

31998L0057

21.8.1998

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

L 235/1

**DYREKTYWA RADY 98/57/WE****z dnia 20 lipca 1998 r.****w sprawie kontroli organizmu *Ralstonia solanacearum* (Smith), *Yabuuchi* i wsp.**

RADA UNII EUROPEJSKIEJ,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską, w szczególności jego art. 43,

uwzględniając wniosek Komisji <sup>(1)</sup>,uwzględniając opinię Parlamentu Europejskiego <sup>(2)</sup>,uwzględniając opinię Komitetu Ekonomiczno-Społecznego <sup>(3)</sup>,

a także mając na uwadze, co następuje:

szkodliwy organizm *Ralstonia solanacearum* (Smith) *Yabuuchi* i wsp. był znany wcześniej jako *Pseudomonas solanacearum* (Smith) *Smith*; *Ralstonia solanacearum* (Smith) *Yabuuchi* i wsp. stanie się prawdopodobnie powszechnie przyjętą nazwą dla tego organizmu; niniejsza dyrektywa powinna uwzględniać ten fakt;

produkcja ziemniaka i pomidora zajmuje istotną pozycję w rolnictwie Wspólnoty; wydajność produkcji ziemniaka i pomidora jest stale zagrożona przez organizmy szkodliwe;

ochrona upraw ziemniaka i pomidora przed takimi szkodliwymi organizmami powinna nie tylko utrzymać na obecnym poziomie, ale nawet zwiększyć wydajność produkcji rolnej;

środki ochronne przed wprowadzeniem organizmów szkodliwych na terytorium Państwa Członkowskiego mogą mieć ograniczony efekt, gdyby jednocześnie nie prowadzono metodycznej kontroli ich występowania w całej Wspólnocie i gdyby nie zapewniono ochrony przed ich rozprzestrzenieniem się;

jednym z organizmów szkodliwych dla ziemniaka i pomidora jest *Ralstonia solanacearum* (Smith) *Yabuuchi* i wsp., czynnik patogenny w chorobie brunatnej zgnilizny ziemniaka i w bakteryjnym więdnieniu ziemniaków oraz pomidorów; epidemie choroby spowodowanej tym patogenem występowały już w niektórych częściach Wspólnoty i nadal występują pewne ograniczone źródła infekcji;

istnieje poważne ryzyko dla upraw ziemniaka i pomidora w całej Wspólnocie, jeżeli nie zostaną podjęte skuteczne środki ochrony tych roślin, polegające na lokalizacji występowania tego organizmu, określeniu jego rozpowszechnienia, tak by zapobiec jego pojawieniu się i rozprzestrzenianiu się oraz w przypadku znalezienia tego organizmu – zabezpieczeniu przed jego rozprzestrzenieniem się i likwidacji organizmu przez usunięcie roślin wraz z korzeniami;

dla zapewnienia osiągnięcia powyższych celów we Wspólnocie powinny być podjęte określone środki; ponadto Państwa Członkowskie muszą być zdolne do podjęcia w razie potrzeby dodatkowych lub bardziej rygorystycznych środków, kiedy nie będzie przeciwwskazań co do transportowania ziemniaków lub pomidorów we Wspólnocie, z wyjątkiem sytuacji określonych w dyrektywie Rady 77/93/EWG z dnia 21 grudnia 1976 r. w sprawie działań ochronnych przeciwko wprowadzaniu do Państw Członkowskich organizmów szkodliwych dla roślin lub produktów roślinnych oraz przeciwko ich rozprzestrzenianiu się we Wspólnocie <sup>(4)</sup>; o podjęciu takich środków należy powiadomić inne Państwa Członkowskie oraz Komisję;

należy podjąć środki, które powinny uwzględniać fakt, że niezbędne są systematyczne urzędowe kontrole w celu zlokalizowania patogenu; takie kontrole powinny obejmować inspekcję oraz, kiedy zachodzi taka potrzeba, gdy w określonych warunkach środowiskowych choroba może pozostawać w formie utajonej i nie dawać się zaobserwować ani w rosnących ziemniakach, ani w zmagazynowanych bulwach ziemniaczanych, to powinny one obejmować także pobieranie próbek i ich badanie; rozprzestrzenianie się patogenu na roślinach w fazie wzrostu nie jest czynnikiem najważniejszym, najgroźniejsze jest jego rozprzestrzenianie się poprzez wody powierzchniowe wraz z dzikimi roślinami psiankowatymi i dlatego nawadnianie upraw ziemniaka i pomidora przy użyciu skażonej wody wydaje się stanowić ryzyko zarażenia tych upraw; patogen może występować również w samosiewach ziemniaka i pomidora w ziemi i może stanowić źródło infekcji przeniesionej z jednego sezonu na drugi; patogen może być również roznoszony przez skażenie ziemniaka wskutek kontaktu z ziemniakami zakażonymi oraz poprzez kontakt z urządzeniami stosowanymi podczas uprawy, zbioru i przetworstwa zbiorów, albo podczas transportu i magazynowania w zbiornikach, które uprzednio zostały zainfekowane tym organizmem, poprzez wcześniejszy kontakt z porażonymi ziemniakami;

<sup>(1)</sup> Dz.U. C 124 z 21.4.1997, str. 12 oraz Dz.U. C 108 z 7.4.1998, str. 85.

<sup>(2)</sup> Dz.U. C 14 z 19.1.1998, str. 34.

<sup>(3)</sup> Dz.U. C 206 z 7.7.1998, str. 57.

<sup>(4)</sup> Dz.U. L 26 z 31.1.1977, str. 20. Dyrektywa ostatnio zmieniona dyrektywą Komisji 98/2/WE (Dz.U. L 15 z 21.1.1998, str. 34).

rozprzestrzenianie się patogenu można zredukować lub można mu całkowicie zapobiec dzięki dekontaminacji odpowiednich obiektów; jakiegokolwiek zarażenie materiału siewnego ziemniaka stanowi główne ryzyko rozprzestrzeniania się patogenu; podobnie utajona postać infekcji ziemniaka stanowi poważne ryzyko rozprzestrzeniania się patogenu i można temu zapobiec poprzez stosowanie materiałów siewnych ziemniaka wyprodukowanych w ramach urzędowo zatwierdzonego programu, w którym materiały siewne zostały przebadane i uznane za wolne od infekcji;

aktualna wiedza na temat biologii i epidemiologii *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi i wsp. w warunkach europejskich nie jest pełna i przewiduje się, że w ciągu najbliższych kilku sezonów konieczne będzie dokonanie przeglądu proponowanych środków ostrożności; przewiduje się dokonanie podobnych ulepszeń w zakresie procedur badań, w wyniku dalszych prac badawczych, szczególnie w odniesieniu do czułości oraz specyficzności metod badania, tak aby wybrać oraz wystandaryzować optymalną wersję spośród dostępnych metod badania;

w celu określenia danych szczegółowych, dotyczących takich ogólnych środków oraz bardziej restrykcyjnych i dodatkowych środków, które zostaną podjęte przez Państwa Członkowskie dla zapobieżenia przenoszenia patogenu na ich terytorium, pożądana jest ścisła współpraca Państw Członkowskich z Komisją, koordynowana przez Stały Komitet ds. Zdrowia Roślin (zwany dalej „Komitetem”),

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

#### Artykuł 1

Niniejsza dyrektywa dotyczy środków, jakie Państwa Członkowskie podejmują w celu zabezpieczenia się przed szkodnikiem *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi i wsp., znanym wcześniej jako *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith (zwanym dalej „organizmem”), w odniesieniu do roślin żywicielskich powyższego organizmu, wyszczególnionych w załączniku I sekcja 1 (zwanym dalej „wyszczególnionym materiałem roślinnym”):

- a) zlokalizowania organizmu i określenia jego występowania;
- b) zabezpieczenia przed pojawieniem się i rozprzestrzenieniem się tego organizmu; oraz
- c) w przypadku stwierdzenia obecności tego organizmu – zabezpieczenia przed jego rozprzestrzenieniem się i jego likwidacji przez usunięcie roślin z korzeniami.

#### Artykuł 2

1. Państwa Członkowskie przeprowadzają coroczne, systematyczne urzędowe kontrole występowania organizmu w wyszczególnionym materiale roślinnym, pochodzącym ze swojego terytorium. W celu identyfikacji innych możliwych źródeł skażenia zagrażającego produkcji wyszczególnionego materiału roślinnego, Państwa Członkowskie oceniają występujące ryzyko i jeżeli stwierdzą ryzyko rozprzestrzeniania się organizmu, prowadzą na obszarach produkcji wyszczególnionego materiału roślinnego docelowe kontrole urzędowe występowania organizmu na roślinach innych niż wyszczególniony materiał roślinny, łącznie z dzikorosnącymi roślinami żywicielskimi tego organizmu z rodziny psiankowatych, kontrole jego obecności w wodach powierzchniowych, używanych do nawadniania lub zraszania wyszczególnionego materiału roślinnego oraz w odpadach płynnych pochodzących z przetwórstwa przemysłowego wyszczególnionego materiału roślinnego, a także w sortowniach i pakowniach wyszczególnionego materiału roślinnego i na obiektach służących do nawadniania i zraszania wyszczególnionego materiału roślinnego. Zakres tych docelowych kontroli jest określany stosownie do stwierdzonego stopnia ryzyka przenoszenia organizmu. Państwa Członkowskie mogą także prowadzić urzędowe kontrole występowania organizmu na takich materiałach, jak pożywki, gleba i odpady stałe z przetwórstwa przemysłowego lub procesu czyszczenia i pakowania.

2. Kontrole urzędowe, przewidziane w ust. 1, przeprowadza się:

- a) na wyszczególnionym materiale roślinnym, zgodnie z ustaleniami przedstawionymi w załączniku I sekcja II pkt 1; oraz,
- b) w przypadku roślin żywicielskich innych niż wyszczególniony materiał roślinny, wód powierzchniowych, łącznie z odpadami ciekłymi, zgodnie z właściwymi metodami, a także gdy zaistnieje taka potrzeba, należy pobrać próbki i poddać je badaniu urzędowemu lub w urzędowo nadzorowanym laboratorium;
- c) w razie potrzeby, kontroli należy poddać inne materiały, stosując właściwe metody.

Dalsze szczegółowe informacje, dotyczące procedur kontrolnych oraz liczb, pochodzenia i czasu pobierania próbek do kontroli, zostaną ustalone przez odpowiednie organy urzędowe, w rozumieniu dyrektywy 77/93/EWG, w oparciu o właściwe zasady naukowe i statystyczne oraz znajomość biologii organizmu, uwzględniając specyfikę poszczególnych systemów produkcyjnych wyszczególnionego materiału roślinnego oraz, w miarę potrzeb, innych roślin żywicielskich tego organizmu, występujących w danym Państwie Członkowskim.

3. Szczegółowe informacje i wyniki kontroli urzędowych, przewidzianych w ust. 1 są co roku przekazywane do wiadomości innych Państw Członkowskich oraz do Komitetu, zgodnie z ustaleniami załącznika I sekcja II pkt 2. Notyfikacje takie należy dostarczyć do dnia 1 czerwca, z wyjątkiem notyfikacji dotyczących ziemniaków przeznaczonych na materiał siewny dla gospodarstw rolnych, w tym przypadku – do dnia 1 września. Szczegółowe informacje o przebiegu kontroli i jej wynikach odnoszą się do produkcji z poprzedniego roku, o czym może być powiadomiony także Komitet.

4. Przyjmuje się następujące przepisy, zgodnie z procedurą ustanowioną w art. 16a dyrektywy 77/93/EWG:

— właściwe metody kontroli i analiz laboratoryjnych, przewidziane w ust. 2 akapit pierwszy lit. b).

5. Można przyjąć następujące przepisy, zgodnie z procedurą przewidzianą w art. 16a dyrektywy 77/93/EWG:

— właściwe metody kontroli, przewidziane w ust. 2 akapit pierwszy lit. c),

— dalsze szczegółowe informacje dotyczące kontroli, przewidziane w ust. 2 akapit drugi, w celu zapewnienia porównywalnego poziomu bezpieczeństwa w Państwach Członkowskich.

### Artykuł 3

Państwa Członkowskie dostarczają do właściwych organów urzędowych informacje o podejrzeniu wystąpienia lub o potwierdzonej obecności organizmu na ich obszarze.

### Artykuł 4

1. We wszystkich przypadkach podejrzeń co do wystąpienia organizmu odpowiedzialne organy Państwa(-w) Członkowskiego(-ch) zapewnią urzędowe lub urzędowo nadzorowane analizy laboratoryjne wyszczególnionego materiału roślinnego, przy użyciu odpowiednich metod, określonych w załączniku II oraz zgodnie z warunkami wymienionymi w załączniku III pkt 1 albo we wszystkich innych przypadkach, przy użyciu innej urzędowo uznanej metody, potwierdzającej lub wykluczającej podejrzaną obecność organizmu. W przypadku potwierdzenia obecności organizmu, zostaną spełnione wymagania ustanowione w załączniku III pkt 2.

2. Do czasu potwierdzenia lub wykluczenia podejrzwanej obecności organizmu według ust. 1, we wszystkich przypadkach podejrzwania wystąpienia organizmu, albo:

i) zostaną zaobserwowane objawy diagnostyczne choroby spowodowanej przez organizm i otrzymana się pozytywne wyniki szybkiego badania(-ń) przesiewowego(-ych), określonego w załączniku II sekcja I pkt 1 oraz sekcja II; albo

ii) otrzymana się wynik pozytywny badania(-ń) przesiewowego(-ych), określonego(-ch) w załączniku II sekcja I pkt 2 oraz sekcja III,

i odpowiedzialne organy Państw Członkowskich, w zakresie dotyczącym ich własnej produkcji:

a) wydadzą zakaz przenoszenia roślin oraz bulw ze wszystkich zbiorów, serii produkcyjnych oraz wysyłkowych, z których pobrano próbki, z wyjątkiem tych znajdujących się pod kontrolą, o których wiadomo, że nie występuje podejrzenie ryzyka rozprzestrzeniania się organizmu;

b) podejmą odpowiednie kroki dla wysledzenia pochodzenia podejrzwanej obecności organizmu;

c) wprowadzą właściwe dodatkowe środki ostrożności, w oparciu o znajomość stopnia oszacowanego ryzyka, szczególnie w odniesieniu do produkcji wyszczególnionego materiału roślinnego oraz przenoszenia materiałów siewnych ziemniaków innych niż te, do których odnosi się lit. a), wyprodukowanych w miejscu, z którego pobrano próbki, do których odnosi się lit. a), aby zapobiec jakimkolwiek rozprzestrzenieniu się organizmu.

3. W przypadkach podejrzenia obecności organizmu, w których występuje ryzyko skażenia wyszczególnionego materiału roślinnego lub wód powierzchniowych ze źródeł w innym Państwie Członkowskim lub występowania ryzyka przeniesienia tego organizmu na teren innego Państwa(-w) Członkowskiego(-ch), Państwo Członkowskie, w którym stwierdzono podejrzenie wystąpienia organizmu, niezwłocznie przekaze innym Państwom Członkowskim informacje szczegółowe, zgodnie ze stwierdzonym ryzykiem, o podejrzwanej obecności organizmu i zostanie nawiązana właściwa współpraca między Państwami Członkowskimi. W ten sposób powiadomione Państwa Członkowskie wprowadzą środki ostrożności, zgodnie z ust. 2 lit. c) i podejmą dalsze działania, we właściwy sposób, zgodnie z ust. 1 i 2.

4. Można przyjąć następujący przepis, zgodnie z procedurą przewidzianą w art. 16a dyrektywy 77/93/EWG:

— środki, określone w ust. 2 lit. c).

