

## I

(Rättsakter vilkas publicering är obligatorisk)

## RÅDETS DIREKTIV 98/57/EG

av den 20 juli 1998

om bekämpning av *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi m.fl.

EUROPEISKA UNIONENS RÅD HAR ANTAGIT DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen, särskilt artikel 43 i detta,

med beaktande av kommissionens förslag<sup>(1)</sup>,

med beaktande av Europaparlamentets yttrande<sup>(2)</sup>,

med beaktande av Ekonomiska och sociala kommitténs yttrande<sup>(3)</sup>, och

av följande skäl:

Skadegöraren *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi m.fl. var tidigare känd som *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith. *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi m.fl. kommer förmodligen att bli det allmänt godtagna namnet på skadegöraren. I detta direktiv bör hänsyn tas till denna vetenskapliga utveckling.

Produktionen av potatis och tomater intar en viktig plats inom gemenskapens jordbruk. Potatis- och tomatkörden hotas ständigt av skadegörare.

Om odlingen av potatis och tomater skyddas mot sådana skadegörare skulle produktionskapaciteten upprätthållas och dessutom skulle jordbruksproduktionen öka.

Skyddsåtgärder mot införsel av skadegörare till en medlemsstats territorium skulle endast ha begränsad effekt om inte sådana skadegörare samtidigt och metodiskt bekämpades inom hela gemenskapen och hindrades från att sprida sig.

En av skadegörarna på potatis och tomat är *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi m.fl., den sjukdomsalstrande organism som orsakar mörk ringröta hos potatis och bakterierologisk vissnesjuka hos potatis och tomat. Sjukdomar som orsakats av denna sjukdomsalstrande organism har brutit ut i några delar av gemenskapen, och det existerar fortfarande några begränsade smittkällor.

Det föreligger en avsevärd risk för odlingen av potatis och tomater i hela gemenskapen om effektiva åtgärder inte vidtas med avseende på dessa grödor för att lokalisera denna skadegörare och avgöra dess utbredning, för att förhindra dess förekomst och spridning samt, om den påträffas, för att förhindra dess spridning och bekämpa den i syfte att utrota den.

För att säkerställa detta måste vissa åtgärder vidtas inom gemenskapen. Medlemsstaterna måste dessutom kunna vidta ytterligare eller strängare åtgärder, där detta är nödvändigt förutsatt att dessa inte hindrar handeln med potatis eller tomater inom gemenskapen än de som anges i rådets direktiv 77/93/EEG av den 21 december 1976 om skyddsåtgärder mot att skadegörare på växter eller växtprodukter förs in till medlemsstaterna<sup>(4)</sup>. Sådana åtgärder måste anmälas till de andra medlemsstaterna och till kommissionen.

Åtgärderna måste beakta att systematiska officiella undersökningar är nödvändiga för att lokalisera den sjukdomsalstrande organismen. Sådana undersökningar bör omfatta besiktningar och där så är lämpligt stickprovskontroller och test, eftersom sjukdomen under vissa miljömässiga omständigheter kan förbli latent och obemärkt både i potatisens förökningsmaterial och i lagrade potatisknölar. Spridningen av den sjukdomsalstrande organismen inom förökningsmaterialet är inte den viktigaste faktorn, men eftersom den sjukdomsalstrande organismen kan spridas med ytvatten och genom vissa besläktade vilda växter av familjen Solanaceae, utgör bevattning av potatis- och tomatgrödor med angripen vatten en

<sup>(1)</sup> EGT C 124, 21.4.1997, s. 12–24 och EGT C 108, 7.4.1998, s. 85.

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

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

<sup>(4)</sup> EGT L 26, 31.1.1977, s. 20. Direktivet senast ändrat genom kommissionens direktiv 98/02/EG (EGT L 15, 21.1.1998, s. 34).

smittorisk för sådana grödor. Den sjukdomsalstrande organismen kan också övervintra i självsådda (övervinttrade) potatis- och tomatplantor, och dessa kan utgöra en smittkälla då de för över smittan från en odlingssäsong till nästa. Den sjukdomsalstrande organismen sprids också genom att potatisplantor angrips vid kontakt med smittad potatis och vid kontakt med utrustning för sättnings-, upptagning och hantering eller med transport- och lagringsbehållare som har angripits av skadegöraren vid tidigare kontakt med smittad potatis.

Spridningen av den sjukdomsalstrande organismen kan minskas eller förhindras genom desinfektion av sådana föremål. Varje angrepp på utsädespotatis innebär en stor risk för att den sjukdomsalstrande organismen sprids. Utsädespotatisens latent smitta utgör på liknande sätt en stor risk för att den sjukdomsalstrande organismen sprids, och detta kan förhindras genom användning av utsädespotatis som har producerats i ett officiellt godkänt program, där utsädespotatis har testats och konstaterats vara fri från smitta.

Den nuvarande kunskapen om de biologiska och epidemiologiska egenskaperna hos *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi m.fl. under europeiska förhållanden är ofullständig, och det förutses att en översyn av de föreslagna åtgärderna kommer att bli nödvändig om ett antal säsonger. Förbättringar av testprocedurerna förväntas också mot bakgrund av ytterligare forskning, särskilt kring testmetodernas sensibilitet och noggrannhet, för att optimala testmetoder skall kunna väljas ut och standardiseras.

För att närmare kunna besluta om dessa allmänna åtgärder, liksom om de strängare eller ytterligare åtgärder som medlemsstaterna vidtar för att förhindra att den sjukdomsalstrande organismen förs in till deras territorium, är det önskvärt att medlemsstaterna samarbetar nära med kommissionen inom Ständiga kommittén för växtskydd (nedan kallad kommittén).

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

#### Artikel 1

Detta direktiv rör de åtgärder som i medlemsstaterna skall vidtas mot *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi m.fl., tidigare känd som *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith (nedan kallad skadegöraren) för att, såvitt avser skadegörarens värdväxter, vilka förtecknas i del 1 i bilaga I, (nedan kallade det förtecknade växtmaterialet),

- a) lokalisera skadegöraren och kartlägga dess utbredning,
- b) förhindra dess förekomst och spridning, och

- c) om det konstateras förekomst av den, förhindra dess spridning och bekämpa den i syfte att utrota den.

#### Artikel 2

1. Medlemsstaterna skall varje år genomföra systematiska officiella undersökningar för att kontrollera förekomst av skadegöraren på det förtecknade växtmaterialet med ursprung i deras territorium. För att identifiera andra möjliga smittkällor som hotar produktionen av det förtecknade växtmaterialet skall medlemsstaterna göra en riskbedömning och, om ingen risk för spridning av skadegöraren har konstaterats under den bedömningen skall de, i produktionsområdena för det förtecknade växtmaterialet, genomföra riktade officiella undersökningar för att kontrollera förekomst av skadegöraren på andra växter än det förtecknade växtmaterialet, även på vilda värdväxter av familjen Solanaceae samt på ytvatten som används för bevattning eller duschning av det förtecknade växtmaterialet och på flytande avfall som släpps ut från anläggningar för industriell bearbetning eller förpackning där det förtecknade växtmaterialet hanteras och som används för bevattning och duschning av det förtecknade växtmaterialet. Omfattningen av dessa riktade undersökningar skall bestämmas med beaktande av den konstaterade risken. Medlemsstaterna kan också utföra officiella undersökningar för att kontrollera förekomst av skadegöraren på annat material, t.ex. odlingssubstrat, jord och fast avfall från anläggningar för industriell bearbetning eller förpackning.

2. De officiella undersökningar som anges i punkt 1 skall genomföras

- a) på det förtecknade växtmaterialet i enlighet med de uppgifter som anges i punkt 1 i avsnitt II i bilaga I,
- b) på värdväxter som inte återfinns i det förtecknade växtmaterialet och på vatten, inklusive flytande avfall, i enlighet med lämpliga metoder, och stickprov skall, när så är lämpligt, tas och genomgå officiella eller officiellt övervakade laboratorietest, och
- c) när så är lämpligt på annat material i enlighet med lämpliga metoder.

Ytterligare uppgifter om besiktningarna och om stickprovernas antal, ursprung och inledning samt om tidpunkten för deras insamling skall för dessa undersökningar beslutas av de ansvariga officiella organen enligt direktiv 77/93/EEG, på grundval av sunda vetenskapliga och statistiska principer och skadegörarens biologiska egenskaper samt med beaktande av de berörda medlemsstaternas särskilda produktionssystem för det förtecknade växtmaterialet och, i förekommande fall, för skadegörarens andra värdväxter.

3. Resultaten av och detaljerna i fråga om de officiella undersökningar som fastställs i punkt 1 skall varje år

anmälas till de andra medlemsstaterna och till kommissionen i enlighet med bestämmelserna i punkt 2 i avsnitt II i bilaga I. Dessa anmälningar skall göras senast den 1 juni, med undantag av anmälningar om utsädespotatis som skall ges in före den 1 september. Detaljerna och resultaten ifråga om grödor skall avse föregående års produktion. Innehållet i dessa anmälningar kan överlämnas till kommittén.

4. Följande bestämmelse skall antas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG:

— De lämpliga metoderna för de undersökningar och laboratorietest som avses i punkt 2 första stycket under b.

5. Följande bestämmelser får antas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG:

— De lämpliga metoderna för de undersökningar som avses i punkt 2 första stycket under c.

— Närmare uppgifter om de undersökningar som avses i punkt 2 andra stycket, för att säkerställa jämförbara nivåer på medlemsstaternas garantier.

#### Artikel 3

Medlemsstaterna skall säkerställa att misstänkt förekomst eller bekräftad närvaro av skadegöraren på deras territorium rapporteras till deras egna ansvariga officiella organ.

#### Artikel 4

1. Vid varje fall av misstänkt förekomst av skadegöraren skall de ansvariga officiella organen i den berörda medlemsstaten eller de berörda medlemsstaterna säkerställa att officiella eller officiellt övervakade laboratorietest genomförs på det förtecknade växtmaterialet enligt den lämpliga metod som anges i bilaga II och enligt de villkor som anges i punkt 1 i bilaga III, eller, i andra fall, någon annan officiellt godkänt metod, för att bekräfta eller vederlägga den misstänkta förekomsten. Om misstanken bekräftas skall de krav som fastställs i punkt 2 i bilaga III gälla.

2. I avvaktan på bekräftelse eller vederläggande av misstänkt förekomst enligt punkt 1, i varje enskilt fall av misstänkt förekomst där antingen

- i) de sjukdomssymptom som orsakas av skadegöraren har diagnostiserats och ett eller flera snabbscreeningstest har genomförts med positivt resultat på sätt som anges i avsnitt I punkt 1 och avsnitt II i bilaga II, eller
- ii) ett eller flera screeningstest har genomförts med positivt resultat på sätt som anges i avsnitt I punkt 2 och avsnitt III i bilaga II,

skall de ansvariga officiella organen i medlemsstaterna med hänsyn till sin egen produktion

- a) förbjuda flyttning av plantor och knölar från alla grödor, partier eller sändningar från vilka stickproven har tagits, förutom då det sker under deras övervakning och förutsatt att det har konstaterats att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas,
- b) vidta åtgärder för att spåra den misstänkta förekomstens ursprung,
- c) införa lämpliga ytterligare försiktighetsåtgärder på grundval av hur stor risken bedöms vara, särskilt i förhållande till produktionen av det förtecknade växtmaterialet och flyttning av andra partier av utsädespotatis än sådana som avses under a, som har producerats på den odlingsplats där de stickprov, som avses under a, har tagits, för att hindra att skadegöraren på något sätt sprids.

3. I fall av misstänkt förekomst av skadegöraren skall, om det finns risk för angrepp på det förtecknade växtmaterialet eller ytvattnet från eller till en annan medlemsstat, den medlemsstat där misstanken har rapporterats omedelbart till den eller de andra berörda medlemsstaterna, beroende på den konstaterade risken, anmäla den nämnda misstänkta förekomsten, och de nämnda medlemsstaterna skall då samarbeta på lämpligt sätt. Den eller de medlemsstater som fått anmälan skall vidta försiktighetsåtgärder enligt punkt 2 c och i förekommande fall vidta ytterligare åtgärder enligt punkterna 1 och 2.

4. Följande bestämmelse får antas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG:

— De åtgärder som anges i punkt 2 c.

#### Artikel 5

1. Om ett officiellt eller officiellt övervakat laboratorietest som, med avseende på det förtecknade växtmaterialet, använder den lämpliga metod som anges i bilaga II, eller i andra fall, någon annan officiellt godkänd metod, bekräftar skadegörarens förekomst i ett stickprov som tagits på grund av detta direktiv, skall de ansvariga officiella organen i en medlemsstat, med beaktande av sunda vetenskapliga principer, skadegörarens biologiska egenskaper och de särskilda systemen för produktion, marknadsföring och bearbetning av skadegörarens värdväxt i den medlemsstaten,

- a) i fråga om det förtecknade växtmaterialet vidta följande åtgärder:
  - i) Genomföra en utredning för att, i enlighet med bestämmelserna i bilaga IV, fastställa angreppets omfattning och dess primärkälla eller -källor, med ytterligare test i enlighet med artikel 4.1 på åtminstone alla lager av utsädespotatis ur kloner som är närbesläktade.

