

I

(Actos cuja publicação é uma condição da sua aplicabilidade)

DIRECTIVA 98/57/CE DO CONSELHO

de 20 de Julho de 1998

relativa ao controlo de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia e, nomeadamente, o seu artigo 43º,

Tendo em conta a proposta da Comissão⁽¹⁾,

Tendo em conta o parecer do Parlamento Europeu⁽²⁾,

Tendo em conta o parecer do Comité Económico e Social⁽³⁾,

Considerando que o organismo prejudicial *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* era anteriormente designado por *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith; que a designação *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* passará provavelmente a ser a geralmente aceite para esse organismo; que a presente directiva deve tomar em consideração este progresso científico;

Considerando que as produções de batata e de tomate ocupam uma posição importante na agricultura da Comunidade; que o rendimento dessas produções está constantemente ameaçado por organismos prejudiciais;

Considerando que a protecção das culturas da batateira e do tomateiro contra os organismos prejudiciais deverá permitir não só manter a capacidade produtiva, como igualmente aumentar a produtividade agrícola;

Considerando que as medidas de protecção destinadas a evitar a introdução de organismos prejudiciais no território de um Estado-membro terão apenas um efeito limitado se esses organismos não forem combatidos simultaneamente e metodicamente em toda a Comunidade e se não for evitada a sua propagação;

Considerando que um dos organismos prejudiciais à batateira e ao tomateiro é a *Ralstonia solanacearum*

(Smith) Yabuuchi *et al.*, agente patogénico do mal murcho da batateira e da podridão bacteriana do tomateiro; que a doença provocada por esse agente surgiu nalgumas regiões da Comunidade e que ainda existem certos focos de infecção limitados;

Considerando que existe um risco considerável para a cultura da batateira e do tomateiro na Comunidade se não forem adoptadas medidas eficazes, no que diz respeito a estas culturas, para localizar esse organismo e determinar a sua distribuição, evitar o seu aparecimento e propagação e, quando detectado, evitar a sua propagação e combatê-lo tendo em vista a sua erradicação;

Considerando que, para atingir este objectivo, devem ser adoptadas determinadas medidas dentro da Comunidade; que, além disso, os Estados-membros devem poder tomar medidas adicionais ou mais rigorosas quando necessário e desde que não sejam criados obstáculos à circulação da batata e do tomate na Comunidade, sem prejuízo do disposto na Directiva 77/93/CEE do Conselho, de 21 de Dezembro de 1976, relativa às medidas de protecção contra a introdução nos Estados-membros de organismos prejudiciais às plantas e produtos vegetais⁽⁴⁾; que essas medidas devem ser notificadas aos demais Estados-membros e à Comissão;

Considerando que as medidas devem ter em conta a necessidade de prospecções oficiais sistemáticas a fim de proceder à localização do agente patogénico; que essas prospecções devem incluir procedimentos de inspecção e — quando apropriado — dado que, em determinadas condições ambientais, a doença pode permanecer latente e não ser detectada nem na cultura de batata em desenvolvimento nem nos tubérculos de batata armazenados, incluir também procedimentos de colheita de amostras e análise; que a propagação do agente patogénico nas culturas em desenvolvimento não é o factor mais importante, mas que o agente patogénico pode propagar-se através das águas superficiais e de determinadas solanáceas silvestres e que, portanto, a irrigação de culturas de batateira e de tomateiro com águas contaminadas parece apresentar riscos em termos de contaminação das mes-

⁽¹⁾ JO C 124 de 21.4.1997, p. 12 e JO C 108 de 7.4.1998, p. 85.

⁽²⁾ JO C 14 de 19.1.1998, p. 34.

⁽³⁾ JO C 206 de 7.7.1997, p. 57.

⁽⁴⁾ JO L 26 de 31.1.1977, p. 20. Directiva com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 98/02/CE da Comissão (JO L 15 de 21.1.1998, p. 34).

mas; que o agente patogénico pode persistir durante o Inverno nas plantas de batateira e de tomateiro provenientes de tubérculos de batata ou de tomates deixados no terreno (plantas espontâneas) e que estas poderão constituir uma das causas da transmissão da infecção de uma campanha para a outra; que o agente patogénico também é propagado através da contaminação de batata em contacto com batata infectada e com material de plantação, colheita e manuseamento ou com recipientes de transporte e de armazenagem contaminados com o organismo devido a contactos anteriores com batata infectada;

Considerando que a propagação do agente patogénico pode ser reduzida ou evitada através da desinfecção desses objectos; que a contaminação, por essa via, da batata de semente constitui um risco importante para a propagação do agente patogénico; que a contaminação latente da batata de semente também apresenta esse tipo de risco, que pode ser evitado através da utilização de batata de semente produzida no âmbito de um programa oficialmente aprovado em que a batata seja analisada e em que se verifique que se encontra indemne de infecção;

Considerando que são incompletos os actuais conhecimentos no que respeita à biologia e à epidemiologia da *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* em presença das condições que se verificam na Europa e que se prevê que venha a ser necessária, dentro de algumas campanhas, uma revisão das medidas propostas; que, na mesma óptica, se esperam melhoramentos dos procedimentos de análise, à luz de novas investigações, principalmente relativas à sensibilidade e especificidade desses métodos com vista à selecção e normalização de métodos de análise optimizados;

Considerando que, para a determinação do teor dessas medidas gerais, bem como no que respeita às medidas mais rigorosas ou adicionais adoptadas pelos Estados-membros tendo em vista evitar a introdução do agente patogénico nos seus territórios, é desejável que os Estados-membros cooperem estreitamente com a Comissão no âmbito do Comité Fitossanitário Permanente, a seguir designado por «comité»;

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1.º

A presente directiva diz respeito às medidas a adoptar pelos Estados-membros contra a *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, anteriormente designada por *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith (a seguir designada por «organismo»), a fim de, no que respeita às plantas hospedeiras desse organismo referidas no anexo I, secção I (a seguir designadas por «materiais vegetais de lista»):

- a) Localizar esse organismo e determinar a sua distribuição;
- b) Evitar o seu aparecimento e propagação;

- c) Quando detectado, evitar a sua propagação e combatê-lo com vista à sua erradicação.

Artigo 2.º

1. Os Estados-membros procederão sistemática e anualmente a prospecções oficiais do organismo em materiais vegetais da lista originários do seu território. Com vista à identificação de outras eventuais fontes de contaminação que possam ameaçar a produção de materiais vegetais da lista, os Estados-membros efectuarão uma avaliação dos riscos e, a menos que não tenha sido identificado qualquer risco de propagação do organismo durante essa avaliação, procederão, em zonas de produção desses materiais, a prospecções oficiais orientadas para o organismo em plantas diferentes das que constituem os materiais vegetais da lista, incluindo solanáceas silvestres hospedeiras, bem como nas águas superficiais utilizadas para a irrigação ou aspersão dos materiais vegetais da lista e em resíduos líquidos de descarga de instalações de transformação industrial ou de embalagem que lidem com materiais vegetais da lista, utilizados para a irrigação ou aspersão dos mesmos. A importância destas prospecções orientadas será determinada em função do risco identificado. Os Estados-membros poderão ainda proceder a prospecções oficiais noutros materiais, tais como meios de cultura, solos e resíduos sólidos provenientes de instalações de transformação industrial ou de embalagem.

2. As prospecções oficiais previstas no n.º 1 serão realizadas:

- a) Para os materiais vegetais da lista, em conformidade com o disposto no anexo I, secção II, ponto 1; e
- b) Para as outras plantas hospedeiras e para as águas, incluindo os resíduos líquidos, utilizando métodos adequados e, quando necessário, com colheita de amostras, que serão submetidas a testes laboratoriais oficiais ou oficialmente controlados;
- c) Quando necessário, para outros materiais, utilizando métodos adequados.

No que respeita a estas prospecções, os pormenores relativos aos procedimentos de inspecção e ao número, origem, discriminação e calendário da colheita de amostras serão decididos pelos organismos oficiais responsáveis na acepção da Directiva 77/93/CEE, com base em princípios científicos e estatísticos válidos e na biologia do organismo, e atendendo aos sistemas utilizados nos Estados-membros em questão para a produção dos materiais vegetais da lista e, quando necessário, de outras plantas hospedeiras do organismo.

3. Os pormenores e resultados das prospecções oficiais previstas no n.º 1 serão notificados anualmente aos

demaís Estados-membros e à Comissão, em conformidade com o disposto no anexo I, secção II, ponto 2. Essas notificações deverão ser apresentadas até 1 de Junho, excepto no que diz respeito às batatas para semente provenientes da própria exploração, caso em que deverão ser apresentadas até 1 de Setembro. Os pormenores e resultados das colheitas serão relativos à produção do ano anterior. O teor dessas notificações poderá ser apresentado ao comité.

4. De acordo com o procedimento previsto no artigo 16^oA da Directiva 77/93/CEE, será adoptada a seguinte disposição:

— métodos adequados para as prospecções e as análises laboratoriais previstas no primeiro parágrafo, alínea b), do n.º 2.

5. De acordo com o procedimento previsto no artigo 16^oA da Directiva 77/93/CEE, poderão ser adoptadas as seguintes disposições:

— métodos adequados para as prospecções previstas no primeiro parágrafo, alínea c), do n.º 2,

— outros pormenores relativos às prospecções previstas no segundo parágrafo do n.º 2 *supra*, para garantir níveis de segurança comparáveis entre Estados-membros.

Artigo 3^o

Os Estados-membros assegurarão que seja comunicada aos respectivos organismos oficiais responsáveis a ocorrência suspeita ou a presença confirmada do organismo nos seus territórios.

Artigo 4^o

1. Em caso de ocorrência suspeita, os organismos oficiais responsáveis do(s) Estado(s)-membro(s) em causa assegurarão a realização de análises laboratoriais oficiais ou oficialmente controladas, utilizando, para os materiais vegetais da lista, o método pertinente previsto no anexo II e, em conformidade com as condições definidas no ponto 1 anexo III ou, nos outros casos, qualquer outro método oficialmente aprovado, a fim de confirmar ou refutar a ocorrência suspeita. Em caso de confirmação, é aplicável o disposto no ponto 2 do anexo III.

2. Na pendência da confirmação ou refutação da ocorrência suspeita nos termos do n.º 1, nos casos de ocorrência suspeita em que:

- i) Se observaram sintomas de diagnóstico da doença causada pelo organismo e se obteve um resultado positivo no(s) teste(s) rápido(s) de rastreio definido(s) no anexo II, secção I, ponto 1, e secção II ou
- ii) Se obteve um resultado positivo no(s) teste(s) de rastreio definido(s) no anexo II, secção I, ponto 2, e secção III,

os organismos oficiais responsáveis dos Estados-membros deverão, no que respeita à sua própria produção:

- a) Proibir a circulação de plantas ou tubérculos de todas as colheitas, lotes ou remessas em que tenham sido colhidas as amostras, excepto sob o seu controlo e desde que tenha sido comprovado que não existe qualquer risco reconhecido de propagação do organismo;
- b) Adoptar medidas para determinar a origem da ocorrência suspeita;
- c) Tomar medidas preventivas adicionais adequadas, com base no nível previsível de risco, em especial para a produção dos materiais vegetais da lista e a circulação de lotes de batata de semente que não os referidos na alínea a), produzida no local de cultura em que tenham sido colhidas as amostras referidas na alínea a), a fim de evitar a propagação do organismo.

3. Nos casos de ocorrência suspeita em que existam riscos de contaminação dos materiais vegetais da lista ou das águas superficiais de ou para outro(s) Estado(s)-membro(s), o Estado-membro em que a ocorrência suspeita tenha sido detectada deverá notificar imediatamente, de acordo com o risco identificado, o(s) outro(s) Estado(s)-membro(s) em causa dos dados relativos à citada ocorrência suspeita e deverá existir uma cooperação adequada entre os referidos Estados-membros. O(s) Estado(s)-membro(s) notificado(s) deverá(ão) tomar medidas preventivas de acordo com o disposto na alínea c) do n.º 2 e quaisquer outras disposições que se revelem necessárias em conformidade com os n.ºs 1 e 2.

4. De acordo com o procedimento previsto no artigo 16^oA da Directiva 77/93/CEE, poderá ser adoptada a seguinte disposição:

— medidas referidas na alínea c) do n.º 2.

Artigo 5^o

1. Se as análises laboratoriais oficiais ou oficialmente controladas, utilizando, para os materiais vegetais da lista, o método pertinente previsto no anexo II ou, nos outros casos, qualquer outro método oficialmente aprovado, confirmarem a presença do organismo numa amostra colhida nos termos da presente directiva, os organismos oficiais responsáveis de um Estado-membro deverão, com base em princípios científicos válidos, na biologia do organismo e nos sistemas de produção, comercialização e transformação das plantas hospedeiras do organismo utilizados nesse Estado-membro:

- a) Para os materiais vegetais da lista,
 - i) proceder a investigações para determinar a extensão e fonte(s) primária(s) da contaminação, de acordo com o disposto no anexo IV, através de análises adicionais em conformidade com o n.º 1 do artigo 4^o, em, pelo menos, todas as existências de batata de semente com uma relação clonal, e

- ii) declarar contaminados os materiais vegetais da lista, remessas e/ou lotes em que tenha sido colhida a amostra, bem como as máquinas, veículos, recipientes, armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo material de embalagem, que tenham estado em contacto com os materiais vegetais da lista em que tenha sido colhida a amostra; deverão igualmente declarar contaminados, quando for necessário, o(s) campo(s), unidade(s) de produção de colheitas protegidas e local(is) de cultura em que tenham sido colhidos os materiais vegetais da lista e de que provém a amostra; no caso de amostras colhidas durante a época de cultura, deverão declarar contaminados o(s) campo(s), local(is) de produção e, quando necessário, unidade(s) de produção de colheitas protegidas em que tenha sido colhida a amostra, e
 - iii) determinar, em conformidade com o disposto no ponto 1 do anexo V, a extensão da contaminação provável por contacto pré ou pós-colheita ou por relação de produção, irrigação ou relação clonal com a contaminação declarada, e
 - iv) demarcar uma zona com base na declaração de contaminação nos termos da subalínea ii), na determinação da extensão da contaminação provável nos termos da subalínea iii) e na possível propagação do organismo, em conformidade com o disposto no ponto 2, alínea i), do anexo V;
- b) Para culturas de plantas hospedeiras diferentes das referidas na alínea a), quando considerarem que está em risco a produção dos materiais vegetais da lista,
- i) proceder a investigações nos termos da alínea a), subalínea i), e
 - ii) declarar contaminadas as plantas hospedeiras do organismo em que tenha sido colhida a amostra, e
 - iii) determinar a contaminação provável e demarcar uma zona nos termos da alínea a), subalíneas iii) e iv), respectivamente, em relação à produção dos materiais vegetais da lista;
- c) Para as águas superficiais (incluindo resíduos líquidos de descarga de instalações de transformação industrial ou de embalagem que lidem com materiais vegetais da lista) e para solanáceas silvestres hospedeiras, quando considerarem que está em risco a produção de materiais vegetais da lista através da irrigação, aspersão ou inundação por águas superficiais,
- i) proceder a investigações, incluindo uma prospecção oficial, nos momentos adequados, em amostras das águas superficiais e de solanáceas silvestres hospedeiras, caso presentes, por forma a determinar a extensão da contaminação, e
 - ii) declarar contaminadas as águas superficiais em que tenha(m) sido colhida(s) a(s) amostra(s), na medida em que tal seja apropriado e no seguimento das investigações referidas na subalínea i), e

- iii) determinar a contaminação provável e demarcar uma zona, com base na declaração de contaminação ao abrigo da subalínea ii) e na possibilidade de propagação do organismo, tendo em conta o disposto no ponto 1 e na alínea ii) do ponto 2 do anexo V.