### Artykuł 5

1. Jeżeli urzędowe lub urzędowo nadzorowane badania wyszczególnionego materiału roślinnego, wykonane z zastosowaniem właściwych metod, podanych w załączniku II lub w innych przypadkach przy użyciu innych urzędowo uznanych metod, potwierdzą obecność organizmu w próbce pobranej zgodnie z niniejszą dyrektywą, to upoważnione organy Państwa Członkowskiego, działające w oparciu o zdrowe zasady naukowe, biologię organizmu, odpowiednio do specyfiki poszczególnych systemów produkcji, wprowadzania do obrotu i przetwarzania roślin żywicielskich organizmu w tym Państwie Członkowskim:

a) w przypadku wyszczególnionego materiału roślinnego:

i) ustalą zakres badań zmierzających do określenia rozmiaru i pierwotnych źródeł(-ła) skażenia, zgodnie z przepisami załącznika IV, przeprowadzając dalsze badania zgodnie z art. 4 ust. 1, przynajmniej na spokrewnionych klonowo siewkach i zapasach materiału siewnego ziemniaka, oraz

- ii) oznaczają jako skażony wyszczególniony materiał roślinny, serię wysyłkową i/lub serię produkcyjną, z której pobrano próbkę, oraz maszyny, pojazdy, magazyny lub ich części, oraz wszelkie inne obiekty, łącznie z materiałami opakowań, będącymi w kontakcie z wyszczególnionym materiałem roślinnym, z którego pobrano próbkę; oznaczać jako skażone również, gdy zajdzie potrzeba, pole(-a) uprawne zabezpieczonej produkcji oraz miejsca, z których pobrano próbkę; oraz w przypadku próbek pobranych w okresie sezonu wegetacyjnego, oznaczać jako skażone pole(-a) uprawne, miejsce(-a) produkcji oraz, gdy zachodzi potrzeba, produkty, z których została pobrana próbka, oraz
- iii) ustalą, zgodnie z przepisami załącznika V pkt 1, zakres możliwego skażenia na drodze kontaktu przed i po zbiorach, w produkcji, podczas nawadniania lub zraszania lub poprzez powiązania klonalne, z oznaczonym skażeniem, oraz
- iv) wytyczą strefę ochronną, w oparciu o oznaczenie skażenia zgodnie z ii), określą rozmiar możliwego skażenia zgodnie z ppkt iii) i możliwe rozprzestrzenienie się organizmu, zgodnie z przepisami załącznika V pkt 2 ppkt i);
- b) w przypadku zbiorów roślin żywicielskich organizmu, innych niż wyszczególnione w lit. a), gdy produkcja wyszczególnionego materiału roślinnego zostanie oceniona za ryzykowną:
- i) przeprowadzą badania zgodnie z lit. a) ppkt i); oraz
- ii) oznaczają jako skażone rośliny żywicielskie organizmu, z których została pobrana próbka; oraz
- iii) określą prawdopodobne skażenie i wytyczą strefę ochronną, zgodnie z lit. a) ppkt iii) i ppkt iv), odpowiednio, w odniesieniu do produkcji wyszczególnionego materiału roślinnego;
- c) w przypadku wód powierzchniowych (łącznie z odpadami płynnymi z przetwórstwa przemysłowego lub czyszczeniem, sortowaniem pakowaniem wyszczególnionego materiału roślinnego) oraz dzikorosnących roślin żywicielskich, gdy produkcja wyszczególnionego materiału roślinnego zostanie uznana za ryzykowną, w związku z nawadnianiem, zraszaniem lub zalaniem wodami powierzchniowymi:
- i) ustalą zasady badań, łącznie z urzędową kontrolą w odpowiednich okresach czasu, próbek wody powierzchniowej oraz, jeśli one występują, próbek dzikorosnących roślin żywicielskich z rodziny psiankowatych organizmu, w celu określenia rozmiaru skażenia; oraz
- ii) oznaczają jako skażoną wodę powierzchniową, z której pobrano próbkę(-i), we właściwym zakresie, na podstawie badania zgodnie z ppkt i); oraz
- iii) określą prawdopodobne skażenie i wytyczą strefę skażenia, na podstawie oznaczenia skażenia zgodnie z ppkt ii), oraz możliwe rozprzestrzenienie się organizmu, przy uwzględnieniu przepisów załącznika V pkt 1 oraz pkt 2 ppkt ii).

2. Państwa Członkowskie niezwłocznie powiadomią pozostałe Państwa Członkowskie oraz Komitet, zgodnie z przepisami załącznika V pkt 3, o wszelkich skażeniach oznakowanych zgodnie z ust. 1 lit. a) ppkt ii) oraz ust. 1 lit. c) ppkt ii) oraz o szczegółach dotyczących wytyczonej strefy skażenia, zgodnie z ust. 1 lit. a) ppkt iv) oraz, gdy stosuje się ust. 1 lit. c) ppkt iii), zgodnie z tym ustępem. Szczegółowe informacje o treści powiadomienia, wysłanego zgodnie z tym ustępem są dostarczane do Komitetu.

Państwa Członkowskie w tym samym czasie dostarczą do Komitetu dodatkowe powiadomienia, określone w załączniku V pkt 4. Szczegółowe dane z tego powiadomienia, zgodnie z tym akapitem, zostaną niezwłocznie dostarczone do członków Komitetu.

3. W wyniku powiadomienia wysłanego zgodnie z ust. 2 oraz jego elementów, inne Państwa Członkowskie, wyszczególnione w powiadomieniu, przeprowadzą badania zgodnie z ust. 1 lit. a) ppkt i) oraz, jeśli się stosuje, ust. 1 lit. c) ppkt i) i podejmą dalsze stosowne działania, zgodnie z ust. 1 i 2.

#### Artykuł 6

1. Państwa Członkowskie zarządzają, że wyszczególnionego materiału roślinnego, oznaczonego jako skażony według art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii) nie wolno wysadzać oraz że pod kontrolą i za zgodą upoważnionych organów zostanie on poddany jednemu z przepisów załącznika VI pkt 1, w sposób zapewniający, że nie powstanie możliwe do zidentyfikowania ryzyko rozprzestrzenienia się organizmu.

2. Państwa Członkowskie zarządzają, że wyszczególniony materiał roślinny, określony jako prawdopodobnie zanieczyszczony, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt iii) oraz lit. c) ppkt iii), łącznie z wyszczególnionym materiałem roślinnym, dla którego zidentyfikowano ryzyko, wyprodukowanym na miejscu produkcji oznaczonym jako prawdopodobnie skażone, na mocy art. 5 ust. 1) lit. a) ppkt iii) nie może być wysadzany i zostanie, pod kontrolą upoważnionych organów urzędowych, właściwie zastosowany lub we właściwy sposób przeznaczony na odpady, zgodnie z załącznikiem VI pkt 2, tak że nie powstanie możliwe do zidentyfikowania ryzyko rozprzestrzenienia się organizmu.

3. Państwa Członkowskie zarządzają, że wszelkie maszyny, pojazdy, zbiorniki, magazyny lub ich części oraz jakiegokolwiek inne obiekty, łącznie z materiałem opakowań, oznaczone jako skażone na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii) lub określone jako prawdopodobnie skażone na mocy 5 ust. 1 lit. a) ppkt iii) oraz lit. c) ppkt ii), zostaną albo zniszczone, albo oczyszczone ze skażenia, przy zastosowaniu właściwych metod, zgodnie z załącznikiem VI pkt 3. Po dekontaminacji wszystkie te obiekty nie będą już dłużej uważane za skażone.

4. Bez uszczerbku dla środków wprowadzonych w życie zgodnie z ust. 1, 2 i 3, Państwa Członkowskie zastosują zasadę, że w strefie skażonej, wytyczonej na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt iv) oraz lit. c) ppkt iii), zostanie wprowadzonych szereg środków, wyszczególnionych w załączniku VI pkt 4.1. i 4.2. Szczegółowe informacje o podjętych środkach są co roku dostarczane innym Państwom Członkowskim oraz Komisji. Szczegółowe informacje mogą zostać dostarczone do Komitetu.

#### Artykuł 7

1. Państwa Członkowskie zarządzają, że materiały siewne spełniają wymogi dyrektywy 77/93/EWG oraz pochodzą w linii prostej z materiału siewnego ziemiaka otrzymanego w ramach urzędowo uznanego programu, wolnego od organizmu, zgodnie z badaniami urzędowymi lub przeprowadzonymi pod nadzorem urzędowym, z użyciem odpowiedniej metody, określonej w załączniku II.

Wyżej określone badania są wykonywane przez Państwo Członkowskie:

- a) w przypadkach, w których potwierdzono obecność organizmu w ich własnej produkcji materiału siewnego,
  - i) przez sprawdzenie roślin, od których pochodzi materiał roślinny, łącznie z selekcją materiału do klonowania oraz systematycznym badaniem klonów podstawowego materiału przeznaczonych do sadzenia; lub
  - ii) w przypadkach stwierdzenia braku powinowactwa w zakresie klonowania, poprzez badanie wszystkich podstawowych klonów materiału do sadzenia lub roślin, od których pochodzą, łącznie z elitarnym materiałem siewnym wybranym do klonowania, oraz
- b) w innych przypadkach albo wszystkich roślin z początkowej selekcji do klonowania lub reprezentatywnych próbek materiału siewnego, albo roślin, od których pochodzą.

2. Można przyjąć następujące przepisy, zgodnie z procedurą przewidzianą w art. 16a dyrektywy 77/93/EWG:

- szczegółowe zasady stosowania ust. 1 akapit drugi lit. a),
- zasady odnoszące się do reprezentatywnych próbek, zawarte w ust. 1 akapit drugi lit. b).

#### Artykuł 8

Państwa Członkowskie wprowadzą zakaz przechowywania organizmu oraz manipulowania tym organizmem.

#### Artykuł 9

Bez uszczerbku dla przepisów dyrektywy 77/93/EWG, Państwa Członkowskie mogą zezwolić na odstępstwa od środków określonych w art. 6 i 8 niniejszej dyrektywy, zgodnie z przepisami dyrektywy 95/44/EWG<sup>(1)</sup>, jeśli zamierzają podjąć próby i prace naukowe oraz prace nad selekcją odmianową.

#### Artykuł 10

Państwa Członkowskie mogą przyjąć, w odniesieniu do ich własnej produkcji takie dodatkowe lub bardziej radykalne środki, jakie mogą być potrzebne do zwalczania organizmu, albo dla zapobieżenia jego rozprzestrzenianiu się, w zakresie zgodnym z przepisami dyrektywy 77/93/EWG.

Szczegółowe dane na temat podjętych środków należy dostarczyć do innych Państw Członkowskich i do Komisji. Ponadto szczegółowe informacje o tej notyfikacji mogą zostać przesłane do Komitetu.

#### Artykuł 11

Zmiany w załącznikach do niniejszej dyrektywy, które będą dokonane w wyniku rozwoju wiedzy naukowej lub technicznej, należy przyjąć zgodnie z procedurą przedstawioną w art. 16a dyrektywy 77/93/EWG. W przypadku zastosowania metod ustanowionych w załączniku II oraz środków ustanowionych w załączniku VI pkt 4.1 i 4.2 do niniejszej dyrektywy, zostaje przygotowane sprawozdanie przez Komisję. Sprawozdanie to przedstawia metody i środki oparte na zdobytych doświadczeniach. Raport należy dostarczyć do Komitetu przed dniem 1 stycznia 2002 r.

#### Artykuł 12

1. Państwa Członkowskie wprowadzą w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy przed dniem 21 sierpnia 1999 r. i niezwłocznie powiadomią o tym Komisję.

Środki te zawierają odniesienie do niniejszej dyrektywy lub odniesienie to towarzyszy ich urzędowej publikacji. Metody dokonywania takiego odniesienia określane są przez Państwa Członkowskie.

2. Państwa Członkowskie niezwłocznie przekażą Komisji teksty podstawowych przepisów prawa krajowego, przyjętych w dziedzinach objętych niniejszą dyrektywą. Komisja poinformuje o tym pozostałe Państwa Członkowskie.

<sup>(1)</sup> Dz.U. L 184 z 3.8.1995, str. 34. Dyrektywa ostatnio zmieniona dyrektywą Komisji 97/46/WE (Dz.U. L 204 z 31.7.1997, str. 43).

*Artykuł 13*

Sporządzono w Brukseli, dnia 20 lipca 1999 r.

Niniejsza dyrektywa wchodzi w życie z dniem jej opublikowania w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

*W imieniu Rady*

W. MOLTERER

*Przewodniczący**Artykuł 14*

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

---

## ZAŁĄCZNIK I

## SEKCJA I

**Wykaz roślin żywicielskich dla *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi i wsp., określonych w art. 1**

Rośliny (łącznie z bulwami), inne niż nasiona <i>Solanum tuberosum</i> L.	Ziemniak
Rośliny, inne niż owoce i nasiona <i>Lycopersicon lycopersicum</i> (L) Karsten ex Farw.	Pomidor

## SEKCJA II

**Kontrole**

1. Kontrole urzędowe, określone w art. 2 ust. 2 lit. a) będą oparte na znajomości biologii organizmu oraz uwzględnią specyfikę poszczególnych systemów produkcji w określonym Państwie Członkowskim. Będą one obejmować:
  - i) w przypadku ziemniaka:
    - we właściwym czasie kontrole wzrokowe rosnących roślin i/lub pobranie próbek zarówno materiału siewnego, jak i innych części roślin w okresie wegetacji lub z magazynu. Próbki te zostaną poddane kontroli urzędowej lub pod urzędowym nadzorem, poprzez nacięcie bulw i kontrolę wzrokową, oraz
    - w przypadku materiału siewnego i wtedy, gdy jest to właściwe dla innych części roślin ziemniaków, badanie laboratoryjne urzędowe lub pod urzędowym nadzorem, z użyciem metody wymienionej w załączniku II,
  - ii) w przypadku pomidora:
    - wzrokowa we właściwej fazie wegetacji, w szczególności sadzonek przeznaczonych dla plantacji produkcyjnych.
2. Notyfikacja z urzędowej kontroli, określonej w art. 2 ust. 3 zawiera:
  - i) w przypadku kontroli ziemniaków:
    - oszacowanie areалу (w hektarach) plantacji materiału siewnego i innych ziemniaków,
    - podział według kategorii materiału siewnego oraz sposobu przechowywania, gdzie sytuacja tego wymaga, z uwzględnieniem regionu,
    - liczba oraz czas pobrania próbek do badań,
    - liczba kontroli wzrokowych na plantacjach,
    - liczba (i wielkość próbki) do kontroli wzrokowej bulw;
  - ii) w przypadku kontroli roślin pomidora, przeznaczonych do rozsady, przeprowadzonych w fazie wzrostu roślin,
    - szacunkowa liczba roślin,
    - liczba kontroli wizualnych;
  - iii) w przypadku kontroli roślin żywicielskich organizmu, innych niż ziemniak i pomidor, łącznie z dzikorosnącymi roślinami żywicielskimi z rodziny psiankowatych dla organizmu:
    - gatunek,
    - liczba i czas pobrania próbek,
    - obszar/rzeka, z których pobrano próbki, stosowanie do okoliczności,
    - metody analizy;
  - iv) w przypadku kontroli wody i odpadów płynnych z przemysłowego przetwórstwa lub pomieszczeń do pakowania:
    - liczba i czas pobrania próbek,
    - powierzchnia/rzeka/lokalizacja obiektu, z których pobrano próbki, stosownie do okoliczności,
    - metoda analizy.

## ZAŁĄCZNIK II

**SCHEMAT BADANIA DIAGNOSTYCZNEGO, WYKRYWANIA ORAZ IDENTYFIKACJI RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI I WSP.**

## ZAKRES BADANIA

Przedstawiony schemat opisuje różne procedury, odnoszące się do:

- i) diagnostyki brunatnej zgnilizny ziemniaka oraz bakteryjnego więdnienia ziemniaka i pomidora;
- ii) wykrywania *Ralstonia solanacearum* w próbkach bulw ziemniaka;
- iii) identyfikacji *Ralstonia solanacearum*.