- ii) Förklara följande angripet: Det förtecknade växtmaterialet, sändningen och/eller partiet som stickprovet togs från, maskinerna, fordonet, fartyget, lagret, eller delar av dessa, och alla andra föremål, inklusive förpackningsmaterialet som har varit i kontakt med det förtecknade växtmaterial från vilket stickprovet togs. I förekommande fall även förklara följande som angripet: Det eller de fält, den eller de enheter för skyddad växtproduktion och den eller de produktionsplatser där det förtecknade växtmaterialet har skördats och från vilka stickprovet tagits. I fråga om de stickprov som tagits under växtsäsongen förklara följande för angripet: Det eller de fält, den eller de produktionsplatser, och i förekommande fall den eller de enheter för skyddad växtproduktion som stickprovet togs ifrån.
- iii) I enlighet med bestämmelserna i punkt 1 i bilaga V fastställa omfattningen av troliga angrepp genom kontakt före eller efter skörd, genom produktionsmässig anknytning, bevattning eller duschning eller genom klonsläktskap med det angivna angreppet.
- iv) Avgränsa ett område på grundval av förklaringen om angreppet enligt punkt ii, fastställa omfattningen av det troliga angreppet enligt punkt iii och skadegörarens möjliga spridning, i enlighet med bestämmelserna i punkt 2 i i bilaga V.
- b) I fråga om grödor från värdväxter som inte nämns under a, då det har konstaterats att det finns en risk vid produktionen av det förtecknade växtmaterialet vidta följande åtgärder:
- i) Genomföra en utredning i enlighet med punkt a i.
- ii) Förklara de av skadegörarens värdväxter som provet har tagits från för angripna.
- iii) Fastställa det troliga angreppet och avgränsa ett område i enlighet med punkterna a iii respektive a iv i förhållande till produktionen av det förtecknade växtmaterialet.
- c) I fråga om ytvatten (även flytande avfall från anläggningar för industriell bearbetning eller förpackning där det förtecknade växtmaterialet hanteras) och besläktade vilda värdväxter av familjen Solanaceae, då det har konstaterats att produktionen av det förtecknade växtmaterialet utgör en risk genom bevattning, duschning eller översämning med ytvatten vidta följande åtgärder:
- i) Genomföra en utredning som omfattar en officiell undersökning vid lämpliga tidpunkter på prov av ytvatten och, om sådana finns, på vilda värdväxter av familjen Solanaceae för att fastställa angreppets omfattning.
- ii) Förklara det ytvatten som provet eller proven har tagits från för angripet i den utsträckning som det är lämpligt och på grundval av undersökningen enligt punkt i.
- iii) Fastställa det troliga angreppet och avgränsa ett område på grundval av förklaringen om angreppet enligt punkt ii och skadegörarens möjliga spridning med beaktande av bestämmelserna i punkt 1 och 2 ii i bilaga V.
2. Medlemsstaterna skall, i enlighet med bestämmelserna i punkt 3 i bilaga V, omedelbart till de andra medlemsstaterna och till kommissionen anmäla varje angrepp som fastställs enligt punkterna 1 a ii och 1 c ii och uppgifterna om avgränsning av områden enligt punkt 1 a iv och, där så är tillämpligt, enligt punkt 1 c iii. Innehållet i denna anmälan enligt detta stycke får överlämnas till kommittén.
- Medlemsstaterna skall samtidigt till kommissionen överlämna en tilläggsanmälan enligt 3 a i bilaga V. Innehållet i denna anmälan enligt detta stycke skall omedelbart överlämnas till kommitténs ledamöter.
3. Till följd av den anmälan som avses i punkt 2 och dess beståndsdelar, skall de andra medlemsstater som anges i anmälan genomföra en utredning i enlighet med punkt 1 a i och, där så är tillämpligt, punkt 1 c i och om så är lämpligt vidta ytterligare åtgärder i enlighet med punkterna 1 och 2.

#### Artikel 6

1. Medlemsstaterna skall föreskriva att det förtecknade växtmaterial som förklarats för angripet enligt artikel 5.1 a ii inte får planteras och att det, under övervakning av och med godkännande av deras ansvariga officiella organ, skall underkastas någon av bestämmelserna i punkt 1 i bilaga VI, så att det kan fastställas att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren sprids.

2. Medlemsstaterna skall föreskriva att det förtecknade växtmaterial som förklarats troligen angripet enligt artikel 5.1 a iii och 5.1 c iii inbegripet det förtecknade växtmaterial för vilket en risk har konstaterats föreligga, och som producerats på produktionsplatser som förklarats troligen angripna enligt artikel 5.1 a iii inte får planteras och att det, under övervakning av deras ansvariga officiella organ, skall användas på lämpligt sätt eller bortförskaffas enligt punkt 2 i bilaga VI, så att det kan fastställas att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren sprids.

3. Medlemsstaterna skall föreskriva att alla maskiner, fordon, fartyg, lager, eller delar av dessa, och alla andra föremål, inklusive förpackningsmaterial, som har förklarats angripna enligt artikel 5.1 a ii eller förklarats troligen

angripna enligt artikel 5.1 a iii och 5.1 c iii, antingen skall förstöras eller saneras med lämpliga metoder som fastställs i punkt 3 i bilaga VI. Efter saneringen skall inga sådana föremål längre betraktas som angripna.

4. Utan att det påverkar tillämpningen av de åtgärder som genomförs enligt punkterna 1–3 skall medlemsstaterna föreskriva att ett antal åtgärder skall genomföras enligt punkterna 4.1 och 4.2 i bilaga VI inom det område som avgränsas enligt artikel 5.1 a iv och 5.1 c iii. Uppgifter om dessa åtgärder skall varje år anmälas till de andra medlemsstaterna och till kommissionen. Innehållet i denna anmälan för överlämnas till kommittén.

#### Artikel 7

1. Medlemsstaterna skall föreskriva att utsädespotatis skall uppfylla kraven i direktiv 77/93/EEG och att de i direkt led skall härstamma ur potatismaterial som erhållits enligt ett officiellt godkänt program och som har konstaterats vara fritt från skadegöraren vid officiella eller officiellt övervakade tester då den lämpliga metod, som anges i bilaga II, har använts.

De ovannämnda testerna skall utföras av en medlemsstat

- a) i de fall då bekräftade fynd av skadegöraren har gjorts i dess egen produktion av utsädespotatis
- i) genom tester av tidigare generationer inklusive det ursprungliga klonurvalet och systematiska tester av det ursprungliga klonurvalet av utsädespotatisen, eller
  - ii) genom tester av allt ursprungligt klonurval av utsädespotatis eller tidigare generationer inklusive det ursprungliga klonurvalet i de fall då inget släktskap genom klon har påvisats och
- b) i andra fall, antingen av varje planta i det ursprungliga klonurvalet eller av representativa stickprov av basutsädespotatis eller tidigare generationer.

2. Följande bestämmelser får antas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG:

- Tillämpningsföreskrifterna i punkt 1, andra stycket, punkt a.
- De bestämmelser om representativa stickprov som föreskrivs i punkt 1, andra stycket, punkt b.

#### Artikel 8

Medlemsstaterna skall förbjuda innehav och hantering av skadegöraren.

#### Artikel 9

Utan att det påverkar tillämpningen av bestämmelserna i direktiv 77/93/EEG får bestämmelserna bevilja undantag från de åtgärder som avses i artiklarna 6 och 8 i det här direktivet i enlighet med bestämmelserna i direktiv 95/44/EG i experimentellt eller vetenskapligt syfte och för växtförädling<sup>(1)</sup>.

#### Artikel 10

Medlemsstaterna får med avseende på sin egen produktion besluta om de ytterligare eller strängare åtgärder som kan krävas för att bekämpa skadegöraren eller för att hindra att den sprids, i den mån dessa är förenliga med bestämmelserna i direktiv 77/93/EEG.

Närmare upplysningar rörande dessa åtgärder skall meddelas de andra medlemsstaterna och till kommissionen. Närmare upplysningar rörande detta meddelande får överlämnas till kommittén.

#### Artikel 11

Ändringar i bilagorna till detta direktiv mot bakgrund av nya vetenskapliga eller tekniska rön skall antas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG. När det gäller de metoder som anges i bilaga II och åtgärderna i punkt 4.1 och 4.2 i bilaga VI till detta direktiv, skall kommissionen förbereda en rapport där metoderna och åtgärderna granskas mot bakgrund av gjorda erfarenheter som vunnits, och rapporten skall överlämnas till kommittén före den 1 januari 2002.

#### Artikel 12

1. Medlemsstaterna skall sätta i kraft de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv senast den 21 augusti 1999. De skall genast underrätta kommissionen om detta.

När en medlemsstat antar dessa bestämmelser skall de innehålla en hänvisning till detta direktiv eller åtföljas av en sådan hänvisning till detta direktiv när de offentliggörs. Närmare föreskrifter för hur hänvisningen skall göras skall varje medlemsstat själv utfärda.

2. Medlemsstaterna skall omedelbart till kommissionen överlämna texterna till de centrala bestämmelser i nationell lagstiftning som de antar inom det område som omfattas av detta direktiv. Kommissionen skall underrätta de övriga medlemsstaterna om detta.

<sup>(1)</sup> EGT L 184, 3.8.1995, s. 34. Direktivet senast ändrat genom kommissionens direktiv 97/46/EG (EGT L 204, 31.7.1997, s. 43).

*Artikel 13*

Utfärdat i Bryssel den 20 juli 1998.

Detta direktiv träder i kraft samma dag som det offentliggörs i *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*.

*Artikel 14*

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

*På rådets vägnar*  
W. MOLTERER  
*Ordförande*

## BILAGA I

## AVSNITT I

Förteckning över de värdväxter för *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi m.fl. som anges i artikel 1:

Växter (inklusive knölar), andra än potatisfröer, av <i>Solanum tuberosum</i> L.	Potatis
Växter, andra än frukter och utsäde, av <i>Lycopersicon lycopersicum</i> (L.) Karsten ex Farw.	Tomat

## AVSNITT II

## Undersökningar

1. De officiella undersökningar som anges i artikel 2.2 a skall grundas på skadegörarens biologi och på det särskilda produktionssystemet i den berörda medlemsstaten och skall omfatta följande:
  - i) I fråga om potatis,
    - vid lämpliga tidpunkter visuell besiktning av den växande grödan och/eller stickprovskontroll av både utsäde och annan potatis under växtsäsongen eller i lager; dessa prov skall genomgå officiella eller officiellt övervakade visuella besiktningar genom att knölarna klyvs, och
    - i fråga om utsädespotatis och där så är lämpligt för annan potatis, officiella eller officiellt övervakade laboratorietest, där den metod tillämpas för diagnostisering, spårande och identifiering av skadegöraren där delar av flödesschemat används och som anges i bilaga II.
  - ii) I fråga om tomat,
    - visuell besiktning vid lämpliga tidpunkter av åtminstone den växande gröda som är avsedd för omplantering för yrkesmässigt bruk.
2. Anmälan av de officiella undersökningar som anges i artikel 2.3 skall innehålla följande:
  - i) I fråga om undersökningar av potatis,
    - uppskattning av den totala areal i hektar där utsädespotatis och annan potatis odlas,
    - indelning i kategorierna utsädes- och matpotatis, och i förekommande fall i regioner,
    - antal prov som tagits för test och tidpunkt för detta,
    - antal okulärbesiktningar på fältet,
    - antal besiktningar av knölar (och stickprovets storlek).
  - ii) I fråga om undersökningar av, åtminstone, växande tomater avsedda för omplantering för yrkesmässigt bruk,
    - uppskattning av det totala antalet plantor,
    - antal okulärbesiktningar.
  - iii) i fråga om undersökningar av värdväxter som inte är potatis- och tomatplantor, inklusive vilda värdväxter av familjen Solanacea,
    - art,
    - antal prov och när dessa tagits,
    - område eller vattendrag där prov tagits,
    - analysmetod.
  - iv) I fråga om undersökningar av vatten och utsläpp av flytande avfall från anläggningar för industriell bearbetning eller förpackning,
    - antal prov och när dessa tagits,
    - område, vattendrag eller anläggningar där prov tagits,
    - analysmetod.

## BILAGA II

TESTPROGRAM FÖR DIAGNOS, UPPTÄCKT OCH IDENTIFIERING AV  
RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI M.FL.

## TESTPROGRAMMETS OMFATTNING

I det framtagna programmet beskrivs de olika förfarandena vid

- i) diagnos av mörk ringröta i potatisknölar och bakteriologisk vissnesjuka på potatis- och tomatplantor,
- ii) upptäckt av *Ralstonia solanacearum* i stickprover av potatisknölar,
- iii) identifiering av *Ralstonia solanacearum*.

Detaljerade anvisningar för preparering av testmaterial dvs. odlingssubstrat, buffertar, lösningar, reagens ges i tilläggen.

