

I

(Veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

RICHTLINIE 98/57/EG DES RATES

vom 20. Juli 1998

zur Bekämpfung von *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

DER RAT DER EUROPÄISCHEN UNION —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft, insbesondere auf Artikel 43,

auf Vorschlag der Kommission⁽¹⁾,

nach Stellungnahme des Europäischen Parlaments⁽²⁾,

nach Stellungnahme des Wirtschafts- und Sozialausschusses⁽³⁾,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Der Schadorganismus *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. war früher als *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith bekannt. Es ist absehbar, daß die Bezeichnung *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. die allgemein anerkannte Bezeichnung für den Schadorganismus wird. In der vorliegenden Richtlinie sollte dieser wissenschaftlichen Entwicklung Rechnung getragen werden.

Die Erzeugung von Kartoffeln und Tomaten nimmt in der Landwirtschaft der Gemeinschaft einen wichtigen Platz ein. Die Kartoffel- und Tomatenerträge sind jedoch ständig durch Schadorganismen bedroht.

Durch den Schutz des Kartoffel- und des Tomatenanbaus gegen solche Schadorganismen soll nicht nur die Erzeugungskapazität erhalten, sondern auch die Produktivität der Landwirtschaft gesteigert werden.

Die Schutzvorkehrungen gegen die Einschleppung von Schadorganismen in das Hoheitsgebiet eines Mitgliedstaates wären nur von begrenzter Wirkung, wenn darauf verzichtet würde, diese Organismen in der ganzen Gemeinschaft gleichzeitig systematisch zu bekämpfen und Vorkehrungen gegen ihre Verschleppung zu treffen.

Einer der Schadorganismen für Kartoffeln und Tomaten ist *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., der

die Schleimkrankheit (Bakterielle Braunfäule) der Kartoffel und die Bakterielle Welke der Kartoffel und der Tomate hervorruft. In einigen Teilen der Gemeinschaft ist die Krankheit bereits aufgetreten, und begrenzte Infektionsquellen gibt es noch immer.

Der Kartoffel- und der Tomatenanbau sind in der gesamten Gemeinschaft stark gefährdet, wenn bei diesen Kulturen keine wirksamen Maßnahmen getroffen werden, um den Ausgangspunkt und die Verbreitung dieser Krankheit zu ermitteln, ihr Auftreten und ihre Verschleppung zu verhindern und nach Feststellung ihres Auftretens ihre Ausbreitung zu verhindern und sie mit dem Ziel der Tilgung zu bekämpfen.

Dazu müssen in der Gemeinschaft bestimmte Maßnahmen ergriffen werden. Darüber hinaus müssen die Mitgliedstaaten die Möglichkeit haben, erforderlichenfalls zusätzliche oder strengere Maßnahmen zu treffen, sofern ausgeschlossen ist, daß es dabei zu einer Behinderung des innergemeinschaftlichen Kartoffel- und Tomatenhandels kommt, die sich nicht mit der Richtlinie 77/93/EWG vom 21. Dezember 1976 des Rates über Maßnahmen zum Schutz der Gemeinschaft gegen die Einschleppung und Ausbreitung von Schadorganismen der Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse⁽⁴⁾ rechtfertigen ließe. Diese Maßnahmen sind den übrigen Mitgliedstaaten und der Kommission mitzuteilen.

Bei diesen Maßnahmen ist zu berücksichtigen, daß systematische amtliche Untersuchungen erforderlich sind, um festzustellen, wo der Schadorganismus auftritt. Diese Untersuchungen sollten auch Kontrollen vor Ort und gegebenenfalls Probenahmen und Tests umfassen, da der Schadorganismus unter bestimmten Bedingungen latent und unentdeckt sowohl in Beständen von Kartoffeln als auch in eingelagerten Kartoffelknollen überleben kann. Die Verschleppung des Schadorganismus im Bestand ist nicht der Hauptverbreitungsfaktor, der Schadorganismus kann auch über das Oberflächenwasser und eine bestimmte Begleitflora der Familie der Nachschattengewächse verbreitet werden; deshalb stellt die Bewässerung

⁽¹⁾ ABl. C 124 vom 21.4.1997, S. 12—24, und ABl. C 108 vom 7.4.1998, S. 85.

⁽²⁾ ABl. C 14 vom 19.1.1998, S. 34.

⁽³⁾ ABl. C 206 vom 7.7.1997, S. 57.

⁽⁴⁾ ABl. L 26 vom 31.1.1977, S. 20. Richtlinie zuletzt geändert durch die Richtlinie 98/2/EG der Kommission (AbL. L 15 vom 21.1.1998, S. 34).

von Kartoffel- und Tomatenbeständen mit kontaminiertem Wasser eine Ansteckungsgefahr für diese Bestände dar. Der Schadorganismus kann außerdem den Winter im Kartoffel- und Tomatendurchwuchs überdauern, was eine Infektionsquelle von einer Vegetationsperiode zur nächsten darstellt. Die Verschleppung des Schadorganismus erfolgt auch durch die Kontaminierung von Kartoffeln nach Berührung mit infizierten Kartoffeln und nach der Berührung mit Pflanz-, Ernte- und Beförderungsgeräten sowie Lagerbehältern, die durch vorherige Berührung mit befallenen Kartoffeln kontaminiert wurden.

Die Verschleppung des Schadorganismus läßt sich durch Entseuchung solcher Gegenstände verringern oder verhindern. Werden Pflanzkartoffeln auf diese Weise infiziert, so besteht eine erhebliche Gefahr, daß sich der Schadorganismus ausbreitet. Auch bei einem latenten Befall von Pflanzkartoffeln besteht eine erhebliche Ausbreitungsgefahr; diese kann durch Verwendung von Pflanzkartoffeln ausgeräumt werden, die im Rahmen eines amtlich zugelassenen Programms erzeugt, untersucht und für befallsfrei befunden wurden.

Die gegenwärtigen Kenntnisse über die Biologie und die Epidemiologie von *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. unter den in Europa herrschenden Bedingungen sind lückenhaft, so daß abzusehen ist, daß in einigen Jahren eine Überprüfung der vorgeschlagenen Maßnahmen erforderlich sein wird. Absehbar ist ferner, daß die Untersuchungsverfahren, insbesondere hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit und Selektivität, auf der Grundlage weiterer Forschungen verbessert werden, so daß dann die besten verfügbaren Untersuchungsverfahren ausgewählt und standardisiert werden können.

Bei der Festlegung der Einzelheiten dieser allgemeinen Maßnahmen sowie strengerer oder zusätzlicher Maßnahmen, die die Mitgliedstaaten treffen können, um die Einschleppung des Schadorganismus in ihr Hoheitsgebiet zu verhindern, ist eine enge Zusammenarbeit der Mitgliedstaaten mit der Kommission im Ständigen Ausschuß für Pflanzenschutz, nachstehend „Ausschuß“ genannt, wünschenswert —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

Diese Richtlinie regelt die in den Mitgliedstaaten zu treffenden Maßnahmen gegen *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., früher bekannt als *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, nachstehend „Schadorganismus“ genannt, mit denen im Hinblick auf die in Anhang I Abschnitt 1 aufgeführten Wirtspflanzen, nachstehend „das aufgeführte Pflanzenmaterial“ genannt, folgende Ziele erreicht werden sollen:

- a) Feststellung des Ausgangspunktes der Krankheit und ihrer Verbreitung;
- b) Verhütung der Krankheit bzw. ihrer Verschleppung und

- c) bei Feststellung der Krankheit Verhütung ihrer Verschleppung und Bekämpfung mit dem Ziel der Tilgung.

Artikel 2

(1) Die Mitgliedstaaten führen jedes Jahr systematische amtliche Untersuchungen darüber durch, ob der Schadorganismus in dem aufgeführten Pflanzenmaterial mit Ursprung in ihrem Hoheitsgebiet vorkommt. Zur Ermittlung anderer möglicher Infektionsquellen, die die Erzeugung des aufgeführten Pflanzenmaterials bedrohen, führen die Mitgliedstaaten in den Gebieten, in denen das aufgeführte Pflanzenmaterial erzeugt wird, eine Risikobewertung und — sofern dabei eine Gefahr der Ausbreitung des Schadorganismus festgestellt wird — gezielte amtliche Untersuchungen darüber durch, ob der Schadorganismus in anderem als dem aufgeführten Pflanzenmaterial vorkommt, so auch in Wirtspflanzen der Begleitflora aus der Familie der Nachtschattengewächse sowie in dem zum Bewässern oder Beregnen des aufgeführten Pflanzenmaterials verwendeten Oberflächenwasser und in Abwässern, die aus Anlagen zur Verarbeitung oder Verpackung des aufgeführten Pflanzenmaterials abgeleitet und zum Bewässern oder Beregnen des aufgeführten Pflanzenmaterials verwendet werden. Der Umfang dieser gezielten Untersuchungen wird je nach dem festgestellten Risiko festgelegt. Die Mitgliedstaaten können auch bei anderem Material wie Kultursubstrat, Erde und festen Abfällen industrieller Verarbeitungs- oder Verpackungsanlagen amtliche Untersuchungen über das Vorkommen des Schadorganismus vornehmen.

(2) Die amtlichen Untersuchungen gemäß Absatz 1 erfolgen

- a) im Falle des aufgeführten Pflanzenmaterials gemäß Anhang I Abschnitt II Nummer 1 und
- b) im Falle von Wirtspflanzen anderer Art als das aufgeführte Pflanzenmaterial sowie im Falle von Wasser und Abwässern mit Hilfe geeigneter Verfahren, wobei gegebenenfalls Proben zu entnehmen sind, die amtlichen oder amtlich überwachten Laboruntersuchungen zu unterziehen sind;
- c) gegebenenfalls im Falle von anderem Material mit Hilfe geeigneter Verfahren.

Für diese Untersuchungen werden die weiteren Einzelheiten der Kontrollverfahren sowie Anzahl, Herkunft und Zusammensetzung der Proben sowie der Zeitpunkt ihrer Entnahme von den zuständigen amtlichen Stellen im Sinne der Richtlinie 77/93/EWG nach anerkannten wissenschaftlichen und statistischen Grundsätzen entsprechend der Biologie des Schadorganismus sowie unter Berücksichtigung der in dem betreffenden Mitgliedstaat verwendeten Produktionssysteme für das aufgeführte Pflanzenmaterial und gegebenenfalls für andere Wirtspflanzen festgelegt.

(3) Die Einzelheiten und Ergebnisse der amtlichen Untersuchungen gemäß Absatz 1 werden gemäß Anhang I

Abschnitt II Nummer 2 alljährlich den anderen Mitgliedstaaten und der Kommission mitgeteilt. Diese Mitteilung erfolgt bis zum 1. Juni, außer im Falle von Pflanzkartoffeln für den hofeigenen Bedarf, in dem sie bis zum 1. September erfolgt. Die Einzelheiten und Ergebnisse bezüglich der Aufwüchse müssen sich auf die Erzeugung des vorangegangenen Jahres beziehen. Die Einzelheiten der Mitteilung können dem Ausschuß vorgelegt werden.

(4) Nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG sind festzulegen:

— die geeigneten Verfahren für die Untersuchungen und Laboruntersuchungen gemäß Absatz 2 Unterabsatz 1 Buchstabe b).

(5) Nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG können festgelegt werden:

— die geeigneten Verfahren für die Untersuchungen gemäß Absatz 2 Unterabsatz 1 Buchstabe c),

— weitere Einzelheiten der Untersuchungen gemäß Absatz 2 Unterabsatz 2, um in den Mitgliedstaaten einen gleichwertigen Sicherheitsstand zu gewährleisten.

Artikel 3

Die Mitgliedstaaten gewährleisten, daß der Verdacht oder die Bestätigung des Auftretens des Schadorganismus in ihrem Hoheitsgebiet den eigenen zuständigen amtlichen Stellen gemeldet wird.

Artikel 4

(1) Besteht der Verdacht, daß der Schadorganismus aufgetreten ist, so gewährleisten die zuständigen amtlichen Stellen des betreffenden Mitgliedstaats (der betreffenden Mitgliedstaaten), daß amtliche oder amtlich überwachte Laboruntersuchungen durchgeführt werden, um den Verdacht zu bestätigen oder zu widerlegen, und zwar im Falle von aufgeführtem Pflanzenmaterial nach dem maßgeblichen Verfahren des Anhangs II und nach Maßgabe der Bedingungen des Anhangs III Nummer 1 und in anderen Fällen nach einem anderen amtlich zugelassenen Verfahren. Bestätigt sich der Verdacht, so gelten die Bestimmungen des Anhangs III Nummer 2.

(2) Bis zur Abklärung des Verdachts gemäß Absatz 1 müssen in jedem Verdachtsfall, bei dem entweder

- i) Symptome der von dem Schadorganismus verursachten Krankheit festgestellt wurden und ein Schnell-Screeningtest gemäß Anhang II Abschnitt I Nummer 1 und Abschnitt II einen positiven Befund ergab oder
- ii) ein Screeningtest gemäß Anhang II Abschnitt I Nummer 2 und Abschnitt III einen positiven Befund ergab,

die zuständigen amtlichen Stellen des Mitgliedstaats in bezug auf ihre eigene Erzeugung

- a) die Verbringung von Pflanzen und Knollen aller beprobten Aufwüchse, Partien oder Sendungen verbieten, es sei denn, die Verbringung erfolgt unter ihrer Überwachung und es besteht nachweislich keine erkennbare Gefahr der Verschleppung des Schadorganismus;
- b) Schritte zur Ermittlung des Ausgangspunkts des vermuteten Befalls einleiten;
- c) weitere angemessene Vorkehrungen auf der Grundlage einer Risikoeinschätzung, insbesondere hinsichtlich der Erzeugung des aufgeführten Pflanzenmaterials und der Verbringung anderer als der unter Buchstabe a) genannten Partien von Pflanzkartoffeln, die am Ort der Probenahme gemäß Buchstabe a) erzeugt wurden, treffen, um eine Verschleppung des Schadorganismus zu verhindern.

(3) Bei einem Verdachtsfall, in dem die Gefahr der Kontamination des aufgeführten Pflanzenmaterials oder Oberflächenwassers aus einem oder in einen anderen Mitgliedstaat besteht, teilt der Mitgliedstaat, in dem der Verdacht gemeldet wurde, dem/den anderen betroffenen Mitgliedstaat(en) die Einzelheiten dieses Verdachts entsprechend der festgestellten Gefahr unverzüglich mit, und die betreffenden Mitgliedstaaten arbeiten in geeigneter Weise zusammen. Der/die auf diese Weise unterrichtete(n) Mitgliedstaat(en) ergreift (ergreifen) vorbeugende Maßnahmen gemäß Absatz 2 Buchstabe c) sowie gegebenenfalls weitere Maßnahmen gemäß Absätze 1 und 2.

(4) Nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG können festgelegt werden:

— die Maßnahmen gemäß Absatz 2 Buchstabe c).

