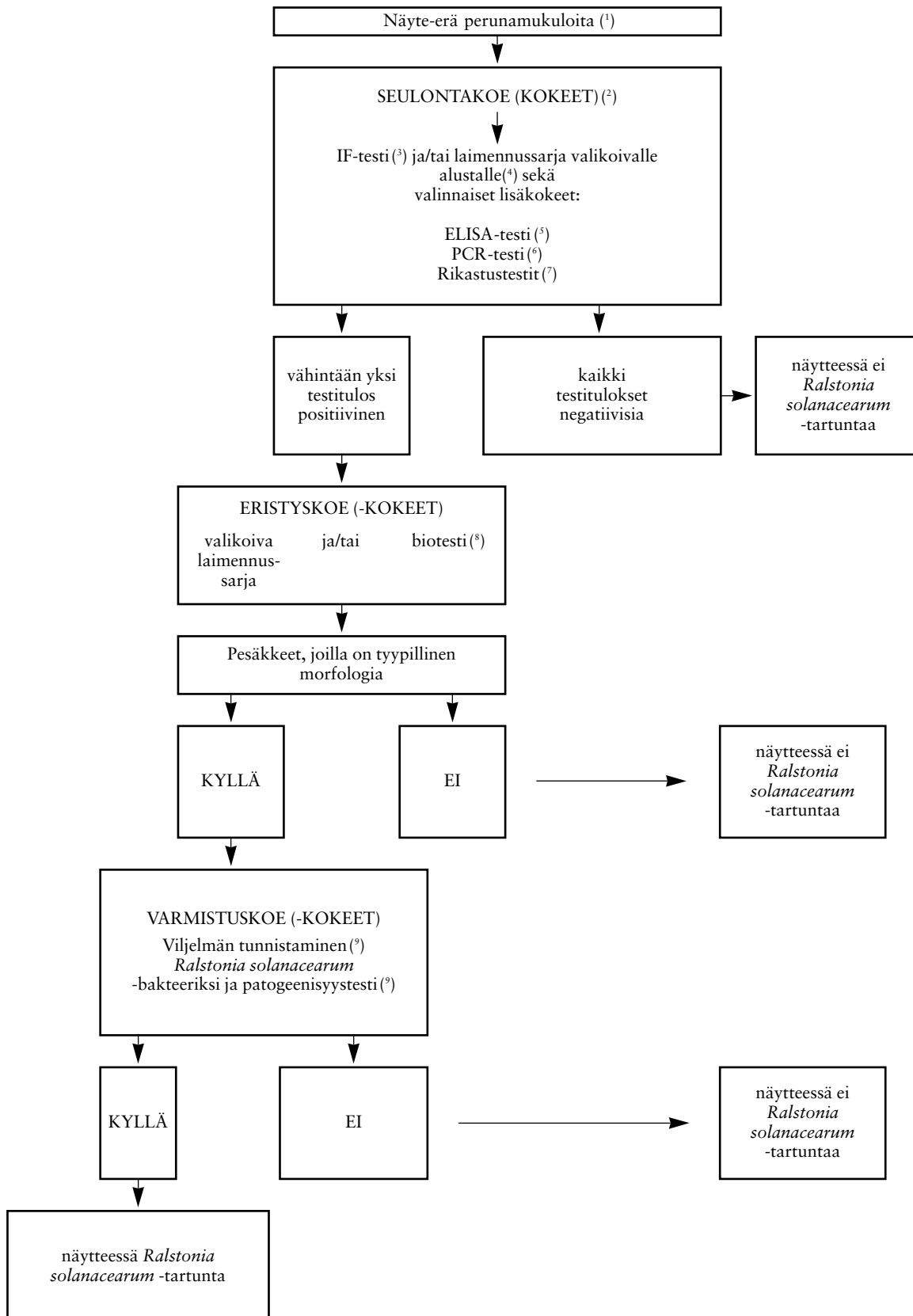
*Etenemiskaavion viittaukset*

- (<sup>1</sup>) Oireiden kuvaus esitetään II jakson 1 kohdassa.
- (<sup>2</sup>) Nopealla seulontakokeella voidaan tehdä alustava taudinmääritys.
- Tarkoituksenmukaiset testit ovat:
- johtosolukon valutustesti (II jakso, 2 kohta)
  - testi poly- $\beta$ -hydroksibutyraattirakeille (II jakso, 2 kohta)
  - IF-testi (III jakso, 2 kohta)
  - ELISA-testi (III jakso, 3 kohta)
  - PCR-testi (III jakso, 4 kohta)
- (<sup>3</sup>) Vaikka taudinaiheuttajan eristäminen tyypillisten oireiden perusteella laimennussarjalla on yksinkertaista, viljely voi epäonnistua, jos tartunta on edennyt pitkälle. Taudin saastuttamissa solukoissa elävät saprofyttiset bakteerit voivat ohittaa kasvussa taudinaiheuttajan tai estää taudinaiheuttajan kasvua eristysalustalla. Jos eristyskokeen tulos on negatiivinen, mutta taudin oireet tyypilliset, eristäminen on toistettava mieluiten valikoivalla laimennussarjalla.
- (<sup>4</sup>) *Ralstonia solanacearum* -kasvintuhoijan puhtaan viljelmän tunnistaminen luotettavasti on mahdollista vähintään yhden II jakson 4.1 kohdassa luetellun testin ja patogeneisyydestin avulla (II jakson 4.3 kohta). Biovarin ja rodun määrittäminen on vapaaehtoista, mutta sitä suositellaan kaikissa uusissa tapauksissa.

2. *Ralstonia solanacearum* -kasvintuhoajan toteaminen ja tunnistaminen perunan mukuloista otetuista näytteistä

Menettely on tarkoitettu piilevien tartuntojen toteamiseen perunan mukuloissa yhden tai mieluummin useamman seulontakokeen avulla. Jos tutkimustulos on positiivinen, sitä täydennetään eristämällä taudinaiheuttaja. Jos eristyskokeen tuloksena saadaan morfologialtaan tyyppillisiä pesäkkeitä, vuorossa on puhtaan viljelmän tunnistaminen *Ralstonia solanacearum* -bakteeriksi.

## Etenemiskaavio



*Etenemiskaavion viittaukset:*

## (1) Näytekokko

Standardi näytekokko on 200 mukulaa. Menetelmä soveltuu myös käytettäväksi alle 200 mukulan näytteille.

## (2) Seulontakoe (-kokeet)

Yksi ainoa testi ei ehkä ole riittävän herkkä tai luotettava *Ralstonia solanacearum* -bakteerin toteamiseksi näytteestä. Sen vuoksi suositellaan useampaa kuin yhtä testiä. Näiden testien olisi mahdollisuuksien mukaan oltava metodiikaltaan erilaisia.

## (3) Immunofluoresenssi (IF) -testi

IF-testi (epäsuora menetelmä) on hyvin tunnettu seulontakoe. Tämä on etu verrattuna muihin kokeisiin, joita ei ole vielä täysin kehitetty tai validoitu. Testiä käytetään moniin muihinkin lakisääteisiin bakteeritutkimuksiin, esim. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* tutkimuksiin. Testin herkkyys on  $10^3$ – $10^4$  solua/ml perunauutetta tämän menetelmän mukaisilla parametreilla.

Antiseerumin laatu on kriittinen tekijä koetulosten luotettavuuden kannalta. Ainoastaan sellainen antiseerumi, jonka tiiteri on korkea (vähintään 2000 käsittelemättömän antiseerumin osalta), on kelvollista, ja kaikki kokeet on tehtävä antiseerumitiiterillä tai tiiteriä pienemmällä yhdellä laimennoksella. Epäsuora menetelmä on parempi. Suoraa menetelmää voidaan soveltaa, jos koe on herkkyysasteeltaan ja spesifisyydeltään epäsuoraa menetelmää vastaava.

IF-testin etuna on se, että reaktion spesifisyydestä tietoa antavaa solujen värjäytymisen morfologiaa ja fluoresenssin voimakkuutta voidaan tulkita subjektiivisesti. Ristireaktiot solumorfologialtaan *Ralstonia solanacearum* -bakteerin kaltaisten maassa tai perunan solukoissa olevien serologisesti saman sukuisten bakteerien kanssa ovat tavallisia. IF-testiä voidaan käyttää ainoana seulontakokeena, vaikka tapauksissa, joissa epäillään ristireaktioita, olisi tehtävä toinen sellainen IF-testi, jossa käytetään eri alkuperää olevaa antiseerumia, tai vaihtoehtoinen seulontakoe. Tällaisissa tapauksissa valikoiva laimennussarja on sopivin koe.

## (4) Valikoiva laimennussarja

Kyseinen koe on herkkä ja valikoiva testi *Ralstonia solanacearum* -bakteerin toteamiseksi, jos käytetään muunnettua SMSA-alustaa ja tätä menetelmää varten määriteltyä testausmetodiikkaa. Tulos saadaan 3–6 päivää näytteen valmistuksen jälkeen. Taudinaiheuttaja saadaan eristettyä suoraan viljelmäksi ja se on helppo tunnistaa. Jotta testistä saataisiin täysi hyöty, testissä käytettävät mukuloiden pienet napapääät on käsiteltävä huolellisesti, jotta voidaan eliminoida toissijaiset bakteerit, jotka ovat alustalla *Ralstonia solanacearum* -bakteerin kilpailijoita ja voivat estää taudinaiheuttajan kehittymisen. Jotkut kannat voivat kasvaa heikosti, koska alustan aineosat vaikuttavat myös valikoivasti kohdeorganismiin. *Ralstonia solanacearum* -bakteerin erottamiseen muista alustalla mahdollisesti kehittyvistä bakteereista tarvitaan myös huolellisuutta. Valikoivaa laimennussarjaa voidaan käyttää ainoana seulontakokeena, vaikkakin kun saadaan negatiivinen testitulos ja kun epäillään muiden bakteerien estävän *Ralstonia solanacearum* -bakteerin kasvua alustalla, olisi tehtävä toinen seulontakoe. Tällaisissa tapauksissa IF-testi on sopivin koe.

## (5) ELISA-testi

ELISA-testi ei yleensä ole yhtä herkkä kuin IF-testi ( $10^4$ – $10^5$  solua perunauutteen yhtä millilitraa kohden). Tämä testi on halpa ja nopea, mutta antaa yleensä herkemmin vääriä positiivisia (ristireaktiot) tuloksia ja vääriä negatiivisia (fenolimolekyylin estävä vaikutus perunauutteessa) tuloksia. Antiseerumin spesifisyyttä koskevat vaatimukset ovat erittäin korkeat. ELISA-testiä ei voida käyttää ainoana seulontakokeena.

## (6) PCR-testi

PCR-testillä on mahdollista suorittaa toteaminen erittäin suurella herkkyydellä, vaikka kasvi- tai mukulauutteen aineosat estävät helposti koetta, jolloin saadaan vääriä negatiivinen tulos. Jotkut perunalajikkeet sisältävät toisia enemmän inhibiittoreita. Sen vuoksi on tarpeen poistaa nämä inhibiittorit. Inhibiittoreita voidaan torjua laimentamalla, mutta *Ralstonia solanacearum* -populaatiot laimenevat samalla. On noudatettava suurta huolellisuutta kaikissa näytevaiheissa ja testin valmistelussa sellaisen saastunnan estämiseksi, joka voisi aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia. Tämän vuoksi suoraa PCR-testiä ei voida käyttää ainoana seulontakokeena.

## (7) Rikastustesti

Perunauutenäytteiden inkubointi puolivalikoivassa liuoksessa, kuten muunnetussa SMSA-liuoksessa, tekee mahdolliseksi *Ralstonia solanacearum* -bakteerin lisääntymisen. Ehkä vielä tärkeämpää on se, että se laimentaa myös ELISA- ja PCR-testille mahdolliset inhibiittorit. Näin *Ralstonia solanacearum* -bakteeri voidaan havaita rikastusliuoksessa IF-, ELISA- ja PCR-testillä. Suoraa laimennussarjaa ei suositella tehtäväksi rikastusliuoksista. Näitä rikastusmenetelmiä ei ole perusteellisesti kokeiltu ja testattu. Ne on mainittu tässä, koska niihin sisältyy lupaavia mahdollisuuksia. Niitä ei kuitenkaan voida käyttää ainoana toteamismenetelmänä, koska niistä on suhteellisen vähän kokemusta.