## INNEHÅLL

<b>AVSNITT I: Tillämpning av testprogrammet</b> .....	9
1. Diagnos av mörk ringröta i potatisknölar och bakteriologisk vissnesjuka på potatis- och tomatplantor .....	9
2. Upptäckt och identifiering av <i>Ralstonia solanacearum</i> i stickprover av potatisknölar .....	11
<b>AVSNITT II: Diagnos av mörk ringröta i potatisplantor och bakteriologisk vissnesjuka på potatis- och tomatplantor</b> .....	13
1. Symtom .....	13
2. Snabbscreeningstest .....	13
3. Isolering förfarande .....	14
4. Verifieringstest .....	14
<b>AVSNITT III: Upptäckt och identifiering av <i>Ralstonia solanacearum</i> i stickprover av potatisknölar</b> .....	17
1. Preparering av prov för testning .....	17
2. Immunofluorescens-(IF-)test .....	18
3. Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) test .....	20
4. Polymerase Chain Reaction (PCR) test .....	20
5. Odling på selektivt medium .....	22
6. Biotest .....	23
7. Anrikningstest .....	23
8. Patogenitetstest .....	23
<i>Tillägg 1:</i> Näringsämnesmedier för isolering och odling av <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	24
<i>Tillägg 2:</i> Material för provpreparering .....	25
<i>Tillägg 3:</i> Material för IF-test .....	26
<i>Tillägg 4:</i> Bestämning av kontamineringsnivå i IF-testet .....	27
<i>Tillägg 5:</i> Material för ELISA-test .....	28
<i>Tillägg 6:</i> Material för PCR-test .....	29
<i>Tillägg 7:</i> Material för odling på selektivt medium .....	29
Hänvisningar .....	30

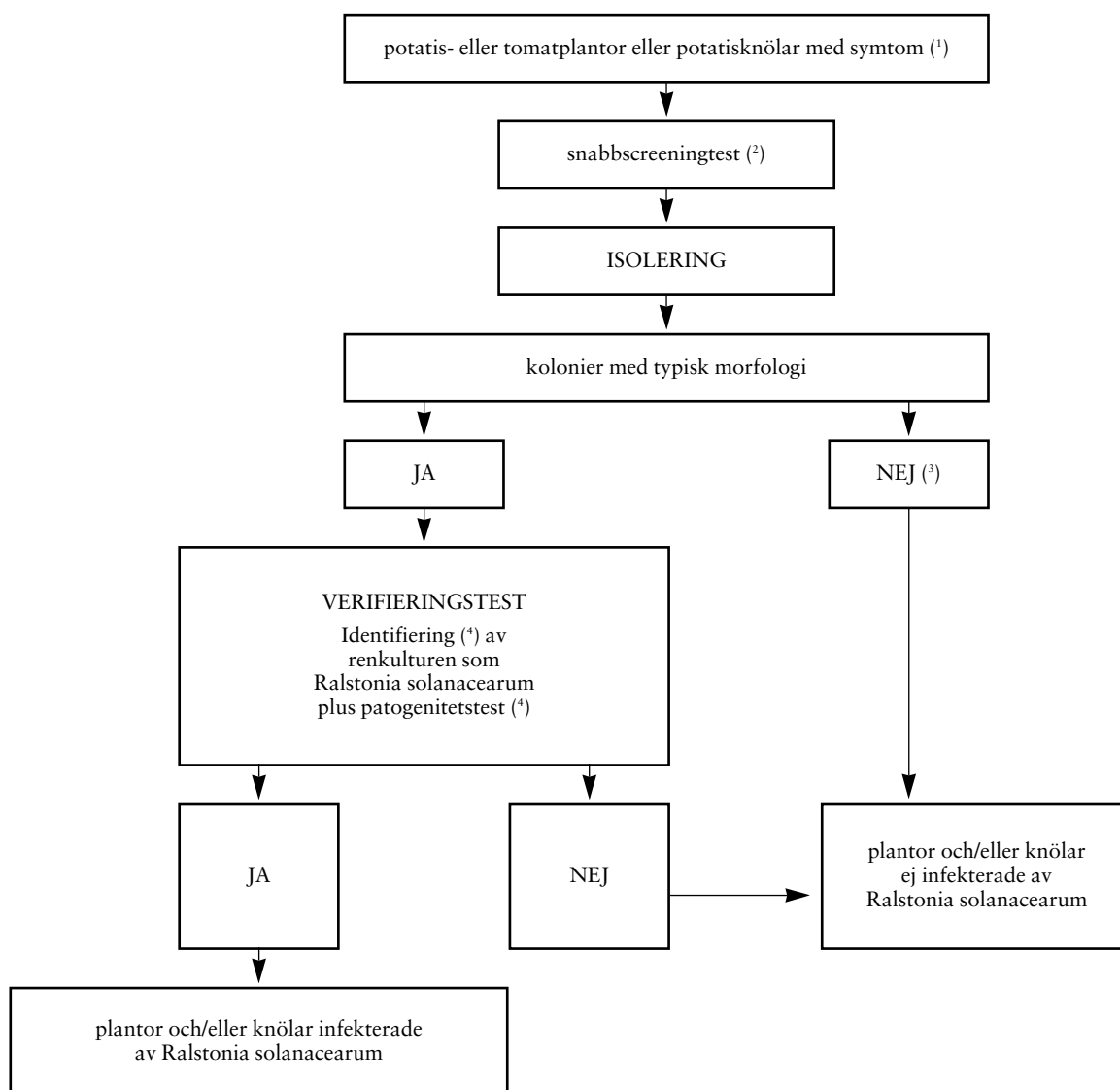
## AVSNITT I

## TILLÄMPNING AV TESTPROGRAMMET

## 1. Diagnos av mörk ringröta i potatisplantor och bakteriologisk vissnesjuka på potatis- och tomatplantor

Testmetoden är avsedd för potatisknölar med symtom som är typiska för eller ger anledning misstänka mörk ringröta och för potatis- och tomatplantor med symtom som är typiska för eller ger anledning att misstänka bakteriologisk vissnesjuka. Den omfattar ett snabbscreeningstest, isolering av den sjukdomsalstrande organismen från infekterad kärlevnad på diagnostiskt medium och, vid positivt utslag, identifiering av kulturen som *Ralstonia solanacearum*.

Flödesdiagram:



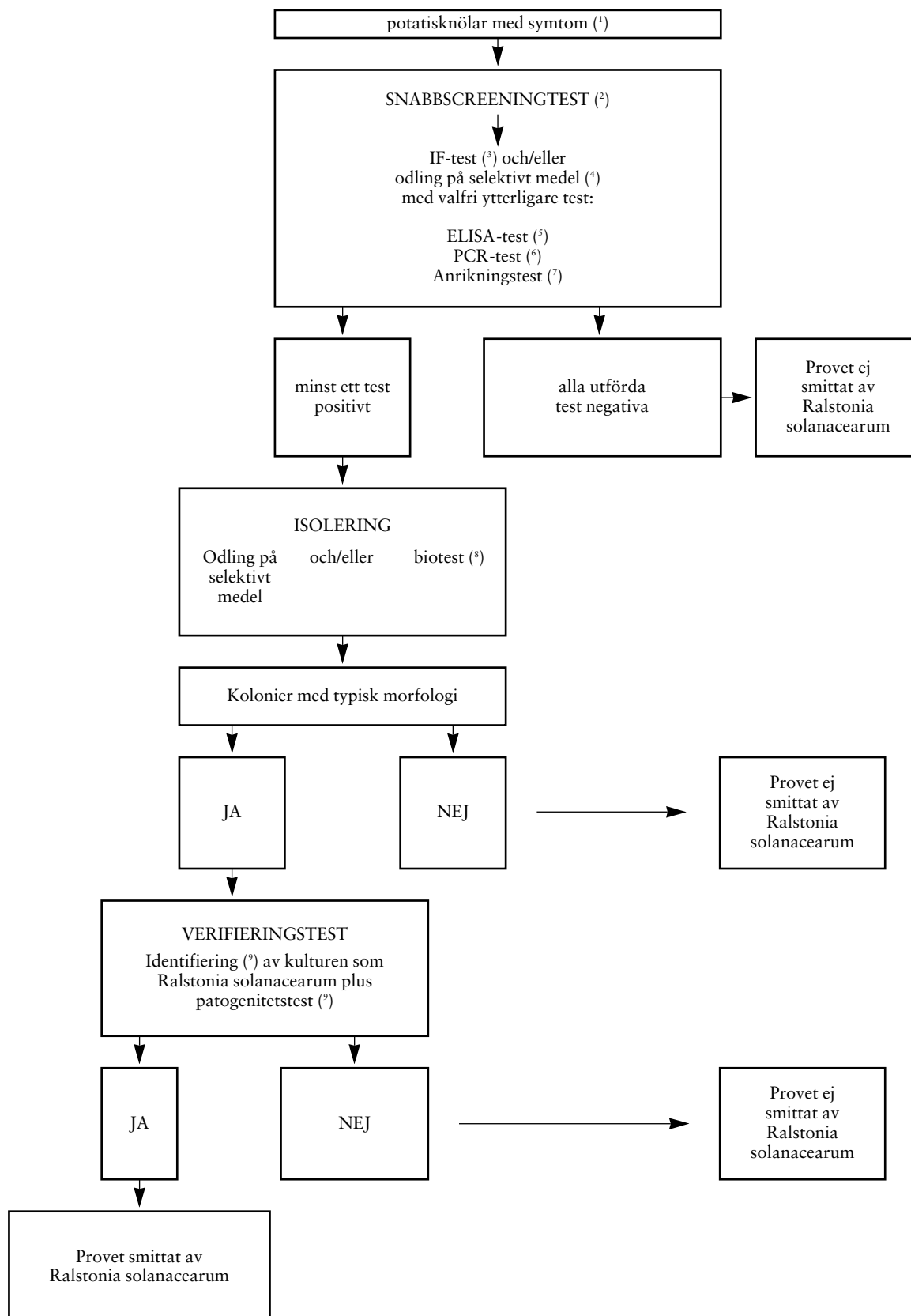
*Referenser till flödesdiagrammet:*

- (<sup>1</sup>) Symtomen beskrivs i avsnitt II.1.
- (<sup>2</sup>) Ett snabbscreeningstest underlättar presumtiv diagnos.  
Lämpliga testmetoder är:  
Strömningstest av kärlvävnad från stjälkar (avsnitt II.2).  
Test för poly- $\beta$ -hydroxibutyratkorn (avsnitt II.2).  
IF-test (avsnitt III.2).  
ELISA-test (avsnitt III.3).  
PCR-test (avsnitt III.4).
- (<sup>3</sup>) Även om isolering av den sjukdomsalstrande organismen genom plattspridning av olika utspädningar från plantor med typiska symptom är enkel kan odling i kultur från långt framskridna infektionsstadier misslyckas. Saprophytiska bakterier som växer på sjuk vävnad kan växa fortare än eller hämma den sjukdomsalstrande organismen på isoleringsmediet. Om isoleringstestet är negativt men sjukdomssymtomen är typiska måste isoleringen upprepas, helst genom odling på selektivt medium.
- (<sup>4</sup>) En renkultur av *Ralstonia solanacearum* kan identifieras tillförlitligt genom minst ett av testen i avsnitt II.4.1 i kombination med ett patogenitetstest (avsnitt II.4.3). Karaktärisering av isolat är valfri men rekommenderas för varje nytt fall.

2. Detektering och identifiering av *Ralstonia solanacearum* i prover av potatisknölar

Metoden används för detektering av latent infektioner i potatisknölar genom ett eller helst flera screeningtest vilka, om de är positiva, verifieras genom isolering av den sjukdomsalstrande organismen, följd av, då det gäller isolering av typiska kolonier, identifiering av en renkultur som *Ralstonia solanacearum*.

Referenser till flödesdiagrammet:



*Referenser till flödesdiagrammet:*

## (1) Provmängd

Standardiserad provmängd är 200 knölar. Proceduren kan emellertid även lätt användas för prover med färre knölantal.

## (2) Screeningtest

Det är möjligt att ett enda test inte är tillräckligt känsligt eller tillförlitligt för att detektera *Ralstonia solanacearum* i ett prov. Därför rekommenderas mer än ett test. Om möjligt bör dessa test företrädesvis utföras enligt metoder baserade på olika biologiska principer.

## (3) Immunofluorescens-(IF)-test

IF-testet (indirekt metod) är ett väl etablerat screeningtest. Detta är en fördel jämfört med andra test som ännu inte är fullt utvecklade eller godkända. Testet används för andra lagstadgade bakterier, t.ex. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Med de avläsningsparametrar som specificeras i denna metod är den ett känsligt test (tröskelvärde  $10^3$ – $10^4$  celler per ml potatisextraktpellet).

Den kritiska faktorn för testresultatets tillförlitlighet är kvaliteten på antiserumet. Endast ett antiserum med hög titer (minimum 2 000 för råserumet) kan godtas, och alla test måste utföras vid antiserums titer eller en utspädning lägre än denna. Den indirekta metoden är att föredra. Den direkta metoden kan tillämpas om testet har en känslighetsnivå och specificitet som motsvarar den indirekta metodens.

IF-testet har fördelen av en subjektiv tolkning av cellmorfologet och fluorescensintensiteten som ger information om specificiteten. Korsreaktioner med serologiskt besläktade bakterier från jord eller potatisvävnad med likartad cellmorfoget som *Ralstonia solanacearum* är vanliga. IF-testet kan användas som enda screeningtest, men i fall där korsreaktioner misstänks skall ett andra screeningtest, baserat på en annan biologisk princip, utföras. I så fall är odling på selektivt medium det lämpligaste testet.

## (4) Odling på selektivt medium

Med det modifierade SMSA-mediet och den testmetod som specificeras i denna metod är detta ett känsligt och selektivt test för *Ralstonia solanacearum*. Resultaten finns tillgängliga 3–6 dygn efter provprepareringen. Den sjukdomsalstrande organismen erhålls direkt i kultur och kan lätt identifieras. För fullt utnyttjande av dess potential kräver testet noggrann preparering av naveländar för att undvika sekundära bakterier som följer med potatisknölen, som konkurrerar med *Ralstonia solanacearum* på mediet och som kan påverka den sjukdomsalstrande organismens utveckling. Vissa stammar kan växa svagt då mediets komponenter också kan påverka målorganismen. *Ralstonia solanacearum* måste nog skiljas från andra bakterier som kan utvecklas på mediet. Odling på selektivt medium kan användas som enda screeningtest, men om ett negativt testresultat erhålls och hämning av *Ralstonia solanacearum* genom andra bakterier på mediet misstänks bör ett andra screeningtest göras. I så fall är IF-testet lämpligast.

## (5) ELISA-test

ELISA-testet är vanligen mindre känsligt än IF-testet (tröskelvärde  $10^4$ – $10^5$  celler per ml potatisextraktpellet). Testet är billigt och snabbt men vanligen mera utsatt för felaktigt positiva resultat (korsreaktioner) och felaktigt negativa resultat (hämning genom fenolmolekyler i potatisextraktet). Kraven på antiserumspecificitet är utomordentligt höga varför ELISA-testet inte kan användas som enda screeningtest.

## (6) PCR-test

PCR har potential för en mycket känslig detektion. Även om det är möjligt att upptäcka en enda DNA-molekyl i ett prov hämmas testet lätt av växt- eller knölextraktkomponenter vilket leder till felaktiga negativa resultat. Vissa potatissorter innehåller flera inhibitorer än andra. Det är därför nödvändigt att avlägsna dessa inhibitorer. Inhiberingen kan reduceras genom utspädning, men populationerna av *Ralstonia solanacearum* späds också ut. Stor försiktighet måste iaktas i alla stadier av prov- och testpreparering för att förhindra kontaminering som skulle leda till felaktiga positiva test. Falska positiva test kan också uppträda genom sekvenshomologi från andra organismer. Av dessa skäl kan direkt PCR inte användas som enda screeningtest.