W uzupełnieniach dostarczamy dane szczegółowe, dotyczące przygotowania materiałów do badania, tzn. pożywek, buforów, roztworów oraz odczynników.

## SPIS TREŚCI

SEKCJA I:	<b>Schemat badania</b>	9
	1. Diagnostyka brunatnej zgnilizny ziemniaka oraz więdnienia bakteryjnego ziemniaka i pomidora: .....	9
	2. Wykrywanie oraz identyfikacja <i>Ralstonia solanacearum</i> w próbkach bulw ziemniaka .....	11
SEKCJA II:	<b>Diagnostyka brunatnej zgnilizny ziemniaka oraz więdnienia bakteryjnego ziemniaka i pomidora</b>	13
	1. Objawy .....	13
	2. Szybkie badanie przesiewne .....	13
	3. Procedura izolacji .....	14
	4. Badanie zgodności .....	14
SEKCJA III:	<b>Wykrywanie i identyfikacja <i>Ralstonia solanacearum</i> w próbkach bulw ziemniaka.</b>	17
	1. Przygotowanie próbki do badania .....	17
	2. Badanie immunofluorescencyjne (IF) .....	18
	3. Badanie ELISA) .....	20
	4. Badanie PCR™ .....	20
	5. Badanie selektywnego wysiewania na płytkach .....	22
	6. Badanie biologiczne .....	23
	7. Badanie wzbogacania .....	23
	8. Badanie na patogenność .....	23
Dodatek 1	Pożywki do izolacji i hodowli <i>Ralstonia solanacearum</i> . .....	24
Dodatek 2	Materiały do przygotowywania próbeki .....	25
Dodatek 3	Materiały do badania IF .....	26
Dodatek 4	Oznaczanie poziomu skażenia w badaniu IF .....	27
Dodatek 5	Materiały do badania ELISA .....	28
Dodatek 6	Materiały do badania PCR .....	29
Dodatek 7	Materiały do selektywnego wysiewania na płytkach oraz badania(ń) na wzbogacanie .....	29
Literatura	.....	30

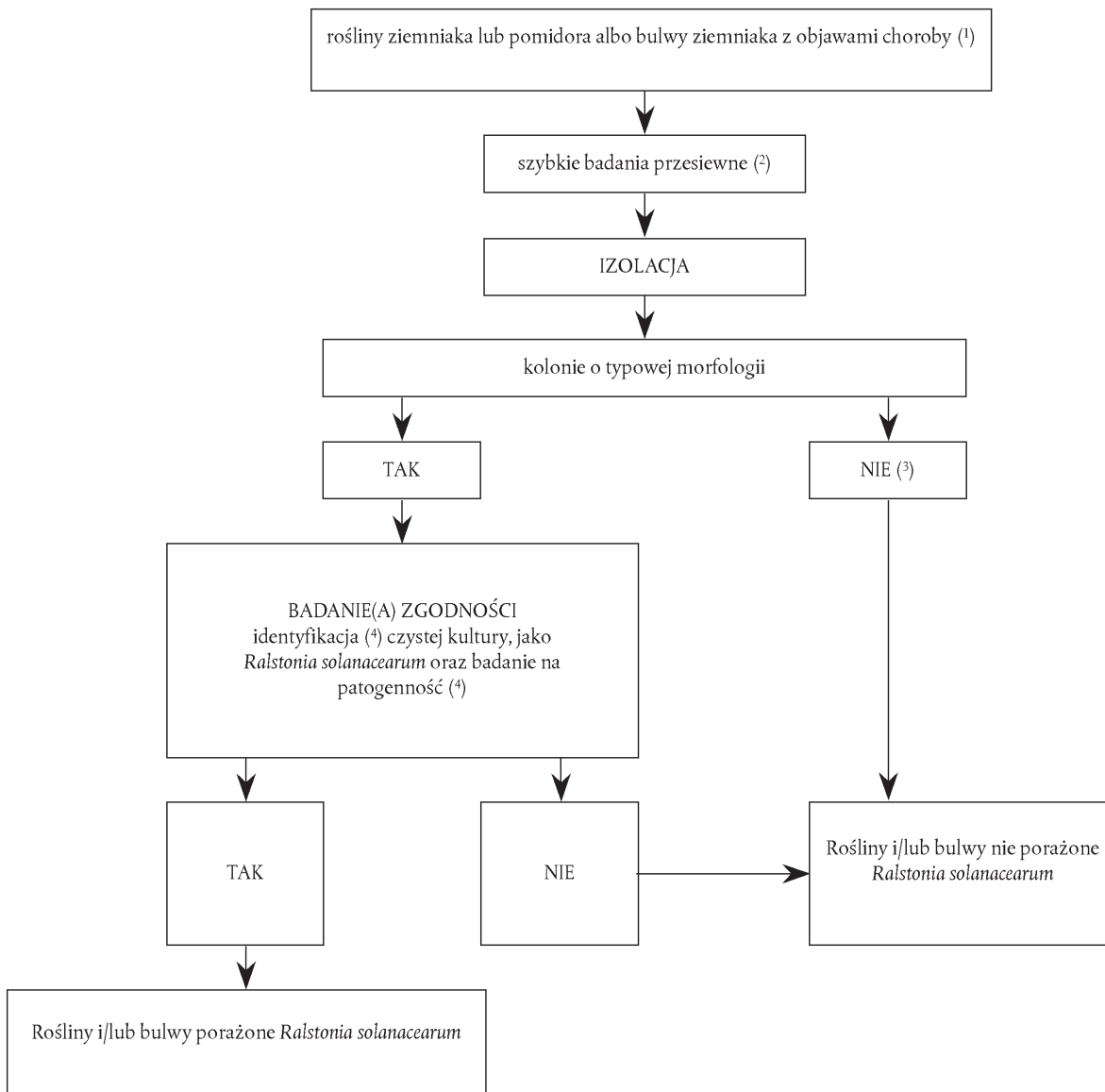
## SEKCJA I

## SCHEMAT BADANIA

## 1. Diagnostyka brunatnej zgnilizny ziemniaka oraz bakteryjnego wędnięcia ziemniaka i pomidora

Procedura badania jest przeznaczona dla bulwy ziemniaka z objawami typowymi dla brązowej zgnilizny, lub pozwalającymi przypuszczać występowanie brązowej zgnilizny oraz dla roślin ziemniaka i pomidora, z objawami typowymi dla wędnięcia bakteryjnego lub podejrzeniem jego wystąpienia. Procedura ta obejmuje szybkie badanie przesiewne, izolację patogenu z porażonej tkanki naczyniowej na pożywkę diagnostyczną oraz, w przypadku wyniku pozytywnego, identyfikację hodowli jako *Ralstonia solanacearum*.

Schemat blokowy procedury



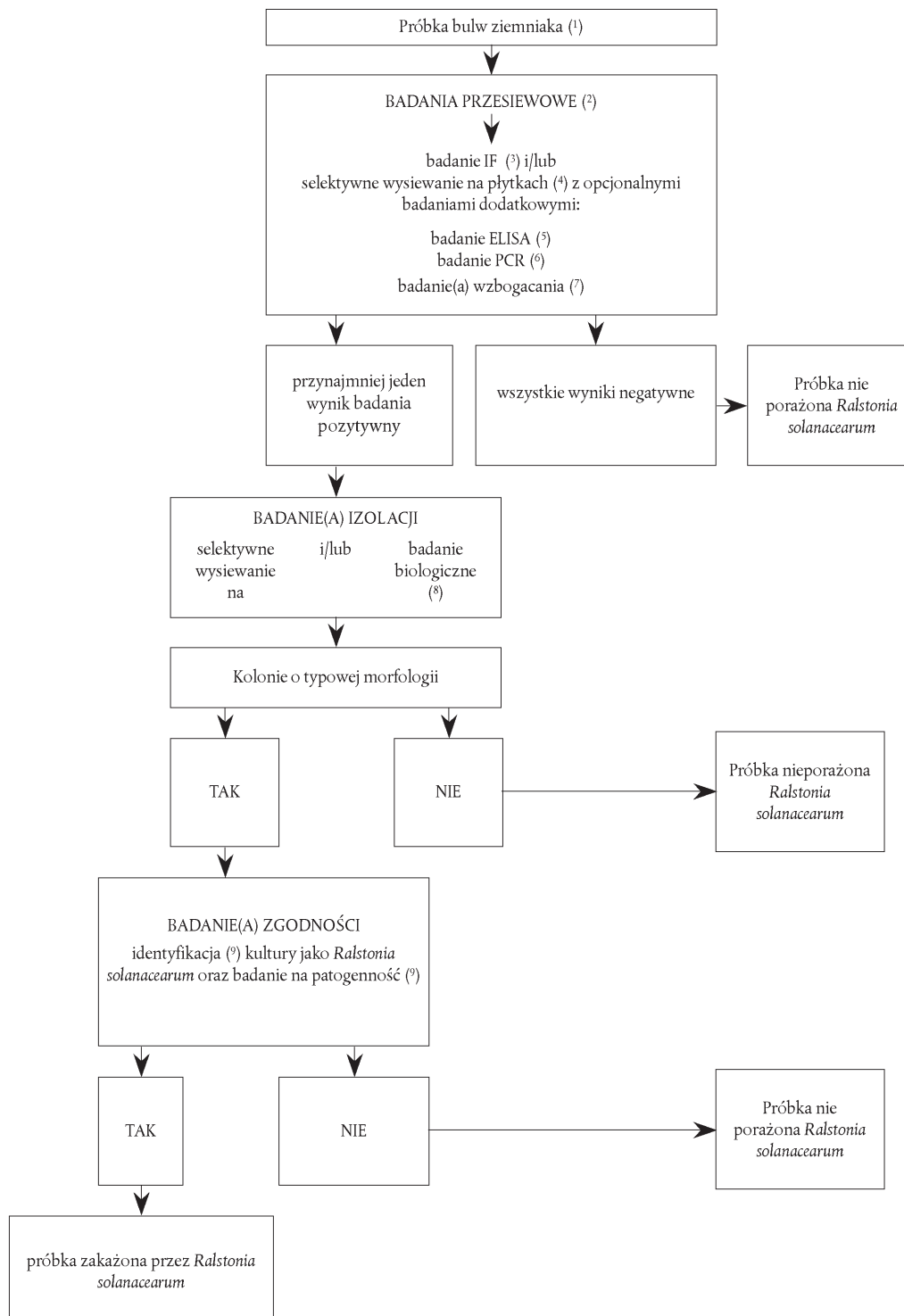
Objaśnienia do schematu:

- (<sup>1</sup>) Opis objawów znajduje się w sekcji II.1.
- (<sup>2</sup>) Szybkie badania przesiewne ułatwiają wstępną diagnozę.  
Właściwe badania to:
- badanie przepływu przez tkankę naczyniową łodygi (sekcja II ust. 2),
  - badanie na obecność granulek poli-β-hydroksymaślanu (sekcja II ust. 2),
  - badanie IF (sekcja III ust. 2),
  - badanie ELISA (sekcja III ust. 3),
  - badanie PCR (sekcja III ust. 4).
- (<sup>3</sup>) Izolacja patogenu z materiału roślinnego o typowych objawach chorobowych przez posiew na płytkach jest metodą prostą, ale hodowla może się nie udać w przypadkach zaawansowanych stadiów infekcji. Bakterie saprofityczne, które rosną na porażonych tkankach, mogą je przerastać lub mogą hamować wzrost patogenu w pożywce izolacyjnej. W przypadku gdy badania izolacji są negatywne, ale objawy choroby mają charakter typowy, należy powtórzyć izolację, najlepiej wykonując selektywne badanie wysiewania na płytkach.
- (<sup>4</sup>) Wiarygodną identyfikację czystej kultury *Ralstonia solanacearum* otrzymuje się przy zastosowaniu przynajmniej jednego z badań wyszczególnionych w sekcji II.4.1, w połączeniu z badaniem na patogenność (sekcja II.4.3). Charakterystyka szczepu jest opcjonalna, ale zaleca się wykonanie jej w każdym nowym przypadku.

## 2. Wykrywanie oraz identyfikacja *Ralstonia solanacearum* w próbkach bulw ziemniaka

Procedurę opracowano dla wykrywania utajonych infekcji bulw ziemniaka, przy użyciu jednego, a najlepiej więcej niż jednego badania przesiewowego. W przypadku wyniku pozytywnego te badania należy uzupełnić izolując patogen, a w przypadku izolacji typowych kolonii, poprzez identyfikację czystej kultury jako *Ralstonia solanacearum*.