## (8) Biotesti

Biotestiä käytetään *Ralstonia solanacearum* -bakteerin eristämiseen perunauutteesta käyttäen valikoivaa laimennussarjaa isäntäkasvissa ja se voidaan tehdä tomaatilla tai munakoisolla. Testi edellyttää optimaalisia menetelmässä tarkennettuja inkubointiolosuhteita. *Ralstonia solanacearum* -bakteerin inhibiittorit SMSA-alustalla eivät todennäköisesti häiritse testiä.

## (9) Varmistuskoe (-kokeet)

*Ralstonia solanacearum* -bakteerin puhdas viljelämä voidaan tunnistaa luotettavasti vähintään yhden II jakson 4.1. kohdassa luetellun testin ja patogeenisyydestin (II jakson 4.3. kohta) avulla. Biovarin ja rodun määrittäminen on vapaaehtoista, mutta sitä suositellaan kaikissa uusissa tapauksissa.

## II JAKSO

## TUMMAN RENGASMÄDÄN MÄÄRITYS PERUNAN MUKULOISTA JA BAKTEERILAKASTUMISTAUDIN MÄÄRITYS PERUNAN JA TOMAATIN KASVEISTA

## 1. Oireet

## 1.1 Oireet perunassa

*Perunan kasvi.* Tartunnan varhaisessa vaiheessa lehdet nuutuvat kasvin tyvestä alkaen päivällä lämpimällä säällä ja toipuvat yöllä. Nuutuminen jää nopeasti pysyväksi ja kasvi kuolee. Nuutuneiden kasvien varsien johtosolukko voi poikkileikkauksesta tarkasteltuna muuttua ruskeaksi ja maitomaista mätää valuu leikatulta pinnalta tai sitä saadaan helposti ulos pusertamalla. Kun leikattu varsi asetetaan veteen, johtosolukkokimpuista valuu limaa.

*Perunan mukula.* Perunan mukulat leikataan halki maavarren kiinnityskohdan läheltä. Tartunnan varhainen vaihe ilmenee lasimaisena värityksenä keltaisesta vaaleanruskeaan johtosolukkokorenkaassa, josta muutaman minuutin kuluttua pursuaa joko itsestään tai peukaloilla kevyesti kuoresta leikkauspinnan läheltä painettaessa vaaleankeltaista mätää. Myöhemmin johtojänteiden väritys muuttuu selvemmin ruskeaksi ja nekroosi voi laajeta tylppysolukkoon. Myöhemmässä vaiheessa tartunta leviää maavarren kiinnityskohdasta ja mukulan silmistä, mistä on seurauksena punaruskeita hieman painuneita kuoren viottumia, joista vuotaa bakteerimätää, johon maahiukkasia kiinnittyy.

## 1.2 Oireet tomaatissa

*Tomaatin kasvi.* Ensimmäinen näkyvä oire on nuorimpien lehtien velttous. Taudinaiheuttajalle suotuisissa ympäristöolosuhteissa (maaperän lämpötila noin 25 °C, kyllästyskosteus) on seurauksena muutaman päivän kuluessa epinastia ja kasvin yhden puolen tai koko kasvin nuutuminen, mikä johtaa koko kasvin kollapsiin. Vähemmän suotuisissa olosuhteissa (maaperän lämpötila alle 21 °C) varteen saattaa kehittyä suuri määrä versojuuria. Varren pinnalla on mahdollista havaita rasvainen nuora, joka on osoitus johtojärjestelmän nekroosista. Leikattaessa vartta poikittaissuunnassa varren värityneen ruskeat johtosolukot tiukuvat valkoisia pisaroita tai kellertävää bakteerimätää.

## 2. Nopeat seulontakokeet

Nopeilla seulontakokeilla voidaan tehdä alustava taudinmääritys. Käytetään yhtä tai useampaa seuraavista kokeista:

*Valutuskoe*

*Ralstonia solanacearum* -bakteerin esiintyminen nuutuneissa perunan tai tomaatin varsissa voidaan arvioida seuraavalla yksinkertaisella ennakoivalla kokeella:

Varsi leikataan juuri maanpinnan yläpuolelta. Leikattu pinta asetetaan dekantterilasiin, jossa on vettä. Pian tämän jälkeen bakteerilimaa alkaa itsestään valua johtosolukkokimpuista. Mikään muu johtosolukkoja perunan tai tomaatin kasveissa tartuttava bakteeri ei aiheuta tällaista ilmiötä.

*Poly-β-hydroksibutyraattirakeiden (PHB) toteaminen*

PHB-rakeet *Ralstonia solanacearum* -bakteerin soluissa saadaan näkyviin värjäämällä niilinsinisellä A tai sudaninmustalla B.

Valmistetaan preparaatti joko limasta taikka suspendoidusta solukosta mikroskooppilevylle tai preparaatti 48 tunnin viljelmästä YPGA- tai SPA-alustalla (lisäys 1). Valmistetaan positiiviset kontrollipreparaatit biovarin 2 tai rodun 3 kannasta. Annetaan kuivua. Kuljetetaan levyn pohja useita kertoja nopeasti liekin läpi kunnes preparaatti on kiinnittynyt.

## Niilinsinisellä tehtävä testi

1. Peitetään kiinnittynyt preparaatti niilinsinisen A 1-prosenttisellä vesiliuoksella. Inkuboidaan 10 minuutin ajan 55 °C:ssa.
2. Valutetaan värjäävä liuos pois. Pestään nopeasti vedellä hiljaa valuvan hanan alla. Poistetaan ylimääräinen vesi paperipyyhkeellä.
3. Peitetään preparaatti 8-prosenttisellä etikkahapon vesiliuoksella.  
Inkuboidaan 1 minuutin ajan laboratoriolämpötilassa.
4. Pestään vedellä hiljaa valuvan hanan alla. Pyyhitään kuivaksi paperipyyhkeellä.
5. Kostutetaan uudelleen pisaralla vettä. Asetetaan peitelevy.
6. Tutkitaan värjäytynyttä preparaattia mikroskoopilla, joka on varustettu epifluoresoivalla valonlähteellä, aallonpituudella 450 nm öljyimmissio-objektiivilla 1 000-kertaisella suurennoksella.

Tarkastellaan PHB-rakeiden kirkkaan oranssia fluoresenssia. Tarkastellaan myös tavanomaisessa valaistuksessa sen varmistamiseksi, että rakeet ovat solunsisäisiä ja että solujen morfologia on tyypillinen *Ralstonia solanacearum* -bakteerille.

### Sudaninmustalla tehtävä testi

- 1) Peitetään kiinnittynyt preparaatti sudaninmustan B 0,3-prosenttisella 70-prosenttisessä etanolissa olevalla liuoksella. Inkuboidaan 10 minuutin ajan laboratoriolämpötilassa.
- 2) Valutetaan värjäävä liuos pois. Pestään nopeasti vedellä hanan alla. Poistetaan ylimääräinen vesi paperipyyhkeellä.
- 3) Uputetaan preparaatti nopeasti ksyloliiniin. Pyyhitään kuivaksi paperipyyhkeellä. Varoitus! Ksyloliini on haitallinen tuote. Työskennellään vetokaapissa.
- 4) Peitetään preparaatti 0,5-prosenttisellä (w/v) safraniinin vesiliuoksella ja jätetään 10 sekunniksi laboratoriolämpötilaan. Varoitus! Safraniini on haitallinen tuote. Työskennellään vetokaapissa.
- 5) Pestään vedellä hiljaa valuvan hanan alla. Pyyhitään kuivaksi paperipyyhkeellä. Asetetaan peitelevy päälle.
- 6) Tutkitaan värjäytyynyttä preparaattia valomikroskoopilla öljyssä 1 000-kertaisella suurennoksella.

*Ralstonia solanacearum* -bakteerin solujen PHB-rakeet värjäytyvät sinimustiksi. Solunseinämä värjäytyy vaaleanpunaiseksi.

### Muut testit

Muut soveltuvat seulontatestit ovat IF-testi (jakso III.2), ELISA-testi (jakso III.3) ja PCR-testi (jakso III.4).

## 3. Eristämismenettely

3.1 Otetaan bakteerilimaa tai värittyneen solukon pala mukulan johtosolukkorenkaasta tai perunan tai tomaatin kasvin varren johtojänteistä. Suspendoidaan pieneen määrään steriiliä tislattua vettä tai 50 mM fosfaatipuskuriin. Jätetään 5–10 minuutiksi työpöydälle.

3.2 Valmistetaan suspensiosta vähintään kaksi kymmenkertaista laimennosta, 1/10 ja 1/100 tai useampia, jos se on tarpeellista.

3.3 Siirretään vakiomäärä suspensiota ja laimennoksia tavalliselle ravintoalustalle (NA, YPGA ja SPA lisäys 1) ja/tai Kelman's tetrazolium-alustalle (lisäys 1) ja/tai valikoivalle SMSA-alustalle (lisäys 7) ja levitetään tarkoituksenmukaisella laimennussarjatekniikalla. Tarvittaessa valmistetaan sarja erillisiä maljoja, joissa on laimennettua solususpensioviljelmää *Ralstonia solanacearum* -bakteerikannan rodun 3 biovaria 2 positiivisena kontrollina.

3.4 Inkuboidaan maljoja 3 päivän ajan 28°C:ssa. Inkubointia voidaan jatkaa 6 päivään jos kasvu on hidasta, mutta SMSA-alustalla olevat pesäkkeet voivat muuttua ei-tyypillisiksi ja kuolla.

Tavallisella ravintoalustalla elinvoimaiset *Ralstonia solanacearum* -bakteerin isolaatit kehittyvät helmenvalkoisiksi, litteiksi, epäsäännöllisen muotoisiksi ja juokseviksi pesäkkeiksi, jotka ovat usein tyyppillisesti kierteisiä.

Kelman's Tetrazolium -alustalla *Ralstonia solanacearum* -lajin virulenttien isolaattien tyyppilliset pesäkkeet ovat kermamaisia, litteitä, epäsäännöllisiä ja juoksevia ja niiden keskellä on verenpunaisia kierteitä. Avirulenttien *Ralstonia solanacearum* -isolaattien pesäkkeet ovat tummanpunaisia.

SMSA-alustalla tyyppilliset elinvoimaiset *Ralstonia solanacearum* -bakteerin isolaatit kehittyvät maidonvalkoisiksi, litteiksi, epäsäännöllisen muotoisiksi ja juokseviksi pesäkkeiksi, joiden keskiosan väri on verenpunainen.

Avirulentit *Ralstonia solanacearum* -bakteerin muodot kehittävät vähemmän juoksevia pesäkkeitä, joiden väri SMSA-alustalla vaihtelee täysin vaaleanpunaisesta punaiseen.

3.5 Puhdistetaan pesäkkeet, joiden morfologia on luonteenomainen, jatkoviljelmällä tavanomaisella ravintoalustalla. Vältetään säännöllistä jatkoviljelyä, joka voi johtaa elinvoimaisuuden vähenemiseen.

## 4. Varmistuskoe (-kokeet)

4.1 *Ralstonia solanacearum* -bakteerin tunnistaminen

*Ralstonia solanacearum* -bakteerin puhdasviljelmät tunnistetaan vähintään yhdellä seuraavista menetelmistä:

Ravinto- ja entsyymaattiset testit

*Huom.* Mukaan on valikoitu testejä, joilla on ratkaiseva merkitys lajin ja biovarin määrittämisessä.

Seuraavat *Ralstonia solanacearum* -bakteerin fenotyyppiset ominaisuudet joko esiintyvät tai puuttuvat:

fluoresoiva pigmentti	-
PHB-inkluusiot	+
O/F-testi	O+/F-
katalaasi	+
Kovacsin oksidaasi	+
nitraatin vähentäminen	+
<hr/>	
sitraatin käyttö	+
kasvu 40 °C:ssa	-
<hr/>	
kasvu 1-prosenttisessa NaCl:ssa	+
kasvu 2-prosenttisessa NaCl:ssa	-
arginiinidihydrolaasi	-
gelatiinin sulatus	-
tärkkelyksen hydrolyysi	-
eskuliinin hydrolyysi	-
levaanin tuotanto	-

ravintoliuokset ja menetelmät, ks. Lelliott & Stead (1987).

