

31998L0057

21.8.1998

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

L 235/1

SMĚRNICE RADY 98/57/ES

ze dne 20. července 1998

o ochraně proti *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

RADA EVROPSKÉ UNIE,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství, a zejména na článek 43 této smlouvy,

s ohledem na návrh Komise ⁽¹⁾,

s ohledem na stanovisko Evropského parlamentu ⁽²⁾,

s ohledem na stanovisko Hospodářského a sociálního výboru ⁽³⁾,

vzhledem k tomu, že škodlivý organismus *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. byl dříve znám pod názvem *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith; že název *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. se pravděpodobně stane obecně uznávaným označením pro tento škodlivý organismus; že v této směrnici by mělo být k tomuto vědeckému vývoji přihlédnuto;

vzhledem k tomu, že produkce brambor a rajčat zaujímá v zemědělství Společenství důležité místo; že výnosy brambor a rajčat jsou však stále ohrožovány škodlivými organismy;

vzhledem k tomu, že ochranou kultur brambor a rajčat proti takovým škodlivým organismům se má nejen zachovat produkční kapacita, nýbrž i zvýšit produktivita zemědělství;

vzhledem k tomu, že ochranná opatření proti zavlečení škodlivých organismů na území některého členského státu by měla jen omezený účinek, pokud by se v boji proti těmto organismům nepostupovalo současně a systematicky v celém Společenství a nebylo učiněno vše potřebné k zabránění jejich šíření;

vzhledem k tomu, že jedním z organismů škodlivých pro brambory a rajčata je patogen *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. způsobující bakteriální hnědou hnilobu brambor a bakteriální vadnutí brambor a rajčat; že tato choroba se vyskytla v některých částech Společenství a dosud existují omezená ohniska infekce;

vzhledem k tomu, že pěstování brambor a rajčat je v celém Společenství silně ohroženo, pokud u těchto kultur nebudou přijata účinná opatření, aby se zjistilo místo výskytu a rozsah rozšíření tohoto organismu, zabránilo jeho výskytu a šíření a, v případě zjištění jeho výskytu, aby se zabránilo jeho šíření a byl potlačován s cílem jeho vyhubení;

vzhledem k tomu, že je proto třeba ve Společenství přijmout určitá opatření; že kromě toho musí být členským státům umožněno přijmout v nezbytných případech doplňující nebo přísnější opatření za předpokladu, že tím nebude bráněno pohybu brambor a rajčat uvnitř Společenství, kromě případů upravených směrnicí Rady 77/93/EHS ze dne 21. prosince 1976 o ochranných opatřeních proti zavlečení organismů škodlivých rostlinám nebo rostlinným produktům do členských států ⁽⁴⁾; že tato opatření musí být oznámena ostatním členským státům a Komisi;

vzhledem k tomu, že u těchto opatření je třeba vzít v úvahu, že ke zjištění, kde se patogen vyskytuje, jsou nezbytné systematické úřední průzkumy; že tyto průzkumy by měly zahrnovat prohlídky a případně i odběry vzorků a testy, jelikož tento škodlivý organismus může za určitých podmínek latentně přežívat jak v porostech brambor, tak v uskladněných bramborových hlízách, aniž by byl objeven; že šíření tohoto patogenu uvnitř porostu není nejvýznamnějším faktorem, ale že se tento patogen může šířit i povrchovou vodou a prostřednictvím volně rostoucích rostlin z čeledi lilkovitých, a proto zavlažování porostů brambor a rajčat kontaminovanou vodou představuje nebezpečí infekce pro tyto kultury; že tento patogen může také přežít zimu v plevelných rostlinách brambor a rajčat, což představuje zdroj infekce od jednoho vegetačního období k druhému; že k šíření tohoto patogenu dochází i kontaminací brambor po dotyku s infikovanými bramborami nebo se sázecími, sklízecími a přepravními zařízeními a skladovacími nebo přepravními kontejnery kontaminovanými předchozím dotykem s napadenými bramborami;

⁽¹⁾ Úř. věst. C 124, 21.4.1997, s. 12 a Úř. věst. C 108, 7.4.1998, s. 85.

⁽²⁾ Úř. věst. C 14, 19.1.1998, s. 34.

⁽³⁾ Úř. věst. C 206, 7.7.1997, s. 57.

⁽⁴⁾ Úř. věst. L 26, 31.1.1977, s. 20. Směrnice naposledy pozměněná směrnicí Komise 98/2/ES (Úř. věst. L 15, 21.1.1998, s. 34).

vzhledem k tomu, že šíření tohoto patogenu je možno omezit nebo mu zabránit dezinfikováním takových předmětů; že pokud se takto infikují sadbové brambory, hrozí značné nebezpečí, že se patogen rozšíří; obdobně latentní infekce sadbových brambor představuje značné nebezpečí rozšíření patogenu, kterému je možné se vyvarovat použitím sadbových brambor vyprodukovaných v rámci úředně schváleného programu, který zaručuje, že byly zkontrolovány a shledány prostými napadení;

vzhledem k tomu, že současné znalosti o biologii a epidemiologii *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. jsou v podmínkách Evropy neúplné, takže již dnes lze předpokládat, že za několik let bude nutné navrhovaná opatření přezkoumat; že rovněž lze očekávat, že na základě dalších výzkumů budou zlepšovány testovací metody, zejména co do citlivosti a selektivity, tak, aby byly zvoleny a jednotně upraveny ty nejlepší z dostupných testovacích metod;

vzhledem k tomu, že pro stanovení podrobností těchto obecných opatření i pro přijetí přísnějších nebo doplňkových opatření členskými státy za účelem toho, aby zabránily zavlečení patogenu na jejich území, je žádoucí, aby členské státy úzce spolupracovaly s Komisí v rámci Stálého rostlinolékařského výboru (dále jen „výbor“),

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Tato směrnice upravuje opatření proti *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., dříve známému pod názvem *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith (dále jen „škodlivý organismus“), která je třeba v členských státech přijmout a jejichž cílem, pokud jde o hostitelské rostliny uvedené v příloze I oddíle 1 (dále jen „uvedený rostlinný materiál“), je:

- a) zjistit místa výskytu a rozsah rozšíření organismu;
- b) zabránit výskytu a šíření organismu a
- c) v případě zjištění výskytu organismu zabránit jeho šíření a provádět ochranná opatření s cílem jeho vyhubení.

Článek 2

1. Členské státy provádějí každý rok systematické úřední průzkumy, zda se organismus vyskytuje v uvedeném rostlinném materiálu pocházejícím z jejich území. Za účelem zjištění jiných možných zdrojů infekce ohrožujících produkci uvedeného rostlinného materiálu provedou členské státy v oblastech, v nichž je uvedený rostlinný materiál produkován, hodnocení rizika, a pokud při tomto hodnocení bude zjištěno nebezpečí šíření organismu, provedou cílené úřední průzkumy na rostlinách, které nepatří k uvedenému rostlinnému materiálu, včetně planých lílkovitých hostitelských rostlin, v povrchové vodě používané pro zavlažování nebo postřik uvedeného rostlinného materiálu a v odpadních vodách vypouštěných průmyslovými zařízeními pro zpracování nebo balírny uvedeného rostlinného materiálu, které jsou používány k zavlažování nebo postřik uvedeného rostlinného materiálu. Rozsah těchto cílených průzkumů se stanoví v závislosti na zjištěném riziku. Členské státy mohou rovněž provádět úřední průzkumy organismu u jiného materiálu, jako je pěstební substrát, zemina a pevný odpad z průmyslových zařízení pro zpracování nebo z balíren.

2. Úřední průzkumy podle odstavce 1 se provádějí:

- a) u uvedeného rostlinného materiálu podle přílohy I oddílu II bodu 1;
- b) u hostitelských rostlin jiných než uvedený rostlinný materiál a u vody a odpadních vod pomocí vhodných postupů; případně se odeberou vzorky, které jsou podrobeny úřednímu nebo úředně kontrolovanému laboratornímu testování;
- c) v případě potřeby u jiného materiálu pomocí vhodných postupů.

Další podrobnosti kontrolních prohlídek, počet, původ a složení vzorků, jakož i časový rozvrh jejich odběru v rámci těchto průzkumů stanoví příslušné úřední subjekty ve smyslu směrnice 77/93/EHS na základě uznávaných vědeckých a statistických zásad, biologie organismu a s přihlédnutím k produkčním systémům používaným v dotyčném členském státu pro uvedený rostlinný materiál, případně i pro jiné hostitelské rostliny.

3. Podrobnosti a výsledky úředních průzkumů uvedených v odstavci 1 se každoročně oznamují členským státům a Komisi v souladu s přílohou I oddílem II bodem 2. Tato oznámení se předkládají do 1. června, kromě farmářské sady brambor, u které se oznámení předkládá do 1. září. Podrobnosti a výsledky týkající se porostů se musí vztahovat na produkci předchozího roku. Podrobnosti oznámení mohou být předloženy výboru.

4. Postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS se stanoví:

— vhodné metody průzkumů a laboratorní testování podle odst. 2 prvního pododstavce písm. b).

5. Postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS je možno stanovit:

— vhodné metody průzkumů podle odst. 2 prvního pododstavce písm. c),

— další podrobnosti průzkumů podle odst. 2 druhého pododstavce, aby byla zaručena srovnatelná úroveň záruk mezi členskými státy.

Článek 3

Členské státy zajistí, že podezření z výskytu tohoto škodlivého organismu nebo jeho potvrzení na jejich území bude ohlášeno jejich příslušným úředním subjektům.

Článek 4

1. V případě podezření z výskytu zajistí příslušné úřední subjekty dotyčného členského státu, že uvedený rostlinný materiál bude podroben úřednímu nebo úředně kontrolovanému laboratornímu testování k potvrzení nebo vyvrácení podezření z výskytu, které budou provedeny podle příslušné metody popsané v příloze II a v souladu s podmínkami přílohy III bodem 1, a ve všech ostatních případech podle jiných úředně schválených metod. Potvrdí-li se podezření, uplatní se požadavky stanovené v příloze III bodě 2.

2. Do potvrzení nebo vyvrácení podezření z výskytu podle odstavce 1 musí příslušné úřední subjekty členského státu v každém případě podezření, kdy:

i) byly zjištěny symptomy choroby způsobené tímto organismem a rychlý screeningový test podle přílohy II oddílu I bodu 1 a oddílu II byl pozitivní nebo

ii) výsledek screeningového testu podle přílohy II oddílu I bodu 2 a oddílu III byl pozitivní,

ve vztahu k vlastní produkci

a) zakázat přemísťování rostlin a hlíz ze všech porostů, partií nebo zásilek, ze kterých byly odebrány vzorky, ledaže by se přemísťování uskutečnilo pod jejich dohledem a pokud prokazatelně neexistuje nebezpečí rozšíření škodlivého organismu;

b) provést kroky ke zjištění původu podezřelého výskytu;

c) přijmout další vhodná preventivní opatření na základě odhadu rizika, zejména ve vztahu k produkci uvedeného rostlinného materiálu a k přemísťování jiných partií sadbových brambor než těch uvedených v písmenu a), které byly vyprodukovány v místě produkce, z kterého byly odebrány vzorky uvedené v písmenu a), aby se zabránilo šíření tohoto škodlivého organismu.

3. V případě podezření z výskytu, kdy existuje nebezpečí kontaminace uvedeného rostlinného materiálu nebo povrchové vody z jiného nebo do jiného členského státu, oznámí ten členský stát, ve kterém bylo podezření ohlášeno, druhému členskému státu resp. ostatním členským státům neprodleně podrobnosti týkající se tohoto podezření v souladu se zjištěným nebezpečím, a dotyčné členské státy budou vhodným způsobem spolupracovat. Tímto způsobem informovaný(é) členský(é) stát(y) přijme(ou) preventivní opatření podle odst. 2 písm. c), případně i další opatření podle odstavců 1 a 2.

4. Postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS je možno stanovit:

— opatření uvedená v odst. 2 písm. c).

Článek 5

1. Potvrdí-li se úředním nebo úředně kontrolovaným testováním, které bylo provedeno u uvedeného rostlinného materiálu podle příslušné metody popsané v příloze II, nebo ve všech ostatních případech podle jiných úředně schválených metod, výskyt tohoto organismu v jednom vzorku odebraném podle této směrnice, musí příslušné úřední subjekty členského státu s ohledem na uznávané vědecké zásady, biologii organismu a produkční, tržní a zpracovatelské systémy používané pro hostitelské rostliny organismu:

a) ohledně uvedeného rostlinného materiálu

i) zjistit rozsah a prvotní zdroje napadení podle přílohy IV a provést další testování podle čl. 4 odst. 1 alespoň u všech klonově příbuzných porostů sadbových brambor;

- ii) prohlásit za napadený uvedený rostlinný materiál, zásilku a/nebo partii, z nichž byly odebrány vzorky, a stroje, dopravní prostředky, přepravní kontejnery, skladovací prostory nebo jejich části jakož i všechny ostatní předměty, včetně obalového materiálu, které přišly do styku s uvedeným rostlinným materiálem, z něhož byly odebrány vzorky; prohlásit rovněž za napadené, je-li to třeba, pole, jednotky s chráněnou produkcí plodin a místa produkce, ze kterých byl uvedený rostlinný materiál sklizen a ze kterých byly odebrány vzorky; u vzorků, které byly odebrány během vegetačního období, prohlásit pole, místa produkce a případně i jednotky s chráněnou produkcí plodin, ze kterých byly odebrány vzorky, za napadené;
- iii) zjistit rozsah pravděpodobného napadení v důsledku kontaktu před nebo po sklizni, během produkce, zavlažování nebo postřiku anebo z důvodu klonové příbuznosti s materiálem prohlášeným za napadený podle přílohy V bodu 1;
- iv) vymezit zónu podle přílohy V bodu 2 podbodů i) na základě prohlášení o napadení podle bodu ii), zjištění rozsahu pravděpodobného napadení podle bodu iii) a možného rozšíření tohoto organismu;
- b) ohledně jiných porostů hostitelských rostlin než těch uvedených v písmenu a), jimiž by mohla být ohrožena produkce uvedeného rostlinného materiálu:
- i) provést šetření podle písm. a) bodu i);
- ii) prohlásit za napadené hostitelské rostliny tohoto organismu, ze kterých byl odebrán vzorek;
- iii) zjistit rozsah pravděpodobného napadení podle písm. a) bodu iii) a vymezit zónu podle písm. a) bodu iv), pokud jde o produkci uvedeného rostlinného materiálu;
- c) ohledně povrchové vody (včetně odpadních vod z průmyslových zařízení na zpracování nebo balíren uvedeného rostlinného materiálu) a volně rostoucích hostitelských rostlin z čeledi lilkovitých, kterými by při zavlažování, postřiku nebo zaplavení povrchovou vodou mohla být ohrožena produkce uvedeného rostlinného materiálu:
- i) provést ve vhodných termínech na základě vzorků povrchové vody a případně volně rostoucích hostitelských rostlin z čeledi lilkovitých šetření, včetně úředního průzkumu, za účelem stanovení rozsahu napadení;
- ii) prohlásit dle závažnosti a na základě šetření podle bodu i) povrchovou vodu za kontaminovanou;
- iii) zjistit rozsah pravděpodobného napadení a vymezit zónu na základě prohlášení o napadení podle bodu ii) a možného rozšíření tohoto organismu podle přílohy V bodu 1 a bodu 2 podbodů i).