Artikel 5

(1) Wird bei der amtlichen oder amtlich überwachten Laboruntersuchung, die im Falle von aufgeführtem Pflanzenmaterial nach dem maßgeblichen Verfahren des Anhangs II und in anderen Fällen nach einem anderen amtlich zugelassenen Verfahren durchgeführt wird, das Auftreten des Schadorganismus in einer nach dieser Richtlinie entnommenen Probe bestätigt, so müssen die zuständigen amtlichen Stellen eines Mitgliedstaates unter Berücksichtigung anerkannter wissenschaftlicher Grundsätze, der Biologie des Schadorganismus und der jeweiligen Produktions-, Vermarktungs- und Verarbeitungssysteme

- a) in bezug auf das aufgeführte Pflanzenmaterial
 - i) gemäß Anhang IV das Ausmaß und den Ausgangspunkt (die Ausgangspunkte) des Befalls ermitteln und weitere Untersuchungen gemäß Artikel 4 Absatz 1 zumindest an allen klonal verbundenen Pflanzkartoffelbeständen durchführen;

- ii) das aufgeführte Pflanzenmaterial, die beprobte Sendung und/oder Partie und die Maschinen, Fahrzeuge, Schiffe, Lagerräume oder Teile davon sowie sonstigen Gegenstände, einschließlich Verpackungsmaterial, die mit dem beprobten aufgeführten Pflanzenmaterial in Berührung gekommen sind, als befallen erklären; ebenfalls als befallen zu erklären sind gegebenenfalls die Felder, die Einheiten mit geschützter Pflanzenerzeugung und die Erzeugungsorte, auf denen das aufgeführte Pflanzenmaterial geerntet und von denen die Probe entnommen worden ist; für die Proben, die in der Vegetationsperiode entnommen wurden, sind die Felder, die Erzeugungsorte und gegebenenfalls die Einheiten mit geschützten Kulturen, von denen die Probe entnommen worden ist, als befallen zu erklären;
 - iii) gemäß Anhang V Nummer 1 das Ausmaß des wahrscheinlichen Befalls infolge der Berührung vor oder nach der Ernte, der Erzeugung, Bewässerung oder Beregnung oder der klonalen Verbindung mit dem als befallen erklärten Material ermitteln;
 - iv) auf der Grundlage der Befallserklärung gemäß Ziffer ii), des gemäß Ziffer iii) ermittelten Ausmaßes des wahrscheinlichen Befalls und der möglichen Verbreitung des Schadorganismus gemäß Anhang V Nummer 2 Ziffer i) eine Sicherheitszone abgrenzen;
- b) in bezug auf andere als unter Buchstabe a) angeführte Kulturen von Wirtspflanzen, durch die der Anbau des aufgeführten Pflanzenmaterials gefährdet werden könnte,
- i) eine Untersuchung gemäß Buchstabe a) Ziffer i) durchführen;
 - ii) die beprobten Wirtspflanzen des Schadorganismus als befallen erklären;
 - iii) gemäß Buchstabe a) Ziffer iii) bzw. iv) in bezug auf die Erzeugung des aufgeführten Pflanzenmaterials den wahrscheinlichen Befall ermitteln und eine Sicherheitszone abgrenzen;
- c) in bezug auf Oberflächenwasser (einschließlich Abwässern aus Anlagen zur Verarbeitung oder Verpackung des aufgeführten Pflanzenmaterials) und Wirtspflanzen der Begleitflora aus der Familie der Nachtschattengewächse, durch die bei Bewässerung, Beregnung oder Überflutung mit Oberflächenwasser die Erzeugung des aufgeführten Pflanzenmaterials gefährdet werden könnte,
- i) zu geeigneten Zeitpunkten anhand von Proben von Oberflächenwasser und gegebenenfalls Wirtspflanzen der Begleitflora aus der Familie der Nachtschattengewächse eine Untersuchung, einschließlich einer amtlichen Untersuchung, durchführen, um das Ausmaß des Befalls zu bestimmen;
 - ii) auf der Grundlage der Untersuchung gemäß Ziffer i) das beprobte Oberflächenwasser gegebenenfalls als befallen erklären;

- iii) auf der Grundlage der Befallserklärung gemäß Ziffer ii) und der möglichen Verbreitung des Schadorganismus gemäß Anhang V Nummer 1 und Nummer 2 Ziffer ii) den wahrscheinlichen Befall ermitteln und eine Sicherheitszone abgrenzen.

(2) Die Mitgliedstaaten unterrichten die anderen Mitgliedstaaten und die Kommission gemäß Anhang V Nummer 3 unverzüglich über jede Befallserklärung gemäß Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer ii) und Absatz 1 Buchstabe c) Ziffer ii) sowie über die Einzelheiten der Zonenabgrenzung gemäß Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer iv) und gegebenenfalls gemäß Absatz 1 Buchstabe c) Ziffer iii). Die Einzelheiten der Mitteilung nach diesem Absatz können dem Ausschuss vorgelegt werden.

Gleichzeitig legen die Mitgliedstaaten der Kommission die zusätzliche Mitteilung nach Anhang V Nummer 4 vor. Die Einzelheiten der Mitteilung nach diesem Unterabsatz werden unverzüglich den Mitgliedern des Ausschusses vorgelegt.

(3) Auf der Grundlage der Mitteilung gemäß Absatz 2 und der darin enthaltenen Einzelheiten führen andere darin genannte Mitgliedstaaten eine Untersuchung gemäß Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer i) und gegebenenfalls Absatz 1 Buchstabe c) Ziffer i) durch und treffen gegebenenfalls weitere Maßnahmen gemäß den Absätzen 1 und 2.

Artikel 6

(1) Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß das aufgeführte Pflanzenmaterial, das gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer ii) als befallen erklärt wurde, nicht angebaut werden darf und daß es unter Aufsicht und mit Genehmigung der zuständigen amtlichen Stellen einer Maßnahme gemäß Anhang VI Nummer 1 zugeführt wird, so daß nachweislich keine erkennbare Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus mehr besteht.

(2) Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß das aufgeführte Pflanzenmaterial, das gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer iii) und Buchstabe c) Ziffer iii) als wahrscheinlich befallen erklärt wurde, einschließlich aufgeführten Pflanzenmaterials, bei dem eine Gefährdung festgestellt wurde und das an Erzeugungsorten erzeugt wurde, die gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer iii) als wahrscheinlich befallen erklärt wurden, nicht angebaut werden darf, sondern unter Aufsicht der zuständigen amtlichen Stellen gemäß Anhang VI Nummer 2 einer geeigneten Verwendung oder Entsorgung zugeführt werden muß, so daß nachweislich keine erkennbare Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus mehr besteht.

(3) Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß Maschinen, Fahrzeuge, Schiffe, Lagerräume oder Teile davon sowie sonstige Gegenstände einschließlich Verpackungsmaterial, die gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer ii) als befallen oder gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a)

Ziffer iii) und Buchstabe c) Ziffer iii) als wahrscheinlich befallen erklärt wurden, entweder unschädlich beseitigt oder nach den in Anhang VI Nummer 3 aufgeführten geeigneten Verfahren entseucht werden. Nach der Entseuchung gelten diese Gegenstände nicht mehr als befallen.

(4) Unbeschadet der gemäß den Absätzen 1, 2 und 3 getroffenen Maßnahmen schreiben die Mitgliedstaaten vor, daß in der gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer iv) und Buchstabe c) Ziffer iii) abgegrenzten Sicherheitszone eine Reihe von Maßnahmen getroffen werden, die in Anhang VI Nummern 4.1 und 4.2 aufgeführt sind. Die Einzelheiten dieser Maßnahmen werden den anderen Mitgliedstaaten und der Kommission alljährlich mitgeteilt. Die Einzelheiten dieser Mitteilung können dem Ausschuß vorgelegt werden.

Artikel 7

(1) Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß Pflanzkartoffeln den Anforderungen der Richtlinie 77/93/EWG genügen und in direkter Linie von Kartoffelmaterial stammen müssen, das im Rahmen eines amtlich genehmigten Programms gewonnen und aufgrund von Untersuchungen, die entweder amtlich oder unter amtlicher Aufsicht nach dem maßgeblichen Verfahren des Anhangs II durchgeführt worden sind, als frei von dem Schadorganismus befunden wurde.

Diese Untersuchungen werden von den Mitgliedstaaten wie folgt durchgeführt:

- a) in Fällen, in denen der Schadorganismus in ihrer Pflanzkartoffelerzeugung entdeckt und bestätigt wurde,
 - i) in Form von Untersuchungen an den Vorstufen, einschließlich des klonalen Ausgangsmaterials und von systematischen Untersuchungen an Klonen von Basispflanzgut oder
 - ii) in Fällen, in denen nachweislich keine klonale Verbindung besteht, in Form von Untersuchungen an allen Klonen von Basispflanzgut oder den Vorstufen, einschließlich des klonalen Ausgangsmaterials, und
- b) in andern Fällen, entweder an jeder Pflanze des klonalen Ausgangsmaterials oder an repräsentativen Stichproben aus dem Basispflanzgut oder den Vorstufen.

(2) Nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG können erlassen werden:

- Durchführungsbestimmungen zu Absatz 1 Unterabsatz 2 Buchstabe a);
- Bestimmungen betreffend die repräsentativen Stichproben gemäß Absatz 1 Unterabsatz 2 Buchstabe b).

Artikel 8

Die Mitgliedstaaten verbieten die Haltung und das Arbeiten mit dem Schadorganismus.

Artikel 9

Unbeschadet der Richtlinie 77/93/EWG können die Mitgliedstaaten gemäß der Richtlinie 95/44/EG⁽¹⁾ für wissenschaftliche Untersuchungen und Versuche sowie für Züchtungsvorhaben Ausnahmen von den Maßnahmen nach Artikel 6 und 8 dieser Richtlinie zulassen.

Artikel 10

Die Mitgliedstaaten können für ihre eigene Erzeugung erforderlichenfalls zusätzliche oder strengere Maßnahmen zur Bekämpfung des Schadorganismus oder zur Verhinderung seiner Ausbreitung erlassen, sofern diese mit den Bestimmungen der Richtlinie 77/93/EWG im Einklang stehen.

Die Einzelheiten dieser Maßnahmen werden den übrigen Mitgliedstaaten und der Kommission mitgeteilt. Die Einzelheiten dieser Mitteilung können dem Ausschuß vorgelegt werden.

Artikel 11

Die infolge des wissenschaftlich-technischen Fortschritts notwendig werdenden Änderungen der Anhänge dieser Richtlinie werden nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG vorgenommen. Bei Verfahren gemäß Anhang II und Maßnahmen gemäß Anhang VI Nummern 4.1 und 4.2 dieser Richtlinie erarbeitet die Kommission einen Bericht über die Überprüfung dieser Verfahren und Maßnahmen auf der Grundlage der gewonnenen Erfahrungen und legt ihn dem Ausschuß vor dem 1. Januar 2002 vor.

Artikel 12

(1) Die Mitgliedstaaten erlassen die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften, um dieser Richtlinie bis zum 21. August 1999 nachzukommen. Sie setzen die Kommission unverzüglich davon in Kenntnis.

Wenn die Mitgliedstaaten diese Vorschriften erlassen, nehmen sie in diesen Vorschriften selbst oder durch einen Hinweis bei der amtlichen Veröffentlichung auf diese Richtlinie Bezug. Die Mitgliedstaaten regeln die Einzelheiten dieser Bezugnahme.

(2) Die Mitgliedstaaten teilen der Kommission unverzüglich die wichtigsten innerstaatlichen Rechtsvorschriften mit, die sie in dem unter diese Richtlinie fallenden Bereich erlassen. Die Kommission teilt diese Vorschriften den anderen Mitgliedstaaten mit.

⁽¹⁾ ABl. L 184 vom 3.8.1995, S. 34. Richtlinie zuletzt geändert durch die Richtlinie 97/46/EG der Kommission (ABl. L 204 vom 31.7.1997, S. 43).

Artikel 13

Geschehen zu Brüssel am 20. Juli 1998.

Diese Richtlinie tritt am Tag ihrer Veröffentlichung im
Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften in Kraft.

Artikel 14

Diese Richtlinie ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

*Im Namen des Rates**Der Präsident*

W. MOLTERER

ANHANG I

ABSCHNITT I

Liste der in Artikel 1 genannten Wirtspflanzen von *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

Pflanzen (einschließlich Knollen), außer Samen, von <i>Solanum tuberosum</i> L.	Kartoffel
Pflanzen, außer Früchten und Samen, von <i>Lycopersicon lycopersicum</i> (L.) Karsten ex Farw.	Tomate

ABSCHNITT II

Untersuchungen

1. Die amtlichen Untersuchungen gemäß Artikel 2 Absatz 2 Buchstabe a) richten sich nach der Biologie des Schadorganismus und den besonderen Produktionssystemen in den betroffenen Mitgliedstaaten und umfassen:
 - i) bei Kartoffeln
 - Besichtigung des Bestandes zu geeigneten Zeitpunkten und/oder Beprobung von Pflanz- und anderen Kartoffeln während der Vegetationsperiode oder in den Lagern. Diese Proben sind einer amtlichen oder amtlich überwachten Augenscheinprüfung zu unterziehen, bei der die Knollen aufgeschnitten werden;
 - und
 - bei Pflanzkartoffeln und gegebenenfalls bei anderen Kartoffeln amtliche oder amtlich überwachte Laboruntersuchung nach dem Verfahren des Anhangs II;
 - ii) bei Tomaten:
 - Besichtigung des Bestandes zumindest bei den Pflanzen, die zur Wiederanpflanzung für gewerbliche Zwecke bestimmt sind, zu geeigneten Zeitpunkten.
2. Die Mitteilung der in Artikel 2 Absatz 3 genannten amtlichen Untersuchungen enthält folgende Einzelheiten:
 - i) im Falle von Untersuchungen bei Kartoffeln:
 - geschätzte Gesamtanbaufläche in Hektar mit Pflanz- und anderen Kartoffeln;
 - Aufschlüsselung nach Pflanzkartoffeln (verschiedene Kategorien) und Speise- bzw. Wirtschaftskartoffeln, gegebenenfalls nach Regionen;
 - Anzahl und Zeitpunkt der Probenahmen für die Untersuchung;
 - Anzahl der Feldbesichtigungen;
 - Anzahl der Augenscheinprüfungen von Knollen (und Probenumfang);
 - ii) im Falle von Untersuchungen an den Beständen zumindest bei den Tomatenpflanzen, die zur Wiederanpflanzung für gewerbliche Zwecke bestimmt sind:
 - geschätzte Gesamtzahl der Pflanzen;
 - Anzahl der Augenscheinprüfungen;
 - iii) im Falle von Untersuchungen bei anderen Wirtspflanzen als Kartoffeln und Tomaten einschließlich Wirtspflanzen der Begleitflora aus der Familie der Nachtschattengewächse:
 - Arten;
 - Anzahl und Zeitpunkt der Probenahmen;
 - beprobte Fläche bzw. beprobtes Gewässer;
 - Analyseverfahren;
 - iv) im Falle von Untersuchungen von Wasser und Abwässern industrieller Verarbeitungs- oder Verpackungsanlagen:
 - Anzahl und Zeitpunkt der Probenahmen;
 - beprobte Fläche, beprobtes Gewässer bzw. beprobter Anlagenstandort;
 - Analyseverfahren.

ANHANG II

TESTVERFAHREN ZUR DIAGNOSE, ZUM NACHWEIS UND ZUR IDENTIFIZIERUNG VON
RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL.

ZWECK DES VERFAHRENS

In der vorliegenden Beschreibung werden verschiedene Vorgangsweisen erläutert für

- i) die Diagnose der Schleimkrankheit (Bakteriellen Braunfäule) bei Kartoffelknollen und der Bakteriellen Welke bei Kartoffel- und Tomatenpflanzen;
- ii) den Nachweis von *Ralstonia solanacearum* an Proben von Kartoffelknollen;
- iii) die Identifizierung von *Ralstonia solanacearum*.

In den Anlagen werden die Aufbereitung des Versuchsmaterials, d. h. Nährmedien, Puffer, Lösungen und Reagenzien, ausführlich erläutert.