2. Em conformidade com o disposto no ponto 4 do anexo V, os Estados-membros notificará imediatamente os demais Estados-membros e a Comissão de qualquer contaminação declarada nos termos da alínea a), subalínea ii), e da alínea c), subalínea ii), do n.º 1 e dos pormenores respeitantes à demarcação da zona nos termos da alínea a), subalínea iv), e, quando aplicável, da alínea c), subalínea iii), do n.º 1. O teor da notificação prevista neste parágrafo poderá ser apresentado ao comité.

Os Estados-membros enviará simultaneamente à Comissão a notificação adicional prevista no ponto 4 do anexo V. O teor da notificação prevista neste parágrafo deverá ser apresentado imediatamente aos membros do comité.

3. Na sequência da notificação nos termos do n.º 2 e dos elementos dela constantes, os demais Estados-membros mencionados na notificação procederão a investigações em conformidade com a alínea a), subalínea i), e, quando aplicável, da alínea c), subalínea i), do n.º 1 e tomarão quaisquer outras disposições que se revelem necessárias em conformidade com os n.ºs 1 e 2.

Artigo 6.º

1. Os Estados-membros determinarão que os materiais vegetais da lista declarados contaminados nos termos do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º não possam ser plantados e, sob controlo e com a aprovação dos respectivos organismos oficiais responsáveis, sejam sujeitos a um dos processos enumerados no ponto 1 do anexo VI, em condições que garantam que não existe qualquer risco reconhecido de propagação do organismo.

2. Os Estados-membros determinarão que os materiais vegetais da lista declarados como provavelmente contaminados nos termos do n.º 1, alínea a), subalínea iii), e alínea c), subalínea iii), do artigo 5.º, incluindo os materiais vegetais da lista que tenham sido considerados em risco, produzidos em locais de cultura declarados como provavelmente contaminados nos termos do n.º 1, alínea a), subalínea iii), do artigo 5.º, não possam ser plantados e, sob controlo dos respectivos organismos oficiais responsáveis, sejam utilizados de forma adequada ou eliminados conforme especificado no ponto 2 do anexo VI, em condições que garantam que não existe qualquer risco reconhecido de propagação do organismo.

3. Os Estados-membros determinarão que todas as máquinas, veículos, recipientes, armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo material de embalagem, declarados contaminados nos termos do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º ou provavel-

mente contaminados nos termos do n.º 1, alínea a), subalínea iii), e alínea c), subalínea iii), do artigo 5.º, sejam destruídos ou descontaminados segundo métodos adequados conforme especificado no ponto 3 do anexo VI. Após a descontaminação, esses objectos deixarão de ser considerados contaminados.

4. Sem prejuízo das medidas aplicadas nos termos dos n.ºs 1, 2 e 3, os Estados-membros determinarão que, na zona demarcada nos termos do n.º 1, alínea a), subalínea iv), e alínea c), subalínea iii), do artigo 5.º, seja aplicada uma série de medidas conforme especificado nos pontos 4.1 e 4.2 do anexo VI. O teor dessas medidas será notificado anualmente aos demais Estados-membros e à Comissão. O teor dessa notificação poderá ser apresentado ao comité.

Artigo 7.º

1. Os Estados-membros determinarão que a batata de semente deve satisfazer os requisitos da Directiva 77/93/CEE e ser proveniente, em linha directa, de material obtido no âmbito de um programa oficialmente aprovado, que tenha sido declarado indemne do organismo em análises oficiais ou oficialmente controladas utilizando o método pertinente constante do anexo II.

Os Estados-membros realizarão as análises acima referidas:

- a) Quando tiver sido comprovada a existência do organismo na sua própria produção de batata de semente,
 - i) através de análises de todo o material de propagação anterior, incluindo a selecção clonal inicial, e de análises sistemáticas de todos os clones de batata de semente de base, ou
 - ii) quando tiver sido demonstrado que não existe relação clonal, através de análises de todos os clones de batata de semente de base ou de material de propagação anterior, incluindo a selecção clonal inicial; e
- b) Noutros casos, ou em todas as plantas da selecção clonal inicial ou em amostras representativas da batata de semente de base ou material de propagação anterior.

2. De acordo com o procedimento previsto no artigo 16.ºA da Directiva 77/93/CEE, poderão ser adoptadas as seguintes disposições:

- regras de execução do disposto no segundo parágrafo, alínea a), do n.º 1,
- normas relativas às amostras representativas previstas no segundo parágrafo, alínea b), do n.º 1.

Artigo 8.º

Os Estados-membros proibirão a posse e o manuseamento do organismo.

Artigo 9.º

Sem prejuízo do disposto na Directiva 77/93/CEE, os Estados-membros poderão autorizar derrogações às medidas referidas nos artigos 6.º e 8.º da presente directiva, nos termos do disposto na Directiva 95/44/CE, para fins experimentais ou científicos e trabalhos de selecção de variedades⁽¹⁾.

Artigo 10.º

Os Estados-membros poderão adoptar, relativamente à sua própria produção, medidas adicionais ou mais rigorosas a fim de combater o organismo ou evitar a sua propagação, desde que sejam compatíveis com o disposto na Directiva 77/93/CEE.

O teor dessas medidas será notificado aos demais Estados-membros e à Comissão. O teor dessa notificação poderá ser apresentado ao comité.

Artigo 11.º

À luz da evolução dos conhecimentos científicos e técnicos, poderão ser adoptadas alterações dos anexos à presente directiva de acordo com o procedimento previsto no artigo 16.ºA da Directiva 77/93/CEE. No caso dos métodos previstos no anexo II e das medidas previstas nos pontos 4.1 e 4.2 do anexo VI da presente directiva, a Comissão elaborará um relatório de revisão desses métodos e medidas com base na experiência adquirida, que apresentará ao comité antes de 1 de Janeiro de 2002.

Artigo 12.º

1. Os Estados-membros porão em vigor as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente directiva a partir de 21 de Agosto de 1999. Do facto informarão imediatamente a Comissão.

Quando os Estados-membros adoptarem essas disposições, estas deverão incluir uma referência à presente directiva ou ser acompanhadas dessa referência aquando da sua publicação oficial. As modalidades dessa referência serão estabelecidas pelos Estados-membros.

2. Os Estados-membros comunicarão imediatamente à Comissão as principais disposições de direito interno que adoptarem no domínio regido pela presente directiva. A Comissão informará do facto os outros Estados-membros.

⁽¹⁾ JO L 184 de 3.8.1995, p. 34. Directiva com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 97/46/CE da Comissão (JO L 204 de 31.7.1997, p. 43).

Artigo 13.º

Feito em Bruxelas, em 20 de Julho de 1998.

A presente directiva entra em vigor na data da sua publicação no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.

Artigo 14.º

Os Estados-membros são destinatários da presente directiva.

*Pelo Conselho**O Presidente*

W. MOLTERER

ANEXO I

SECÇÃO I

Lista das plantas hospedeiras de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* referidas no artigo 1º

Plantas (incluindo tubérculos), com excepção da semente verdadeira, de *Solanum tuberosum* L. Batata

Plantas, com excepção de frutos e sementes, de *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw. Tomate

SECÇÃO II

Prospecções

1. As prospecções oficiais referidas no n.º 2, alínea a), do artigo 2.º serão baseadas na biologia do organismo e nos sistemas de produção específicos do Estado-membro em causa, devendo incluir:
 - i) No caso da batata:
 - em alturas apropriadas, inspecção visual da cultura em desenvolvimento e/ou colheita de amostras de batata de semente e de batata para consumo durante a época de cultura ou em armazém. Essas amostras serão sujeitas a uma inspecção visual oficial ou oficialmente controlada, com corte dos tubérculos,
 - e
 - no caso da batata de semente e, quando apropriado, da batata para consumo, análises laboratoriais oficiais ou oficialmente controladas, utilizando o método constante do anexo II;
 - ii) No caso do tomate:
 - inspecção visual em alturas apropriadas, pelo menos da cultura em desenvolvimento de plantas destinadas a replantação para utilização profissional.
2. A notificação das prospecções oficiais a que se refere o n.º 3 do artigo 2.º deverá incluir:
 - i) No caso de prospecções em batata:
 - estimativa da superfície total de cultura de batata de semente e de batata para consumo, em hectares,
 - discriminação por categoria de semente e calibre e, quando apropriado, por região,
 - número e data das amostras colhidas para análise,
 - número de inspecções visuais da cultura,
 - número (e dimensão da amostra) de inspecções visuais de tubérculos;
 - ii) No caso de prospecções pelo menos na cultura em desenvolvimento de plantas de tomate, destinadas a replantação para utilização profissional:
 - estimativa do número total de plantas,
 - número de inspecções visuais;
 - iii) No caso de prospecções noutras plantas hospedeiras, incluindo solanáceas silvestres hospedeiras:
 - espécie,
 - número e data das amostras colhidas,
 - área/rio, consoante o caso, em que foram colhidas amostras,
 - método analítico;
 - iv) No caso de prospecções em águas e descargas de resíduos líquidos provenientes de instalações de transformação industrial ou de embalagem:
 - número e data das amostras,
 - área/rio/situação das instalações, consoante o caso, em que foram colhidas amostras,
 - método analítico.

ANEXO II

ESQUEMA DE ENSAIO PARA DIAGNÓSTICO, DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI *ET AL.*

CONTEÚDO DO ESQUEMA DE ENSAIO

O esquema de ensaio apresentado descreve os vários procedimentos envolvidos:

- i) No diagnóstico do mal murcho em tubérculos de batata e da podridão bacteriana em plantas de batateira e de tomateiro;
- ii) Na detecção de *Ralstonia solanacearum* em amostras de tubérculos de batata;
- iii) Na identificação de *Ralstonia solanacearum*.

Nos apêndices, são fornecidos pormenores para a preparação dos materiais a utilizar nas análises, isto é, meios de cultura, tampões, soluções e reagentes.

ÍNDICE

SECÇÃO I: Aplicação do esquema de ensaio	9
1. Diagnóstico do mal murcho em tubérculos de batata e da podridão bacteriana em plantas de batateira e de tomateiro	9
2. Detecção e identificação de <i>Ralstonia solanacearum</i> em amostras de tubérculos de batata	11
SECÇÃO II: Diagnóstico do mal murcho em tubérculos de batata e da podridão bacteriana em plantas de batateira e de tomateiro	13
1. Sintomas	13
2. Teste(s) rápidos de rastreio	13
3. Isolamento	14
4. Teste(s) de confirmação	14
SECÇÃO III: Detecção e identificação de <i>Ralstonia solanacearum</i> em amostras de tubérculos de batateira	17
1. Preparação da amostra para o teste	17
2. Teste de imunofluorescência (IF)	18
3. «Enzyme linked immuno sorbent assay» (teste ELISA)	20
4. Teste de polimerização em cadeia (PCR™)	20
5. Teste de sementeira em placas com meio selectivo	22
6. Bio-ensaio	23
7. Teste de enriquecimento	23
8. Testes de patogenicidade	23
<i>Apêndice 1:</i> Meios nutritivos para isolamento e cultura de <i>Ralstonia solanacearum</i>	24
<i>Apêndice 2:</i> Materiais para a preparação das amostras	25
<i>Apêndice 3:</i> Materiais para o teste IF	26
<i>Apêndice 4:</i> Determinação do nível de contaminação no teste IF	27
<i>Apêndice 5:</i> Materiais para o teste ELISA	28
<i>Apêndice 6:</i> Materiais para o teste PCR	29
<i>Apêndice 7:</i> Materiais para os testes de sementeira em placas com meio selectivo e testes de enriquecimento	29
Bibliografia	30

