

I

(Retsakter hvis offentliggørelse er obligatorisk)

RÅDETS DIREKTIV 98/57/EF

af 20. juli 1998

om bekæmpelse af *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

RÅDET FOR DEN EUROPÆISKE UNION HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab, særlig artikel 43,

under henvisning til forslag fra Kommissionen⁽¹⁾,

under henvisning til udtalelse fra Europa-Parlamentet⁽²⁾,

under henvisning til udtalelse fra Det Økonomiske og Sociale Udvalg⁽³⁾, og

ud fra følgende betragtninger:

Skadegøreren *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. var tidligere kendt som *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith; *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. bliver sandsynligvis den almindeligt accepterede betegnelse for skadegøreren; dette direktiv bør tage hensyn til denne videnskabelige udvikling;

produktionen af kartofler og tomater indtager en vigtig plads i EF-landbruget; kartoffel- og tomatudbyttet bliver til stadighed truet af skadegørere;

ved at beskytte kartoffel- og tomatdyrkingen mod sådanne skadegørere vil ikke alene produktionskapaciteten blive bevaret, men landbrugsproduktiviteten vil tillige blive øget;

beskyttelsesforanstaltninger til at hindre, at der indslæbes skadegørere på en medlemsstats område, ville kun have begrænset virkning, hvis sådanne skadegørere ikke samtidig blev metodisk bekæmpet i hele Fællesskabet og hindret i at brede sig;

en af skadegørerne på kartofler og tomater er *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., som er det pato-

gene agens, der forårsager brunbakteriose hos kartofler og bakterievishnesyge hos kartofler og tomater; sygdomsudbrud forårsaget af dette patogen er forekommet i nogle dele af Fællesskabet, og der findes stadig enkelte, begrænsede smittekilder;

det vil være en betydelig risiko for kartoffel- og tomatdyrkingen i hele Fællesskabet, hvis der ikke for disse afgrøder træffes effektive foranstaltninger til at lokalisere denne skadegører og fastslå dens udbredelse, således at man kan hindre dens forekomst og spredning, og hvis den findes, at forhindre, at den spredes, og at bekæmpe den med henblik på udryddelse;

for at sikre dette må der træffes en række foranstaltninger i Fællesskabet; desuden bør medlemsstaterne om nødvendigt kunne træffe yderligere eller strengere foranstaltninger, forudsat at varebevægelserne for kartofler og tomater i Fællesskabet ikke hindres ud over, hvad der er fastsat i Rådets direktiv 77/93/EØF af 21. december 1976 om foranstaltninger mod indslæbning i Fællesskabet af skadegørere på planter eller planteprodukter og mod deres spredning inden for Fællesskabet⁽⁴⁾; sådanne foranstaltninger skal meddeles de øvrige medlemsstater og Kommissionen;

i foranstaltningerne bør der tages hensyn til, at systematiske officielle undersøgelser er nødvendige for at lokalisere patogenet; sådanne undersøgelser bør omfatte inspektionsprocedurer, og da sygdommen under visse miljømæssige omstændigheder kan være latent uden synlige symptomer såvel i kartofler i vækst som i kartoffelknolde under lagring, bør foranstaltningerne tillige omfatte prøvetagnings- og testmetoder i relevante tilfælde; patogenets spredning i afgrøden i vækst er ikke den vigtigste faktor, men patogenet kan spredes med overfladevand og visse vilde planter af natskyggefamilien, og vanding af kartofler og tomater med kontamineret vand lader derfor til at udgøre en risiko for kontaminering af sådanne afgrøder; patogenet kan også overvinde i gengrøninger af kartofler (spildkartofler) og selvsåede

⁽¹⁾ EFT C 124 af 21.4.1997, s. 12, og EFT C 108 af 7.4.1998, s. 85.

⁽²⁾ EFT C 14 af 19.1.1998, s. 34.

⁽³⁾ EFT C 206 af 7.7.1997, s. 57.

⁽⁴⁾ EFT L 26 af 31.1.1977, s. 20. Direktivet er senest ændret ved Kommissionens direktiv 98/2/EF (EFT L 15 af 21.1.1998, s. 34).

tomater, som kan være en smittekilde og overføre sygdommen fra en vækstsæson til den næste; patogenet spredes endvidere ved kontaminering af kartofler ved kontakt med kontaminerede kartofler eller med lægge-, optagnings- og behandlingsmaskiner og -redskaber eller udstyr, der anvendes til transport og lagring, og som er blevet kontamineret med skadegøreren ved tidligere kontakt med kontaminerede kartofler;

patogenets spredning kan mindskes eller hindres ved dekontaminering af sådanne genstande; sådan kontaminering af læggekartofler vil altid udgøre en stor risiko for, at patogenet spredes; ligeledes udgør latent kontaminering af læggekartofler en stor risiko for spredning af patogenet, og dette kan forhindres ved benyttelse af læggekartofler, der er avlet efter et officielt godkendt program, hvorunder læggekartoflerne er blevet prøvet og fundet sygdomsfrie;

det nuværende kendskab til biologien og epidemiologien hos *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. under europæiske betingelser er ufuldstændigt, og det forventes, at det vil være nødvendigt at tage de foreslåede foranstaltninger op til fornyet overvejelse inden for flere vækstsæsoner; der forventes ligeledes forbedringer af testmetoden i lyset af yderligere forskning, navnlig med hensyn til testmetodernes følsomhed og specificitet, således at de optimale testmetoder, der er til rådighed, kan vælges og standardiseres;

fastlæggelsen af enkelthederne i sådanne generelle foranstaltninger og i de strengere eller supplerende foranstaltninger, der træffes af medlemsstaterne for at forhindre indslæbning af patogenet på deres område, bør foregå i snævert samarbejde mellem medlemsstaterne og Kommissionen i Den Stående Komité for Plantesundhed, i det følgende benævnt »komitéen« —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

Dette direktiv omhandler de foranstaltninger, der skal træffes i medlemsstaterne mod *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., tidligere kendt som *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, i det følgende benævnt »skadegøreren«, for med hensyn til de værtsplanter for skadegøreren, der er opført på listen i afsnit I i bilag I, i det følgende benævnt »det nævnte plantemateriale«, at

- a) lokalisere skadegøreren og bestemme dens udbredelse
- b) forhindre, at den forekommer og spredes, og

- c) hvis den konstateres: forhindre, at den spredes, og bekæmpe den med henblik på udryddelse.

Artikel 2

1. Medlemsstaterne gennemfører årlige systematiske officielle undersøgelser for skadegøreren på det nævnte plantemateriale med oprindelse på deres område. For at fastslå eventuelle andre smittekilder, der truer produktionen af det nævnte plantemateriale, skal medlemsstaterne i produktionsområder med det nævnte plantemateriale foretage en risikovurdering og, medmindre der ved vurderingen ikke er konstateret nogen risiko for spredning af skadegøreren, skal de udføre målrettede officielle undersøgelser for skadegøreren på andre planter end det nævnte plantemateriale, herunder vilde værtsplanter af natskyggefamilien, samt undersøgelser af såvel overfladevand, der bruges til vanding eller sprøjtning af det nævnte plantemateriale, som flydende affald, der udledes fra industrielle forarbejdnings- eller pakkeanlæg, der håndterer det nævnte plantemateriale, og som bruges til vanding eller sprøjtning af det nævnte plantemateriale. Omfanget af disse målrettede undersøgelser fastlægges under hensyn til den konstaterede risiko. Medlemsstaterne kan også foretage officielle undersøgelser for skadegøreren på andet materiale, f.eks. vækstmedier, jordbund og fast affald fra industrielle forarbejdnings- eller pakkeanlæg.

2. De i stk. 1 omhandlede officielle undersøgelser skal foretages

- a) på det nævnte plantemateriale ifølge de nærmere regler i bilag I, afsnit II, punkt 1
- b) på andre værtsplanter end det nævnte plantemateriale og af vand, herunder flydende affald, efter egnede metoder, og der skal hvor relevant udtages prøver, som underkastes officiel laboratorietest eller laboratorietest under officielt tilsyn
- c) i relevante tilfælde på andet materiale efter egnede metoder.

Med henblik på disse undersøgelser træffer de officielle ansvarlige organer, jf. direktiv 77/93/EØF, beslutning om de nærmere regler for inspektionsprocedurerne og antal, oprindelse, stratificering og tidspunkt for indsamling af prøver baseret på kvalificerede videnskabelige og statistiske principper samt skadegøreren's biologi og under hensyntagen til den pågældende medlemsstats særlige produktionssystemer for det nævnte plantemateriale og — i relevante tilfælde — for andre værtsplanter for skadegøreren.

3. De nærmere enkeltheder vedrørende og resultaterne af de i stk. 1 omhandlede officielle undersøgelser medde-

les hvert år de øvrige medlemsstater og Kommissionen som angivet i bilag I, afsnit II, punkt 2. Disse oplysninger skal meddeles inden den 1. juni, undtagen oplysninger om kartofler, der anvendes som udsæd af egen avl, idet disse oplysninger skal meddeles inden den 1. september. De nærmere enkeltheder og resultater vedrørende afgrøderne skal referere til det foregående års produktion. Oplysningerne i denne meddelelse kan indgives til komitéen.

4. Følgende bestemmelse vedtages efter proceduren i artikel 16a i direktiv 77/93/EØF:

— de egnede metoder til undersøgelserne og laboratorietesten som omhandlet i stk. 2, første afsnit, litra b).

5. Følgende bestemmelser kan vedtages efter proceduren i artikel 16a i direktiv 77/93/EØF:

— de egnede metoder for undersøgelserne som omhandlet i stk. 2, første afsnit, litra c)

— yderligere enkeltheder om de i stk. 2, andet afsnit, omhandlede undersøgelser med henblik på at sikre, at sikkerhedsniveauet er sammenligneligt medlemsstaterne imellem.

Artikel 3

Medlemsstaterne drager omsorg for, at en mistænkt eller bekræftet forekomst af skadegøreren på deres område indberettes til deres egne officielle ansvarlige organer.

Artikel 4

1. Hvis der foreligger mistanke om forekomst, sørger den (de) pågældende medlemsstats(ers) officielle ansvarlige organer for, at der gennemføres officiel laboratorietest eller laboratorietest under officielt tilsyn for det nævnte plantemateriale efter den i bilag II fastsatte relevante metode og i overensstemmelse med de betingelser, der er foreskrevet i bilag III, punkt 1, eller i alle andre tilfælde efter en anden officielt godkendt metode for at bekræfte eller afkræfte mistanken. I tilfælde af bekræftelse finder betingelserne i bilag III, punkt 2, anvendelse.

2. I hvert tilfælde af mistanke, hvor

- i) der enten visuelt er konstateret diagnostiske symptomer på sygdom forårsaget af skadegøreren, og en hurtigscreeningstest, jf. bilag II, afsnit I, punkt 1, og afsnit II har givet positivt resultat
- ii) eller en screeningstest, jf. bilag II, afsnit I, punkt 2, og afsnit III har givet positivt resultat

skal medlemsstatens officielle ansvarlige organ, indtil mistanken er blevet bekræftet eller afkræftet, jf. stk. 1, for så vidt angår medlemsstatens egen produktion:

- a) forbyde flytning af planter og knolde fra alle afgrøder, partier eller sendinger, hvorfra prøverne er taget, medmindre det sker under organets tilsyn og på betingelse af, at det er fastslået, at der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes
- b) tage skridt til at tilbagespore det mistænkte tilfældes oprindelse
- c) på grundlag af omfanget af den skønnede risiko, navnlig med hensyn til produktion af det nævnte plantemateriale og bevægelser af partier af læggekartofler bortset fra dem, der er henvist til i litra a), som er avlet på det produktionssted, hvorfra prøverne er taget, træffe yderligere forholdsregler for at hindre, at skadegøreren spredes.

3. I de tilfælde af mistanke om forekomst, hvor der er risiko for kontaminering af det nævnte plantemateriale eller overfladevand fra eller til andre medlemsstater, skal den medlemsstat, hvori det mistænkte tilfælde er rapporteret, alt efter den beregnede risiko straks meddele vedkommende medlemsstat(er) de nærmere enkeltheder vedrørende det mistænkte tilfælde, og der skal etableres et hensigtsmæssigt samarbejde mellem de pågældende medlemsstater. De(n) medlemsstat(er), der har fået en sådan meddelelse, skal indføre forholdsregler efter stk. 2, litra c), og alt efter omstændighederne træffe yderligere foranstaltninger efter stk. 1 og 2.

4. Følgende bestemmelse kan vedtages efter proceduren i artikel 16a i direktiv 77/93/EØF:

— de foranstaltninger, der omhandles i stk. 2, litra c).