#### IF-testi

Valmistetaan viljelmästä ja positiivisesta kontrollikannasta suspensio, jossa on  $10^6$  solua millilitraa kohden. Valmistetaan sarja antiseerumin kaksinkertaisia laimennoksia. Sovelletaan IF-menettelyä (III jakson 2. kohta). Viljelmän IF-tiitterin on vastattava positiivisen kontrollin tiitteriä.

#### ELISA-testi

Valmistetaan viljelmästä ja positiivisesta kontrollikannasta suspensio, jossa on  $>10^6$  solua millilitraa kohden. Sovelletaan ELISA-menettelyä (III jakson 3. kohta). Viljelmän ELISA-arvon on vastattava positiivisen kontrollin arvoa.

#### PCR-testi

Valmistetaan viljelmästä ja positiivisesta kontrollikannasta suspensio, jossa on  $10^6$  solua millilitraa kohden. Sovelletaan PCR-menettelyä (III jakson 4. kohta). Viljelmän PCR tuotteen on vastattava määrältään ja restriktio entsyymianalyysi (REA) -kuvioiltaan positiivista kontrollia.

#### Fluoresoiva in-situ hybridisaatio (FISH)

Valmistetaan viljelmästä ja positiivisesta kontrollikannasta suspensio, jossa on  $10^6$  solua millilitraa kohden. Sovelletaan FISH-menettelyä (van Beuningen *et al.*, 1995) sekä OLI-1 PCR aluketta (Sea *et al.*, 1993). Viljelmässä on ilmentävä samat reaktiot kuin positiivisessa kontrollissa.

#### Proteiiniprofilointi

Denaturoidut kokonaiset soluproteiinit erotetaan polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (PAGE) (Stead, 1992a).

#### Rasvahappoprofilointi (FAP)

Kasvatetaan viljelmää ja positiivista kontrollikantaa 48 tunnin ajan 28 °C:ssa tryptikaasisoija-agarilla ja sovelletaan FAP-menettelyä (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead 1992b). Viljelmän profiilin on oltava sama kuin positiivisella kontrollilla. Tarkasti määritellyissä olosuhteissa luonteenomaiset rasvahapot ovat 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH ja 18:1 2OH.

## 4.2

### Kantojen määrittäminen

Kannan määrittäminen on vapaaehtoista, mutta suositeltavaa kaikissa uusissa tapauksissa.

## Biovarin määrittäminen

*Ralstonia solanacearum* -bakteerin biovarit erotetaan kolmen heksoosialkoholin ja kolmen sokerin käyttö- ja hapettamiskyvyn perusteella (Hayward, 1964 ja 1994):

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Käyttö:					
— maltoosi	-	+	+	-	+
— laktoosi	-	+	+	-	+
— sellobioosi	-	+	+	-	+
— mannitoli	-	-	+	+	+
— sorbitoli	-	-	+	+	-
— dulcitol	-	-	+	+	-

Lisäkokeet jakavat biovarin 2 alafenotyyppeihin (Hayward, 1994):

	Biovar 2	Biovar 2-A	Biovar 2-T
trehaloosin käyttö	-	+	+
inositolin käyttö	+	-	+
D-riboosin käyttö	-	-	+
pektolyttinen aktiivisuus	alhainen	alhainen	korkea

## Rodun määrittäminen

Rotu (Buddenhagen *et al.*, 1962) määritetään patogeenisyydestin perusteella tomaatti- tai munakoisoskasveista ja tupakkakasveista ja yliherkkyysoiretestillä (HR) tupakan lehdistä (Lozano ja Sequeira, 1970):

	Rotu(*)		
	1	2	3
Reaktio:			
— tomaatti/munakoisoskasveissa	nuutuminen	ei reaktiota	nuutuminen
— tupakkakasveissa	nuutuminen	ei reaktiota	ei reaktiota
— tupakan lehdistä	nekroosi (48 h) ja nuutuminen (7—8 pv)	HR (12—24 h)	Kloroosi (2—8 pv)

(\*) Rotua 4 (patogeeninen inkiväärillä ja muutamilla muilla isäntäkasveilla) ja rotua 5 (patogeeninen vain mulperipuulla) ei ole sisällytetty.

Rodun määrittäminen tupakan hypersensitiivisyysreaktioon perustuvalla patogeenisyydestillä ei ole täysin luotettavaa, ja rotu voidaan sen sijaan määrittää biovarin ja eristetyn bakteerin isäntäkasvin perusteella.

Viljelmä voidaan lisäksi kuvata seuraavilla menetelmillä:

## Genomien sormenjäljet

*Ralstonia solanacearum* -kompleksin rotujen molekulaarinen erottaminen voi tapahtua:

RFLP-analyysillä (Cook *et al.*, 1989)

Toistuvan järjestyksen PCR:llä (REP-, ERIC- & BOX-PCR [Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995]).

## 4.3

## Patogeenisyydesti

Tämä testi on tarkoitettu varmistamaan *Ralstonia solanacearum* -bakteeriksi tunnistettujen viljelmien virulenssi.

Valmistetaan viljelmästä ja positiivisesta kontrollikannasta inokulaatti, jossa on 10<sup>6</sup>, solua millilitraa kohden. Inokuloidaan 5—10 kolmelehtiasteella olevaa tomaatti- tai munakoisoskasvia (III jakson 6. kohta). Inkuboidaan kahden viikon ajan 22°C — 28°C:ssa korkeassa suhteellisessa kosteudessa kastellen päivittäin. Tarkkaillaan nuutumisoireita, equinastiaa, kloroosia ja/tai hidastunutta kasvua.

Eristetään kasveista, joissa näkyy oireita:

— Poistetaan kudosta varresta 2 cm inokulointikohdan yläpuolelta.

— Pienennetään ja suspendoidaan pieneen määrään steriiliä tislattua vettä tai 50 mM fosfaattipuskuria. Viljellään maljassa, inkuboidaan ja tutkitaan tyypilliset *Ralstonia solanacearum* -pesäkkeet.

## III JAKSO

**RALSTONIA SOLANACEARUM -KASVINTUHOOJAN TOTEAMINEN JA TUNNISTAMINEN PERUNAN MUKULOISTA OTETUISTA NÄYTTEISTÄ**

*Huom.* Standardinäytekoko on 200 mukulaa. Menetelmä soveltuu myös käytettäväksi alle 200 mukulan näytteille.

**1. Näytteen valmistaminen koetta varten**

*Huom.* Kyseisessä menettelyssä saatavaa perunauutetta voidaan käyttää myös *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* -bakteerin toteamiseen.

Vapaavalintaiset esikäsittelyt, jos ne arvioidaan tarpeellisiksi:

- i) Inkuboidaan näytettä 25—30°C:ssa kahden viikon ajan piilevien *Ralstonia solanacearum* -populaatioiden lisääntymisen edistämiseksi.
- ii) Pestään mukulat juoksevalla vedellä tarkoituksenmukaisilla desinfiointi- ja puhdistusaineilla. Ilmakuivataan mukulat.

**1.1. Poistetaan puhtaalla ja desinfioidulla leikkausveitsellä tai vihannesveitsellä kuori mukulan napapäästä siten, että johtosolukot tulevat ensin näkyviin. Leikataan varovasti pieni kartionmuotoinen kappale (halkaisija 3—5 mm) johtosolukosta kunkin mukulan napapäästä. Yritetään pitää muun solukon kuin johtosolukon osuus mahdollisimman pienenä. Toistetaan 1 kohdan mukaiset toimet näytteen jokaisen mukulan kohdalla. Vaihetaan leikkausveitsen terää tai vihannesveistä näytteiden välillä.**

*Huom.* Mukuloiden silmämääräinen tarkastelu (II jakson 1 kohta) voidaan tehdä tässä vaiheessa. Laitetaan sivuun jokainen mukula, jossa on oireita, ja testataan yksittäin (II jakso).

**1.2. Kerätään solukkokappaleet suljettuun astiaan. Solukkokappaleet olisi mieluiten käsiteltävä viipymättä. Jos tämä ei ole mahdollista, niitä voidaan varastoida korkeintaan 24 tunnin ajan tai 4°C:ssa korkeintaan 72 tunnin ajan.****1.3. Käsitellään solukkokappaleet yhtä seuraavista menettelyistä noudattaen:**

- i) Siirretään solukkokappaleet sopivaan säiliöön.  
Lisätään riittävä määrä liotuspuskuria (lisäys 2) peittämään kappaleet. Jauhetaan kappaleet hienoksi Waring Blenderissä tai Ultra Thurraxissa kunnes ne ovat juuri homogenoituneet. Vältetään liiallista homogenointia. Annetaan massan liota 15—30 minuuttia.
- ii) Siirretään solukkokappaleet sopivaan säiliöön.  
Lisätään riittävä määrä liotuspuskuria peittämään kappaleet.  
Asetetaan säiliö tasoravistimeen.  
Inkuboidaan 50—100 rpm:n kierrosnopeudella neljän tunnin ajan 20—22°C:ssa tai 16—24 tunnin ajan 4°C:ssa.
- iii) Siirretään solukkokappaleet vahvaan kertakäyttöiseen maseraatiopussiin (esim. Stomacher-pussi, jonka mitat ovat 105 mm × 150 mm, säteilysteriili).  
Murskataan solukkokappaleet varovasti sopivalla työkalulla, esim. vasaralla, kunnes ne ovat juuri homogenoituneet.  
Lisätään riittävä määrä liotuspuskuria peittämään murskatut kappaleet. Annetaan massan seistä 15—30 minuuttia.

**1.4. Uutetaan bakteerit käsitellyistä solukkokappaleista jollakin seuraavista menettelyistä:**

- i) Dekantoidaan liuos varovasti sentrifugiputkeen jättäen jäännökset säiliöön tai pussiin.  
Vaihtoehto: Jos dekantoitu liuos on sameaa: sentrifugoidaan enintään 180 xg 10 minuutin ajan alle 10°C:n lämpötilassa.  
Sentrifugoidaan dekantoitua liuosta tai ensimmäisestä sentrifugoinnista saatua supernatanttia 7 000 xg 15 minuutin ajan tai 10 000 xg 10 minuutin ajan alle 10°C:n lämpötilassa.  
Poistetaan supernatantti sakkaa sekoittamatta.
- ii) Suodatetaan liuos sellaisen suodatusjärjestelmän läpi, jonka huokoskoko on 40—100 µm. Tehostetaan suodatusta tyhjiöpumpulla.  
Kootaan suodos sentrifugiputkeen.  
Pestään suodatin liotuspuskurilla.  
Sentrifugoidaan suodosta 7 000 xg 15 minuutin ajan tai 10 000 xg 10 minuutin ajan alle 10°C:n lämpötilassa.  
Poistetaan supernatantti sakkaa sekoittamatta.