## (7) Anrikningstest

Inkubation av potatisextraktprover på ett semi-selektivt substrat, t.ex. modifierat SMSA-substrat, möjliggör förökning av *Ralstonia solanacearum*. Kanske mera betydelsefullt är att det även späder ut potentiella inhibitorer av ELISA- eller PCR-test. *Ralstonia solanacearum* på anrikningssubstrat kan alltså upptäckas genom IF, ELISA och PCR. Vi rekommenderar inte direkt plattspridning från anrikat substrat. Dessa anrikningsmetoder är inte grundligt prövade och testade. De tas med här därför att de har en god potential. Eftersom det finns relativt liten erfarenhet av dem kan de emellertid inte användas som enda metoder för detektion.

## (8) Biotest

Biotest används för isolering av *Ralstonia solanacearum* i potatisextraktpellets genom selektiv anrikning i en värdväxt och kan göras på tomatplantor eller äggplantor (aubergine). Testet kräver optimala inkubationsförhållanden enligt metodens specifikation. Bakterier som hämmar *Ralstonia solanacearum* på SMSA-medium kommer sannolikt inte att interferera i detta test.

## (9) Verifierande test(er)

En renkultur av *Ralstonia solanacearum* kan identifieras tillförlitligt genom minst ett av testen i avsnitt II.4.1 i kombination med ett patogenitetstest (avsnitt II.4.3). Karaktärisering av isolat är valfri men rekommenderas för varje nytt fall.

## AVSNITT II

## DIAGNOS AV MÖRK RINGRÖTA I POTATISPLANTOR OCH BAKTERIOLOGISK VISSNESJUKA PÅ POTATIS- OCH TOMATPLANTOR

## 1. Symtom

## 1.1 Symtom på potatis

*Potatisplantan.* I det tidiga skedet av infektionen vissnar bladen mot toppen av plantan vid höga dagstemperaturer, men återhämtar sig under natten. Vissningen blir snabbt irreversibel och leder till att plantan dör. Kärnvävnaden i stjälgar skurna på tvären från vissnade plantor kan bli brun och ett mjölkaktigt sekret avsöndras från den skurna ytan eller kan lätt pressas ut. När en skuren stjälk ställs i vatten strömmar trådar av slem ut från kärlnippena.

*Potatisknölen.* Potatisknölena måste skäras på tvären nära navel(= stolon-)ändan. I det tidiga skedet av infektionen syns en glasaktig gul till ljusbrun missfärgning av kärningen från vilken ett blekgult krämigt sekret spontant kommer fram efter några minuter eller när man trycker lätt med tummen på skalet nära den skurna ytan. Senare blir kärnmissfärgningen tydligare brun och nekrosen kan sprida sig till parenkymvävnaden. Vid ett långt framskridet skede bryter infektionen fram från naveländan och ögonen vilket ger rödbruna, lätt insjunkna lesioner i skalet från vilka bakterieslem utsöndras så att jordpartiklar häftar vid.

## 1.2. Symtom på tomat

*Tomatplantan.* Det förste synliga symtomet är att de yngsta bladen blir sladdriga. Under gynnsamma miljöförhållanden för den sjukdomsalstrande organismen (jordtemperatur cirka 25°C, mättad fuktighet) följer växtförstoring och vissning av ena sidan eller hela plantan inom några få dagar vilket leder till att hela plantan faller samman. Under mindre gynnsamma förhållanden (jordtemperatur under 21°C) kan ett stort antal extra rottrådar utvecklas på stälken. En kladdig sträng kan uppstå längs stälken vilket är tecken på nekros i det kärlsystemet. När stälken genomskärs utsöndrar missfärgade bruna kärnvävnader i stälken droppar av vitt eller gulaktigt bakterieellt sekret.

## 2. Snabbscreeningstest

Ett snabbscreeningstest underlättar presumtiv diagnos. Använd ett eller flera av följande test:

*Kärströmningstest*

Närvaron av *Ralstonia solanacearum* i vissnade potatisstjälgar kan bestämmas genom följande enkla presumtiva test:

Skär av stälken strax ovan markytan. Ställ den avskurna stälken i en bägare med vatten. Strax kommer trådar av bakterieslem att spontant strömma ut ur kärlnippena. Inga andra bakterier som orsakar infektion av potatisplantornas kärnvävnader visar detta fenomen.

*Detektion av poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) korn*

PHB-kornen i celler av *Ralstonia solanacearum* kan göras synliga genom färgning med Nilblått A eller med Sudan-svart B.

Bered antingen ett utstryk av bakterieslemmet eller den suspenderade vävnaden på ett objektglas, eller ett utstryk av en 48-timmars kultur på YPGA eller SPA (tillägg 1). Bered som kontroll positiva utstryk av en biovar 1/ras 3-stam och om det anses lämpligt en negativ kontroll från en heterolog stam.

Låt torka. För snabbt undersidan av glaset flera gånger genom lågan tills utstryket är fixerat.

## Nilblått-test

1. Dränk in det fixerade utstryket med en 1% vattenlösning av Nilblått A. Inkubera i 10 minuter vid 55°C.
2. Dränera av färglösningen. Tvätta snabbt i långsamt rinnande kranvatten. Avlägsna överskottsvatten med läskpapper.
3. Dränk in utstryket med 8% lösning av ättiksyra i vatten. Inkubera i 1 minut vid rumstemperatur.
4. Tvätta försiktigt i rinnande kranvatten. Läska torrt.
5. Återfukta med en droppe vatten. Sätt på ett täckglas.
6. Undersök det färgade utstryket i epifluorescensmikroskop vid 450 nm under oljeimmersion vid 1000 $\times$  förstoring.

Leta efter ljusorange fluorescens av PHB-korn. Undersök också provet i vanligt ljus för att säkerställa att kornen är intracellulära och att cellmorfologin är typisk för *Ralstonia solanacearum*.

### Sudansvarttest

1. Dränk in det fixerade utstryket med 0,3 % Sudansvart B-lösning i 70 % etanol. Inkubera i 10 minuter vid rumstemperatur.
2. Dränera av färglösningen. Tvätta snabbt i kranvatten. Avlägsna överskottsvatten med läskpapper.
3. Doppa utstryket en kort stund i xylol. Läska torrt.

*Varning!* Xylol är en farlig produkt. Arbeta i dragskåp.

4. Dränk in utstryket med 0,5 % (w/v) safranin i vatten och lämna i 10 sekunder vid rumstemperatur.

*Varning!* Safranin är en farlig produkt. Arbeta i dragskåp.

5. Tvätta i långsamt rinnande kranvatten. Läska torrt. Sätt på ett täckglas.
6. Undersök det färgade utstryket i ljusmikroskop (genomfallande ljus) under oljeimmersion vid 1000× förstoring.

PHB-korn i celler av *Ralstonia solanacearum* färgas blåsvarta. Cellväggarna färgas skära.

### Andra tester

Andra lämpliga screeningtester är IF-testet (avsnitt III.2), ELISA-testet (avsnitt III.3) och PCR-testet (avsnitt III.4).

## 3. Isoleringförfarande

- 3.1 Avlägsna bakterieslem eller partier med missfärgad vävnad från knölens kärtring eller från stjälkens kärsträngar. Suspendera bakterieslem eller missfärgad vävnad i en liten volym sterilt destillerat vatten eller 50 mM fosfatbuffert. Låt stå på bänken 5–10 minuter.

- 3.2 Bered en decimal utspädningsserie, t.ex 1/10 och 1/100, av suspensionen eller mer om detta bedöms lämpligt.

- 3.3 Överför en standardvolym av suspensionen på ett vanligt näringsmedium (NA, YPGA och SPA, tillägg 1) och/eller Kelmans tetrazolium medium (tillägg 1) och/eller SMSA selektivt medium (tillägg 7). Sprid en utspädningsserie med lämplig plattspridnings- eller strykteknik. Om det anses lämpligt förbereds separata plattor före varje medium med en cellsuspension av en virulent biovar 2/ras 3-stam av *Ralstonia solanacearum* som positiv kontroll.

- 3.4 Inkubera plattorna i 3 dygn vid 28°C. Inkubationen kan förlängas till 6 dygn om tillväxten är långsam, men kolonier på SMSA plattor blir ofta atypiska och dör.

På det allmänna näringsmediet utvecklar virulenta isolat av *Ralstonia solanacearum* pärlvita, platta, oregelbundna, flödiga kolonier med karakteristiska virvlar.

På Kelmans tetrazolium medium utvecklar virulenta isolat av *Ralstonia solanacearum* gräddvita, platta, oregelbundna och flödiga kolonier med blodrödfärgade virvlar i centrum. Icke virulenta former utvecklar smörlika, djupröda kolonier.

På SMSA mediet utvecklar virulenta isolat av *Ralstonia solanacearum* mjölkvita, platta, oregelbundna, flödiga kolonier med tydliga röda till purpurfärgade centra.

Avirulenta former av *Ralstonia solanacearum* utvecklar mindre flödiga kolonier som är helt skära till röda på SMSA-mediet.

- 3.5 Renodla kolonier med karakteristisk morfologi genom subkultur på ett vanligt näringsmedium. Undvik regelbunden subkulturodling som kan framkalla virulensförlust.

## 4. Verifieringstester

### 4.1 Identifiering av *Ralstonia solanacearum*

Identifiera renkulturer av *Ralstonia solanacearum* med minst en av följande metoder:

#### Närings- och enzymatiska test

*Obs:* Inkludera lämpliga kontrollisolat i varje test.

Följande fenotypiska egenskaper hos *Ralstonia solanacearum* är alltid närvarande eller frånvarande:

Fluorescerande pigment	-
PHB-innehåll	+
Oxidation/Fermentation (O/F) test	O+/F-
Katalas	+
Kovacs' oxidas	+
Nitratreduktion	+
<hr/>	
Citratutnyttjande	+
Växt vid + 40°C	-
<hr/>	
Tillväxt i 1% NaCl	+
Tillväxt i 2% NaCl	-
Arginindihydrolas	-
Gelatinsmältning	-
Stärkelsehydrolys	-
Aesculinhydrolys	-
Levanproduktion	-

(Lelliott and Stead, 1987)

#### IF-test

Bered en suspension av  $10^6$  celler per ml av kulturen och kontrollisolaten. Bered en serie av tvåfaldiga utspädningar av antiserumet. Tillämpa IF-metoden (avsnitt III.2). Kulturen måste ha samma IF-titer som den positiva kontrollen.

#### ELISA-test

Bered en suspension av  $> 10^6$  celler per ml av kulturen och ett positivt kontrollisolat. Tillämpa ELISA-metoden (avsnitt III.3). Kulturen måste ha samma ELISA-värde som den positiva kontrollen.

#### PCR-test

Bered en suspension av  $10^6$  celler per ml av kulturen och ett positivt kontrollisolat. Tillämpa PCR-metoden (avsnitt III.4). PCR-produkten av kulturen måste ha samma storlek och restriction enzyme analysis (REA)-mönster som den positiva kontrollen.

#### Fluorescent in-situ-hybridisering (FISH)

Bered en suspension av  $10^6$  celler per ml från kulturen och ett positivt kontrollisolat. Tillämpa FISH-metoden (van Beuningen et al. 1995) med OLI-1 PCR-primern (Seal et al. 1993). Kulturen måste visa samma reaktion som den positiva kontrollen.

#### Proteinprofilering

Denaturerade hela cellproteiner separeras genom polyakrylamidgelelektrofores -PAGE (Stead, 1992a).

#### Fettsyraprofilering (FAP)

Odlå kulturen och ett positivt kontrollisolat i 48 timmar vid 28°C på trypticase-soja-agar och tillämpa FAP-metoden (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead, 1992b). Kulturen måste visa samma profil som den positiva kontrollen. Under de specificerade villkoren är 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH och 18:1 2OH karakteristiska fettsyror.

## 4.2

### Isolatkaraktisering

Karaktisering av isolat är valfri men rekommenderas för varje nytt fall med minst en av följande metoder:

## Biovarbestämning

*Ralstonia solanacearum* separeras i biovarer på grundval av förmågan att producera syra från tre hexosalkoholer och tre sockerarter (Hayward, 1964 och 1994):

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Utnyttjande av:					
— maltos	-	+	+	-	+
— laktos	-	+	+	-	+
— cellobios	-	+	+	-	+
— mannitol	-	-	+	+	+
— sorbitol	-	-	+	+	-
— dulcitol	-	-	+	+	-

Ytterligare test differentierar biovar 2 i subfenotyper (Hayward, 1994):

	Biovar 2	Biovar 2-A	Biovar 2-T
Utnyttjande av trehalos	-	+	+
Utnyttjande av inositol	+	-	+
Utnyttjande av D-ribos	-	-	+
Pectolytisk aktivitet	låg	låg	hög

## Rasbestämning

Rasen (Buddenhagen et al., 1962) bestäms på grundval av ett patogenitetstest på tomatplantor eller äggplantor och tobaksplantor och genom ett hypersensitivitetstest (HR) på tobaksblad (Lozano och Sequeira, 1970):

	Ras(*)		
	1	2	3
Reaktion på:			
— tomatplanta/äggplanta	vissning	ingen reaktion	vissning
— tobaksplanta	vissning	ingen reaktion	ingen reaktion
— tobaksblad	nekros (48 tim) och vissning (7–8 dagar)	HR (12–24 tim)	kloros (2–8 dagar)

(\*) Ras 4 (patogen på ingefära och några andra värdväxter) och ras 5 (endast patogen på mullbär) är inte inkluderade.

Rasbestämning genom patogenitetstest eller hypersensitivitetstest på tobak är inte helt tillförlitligt och kan istället bedömas utifrån biovartillhörighet och den naturliga värdväxten.