2. Členské státy neprodleně oznámí ostatním členským státům a Komisi podle přílohy V bodu 3 každé prohlášení o napadení podle odst. 1 písm. a) bodu ii) a odst. 1 písm. c) bodu ii) a podrobné informace o vymezení zóny podle odst. 1 písm. a) bodu iv), případně podle odst. 1 písm. c) bodu iii). Podrobnosti oznámení podle tohoto odstavce mohou být předloženy výboru.

Současně členské státy předloží Komisi doplňkové oznámení podle přílohy V bodu 4. Podrobnosti oznámení podle tohoto pododstavce se neprodleně předloží členům výboru.

3. Na základě oznámení podle odstavce 2 a v něm obsažených údajů provedou ostatní v oznámení uvedené členské státy šetření podle odst. 1 písm. a) bodu i), případně odst. 1 písm. c) bodu i) a přijmou další vhodná opatření v souladu s odstavci 1 a 2.

Článek 6

1. Členské státy stanoví, že uvedený rostlinný materiál, který byl podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu ii) prohlášen za napadený, nesmí být vysázen a že pod dohledem a se schválením příslušných úředních subjektů je podroben některému z opatření uvedených v příloze VI bodu 1 tak, aby bylo zaručeno, že neexistuje žádné prokazatelné nebezpečí rozšíření organismu.

2. Členské státy stanoví, že uvedený rostlinný materiál, který byl podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu iii) a písm. c) bodu iii) prohlášen za pravděpodobně napadený, včetně uvedeného rostlinného materiálu, u kterého bylo zjištěno riziko a který byl vyprodukován v místech produkce prohlášených za pravděpodobně napadená podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu iii), nesmí být vysázen, a že pod dohledem příslušných úředních subjektů je vhodným způsobem použit nebo zlikvidován podle přílohy VI bodu 2 tak, aby bylo zaručeno, že neexistuje žádné prokazatelné nebezpečí rozšíření organismu.

3. Členské státy stanoví, že stroje, dopravní prostředky, přepravní kontejnery, skladovací prostory nebo jejich části, jakož i všechny ostatní předměty, včetně obalového materiálu, které byly podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu ii) prohlášený za napadené nebo podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu iii) a písm. c) bodu iii) prohlášený za pravděpodobně napadené, budou vhodným způsobem zničeny nebo dekontaminovány podle přílohy VI bodu 3. Po dekontaminaci se tyto předměty již nepovažují za napadené.

4. Aniž jsou dotčena opatření přijatá podle odstavců 1, 2 a 3, členské státy stanoví, že v zóně vymezené podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu iv) a písm. c) bodu iii) bude přijat soubor opatření uvedených v příloze VI bodech 4.1 a 4.2. Podrobnosti těchto opatření se každoročně sdělují ostatním členským státům a Komisi. Podrobnosti tohoto oznámení mohou být předloženy výboru.

Článek 7

1. Členské státy stanoví, že sadbové brambory musí splňovat požadavky směrnice 77/93/EHS a pocházet v přímé linii z materiálu brambor, který byl získán v rámci úředně schváleného programu a na základě úředního nebo úředně kontrolovaného testování podle příslušné metody popsané v příloze II byl shledán prostým tohoto organismu.

Členské státy provádějí toto testování:

- a) v případech, kdy výskyt organismu ve vlastní produkci sadbových brambor byl potvrzen:
 - i) při testování předcházejících generací, včetně výchozího klonového materiálu a při systematickém testování klonů základního sadbového materiálu nebo
 - ii) v případech, ve kterých prokazatelně není žádná klonová příbuznost, při testování všech klonů základního sadbového materiálu nebo předcházejících generací, včetně výchozího klonového materiálu a
- b) v jiných případech buď u každé rostliny výchozího klonového materiálu nebo u reprezentativních vzorků ze základního sadbového materiálu nebo předcházejících generací.

2. Postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS je možno přijmout:

- prováděcí pravidla k odst. 1 druhému pododstavci písm. a),
- pravidla týkající se reprezentativních vzorků uvedených v odst. 1 druhém pododstavci písm. b).

Článek 8

Členské státy zakáží držení tohoto organismu a manipulaci s ním.

Článek 9

Aniž jsou dotčena ustanovení směrnice 77/93/EHS, mohou členské státy v souladu se směrnicí Komise 95/44/ES⁽¹⁾ pro pokusné nebo vědecké účely a pro práci ve šlechtění odrůd povolit odchylky z opatření uvedených v člancích 6 a 8 této směrnice.

Článek 10

Členské státy mohou pro svou vlastní produkci přijmout doplňující nebo přísnější opatření k boji proti tomuto organismu nebo k zabránění jeho rozšíření, pokud budou v souladu s ustanoveními směrnice 77/93/EHS.

Podrobnosti těchto opatření se každoročně oznamují ostatním členským státům a Komisi. Podrobnosti tohoto oznámení mohou být předloženy výboru.

Článek 11

Změny příloh této směrnice, nezbytné s ohledem na vývoj vědeckých a technických poznatků, se přijímají postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS. Pokud jde o metody popsané v příloze II a opatření uvedená v příloze VI bodech 4.1 a 4.2 této směrnice, vypracuje Komise zprávu o přezkoumání těchto metod a opatření na základě získaných zkušeností a předloží ji výboru do 1. ledna 2002.

Článek 12

1. Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 21. srpna 1999. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Tato opatření přijatá členskými státy musí obsahovat odkaz na tuto směrnici nebo musí být takový odkaz učiněn při jejich úředním vyhlášení. Způsob odkazu si stanoví členské státy.

2. Členské státy neprodleně sdělí Komisi hlavní ustanovení vnitrostátních právních předpisů, které přijmou v oblasti působnosti této směrnice. Komise o nich uvědomí ostatní členské státy.

⁽¹⁾ Úř. věst. L 184, 3.8.1995, s. 34. Směrnice naposledy pozměněná směrnicí Komise 97/46/ES (Úř. věst. L 204, 31.7.1997, s. 43).

Článek 13

V Bruselu dne 20. července 1998.

Tato směrnice vstupuje v platnost dnem vyhlášení v *Úředním věstníku Evropských společenství*.

Za Radu
předseda

Článek 14

Tato směrnice je určena členskými státy.

W. MOLTERER

PŘÍLOHA I

ODDÍL I

Seznam hostitelských rostlin *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. uvedených v článku 1

Rostliny <i>Solanum tuberosum</i> L. (včetně hlíz) kromě semen	brambor
Rostliny <i>Lycopersicon lycopersicum</i> (L.) Karsten ex Farw. kromě plodů a semen	rajče

ODDÍL II

Průzkum

1. Úřední průzkumy podle čl. 2 odst. 2 písm. a) se řídí biologií organismu a zvláštními produkčními systémy v dotyčných členských státech a zahrnují:
 - i) u brambor
 - prohlídku porostu ve vhodných termínech v době růstu a/nebo odběr vzorků sadbových a ostatních brambor během vegetačního období nebo ve skladech. Tyto vzorky se podrobí úřední nebo úředně kontrolované prohlídce, při níž se hlízy rozřezávají, a
 - u sadbových a případně ostatních brambor úřední nebo úředně kontrolované laboratorní testování podle metody popsané v příloze II;
 - ii) u rajčat
 - prohlídku porostu ve vhodných termínech alespoň u rostlin v době růstu určených pro profesionální použití k opětovnému sázení.
2. Oznámení úředních průzkumů uvedených v čl. 2 odst. 3 obsahuje:
 - i) v případě průzkumů brambor:
 - odhadovanou celkovou pěstební plochu v hektarech pro sadbové a ostatní brambory,
 - roztřídění na sadbové brambory (různých kategorií) a konzumní brambory, a případně podle regionů,
 - počet a časový rozvrh odběrů vzorků pro testování,
 - počet prohlídek na poli,
 - počet a velikost vzorků u vizuálních prohlídek hlíz;
 - ii) v případě průzkumů rajčat, alespoň u rostlin v době růstu určených pro profesionální použití k opětovnému sázení:
 - odhadovaný celkový počet rostlin,
 - počet vizuálních prohlídek;
 - iii) v případě průzkumů jiných hostitelských rostlin než brambor a rajčat včetně volně rostoucích hostitelských rostlin z čeledi lilkovitých:
 - druh,
 - počet a datum odběrů vzorků,
 - plocha nebo vodní tok, odkud byly odebrány vzorky,
 - analytická metoda;
 - iv) v případě průzkumů vodních zdrojů a odpadních vod z průmyslových zařízení na zpracování a z balíren:
 - počet a datum odběrů vzorků,
 - plocha, vodní tok nebo umístění provozů, odkud byly odebrány vzorky,
 - analytická metoda.

PŘÍLOHA II

TESTOVACÍ SCHÉMA PRO DIAGNÓZU, DETEKCI A IDENTIFIKACI *RALSTONIA SOLANACEARUM*
(SMITH) YABUUCHI ET AL.

OBLAST POUŽITÍ TESTOVACÍHO SCHÉMATU

V tomto schématu se popisují různé druhy postupů pro:

- i) diagnózu bakteriální hnědé hniloby hlíz bramboru a bakteriálního vadnutí rostlin bramboru a rajčete;
- ii) detekci *Ralstonia solanacearum* ve vzorcích hlíz bramboru;
- iii) identifikaci *Ralstonia solanacearum*.

V dodatcích je podrobně vysvětlena příprava materiálů k testům, tzn. pěstebních substrátů, pufřů, roztoků a činidel.

OBSAH

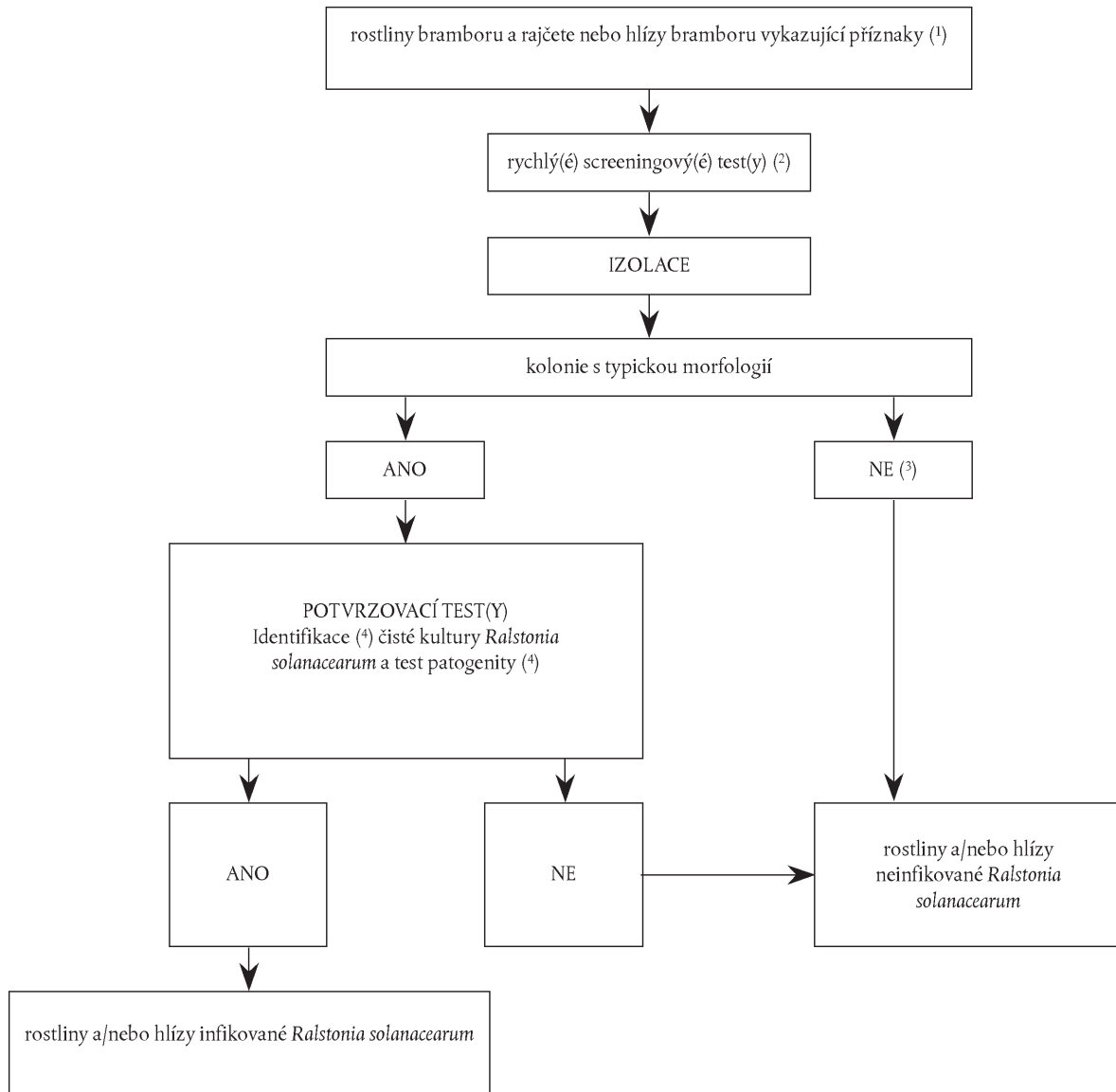
ODDÍL I:	Použití testovacího schématu	383
	1. Diagnóza bakteriální hnědé hniloby hlíz bramboru a bakteriálního vadnutí rostlin bramboru a rajčete	383
	2. Detekce a identifikace <i>Ralstonia solanacearum</i> ve vzorcích hlíz bramboru	385
ODDÍL II:	Diagnóza bakteriální hnědé hniloby hlíz bramboru a bakteriálního vadnutí rostlin bramboru a rajčete	387
	1. Příznaky	387
	2. Rychlý(é) screeningový(é) test(y)	387
	3. Postup při izolaci.	388
	4. Potvrzovací test(y)	388
ODDÍL III:	Detekce a identifikace <i>Ralstonia solanacearum</i> ve vzorcích hlíz bramboru	391
	1. Příprava vzorku pro testování	391
	2. Imunofluorescenční test (IF test)	392
	3. ELISA test (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay test)	394
	4. PCR test (polymerázová řetězová reakce).	394
	5. Kultivace na selektivních živných médiích	396
	6. Biotest	397
	7. Obohacovací testy	397
	8. Test patogenity	397
Dodatek 1	Živná média pro izolaci a kultivaci <i>Ralstonia solanacearum</i>	398
Dodatek 2	Materiál pro přípravu vzorku	399
Dodatek 3	Materiál pro IF test	400
Dodatek 4	Stanovení stupně kontaminace v IF testu	401
Dodatek 5	Materiál pro ELISA test	402
Dodatek 6	Materiál pro PCR test	403
Dodatek 7	Materiál pro test na selektivních živných médiích a obohacovací test	403
Literatura	404