Schemat blokowy procedury



## Objaśnienia do schematu:

- (<sup>1</sup>) Wielkość próbek  
Standardowa wielkość próbki obejmuje 200 bulw. Jednakże procedurę można zastosować do próbek zawierających mniej niż 200 bulw.
- (<sup>2</sup>) Badanie(-a) przesiewowe  
Pojedyncze badanie może okazać się niewystarczająco czułe lub wiarygodne do wykrywania *Ralstonia solanacearum* w próbce. Dlatego zaleca się wykonanie więcej niż jednego badania. Najlepiej byłoby, gdyby badania opierały się na różnych podstawach biologicznych.
- (<sup>3</sup>) Badanie immunofluorescencyjne (IF)  
Badanie IF jest badaniem o dobrych podstawach analitycznych. Stanowi to o jego przewadze nad innymi badaniami, które są obecnie na etapie dopracowywania lub nie zostały jeszcze w pełni uwiarygodnione. Badanie IF stosuje się do wielu innych bakterii objętych ustawą, takich jak np. *Clavibacter michiganensis* odmiana *sepedonicus*. Jest ono czułym badaniem (próg czułości wynosi  $10^4$ – $10^5$  komórek na 1 ml ekstraktu z ziemniaka).  
Czynnikiem krytycznym dla wiarygodności badania IF jest jakość surowicy. Dopuszczalna jest jedynie surowica o wysokim mianie (co najmniej 2000 dla normalnej surowicy). Wszystkie badania trzeba wykonywać stosując odpowiednie miano surowicy i przynajmniej jedno rozcieńczenie poniżej poziomu miana surowicy. Preferowana jest metoda pośrednia. Metodę bezpośrednią można stosować jedynie wtedy, gdy badanie wykazuje czułość i specyficzność odpowiadające metodzie pośredniej.  
Badanie IF daje korzyści związane z subiektywną metodą interpretacji morfologii wybarwionych komórek oraz pomiarem intensywności fluorescencji, informującej o specyficzności reakcji. Często obserwuje się reakcje krzyżowe serologicznie spokrewnionych bakterii pochodzących z gleby, lub zawartych w tkankach ziemniaka o morfologii komórek odpowiadającej *Ralstonia solanacearum*. Badanie IF można stosować jako jedyne badanie przesiewowe, choć w przypadku podejrzenia wystąpienia reakcji krzyżowych należy wykonać dodatkowe badanie przesiewowe, oparte na innej zasadzie biologicznej. W takim przypadku najważniejsze jest badanie selektywne wysiewania na płytkach.
- (<sup>4</sup>) Badanie selektywne wysiewania na płytkach  
Jest to specyficzne i selektywne badanie na obecność *Ralstonia solanacearum*, pod warunkiem zastosowania zmodyfikowanej pożywki SMSA oraz przedstawionej metodyki pracy. Wynik otrzymuje się po 3–6 dniach od przygotowania próbki. Patogen otrzymuje się bezpośrednio w hodowli i można go łatwo zidentyfikować. Aby w pełni wykorzystać przeprowadzone badanie, należy bardzo starannie przygotować próbkę, aby uniknąć zanieczyszczenia jej bakteriami wtórnymi, obecnymi na bulwie ziemniaka, które współzawodniczą w wykorzystaniu pożywki z *Ralstonia solanacearum* i mogą hamować wzrost patogenu. Niektóre szczepy mogą słabo rosnąć na pożywce, gdy składniki pożywki wywierają ujemny wpływ na organizm docelowy. Wymagana jest także dokładność, podczas różnicowania *Ralstonia solanacearum* od innych bakterii, które mogą rosnąć na pożywce. Sелеktywny posiew na płytkach może być stosowany jako jedyne badanie przesiewowe, gdy nie podejrzewa się inhibicji wzrostu *Ralstonia solanacearum* przez inne bakterie na płytce. Negatywny wynik badania powinno się zweryfikować stosując inne badanie pozwalające potwierdzić lub wykluczyć obecność tego organizmu. W takich przypadkach najlepszym badaniem jest badanie IF.
- (<sup>5</sup>) Badanie ELISA  
Badanie ELISA jest generalnie mniej czułe niż badanie IF (próg czułości wynosi  $10^2$ – $10^1$  komórek na 1 ml ekstraktu ziemniaka). To badanie jest tanie i szybkie, ale generalnie częściej daje mylne pozytywne wyniki (reakcje krzyżowe) oraz mylne ujemne wyniki (inhibicja przez cząsteczki fenoli obecne w ekstrakcie z ziemniaka). Wymagania odnośnie do specyficzności surowicy są wyjątkowo wysokie. Dlatego badania ELISA nie można stosować jako jedyne badania przesiewowego.
- (<sup>6</sup>) Badanie PCR  
Badanie PCR cechuje się bardzo czułym wykrywaniem, choć reakcja jest łatwo hamowana przez składniki ekstraktu roślinnego lub ekstraktu z bulwy, co daje wyniki fałszywie ujemne. Niektóre wyhodowane szczepy ziemniaka zawierają więcej inhibitorów niż inne szczepy. Dlatego konieczne jest usunięcie tych inhibitorów. Inhibicję można zmniejszyć poprzez rozcieńczanie, lecz w tym przypadku rozcieńcza się także populację *Ralstonia solanacearum*. Należy zachować szczególną ostrożność na wszystkich etapach przygotowania próbki oraz przygotowania badania tak, aby zapobiec zanieczyszczeniu, które mogłoby spowodować fałszywie pozytywny wynik. Można również otrzymać wynik fałszywie pozytywny w przypadku homologii sekwencji innych organizmów. Z tego powodu nie można używać bezpośredniego badania PCR jako pojedynczego badania przesiewowego.
- (<sup>7</sup>) Badanie na wzbogacanie  
Inkubacja próbek z ekstraktu ziemniaka w hodowli semi-selektywnej, takiej jak hodowla na pożywce SMSA, umożliwi namnożenie *Ralstonia solanacearum*. Co jednak jest bardziej istotne, umożliwi także rozcieńczenie potencjalnych inhibitorów w badaniu ELISA lub PCR. Można wykryć *Ralstonia solanacearum* we wzbogaconej hodowli stosując badanie IF, ELISA lub PCR. Nie zalecamy jednak bezpośredniego wysiewania na płytki z hodowli wzbogaconej. Metody wzbogacania nie zostały dostatecznie sprawdzone i przebadane. Zostały umieszczone w niniejszym badaniu, ponieważ wykazują potencjalnie duże możliwości. Ze względu na stosunkowo małe doświadczenie w wykorzystaniu badań, nie mogą być one stosowane jako pojedyncza metoda wykrywania poszukiwanego organizmu.
- (<sup>8</sup>) Badanie biologiczne  
Badanie biologiczne stosowane jest do izolacji *Ralstonia solanacearum* z ekstraktu ziemniaka, na drodze selektywnego wzbogacania rośliny żywicielskiej. Można go przeprowadzić, wykorzystując rośliny pomidora lub psianki podłużnej. Badanie wymaga optymalnych warunków inkubacji, takich jak opisane w tej metodzie. Bakterie będące inhibitorami *Ralstonia solanacearum* na pożywce SMSA najprawdopodobniej nie będą stanowić przeszkody w wykonaniu badania.
- (<sup>9</sup>) Badanie(-a) zgodności  
Wiarygodną identyfikację czystej kultury *Ralstonia solanacearum* osiąga się, stosując co najmniej jedno z badań wyszczególnionych w sekcji II.4.1, w połączeniu z badaniem na patogenność (sekcja I.4.3). Charakteryzacja szczepu jest opcjonalna, ale zaleca się ją w każdym nowym przypadku.

## SEKCJA II

## Diagnostyka brązowej zgnilizny bulw ziemniaka oraz bakteryjnego więdnienia roślin ziemniaka i pomidora

## 1. Objawy

## 1.1. Objawy u ziemniaka

*Roślina ziemniaka.* Wczesnym stadium infekcji jest więdnienie liści w kierunku wierzchołka rośliny w wysokiej temperaturze panującej w ciągu dnia oraz poprawa ich stanu w ciągu nocy. W szybkim czasie więdnienie staje się nieodwracalne i prowadzi do śmierci całej rośliny. Tkanka naczyniowa w łodygach wyciętych w poprzek więdnącej rośliny może brązowieć, a z przeciętej powierzchni wypływa mleczny płyn. Można go też wycisnąć z rośliny. Gdy uciętą łodygę wstawi się pionowo do wody, z wiązek naczyniowych będzie wypływać śluz.

*Bulwa ziemniaka.* Bulwy ziemniaka należy przecinać poprzecznie do pępka (pęd podziemny). Wczesne stadium infekcji manifestuje się odbarwieniem szklisto żółtym do lekko brązowego pierścienia naczyniowego, na którym po kilku minutach zacznie pojawiać się kremowy wyciek. Można go też wywołać naciskając lekko kciukiem skórki w pobliżu naciętej powierzchni. Później odbarwienie naczyniowe staje się bardziej brązowe, a martwica tkanki może rozciągnąć się na tkankę miąższową. W zaawansowanych stadiach choroby infekcja posuwa się poza pępek i oczka. Może to prowadzić do czerwono-brązowych, lekko zapadniętych ubytków na skórcie, z których mogą wypływać bakterie, co powoduje przyleganie cząstek glebowych do bulwy.

## 1.2. Objawy występujące u pomidora

*Roślina pomidora.* Pierwszym wizualnym objawem jest obwisły wygląd najmłodszych liści. W korzystnych dla patogenu warunkach środowiska (temperatura gleby powyżej 25 °C oraz wysoka wilgotność powietrza) w ciągu kilku dni następuje epinastia oraz więdnienie jednej strony lub całej rośliny, co prowadzi do pokładania się rośliny. W warunkach mniej korzystnych dla patogenu (temperatura gleby niższa od 21 °C), na łodydze może rozwinąć się wiele nowych korzeni. Można zaobserwować tłustawy pasek dookoła łodygi, który świadczy o martwicy układu naczyniowego. Po przecięciu łodygi odbarwione, brązowe tkanki naczyniowe wydzielają krople białego lub żółtawego płynu bakteryjnego.

## 2. Szybkie badania przesiewowe

Szybkie badania przesiewowe ułatwiają wstępną diagnozę. Należy zastosować jeden lub kilka z poniższych badań:

*Badanie wypływu cieczy z łodygi*

Obecność *Ralstonia solanacearum* w więdnących łodygach ziemniaka lub pomidora można stwierdzić, wykonując poniższy proste badanie wstępne:

Uciąć łodygę tuż nad poziomem gleby. Umieścić odciętą powierzchnię łodygi w zlewce napełnionej wodą. Po krótkim czasie wypłynie samoczynnie śluz z wiązek naczyniowych. Żadne inne bakterie wywołujące infekcję naczyniową roślin ziemniaka i pomidora nie dają takich objawów.

*Wykrywanie granulek poli-β-hydroksymasłanu (PHB)*

Granulki PHB w komórkach *Ralstonia solanacearum* można zobaczyć, wybarwiając je błękitem Nilu A lub czernią Sudanową B.

Przygotować rozmaz wycieku tkanki na szkiełku mikroskopowym albo rozmaz z 48-godzinnej hodowli na pożywce YPGA lub SPA (dodatek 1). Przygotować dodatkowo rozmazy kontrolne ze szczepu biovar2/forma 3, oraz jeśli konieczne, przygotować do analizy negatywny rozmaz ze szczepu heterologicznego. Pozostawić rozmazy do wyschnięcia. Ogrzać dolną część szkiełka kilkakrotnie w płomieniu. Rozmaz powinien się dobrze utrwalić na powierzchni.

*Badanie z błękitem Nilu*

1) Zanurzyć utrwalony rozmaz w 1 % wodnym roztworze błękitu Nilu A.

Inkubować przez 10 minut w temperaturze 55 °C.

2) Odsączyć roztwór barwiący. Opłukać szkiełko pod kranem z bieżącą wodą. Usunąć nadmiar wody bibułą.

3) Zanurzyć rozmaz w 8 % wodnym roztworze kwasu octowego.

Inkubować przez 1 minutę w temperaturze otoczenia.

4) Opłukać delikatnie pod bieżącą wodą z kranu. Osuszyć przez przyłożenie bibuły.

5) Ponownie zwilżyć rozmaz kroplą wody. Nałożyć szkiełko przykrywkowe.

6) Zbadać rozmaz pod mikroskopem epifluorescencyjnym w świetle 450 nm, pod warstwą oleju imersyjnego, przy powiększeniu 1000 razy.

Sprawdzić, czy pojawi się jasna, pomarańczowa fluorescencja granulek PHB. Sprawdzić także w świetle normalnym, czy wewnątrz komórek znajdują się granulki i czy morfologia komórek ma cechy typowe dla *Ralstonia solanacearum*.

**B a d a n i e z c z e r n i ą S u d a n o w ą B**

- 1) Zanurzyć utrwalony rozmaz w 0,3 % roztworze czerni Sudanowej B w 70 % alkoholu etylowego. Inkubować przez 10 minut w temperaturze otoczenia.
- 2) Zlać roztwór barwiący. Krótco płukać szkiełko pod bieżącą wodą z kranu. Zlać nadmiar wody. Osuszyć nadmiar wody bibułą.
- 3) Zanurzyć rozmaz na chwilę w ksylenie (dwumetylobenzenie). Osuszyć szkiełko na bibule.

Uwaga! Ksylen jest substancją szkodliwą dla zdrowia. Pracować pod digestorium.

- 4) Zanurzyć rozmaz w 0,5 % (w/v) wodnym roztworze safraniny i pozostawić na 10 sekund w temperaturze otoczenia.

Uwaga! Safranina jest substancją szkodliwą dla zdrowia. Pracować pod digestorium.

- 5) Wypłukać rozmaz delikatnie wodą z kranu. Osuszyć je na bibule. Nałożyć szkiełko przykrywkowe.

- 6) Zbadać wybarwiony rozmaz pod mikroskopem, stosując światło przepuszczone, pod warstwą olejku imersyjnego, przy powiększeniu 1 000 razy.

Granulki PHB w komórkach *Ralstonia solanacearum* wybarwiają się na kolor czarno - niebieski. Ściany komórkowe wybarwiają się na różowo.

**I n n e b a d a n i a**

Inne badania przesiewowe, odpowiednie dla *Ralstonia solanacearum*, to badanie immunofluorescencyjne (IF) (sekcja III.2), badanie ELISA (sekcja III.3) oraz badanie łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR) (sekcja III.4).

**3. Procedura izolacji**

- 3.1 Pobrać wyciek z tkanki lub fragmenty odbarwionej tkanki z pierścienia naczyniowego bulwy ziemniaka, albo z naczyń łodygi rośliny ziemniaka lub pomidora. Zanurzyć je w niewielkiej ilości sterylnej wody destylowanej lub 50 mM buforu fosforanowego. Pozostawić na 5–10 minut.
- 3.2 Przygotować serię dziesięciokrotnych rozcieńczeń zawiesiny, np. 1/10 oraz 1/100, lub większych rozcieńczeń, stosownie do potrzeb.
- 3.3 Przenieść standardową objętość zawiesiny i jej rozcieńczeń na pożywkę uniwersalną (NA, YPGA I SPA dodatek 1) i/lub na pożywkę tetrazolową Kelmana (dodatek 1) i/lub na selektywną pożywkę SMSA (dodatek 7). Rozmazać zawiesinę po płytce lub nałożyć ją na płytkę przez dotyk. W razie potrzeby przygotować oddzielne płytki z każdą z pożywek i rozcieńczoną zawiesiną kultury z wirulentnego szczepu *Ralstonia solanacearum* z biotypu 2/rasy 3, jako pozytywną próbkę kontrolną.
- 3.4 Inkubować płytki przez trzy dni w temperaturze 28 °C. Inkubację można przedłużyć do sześciu dni, w razie powolnego wzrostu, ale kolonie na płytkach z pożywką SMSA często tracą typowy charakter i giną.

Na pożywkach uniwersalnych wirulentne szczepy *Ralstonia solanacearum* rosną w postaci kolonii perłowo-białych, płaskich, nieregularnych i ciekłych, z charakterystycznymi spiralami.

Na pożywce tetrazolowej Kelmana typowe kolonie wirulentnych szczepów *Ralstonia solanacearum* są kremowe, płaskie, nieregularne i ciekłe, z krwistoczerwonymi spiralami w centrum. Awirulentne postacie *Ralstonia solanacearum* rosną jako maślane kolonie o głębokiej barwie czerwonej.

Na pożywce SMSA, typowe kolonie wirulentne *Ralstonia solanacearum* są mlecznobiałe, płaskie, nieregularne i ciekłe, z krwistoczerwonym zabarwieniem pośrodku.

Awirulentne postacie *Ralstonia solanacearum* rosną na pożywce SMSA jako kolonie mniej ciekłe, całkowicie zabarwione, różowo aż do czerwieni.

- 3.5 Oczyszczyć kolonie o charakterystycznej morfologii, prowadząc hodowlę na pożywce uniwersalnej. Należy unikać zbędnego powtarzania hodowli, które może prowadzić do utraty wirulencji.

**4. Badanie(-a) zgodności**

- 4.1. Identyfikacja *Ralstonia solanacearum*

Zidentyfikować kultury *Ralstonia solanacearum*, stosując przynajmniej jedną z podanych poniżej metod:

**B a d a n i a n a m n a ż a n i a i e n z y m a t y c z n e**

Uwaga: W każdym z badań wykonaj kontrolną próbę na szczepie kontrolnym.

Barwnik fluorescencyjny	-
Inkluzje PHB	+
Badanie utleniania/fermentacji (O/F)	O+/F-
Katalaza	+
Oksydaza Kovacsza	+
Redukcja azotanu	+
Zużycie cytrynianu	+
Wzrost w temp. 40 °C	-
Wzrost na 1 % NaCl	+
Wzrost na 2 % NaCl	-
Dihydrolaza argininy	-
Upłynnianie żelatyny	-
Hydroliza skrobi	-
Hydroliza esuliny	-
Produkcja lewanu	-

Pożywki i metody podane w publikacji: Lelliott i Stead (1987).

#### B a d a n i e I F

Przygotować zawiesinę  $10^3$  komórek w 1 ml, ze szczepów z hodowli i szczepu kontrolnego. Przygotować serię dwukrotnych rozcieńczeń surowicy. Zastosować procedurę badanie IF (sekcja III.2). Miano IF hodowli musi być równoważne mianu z kontrolnej próby pozytywnej.

#### B a d a n i e E L I S A

Przygotować zawiesinę zawierającą więcej niż  $10^4$  komórek w 1 ml szczepów z hodowli i szczepu kontrolnego. Zastosować procedurę badania ELISA (sekcja II.3). Wartość ELISA dla hodowli musi być równoważna wartości dla pozytywnej kultury kontrolnej.