Kulturen kan dessutom karakteriseras genom:

Genomiskt fingeravtryck

Molekylär differentiering av stammar av *Ralstonia solanacearum*-komplexet kan göras genom:

RFLP-analyse (Cook et al., 1989)

Repetitiv sekvens-PCR [REP-, ERIC- & BOX-PCR (Louws et al., 1995; Smith et al., 1995)].

## 4.3

*Patogenitetstest*

Detta test används för verifiering av diagnosen av *Ralstonia solanacearum* och för bedömning av virulens hos kulturer identifierade som *Ralstonia solanacearum*.

Bered ett inokulum av  $10^6$  celler per ml av kulturen och ett positivt kontrollisolat. Inokulera fem till tio tomatplantor eller äggplantor på trebladsstadiet eller äldre (avsnitt III.6). Inkubera i upp till 2 veckor vid 22–28°C och hög relativ fuktighet med daglig vattning. Observera vissningssymtom och/eller epinasti, kloros, dvärgväxt.

Isolera från plantor med symtom:

— Avlägsna en bit växtvävnad från stjälken, 2 cm ovanför inokuleringspunkten.

— Finfördela och suspendera i en liten volym sterilt destillerat vatten eller 50 mM fosfatbuffert. Sprid ut på agar, inkubera och kontrollera om plattorna har typiska kolonier av *Ralstonia solanacearum*.

## AVSNITT III

## DETEKTERING OCH IDENTIFIERING AV RALSTONIA SOLANACEARUM I PROVER AV POTATISKNÖLAR

*Obs:* Standardiserad provmängd är 200 knölar. Proceduren kan emellertid även lätt användas för prover med färre knölantal.

**1. Beredning av provet för testning**

*Obs!* Den potatisextraktpellet som erhålls i detta förfarande kan även användas för detektion av *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Åtgärder före test, om de anses lämpliga:

- i) Inkubera provet vid 25–30°C i upp till 2 veckor för att stimulera förökning av låga populationer av *Ralstonia solanacearum*.
- ii) Tvätta knölarerna under rinnande vatten med lämpliga desinfektionsmedel och tvättmedel. Lufttorka knölarerna.

1.1 Avlägsna med en ren, desinficerad skalpell eller grönsakskniv epidermis från varje knöls navelände så att kärllävnaderna just blir synliga. Skär försiktigt ut en liten konisk kärna (3–5 mm i diameter) av kärllävnad i naveländan av varje knöl. Mängden icke-kärllävnad skall vara minsta möjliga. Naveländar skärs från varje knöl.

*Obs!* Okulärbesiktning av knölarerna (avsnitt II.1) kan göras på detta stadium. Lägg undan alla knölar med symtom eller kraftig röta och testa separat (avsnitt II).

1.2 Samla naveländarna i en sluten behållare. Naveländarna bör helst behandlas omedelbart. Är detta inte möjligt bör de inte lagras längre än 24 timmar – eller vid 4°C inte längre än 72 timmar.

1.3 Behandla naveländarna enligt något av följande förfaranden:

- i) Överför naveländarna till en lämplig behållare.  
Sätt till en så stor volym malningsbuffert (tillägg 2) att kärnorna täcks.  
Finfördela naveländarna i en mixer eller med Ultra Thurrax tills de precis nått fullständig homogenisering. Undvik överdriven homogenisering.  
Låt det upplösta materialet dra i 15–30 minuter.
- ii) Överför naveländarna till en lämplig behållare.  
Sätt till så mycket malningsbuffert att naveländarna täcks.  
Placera behållaren på en rotationskak.  
Inkubera vid 50–100 rpm i 4 timmar vid 20–22°C eller i 16–24 timmar vid 4°C.
- iii) Överför naveländarna till en kraftig engångspåse för finfördelning (t.ex. Stomacherpåse med dimensionerna 105 × 150 mm, steriliserad genom strålning).  
Krossa naveländarna försiktigt med ett lämpligt verktyg, t.ex. en hammare, tills de precis nått fullständig homogenisering.  
Sätt till en malningsbuffert så att de krossade naveländarna täcks.  
Låt det upplösta materialet sätta sig i 15–30 minuter.

1.4 Extrahera bakterierna från de behandlade naveländarna med någon av följande metoder:

- i) Dekanter försiktigt det upplösta materialet i ett centrifugrör så att avfallet stannar kvar i behållaren eller påsen. Om det dekanterade upplösta materialet är grumligt: centrifugera vid högst 180 g i 10 minuter vid en temperatur understigande 10°C.  
Centrifugera det dekanterade upplösta materialet eller vätskefasen från det första centrifugeringssteget vid 7 000 g i 15 minuter eller vid 10 000 g i 10 minuter vid en temperatur understigande 10°C.  
Kasta bort vätskefasen utan att störa pelleten.
- ii) Filtrera det dekanterade upplösta materialet genom ett filtreringssystem vid en porstorlek av 40–100 µm. Påskynda filtreringen med hjälp av en vakuumpump.  
Samla upp filtratet i ett centrifugrör.  
Tvätta filtret med malningsbuffert.  
Centrifugera filtratet vid 7 000 g i 15 minuter eller vid 10 000 g i 10 minuter vid en temperatur understigande 10°C.  
Kasta bort vätskefasen utan att störa pelleten.

- 1.5 Återsuspendera pelleten i 1 ml pelletbuffert (tillägg 2).  
Dela i två lika delar och överför varje del till ett mikrorör.  
Använd ett mikrorör för testning. Bevara resten av detta extrakt vid 4 °C under testningen.  
Tillsätt 10–25 % (v/v) steril glycerol till det andra mikroröret. Skaka. Lagra vid –18 °C (veckor) eller vid –70 °C (månader).
2. **Immunofluorescens-(IF)-test**
- Använd antiserum för *Ralstonia solanacearum*, helst ras 3/biovar 2. Bestäm titern på en suspension av 10<sup>6</sup> celler per ml från den homologa stammen av *Ralstonia solanacearum* med en lämplig utspädning av fluoresceinisothiocyanat-(FITC-)konjugat enligt tillverkarens rekommendationer. Råserum bör ha en IF-titer av minst 1:2 000.
- Använd multispot-objektglas med helst 10 fönster av minst 6 mm diameter.
- Tillsätt en FITC-konjugatkontroll på varje testglas. Testet bör upprepas med en PBS-kontroll om någon positiv cell observeras i FITC-kontrollen.
- Bered separata positiva kontrollglas med en suspension av 10<sup>6</sup> celler per ml från ett lämpligt ras/biovarisolat av *Ralstonia solanacearum*. Ta med ett glas i varje testserie.
- 2.1 Preparera testglas enligt någon av följande metoder:
- i) För pelletar med relativt lite stärkelse:  
Pipettera en uppmätt standardvolym (15 µl är lämpligt för 6 mm fönsterdiameter – öka volymen för större fönster) av den återsuspenderade pelleten på en fönsterrad. Den återstående raden kan användas som duplikat eller för ett andra prov enligt figur 1.
- ii) För andra pelletar:  
Bered decimala utspädningar, d.v.s. 1/10, 1/100 och 1/1 000 av den återsuspenderade pelleten i pelletbuffert. Pipettera en uppmätt standardvolym (15 µl är lämpligt för 6 mm fönsterdiameter – öka volymen för större fönster) av den återsuspenderade pelleten och varje utspädning på en fönsterrad. Den återstående raden kan användas som duplikat eller för ett andra prov enligt figur 2.
- 2.2 Låt dropparna torka. Fixera bakteriecellerna på glaset antingen genom upphettning, flambering med 95 % etanol.
- 2.3 IF-förfarande
- i) Enligt testglaspreparering i 2.1 (i):  
Bered en serie dubbla utspädningar av antiserumet i IF-buffert (Tillägg 3):  
1/4 av titern (T/4), 1/2 av titern (T/2), titern (T) och dubbla titern (2T).
- ii) Enligt testglaspreparering i 2.1 (ii):  
Bered arbetsutspädningen (WD) av antiserumet i IF-buffert. Arbetsutspädningen är den utspädning av antiserum som har optimal specificitet och är vanligen halva titern.

Figur 1

## Preparering av testglas enligt 2.1i och 2.3i

En standardutspädning av återsuspenderad pellet

 $T = \text{titer}$ 

	FITC	T/4	T/2	T	2T	⇒ Dubbel utspädning av antiserum
Prov 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplikat av prov 1 eller prov 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Figur 2

## Preparering av testglas enligt 2.1ii och 2.3ii

	FITC		Standardutspädning av antiserum			⇒ Decimal utspädning av återsuspenderad pellet
	Outspädd	Outspädd	1/10	1/100	1/1 000	
Prov 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplikat av prov 1 eller prov 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

2.3.1 Ordna glaset på fuktigt hushållspapper/pappershandduk.

Täck fönstren med antiserumutspädning(ar). Tillsätt PBS på FITC-fönstren. Den volym antiserum som tillsätts på fönstren måste vara lika med volymen tillsatt extrakt.

2.3.2 Inkubera under lock i 30 minuter vid rumstemperatur.

2.3.3 Skaka av antiserumdropparna från glaset och skölj glaset noga med IF-buffert. Tvätta 5 minuter i IF-buffert-Tween och sedan 5 minuter i IF-buffert (tillägg 3).

Avlägsna noga överskottsfukt med papper.

2.3.4 Ordna glaset på fuktigt papper.

Täck testfönstren och FITC-fönstret med den utspädning av FITC-konjugat som används för att bestämma titern. Den volym konjugat som tillsätts på fönstren måste vara lika med volymen tillsatt antiserum.

2.3.5 Inkubera under lock i 30 minuter vid rumstemperatur.

2.3.6 Skaka av konjugatdropparna från glaset. Skölj och tvätta som ovan (2.3.3).

Avlägsna noga överskottsfukt.

2.3.7 Pipettera 5–10  $\mu$ l 0,1 M fosfatbuffrad glycerol (tillägg 3) eller motsvarande på varje fönster och lägg på ett täckglas.

2.4 Avläsning av IF-testet

Undersök testglaset i ett epifluorescensmikroskop med filter lämpliga för FITC under oljeimmersion vid 500–1 000 gångers förstoring. Scanna fönstren utefter två diametrar i rät vinkel och runt perimetern.

Kontrollera glaset med positiv kontroll först. Cellerna måste vara klart fluorescerande och helt färgade.

*Obs!* Testet måste återupprepas om färgningen är avvikande.

Avläs testglaset. Sök efter frånvaro av fluorescerande celler i FITC-kontrollfönstret. Fluorescerande celler i FITC-kontrollen indikerar icke-specifik bindning av konjugatet, autofluorescens eller kontaminering.

*Obs!* Upprepa testet om sådana observeras.

Sök efter ljusa fluorescerande celler med karakteristisk morfologi av *Ralstonia solanacearum* i testfönstren. Fluorescensintensiteten måste motsvara det positiva kontrollisolatets vid samma antiserumutspädning. Celler med ojämn eller ofullständig färgning eller med svag fluorescens beaktas inte om det inte finns många sådana celler (se tolkning av IF testresultat).

#### Tolkning av IF-testresultatet

- i) För varje prov som saknar ljusa fluorescerande celler med karakteristisk morfologi är IF-testet negativt.
- ii) För varje prov med ljusa fluorescerande celler med karakteristisk morfologi, bestäm medeltalet celler per mikroskopfält och beräkna antal celler (N) per ml återsuspenderad pellet (tillägg 4).

En population på ca  $10^3$  celler per ml återsuspenderat pellet anses vara detektionsgränsen för IF-testet:

— för prov med  $N > 10^3$  celler per ml är IF-testet positivt.

— för prov med  $N < 10^3$  celler per ml kan IF-testet anses vara positivt.

iii) Om ett högt antal ( $> 10^5$  celler per ml) ofullständigt eller svagt fluorescerande celler förekommer vid antiserumets titer, skall ett andra test utföras:

- antingen ett test baserat på en annan biologisk princip
- eller
- ett nytt IF-test med antingen ett andra antiserum eller en tiospädning av pelleten.

### 3. ELISA-test

Baserat på Robinson-Smith et al., 1995.

Använd antiserum för *Ralstonia solanacearum*, helst mot ras 3/biovar 2-stam. Bestäm titern i en suspension av  $10^6$  celler per ml från den homologa stammen av *Ralstonia solanacearum*.

Användning av NUNC Polysorp-mikrotiterplattor rekommenderas.

Lägg till en negativ potatisextraktkontroll och en fosfatbuffrad salt-(PBS-)kontroll.

Använd en suspension av  $> 10^6$  celler per ml från en lämplig ras/biovar av *Ralstonia solanacearum* som positiv kontroll. Testa exakt som provet/proven men väl avskilt från dessa på mikrotiterplattan.

- 3.1 Pipettera 100–200  $\mu$ l av den återsuspenderade pelleten i ett mikrorör.  
Upphetta 4 minuter vid 100°C. Ställ mikroröret på kylning.
- 3.2 Tillsätt en motsvarande volym coatingbuffert av dubbel styrka (tillägg 5). Skaka.
- 3.3 Tillsätt 100  $\mu$ l prov till minst 2 brunnar på mikrotiterplattan. Inkubera i en timme vid 37°C eller över natt vid 4°C.
- 3.4 Häll ut extrakten från brunnarna. Tvätta brunnarna tre gånger med PBS-Tween (tillägg 5), varvid den sista tvättlösningen får vara kvar i brunnarna minst 5 minuter.
- 3.5 Bered den tillämpliga utspädningen av *Ralstonia solanacearum*-antiserum i blockeringsbuffert (tillägg 5). Tillsätt 100  $\mu$ l utspätt antiserum till varje brunn.  
Inkubera 1 timme vid 37°C.
- 3.6 Häll ut extrakten från brunnarna. Tvätta brunnarna som ovan (3.4).
- 3.7 Bered den tillämpliga utspädningen av alkaliskt fosfataskonjugat i blockeringsbuffert. Tillsätt 100  $\mu$ l utspätt konjugat till brunnarna. Inkubera 1 timme vid 37°C.
- 3.8 Häll ut extrakten från brunnarna. Tvätta brunnarna som ovan (3.4 och 3.6).
- 3.9 Bered den alkaliska fosfatassubstratlösningen (tillägg 5). Tillsätt 100  $\mu$ l till brunnarna. Inkubera i 30 minuter till 1 timme i mörker vid laboratorietemperatur.
- 3.10 Läs av absorptionen vid 409 nm.