ODDÍL I
 POUŽITÍ TESTOVACÍHO SCHÉMATU

1. **Diagnóza bakteriální hnědé hniloby hlíz bramboru a bakteriálního vadnutí rostlin bramboru a rajčete**

Testovací postup je určen pro hlízy bramboru, které vykazují typické příznaky bakteriální hnědé hniloby nebo příznaky vyvolávající podezření z jejího výskytu, a pro rostliny bramboru a rajčete, které vykazují typické příznaky bakteriálního vadnutí nebo příznaky vyvolávající podezření z jeho výskytu. Zahrnuje rychlý screeningový test, izolaci původce z infikovaného vodivého pletiva na diagnostických médiích a, při pozitivním nález, identifikaci kultury jako *Ralstonia solanacearum*.

Postupový diagram



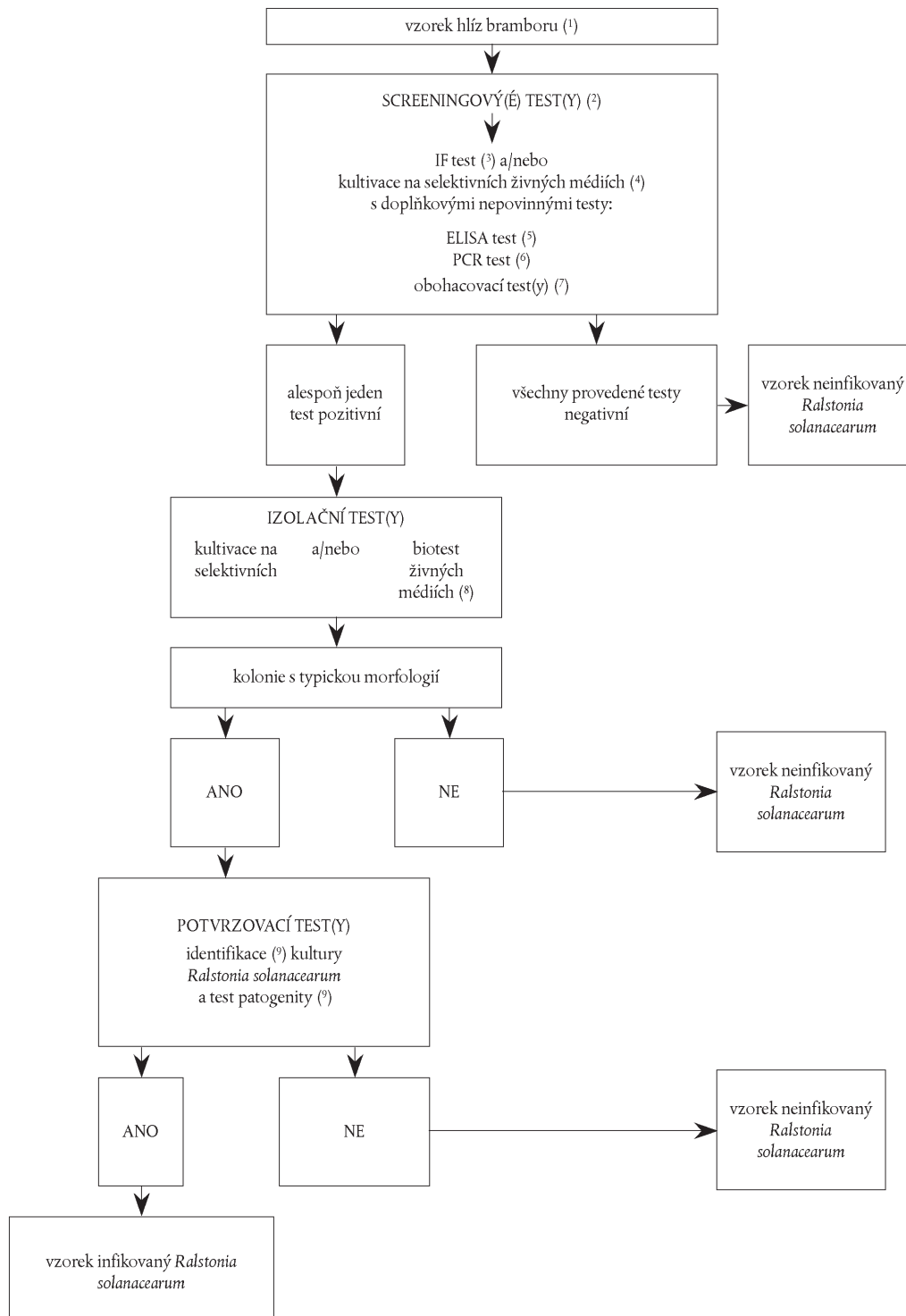
Poznámky k postupovému diagramu

- (¹) Popis příznaků v oddílu II.1.
- (²) Rychlé screeningové testy usnadňují předběžnou diagnózu.
Vhodnými testy jsou:
— test na výtok slizu z cévních svazků (oddíl II.2),
— test na přítomnost granulí poly- β -hydroxybutyrátu (oddíl II.2),
— IF test (oddíl III.2),
— ELISA test (oddíl III.3),
— PCR test (oddíl III.4).
- (³) Ačkoliv je izolace původce hnědé hniloby z rostlinného materiálu s typickými příznaky metodou zředovacích roztěrů poměrně jednoduchá, může zakládání kultivace v pokročilých stádiích infekce selhat. Saprophytické bakterie rostoucí na nemocné tkáni mohou přerůst původce na izolačním médiu nebo bránit jeho růstu. Je-li izolační test negativní, přestože existují typické příznaky choroby, je třeba izolaci opakovat, přednostně kultivací na selektivních živných médiích.
- (⁴) Pro spolehlivou identifikaci čisté kultury *Ralstonia solanacearum* je nezbytné provést alespoň jeden z testů uvedených v oddílu II.4.1 v kombinaci s testem patogenity (oddíl II.4.3). Charakteristika kmene není povinná, doporučuje se však pro každý nový případ.

2. Detekce a identifikace *Ralstonia solanacearum* ve vzorcích hlíz bramboru

Testovací postup je určen k detekci latentních infekcí v hlízách bramboru jedním nebo lépe několika screeningovými testy, které se při pozitivním nálezu potvrdí izolací patogenu. V případě izolace typických kolonií se čistá kultura identifikuje jako *Ralstonia solanacearum*.

Postupový diagram



Poznámky k postupovému diagramu

(1) Velikost vzorku

Standardní velikost vzorku je 200 hlíz. Metoda je však vhodná i pro vzorky s méně než 200 hlízami.

(2) Screeningový(é) test(y)

Jediný test nemusí být dostatečně citlivý nebo spolehlivý k detekci *Ralstonia solanacearum* v jednom vzorku. Proto se doporučuje provedení několika testů založených pokud možno na rozdílných biologických principech.

(3) Imunofluorescenční test (IF test)

IF test je osvědčeným screeningovým testem. To je výhodou oproti jiným testům, které ještě nejsou plně vyvinuty nebo ověřeny. Test se používá pro mnoho jiných karanténních bakterií, např. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Podle parametrů udávaných pro tuto metodu se jedná o citlivý test (hranice detekovatelnosti 10^3 – 10^4 buněk v 1 ml pelety z bramborového extraktu).

Rozhodujícím faktorem pro spolehlivost výsledku testu je kvalita antiséra. Přijatelné je jen antisérum s vysokým titrem (nejméně 2 000 u surového antiséra) a všechny testy musí být prováděny při antisérovém titru nebo při jednom ředění pod úroveň titru. Upřednostňuje se nepřímá metoda. Přímou metodu lze použít, pokud citlivost a specifčnost testu jsou rovnocenné citlivosti a specifčnosti nepřímé metody.

IF test má výhodu subjektivního vyhodnocení buněčné morfologie a intenzity fluorescence, které vypovídají o specifčnosti reakce. Časté jsou křížové reakce se sérologicky příbuznými bakteriemi se stejnou buněčnou morfologií jako *Ralstonia solanacearum*, které pocházejí z půdy nebo ulpívají na hlíze. IF test lze provádět jako jediný screeningový test, pokud však existuje podezření na výskyt křížové reakce, měl by být proveden další test založený na jiném biologickém principu. V takovém případě je nevhodnější kultivace na selektivních živných médiích.

(4) Kultivace na selektivních živných médiích

S modifikovaným médiem SMSA a metodologií testování používanou při této metodě se jedná o citlivý a selektivní test na *Ralstonia solanacearum*. Výsledek je k dispozici za 3–6 dnů po přípravě vzorku. Původce choroby se získá přímo v kultuře a lze jej snadno identifikovat. Má-li se plně využít potenciálu tohoto testu, je třeba pečlivě připravit pupkovou část hlíz, aby byly vyloučeny sekundární bakterie z hlíz, které si na médiu konkurují s *Ralstonia solanacearum* a mohly by tak ovlivňovat vývoj patogenu. Některé kmeny mohou kromě toho špatně růst, jelikož složky živného média mohou mít též vliv na cílový organismus. Rovněž je třeba pečlivě rozlišovat *Ralstonia solanacearum* od jiných bakterií, které by se na médiu mohly vyvíjet. Selektivní plotnový roztěr lze použít jako jediný screeningový test, avšak při negativním výsledku testu, u něž je podezření, že k němu došlo inhibicí *Ralstonia solanacearum* jinými bakteriemi v médiu, by měl být proveden druhý screeningový test. V takových případech je nevhodnější IF test.

(5) ELISA test

ELISA test je v zásadě méně citlivý než IF test (hranice detekovatelnosti 10^4 – 10^5 buněk v 1 ml pelety z bramborového extraktu). Je levný a rychlý, obecně však vykazuje spíše falešné pozitivní výsledky (křížové reakce) a falešné negativní výsledky (inhibice fenolovými molekulami v bramborovém extraktu). Požadavky na specifčnost antiséra jsou mimořádně vysoké. ELISA test nelze provést jako jediný screeningový test.

(6) PCR test

PCR test je potenciálně velmi citlivý detekční test, i když může být snadno inhibován složkami extraktu z rostlin nebo hlíz, které vedou k falešným negativním výsledkům. Některé odrůdy brambor obsahují více inhibitorů než jiné. Proto je třeba tyto inhibitory odstranit. Jednou z možností je zředění, přitom však dojde i ke zředění populací *Ralstonia solanacearum*. Ve všech fázích přípravy vzorku a testu musí být postupováno velmi pečlivě, aby se zabránilo kontaminaci, která by vedla k falešným pozitivním výsledkům. Falešné pozitivní výsledky by se mohly vyskytnout i v důsledku homologních sekvencí jiných organismů. Proto nelze PCR test používat jako jediný screeningový test.

(7) Obohacovací test

Inkubace vzorku pelety z bramborového extraktu v semiselektivním tekutém médiu, např. v modifikovaném SMSA tekutém médiu, umožňuje množení *Ralstonia solanacearum*. Ještě důležitější je možná skutečnost, že se tímto způsobem zároveň zředí i potenciální inhibitory testů ELISA a PCR. *Ralstonia solanacearum* lze tak v obohaceném bujónu detekovat pomocí IF testu, ELISA testu nebo PCR testu. Přímé roztěry z obohaceného tekutého média se nedoporučují. Tyto obohacovací metody nebyly dostatečně vyzkoušeny a otestovány. Jsou zde zahrnuty pouze pro jejich vysoký potenciál. Pro nedostatek zkušeností je však nelze použít jako jedinou detekční metodu.

(8) Biotest

Tento test se používá pro izolaci *Ralstonia solanacearum* z pelet bramborového extraktu selektivním obohacením na hostitelské rostlině a lze jej provést na rostlinách rajčete nebo na rostlinách lilku vejcoplodého. Vyžaduje optimální inkubační podmínky podle návodů uvedených u této metody. Bakterie, které inhibují *Ralstonia solanacearum* na živném médiu SMSA, tento test s největší pravděpodobností neovlivňují.

(9) Potvrzovací test(y)

Čistou kulturu *Ralstonia solanacearum* lze spolehlivě identifikovat alespoň jedním z testů uvedených v oddílu II.4.1 v kombinaci s testem patogenity (oddíl II.4.3). Charakteristika kmene není povinná, doporučuje se však pro každý nový případ.

ODDÍL II

DIAGNÓZA BAKTERIÁLNÍ HNĚDÉ HNILOBY HLÍZ BRAMBORU A BAKTERIÁLNÍHO VADNUTÍ ROSTLIN BRAMBORU A RAJČETE

1. Příznaky

1.1 Příznaky napadení u brambor

Rostlina bramboru. V rané fázi infekce listy na vrcholu rostliny při vysokých teplotách ve dne vadnou a v noci se regenerují. Vadnutí se rychle stane nevratným a vede k odumírání rostliny. Vodivá pletiva v příčně rozříznutých stoncích zvadlých rostlin jsou hnědě zbarvená, na řezu vytéká nebo lze snadno vytlačit mléčný exsudát. Při ponoření rozříznutého stonku do vody ve svislé poloze vytékají z cévních svazků slizová vlákna.