Artikel 5

1. Hvis en officiel laboratorietest eller en laboratorietest under officielt tilsyn, for det nævnte plantemateriale, efter den relevante metode, der er fastsat i bilag II, eller i alle andre tilfælde efter en anden officielt godkendt metode, bekræfter skadegøreren tilstedeværelse i en prøve udtaget i henhold til dette direktiv, skal medlemsstatens officielle ansvarlige organer under hensyntagen til gode videnskabelige principper, skadegøreren's biologi og det særlige produktions-, omsætnings- og forarbejdnings-system for skadegøreren's værtsplanter i den pågældende medlemsstat:

- a) for det nævnte plantemateriales vedkommende
 - i) foretage en undersøgelse for at fastslå kontamineringens omfang og primærkilde(r) efter bestemmelserne i bilag IV med en yderligere test efter artikel 4, stk. 1, af mindst alle relevante læggekartoffelmateriale med indbyrdes klonslægtskab, og

- ii) erklære følgende kontamineret: det nævnte plantemateriale, partiet og/eller sendingen, hvorfra prøven er taget, samt de maskiner, køretøjer, fartøjer, lagre eller enheder heraf og alle andre genstande, herunder emballage, som har været i kontakt med det nævnte plantemateriale, hvorfra prøven er taget; eventuelt skal også følgende erklæres kontamineret: marken(-erne), enheden(-erne) med beskyttet planteproduktion og produktionsstedet(-erne), hvor det nævnte plantemateriale er høstet, og hvorfra prøven er taget; for prøver, der er taget i vækstsæsonen, skal følgende erklæres kontamineret: marken(-erne), produktionsstedet(-erne) og eventuelt enheden(-erne) med beskyttet planteproduktion, hvorfra prøven er taget, og
 - iii) efter bestemmelserne i bilag V, punkt 1, bestemme omfanget af sandsynlig kontaminering ved kontakt før eller efter høst, ved forbindelse gennem produktion, vanding eller sprøjtning eller ved klonslægtkab med den erklærede kontaminering, og
 - iv) afgrænse en zone på grundlag af erklæringen om kontaminering, jf. nr. ii), bestemmelsen af en sandsynlig kontaminerings omfang, jf. nr. iii), og skadegørers mulige spredning efter bestemmelserne i bilag V, punkt 2, nr. i)
- b) for afgrøder af andre værtsplanter end de i litra a) omhandlede, hvor det er fastslået, at der er risiko ved produktion af det nævnte plantemateriale:
- i) foretage en undersøgelse i henhold til litra a), nr. i), og
 - ii) erklære følgende kontamineret: de værtsplanter for skadegøreren, hvorfra prøven er taget, og
 - iii) efter henholdsvis litra a), nr. iii) og iv), bestemme den sandsynlige kontaminering og afgrænse en zone i forhold til produktionen af det nævnte plantemateriale
- c) for overfladevands vedkommende (herunder flydende affald fra industrielle forarbejdnings- eller pakkeanlæg, der håndterer det nævnte plantemateriale) og visse vilde værtsplanter af natskyggefamilien, hvis det er fundet, at produktionen af det nævnte plantemateriale udgør en risiko for overfladevandet ved vanding, sprøjtning eller oversvømmelse:
- i) foretage en undersøgelse, herunder en officiel undersøgelse, på passende tidspunkter på prøver af overfladevand og eventuelle vilde værtsplanter af natskyggefamilien for at fastslå kontamineringens omfang, og
 - ii) i passende omfang og på grundlag af undersøgelserne, jf. nr. i), erklære det overfladevand, hvorfra prøven er taget, kontamineret, og

- iii) bestemme den sandsynlige kontaminering og afgrænse en zone på grundlag af erklæringen om kontaminering, jf. nr. ii), og skadegørers mulige spredning under hensyntagen til bestemmelserne i bilag V, punkt 1, og punkt 2, nr. ii).

2. Medlemsstaterne giver straks i overensstemmelse med bilag V, punkt 3, de øvrige medlemsstater og Kommissionen meddelelse om en erklæret kontaminering, jf. stk. 1, litra a), nr. ii), og stk. 1, litra c), nr. ii), og de nærmere enkeltheder vedrørende zoneafgrænsningen, jf. stk. 1, litra a), nr. iv), og hvor relevant stk. 1, litra c), nr. iii). Oplysningerne i meddelelsen i henhold til dette stykke kan indgives til komitéen.

Medlemsstaterne sender samtidig Kommissionen den supplerende meddelelse, der er fastlagt i punkt 4 i bilag V. Oplysningerne i meddelelsen i henhold til dette stykke skal indgives til komitéen.

3. Som følge af meddelelsen efter stk. 2 og de elementer, der indgår heri, skal eventuelle andre medlemsstater, som er anført i meddelelsen, foretage en undersøgelse efter stk. 1, litra a), nr. i), og hvor relevant stk. 1, litra c), nr. i), og alt efter omstændighederne træffe yderligere forholdsregler efter stk. 1 og 2.

Artikel 6

1. Medlemsstaterne foreskriver, at det nævnte plantemateriale, som er erklæret kontamineret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii), ikke må udplantes, og at det under deres officielle ansvarlige organers tilsyn og godkendelse skal behandles efter en af bestemmelserne i bilag VI, punkt 1, således at det kan fastslås, at der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes.

2. Medlemsstaterne foreskriver, at det nævnte plantemateriale, som er erklæret sandsynligvis kontamineret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iii), og litra c), nr. iii), herunder det nævnte plantemateriale, for hvilket der er fastslået en risiko, og som er produceret på produktionssteder, der er fastlagt som sandsynligvis kontamineret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iii), ikke må udplantes, og at det under deres officielle ansvarlige organers tilsyn skal anvendes på passende vis eller bortskaffes som beskrevet i bilag VI, punkt 2, således at det kan fastslås, at der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes.

3. Medlemsstaterne foreskriver, at maskiner, køretøjer, fartøjer, lagre eller enheder deraf og alle andre genstande, herunder emballage, som er erklæret kontamineret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii), eller som er erklæret

sandsynligvis kontamineret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iii), og litra c), nr. iii), skal destrueres eller dekontamineres efter passende metoder som anført i bilag VI, punkt 3. Efter dekontaminering anses sådanne genstande ikke længere for at være kontamineret.

4. Uden at dette berører foranstaltningerne i henhold til stk. 1, 2 og 3, foreskriver medlemsstaterne, at der skal træffes en række foranstaltninger som anført i bilag VI, punkt 4.1 og 4.2, i den afgrænsede zone, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iv), og litra c), nr. iii). Enkeltheder om sådanne foranstaltninger skal årligt meddeles til de øvrige medlemsstater og Kommissionen. Oplysningerne i denne meddelelse kan indgives til komitéen.

Artikel 7

1. Medlemsstaterne foreskriver, at læggekartofler skal opfylde kravene i direktiv 77/93/EØF og i direkte linje stamme fra kartoffelmateriale, der er frembragt under et officielt godkendt program, og som er fundet fri for skadegøreren ved officielle test eller test under officielt tilsyn efter den relevante metode i bilag II.

Ovennævnte test udføres af en medlemsstat:

- a) i de tilfælde, hvor der er en bekræftet forekomst af skadegøreren i dens egen produktion af læggekartofler
 - i) ved test af tidligere opformeringer, herunder den oprindelige klonselektion og systematisk test af basislæggekartoffelkloner, eller
 - ii) i tilfælde, hvor det er godtgjort, at der ikke er noget klonslægtskab, ved test af alle basislæggekartoffelkloner eller tidligere opformeringer, herunder den almindelige klonselektion, og
- b) i andre tilfælde enten på hver plante fra den oprindelige klonselektion eller på repræsentative prøver af basislæggekartoflerne eller af tidligere opformeringer.

2. Følgende bestemmelser kan vedtages efter proceduren i artikel 16a i direktiv 77/93/EØF:

- gennemførelsesbestemmelser til stk. 1, andet afsnit, litra a)
- regler vedrørende repræsentative prøver, jf. stk. 1, andet afsnit, litra b).

Artikel 8

Medlemsstaterne forbyder besiddelse og håndtering af skadegøreren.

Artikel 9

Uden at dette berører bestemmelserne i direktiv 77/93/EØF kan medlemsstaterne efter direktiv 95/44/EF⁽¹⁾ tillade undtagelser fra de i nærværende direktivs artikel 6 og 8 omhandlede foranstaltninger, når formålet er forsøg, forskning eller sortsforædling.

Artikel 10

Medlemsstaterne kan for deres egen produktion i fornødent omfang træffe supplerende eller strengere foranstaltninger til bekæmpelse af skadegøreren eller til at forhindre dens spredning, forudsat at foranstaltningerne er i overensstemmelse med direktiv 77/93/EØF.

Enkelthederne i disse foranstaltninger meddeles de øvrige medlemsstater og Kommissionen. Oplysningerne i denne meddelelse kan indgives til komitéen.

Artikel 11

Ændringer af bilagene til dette direktiv som følge af udviklingen i den tekniske og videnskabelige viden vedtages efter proceduren i artikel 16a i direktiv 77/93/EØF. Hvad angår metoderne i bilag II og foranstaltningerne i punkt 4.1 og 4.2 i bilag VI til dette direktiv skal Kommissionen udarbejde en rapport, hvori den gennemgår disse metoder og foranstaltninger i lyset af erfaringerne; rapporten skal forelægges komitéen inden den 1. januar 2002.

Artikel 12

1. Medlemsstaterne sætter de nødvendige love og administrative bestemmelser i kraft for at efterkomme dette direktiv med virkning fra den 21. august 1999. De underretter straks Kommissionen herom.

Disse love og administrative bestemmelser skal ved vedtagelsen indeholde en henvisning til dette direktiv eller skal ved offentliggørelsen ledsages af en sådan henvisning. De nærmere regler for denne henvisning fastsættes af medlemsstaterne.

2. Medlemsstaterne meddeler straks Kommissionen teksten til de vigtigste nationale retsfor skrifter, som de udsteder på det område, der er omfattet af dette direktiv. Kommissionen underretter de øvrige medlemsstater herom.

⁽¹⁾ EFT L 184 af 3.8.1995, s. 34. Direktivet er senest ændret ved Kommissionens direktiv 97/46/EF (EFT L 204 af 31.7.1997, s. 43).

Artikel 13

Udfærdiget i Bruxelles, den 20. juli 1998.

Dette direktiv træder i kraft på dagen for offentliggørelsen i *De Europæiske Fællesskabers Tidende*.

Artikel 14

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

På Rådets vegne
W. MOLTERER
Formand

*BILAG I**AFSNIT I*Liste over værtsplanter for *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. som omhandlet i artikel 1

Planter (herunder knolde), dog ikke ægte frø, af <i>Solanum tuberosum</i> L.	Kartoffel
Planter, dog ikke frugter og frø, af <i>Lycopersicon lycopersicum</i> (L.) Karsten ex Farw.	Tomat

AFSNIT II

Undersøgelser

1. De i artikel 2, stk. 2, litra a), omhandlede officielle undersøgelser foretages på grundlag af skadegørerens biologi og det særlige produktionssystem i den pågældende medlemsstat, og de skal omfatte:
 - i) for kartoflers vedkommende:
 - på passende tidspunkter besigtigelse af afgrøden i vækst og/eller prøver af såvel læggekartofler som andre kartofler i vækstperioden eller på lager. Prøverne skal besigtiges enten officielt eller under officielt tilsyn ved gennemskæring af knoldene
 - og
 - når der er tale om læggekartofler, og når relevant andre kartoffelafgrøder, officiel laboratorietest eller laboratorietest under officielt tilsyn ved benyttelse af metoden i bilag II
 - ii) for tomaters vedkommende:
 - på passende tidspunkter som et minimum besigtigelse af planteafgrøder i vækst, som er bestemt til genplantning til erhvervmæssig brug.
2. Den i artikel 2, stk. 3, omhandlede meddelelse skal omfatte:
 - i) når det drejer sig om undersøgelser af kartofler:
 - det skønnede samlede areal i hektar, hvor der dyrkes læggekartofler og andre kartofler
 - stratificering efter kategori læggekartofler og andre kartofler og hvor relevant efter region
 - antal prøver udtaget til test og tidspunktet herfor
 - antal besigtigelser i marken
 - antal (og prøvens størrelse) besigtigelser af knolde
 - ii) når det drejer sig om undersøgelser af tomatafgrøder i vækst, som er bestemt til genplantning til erhvervmæssig brug, som et minimum
 - det skønnede samlede antal planter
 - antallet af besigtigelser
 - iii) når det drejer sig om undersøgelser af andre værtsplanter end kartofler og tomater, herunder vilde værtsplanter af natskyggefamilien
 - art
 - antal udtagne prøver og tidspunkterne herfor
 - det jordstykke eller vandløb, der er taget prøver fra
 - analysemetode
 - iv) når det drejer sig om undersøgelser af vand og flydende affald fra industrielle forarbejdnings- og pakkeanlæg
 - antal prøver og tidspunkterne herfor
 - alt efter omstændighederne enten det jordstykke, vandløb eller fabriksanlæg, der er taget prøver fra
 - analysemetode.

BILAG II

TESTPROGRAM FOR DIAGNOSTICERING, PÅVISNING OG IDENTIFIKATION AF RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL.

OMRÅDE

Det forelagte program beskriver de forskellige procedurer, der indgår i:

- i) diagnosticering af brunbakteriose i kartoffelknolde og af bakteriefremkaldt nedvisning af kartoffel- og tomatplanter
- ii) påvisning af *Ralstonia solanacearum* i prøver af kartoffelknolde
- iii) identifikation af *Ralstonia solanacearum*.

Der er i tillæggene givet detaljer om tilberedning af testmateriale, f.eks. dyrkningsmedier, buffere, opløsninger og reagenser.