INHALT

ABSCHNITT I:	Anwendung des Verfahrens	9
	1. Diagnose der Schleimkrankheit (Bakteriellen Braunfäule) bei Kartoffelknollen und der Bakteriellen Welke bei Kartoffel- und Tomatenpflanzen	9
	2. Nachweis und Identifizierung von <i>Ralstonia solanacearum</i> in Proben von Kartoffelknollen	11
ABSCHNITT II:	Diagnose der Schleimkrankheit (Bakteriellen Braunfäule) bei Kartoffelknollen und der Bakteriellen Welke bei Kartoffel- und Tomatenpflanzen	13
	1. Symptome	13
	2. Schnell-Screeningtest(s)	13
	3. Isolierungsverfahren	14
	4. Bestätigungstest(s)	14
ABSCHNITT III:	Nachweis und Identifizierung von <i>Ralstonia solanacearum</i> in Proben von Kartoffelknollen	17
	1. Vorbereitung der Probe für den Test	17
	2. Immunfluoreszenztest (IF-Test)	18
	3. Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)-Test	20
	4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR TM)-Test	20
	5. Selektivausstrichtest	22
	6. Bioassay-Test	23
	7. Anreicherungstests	23
	8. Pathogenitätstest	23
<i>Anlage 1</i>	Nährmedien für die Isolierung und Kultur von <i>Ralstonia solanacearum</i>	24
<i>Anlage 2</i>	Material für die Vorbereitung der Probe	25
<i>Anlage 3</i>	Material für den IF-Test	26
<i>Anlage 4</i>	Bestimmung des Kontaminationsgrades im IF-Test	27
<i>Anlage 5</i>	Material für den ELISA-Test	28
<i>Anlage 6</i>	Material für den PCR-Test	29
<i>Anlage 7</i>	Material für den Selektivausstrichtest	29
Bibliographie		30

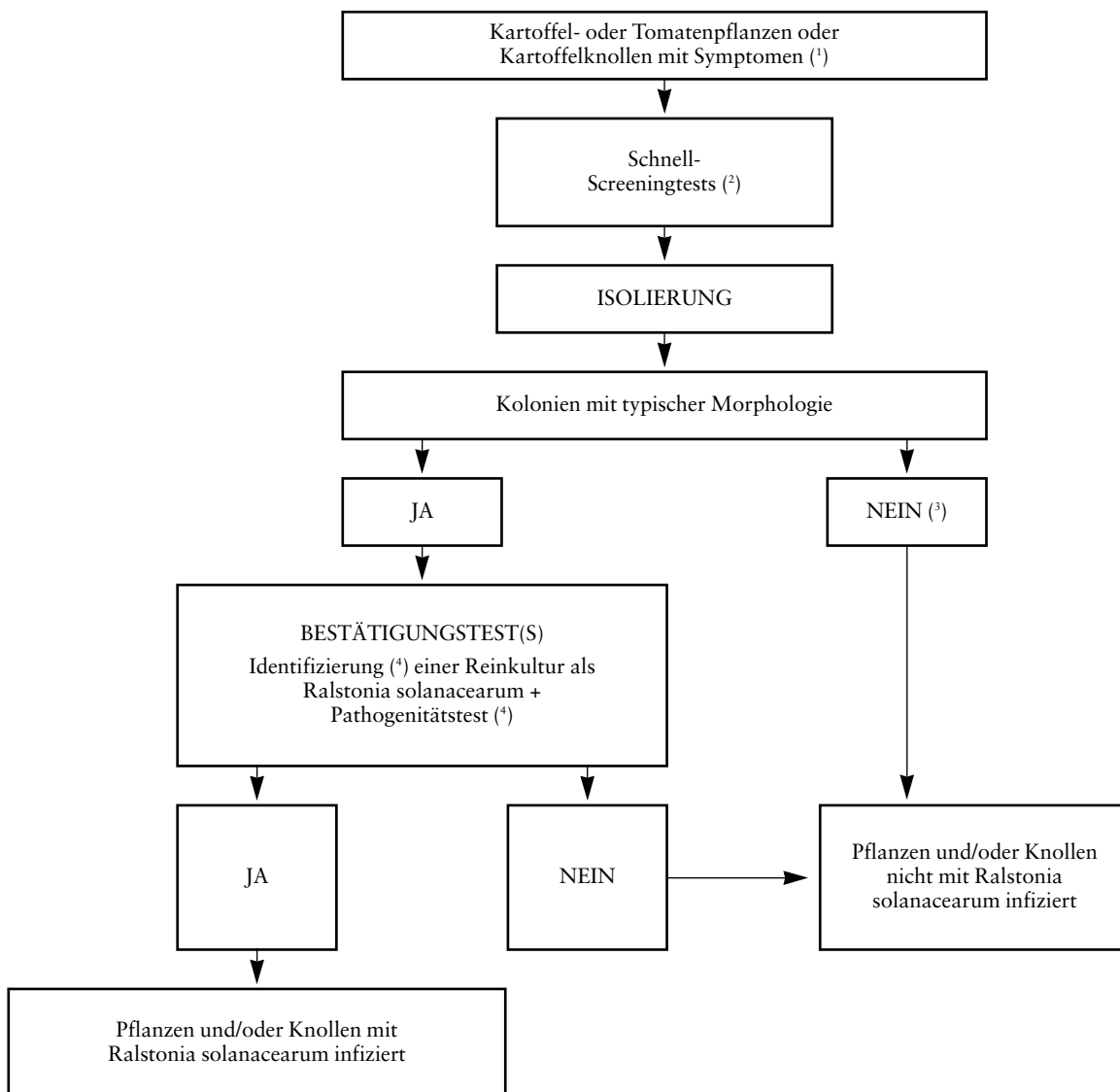
ABSCHNITT I

ANWENDUNG DES TESTVERFAHRENS

1. Diagnose der Schleimkrankheit (Bakteriellen Braunfäule) bei Kartoffelknollen und der Bakteriellen Welke bei Kartoffel- und Tomatenpflanzen

Das Verfahren ist geeignet für Kartoffelknollen, die typische Symptome von Schleimkrankheit (Bakterieller Braunfäule) aufweisen oder bei denen aufgrund der Symptomatik der Verdacht einer Infektion mit dieser Krankheit besteht, sowie für Kartoffel- und Tomatenpflanzen, die typische Symptome der Bakteriellen Welke aufweisen oder bei denen aufgrund der Symptomatik der Verdacht einer Infektion mit der Bakteriellen Welke besteht. Es umfaßt einen Schnell-Screeningtest, die Isolierung des Erregers aus infiziertem vaskulärem Gewebe auf Diagnosemedien und, bei positivem Befund, die Identifizierung der Kultur als *Ralstonia solanacearum*.

Flußdiagramm



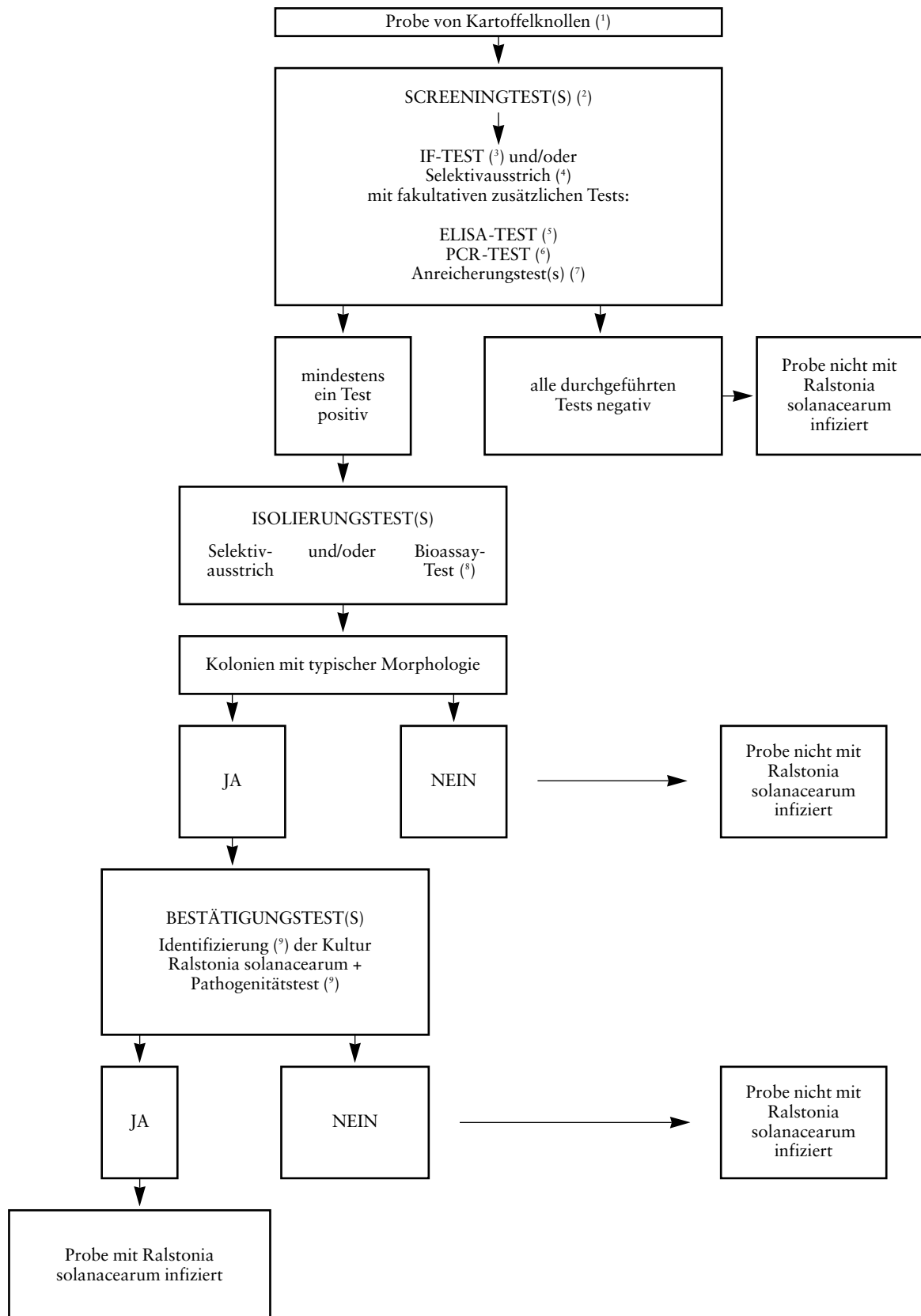
Anmerkungen zum Flußdiagramm:

- (¹) Beschreibung der Symptome in Abschnitt II.1.
- (²) Schnell-Screeningtest(s) erleichtert(n) die vorläufige Diagnose.
Geeignete Tests sind:
 - Gefäßbündeltest (Abschnitt II.2)
 - Prüfung auf Poly- β -hydroxybutyratgranula (Abschnitt II.2)
 - IF-Test (Abschnitt III.2)
 - ELISA-Test (Abschnitt III.3)
 - PCR-Test (Abschnitt III.4)
- (³) Obwohl die Isolierung des Erregers aus Pflanzenmaterial mit typischen Symptomen durch das Verdünnungsausstrichverfahren relativ einfach ist, kann das Anlegen von Kulturen in fortgeschrittenen Infektionsstadien scheitern. Saprophytische Bakterien, die auf erkranktem Gewebe wachsen, können den Erreger auf dem Isoliermedium überwachsen oder hemmen. Wenn der Isolierungstest negativ ausfällt, aber typische Krankheitssymptome vorliegen, ist die Isolierung zu wiederholen, vorzugsweise mit einem Selektivausstrichtest.
- (⁴) Eine Reinkultur von *Ralstonia solanacearum* wird durch mindestens einen der in Abschnitt II.4.1 genannten Tests in Kombination mit einem Pathogenitätstest (Abschnitt II.4.3) zuverlässig identifiziert. Die Bestimmung von Biovar und Rasse ist fakultativ, wird aber für jeden neuen Fall empfohlen.

2. Nachweis und Identifizierung von *Ralstonia solanacearum* in Proben von Kartoffelknollen

Das Verfahren ist zum Nachweis latenter Infektionen in Kartoffelknollen durch einen oder vorzugsweise mehrere Screeningtests geeignet, die bei positivem Befund durch die Isolierung des Erregers bestätigt werden. Im Fall der Isolierung typischer Kolonien erfolgt die Identifizierung einer Reinkultur als *Ralstonia solanacearum*.

Flußdiagramm



*Anmerkungen zum Flußdiagramm:***(1) Probengröße**

Die Standardprobengröße besteht aus 200 Knollen. Das Verfahren ist aber auch für Proben mit weniger als 200 Knollen geeignet.

(2) Screeningtest(s)

Ein einziger Test ist möglicherweise nicht sensitiv oder zuverlässig genug, um *Ralstonia solanacearum* in einer Probe nachzuweisen. Daher wird empfohlen, mehrere Tests durchzuführen, die möglichst auf unterschiedlichen biologischen Prinzipien beruhen.

(3) Immunfluoreszenztest

Der IF-Test (indirekte Methode) ist ein bewährter Screeningtest. Das ist ein Vorteil gegenüber anderen Tests, die noch nicht vollständig ausgereift oder validiert sind. Der Test wird für viele andere Quarantäne-Bakterien, z. B. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, angewendet. Bei den für diese Methode angegebenen Parametern handelt es sich um einen sensitiven Test (Nachweisgrenze von 10^3 – 10^4 Zellen je ml Kartoffelextraktpellet).

Ausschlaggebend für die Zuverlässigkeit des Testergebnisses ist die Qualität des Antiserums. Nur ein Antiserum mit einem hohen Titer (mindestens 2 000 für das Rohserum) ist akzeptabel, und alle Tests müssen bei dem Antiserumtiter oder einer Verdünnung unterhalb des Titers durchgeführt werden. Die indirekte Methode wird bevorzugt. Die direkte Methode kann angewandt werden, wenn Sensitivität und Spezifität des Tests denen der indirekten Methode gleichwertig sind.

Der IF-Test bietet den Vorteil der subjektiven Auswertung der Zellmorphologie und der Fluoreszenzintensität, die Aufschluß über die Reaktionsspezifität geben. Kreuzreaktionen mit serologisch verwandten, aus dem Boden stammenden oder der Knolle anhaftenden Bakterien mit gleicher Zellmorphologie von *Ralstonia solanacearum* sind häufig. Der IF-Test kann als einziger Screeningtest durchgeführt werden, doch wenn Kreuzreaktionen vermutet werden, sollte ein zweiter Test, der auf einem anderen biologischen Prinzip beruht, durchgeführt werden. In einem solchen Fall ist der Selektivausstrich am geeignetsten.

(4) Selektivausstrich

Mit dem bei diesem Verfahren verwendeten modifizierten SMSA-Medium und der Versuchsmethodik handelt es sich um einen sensitiven und selektiven Test für *Ralstonia solanacearum*. Das Ergebnis liegt 3–6 Tage nach der Zubereitung der Probe vor. Der Erreger liegt direkt in einer Kultur vor und läßt sich leicht identifizieren. Wenn das Potential des Tests voll ausgeschöpft werden soll, müssen die Nabelenden sorgfältig vorbereitet werden, um Sekundärbakterien aus den Knollen auszuschalten, die auf dem Medium mit *Ralstonia solanacearum* konkurrieren und die Entwicklung des Erregers beeinflussen könnten. Es ist möglich, daß einige Stämme schlecht wachsen, da die Bestandteile des Mediums auch einen Einfluß auf die Zielorganismen haben können. Sorgfalt ist auch gefordert bei der Unterscheidung von *Ralstonia solanacearum* von anderen Bakterien, die sich auf dem Medium entwickeln könnten. Der Selektivausstrich kann als einziger Screeningtest durchgeführt werden, doch bei einem negativen Testergebnis, das wegen einer Hemmung von *Ralstonia solanacearum* durch andere Bakterien in dem Medium vermutet wird, ist ein zweiter Screeningtest durchzuführen. Am besten geeignet ist in solchen Fällen der IF-Test.

(5) ELISA-Test

Der ELISA-Test ist generell weniger sensitiv als der IF-Test (Nachweisgrenze von 10^4 – 10^5 Zellen je ml Kartoffelextraktpellet). Er ist preiswert und schnell, führt im allgemeinen aber eher zu falsch positiven Ergebnissen (Kreuzreaktionen) und zu falsch negativen Ergebnissen (Hemmung durch Phenolmoleküle im Kartoffelextrakt). Die Anforderungen an die Antiserumspezifität sind außerordentlich hoch. Der ELISA-Test kann nicht als einziger Screeningtest durchgeführt werden.

(6) PCR-Test

Der PCR-Test ist potentiell eine sehr sensitive Nachweisverfahren, obwohl der Test leicht durch Pflanzen- oder Knollenextraktbestandteile behindert werden kann, die zu falsch negativen Ergebnissen führen. Einige Kartoffelsorten enthalten mehr Inhibitoren als andere. Daher müssen diese Inhibitoren beseitigt werden. Eine Möglichkeit ist die Verdünnung, doch dabei werden die Populationen von *Ralstonia solanacearum* ebenfalls verdünnt. In allen Phasen der Proben- und Testvorbereitung muß sehr sorgfältig gearbeitet werden, um eine Kontamination, die zu falsch positiven Ergebnissen führen würde, zu vermeiden. Falsch positive Ergebnisse können auch durch homologe Sequenzen anderer Organismen auftreten. Daher kann der direkte PCR-Test nicht als einziger Screeningtest verwendet werden.

(7) Anreicherungstest

Die Bebrütung von Kartoffelextraktpelletproben in einer semiselektiven Bouillon, wie z. B. modifizierte SMSA-Bouillon, ermöglicht die Vermehrung von *Ralstonia solanacearum*. Noch wichtiger ist vielleicht, daß auf diese Weise auch potentielle Inhibitoren der ELISA- oder PCR-Tests verdünnt werden. *Ralstonia solanacearum* in Anreicherungsbouillon kann also durch IF, ELISA oder PCR nachgewiesen werden. Direktausstriche von den angereicherten Bouillons werden nicht empfohlen. Diese Anreicherungsmethoden wurden nicht gründlich genug erprobt und getestet. Sie wurden hier nur wegen ihres hohen Potentials aufgenommen. Da aber noch relativ wenig Erfahrungen mit ihnen vorliegen, können sie nicht als einzige Nachweismethoden verwendet werden.