Hlíza bramboru. Bramborové hlízy se na pupkové části rozříznou napříč. V rané fázi infekce má prstenec cévních svazků sklovitě žluté až světle hnědé zbarvení a po několika minutách z něj samovolně nebo po lehkém stisknutí slupky v blízkosti řezné plochy vytéká bledý exsudát krémové barvy. Zbarvení je později zřetelně hnědé a nekróza se může rozšířit až do parenchymatického pletiva. V pokročilých stádiích se infekce šíří od pupkových částí hlíz a z oček, což vede ke vzniku načervenalé hnědých, lehce vmáčknutých lézí na slupce. Z nich může vytékat bakteriální sliz, na němž ulpívají půdní částice.

1.2 Příznaky u rajčat

Rostlina rajčete. Prvním patrným příznakem je povadlý vzhled nejmladších listů. Za podmínek příznivých pro patogen (teplota půdy přibližně 25 °C při nasycené vzdušné vlhkosti) je jedna strana rostliny nebo celá rostlina během několika dnů postižena epinastií a vadnutím, což vede k úplnému odumření rostliny. Za méně příznivých podmínek (teplota půdy do 21 °C) se může na stonku tvořit velký počet postranních výhonů. Na stonku lze pozorovat slizovitý pás, který je viditelným znakem nekrózy cévního systému. Při příčném rozříznutí stonku vytéká z hnědě zbarveného vodivého pletiva stonku po kapkách bílý nebo nažloutlý bakteriální sliz.

2. Rychlé screeningové testy

Rychlé screeningové testy umožňují předběžnou diagnózu. Používá se jeden nebo několik z následujících testů:

Test vytékání bakteriálního slizu z cévních svazků

Přítomnost *Ralstonia solanacearum* v zavadlých stoncích bramboru nebo rajčete lze zjistit následujícím jednoduchým testem:

Stonky se uříznou nízko nad zemí a řezná plocha se vloží do kádinky s vodou. Krátce nato z cévních svazků samovolně vytékají vlákna bakteriálního slizu. Žádná jiná bakterie způsobující cévní infekce u rostlin bramboru a rajčete nevykazuje tento příznak.

Detekce granulí poly- β -hydroxybutyrátu (PHB)

Granule PHB v buňkách *Ralstonia solanacearum* se zviditelní obarvením nilskou modří A a sudánskou černí B.

Připraví se buď roztěr exsudátu, nebo suspendovaného pletiva na podložním sklíčku nebo roztěr 48hodinové kultury na živné půdě YPGA nebo SPA (dodatek 1). Připraví se roztěry pro pozitivní kontroly kmene biovaru 2 rasy 3, a v případě potřeby i pro negativní kontroly heterologního kmene, a nechají se vyschnout. Spodní strana podložního sklíčka se několikrát rychle protáhne plamenem až do fixace roztěru.

Test nilskou modří

1. Fixovaný roztěr se přelije 1 % vodním roztokem nilské modří A.

Inkubuje se 10 minut při 55 °C.

2. Barvicí roztok se nechá stéci. Krátce se opláchne pod slabě tekoucí vodou. Přebytná voda se vysaje savým papírem.

3. Roztěr se přelije 8 % vodním roztokem kyseliny octové.

Inkubuje se 1 minutu při pokojové teplotě.

4. Opláchne se pod slabě tekoucí vodou a osuší se savým papírem.

5. Znovu se navlhčí kapkou vody. Přikryje se krycím sklíčkem.

6. Obarvený roztěr pozorujeme pod epifluorescenčním mikroskopem při 450 nm pod olejovou imerzí při zvětšení 1 000 x.

Sledujeme sytě oranžovou fluorescenci granulí PHB. Pozorování provádíme i při normálním světle, abychom se ujistili, že granule jsou intracelulární a že morfologie buňky je typická pro *Ralstonia solanacearum*.

Test sudánskou černí

1. Fixovaný roztěr se přelije 0,3 % roztokem sudánské černě B v 70 % ethanolu. Inkubuje se 10 minut při pokojové teplotě.
2. Barvicí roztok se nechá stéci. Krátce se opláchne pod slabě tekoucí vodou. Přebytečná voda se vysaje savým papírem.
3. Roztěr se krátce ponoří do xylolu. Osuší se savým papírem.

Upozornění! Xylol je zdraví škodlivá látka. Nutno pracovat v digestoři.

4. Roztěr se přelije 0,5 % vodním roztokem safraninu. Nechá se 10 sekund stát při pokojové teplotě.

Upozornění! Safranin je zdraví škodlivá látka. Nutno pracovat v digestoři.

5. Opláchne se pod slabě tekoucí vodou. Osuší se savým papírem a přikryje se krycím sklíčkem.
6. Obarvený roztěr pozorujeme mikroskopem v procházejícím světle pod olejovou imerzí při zvětšení 1 000 x.

Granule PHB v buňkách *Ralstonia solanacearum* jsou zbarvené modročerně. Buněčné stěny jsou zbarvené růžově.

Jiné testy

Z jiných screeningových testů je vhodný IF test (oddíl III.2), ELISA test (oddíl III.3) a PCR test (oddíl III.4).

3. Postup při izolaci

- 3.1 Odebereme slizový sekret nebo části odbarveného pletiva z prstence cévních svazků hlízy bramboru nebo z vodivých pletiv ve stonku rostlin bramboru nebo rajčete. Suspendujeme v malém objemu sterilní destilované vody nebo v 50 mM fosfátovém pufru a necháme 5–10 minut stát.
- 3.2 Připravíme nejméně dvě desetinná ředění suspenze (1/10 a 1/100), v případě potřeby i více.
- 3.3 Standardní objem suspenze a ředění převedeme na univerzální živné médium NA, YPGA a SPA (dodatek 1) a/nebo na Kelmanovo tetrazoliové médium (dodatek 1) a/nebo na selektivní médium SMSA (dodatek 7). Potom je vhodnou metodou rozprostřeme nebo rozetřeme na plotny. Může být užitečné připravit samostatné plotny každého média se zředěnou kulturou buněčné suspenze virulentního kmene biovaru 2 rasy 3 *Ralstonia solanacearum* jako pozitivní kontrolu.
- 3.4 Plotny se inkubují 3 dny při 28 °C. Při pomalém růstu lze dobu inkubace prodloužit až na 6 dnů, přičemž se však kolonie na médiu SMSA stávají atypickými a odumírají.

Na univerzálních živných substrátech tvoří virulentní izoláty *Ralstonia solanacearum* perlově bílé, ploché, nepravidelné a tekuté kolonie, často s charakteristickými spirálkami.

Na Kelmanově tetrazoliovém médiu tvoří virulentní izoláty *Ralstonia solanacearum* typické krémově zbarvené, ploché, nepravidelné, tekuté kolonie s krvavě červeně zbarvenými spirálkami. Nevirulentní formy *Ralstonia solanacearum* naproti tomu tvoří máslovitě tmavě červené kolonie.

Na médiu SMSA tvoří virulentní izoláty *Ralstonia solanacearum* mléčně bílé, ploché, nepravidelné a tekuté kolonie s krvavě červeně zbarveným středem.

Nevirulentní formy *Ralstonia solanacearum* tvoří na médiu SMSA méně tekuté kolonie, které jsou celé růžové až červené.

- 3.5 Kolonie s charakteristickou morfologií subkultur se vyčistí na univerzálním živném médiu. Je třeba se vyvarovat pravidelnému přeočkování, které může vést ke ztrátě virulence.

4. Potvrzovací testy

4.1 Identifikace *Ralstonia solanacearum*

Čisté kultury *Ralstonia solanacearum* se identifikují nejméně jednou z následujících metod:

Výživové a enzymatické testy

Poznámka: Do každého testu je nutno zahrnout vhodné kontrolní kmeny.

Následující fenotypové vlastnosti *Ralstonia solanacearum* jsou buď vždy přítomny, nebo chybí:

fluoreskující pigmenty	–
inkluze PHB	+
oxidační/fermentační test	O+/F-
kataláza	+
oxidáza podle Kovace	+
redukce dusičnanů	+
<hr/>	
využití citrátů	+
růst při 40 °C	–
<hr/>	
růst v 1 % NaCl	+
růst v 2 % NaCl	–
arginin-dihydroláza	–
ztekucení želatiny	–
hydrolýza škrobu	–
hydrolýza eskulinu	–
produkce levanu	–

Média a metody viz Lelliott & Stead (1987).

IF test

Připraví se suspenze 10^6 buněk na 1 ml kultury a kontrolního kmene. Připraví se řada dvojnásobného ředění antiséra. Použije se IF metody (oddíl III.2). IF titr kultury musí odpovídat IF titru pozitivní kontroly.

ELISA test

Připraví se suspenze o hustotě větší než 10^6 buněk na 1 ml kultury a kontrolního kmene. Použije se metody ELISA (oddíl III.3). Extinkce kultury musí odpovídat extinkci pozitivní kontroly.

PCR test

Připraví se suspenze 10^6 buněk na 1 ml kultury a kontrolního kmene. Použije se metody PCR (oddíl III.4). PCR produkt kultury musí mít stejnou velikost a stejný vzor restriční enzymové analýzy (REA) jako pozitivní kontrola.

Fluorescenční hybridizace in situ (FISH)

Připraví se suspenze 10^6 buněk na 1 ml kultury a kontrolního kmene. Použije se metody FISH (van Beuningen et al., 1995) s PCR primerem OLI-1 (Seal et al., 1993). Kultura musí vykazovat stejnou reakci jako pozitivní kontrola.

Proteinový profil

Denaturované proteiny celých buněk se oddělují elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (PAGE) (Stead, 1992a).

Stanovení profilu mastných kyselin (FAP)

Kultura a pozitivní kontrola se nechají růst 48 hodin při 28 °C na tryptikázovém sójovém agaru a pak se použije metody FAP (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead, 1992b). Profil kultury musí být shodný s profilem pozitivní kontroly. Charakteristickými mastnými kyselinami za uvedených podmínek jsou: 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH a 18:1 2OH.

4.2 Charakteristika kmene

Charakteristika kmene není povinná, ale doporučuje se ji provést pro každý nový případ při použití alespoň jednoho z následujících testů:

Určení biovaru

Ralstonia solanacearum se dělí na biovary podle schopnosti vytvářet kyselinu ze tří hexózových alkoholů a tří cukrů (Hayward, 1964, 1994):

	biovar				
	1	2	3	4	5
Využití					
— maltózy	-	+	+	-	+
— laktózy	-	+	+	-	+
— celobiózy	-	+	+	-	+
— mannitu	-	-	+	+	+
— sorbitu	-	-	+	+	-
— dulcitu	-	-	+	+	-

Doplňkovými testy lze biovar 2 členit na subfenotypy (Hayward, 1994):

	biovar 2	biovar 2-A	biovar 2-T
Využití trehalózy	-	+	+
Využití inozitolu	+	-	+
Využití D-ribózy	-	-	+
Pektolytická aktivita	nízká	nízká	vysoká

Stanovení rasy

Rasa (Buddenhagen et al., 1962) se stanovuje na základě testu patogenity na rostlinách rajčete nebo lilku vejcoplodého a na rostlinách tabáku, jakož i testem hypersenzitivní reakce (HR) na listech tabáku (Lozano a Sequeira, 1970):

	rasa (*)		
	1	2	3
Reakce u:			
— rostlin rajčete/lilku vejcoplodého	vadnutí	žádná reakce	vadnutí
— rostlin tabáku	vadnutí	žádná reakce	žádná reakce
— listů tabáku	nekróza (48 hod.) a vadnutí (7–8 dnů)	hypersenzitivní reakce (12–24 hod.)	chloróza (2–8 dnů)

(*) Rasa 4 (patogenní na zázvoru a některých jiných hostitelích) a rasa 5 (patogenní jen na moruši) nebyly zohledněny.

Stanovení rasy testem patogenity nebo testem hypersenzitivní reakce na tabáku nemusí být příliš spolehlivé a může se také provádět na základě stanovení biovaru a původního hostitele.

Kulturu lze dále charakterizovat pomocí:

Genomového fingerprintu

Molekulární odlišení kmenů komplexu *Ralstonia solanacearum* lze provést:

analýzou RFLP (Cook et al., 1989).

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

4.3 Test patogenity

Tento test slouží k potvrzení diagnózy *Ralstonia solanacearum* a k potvrzení virulence kultur identifikovaných jako *Ralstonia solanacearum*.

Z kultury a pozitivního kontrolního kmene se připraví inokulum o hustotě 10^6 buněk na 1 ml. Naočkuje se 5–10 rostlin rajčete nebo lilku vejcoplodého ve stadiu třetího listu nebo stadiu starším (oddíl III.6). Inkubuje se až dva týdny při teplotě 22–28 °C a vysoké relativní vlhkosti vzduchu a denně se zavlažuje. Sledují se příznaky vadnutí a/nebo epinastie, chlorózy a zakrslosti.

Z rostlin s charakteristickými příznaky *Ralstonia solanacearum* se provede izolace takto:

— odebere se část pletiva stonku 2 cm nad místem inokulace,

— rozmělní se a suspenduje se v malém množství sterilní destilované vody nebo ve fosfátovém pufru 50 mM, pak se rozetře na plotny, inkubuje se a poté se vyhodnotí typické kolonie *Ralstonia solanacearum*

ODDÍL III

DETEKCE A IDENTIFIKACE *RALSTONIA SOLANACEARUM* VE VZORCÍCH HLÍZ BRAMBORU

Upozornění: Vzorek standardní velikosti sestává z 200 hlíz. Metoda je však vhodná i pro vzorky s méně než 200 hlízami.

1. Příprava vzorku pro testování

Upozornění: Peletu z bramborového extraktu, získanou touto metodou, lze použít i pro detekci *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Před testem je možné, je-li to považováno za účelné, provést následující postupy:

- i) vzorek se inkubuje až 2 týdny při teplotě 25–30 °C, aby se podpořilo namnožení slabých populací *Ralstonia solanacearum*;
- ii) hlízy se omyjí pod tekoucí vodou s přídavkem vhodného dezinfekčního a mycího prostředku. Hlízy se nechají usušit na vzduchu.