- 1.5. Suspendoidaan sakka uudelleen 1 ml:aan sakkapuskuria (lisäys 2).  
Jaetaan kahteen yhtä suureen osaan ja siirretään kumpikin osa pieneen koeputkeen.  
Käytetään toinen koeputkista testaukseen. Säilytetään loput tästä uutteesta 4°C:n lämpötilassa testauksen ajan.  
Lisätään 10—25 % (v/v) steriiliä glyserolia toiseen koeputkeen. Sekoitetaan (Vortex). Varastoidaan -18°C:n lämpötilaan (viikoiksi) tai -70°C:n lämpötilaan (kuukausiksi).
2. **Immunofluoresenssitesti (IF)**  
Käytetään *Ralstonia solanacearum* -bakteerin, mieluiten rodun 3 biovaria 2, antiseerumia. Määritetään tiitteri suspensios-  
ta, jossa on 10<sup>6</sup> solua millilitraa kohden *Ralstonia solanacearum* -bakteerin homologisesta kannasta sopivalla fluoreseiini  
-isotiosyanaattikonjugaatin (FITC) laimennoksella valmistajan suositusten mukaisesti. Käsittelemättömän antiseerumin  
IF-tiitterin olisi oltava vähintään 1:2 000.  
Käytetään mikroskoopin monisyvennyslevyjä, joissa on mieluiten 10 halkaisijaltaan vähintään 6 mm:n syvennystä.  
Käytetään FITC-konjugaattikontrollia ja fosfaattipuskuroidun suolaliuoksen (PBS) kontrollia kullakin testilevyllä. Testi  
olisi toistettava PBS-kontrollin kanssa, jos FITC-kontrollissa havaitaan yksikin positiivinen solu. Valmistetaan erilliset  
positiiviset kontrollilevyt suspensiosista, jossa on 10<sup>6</sup> solua millilitraa kohden, *Ralstonia solanacearum* -bakteerikannan  
rodun biovarin. Sisällytetään yksi levy kuhunkin testisarjaan.
- 2.1. Käsitellään testilevyt yhdellä seuraavista menettelyistä:
- i) Sakat, jossa on suhteellisen vähän tärkkelystä:  
Pipetoidaan mitattu vakiomäärä (15 µl on sopiva halkaisijaltaan 6 mm:n syvennykseen — lisätään määrää samassa  
suhteessa suuremmille syvennyksille) uudelleen suspendoitua sakkaa riville syvennyksiä. Jäljellä olevaa riviä voidaan  
käyttää toisintona tai toiselle näytteelle kuten kuvassa 1 on esitetty.
- ii) Muut sakat:  
Valmistetaan kymmenkertaisia laimennoksia, eli 1/10, 1/100 ja 1/1 000 uudelleen suspendoidusta sakasta sakkapusku-  
riin. Pipetoidaan mitattu vakiomäärä (15 µl on sopiva halkaisijaltaan 6 mm:n syvennykseen — lisätään määrää  
samassa suhteessa suuremmille syvennyksille) uudelleen suspendoitua sakkaa ja kutakin laimennosta riville syvennyk-  
siä. Jäljellä olevaa riviä voidaan käyttää toisintona tai toiselle näytteelle kuten kuvassa 2 on esitetty.
- 2.2. Annetaan pisaroiden kuivua. Kiinnitetään bakteerisolut levyille joko kuumentamalla, liekittämällä tai 95 % etanolilla.
- 2.3. IF-menettely
- i) Testilevyn valmistaminen 1 kohdan i alakohdan mukaisesti:  
Valmistetaan sarja kaksinkertaisia antiseerumin laimennoksia IF-puskuriin (lisäys 3): 1/4 tiitteriä (T/4), 1/2 tiitteriä  
(T/2), tiitteri (T) ja tiitteri kaksinkertaisena (2T).
- ii) Testilevyn valmistaminen 1 kohdan ii alakohdan mukaisesti:  
Valmistetaan työskentelylaimennos (WD) antiseerumista IF-puskuriin. Työskentelylaimennos on antiseerumin laimen-  
nos, jonka spesifisyys on optimaalinen, ja se on tavallisesti puolet tiitteristä.

Kuva 1

## Testilevyn valmistaminen 1 kohdan i alakohdan ja 3 kohdan i alakohdan mukaisesti

Vakiolaimennos uudelleen suspendoidusta sakasta

(T = tiitteri)

	FITC	T/4	T/2	T	2T	⇒ Antiseerumin kaksinkertaiset laimennokset
Näyte 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Näytteen 1 toi- sinto tai näyte 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

## Kuva 2

## Testilevyn valmistaminen 1 kohdan ii alakohdan ja 3 kohdan ii alakohdan mukaisesti

	FITC		Vakiolaimennos antiseerumista			⇒ Uudelleen suspendoidun sakan kymmenkertainen laimennos
	Laimentamaton	Laimentamaton	1/10	1/100	1/1 000	
Näyte 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Näytteen 1 toisinto tai näyte 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

2.3.1. Järjestetään levyt kostean paperipyyhkeen päälle.

Täytetään testisyvennykset antiseerumin laimennokse(i)lla. Pipetoidaan PBS:ää PBS- ja FITC-syvennyksiin. Syvennyksiin pipetoidun antiseerumin määrän on vastattava levitetyn uutteen määrää.

2.3.2. Inkuboidaan kannen alla 30 minuutin ajan huoneenlämmössä.

2.3.3. Ravistetaan antiseerumipisarat pois levyiltä ja huuhdellaan levyt varovasti IF-puskurilla. Pestään 5 minuutin ajan Tween-IF-puskurissa ja sen jälkeen 5 minuutin ajan IF-puskurissa (lisäys 3).

Poistetaan varovasti ylimääräinen kosteus paperipyyhkeellä.

2.3.4. Järjestetään levyt kostean paperipyyhkeen päälle.

Täytetään testisyvennykset ja FITC-syvennykset FITC-konjugaatin laimennoksella, jota on käytetty titterin määrittämiseen. Syvennyksiin pipetoidun konjugaatin määrän on vastattava pipetoidun antiseerumin määrää.

2.3.5. Inkuboidaan kannen alla 30 minuutin ajan huoneenlämmössä.

2.3.6. Ravistetaan konjugaattipisarat pois levyiltä. Huuhdellaan ja pestään kuten edellä (2.3.3). Poistetaan varovasti ylimääräinen kosteus paperipyyhkeellä.

2.3.7. Pipetoidaan 5—10 µl 0,1 M fosfaattipuskuroitua glyserolia (lisäys 3) kuhunkin syvennykseen ja asetetaan peitelevy.

2.4. IF-testin lukeminen

Tutkitaan testilevyjä mikroskoopilla, joka on varustettu epifluoresoivalla valonlähteellä, FITC:n eksitaatioon sopivilla suodattimilla öljyimmersion-objektiivin 500—1 000-kertaisella suurennoksella. Tutkitaan syvennyksiä tarkasti kohtisuoraan kahden halkaisijan suuntaisesti ja pitkin aukon kehää.

Tutkitaan ensin positiiviset kontrollilevyt. Solujen on oltava kirkkaasti fluoresoivia ja täydellisesti värjäytyneitä. *Huom.* Testi on uusittava, jos värjäytyminen ei ole täydellistä.

Tutkitaan testilevyt. Tarkastellaan ensin fluoresoivien solujen puuttumista FITC-kontrollisyvennyksissä. Fluoresoivat solut FITC-kontrollissa osoittavat konjugaatin epäspesifistä sitoutumista, autofluorisaatiota tai kontaminaatiota. *Huom.* Toistetaan testi, jos tällaista ilmenee.

Tarkastellaan testisyvennyksissä kirkkaasti fluoresoivia soluja, joiden morfologia on tyypillinen *Ralstonia solanacearum*-bakteerille. Fluoresenssin intensiteetin on vastattava positiivista kontrollikantaa samassa antiseerumilaimennoksessa. Sellaisia soluja, joiden värjäytyminen on kirjavaa tai epätäydellistä tai joiden fluoresenssi on heikko, ei oteta huomioon, paitsi, jos tällaisia soluja on paljon. (Ks. IF-testin tulosten tulkinta).

*IF-testin tulosten tulkinta:*

- i) Jos näytteestä ei löydy kirkkaasti fluoresoivia soluja, joiden morfologia on tyypillinen, IF-testin tulos on negatiivinen.
- ii) Jos näytteestä löytyy kirkkaasti fluoresoivia soluja, joiden morfologia on tyypillinen, solujen keskimääräinen lukumäärä määritetään mikroskooppikenttää kohden ja lasketaan solujen lukumäärä (N) uudelleen suspendoidun sakan millilitraa kohden (lisäys 4).

IF-testin herkkyys on noin  $10^3$  solua/ml uudelleen suspensoitua sakkaa:

— jos näytteissä on  $N > 10^3$  solua millilitraa kohden, IF-testin tulos on positiivinen,

— jos näytteissä on  $N > 10^3$  solua millilitraa kohden, IF-testin tulosta voidaan pitää positiivisena.

iii) Jos näytteessä on paljon ( $< 10^5$  solua millilitraa kohden) epätäydellisesti tai heikosti fluoresoivia soluja antiseerumin tiitterillä, näyte tulisi testata uudelleen:

— joko toisella, biologisesti erilaisella testillä

tai

— toisella IF-testillä, jossa käytetään eri antiseerumia tai sakasta tehtyä kymmenkertaista laimennossarjaa.

### 3. ELISA-testi

(Robinson-Smith *et al.*, 1995)

Käytetään *Ralstonia solanacearum* -bakteerin, mieluiten rodun 3 biovaria 2, antiseerumia. Määritetään tiitteri suspensios-  
ta, jossa on  $10^6$  solua millilitraa kohden, *Ralstonia solanacearum* -bakteerin homologisesta kannasta.

*NUNC Polysorb* -mikrotiitterilevyjen käyttöä suositellaan.

Testiin sisällytetään negatiivinen perunauutekontrolli ja fosfaattipuskuroidun suolaliuoksen (PBS) kontrolli.

Positiivisena kontrollina käytetään suspensiota, jossa on  $10^6$  solua millilitraa kohden, *Ralstonia solanacearum* -bakteeri-  
kannan rodun biovaria. Testataan kuten näyte (näytteet), mutta pidetään selvästi erillään mikrotiitterilevyllä olevista  
näytteistä.

- 3.1. Pipetoidaan 100—200  $\mu$ l uudelleen suspendoitua sakkaa pieneen putkeen. Kuumennetaan neljän minuutin ajan 100 °C:n  
lämpötilassa. Siirretään putki jäihin.
- 3.2. Lisätään yhtä suuri määrä väkevyydeltään kaksinkertaista karbonaattikiinnityspuskuria (lisäys 5). Sekoitetaan (Vortex).
- 3.3. Lisätään 100  $\mu$ l kuhunkin, *vähintään* kahteen, mikrotiitterilevyn syvennykseen. Inkuboidaan yhden tunnin ajan 37 °C:n  
lämpötilassa tai yön yli 4 °C:n lämpötilassa.
- 3.4. Kaadetaan uutteen syvennyksistä. Pestään syvennykset kolmeen kertaan PBS-Tweenillä (lisäys 5) niin, että viimeinen  
pesuliuos jätetään syvennyksiin vähintään viideksi minuutiksi.
- 3.5. Valmistetaan sopiva laimennos *Ralstonia solanacearum* -bakteerin antiseerumista estopuskuriin (blocking buffer) (lisäys 5).  
Lisätään 100  $\mu$ l antiseerumin laimennosta syvennyksiin.  
Inkuboidaan yhden tunnin ajan 37 °C:n lämpötilassa.
- 3.6. Kaadetaan antiseerumi syvennyksistä. Pestään syvennykset kuten edellä (3.4.).
- 3.7. Valmistetaan sopiva laimennos emäksistä fosfataasikonjugaattia estopuskuriin (blocking buffer). Lisätään 100  $\mu$ l konju-  
gaatin laimennosta syvennyksiin.  
Inkuboidaan yhden tunnin ajan 37 °C:n lämpötilassa.
- 3.8. Kaadetaan konjugaatti syvennyksistä. Pestään syvennykset kuten edellä (3.4. ja 3.6.).
- 3.9. Valmistetaan emäksinen fosfataasisubstraattiliuos (lisäys 5). Lisätään 100  $\mu$ l syvennyksiin. Inkuboidaan 30 minuutista  
yhteen tuntiin pimeässä laboratoriolämpötilassa.
- 3.10. Mitataan absorbanssi 409 nm:ssä.

#### *ELISA-testin tulkinta*

ELISA-testi on negatiivinen, jos näytteen optinen tiheys (O.D.) on  $< 2 \times$  negatiivisen kontrollin optinen tiheys.

ELISA-testi on positiivinen jos näytteen optinen tiheys (O.D.) on  $> 2 \times$  negatiivisen kontrollin optinen tiheys.

### 4. PCR-testi

(Seal *et al.*, 1993)

*Huom.* Kaikissa näytteen esikäsittelyvaiheissa ja muissa PCR:ään liittyvissä käsittelyissä on käytettävä suodattimella  
varustetun pipetin kärkiä.

Valmistetaan suspensio, jossa on  $10^6$  solua millilitraa kohden, *Ralstonia solanacearum* -bakteerikannan rodun 3  
biovaria 2, positiiviseksi kontrolliksi. Testataan kuten näyte (näytteet).

- 4.1. Pipetoidaan 100  $\mu$ l uudelleen suspendoitua sakkaa pieneen putkeen. Vaihtoehtoisesti siirretään 90  $\mu$ l uudelleen  
suspendoitua sakkaa pieneen putkeen, jossa on 10  $\mu$ l 0,5 M NaOH:ta. Sekoitetaan kääntelemällä putkea useita kertoja.