#### *Tolkning av ELISA-testet*

ELISA-testet är negativt om provets optiska densitet (O.D.) är  $< 2 \times$  den negativa kontrollens O.D.

ELISA-testet är positivt om provets optiska densitet (O.D.) är  $> 2 \times$  den negativa kontrollens O.D.

### 4. PCR-test

Baseras på Seal et al., 1993.

*Obs!* Pipettspetsar med filterpropp måste användas på alla stadier av provpreparering och annan behandling där PCR ingår.

Bered en suspension av  $10^6$  celler per ml från en ras 3/biovar 2-stam av *Ralstonia solanacearum* som positiv kontroll. Testa exakt som provet/proven.

- 4.1 Pipettera 100  $\mu$ l av den återsuspenderade pelleten i ett mikrorör.

Alternativt, för över 90  $\mu$ l av den återsuspenderade pelleten i ett mikrorör med 10  $\mu$ l 0,5 M NaOH. Blanda genom att vända upp och ner på mikroröret upprepade gånger.

- 4.2 Upphetta 4 minuter vid 100°C. Ställ mikroröret på kylning omedelbart.
- 4.3 Bered minst två decimala utspädningar, t.ex. 1/10 och 1/100 eller fler, i sterilt destillerat eller ultrarent vatten (UPW).
- 4.4 Bered PCR-reaktionsblandningen (tillägg 6) i ett sterilt rör genom tillsats av följande komponenter i nämnd ordning:

*För 50 µl reaktionsvolym*

Komponent	Kvantitet	Slutkoncentration
Sterilt destillerat eller UPW	30,8 µl–33,8 µl	
10×PCR-buffert	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-polymeras (5U/µl)	0,2 µl	1,0 U
Totalvolym	45 µl–48 µl	

*För flera reaktioner*

Beräkna kvantiteten av varje komponent för erforderligt antal reaktioner.

Blanda komponenterna och överför 45 µl–48 µl av blandningen till sterila PCR-rör.

Förvara rören med PCR-reaktionsblandningen kylda.

*För 25 µl reaktionsvolym:*

Minska komponenterna i motsvarande grad.

- 4.5 PCR-amplifiering
- 4.5.1 Alternativ! Pulscentrifugera rören med det kokta provet och en positiv kontroll.
- Tillsätt i nämnd ordning 2–5 µl av provet/proven, vattenkontroll och positiv kontroll till rören med PCR-reaktionsblandningen. Placera rören i värmeblocket i en DNA-termocycelapparat.
- 4.5.2 Kör följande program:
- 1 cykel under:
- i) 2 minuter vid 96°C: denaturering av förlaga/mall
- 50 cykler under:
- ii) 20 sekunder vid 94°C: denaturering
  - iii) 20 sekunder vid 68°C: påkoppling av primers
  - iv) 30 sekunder vid 72°C: förlängning av kopia
- 1 cykel under:
- v) 10 minuter vid 72°C: fullföljd kopiering
- 1 cykel:
- vi) stillastående vid 4°C
- Obs!* Dessa parametrar gäller för en Perkin Elmer 9600. Andra termocycelapparater kan kräva mineraloljetäckning i PCR-reaktionsrören och/eller modifikation av varaktigheten av steg ii, iii och iv i amplifieringsprofilen.
- 4.5.3 Avlägsna rören från apparaten. Analysera PCR-produkten. Om detta inte görs omedelbart, förvara rören vid 4°C om de skall användas samma dag, vid –18°C för längre tids förvaring.
- 4.6 Analys av PCR-produkten
- PCR-fragmenten upptäcks genom agarosgelelektrofores och färgning med ethidiumbromid.
- 4.6.1 Bered en lämplig agarosgel genom att försiktigt hetta upp agaros i tris-acetat-elektrofores-(TAE)-buffert till kokning.

- 4.6.2 Kyl den smälta agarosen till 50–60 °C, håll den i elektroforesenhetens form och sätt in kammen. Låt gelen stelna.
- 4.6.3 Avlägsna kammen. Sänk ner gelen i TAE så att det precis täcks (2–3 mm) av bufferten.
- 4.6.4 Placera 3  $\mu\text{l}$  droppar av buffert på parafilm. Sätt till 12  $\mu\text{l}$  av PCR-produkten, antingen från proven, den positiva kontrollen eller vattenkontrollen, och blanda genom försiktig uppsugning i pipettspetsen före fyllning. De nämnda volymerna kan anpassas så att de överensstämmer med volymen på brunnarna i agarogelen.
- 4.6.5 Fyll försiktigt brunnarna i gelen. Ta med som referens en lämplig DNA-markör i minst en brunn.
- 4.6.6 Anslut trådarna på kraftkällan och elektroforesutrustningen. Kör gelen vid 5–8 V/cm tills spårindikatorns främre ände är inom 1 cm från änden av gelen.
- 4.6.7 Stäng av strömmen. Ta bort trådarna från elektroforesenheten. Ta försiktigt bort gelen. Sänk ner i ethidiumbromidlösning i 30–45 minuter.
- Obs!* Använd alltid engångshandskar vid arbete med ethidiumbromid som är en kraftig mutagen!
- 4.6.8 Avfärga i destillerat vatten i 10–15 minuter.
- 4.6.9 Betrakta de amplifierade DNA-fragmenten med UV-genomlysning. PCR-produkten av *Ralstonia solanacearum* med primerserien OLI-1 och Y-2 är 288 bp lång. Kontrollera mot DNA-markören och mot den positiva kontrollen.
- Obs!* Vattenkontrollen måste under alla förhållanden vara negativ. Är den positiv måste testet upprepas.
- 4.6.10 Fotografera gelen om varaktig dokumentation krävs.
- 4.6.11 Verifiera det amplifierade fragmentets äkthet med restriktionsenzymanalys (REA).
- 4.7 Restriktionsenzymanalys (REA)
- 4.7.1 Överför 8,5  $\mu\text{l}$  av PCR-produkten (4.5.3) till ett nytt mikrorör. Sätt till 1  $\mu\text{l}$  10 $\times$  enzymbuffert och 0,5  $\mu\text{l}$  restriktionsenzym Ava II.
- 4.7.2 Blanda genom försiktig uppsugning i pipettspetsen. Om droppar stannar kvar på rörets väggar, pulscentrifugera i mikrocentrifug. Inkubera en timme vid 37 °C.
- 4.7.3 Analysera de uppdelade PCR-fragmenten med agarosgelelektrofores enligt ovan (4.6).

#### *Tolkning av PCR-resultaten*

PCR-testet är negativt om det karakteristiska 288 bp-fragmentet inte upptäcks och fragmentet upptäcks i det positiva kontrollisolatet av *Ralstonia solanacearum*.

PCR-testet är positivt om 288 bp-fragmentet upptäcks och REA-analys av det förstärkta fragmentet är identisk med det positiva kontrollisolatet av *Ralstonia solanacearum*.

## 5. Odling på selektivt medium

Baseras på Elphinstone et al., 1996.

- 5.1 Utför testet genom en lämplig utspädningsplatt-teknik, t.ex:
- Bered minst två decimala utspädningsplattor, d.v.s. 1/10 och 1/100 eller fler om så önskas, av den återsuspenderade pelleten i pelletbuffert. Pipettera en uppmätt standardvolym (50–100  $\mu\text{l}$ ) av den återsuspenderade pelleten och varje utspädning till ett modifierat SMSA selektivt medium (tillägg 7) och sprid med en glasstav över hela mediets yta.  
Om det anses lämpligt utförs även ett utspädningsutstryk av en 10  $\mu\text{l}$  ögla med den återsuspenderade pelleten. Flambera ögla mellan utstryken.
  - För över en uppmätt standardvolym (50–100  $\mu\text{l}$ ) av den återsuspenderade pelleten till ett modifierat SMSA selektivt medium och sprid med en glasstav över hela mediets yta. Gör utstryk med staven utan flambering på ytterligare två modifierade SMSA-plattor.
- 5.2 Tillsätt med samma utspädningsplatt-teknik en suspension av 10<sup>6</sup> celler per ml från en ras 3/biovar 2-stam av *Ralstonia solanacearum* som positiv kontroll på en serie separata modifierade SMSA-plattor.
- 5.3 Inkubera plattorna vid 28 °C. Börja läsa av plattorna efter 3 dagar. Om de är negativa, inkubera vidare upp till 6 dagar. Virulenta isolat av *Ralstonia solanacearum* utvecklar mjölkvita, platta, oregelbundna, flödiga kolonier med tydliga röda till purpurfärgade centra som visar inre strimmor eller virvlar.
- 5.4 Renodla kolonier med karakteristisk morfologi genom subkultur på ett vanligt näringsmedium (tillägg 1).

- 5.5 Identifiera rena kulturer (avsnitt II.4.1) och verifiera *Ralstonia solanacearum* med ett isolat med patogenitetstest (avsnitt II.4.3).

*Tolkning av resultatet på selektivt medium*

Testet på selektivt medium är negativt om inga kolonier isoleras inom sex dagar eller om inga karakteristiska kolonier av *Ralstonia solanacearum* isoleras, förutsatt att ingen inhibition från kolonier av andra bakterier misstänks och att *Ralstonia solanacearum* karakteristiska isolat återfinns på de positiva kontrollerna.

Test på selektivt medium är positivt om karakteristiska kolonier av *Ralstonia solanacearum* isoleras.

6. **Biotest**

Baseras på Janse, 1988.

- 6.1 Använd 10 testplantor (mottagliga tomat- eller äggplantor) på trebladsstadiet för varje prov. Vattna inte testplantorna inom 24 timmar före inokuleringen.

- 6.2 Fördela 100  $\mu$ l återsuspenderad pellet mellan testplantorna. Inokulera i stjälken mellan hjärtbladen och på ett eller flera andra ställen.

- 6.3 Inokulera med samma teknik 10 småplantor med en suspension av  $10^6$  celler per ml av en virulent ras 3/biovar 2-stam av *Ralstonia solanacearum* som positiv kontroll och med pelletbuffert som negativ kontroll. Separera de positiva kontrollplantorna från de andra plantorna för att undvika korskontaminering.

- 6.4 Odlå plantorna vidare upp till 4 veckor, vid 22°C–28°C, med hög relativ fuktighet och med daglig vattning. Notera utveckling av vissningssymtom, epinasti, kloros och/eller försvagad tillväxt.

- 6.5 Isolera från infekterade plantor (avsnitt II). Identifiera rena kulturer med karakteristisk morfologi (avsnitt II.4.1) och verifiera *Ralstonia solanacearum*-kulturer med ett patogenitetstest (avsnitt II.4.3)

- 6.6 Om det anses lämpligt, kontrollera frånvaro av infektion i serier av testplantor som inte visar tecken på infektion. Avlägsna från varje testplanta en 1 cm sektion av stjälken från 2 cm ovanför inokuleringsstället. Homogenisera vävnaderna i upplösningsbuffert. Gör utspädningsplatt-test (avsnitt III.5.1). Om det är positivt, identifiera rena kulturer med karakteristisk morfologi (avsnitt II.4.1) och verifiera *Ralstonia solanacearum*-kulturer med ett patogenitetstest (avsnitt II.4.3).

*Tolkning av resultatet av biotest*

Biotestet är negativt om testplantorna inte är infekterade av *Ralstonia solanacearum* och under förutsättning att *Ralstonia solanacearum* detekterats i den positiva kontrollen.

Biotestet är positivt om testplantorna är infekterade av *Ralstonia solanacearum*.

7. **Anrikningstest**

Baseras på Elphinstone et al., 1996

- 7.1 För över 100  $\mu$ l av den suspenderade pelleten i 3 ml modifierat SMSA-substrat (tillägg 7).

- 7.2 Inkubera 48 timmar och i varje fall inte längre än 72 timmar, vid 28°C med locket på röret löst påsatt för luftning.

- 7.3 Sätt fast locket och skaka. Prov för IF-testet (detta avsnitt 2), ELISA-testet (detta avsnitt 3) och/eller PCR-testet (detta avsnitt 4).

8. **Patogenitetstest**

Se avsnitt II.4.3.

*Tillägg 1***Näringsmedier för isolering och odling av *Ralstonia solanacearum*****Näringsagar (Nutrient Agar, NA)**

Nutrient Agar (Difco)	23 g
Destillerat vatten	1 liter

Bered 1/2-litersvolymen av mediet i 1-litersflaskor.

Lös ingredienserna.

Sterilisera genom autoklavering vid 121°C i 15 minuter.

Kyl till 50°C. Häll ut på plattor.

**Jäst-pepton-glukosagar (Yeast Peptone Glucose Agar, YPGA)**

Jästextrakt (Difco)	5 g
Bacto pepton (Difco)	5 g
D(+)-glukos (monohydrat)	10 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Destillerat vatten	1 liter

Bered 1/2-litersvolymen av mediet i 1-litersflaskor.

Lös ingredienserna.

Sterilisera genom autoklavering vid 121°C i 15 minuter.

Kyl till 50°C. Häll ut på plattor.

**Sucrospeptonagar (Sucrose Peptone Agar, SPA)**

Sucros	20 g
Pepton	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Destillerat vatten	1 liter

Bered 1/2-litersvolymen av mediet i 1-litersflaskor.

Lös ingredienserna. Justera till pH 7,2–7,4 om så erfordras.

Sterilisera genom autoklavering vid 121°C i 15 minuter.

Kyll till 50°C. Häll ut på plattor.