1.1 Čistým a dezinfikovaným skalpelem nebo nožem na zeleninu se odstraní slupka hlízy na pupkové části tak, aby byla vidět vodivá pletiva. Na pupkové části každé hlízy se opatrně vyřízne malý kónický výkroj (průměru 3–5 mm) z vodivého pletiva. Přitom se dbá na to, aby se zasáhlo co nejméně nevodivého pletiva. Proveďte se u každé hlízy vzorku.

Upozornění: V této fázi je možno hlízy zkoumat vizuálně (oddíl II.1). Hlízy vykazující příznaky se vytřídí a zkouší odděleně (oddíl II).

1.2 Pupkové části hlíz se dají do uzavřené nádoby a měly by se neprodleně zpracovat. Není-li to možné, neměly by se uchovávat déle než 24 hodin nebo při teplotě 4 °C déle než 72 hodin.

1.3 Pupkové části se zpracovávají jednou z následujících metod:

i) Pupkové části se dají do vhodné nádoby.

Přidá se macerační pufr (dodatek 2) v takovém objemu, aby překryl pupkové části.

Pupkové části se v mixeru Waring Blender nebo Ultra Thurrax rozmělní až do úplné homogenizace. Je třeba se vyvarovat příliš silné homogenizaci.

Macerát se nechá 15–30 minut máčet.

ii) Pupkové části se dají do vhodné nádoby.

Přidá se macerační pufr v takovém objemu, aby překryl pupkové části.

Nádoba se postaví na třepačku.

Inkubuje se při 50–100 kmitech za minutu po dobu 4 hodin při teplotě 20–22 °C nebo po dobu 16–24 hodin při teplotě 4 °C.

iii) Pupkové části se dají do pevného jednorázového maceračního sáčku (např. sáček Stomacher, rozměry 105 mm x 150 mm, sterilizován zářením).

Pupkové části se vhodným nástrojem, např. kladivem, rozmělní až do úplné homogenizace.

Přidá se macerační pufr v takovém objemu, aby překryl pupkové části.

Macerát se nechá 15–30 minut odstát.

1.4 Bakterie se z upravených pupkových částí hlíz extrahují jednou z následujících metod:

i) Macerát se opatrně slijí do centrifugační zkumavky, přičemž tuhý zbytek se ponechá v nádobě nebo sáčku. Je-li slitý macerát zakalený, odstředí se při teplotě do 10 °C po dobu 10 minut při odstředivé síle ne větší než 180 g.

Slitý macerát nebo supernatant z prvního odstředování se odstředí po dobu 15 minut při 7 000 g nebo po dobu 10 minut při 10 000 g a teplotě do 10 °C.

Supernatant se slijí tak, aby se peleta nezvířila.

ii) Macerát se přefiltruje přes filtrační systém s velikostí pórů 40–100 µm. Filtraci posílíme vakuovým čerpadlem.

Filtrát se zachycuje v centrifugační zkumavce.

Filtr se promyje maceračním pufrem.

Filtrát se odstředí po dobu 15 minut při 7 000 g nebo po dobu 10 minut při 10 000 g a teplotě do 10 °C.

Supernatant se slijí tak, aby se peleta nezvířila.

1.5 Peleta se resuspenduje v 1 ml peletového pufru (dodatek 2).

Rozdělí se na dvě stejné části a každá část se nalije do mikrozkušavky.

Jedna mikrozkušavka se použije pro test. Zbytek tohoto extraktu se během testu uchovává při teplotě 4 °C.

Do druhé mikrozkušavky se přidá 10–25 % objemových sterilního glycerinu. Protřepe se a skladuje při teplotě –18 °C (několik týdnů) nebo –70 °C (několik měsíců).

2. IF test

Použije se antisérum pro *Ralstonia solanacearum*, přednostně rasy 3 biovaru 2. Stanoví se titer u suspenze o hustotě 10⁶ buněk na 1 ml homologního kmene *Ralstonia solanacearum* s vhodným ředěním konjugátu fluorescenčního isothiokyanátu (FITC) podle doporučení výrobce. Surové sérum by mělo mít IF titer nejméně 1: 2 000.

Použije se víceobjektové podložní sklíčko nejlépe s 10 okénky o průměru nejméně 6 mm.

Na každé podložní sklíčko se nanese kontrola konjugátu FITC. Test by měl být opakován s kontrolou PBS, pokud kontrola FITC vykáže nějakou pozitivní buňku.

Připraví se několik pozitivních kontrolních podložních sklíček se suspenzí 10⁶ buněk na 1 ml jednoho kmene příslušné rasy a biovaru *Ralstonia solanacearum*. V každé řadě testu se použije jedno podložní sklo.

2.1 Podložní sklíčka se připraví podle jedné z následujících metod:

i) Pelety s relativně nízkým obsahem škrobu:

Na řadu okének se nanese pipetou odměřený standardní objem (na jedno okénko o průměru 6 mm stačí 15 µl - u větších okének je nutné použít odpovídající větší objem) resuspendované pelety. Další řadu lze použít jako duplikát nebo pro druhý vzorek, jak je znázorněno na obrázku 1.

ii) Jiné pelety:

Připraví se desetinná ředění (1/10, 1/100 a 1/1000) resuspendované pelety v peletovém pufru. Na řadu okének se nanese pipetou odměřený standardní objem (na jedno okénko o průměru 6 mm stačí 15 µl - u větších okének je nutné použít odpovídající větší objem) resuspendované pelety a každé ředění. Další řadu lze použít jako duplikát nebo pro druhý vzorek, jak je znázorněno na obrázku 2.

2.2 Kapky se nechají uschnout. Bakteriální buňky se na podložním sklíčku fixují buď zahřátím, ožehnutím nebo 95 % ethanolem.

2.3 Postup při IF testu

i) Při přípravě podložního sklíčka podle 2.1.i):

Připraví se sada dvojnásobného ředění antiséra v IF pufru (dodatek 3):
1/4 titru (T/4), 1/2 titru (T/2), titer (T) a dvojnásobek titru (2T).

ii) Při přípravě podložního sklíčka podle 2.1.ii):

Připraví se pracovní ředění antiséra v IF pufru. Pracovní ředění je ředění antiséra s optimální specifícností a obvykle činí polovinu hodnoty titru.

Obrázek 1

Příprava podložního sklíčka podle 2.1.i) a 2.3.i)

Standardní ředění resuspendované pelety

$T = \text{titer}$

	FITC	T/4	T/2	T	2T	⇒ dvojnásobné ředění antiséra
vzorek 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
duplikát nebo vzorek 2						
vzorku 1	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Obrázek 2

Příprava podložního sklíčka podle 2.1.ii) a 2.3.ii)

	FITC		Pracovní ředění antiséra			⇒ desetinasobné ředění resuspendované pelety
	neředěno	neředěno	1/10	1/100	1/1000	
vzorek 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
duplikát vzorku 1 nebo vzorek 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

2.3.1 Podložní sklíčka se vyloží na savý papír.

Všechna testovací okénka se překryjí ředěním(i) antiséra. Na okénka FITC se nanese PBS. Objem antiséra, nanesený na okénka, musí odpovídat objemu naneseného extraktu.

2.3.2 Inkubuje se přikryté po dobu 30 minut při pokojové teplotě.

2.3.3 Z podložního sklíčka se setřesou kapky antiséra a sklíčko se opatrně opláchne IF pufrem. Omývá se 5 minut IF pufrem Tween a poté 5 minut v IF pufru (dodatek 3). Přebytečná vlhkost se pečlivě odstraní.

2.3.4 Podložní sklíčka se vyloží na vlhký savý papír. Testovací okénka a okénko FITC se pokryjí ředěním konjugátu FITC použitým ke stanovení titru. Objem konjugátu, nanesený na okénka, musí odpovídat objemu naneseného antiséra.

2.3.5 Inkubuje se přikryté po dobu 30 minut při pokojové teplotě.

2.3.6 Z podložního sklíčka se setřesou kapky konjugátu. Omývá a oplachuje se jako podle bodu 2.3.3. Pečlivě se odstraní přebytečná vlhkost.

2.3.7 Na každé okénko se nanese pipetou 5–10 µl 0,1 M fosfátové pufovaného glycerinu (dodatek 3) nebo podobná krycí kapalina a přiloží se krycí sklíčko.

2.4 Hodnocení IF testu

Podložní sklíčka se zkoumají pod epifluorescenčním mikroskopem s filtry vhodnými pro excitaci FITC pod olejovou imerzí při zvětšení 500 až 1 000 x. Každé okénko se zkoumá mikroskopicky ve dvou navzájem kolmých průměrech a rovněž po obvodu.

Nejprve se zkoumá podložní sklíčko s pozitivní kontrolou. Buňky musí jasně fluoreskovat a být plně vybarvené. Upozornění: Při odchýlném zbarvení je třeba test opakovat.

Nejprve se zkoumá nepřítomnost fluoreskujících buněk v kontrolních okénkách FITC. Fluoreskující buňky v kontrolním okénku FITC ukazují na nespecifickou vazbu konjugátu, autofluorescenci nebo kontaminaci. *Upozornění: Při takovém zjištění je třeba test opakovat.*

V testovacích okénkách se pozorují jasně fluoreskující buňky s charakteristickou morfologií *Ralstonia solanacearum*. Intenzita fluorescence musí odpovídat intenzitě fluorescence pozitivního kontrolního kmene při stejném zředění antiséra. Na buňky s neúplným zbarvením nebo se slabou fluorescencí se nebere zřetel, ledaže by těchto buněk bylo mnoho (viz vyhodnocení výsledku IF testu).

Vyhodnocení výsledku IF testu:

- i) Pro každý vzorek, v němž nebyly nalezeny žádné fluoreskující buňky s charakteristickou morfologií, je IF test negativní.
- ii) Pro každý vzorek, v němž byly nalezeny jasně fluoreskující buňky s charakteristickou morfologií, se stanoví průměrný počet buněk na mikroskopické pole a vypočte se počet buněk na 1 ml (N) resuspendované pelety (dodatek 4).

Hustota bakterií přibližně 10^3 buněk na 1 ml resuspendované pelety je považována za mez detekce pro IF test:

- u vzorků s $N > 10^3$ buněk na 1 ml resuspendované pelety se výsledek IF testu hodnotí jako pozitivní,
- u vzorků s $N < 10^3$ buněk na 1 ml resuspendované pelety může být výsledek IF testu hodnocen jako pozitivní.

- iii) Při zjištění velkého počtu ($N > 10^5$ buněk na 1 ml) neúplně nebo slabě fluoreskujících buněk u titru antiséra by měl být proveden druhý test:
- buď test založený na jiném biologickém principu, nebo
 - další IF test, buď s druhým antisérem, nebo s desetinásobným zředěním pelety.

3. ELISA test

(podle Robinsona-Smithe et al., 1995)

Použije se antisérum pro *Ralstonia solanacearum*, přednostně pro rasu 3 biovar 2. Stanoví se titr u suspenze 10^6 buněk na 1 ml homologního kmene *Ralstonia solanacearum*.

Doporučuje se používat mikrotitrační destičky NUNC-Polysorb.

Test by měl zahrnovat negativní kontrolu bramborového extraktu a kontrolu fosfátového pufru (PBS).

Jako pozitivní kontrola se používá suspenze o hustotě větší než 10^6 buněk na 1 ml kmene příslušné rasy a biovaru *Ralstonia solanacearum*. Test se provede stejně jako u vzorku(ů), avšak odděleně od vzorků na mikrotitrační destičce.

- 3.1 Do mikrozkuvkavky se napipetuje 100–200 μ l resuspendované pelety.
- Zahřívá se po dobu 4 minut při teplotě 100 °C. Mikrozkuvkavka se pak položí na led.
- 3.2 Přidá se stejný objem dvojnásobně silného uhličitanového krycího pufru (dodatek 5). Protřepe se.
- 3.3 Do nejméně dvou jamek v mikrotitrační destičce se dá vždy po 100 μ l. Inkubuje se po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C nebo přes noc při teplotě 4 °C.
- 3.4 Extrakty se z jamek úplně odstraní. Jamky se třikrát vymyjí PBS Tween (dodatek 5); poslední mycí roztok by měl v jamkách zůstat nejméně 5 minut.
- 3.5 Připraví se vhodné ředění antiséra *Ralstonia solanacearum* v blokačním pufru (dodatek 5). Do jamek se dá po 100 μ l ředěného antiséra.
- Inkubuje se po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C.
- 3.6 Antisérum se z jamek úplně odstraní. Jamky se vymyjí výše popsaným způsobem (3.4).
- 3.7 Připraví se vhodné ředění konjugátu alkalické fosfatázy v blokačním pufru. Do jamek se dá po 100 μ l ředěného konjugátu.
- Inkubuje se po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C.
- 3.8 Konjugát se z jamek úplně odstraní. Jamky se vymyjí výše popsaným způsobem (3.4 a 3.6).
- 3.9 Připraví se alkalický roztok ze substrátu fosfatázy (dodatek 5). Do jamek se dá po 100 μ l. Inkubuje se po dobu 30 minut až 1 hodiny v temnu při pokojové teplotě.
- 3.10 Odečte se extinkce při 409 nm.

Vyhodnocení výsledku ELISA testu

ELISA test je negativní, jestliže optická hustota vzorku je nižší než dvojnásobek optické hustoty negativní kontroly.

ELISA test je pozitivní, jestliže optická hustota vzorku je vyšší než dvojnásobek optické hustoty negativní kontroly.

4. PCR test

(podle Seala et al., 1993)

Upozornění:

Při všech krocích přípravy vzorků a jiných činnostech v souvislosti s PCR se musí používat špičky pipet s filtrem.

Jako pozitivní kontrola se připraví suspenze 10^6 buněk na 1 ml kmene rasy 3 biovaru 2 *Ralstonia solanacearum*. Test se provede stejným způsobem jako u vzorku(ů).

- 4.1 Do mikrozkuvkavky se napipetuje 100 μ l resuspendované pelety.

Alternativně lze dát 90 μ l resuspendované pelety do mikrozkuvkavky, která obsahuje 10 μ l 0,5 M NaOH. Promíchá se opakovaným převrácením mikrozkuvkavky.