(8) Bioassay-Test

Dieser Test wird für die selektive Anreicherung von *Ralstonia solanacearum* in Kartoffelextraktpellets in Wirtspflanzen verwendet und kann an Tomatenpflanzen oder Eierfrüchten durchgeführt werden. Er erfordert optimale Inkubationsbedingungen gemäß den Angaben dieser Methode. Bakterien, die *Ralstonia solanacearum* auf dem SMSA-Medium hemmen, werden diesen Test höchstwahrscheinlich nicht beeinflussen.

(9) Bestätigungstest(s)

Eine Reinkultur von *Ralstonia solanacearum* wird zuverlässig identifiziert durch mindestens einen der in Abschnitt II.4.1 genannten Tests in Kombination mit einem Pathogenitätstest (Abschnitt II.4.3). Die Stammcharakterisierung ist fakultativ, wird aber für jeden neuen Fall empfohlen.

ABSCHNITT II

DIAGNOSE DER SCHLEIMKRANKHEIT (BAKTERIELLEN BRAUNFÄULE) BEI KARTOFFELKNOLLEN UND DER BAKTERIELLEN WELKE BEI KARTOFFEL- UND TOMATENPFLANZEN

1 Symptome

1.1 Symptome bei der Kartoffel

Die *Kartoffelpflanze*. In der frühen Phase der Infektion welken die Blätter an der Spitze der Pflanze bei hohen Temperaturen während des Tages und regenerieren nachts. Die Welke wird schnell irreversibel und führt zum Absterben der Pflanze. Das vaskuläre Gewebe in quer durchgeschnittenen Stengeln verwelkter Pflanzen kann braun werden, und aus der Schnittfläche tritt ein milchiges Exsudat aus oder kann leicht herausgedrückt werden. Wird ein durchgeschnittener Stengel senkrecht ins Wasser gehalten, treten aus den Gefäßbündeln Schleimfäden aus.

Die *Kartoffelknolle*. Die Kartoffelknollen sind am Nabelende quer durchzuschneiden. In der frühen Phase der Infektion zeigt sich eine glasig gelbe bis hellbraune Verfärbung des Gefäßbündelringes, aus dem nach einigen Minuten spontan oder bei Ausübung von leichtem Druck mit dem Daumen auf die Schale in der Nähe der Schnittfläche ein blasses, cremefarbiges Exsudat austritt. Später wird die Verfärbung deutlich braun, und die Nekrose kann sich bis ins parenchymatische Gewebe erstrecken. In fortgeschrittenen Stadien breitet sich die Infektion von den Nabelenden und den Augen aus, was zu rötlich-braunen, leicht eingesunkenen Läsionen auf der Schale führt. Aus ihnen kann Bakterien Schleim austreten, an dem Bodenpartikel haften bleiben.

1.2 Symptome bei der Tomate

Die *Tomatenpflanze*. Das erste sichtbare Symptom ist das schwammige Aussehen der jüngsten Blätter. Unter für den Erreger günstigen Bedingungen (Bodentemperatur etwa 25°C bei gesättigter Feuchtigkeit) wird eine Seite der Pflanze oder die gesamte Pflanze innerhalb weniger Tage von Epinastie und Welke befallen, die zum völligen Absterben der Pflanze führen. Unter weniger günstigen Bedingungen (Bodentemperatur unter 21°C) kann sich am Stengel eine große Zahl von Nebentrieben bilden. Am Stengel läßt sich ein schleimiger Strang beobachten, der sichtbares Zeichen der Nekrose des vaskulären Systems ist. Wird der Stengel quer durchgeschnitten, tritt aus dem braun verfärbten vaskulären Gewebe des Stengels tropfenweise ein weißer oder gelblicher Bakterien Schleim aus.

2 Schnell-Screeningtests

Schnell-Screeningtests ermöglichen die vorläufige Diagnose. Einen oder mehrere der nachfolgenden Tests verwenden:

Gefäßbündeltest

Ob in welchen Kartoffel- oder Tomatenstengeln *Ralstonia solanacearum* vorhanden sind, kann mit folgendem leichten Test festgestellt werden:

Stengel kurz über dem Boden abschneiden und die Schnittfläche in ein Becherglas mit Wasser halten. Kurz danach treten spontan Bakterien Schleimfäden aus den Gefäßbündeln aus. Kein anderes Bakterium, das Gefäßinfektionen bei Kartoffel- oder Tomatenpflanzen verursacht, weist dieses Phänomen auf.

Nachweis von Poly- β -hydroxybutyrat-Granula (PHB)

Die PHB-Granula in den Zellen von *Ralstonia solanacearum* werden durch Anfärbung mit Nilblau A oder Sudanschwarz B sichtbar gemacht.

Entweder einen Ausstrich des Exsudats oder des suspendierten Gewebes auf einem Objektträger oder einen Ausstrich von einer 48stündigen Kultur auf YPGA (Anlage 1) zubereiten. Ausstriche für positive Kontrollen eines Biovar-2-Rasse-3-Stammes und bei Bedarf für eine negative Kontrolle eines heterologen Stammes zubereiten und trocknen lassen. Die Unterseite des Objektträgers mehrmals schnell durch eine Flamme führen, bis der Ausstrich fixiert ist.

Nilblautest

1. Fixierten Ausstrich mit 1%iger wäßriger Lösung von Nilblau A überspülen. 10 Minuten bei 55°C inkubieren.
2. Färbelösung ablaufen lassen. Kurz unter schwach fließendem Leitungswasser abwaschen. Überschüssiges Wasser mit Papiertüchern aufnehmen.
3. Ausstrich mit 8%iger wäßriger Essigsäure überspülen. 1 Minute bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Unter schwach fließendem Leitungswasser abwaschen. Mit Papiertüchern trockenlöscheln.
5. Mit einem Tropfen Wasser wieder befeuchten. Deckglas auflegen.
6. Gefärbten Ausstrich unter einem Epifluoreszenzmikroskop bei 450 nm unter Ölimmersion und bei einer Vergrößerung von 1 000 betrachten.

Auf kräftig orangefarbene Fluoreszenz von PHB-Granula achten. Auch bei Normallicht betrachten, um sicherzustellen, daß die Granula intrazellulär sind und die Zellmorphologie typisch für *Ralstonia solanacearum* ist.

Sudanschwarztest

1. Fixierten Ausstrich mit 0,3%iger Sudanschwarz-B-Lösung in 70%igem Ethanol überspülen. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
2. Färbelösung ablaufen lassen. Kurz unter Leitungswasser abwaschen. Überschüssiges Wasser mit Papiertüchern aufnehmen.
3. Ausstrich kurz in Xylol tauchen. Mit Papiertüchern trockenlöschen.
Achtung! Xylol ist gesundheitsschädlich. Im Abzug arbeiten.
4. Ausstrich mit 0,5%igem (w/v) wäßrigem Safranin überspülen und 10 Sekunden bei Raumtemperatur belassen.
Achtung! Safranin ist gesundheitsschädlich. Im Abzug arbeiten.
5. Unter schwach fließendem Leitungswasser abwaschen. Mit Papiertüchern trockenlöschen. Deckglas auflegen.
6. Gefärbten Ausstrich im Durchlichtmikroskop unter Ölimmersion bei einer Vergrößerung von 1 000 betrachten.
PHB-Granula in Zellen von *Ralstonia solanacearum* sind blau-schwarz gefärbt. Die Zellwände sind rosa gefärbt.

Andere Tests

Als andere Screeningtests eignen sich der IF-Test (Abschnitt III.2), der ELISA-Test (Abschnitt III.3) und der PCR-Test (Abschnitt III.4).

3 Isolierungsverfahren

- 3.1 Das Exsudat oder Bereiche verfärbten Gewebes vom Gefäßbündelring in der Kartoffelknolle oder von den Gefäßsträngen im Stengel der Kartoffel- oder Tomatenpflanze entfernen.
In einem geringen Volumen sterilen, destillierten Wassers oder 50 mM Phosphat-Puffer suspendieren und 5 bis 10 Minuten stehenlassen.
- 3.2 Mindestens zwei Dezimalverdünnungen, 1/10 und 1/100, der Suspension herstellen oder bei Bedarf mehr.
- 3.3 Ein Standardvolumen der Suspension und der Verdünnungen auf ein Universalnährmedium NA, YPGA und SPA (Anlage 1) und/oder auf das Kelman's Tetrazolium-Medium (Anlage 1) und/oder auf das selektive SMSA-Medium (Anlage 7) überführen. Mit einem geeigneten Verdünnungsausstrichverfahren ausspateln oder austreichen. Es kann günstig sein, einen Satz separater Platten mit einer verdünnten Zellsuspensionskultur eines Biovar-2-Rasse-3-Stamms von *Ralstonia solanacearum* als positive Kontrolle anzulegen.
- 3.4 Die Platten 3 Tage bei 28 °C bebrüten. Bei langsamem Wachstum kann bis zu 6 Tagen bebrütet werden, wobei aber die Kolonien auf SMSA-Medium atypisch werden und absterben können.
Auf den Universalnährmedien bilden virulente Isolate von *Ralstonia solanacearum* perlweiße, flache, unregelmäßige und flüssige Kolonien, oft mit charakteristischen Wirbeln.
Auf Kelman's Tetrazolium-Medium bilden virulente Isolate von *Ralstonia solanacearum* typische cremefarbene, flache, unregelmäßige, flüssige Kolonien mit blutrot gefärbtem Zentrum. Avirulente Formen von *Ralstonia solanacearum* bilden dagegen butterartige, dunkelrote Kolonien.
Virulente Isolate von *Ralstonia solanacearum* bilden auf dem SMSA-Medium milchig-weiße, flache, unregelmäßige und flüssige Kolonien mit blutrot gefärbtem Zentrum.
Avirulente Formen von *Ralstonia solanacearum* bilden weniger flüssige Kolonien, die vollständig rosa bis rot auf dem SMSA-Medium erscheinen.
- 3.5 Kolonien mit charakteristischer Morphologie durch Subkultur auf einem Universalnährmedium reinigen. Regelmäßiges Subkultivieren, das zum Verlust der Virulenz führen könnte, ist zu vermeiden.

4 Bestätigungstest(s)

4.1 Identifizierung von *Ralstonia solanacearum*

Identifizierte Reinkulturen von *Ralstonia solanacearum* durch zumindest eines der nachfolgenden Verfahren:

Nähr- und enzymatische Tests

Hinweis: In jeden Test geeignete Kontrollstämme einbeziehen.

Folgende phänotypische Eigenschaften von *Ralstonia solanacearum* sind universell vorhanden oder abwesend:

Fluoreszierende Pigmente	-
PHB-Einschlüsse	+
Oxidations-/Fermentations-Test	O +/F-
Katalase	+
Kovacs' Oxidase	+
Nitratreduktion	+
<hr/>	
Citratverwertung	+
Wachstum bei 40 °C	-
<hr/>	
Wachstum in 1 % NaCl	+
Wachstum in 2 % NaCl	-
Arginin-Dihydrolase	-
Gelatineverflüssigung	-
Stärkehydrolyse	-
Aesculinhydrolyse	-
Levanproduktion	-

Medien und Methoden sind Lelliott & Stead (1987) zu entnehmen.

IF-Test

Eine Suspension von 10^6 Zellen je ml von der Kultur und dem(n) Kontrollstamm(stämmen) zubereiten. Eine Reihe von Zweifachverdünnungen des Antiserums zubereiten. Das IF-Verfahren anwenden (Abschnitt III.2). Der IF-Titer der Kultur muß dem der positiven Kontrolle entsprechen.

ELISA-Test

Eine Suspension von $> 10^6$ Zellen je ml von der Kultur und von dem(n) Kontrollstamm(stämmen) zubereiten. Das ELISA-Verfahren anwenden (Abschnitt III.3). Der Extinktionswert der Kultur muß dem der positiven Kontrolle entsprechen.

PCR-Test

Eine Suspension von 10^6 Zellen je ml von der Kultur und von dem(n) Kontrollstamm(stämmen) zubereiten. Das PCR-Verfahren anwenden (Abschnitt III.4). Das PCR-Produkt der Kultur muß die gleiche Größe und das gleiche Restriktionsenzymanalyse (REA)-Muster haben wie das der positiven Kontrolle.

Fluoreszenz-in-Hybridisierung (FISH)

Eine Suspension von 10^6 Zellen je ml von der Kultur und von dem(n) Kontrollstamm(stämmen) zubereiten. Das FISH-Verfahren (van Beuningen et al., 1995) mit dem PCR-Primer OLI-1 (Seal et al., 1993) anwenden. Die Kultur muß die gleiche Reaktion aufweisen wie die positive Kontrolle.

Proteinprofil

Denaturierte Proteine ganzer Zellen werden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) getrennt (Stead, 1992a).

Bestimmung des Fettsäureprofils (FAP)

Die Kultur und eine positive Kontrolle 48 Stunden bei 28 °C auf Trypticase-Soja-Agar wachsen lassen und das FAP-Verfahren anwenden (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead, 1992b). Das Profil der Kultur muß mit dem der positiven Kontrolle identisch sein. Charakteristische Fettsäuren unter den angegebenen Bedingungen sind 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH und 18:1 2OH.

4.2 Stammcharakterisierung

Die Stammcharakterisierung ist fakultativ, wird aber für jeden neuen Fall unter Anwendung von zumindest einem der nachfolgenden Tests empfohlen.

Biovarbestimmung

Ralstonia solanacearum wird nach der Fähigkeit, aus drei Zuckeralkoholen und drei Zuckern Säuren zu bilden, in Biovare eingeteilt (Hayward, 1964, 1994):

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Verwertung von:					
— Maltose	-	+	+	-	+
— Laktose	-	+	+	-	+
— Cellobiose	-	+	+	-	+
— Mannit	-	-	+	+	+
— Sorbit	-	-	+	+	-
— Dulcitol	-	-	+	+	-

Durch zusätzliche Tests kann Biovar 2 in Subphänotypen unterschieden werden (Hayward, 1994):

	Biovar 2	Biovar 2-A	Biovar 2-T
Verwertung von Trehalose	-	+	+
Verwertung von Inositol	+	-	+
Verwertung von D-Ribose	-	-	+
Pektolytische Aktivität	gering	gering	hoch

Rassenbestimmung

Die Rasse (Buddenhagen et al., 1962) wird auf der Grundlage eines Pathogenitätstests an Tomatenpflanzen oder Eierfrüchten und an Tabakpflanzen sowie durch einen Hypersensitivitätsreaktionstest (HR) an Tabakblättern (Lozano und Sequeira, 1970) bestimmt:

	Rasse(*)		
	1	2	3
Reaktionen bei:			
— Tomatenpflanzen/Eierfrüchten	Welke	keine Reaktion	Welke
— Tabakpflanzen	Welke	keine Reaktion	keine Reaktion
— Tabakblättern	Nekrose (48 Std.) und Welke (7—8 Tage)	HR (12—24 Std.)	Chlorose (2—8 Tage)

(*) Rasse 4 (pathogen an Ingwer und einigen anderen Wirten) und Rasse 5 (nur pathogen an Maulbeere) sind nicht berücksichtigt.

Die Bestimmung der Rasse mit dem Pathogenitätstest oder dem Hypersensitivitätstest an Tabak muß nicht sehr zuverlässig sein und kann anhand der Bestimmung des Biovars und des ursprünglichen Wirtes erfolgen.

Die Kultur kann weiter charakterisiert werden durch:

Genetischen Fingerabdruck

Die molekulare Unterscheidung von Stämmen des *Ralstonia-solanacearum*-Komplexes kann erfolgen durch:

RFLP-Analyse (Cook et al., 1989).

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

4.3

Pathogenitätstest

Dieser Test dient zur Bestätigung der Diagnose von *Ralstonia solanacearum* und der Bestätigung der Virulenz der als *Ralstonia solanacearum* identifizierten Kulturen.

Aus der Kultur und einem positiven Kontrollstamm ein Inokulum mit einer Zelldichte von 10^6 /ml zubereiten. 5—10 Tomatenpflanzen oder Eierfrüchte vorzugsweise im Dreiblattstadium oder älter beimpfen (Abschnitt III. 6). Bis zu zwei Wochen bei Temperaturen von 22°C—28°C und hoher relativer Luftfeuchtigkeit kultivieren und täglich wässern. Auf Anzeichen von Welke und/oder Epinastie, Chlorosen, Stauchungen achten.