**Kelmans tetrazoliummedium**

Casamino acids (Difco)	1 g
Bacto pepton (Difco)	10 g
Dextros	5 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Destillerat vatten	1 liter

Bered 1/2-litersvolymen av mediet i 1-litersflaskor.

Lös ingredienserna.

Sterilisera genom autoklavering vid 121°C i 15 minuter.

Kyl till 50°C.

Tillsätt en filtersteriliserad vattenlösning av trifenyl-tetrazoliumklorid (Sigma) så att en slutkoncentration av 50 mg per 1 uppnås.

Häll ut på plattor.

*Tillägg 2***Material för provpreparering**

Malningsbuffert: 50 mM fosfatbuffert, pH 7,0

Denna buffert används för malning av vävnad.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g
Destillerat vatten	1 liter

Lös ingredienserna och kontrollera pH. Dela upp på lämpligt sätt. Sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter.

Tillsats av 5 % Polyvinylpyrrolidon – 40 000 MWT(PVP-40) rekommenderas när direkt PCR-test görs för att minska förekomsten av amplifieringshämning genom aromatiska molekyler i extraktet.

Tillsats av en deflockulant, ett antiskummedel eller en anti-oxidant rekommenderas med användande av Waring mixer eller Ultra Turrax homogeniseringsförfarande för malning av potatisvävnadskärnorna.

Lubrolflingor	0,5 g per l
DC silikon-antiskum	1,0 ml per l
Tetra-natriumpyrofosfat	1,0 g per l

Autoklavera separat. Tillsätt till önskad koncentration.

Pelletbuffert: 10 mM fosfatbuffert pH 7,2

Denna buffert används för återsuspension och utspädning av pelletarna av potatisens naveländar.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,4 g
Destillerat vatten	1 liter

Lös ingredienserna och kontrollera pH. Dela upp på lämpligt sätt. Sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter.

---

*Tillägg 3***Material för IF-test**

IF-buffert: 10 mM fosfatbuffrad saltlösning (PBS), pH 7,2

Denna buffert används för utspädning av antiserum.

Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O 2,7 g

NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O 0,4 g

NaCl 8,0 g

Destillerat vatten 1 liter

Lös ingredienserna och kontrollera pH. Dela upp på lämpligt sätt.

Sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter.

IF-buffert — Tween

Denna buffert används för att tvätta objektglasen. Tillsätt 0,1 % Tween 20 till IF-bufferten.

0,1 M fosfatbuffrad glycerol, pH 7,6

Denna buffert används som monteringsvätska på fönstren av IF-glasen för att förbättra fluorescensen.

Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O 3,2 g

NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O 0,15 g

Glycerol 50 ml

Destillerat vatten 100 ml

---

## Tillägg 4

## Bestämning av kontamineringsnivå i IF-testet

Multispotglasets fönsteryta (S)

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

där D = fönstrets diameter.

(1)

Objektivfältets yta (ytor)

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

där d = fältets diameter.

(2)

Beräkna d antingen genom direkt mätning eller ur följande formel:

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

(3)

där i = fältkoefficienten (beror av okulartyp och varierar från 8 till 24),

K = aperturkoefficienten (1 eller 1,25),

G = objektivets förstoring (100×, 40× etc.),

från (2)

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

(4)

från (3)

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

Räkna antalet typiska fluorescerande celler per fält (c).

Beräkna antalet typiska fluorescerande celler per fönster (C).

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

Beräkna antalet typiska fluorescerande celler per ml pellet (N).

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

där y = pelletvolymen på fönstret,

där F = pelletens utspädningsfaktor.

—

## Tillägg 5

## Material för ELISA-test

Coatingbuffert av dubbel styrka, pH 9,6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6,36 g
NaHCO <sub>3</sub>	11,72 g
Destillerat vatten	1 liter

Lös ingredienserna och kontrollera pH. Dela upp på lämpligt sätt.

Sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter.

Natriumsulfit med en slutkoncentration av 0,2 % kan tillsättas som antioxidant om extraktet innehåller en hög andel aromatiska molekyler.

10 × fosfatbuffrad saltlösning (PBS), pH 7,4

NaCl	80 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	29 g
KCl	2 g
Destillerat vatten	1 liter

Lös ingredienserna och kontrollera pH. Dela upp på lämpligt sätt.

Sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter.

Fosfatbuffrad saltlösning — Tween (PBS-T)

10 × PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destillerat vatten	895 ml

Blockerings- (antikropps-)buffert (måste vara nyberedd)

10 × PBS	10 ml
Polyvinylpyrrolidon-44 000 MWT (PVP-44)	2 g
10 % Tween 20	0,5 g
Mjölkpulver	0,5 g
Destillerat vatten	till 100 ml

Alkalisk fosfatas-substratlösning pH 9,8

Dietanolamin	97 ml
Destillerat vatten	800 ml

Blanda och justera till pH 9,8 med koncentrerad HCl.

Fyll upp till 1 liter med destillerat vatten.

Tillsätt 0,2 g Mg Cl<sub>2</sub>.

Lös 2 fosfatas-substrat tabletter 5 mg (Sigma) per 15 ml lösning.

## Tillägg 6

## Material för PCR-test

## Oligonukleotidprimersekvens

Primer OLI-1 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

Primer Y-2 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

För material: Se Seal et al., (1993).

## Tillägg 7

## Material för odling på selektivt medium och anrikningstest

SMSA selektivt medium (Engelbrecht, 1994, modifierat av Elphinstone et al., 1996).

## Basismedium

Casamino acid (Difco)	1 g
Bacto pepton (Difco)	10 g
Glycerol	5 ml
Agar (Difco)	15 g
Destillerat vatten	1 liter

Bered 1/2-litersvolym av mediet i 1-litersflaskor.

Lös ingredienserna och kontrollera pH. Justera pH, om så erfordras, till 6,5 före autoklavering. *Ralstonia solanacearum* växer inte bra på mediet vid pH > 7,0.

Sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter.

Kyl till 50 °C.

Tillsätt följande ingredienser (alla från Sigma) för att nå angivna slutkoncentrationer:

Kristallviolett	5 mg per l		
Polymixin B sulfat	100 mg per l	(ca 600 000 enheter)	Sigma P-1004
Bacitracin (*)	25 mg per l	(ca 1 250 enheter)	Sigma P-0125
Kloramphenicol	5 mg per l		Sigma C-3175
Penicillin-G	0,5 mg per l	(ca 825 enheter)	Sigma P-3032
Tetrazoliumsalter	50 mg per l		

Lös ingredienserna i 70 % etanol till de koncentrationer som anges för de volymer av medium som bereds. Vissa ingredienser, nämligen polymixin B och kloramphenicol, kräver lätt värmning och skakning.

SMSA-substrat (Elphinstone et al., 1996)

Bered som SMSA selektivt medium men uteslut agarn.

Fördela i 3 ml-portioner i 30 ml engångs Universalsrör.

(\*) Om det anses nödvändigt kan en ökning av bacitracin-koncentrationen till 300 ppm minska mängden kontaminerande saprofytiska bakterier utan att återvinningen av *Ralstonia solanacearum* minskar.

## Referenser

- 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 respons. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2, 113–121.
- Dinesen I.G. and DeBoer, S.H., 1995. Extraction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from Elphinstone, J.G.; Hennessy, J.; Wilson, J. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith)Smith in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26.
- Engelbrecht, M.C. 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3–5.
- Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27, 265–277.
- Hayward, A.C. 1994. Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: *Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (eds. A.C. Hayward and G.L. Hartman) CAB International Oxford, 127–135.
- Janse, J.D. 1988. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *EPPO Bulletin* 18, 343–351.
- Janse, J.D. 1991. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14, 335–345.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 64, 293–695.
- Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants.* (T.F. Preece ed.) Blackwell Scientific Publications, Oxford. 216 pp.
- Louws, F.J.; Fullbright, 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.

*BILAGA III*

1. Varje gång det föreligger misstanke om att skadegöraren förekommer och ett eller flera positiva screeningtest har genomförts för det förtecknade växtmaterialet enligt den metod som anges i bilaga II, eller i alla andra fall varje annan officiellt godkänd metod, bör, i avvaktan på bekräftelse eller vederläggning genom slutförande av den nämnda metoden, följande bevaras och förvaras på lämpligt sätt tills metoden har slutförts:
    - Om möjligt partiet eller delar av det (från vilket prov har tagits) i dess ursprungliga förpackning med etikett.
    - Om möjligt alla de knölar och plantor från vilka prover har tagits.
    - Allt kvarvarande extrakt och ytterligare förberett material för screeningtest, t.ex. immunofluorescensglas.
    - All relevant dokumentation.
  2. Om det bekräftas att skadegöraren förekommer, bör följande bevaras och förvaras på lämpligt sätt under åtminstone en månad efter anmälningsförfarandet enligt artikel 5.2:
    - Det material som specificeras i punkt 1.
    - Ett prov av det angripna tomat- eller äggplantematerialet inokulerat med knöl eller plantextrakt i förekommande fall.
    - En isolerad kultur av skadegöraren.
-

*BILAGA IV*

Följande skall, när så är lämpligt, ingå i den utredning som anges i artikel 5.1 a i:

i) Produktionsplatser

- där potatis odlas eller har odlats ur kloner som är närbesläktade med potatis som har visat sig vara smittad av skadegöraren,
- där tomater odlas eller har odlats, vilka kommer från samma parti som tomater som har visat sig vara smittade av skadegöraren,
- där potatis eller tomater odlas eller har odlats vilka har satts under officiell kontroll därför att det misstänks att skadegöraren förekommer,
- där potatis odlas eller har odlats ur kloner som är närbesläktade med potatis som har växt på produktionsplatser som befunnits vara infekterad av skadegöraren,
- där potatis eller tomater odlas och finns i samma grannskap som infekterade produktionsplatser, inklusive anknötning via produktionsutrustning och -anordningar som delas direkt eller genom en gemensam entreprenör,
- där det för bevattning eller duschning används ytvatten från någon källa som har bekräftats vara eller som misstänks vara infekterad av skadegöraren,
- där det för bevattning eller duschning används ytvatten från en källa som även används på produktionsplatser som har bekräftats vara eller som misstänks vara infekterad av skadegöraren,
- som är översvämmade eller har översvämmats av ytvatten som bekräftats eller misstänks vara infekterad av skadegöraren.

ii) Ytvatten som används för bevattning eller duschning av, eller som har översvämmat det eller de fält eller den eller de produktionsplatser som har bekräftats vara smittade av skadegöraren.

—

## BILAGA V

1. Följande skall, när så är lämpligt, ingå vid bestämningen av hur omfattande det troliga angrepp som avses i artikel 5.1 a iii och 5.1 c iii är:
  - Det förtecknade växtmaterial som har odlats på en produktionsplats som förklaras angripen enligt artikel 5.1 a ii.
  - En eller flera produktionsplatser med någon anknytning till produktionen av det förtecknade växtmaterial som har förklarats angripet i enlighet med artikel 5.1 a ii, inklusive anknytning via produktionsutrustning och anordningar som delas direkt eller genom en gemensam entreprenör.
  - Det förtecknade växtmaterial som har producerats på en eller flera sådana produktionsplatser som avses i föregående strecksats, eller som har förvarats på en eller flera sådana produktionsplatser under den tid då det förtecknade växtmaterial som har förklarats angripet i enlighet med artikel 5.1 a ii befann sig på de produktionsplatser som avses i första strecksatsen.
  - Lager som hanterar det förtecknade växtmaterialet från de ovan nämnda produktionsplatserna.
  - Alla maskiner, fordon, fartyg, lager, eller delar av dessa, och alla andra föremål, inklusive förpackningsmaterial, som kan ha kommit i kontakt med det förtecknade växtmaterial som har förklarats angripet i enlighet med artikel 5.1 a ii.
  - All växtmaterial som har lagrats i, eller kommit i kontakt med, något av de föremål som anges i föregående strecksats innan dessa föremål hade rengjorts och sanerats.
  - Till följd av den undersökning och de test som avses i artikel 5.1 a i, i fråga om potatis, de knölar eller plantor som har ett syster- eller moderförhållande genom kloning och i fråga om tomater de plantor med samma källa som det förtecknade växtmaterial som har förklarats angripet i enlighet med artikel 5.1 a ii och som trots att det kan ha givit negativt svar när det testats för skadegöraren, sannolikt är angripet via ett kloningssamband.
  - En eller flera produktionsplatser för det förtecknade växtmaterial som avses i föregående strecksats.
  - En eller flera produktionsplatser för det förtecknade växtmaterialet där det för bevattning eller duschning används sådant vatten som har förklarats angripet i enlighet med artikel 5.1 c ii.
  - Det förtecknade växtmaterial som produceras på fält som översvämmats av ytvatten som bekräftats vara angripet av skadegöraren.
2. Fastställandet av den möjliga spridning som avses i artikel 5.1 a iv och 5.1 c iii skall omfatta följande:
  - i) För fall som behandlas i artikel 5.1 a iv skall följande beaktas:
    - Närheten till andra produktionsplatser där det förtecknade växtmaterialet odlas.
    - Den gemensamma produktionen och användningen av partierna av utsädespotatis.
    - Produktionsplatser som använder ytvatten för bevattning och duschning av förtecknat växtmaterial i fall då det finns eller har funnits en risk för ytvattenströmningar från eller översvämning av den eller de produktionsplatser som har förklarats nedsmittade i enlighet med artikel 5.1 a ii.
  - ii) För fall då ytvattnet har förklarats nedsmittat i enlighet med artikel 5.1 c ii skall följande beaktas:
    - Produktionsplatser där det produceras förtecknat växtmaterial och som gränsar till eller riskerar att bli översvämmade av ytvatten som har förklarats nedsmittat.
    - Alla åtskilda bevattningsdammar som är förbundna med det ytvatten som har förklarats nedsmittat.