- 4.2 Zahřívá se po dobu 4 minut při teplotě 100 °C. Mikrozkušavka se pak ihned umístí do ledu.
- 4.3 Přípraví se nejméně dvě desetinná ředění (např. 1/10 a 1/100, nebo v případě potřeby více) ve sterilní destilované nebo ultračisté vodě (UPW).
- 4.4 Ve sterilní mikrozkušavce se připraví reakční směs pro PCR (dodatek 6) tak, že se přidají následující složky v tomto pořadí:

Pro reakční objem 50 µl

Složka	Množství	Konečná koncentrace
Sterilní destilovaná voda nebo ultračistá voda	30,8 µl–33,8 µl	
10 x PCR pufr	5,0 µl	1 x
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
Polymeráza Taq (5U/µl)	0,2 µl	1,0 U
Celkový objem	45 µl–48 µl	

Pro více reakcí:

Vypočte se množství každé složky pro potřebný počet reakcí.

Složky se smíchají a 45–48 µl směsi se dá do sterilních mikrozkušavek PCR.

Mikrozkušavky s reakční směsí PCR se uloží do ledu.

Pro reakční objem 25 µl:

Množství složek se přiměřeně sníží.

- 4.5 Amplifikace PCR
- 4.5.1 Nepovinně! Mikrozkušavky s povařeným vzorkem a pozitivní kontrolou se pulzačně odstředí.
- Do mikrozkušavek s reakční směsí PCR se v uvedeném pořadí přidá 2–5 µl vzorku(ů), vodní kontrola a pozitivní kontrola. Mikrozkušavky se postaví do vyhřívacího bloku termocykleru.
- 4.5.2 Proveďte se následující program:
- 1 cyklus:
- i) 2 minuty při teplotě 96 °C: denaturace matrice
- 50 cyklů:
- ii) 20 sekund při teplotě 94 °C: denaturace
- iii) 20 sekund při teplotě 68 °C: napojování primeru
- iv) 30 sekund při teplotě 72 °C: prodloužení kopie
- 1 cyklus
- v) 10 minut při teplotě 72 °: další prodloužení
- 1 cyklus
- vi) udržování při teplotě 4 °C.
- Upozornění:* Tyto parametry se vztahují na termocykler Perkin Elmer 9600. U jiných termocyklerů může být zapotřebí vrstva minerálního oleje v reakční mikrozkušavce PCR a/nebo změna trvání kroku ii), iii) a iv) v amplifikačním profilu.
- 4.5.3 Mikrozkušavky se vyjmou z termocykleru. Produkt PCR se analyzuje. Nelze-li to provést okamžitě, mikrozkušavky se uloží při teplotě 4 °C pro použití v tomtež dni nebo při teplotě –18 °C pro použití za delší dobu.
- 4.6 Analýza produktu PCR
- Fragmenty PCR se analyzují elektroforézou v agarózovém gelu a obarvením ethidiumbromidem.
- 4.6.1 Přípraví se vhodný agarózový gel tak, že agaróza se opatrně povaří v tris-acetátovém elektroforetickém pufru (TAE).

- 4.6.2 Roztavená agaróza se ochladí na teplotu 50–60 °C, nalije se do komůrky na nalévání gelu elektroforézní aparatury a vloží se hřeben. Roztok se nechá ztuhnout.
- 4.6.3 Hřeben se vyjme. Gel se ponoří do pufru TAE tak, aby byl pokryt 2–3 mm vrstvou pufru.
- 4.6.4 Na parafilm se nanese kapka 3 µl nanášecího pufru. Přidá se 12 µl produktu PCR ze vzorků, pozitivní kontroly a vodní kontroly a před nanášením se smísí lehkým nasáváním do špičky pipety. Uvedené objemy lze přizpůsobit kapacitě jamek v agarózovém gelu.
- 4.6.5 Jamky v gelu se pečlivě naplní. Nejméně do jedné jamky se jako srovnávací substance nanese vhodný marker DNA.
- 4.6.6 K elektroforézní aparatuře se připojí síťový zdroj. Elektroforéza se provádí při 5–8 V/cm, dokud se čelo barviva nebude nacházet ve vzdálenosti 1 cm od okraje gelu.
- 4.6.7 Vypne se proudové napájení a síťový zdroj se odpojí z elektroforézní aparatury.
- Gel se opatrně vyjme a po dobu 30–45 minut se barví v roztoku ethidiumbromidu.
- Upozornění:* Při manipulaci s ethidiumbromidem, který je silným mutagenem, je třeba vždy použít jednorázové rukavice!
- 4.6.8 Barvivo se vymývá v destilované vodě po dobu 10–15 minut.
- 4.6.9 Amplifikované fragmenty DNA se zviditelní transiluminací. PCR produkt *Ralstonia solanacearum* s primery OLI-1 a Y-2 má délku 288 bp. Porovná se s markerem DNA a pozitivní kontrolou.
- Upozornění:* Vodní kontrola musí být v každém případě negativní. Pokud je pozitivní, je třeba test opakovat.
- 4.6.10 Pro zdokumentování se gel případně vyfotografuje.
- 4.6.11 Pravost amplifikovaného fragmentu se potvrdí restrikční enzymovou analýzou (REA).
- 4.7 Restrikční enzymová analýza (REA)
- 4.7.1 Do nové mikrozkušavky se dá 8,5 µl produktu PCR (4.5.3). Přidá se 1 µl enzymového pufru (10 x) a 0,5 µl restrikčního enzymu Avall.
- 4.7.2 Promísí se jemným odsáváním do špičky pipety. Zůstávají-li na stěnách mikrozkušavky kapky, pulzně se odstředí v mikroadstředivce. Inkubuje se po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C.
- 4.7.3 Naštípaný fragment PCR se analyzuje elektroforézou v agarózovém gelu jako v bodě 4.6.

Vyhodnocení výsledku PCR testu

PCR test je negativní, pokud nebyl prokázán charakteristický fragment 288 bp a přitom byl prokázán fragment u pozitivního kontrolního kmene *Ralstonia solanacearum*.

PCR test je pozitivní, pokud byl prokázán fragment 288 bp a analýza REA ukazuje na to, že amplifikovaný fragment je identický s pozitivním kontrolním kmenem *Ralstonia solanacearum*.

5. Kultivace na selektivních živných médiích

(podle Elphinstona et al., 1996)

- 5.1 Test se provádí vhodnou zředovací technikou roztěrů, např.:
- Připraví se nejméně dvě desetinná ředění (např. 1/10 a 1/100) resuspendované pelety v peletovém pufru. Odměřený standardní objem (50–100 µl) resuspendované pelety a každého ředění se nanese pipetou na modifikované selektivní SMSA médium (dodatek 7) a skleněnou tyčinkou se rozprostře po celé ploše média.
- Pokud je to účelné, provede se 10 µl očkem zředovací roztěr resuspendované pelety. Mezi roztěry se očko sterilizuje plamenem.
- Na modifikované selektivní SMSA médium se nanese odměřený standardní objem (50–100 µl) resuspendované pelety a skleněnou tyčinkou se rozetře po celé ploše média. Tyčinkou bez ožehnutí plamenem se provede roztěr na nejméně dvě další plotny s modifikovaným SMSA médiem.
- 5.2 Stejnou zředovací technikou roztěru se nanese suspenze virulentního kmene *Ralstonia solanacearum* rasa 3 biovar 2 o hustotě 10⁶ buněk v 1 ml jako pozitivní kontrola na sadu samostatných ploten s modifikovaným SMSA médiem.
- 5.3 Plotny se inkubují při teplotě 28 °C. Po 3 dnech se provede první kontrola ploten. Při negativním nálezů se dále inkubuje až do 6 dnů. Kolonie virulentních izolátů *Ralstonia solanacearum* jsou mléčně bílé, ploché, nepravidelné a fluidní, se zřetelně rozeznatelnými červenými až purpurovými středy s proužky nebo spirálkami.
- 5.4 Kolonie s charakteristickou morfologií se vyčistí přeočkováním do čisté kultury na univerzálním médiu (dodatek 1).

- 5.5 Identifikuje se čistá kultura (oddíl II.4.1) a pozitivní kultury *Ralstonia solanacearum* se potvrdí testem patogenity (oddíl II.4.3).

Vyhodnocení výsledku kultivace na selektivních živných médiích

Test na selektivním živném médiu je negativní, jestliže po šesti dnech nelze izolovat žádné kolonie bakterií nebo nejsou izolovány žádné charakteristické kolonie *Ralstonia solanacearum* za předpokladu, že není podezření z inhibice koloniemi jiných bakterií a že v pozitivních kontrolách byly zjištěny charakteristické kolonie *Ralstonia solanacearum*.

Test na selektivním živném médiu je pozitivní, jestliže jsou izolovány charakteristické kolonie *Ralstonia solanacearum*.

6. **Biotest**

(podle Janse, 1988)

- 6.1 Pro každý vzorek se použije 10 testovacích rostlin náchylných semenáčků rajčete nebo lilku vejcoplodého v růstové fázi třech pravých listů. Testovací rostliny se 24 hodin před inokulací nezavlažují.
- 6.2 100 µl resuspendované pelety se rozdělí mezi testované rostliny. Naočkuje se stonek v místě mezi děložními lístky a na jednom nebo několika dalších místech.
- 6.3 Stejnou technikou se inokuluje 10 semenáčků suspenzí virulentního kmene *Ralstonia solanacearum* rasa 3 biovar 2 o hustotě 10^6 buněk v 1 ml jako pozitivní kontrola a peletovým pufrům jako negativní kontrola. Rostliny pozitivní kontroly se oddělí od ostatních rostlin, aby se zabránilo křížovým kontaminacím.
- 6.4 Testovací rostliny se nechají růst po dobu až 4 týdnů při teplotě 22 až 28 °C, vysoké relativní vlhkosti vzduchu a při denním zavlažování. Rostliny pozitivní kontroly se oddělí od ostatních rostlin, aby se zabránilo křížovým kontaminacím. Sledují se příznaky vadnutí, epinastie, chlorózy a/nebo krnění.
- 6.5 Proveďte izolace z infikovaných rostlin (oddíl II). Identifikují se čisté kultury s charakteristickou morfologií (oddíl II.4.1) a kultury *Ralstonia solanacearum* se potvrdí testem patogenity (oddíl II.4.3).
- 6.6 V případě potřeby se u testovacích rostlin, které nevykazují žádné příznaky infekce, zkontroluje, zda k infekci skutečně nedošlo. Z každé testované rostliny se 2 cm nad místem naočkování odebere úsek stonku dlouhý 1 cm. Části pletiv se homogenizují v maceračním pufru. Proveďte test zředovací technikou (oddíl III.5.1). Při pozitivním nálezů se identifikují čisté kultury s charakteristickou morfologií (oddíl II.4.1) a kultury *Ralstonia solanacearum* se potvrdí testem patogenity (oddíl II.4.3).

Vyhodnocení výsledku biotestu

Biotest je negativní, jestliže testovací rostliny nejsou infikované *Ralstonia solanacearum* za předpokladu, že v pozitivních kontrolách byla *Ralstonia solanacearum* prokázána.

Biotest je pozitivní, jestliže testovací rostliny jsou infikované *Ralstonia solanacearum*.

7. **Obohacovací test**

(podle J.G. Elphinstona et al., 1996)

- 7.1 Do 3 ml modifikovaného živného média SMSA se vloží 100 µl resuspendované pelety (dodatek 7).
- 7.2 Inkubuje se po dobu 48 hodin, avšak ne déle než 72 hodin, při teplotě 28 °C s volně nasazeným víčkem za účelem větrání.
- 7.3 Zavře se víčko mikroskopu a protřepe se. Množství se rozdělí pro IF test (tento oddíl bod 2), ELISA test (tento oddíl bod 3) a/nebo PCR test (tento oddíl bod 4).

8. **Test patogenity**

Viz oddíl II.4.3.

Dodatek 1

Živná média pro izolaci a kultivaci *Ralstonia solanacearum*

Živný agar (NA)

Živný agar (Difco)	23 g
Destilovaná voda	1 l

V baňce o objemu 1 litr se připraví 0,5 litru média.

Látky se rozpustí.

Sterilizuje se 15 minut v autoklávu při teplotě 121 °C.

Ochladí se na 50 °C. Provede se rozliv na plotny.

Kvasnično-pepton-glukosový agar (YPGA)

Kvasničný extrakt (Difco)	5 g
Bacto pepton (Difco)	5 g
D(+)-glukosa (monohydrát)	10 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Destilovaná voda	1 l

V baňce o objemu 1 litr se připraví 0,5 litru média.

Látky se rozpustí.

Sterilizuje se 15 minut v autoklávu při teplotě 121 °C.

Ochladí se na 50 °C. Provede se rozliv na plotny.

Sacharoso-peptonový agar (SPA)

Sacharosa	20 g
Pepton	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Destilovaná voda	1 l

V baňce o objemu 1 litr se připraví 0,5 litru média.

Látky se rozpustí. V případě potřeby se upraví pH na 7,2–7,4.

Sterilizuje se 15 minut v autoklávu při teplotě 121 °C.

Ochladí se na 50 °C. Provede se rozliv ploten.

Kelmanovo tetrazoliové médium

Kyseliny kasaminové (Difco)	1 g
Bacto pepton	10 g
Dextróza	5 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Destilovaná voda	1 l

V baňce o objemu 1 litr se připraví 0,5 litru média.

Látky se rozpustí. Sterilizuje se 15 minut v autoklávu při teplotě 121 °C.

Ochladí se na 50 °C.

Přidá se filtrem sterilizovaný vodní roztok trifenyl-tetrazolium chloridu (Sigma) až do dosažení konečné koncentrace 50 mg/l.

Provede se rozliv ploten.

Dodatek 2

Materiál pro přípravu vzorku

Macerační pufr: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,0

Tento pufr se používá pro maceraci pletiv.

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Destilovaná voda	1 l

Látky se rozpustí a zkontroluje se pH. Podle potřeby se provede alikvotace.

Sterilizuje se 15 minut v autoklávu při teplotě 121 °C.

Při provádění přímého PCR testu se doporučuje přidat 5 % polyvinylpyrrolidonu 40 000 MWT (PVP-40), aby se snížilo působení inhibice amplifikace aromatickými molekulami v extraktu.

Při použití homogenizační metody pomocí Waring-Blender nebo Ultra-Turrax k maceraci výkrojků pletiva bramboru se doporučuje přidat deflokulační prostředek, prostředek proti tvorbě pěny nebo antioxidant.