Von Pflanzen mit charakteristischen Symptomen wie folgt isolieren:

— ein Stengelstück 2 cm oberhalb der Inokulationsstelle entnehmen;

— in wenig sterilem destilliertem Wasser oder 50mM Phosphatpuffer suspendieren, zerkleinern und ausplattieren, inkubieren, anschließend auf typische Kolonien von *Ralstonia solanacearum* bonitieren.

ABSCHNITT III

NACHWEIS UND IDENTIFIZIERUNG VON RALSTONIA SOLANACEARUM IN PROBEN VON KARTOFFELKNOLLEN

Hinweis: Die Standardprobengröße besteht aus 200 Knollen. Das Verfahren ist aber auch für Proben mit weniger als 200 Knollen geeignet.

1 Vorbereitung der Probe für den Test

Hinweis: Das mit diesem Verfahren gewonnene Kartoffelextraktpellet kann auch für den Nachweis von *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* verwendet werden.

Optionen vor dem Test, falls als zweckmäßig angesehen:

- i) Die Probe bis zu 2 Wochen bei 25—30°C inkubieren, um die Vermehrung geringer *Ralstonia-solanacearum*-Populationen zu fördern;
- ii) die Knollen unter fließendem Wasser mit geeigneten Desinfektions- und Waschmitteln waschen. Die Knollen an der Luft trocknen.

1.1 Mit einem sauberen und desinfizierten Skalpell oder Gemüsemesser die Schale am Nabelende der Knolle entfernen, so daß das vaskuläre Gewebe sichtbar wird. Am Nabelende jeder Knolle sorgfältig ein kleines kegelförmiges Stück (3—5 mm Durchmesser) vaskulären Gewebes ausschneiden. Dabei ist darauf zu achten, daß möglichst wenig nichtvaskuläres Gewebe erfaßt wird. An jeder Knolle der Probe durchführen.

Hinweis: In dieser Phase können die Knollen visuell untersucht werden (Abschnitt II.1). Knollen mit Symptomen oder starker Fäule sind auszusondern und gesondert zu prüfen (Abschnitt II).

1.2 Die Nabelenden in einen geschlossenen Behälter geben. Die Nabelenden sollten sofort verarbeitet werden. Ist dies nicht möglich, sollten sie nicht länger als 24 Stunden oder bei 4°C nicht länger als 72 Stunden aufbewahrt werden.

1.3 Die Nabelenden sind nach einem der folgenden Verfahren zu verarbeiten:

- i) Die Nabelenden in einen geeigneten Behälter geben.
Ausreichendes Volumen Mazerationspuffer (Anlage 2) zugeben, um die Nabelenden zu bedecken.
Die Stücke in einem Waring-Blender oder Ultra-Turrax gerade bis zur vollständigen Homogenisierung zerkleinern. Eine zu starke Homogenisierung sollte vermieden werden.
Das Mazerat 15—30 Minuten ziehen lassen.
- ii) Die Nabelenden in einen geeigneten Behälter geben.
Ausreichendes Volumen Mazerationspuffer zugeben, um die Nabelenden zu bedecken.
Den Behälter auf eine Schüttelmaschine stellen.
Bei 50—100 rpm 4 Stunden bei 20°C—22°C oder 16—24 Stunden bei 4°C inkubieren.
- iii) Die Nabelenden in einen festen Einmalmazerationsbeutel (z. B. Stomacher-Beutel, Abmessungen 105 mm × 150 mm, strahlungssteril) geben.
Die Nabelenden mit einem geeigneten Werkzeug, z. B. einem Hammer, bis zur vollständigen Homogenisierung zerkleinern.
Ausreichendes Volumen des Mazerationspuffers zugeben, um die Nabelenden zu bedecken.
Das Mazerat 15—30 Minuten absetzen lassen.

1.4 Die Bakterien sind nach einem der folgenden Verfahren aus den aufgearbeiteten Nabelenden zu extrahieren:

- i) Das Mazerat vorsichtig in Zentrifugenröhrchen abgießen, Rückstand dabei im Behälter oder Beutel lassen. Wenn das dekantierte Mazerat trüb ist: bei einer Temperatur unter 10°C und nicht mehr als 180 g 10 Minuten zentrifugieren.
Dekantiertes Mazerat oder Überstand von der ersten Zentrifugierung 15 Minuten lang bei 7 000 g oder 10 Minuten lang bei 10 000 g und bei einer Temperatur unter 10°C zentrifugieren.
Den Überstand verwerfen, ohne das Pellet aufzurühren.
- ii) Das Mazerat durch ein Filtrationssystem mit einer Porenweite von 40—100 µm filtrieren. Dabei ist die Filtration mit einer Vakuumpumpe zu verstärken.
Das Filtrat in einem Zentrifugenröhrchen auffangen.
Das Filtrat mit Mazerationspuffer waschen.
Das Filtrat 15 Minuten lang bei 7 000 g oder 10 Minuten lang bei 10 000 g und bei einer Temperatur unter 10°C zentrifugieren.
Den Überstand verwerfen, ohne das Pellet aufzurühren.

- 1.5 Das Pellet in 1 ml Pelletpuffer (Anlage 2) suspendieren.
In zwei gleiche Teile und jeden Teil in ein Mikroröhrchen füllen.
Ein Mikroröhrchen wird für den Test verwendet. Der Rest dieses Extrakts wird während des Tests bei 4°C aufbewahrt.
Dem anderen Mikroröhrchen 10—25 % (v/v) steriles Glycerin zugeben. Vortexen. Bei -18°C (Wochen) oder -70°C (Monate) lagern.
- 2 **IF-Test**
- Antiserum für *Ralstonia solanacearum*, vorzugsweise Rasse 3/Biovar 2, verwenden. Den Titer an einer Suspension von 10^6 Zellen je ml eines homologen Stammes von *Ralstonia solanacearum* mit einer geeigneten Verdünnung des Fluoreszein-isothiocyanat-Konjugats (FITC) nach den Empfehlungen des Herstellers bestimmen. Das Rohserum sollte einen IF-Titer von mindestens 1 : 2 000 haben.
- Multiwell-Objektträger vorzugsweise mit 10 Feldern von mindestens 6 mm Durchmesser verwenden.
- Auf jeden Objektträger eine FITC-Konjugatkontrolle auftragen. Bei einer großen Anzahl von Objektträgern kann auf die PBS-Kontrolle verzichtet werden. Der Test sollte allerdings mit einer PBS-Kontrolle wiederholt werden, wenn die FITC-Kontrolle eine positive Zelle aufweist.
- Separate Positivkontroll-Träger mit einer Suspension von 10^6 Zellen je ml von einem Stamm der entsprechenden Rasse/Biovar von *Ralstonia solanacearum* vorbereiten. In jeder Testreihe ist ein Objektträger zu verwenden.
- 2.1 Die Objektträger sind nach einem der folgenden Verfahren vorzubereiten:
- i) Pellets mit relativ wenig Stärke:
Ein abgemessenes Standardvolumen (15 µl reichen für ein Feld von 6 mm Durchmesser aus — bei größeren Feldern ein entsprechend größeres Volumen verwenden) des resuspendierten Pellets auf eine Reihe von Feldern pipettieren. Die verbleibende Reihe kann wie in Abbildung 1 dargestellt für ein Duplikat oder für eine zweite Probe verwendet werden.
- ii) Andere Pellets:
Dezimalverdünnungen, d. h. 1/10, 1/100 und 1/1 000, des resuspendierten Pellets in Pelletpuffer herstellen. Ein abgeschlossenes Standardvolumen (15 µl reichen für ein Feld von 6 mm Durchmesser aus — bei größeren Feldern ein entsprechendes größeres Volumen verwenden) des resuspendierten Pellets und jeder Verdünnung auf eine Reihe von Feldern pipettieren. Die verbleibende Reihe kann wie in Abbildung 2 dargestellt für ein Duplikat oder für eine zweite Probe verwendet werden.
- 2.2 Tropfen trocknen lassen. Bakterienzellen entweder durch Erhitzen, Abflammen oder mit 95%igem Ethanol am Objektträger fixieren.
- 2.3 **IF-Verfahren**
- i) Bei Objektträgervorbereitung nach 2.1.i):
Einen Satz Zweifachverdünnungen des Antiserums in IF-Puffer (Anlage 3) zubereiten:
1/4 des Titers (T/4), 1/2 des Titers (T/2), Titer (T) und das Doppelte des Titers (2T).
- ii) Bei Objektträgervorbereitung nach 2.1.ii):
Zubereitung der Arbeitsverdünnung des Antiserums in IF-Puffer. Die Arbeitsverdünnung ist die Verdünnung des Antiserums mit optimaler Spezifität und hat normalerweise die Hälfte des Titers.

Abbildung 1

Vorbereitung des Objektträgers nach 2.1.i) und 2.3.i)

Standardverdünnung des resuspendierten Pellets

 $T = \text{Titer}$

	FITC	T/4	T/2	T	2T	⇒ Zweifachverdünnungen des Antiserums
Probe 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplikat von Probe 1 oder Probe 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Abbildung 2

Vorbereitung des Objektträgers nach 2.1.ii) und 2.3.ii)

	FITC		Arbeitsverdünnung des Antiserums			⇒ Dezimalverdünnungen des resuspendierten Pellets
	Unverdünnt	Unverdünnt	1/10	1/100	1/1 000	
Probe 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplikat von Probe 1 oder Probe 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

- 2.3.1 Die Objektträger auf feuchten Papiertüchern auslegen.
Alle Testfelder mit Antiserumverdünnung(en) bedecken. Auf die FITC-Fehler PBS auftragen. Das auf die Felder aufgetragene Antiserumvolumen muß dem Volumen des aufgetragenen Extraktes entsprechen.
- 2.3.2 Abgedeckt 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
- 2.3.3 Die Antiserumtropfen vom Objektträger vorsichtig abschütteln, und die Objektträger sorgfältig mit IF-Puffer spülen. 5 Minuten mit IF-Puffer-Tween und anschließend 5 Minuten in IF-Puffer waschen (Anlage 3).
Überschüssige Feuchtigkeit sorgfältig entfernen.
- 2.3.4 Die Objektträger auf feuchten Papiertüchern auslegen.
Die Testfelder und das FITC-Feld mit der Verdünnung des zur Bestimmung des Titers verwendeten FITC-Konjugats bedecken. Das auf die Felder aufgetragene Konjugatvolumen muß dem Volumen des aufgetragenen Antiserums entsprechen.
- 2.3.5 Abgedeckt 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
- 2.3.6 Die Konjugattropfen vorsichtig vom Objektträger abschütteln. Wie unter 2.3.3 angegeben waschen und spülen.
Überschüssige Feuchtigkeit sorgfältig entfernen.
- 2.3.7 Auf jedes Feld 5—10 µl 0,1 M phosphatgepuffertes Glycerin (Anlage 3) oder eine ähnliche Deckflüssigkeit auftragen und Deckglas auflegen.
- 2.4 Auswertung des IF-Tests
Objektträger unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop mit Filtern, die für FITC-Anregung geeignet sind, unter Ölimmersion bei einer Vergrößerung von 500—1 000 untersuchen. Jedes Feld in zwei rechtwinklig zueinanderstehenden Durchmessern sowie entlang des Feldrandes mikroskopisch untersuchen.
Zunächst den Objektträger mit der Positivkontrolle prüfen. Die Zellen müssen stark fluoreszieren und vollständig gefärbt sein. *Hinweis: Bei abweichender Färbung zum Normalzustand ist der Test zu wiederholen.*
Auswertung der zu untersuchenden Objektträger. Zunächst auf Abwesenheit von fluoreszierenden Zellen in den FITC-Kontrollfeldern prüfen. Fluoreszierende Zellen im FITC-Kontrollfeld deuten auf unspezifische Bindung des Konjugats, Autofluoreszenz oder Kontamination hin. *Hinweis: Wenn dies festgestellt wird, ist der Test zu wiederholen.*
Stark fluoreszierende Zellen mit charakteristischer Morphologie von *Ralstonia solanacearum* in den Testfeldern beobachten. Die Intensität der Fluoreszenz muß der des positiven Kontrollstammes bei gleicher Antiserumverdünnung entsprechen. Zellen mit unvollständiger Färbung oder mit schwacher Fluoreszenz sind nicht zu berücksichtigen, es sei denn, es gibt viele solcher Zellen (siehe Auswertung des IF-Testergebnisses).
- Auswertung des IF-Testergebnisses*
- Für jede Probe, bei der keine stark fluoreszierenden Zellen mit charakteristischer Morphologie gefunden werden, ist der IF-Test negativ.
 - Für jede Probe, bei der stark fluoreszierende Zellen mit charakteristischer Morphologie gefunden werden, ist die mittlere Anzahl der Zellen pro Mikroskopfeld zu bestimmen und je ml (N) resuspendiertes Pellet (Anlage 4) zu berechnen.
Eine Bakteriendichte von ungefähr 10^3 Zellen je ml resuspendiertes Pellet ist als die Nachweisgrenze für den IF-Test anzusehen:
— Bei Proben mit $N > 10^3$ Zellen je ml resuspendiertes Pellet ist der IF-Test als positiv zu bewerten;
— bei Proben mit $N < 10^3$ Zellen je ml resuspendiertes Pellet kann der IF-Test als positiv bewertet werden;

- iii) Wird eine große Anzahl ($> 10^5$ Zellen je ml) unvollständig oder schwach fluoreszierender Zellen beim Antiserumtiter festgestellt, sollte ein zweiter Test durchgeführt werden:
- entweder ein Test auf der Grundlage eines anderen biologischen Prinzips
 - oder
 - ein weiterer IF-Test, entweder mit einem zweiten Antiserum oder einer zehnfachen Verdünnung des Pellets.

3 ELISA-Test

(Nach Robinson-Smith et al., 1995)

Antiserum für *Ralstonia solanacearum*, vorzugsweise Rasse 3 Biovar 2, verwenden. Den Titer an einer Suspension von 10^6 Zellen je ml eines homologen Stamms von *Ralstonia solanacearum* bestimmen.

Es wird empfohlen, NUNC-Polysorb-Mikrotiterplatten zu verwenden.

Der Test sollte eine negative Kartoffelextraktkontrolle und eine PBS-Kontrolle umfassen.

Als positive Kontrolle ist eine Suspension von $> 10^6$ Zellen je ml von einem Stamm der entsprechenden Rasse/Biovar von *Ralstonia solanacearum* zu verwenden. Der Test ist genauso durchzuführen wie für die Probe(n), aber getrennt von den Proben auf der Mikrotiterplatte.

- 3.1 100—200 μ l des resuspendierten Pellets in ein Mikroröhrchen pipettieren.
4 Minuten lang bei 100°C erhitzen. Mikroröhrchen auf Eis legen.
- 3.2 Gleiches Volumen doppelt starken Carbonat-Beschichtungs-Puffer (Anlage 5) zugeben. Vortexen.
- 3.3 In *mindestens* zwei Vertiefungen der Mikrotiterplatte Aliquote von jeweils 100 μ l geben. Eine Stunde bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubieren.
- 3.4 Extrakte aus den Vertiefungen vollständig entfernen. Vertiefungen dreimal mit PBS-Tween (Anlage 5) waschen; die letzte Waschlösung sollte mindestens 5 Minuten in den Vertiefungen bleiben.
- 3.5 Die geeignete Verdünnung vom *Ralstonia-solanacearum*-Antiserum in Blockierungs-Puffer (Anlage 5) zubereiten. 100 μ l der Antiserumverdünnung in die Vertiefungen geben.
Eine Stunde bei 37°C inkubieren.
- 3.6 Antiserum aus den Vertiefungen vollständig entfernen. Vertiefungen wie zuvor beschrieben (3.4) waschen.
- 3.7 Die geeignete Verdünnung des Konjugats der alkalischen Phosphatase in Blockierungs-Puffer zubereiten. 100 μ l der Konjugatverdünnung in die Vertiefungen geben.
Eine Stunde bei 37°C inkubieren.
- 3.8 Konjugat aus den Vertiefungen vollständig entfernen. Vertiefungen wie zuvor beschrieben (3.4 und 3.6) waschen.
- 3.9 Alkalische Phosphatasesubstratlösung zubereiten (Anlage 5). 100 μ l in die Vertiefungen geben. Zwischen 30 Minuten und 1 Stunde bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubieren.
- 3.10 Extinktion bei 409 nm ablesen.