- 4.2. Kuumennetaan neljän minuutin ajan 100 °C:n lämpötilassa. Siirretään putki välittömästi jäihin.
- 4.3. Valmistetaan kymmenkertaiset laimennokset, esim. 1/10 ja 1/100, steriiliin tislattuun tai ultrapuhtaaseen veteen (UPW).
- 4.4. Valmistetaan PCR-reaktioseos (lisäys 6) steriiliin putkeen lisäämällä seuraavat aineosat seuraavassa järjestyksessä:

50 µl:n reaktiotilavuuteen:

Aine	Osamäärä	Lopullinen pitoisuus
Steriili tislattu vesi tai UPW	30,8 µl — 33,8 µl	
10×PCR puskuri	5,0 µl	1 ×
d-ATP	1,0 µl	0,2 mM
d-CTP	1,0 µl	0,2 mM
d-GTP	1,0 µl	0,2 mM
d-TTP	1,0 µl	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 µM)	2,5 µl	1 mM
Primer Y-2 (20 µM)	2,5 µl	1 mM
Taq-polymeraasi (5U/µl)	0,2 µl	1,0 U
	45 µl — 48 µl	

Lisäreaktioihin:

Lasketaan kunkin aineosan määrä vaaditulle lukumäärälle reaktioita.

Sekoitetaan aineosat ja siirretään 45 µl — 48 µl seosta steriileihin PCR-putkiin.

Pidetään putket, joissa on PCR-reaktioseosta, jäissä.

25 µl:n reaktiotilavuuteen:

Pienennetään aineosien määriä vastaavasti.

- 4.5. PCR:n monistaminen
- 4.5.1. Vapaaehtoista! Sentrifugoidaan (pulse centrifuge) putket keitetyn näytteen ja positiivisen kontrollin kanssa.
- Lisätään täsmennetyssä järjestyksessä 2—5 µl näytettä (näytteitä), vesikontrollia ja positiivista kontrollia putkiin, joissa on PCR-reaktioseosta. Asetetaan putket DNA-lämpösyklilaitteen (DNA thermal cycler) lämpöblokkiin.
- 4.5.2. Ajetaan seuraava ohjelma:
- 1 sykli:
- i) 2 minuuttia 96 °C:n lämpötilassa: templaatin (DNA-näytteen) denaturointi
- 50 sykliä:
- ii) 20 sekuntia 94 °C:n lämpötilassa: denaturointi
- iii) 20 sekuntia 68 °C:n lämpötilassa: alukkeiden (primers) pariutuminen
- iv) 30 sekuntia 72 °C:n lämpötilassa: kopioiden lisääminen
- 1 sykli:
- v) 10 minuuttia 72 °C:n lämpötilassa: lisääminen edelleen
- 1 sykli:
- vi) pidetään 4 °C:n lämpötilassa
- Huom.* Nämä parametrit koskevat Perkin Elmer 9600:ta. Muut lämpösyklilaitteet voivat vaatia mineraaliöljyperroksen PCR-reaktioputkiin ja/tai vaiheiden ii), iii) ja iv) keston muuttamisen monistamisohjelmassa.
- 4.5.3. Poistetaan putket lämpösyklilaitteesta. Analysoidaan PCR-tuote. Jos tätä ei tehdä välittömästi, putket varastoidaan 4 °C:n lämpötilaan samana päivänä käytettäväksi tai -18 °C:n lämpötilaan pidemmäksi aikaa varastoitavaksi.
- 4.6. PCR-tuotteen määrittäminen
- PCR-fragmentit todetaan agaroosigeelielektroforeesilla ja etidiumbromidivärjäyksellä.
- 4.6.1. Valmistetaan tarkoituksenmukainen agaroosigeeli kuumentamalla varovasti kiehumapisteeseen agaroosia trisetaattielektroforeesipuskurissa (TAE).

- 4.6.2. Jäähdytetään sulanut agarooosi 50—60 °C:seen, kaadetaan elektroforeesiyksikön muottiin ja lisätään kampa. Annetaan geelin jähmettyä.
- 4.6.3. Poistetaan kampa. Peitetään geeli TAE:lla niin, että se juuri ja juuri peittyy (2—3 mm) puskurilla.
- 4.6.4. Pipetoidaan 3  $\mu$ l latauspuskuria (loading buffer) parafilmille. Lisätään 12  $\mu$ l PCR-tuotetta joko näytteistä, positiivisesta kontrollista tai vesikontrollista ja sekoitetaan imemällä kevyesti pipetinkärjestä ennen täyttämistä. Annettuja määriä voidaan muuttaa agarosigeelisyvennyksen tilavuuden mukaan.
- 4.6.5. Täytetään geelisyvennykset varovasti. Laitetaan vertailuksi sopiva DNA-markkeri vähintään yhteen syvennykseen.
- 4.6.6. Kytetään virtalähde ja virta elektroforeesilaitteeseen. Ajetaan geeliä 5—8 V/cm kunnes seurantaindikaattorin rintama on 1 cm:n päässä geelin reunasta.
- 4.6.7. Kytetään virta pois virtalähteestä. Irrotetaan johdot elektroforeesiyksiköstä. Poistetaan geeli varovasti. Liotetaan sitä etidiumbromidiliuoksessa 30—45 minuutin ajan.
- Huom.* Käytetään kertakäyttökäsineitä aina, kun käsitellään etidiumbromidia, joka on voimakas mutageeni!
- 4.6.8. Poistetaan väriä tislatussa vedessä 10—15 minuutin ajan.
- 4.6.9. Saatetaan moniste(tut)ttu DNA-fragmentti(it) näkyviin UV-läpivalaisulla. *Ralstonia solanacearum* -bakteerin PCR-tuote OLI-1- ja Y-2-alkukeyhdistelmällä tuotettuna on 288 bp:n pituinen. Tutkitaan DNA-markkeriin ja positiiviseen kontrolliin verrattuna.
- Huom.* Vesikontrollin on oltava aina negatiivinen; jos se on positiivinen, testi toistetaan.
- 4.6.10. Valokuvataan geeli, jos tiedon tallentamista vaaditaan.
- 4.6.11. Varmistetaan monistetun fragmentin autenttisuus restriktioentsyymianalyysillä (REA).
- 4.7. Restriktio-entsyymianalyysi (REA)
- 4.7.1. Siirretään 8,5  $\mu$ l PCR-tuotetta (4.5.3.) uuteen pieneen putkeen. Lisätään 1  $\mu$ l 10x entsyymipuskuria ja 0,5  $\mu$ l rajoittavaa entsyymiä Avall.
- 4.7.2. Sekoitetaan imemällä kevyesti pipetinkärjellä. Jos pisaroita jää pullon seinämiin, sentrifugoidaan (pulse spin) mikrosentrifugilla. Inkuboidaan yhden tunnin ajan 37 °C:n lämpötilassa.
- 4.7.3. Määritetään pilkottu PCR-fragmentti agarosigeelielektroforeesilla kuten edellä (4.6.).
- PCR-testin tulosten tulkinta*
- PCR-testi on negatiivinen, jos tyypillistä 288 bp -fragmenttia ei todeta ja fragmentti todetaan *Ralstonia solanacearum* -kannan positiivisesta kontrollista.
- PCR-testi on positiivinen, jos tyypillinen 288 bp -fragmentti todetaan ja monistetun fragmentin REA-määrittämisestä saadaan sama tulos kuin *Ralstonia solanacearum* -kannan positiivisen kontrollin määrittämisestä.
5. **Laimennussarja valikoivalle alustalle**
- (Elphinstone *et al.*, 1996)
- 5.1. Koe tehdään sopivalla laimennussarjatekniikalla, esim.:
- i) Valmistetaan vähintään kaksi kymmenkertaista laimennosta, 1/10 ja 1/100, uudelleen suspendoidusta sakkapuskuriin. Pipetoidaan mitattu vakiomäärä (50—100  $\mu$ l) uudelleen suspendoitua sakkaa ja kutakin laimennosta muunnetulle valikoivalle SMSA-alustalle (liite 7) ja levitetään lasisauvalla koko alustan pinnalle.
- Tehdään myös, mikäli katsotaan tarpeelliseksi, viiden kohdan siveilyviljely 10- $\mu$ l:n silmukallisella uudelleen suspendoitua sakkaa. Silmukka liekitetään siveilyjen välillä.
- ii) Siirretään mitattu vakiomäärä (50—100  $\mu$ l) uudelleen suspendoitua sakkaa muunnetulle valikoivalle SMSA-alustalle ja levitetään lasisauvalla koko alustan pinnalle. Sivellään sauvaa liekittämättä sitä kahdella tai useammalla muunnetulla SMSA-levyllä.
- 5.2. Levitetään samalla laimennussarjatekniikalla *Ralstonia solanacearum* -bakteerikannan rodun 3 biovaria 2 positiiviseksi kontrolliksi tehtyä suspensiota, jossa on 10<sup>6</sup> solua millilitraa kohden, sarjalle erillisiä muunnettuja SMSA-alustoja.
- 5.3. Inkuboidaan levyjä 28 °C:n lämpötilassa. Tulosten tulkitseminen aloitetaan kolme päivää myöhemmin. Jos tulos on negatiivinen, inkuboidaan edelleen kuuteen päivään asti. *Ralstonia solanacearum* -bakteerin elinvoimaiset isolaatit kehittävätkin maidonvalkoisia, litteitä, epäsuunnollisen muotoisia ja juoksevia pesäkkeitä, joiden keskustat ovat selvästi väriltään punaisesta purppuraan ja sisältä juovikkaita tai kierteisiä kuten kuvassa 1 osoitetaan.
- 5.4. Puhdistetaan pesäkkeet, joiden morfologia on tyypillinen, jatkoviljelyllä tavallisella ravintoalustalla (lisäys 1).

- 5.5. Tunnistetaan puhtaat viljelmät (II jakson 4.1. kohta) ja varmistetaan positiiviset viljelmät patogeenisyydestillä (II jakson 4.3. kohta).

*Laimennussarjatestin tulosten tulkinta*

Laimennussarjatesti on negatiivinen, jos yhtään pesäkettä ei ole eristetty kuuden päivän jälkeen tai jos yhtään *Ralstonia solanacearum* -bakteerille tyypillistä pesäkettä ei ole eristetty edellyttäen, että ei epäillä muiden bakteerien pesäkkeiden estävää vaikutusta ja että *Ralstonia solanacearum* -bakteerin tyypillisiä pesäkkeitä löytyy positiivisesta kontrollista.

Laimennussarjatesti on positiivinen, jos *Ralstonia solanacearum* -bakteerille tyypillisiä pesäkkeitä eristetään.

6. **Biotesti**

(Janse, 1988)

- 6.1. Käytetään 10 todellisella kolmilehtiasteella olevaa testikasvia kutakin näytettä kohden. Testikasveja ei kastella 24 tuntiin ennen inokulointia.
- 6.2. Jaetaan 100 µl uudelleen suspendoitua sakkaa testikasvien kesken. Inokuloidaan varteen sirkkalehtien väliin ja yhteen tai useampaan muuhun paikkaan.
- 6.3. Inokuloidaan samalla tekniikalla 10 siementainta suspensiolla, jossa on 10<sup>6</sup> solua/m virulenttia *Ralstonia solanacearum* biovar 2/rotu 3 -kanta (positiivinen kontrolli) ja sakkapuskuri (negatiivinen kontrolli). Kasvit, joita käytetään positiivisenä kontrollina, pidetään erillään muista kasveista ristikontaminaation estämiseksi.
- 6.4. Kasvatetaan testitaimia edelleen neljä viikkoa 22°C — 28°C:ssa korkeassa suhteellisessa kosteudessa kastellen päivittäin. Tarkkaillaan nuutumisoireita, epinastiaa, kloroosia ja/tai hidastunutta kasvua.
- 6.5. Eristetään tartunnan saaneista kasveista (II jakso). Tunnistetaan puhtaat viljelmät, joiden morfologia on tyypillinen (II jakson 4.1. kohta) ja varmistetaan positiiviset viljelmät patogeenisyydestillä (II jakson 4.3. kohta).
- 6.6. Tutkitaan tartunnan puuttumista niissä testikasveissa, jotka eivät osoita minkäänlaisia tartunnan merkkejä. Poistetaan kustakin testikasvista 1 cm:n pala vartta 2 cm inokulointikohdan yläpuolelta. Homogenoidaan solukot maseraatiopuskurissa. Tehdään laimennussarja valikoivalle alustalle (III jakson 5. kohta). Jos tulos on positiivinen, tunnistetaan puhtaat viljelmät, joiden morfologia on tyypillinen (II jakson 4.1. kohta) ja varmistetaan positiiviset viljelmät patogeenisyydestillä (II jakson 4.3. kohta).