Lubrol vložky	0,5 g/l
Antipěnidlo DC-Silikon	1,0 ml/l
Tetrapyrofosfát sodný	1,0 g/l

Autoklávuje se odděleně. Přidává se až do dosažení žádané koncentrace.

Peletový pufr: 10 mM fosfátový pufr, pH 7,2

Tento pufr se používá pro resuspendování a ředění pelet z pupkových částí bramborových hlíz.

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

Látky se rozpustí a zkontroluje se pH. Podle potřeby se provede alikvotace.

Sterilizuje se 15 minut v autoklávu při teplotě 121 °C.

Dodatek 3

Materiál pro IF test

IF pufr: 10 mM roztoku chloridu sodného pufrovaného fosfátem (PSB), pH 7,2

Tento pufr se používá pro ředění antiséra.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destilovaná voda	1 l

Látky se rozpustí a zkontroluje se pH. Podle potřeby se provede alikvotace.

Sterilizuje se 15 minut v autoklávu při teplotě 121 °C.

IF pufr Tween

Tento pufr se používá k omytí podložních sklíček. K IF pufru se přidá 0,1% Tween 20.

0,1 M glycerin pufrovaný fosfátem, pH 7,6

Tento pufr se používá ke zvýšení fluorescence jako krycí tekutina na okénkách IF podložního sklíčka.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3,2 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
Glycerin	50 ml
Destilovaná voda	100 ml

Dodatek 4

Stanovení stupně kontaminace v IF testu

$$\begin{aligned} \text{Plocha (S) jednoho okénka na podloním sklíčku s více okénky} & \quad (1) \\ = \frac{\pi D^2}{4} \end{aligned}$$

kde D = průměr okénka.

$$\begin{aligned} \text{Plocha (s) pole objektivu} & \quad (2) \\ = \frac{\pi d^2}{4} \end{aligned}$$

kde d = průměr pole objektivu.

Průměr pole (d) se zjišťuje buď přímým měřením nebo z následujících vzorců: (3)

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

kde i = koeficient pole (závislý na typu okuláru a pohybuje se mezi 8 a 24),

K = koeficient tubusu (1 nebo 1,25),

G = (100násobné, 40násobné atd.) zvětšení objektivu.

Ze vzorce (2) (4)

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

Ze vzorce (3)

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

Zjistí se počet typických fluoreskujících buněk v jednom poli (c).

Vypočte se počet typických fluoreskujících buněk v celém okénku (C).

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

Vypočte se počet typických fluoreskujících buněk v 1 ml pelety (N).

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

kde y = objem pelety na okénku podložního sklíčka

F = zředovací faktor pelety

Dodatek 5

Materiál pro ELISA test

Dvojnásobný uhličitanový povlakový pufr, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
Destilovaná voda	1 l

Látky se rozpustí a zkontroluje se pH. Podle potřeby se provede alikvotace.

Sterilizuje se 15 minut v autoklávu při teplotě 121 °C.

Pokud extrakt obsahuje vysoký podíl aromatických molekul, lze jako antioxidant přidat siričitan sodný s konečnou koncentrací 0,2 %.

Desetinásobný roztok chloridu solného pufovaný fosfátem (PSB), pH 7,4

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

Látky se rozpustí a zkontroluje se pH. Podle potřeby se provede alikvotace.

Sterilizuje se 15 minut v autoklávu při teplotě 121 °C.

Roztok chloridu sodného – Tween– pufovaný fosforečnanem (PBS-T)

10 x PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilovaná voda	895 ml

Blokační (antilátkový) pufr (musí se připravit čerstvý)

10 x PBS	10 ml
Polyvinylpyrrolidon 44 000 MWT (PVP-44)	2 g
10 % Tween 20	0,5 g
Sušené mléko	0,5 g
Destilovaná voda	do 100 ml

Alkalický substrátový roztok fosfatázy, pH 9,8

Dietanolamin	97 ml
Destilovaná voda	800 ml

Promísí se a pH se upraví koncentrovanou HCl na 9,8.

Doplní se destilovanou vodou na objem 1 litru.

Přidá se 0,2 g MgCl₂.

Na každých 15 ml roztoku se rozpustí 2 tablety (5 mg) substrátové fosfatázy (Sigma).

Dodatek 6

Materiál pro PCR test

Sekvence oligonukleotidových primerů

Primer OLI 1 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

Primer Y2 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Potřebné chemikálie viz Seal et al., 1993.

Dodatek 7

Materiál pro test na selektivních živných médiích a obohacovací test

Selektivní médium SMSA (Engelbrecht, 1994, modifikováno Elphinstonem et al., 1996)

Základní médium

Kaseinový hydrolyzát (Difco)	1 g
Bacto pepton (Difco)	10 g
Glycerin	5 ml
Agar (Difco)	15 g
Destilovaná voda	1 l

V baňce o objemu 1 litr se připraví 0,5 litru média.

Látky se rozpustí a zkontroluje se pH. V případě potřeby se před autoklávováním upraví pH na 6,5. *Ralstonia solanacearum* při pH > 7,0 neroste na médiu příliš dobře.

Sterilizuje se 15 minut v autoklávu při teplotě 121 °C.

Ochladí se na 50 °C.

Pro docílení uvedených konečných koncentrací se přidají následující látky (všechny od firmy Sigma):

Krystalová violet	5 mg/l		
Polymixin B sulfát	100 mg/l	(cca 600 000 jednotek)	Sigma P-1004
Bacitracin (*)	25 mg/l	(cca 1 250 jednotek)	Sigma B-0125
Chloramfenikol	5 mg/l		Sigma C-3175
Penicilin G	0,5 mg/l	(cca 825 jednotek)	Sigma P-3032
Tetrazoliové soli	50 mg/l		

Látky se rozpustí v 70 % ethanolu na koncentrace uvedené pro připravený objem média. Některé látky, jako např. polymixin a chloramfenikol, se musí mírně zahřát a protřepat.

SMSA bujón (Elphinstone et al., 1996)

Příprava stejná jako pro selektivní médium SMSA, avšak bez agaru nebo tetrazoliových solí.

Alikvóty 3 ml se plní do univerzálních jednorázových zkumavek o objemu 30 ml.

(*) Látky se rozpustí v 70 % ethanolu na koncentrace uvedené pro připravený objem média. Některé látky, jako např. polymixin a chloramfenikol, se musí mírně zahřát a protřepat.

Literatura

- Buddenhagen, I.W.; Sequeira, L. and Kelman, A., 1962. Description of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52, 726.
- Cook, D.; Elizabeth B. and Sequeira, L., 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2, 113–121.
- Dinesen I.G. and DeBoer, S.H., 1995. Extraction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from composite samples of potato tubers. *American Potato Journal* 72, 133–142.
- Elphinstone, J.G.; Hennessy, J.; Wilson, J. and Stead, D.E., 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26.
- Engelbrecht, M.C., 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3–5.
- Hayward, A.C., 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27, 265–277.
- Hayward, A.C., 1994. Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. V: Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* (eds. 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 of *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.; Fulbright, D.W.; Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85, 528–536.
- Lozano, J.C. and Sequeira, L., 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology* 60, 838.
- Mirza, M.S.; Rademaker, J.W.L.; Janse, J.D. and Akkermans, A.D.L., 1993. Specific 16S ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 1029–1034.
- Robinson-Smith, A.; Jones, P.; Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D., 1995. Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67–79.
- Seal, S.E.; Jackson, L.A.; Young, J.P.W. and Daniels, M.J., 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *P. syzygii*, *P. picketti* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology* 139, 1587–1594.
- Smith, J.J.; Offord, L.C.; Holderness, M. and Saddler, G.S., 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 4262–4268.
- Stead, D.E., 1992a. Techniques for detecting and identifying plant pathogenic bacteria. V: 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.

PŘÍLOHA III

1. Ve všech případech podezření z výskytu škodlivého organismu, kdy screeningový(é) test(y) provedený(é) na uvedeném rostlinném materiálu podle metody popsané v příloze II, a ve všech ostatních případech podle některé z úředně schválených metod, dopadl pozitivně a na potvrzení nebo vyvrácení výsledku uvedenou metodou se ještě čeká, by měl být následující materiál zajištěn a vhodnou formou uschován:
 - dle možností partie (z níž byl vzorek odebrán) nebo část této partie v původním balení s etiketou,
 - dle možností zbývající část vzorků,
 - zbylé extrakty a další materiál připravený pro screeningový test, jako např. podložní sklička pro imunofluorescenční test, a
 - všechny příslušné podklady, dokud není výše uvedený postup zcela ukončen.
 2. Při potvrzení výskytu škodlivého organismu by měl být následující materiál zajištěn a vhodnou formou uschován nejméně po dobu jednoho měsíce po oznamovacím řízení podle čl. 5 odst. 2:
 - materiál uvedený v bodu 1,
 - případně vzorek infikovaných rostlin rajčete nebo lilku vejčoplodého naočkovaný extraktem z hlíz nebo rostlin a
 - izolovaná kultura původce.
-

PŘÍLOHA IV

Šetření uvedené v čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu i) se v závažných případech vztahuje na tyto faktory:

- i) místa produkce,
- na nichž se pěstují nebo pěstovaly brambory, které jsou klonově příbuzné s bramborami, které byly prohlášeny za napadené tímto organismem,
 - na nichž se pěstují nebo pěstovala rajčata, která vyrostla z téže partie osiva jako rajčata, která byla prohlášena za napadená tímto organismem,
 - na nichž se pěstují nebo pěstovaly brambory nebo rajčata, které byly pro podezření z výskytu tohoto organismu zařazeny pod úřední kontrolu,
 - na nichž se pěstují nebo pěstovaly brambory, které jsou klonově příbuzné s bramborami, které byly vypěstovány v místech produkce prohlášených za napadená tímto organismem,
 - na nichž se pěstují brambory nebo rajčata a která leží v sousedství zamořených míst produkce, včetně takových míst, na kterých se pracovní nářadí a zařízení používají společně buď přímo nebo přes společného smluvního partnera,
 - na nichž se k zavlažování nebo postřiku používá povrchová voda ze zdroje, který se ukázal jako kontaminovaný tímto organismem nebo u něhož existuje podezření z kontaminace tímto organismem,
 - na nichž se k zavlažování nebo postřiku používá povrchová voda ze zdroje, který se používá společně s místy produkce, která se ukázala jako kontaminovaná tímto organismem nebo u nichž existuje podezření z kontaminace tímto organismem,
 - která jsou nebo byla zaplavena povrchovou vodou, která se ukázala jako kontaminovaná tímto organismem nebo u níž existuje podezření z kontaminace tímto organismem, a
- ii) povrchovou vodu, která slouží k zavlažování nebo postřiku polí či míst produkce, která se ukázala jako kontaminovaná tímto organismem, nebo která byla touto vodou zaplavena.
-

PŘÍLOHA V

1. Faktory, na které je třeba brát zřetel při stanovení rozsahu pravděpodobného napadení podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu iii) a písm. c) bodu iii), v závažných případech zahrnují:
 - uvedený rostlinný materiál, který byl pěstován v místě produkce, které bylo podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu ii) prohlášeno za napadené,
 - místa produkce s výrobně technickým spojením s uvedeným rostlinným materiálem, který byl podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu ii) prohlášen za napadený, včetně takových míst, na kterých se pracovní nářadí a zařízení používají společně buď přímo nebo přes společného smluvního partnera,
 - uvedený rostlinný materiál, který byl pěstován na místech produkce uvedených v předchozí odrážce nebo byl na takových místech přítomen v době, ve které uvedený rostlinný materiál, který byl podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu ii) prohlášen za napadený, byl přítomen na místě produkce uvedeném v první odrážce,
 - sklady, do nichž byl uvedený rostlinný materiál dopraven z výše uvedených míst produkce,
 - jakékoli stroje, dopravní prostředky, přepravní kontejnery, skladovací prostory nebo jejich části jakož i ostatní předměty, včetně obalového materiálu, které mohly přijít do styku s uvedeným rostlinným materiálem, který byl podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu ii) prohlášen za napadený,
 - veškerý uvedený rostlinný materiál, který byl skladován v zařízeních nebo přišel do styku s předměty uvedenými v předchozí odrážce před jejich očištěním nebo dezinfekcí,
 - jako výsledek šetření a testování podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu i) v případě brambor ty hlízy nebo rostliny se sesterským nebo rodičovským klonovým vztahem k uvedenému rostlinnému materiálu, resp. v případě rajčat ty rostliny, které vyrostly ze stejného osiva jako uvedený rostlinný materiál, který byl podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu ii) prohlášen za napadený, a u nichž, třebaže byly vyšetřeny na původce s negativním výsledkem, se napadení na základě klonové vazby jeví pravděpodobným,
 - místa produkce uvedeného rostlinného materiálu, vztahujícího se k předchozí odrážce,
 - místa produkce uvedeného rostlinného materiálu, která byla zavlažována nebo postřikována vodou, která byla podle čl. 5 odst. 1 písm. c) bodu ii) prohlášena za kontaminovanou,
 - uvedený rostlinný materiál, který byl vypěstován na polích, která byla zaplavena kontaminovanou povrchovou vodou.
2. Stanovení možného rozšíření podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu iv) a písm. c) bodu iii) zahrnuje:
 - i) v případech podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu iv) zkoumání následujících aspektů:
 - blízkost k jiným místům produkce, na nichž se pěstuje uvedený rostlinný materiál,
 - společná produkce a použití partií sadbových brambor,
 - místa produkce, na nichž byla k zavlažování nebo k postřikování uvedeného rostlinného materiálu použita povrchová voda v případech, kdy hrozí nebo hrozilo nebezpečí odtoku povrchové vody nebo zaplavení z míst produkce, která byla podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu ii) prohlášena za napadená;
 - ii) v případech, kdy byla povrchová voda podle čl. 5 odst. 1 písm. c) bodu ii) prohlášena za kontaminovanou:
 - místa produkce, na nichž se uvedený rostlinný materiál pěstuje v bezprostřední blízkosti povrchové vody prohlášené za kontaminovanou nebo která by touto povrchovou vodou mohla být zaplavena,
 - každá samostatná zavlažovací nádrž, která má spojitost s povrchovou vodou prohlášenou za kontaminovanou.