Auswertung des ELISA-Tests

Der ELISA-Test ist negativ, wenn die optische Dichte (OD) der Probe $< 2 \times$ OD der negativen Kontrolle beträgt.

Der ELISA-Test ist positiv, wenn die optische Dichte (OD) der Probe $> 2 \times$ OD der negativen Kontrolle beträgt.

4 PCR-Test

(nach Seal et al., 1993)

Hinweis: Bei allen Schritten der Probenzubereitung und anderen Tätigkeiten in Zusammenhang mit PCR müssen Pipettenspitzen mit Filtern verwendet werden.

Eine Suspension von 10^6 Zellen je ml von einem Rasse-3-Biovar-2-Stamm von *Ralstonia solanacearum* als positive Kontrolle zubereiten. Der Test ist genauso durchzuführen wie für die Probe(n).

- 4.1 100 μ l des resuspendierten Pellets in ein Mikroröhrchen pipettieren.
Alternativ können 90 μ l des resuspendierten Pellets in ein Mikroröhrchen gegeben werden, das 10 μ l 0,5 M NaOH enthält. Durch wiederholtes Umdrehen des Mikroröhrchens mischen.

- 4.2 4 Minuten bei 100 °C erhitzen. Mikroampulle sofort auf Eis legen.
- 4.3 Zumindest zwei Dezimalverdünnungen, z. B. 1/10 und 1/100, oder bei Bedarf mehr, in sterilem, destilliertem oder ultrareinem Wasser (UPW) zubereiten.
- 4.4 Die PCR-Reaktionsmischung (Anlage 6) in einem sterilen Röhrchen durch Zugabe der folgenden Komponenten in folgender Reihenfolge zubereiten:

Für ein Reaktionsvolumen von 50 µl

Komponente	Menge	Endkonzentration
Steriles, destilliertes Wasser oder UPW	30,8 µl—33,8 µl	
10×PCR-Puffer	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 (5U/µl)	0,2 µl	1,0 U
Gesamtvolumen	45 µl—48 µl	

Für mehr Reaktionen

Die Menge jeder Komponente für die erforderliche Anzahl von Reaktionen berechnen.

Die Komponenten mischen und 45 µl—48 µl des Gemisches in sterile PCR-Röhrchen geben.

Röhrchen mit der PCR-Reaktionsmischung auf Eis lagern.

Für Reaktionsvolumen von 25 µl:

Menge der Komponenten entsprechend verringern.

- 4.5 PCR-Amplifikation
- 4.5.1 Fakultativ! Röhrchen mit der gekochten Probe und der positiven Kontrolle pulszentrifugieren.
Den Röhrchen mit der PCR-Reaktionsmischung in der angegebenen Reihenfolge 2—5 µl der Probe(n), Wasserkontrolle und positiven Kontrolle zugeben. Röhrchen in den Heizblock des DNA-Thermocyclers stellen.
- 4.5.2 Folgendes Programm durchführen:
- 1 Zyklus:
i) 2 Minuten bei 96 °C: Denaturierung der Matrisse;
- 50 Zyklen:
ii) 20 Sekunden bei 94 °C: Denaturierung;
iii) 20 Sekunden bei 68 °C: Anlagerung der Primer;
iv) 30 Sekunden bei 72 °C: Verlängerung der Kopie;
- 1 Zyklus:
v) 10 Minuten bei 72 °C: weitere Verlängerung;
- 1 Zyklus:
vi) bei 4 °C halten.
- Hinweis:* Diese Parameter beziehen sich auf einen Perkin Elmer 9600. Bei anderen Thermocyclern ist möglicherweise eine Mineralölschicht im PCR-Reaktionsröhrchen erforderlich und/oder eine Veränderung der Dauer von Schritt ii), iii) und iv) im Amplifikationsprofil.
- 4.5.3 Röhrchen aus dem Thermocycler nehmen. Das PCR-Produkt analysieren. Wenn dies nicht sofort geschehen kann, sind die Röhrchen zur Verwendung am selben Tag bei 4 °C bzw. für einen längeren Zeitraum bei -18 °C zu lagern.
- 4.6 Analyse des PCR-Produkts
- Die PCR-Fragmente werden durch Agarose-Gelelektrophorese und Anfärben mit Ethidiumbromid nachgewiesen.
- 4.6.1 Ein geeignetes Agarosegel zubereiten, indem man Agarose in Tris/Acetat-Elektrophorese-Puffer (TAE) vorsichtig aufkocht.

- 4.6.2 Die geschmolzene Agarose auf 50—60 °C abkühlen, in die Gelgießkammer der Elektrophoreseapparatur füllen und den Kamm einsetzen. Die Lösung erstarren lassen.
- 4.6.3 Den Kamm herausnehmen. Das Gel in TAE tauchen, so daß es gerade 2—3 mm mit dem Puffer bedeckt ist.
- 4.6.4 3- μ l-Tropfen Beladungs-Puffer auf Parafilm geben. 12 μ l des PCR-Produkts von den Proben, der Positivkontrolle oder der Wasserkontrolle zugeben und durch leichtes Ansaugen in der Pipettenspitze vor dem Einfüllen mischen. Die angegebenen Volumina können der Kapazität der Vertiefungen im Agarosegel angepaßt werden.
- 4.6.5 Die Vertiefungen des Gels sorgfältig befüllen. In mindestens eine Vertiefung als Bezugssubstanz einen geeigneten DNA-Marker geben.
- 4.6.6 Netzgerät an die Elektrophoreseapparatur anschließen. Die Elektrophorese bei 5—8 V/cm durchführen, bis die Front des Trackingindikators sich innerhalb von 1 cm vom Ende des Gels befindet.
- 4.6.7 Stromversorgung abschalten und Netzgerät von der Elektrophoreseapparatur abnehmen.
Das Gel vorsichtig herausnehmen und 30—45 Minuten in Ethidiumbromidlösung tränken.
Hinweis: Beim Umgang mit Ethidiumbromid, einem starken Mutagen, sind stets Einmalhandschuhe zu tragen!
- 4.6.8 Färbemittel 10—15 Minuten in destilliertem Wasser abwaschen.
- 4.6.9 Das/die amplifizierte(n) DNA-Fragment(e) durch UV-Transillumination sichtbar machen. Das PCR-Produkt von *Ralstonia solanacearum* mit den Primern OLI-1 und Y-2 hat eine Länge von 288 bp. Mit dem DNA-Marker und der positiven Kontrolle vergleichen.
Hinweis: Die Wasserkontrolle muß auf jeden Fall negativ sein. Fällt sie positiv aus, ist der Test zu wiederholen.
- 4.6.10 Zur Dokumentation gegebenenfalls das Gel photographieren.
- 4.6.11 Die Echtheit des amplifizierten Fragments durch Restriktionsenzymanalyse (REA) bestätigen.
- 4.7 Restriktionsenzymanalyse (REA)
- 4.7.1 8,5 μ l des PCR-Produkts (4.5.3) in ein neues Mikroröhrchen geben. 1 μ l des 10 \times Enzympuffers und 0,5 μ l des Restriktionsenzym Avall zugeben.
- 4.7.2 Durch leichtes Ansaugen in der Pipettenspitze mischen. Wenn Tropfen an den Wänden des Röhrchens verbleiben, in der Mikrozentrifuge pulsentrifugieren. Eine Stunde bei 37 °C inkubieren.
- 4.7.3 Das verdaute PCR-Fragment wie zuvor (4.6) durch Agarose-Gelelektrophorese analysieren.
Auswertung des PCR-Testergebnisses
Der PCR-Test ist negativ, wenn das charakteristische 288-bp-Fragment nicht nachgewiesen *und* das Fragment für den positiven Kontrollstamm von *Ralstonia solanacearum* nachgewiesen wird.
Der PCR-Test ist positiv, wenn das 288-bp-Fragment nachgewiesen wird *und* die REA zeigt, daß das amplifizierte Fragment mit dem positiven Kontrollstamm von *Ralstonia solanacearum* identisch ist.
- 5 **Selektivausstrichtest**
(nach Elphinstone et al., 1996)
- 5.1 Der Test wird mit einer geeigneten Verdünnungsausstrichtechnik durchgeführt, z. B.:
- i) mindestens zwei Dezimalverdünnungen, d. h. 1/10 und 1/100, des resuspendierten Pellets in Pelletpuffer zubereiten. Ein abgemessenes Standardvolumen (50—100 μ l) des resuspendierten Pellets und jeder Verdünnung auf ein modifiziertes selektives SMSA-Medium (Anlage 7) aufbringen und mit einem Glasstäbchen über die gesamte Fläche des Mediums verteilen.
Wenn es zweckmäßig erscheint, ist mit einer 10- μ l-Öse auch ein Verdünnungsausstrich des resuspendierten Pellets durchzuführen. Die Öse zwischen den Strichen abflammen.
- ii) Ein abgemessenes Standardvolumen (50—100 μ l) des resuspendierten Pellets auf ein modifiziertes selektives SMSA-Medium aufbringen und mit einem Glasstäbchen über die gesamte Fläche des Mediums verteilen. Das Stäbchen ohne Abflammen auf zwei weiteren Platten mit modifiziertem SMSA-Medium austreichen.
- 5.2 Mit der gleichen Verdünnungsausstrichtechnik eine Suspension von 10⁶ Zellen je ml von einem virulenten Rasse-3-/Biovar-2-Stamm von *Ralstonia solanacearum* als positive Kontrolle auf einen Satz separater Platten mit modifiziertem SMSA-Medium auftragen.
- 5.3 Die Platten bei 28 °C bebrüten. Die Platten nach 3 Tagen erstmals prüfen. Bei Negativbefund bis zu insgesamt 6 Tagen weiter bebrüten. Virulente Isolate von *Ralstonia solanacearum* bilden milchig weiße, flache, unregelmäßige und flüssige Kolonien mit deutlich erkennbaren roten bis purpurfarbenen Zentren mit Strichen oder Wirbeln.
- 5.4 Kolonien mit charakteristischer Morphologie durch Subkultur auf einem Universalnährmedium (Anlage 1) reinigen.

- 5.5 Reinkulturen identifizieren (Abschnitt II.4.1) und positive *Ralstonia-solanacearum*-Kulturen durch einen Pathogenitätstest (Abschnitt II.4.3) bestätigen.

Auswertung des Ergebnisses des Selektivausstrichtests

Der Selektivausstrichtest ist negativ, wenn nach sechs Tagen keine Kolonien isoliert werden oder wenn keine charakteristischen Kolonien von *Ralstonia solanacearum* isoliert werden, vorausgesetzt, daß keine Hemmung durch Kolonien anderer Bakterien vermutet wird und daß charakteristische Kolonien von *Ralstonia solanacearum* von den positiven Kontrollen gefunden worden sind.

Der Verdünnungsausstrichtest ist positiv, wenn charakteristische Kolonien von *Ralstonia solanacearum* isoliert werden.

6 **Bioassay-Test**

(nach Janse, 1988)

- 6.1 Für jede Probe sind 10 Testpflanzen anfälliger Tomaten- oder Eierfruchtsämlinge im Dreiblattstadium zu verwenden. Die Testpflanzen sind 24 Stunden vor der Inokulation nicht zu wässern.
- 6.2 100 µl des resuspendierten Pellets auf die Testpflanzen aufteilen. Den Stengel zwischen den Keimblättern sowie eine oder mehrere weitere Stellen beimpfen.
- 6.3 Mit der gleichen Technik 10 Sämlinge mit einer Suspension von 10⁶ Zellen je ml eines virulenten Rasse-3-/Biovar-2-Stamms von *Ralstonia solanacearum* als positive Kontrolle und mit Pelletpuffer als negative Kontrolle beimpfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen sind die positiven Kontrollpflanzen von den anderen Pflanzen zu trennen.
- 6.4 Die Testpflanzen bei 22°C bis 28°C und hoher relativer Luftfeuchte bis zu 4 Wochen und täglichem Wässern weiter wachsen lassen. Auf Anzeichen von Welke, Epinastie, Chlorosen und/oder Wachstumsstörungen achten.
- 6.5 Von infizierten Pflanzen isolieren (Abschnitt II). Reinkulturen mit charakteristischer Morphologie identifizieren (Abschnitt II.4.1) und *Ralstonia-solanacearum*-Kulturen durch einen Pathogenitätstest bestätigen (Abschnitt II.4.3).
- 6.6 Bei Bedarf bei Testpflanzen, die keine Anzeichen für eine Infektion zeigen, überprüfen, ob keine Infektion vorliegt. Von jeder Testpflanze 2 cm über der Inokulationsstelle einen 1 cm großen Abschnitt des Stengels entnehmen. Die Gewebeteile in Mazerationspuffer homogenisieren. Verdünnungsausstrichtest durchführen (Abschnitt III.5.1). Bei positivem Befund Reinkulturen mit charakteristischer Morphologie identifizieren (Abschnitt II.4.1) und positive Kulturen durch einen Pathogenitätstest (Abschnitt II.4.3) bestätigen.

Auswertung des Bioassay-Testergebnisses

Der Bioassay-Test ist negativ, wenn die Testpflanzen nicht mit *Ralstonia solanacearum* infiziert sind, vorausgesetzt, *Ralstonia solanacearum* ist in den Positivkontrollen nachgewiesen worden.

Der Bioassay-Test ist positiv, wenn die Testpflanzen mit *Ralstonia solanacearum* infiziert sind.

7 **Anreicherungstest**

(nach J. G. Elphinstone et al., 1996)

- 7.1 100 µl des resuspendierten Pellets in 3 ml modifizierte SMSA-Bouillon geben (Anlage 7).
- 7.2 48 Stunden lang, auf keinen Fall länger als 72 Stunden, bei 28°C mit zwecks Belüftung lose aufgesetzter Kappe bebrüten.
- 7.3 Kappe schließen und vortexen. Für den IF-Test (dieser Abschnitt, Ziffer 2), den ELISA-Test (dieser Abschnitt, Ziffer 3) und/oder den PCR-Test (dieser Abschnitt, Ziffer 4) aliquotieren.

8 **Pathogenitätstest**

Siehe Abschnitt II.4.3.

*Anlage 1***Nährmedien für Kulturen von *Ralstonia solanacearum*****Nähragar (NA)**

Nähragar (Difco)	23 g
Destilliertes Wasser	1 l

In 1-Liter-Kolben 0,5-Liter-Volumen des Mediums zubereiten.

Die Substanzen auflösen.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Auf 50 °C abkühlen. Platten gießen.

Hefe-Pepton-Glukose-Agar (YPGA)

Hefeextrakt (Difco)	5 g
Bacto-Pepton	5 g
D(+)-Glukose (Monohydrat)	10 g
Bacto-Agar (Difco)	15 g
Destilliertes Wasser	1 l

In 1-Liter-Kolben 0,5-Liter-Volumen des Mediums zubereiten.

Die Substanzen auflösen.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Auf 50 °C abkühlen. Platten gießen.

Saccharose-Pepton-Agar (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
Destilliertes Wasser	1 l

In 1-Liter-Kolben 0,5-Liter-Volumen des Mediums zubereiten.

Die Substanzen auflösen. Erforderlichenfalls auf pH 7,2—7,4 einstellen.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Auf 50 °C abkühlen. Platten gießen.

Kelmans Tetrazolium-Medium

Casaminosäuren (Difco)	1 g
Bacto-Pepton (Difco)	10 g
Dextrose	5 g
Bacto-Agar (Difco)	15 g
Destilliertes Wasser	1 l

In 1-Liter-Kolben 0,5-Liter-Volumen des Mediums zubereiten.

Die Substanzen auflösen.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Auf 50 °C abkühlen.

Filtersterilisierte wäßrige Lösung von Triphenyl-Tetrazoliumchlorid (Sigma) bis zu einer Endkonzentration von 50 mg/l zugeben.

Platten gießen.

*Anlage 2***Material für die Vorbereitung der Probe**

Mazerationspuffer: 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,0

Dieser Puffer wird für die Gewebemazeration verwendet.

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Destilliertes Wasser	1 l

Die Substanzen auflösen und den pH-Wert bestimmen. Nach Bedarf aliquotieren.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Bei Durchführung der direkten PCR wird die Zugabe von 5 % Polyvinylpyrrolidon MG 40.000 (PVP-40) empfohlen, um die Inzidenz der Amplifizierungshemmung durch aromatische Moleküle im Extrakt zu reduzieren.