INDHOLD

AFSNIT I: Anvendelse af testprogrammet	9
1. Diagnosticering af brunbakteriose i kartoffelknolde og af bakteriefremkaldt nedvisning af kartoffel- og tomatplanter	9
2. Påvisning og identifikation af <i>Ralstonia solanacearum</i> i prøver af kartoffelknolde ..	11
AFSNIT II: Diagnosticering af brunbakteriose i kartoffelknolde og af bakteriefremkaldt nedvisning af kartoffel- og tomatplanter	13
1. Symptomer	13
2. Hurtigscreeningstest	13
3. Isolering	14
4. Konfirmative test	14
AFSNIT III: Påvisning og identifikation af <i>Ralstonia solanacearum</i> i prøver af kartoffelknolde	17
1. Tilberedelse af prøven til test	17
2. Immunofluorescenstest (IF-test)	18
3. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay-test (ELISA)	20
4. Polymerase Chain Reaction-test (PCR TM)	20
5. Dyrkning på selektivt medie	22
6. Biotest	23
7. Berigningstest	23
8. Patogenitetstest	23
<i>Tillæg 1:</i> Næringsmedier til isolering og dyrkning af <i>Ralstonia solanacearum</i>	24
<i>Tillæg 2:</i> Materiale til prøvetilberedelse	25
<i>Tillæg 3:</i> Materiale til IF-test	26
<i>Tillæg 4:</i> Bestemmelse af celleantal i IF-testen	27
<i>Tillæg 5:</i> Materiale til ELISA-test	28
<i>Tillæg 6:</i> Materiale til PCR-test	29
<i>Tillæg 7:</i> Materiale til dyrkning på selektivt medie- og berigningstest	29
Litteraturhenvisninger	30

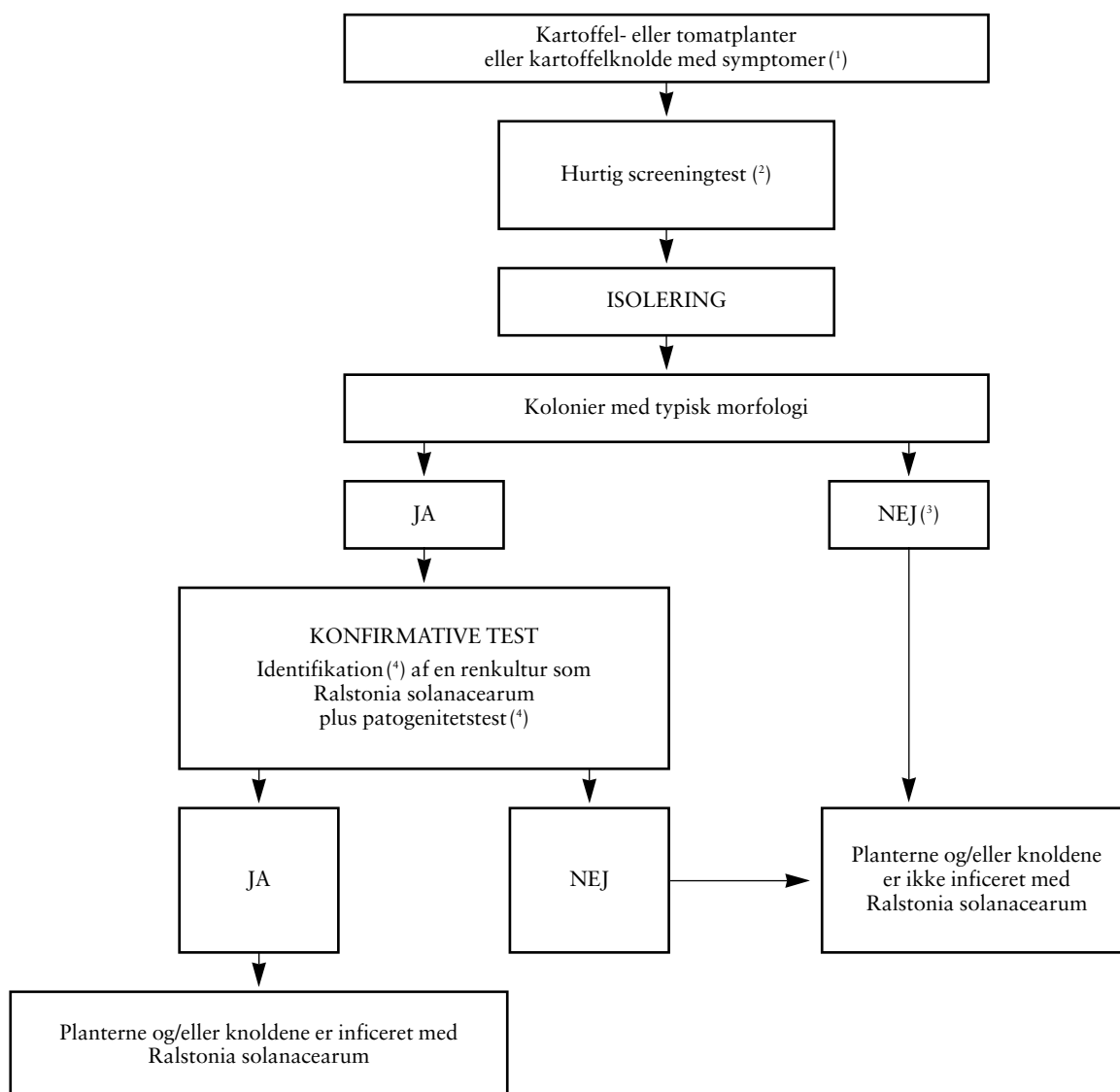
AFSNIT I

ANVENDELSE AF TESTPROGRAMMET

1. Diagnosticering af brunbakteriose i kartoffelknolde og af bakteriefremkaldt nedvisning af kartoffel- og tomatplanter

Testmetoden er beregnet til kartoffelknolde med symptomer, der er typiske for eller giver mistanke om brunbakteriose og til kartoffel- og tomatplanter med symptomer, der er typiske for eller giver mistanke om bakteriefremkaldt nedvisning. Den omfatter en hurtigscreeningstest, isolering af patogenet fra inficeret karvæv på diagnostiske substrater og i tilfælde af positivt resultat identifikation af kulturen som *Ralstonia solanacearum*.

Flowdiagram



Bemærkninger til flowdiagrammet:

(¹) Symptomerne er beskrevet i afsnit II, punkt 1.

(²) En screeningtest til en foreløbig diagnose.

Egnede test er:

— karstrømningstest af karvæv fra stængler (afsnit II, punkt 2)

— test for poly- β -hydroxybutyratkorn (afsnit II, punkt 2)

— IF-test (afsnit III, punkt 2)

— ELISA-test (afsnit III, punkt 3)

— PCR-test (afsnit III, punkt 4).

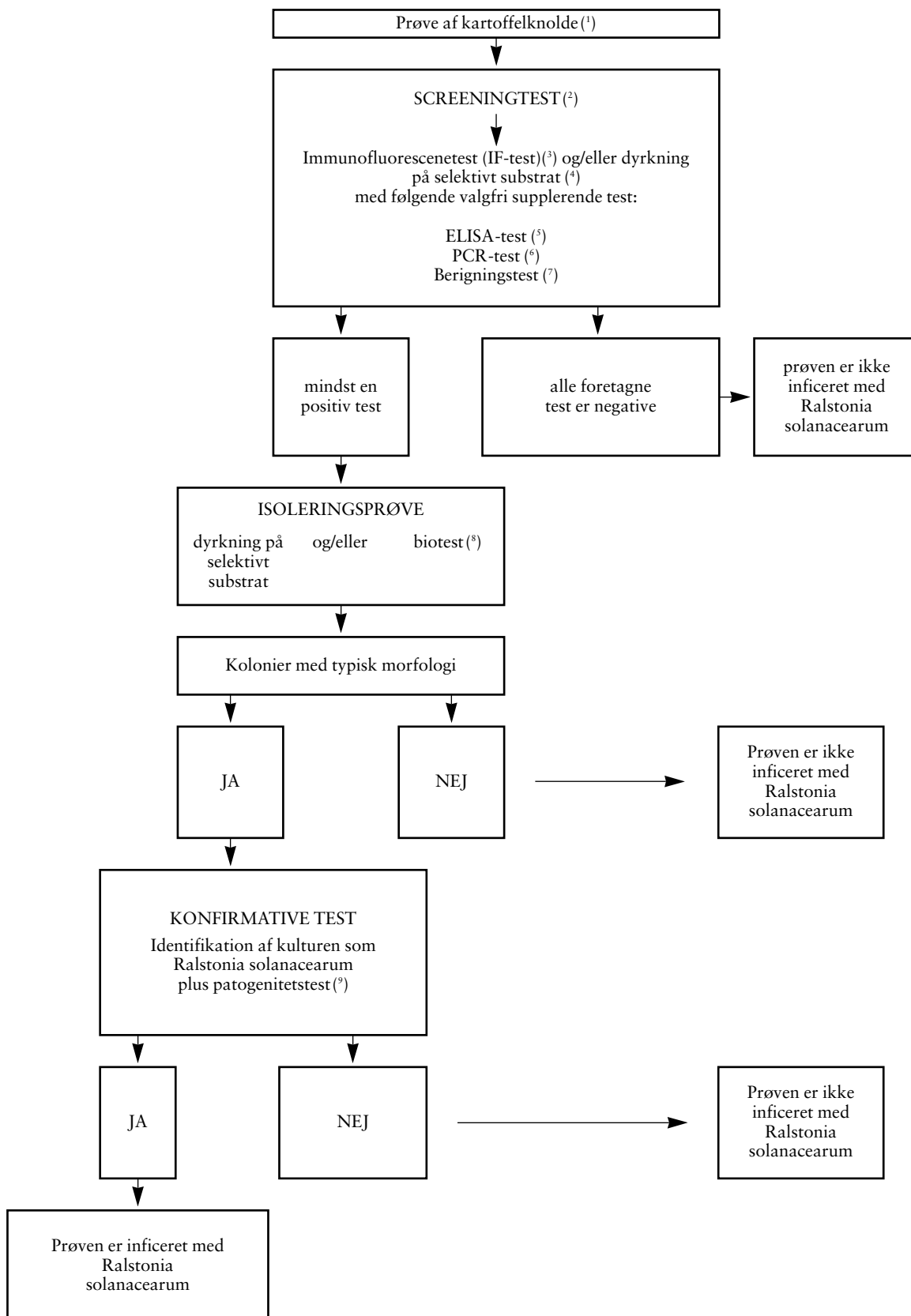
(³) Skønt isolering af patogener fra plantemateriale med typiske symptomer ved pladespredning af forskellige fortyndinger er ligetil, kan dyrkningen dog slå fejl på fremskredne infektionsstadier. Saprophytiske bakterier, der vokser på sygt væv, kan vokse stærkere end eller hæmme patogenet på isoleringsmediet. Hvis isoleringstesten er negativ, men sygdomssymptomerne typiske, skal isoleringen gentages, helst ved dyrkning på et selektivt medie.

(⁴) Pålidelig identifikation af en renkultur af *Ralstonia solanacearum* kan opnås ved mindst en af de i afsnit II, punkt 4.1, omhandlede test kombineret med en patogenitetstest (afsnit II, punkt 4.3). Bestemmelse af linjen er ikke krævet, men anbefales i hvert nyt tilfælde.

2. Påvisning og identifikation af *Ralstonia solanacearum* i prøver af kartoffelknolde

Metoden er bestemt til påvisning af latente infektioner i kartoffelknolde ved en eller helst flere screeningtest, som, hvis resultatet er positivt, bekræftes ved isolering af patogenet. Ved isolering af typiske kolonier efterfølges dette af identifikation af en renkultur som *Ralstonia solanacearum*.

Flowdiagram



Bemærkninger til flowdiagrammet:

(1) Prøvestørrelse

Standardprøvestørrelse er 200 knolde, dog kan metoden tillige anvendes for prøver med færre end 200 knolde.

(2) Screeningstest

En enkelt test er måske ikke tilstrækkeligt følsom eller pålidelig til at påvise *Ralstonia solanacearum* i en prøve. Der anbefales derfor mere end en test. Om muligt bør disse test baseres på forskellige biologiske principper.

(3) Immunofluorescenstest (IF-test)

IF-testen (indirekte metode) er en veletableret screeningstest. Det er en fordel frem for andre test, som endnu ikke er fuldt udviklet eller valideret. Testen bruges for mange andre bakterier, f.eks. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Med de aflæsningsparametre, der er bestemt i denne metode, er det en følsom test (grænseværdien for følsomheden på 10^3 - 10^4 celler/ml kartoffelekstraktpellet).

Den kritiske faktor for testresultatets pålidelighed er antiserumets kvalitet. Kun et antiserum med høj titer (mindst 2 000 for det ubehandlede antiserum) er acceptabelt, og alle test skal foretages ved antiserumtiteren eller en fortynding under titeren. Den indirekte metode foretrækkes. Den direkte metode kan benyttes, hvis testens følsomhed og specificitet svarer til den indirekte metodes.

IF-testen har den fordel at give subjektiv fortolkning af cellefarvningsmorfologi og fluorescensintensitet, som giver oplysninger om reaktionsspecificitet. Krydsreaktioner med serologisk beslægtede bakterier fra jord eller kartoffelvæv med lignende cellemorfologi som *Ralstonia solanacearum* forekommer hyppigt. IF-testen kan benyttes som eneste screeningstest, men i tilfælde, hvor der er mistanke om krydsreaktioner, bør der foretages yderligere screeningstest baseret på et andet biologisk princip. I sådan et tilfælde er selektiv udstrygning at foretrække.

(4) Dyrkning på selektivt substrat

Med det modificerede SMSA-medie og den testmetodik, der er beskrevet i denne metode, er dette en følsom og selektiv test for *Ralstonia solanacearum*. Resultatet foreligger 3-6 døgn efter tilberedelse af prøven. Patogenet fås som renkultur og kan let identificeres. For at testens potentiel kan udnyttes fuldt ud, kræves omhyggelig tilberedelse af navleender for at eliminere sekundære bakterier forbundet med kartoffelknolde, som er konkurrenter til *Ralstonia solanacearum* på substratet og kan hæmme patogenets udvikling. Nogle stammer kan have ringe vækst, da substratets bestanddele må have indflydelse på målorganismen. Der kræves desuden omhu for at differentiere *Ralstonia solanacearum* fra andre bakterier, som måtte udvikle sig på mediet.

Dyrkning på selektivt medie kan benyttes som eneste screeningstest, men hvis testresultatet er negativt, og der foreligger mistanke om hæmning af *Ralstonia solanacearum* på grund af andre bakterier på substratet, bør der foretages endnu en screeningstest. I sådanne tilfælde er IF-testen den mest velegnede.

(5) ELISA-test

ELISA-testen er generelt mindre følsom end IF-testen (grænseværdien for følsomheden på 10^4 - 10^5 celler/ml kartoffelekstraktpellet). Testen er billig og hurtig, men generelt mere tilbøjelig til at give falsk positive (krydsreaktioner) og falsk negative (hæmning ved fenolmolekyler i kartoffelekstraktet) resultater. Kravene til antiserumsspecificitet er overordentligt strenge. ELISA kan ikke benyttes som eneste screeningstest.

(6) PCR-test

PCR-testen har potentiale til meget følsom påvisning, skønt testen meget let bliver hæmmet af plante- eller knoldestraktbestanddele og giver falsk negative resultater. Nogle kartoffelsorter indeholder flere inhibitorer end andre. Det er derfor nødvendigt at fjerne disse inhibitorer. Inhibitorerne kan reduceres ved fortynding, men derved bliver populationerne af *Ralstonia solanacearum* også fortyndet. Der må udvises stor forsigtighed på alle trin i tilberedelsen af prøve og test for at hindre kontamination, som kunne give falsk positive resultater. Falsk positive kan også hidrøre fra andre organismers sekvenshomologi. Af disse årsager kan direkte PCR ikke benyttes som eneste screeningstest.