3. Podrobnosti oznámení podle čl. 5 odst. 2 zahrnují:
 - datum ohlášení podezření z výskytu organismu podle článku 4 a datum odběru vzorků, popřípadě potvrzení o přítomnosti organismu podle článku 5,
 - popis jednotlivých aspektů prohlášení o napadení a vymezení zóny.
 4. Podrobnosti doplňkového oznámení podle čl. 5 odst. 2 druhého pododstavce zahrnují:
 - pro každou zásilku nebo partii brambor prohlášenou za napadenou osvědčení podle článku 7 nebo 8 směrnice 77/93/EHS, číslo rostlinolékařského pasu nebo registrační číslo producenta brambor, společného skladu či expedičního střediska,
 - pro každou zásilku nebo partii rostlin rajčat prohlášenou za napadenou osvědčení podle článku 7 nebo 8 směrnice 77/93/EHS a číslo rostlinolékařského pasu podle seznamu v příloze V části A kapitole 1 bodu 2.2 směrnice 77/93/EHS,
 - označení odrůdy a kategorie v případě porostů sadbových brambor, a dle možností ve všech ostatních případech,
 - veškeré další údaje o potvrzení ohniska, které si Komise případně vyžádá.
-

PŘÍLOHA VI

1. Opatření uvedená v čl. 6 odst. 1 jsou tato:
 - spálení, nebo
 - použití jako krmivo po tepelné úpravě, která vylučuje nebezpečí přežití tohoto organismu, nebo
 - hluboké zakopání na skládkách, odkud nehrozí nebezpečí prosáknutí na zemědělské půdy nebo kontaminace povrchové vody, která by mohla být použita k zavlažování zemědělských půd, nebo
 - průmyslové zpracování přímou neprodlenou dodávkou do zpracovatelského závodu s úředně schválenými zařízeními na odstraňování odpadů, která splňují ustanovení přílohy VII, nebo
 - jiná opatření, pokud prokazatelně nepředstavují žádné rozpoznatelné nebezpečí rozšiřování tohoto organismu; tato opatření musejí být neprodleně oznámena Komisi a ostatním členským státům.

2. Vhodné použití nebo likvidace uvedeného rostlinného materiálu podle čl. 6 odst. 2 pod dohledem příslušných úředních subjektů dotyčného členského státu při jejich vzájemném informování za účelem zajištění kontroly v kterémkoliv okamžiku a se souhlasem příslušného úředního subjektu členského státu, v němž se brambory mají balit nebo zpracovávat, s ohledem na zařízení k odstraňování odpadů uvedená v první a druhé odrážce, zahrnuje:
 - i) v případě hlíz bramboru:
 - jejich použití jako konzumních brambor určených ke spotřebě, balených v provozech vybavených vhodnými zařízeními k odstraňování odpadů do obalů pro přímou dodávku a použití, které nevyžadují změnu obalu, a určených pro takovou přímou dodávku a použití, nebo
 - jejich použití jako konzumních brambor určených k průmyslovému zpracování po přímé a okamžité dodávce do zpracovatelského závodu vybaveného vhodnými zařízeními k odstraňování odpadů, nebo
 - jiné použití nebo likvidaci, pokud prokazatelně nepředstavují žádné rozpoznatelné nebezpečí rozšiřování tohoto organismu a s výhradou souhlasu příslušných úředních subjektů; tato opatření musejí být neprodleně oznámena Komisi a ostatním členským státům;
 - ii) v případě jiných částí rostlin včetně stonků a zbytků listů:
 - jejich zničení, nebo
 - jiné použití nebo likvidaci, pokud prokazatelně nepředstavují žádné rozpoznatelné nebezpečí rozšiřování tohoto organismu; tato opatření musejí být neprodleně oznámena Komisi a ostatním členským státům.

3. Vhodné metody dekontaminace předmětů uvedených v čl. 6 odst. 3 zahrnují očistu a případnou desinfekci tak, aby nehrozilo žádné rozpoznatelné nebezpečí rozšiřování tohoto organismu; tato opatření se provádějí pod dohledem příslušných úředních subjektů členských států.

4. Soubor opatření, uvedených v čl. 6 odst. 4, která přijmou členské státy v zóně vymezené podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu iv) a písm. c) bodu iii), zahrnuje:
 - 4.1 V případech, kdy místa produkce byla podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu ii) prohlášena za napadená:
 - a) na poli nebo na jednotce s chráněnou produkcí plodin, které(á) bylo(a) prohlášeno(a) za napadené(ou) podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu ii), buď:

- i) v průběhu nejméně čtyř hospodářských let následujících po prohlášení místa produkce za napadené:
- opatření k odstranění planě rostoucích rostlin bramboru a rajčete i ostatních hostitelských rostlin organismu, včetně plevelů z čeledi lilkovitých, a
 - zákaz pěstování:
 - hlíz a rostlin bramboru,
 - rostlin a osiva rajčete,
 - se zřetelem na biologii organismu:
 - jiných hostitelských rostlin,
 - rostlin rodu *Brassica*, u kterých prokazatelně existuje nebezpečí přežití tohoto organismu,
 - kultur, u kterých prokazatelně existuje nebezpečí rozšiřování tohoto organismu,
 - v prvním sklizňovém období brambor a rajčat, následujícím po období uvedeném v předchozí odrážce, a za podmínky, že pole bylo nejméně dva hospodářské roky po sobě před osázením shledáno prostým planě rostoucích rostlin bramboru a rajčete i ostatních hostitelských rostlin včetně plevelů z čeledi lilkovitých:
 - v případě brambor pěstování úředně certifikované sadby brambor výlučně pro produkci konzumních brambor a
 - provedení úředních průzkumů, včetně testování, podle čl. 2 odst. 1,
 - v sklizňovém období brambor a rajčat, následujícím po sklizňovém období uvedeném v předchozí odrážce a po příslušném rotačním cyklu, v případě brambor výsadbu úředně certifikované sadby pro produkci sadbových nebo konzumních brambor, a v případě brambor a rajčat provedení úředních průzkumů podle čl. 2 odst. 1; nebo
- ii) v průběhu pěti hospodářských let následujících po prohlášení místa produkce za napadené:
- opatření k odstranění planě rostoucích rostlin bramboru a rajčete i ostatních hostitelských rostlin organismu, včetně plevelů z čeledi lilkovitých, a
 - v prvních třech letech buď ponechání pole ladem nebo pěstování obilovin podle zjištěného rizika, anebo jeho využití jako stálé pastviny s častým nízkým sečením nebo intenzivní pastvou nebo pěstování semenných porostů trav s následným pěstováním nehostitelských rostlin v dalších dvou letech, které prokazatelně nepředstavují žádné nebezpečí přežití nebo rozšiřování organismu,
 - v prvním sklizňovém období brambor a rajčat následujícím po období uvedeném v předchozí odrážce:
 - v případě brambor pěstování úředně certifikované sadby brambor pro produkci sadbových nebo konzumních brambor
 - a provedení úředních průzkumů, včetně testování, podle čl. 2 odst. 1;
- b) na ostatních polích:
- v hospodářském roce následujícím po prohlášení místa produkce za napadené:
 - zákaz pěstování hlíz nebo rostlin bramboru ani jiných hostitelských rostlin organismu a opatření k odstranění planě rostoucích rostlin bramboru a rajčete i ostatních hostitelských rostlin organismu, včetně plevelů z čeledi lilkovitých, nebo
 - v případě hlíz bramboru výsadbu úředně certifikované sadby brambor výlučně k produkci konzumních brambor, za předpokladu, že příslušným úředním subjektům bylo uspokojivě prokázáno, že bylo odstraněno nebezpečí spojené s planě rostoucími rostlinami bramboru a rajčete i z jiných hostitelských rostlin organismu, včetně plevelů z čeledi lilkovitých. Porost je v přiměřených lhůtách kontrolován a planě rostoucí rostliny bramboru jsou testovány na přítomnost organismu; kromě toho jsou kontrolovány sklizené hlízy bramboru,

- v prvním hospodářském roce následujícím po hospodářském roce uvedeném v předchozí odrážce:
 - v případě brambor výlučně výsadbu úředně certifikované sadby brambor pro produkci buď sadbových nebo konzumních brambor,

 - v průběhu alespoň druhého hospodářského roku následujícího po hospodářském roce uvedeném v první odrážce:
 - v případě brambor výlučně výsadbu úředně certifikované sadby brambor nebo sadby brambor vypěstované pod úředním dohledem z úředně certifikované sadby brambor k produkci sadbových nebo konzumních brambor,

 - v každém z hospodářských roků uvedených v předchozích odrážkách opatření k odstranění planě rostoucích rostlin bramboru a rajčete i ostatních hostitelských rostlin organismu, včetně plevelů z čeledi lilkovitých, a provedení úředních průzkumů podle čl. 2 odst. 1; při pěstování sadby brambor k produkci sadbových brambor musí být provedeno vyšetření hlíz;
- c) neprodleně po prohlášení pole za napadené podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu ii) a v každém z následujících hospodářských roků až do prvního povoleného sklizňového období brambor nebo rajčat včetně podle písmene a):
- očištění a případně dezinfekci všech strojů a skladovacích zařízení v místě produkce, které byly použity při produkci brambor nebo rajčat, podle metod uvedených v bodu 3,
 - zavedení úředních kontrol zavlažovacích a postřikovacích programů, včetně zákazu těchto programů jako prevence proti rozšiřování organismu;
- d) na jednotce s chráněnou produkcí plodin, prohlášené za napadenou podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu ii), u níž je možná úplná výměna pěstebního substrátu:
- zákaz pěstování hlíz nebo rostlin bramboru ani jiných hostitelských rostlin, včetně rostlin a semen rajčete, ledaže dotyčná jednotka byla podrobena úředně kontrolovaným opatřením k odstranění organismu a veškerého hostitelského rostlinného materiálu včetně alespoň úplné výměny pěstebního substrátu a vyčištění, popřípadě vydezinfikování výše uvedené jednotky a veškerého vybavení, a v návaznosti byla schválena pro produkci brambor nebo rajčat příslušnými úředními subjekty a
 - v případě produkce brambor použití úředně certifikované sadby brambor, minihlíz nebo mikrorostlin získaných z testovaných zdrojů,
 - zavedení úředních kontrol zavlažovacích a postřikových programů, včetně zákazu těchto programů jako prevence proti rozšiřování organismu.

4.2 Bez dotčení opatření uvedených v bodu 4.1 členské státy ve vymezené zóně:

- a) neprodleně po prohlášení o napadení po dobu nejméně tří hospodářských let:
- aa) v případech, kdy zóna byla vymezena podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu iv):
- zajistí dohled příslušných úředních subjektů nad zařízeními, ve kterých se pěstují nebo skladují bramborové hlízy či rajčata nebo se s nimi manipuluje, jakož i nad prostorami, které smluvně poskytují stroje používané k produkci brambor a rajčat,
 - vyžadují vyčištění a případně dezinfekci strojů a skladů v těchto prostorách podle vhodných metod uvedených v bodu 3,

- vyžadují, aby v této zóně byla pro všechny kultury brambor používána výlučně certifikovaná sadba nebo sadba vypěstovaná pod úředním dohledem a aby sadbové brambory, které byly vypěstovány v místech produkce zařazených jako pravděpodobně napadená podle čl. 5 odst. 1 písm. a) bodu iii), byly po sklizni vyšetřeny,
 - vyžadují oddělené nakládání se sklizenými sadbovými bramborami a s konzumními bramborami ve všech podnicích v rámci této zóny,
 - provádí úřední průzkumy podle čl. 2 odst. 1;
- ab) v případech, kdy povrchová voda je prohlášena za kontaminovanou podle čl. 5 odst. 1 písm. c) bodu ii) nebo je považována za jeden ze zdrojů možného rozšiřování organismu podle přílohy V bodu 2:
- provádí ve vhodných termínech každoroční šetření, včetně odběru vzorků povrchové vody a případných hostitelských rostlin z čeledi lilkovitých v dotyčných vodních zdrojích, a testování:
 - uvedeného rostlinného materiálu podle příslušné metody popsané v příloze II, nebo
 - v ostatních případech podle jiné úředně schválené metody;
 - zavedou úřední kontroly zavlažovacích a postřikových programů, včetně zákazu používání vody prohlášené za kontaminovanou k zavlažování a postřiku uvedeného rostlinného materiálu a případně jiných hostitelských rostlin, aby zabránily rozšiřování organismu. Tento zákaz může být na základě výsledků uvedeného každoročního šetření přezkoumán,
 - při kontaminaci odpadních vod zavedou úřední kontroly likvidace odpadů z průmyslových zařízení pro zpracování nebo z balíren, které nakládají s uvedeným rostlinným materiálem;
- b) vypracují v případě potřeby program k obnově veškerých porostů sadbových brambor na přiměřené časové období.
-

PŘÍLOHA VII

Úředně schválená zařízení k odstraňování odpadů uvedená v příloze VI bodu 1 čtvrté odrážce musí splňovat níže uvedené podmínky, aby se vyloučilo nebezpečí rozšiřování organismu:

- i) odpad ze zpracování brambor a rajčat (včetně bramborových slupek, odpadních brambor a rajčat), jakož i jiný tuhý odpad z brambor a rajčat, se likvidují takto:
 - hlubokým zakopáním na skládkách, odkud nehrozí nebezpečí prosáknutí na zemědělské půdy nebo kontaktu s povrchovou vodou, která by mohla být použita k zavlažování zemědělských půd. Odpad je dopraven přímo na skládku za takových podmínek izolace, aby nehrozilo žádné nebezpečí ztráty odpadů, nebo
 - spálením;
- ii) odpadní vody: před dalším použitím se odpadní vody, které obsahují suspendované pevné látky, za účelem odstranění těchto látek přefiltrují nebo odkalí v usazovacích nádržích. Tyto pevné látky se likvidují podle bodu i).

Následně se odpadní vody:

- před dalším použitím zahřejí na teplotu nejméně 70 °C po dobu alespoň 30 minut, nebo
 - ošetří jiným úředně povoleným a kontrolovaným způsobem, při kterém nehrozí nebezpečí, že by odpad přišel do styku se zemědělskými půdami nebo vodními zdroji, které by mohly být použity k zavlažování zemědělských půd. Podrobnosti tohoto způsobu se oznamují ostatním členským státům a Komisi.
-