#### B a d a n i e P C R

Przygotować zawiesinę  $10^4$  komórek w 1 ml, ze szczepów z hodowli oraz szczepu kontrolnego. Zastosować procedurę PCR (sekcja III.4). Produkt PCR z hodowli musi mieć tę samą wielkość i wynik analizy enzymem restrykcyjnym (REA), co pozytywne badanie kontrolne.

#### F l u o r e s c e n c y j n a h y b r y d y z a c j a *in-situ* (FISH)

Przygotować zawiesinę  $10^4$  komórek w 1 ml, ze szczepów z hodowli oraz szczepu kontrolnego. Zastosować procedurę FISH (van Beuningen i wsp., 1995), używając primeru PCR OLI-1 (Seal i wsp., 1993). Kultura z hodowli musi dawać tę samą reakcję co pozytywna kultura kontrolna.

#### O z n a c z a n i e p r o f i l u b i a ł k o w e g o

Przeprowadzić na żelu poliakryloamidowym elektroforezę zdenaturowanych białek z całych komórek kultury – PAGE (Stead, 1992a).

#### O z n a c z a n i e p r o f i l u k w a s ó w t ł u s z c z o w y c h (FAP)

Hodować kulturę badaną oraz pozytywny szczep kontrolny przez 48 godzin w temperaturze 28 °C na trypsynowym agarze sojowym i zastosować procedurę FAP (Janse, 1991; Stead 1992a; Stead 1992b). Profil kultury musi być identyczny z profilem dla pozytywnej hodowli kontrolnej. W szczególnych warunkach otrzymuje się następującą charakterystykę składu kwasów tłuszczowych: 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH oraz 18:1 2OH.

#### 4.2. C h a r a k t e r y z a c j a s z c z e p u

Wykonanie charakteryzacji szczepu nie jest obowiązkowe, ale w każdym nowym przypadku zaleca się wykonanie przynajmniej jednej z poniższych analiz:

## Określenie biotypu

*Ralstonia solanacearum* dzieli się na grupy ze względu na ich zdolność do wytwarzania kwasu z trzech alkoholi heksozowych i trzech cukrów (Hayward, 1964 & 1994):

	Biotyp				
	1	2	3	4	5
— Wykorzystanie:					
— maltozy	-	+	+	-	+
— laktozy	-	+	+	-	+
— celobiozy	-	+	+	-	+
— manitu	-	-	+	+	+
— sorbitu	-	-	+	+	-
dulcytu	-	-	+	+	-

Dodatkowe badania różnicujące biotyp 2 na subfenotypy (Hayward, 1994):

	Biotyp 2	Biotyp 2-A	Biotyp 2-T
wykorzystanie trehalozy	-	+	+
wykorzystanie inozytu	+	-	+
wykorzystanie D-rybozy	-	-	+
aktywność pektolityczna	niska	niska	wysoka

## Oznaczenie szczepu

Szczep kultury (Buddenhagen i wsp., 1962) można wyznaczyć w oparciu o badanie na patogenność wobec roślin pomidora lub psianki podłużnej oraz roślin tytoniu i na podstawie reakcji nadwrażliwości (HR) w liściach tytoniu (Lozano i Sequeira, 1970):

	Szczep (*)		
	1	2	3
Reakcja w:			
— roślinach pomidora/psianki podłużnej	więdnienie	brak reakcji	więdnienie
— roślinach tytoniu	więdnienie	brak reakcji	brak reakcji
— liściach tytoniu	martwica (48 godz.) i więdnienie (7–8 dni)	HR (12–24 godz.)	chloroza (2–8 dni)

(\*) Nie uwzględniono formy 4 (patogenna wobec imbiru i kilku innych roślin żywicielskich) oraz postaci 5 (patogenna jedynie wobec morwy).

Charakteryzacja szczepu z wykorzystaniem badania na patogenność lub nadwrażliwość tytoniu może nie być wysoce wiarygodna. Można ją wydedukować z danych o różnorodności biologicznej i naturalnej roślinie żywicielskiej.

Kulturę można ponadto scharakteryzować na podstawie:

Danych o genomie

Różnicowanie molekularne szczepów kompleksu *Ralstonia solanacearum* można zrealizować na drodze analizy:

RFLP (Cook i wsp., 1989)

Powtarzanego sekwencjonowania PCR (REP-, ERIC-, BOX-PCR) (Louws i wsp., 1995; Smith i wsp., 1995).

## 4.3. Badanie na patogenność

Badanie to służy do potwierdzania diagnozy *Ralstonia solanacearum* oraz do określania wirulencji kultur zidentyfikowanych jako *Ralstonia solanacearum*.

Przygotować inokulum z  $10^4$  komórek na 1 ml kultury oraz pozytywny szczep kontrolny. Zaszczepić 5–10 roślin pomidora lub psianki podłużnej, najlepiej na poziomie 3. właściwego liścia lub starszego liścia (sekcja III ust. 6). Hodować roślinę przez okres do dwu tygodni w temperaturze 22–28 °C, zachowując wysoką wilgotność. Codziennie ją podlewać. Obserwować więdnienie i/lub epinastię, chlorozę, zahamowanie rozwoju.

Wyizolować kulturę z roślin wykazujących objawy porażenia, w następujący sposób:

— Pobrać wycinek tkanki z łodygi, 2 cm powyżej punktu zaszczepienia.

— Rozdrobnić ją i zawiesić w małej objętości sterylnej wody destylowanej lub 50 mM buforu fosforanowego. Następnie nanieść zawiesinę na płytkę, hodować i sprawdzić, czy pojawiły się typowe kolonie *Ralstonia solanacearum*.

## SEKCJA III

## WYKRYWANIE ORAZ IDENTYFIKACJA RALSTONIA SOLANACEARUM W PRÓBKACH BULW ZIEMNIAKA

Uwaga: Standardowa wielkość próbki wynosi 200 bulw. Procedurę można również stosować do próbek mniejszych niż 200 bulw.

**1. Przygotowanie próbki do badania**

Uwaga: Ekstrakt ziemniaka otrzymany według niniejszej procedury można także stosować do wykrywania *Clavibacter michiganensis* odmiana *sepedonicus*.

Wstępne badanie opcjonalne, jeśli uważane jest za użyteczne:

- i) Hodować próbkę w temperaturze 25–30 °C, przez okres do dwu tygodni tak, by namnożyć populację *Ralstonia solanacearum*.
- ii) Umyć bulwy pod bieżącą wodą, zawierającą właściwe środki odkażające i detergenty. Wysuszyć bulwy powietrzem.

- 1.1 Pobrać czystym i zdezynfekowanym skalpelem lub nożem do warzyw skórkę przy pępku bulwy, w taki sposób, by odsłonić przede wszystkim tkankę naczyniową. Starannie odciąć mały stożek (o średnicy 3–5 mm) z tkanki naczyniowej od strony pępka. Ograniczyć ilość tkanki innej niż naczyniowa do minimum. Powtórzyć tę samą operację na wszystkich bulwach z próbki.

Uwaga: Na tym etapie można obserwować bulwy (sekcja II.1). Odłożyć na bok wszystkie bulwy wykazujące objawy choroby lub widoczną zgniliznę i badać je oddzielnie (sekcja II).

- 1.2 Zebrać końcówki bulw i zamknąć w szczelnym pojemniku. Najlepiej wykonać wszystkie prace od razu. Jeżeli jednak nie będzie to możliwe, przechować je nie dłużej niż przez 24 godziny w temperaturze otoczenia lub 72 godziny w temperaturze 4 °C.

- 1.3 Przygotować końcówki bulw w następujący sposób:

- i) Przenieść końcówki do odpowiedniego pojemnika.

Dodać wystarczającą ilość buforu macerującego (dodatek 2) tak, by całkowicie przykrył końcówki.

Rozdrobnić końcówki w homogenizatorze Waringa lub Ultra Thurrax, aż do pełnej homogenizacji tkanki. Unikać nadmiernej homogenizacji.

Moczyć macerat przez 15–30 minut.

- ii) Przenieść końcówki do odpowiedniego pojemnika.

Dodać odpowiednią objętość buforu macerującego tak, by przykryć końcówki.

Umieścić pojemnik na wytrząsarce rotacyjnej.

Wytrząsać go przy obrotach 50–100 obr/min, przez 4 godziny, w temperaturze 20–22 °C lub przez 16–24 godziny w temperaturze 4 °C.

- iii) Przenieść końcówki do jednorazowego pojemnika maceracyjnego (np. Stomachera, o wymiarach 105 mm x 150 mm, wysterylizowanego promieniowaniem).

Pokruszyć starannie końcówki, stosując odpowiednie narzędzie, np. tłuczek, aż do pełnej homogenizacji.

Dodać odpowiednią objętość buforu maceracyjnego tak, by przykryć końcówki bulw.

Prowadzić sedimentację maceratu przez 15–30 minut.

- 1.4 Wyekstrahować bakterie z końcówek bulw, stosując jedną z poniżej podanych procedur:

- i) Zdekantować delikatnie macerat do pojemnika wirówki, pozostawiając resztki tkanki w pojemniku maceracyjnym. Jeśli zdekantowany macerat będzie mętny, odwirować go, ale nie mocniej niż przy obrotach 180 g, przez 10 minut, w temperaturze poniżej 10 °C.

Odwirować zdekantowany macerat, lub płyn z pierwszego wirowania przy obrotach 7 000 g, przez 15 minut lub przy obrotach 10 000 g, przez 10 minut, w temperaturze poniżej 10 °C.

Oddzielić płyn, nie naruszając osadu.

- ii) Przesączyć macerat przez filtr o wielkości oczek 40–100 µm. Przyspieszyć sączenie stosując pompę próżniową.

Zebrać przesącz w pojemniku wirówki.

Odmyć filtr buforem maceracyjnym.

Odwirować przesącz przy obrotach 7 000 g przez 15 minut, lub przy obrotach 10 000 g przez 10 minut w temperaturze poniżej 10 °C.

Oddzielić płyn nie naruszając osadu.

1.5 Zawiesić ponownie osad w 1 ml buforu (dodatek 2).

Podzielić całość na dwie równe części i przenieść każdą z nich do mikroprobówki.

Użyć jedną z mikroprobówek do przeprowadzenia badania. Zachować pozostałą część ekstraktu w temperaturze 4 °C, aż do zakończenia badania.

Dodać 10–25 % objętości sterylnej gliceryny do drugiej mikroprobówki. Wstrząsnąć mikroprobówkę. Przechowywać ją w temperaturze –18 °C (na okres tygodni) lub w temperaturze –70 °C (przez kilka miesięcy).

## 2. Badanie IF

Stosować surowicę *Ralstonia solanacearum*, najlepiej typu szczep 3/biotyp 2. Oznaczyć miano zawiesiny  $10^4$  komórek w 1 ml ze szczepu homologicznego *Ralstonia solanacearum*, stosując właściwe rozcieńczenie koniugatu izotiocyjanianu (rodanku) fluoresceiny (FITC), zgodnie z zaleceniami producenta. Nie oczyszczona surowica powinna mieć miano IF nie niższe niż 1:2000.

Użyć szkiełek mikroskopowych o wielu zagłębieniach, najlepiej – 10 lub więcej zagłębień, 6 mm.

Nałożyć kontrolny koniugat FITC na wszystkie szkiełka. Badanie należy powtórzyć także dla PBS, jeśli w przypadku choć jednej kontrolnej próby FITC zaobserwuje się wynik pozytywny.

Przygotować oddzielne szkiełka kontrolne, z zawiesiną  $10^4$  komórek w 1 ml, ze szczepu z odpowiedniego typu szczep/biotyp *Ralstonia solanacearum*. W każdej z serii badań użyć jednego takiego szkiełka.

2.1 Przygotować szkiełka do badań, stosując jedną z poniższych procedur:

i) Dla próbek zawierających stosunkowo niewiele skrobi:

Odmierzyć pipetą standardową objętość (15 µl odpowiada 6 mm średnicy końcówki – dla większych końcówek odmierzyć odpowiednio większą objętość) zawiesiny na szereg zagłębień. Drugi szereg można wykorzystać do powtórzenia badania lub można je przeznaczyć do analizy drugiej próbki, patrz rysunek 1.

ii) Dla innych próbek:

Przygotować dziesiętne rozcieńczenia, np. 1/10, 1/100 i 1/1000 zawiesiny w buforze. Odmierzyć standardową objętość (15 µl odpowiada 6 mm średnicy otwory – dla większych otworów odmierzyć proporcjonalnie większą objętość) zawiesiny na szereg zagłębień. Drugi szereg można wykorzystać do powtórzenia analizy lub dla drugiej próbki, patrz rysunek 2.

2.2 Zostawić krople do wyschnięcia. Utrwalić komórki bakteryjne na szkiełku przez ogrzanie albo umieszczenie w płomieniu lub też za pomocą 95 % alkoholu etylowego.

2.3 Procedura IF

i) Przygotować szkiełka tak jak opisano w 2.1. ppkt i):

Przygotować zestaw dwukrotnych rozcieńczeń surowicy w buforze IF (dodatek 3):

$\frac{1}{4}$  miana, (T/4),  $\frac{1}{2}$  miana (T/2), miano (T), dwukrotność miana (2T).

ii) Przygotować szkiełka do badania, jak opisano w ust. 2.1 ppkt ii):

Przygotować rozcieńczenie robocze (WD) surowicy w buforze IF. Rozcieńczenie robocze jest takim rozcieńczeniem surowicy, które wykazuje optymalną specyficzność. Zazwyczaj jest ono równe połowie miana.

Rysunek 1

### Przygotowanie szkiełka roboczego według 2.1 ppkt i) oraz 2.3. ppkt i)

Jedno standardowe rozcieńczenie próbki ponownie zawieszony w buforze

T = miano

	FITC	T/4	T/2	T	2T	⇒ Dwukrotne rozcieńczenia surowicy
Próbka 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplikat próbki 1 lub próbki 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Rysunek 2

**Przygotowanie szkiełka roboczego według ust. 2.1 ppkt ii) oraz 2.3. ppkt ii)**

	FTIC	standardowe rozcieńczenia surowicy				⇒ Dziesiętne rozcieńczenia surowicy
	0	0	1/10	1/100	1/1000	
Próbka 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplikat próbki 1 lub próbki 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

## 2.3.1 Ułożyć szkiełka na bibule.

Nałożyć rozcieńczoną surowicę do zagłębień. Nałożyć PBS do zagłębień FTIC. Objętość nakładanej surowicy musi być równa objętości nakładanego ekstraktu.

## 2.3.2 Inkubować przez 30 minut pod szkiełkiem nakrywkowym w temperaturze otoczenia.

## 2.3.3 Strząsnąć krople surowicy ze szkiełek i przepłukać szkiełka starannie buforem IF. Odmywać je przez 5 minut buforem IF – Tween, a następnie przez 5 minut buforem IF (dodatek 3). Starannie usunąć nadmiar wilgoci.

## 2.3.4 Ułożyć szkiełka na bibule. Pokryć zagłębienia do badań oraz zagłębienie FTIC rozcieńczonym koniugatem FITC, stosowanym do wyznaczenia miana. Objętość koniugatu nałożonego na okienka musi być identyczna z objętością zastosowanej surowicy.

## 2.3.5 Inkubować pod przykryciem przez 30 minut w temperaturze otoczenia.

## 2.3.6 Strząsnąć krople koniugatu ze szkiełka. Opłukać je, tak jak poprzednio (2.3.3). Starannie usunąć nadmiar wilgoci.

## 2.3.7 Odpipetować 5 – 10 µl 0,1 M buforu fosforanowego zawierającego glicerynę (dodatek 3), albo podobną ilość utrwalacza każde z zagłębień i przykryć je szkiełkiem nakrywkowym.