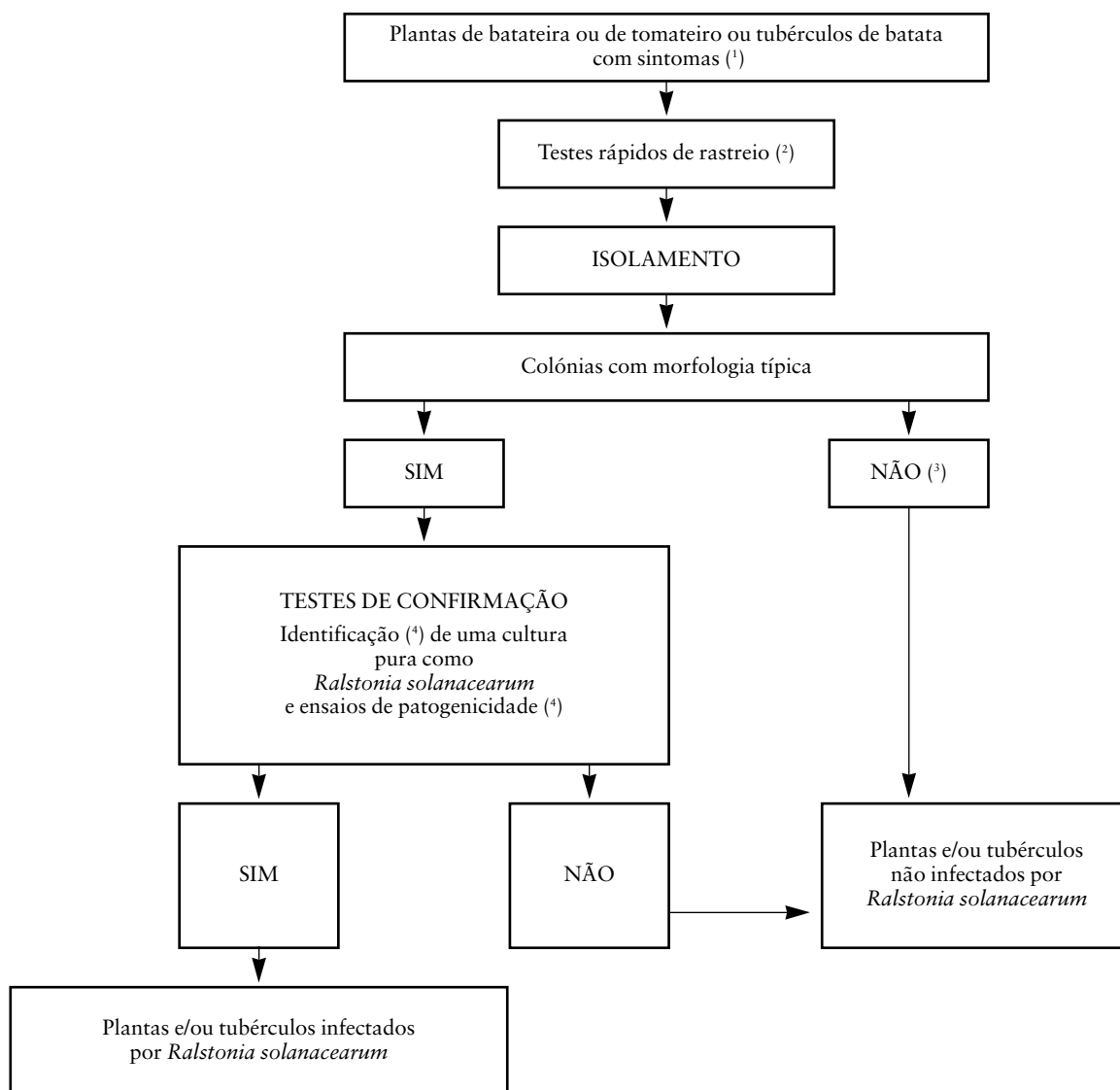
SECÇÃO I

APLICAÇÃO DO ESQUEMA DE ENSAIO

1. Diagnóstico do mal murcho em tubérculos de batata e da podridão bacteriana em plantas de batateira e de tomateiro

Este procedimento destina-se a tubérculos de batata com sintomas típicos ou suspeitos de mal murcho e a plantas de batateira e de tomateiro com sintomas típicos ou suspeitos de podridão bacteriana. Implica um teste rápido de rastreio, isolamento do agente patogénio a partir do tecido vascular infectado em meios de cultura adequados e, em caso de resultado positivo, identificação da cultura como *Ralstonia solanacearum*.

Apresentação do fluxograma:



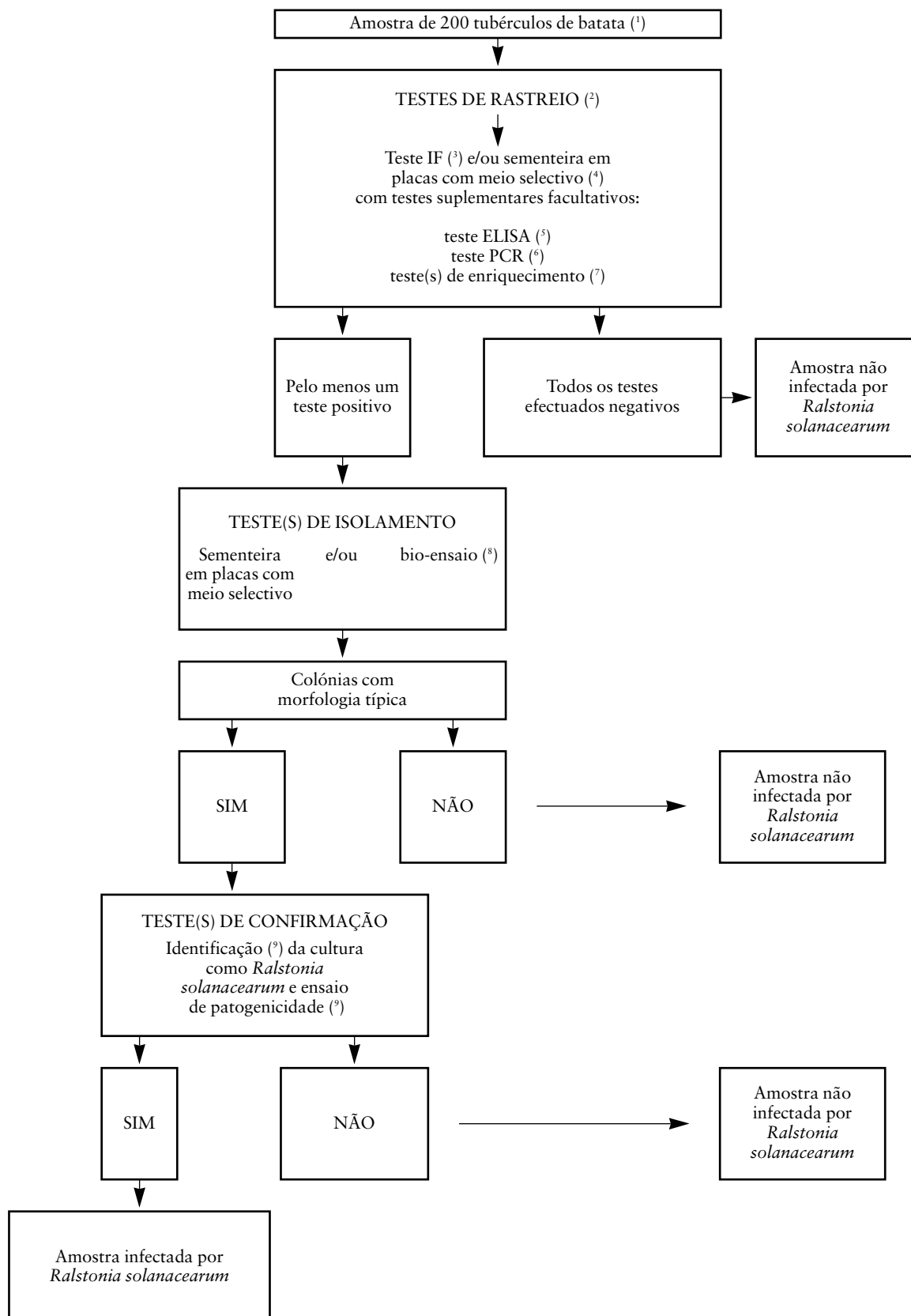
Referências do fluxograma:

- (¹) A descrição dos sintomas é apresentada na secção II, ponto 1.
- (²) Os testes rápidos de rastreio facilitam um diagnóstico inicial.
- O testes adequados são:
- teste de exsudação do tecido vascular do caule (secção II, ponto 2),
 - teste para detecção de grânulos de poli- β -hidroxibutirato (secção II.2),
 - teste IF (secção III, ponto 2),
 - teste ELISA (secção III, ponto 3),
 - teste PCR (secção III, ponto 4).
- (³) Embora o isolamento por plaqueamento de diluições do patógeno proveniente de material vegetal que apresente sintomas típicos seja simples, poderá não ser possível fazer culturas a partir de material em fase avançada de infecção. As bactérias saprófitas que se desenvolvem nos tecidos afectados podem ter um crescimento mais rápido ou inibir o patógeno no meio de isolamento. Se não for possível isolar a bactéria, apesar de os sintomas de doença serem típicos, o isolamento deverá ser repetido, de preferência através de um teste de sementeira em placas com meio selectivo.
- (⁴) A identificação fiável de uma cultura pura de *Ralstonia solanacearum* é alcançada através de, pelo menos, um dos testes mencionados na secção II, ponto 4.1, em combinação com um teste de patogenicidade (secção II, ponto 4.3). A caracterização da estirpe é facultativa, mas recomendada para cada novo caso.

2. Detecção e identificação de *Ralstonia solanacearum* em amostras de tubérculos de batateira

Este procedimento destina-se à detecção de infecções latentes em tubérculos de batateira por um ou, de preferência, mais teste(s) de rastreio que, se positivos, são complementados pelo isolamento do patógeno, seguido, no caso do isolamento de colónias típicas, da identificação de uma cultura pura como *Ralstonia solanacearum*.

Apresentação do fluxograma:



*Referências do fluxograma:***(1) Dimensão da amostra**

A dimensão normal da amostra é de 200 tubérculos. Contudo, este procedimento pode ser aplicado a amostras com menos de 200 tubérculos.

(2) Teste(s) de rastreio

Um teste único poderá não ser suficientemente sensível ou fiável para detectar *Ralstonia solanacearum* numa amostra. Portanto, recomenda-se que seja efectuado mais de um teste. Sempre que possível, estes testes deverão, de preferência, basear-se em diferentes princípios biológicos.

(3) Teste de imunofluorescência (IF)

O teste IF é um teste de rastreio bem estabelecido, o que representa uma vantagem sobre os outros testes que não estão ainda completamente desenvolvidos e validados. Este teste é utilizado para muitas outras bactérias de quarentena, como por exemplo *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Com os parâmetros de leitura especificados neste método, este teste é sensível (limiar de sensibilidade de 10^3 - 10^4 células por ml de sedimento de extracto de batata).

O factor crítico para determinação da fiabilidade do resultado do teste é a qualidade do anti-soro. Só um anti-soro com um título elevado (mínimo 2 000 para o anti-soro cru) é aceitável e todos os testes têm que ser efectuados com o anti-soro no seu título ou com uma diluição abaixo do título. Dá-se preferência ao método indirecto. Os métodos directos podem ser aplicados se tiverem níveis de sensibilidade e de especificidade equivalentes aos do método indirecto.

O teste IF tem a vantagem de possibilitar uma interpretação subjectiva da morfologia das células coradas e da intensidade de fluorescência, que fornecem informações acerca da especificidade da reacção. São comuns a reacções cruzadas por parte de bactérias do solo ou associadas aos tecidos de batateira serologicamente relacionadas ou com a morfologia celular de *Ralstonia solanacearum*. O teste IF pode ser utilizado como único teste de rastreio, embora nos testes em que se suspeite da existência de reacções cruzadas deva ser feito um teste de rastreio adicional baseado em diferentes princípios biológicos. Nesses casos, a sementeira em placas com meio selectivo é o teste mais apropriado.

(4) Sementeira em placas com meio selectivo

Utilizando o meio SMSA modificado e a metodologia especificada neste método, este é um teste sensível e selectivo para *Ralstonia solanacearum*. O resultado está disponível 3 a 6 dias após a preparação das amostras. O patógeno é isolado directamente em cultura e pode ser facilmente identificado. Para tirar o máximo partido das suas capacidades, o teste requer uma preparação cuidada dos hilos, de forma e evitar bactérias secundárias associadas aos tubérculos da batateira, bactérias essas que são concorrentes com *Ralstonia solanacearum* no meio e que podem afectar o desenvolvimento do patógeno. Algumas estirpes podem exibir um crescimento deficiente devido ao facto de os componentes do meio poderem afectar o organismo alvo. Também é necessário estar atento de forma a diferenciar *Ralstonia solanacearum* de outras bactérias que possam desenvolver-se no meio. A sementeira em placas com meio selectivo pode ser utilizada como o único teste de rastreio, embora deva ser feito um segundo teste de rastreio diferente, para confirmar ou refutar o diagnóstico, quando se obtém um resultado negativo e se suspeite da inibição de *Ralstonia solanacearum* por parte de outras bactérias presentes no meio. Nesses casos, o tipo de teste mais apropriado é o IF.

(5) Teste ELISA

O teste ELISA tem geralmente um limiar de sensibilidade menor do que o teste IF (10^4 — 10^5 células por ml de sedimento de extracto de batata). O teste é económico e rápido mas geralmente mais sujeito ao aparecimento de falsos resultados positivos (reacções cruzadas) e de falsos resultados negativos (inibição pelas moléculas fenólicas do extracto de batata). As exigências relativas à especificidade do anti-soro são extremamente elevadas. O teste ELISA não pode ser utilizado como o único teste de rastreio.

(6) Teste PCR

A PCR é, potencialmente, um teste que permite um rastreio extremamente sensível, embora seja facilmente inibido por componentes do extracto de planta ou do tubérculo, daí resultando falsos resultados negativos. Algumas cultivares de batateira contêm mais inibidores que outras. É portanto necessário eliminar estes inibidores. A inibição pode ser reduzida através da diluição, mas à custa da diluição das populações de *Ralstonia solanacearum*. Têm que ser tomadas precauções durante todas as etapas de preparação da amostra e do teste para evitar contaminações, que resultariam em falsos resultados positivos. Falsos resultados positivos podem igualmente surgir a partir da homologia de sequências de outros organismos. Por estes motivos, a PCR directa não pode ser utilizada como único método de rastreio.