(7) Berigningstest

Inkubering af prøver af kartoffelekstraktpellet i et semiselektivt flydende næringsmedie, f.eks. modificeret SMSA-bouillon, gør opformering af *Ralstonia solanacearum* mulig. Vigtigere er det måske, at derved fortyndes også potentielle inhibitorer for ELISA- eller PCR-test. *Ralstonia solanacearum* i berigningsbouillon kan således påvises ved IF, ELISA og PCR. Det kan ikke anbefales at foretage direkte pladespredning fra beriget flydende næringsmedie. Disse berigningsmetoder er ikke grundigt gennemprøvet og testet. De er medtaget her, fordi de har et godt potentiale. Men på grund af den relative mangel på erfaring med dem kan de ikke benyttes som eneste påvisningsmetoder.

(8) Biotest

Biotesten bruges til isolering af *Ralstonia solanacearum* fra kartoffelekstrakt ved selektiv berigelse i en værtsplante og kan foretages på kartoffelplanter eller ægplante (aubergine). Testen kræver optimale inkuberingsbetingelser som beskrevet i denne metode. Bakterier, der er inhibitorer for *Ralstonia solanacearum* på SMSA-substratet, vil sandsynligvis ikke virke forstyrrende i denne test.

(9) Konfirmative test

Pålidelig identifikation af en renkultur af *Ralstonia solanacearum* opnås ved mindst en af de test, der er angivet i afsnit II, punkt 4.1, i kombination med en patogenitetstest (afsnit II, punkt 4.3). Bestemmelse af linjen er ikke krævet, men anbefales i hvert nyt tilfælde.

AFSNIT II

DIAGNOSTICERING AF BRUNBAKTERIOSE I KARTOFFELKNOLDE OG AF BAKTERIEFREMKAJDT NEDVISNING AF KARTOFFEL- OG TOMATPLANTER

1. Symptomer

1.1. Symptomer for kartoffel

Kartoffelplanten. De tidlige symptomer er, når bladene visner i plantens top ved høje temperaturer om dagen for derefter at komme sig om natten. Denne visnen bliver hurtigt irreversibel og medfører, at planten dør. Karvævet i stængler fra visne planter, der er skåret tværs over, kan blive brunt, og et mælkeagtigt sekret siver ud fra sårfladen eller kan let trykkes ud, ved at man kniber stænglen. Hvis en overskåret stængel anbringes vertikalt i vand, vil slimtråde strømme fra karstregene.

Kartoffelknolden. Kartoffelknolde skal skæres tværs over nær ved navleenden (= stolon). Det tidlige infektionsstadium er en glasagtig gullig til lysebrun misfarvning af karringen, hvorfra der spontant kommer et blegt sekret efter et par minutter, eller hvis man trykker let med tommelfingrene på huden nær ved sårfladen. Senere bliver karmisfarvningen mere tydeligt brun, og vævsdøden kan brede sig til parenkymvævet. På mere fremskredne stadier bryder infektionen ud fra endeskorpen og øjnene, hvilket medfører rødbrune, let indsunkne læsioner på huden, hvorfra bakterier siver ud og får jordpartikler til at hænge ved.

1.2. Symptomer for tomat

Tomatplanten. Det første synlige symptom er de yngste blades slatne udseende. Under gunstige forhold for patogenet (jordtemperatur på ca. 25°C mættet fugtighed) følger epinasti og visnen af den ene side eller af hele planten inden for nogle få dage, hvorefter hele planten falder sammen. Under mindre gunstige forhold (jordtemperatur på under 21°C) kan der udvikle sig talrige birødder på stænglen. Der kan ses et fedtet bånd langs med stænglen, hvilket er tegn på karsystemets vævsdød. Når stænglen skæres over på tværs, siver der dråber af hvidt eller gulligt bakteriesekret ud fra misfarvede brune karvæv i stænglen.

2. Hurtigscreeningstest

Hurtigscreeningstest letter en foreløbig diagnose. Brug en eller flere af de følgende test:

Karstrømningstest

Tilstedeværelsen af *Ralstonia solanacearum* i visnende kartoffel- eller tomatstængler kan påvises ved nedenstående enkle test:

Stænglen overskæres lige over jorden. Den overskårne stængel stilles i et bæger med vand. Kort efter vil tråde af bakterieslim spontant strømme ud af karstregene. Eventuelle andre bakterier, der forårsager karvævsinfektion i kartoffel- eller tomatplanter, vil ikke vise dette fænomen.

Påvisning af poly- β -hydroxybutyrat (PHB)

PHB-kornene i cellerne i *Ralstonia solanacearum* gøres synlige ved farvning med Nile blue A eller Sudan black B.

Der laves et udstrygningspræparat af bakterieslimen eller det oplømmede væv på et objektglas, eller der tilberedes et udstrygningspræparat af en 48-timers kultur på YPGA eller SPA (tillæg 1). Som kontrol laves positive udstrygningspræparater af en biovar 2/race 3-stamme, og hvis nødvendigt et negativt udstrygningspræparat af en heterolog stamme. Glasset tørres. Dets underside føres gentagne gange hurtigt gennem flammen, indtil præparatet er fikseret.

Nile blue-test

- 1) Det fikserede udstrygningspræparat overhældes med en 1% vandig opløsning af Nile blue A. Inkuberes i 10 min. ved 55°C.
- 2) Farvningsopløsningen afdrænes. Prøven vaskes kort i langsomt rindende ledningsvand. Overskydende vand fjernes med filterpapir.
- 3) Udstrygningspræparatet overhældes med 8% vandig eddikesyre. Inkuberes i 1 min. ved laboratorietemperatur.
- 4) Prøven vaskes i langsomt rindende ledningsvand. Den tørres med filterpapir.
- 5) Prøven genbefugtes med en dråbe vand. Der sættes et dækglas på.
- 6) Det farvede udstrygningspræparat undersøges under et epifluorescensmikroskop ved 450 nm i immersionsolie ved 1 000 ganges forstørrelse.

Der observeres for klart orange fluorescens fra PHB-korn. Desuden foretages observation i normalt lys for at sikre, at kornene er intracellulære, og at cellemorfologien er typisk for *Ralstonia solanacearum*.

Sudan black-test

- 1) Det fikserede udstrygningspræparat overhældes med 0,3 % Sudan black B-opløsning i 70 % ethanol. Prøven inkuberes i 10 min. ved laboratorietemperatur.
- 2) Farvningsopløsningen afdrænes. Prøven vaskes hurtigt i ledningsvand. Overskydende vand fjernes med filtrerpapir.
- 3) Udstrygningspræparatet neddyppes kort i xylene. Glasset duppes tørt med filtrerpapir.
NB: Xylen er et farligt stof. Arbejdet skal foregå i et stinkskab.
- 4) Udstrygningspræparatet overhældes med 0,5 % (w/v) vandig safranin og henstår 10 sek. ved laboratorietemperatur.
NB: Safranin er et farligt stof. Arbejdet skal foregå i et stinkskab.
- 5) Prøven vaskes i langsomt rindende vand. Den tørres med filtrerpapir. Der sættes dækglas på.
- 6) Det farvede udstrygningspræparat undersøges under et lysmikroskop med gennemfaldende lys i immersionsolie ved 1 000 ganges forstørrelse.
PHB-korn i celler af *Ralstonia solanacearum* bliver blåsorte. Cellevæggen bliver lyserød.

Andre test

Andre anbefalelsesværdige test er IF-testen (afsnit III, punkt 2), ELISA-testen (afsnit III, punkt 3) og PCR-testen (afsnit III, punkt 4).

3. Isolering

- 3.1. En lille mængde af bakterieslimen eller partier af misfarvet væv fra karringen i kartoffelknolden eller fra karstrengene i stænglen fra kartoffel- eller tomatplanter opslæmmes i sterilt, destilleret vand eller 50 mM fosfatbuffer. Prøven henstår på testbordet i 5-10 min.
- 3.2. Der laves en serie tifoldsfortyndinger af suspensionen — 1:10 og 1:100 eller flere, hvis det skønnes nødvendigt.
- 3.3. En standardmængde af suspensionen overføres til et standardnæringsmedie (NA, YPGA og SPA (tillæg 1)), og/eller Kelmans tetrazolium-medium (tillæg 1), og/eller et selektivt SMSA-substrat (tillæg 7). Spred og udstryk med en formålstjenlig fortyndingsteknik. Hvis nødvendigt skal der tilberedes et sæt særskilte plader med en fortyndet cellesuspensionskultur af en biovar 2/race 3-stamme af *Ralstonia solanacearum* som positiv kontrol.
- 3.4. Pladerne inkuberes i 3 døgn ved 28 °C. Inkubationen kan forlænges indtil 6 dage, hvis væksten er langsom, men kolonier på SMSA-plader bliver ofte atypiske og dør.
På standardnæringsmediet udvikler virulente isolater af *Ralstonia solanacearum* perlehvide, flade, uregelmæssige og udflydende kolonier, der ofte har karakteristiske hvirvler.
På Kelmans tetrazolium-mediet er typiske kolonier af virulente isolater af *Ralstonia solanacearum* cremefarvede, flade, uregelmæssige og udflydende, med blodrøde hvirvler i centrum. Avirulente former af *Ralstonia solanacearum* udvikler smørlignende, dybrøde kolonier.
På SMSA-mediet udvikler virulente isolater af *Ralstonia solanacearum* mælkehvide, flade, uregelmæssige og udflydende kolonier, der har tydelige, blodrøde centre.
Avirulente former af *Ralstonia solanacearum* udvikler mindre udflydende kolonier, som er fuldstændigt lyserøde til røde på SMSA-mediet.
- 3.5. Kolonier med karakteristisk morfologi re dyrkes ved subkultur på et generelt næringssubstrat. Regelmæssig subkultur bør undgås, da det kan medføre tab af virulens.

4. Konfirmative test

4.1. Identifikation af *Ralstonia solanacearum*

Identificer renkulturer af *Ralstonia solanacearum* ved mindst en af de følgende procedurer:

Nærings- og enzymtest

Bemærk: inkluder en kontrollkultur ved hver test.

Følgende fænotypiske egenskaber hos *Ralstonia solanacearum* forekommer enten universelt eller slet ikke:

Fluorescerende pigment	-
PHB-indhold	+
Oxidations/fermenteringstest	O+/F-
Katalase	+
Kovacs' oxidase	+
Reduktion af nitrat	+
<hr/>	
Udnyttelse af citrat	+
Vækst ved 40°C	-
<hr/>	
Vækst i 1% NaCl	+
Vækst i 2% NaCl	-
Arginindihydrolase	-
Smeltning af gelatine	-
Hydrolyse af stivelse	-
Hydrolyse af aesculin	-
Levanproduktion	-

Medier og metoder: se Lelliott og Stead (1987).

IF-test

Der laves en opslæmning af 10^6 celler/ml fra kulturen og en positiv kontrolstamme. Der laves en række tofoldsopløsninger af antiserum. IF-metoden benyttes (afsnit III, punkt 2). Kulturens IF-titer skal svare til den positive kontrols titer.

ELISA-test

Der laves en opslæmning af $> 10^6$ celler/ml fra kulturen og en positiv kontrolstamme. ELISA-metoden benyttes (afsnit III, punkt 3). Kulturens ELISA-værdi skal svare til den positive kontrols værdi.

PCR-test

Der laves en opslæmning af 10^6 celler/ml fra kulturen og en positiv kontrolstamme. PCR-metoden benyttes (afsnit III, punkt 4). Kulturens PCR-produkt skal være af samme størrelse og have samme restriktionsenzymanalyse mønster (REA) som den positive kontrol.

Fluorescerende in situ-hybridisering (FISH)

Der laves en opslæmning af 10^6 celler/ml fra kulturen og en positiv kontrolstamme. FISH-metoden benyttes (van Beuningen et al., 1995) med OLI-1 PCR-primer (Seal et al., 1993). Kulturen skal vise samme reaktion som den positive kontrol.

Proteinprofilering

Denaturerede helcelleproteiner separeres ved polyacrylamidgelelektroforese — PAGE (Stead, 1992a).

Fedtsyreprofilering (FAP)

Kulturen og en positiv kontrolstamme dyrkes i 48 timer ved 28°C på trypticasesojaagar. FAP-metoden benyttes (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead 1992b). Kulturens profil skal være identisk med den positive kontrols profil. Under de beskrevne betingelser er karakteristiske fedtsyrer 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH og 18:1 2OH.

4.2. *Karakterisering af stammen*

Linjekarakterisering er ikke krævet, men anbefales for hvert nyt tilfælde ved mindst en af følgende metoder:

Biovarbestemmelse

Ralstonia solanacearum opdeles i biovarer ud fra deres evne til at udnytte og/eller oxidere tre hexosealkoholer og tre sukkerarter (Hayward, 1964 & 1994):

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Udnyttelse af:					
— Maltose	-	+	+	-	+
— Laktose	-	+	+	-	+
— Cellobiose	-	+	+	-	+
— Mannitol	-	-	+	+	+
— Sorbitol	-	-	+	+	-
— Dulcitol	-	-	+	+	-

Supplerende test differentierer biovar 2 i underfænotyper (Hayward, 1994):

	Biovar 2	Biovar 2-A	Biovar 2-T
Udnyttelse af trehalose	-	+	+
Udnyttelse af inositol	+	-	+
Udnyttelse af D-ribose	-	-	+
Pektolytisk aktivitet	ringe	ringe	høj

Racebestemmelse

Racen (Buddenhagen et al., 1962) bestemmes på grundlag af en patogenitetstest i tomatplanter eller ægplanter og i tobaksplanter og ved hjælp af en hypersensitivitetsreaktion (HR) i tobaksblade (Lozano & Sequeira, 1970):

	Race(*)		
	1	2	3
Reaktion i:			
— Tomat-/ægplanter	visnen	ingen reaktion	visnen
— Tobaksplanter	visnen	ingen reaktion	ingen reaktion
— Tobaksblade	nekrose (48 timer) og visnen (7-8 døgn)	HR (12-24 timer)	klorose (2-8 døgn)

(*) Race 4 (patogen på ingefær og nogle få andre værtsplanter) og race 5 (patogen kun på morbær) er ikke taget med.