Bei Anwendung des Waring-Blender- oder Ultra-Turrax-Homogenisierungsverfahrens zur Mazeration des Kartoffelgewebes wird die Zugabe eines Verflüssigungsmittels, eines Schaumverhütungsmittels oder eines Antioxidationsmittels empfohlen.

Lubrolflocken	0,5 g/l
DC-Silikon-Antischaum	1,0 ml/l
Tetranatriumpyrophosphat	1,0 g/l

Getrennt autoklavieren. Bis zum Erreichen der gewünschten Konzentration zugeben.

Pelletpuffer: 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,2

Dieser Puffer wird für die Resuspendierung und Verdünnung der Pellets der Kartoffelnabelenden verwendet.

Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	2,7 g
Na H ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	0,4 g
Destilliertes Wasser	1 l

Die Substanzen auflösen und den pH-Wert prüfen. Nach Bedarf aliquotieren.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

*Anlage 3***Material für den IF-Test**

IF-Puffer: 10 mM phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2

Dieser Puffer wird für die Verdünnung von Antisera benutzt.

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

Die Substanzen auflösen und den pH-Wert prüfen. Nach Bedarf aliquotieren.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

IF-Puffer-Tween

Dieser Puffer wird zum Waschen von Objektträgern verwendet. 0,1% Tween 20 zum IF-Puffer geben.

0,1 M phosphatgepuffertes Glycerin, pH 7,6

Dieser Puffer wird zur Erhöhung der Fluoreszenz als Einbettungsmittel auf den Feldern des IF-Objektträgers verwendet.

Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	0,15 g
Glycerin	50 ml
Destilliertes Wasser	100 ml

—

Anlage 4

Bestimmung des Kontaminationsgrads im IF-Test

Fläche (S) eines Feldes eines Multiwell-Objektträgers

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

wobei D = Durchmesser des Gesamtfeldes. (1)

Fläche (s) des Objektivfeldes

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

wobei d = Durchmesser des Objektivfeldes. (2)

d entweder durch direktes Messen oder aufgrund der folgenden Formeln ermitteln:

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

wobei i = Feldkoeffizient (hängt vom Okulartyp ab und variiert zwischen 8 und 24),

K = Tubuskoeffizient (1 oder 1,25),

G = (100fache, 40fache usw.) Vergrößerung des Objektivs.

Von (2)

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

Von (3)

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

Anzahl der typischen fluoreszierenden Zellen je Feld (c) zählen.

Anzahl der typischen fluoreszierenden Zellen je Gesamtfeld (C) berechnen.

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

Anzahl der typischen fluoreszierenden Zellen je ml Pellet (N) berechnen.

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

wobei y = Volumen des Pellets auf dem Objektträgerfeld,

F = Pelletverdünnungsfaktor.

*Anlage 5***Material für den ELISA-Test**

2 × Carbonat-Beschichtungs-Puffer, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
Destilliertes Wasser	1 l

Die Substanzen auflösen und den pH-Wert messen. Nach Bedarf aliquotieren.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Wenn der Extrakt einen hohen Anteil aromatischer Moleküle enthält, kann Natriumsulfit mit einer Endkonzentration von 0,2 % als Antioxidationsmittel zugegeben werden.

10 × phosphatgepufferte Kochsalzlösung (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
Destilliertes Wasser	1 l

Die Substanzen auflösen und den pH-Wert messen. Nach Bedarf aliquotieren.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung-Tween (PBS-T)

10 × PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilliertes Wasser	895 ml

(Antikörper)-Blockierungs-Puffer (muß frisch angesetzt werden)

10 × PBS	10 ml
Polyvinylpyrrolidon-MG 44.000 (PVP-44)	2 g
10 % Tween 20	0,5 g
Milchpulver	0,5 g
Destilliertes Wasser	auf 100 ml

Alkalische Phosphatase-Substratlösung, pH 9,8

Diethanolamin	97 ml
Destilliertes Wasser	800 ml

Mischen und mit konzentrierter HCl auf pH 9,8 einstellen.

Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen.

0,2 g MgCl₂ zugeben.

Je 15 ml Lösung 2 Phosphatase-Substrattabletten (5 mg) (Sigma) auflösen.

*Anlage 6***Material für den PCR-Test**

Sequenz der Oligonukleotidprimer

Primer OLI-1 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

Primer Y-2 5'CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Reagenzien siehe Seal et al., 1993.

*Anlage 7***Material für den Selektivausstrich- und Anreicherungstest**

SMSA-Selektivmedium (Engelbrecht, 1994, modifiziert von Elphinstone et al., 1996)

Basismedium

Casaminosäuren (Difco)	1 g
Bacto-Pepton (Difco)	10 g
Glycerin	5 ml
Agar (Difco)	15 g
Destilliertes Wasser	1 l

In 1-Liter-Kolben 0,5-Liter-Volumen des Mediums zubereiten.

Die Inhaltsstoffe auflösen und den pH-Wert prüfen. Erforderlichenfalls vor dem Autoklavieren auf pH 6,5 einstellen. *Ralstonia solanacearum* wächst auf dem Medium bei pH > 7,0 nicht gut.

Durch 15minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Auf 50 °C abkühlen.

Für die angegebenen Endkonzentrationen folgende Inhaltsstoffe (alle von Sigma) zugeben:

Kristallviolett	5 mg/l		
Polymixin-B-Sulfat	100 mg/l	(ca. 600 000 Einheiten)	Sigma P-1004
Bacitracin (*)	25 mg/l	(ca. 1 250 Einheiten)	Sigma P-0125
Chloramphenicol	5 mg/l		Sigma C-3175
Penicillin-G	0,5 mg/l	(ca. 825 Einheiten)	Sigma P-3032
Tetrazoliumsalze	50 mg/l		

Die Inhaltsstoffe in 70%igem Ethanol zu den für das zubereitete Mediumvolumen angegebenen Konzentrationen auflösen. einige Inhaltsstoffe, z. B. Polymixin und Chloramphenicol, müssen leicht erwärmt und geschüttelt werden.

SMSA-BOUILLON (Elphinstone et al., 1996), jedoch ohne Agar oder Tetrazoliumsalze.

Zubereitung wie für SMSA-Selektivmedium, jedoch ohne Agar oder ohne Tetrazoliumsalze.

Aliquote von 3 ml in 30-ml-Einweg-Universalröhrchen füllen.

(*) Erforderlichenfalls kann die Kontamination mit saprophytischen Bakterien durch Erhöhung der Bacitracinkonzentration auf 300 ppm verringert werden, ohne daß die Isolierung von *Ralstonia solanacearum* beeinträchtigt wird.

Bibliographie

- Buddenhagen, I.W.; Sequeira, L. and Kelman, A., 1962. Description of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52, 726.
- Cook, D.; Elizabeth B. and Sequeira L., 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive respons. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2, 113—121.
- Dinesen I.G. and DeBoer, S.H., 1995. Extraction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from 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.

ANHANG III

- 1 In jedem Verdachtsfall, bei dem der Screeningtest für das aufgeführte Pflanzenmaterial gemäß dem Verfahren des Anhangs II und in allen anderen Fällen nach einem anderen amtlich zugelassenen Verfahren positiv ausgefallen ist und ein endgültiges Untersuchungsergebnis nach dem genannten Verfahren noch aussteht, sollte folgendes Material zurückgehalten und in geeigneter Form aufbewahrt werden:
 - nach Möglichkeit die Partie (von der die Probe entnommen wurde) oder ein Teil dieser Partie in der Originalverpackung mit Etikett,
 - nach Möglichkeit der von der Probe verbleibende Teil,
 - verbleibende Auszüge und weiteres für die Screeningtests vorbereitetes Material, z. B. Objektträger für Immunfluoreszenztest,
und
 - alle sachdienlichen Unterlagen,bis das genannte Verfahren vollständig abgeschlossen ist.
- 2 Bei Bestätigung des Schadorganismus sollte folgendes Material zurückgehalten und in geeigneter Form für die Dauer von mindestens einem Monat nach Ablauf des Meldeverfahrens gemäß Artikel 5 Absatz 2 aufbewahrt werden:
 - das in Absatz 1 genannte Material;
 - gegebenenfalls eine mit Knollen- oder Pflanzenextrakt beimpfte Probe infizierten Tomaten- oder Auberginenmaterials und
 - die isolierte Erregerkultur.

ANHANG IV

Die in Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer i) genannte Untersuchung bezieht sich gegebenenfalls auf folgende Parameter:

- i) Erzeugungsorte,
- an denen Kartoffeln angebaut werden oder wurden, die klonal mit Kartoffeln verbunden sind, die sich als mit dem Schadorganismus befallen erwiesen haben;
 - an denen Tomaten angebaut werden oder wurden, die aus derselben Saatgutpartie erwachsen sind wie die Tomaten, die sich als mit dem Schadorganismus befallen erwiesen haben;
 - an denen Kartoffeln oder Tomaten angebaut werden oder wurden, die wegen Verdachts des Auftretens des Schadorganismus der amtlichen Kontrolle unterstellt wurden;
 - an denen Kartoffeln angebaut werden oder wurden, die klonal mit Kartoffeln verbunden sind, die an mit dem Schadorganismus befallenen Erzeugungsorten angebaut wurden;
 - an denen Kartoffeln oder Tomaten angebaut werden und die in der Nachbarschaft zu befallenen Erzeugungsorten liegen, einschließlich solcher, an denen Anbaugeräte und -einrichtungen direkt oder über einen gemeinsamen Vertragspartner gemeinsam genutzt werden;
 - an denen Oberflächenwasser zur Bewässerung oder Beregnung aus Quellen genutzt werden, die sich als mit dem Schadorganismus kontaminiert erwiesen haben oder die der Kontamination mit dem Schadorganismus verdächtig sind;
 - an denen Oberflächenwasser zur Bewässerung oder Beregnung aus einer Quelle genutzt wird, die gemeinsam mit Erzeugungsorten benutzt wird, die sich als mit dem Schadorganismus kontaminiert erwiesen haben oder die der Kontamination mit dem Schadorganismus verdächtig sind;
 - die von Oberflächenwasser überflutet sind oder waren, das sich als mit dem Schadorganismus kontaminiert erwiesen hat oder das der Kontamination mit dem Schadorganismus verdächtig ist,
- und
- ii) Oberflächenwasser, das zur Bewässerung oder Beregnung von Feldern oder Erzeugungsorten, die sich als mit dem Schadorganismus als kontaminiert erwiesen haben, genutzt wird oder diese überflutet hat.
-

ANHANG V

- 1 Die Faktoren, die bei der Bestimmung des Ausmaßes des wahrscheinlichen Befalls gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer iii) und Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe c) Ziffer iii) zu berücksichtigen sind, umfassen gegebenenfalls:
 - das aufgeführte Pflanzenmaterial, das an einem Erzeugungsort angebaut wurde, der gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer ii) als befallen erklärt wurde;
 - Erzeugungsorte mit produktionstechnischer Verbindung zu dem aufgeführten Pflanzenmaterial, das gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer ii) als befallen erklärt wurde, einschließlich solcher, an denen Anbaugeräte und -einrichtungen direkt oder über einen gemeinsamen Vertragspartner gemeinsam genutzt werden;
 - das aufgeführte Pflanzenmaterial, das an den im vorstehenden Gedankenstrich genannten Erzeugungsorten angebaut wurde oder an solchen Erzeugungsorten in dem Zeitraum anwesend war, in dem das aufgeführte Pflanzenmaterial, das gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer ii) als befallen erklärt wurde, an dem im ersten Gedankenstrich genannten Erzeugungsort anwesend war;
 - Läger, in denen das aufgeführte Pflanzenmaterial von den vorgenannten Erzeugungsorten umgeschlagen wird;
 - Maschinen, Fahrzeuge, Schiffe, Lagerräume oder Teile davon sowie sonstige Gegenstände, einschließlich Verpackungsmaterial, die mit dem aufgeführten Pflanzenmaterial, das gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer ii) als befallen erklärt wurde, in Berührung gekommen sein könnten;
 - jegliches aufgeführte Pflanzenmaterial, das in den im vorstehenden Gedankenstrich bezeichneten Einrichtungen oder Berührungsgegenständen vor deren Reinigung oder Desinfizierung gelagert wurde oder damit in Berührung gekommen ist, und
 - als Ergebnis der Untersuchungen und Tests gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer i) im Falle von Kartoffeln diejenigen Knollen oder Pflanzen mit geschwisterlicher oder elterlicher klonaler Beziehung zu dem aufgeführten Pflanzenmaterial, das gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer ii) als befallen erklärt wurde, bzw. im Falle von Tomaten diejenigen Pflanzen, die aus dem gleichen Saatgut wie das genannte Pflanzenmaterial erwachsen sind, und bei denen, auch wenn sie vielleicht mit negativem Ergebnis auf den Erreger hin untersucht worden sind, ein Befall aufgrund einer klonalen Verbindung wahrscheinlich erscheint;
 - Erzeugungsorte des aufgeführten Pflanzenmaterials, auf die im vorhergehenden Gedankenstrich Bezug genommen wird;
 - Erzeugungsorte des aufgeführten Pflanzenmaterials, die mit Wasser bewässert oder beregnet werden, das gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe c) Ziffer ii) als kontaminiert erklärt wurde;
 - aufgeführtes Pflanzenmaterial, das auf Feldern erzeugt wurde, welche von kontaminiertem Oberflächenwasser überflutet wurden.
- 2 Die Bestimmung der möglichen Verbreitung gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer iv) und Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe c) Ziffer ii) umfaßt
 - i) in den Fällen gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer iv) die Prüfung folgender Aspekte:
 - Nähe zu anderen Erzeugungsorten, an denen das aufgeführte Pflanzenmaterial angebaut wird;
 - gemeinsame Erzeugung und Verwendung von Pflanzkartoffelbeständen;
 - Erzeugungsorte, an denen das aufgeführte Pflanzenmaterial bewässert oder beregnet wird und an denen die Gefahr der Abschwemmung oder Überflutung von Erzeugungsorten besteht, die gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer ii) als befallen erklärt wurden;
 - ii) in den Fällen, in denen Oberflächenwasser gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe c) Ziffer ii) als kontaminiert erklärt wurde:
 - Erzeugungsorte, an denen das aufgeführte Pflanzenmaterial unmittelbar neben dem als kontaminiert erklärten Oberflächenwasser angebaut wird oder die von diesem Oberflächenwasser überflutet werden können;
 - jedes einzelne Bewässerungsbecken, das mit dem als kontaminiert erklärten Oberflächenwasser in Verbindung steht.