(7) Teste de enriquecimento

A incubação de amostras de sedimentos de extracto da batata em meio líquido semi-selectivo, como o caldo SMSA modificado, permite a multiplicação de *Ralstonia solanacearum*. Talvez mais importante, dilui também os potenciais inibidores dos testes ELISA e PCR. Portanto, *Ralstonia solanacearum* em meio enriquecido pode ser detectada pelos testes IF, ELISA e PCR. Não se recomenda que seja feita a sementeira em placas directamente a partir dos meios enriquecidos. Os métodos de enriquecimento não foram ainda extensivamente ensaiados e testados. Estão aqui incluídos porque têm um bom potencial. No entanto, devido à relativa falta de experiência com os mesmos, não podem ser utilizados como únicos métodos de detecção.

(8) Bio-ensaio

O bio-ensaio é utilizado para o isolamento de *Ralstonia solanacearum* a partir de sedimentos de extractos de batata, através de um enriquecimento selectivo numa planta hospedeira. Os bio-ensaios podem ser efectuados em plantas de tomateiro ou de beringela. O teste requer condições óptimas de incubação, especificadas neste método. Não é provável que as bactérias inibidoras de *Ralstonia solanacearum* no meio SMSA interfiram neste teste.

(9) Teste de confirmação

A identificação fiável de uma cultura pura de *Ralstonia solanacearum* é alcançada por, pelo menos, um dos testes mencionados na secção II, ponto 4.1, em combinação com um teste de patogenicidade (secção II, ponto 4.3). A caracterização da estirpe é facultativa mas recomendada para cada novo caso.

SECÇÃO II

DIAGNÓSTICO DO MAL MURCHO EM TUBÉRCULOS DA BATATA E DA PODRIDÃO BACTERIANA EM PLANTAS DE BATATEIRA E DE TOMATEIRO

1. Sintomas

1.1. Sintomas na batateira

Planta da batateira. Na fase inicial de infecção, verifica-se uma murchidão das folhas na parte superior da planta a temperaturas elevadas e durante o dia, com recuperação à noite. A murchidão torna-se rapidamente irreversível, resultando na morte da planta. O tecido vascular dos caules de plantas afectadas cortados transversalmente pode tornar-se castanho e uma exsudação leitosa escorre da superfície cortada ou pode ser facilmente extraída apertando o caule com os dedos. Quando um caule cortado é colocado verticalmente em água, há um escorrimento viscoso a partir dos feixes vasculares.

Tubérculo de batata. Os tubérculos de batata têm que ser cortados transversalmente junto do hilo (estolho). Na fase inicial da infecção há uma coloração amarela vítrea ou castanha clara no anel vascular, pelo qual emerge espontaneamente, após alguns minutos ou quando é aplicada uma ligeira pressão com os polegares junto da superfície cortada, uma exsudação de cor creme clara. Mais tarde, a coloração torna-se castanha mais evidente e a necrose pode alastrar ao parênquima. Nas fases mais avançadas, a infecção alastra a partir do hilo e dos olhos, podendo observar-se lesões na casca, de cor vermelha acastanhada e em ligeira depressão, a partir das quais se pode manifestar exsudação bacteriana que origina a adesão de partículas de terra.

1.2. Sintomas no tomateiro

Planta de tomateiro. Os primeiros sintomas visíveis são o aspecto flácido das folhas mais jovens. Em condições ambientais favoráveis ao agente patogénico (temperatura do solo de cerca de 25 °C, humidade saturada), segue-se dentro de dias a epinastia e a murchidão de um lado ou da planta inteira, que resulta no colapso total da planta. Em condições menos favoráveis (temperatura do solo inferior a 21 °C), pode desenvolver-se no caule um grande número de raízes adventícias. Pode observar-se um cordão gorduroso ao longo do caule, que põe em evidência a necrose do sistema vascular. Quando o caule é cortado transversalmente, os tecidos vasculares do caule, com uma descoloração acastanhada, exsudam gotas de líquido amarelado ou branco, que contém bactérias.

2. Testes rápidos de rastreio

Os testes rápidos de rastreio facilitam o diagnóstico inicial. Utilizar um ou mais dos seguintes testes:

Teste de exsudação do caule

A presença de *Ralstonia solanacearum* em caules de batateira com sintomas de murchidão pode ser avaliada através de um simples teste inicial:

Cortar o caule imediatamente acima do nível do solo. Colocar a superfície cortada num recipiente com água. Pouco tempo depois, haverá uma exsudação bacteriana espontânea a partir dos anéis vasculares. Qualquer outra bactéria que provoque infecção vascular em plantas de batateira não exibirá este fenómeno.

Deteção de grânulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB)

Os grânulos de PHB nas células de *Ralstonia solanacearum* são visualizados através da coloração com azul de Nilo A ou com negro de Sudão B.

Preparar um esfregaço a partir do exsudado ou com uma suspensão do tecido necrosado numa lâmina de microscópio, ou então preparar um esfregaço de uma cultura de 48 horas em YPGA ou SPA (apêndice 1). Preparar esfregaços de controlo positivo da estirpe Biovar 2/Raça 3 e, se necessário, um esfregaço de uma estirpe heteróloga como controlo negativo. Deixar secar. Passar rapidamente a parte de baixo da lâmina à chama várias vezes, até que o esfregaço esteja fixado.

Teste do azul de Nilo

1. Corar o esfregaço fixado na lâmina com uma solução aquosa a 1 % de azul de Nilo A. Incubar durante 10 minutos a uma temperatura de 55 °C.
2. Escorrer a solução corante. Lavar brevemente e com cuidado em água corrente. Retirar o excesso de água com papel de filtro.
3. Lavar o esfregaço com uma solução aquosa a 8 % de ácido acético. Incubar durante um minuto à temperatura ambiente.
4. Lavar com cuidado em água da torneira corrente. Secar com papel de filtro.
5. Voltar a humedecer com uma gota de água. Cobrir com uma lamela.
6. Examinar o esfregaço corado em microscópio de epifluorescência a 450 nm, com lente de imersão em óleo, e uma ampliação de 1 000 ×.

Os grânulos de PHB apresentam uma fluorescência laranja vivo. Observar também com luz normal para verificar se os grânulos são intracelulares e se a morfologia das células é típica de *Ralstonia solanacearum*.

Teste negro de Sudão

1. Corar o esfregaço fixado na lâmina com uma solução a 0,3 % de negro de Sudão B em etanol a 70 %. Incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente.
2. Escorrer a solução corante. Lavar brevemente e com cuidado em água da torneira corrente. Retirar o excesso de água com papel de filtro.
3. Mergulhar o esfregaço brevemente em xilol. Secar com papel de filtro.

NB: Cuidado! O xilol é um produto nocivo. Trabalhar em «hotte».

4. Lavar o esfregaço com uma solução aquosa a 0,5 % (p/v) de safranina e deixar durante 10 segundos à temperatura ambiente.

NB: Cuidado! A safranina é um produto nocivo. Trabalhar em «hotte».

5. Lavar com cuidado em água corrente. Secar com papel de filtro. Cobrir com uma lamela.
6. Examinar o esfregaço corado em microscópio com luz transmitida com lente de imersão em óleo e uma ampliação de 1 000 x. Os grânulos de PHB em células de *Ralstonia solanacearum* apresentam uma coloração azul negra. As paredes celulares apresentam uma coloração rosa.

Outros testes

Outros testes de rastreio considerados apropriados são o teste IF (secção III, ponto 2), o teste ELISA (secção III, ponto 3) e o teste PCR (secção III, ponto 4).

3. Isolamento

- 3.1. Retirar o exsudado ou secções do tecido necrosado do anel vascular do tubérculo ou da zona vascular do caule da planta de batateira ou de tomateiro. Preparar uma suspensão num pequeno volume de água destilada esterilizada ou de tampão fosfato 50 mM. Deixar em repouso durante 5 a 10 minutos.

- 3.2. Preparar uma série de diluições decimais da suspensão, por exemplo 1/10 e 1/100, ou mais, se consideradas necessárias.

- 3.3. Transferir um volume padrão da suspensão para um meio nutritivo geral (NA, YPGA e SPA, apêndice 1) e/ou para o meio de tetrazólio de Kelman (apêndice 1) e/ou para o meio selectivo SMSA (apêndice 7). Espalhar ou riscar com uma técnica adequada de diluição em placas. Se se considerar necessário, preparar um conjunto separado de placas com cada um dos meios de cultura utilizados e com uma suspensão diluída de células de uma estirpe virulenta de Biovar 2/Raça 3 de *Ralstonia solanacearum* como controlo positivo.

- 3.4. Incubar as placas durante 3 dias a uma temperatura de 28 °C. A incubação pode ser prolongada até 6 dias se o crescimento for lento mas, frequentemente, as colónias em placas com SMSA tornam-se atípicas e as células bacterianas morrem.

Em meios nutritivos gerais, os isolados virulentos de *Ralstonia solanacearum* produzem colónias de cor de pérola, achatadas, irregulares e fluidas, exibindo muitas vezes espirais características.

Em meio de tetrazólio de Kelman, as colónias típicas de isolados virulentos de *Ralstonia solanacearum* são cremes, achatadas, irregulares e fluidas, com espirais de cor vermelha viva no centro. Formas avirulentas de *Ralstonia solanacearum* desenvolvem colónias butirosas vermelho-escuras.

Em meio SMSA, os isolados virulentos de *Ralstonia solanacearum* produzem colónias brancas leitosas, achatadas, irregulares e fluidas, com centros vermelho vivo bem distintos.

As formas avirulentas de *Ralstonia solanacearum* desenvolvem no meio SMSA colónias menos fluidas, completamente rosas a vermelhas.

- 3.5. Purificar as colónias com morfologia característica através de subcultura num meio nutritivo. Evitar a repicagem regular de subculturas, que pode induzir uma perda de virulência.

4. Teste(s) de confirmação

4.1. Identificação de *Ralstonia solanacearum*

Identificar as culturas puras de *Ralstonia solanacearum* através de, pelo menos, um dos seguintes procedimentos:

Testes nutricionais e enzimáticos

Nota: Incluir estirpes apropriadas de controlo para cada teste utilizado.

As seguintes características fenotípicas de *Ralstonia solanacearum* estão universalmente presentes ou ausentes:

Pigmento fluorescente	-
Inclusões de PHB	+
Teste de oxidação/fermentação (O/F)	O+/F-
Catalase	+
Oxidase de Kovacs	+
Redução dos nitratos	+
<hr/>	
Utilização de citrato	+
Crescimento a 40 °C	-
<hr/>	
Crescimento em NaCl a 1 %	+
Crescimento em NaCl a 1 %	-
Hidrólise da arginina	-
Liquefação da gelatina	-
Hidrólise de amido	-
Hidrólise de esculina	-
Produção de levana	-

Os meios de cultura e métodos de ensaio estão descritos em Lelliott & Stead (1987).

Teste IF

Preparar uma suspensão de 10^6 células por ml a partir da cultura e de uma estirpe de controlo. Preparar uma série de diluições de anti-soro, com duas ordens de diluição. Aplicar o procedimento IF (secção III, ponto 2). O título de IF da cultura tem que ser equivalente ao do controlo positivo.

Teste ELISA

Preparar uma suspensão com uma concentração superior a 10^6 células por ml a partir da cultura e de uma estirpe de controlo. Aplicar o procedimento ELISA (secção III, ponto 3). O valor ELISA da cultura tem que ser equivalente ao do controlo positivo.

Teste PCR

Preparar uma suspensão de 10^6 células por ml a partir da cultura e de uma estirpe de controlo positivo. Aplicar o procedimento da PCR (secção III, ponto 4). O produto da PCR da cultura tem que ter a mesma dimensão e padrão da análise enzimática restritiva (REA) do controlo positivo.

Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

Preparar uma suspensão de 10^6 células por ml da cultura e de uma estirpe de controlo. Aplicar o procedimento FISH (van Beuningen *et al.*, 1995) com o «primer» OLI-1 (Seal *et al.*, 1993). A cultura tem de manifestar a mesma reacção que o controlo positivo.

Perfil proteico

As proteínas desnaturadas de células inteiras são separadas através de electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (Stead, 1992a).

Perfil de ácidos gordos (FAP)

Incubar a cultura e uma estirpe de controlo positivo durante 48 horas a uma temperatura de 28 °C em agar de soja tripticase e aplicar o procedimento FAP (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead, 1992b). O perfil da cultura tem de ser idêntico ao do controlo positivo. Nas condições especificadas, os ácidos gordos característicos são 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH e 18:1 2OH.

4.2. Caracterização da estirpe

A caracterização da estirpe é opcional mas recomendada para cada novo caso, utilizando, pelo menos, um dos seguintes:

Determinação da biovar

A *Ralstonia solanacearum* é dividida em biovars com base na capacidade de produzir ácido a partir de três álcoois de hexose e três açúcares (Hayward, 1964 & 1994):

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Utilização de:					
— maltose	-	+	+	-	+
— lactose	-	+	+	-	+
— celobiose	-	+	+	-	+
— manitol	-	-	+	+	+
— sorbitol	-	-	+	+	-
— dulcitol	-	-	+	+	-

Testes suplementares diferenciam a Biovar 2 em subfenótipos (Hayward, 1994):

	Biovar 2	Biovar 2-A	Biovar 2-T
Utilização de trealose	-	+	+
Utilização de inositol	+	-	+
Utilização de D-ribose	-	-	+
Actividade pectolítica	baixa	baixa	alta

Determinação da raça

A raça (Buddenhagen *et al.*, 1962) é determinada com base no teste de patogenicidade em plantas de tomateiro, beringela ou tabaco e através de um teste de avaliação da reacção de hipersensibilidade (HR) em folhas de tabaco (Lozano & Sequeira, 1970):

	Raça (*)		
	1	2	3
Reacção em:			
— plantas de tomateiro/beringela	murchidão	sem reacção	murchidão
— plantas de tabaco	murchidão	sem reacção	sem reacção
— folhas de tabaco	necrose (48 h) e murchidão (7-8 dias)	HR (12-24 h)	clorose (2-8 dias)

(*) A raça 4 (patogénica para gingeira e poucos mais hospedeiros) e a raça 5 (patogénica exclusivamente para amoreira) não estão incluídas.