Karakterisering af racen ved hjælp af en patogenitetstest eller en hypersensitivitetsreaktion i tobak er ikke helt troværdig, og kan i stedet bedømmes ud fra biovar og den naturlige værtsplante.

Kulturen kan yderligere beskrives ved:

»Fingeraftryk« af genomet

Molekylær differentiering af stammer i *Ralstonia solanacearum*-komplekset kan foretages ved:

RFLP-analyse (Cook et al., 1989)

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

4.3.

Patogenitetstest

Testen er beregnet til konfirmering af diagnosen for *Ralstonia solanacearum* og for at bekræfte virulensen af kulturer identificeret som *Ralstonia solanacearum*.

Der laves et inokulum på 10^6 celler/ml fra kulturen og en positiv kontrolstamme. Fem til ti tomatplanter eller ægplanter indpodes helst på bladstadium 3 eller ældre (afsnit III, punkt 6). Planterne inkuberes i indtil to uger ved 22-28°C og høj relativ fugtighed og vandes hver dag. Der observeres for visnesymptomer, epinasti, klorose eller hæmning.

Isoler fra symptomatiske planter på følgende måde:

— fjern en del af vævet fra stænglen 2 cm over inokuleringspunktet

— opslem i lille mængde sterilt destilleret vand eller 50 mM PBS-buffer, og udstryk, inkuber og check for typiske kolonier af *Ralstonia solanacearum*.

AFSNIT III

PÅVISNING OG IDENTIFIKATION AF RALSTONIA SOLANACEARUM I PRØVER AF KARTOFFELKNOLDE

NB: Standardprøvestørrelse er 200 knolde, dog kan metoden tillige anvendes for prøver med færre end 200 knolde.

1. Tilberedelse af prøven til test

NB: Den kartoffelekstraktpellet, der fremkommer ved denne metode, kan tillige bruges til påvisning af *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Metoder, der kan benyttes til foreløbig test, hvis det findes nyttigt:

- i) Prøven inkuberes ved 25-30°C i indtil 2 uger for at fremme formeringen af latente populationer af *Ralstonia solanacearum*
 - ii) Knoldene vaskes i rindende vand med passende desinfektions- og opløsningsmidler. Knoldene lufttørres.
- 1.1. Med en ren, desinficeret skalpel eller grøntsagskniv fjernes huden fra knoldens navleende, således at karvævene lige netop bliver synlige. En lille konisk kerne (3-5 mm diameter) karvæv fra hver knolds navleende udskæres. Mængden af ikke-karvæv skal være mindst mulig. Første trin gentages for hver knold i prøven.
- NB: Der kan foretages visuel undersøgelse af knoldene (afsnit II, punkt 1) på dette stadium. Eventuelle knolde med symptomer eller forrådnelse anbringes for sig og underkastes særskilt test (afsnit II).
- 1.2. Navleenderne anbringes i en lukket beholder. Navleenderne skal helst behandles straks. Hvis dette ikke er muligt, bør de ikke opbevares i over 24 timer — eller ved 4°C ikke længere end 72 timer.
- 1.3. Navleenderne behandles på en af nedenstående måder:
- i) Navleenderne overføres til en egnet beholder.
Der tilsættes nok udblødningsbuffer (tillæg 2) til at dække kernerne.
Navleenderne findeles i en Waring Blender eller ved Ultra Thurrax, indtil de lige netop er homogeniseret. Overdreven homogenisering skal undgås.
Prøven henstår til udblødning i 15-30 min.
 - ii) Navleenderne overføres til en egnet beholder.
Der tilsættes nok udblødningsbuffer til at dække navleenderne.
Beholderen anbringes på en rotationsryster.
Prøven inkuberes ved 50-100 rpm i 4 timer ved 20-22°C eller 16-24 timer ved 4°C.
 - iii) Navleenderne overføres til en kraftig engangspose til udblødning (fx Stomacherpose på 105 mm × 150 mm, steriliseret ved bestråling).
Vævskerne knuses omhyggeligt med et egnet værktøj, fx en hammer, indtil de lige netop er homogeniseret.
Der tilsættes nok udblødningsbuffer til at dække de knuste kerner.
Prøven henstår til bundfældning i 15-30 min.
- 1.4. Bakterierne ekstraheres fra de behandlede endeskorper på en af nedenstående måder:
- i) Den macererede prøve dekanteres forsigtigt til et centrifugeglas, således at bundfaldet forbliver i beholderen eller posen. Hvis det dekanterede, udblødte præparat er uklart, centrifugeres ved højst 180 g i 10 min. ved under 10°C.
Det udblødte præparat eller supernatanten fra første centrifugeringstrin centrifugeres ved 7 000 g i 15 min. eller ved 10 000 g i 10 min. ved en temperatur på under 10°C.
Supernatanten kasseres, uden at pelleten forstyrres.
 - ii) Det udblødte præparat filtreres gennem et filtersystem med en porestørrelse på 40-100 µm.
Filteringen fremskyndes ved brug af en vakuumpumpe.
Filtratet opsamles i en centrifugeglas.
Filtret vaskes med udblødningsbuffer.
Filtratet centrifugeres ved 7 000 g i 15 min. eller ved 10 000 g i 10 min. ved en temperatur på under 10°C.
Supernatanten kasseres, uden at pelleten forstyrres.

- 1.5. Pelleten genopslømmes i 1 ml pelletbuffer (tillæg 2).
 Det deles i to lige store portioner, og hver portion overføres til et eppendorfrør.
 Det ene eppendorfrør benyttes til test. Resten af dette ekstrakt opbevares ved 4°C under testen.
 Der tilsættes 10-25 % (v/v) steril glycerin til det andet eppendorfrør. Glasset rystes. Opbevares ved -18°C (uger) eller -70°C (måneder).
2. **IF-test**
- Der benyttes antiserum mod *Ralstonia solanacearum*, helst mod race 3/biovar 2. Titeren bestemmes på en suspension af 10⁶ celler/ml fra den homologe stamme af *Ralstonia solanacearum*. Der benyttes en passende fortynding af fluoresceinisotiocyanatkonjugatet (FITC-konjugatet) ifølge producentens anbefalinger. Det ubehandlede antiserum bør have en IF-titer på mindst 1:2 000.
- Der benyttes mangelhullede objektglas med helst ti vinduer med mindst 6 mm diam.
- Der skal for hvert objektglas indgå en FITC-konjugatkontrol. Testen gentages med en PBS-kontrol indbefattet, hvis der observeres positive celler ved FITC-kontrollen.
- Der tilberedes særskilte, positive kontrolglas med en opslæmning af 10⁶ celler/ml fra den korrekte race/biovar-stamme af *Ralstonia solanacearum*. Der indgår et objektglas i hvert testsæt.
- 2.1. Testglassene tilberedes på en af nedenstående måder:
- i) For pellets med forholdsvis lidt stivelse:
 En afmålt standardmængde (15 µl er passende for 6 mm vinduesdiameter — mængden øges forholdsommæssigt for større vinduer) af den genopslåmmede pellet afpipetteres på en række vinduer. Den resterende række kan anvendes som duplikat eller til en anden prøve som beskrevet i figur 1.
- ii) For andre pellets:
 Der laves tifoldsfortyndinger, dvs. 1:10, 1:100 og 1:1 000, af den genopslåmmede pellet i pelletbuffer. En afmålt standardmængde (15 µl er passende for 6 mm vinduesdiameter — mængden øges forholdsommæssigt for større vinduer) af den genopslåmmede pellet og hver fortynding afpipetteres på en række vinduer. Den resterende række kan anvendes som duplikat eller til en anden prøve som beskrevet i figur 2.
- 2.2. Man lader dråberne tørre. Bakteriecellerne fikseres på glasset ved opvarmning, ved flambering eller med 95 % ethanol.
- 2.3. IF-metode
- i) Ved tilberedelse af objektglas som beskrevet ovenfor i punkt 2.1, nr. i):
 Der laves en række tofoldsfortyndinger af antiserum i IF-buffer (tillæg 3):
 1/4 af titeren (T/4), 1/2 af titeren (T/2), titeren (T) og det dobbelte af titeren (2T).
- ii) Ved tilberedelse af objektglas som beskrevet ovenfor i punkt 2.1, nr. ii):
 Der laves en arbejdsfortynding (WD) af antiserum i IF-buffer. Arbejdsfortyndingen er den fortynding af antiserum, som har optimal specificitet, og den har normalt det halve af titeren.

Figur 1

Tilberedelse af objektglas som beskrevet i punkt 2.1, nr. i), og punkt 2.3, nr. i)

Standardfortynding af genopslåmmede pellet

(T = titer)

	FITC	T/4	T/2	T	2T	⇒ Tofoldsfortyndinger af antiserum
Prøve 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplikat af prøve 1 eller prøve 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Figur 2

Tilberedelse af objektglas som beskrevet i punkt 2.1, nr. ii), og punkt 2.3, nr. ii)

	FITC	Standardfortynding af antiserum				⇒ Tifoldsfortynding af genopslæmmet pellet
	Ufortyndet	Ufortyndet	1:10	1:100	1:1 000	
Prøve 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplikat af prøve 1 eller prøve 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

2.3.1. Objektglassene placeres på fugtigt filterpapir.

Testvinduerne dækkes med antiserumfortyndingen(-erne). Der pådryppes PBS på FITC-vinduerne. Den mængde antiserum, der anbringes på vinduerne, skal svare til den tilsatte mængde ekstrakt.

2.3.2. Glassene inkuberes tildækket i 30 min. ved rumtemperatur.

2.3.3. Antiserumdråberne rystes af glasset, og glassene skylles omhyggeligt med IF-buffer.

De vaskes 5 min. i IF-buffer-Tween og efterfølgende i 5 min. i IF-buffer (tillæg 3).

Overskydende væske fjernes omhyggeligt.

2.3.4. Objektglassene placeres på fugtigt filterpapir.

Testvinduerne og FITC-vinduet dækkes med den fortynding af FITC-konjugatet, der er brugt til at bestemme titeren. Den mængde konjugat, der anbringes på vinduerne, skal svare til den tilsatte mængde antiserum.

2.3.5. Glassene inkuberes tildækket i 30 min. ved rumtemperatur.

2.3.6. Konjugatdråberne rystes af glasset. Glassene skylles og vaskes som ovenfor (2.3.3).

Overskydende fugt fjernes omhyggeligt.

2.3.7. 5-10 μ l af 0,1 M fosfatbufferet glycerin (tillæg 3) eller en tilsvarende indlejningsolie afpipetteres på hvert vindue, og der sættes dækglas på.

2.4. Aflæsning af IF-testen

Testglassene undersøges i et mikroskop med en epifluorescerende lyskilde og filtre, som er egnet til arbejdet med FITC, i immersionsolie ved 500-1 000 ganges forstørrelse. Vinduerne gennemses langs to diametre vinkelret på hinanden og langs omkredsen.

Det positive kontrolvindue undersøges først. Cellerne skal være lyse, fluorescerende og fuldstændig farvede.

NB: Testen må gentages, hvis farvningen er unormal.

Det konstanteres derefter, at der ikke er fluorescerende celler i FITC-kontrolvinduerne. Fluorescerende celler i FITC-kontrollen viser uspecifik binding af konjugatet, autofluorescens eller kontaminering.

NB: Hvis sådanne celler observeres, gentages testen.

Dernæst observeres, om der er lyse, fluorescerende celler med den karakteristiske morfologi for *Ralstonia solanacearum* i testvinduerne. Fluorescensens intensitet skal svare til den positive kontrolstammes ved samme antiserumfortynding. Celler med ufuldstændig farvning eller med svag fluorescens ses der bort fra, undtagen hvis de forekommer i stort antal (se fortolkning af IF-testresultatet).

Fortolkning af IF-testresultatet

- i) En IF-test er negativ, hvis der ikke er fundet lyse, fluorescerende celler med karakteristisk morfologi i en prøve.
- ii) Hvis der er fundet lyse, fluorescerende celler med karakteristisk morfologi i en prøve, bestemmes gennemsnitsantallet af celler pr. mikroskopfelt og antal celler (N) pr. ml genopslæmmet pellet beregnes (tillæg 4).

En population på omkring 10^3 celler/ml af det opsamlede bundfald er grænseværdien for IF-testen.

— for prøver med $N > 10^3$ celler/ml er IF-testen positiv

— for prøver med $N < 10^3$ celler/ml kan IF-testen betragtes som positiv.

- iii) Hvis et stort antal ($> 10^5$ celler/ml) af ufuldstændige eller svage fluoricerende celler ses ved antiserummets titer, skal en anden test gennemføres:
- enten baseret på et anderledes serologisk princip, eller
 - en gentagelse af IF-testen, med et andet antiserum eller en tifoldsfortynding af bundfaldet.

3. ELISA-test

Robinson-Smith et al., 1995

Der benyttes antiserum mod *Ralstonia solanacearum*, helst mod race 3/biovar 2. Titeren bestemmes på en opslæmning af 10^6 celler/ml fra den homologe stamme af *Ralstonia solanacearum*.

Det anbefales at bruge NUNC Polysorb-mikrotiterplader.

Der skal indgå en negativ kartoffelekstraktkontrol og en fosfatbufferet saltkontrol (PBS).

Der anvendes en opslæmning af $> 10^6$ celler/ml fra en stamme af korrekt race/biovar af *Ralstonia solanacearum* som positiv kontrol. Test af kontrollerne foretages som for prøvernes vedkommende, men de skal holdes godt adskilt fra prøverne på mikrotiterpladen.