*Biotestin tulosten tulkinta*

Biotesti on negatiivinen, jos testikasveissa ei ole *Ralstonia solanacearum* -bakteerin aiheuttamaa tartuntaa ja että *Ralstonia solanacearum* -bakteeri todetaan positiivisesta kontrollista.

Biotesti on positiivinen, jos testikasveissa on *Ralstonia solanacearum* -bakteerin aiheuttama tartunta.

7. **Rikastustesti**

(Elphinstone *et al.*, 1996)

- 7.1. Siirretään 100 µl uudelleen suspendoitua sakkaa 3 ml:aan muunnettua SMSA-liuosta (lisäys 7).
- 7.2. Inkuboidaan 48 tunnin ajan, ei missään tapauksessa yli 72:tä tuntia, 28°C:n lämpötilassa siten, että putken korkki on löysästi kiinni ilmanvaihdon turvaamiseksi.
- 7.3. Kiinnitetään korkki tiiviisti ja sekoitetaan Vortexilla. Jaetaan määräosiin IF-testiä (tämän jakson 2. kohta), ELISA-testiä (tämän jakson 3. kohta) ja/tai PCR-testiä (tämän jakson 4. kohta) varten.

8. **Patogeenisyydesti**

II jakson 4.3. kohta.

## Lisäys 1

Ravinneagar *Ralstonia solanacearum* -kasvintuhoajan viljelyä varten

## Ravinneagar (NA)

Ravinneagar (Difco)	23 g
Tislattu vesi	1 litra

Valmistetaan puolen litran tilavuus alustaa yhden litran pulloihin.

Liuotetaan ainesosat.

Steriloidaan autoklavaimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Jäähdytetään 50 °C:seen. Kaadetaan maljoille.

## Hiiva-peptoni-glukoosiagar (YPGA)

Hiivauute (Difco)	5 g
Bacto-peptoni (Difco)	5 g
D(+)-glukoosi (monohydraatti)	10 g
Bacto-agar (Difco)	15 g
Tislattu vesi	1 litra

Valmistetaan puolen litran tilavuus alustaa yhden litran pulloihin.

Liuotetaan ainesosat.

Steriloidaan autoklavaimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Jäähdytetään 50 °C:seen. Kaadetaan maljoille.

## Sakkaroosipeptoniagar (SPA)

Sakkaroosi	20 g
Peptoni	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,25 g
Bacto-agar (Difco)	15 g
Tislattu vesi	1 litra

Valmistetaan puolen litran tilavuus alustaa yhden litran pulloihin.

Liuotetaan ainesosat. Säädetään tarvittaessa pH:ksi 7,2—7,4.

Steriloidaan autoklavaimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Jäähdytetään 50 °C:seen. Kaadetaan maljoille.

## Kelmanin tetrasolium-alusta

Casaminohappoja	1 g
Bacto-peptoni	10 g
Dekstroosi	5 g
Bacto-agar	15 g
Tislattu vesi	1 litra

Valmistetaan puolen litran tilavuus alustaa yhden litran pulloihin.

Liuotetaan ainesosat. Steriloidaan autoklavaimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Jäähdytetään 50 °C:seen.

Lisätään suodatinsteriloitua trifenyylitetratsoliumkloridin (Sigma) vesiliuosta, jotta loppupitoisuudeksi saadaan 50 mg/l.

Kaadetaan maljoille.

*Lisäys 2***Aineistot näytteen käsittelyä varten**

Maseroointipuskuri: 50 mM fosfaattipuskuri, pH 7,0

Tätä puskuria käytetään solukon pehmentämiseen.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g
Tislattu vesi	1 litra

Liutetaan ainesosat ja tarkastetaan pH. Jaetaan sopivaksi katsottaviin osiin.

Steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Suositellaan lisättäväksi 5 % polyvinylpyrrolidone-40 000 MWT (PVP-40):tä suoraa PCR-testiä suoritettaessa, jotta uutteen olevien aromaattisten molekyylien monistumista estävä vaikutus vähenisi.

Homogenoitaessa pehmitettäviä perunasolukoita Waring Blenderissä tai Ultra Thurraxissa suositellaan lisättäväksi dispergointiainetta, vaahdonestoainetta tai antioksidanttia.

Lubrol-hiutaleita	0,5 g/l
DC-silikoni-vaahdonesto	1,0 ml/l
Tetranatriumpyrofosfaatti	1,0 g/l

Autoklavoidaan erillään. Säädetään haluttuun väkevyyteen.

Sakkapuskuri: 10 mM fosfaattipuskuri, pH 7,2

Tätä puskuria käytetään perunan tyvistä saadun uutteen uudelleen suspendointiin ja laimentamiseen.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×12H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	0,4 g
Tislattu vesi	1 litra

Liutetaan ainesosat ja tarkastetaan pH. Jaetaan sopivaksi katsottaviin osiin.

Steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

---

*Lisäys 3***Aineistot IF-testiä varten**

IF-puskuri: 10 mM fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS), pH 7,2

Tätä puskuria käytetään antiseerumin laimentamiseen.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  2,7 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  0,4 g

NaCl 8,0 g

Tislattu vesi 1 litra

Liutetaan ainesosat ja tarkastetaan pH. Otetaan soveltuvaksi katsottu määräosa.

Steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

**IF-puskuri-Tween**

Tätä puskuria käytetään levyjen pesuun. Lisätään 0,1 % Tween 20:tä IF-puskuriin.

0,1 M fosfaattipuskuroitu glyseroli, pH 7,6

Tätä puskuria käytetään petausliuksena IF-levyillä fluoresenssin tehostamiseksi.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  3,2 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  0,15 g

Glyseroli 50 ml

Tislattu vesi 100 ml

---

## Lisäys 4

## Kontaminaatioasteen määrittäminen IF-testillä

Moniaukkoisen levyn yhden aukon pinta-ala (S):

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

jossa D = aukon halkaisija (1)

Näkökentän pinta-ala (s):

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

jossa d = näkökentän halkaisija. (2)

Lasketaan kentän halkaisija (d) suoraan mittaamalla tai soveltaen seuraavia kaavoja:

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

jossa i = kentän kerroin (8—24 okulaarin tyyppin mukaan),

K = putken kerroin (1 tai 1,25),

G = objektiivin suurennos (100-kertainen, 40-kertainen jne.).

(2):sta saadaan:

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

(3):sta saadaan:

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

Lasketaan tyyppillisten fluoresoivien solujen määrä kenttää kohden (c).

Lasketaan tyyppillisten fluoresoivien solujen määrä aukkoa kohden (C).

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

Lasketaan tyyppillisten fluoresoivien solujen määrä konsentroidun uutteen millilitraa kohti (N):

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

jossa y = konsentroidun uutteen määrä (tilavuus) aukossa,

F = konsentroidun uutteen laimennuskerroin.

## Lisäys 5

## Aineistot ELISA-testiä varten

Väkevydeltään kaksinkertainen karbonaattikiinnityspuskuri, pH 9,6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6,36 g
NaHCO <sub>3</sub>	11,72 g
Tislattu vesi	1 litra

Liutetaan ainesosat ja tarkastetaan pH. Jaetaan sopivaksi katsottaviin osiin.

Steriloidaan autoklavoimalla 121°C:ssa 15 minuutin ajan.

Natriumsulfiittia voidaan lisätä antioksidanttina siten, että sen lopulliseksi pitoisuudeksi tulee 0,2%, jos uute sisältää paljon aromaattisia molekyylejä.

10 × fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS), pH 7,4

NaCl	80 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12H <sub>2</sub> O	29 g
KCl	2 g
Tislattu vesi	1 litra

Liutetaan ainesosat ja tarkastetaan pH. Jaetaan sopivaksi katsottaviin osiin.

Steriloidaan autoklavoimalla 121°C:ssa 15 minuutin ajan.

Fosfaattipuskuroitu suolaliuos — Tween (PBS-T)

10 × PBS	100 ml
10 % Tween 20:tä	5 ml
Tislattu vesi	895 ml

Estopuskuri (valmistettava juuri ennen käyttöä)

10 × PBS	10 ml
Polyvinylpyrrolidone-44 000 MWT (PVP-44)	2 g
10 % Tween 20:tä	0,5 g
Maitojauhe	0,5 g
Tislattu vesi	100 ml:aan

Emäksinen fosfataasisubstraattiliuos, pH 9,8

Dietanoliamiini	97 ml
Tislattu vesi	800 ml

Sekoitetaan ja säädetään pH:ksi 9,8 väkevällä HCl:llä.

Täytetään 1 l:ksi tislatulla vedellä.

Lisätään 0,2 g MgCl<sub>2</sub>:ta.

Liutetaan 2 × 5 mg fosfataasisubstraattitablettia (Sigma) 15 ml liuosta kohden.

## Lisäys 6

## Aineistot PCR-testiä varten

Oligonukleotidialukejakso

Alukejakso OLI-1 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

Alukejakso Y-2 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Aineistoa varten: katso Seal *ym.* (1993).

## Lisäys 7

## Aineistot valikoivaa laimennussarjaa varten ja rikastustesti (-testejä)

Valikoiva SMSA-alusta (Engelbrecht 1994, sellaisena kuin se on Elphinstonen *ym.* muuttamana 1996)

Kasvualusta

Casaminohappoja (Difco)	1 g
Bacto-peptoni (Difco)	10 g
Glyseroli	5 ml
Agar (Difco)	15 g
Tislattu vesi	1 litra

Valmistetaan puolen litran tilavuus alustaa yhden litran pulloihin.

Liuetetaan ainesosat ja tarkastetaan pH. Säädetään, tarvittaessa, pH:ksi 6,5 ennen autoklavoimista. *Ralstonia solanacearum* kasvaa heikosti, jos alustan pH on yli 7,0. Steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Jäähdytetään 50 °C:seen.

Lisätään seuraavat ainesosat (kaikki Sigmalta), jotta saadaan määrätyt lopulliset pitoisuudet:

Kristallivioletti	5 mg/l		
Polymiksiini-B-sulfaatti	100 mg/l	(noin 600 000 yksikköä)	Sigma P-1004
Basitrasiiini (*)	25 mg/l	(noin 1 250 yksikköä)	Sigma P-0125
Kloramfenikoli	5 mg/l		Sigma C-3175
Penisilliini-G	0,5 mg/l	(noin 825 yksikköä)	Sigma P-3032
Tetratsoliumsuoloja	50 mg/l		

Liuetetaan ainesosat 70-prosenttiseen etanoliin, jotta valmistetun alustan määrätilavuudelle saadaan annetut pitoisuudet. Jotkut ainesosat, erityisesti polymiksiini-B ja kloramfenikoli, vaativat hieman lämmitystä ja ravistelua.

SMSA-ravintoliuos (Elphinstone *ym.*, 1996)

Valmistetaan samalla tavoin kuin valikoiva SMSA-alusta, mutta ilman agaria ja tetrasoliumsuoloja.

Jaetaan 3 ml:n määrääsiin 30 ml:n vetoisiin kertakäyttöisiin Universal-putkiin.

(\*) Basitrasiiinipitoisuuden voi tarvittaessa korottaa 300 ppm:n suuruiseksi vähentämään kontaminoivia saprofyttisiä bakteereja vaikuttamatta *Ralstonia solanacearum* -kasvintuhoajan löytämiseen.

## Viitteet

- 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, 693—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 ss.
- 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.