A caracterização da raça através de testes de patogenicidade ou hipersensibilidade em folhas de tabaco pode não ser muito fiável pelo que poderá ser deduzida a partir da biovar e do hospedeiro natural de origem.

A cultura pode ser ainda caracterizada através de:

Impressão digital genómica

A diferenciação molecular das estirpes do complexo *Ralstonia solanacearum* pode ser feita através de:

Análise RFLP (Cook *et al.*, 1989)

Sequenciação repetitiva de PCR [REP-, ERIC- & BOX-PCR (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995)]

4.3.

Teste de patogenicidade

A finalidade deste teste é a confirmação da virulência das culturas identificadas como *Ralstonia solanacearum*.

Preparar inóculos de 10⁶ células por ml a partir da cultura e de uma estirpe de controlo positivo. Inocular 5-10 plantas de tomateiro ou beringela de preferência no estádio de terceira folha verdadeira ou mais velha (secção III, ponto 6). Incubar até 2 semanas a uma temperatura de 22-28 °C e elevada humidade relativa, regando diariamente. Observar sintomas de murchidão e/ou epinastia, clorose, nanismo.

Proceder ao isolamento a partir de plantas com sintomas:

- remover uma secção de tecido do caule 2 cm acima do ponto de inoculação,
- fragmentá-la e suspendê-la num pequeno volume de água destilada esterilizada ou tampão fosfato 50 mM e semear, incubar e observar a presença de colónias típicas de *Ralstonia solanacearum*.

SECÇÃO III

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *RALSTONIA SOLANACEARUM* EM AMOSTRAS DE TUBÉRCULOS DE BATATEIRA

Nota: A dimensão normal da amostra é de 200 tubérculos. Contudo, este procedimento pode ser aplicado a amostras com menos de 200 tubérculos.

1. Preparação da amostra para o teste

Nota: Os sedimentos de extracto de batata obtidos através deste protocolo também podem ser utilizados para a detecção de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Opções pré-teste, se consideradas úteis:

- i) incubar a amostra a uma temperatura de 25-30°C durante um período de até 2 semanas, para favorecer a multiplicação das baixas populações de *Ralstonia solanacearum*,
- ii) lavar os tubérculos em água corrente com desinfetantes e detergentes adequados. Secar os tubérculos ao ar.

- 1.1. Retirar a pele na zona do hilo do tubérculo com um bisturi ou faca de cortar legumes, limpos e desinfetados, de forma a que os tecidos vasculares fiquem visíveis. Retirar cuidadosamente um núcleo cónico (3-5 mm de diâmetro) de tecido vascular na zona do hilo de cada tubérculo. Limitar ao máximo a quantidade de tecido não vascular. Processar cada um dos tubérculos que constituem a amostra.

Nota: O exame visual dos tubérculos (secção II, ponto 1) pode ser feito nesta fase. Pôr de lado qualquer tubérculo que exiba sintomas ou severas podridões e testá-los separadamente (secção II).

- 1.2. Recolher os hilos num recipiente fechado. Os hilos devem ser, de preferência, processados de imediato. Se tal não for possível, guardá-los durante 24 horas ou nunca mais de 72 horas, a uma temperatura de 4°C.

- 1.3. Processar os hilos de acordo com um dos seguintes procedimentos:

- i) Transferir os hilos para um recipiente adequado.

Adicionar um volume adequado de tampão de maceração (apêndice 2) de forma a cobrir o material.

Fragmentar o material num misturador Waring Blender ou Ultra Thurrax até à homogeneização completa. Evitar uma homogeneização exagerada.

Deixar o macerado repousar durante 15-30 minutos.

- ii) Transferir os hilos para um recipiente adequado.

Adicionar um volume adequado de tampão de maceração de forma a cobrir o material.

Colocar o recipiente num agitador rotativo.

Incubar a uma velocidade de 50 a 100 r.p.m. durante 4 horas a uma temperatura de 20-22°C ou durante 16-24 horas a uma temperatura de 4°C.

- iii) Transferir os hilos para um saco de maceração descartável forte (por exemplo, um saco Stomacher com 105 x 150 mm, esterilizado por radiação).

Esmagar cuidadosamente os hilos com uma ferramenta adequada, por exemplo um martelo, até à homogeneização completa.

Adicionar um volume suficiente de tampão de maceração, de forma a cobrir o material.

Deixar o macerado sedimentar durante 15-30 minutos.

- 1.4. Extrair as bactérias dos hilos processados através de um dos seguintes procedimentos:

- i) Decantar o macerado com cuidado para um tubo de centrifugação, deixando os resíduos no recipiente ou saco. Se o macerado estiver turvo após decantação, centrifugar a não mais de 180 g durante 10 minutos, a uma temperatura inferior a 10°C.

Centrifugar o macerado decantado, ou o sobrenadante resultante da primeira etapa de centrifugação, a 7 000 g durante 15 minutos ou a 10 000 g durante 10 minutos a uma temperatura inferior a 10°C.

Desprezar o sobrenadante sem perturbar o sedimento.

- ii) Filtrar o macerado através de um sistema de filtração com dimensão de poro de 40-100 µm. Intensificar a filtração utilizando uma bomba de vácuo.

Recolher o filtrado num tubo de centrifugação.

Lavar o filtro com tampão de maceração.

Centrifugar o filtrado a 7 000 g durante 15 minutos ou a 10 000 g durante 10 minutos, a uma temperatura inferior a 10°C.

Desprezar o sobrenadante sem perturbar o sedimento.

- 1.5. Ressuspender o sedimento em 1 ml de tampão de sedimentação (apêndice 2).
Dividir em duas partes iguais e transferir cada parte para um microtubo.
Utilizar um microtubo para os testes. Durante o ensaio, conservar o extracto restante a uma temperatura de 4°C.
Adicionar uma solução a 10-25 % (v/v) de glicerol esterilizado ao outro microtubo. Agitar em *vortex*. Armazenar a uma temperatura de -18°C (semanas) ou de -70°C (meses).
2. Teste IF
- Utilizar anti-soro para *Ralstonia solanacearum*, de preferência para a Biovar 2/Raça 3. Determinar o título com uma suspensão de 10⁶ células por ml da estirpe homóloga de *Ralstonia solanacearum*, com uma diluição adequada do conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC), de acordo com as recomendações do fabricante. O anti-soro não purificado deverá ter um título de IF de, pelo menos, 1:2 000.
- Utilizar lâminas de microscópio com vários poços, de preferência 10, com, pelo menos, 6 mm de diâmetro.
- Incluir um controlo de conjugado FITC em cada lâmina. O teste deverá ser repetido, com um controlo de PBS incluído, no caso de ser observado qualquer resultado positivo no controlo de FITC.
- Preparar lâminas de controlo positivo em separado, com uma suspensão de 10⁶ células por ml de uma estirpe de *Ralstonia solanacearum* de Biovar/Raça apropriadas. Incluir uma lâmina em cada conjunto de testes.
- 2.1. Preparar as lâminas através de um dos seguintes processos:
- i) Para sedimentos com relativamente pouco amido:
Pipetar um volume padrão de sedimento ressuspense para cada um dos poços de uma fila (15 µl é adequado para um poço com 6 mm de diâmetro — aumentar o volume à escala para poços maiores). A fila de poços restante pode ser utilizada como um duplicado ou para outra amostra, como indicado na figura 1.
- ii) Para outros sedimentos:
Preparar diluições decimais, isto é, 1/10, 1/100 e 1/1 000 do sedimento ressuspense em tampão de sedimentação. Pipetar um volume padrão (15 µl é adequado para poços com 6 mm de diâmetro — aumentar o volume à escala para poços maiores) do sedimento ressuspense e de cada uma das diluições numa fila de poços. A fila de poços restante pode ser utilizada como duplicado ou para uma segunda amostra, como indicado na figura 2.
- 2.2. Deixar secar as gotículas. Fixar as células bacterianas na lâmina através de aquecimento, à chama ou com etanol a 95%.
- 2.3. Procedimento para IF:
- i) De acordo com a preparação da lâmina descrita na alínea i) do ponto 2.1:
Preparar um conjunto de diluições do anti-soro em tampão IF (apêndice 3): 1/4 do título (T/4), 1/2 do título (T/2), o título (T) e duas vezes o título (2T).
- ii) De acordo com a preparação da lâmina descrita na alínea ii) do ponto 2.1:
Preparar a diluição de trabalho (DT) do anti-soro em tampão IF. A diluição de trabalho é a diluição do anti-soro com especificidade óptima e é normalmente igual a metade do título.

Figura 1

Preparação da lâmina de acordo com os pontos 2.1, alínea i), e 2.3, alínea i)

Uma diluição padrão do sedimento ressuspense

(T = Título)

	FITC	T/4	T/2	T	2T	⇒ Diluições do anti-soro
Amostra 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplicado da amostra 1 ou amostra 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Figura 2

Preparação da lâmina de acordo com os pontos 2.1, alínea ii), e 2.3, alínea ii)

	FITC	Diluição padrão do anti-soro				⇒ Diluição decimal do sedimento ressuspensão
	Puro	Puro	1/10	1/100	1/1 000	
Amostra 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplicado da amostra 1 ou amostra 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

2.3.1. Disponibilizar as lâminas sobre papel de filtro humedecido.

Cobrir os poços da amostra com a(s) diluição(ões) de anti-soro. Juntar PBS aos poços de FITC. O volume de anti-soro adicionado aos poços deve ser equivalente ao volume de extracto utilizado.

2.3.2. Incubar na obscuridade durante 30 minutos à temperatura ambiente.

2.3.3. Eliminar as gotículas de anti-soro da lâmina e enxaguar as lâminas cuidadosamente com tampão IF. Lavar durante 5 minutos em tampão IF-Tween e subsequentemente durante 5 minutos em tampão IF (apêndice 3).

Retirar cuidadosamente o excesso de humidade.

2.3.4. Disponibilizar as lâminas sobre papel de filtro humedecido.

Cobrir os poços da amostra e o poço FITC com a diluição do conjugado FITC utilizada para determinar o título. O volume de conjugado FITC adicionado aos poços deve ser idêntico ao volume de anti-soro utilizado.

2.3.5. Incubar na obscuridade durante 30 minutos à temperatura ambiente.

2.3.6. Eliminar as gotículas de conjugado FITC. Enxaguar e lavar como anteriormente (ponto 2.3.3).

Retirar cuidadosamente o excesso de humidade.

2.3.7. Pipetar 5-10 μ l de uma solução 0,1 M de tampão fosfato com glicerol (apêndice 3) ou líquido de montagem similar para cada poço e cobrir com uma lamela.

2.4. Leitura do teste IF

Examinar as lâminas do teste num microscópio de epifluorescência, com filtros adequados para excitação do FITC, sob lente de imersão em óleo, a uma ampliação de 500-1 000 \times . Examinar os poços ao longo de dois diâmetros perpendiculares e à volta do perímetro.

Observar primeiro a lâmina do controlo positivo. As células devem apresentar-se com uma fluorescência brilhante e completamente coradas.

Nota: O teste deve ser repetido se a coloração for aberrante.

Ler as lâminas do teste. Observar primeiro a ausência de células fluorescentes nos poços de controlo FITC. Células fluorescentes no controlo de FITC indicam ligação não específica do conjugado, autofluorescência ou contaminação.

Nota: Repetir o teste se tal for observado.

Observar células fluorescentes brilhantes e com a morfologia característica de *Ralstonia* nos poços das lâminas. A intensidade de fluorescência deve ser equivalente à da estirpe do controlo positivo, para a mesma diluição do anti-soro. As células com coloração incompleta ou com fluorescência fraca não devem ser consideradas, a não ser que sejam muito abundantes (ver interpretação dos resultados do teste IF).

Interpretação dos resultados do teste IF

- i) Se não forem detectadas células fluorescentes brilhantes e com a morfologia característica, o teste IF é negativo.
- ii) Se forem detectadas células fluorescentes brilhantes e com a morfologia característica, determinar o número médio de células por cada campo do microscópio e calcular o número de células por ml (N) de sedimento ressuspensão (apêndice 4).

Uma população de aproximadamente 10^3 células por ml de sedimento ressuspensão é considerada como sendo o limite de detecção para o teste IF:

- para as amostras com $N > 10^3$ células por ml, o teste IF é considerado positivo,
- para as amostras com $N < 10^3$ células por ml, o teste IF pode ser considerado positivo.

- iii) Se números mais elevados ($N > 10^5$ células por ml) de células, desigual ou incompletamente coradas ou fracamente fluorescentes forem observadas com o anti-soro no seu título, um segundo teste deve ser realizado:
- ou um teste baseado num princípio biológico distinto,
 - ou uma repetição do teste IF, utilizando um segundo anti-soro ou uma diluição decimal do sedimento.

3. Teste ELISA

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

Utilizar anti-soro para *Ralstonia solanacearum*, de preferência para a Biovar 2/Raça 3. Determinar o título com uma suspensão de 10^6 células por ml de uma estirpe homóloga de *Ralstonia solanacearum*.

Recomenda-se a utilização de microplacas NUNC Polysorp.

Incluir um controlo negativo constituído pelo extracto de batata e um controlo de tampão fosfato salino (PBS).

Utilizar uma suspensão de $> 10^6$ células por ml de uma estirpe de *Ralstonia solanacearum* de Biovar/Raça apropriadas como controlo positivo. Testar de forma idêntica à da(s) amostra(s), mas dela(s) bem separada na microplaca.