- 3.1. 100-200 μ l af den genopslæmmede pellet afpipetteres i et eppendorfrør.
Glasset opvarmes i 4 min. ved 100°C. Glasset afkøles på is.
- 3.2. Der tilsættes en lige så stor mængde karbonatcoatingbuffer af dobbelt styrke (tillæg 5). Eppendorfrøret rystes.
- 3.3. 100 μ l portioner af prøven anbringes på hver af mindst to brønde i mikrotiterpladen. Pladen inkuberes i en time ved 37°C eller natten over ved 4°C.
- 3.4. Ekstrakterne hældes ud af brøndene. Brøndene vaskes tre gange med PBS-Tween (tillæg 5). Det sidste hold vaskeopløsning skal henstå i brøndene mindst 5 min.
- 3.5. Der laves en passende fortynding af *Ralstonia solanacearum*-antiserum i blokeringsbuffer (tillæg 5). 100 μ l antiserumfortynding overføres til brøndene.
Pladen inkuberes i en time ved 37°C.
- 3.6. Antiseratet hældes ud af brøndene. Brønden vaskes som ovenfor (punkt 3.4).
- 3.7. Man laver en passende fortynding af alkalisk fosfatasekonjugat i blokeringsbuffer. 100 μ l af konjugatfortyndingen overføres til brøndene.
Pladen inkuberes i en time ved 37°C.
- 3.8. Konjugatet slås ud af brøndene. Brøndene vaskes som ovenfor (punkt 3.4 og 3.6).
- 3.9. Man laver den alkaliske fosfatasesubstratopløsning (tillæg 5). 100 μ l overføres til hullerne. Pladen inkuberes i 30-60 minutter i mørke ved laboratorietemperatur.
- 3.10. Absorbansen aflæses ved 409 nm.

Fortolkning af ELISA-test

ELISA-testen er negativ, hvis prøvens absorbans er $< 2 \times$ den negative kontrols absorbans.

ELISA-testen er positiv, hvis prøvens absorbans er $> 2 \times$ den negative kontrols absorbans.

4. PCR-test

Seal et al., 1993

NB: Der skal på alle trin i tilberedelsen af prøven og andre manipulationer med PCR benyttes pipettespidser med filterprop.

Der laves en opslæmning af 10^6 celler/ml fra en race 3/biovar 2-stamme af *Ralstonia solanacearum* som positiv kontrol. Test af kontrollen foretages som for prøvernes vedkommende.

- 4.1. 100 μ l af den genopslæmmede pellet afpipetteres i et eppendorfrør.

Som alternativ kan 90 μ l af den genopslæmmede pellet overføres til et eppendorfrør med 10 μ l 0,5 M NaOH. Prøven blandes ved, at eppendorfrøret vendes gentagne gange.

- 4.2. Prøven opvarmes i 4 min. ved 100°C. Eppendorfrøret afkøles straks på is.
- 4.3. Der laves tifoldsfortyndinger, fx 1:10 og 1:100, i sterilt destilleret eller ultrarent vand (UPW).
- 4.4. PCR-reaktionsvolumen (tillæg 6) laves i et sterilt glas ved tilsætning af følgende bestanddele i nedenstående rækkefølge:

Til en reaktionsvolumen på 50 µl

Bestanddel	Mængde	Slutkoncentration
Sterilt, destilleret vand eller UPW	30,8 µl-33,8 µl	—
10×PCR-buffer	5,0 µl	1×
d-ATP	1,0 µl	0,2 mM
d-CTP	1,0 µl	0,2 mM
d-GTP	1,0 µl	0,2 mM
d-TTP	1,0 µl	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Primer Y-2 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Taq-polymerase (5 units/µl)	0,2 µl	1,0 U
Mængde i alt	45 µl-48 µl	

Til flere reaktioner

Mængden af hver bestanddel til det krævede antal reaktioner beregnes.

Bestanddelene blandes, og 45-48 µl af blandingen overføres til sterile PCR-rør.

Røerne med PCR-reaktionsvolumet opbevares på is.

Til en reaktionsvolumen på 25 µl

Mængderne af bestanddele reduceres proportionalt.

- 4.5. PCR-forstærkning
- 4.5.1. Valgmulighed: Pulscentrifugering af glassene med den kogte prøve og den positive kontrol.
Der tilsættes i denne rækkefølge 2-5 µl prøve(r), vandkontrol og positiv kontrol til glassene med PCR-reaktionsblandingen. Glassene anbringes i PCR-apparatets varmekontrol.
- 4.5.2. Følgende program køres:
- 1 cyklus på
- i) 2 min. ved 96°C: denaturering af DNA
- 50 cykler på
- ii) 20 sek. ved 94°C: denaturering
 - iii) 20 sek. ved 68°C: påhæftning af primere
 - iv) 30 sek. ved 72°C: forlængelse af kopi
- 1 cyklus på
- v) 10 min. ved 72°C: yderligere forlængelse
- 1 cyklus på
- vi) henstand ved 4°C.
- NB: Disse parametre gælder for en Perkin Elmer 9600. Andre PCR-apparater kræver måske et øvre lag af mineralolie i PCR-reaktionsglassene og/eller modifikation af varigheden af trin ii), iii) og iv) i forstærkningsprofilen.
- 4.5.3. Glassene tages ud af PCR-apparatet. PCR-produktet analyseres. Hvis dette ikke straks finder sted, opbevares glassene ved 4°C for brug samme dag eller ved -18°C for senere brug.
- 4.6. Analyse af PCR-produktet
- PCR-fragmenterne påvises ved agarosegelelektroforese og farvning med ethidiumbromid.
- 4.6.1. Der laves en agarosegel ved langsomt at bringe agarose i kog i trisacetatelektroforese (TAE)-buffer.

- 4.6.2. Den smeltede agarose afkøles til 50-60 °C og hældes i elektroforeseenhedens form, hvorefter kammen indsættes. Man lader gelen størkne.
- 4.6.3. Kammen tages ud. Gelen nedsænkes i TAE, således at den lige netop er dækket (2-3 mm) af bufferen.
- 4.6.4. 3 μ l dråber buffer anbringes på parafilm. Der tilsættes 12 μ l af PCR-produktet fra prøverne, den positive kontrol eller vandkontrollen, og der blandes ved at suge let i pipettespidsen inden påfyldning. De givne mængder kan ændres, således at de passer til kapaciteten af brøndene i agarosegelen.
- 4.6.5. Gelens brønde flydes forsigtigt. Som reference anbringes en egnet DNA-markør i mindst en brønd.
- 4.6.6. Ledningerne mellem strømforsyningen og elektroforeseapparatet forbindes. Man lader gelen løbe ved 5-8 V/cm, indtil frontindikatoren er 1 cm fra enden af gelen.
- 4.6.7. Strømforsyningen afbrydes. Ledningerne tages af elektroforeseapparatet. Gelen fjernes forsigtigt. Den nedsænkes i ethidiumbromidopløsning i 30-45 min.
- NB: Man skal altid bære engangshandsker, når man håndterer ethidiumbromid, som er et kraftigt mutagen stof.
- 4.6.8. Prøven affarves i destilleret vand i 10-15 min.
- 4.6.9. De forstærkede DNA-fragmenter visualiseres ved UV-gennemlysning. PCR-produktet af *Ralstonia solanacearum* ved primer OLI-1 og Y-2 er 288 bp i længde. Dette kontrolleres i forhold til DNA-markøren og den positive kontrol.
- NB: Vandkontrollen skal under alle omstændigheder være negativ. Hvis den er positiv, gentages testen.
- 4.6.10. Gelen fotograferes, hvis der er brug for at bevare resultatet.
- 4.6.11. Det forstærkede fragments ægthed bekræftes ved restriktionszymanalyse (REA).
- 4.7. Restriktionszymanalyse (REA)
- 4.7.1. 8,5 μ l af PCR-produktet (4.5.3) overføres til et nyt mikroglas. Der tilsættes 1 μ l 10 \times enzymbuffer og 0,5 μ l restriktionsenzym Avall.
- 4.7.2. Blandingen foretages ved at suge forsigtigt i pipettespidsen. Hvis der stadig er dråber på glassets vægge, pulscentrifugeres i en mikrocentrifuge. Glasset inkuberes i en time ved 37 °C.
- 4.7.3. Det destruerede PCR-fragment analyseres ved agarosegelelektroforese som ovenfor (punkt 4.6).

Fortolkning af PCR-testresultatet

PCR-testen er negativ, hvis det karakteristiske 288 bp-fragment ikke påvises, samtidig med at fragmentet påvises for den positive kontrolstamme af *Ralstonia solanacearum*.

PCR-testen er positiv, hvis 288 bp-fragmentet påvises, samtidig med at REA-analysen af det forstærkede fragment er identisk med den positive kontrolstamme af *Ralstonia solanacearum*.

5. Dyrkning på selektivt medie

Elphinstone et al., 1996

- 5.1. Testen foretages ved en passende fortyndingsudstrykningsmetode, f.eks.:
- Der laves mindst to tifoldsfertyndninger, dvs. 1:10 og 1:100, af den genoplæmmede pellet i pelletbuffer. En afmålt standardmængde (50-100 μ l) af den genoplæmmede pellet og hver fortynding afpipetteres på et modificeret, selektivt SMSA-substrat (tillæg 7) og stryges med en glasstav ud over hele substratets overflade.
Hvis man finder det nyttigt, kan der også foretages en fortynding ved hjælp af en podenål fyldt med 10 μ l af den genoplæmmede pellet. Øskenen skal flamberes mellem strøgene.
 - En afmålt standardmængde (50-100 μ l) af den genoplæmmede pellet overføres til et modificeret, selektivt SMSA-medie og stryges med en glasstav ud over hele substratets overflade. Der stryges med staven uden flambering på endnu to modificerede SMSA-plader.
- 5.2. Efter samme fortyndingsudstrykningsmetode udstryges en opløsning af 10⁶ celler/ml fra en race 3/biovar 2-stamme af *Ralstonia solanacearum* som positiv kontrol på en række særskilte, modificerede SMSA-plader.
- 5.3. Pladerne inkuberes ved 28 °C. Man begynder at aflæse pladerne efter tre døgn. Hvis de er negative, inkuberes de yderligere i indtil seks døgn. Virulente isolater af *Ralstonia solanacearum* udvikler mælkehvide, flade, uregelmæssige og udflydende kolonier med tydelige røde til violette centre, der viser indre striber eller hvirvler.
- 5.4. Kolonier med karakteristisk morfologi reindyrkes ved subkultur på et generelt næringssubstrat (tillæg 1).

- 5.5. Renkulturer (afsnit II, punkt 4.1) identificeres, og *Ralstonia solanacearum*-kulturer bekræftes ved en patogenitetstest (afsnit II, punkt 4.3)

Fortolkning af resultatet af selektiv udstrygning

Selektiv udstrygning er negativ, hvis der ikke er isoleret nogen kolonier efter seks døgn, eller hvis der ikke er isoleret nogen karakteristiske kolonier af *Ralstonia solanacearum*, forudsat at der ikke foreligger mistanke om hæmning ved kolonier af andre bakterier, og at karakteristiske kolonier af *Ralstonia solanacearum* er fundet i den positive kontrol.

Selektiv udstrygning er positiv, hvis der isoleres karakteristiske kolonier af *Ralstonia solanacearum*.

6. **Biotest**

Janse, 1988

- 6.1. Der benyttes ti testplanter af modtagelige tomat- eller ægplanter bladstadium 3 til hver prøve. Planterne må ikke vandes de sidste 24 timer før indpodningen.
- 6.2. 100 μ l genopløst pellet fordeles mellem testplanterne. Der indpodes i stænglen mellem kimbladene på et eller flere steder.
- 6.3. Efter samme metode indpodes ti frøplanter med en opløsning af 10^6 celler/ml fra en race 3/biovar 2-stamme af *Ralstonia solanacearum* som positiv kontrol og med pelletbuffer som negativ kontrol. De positive kontrolplanter holdes adskilt fra de øvrige planter for at undgå kontamination.
- 6.4. Småplanterne videredyrkes ved en temperatur på 22°C-28°C, med høj relativ fugtighed og daglig vanding, i op til fire uger. Der observeres for udvikling af visnesymptomer, epinasti, klorose og/eller nedsat vækst.
- 6.5. Der isoleres fra inficerede planter (afsnit II). Renkulturer med karakteristisk morfologi (afsnit II, punkt 4.1) identificeres, og *Ralstonia solanacearum*-kulturer bekræftes ved en patogenitetstest (afsnit II, punkt 4.3).
- 6.6. Det kontrolleres, at der ikke findes infektion i hold af testplanter, der ikke viser tegn på infektion. 2 cm over indpodningsstedet på hver testplante fjernes et stykke stilk på 1 cm. Vævene homogeniseres i udblødningsbuffer. Der foretages fortyndingsudstrygning (punkt 5.1). Hvis resultatet er positivt, identificeres renkulturer med karakteristisk morfologi (afsnit II, punkt 4.1), og *Ralstonia solanacearum*-kulturer bekræftes ved en patogenitetstest (afsnit II, punkt 4.3).

Fortolkning af resultatet af biotesten

Biotesten er negativ, hvis testplanterne ikke er inficeret med *Ralstonia solanacearum*, og forudsat at *Ralstonia solanacearum* er påvist i de positive kontrolplanter.

Biotesten er positiv, hvis testplanterne er inficeret med *Ralstonia solanacearum*.

7. **Berigningstest**

J. G. Elphinstone et al., 1996

- 7.1. 100 μ l genopløst pellet overføres til 3 ml modificeret SMSA-bouillon (tillæg 7).
- 7.2. Der inkuberes i 48 timer (men højst 72 timer) ved 28°C med glassets prop sat løst på af hensyn til beluftning.
- 7.3. Proppen sættes fast, og prøven omrystes. Der tages portioner fra til IF-testen (dette afsnit, punkt 2), ELISA-testen (dette afsnit, punkt 3) og/eller PCR-testen (dette afsnit, punkt 4).

8. **Patogenitetstest**

Se afsnit II, 4.3.

*Tillæg 1***Medier til isolering og dyrkning af *Ralstonia solanacearum*****Næringsagar (NA)**

Næringsagar (Difco)	23 g
Destilleret vand	1 l

Der tilberedes medium i kolber på 1 l med ½ l medium i hver.

Ingredienserne opløses.

Der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 minutter.

Der afkøles til 50 °C. Ophældning på petriskåle.