## 2.4 Odczytywanie badania IF

Sprawdzić szkiełka pod mikroskopem epifluorescencyjnym z filtrem właściwym dla wzbudzenia FITC, pod olejkim imerysijnym, przy powiększeniu 500–1000 razy. Skanować zagłębienia wzdłuż dwu średnic pod kątem prostym oraz dookoła obwodu.

Sprawdzić najpierw zagłębienie z kontrolą pozytywną. Komórki muszą fluoryzować jasno i być zupełnie wybarwione. *Uwaga: badanie należy powtórzyć, jeżeli wybarwienie nie spełnia powyższych kryteriów.*

Odczytać szkiełka do badań. Sprawdzić najpierw obecność komórek fluoryzujących w zagłębieniu kontrolnym z FITC. Obecność komórek fluoryzujących w zagłębieniu FITC świadczy o niespecyficznym wiązaniu koniugatu, autofluorescencji lub zanieczyszczeniu. *Uwaga: w przypadku takich obserwacji badanie należy powtórzyć.*

Sprawdzić, czy w zagłębieniach do badań występują komórki fluoryzujące o charakterystycznej morfologii *Ralstonia solanacearum*. Intensywność fluorescencji musi być równoważna intensywności wykazywanej przez pozytywny szczep kontrolny przy tym samym rozcieńczeniu surowicy. Komórki niecałkowicie wybarwione lub komórki o słabej fluorescencji należy odrzucić, pod warunkiem że nie są bardzo liczne (patrz interpretacja wyników badania IF).

*Interpretacja wyników badania IF:*

- i) Jeżeli nie stwierdzono obecności komórek jasno fluoryzujących o charakterystycznej morfologii, to wynik badania IF jest negatywny.
- ii) Jeżeli stwierdzono obecność fluoryzujących komórek o charakterystycznej morfologii, trzeba oznaczyć średnią liczbę tych komórek w polu widzenia mikroskopu oraz obliczyć liczbę komórek (N), przypadającą na 1 ml zawiesiny próbki (dodatek 4).

Za granicę wykrywania badania IF uważa się około 1 000 komórek w 1 ml,

— dla próbek o wartości  $N > 10^1$  komórek w 1 ml, wynik badania IF jest uznany za pozytywny,

— dla próbek o wartości  $N < 10^1$  komórek w 1 ml, wynik badania IF może być uznany za pozytywny.

- iii) jeżeli zaobserwuje się dużą liczbę ( $> 10^3$  komórek w 1 ml) niezupełnie lub słabo fluoryzujących komórek, przy wielkości miana odpowiedniej dla surowicy, należy wykonać drugie badanie:
- badanie oparte na odmiennie zasadzie biologicznej, lub
  - ponowne badanie IF, z użyciem innej surowicy lub przy 10-krotnym rozcieńczeniu próbki.

### 3. Badanie ELISA

Oparty na publikacji: Robinson –Smith i wsp., 1995.

Stosować surowicę na *Ralstonia solanacearum*, najlepiej typu forma 3/biovar 2. Wyznaczyć miano dla zawiesiny  $10^4$  komórek w 1 ml homologicznego szczepu *Ralstonia solanacearum*.

Zalecane jest używanie płytek mikromiarczkowych NUNC-Polysorb.

Dołączyć próbę kontrolną, z negatywnego ekstraktu ziemniaka oraz próbkę PBS (roztwór soli w buforze fosforanowym).

Użyć zawiesiny zawierającej więcej niż  $10^4$  komórek w 1 ml szczepu odpowiedniego typu (forma/biotyp) *Ralstonia solanacearum* jako pozytywnego badania kontrolnego. Badać go w podobny sposób, jak próbkę (próbki), ale umieścić na płytce z dala od zagłębień zawierających próbki.

- 3.1 Odsopić 100–200 µl zawiesiny próbki do mikroprobówki.
- Ogrzewać przez 4 minuty w temperaturze 100 °C. Przenieść mikroprobówkę na powierzchnię lodu.
- 3.2 Dodać tę samą objętość buforu przykrywającego o podwojonym stężeniu (dodatek 5). Wytrząsnąć.
- 3.3 Nałożyć po 100 µl do każdego z dwu zagłębień na płytce. Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C lub na noc w temperaturze 4 °C.
- 3.4 Usunąć ekstrakty z zagłębień. Obmyć je trzykrotnie buforem PBS-Tween (dodatek 5), pozostawiając w zagłębieniu ostatni roztwór używany do płukania na przynajmniej 5 minut.
- 3.5 Przygotować stosowne rozcieńczenia surowicy *Ralstonia solanacearum* w buforze blokującym (dodatek 5). Nałożyć po 100 µl rozcieńczeń surowicy do zagłębień.
- Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C.
- 3.6 Usunąć surowicę z zagłębień. Obmyć je tak jak poprzednio (3.4).
- 3.7 Przygotować właściwe rozcieńczenia koniugatu fosfatazy alkalicznej w buforze blokującym. Nałożyć po 100 µl rozcieńczeń surowicy do zagłębień.
- Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C.
- 3.8 Usunąć z zagłębień koniugat. Obmyć okienka, tak jak poprzednio (3.4 i 3.6).
- 3.9 Przygotować roztwór substratu fosfatazy alkalicznej (dodatek 5). Nałożyć do okienek po 100 µl roztworu. Inkubować przez 30 minut do 1 godziny w ciemności w temperaturze otoczenia.
- 3.10 Odczytać absorpcję przy długości fali światła 409 nm.

#### Interpretacja badania ELISA:

Wynik badania ELISA jest negatywny, gdy gęstość optyczna (OD) próbki  $< 2 \times$  OD dla negatywnej ślepej próby.

Wynik badania ELISA jest pozytywny, gdy gęstość optyczna (OD) próbki jest  $> 2 \times$  OD dla negatywnej ślepej próby.

### 4. Badanie PCR

W oparciu o publikację Seal i wsp., 1993.

*Uwaga:* We wszystkich etapach przygotowywania próbki oraz innych manipulacjach, łącznie z CR trzeba stosować końcówki pipet z filtrem.

Przygotować zawiesinę  $10^4$  komórek w 1 ml szczepu *Ralstonia solanacearum* typu szczep 3/biotyp 2, jako pozytywną próbkę kontrolną. Należy ją badać w sposób identyczny jak próbki badane.

- 4.1 Odmierzyć po 100 µl zawiesiny próbki do mikroprobówki.

Ewentualnie przenieść 90 µl zawiesiny do mikroprobówki, zawierającej 10 µl 0,5 M NaOH. Zmieszać wielokrotnie, odwracając mikroprobówkę do góry dnem.

- 4.2 Ogrzewać ją przez 4 minuty w temperaturze 100 °C. Przenieść natychmiast mikroprobówkę na powierzchnię lodu.
- 4.3 Przygotować co najmniej dwa rozcieńczenia dziesiętne, np. 1/10 oraz 1/100 lub więcej, w razie potrzeby, w sterylnej wodzie destylowanej lub wodzie ultra czystej (UPW).
- 4.4 Przygotować mieszaninę reakcyjną PCR (dodatek 6) w sterylnej fiołce, dodając składniki w następującej kolejności:

W przypadku objętości reakcyjnej równej 50 µl:

Składnik	Objętość	Stężenie końcowe
Sterylna woda destylowana lub UPW	30,8–33,8 µl	
10 x bufor PCR	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
prymery OLI-1 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
prymery Y-2 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
polimeraza Taq(5U/µl)	0,2 µl	1,0 U
<b>Całkowita objętość</b>	<b>45–48 µl</b>	

W przypadku większej liczby reakcji:

Obliczyć objętość każdego ze składników dla planowanej liczby reakcji.

Zmieszać składniki i przenieść po 45–48 µl mieszaniny do sterylnych fiołek PCR.

Pozostawić fiołki reakcyjne PCR na powierzchni lodu.

W przypadku objętości reakcyjnej równej 25 µl:

Proporcjonalnie zmniejszyć objętość dodawanych składników.

- 4.5 Namnażanie PCR
- 4.5.1 Opcjonalnie: odwirować impulsowo fiołki z zagotowaną próbką oraz pozytywną próbką kontrolną.
- Dodawac, w odpowiedniej kolejności, po 2–5 µl próbki (próbek), ślepa próbę z wody i pozytywną próbkę kontrolną do fiołek zawierających mieszaninę reakcyjną PCR. Umieścić fiołki w termocyklerze DNA.
- 4.5.2 Wykonać następujący program:
- 1 cykl:
- (i) 2 minuty w temperaturze 96 °C: denaturacja matrycy
- 50 cykli:
- (ii) 20 sekund w temperaturze 94 °C: denaturacja
- (iii) 20 sekund w temperaturze 68 °C: wygrzewanie primerów
- (iv) 30 sekund w temperaturze 72 °C: kopiowanie
- 1 cykl:
- (v) 10 minut w temperaturze 72 °C: dalsze powielanie.
- 1 cykl:
- i) Inkubować w temperaturze 4 °C

Uwaga: Parametry powyższe odnoszą się do instrumentu Perkin – Elmer 9600. Inne cykle termiczne mogą wymagać nałożenia oleju mineralnego do fiołek reakcyjnych PCR i/lub modyfikacji czasu trwania etapu ii), iii) oraz iv) namnażania.

- 4.5.3 Wyjąć fiołki z termocyklera. Przeprowadzić analizę produktu PCR. Jeśli nie wykonuje się tej analizy natychmiast, należy przechowywać fiołki w temperaturze 4 °C, jeśli analiza będzie wykonana w tym samym dniu, lub w temperaturze –18 °C, gdy fiołki trzeba przechować przez dłuższy okres czasu.
- 4.6 Analiza produktu PCR
- Fragmenty PCR wykrywa się prowadząc elektroforezę na żelu agarozowym, oraz wybarwiając żel bromkiem etydyny.
- 4.6.1 Przygotować właściwy żel agarozowy, delikatnie doprowadzając do wrzenia agarozę w buforze Tris-octanowym do elektroforezy (bufor TAE).

- 4.6.2 Oziębic stopioną agarozę do około 50–60 °C, wylać ją do aparatu do elektroforezy i nałożyć grzebień. Pozostawić roztwór do zestalenia się żelu.
- 4.6.3 Wyjąć grzebień. Zanurzyć żel w buforze TAE tak, aby był przykryty około 2–3 mm warstwą buforu.
- 4.6.4 Umieścić po 3 µl krople buforu ładującego na parafilmie. Dodać po 12 µl produktu PCR z każdej z próbek, próbki pozytywnej kontrolnej oraz wody, przed nałożeniem zmieszać je delikatnie końcówką pipety. Podane objętości można zmieniać, stosownie do objętości studzienek w żelu agarozowym.
- 4.6.5 Ostrożnie nałożyć próbki do studzienek w żelu. Do przynajmniej jednej studzienki dodać jako wzorec odpowiedni znacznik DNA.
- 4.6.6 Podłączyć przewody elektryczne do zasilacza i aparatu do elektroforezy. Włączyć prąd. Ustawić gradient 5–8 V/cm. Prowadzić elektroforezę tak długo, aż wskaźnik czoła znajdzie się około 1 cm od końca żelu.
- 4.6.7 Wyłączyć zasilanie elektryczne. Odłączyć przewody elektryczne.
- Ostrożnie wyjąć żel. Namoczyć żel w roztworze bromku etydyny na 30–45 minut.
- Uwaga: Nosić rękawiczki jednorazowe podczas pracy z bromkiem etydyny, który jest potężnym czynnikiem mutagennym!
- 4.6.8 Odbarwiać żel w wodzie przez 10–15 minut.
- 4.6.9 Obserwować namnożone fragmenty DNA pod lampą UV. Produkt PCR *Ralstonia solanacearum* z zestawem primera LI-1 oraz Y-2 ma długość 288 bp. Porównać ze znacznikiem DNA oraz z wynikiem uzyskanym dla próbki kontrolnej pozytywnej.
- Uwaga: W każdym przypadku próbka zawierająca wodę musi dać wynik negatywny. W przypadku pozytywnego wyniku dla wody badanie należy powtórzyć.
- 4.6.10 Gdy zachodzi potrzeba zachowania dokumentacji wyniku, wykonać zdjęcie żelu.
- 4.6.11 Potwierdzić autentyczność namnożonego fragmentu, stosując enzymatyczną analizę restrykcyjną (REA).
- 4.7 Enzymatyczna analiza restrykcyjna (REA)
- 4.7.1 Przenieść 8,5 µl produktu CPR (4.5.3) do nowej mikrofiolki. Dodać 1 µl 10 × buforu enzymatycznego oraz 0,5 µl enzymu restrykcyjnego *Ava II*.
- 4.7.2 Zamieszać delikatnie w końcówce pipety. Jeżeli na ściankach fiolki pozostanie kropla, podłączyć ultrawirówkę. Inkubować fiolkę na 1 godzinę w temperaturze 37 °C.
- 4.7.3 Przeanalizować trawiony fragment PCR, wykonując elektroforezę na żelu agarozowym, tak jak poprzednio (4.6).

#### Interpretacja wyników badania PCR:

Wynik badania PCR jest negatywny, jeśli nie wykryto fragmentu 288 bp, a taki fragment znaleziono dla pozytywnej próbki kontrolnej, wykonanej dla szczepu *Ralstonia solanacearum*.

Wynik badania PCR jest pozytywny, jeżeli wykryto fragment 288 bp, a analiza REA namnożonego fragmentu jest identyczna z wynikiem uzyskanym dla pozytywnej próbki kontrolnej ze szczepu *Ralstonia solanacearum*.

#### 5. Badanie selektywnego wysiewania na płytkę

Oparty na publikacji: Elphinstone i wsp., 1996.

- 5.1 Wykonać badanie, stosując odpowiednią technikę wysiewania na płytkę z rozcieńczeń, np.:
- Przygotować przynajmniej dwa rozcieńczenia dziesiętne, np. 1/10 oraz 1/1000 lub więcej, gdy jest to stosowne, zawiesiny granulki w buforze. Odmierzyć standardową objętość (50–100 µl) zawiesiny oraz każdego z wykonanych rozcieńczeń na zmodyfikowaną pożywkę selektywną SMSA (dodatek 7) i rozprowadzić pręcikiem szklanym po całej powierzchni pożywki.
- W razie potrzeby wykonać także punktowe nałożenie 10 µl zawiesiny. Wypalać naczynie w płomieniu przed każdym nałożeniem zawiesiny.
- Przenieść odmierzoną objętość standardową (50–100 µl) zawiesiny na zmodyfikowaną pożywkę selektywną SMSA i rozprowadzić ją szklanym pręcikiem po całej powierzchni pożywki. Dotknąć prętem co najmniej dwie inne płytki ze zmodyfikowaną pożywką SMSA, bez wypalania pręta.
- 5.2 Stosując tę samą technikę rozcieńczania i nakładania, nałożyć na płytki zawiesinę 10<sup>4</sup> komórek w 1 ml wirulentnego szczepu (rasa 3/ biotyp 2) *Ralstonia solanacearum* jako pozytywne i próbkę kontrolną na serii oddzielnych płytek ze zmodyfikowaną pożywką SMSA.
- 5.3 Poddać płytki inkubacji w temperaturze 28 °C. Zacząć oglądanie płytek po trzech dniach. Jeśli wynik będzie negatywny, poczekać do 6 dni. Kolonie wirulentnych szczepów *Ralstonia solanacearum* są mleczno białe, płaskie, nieregularne, oraz ciekłe, w krwistoczerwonym środku. Pojawiają się również wewnętrzne smugi lub spirale.
- 5.4 Oczyszczyć kolonie o charakterystycznej morfologii, przenosząc je na pożywkę uniwersalną (dodatek 1).

- 5.5 Zidentyfikować czyste kultury (sekcja II ust. 4.1) oraz potwierdzić obecność kultury *Ralstonia solanacearum*, stosując badanie na patogenność (sekcja II, 4.3).