3. Uppgifterna i den anmälan som avses i artikel 5.2 första stycket skall omfatta följande:
    - Datum för när misstanken om att skadegöraren förekommer rapporterades enligt artikel 4 och datum för stickprovskontroll och bekräftelse av skadegörarens förekomst enligt artikel 5 i förekommande fall.
    - En närmare beskrivning av den angivna nedsmittningen och av det avgränsade området.
  4. Uppgifterna i den anmälan som avses i artikel 5.2 andra stycket skall omfatta följande:
    - För alla sändningar med eller partier av potatis som har förklarats nedsmittade, de certifikat som föreskrivs i artikel 7 eller artikel 8 i direktiv 77/93/EEG, växtpassnummer eller potatisproducentens registreringsnummer, gemensamma lageranläggningar och distributionscentraler, i förekommande fall.
    - För alla sändningar med eller partier av tomatplantor som har förklarats nedsmittade, de certifikat som föreskrivs i artikel 7 eller artikel 8 i direktiv 77/93/EEG och växtpassnummer i enlighet med förteckningen i del A avsnitt I 2.2 i bilaga V till direktiv 77/93/EEG.
    - Sortnamn och kategori för partier av utsädespotatis, och om möjligt i alla andra fall.
    - Annan information som bekräftar förekomsten av smitta och som kommissionen kan kräva.
-

## BILAGA VI

1. Med hänvisning till artikel 6.1 skall bestämmelserna innebära
  - förbränning, eller
  - användning som djurfoder efter värmebehandling av en typ som innebär att det inte finns någon risk för att skadegöraren har överlevt, eller
  - djup nedgrävning vid en avfallsanläggning där det inte finns någon risk för läckage till jordbruksmark eller kontakt med vattenkällor som skulle kunna användas vid bevattning av jordbruksmark, eller
  - industriell bearbetning genom direkt och omedelbar leverans till en bearbetningsanläggning med officiellt godkända anordningar för avfallshantering, vilka överensstämmer med bestämmelserna i bilaga VII till detta direktiv, eller
  - andra åtgärder, förutsatt att det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren sprids; dessa åtgärder skall omedelbart anmälas till kommissionen och till de andra medlemsstaterna.
2. Följande sätt är lämpliga för att under tillsyn av de berörda medlemsstaternas ansvariga officiella organ använda eller bortförskaffa det förtecknade växtmaterial som avses i artikel 6.2, med lämplig kommunikation mellan ansvariga officiella organ för att alltid säkerställa sådan tillsyn och godkännande av ansvarigt officiellt organ i den medlemsstat där potatisen skall förpackas eller bearbetas med hänsyn till de anordningar för avfallshantering som avses i första och andra strecksatsen
  - i) När det gäller potatisknölar:
    - Användning som matpotatis avsedd för konsumtion och packad på platser med lämpliga anordningar för avfallshantering, klar för direkt leverans och användning utan ompaketering, samt avsedd för sådan direkt leverans och användning.
    - Användning som matpotatis avsedd för industriell bearbetning, och avsedd för direkt och omedelbar leverans till en bearbetningsanläggning som har lämpliga anordningar för avfallshantering.
    - Annan användning eller annat bortförskaffande, förutsatt att det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren sprids och under förutsättning att nämnda ansvariga officiella organ lämnat sitt tillstånd. Sådana åtgärder skall omedelbart meddelas kommissionen och de andra medlemsstaterna.
  - ii) I fråga om andra växtdelar, inklusive avfall från skaft och blad:
    - Destruktion.
    - Annan användning eller bortskaffande, förutsatt att det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren sprids. Sådana åtgärder skall meddelas kommissionen och andra medlemsstater.
3. Lämpliga metoder för att sanera de föremål som avses i artikel 6.3 skall vara rengöring och när så är lämpligt desinfektion, så att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren sprids. Metoderna skall tillämpas under övervakning av medlemsstaternas ansvariga officiella organ.
4. Den serie åtgärder som medlemsstaterna skall vidta inom det eller de avgränsade områden som upprättas i enlighet med artikel 5.1 a iv och 5.1 c iii och som avses i artikel 6.4 skall omfatta följande:
  - 4.1 Produktionsplatser som har förklarats nedsmittade i enlighet med artikel 5.1 a ii:
    - a) På fält eller enheter med skyddad växtproduktion som har förklarats angripna i enlighet med artikel 5.1 a ii, skall antingen

- i) under åtminstone de fyra odlingsår som följer på det år då fältet förklarades angripet,
- åtgärder vidtas för att utrota övervintrade potatis- och tomatplantor, liksom andra värdväxter för skadegöraren inklusive ogräs av familjen Solanaceae, och
  - följande skall inte planteras:
    - potatisknölar eller -plantor,
    - tomatplantor och -frön,
    - med hänsyn till skadegörarens biologiska egenskaper,
      - andra värdväxter,
      - plantor av arten Brassica, på vilka det finns en identifierad risk att organismen överlever,
    - grödor som medför en identifierad risk för att skadegöraren kommer att spridas,
  - under den första växtsäsongen för potatis eller tomater efter den period som fastställs i föregående strecksats, och på villkor att fältet har förklarats vara fritt från övervintrade potatis- och tomatplantor och andra värdväxter, inklusive ogräs av familjen Solanaceae under minst två på varandra följande odlingsår före plantering,
    - i fråga om potatis, officiellt godkänd utsädespotatis endast planteras för produktion av matpotatis och
    - en officiell undersökning omfattande tester, enligt vad som anges i artikel 2.1, genomförs,
  - under den växtsäsong för potatis eller tomater som följer på den som avses i föregående strecksats och efter en lämplig växtföljdscykel, skall det i fråga om potatis, för officiellt certifierad utsädespotatis som är avsedd för produktion av utsädespotatis eller av matpotatis och i fråga om potatis och tomater genomföras en officiell undersökning i enlighet med artikel 2.1,
- eller
- ii) under de fem odlingsåren som följer på det år då fältet förklarades nedsmittat skall
- åtgärder vidtas för att utrota övervintrande potatis- och tomatplantor och andra värdväxter för skadegöraren, inklusive ogräs av familjen Solanaceae och
  - fältet under de första tre åren läggas och bibehållas antingen i helträda eller med spannmål i enlighet med den identifierade risken eller med permanent betesmark som slås ofta respektive betas intensivt eller som gräs för utsädesproduktion, följt under de följande två åren av plantering av växter som inte är värdväxter för skadegöraren och som därmed inte utgör någon identifierad risk för att skadegöraren överlever eller sprids,
  - under den första växtsäsongen för potatis eller tomater efter den period som fastställs i föregående strecksats skall,
    - när det gäller potatis, officiellt certifierad utsädespotatis planteras för produktion av utsädes- eller matpotatis,och en officiell undersökning, inklusive tester, skall göras i enlighet med artikel 2.1.
- b) På andra fält
- skall under det odlingsår som följer på det år då fältet förklarades nedsmittat
    - antingen inga potatisknölar eller -plantor eller andra värdväxter för skadegöraren planteras och åtgärder vidtas för att på lämpligt sätt utrota övervintrade potatis- och tomatplantor och andra värdväxter inklusive ogräs av familjen Solanaceae, eller
    - när det gäller potatisknölar officiellt certifierad utsädespotatis endast få planteras för produktion av matpotatis, på villkor att de ansvariga officiella organen har förvissat sig om att risken för plantor från övervintrande potatis- och tomatplantor och andra värdväxter för skadegöraren, inklusive ogräs av familjen Solanaceae, har undanröjts; den växande

grödan skall besiktigas vid lämpliga tidpunkter, och övervintrade potatisplantor skall testas för att undersöka om skadegöraren finns närvarande; dessutom skall, vad gäller potatis, de skördade knölnarna besiktigas,

- skall under det första odlingsår som följer på det år som fastställs i första strecksatsen,
    - när det gäller potatis, endast officiellt certifierad utsädespotatis planteras för produktion av utsädespotatis eller av matpotatis,
  - skall under åtminstone det andra odlingsår som följer på det år som anges i första strecksatsen,
    - när det gäller potatis, endast officiellt certifierad utsädespotatis eller utsädespotatis som odlats under officiell kontroll och kommer från officiellt certifierad utsädespotatis planteras för produktion av utsädespotatis eller matpotatis,
  - skall, under vart och ett av de odlingsår som avses i de föregående strecksatserna, åtgärder vidtas för att utrota övervintrade potatis- och tomatplantor och andra värdväxter för skadegöraren, inklusive ogräs av familjen Solanaceae och en officiell undersökning genomförs i enlighet med artikel 2.1, och i de fall då utsädespotatis planteras för utsädesproduktion, skall tester av knölar genomföras.
- c) Omedelbart efter det att angreppet har konstaterats enligt artikel 5.1 a ii och under varje därpå följande odlingsår till och med den första växtsäsongen för potatis- eller tomatodling som tillåts på det eller de fält som förklarats angripna enligt punkt a,
- skall alla maskiner och lageranläggningar på produktionsplatsen som har använts i potatis- eller tomatproduktionen rengöras och, när så är lämpligt, desinfekteras med lämpliga metoder enligt punkt 3,
  - skall officiella kontroller av program för bevattning och duschning, inklusive ett förbud mot detta, införas enligt vad som är lämpligt, för att hindra att skadegöraren sprids.
- d) I en enhet med skyddad växtproduktion som har förklarats angripen i enlighet med artikel 5.1 a ii, där det är möjligt att fullständigt byta ut odlingssubstratet,
- skall inga potatisknölar eller -plantor eller andra värdväxter för skadegöraren inklusive tomatplantor och utsäde planteras, om inte den angivna enheten har underkastats officiellt övervakade åtgärder för att utrota skadegöraren och avlägsna allt material från värdväxter, inklusive åtminstone ett totalt byte av odlingssubstrat och rengöring och, där så är lämpligt, desinfektion av den angivna enheten och all utrustning, och därefter av de ansvariga officiella organen har godkänts för potatis- eller tomatproduktion, och
  - skall, när det gäller potatisproduktion, denna produktion komma från officiellt certifierad utsädespotatis, eller från miniknölar eller mikroplantor som härstammar från undersökta källor,
  - skall officiella kontroller om program för bevattning och duschning, inklusive ett förbud mot detta, införas enligt vad som är lämpligt, för att hindra att skadegöraren sprids.
- 4.2 Utan att det påverkar tillämpningen av åtgärderna i 4.1 skall medlemsstaterna inom det avgränsade området
- a) omedelbart, och under åtminstone tre vegetationsperioder efter det att området har förklarats nedsmittat
- aa) när det avgränsade området har fastställts enligt artikel 5.1 a iv,
- säkerställa övervakning genom sina ansvariga officiella organ av anläggningar där potatisknölar eller tomater odlas, lagras eller hanteras, och av anläggningar som bedriver entreprenadverksamhet med maskiner för potatis- och tomatproduktion,
  - kräva att maskiner och lager på sådana anläggningar rengörs och vid behov desinfekteras med lämpliga metoder enligt punkt 3,

- kräva att endast certifierat utsäde eller utsäde som odlats under officiell kontroll för alla potatisgrödor inom det området planteras, samt att utsädespotatis som har odlats på produktionsplatser som har fastställts som troligen angripna enligt artikel 5.1 a iii, testas efter skörden,
  - kräva att skördade partier av utsädespotatis hanteras åtskilda från matpotatisen på alla anläggningar inom området,
  - genomföra en officiell undersökning enligt artikel 2.1,
- ab) när ytvattnet har förklarats vara angripet enligt artikel 5.1 c ii eller kan finnas med bland de faktorer som kan sprida skadegöraren i enlighet med punkt 2 i bilaga V,
- genomföra en årlig undersökning vid lämplig tidpunkt, inklusive provtagning av ytvatten och ifrågakommande värdväxter av familjen Solanaceae i de relevanta vattnen och test i enlighet med
    - den relevanta metod som anges i bilaga II för det förtecknade växtmaterialet, eller
    - någon annan officiellt godkänd metod,
  - införa officiella kontroller av programmen för bevattning och duschning, inklusive ett förbud mot att vatten som förklarats angripet används för bevattning och duschning av förtecknat växtmaterial, och, när så är lämpligt, av andra värdväxter för att hindra att skadegöraren sprids; detta förbud kan tas upp till granskning igen mot bakgrund av resultaten från den nämnda årliga undersökningen,
  - när spillvattnets utlopp är angripna, införa officiella kontroller av avfallshantering från anläggningar för industriell bearbetning eller förpackning av förtecknat växtmaterial.
- b) upprätta ett program, när så är lämpligt, för att ersätta alla partier utsädespotatis under en lämplig tidsperiod.
-

*BILAGA VII*

De officiellt godkända anläggningar för avfallshantering som anges i punkt 1 fjärde strecksatsen i bilaga VI skall uppfylla kraven i följande bestämmelser så att risken för spridning av skadegöraren undanröjs:

- i) Avfall från bearbetningen av potatis och tomater (även kasserad potatis och skal och tomater) och allt annat fast avfall som hör ihop med potatis och tomater skall antingen hanteras genom
  - djup nedgrävning vid en avfallsanläggning där det inte finns någon risk för läckage till jordbruksmark eller kontakt med vattenkällor som skulle kunna användas vid bevattning av jordbruksmark. Avfallet skall föras direkt till platsen under så säkra villkor att det inte finns någon risk för att avfallet förloras, eller genom
  - förbränning.
- ii) Flytande avfall från bearbetningen: Innan det bortskaffas skall flytande avfall som innehåller uppslammade fasta ämnen genomgå filtrering eller sedimentering så att dessa fasta ämnen tas bort. Dessa ämnen skall bortförskaffas på det sätt som föreskrivs i punkt i.

Det flytande avfallet skall sedan antingen

— upphetas till minst 70°C under minst 30 minuter före bortskaffandet,

eller

— bortskaffas på annat sätt, förutsatt att det sker efter officiellt godkännande och under officiell kontroll så att det inte finns någon risk för att avfallet kan komma i kontakt med jordbruksmark eller vattenkällor som kan komma att användas för bevattning av jordbruksmark. Uppgifterna om detta skall meddelas de andra medlemsstaterna och kommissionen.

---