Gær-pepton-glucoseagar (YPGA)

Gærekstrakt (Difco)	5 g
Bacto-pepton (Difco)	5 g
D(+) glucose (monohydrat)	10 g
Bacto-agar (Difco)	15 g
Destilleret vand	1 l

Der tilberedes medium i kolber på 1 l med ½ l medium i hver.

Ingredienserne opløses.

Der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 minutter.

Der afkøles til 50 °C. Ophældning på petriskåle.

Saccharose-peptonagar (SPA)

Saccharose	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
Destilleret vand	1 l

Der tilberedes medium i kolber på 1 l med ½ l medium i hver.

Ingredienserne opløses. Om nødvendigt justeres pH til 7,2-7,4.

Der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 minutter.

Der afkøles til 50 °C. Ophældning på petriskåle.

Kelmans tetrazolium-medium

Casaminosyrer (Difco)	1 g
Bacto-pepton (Difco)	10 g
Dextrose	5 g
Bacto-agar (Difco)	15 g
Destilleret vand	1 l

Der tilberedes medium i kolber på 1 l med ½ l medium i hver.

Ingredienserne opløses. Der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 minutter.

Der afkøles til 50 °C.

Der tilsættes en filtersteriliseret vandig opløsning af triphenyltetrazoliumchlorid (Sigma), så der opnås en slutkoncentration på 50 mg/l.

Ophældning på petriskåle.

*Tillæg 2***Materiale til tilberedning af prøver**

Udblødningsbuffer: 50 mM fosfatbuffer, pH 7,0

Denne buffer benyttes til udblødning af væv.

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Destilleret vand	1 l

Ingredienserne opløses, og pH kontrolleres. Der fremstilles opløsninger efter behov. Der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 minutter.

Det anbefales, at der tilsættes 5% Poly Vinyl Pyrolidon-40 000 MWT (PVP-40) ved udførelsen af den direkte PCR-test for at mindske sandsynligheden for, at aromatiske molekyler i ekstraktet hæmmer forstærkningen.

Det anbefales, at det tilsættes et antiflokkuleringsmiddel, et antiskummiddel eller en antioxidant, når der bruges en Waring Blender- eller Ultra Turrax-homogeniseringsprocedure for udblødning af kartoffelvæv.

Lubrolflager	0,5 g/l
DC-siliconeantiskum	1,0 ml/l
Tetranatriumpyrophosphat	1,0 g/l

Der autoklaveres særskilt. Der tilsættes, til den ønskede koncentration opnås.

Pelletbuffer: 10 mM fosfatpuffer pH 7,2

Denne buffer benyttes til genopslæmning og fortynding af pellets af kartoffelendeskorper.

Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	2,7 g
Na H ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
Destilleret vand	1 l

Ingredienserne opløses, og pH kontrolleres. Der fremstilles opløsninger efter behov.

Der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 minutter.

*Tillæg 3***Materiale til IF-testen**

IF-buffer: 10 mM saltvand med phosphatbuffer (PBS), pH 7,2

Denne buffer benyttes til fortynding af antisera.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destilleret vand	1 l

Ingredienserne opløses, og pH kontrolleres. Der fremstilles opløsninger efter behov.

Der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 minutter.

IF-buffer — Tween

Denne buffer benyttes til skylning af objektglas. Der tilsættes 0,1 % Tween 20 til IF-bufferen.

0,1 M Glycerol med phosphatbuffer pH 7,6

Denne buffer benyttes som indlejningsmiddel på vinduerne i IF-objektglasset for at intensivere fluorescensen.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15 g
Glycerol	50 ml
Destilleret vand	100 ml

—————

Tillæg 4

Bestemmelse af kontaminationen i IF-testen

Overflademål (S) af vindue eller multispot-objektglas

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

hvor D = vinduets diameter.

(1)

Synsfeltets (s) overflademål

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

hvor d = synsfeltets diameter.

(2)

d bestemmes enten ved direkte måling eller på grund af følgende formel:

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

(3)

hvor i = synsfeltkoefficienten (afhænger af okulartype og varierer fra 8 til 24)

K = rørkoefficienten (1 til 1,25)

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

Af (2)

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

(4)

fås (3)

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

Oprælling: antal typisk fluorescerende celler pr. synsfelt (c).

Beregning: antal typisk fluorescerende celler pr. vindue (C).

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

Beregning: antal typisk fluorescerende celler pr. ml tørstofenhed (N).

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

hvor y = tørstofenhedens volumen på vinduet, og

F = tørstofenhedens opløsningsfaktor

—

Tillæg 5

Materiale til ELISA-testen

Coating buffer, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
Destilleret vand	1 l

Ingredienserne opløses, og pH kontrolleres. Der fremstilles opløsninger efter behov.

Der steriliseres ved autoklaving ved 121 °C i 15 minutter.

Der kan tilsættes natriumsulfit til en slutkoncentration på 0,2 % som antioxidant, hvis ekstraktet har et stort indhold af aromatiske molekyler.

10 × saltvand med phosphatbuffer (PBS), pH 7,4

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

Ingredienserne opløses, og pH kontrolleres. Der fremstilles opløsninger efter behov.

Der steriliseres ved autoklaving ved 121 °C i 15 minutter.

Saltvand med phosphatbuffer-Tween (PBS-T)

10 × PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilleret vand	895 ml

Blokerende (antistof) buffer (skal være frisklavet)

10 × PBS	10 ml
Polyvinylpyrrolidon-440 000 MWT (PVP-44)	2 g
10 % Tween 20	0,5 g
Mælkepulver	0,5 g
Destilleret vand	til 100 ml

Alkalisk phosphatasesubstratopløsning pH 9,8

Diethanolamin	97 ml
Destilleret vand	800 ml

Der blandes og justeres til pH 9,8 med koncentreret HCl.

Der fyldes op til 1 l med destilleret vand.

Der tilsættes 0,2 g MgCl₂.

2 phosphatasesubstrattabletter (5 mg) (Sigma) opløses pr. 15 ml opløsning.

*Tillæg 6***Materiale til PCR-testen**

Oligonucleotid primersekvens:

Primer OLI-1 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

Primer Y-2 5'CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Materialer: se Seal et al., 1993

*Tillæg 7***Materiale til dyrkning på selektivt substrat og berigningstest**

SMSA selektivt medium (Engelbrecht, 1994, som ændret ved Elphinstone et al., 1996)

Grundmedium

Casaminosyrer (Difco)	1 g
Bacto-pepton (Difco)	10 g
Glycerol	5 ml
Agar (Difco)	15 g
Destilleret vand	1 l

Der tilberedes medium i kolber på 1 l med ½ l medium i hver.

Ingredienserne opløses, og pH kontrolleres. Om nødvendigt justeres pH til 6,5 inden autoklavering. *Ralstonia solanacearum* gror dårligt på mediet ved pH > 7,0.

Der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 minutter.

Der nedkøles til 50 °C.

Følgende ingredienser tilsættes (alle fra Sigma), så de angivne slutkoncentrationer opnås:

Krystalviolet	5 mg/l		
Polymixin B sulfat	100 mg/l	(ca. 600 000 enheder)	Sigma P-1004
Bacitracin (*)	25 mg/l	(ca. 1 250 enheder)	Sigma P-0125
Chloramphenicol	5 mg/l		Sigma C-3175
Penicilin-G	0,5 mg/l	(ca. 825 enheder)	Sigma P-3032
Tetrazoliumsulte	50 mg/l		

Ingredienserne opløses i 70% ethanol til de koncentrationer, der følger af den tilberedte mediemængde. Nogle ingredienser, fx polymixin B og chloramphenicol, kræver en let opvarmning og skal omrystes.

SMSA-bouillon (Elphinstone et al., 1996)

Tilberedningen foregår som for det selektive SMSA-medium, men agaren eller tetrazoliumsulte udelades.

Hældes i 30 ml Universal-glas til engangsbrug i 3 ml aliquoter.

(*) Hvis det findes nødvendigt, kan en forøgelse af bacitracin-koncentrationen til 300 ppm mindske forurening med rådbakterier uden at hæmme *Ralstonia solanacearum*.

Litteraturhenvisninger

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

BILAG III

1. I ethvert tilfælde af mistanke om forekomst, hvor screening efter den relevante metode i bilag II for det nævnte plantemateriale vedkommende eller i alle andre tilfælde efter en officielt godkendt metode har givet positivt resultat, og der afventes bekræftelse eller afkræftelse efter gennemførelsen af den nævnte metode, tilbageholdes nedennævnte og opbevares hensigtsmæssigt:
 - så vidt muligt partiet eller en del af partiet (hvorfra prøven er taget) i originalemballage med etiket
 - så vidt muligt den resterende del af prøverne
 - eventuelt resterende ekstrakt og andet materiale forberedt til screening, f.eks. objektglas til immunofluorescensog
 - al relevant dokumentationindtil nævnte metode er gennemført.
2. Ved bekræftelse af skadegørers tilstedeværelse tilbageholdes nedennævnte og opbevares hensigtsmæssigt:
 - det i punkt 1 nævnte materiale, og
 - hvor relevant en prøve af det inficerede tomat- eller auberginemateriale, som blev podet med knold- eller planteekstraktet, og
 - den isolerede kultur med skadegørereni mindst en måned efter den i artikel 5, stk. 2, omhandlede meddelelsesprocedure.

BILAG IV

Elementerne i forbindelse med den undersøgelse, der omhandles i artikel 5, stk. 1, litra a), nr. i), skal omfatte:

i) produktionssteder:

- hvor der bliver eller har været dyrket kartofler, der er klonbeslægtede med kartofler, som er fundet kontamineret med skadegøveren
- hvor der bliver eller har været dyrket tomater, der kommer fra samme kilde som tomater, der er fundet kontamineret med skadegøveren
- hvor der bliver eller har været dyrket kartofler eller tomater, som har været sat under officielt tilsyn på grund af mistanke om skadegøverens forekomst
- hvor der bliver eller har været dyrket kartofler, der er klonbeslægtede med kartofler, som er blevet dyrket på produktionssteder, der er fundet kontamineret med skadegøveren
- hvor der er kartofler eller tomater i vækst, der befinder sig i nærheden af kontaminerede produktionssteder, herunder produktionssteder, som direkte eller via en maskinstation deler produktionsudstyr- og anlæg
- hvor der benyttes overfladevand til vanding eller sprøjtning fra kilder, for hvilke der enten foreligger en bekræftelse af eller en mistanke om, at de er kontamineret med skadegøveren
- hvor der benyttes overfladevand til vanding eller sprøjtning fra kilder, der bruges i fællesskab med produktionssteder, for hvilke der enten foreligger en bekræftelse af eller en mistanke om, at de er kontamineret med skadegøveren
- som er eller har været oversvømmet med overfladevand, for hvilket der foreligger en bekræftelse af eller en mistanke om, at det er kontamineret med skadegøveren

og

ii) overfladevand, der benyttes til vanding eller sprøjtning af eller som har oversvømmet marker eller produktionssteder, for hvilke der foreligger en bekræftelse af, at de er kontamineret med skadegøveren.

—

BILAG V

1. Elementerne til bestemmelserne af den sandsynlige kontaminerings omfang, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iii), og artikel 5, stk. 1, litra c), nr. iii), skal, hvor dette er relevant, omfatte:
 - det nævnte plantemateriale, som dyrkes på et produktionssted, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii)
 - produktionssteder med en produktionsforbindelse til det nævnte plantemateriale, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii), herunder produktionssteder, som direkte eller via en maskinstation deler produktionsudstyr- og anlæg
 - det nævnte plantemateriale, som produceres på de produktionssteder, der omhandles i det foregående led, eller som befandt sig på sådanne produktionssteder i den periode, hvor det nævnte plantemateriale, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii), var på de produktionssteder, der omhandles i første led
 - lagre, som håndterer det nævnte plantemateriale fra ovennævnte produktionssteder
 - maskiner, køretøjer, fartøjer, lagre eller enheder heraf og alle andre genstande, herunder emballage, der kan have været i kontakt med det nævnte plantemateriale, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii)
 - det nævnte plantemateriale, der opbevares i eller er i kontakt med noget af det i det foregående led omhandlede, inden dette er blevet rengjort og desinficeret
 - som resultat af undersøgelse og test, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), nr. i), for kartoflers vedkommende knolde eller planter med klonslægtsskab på søster- eller forældreniveau og for tomaters vedkommende planter med samme kilde som det nævnte plantemateriale, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii), og for hvilke det, selv om de er undersøgt for skadegøreren og fundet negative, alligevel ser ud til, at kontaminering er sandsynlig via en klonforbindelse
 - produktionssteder med det nævnte plantemateriale, der omhandles i det foregående led
 - produktionssteder med det nævnte materiale, som benytter vand til vanding eller sprøjtning, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra c), nr. ii)
 - det nævnte plantemateriale, som er produceret på marker, der er oversvømmet med overfladevand, for hvilket der foreligger en bekræftelse af, at det er kontamineret med skadegøreren.
2. Bestemmelsen af mulig spredning, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iv), og artikel 5, stk. 1, litra c), nr. iii), skal omfatte:
 - i) for tilfælde som omhandlet i artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iv), tages følgende i betragtning:
 - afstanden til andre produktionssteder, der dyrker det nævnte plantemateriale
 - fælles produktion og anvendelse af læggekartoffelmateriale
 - produktionssteder, som benytter overfladevand til vanding eller sprøjtning af det nævnte plantemateriale, i tilfælde, hvor der er eller har været risiko for overfladevandsafstrømning fra eller oversvømmelse af produktionssteder, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii)
 - ii) for tilfælde, hvor overfladevand er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra c), nr. ii):
 - produktionssteder, som producerer det nævnte plantemateriale og støder op til eller risikerer at blive oversvømmet af overfladevand, der er erklæret kontamineret
 - eventuelt særskilt vandingsbassin, som har tilknytning til overfladevand, der er erklæret kontamineret.