- 3 Die Einzelheiten der Mitteilung gemäß Artikel 5 Absatz 2 umfassen
- den Zeitpunkt der Mitteilung des Befallverdachts gemäß Artikel 4 bzw. die Zeitpunkte der Probenahmen bzw. den Nachweis des Schadorganismus gemäß Artikel 5;
 - eine Beschreibung der Einzelheiten der Befallserklärung und der Abgrenzung der Sicherheitszone.
- 4 Die Einzelheiten der zusätzlichen Mitteilung nach Artikel 5 Absatz 2 Unterabsatz 2 umfassen
- für jede als befallen erklärte Kartoffelsendung oder -partie die Zeugnisse gemäß Artikel 7 oder 8 der Richtlinie 77/93/EWG, die Pflanzenpaßnummer oder die Registriernummer des Kartoffelerzeugers, Sammelagers und Versandzentrums;
 - für jede als befallen erklärte Tomatenpflanzensendung oder -partie die Zeugnisse gemäß Artikel 7 oder 8 der Richtlinie 77/93/EWG und die Pflanzenpaßnummer gemäß der Auflistung des Anhangs V Teil A Abschnitt I Nummer 2.2 der Richtlinie 77/93/EWG;
 - die Sortenbezeichnung und die Kategorie im Falle von Pflanzkartoffelbeständen und nach Möglichkeit in allen anderen Fällen;
 - sonstige Angaben zu dem bestätigten Auftreten des Schadorganismus, die die Kommission gegebenenfalls anfordert.
-

ANHANG VI

- 1 Mit Bezug auf Artikel 6 Absatz 1 gilt folgendes:
 - Verbrennen oder
 - Verwendung als Tierfutter nach einer Hitzebehandlung, die die Gefahr des Überlebens des Schadorganismus ausschließt, oder
 - tiefes Vergraben in Deponien, bei denen keine Versickerungsgefahr für Agrarflächen oder Oberflächenwasser besteht, die zur Bewässerung landwirtschaftlicher Nutzflächen verwendet werden könnten;
 - industrielle Verarbeitung durch direkte, unverzügliche Lieferung an einen Verarbeitungsbetrieb mit amtlich zugelassenen Abfallentsorgungseinrichtungen, die die Bestimmungen des Anhangs VII erfüllen, oder
 - andere Maßnahmen, sofern nachweislich keine erkennbare Gefahr der Verschleppung des Schadorganismus besteht; diese Maßnahmen sind der Kommission und den anderen Mitgliedstaaten umgehend mitzuteilen.
- 2 Die sachgerechte Verwendung oder Entsorgung des aufgeführten Pflanzenmaterials gemäß Artikel 6 Absatz 2 unter Aufsicht der zuständigen amtlichen Stellen der betreffenden Mitgliedstaaten bei gegenseitiger Unterrichtung der zuständigen amtlichen Stellen zwecks Sicherstellung einer jederzeitigen Kontrolle und mit Zustimmung der zuständigen amtlichen Stelle des Mitgliedstaats, in dem die Kartoffeln im Hinblick auf die im ersten und im zweiten Gedankenstrich genannten Abfallentsorgungseinrichtungen verpackt oder verarbeitet werden sollen, ist wie folgt durchzuführen:
 - i) im Falle von Kartoffelknollen:
 - Verwendung als Speisekartoffeln und Verpackung in mit geeigneten Abfallentsorgungseinrichtungen ausgerüsteten Betrieben, ohne Umpacken liefer- und verwendungsfertig, bestimmt zur direkten Belieferung und Verwendung, oder
 - Verwendung als Wirtschaftskartoffeln, bestimmt zur direkten, sofortigen Belieferung einer mit geeigneten Abfallentsorgungseinrichtungen ausgerüsteten Verarbeitungsanlage und dortigen Verwendung;
 - andere Verwendung oder Entsorgung, sofern nachweislich keine erkennbare Gefahr der Verschleppung des Schadorganismus besteht und vorbehaltlich der Zustimmung der genannten zuständigen amtlichen Stellen; diese Maßnahmen sind umgehend der Kommission und den anderen Mitgliedstaaten mitzuteilen;
 - ii) im Falle von anderen Pflanzenteilen einschließlich Stengel und Blattabfall:
 - unschädliche Beseitigung oder
 - andere Verwendung oder Entsorgung, sofern nachweislich keine erkennbare Gefahr der Verschleppung des Schadorganismus besteht; diese Maßnahmen sind der Kommission und den anderen Mitgliedstaaten mitzuteilen.
- 3 Die geeigneten Verfahren zur Entseuchung der in Artikel 6 Absatz 3 genannten Berührungsgegenstände umfassen die Reinigung und gegebenenfalls Desinfektion, damit sichergestellt ist, daß keine erkennbare Gefahr der Verschleppung des Schadorganismus besteht; diese Maßnahmen sind unter Aufsicht der zuständigen amtlichen Behörden der Mitgliedstaaten durchzuführen.
- 4 In der gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer iv) und Buchstabe c) Ziffer ii) abgegrenzten und in Artikel 6 Absatz 4 genannten Sicherheitszone treffen die Mitgliedstaaten die folgenden Maßnahmen:
- 4.1 In Fällen, in denen Erzeugungsorte gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer ii) als befallen erklärt wurden, treffen die Mitgliedstaaten folgende Maßnahmen:
 - a) auf einem Feld oder in einer Einheit für geschützte Pflanzenerzeugung, das bzw. die gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer ii) als befallen erklärt wurde,
 - entweder

- i) mindestens in den vier auf die Befallserklärung folgenden Anbaujahren:
- Maßnahmen zur Bekämpfung des Kartoffel- und Tomatendurchwuchses sowie anderer Wirtspflanzen des Schadorganismus, einschließlich Unkräutern aus der Familie der Nachtschattengewächse, und
 - Verzicht auf den Anbau von
 - Kartoffelknollen oder -pflanzen,
 - Tomatenpflanzen und -samen,
 - unter Berücksichtigung der biologischen Eigenart des Schadorganismus:
 - anderen Wirtspflanzen des Schadorganismus,
 - Brassica-Arten, bei denen nachweislich die Gefahr des Überlebens des Schadorganismus besteht,
 - Kulturen, bei denen nachweislich die Gefahr der Verschleppung des Schadorganismus besteht;
 - in der ersten auf den im vorstehenden Gedankenstrich genannten Zeitraum folgenden Vegetationsperiode für Kartoffeln oder Tomaten und unter der Bedingung, daß das Feld mindestens in den zwei vor der Pflanzung liegenden Anbaujahren als frei von Kartoffel- und Tomatendurchwuchs sowie von anderen Wirtspflanzen, einschließlich Unkräutern aus der Familie der Nachtschattengewächse befunden wurde:
 - im Falle von Kartoffeln Anbau von amtlich zertifiziertem Kartoffelpflanzgut ausschließlich zur Erzeugung von Speise- und Wirtschaftskartoffeln und
 - Durchführung einer amtlichen Erhebung, einschließlich Test, gemäß Artikel 2 Absatz 1;
 - in der auf die im vorstehenden Gedankenstrich genannte Vegetationsperiode folgenden Vegetationsperiode für Kartoffeln oder Tomaten unter Einhaltung einer geeigneten Fruchtfolge im Falle von Kartoffeln: Anbau von amtlich zertifiziertem Kartoffelpflanzgut entweder zur Erzeugung von Pflanzkartoffeln oder von Speise- bzw. Wirtschaftskartoffeln und im Falle von Kartoffeln und Tomaten Durchführung einer amtlichen Erhebung gemäß Artikel 2 Absatz 1;
- oder
- ii) in den fünf auf die Befallserklärung folgenden Anbaujahren:
- Maßnahmen zur Beseitigung von Kartoffel- und Tomatendurchwuchs sowie anderer Wirtspflanzen des Schadorganismus, einschließlich Unkräutern aus der Familie der Nachtschattengewächse, und
 - in den ersten drei Jahren dieses Zeitraums entweder Schwarzbrache oder Anbau von Getreide entsprechend dem festgestellten Risiko oder Dauerweide mit häufigem Rotationschnitt oder Intensivbeweidung oder Gräsersamengewinnung sowie in den darauffolgenden beiden Jahren Anbau von Nichtwirtspflanzen, die nachweislich keine Gefahr des Überlebens oder der Verschleppung des Schadorganismus darstellen;
 - in der ersten auf den im vorstehenden Gedankenstrich genannten Zeitraum folgenden Vegetationsperiode für Kartoffeln oder Tomaten:
 - im Falle von Kartoffeln Anbau von amtlich zertifiziertem Kartoffelpflanzgut entweder zur Gewinnung von Pflanzkartoffeln oder von Speise- bzw. Wirtschaftskartoffeln und Durchführung einer amtlichen Erhebung, einschließlich Test, gemäß Artikel 2 Absatz 1;
- b) auf den anderen Feldern:
- in dem auf die Befallserklärung folgenden Anbaujahr:
 - entweder Verzicht auf den Anbau von Kartoffelknollen oder -pflanzen oder anderen Wirtspflanzen des Schadorganismus sowie Maßnahmen zur Beseitigung von Kartoffel- und Tomatendurchwuchs sowie anderer Wirtspflanzen des Schadorganismus, einschließlich Unkräutern aus der Familie der Nachtschattengewächse, oder
 - im Falle von Kartoffelknollen Anbau von amtlich zertifiziertem Kartoffelpflanzgut ausschließlich zur Erzeugung von Speise- und Wirtschaftskartoffeln, vorausgesetzt, daß den zuständigen amtlichen Stellen zufriedenstellend nachgewiesen wurde, daß die von Kartoffeln- und Tomatendurchwuchs und anderen Wirtspflanzen des Schadorganismus, einschließ-

- lich Unkräuter aus der Familie der Nachtschattengewächse ausgehenden Gefahren ausgeschaltet wurden. Der Bestand ist zu geeigneten Zeitpunkten zu kontrollieren, und Kartoffeldurchwuchs ist auf den Schadorganismus zu untersuchen; ferner sind die geernteten Kartoffelknollen zu kontrollieren;
- in dem auf das im vorstehenden Gedankenstrich genannte Anbaujahr folgende Anbaujahr:
 - im Falle von Kartoffeln ausschließlich Anbau von amtlich zertifiziertem Kartoffelpflanzgut entweder zur Erzeugung von Pflanzkartoffeln oder von Speise- bzw. Wirtschaftskartoffeln;
 - zumindest für die Dauer des zweiten auf das im ersten Gedankenstrich genannte Anbaujahr folgenden Anbaujahres:
 - im Falle von Kartoffeln ausschließlich Anbau von amtlich zertifiziertem Kartoffelpflanzgut oder von aus amtlich zertifiziertem Kartoffelpflanzgut unter amtlicher Überwachung erwachsenem Kartoffelpflanzgut entweder zur Erzeugung von Pflanzkartoffeln oder von Speise- bzw. Wirtschaftskartoffeln;
 - in jedem der in den vorstehenden Gedankenstrichen genannten Anbaujahren Maßnahmen zur Beseitigung von Kartoffel- und Tomatendurchwuchs sowie anderer Wirtspflanzen des Schadorganismus, einschließlich der Unkräuter aus der Familie der Nachtschattengewächse, sowie Durchführung einer amtlichen Erhebung gemäß Artikel 2 Absatz 1 sowie bei Anbau von Kartoffelpflanzgut zur Pflanzkartoffelerzeugung einer Untersuchung der Knollen;
- c) sofort nach der Befallserklärung gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer ii) und in jedem der nachfolgenden Anbaujahre bis zum ersten zulässigen Kartoffel- bzw. Tomatenanbau auf dem gemäß Buchstabe a) als befallen erklärten Feld:
- sachgerechte Reinigung und gegebenenfalls Desinfektion gemäß Nummer 3 aller am Erzeugungsstandort befindlichen Maschinen und Lagereinrichtungen, die bei der Kartoffel- bzw. Tomatenerzeugung verwendet werden;
 - amtliche Kontrolle der Bewässerungs- und Beregnungsprogramme, einschließlich der Verhängung des Bewässerungs- und Beregnungsverbots, zur Verhinderung der Verschleppung des Schadorganismus;
- d) auf einer gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer ii) als befallen erklärten Einheit mit geschützter Pflanzenerzeugung, bei der ein vollständiger Austausch des Kultursubstrats möglich ist,
- Verzicht auf den Anbau von Kartoffelknollen oder -pflanzen oder anderen Wirtspflanzen des Schadorganismus, einschließlich Tomatenpflanzen und Samen, bis die betreffende Einheit amtlich überwachten Maßnahmen zur Vernichtung des Schadorganismus und zur Beseitigung sämtlicher Wirtspflanzen, einschließlich zumindest eines vollständigen Austauschs des Kultursubstrats nebst Reinigung und gegebenenfalls Desinfektion der genannten Einheit nebst aller Ausrüstungen, unterzogen und im Anschluß daran von den zuständigen amtlichen Stellen für den Kartoffel- bzw. Tomatenanbau zugelassen wurde; hierbei
 - im Falle der Kartoffelerzeugung Verwendung von amtlich zertifiziertem Kartoffelpflanzgut, Miniknollen oder Meristemkulturen, die von untersuchtem Ausgangsmaterial abstammen, und
 - gegebenenfalls amtliche Kontrolle der Bewässerungs- und Beregnungsprogramme, einschließlich der Verhängung des Bewässerungs- und Beregnungsverbots, zur Verhinderung der Verschleppung des Schadorganismus.
- 4.2 Unbeschadet der unter der Nummer 4.1 aufgeführten Maßnahmen sorgen die Mitgliedstaaten in der abgegrenzten Sicherheitszone dafür, daß
- a) sofort und mindestens für die Dauer der auf die die Befallserklärung folgenden drei Anbaujahre,
 - aa) sofern eine Sicherheitszone gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer iv) abgegrenzt wurde,
 - die Betriebe, die Kartoffelknollen oder Tomaten anbauen, lagern oder umschlagen sowie die Betriebe, die Maschinen für die Kartoffel- und Tomatenerzeugung vertraglich zur Verfügung stellen, von ihren zuständigen amtlichen Stellen überwacht werden;
 - die Reinigung und gegebenenfalls Desinfektion der Maschinen und Läger dieser Betriebe mit Hilfe der in Nummer 3.1 genannten geeigneten Verfahren vorgeschrieben ist;

- vorgeschrieben ist, daß in dieser Sicherheitszone für alle Kartoffelkulturen ausschließlich zertifiziertes Pflanzgut oder unter amtlicher Überwachung erwachsendes Pflanzgut angepflanzt wird und die Pflanzkartoffeln, die an gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a) Ziffer iii) als wahrscheinlich befallen eingestuften Erzeugungsorten angebaut wurden, nach der Ernte untersucht werden;
 - vorgeschrieben ist, daß in allen in der Sicherheitszone gelegenen Betrieben der Umgang mit geernteten Pflanzkartoffeln von dem Umgang mit geernteten Speise- bzw. Wirtschaftskartoffeln zu trennen ist;
 - eine amtliche Erhebung gemäß Artikel 2 Absatz 1 durchgeführt wird;
- ab) sofern Oberflächenwasser gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe c) Ziffer ii) als kontaminiert erklärt oder als Verschleppungsmöglichkeit für den Schadorganismus gemäß Anhang V Nummer 2 gilt,
- zu geeigneten Zeitpunkten eine jährliche Untersuchung durchgeführt wird, einschließlich Beprobung des Oberflächenwassers und geeigneter Wirtspflanzen aus der Familie der Nachtschattengewächse in den betreffenden Wasserquellen sowie Untersuchung nach
 - dem maßgeblichen Verfahren des Anhangs II für das aufgeführte Pflanzenmaterial oder
 - jedem anderen amtlich zugelassenen Verfahren in anderen Fällen;
 - amtliche Kontrollen der Bewässerungs- und Beregnungsprogramme eingeführt werden, einschließlich der Verhängung des Verbots der Bewässerung und Beregnung des aufgeführten Pflanzenmaterials und gegebenenfalls anderer Wirtspflanzen mit als befallen erklärtem Wasser zwecks Verhinderung der Verschleppung des Schadorganismus. Dieses Verbot kann auf der Grundlage der Befunde der genannten jährlichen Untersuchung überprüft werden;
 - bei Kontamination von Abwässern amtliche Kontrollen der Entsorgung der Abwässer industrieller Verarbeitungs- oder Verpackungsbetriebe, die mit dem aufgeführten Pflanzenmaterial umgehen, eingeführt werden;
- b) gegebenenfalls ein Programm zur Erneuerung sämtlicher Kartoffelpflanzgutbestände über einen geeigneten Zeitraum erstellt wird.
-

ANHANG VII

Die amtlich zugelassenen Abfallentsorgungseinrichtungen gemäß Anhang VI Absatz 1 vierter Gedankenstrich müssen nachstehende Bedingungen erfüllen, um die Gefahr der Verschleppung des Schadorganismus auszuschalten:

- i) Abfälle aus der Kartoffel- und Tomatenverarbeitung (einschließlich verworfene Kartoffeln, Kartoffelschalen und Tomaten) sowie andere feste Abfälle von Tomaten und Kartoffeln sind wie folgt zu entsorgen: entweder
 - durch tiefes Vergraben in Deponien, bei denen keine Versickerungsgefahr für Agrarflächen oder Oberflächenwasser besteht, das zur Bewässerung landwirtschaftlicher Nutzflächen verwendet werden könnte. Der Abfall muß direkt zur Deponie verbracht werden und dabei so verpackt sein, daß keine Gefahr des Abfallverlustes besteht,
 - oder
 - durch Verbrennen;
- ii) Abwässer: vor der Entsorgung sind Abwässer, die Schwimmstoffe enthalten, Filtern oder Absetzbecken zuzuleiten, um sie von diesen Schwimmstoffen zu reinigen. Die dabei anfallenden Feststoffe sind gemäß Ziffer i) zu entsorgen.

Anschließend sind die Abwässer wie folgt zu behandeln:

- vor der Entsorgung mindestens dreißigminütige Erhitzung auf 70°C
 - oder
 - anderweitige amtlich zugelassene und überwachte Entsorgung, damit ausgeschlossen ist, daß der Abfall mit landwirtschaftlichen Nutzflächen oder Wasserquellen, die zur Bewässerung landwirtschaftlicher Nutzflächen genutzt werden könnten, in Berührung kommen könnte. Die diesbezüglichen Einzelheiten sind den anderen Mitgliedstaaten und der Kommission mitzuteilen.
-