- 3.1. Pipetar 100-200 μl do sedimento ressuspensão para um microtubo.
Aquecer durante 4 minutos a uma temperatura de 100°C. Retirar o microtubo e colocá-lo em gelo.
- 3.2. Adicionar um volume igual de tampão carbonato de revestimento 2x (apêndice 5). Agitar em *vortex*.
- 3.3. Colocar alíquotas de 100 μl em pelo menos dois dos poços da microplaca. Incubar durante 1 hora a uma temperatura de 37°C ou de um dia para o outro a uma temperatura de 4°C.
- 3.4. Retirar os extractos dos poços. Lavar os poços três vezes com PBS-Tween (apêndice 5), deixando a última solução de lavagem dentro dos poços durante, pelo menos, 5 minutos.
- 3.5. Preparar uma diluição adequada de anti-soro de *Ralstonia solanacearum* em tampão de bloqueio (apêndice 5).
Adicionar 100 μl da diluição de anti-soro aos poços.
Incubar durante 1 hora a uma temperatura de 37°C.
- 3.6. Retirar o anti-soro dos poços. Lavar os poços como anteriormente (ponto 3.4).
- 3.7. Preparar uma diluição adequada de conjugado de fosfatase alcalina em tampão de bloqueio. Adicionar 100 μl da diluição do conjugado aos poços.
Incubar durante 1 hora a uma temperatura de 37°C.
- 3.8. Retirar o conjugado dos poços. Lavar os poços como anteriormente (pontos 3.4 e 3.6).
- 3.9. Preparar a solução do substrato de fosfatase alcalina (apêndice 5). Adicionar 100 μl aos poços. Incubar entre 30 minutos e 1 hora, na obscuridade, à temperatura ambiente.
- 3.10. Ler a absorvância a 409 nm.

Interpretação do teste ELISA

O teste ELISA é negativo se a densidade óptica (DO) da amostra for $< 2 \times \text{DO}$ do controlo negativo.

O teste ELISA é positivo se a densidade óptica (DO) da amostra for $> 2 \times \text{DO}$ do controlo negativo.

4. Teste PCR

(Baseado em Seal *et al.*, 1993)

Nota: Têm de se utilizar pontas de pipeta com filtro durante todas as etapas de preparação das amostras e durante outras manipulações que envolvam a PCR.

Preparar uma suspensão de 10^6 células por ml de uma estirpe de Biovar 2/Raça 3 de *Ralstonia solanacearum* como controlo positivo. Testar de forma idêntica à da(s) amostra(s).

- 4.1. Pipetar 100 μl do sedimento ressuspensão para um microtubo.

Em alternativa, transferir 90 μl do sedimento ressuspensão para um microtubo contendo 10 μl de hidróxido de sódio 0,5 M. Misturar invertendo repetidamente o microtubo.

- 4.2. Aquecer durante 4 minutos a uma temperatura de 100°C. Retirar de imediato o microtubo e colocá-lo em gelo.
- 4.3. Preparar pelo menos duas diluições decimais, por exemplo, 1/10 e 1/100 ou mais, se consideradas necessárias, em água destilada esterilizada ou ultra pura (UPW).
- 4.4. Preparar a mistura de reacção da PCR (apêndice 6) num tubo esterilizado adicionando os componentes pela ordem que se segue:

Para um volume de reacção de 50 µl

Componente	Quantidade	Concentração final
Água destilada esterilizada ou UPW	30,8 µl-33,8 µl	—
Tampão PCR 10×	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 µM
«Primer» Y-2 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Taq Polimerase (5U/µl)	0,2 µl	1,0 U
Volume total	45 µl-48 µl	

Para mais reacções

Calcular a quantidade de cada componente para o número de reacções necessário.

Misturar os componentes e transferir 45 µl-48 µl da mistura para tubos de PCR esterilizados.

Manter os tubos com a mistura da PCR em gelo.

Para volumes de reacção de 25 µl

Reduzir proporcionalmente a quantidade dos componentes.

- 4.5. Amplificação pela PCR
- 4.5.1. Facultativo: centrifugar de forma intermitente os tubos com a amostra fervida e o controlo positivo. Adicionar, pela ordem especificada, 2-5 µl da(s) amostra(s), controlo de água e controlo positivo aos tubos contendo a mistura de reacção PCR. Colocar os tubos no bloco de aquecimento do termociclador de DNA.
- 4.5.2. Correr o seguinte programa:
- 1 ciclo de:
- i) 2 minutos a uma temperatura de 96°C: desnaturação da amostra original
- 50 ciclos de:
- ii) 20 segundos a uma temperatura de 94°C: desnaturação
- iii) 20 segundos a uma temperatura de 68°C: emparelhamento dos «primers»
- iv) 30 segundos a uma temperatura de 72°C: extensão da cópia
- 1 ciclo de:
- v) 10 minutos a uma temperatura de 72°C: continuação da extensão
- 1 ciclo de:
- vi) manter a uma temperatura de 4°C
- Nota:* Estes são os parâmetros para o aparelho Perkin Elmer 9600. Outros termocicladores poderão necessitar de uma camada de óleo mineral nos tubos de reac o da PCR e/ou modificação da duração das etapas ii), iii) e iv) do programa de amplificação.
- 4.5.3. Retirar os tubos do termociclador. Analisar o produto da PCR. Se não for analisado de imediato, armazenar os tubos a uma temperatura de 4°C para utilização no próprio dia ou a uma temperatura de -18°C durante mais tempo.
- 4.6. Análise do produto da PCR
- Os fragmentos da PCR são detectados através de electroforese em gel de agarose e colora o com brometo de etídio.
- 4.6.1. Preparar um gel de agarose adequado, fervendo a agarose cuidadosamente em tampão tris acetato de electroforese (TAE).

- 4.6.2. Arrefecer a agarose fundida a uma temperatura de 50-60°C. Deitar no molde da unidade de electroforese e inserir o pente. Deixar a solução solidificar.
- 4.6.3. Retirar o pente. Submergir o gel em TAE de forma a que fique ligeiramente coberto (2-3 mm) pelo tampão.
- 4.6.4. Colocar gotículas de 3 μ l de tampão de carregamento em parafilme. Adicionar 12 μ l do produto da PCR de qualquer uma das amostras, do controlo positivo e do controlo de água e misturar através de aspiração ligeira na ponta da pipeta antes de carregar. Os volumes indicados podem ser modificados de acordo com a capacidade dos poços do gel de agarose.
- 4.6.5. Encher cuidadosamente os poços do gel. Como referência, incluir pelo menos num dos poços um marcador de DNA adequado.
- 4.6.6. Ligar os cabos à fonte de alimentação e à tina de electroforese. Submeter o gel a uma carga de 5-8 V/cm até que a frente de corrida esteja a 1 cm da extremidade do gel.
- 4.6.7. Desligar a fonte de alimentação. Desligar os cabos da tina de electroforese. Retirar cuidadosamente o gel. Mergulhá-lo numa solução de brometo de etídio durante 30 a 45 minutos.
- Nota:* Utilizar luvas descartáveis sempre que manusear o brometo de etídio, pois é um potente agente mutagénico!
- 4.6.8. Retirar o corante em excesso em água destilada durante 10-15 minutos.
- 4.6.9. Visualizar o(s) fragmento(s) de DNA num transiluminador com UV. O produto PCR de *Ralstonia solanacearum* com o conjunto de «primers» OLI-1 e Y-2 tem 288 bp de comprimento. Comparar com o marcador de DNA e o controlo positivo.
- Nota:* O controlo da água tem que ser sempre negativo. Se for positivo, repetir o teste.
- 4.6.10. Se for necessário um registo permanente, tirar uma fotografia ao gel.
- 4.6.11. Confirmar a autenticidade do fragmento amplificado através de análise de restrição enzimática (REA — Restriction enzyme analysis).
- 4.7. Análise de restrição enzimática (REA)
- 4.7.1. Transferir 8,5 μ l do produto da PCR (ponto 4.5.3) para um microtubo novo. Adicionar 1 μ l de tampão da enzima 10 \times concentrado e 0,5 μ l da enzima de restrição Avall.
- 4.7.2. Misturar através de ligeira aspiração na ponta da pipeta. Se permanecerem gotículas nas paredes do tubo, centrifugar de forma intermitente na microcentrifugadora. Incubar durante 1 hora a uma temperatura de 37°C.
- 4.7.3. Analisar o fragmento da PCR digerido através de electroforese em gel de agarose, como anteriormente (ponto 4.6).
- Interpretação do resultado do teste PCR*
- O teste PCR é negativo se o fragmento característico de 288 bp não for detectado e se o fragmento for detectado para a estirpe do controlo positivo de *Ralstonia solanacearum*.
- O teste PCR é positivo se o fragmento característico de 288 bp for detectado e se a análise REA do fragmento amplificado for idêntica à da estirpe do controlo positivo de *Ralstonia solanacearum*.
5. **Teste de sementeira em placas com meio selectivo**
- (Baseado em Elphinstone *et al.*, 1996)
- 5.1. Efectuar o teste através de uma técnica de diluição em placas adequada, por exemplo:
- i) Preparar, pelo menos, duas diluições decimais, ou seja 1/10 e 1/100 ou mais, se consideradas necessárias, de sedimento ressuspensão em tampão de sedimentação. Pipetar um volume padrão (50-100 μ l) do sedimento ressuspensão e de cada diluição para meio selectivo SMSA modificado (apêndice 7) e espalhar com uma vareta de vidro sobre toda a superfície do meio.
- Se for considerado útil, fazer uma diluição através de riscado com uma ansada de 10 μ l de sedimento ressuspensão. Passar a ansa pela chama entre cada uma das inoculações;
- ii) Transferir um volume padrão (50-100 μ l) do sedimento ressuspensão para o meio selectivo SMSA modificado e espalhar com uma vareta de vidro sobre toda a superfície do meio. Repetir o procedimento, sem passar a vareta pela chama, em mais duas placas de SMSA modificado.
- 5.2. Inocular, através da mesma técnica de diluição em placas, uma suspensão de 10⁶ células por ml a partir de uma estirpe de *Ralstonia solanacearum* Biovar 2/Raça 3, como controlo positivo, num conjunto de placas de SMSA modificado.
- 5.3. Incubar as placas a uma temperatura de 28°C. Começar a ler as placas após 3 dias de incubação. Se negativo, incubar mais tempo, até 6 dias. As colónias de isolamentos virulentos de *Ralstonia solanacearum* apresentam-se brancas, de aspecto leitoso, achatadas, irregulares e fluidas, com centros vermelhos vivos e apresentando estrias ou espirais internas.
- 5.4. Purificar as colónias com morfologia típica através de subcultura em meio nutritivo geral (apêndice 1).

- 5.5. Identificar as culturas puras (secção II, ponto 4.1) e confirmar as culturas de *Ralstonia solanacearum* através de um teste de patogenicidade (secção II, ponto 4.3).

Interpretação do resultado da sementeira em placas com meio selectivo

O teste de sementeira em placas com meio selectivo é negativo se não for isolada nenhuma colónia ao fim de seis dias ou se não forem isoladas colónias características de *Ralstonia solanacearum*, desde que não se suspeite de inibição por colónias de outras bactérias e que colónias características de *Ralstonia solanacearum* sejam detectadas nos controlos positivos.

O teste de sementeira em placas com meio selectivo é positivo se forem isoladas colónias características de *Ralstonia solanacearum*.

6. **Bio-ensaio**

(Baseado em Janse, 1988)

- 6.1. Para cada amostra, utilizar 10 plântulas (plântulas susceptíveis de tomateiro ou beringela) no estágio de terceira folha verdadeira. Não regar as plântulas nas 24 horas anteriores à inoculação.
- 6.2. Distribuir 100 µl do sedimento ressuspenso entre as plântulas. Inocular o caule, entre os cotilédones e em um ou mais locais.
- 6.3. Inocular, através da mesma técnica, 10 plântulas com uma suspensão de 10⁶ células por ml de uma estirpe de Biovar 2/Raça 3 de *Ralstonia solanacearum*, como controlo positivo, e com tampão de sedimentação, como controlo negativo. Separar as plântulas que constituem o controlo positivo das outras plântulas a fim de evitar contaminações cruzadas.
- 6.4. Deixar crescer as plântulas durante 4 semanas a uma temperatura de 22-28°C e elevada humidade relativa, com rega diária. Observar o desenvolvimento de sintomas de murchidão, epinastia, clorose e/ou nanismo.
- 6.5. Fazer isolamentos a partir das plântulas infectadas (secção II). Identificar culturas puras com morfologia característica (secção II, ponto 4.1) e confirmar as culturas de *Ralstonia solanacearum* através de um teste de patogenicidade (secção II, ponto 4.3).
- 6.6. Se se considerar necessário, verificar a ausência de infecção nos lotes de plântulas ensaiadas que não demonstram sinais de infecção. Retirar de cada plântula uma secção de 1 cm de caule, 2 cm acima do ponto de inoculação. Homogeneizar os tecidos em tampão de maceração. Proceder à diluição em placas (secção III, ponto 5.1). Se o resultado for positivo, identificar culturas puras com morfologia característica (secção II, ponto 4.1) e confirmar as culturas de *Ralstonia solanacearum* através de um teste de patogenicidade (secção II, ponto 4.3).

Interpretação do resultado do bio-ensaio

O bio-ensaio é negativo se as plântulas ensaiadas não estiverem infectadas por *Ralstonia solanacearum* e se *Ralstonia solanacearum* for detectada no controlo positivo.

O bio-ensaio é positivo se as plântulas ensaiadas estiverem infectadas por *Ralstonia solanacearum*.

7. **Teste de enriquecimento**

(Baseado em Elphinstone *et al.*, 1996)

- 7.1. Transferir 100 µl do sedimento ressuspenso para 3 ml de meio líquido SMSA modificado (apêndice 7).
- 7.2. Incubar durante 48 horas, e nunca mais de 72 horas, a uma temperatura de 28°C, com a tampa do tubo apertada frouxamente para permitir o arejamento.
- 7.3. Apertar a tampa e agitar em *vortex*. Separar em alíquotas para o teste IF (ponto 2 da presente secção), o teste ELISA (ponto 3 da presente secção) e/ou o teste PCR (ponto 4 da presente secção).

8. **Testes de patogenicidade**

Ver secção II, ponto 4.3.

Apêndice 1

Meios nutritivos para isolamento e cultura de *Ralstonia solanacearum*

Agar nutritivo (NA)

Agar nutritivo (Difco)	23 g
Água destilada	1 l

Preparar volumes de 0,5 l de meio em frascos de 1 l.

Dissolver os ingredientes.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Arrefecer a 50 °C. Preparar placas.