## LIITE III

1. Kaikissa epäillyissä esiintymistapauksissa, joiden seulontakokeista on luettelossa olevan kasviaineiston osalta saatu positiivinen tulos käyttäen liitteessä II esitettyä asianmukaista menetelmää tai kaikissa muissa tapauksissa käyttäen jotain muuta virallisesti hyväksyttyä menetelmää ja joille odotetaan vahvistusta tai kumoamista kyseisen menetelmän päätyttyä, olisi säilytettävä ja varastoitava asianmukaisissa olosuhteissa kyseisen menetelmän loppuun saattamiseen asti:
    - jos mahdollista, erä tai osa erästä (josta näyte on otettu) alkuperäisessä pakkauksessaan etiketillä varustettuna,
    - jos mahdollista, jäljelle jäävä osa näytteistä,
    - ylimääräinen uute ja seulontakoetta (-kokeita) varten valmistettu täydentävä aineisto, esimerkiksi immunofluoresenssikokeita varten valmistetut levyt,  
ja
    - kaikki aiheeseen liittyvät asiakirjat.
  2. Tapauksissa, joissa organismin esiintyminen on varmistunut, olisi säilytettävä ja varastoitava asianmukaisissa olosuhteissa vähintään kuukauden ajan 5 artiklan 2 kohdassa säädetyn ilmoitusmenettelyn jälkeen:
    - 1 kohdassa tarkoitettu aineisto,
    - tartunnan saanut tomaatti- tai munakoisonäyte, joka on tarvittaessa inokuloitu mukula- tai kasviutteella, ja
    - organismin eristetty viljelmä.
-

## LIITE IV

Edellä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan i alakohdassa tarkoitettussa tutkimuksessa olisi tarvittaessa otettava huomioon seuraavat tekijät:

- i) tuotantopaikat,
- joilla viljellään tai on viljelty perunoita, jotka polveutuvat samasta kloonista kuin organismin saastuttamat perunat,
  - joilla viljellään tai on viljelty tomaatteja, joiden alkuperä on sama kuin organismin saastuttamien tomaattien,
  - joilla viljellään tai on viljelty perunoita tai tomaatteja, jotka ovat virallisen valvonnan alaisina organismin epäillyn esiintymisen vuoksi,
  - joilla viljellään tai on viljelty perunoita, jotka polveutuvat samasta kloonista kuin perunat, joiden on todettu kasvaneen organismin saastuttamissa tuotantopaikoissa,
  - joilla viljellään perunoita tai tomaatteja, jotka sijaitsevat saastuneiden tuotantopaikkojen läheisyydessä mukaan lukien tuotantopaikat, jotka joutuvat tekemisiin samojen välineiden tai tuotantotilojen kanssa välittömästi tai yhteisen yrittäjän välityksellä,
  - joilla käytetään pintavettä kasteluun tai sumutukseen lähteestä, joka on vahvistettu tai jota epäillään organismin saastuttamaksi,
  - joilla käytetään pintavettä kasteluun tai sumutukseen lähteestä, jota käytetään myös organismin saastuttamiksi vahvistetuilla tai epäillyillä tuotantopaikoilla,
  - joilla organismin saastuttamaksi vahvistettu tai epäilty pintavesi tulvii tai on tulvinut,
- ja
- ii) pintavesi, jota käytetään kasteluun tai sumutukseen tai joka on tulvinut pellolla (pelloilla) tai tuotantopaikalla (-paikoilla), joiden on vahvistettu olevan organismin saastuttamia.
-

## LIITE V

1. Edellä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iii alakohdassa ja c alakohdan iii alakohdassa tarkoitettujen todennäköisen saastunnan laajuuden määrittämiseen olisi tarpeen mukaan kuuluttava seuraavat tekijät:
  - luettelossa oleva kasviaineisto, jota on viljelty 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitetulla tuotantopaikalla,
  - tuotantopaikka (-paikat), jotka ovat tuotantojärjestelmässä yhteydessä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitettuun luettelossa olevaan kasviaineistoon, mukaan lukien ne, jotka joutuvat tekemisiin samojen välineiden tai tuotantotilojen kanssa välittömästi tai yhteisen yrittäjän välityksellä,
  - luettelossa oleva kasviaineisto, joka on tuotettu edellisessä luetelmakohdassa tarkoitettulla tuotantopaikalla (-paikoilla), tai jotka ovat mainituilla (mainituilla) paikalla (paikoilla) aikana, jolloin 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitettu luettelossa oleva kasviaineisto oli ensimmäisessä luetelmakohdassa tarkoitetuissa tuotantopaikoissa,
  - varastot, joissa on käsitelty luettelossa olevaa kasviaineistoa edellä mainituilta tuotantopaikoilta,
  - kaikki koneet, ajoneuvot, säiliöt, varastot tai näiden osat sekä kaikki muut esineet, mukaan lukien pakkaukset, jotka ovat voineet olla kosketuksissa 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitetun luettelossa olevan kasviaineiston kanssa,
  - luettelossa oleva kasviaineisto, joka on varastoitu johonkin edellisessä luetelmakohdassa tarkoitettuun rakenteeseen tai esineeseen tai joka on ollut kosketuksissa niiden kanssa ennen kyseisten rakenteiden ja esineiden puhdistamista ja desinfiointia,
  - perunan osalta 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan i alakohdassa tarkoitettujen tutkimusten ja testien jälkeen ne mukulat tai kasvit, jotka ovat samaa sisarus- tai vanhemmais-kloonialkuperää, ja tomaatin osalta kasvit, jotka ovat samasta lähteestä kuin 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitettu luettelossa oleva kasviaineisto ja joiden saastunta näyttäisi todennäköiseltä samasta kloonista polveutumisen kautta, vaikka niiden testitulokset ovat negatiiviset organismin osalta,
  - edellisessä luetelmakohdassa tarkoitettujen luettelossa olevan kasviaineiston tuotantopaikka (-paikat),
  - luettelossa olevan kasviaineiston tuotantopaikka (-paikat), jossa käytetään 5 artiklan 1 kohdan c alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitettua pintavettä kasteluun tai sumutukseen,
  - pelloilla, joilla on tulvinut organismin saastuttamaksi vahvistettu pintavesi, tuotettu luettelossa oleva kasviaineisto.
2. Edellä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iv alakohdassa ja 5 artiklan 1 kohdan c alakohdan iii alakohdassa tarkoitettujen mahdollisen leviämisen määrittämisessä on otettava huomioon seuraavat tekijät:
  - i) 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iv alakohdan mukaisissa tapauksissa:
    - muiden sellaisten tuotantopaikkojen läheisyys, joilla viljellään luettelossa olevaa kasviaineistoa,
    - siemenperunavarastojen yhteinen tuotanto ja käyttö,
    - tuotantopaikat, joilla käytetään pintavettä luettelossa olevan kasviaineiston kasteluun tai sumutukseen, jos kyseessä olevissa tapauksissa 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitetulta tuotantopaikalta (-paikoilta) on tai on ollut vaarana valua pintavettä tai jos siellä on tai on ollut tulvimisvaara.
  - ii) 5 artiklan 1 kohdan c alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitetun pintaveden osalta:
    - tuotantopaikka (-paikat), jo(i)ssa tuotetaan luettelossa olevaa kasviaineistoa ja joka sijaitsee saastuneeksi ilmoitetun pintaveden läheisyydessä tai jossa esiintyy sen tulvimisen uhka,
    - kaikki erilliset kastelualtaat, jotka ovat yhteydessä saastuneeksi ilmoitettuun pintaveteen.

3. Yksityiskohtaisiin, 5 artiklan 2 kohdan ensimmäisessä alakohdassa tarkoitettuihin ilmoittamista koskeviin sääntöihin kuuluu:
    - tapauksen mukaan 4 artiklan mukaisen epäillyn esiintymistapauksen ilmoituspäivä sekä 5 artiklan mukaisen näytteenottopäivämäärät ja 5 artiklan mukainen vahvistus organismin esiintymisestä,
    - tiedot ilmoitetusta saastunnasta ja alueen määrittäminen.
  4. Yksityiskohtaisiin, 5 artiklan 2 kohdan ensimmäisessä alakohdassa tarkoitettuihin ilmoittamista koskeviin täydentäviin sääntöihin kuuluu:
    - kaikkien saastuneiksi ilmoitettujen perunalähetysten tai -erien osalta direktiivin 77/93/ETY 7 tai 8 artiklassa säädetty todistukset ja, tapauksen mukaan, passin numero tai perunantuottajien, yhteisvarastojen ja lähetykseskusten rekisterinumero,
    - kaikkien saastuneiksi ilmoitettujen tomaattilähetysten tai -erien osalta direktiivin 77/93/ETY 7 tai 8 artiklassa säädetty todistukset ja passin numero direktiivin 77/93/ETY liitteessä V olevan A osan I jakson 2.2 kohdan luettelon mukaisesti,
    - lajikenimitys ja luokka siemenperunavarastojen osalta ja jos mahdollista, myös kaikissa muissa tapauksissa,
    - vahvistettua esiintymistä koskevat muut vastaavat tiedot, joita komissio voi vaatia.
-

## LIITE VI

1. Edellä 6 artiklan 1 kohdassa tarkoitettuja toimenpiteitä ovat:
  - polttaminen, tai
  - käyttö eläinten rehuksi sellaisen lämpökäsittelyn jälkeen, jolla varmistetaan ettei organismi jää henkiin, tai
  - syvähaudalla ne jätteiden käsittelypaikkaan, josta ne eivät voi valua maatalousmaahan tai joutua kosketuksiin sellaisten vedensaantilähteiden kanssa, joita voitaisiin käyttää maatalousmaan kasteluun, tai
  - teollinen käsittely toimittamalla suoraan ja välittömästi sellaiselle käsittelylaitokselle, jolla on käytettävissään tämän direktiivin liitteen VII määräysten mukaiset virallisesti hyväksytyt jätteidenhävitystilat ja -laitteet, tai
  - muut toimenpiteet, jos on todettu, että ne eivät voi aiheuttaa tunnistettavaa organismin leviämisaavaa; nämä toimenpiteet on viipymättä ilmoitettava komissiolle ja muille jäsenvaltioille.
2. Kyseisen jäsenvaltion (-valtioiden) vastuullisten toimivaltaisten viranomaisten valvonnan alasta 6 artiklan 2 kohdassa tarkoitetun luettelossa olevan kasviaineiston asianmukaista käyttöä tai hävittämistä on, edellyttäen, että toimivaltaisten viranomaisten välillä toimii asianmukainen tiedonvaihto jatkuvan valvonnan varmistamiseksi ja että jäsenvaltion vastuullinen toimivaltainen viranomainen on hyväksynyt ensimmäisessä ja toisessa luetelmakohdassa tarkoitettujen jätteidenhävitystilat ja -laitteet paikoissa, joissa perunat on tarkoitus pakata tai jalostaa, seuraava:
  - i) perunan mukuloiden osalta:
    - niiden käyttö kulutukseen tarkoitettuina ruokaperunoina, jos ne on pakattu paikoissa, joissa on käytettävissä asianmukaiset jätteidenhävitystilat ja -laitteet, ja jos ne ovat valmiita suoraan toimitettavaksi ja käytettäväksi ilman uudelleen pakkaamista ja jos ne on tarkoitettu tällä tavoin suoraan toimitettavaksi ja käytettäväksi, tai
    - niiden käyttö teolliseen käsittelyyn tarkoitettuina ruokaperunoina, jos ne toimitetaan suoraan ja välittömästi sellaiselle käsittelylaitokselle, jolla on käytettävissään asianmukaiset jätteidenhävitystilat ja -laitteet, tai
    - mikä tahansa muu käyttö tai hävittäminen, jos on todettu, että se ei aiheuta tunnistettavaa organismin leviämisaavaa ja jos se on saanut mainittujen vastuullisten toimivaltaisten viranomaisten hyväksynnän. Nämä toimenpiteet on viipymättä ilmoitettava komissiolle ja muille jäsenvaltioille.
  - ii) muiden kasvin osien osalta, varsien ja lehtien jätteet mukaan luettuina,
    - hävittäminen, tai
    - mikä tahansa muu käyttö tai hävittäminen, jos on todettu, että se ei aiheuta tunnistettavaa organismin leviämisaavaa; nämä toimenpiteet on ilmoitettava komissiolle ja muille jäsenvaltioille.
3. Asianmukaiset 6 artiklan 3 kohdassa tarkoitettujen esineiden puhdistamismenetelmät ovat pesu ja tarvittaessa desinfiointi siten, että ne eivät aiheuta tunnistettavaa organismin leviämisaavaa; niitä on käytettävä jäsenvaltioiden vastuullisten viranomaisten valvonnassa.
4. Toimenpiteisiin, jotka jäsenvaltioiden on toteutettava 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iv alakohdan ja c alakohdan iii alakohdan mukaisesti vahvistetu(i)lla ja 6 artiklan 4 kohdassa tarkoitetu(i)lla alueella (alueilla) on kuuluttava seuraavat toimenpiteet:
  - 4.1. Edellä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneiksi ilmoitettujen tuotantopaikkojen tapauksissa:
    - a) edellä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitetulla pellolla tai katteen alla kasvatettujen satokasvien tuotantoyksikössä, joko