*Interpretacja wyników badania selektywnego wysiewania na płytkach:*

Badanie selektywnego wysiewania na płytkach jest negatywne w przypadku gdy po 6 dniach nie wyizolowano żadnych kolonii bakteryjnych, albo jeżeli nie wyizolowano żadnych kolonii o morfologii charakterystycznej dla *Ralstonia solanacearum*, pod warunkiem że nie podejrzewa się inhibicji kolonii przez inne bakterie i potwierdzono na kontrolnych płytkach pozytywnych obecność kolonii, charakterystycznych dla *Ralstonia solanacearum*.

Badanie selektywnego wysiewania na płytkach jest pozytywne jeżeli wyizolowano kolonie o morfologii charakterystycznej dla *Ralstonia solanacearum*

## 6. **Badanie biologiczne**

Oparty na publikacji: Janse, 1988.

- 6.1 Wykorzystać 10 roślin badanych podejrzanych pomidorów lub psianek podłużnych, w każdej próbie na poziomie trzeciego właściwego liścia. Nie podlewać roślin do badań 24 godziny przed zaszczepieniem.
- 6.2 Rozprowadzić po 100 µl zawiesiny granulek po roślinach do badań. Zaszczepić łodygi pomiędzy szypułkami, w jednym lub więcej miejsc.
- 6.3 Stosując tę samą technikę, zaszczepić 10 rozsąd zawiesiną 10<sup>6</sup> komórek szczepu wirulentnego *Ralstonia solanacearum*, typu biotyp 2/rasa 3, w 1 ml zawiesiny (jako kontrolną próbkę pozytywną) oraz bufor, wykorzystywany do zawiesiny (jako kontrolną próbkę negatywną). Oddzielić rośliny zaszczepione jako kontrolna próbka pozytywna od pozostałych roślin, aby uniknąć zakażenia.
- 6.4 Utrzymywać rośliny do badań przez okres do 4 tygodni, w temperaturze 22–24 °C przy zachowaniu wysokiej wilgotności względnej, codziennie je podlewać. Obserwować objawy więdnienia, epinastii, chlorozy i/lub zamierania roślin.
- 6.5 Wyizolować patogen z porażonych roślin (sekcja II). Zidentyfikować czyste kultury o charakterystycznej morfologii (sekcja II ust. 4.1) i potwierdzić obecność kultur *Ralstonia solanacearum*, wykonując badanie na patogenność (sekcja II ust. 4.3).
- 6.6 W razie potrzeby, sprawdzić obecność bakterii w seriach roślin do badań, które nie wydają się być porażone. Pobrać z tych roślin wycinki 1 cm łodygi z części położonej 2 cm powyżej punktu szczepienia. Zhomogenizować tkanki w buforze maceracyjnym. Wykonać posiew z rozcieńzonego roztworu na płytce (sekcja III ust. 5.1). W razie wyniku pozytywnego zidentyfikować czyste kultury o charakterystycznej morfologii (sekcja I ust. 4.1) i potwierdzić obecność kultur *Ralstonia solanacearum*, wykonując badanie na patogenność (sekcja II ust. 4.3).

*Interpretacja wyników badania biologicznego:*

Badanie biologiczne daje wynik negatywny, jeżeli rośliny nie zostały porażone przez *Ralstonia solanacearum*, pod warunkiem że obecność kultury *Ralstonia solanacearum* wykryto na płytkach kontrolnych pozytywnych.

Badanie biologiczne daje wynik pozytywny, gdy rośliny do badań zostaną zakażone przez *Ralstonia solanacearum*.

## 7. **Badanie na wzbogacenie**

Oparte na publikacji: Elphinstone i wsp., 1996.

- 7.1 Przenieść 100 µl zawiesiny do trzech ml zmodyfikowanej pożywki SMSA (dodatek 7).
- 7.2 Inkubować przez 48 godzin, a w żadnym razie nie dłużej niż przez 72 godziny, w temperaturze 28 °C. Przykrywką powinna luźno przylegać do próbówki tak, by umożliwić dostęp do powietrza.
- 7.3 Zamknąć szczelnie przykrywkę i wytrząsnąć próbówkę. Pobrać próbkę do badania IF (niniejsza sekcja, ust. 2.0), badania ELISA (niniejsza sekcja ust. 3) i/lub badania PCR (niniejsza sekcja 4).

## 8. **Badanie na patogenność**

Patrz sekcja II ust. 4.3.

---

## Dodatek 1

**Pożywki do izolacji i hodowli *Ralstonia solanacearum***

Pożywka agarowa (NA)

Pożywka agarowa (Difco)	23 g
Woda destylowana	1 litr

Przygotować po ½ l pożywki w kolbach pojemności 1 l.

Rozpuścić składniki.

Sterylizować pożywkę w autoklawie w temp. 121 °C przez 15 minut.

Oziębic pożywkę do 50 °C. Wylać na płytki.

Agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy (YPGA)

Ekstrakt drożdży (Difco)	5 g
Bacto pepton (Difco)	5 g
Monohydrat d(+) glukozy	10 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Woda destylowana	1 litr

Przygotować po ½ l pożywki w kolbach pojemności 1 l.

Rozpuścić składniki.

Sterylizować pożywkę w autoklawie w temp. 121 °C przez 15 minut.

Oziębic pożywkę do 50 °C. Wylać na płytki.

Agar sacharozowo-peptonowy (SPA)

Sacharoza	20 g
Pepton	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,25 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Woda destylowana	1 litr

Przygotować po ½ l pożywki w kolbach pojemności 1 l.

Rozpuścić składniki. Doprowadzić pH roztworu do wartości 7,2–7,4 – w zależności od potrzeb.

Sterylizować pożywkę w autoklawie w temp. 121 °C przez 15 minut.

Oziębic pożywkę do 50 °C. Wylać na płytki.

Pożywka tetrazolowa Kelmana

Aminokwasy Cas (Difco)	1 g
Pepton Bacto (Difco)	10 g
Dekstroza	5 g
Agar Bacto (Difco)	15 g
Woda destylowana	1 litr

Przygotować w kolbach po ½ l pożywki na 1 l.

Rozpuścić składniki.

Sterylizować pożywkę w autoklawie w temp. 121 °C przez 15 minut.

Oziębic pożywkę do 50 °C. Dodać przesączony roztwór wodny chlorku trifenylotetrazolowego (Sigma) tak, by otrzymać stężenie końcowe 50 mg/l.

Wylać na płytki.

## Dodatek 2

**Materiały do przygotowywania próbek**

Bufor maceracyjny: 50 mM bufor fosforanowy, pH 7,0

Stosuje się go do maceracji tkanek.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g
Woda destylowana	1 litr

Rozpuścić składniki i sprawdzić wartość pH. Odczyn musi być właściwy.

Sterylizować pożywkę w autoklawie w temp. 121 °C przez 15 minut.

Zaleca się dodatek 5 % poliwinylpirolidonu – o masie cząsteczkowej 40 000 (PVP-40), podczas wykonywania bezpośredniego badania PCR, w celu zmniejszenia inhibicji namnażania przez cząsteczki aromatyczne obecne w ekstrakcie.

Zaleca się też dodatek czynnika deflokulacyjnego, antypieniącego lub antyutleniacza, gdy stosuje się homogenizator Waringa lub homogenizację Ultra Thurrax, w celu maceracji rdzenia ziemniaka.

Płatki Lubrolu	0,5 g/l
Czynnik antypieniący (Silicone DC)	1,0 ml/l
Pirofosforan czterosodowy	1,0 g/l

Sterylizować składniki oddzielnie w autoklawie. Dodawać je w ilościach potrzebnych do uzyskania odpowiedniego stężenia końcowego.

Bufor do zawieszania próbek: 10 mM bufor fosforanowy, pH 7,2

Bufor jest używany do zawieszania i rozpuszczania pędów podziemnych i próbek ziemniaka.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,4 g
Woda destylowana	1 litr

Rozpuścić składniki i sprawdzić wartość pH. Odczyn musi być właściwy.

Sterylizować pożywkę w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut.

---

## Dodatek 3

**Materiały do wykonania badania IF**

Bufor IF: roztwór soli w 10 mM buforze fosforanowym (PBS), pH 7,2

Bufor jest używany do rozpuszczania antisery

$\text{Na}_2\text{HPO}_{4 \cdot 12} \text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_{4 \cdot 2} \text{H}_2\text{O}$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Woda destylowana	1 litr

Rozpuścić składniki i sprawdzić wartość pH. Odczyn musi być właściwy.

Sterylizować pożywkę w autoklawie w temp. 121 °C przez 15 minut.

Bufor IF-Tween

Stosowany jest do odmywania płytek. Dodać 0,1 % Tween 20 do buforu IF.

Gliceryna w 0,1 M buforze fosforanowym, pH 7,6

Jest stosowany jako ciecz utrwalająca na okienkach IF, w celu zwiększenia fluorescencji.

$\text{Na}_2\text{HPO}_{4 \cdot 12} \text{H}_2\text{O}$	3,2 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_{4 \cdot 2} \text{H}_2\text{O}$	0,15 g
Gliceryna	50 ml
Woda destylowana	100 ml

---

## Dodatek 4

## Wyznaczanie poziomu skażenia w badaniu IF

Pole powierzchni (S) okienka na szkiełku wielopunktowym (1)

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

gdzie: D = średnica okienka

Pole powierzchni (s) obiektywu: (2)

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

gdzie: d = średnica pola

Wyznaczyć d z pomiaru bezpośredniego albo obliczyć wartość d z następującego wzoru: (3)

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

gdzie: i = współczynnik pola (zależy od rodzaju okularu i zmienia się od 8 do 24),

K = współczynnik rury (1 lub 1,25),

G = powiększenie obiektywu 100x, 40x itp.

z równania (2) wynika, że: (4)

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

z równania (3) wynika, że:

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

Obliczyć liczbę typowych komórek fluorescencyjnych w polu widzenia (c).

Obliczyć liczbę typowych komórek fluorescencyjnych w zagłębieniu (C).

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

Obliczyć liczbę typowych komórek fluorescencyjnych w 1 ml zawiesiny (N).

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

gdzie: y = objętość zawiesiny w zagłębieniu,

F = współczynnik rozcieńczenia zawiesiny.

## Dodatek 5

**Materiały do badania ELISA**

Bufor pokrywający podwójnej mocy, pH 9,6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6,36 g
NaHCO <sub>3</sub>	11,72 g
Woda destylowana	1 litr

Rozpuścić składniki i sprawdzić wartość pH. Odczyn musi być właściwy.

Sterylizować w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 15 minut.

Można dodać siarczek sodu, o stężeniu końcowym 0,2 %, jako antyutleniacz, jeżeli ekstrakt zawiera znaczną ilość cząsteczek substancji aromatycznych.

10 × PBS – roztwór soli w buforze fosforanowym, pH 7,4

NaCl	80 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12 H <sub>2</sub> O	29 g
KCl	2 g
Woda destylowana	1 litr

Rozpuścić składniki i sprawdzić wartość pH.

Sterylizować w autoklawie w temp. 121 °C przez 15 minut.

Roztwór soli w buforze fosforanowym-Tween (PBS-T)

10 × PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Woda destylowana	895 ml

Bufor blokujący (przeciwciało) (należy go przygotowywać na krótko przed wykorzystaniem)

10 x PBS	10 ml
Poliwinylopirolidon-44 000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 g
Mleko w proszku	0,5 g
Woda destylowana	do 100 ml

Roztwór substratu w zasadowym buforze fosforanowym, pH 9,8

Dietanoloamina	97 ml
Woda destylowana	800 ml

Zmieszać składniki, doprowadzić pH do wartości 9,8 za pomocą stężonego roztworu HCl.

Uzupełnić wodą destylowaną do 1 l.

Dodać 0,2 g MgCl<sub>2</sub>.

Rozpuścić po dwie tabletki substratu fosfatazy po 5 mg (Sigma) na 15 ml roztworu.

## Dodatek 6

**Materiały do badania PCR**

Sekwencja oligonukleotydów primerów

Primer OLI-1 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

Primer Y-2 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Dane o stosowanych materiałach odszukać w pracy Seal i wsp. (1993).

## Dodatek 7

**Materiały do badania selektywnego wysiewania na płytkach oraz badania na wzbogacanie**

Pożywka selektywna SMSA (Engelbrecht, 1994, modyfikacja – Elphinstone i wsp., 1996), lecz bez agaru oraz soli tetrazolowych.

Pożywka podstawowa

Aminokwasy CAS (Difco) 1 g

Pepton Bacto (Difco) 10 g

Gliceryna 5 ml

Agar (Difco) 15 g

Woda destylowana 1 l

Przygotować po ½ l pożywki w kolbach o pojemności 1 l.

Rozpuścić składniki i sprawdzić wartość pH. W razie potrzeby doprowadzić pH do wartości 6,5 przed sterylizacją w autoklawie. *Ralstonia solanacearum* nie rośnie dobrze na pożywkach o wartościach pH wyższych od 7,0.

Sterylizować w autoklawie w temp. 121 °C przez 15 minut.

Oziębic do temperatury 50 °C.

Dodać następujące składniki (wszystkie produkcji Sigma) tak, by otrzymać następujące stężenia końcowe:

Fiolet krystaliczny 5 mg/l

Siarczan polimyksyny B 100 mg/l (ok. 600 000 jedn.) Sigma P-1004

Bacytracyna (\*) 25 mg/l (ok. 1 250 jedn.) Sigma B-0125

Chloroamfenikol 5 mg Sigma C-3175

Penicylina-G 0,5 mg/l (ok. 825 jedn.) Sigma P-3032

Sole tetrazolowe 50 mg/l

Rozpuścić składniki w 70 % alkoholu etylowego tak, aby otrzymać oczekiwane stężenia w przygotowanej pożywce. Niektóre składniki, jak np. polimyksyna B oraz chloroamfenikol, wymagają ogrzewania i wstrząsania podczas rozpuszczania.

Pożywka SMSA (Elphinstone i wsp., 1996)

Przygotować pożywkę w podobny sposób jak selektywną pożywkę SMSA, ale bez dodawania agaru.

Odmierzyć po 3 ml do uniwersalnych próbek jednorazowych o pojemności 30 ml.

(\*) W razie potrzeby można zmniejszyć stężenie bakterii saprofitycznych bez hamowania *Ralstonia solanacearum*, zwiększając stężenie bacytracyny do 300 ppm

### Literatura

- Buddenhagen, I.W.; Sequeira, L. and Kelman, A. 1962. Description of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52, 726.
- Cook, D.; Elizabeth B. and Sequeira L., 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive respons. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2, 113–142.
- 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, 343–345.
- 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, 4262–4268.
- 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.