3. Oplysningerne i den meddelelse, der omhandles i artikel 5, stk. 2, første afsnit, skal omfatte:
 - dato for indberetning af mistanke om forekomst efter artikel 4 og dato for prøvetagning og eventuel bekræftelse af skadegørerens forekomst efter artikel 5
 - en beskrivelse af de nærmere enkeltheder vedrørende den erklærede kontaminering og zoneafgrænsning.
 4. Den supplerende meddelelse, der er nævnt i artikel 5, stk. 2, andet afsnit, skal omfatte følgende oplysninger:
 - for kartoffelsendinger eller -partier, der er erklæret kontamineret, de certifikater, der foreskrives i artikel 7 og 8 i direktiv 77/93/EØF, eller henholdsvis plantepasnummer eller registreringsnummer for kartoffelavlere, fælleslagre og forsendelsescentre
 - for tomatplantesendinger eller -partier, der er erklæret kontamineret, de certifikater, der foreskrives i artikel 7 og 8 i direktiv 77/93/EØF, samt plantepasnummer i henhold til del A, afsnit I, punkt 2.2, i bilag V til direktiv 77/93/EØF
 - sortsnavn og -kategori for læggekartoffelmateriale og om muligt i alle andre tilfælde
 - andre oplysninger om den erklærede kontaminering, som Kommissionen måtte ønske.
-

BILAG VI

1. Vedrørende artikel 6, stk. 1, gælder følgende bestemmelser:
 - forbrænding, eller
 - anvendelse til foder efter en varmebehandling, som sikrer, at der ikke er nogen risiko for, at skadegøreren overlever, eller
 - dyb nedgravning på et sted, hvor der ikke er nogen risiko for udsivning til landbrugsjord eller kontakt med vandkilder, som kunne benyttes til vanding af landbrugsjord, eller
 - industriel forarbejdning ved direkte, øjeblikkelig levering til et forarbejdningsanlæg med officielt godkendte faciliteter til bortskaffelse af affald, som er i overensstemmelse med bilag VII, eller
 - andre foranstaltninger, forudsat at det er blevet fastslået, at der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes; sådanne foranstaltninger skal straks meddeles Kommissionen og de øvrige medlemsstater.
2. Den korrekte brug eller bortskaffelse af det nævnte plantemateriale, jf. artikel 6, stk. 2, under tilsyn af de(n) pågældende medlemsstat(er)s officielle ansvarlige organer og med passende kommunikation mellem de officielle ansvarlige organer for at sikre sådant tilsyn på ethvert tidspunkt og godkendelse fra det officielle ansvarlige organ i den medlemsstat, hvor kartoflerne skal pakkes eller forarbejdes, for så vidt angår de i første og andet led omhandlede faciliteter til bortskaffelse af affald er følgende:
 - i) for kartoffelknolde:
 - brug som spisekartofler til konsum efter pakning på steder med passende faciliteter til bortskaffelse af affald, så de er klar til direkte levering og brug uden ompakning, og er bestemt til sådan direkte levering og brug, eller
 - brug som kartofler til industriel forarbejdning og bestemt til direkte, øjeblikkelig levering til et forarbejdningsanlæg med passende faciliteter til bortskaffelse af affald, eller
 - anden brug eller bortskaffelse, såfremt det er fastslået, at der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes, og forudsat at de nævnte officielle ansvarlige organer giver deres godkendelse. Sådanne foranstaltninger skal straks meddeles til Kommissionen og de øvrige medlemsstater
 - ii) for andre plantedele, herunder stykker af stilk og blade:
 - destruktion, eller
 - anden brug eller bortskaffelse, såfremt det er fastslået, at der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes; sådanne foranstaltninger skal meddeles Kommissionen og de øvrige medlemsstater.
3. De egnede metoder til dekontaminering af de genstande, der omhandles i artikel 6, stk. 3, er rengøring og når relevant desinficering, således at der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes, og metoderne skal følges under tilsyn af medlemsstaternes officielle ansvarlige organer.
4. Den række foranstaltninger, der skal gennemføres af medlemsstaterne i afgrænsede zoner som fastsat i artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iv), og litra c), nr. iii), og omhandlet i artikel 6, stk. 4, omfatter:
 - 4.1. I tilfælde, hvor produktionssteder er erklæret kontaminerede efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii):
 - a) i en mark eller enhed med beskyttet planteproduktion, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii), gælder følgende:

- i) i mindst fire vækstår efter erklæringen om kontaminering
- skal der træffes foranstaltninger til at eliminere gengroninger og selvsåede tomatplanter eller andre værtsplanter for skadegøreren, herunder ukrudt af natskyggefamilien, og
 - må der ikke udplantes følgende:
 - kartoffelknolde eller planter
 - tomatplanter og -frø
 - under hensyntagen til skadegøreren's biologi:
 - andre værtsplanter
 - planter af slægten Brassica, for hvilke der er en påvist risiko for, at skadegøreren kan overleve
 - afgrøder, for hvilke der er en åbenbar risiko for, at skadegøreren kan spredes
 - i den første kartoffel- eller tomatdyrknings sæson efter den i foregående led nævnte periode, dog på betingelse af, at marken er fundet fri for gengroninger og selvsåede tomatplanter eller andre værtsplanter, herunder ukrudt af natskyggefamilien, i mindst to på hinanden følgende vækstår forud for udplantning
 - må der for kartoflernes vedkommende kun lægges officielt certificerede læggekartofler til produktion af spise-, foder- eller industrikartofler, og
 - skal der foretages en officiel undersøgelse omfattende test som beskrevet i artikel 2, stk. 1
 - i den kartoffel- eller tomatdyrknings sæson, der følger efter den i foregående led nævnte periode, og efter et passende sædskifte, lægges for kartoflernes vedkommende officielt certificerede læggekartofler til avl af læggekartofler eller andre kartofler, og der skal for såvel kartoflernes som tomaternes vedkommende foretages en officiel undersøgelse som beskrevet i artikel 2, stk. 1
- eller
- ii) i de fem vækstår, der følger efter erklæringen om kontaminering
- skal der træffes foranstaltninger til at eliminere gengroninger og selvsåede tomatplanter eller andre værtsplanter for skadegøreren, herunder ukrudt af natskyggefamilien, og
 - skal marken i de første tre år etableres og holdes enten som helbrak eller med korn, alt efter den påviste risiko, eller vedvarende græs med hyppige, dybe slæt eller intensiv græsning eller som græs til frøavl efterfulgt af udplantning i de to følgende år med ikke-værtsplanter for skadegøreren, for hvilke der ikke er nogen påvist risiko for, at skadegøreren kan overleve eller spredes
 - i den første kartoffel- eller tomatdyrknings sæson efter den i foregående led nævnte periode
 - må der for kartoflernes vedkommende kun lægges officielt certificerede læggekartofler til avl af læggekartofler eller andre kartofler
- og der skal foretages en officiel undersøgelse omfattende en test som beskrevet i artikel 2, stk. 1
- b) på andre marker:
- i det vækstår, der følger efter erklæringen om kontaminering:
 - må der ikke udplantes kartoffelknolde eller -planter eller andre værtsplanter for skadegøreren, og der skal træffes foranstaltninger til at eliminere gengroninger og selvsåede tomatplanter og andre værtsplanter, herunder, hvor relevant, ukrudt af natskyggefamilien, eller
 - må der for kartoffelknoldes vedkommende kun lægges officielt certificerede læggekartofler til avl af spise-, foder- eller industrikartofler, forudsat at de officielle ansvarlige organer finder det godtgjort, at risici for gengroninger og selvsåede tomatplanter eller andre

værtsplanter for skadegøreren, herunder ukrudt af natskyggefamilien, er elimineret. Afgrøder i vækst skal inspiceres på passende tidspunkter, og gengroninger skal testes for skadegøreren; for kartoflers vedkommende skal også høstede knolde inspiceres

- i det første vækstår efter det i første led nævnte vækstår:
 - må der for kartoflers vedkommende kun lægges officielt certificerede læggekartofler til avl af læggekartofler eller andre kartofler
- i mindst det andet vækstår efter det i første led nævnte vækstår:
 - må der for kartoflers vedkommende kun lægges officielt certificerede læggekartofler eller læggekartofler, der er dyrket under officielt tilsyn af officielt certificerede læggekartofler, til avl af læggekartofler eller andre kartofler
- i hvert af de i de foregående led nævnte vækstår skal der træffes foranstaltninger til at eliminere gengroninger og selvsåede tomatplanter eller andre værtsplanter for skadegøreren, herunder ukrudt af natskyggefamilien, og der skal foretages en officiel undersøgelse som beskrevet i artikel 2, stk. 1; i tilfælde, hvor der er lagt læggekartofler til læggekartoffelavl, skal der foretages test af knolde

c) straks efter erklæringen om kontaminering efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii), og i hvert af de følgende vækstår til og med den første kartoffel- eller tomatdyrkningsæson, som er tilladt på marker, der er erklæret kontamineret som beskrevet i litra a):

- skal alle maskiner og lagerfaciliteter på produktionsstedet, der indgår i kartoffel- eller tomatavl, rengøres og, hvor relevant, desinficeres efter passende metoder som beskrevet i punkt 3
- skal der indføres officiel kontrol med vandings- og sprøjteprogrammer, herunder eventuelt forbud mod vanding og sprøjtning, for at hindre, at skadegøreren spredes

d) i en enhed med beskyttet planteproduktion, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii), hvor det er muligt at udskifte vækstmediet fuldstændigt:

- må der ikke udplantes nogen kartoffelknolde eller -planter eller andre værtsplanter for skadegøreren, herunder tomatplanter og -frø, medmindre nævnte enhed har været underkastet foranstaltninger under officielt tilsyn til at eliminere skadegøreren og fjerne alt værtsplante-materiale, herunder i det mindste en fuldstændig udskiftning af vækstmedium samt rengøring og hvor relevant desinficering af nævnte enhed og alt udstyr, således at enheden derefter fra de officielle ansvarlige organer har fået godkendelse til at procedure kartofler eller tomater, og
- for kartoffelavl vedkommende skal denne produktion være fra officielt certificerede læggekartofler eller fra miniknolde eller mikroplanter hidrørende fra testet materiale
- skal der indføres officiel kontrol med vandings- og sprøjteprogrammer, herunder eventuelt forbud mod vanding og sprøjtning, for at hindre, at skadegøreren spredes.

4.2. Uden at dette berører foranstaltningerne i punkt 4.1, skal medlemsstaterne i en afgrænset zone:

a) straks og i mindst tre vækstår efter erklæringen om kontaminering:

aa) i tilfælde, hvor den afgrænsede zone er bestemt efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iv)

- drage omsorg for, at deres officielle ansvarlige organer fører tilsyn med foretagender, som dyrker, opbevarer eller håndterer kartoffelknolde eller tomater, såvel som med foretagender, der arbejder med maskiner til kartoffel- eller tomatavl som maskinstation
- kræve rengøring og, hvor relevant, desinficering af sådanne foretagenders maskiner og lagre ved brug af passende metoder som beskrevet i punkt 3

- kræve, at der kun udplantes certificerede læggekartofler eller læggekartofler dyrket under officielt tilsyn til al kartoffeldyrkning i zonen, og at læggekartoffelafgrøden, der er dyrket på produktionssteder, der er erklæret sandsynligvis kontamineret i henhold til artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iii), testes efter høsten
 - kræve, at indhøstet læggekartoffelmateriale håndteres adskilt fra andet kartoffelmateriale på alle foretagender i zonen
 - foretage en officiel undersøgelse som beskrevet i artikel 2, stk. 1
- ab) i tilfælde, hvor overfladevand er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra c), nr. ii), eller indgår i de elementer, der giver mulighed for spredning af skadegøreren efter bilag V, punkt 2
- foretage en årlig undersøgelse på passende tidspunkter, herunder prøvetagning af overfladevand og passende værtsplanter af natskyggefamilien i de pågældende vandkilder samt test efter metoderne, hvor der anvendes elementer fra flowdiagrammet i bilag II
 - for det nævnte plantemateriale, efter den relevante metode i bilag II, eller
 - i andre tilfælde, efter enhver anden officielt godkendt metode
 - indføre officiel kontrol med vandings- og sprøjteprogrammer, herunder forbud mod benyttelse af vand, der er erklæret kontamineret, til vanding eller sprøjtning af det nævnte materiale og, hvor relevant, andre værtsplanter, for at hindre, at skadegøreren spredes. Et sådant forbud kan tages op til fornyet overvejelse ud fra resultaterne af ovennævnte årlige undersøgelse
 - i tilfælde, hvor udledninger af spildevand er kontaminerede, indføre officiel kontrol med bortskaffelse af affald fra industrielle forarbejdnings- eller pakkevirksomheder, der håndterer det nævnte materiale
- b) eventuelt indføre et program til udskiftning af alt materiale af læggekartofler i løbet af en rimelig tid.
-

BILAG VII

De officielt godkendte faciliteter til bortskaffelse af affald, der omhandles i bilag VI, punkt 1, fjerde led, skal være i overensstemmelse med nedenstående bestemmelser, således at risikoen for spredning af skadegøreren undgås:

- i) affald fra forarbejdning af kartofler og tomater (herunder kasserede kartofler og skræller samt tomater) og alt andet fast affald i forbindelse med kartoflerne og tomaterne skal bortskaffes ved:
 - dyb nedgravning på et sted, hvor der ikke er nogen risiko for udsivning til landbrugsjord eller kontakt med vandkilder, som kunne benyttes til vanding af landbrugsjord. Affaldet skal føres direkte til det sted på så sikre betingelser, at der ikke er nogen risiko for tab af affaldet, eller
 - forbrænding
- ii) flydende affald fra forarbejdning: inden flydende affald, der indeholder opslæmmede faste stoffer, bortskaffes, skal det filtreres eller gennemgå fældningsprocesser, således at sådanne faste stoffer fjernes. De faste stoffer skal bortskaffes som beskrevet i nr. i).

Derefter skal det flydende affald

- opvarmes til mindst 70 °C i mindst 30 minutter inden bortskaffelsen

eller

- bortskaffes på anden vis, forudsat at det sker efter officiel godkendelse og under officielt tilsyn, således at der ikke er nogen fare for, at affaldet kan komme i kontakt med landbrugsjord eller vandkilder, som kunne benyttes til vanding af landbrugsjord. Enkelthederne herom skal meddeles de øvrige medlemsstater og Kommissionen.
-