Agar de levedura-peptona-glucose (YPGA)

Extracto de levedura (Difco)	5 g
Bacto-peptona (Difco)	5 g
D(+)-glucose (monohidrato)	10 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Água destilada	1 l

Preparar volumes de 0,5 l de meio em frascos de 1 l.

Dissolver os ingredientes.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Arrefecer a 50 °C. Preparar placas.

Agar de sacarose e peptona (SPA)

Sacarose	20 g
Peptona	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Água destilada	1 l

Preparar volumes de 0,5 l de meio em frascos de 1 l.

Dissolver os ingredientes. Se necessário, acertar o pH a 7,2-7,4.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Arrefecer a 50 °C. Preparar placas.

Meio de tetrazólio de Kelman

Casaminoácidos (Difco)	1 g
Bacto peptona (Difco)	10 g
Dextrose	5 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Água destilada	1 l

Preparar volumes de 0,5 l de meio em frascos de 1 l.

Dissolver os ingredientes. Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Arrefecer a 50 °C.

Adicionar o volume necessário de solução aquosa de cloreto de trifetil tetrazólio (Sigma), esterilizada por filtração, para obter uma concentração final de 50 mg/l.

Preparar placas.

*Apêndice 2***Materiais para a preparação das amostras**

Tampão de maceração: tampão fosfato 50 mM, pH 7,0

Este tampão é utilizado para maceração dos tecidos.

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Água destilada	1 l

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Preparar as alíquotas que forem consideradas necessárias.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Para a realização do teste PCR directo, recomenda-se a adição de polivinilpirrolidona 40 000 MWT (PVP-40) a 5%, para reduzir a incidência de inibição da amplificação por moléculas aromáticas presentes no extracto.

No caso de se utilizarem os procedimentos de homogeneização com Waring Blender ou com Ultra Turrax para a maceração dos hilos de batata, recomenda-se a adição de um anti-floculante, antiespuma ou antioxidante.

Flocos de Lubrol	0,5 g/l
Antiespuma DC Silicone	1 ml/l
Pirofosfato tetrassódico	1 g/l

Esterilizar separadamente em autoclave. Adicionar de forma a obter a concentração desejada.

Tampão de sedimentação: tampão fosfato 10 mM, pH 7,2

Este tampão é utilizado para a ressuspensão e diluição dos sedimentos dos hilos de batata.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
Água destilada	1 l

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Preparar as alíquotas que forem consideradas necessárias.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

*Apêndice 3***Materiais para o teste IF**

Tampão IF: tampão fosfato salino (PBS) 10 mM, pH 7,2

Este tampão é utilizado para a diluição dos anti-soros.

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

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

NaCl 8,0 g

Água destilada 1 l

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Preparar as alíquotas que forem consideradas necessárias.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Tampão IF-Tween

Este tampão é utilizado para lavar as lâminas. Adicionar 0,1% de Tween 20 ao tampão IF.

Tampão fosfato com glicerol 0,1 M, pH 7,6

Este tampão é utilizado como fluido de montagem nos poços das lâminas de IF, para aumentar a fluorescência.

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

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

Glicerol 50 ml

Água destilada 100 ml

Apêndice 4

Determinação do nível de contaminação no teste IF

Área (S) de cada poço da lâmina de poços múltiplos:

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

em que D = diâmetro do poço.

Área (S) do campo da objectiva:

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

em que d = diâmetro do campo.

Calcular d quer por medição directa quer através das seguintes fórmulas:

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

em que: i = coeficiente de campo (depende do tipo de ocular e varia entre 8 e 24),

K = coeficiente do tubo (1 ou 1,25),

G = ampliação da objectiva (100×, 40×, etc.).

de (2), vem que

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

de (3), vem que

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

Contar o número de células fluorescentes típicas por campo (c).

Calcular o número de células fluorescentes típicas por poço (C):

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

Calcular o número de células fluorescentes típicas por ml de sedimento (N):

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

em que: y = volume de sedimento no poço,

F = factor de diluição do sedimento.

*Apêndice 5***Materiais para o teste ELISA**

Tampão carbonato 2 × para revestimento, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
Água destilada	1 l

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Preparar as alíquotas que forem consideradas necessárias.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Pode ser acrescentado, como antioxidante, sulfito de sódio com uma concentração final de 0,2 %, caso o extracto contenha uma grande fracção de moléculas aromáticas.

Tampão fosfato salino (PBS) 10 ×, pH 7,4

NaCl	80 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	29 g
KCl	2 g
Água destilada	1 l

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Preparar as alíquotas que forem consideradas necessárias.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Tampão fosfato salino — Tween (PBS-T)

PBS 10 ×	100 ml
Solução a 10 % de Tween 20	5 ml
Água destilada	895 ml

Tampão de bloqueio (anticorpo) — deve ser preparado na altura da utilização

PBS 10 ×	10 ml
Polivinilpirrolidona-44 000 MWT (PVP-44)	2 g
Solução a 10 % de Tween 20	0,5 g
Leite em pó	0,5 g
Água destilada	perfazer 100 ml

Solução de substrato de fosfatase alcalina, pH 9,8

Dietanolamina	97 ml
Água destilada	800 ml

Misturar e acertar a pH 9,8 com HCl concentrado.

Completar até 1 l com água destilada.

Juntar 0,2 g de MgCl₂.

Dissolver duas pastilhas de 5 mg cada de substrato fosfatase (Sigma) por cada 15 ml de solução.

Apêndice 6

Materiais para o teste PCR

Sequência dos oligonucleótidos

«Primer» OLI-1 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

«Primer» Y-2 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Os materiais encontram-se referidos em Seal *et al.*, 1993.

Apêndice 7

Materiais para os testes de sementeira em placas com meio selectivo e testes de enriquecimento

Meio selectivo SMSA (Engelbrecht, 1994, modificado por Elphinstone *et al.*, 1996)

Meio basal

Casaminoácidos (Difco)	1 g
Bacto-peptona (Difco)	10 g
Glicerol	5 ml
Água destilada	1 l

Preparar volumes de 0,5 l de meio em frascos de 1 l.

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Se necessário, acertar o pH a 6,5 antes de esterilizar. *Ralstonia solanacearum* não se desenvolve bem a pH > 7,0.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Arrefecer a 50 °C.

Juntar os ingredientes seguintes (todos Sigma) para obter as concentrações finais especificadas:

Violeta cristal	5 mg/l		
Sulfato de polimixina B	100 mg/l	(cerca de 600 000 unidades)	Sigma P-1004
Bacitracina	25 mg/l(*)	(cerca de 1 250 unidades)	Sigma B-0125
Cloranfenicol	5 mg/l		Sigma C-3175
Penicilina-G	0,5 mg/l	(cerca de 825 unidades)	Sigma P-3032

Dissolver os ingredientes em etanol a 70 % de forma a obter as concentrações indicadas para o volume de meio preparado. Alguns desses ingredientes, como por exemplo o sulfato de polimixina B e o cloranfenicol, exigem ligeiro aquecimento e agitação.

Caldo SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996)

Preparar de forma idêntica à do meio selectivo SMSA excluindo a adição de agar ou de sais de tetrazólio.

Distribuir em alíquotas de 3 ml por tubos universais de 30 ml descartáveis.

(*) Se for considerado necessário, o aumento da concentração de bacitracina para 300 ppm pode reduzir a contaminação por bactérias saprófitas, sem reduzir a recuperação de *Ralstonia solanacearum*.

Bibliografia

- 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 pp.
- 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. picketti* 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.

ANEXO III

1. Sempre que, em caso de ocorrência suspeita, surja um resultado positivo no(s) teste(s) de rastreio definido(s), para os materiais vegetais da lista, em conformidade com o método constante do anexo II ou, para todos os casos restantes, com qualquer outro método oficialmente aprovado, e se esteja a aguardar a sua confirmação ou refutação através da conclusão dos testes, deverá ser garantida a retenção e conservação adequada:
 - quando possível, do lote, ou parte do mesmo (em que foi colhida a amostra) com a embalagem e rótulo originais,
 - quando possível, da parte restante das amostras,
 - de qualquer extracto restante e outro material preparado para o(s) teste(s) de rastreio, por exemplo, lâminas de imunofluorescência,
 - e
 - de toda a documentação relevante,até à conclusão do referido método.
2. Sempre que a presença do organismo seja confirmada, deverá ser garantida a retenção e conservação adequada:
 - do material especificado no ponto 1,
 - de uma amostra do material contaminado da planta de tomate ou de beringela inoculada com o extracto do tubérculo ou da planta, se for caso disso, e
 - de uma cultura isolada do referido organismo,durante pelo menos um mês após o procedimento de notificação referido no n.º 2 do artigo 5.º

ANEXO IV

Os elementos da investigação referida no n.º 1, alínea a), subalínea i), do artigo 5.º, deverão incluir consoante o caso:

i) Locais de produção que:

- cultivem ou tenham cultivado batata que tenha uma relação clonal com batata que se verificou estar infestada pelo organismo,
- cultivem ou tenham cultivado tomate da mesma origem que o tomate que se verificou estar infestado pelo organismo,
- cultivem ou tenham cultivado batata ou tomate que tenham sido colocados sob controlo oficial por se suspeitar da ocorrência do organismo,
- cultivem ou tenham cultivado batata que tenha uma relação clonal com batata cultivada em locais de produção que se verificou estarem infestados pelo organismo,
- cultivem batata ou tomate e se encontrem localizados na vizinhança de locais de produção infestados pelo organismo, incluindo os locais de produção que partilhem entre si equipamentos e instalações de produção, directamente ou através de um contratante comum,
- utilizem, para irrigação ou aspersão, águas superficiais provenientes de qualquer fonte de que se suspeite ou esteja confirmada a infestação pelo organismo,
- utilizem, para irrigação ou aspersão, águas superficiais provenientes de uma fonte partilhada com locais de produção de que se suspeite ou esteja confirmada a infestação pelo organismo,
- estejam ou tenham sido inundados por águas superficiais de que se suspeite ou esteja confirmada a infestação pelo organismo.

e,

ii) Águas superficiais utilizadas para irrigação ou aspersão do(s) campo(s) ou local(is) de produção, ou que tenham inundado os mesmos, de que esteja confirmada a infestação pelo organismo.

—

ANEXO V

1. Os elementos para determinação da extensão da provável contaminação, ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea iii), e alínea c), subalínea iii), do artigo 5.º, deverão incluir, consoante o caso:
 - os materiais vegetais da lista cultivados num local de produção que tenha sido declarado contaminado ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º,
 - local(is) de produção com ligações de produção aos materiais vegetais da lista declarados contaminados ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º, incluindo os que partilham equipamentos e instalações de produção, directamente ou através de um contratante comum,
 - os materiais vegetais da lista produzidos no(s) local(is) de produção referido(s) no travessão anterior, ou que tenham estado presentes nesse(s) local(is) durante o período em que os materiais vegetais da lista declarados contaminados ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º se encontravam nos locais de produção referidos no primeiro travessão,
 - armazéns que lidem com os materiais vegetais da lista dos locais de produção acima referidos,
 - quaisquer máquinas, veículos, recipientes, armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo material de embalagem, que possam ter estado em contacto com os materiais vegetais da lista declarados contaminados ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º,
 - quaisquer materiais vegetais da lista que tenham estado armazenados em, ou em contacto com, qualquer das estruturas ou objectos referidos no travessão anterior, antes da lavagem e desinfeção dessas estruturas e objectos,
 - em resultado das investigações e testes referidos no n.º 1, alínea a), subalínea i), do artigo 5.º, no caso da batata, os tubérculos ou plantas que tenham uma relação clonal colateral ou parental e, no caso do tomate, as plantas que tenham a mesma origem que os materiais vegetais da lista declarados contaminados ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º e em relação aos quais, embora os testes se tenham revelado negativos no que diz respeito ao organismo, a contaminação se afigure provável através de uma ligação clonal,
 - local(is) de produção dos materiais vegetais da lista referidos no travessão anterior,
 - local(is) de produção dos materiais vegetais da lista que tenham usado, para irrigação ou aspersão, águas declaradas contaminadas ao abrigo do n.º 1, alínea c), subalínea ii), do artigo 5.º,
 - materiais vegetais da lista produzidos em campos inundados por águas superficiais de que esteja confirmada a infestação pelo organismo.
2. A determinação da possível extensão da contaminação, ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea iv), e alínea c) subalínea iii), do artigo 5.º, deverá contemplar:
 - i) Nos casos ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea iv), do artigo 5.º, os seguintes elementos:
 - proximidade de outros locais de produção que cultivem materiais vegetais da lista,
 - produção ou utilização comuns de lotes de batata de semente,
 - locais de produção que utilizem águas superficiais para irrigação ou aspersão dos materiais vegetais da lista, nos casos em que haja ou tenha havido risco de escorrência de, ou inundações por essas águas a partir de locais de produção declarados contaminados ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º;
 - ii) Nos casos em que as águas superficiais tenham sido declaradas contaminadas ao abrigo do n.º 1, alínea c), subalínea ii), do artigo 5.º:
 - local(is) de produção adjacente(s) de, ou que esteja(m) em perigo de ser inundado(s) por, águas superficiais declaradas contaminadas, em que sejam produzidos materiais vegetais da lista,
 - qualquer bacia de irrigação contida que esteja associada às águas superficiais declaradas contaminadas.