- i) ilmoitettua saastunutta seuraavien vähintään neljän kasvuvuoden aikana:
- toteutetaan toimenpiteitä ylivuotisten peruna- ja tomaattikasvien ja muiden organismin isäntäkasvien, koisokasvien rikkakasvit mukaan luettuina, hävittämiseksi, ja
  - ei istuteta eikä kylvetä:
    - perunan mukuloita tai kasveja,
    - tomaatin kasveja tai siemeniä,
    - organismin biologia huomioon ottaen,
      - muita isäntäkasveja,
      - *Brassica*-sukuisia kaaleja, joiden osalta on olemassa tunnistettava vaara, että organismi säilyy hengissä,
    - satokasveja, joiden osalta on olemassa tunnistettava organismin leviämiskaava,
  - edellisessä luetelmakohdassa tarkoitettua ajanjaksoa seuraavan ensimmäisen perunoiden tai tomaattien korjuukauden aikana ja edellyttäen, että pelto on todettu vähintään kahden perättäisen kasvuvuoden aikana ennen istuttamista vapaaksi ylivuotisista perunan tai tomaatin kasveista tai muista isäntäkasveista, koisokasvien rikkakasvit mukaan luettuina,
    - perunoiden osalta istutetaan virallisesti sertifioituja siemenperunoita ainoastaan ruokaperunoiden tuottamiseksi,
    - suoritetaan 2 artiklan 1 kohdan mukaisesti virallinen tutkimus, johon kuuluu myös testaus,
  - edellisessä luetelmakohdassa tarkoitettua korjuukautta seuraavan perunoiden tai tomaattien korjuukauden aikana ja sopivan viljelykierron jälkeen perunoiden osalta istutetaan virallisesti sertifioitua siemenperunaa siemenen tai ruokaperunan tuottamiseksi ja perunoiden ja tomaattien osalta suoritetaan virallinen tutkimus 2 artiklan 1 kohdan mukaisesti,
- tai
- ii) ilmoitettua saastunutta seuraavien viiden kasvuvuoden aikana:
- toteutetaan toimenpiteitä ylivuotisten perunan ja tomaatin kasvien sekä muiden organismin isäntäkasvien, koisokasvien rikkakasvit mukaan luettuina, hävittämiseksi,
  - pelto jätetään avokesannoksi ja sitä pidetään ensimmäisten kolmen vuoden ajan joko avokesantona tai viljalla tunnistetusta vaarasta riippuen tai se jätetään pysyvästi laitumeksi, jolloin sitä joko niitetään usein ja matalaan tai laidunnetaan tehokkaasti, tai se pidetään nurmella siementuotantoa varten, minkä jälkeen seuraavien kahden vuoden ajan siinä viljellään muita kuin organismin isäntäkasveja, joista ei aiheudu tunnistettavaa organismin säilymis- tai leviämiskaavaa,
  - edellisessä luetelmakohdassa tarkoitettua korjuukautta seuraavan ensimmäisen perunoiden tai tomaattien korjuukauden aikana,
    - perunoiden osalta istutetaan virallisesti sertifioitua siemenperunaa joko siemenen tai ruokaperunan tuottamiseksi,
- ja suoritetaan 2 artiklan 1 kohdan mukaisesti virallinen tutkimus, johon kuuluu myös testaus,
- b) muilla pelloilla:
- todettua saastunutta seuraavan kasvuvuoden aikana:
    - yhtään perunan mukulaa, kasvia tai muuta organismin isäntäkasvia ei istuteta tai kylvetä ja tarvittaessa toteutetaan toimenpiteitä ylivuotisten perunan ja tomaatin kasvien ja muiden isäntäkasvien, koisokasvien rikkakasvit mukaan luettuina, hävittämiseksi, tai
    - perunan mukuloiden osalta istutetaan virallisesti sertifioitua siemenperunaa ainoastaan ruokaperunan tuottamiseksi edellyttäen, että on todettu vastuullisia toimivaltaisia viranomaisia tyydyttävällä tavalla, että ylivuotisista perunan ja tomaatin kasveista ja muista

organismien isäntäkasveista, koisokasvien rikkakasvit mukaan luettuina, ei ole vaaraa. Kasvustot tarkastetaan sopivina ajankohtina ja ylivuotiset perunakasvit testataan organismien esiintymisen selvittämiseksi; lisäksi perunoiden osalta tarkastetaan korjatut mukulat.

- ensimmäisessä luettelamakohdassa tarkoitettua kasvuvuotta seuraavan ensimmäisen kasvuvuoden aikana,
    - perunoiden osalta istutetaan ainoastaan virallisesti sertifioituja siemenperunoita joko siemenen tai ruokaperunan tuottamiseksi,
  - ainakin toisen ensimmäisessä luettelamakohdassa tarkoitettua kasvuvuotta seuraavan kasvuvuoden aikana,
    - perunoiden osalta istutetaan ainoastaan virallisesti sertifioituja siemenperunoita tai virallisesti sertifioituista siemenperunoista virallisen valvonnan alaisina kasvatettuja siemenperunoita joko siemenen tai ruokaperunan tuottamiseksi,
  - edellisissä alakohdissa tarkoitettujen kasvuvuosien aikana toteutetaan toimenpiteitä ylivuotisten perunan tai tomaatin kasvien ja muiden organismien isäntäkasvien, koisokasvien rikkakasvit mukaan luettuina, hävittämiseksi ja suoritetaan virallinen tutkimus 2 artiklan 1 kohdan mukaisesti, ja siementuotantoa varten istutettujen siemenperunoiden osalta suoritetaan mukuloiden testaus,
- c) välittömästi 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisen saastunnan toteamisen jälkeen ja kaikkien seuraavien kasvuvuosien aikana ensimmäiseen a kohdassa esitettyjen yksityiskohtaisten sääntöjen mukaisesti hyväksytyyn perunan tai tomaatin korjuukauteen asti ja kyseinen kausi mukaan lukien saastuneiksi ilmoitettu(i)lla pellolla (pelloilla):
- kaikki tuotantopaikan koneet ja varastotilat, joita käytetään perunan ja tomaatin tuotantoon, puhdistetaan ja tarvittaessa desinfioidaan sopivin menetelmin 3 kohdan mukaisesti,
  - kastelu- ja sumutusohjelmia sekä niiden kieltä koskevia virallisia tarkastuksia on tarvittaessa toteutettava organismien leviämisen estämiseksi,
- d) edellä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitetussa, katteen alla kasvatettujen satokasvien yksikössä, jossa kasvualustan korvaaminen kokonaan on mahdollista:
- mukuloita tai kasveja tai muita organismien isäntäkasveja, tomaattikasvit ja tomaatin siemenet mukaan luettuina, saa istuttaa tai kylvää ainoastaan, jos kyseinen yksikkö on virallisessa valvonnassa olevien toimenpiteiden alainen, joiden tarkoituksena on organismien ja kaikkien isäntäkasviaineistoon kuuluvien kasvien hävittäminen, mukaan lukien vähintään kasvualustan vaihtaminen kokonaan sekä kyseisen yksikön ja kaikkien välineiden puhdistus ja tarvittaessa desinfiointi, ja jos vastuulliset viranomaiset ovat tämän seurauksena hyväksyneet sen perunan tai tomaatin tuotantoon, ja
  - perunantuotannossa perunoita tuotetaan virallisesti sertifioituista siemenperunoista tai testatuista lähteistä olevista minimimukuloista tai mikrokasveista;
  - kastelu- ja sumutusohjelmia sekä niiden kieltä koskevia virallisia tarkastuksia on toteutettava tarvittaessa organismien leviämisen estämiseksi.
- 4.2. Rajoittamatta 4.1. kohdassa lueteltujen toimenpiteiden soveltamista, jäsenvaltioiden on määritettävä alueen sisällä:
- a) välittömästi todetun saastunnan jälkeen ja sen jälkeen vähintään kolmen kasvuvuoden ajan:
- aa) edellä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iv alakohdan mukaisesti määritetyn alueen osalta:
- määrättävä vastuulliset viranomaiset valvomaan tiloja, joissa harjoitetaan perunan mukuloiden tai tomaattien viljelyä varastointia tai käsittelyä, sekä niiden yritysten tiloja, jotka käyttävät perunan- tai tomaatintuotannossa koneita sopimuksen perusteella,
  - vaadittava näiden tilojen koneiden ja varastojen puhdistusta ja tarvittaessa desinfiointia 3 kohdassa tarkoitetuilla asianmukaisilla menetelmillä,

- vaadittava, että kyseisen alueen kaikki perunasadot istutetaan ainoastaan sertifioitua siementä käyttäen tai virallisen valvonnan alaisena kasvatettua siementä ja että korjuun jälkeen testataan 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iii alakohdan mukaisesti mahdollisesti saastuneiksi määritellyillä tuotantopaikoilla kasvaneet siemenperunat,
  - vaadittava, että kaikissa alueella sijaitsevilla tiloilla siemenperuna ja ruokaperuna käsitellään erikseen,
  - toteutettava viralliset tutkimukset 2 artiklan 1 kohdan mukaisesti,
- ab) edellä 5 artiklan 1 kohdan c alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitetun tai liitteessä V olevan 2 kohdan mukaisesti organismin mahdollisen leviämisen määrittämisessä huomioon otettaviin tekijöihin kuuluvan pintaveden osalta:
- toteutettava soveltuvina ajankohtina vuosittainen tutkimus, joka käsittää näytteenoton pintavedestä sekä asiaankuuluvista isäntäkasveista soveltuviin vedensaantilähteisiin liittyen sekä testauksen
    - luettelossa olevan kasviaineiston osalta liitteessä II oleva asianmukaisen menetelmän mukaisesti,
    - muissa tapauksissa muun virallisesti hyväksytyt menetelmän mukaisesti,
  - toteutettava virallisia tarkastuksia, jotka koskevat kastelu- ja sumutusohjelmia sekä saastuneeksi ilmoitetun veden luettelossa olevan kasviaineiston kasteluun ja sumutukseen tarkoitettua käyttöä koskevaa kieltoa ja tarvittaessa muita isäntäkasveja organismin leviämisen estämiseksi. Kieltoa voidaan tarkistaa mainitussa vuosittaisessa tutkimuksessa saatujen tulosten perusteella,
  - saastuneiden nestemäisten jätepäästöjen osalta toteutettava virallisia tarkastuksia, jotka koskevat luettelossa olevaa kasviaineistoa käsittelevien teollisten jalostus- ja pakkauslaitosten jätteiden hävittämistä.
- b) laadittava tarvittaessa ohjelma kaikkien siemenperunavarastojen korvaamiseksi sopivan ajanjakson kuluessa.

## LIITE VII

Liitteessä VI olevan 1 kohdan neljännessä luetelmakohdassa tarkoitettujen virallisesti hyväksytyjen jätteenhävitystilojen ja -laitteiden on oltava seuraavien määräysten mukaisia, siten että organismin leviämisen vaara vältetään:

- i) perunoiden ja tomaattien käsittelyjäte (mukaan lukien poisheitetyt perunat, kuoret ja tomaatit) sekä kaikki muut perunoista ja tomaateista peräisin olevat kiinteät jätteet on hävitettävä, joko
  - syvähautaamalla ne jätteiden käsittelypaikkaan, josta ne eivät pääse valumaan maatalousmaahan tai joutu kosketuksiin sellaisten vedensaantilähteiden kanssa, joita voitaisiin käyttää maatalousmaan kasteluun. Jätteet on kuljetettava suoraan paikkaan sellaisissa säiliöissä, että jätteiden valumisen uhkaa ei esiinny, tai
  - polttamalla.
- ii) nestemäinen käsittelyjäte: ennen hävittämistä nestemäinen jäte, joka sisältää suspendoituneita kiintoaineita, on suodatettava tai laskeutettava kiintoaineen poistamiseksi. Kiintoaineet on hävitettävä i alakohdassa määrättyllä tavalla.

Tämän jälkeen nestemäinen jäte joko:

- kuumennetaan vähintään 70°C:seen vähintään 30 minuutin ajaksi ennen hävittämistä,  
tai
  - hävitetään muulla virallisesti hyväksytyllä tavalla virallisen valvonnan alaisena siten, että jäte ei voi joutua kosketuksiin maatalousmaan tai sellaisten vedensaantilähteiden kanssa, joita voitaisiin käyttää maatalousmaan kasteluun. Tähän liittyvät yksityiskohdat on ilmoitettava muille jäsenvaltioille ja komissiolle.
-