3. O teor da notificação referida no n.º 2, primeiro parágrafo, do artigo 5.º deverá incluir:
 - a data de detecção da ocorrência suspeita, ao abrigo do artigo 4.º, e as datas de colheita de amostras e de confirmação da presença do organismo, ao abrigo do artigo 5.º, quando apropriado,
 - uma descrição dos elementos constantes da declaração de contaminação e da zona demarcada.
 4. O teor da notificação adicional referida no n.º 2, segundo parágrafo, do artigo 5.º deverá incluir:
 - para qualquer remessa ou lote de batata declarado contaminado, os certificados previstos nos artigos 7.º e 8.º da Directiva 77/93/CEE, o número de passaporte ou de registo dos produtores, armazéns colectivos e centros de distribuição, quando apropriado,
 - para qualquer remessa ou lote de plantas de tomateiro declarado contaminado, os certificados previstos nos artigos 7.º ou 8.º da Directiva 77/93/CEE e o número de passaporte, em conformidade com a lista incluída na parte A, secção I, ponto 2.2, do anexo V da Directiva 77/93/CEE,
 - a designação da variedade e categoria no caso de lotes de batata de semente e, sempre que possível, nos outros casos,
 - quaisquer outras informações relacionadas com o surto confirmado que a Comissão venha a solicitar.
-

ANEXO VI

1. Nos termos do n.º 1 do artigo 6.º, aplicar-se-á um dos seguintes processos:
 - incineração, ou
 - utilização para a alimentação de gado após tratamento térmico que garanta a impossibilidade de sobrevivência do organismo, ou
 - enterramento profundo num local em que não existam riscos de escorrência para terras agrícolas ou de contacto com fontes de água que possam ser utilizadas para a irrigação de terras agrícolas, ou
 - transformação industrial através de entrega directa e imediata a uma instalação de transformação que disponha de equipamentos de eliminação de resíduos oficialmente aprovados que estejam em conformidade com o disposto no anexo VII da presente directiva, ou
 - outras medidas, desde que tenha sido comprovado que não existe qualquer risco reconhecido de propagação do organismo; essas medidas serão imediatamente notificadas à Comissão e aos restantes Estados-membros.

2. A utilização ou eliminação adequada dos materiais vegetais da lista a que se refere o n.º 2 do artigo 6.º, sob controlo dos organismos oficiais responsáveis do(s) Estado(s)-membro(s) em causa, com a devida comunicação entre organismos oficiais responsáveis para garantir esse controlo a todo o momento e a aprovação pelo organismo oficial responsável do Estado-membro em que a batata irá ser embalada ou transformada no que diz respeito aos equipamentos de eliminação de resíduos a que se referem os primeiro e segundo travessões, será:
 - i) Para os tubérculos de batata:
 - utilização como batata destinada ao consumo, embalada em locais que disponham de equipamentos de eliminação de resíduos adequados, pronta e destinada a entrega e utilização imediatas, sem mudança de embalagem, ou
 - utilização como batata destinada a transformação industrial e a entrega directa e imediata a uma instalação industrial que disponha de equipamentos de eliminação de resíduos adequados, ou
 - qualquer outra utilização ou forma de eliminação, desde que seja comprovado que não existe qualquer risco reconhecido de propagação do organismo e sob reserva de aprovação pelos referidos organismos oficiais responsáveis. Essas medidas deverão ser imediatamente notificadas à Comissão e aos restantes Estados-membros;
 - ii) Para outras partes das plantas, incluindo fragmentos de caules e folhas,
 - destruição, ou
 - qualquer outra utilização ou forma de eliminação, desde que seja comprovado que não existe qualquer risco reconhecido de propagação do organismo; essas medidas deverão ser notificadas à Comissão e aos restantes Estados-membros.

3. Os métodos adequados para a descontaminação dos objectos referidos no n.º 3 do artigo 6.º serão a lavagem e, quando necessário, desinfecção, de forma a garantir que não existe qualquer risco reconhecido de propagação do organismo. A sua aplicação terá lugar sob supervisão dos organismos oficiais responsáveis dos Estados-membros.

4. A série de medidas a aplicar pelos Estados-membros na(s) zona(s) demarcada(s) ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea iv), e alínea c), subalínea iii), do artigo 5.º, a que se refere o n.º 4 do artigo 6.º deverá incluir:
 - 4.1. Nos casos em que em que os locais de produção tenham sido declarados contaminados ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º:
 - a) Nos campos ou unidades de produção de culturas protegidas declarados contaminados ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º, será aplicada uma das seguintes opções:

- i) Durante pelo menos os quatro períodos de cultura subsequentes à declaração de contaminação:
- serão tomadas medidas para eliminar as plantas espontâneas de batateira ou tomateiro, bem como outras plantas hospedeiras do organismo, incluindo solanáceas infestantes, e
 - não poderão ser plantados:
 - tubérculos nem plantas de batateira,
 - sementes nem plantas de tomateiro,
 - tendo em conta a biologia do organismo:
 - outras plantas hospedeiras
 - plantas de espécies do género *Brassica* para as quais exista um risco reconhecido de sobrevivência do organismo,
 - culturas para as quais exista um risco reconhecido de propagação do organismo,
 - na primeira época de colheita de batata ou tomate subsequente ao período especificado no travessão anterior, e sob condição de o campo ter sido considerado livre de plantas espontâneas de batateira ou de tomateiro e de outras plantas hospedeiras do organismo, incluindo solanáceas infestantes, durante pelo menos os dois períodos de cultura consecutivos anteriores à plantação:
 - no caso da batata, só serão plantadas, para culturas destinadas ao consumo, batatas de semente oficialmente certificadas e,
 - será realizada uma prospeção oficial, incluindo análises, nos termos do n.º 1 do artigo 2.º,
 - na época de colheita de batata ou tomate subsequente à referida no travessão anterior e no seguimento de um ciclo de rotação adequado, no caso da batata, será plantada batata de semente oficialmente certificada para produção de semente ou de batata para consumo e, no caso da batata e do tomate, será realizada uma prospeção oficial, nos termos do n.º 1 do artigo 2.º,
- ou,
- ii) Durante os cinco anos de cultura subsequentes à declaração de contaminação:
- serão tomadas medidas para eliminar as plantas espontâneas de batateira ou tomateiro, bem como outras plantas hospedeiras do organismo, incluindo solanáceas infestantes, e
 - o campo será tratado e mantido, durante os primeiros três anos, em pousio completo ou plantado com cereais de acordo com o risco reconhecido, ou como pastagem permanente, com frequentes cortes ou com pastorícia intensiva, ou plantado com gramíneas destinadas à produção de semente, a que se seguirão dois anos em que serão plantadas plantas que não sejam hospedeiras do organismo e para as quais não exista um risco reconhecido de sobrevivência ou propagação do organismo,
 - na primeira época de colheita de batata ou de tomate subsequente ao período especificado no travessão anterior:
 - no caso da batata, só serão plantadas, para obtenção de semente ou de batata para consumo, batatas de semente oficialmente certificadas,
 - e será realizada uma prospeção oficial, incluindo análises, nos termos do n.º 1 do artigo 2.º;
- b) Noutros campos:
- no ano de cultura subsequente à declaração de contaminação:
 - não serão plantados tubérculos nem plantas de batateira nem outras plantas hospedeiras do organismo, sendo tomadas medidas para eliminar as plantas espontâneas de batateira ou tomateiro e outras plantas hospedeiras do organismo, incluindo solanáceas infestantes, quando apropriado, ou
 - no caso dos tubérculos de batata, só poderão ser plantadas batatas de semente oficialmente certificadas, para produção de batata destinada ao consumo, sob condição de que os organismos oficiais responsáveis considerem que foram eliminados de forma satisfatória os riscos decorrentes de plantas espontâneas de batateira ou tomateiro e outras plantas

hospedeiras do organismo, incluindo solanáceas infestantes. A cultura será inspecionada ao longo do desenvolvimento, em momentos apropriados, e as plantas espontâneas de batateira serão testadas no que respeita à presença do organismo; além disso, no caso da batata, os tubérculos colhidos serão inspecionados,

- no primeiro ano de cultura subsequente ao referido no travessão anterior:
 - no caso da batata, só serão plantadas, para obtenção de semente ou de batata para consumo, batatas de semente oficialmente certificadas.
 - pelo menos no segundo ano de cultura subsequente ao referido no primeiro travessão:
 - no caso da batata, só serão plantadas, para obtenção de semente ou de batata para consumo, batatas de semente oficialmente certificadas ou produzidas, sob controlo oficial, a partir de batatas de semente oficialmente certificadas,
 - em cada um dos anos de cultura referidos nos travessões anteriores, serão tomadas medidas para eliminar as plantas espontâneas de batateira ou tomateiro e outras plantas hospedeiras do organismo, incluindo solanáceas infestantes, e será realizada uma prospeção oficial, nos termos do n.º 1 do artigo 2.º; nos casos em que seja plantada batata para produção de semente, os tubérculos serão sujeitos a testes;
- c) Imediatamente após a declaração de contaminação ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º, e em cada um dos anos de cultura subsequentes até à primeira campanha, inclusive, em que a colheita de batata ou de tomate seja autorizada no(s) campo(s) declarado(s) contaminado(s), nos termos da alínea a):
- todas as máquinas e instalações de armazenamento do local e produção que estejam envolvidas na produção de batata ou tomate devem ser limpas e, quando necessário, desinfectadas através de métodos apropriados conforme especificado no ponto 3,
 - serão estabelecidos controlos oficiais dos programas de irrigação e aspersão, que poderão conduzir à sua proibição, quando necessário, para evitar a propagação do organismo;
- d) Numa unidade de produção de culturas protegidas declarada contaminada ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea ii), do artigo 5.º, nos casos em que seja possível a total substituição do meio de cultura:
- não serão plantados tubérculos nem plantas de batateira, nem nenhuma planta hospedeira do organismo, incluindo plantas e sementes de tomateiro, a não ser quando a unidade tiver sido sujeita, sob supervisão oficial, a medidas destinadas a eliminar o organismo e a remover todo o material vegetal hospedeiro, incluindo, no mínimo, a renovação completa do meio de cultura e a limpeza e, quando necessário, desinfeção da unidade e de todo o equipamento, e quando os organismos oficiais responsáveis tiverem concedido a sua aprovação para fins de produção de batata ou de tomate, e
 - para a produção de batata, apenas serão utilizadas batatas de semente oficialmente certificadas ou mini-tubérculos ou micro-plantas provenientes de origens testadas,
 - serão estabelecidos controlos oficiais dos programas de irrigação e aspersão, que poderão conduzir à sua proibição, quando necessário, para evitar a propagação do organismo.
- 4.2. Dentro da zona demarcada, sem prejuízo das medidas definidas no ponto 4.1, os Estados-membros deverão:
- a) Imediatamente, e pelo menos durante os três anos de cultura subsequentes à declaração de contaminação:
- aa) Nos casos em que a zona tenha sido demarcada ao abrigo do n.º 1, alínea a), subalínea IV, do artigo 5.º,
- garantir, através dos seus organismos oficiais responsáveis, o controlo das instalações que cultivem, armazenem ou lidem com tubérculos de batata ou com tomate, e também das instalações que operem máquinas destinadas à produção de batata ou tomate sob contrato,
 - exigir a limpeza e, caso necessário, desinfeção das máquinas e locais de armazenamento que se encontrem nessas instalações, utilizando métodos adequados conforme especificado no ponto 3,

- exigir, para todas as culturas de batata da zona, que só sejam plantadas batatas de semente certificadas ou sementes cultivadas sob controlo oficial, e que sejam analisadas após colheita as culturas de batata de semente efectuadas em locais de produção declarados como provavelmente contaminados nos termos do n.º 1, alínea a), subalínea iii), do artigo 5.º,
 - exigir que, em todas as instalações da zona, a batata de semente colhida seja mantida separada da batata destinada ao consumo,
 - realizar uma prospecção oficial, nos termos do n.º 1 do artigo 2.º;
- ab) Nos casos em que as águas superficiais tenham sido declaradas contaminadas ao abrigo do n.º 1, alínea c), subalínea ii), do artigo 5.º ou incluídas entre os elementos que eventualmente possam contribuir para a propagação do organismo, nos termos do ponto 2 do anexo V,
- realizar, nas alturas apropriadas, uma prospecção anual, incluindo uma amostragem das águas superficiais e de solanáceas hospedeiras que se encontrem junto das fontes de água em causa, devendo as amostras ser analisadas em conformidade com:
 - para os materiais vegetais da lista, o método adequado constante do anexo II,
 - nos outros casos, qualquer outro método oficialmente aprovado,
 - estabelecer controlos oficiais dos programas de irrigação e aspersão, incluindo a proibição de utilização das águas declaradas contaminadas para irrigação ou aspersão dos materiais vegetais da lista e, quando necessário, de outras plantas hospedeiras, para evitar a propagação do organismo. Essa proibição poderá ser objecto de uma revisão com base nos resultados da citada prospecção anual,
 - nos casos em que haja contaminação dos resíduos líquidos de descarga, estabelecer controlos oficiais da eliminação desses resíduos provenientes de instalações de transformação industrial ou de embalagem que lidem com materiais vegetais da lista;
- b) Estabelecer, quando necessário, um programa de substituição de todas as existências de batata de semente ao longo de um período de tempo adequado.
-

ANEXO VII

Os equipamentos de eliminação de resíduos oficialmente aprovados a que se refere o ponto 1, quarto travessão, do anexo VI, deverão obedecer às seguintes disposições, por forma a obviar aos riscos de propagação do organismo:

- i) Os resíduos de transformação de batata e tomate (incluindo batatas, cascas e tomates rejeitados) e qualquer outro resíduo sólido associado à batata e ao tomate serão eliminados por:
 - enterramento profundo num local em que não existam riscos de escorrência para terras agrícolas ou de contacto com fontes de água que possam ser utilizadas para a irrigação de terras agrícolas. Os resíduos serão directamente transportados para os locais, em condições que evitem qualquer perda, ou
 - incineração;
- ii) Resíduos líquidos de transformação: antes de serem eliminados, os resíduos líquidos que contenham sólidos em suspensão serão sujeitos a processos de filtração ou decantação para remoção dos mesmos. Os sólidos removidos serão eliminados em conformidade com a subalínea i).

Os resíduos líquidos serão depois:

- aquecidos a, no mínimo, 70°C durante pelo menos 30 minutos, antes de serem eliminados, ou
 - eliminados de outro modo, sujeito a aprovação e controlo oficial, de forma a que não exista qualquer risco de que os resíduos venham a entrar em contacto com terras agrícolas ou com fontes de água que possam ser utilizadas para a irrigação de terras agrícolas. Os pormenores relativos a esse método serão notificados aos restantes Estados-membros e à Comissão.
-