## ZAŁĄCZNIK III

1. We wszystkich przypadkach podejrzenia wystąpienia organizmu, gdy uzyskano pozytywny wynik badania/badań przesiewowego dla wyszczególnionego materiału roślinnego, stosując właściwą metodę określoną w załączniku II, lub we wszystkich innych przypadkach – stosując inną dowolną oficjalnie zaakceptowaną metodę, gdy oczekuje się na potwierdzenie lub wykluczenie wyniku po zakończeniu stosowanych badań, należy we właściwy sposób zachować i zabezpieczyć:
    - gdy tylko jest to możliwe, partię produkcyjną lub jej część (z której pobrano próbkę) w oryginalnym opakowaniu, z jego etykietą,
    - gdy tylko jest to możliwe, pozostałą część próbek,
    - wszelkie pozostałe ekstrakty oraz inny przygotowany do badań przesiewowych materiał, np. szkiełka do immunofluorescencji, oraz wszelkie stosowne dokumenty
    - aż do zakończenia opisywanych badań.
  2. W przypadku potwierdzenia wystąpienia organizmu należy zachować i we właściwy sposób zabezpieczyć:
    - materiał wyszczególniony w ust. 1, oraz
    - próbkę zarażonego materiału z ziemniaka lub psianki podłużnej, zaszczipionego ekstraktem z bulwy lub rośliny, gdy jest to stosowne, a także, wyizolowaną kulturę organizmu,
    - co najmniej przez 1 miesiąc od przeprowadzenia procedury powiadamiania, na podstawie art. 5 ust. 2.
-

## ZAŁĄCZNIK IV

Elementy poddane badaniom, do których odnosi się art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt i) obejmują, w zależności od potrzeb:

- i) miejsce produkcji,
- upraw ziemniaka, które są klonalnie spokrewnione z ziemniakami, porażonymi przez organizm,
  - upraw pomidora, które pochodzą z tego samego źródła, co pomidory skażone przez organizm,
  - upraw ziemniaka lub pomidora, które zostały objęte urzędową kontrolą w związku z podejrzeniem wystąpienia organizmu,
  - upraw ziemniaka, które są klonalnie spokrewnione z ziemniakami rosnącymi na uprawach zarażonych organizmem,
  - upraw ziemniaka lub pomidora zlokalizowanych w pobliżu zarażonych miejsc uprawowych, łącznie z takimi, jak plantacje produkcyjne, na których wykorzystywany jest ten sam sprzęt i urządzenia niezależnie od tego czyją jest własnością,
  - w których stosuje się do nawadniania lub zraszania wody powierzchniowe ze źródła, o którym wiadomo lub podejrzewa się, że zostało skażone organizmem,
  - w których wykorzystuje się te same wody powierzchniowe do nawadniania lub zraszania, co w dowolnym miejscu produkcji, w którym potwierdzono lub podejrzewa się obecność organizmu,
  - zalane lub wcześniej zalane wodami powierzchniowymi, o których wiadomo lub podejrzewa się, że zostały zakażone organizmem oraz,
- ii) wody powierzchniowe, stosowane do nawadniania lub zraszania, lub takie wody, które zalały pola) uprawne lub miejsca) produkcji, o których wiadomo, że zostały zakażone organizmem.
-

## ZAŁĄCZNIK V

1. Postępowanie w celu określenia rozmiaru prawdopodobnego zarażenia, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt iii) oraz 5 ust. 1 lit. c) ppkt ii) obejmuje:
  - wyszczególniony materiał roślinny rosnący na miejscu uprawy, uznanym za zakażone na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt iii),
  - miejsce(-a) produkcji oraz związane produkcją z wyszczególnionym materiałem roślinnym, uznane za zakażone, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii), łącznie z tymi miejscami, w których wykorzystuje się to samo wyposażenie i urządzenia, bezpośrednio lub poprzez wspólnego kontrahenta,
  - wyszczególniony materiał roślinny, wytworzony w miejscu(-ach) produkcji, do których odnosi się poprzednie tiret lub obecne w takim miejscu(-ach) produkcji, w okresie czasu, gdy wyszczególniony materiał roślinny, uznany za zakażony na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii), był obecny w miejscu produkcji, do którego odnosi się tiret pierwsze,
  - magazyny, w których znajdował się wyszczególniony materiał roślinny z powyżej omawianych miejsc produkcji,
  - wszelkie maszyny, urządzenia, pojazdy, zbiorniki, magazyny, oraz ich części, a także wszelkie inne obiekty, łącznie z opakowaniami, które mogłyby być w kontakcie z wyszczególnionym materiałem roślinnym uznanym za zakażony, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii),
  - cały wyszczególniony materiał roślinny, przechowywany lub będący w kontakcie z wszelkimi strukturami lub obiektami, wyszczególnionymi w poprzednim tiret, przed ich czyszczeniem i dezynfekcją,
  - w wyniku dochodzenia i badania, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt i), w przypadku ziemniaka, bulwy lub rośliny, które cechuje klonalne powinowactwo, a w przypadku pomidora, te rośliny, które pochodzą z tego samego źródła co wyszczególniony materiał roślinny, uznany za zakażony na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii), i który, choć może potem dawać negatywne wyniki badania na obecność organizmu, wydaje się teraz, że może być zarażony dzięki związku klonalnemu,
  - miejsce(-a) produkcji wyszczególnionego materiału roślinnego, przedstawione w poprzednim tiret,
  - miejsce(-a) produkcji wyszczególnionego materiału roślinnego, w których stosuje się wody powierzchniowe do nawadniania lub zraszania, które zostały uznane za zarażone, na mocy art. 5 ust. 1 lit. c) ppkt ii),
  - wyszczególniony materiał roślinny, wyprodukowany na polach zalanych wodami powierzchniowymi, dla których potwierdzono zakażenie organizmem.
2. Określenie możliwego rozprzestrzenienia się organizmu, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) iv) oraz art. 5 ust. 1 lit. c) ppkt iii) obejmuje:
  - i) w przypadkach objętych art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt iv), rozpatrzenie następujących spraw:
    - bliskość innych miejsc uprawy wyszczególnionego materiału roślinnego,
    - wspólna produkcja i wykorzystywanie zapasów materiału siewnego ziemniaka,
    - miejsca produkcji, w których wykorzystuje się wody powierzchniowe do nawadniania lub zraszania wyszczególnionego materiału roślinnego, w przypadkach, gdy istnieje ryzyko wypływu wody powierzchniowej, lub zalania miejsca(-sc) produkcji, uznanych za zakażone na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii);
  - ii) w przypadkach gdy wody powierzchniowe zostały uznane za zakażone, na mocy art. 5 ust. 1 lit. c) ppkt ii):
    - miejsce(-a) produkcji wyszczególnionego materiału roślinnego, sąsiadujących lub narażonych na ryzyko zalania przez wody powierzchniowe uznane za zakażone,
    - dowolnych zbiorników nawadniających, łączących się z wodą uznaną za zakażoną.

3. Szczegółowe informacje zawarte w powiadomieniu, wskazanym w art. 5 ust. 2 akapit pierwszy obejmują:
    - datę zgłoszenia podejrzewanej obecności na mocy art. 4 oraz daty pobrania próbek oraz potwierdzenia obecności organizmu na mocy art. 5,
    - opis sposobu oznaczenia elementów zakażonych oraz wytyczenia strefy zakażonej.
  4. Szczegółowe informacje zawarte w dodatkowym powiadomieniu, przedstawionym w art. 5 ust. 2 akapit drugi obejmują:
    - w przypadku wszelkich serii produkcyjnych lub wysyłkowych ziemniaka, uznanych za zakażone, świadectwa zalecane w art. 7 i 8 dyrektywy 77/93/EWG, numer paszportu lub numer rejestracyjny producenta ziemniaka, domów towarowych lub centrów wysyłkowych, w zależności od sytuacji,
    - w przypadku wszelkich serii produkcyjnych lub wysyłkowych pomidora, uznanych za skażone, świadectwa zalecane w art. 7 oraz 8 dyrektywy 77/93/EWG oraz numer paszportu, zgodnie z wykazem przedstawionym w dodatku V część A sekcja I.2.2 do dyrektywy 77/93/EWG,
    - nazwę gatunkową i kategorię zapasów materiału siewnego ziemniaka, oraz jeśli to jest możliwe, we wszystkich innych przypadkach,
    - inne informacje dotyczące potwierdzonego zakażenia, jakich może zażądać Komisja.
-

## ZAŁĄCZNIK VI

1. W odniesieniu do art. 6 ust. 1 stosują się następujące przepisy:
  - spalanie, lub
  - zastosowanie jako paszy dla zwierząt, lub po uprzedniej obróbce cieplnej, która zabezpieczy przed ryzykiem przeżycia organizmu, lub
  - głębokie zakopanie na składowisku odpadów, gdzie nie występuje ryzyko przesączenia się na użytki rolne, ani kontaktu ze źródłami wody, która mogłaby być wykorzystywana do nawadniania lub zraszania użytków rolnych, lub
  - przetwórstwo przemysłowe, poprzez bezpośrednie i natychmiastowe przesłanie do fabryki, posiadającej urzędowo zaakceptowane urządzenia do składowania odpadów, zgodne z przepisami ustalonymi w załączniku VII do niniejszej dyrektywy, lub
  - podjęcie innych środków, pod warunkiem że nie niosą one ze sobą możliwego do zidentyfikowania ryzyka rozprzestrzenienia się organizmu; o tych środkach należy niezwłocznie powiadamiać Komisję i pozostałe Państwa Członkowskie.
2. Właściwe użycie lub składowanie jako odpady wyszczególnionego materiału roślinnego, określonego w art. 6 ust. 2, pod kontrolą upoważnionych organów urzędowych danego Państwa(-w) Członkowskiego(-ich), przy zapewnieniu właściwego komunikowania się właściwych organów urzędowych, w celu zapewnienia stałej kontroli oraz akceptacji przez upoważnione organy Państwa Członkowskiego, w którym ziemniaki są pakowane lub przetwarzane, w związku z wymienionymi w pierwszym i drugim tiret urządzeniami do usuwania odpadów, obejmuje:
  - i) w stosunku do bulw ziemniaka,
    - użycie ich jako ziemniaki konsumpcyjne, pakowane w miejscach, w których są urządzenia przeznaczone do usuwania odpadów, gotowe do szybkiej dostawy i zastosowania bez przepakowywania, przeznaczone do bezpośredniego wykorzystania, lub
    - użycie ich jako ziemniaki konsumpcyjne, przeznaczone do przetwórstwa przemysłowego oraz przeznaczone do bezpośredniej i natychmiastowej dostawy do zakładu przemysłowego, wyposażonego w odpowiednie urządzenia do usuwania odpadów, lub
    - niektóre inne ich użycie lub sposoby przeznaczenia na odpady, pod warunkiem że zostanie potwierdzony brak ryzyka rozprzestrzenienia się organizmu, oraz że postępowanie powyższe uzyska zatwierdzenie odpowiednich, upoważnionych organów urzędowych. O podjętych środkach należy niezwłocznie powiadomić Komisję i pozostałe Państwa Członkowskie.
  - ii) w odniesieniu do innych części roślin, łącznie z łodygą oraz resztkami liści,
    - zniszczenie, lub
    - niektóre inne sposoby wykorzystania lub przeznaczenia na odpady, pod warunkiem że zostanie potwierdzone, iż nie stanowią one ryzyka rozprzestrzenienia się organizmu; o tych środkach należy powiadomić Komisję oraz upoważnione organy urzędowe pozostałych Państw Członkowskich.
3. Właściwymi metodami odkażania obiektów, określonych w art. 6 ust. 3 jest oczyszczanie, oraz w przypadkach uzasadnionych – dezynfekcja tak, aby nie powstało możliwe do zidentyfikowania ryzyko rozprzestrzenienia się organizmu. Metody te należy stosować pod nadzorem upoważnionych organów urzędowych Państw Członkowskich.
4. Szereg środków, które Państwa Członkowskie wprowadzą w wytyczonej strefie(-ach) ochronnej(-ych), na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt iv) oraz art. 5 ust. 1 lit. c) ppkt iii), określonych w art. 6 ust. 4, obejmują:
  - 4.1. we wszystkich miejscach produkcji uznanych za skażone, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii):
    - a) na polu uprawnym lub w jednostce chronionej produkcji roślin, uznanych za zarażone, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii), również

- i) w ciągu co najmniej czterech lat wegetacji, po stwierdzeniu zarażenia,
- podjęte zostaną środki, prowadzące do wyeliminowania samosiewów ziemniaka oraz pomidora, a także innych roślin, żywicielskich dla organizmu, łącznie z chwastami psiankowatymi oraz
  - nie należy uprawiać:
    - plantacji nasiennych ani produkcyjnych ziemniaka,
    - plantacji nasiennych ani produkcyjnych pomidora,
    - uwzględniając biologię organizmu:
      - innych jego roślin żywicielskich,
      - roślin z gatunku *Brassica*, ponieważ istnieje ryzyko, że ten organizm może w nich przetrwać,
    - upraw, dla których istnieje możliwe do zidentyfikowania ryzyko rozprzestrzeniania się organizmu;
  - w pierwszym sezonie uprawy ziemniaka lub pomidora, zaraz po okresie opisanym w poprzednim ustępie, jeżeli sprawdzono, że na polu uprawnym nie ma ani samosiewów ziemniaka lub pomidora, ani innych roślin żywicielskich organizmu, łącznie z chwastami psiankowatymi, przez dwa kolejne lata wegetacji przed sadzeniem roślin,
  - w przypadku ziemniaka, odpowiedni kwalifikowany materiał siewny można będzie wysadzać, jedynie do celów przetwórstwa, pod warunkiem że:
    - zostanie przeprowadzona kontrola, obejmująca przeprowadzenie badań, zgodnie z art. 2 ust. 1,
  - w sezonie uprawy ziemniaka lub pomidora, następującym bezpośrednio po tym, do którego odnosi się poprzedni tiret, po odpowiednim cyklu rotacji, w przypadku ziemniaka będzie wysadzany kwalifikowany materiał siewny, jak i do celów przetwórstwa, a w przypadku pomidora jest prowadzona urzędowa kontrola zgodnie z art. 2 ust. 1, lub
- ii) podczas pięciu lat wegetacji, od czasu zakażenia:
- powinny być podejmowane działania zmierzające do eliminacji samosiewów ziemniaka oraz pomidora i innych roślin żywicielskich organizmu, łącznie z chwastami psiankowatymi, a także
  - należy wyznaczyć pole, które w ciągu pierwszych trzech lat należy: albo pozostawić odłogiem, albo uprawiać na nim zboża lub w zależności od ocenionego stopnia ryzyka – jako stałe pastwisko lub plantacje nasienne traw; po czym przez kolejne dwa lata będą tam uprawiane rośliny żywicielskie omawianego organizmu i nie stanowią możliwego do zidentyfikowania ryzyka rozprzestrzeniania się lub przetrwania tego organizmu,
  - w pierwszym sezonie uprawy ziemniaka lub pomidora, po okresie omówionym w poprzednim tiret,
    - w przypadku ziemniaków wysadzany może być tylko kwalifikowany materiał siewny posiadający stosowne świadectwo – na materiał siewny lub do celów przetwórstwa,
- ponadto prowadzone są urzędowe kontrole, obejmujące przeprowadzenie badań, według art. 2 ust. 1;
- b) w innych sytuacjach:
- w roku wegetacji następującym bezpośrednio po wykryciu zakażenia:
    - nie będzie się uprawiać plantacji nasiennych ani towarowych ziemniaka i innych roślin żywicielskich danego organizmu, a zostaną podjęte działania zmierzające do wyeliminowania samosiewów roślin ziemniaka, pomidora oraz innych roślin żywicielskich danego organizmu, łącznie z chwastami psiankowatymi, stosownie do okoliczności, albo
    - w odniesieniu do bulw ziemniaka, można będzie sadzić wyłącznie urzędowo dopuszczony kwalifikowany materiał siewny, do celów przetwórstwa pod warunkiem że upoważnione organy uznają, że zostało wyeliminowane ryzyko pojawienia się samosiewów ziemniaka, pomidora oraz innych roślin żywicielskich danego organizmu. Plantacje w okresie wegetacji będą poddawane kontroli w odpowiednich okresach czasu, a samosiewy ziemniaka będą kontrolowane na obecność danego organizmu; ponadto – w przypadku ziemniaka – kontrolowane będą zbiory bulw;

- w pierwszym roku wegetacji, bezpośrednio po roku wymienionym w tirecie pierwszym,
  - w przypadku ziemniaka tylko urzędowo dopuszczony kwalifikowany materiał siewny może być używany do celów produkcji nasiennej lub przetwórstwa,
  - najwcześniej w drugim roku wegetacji po roku, wymienionym w tirecie pierwszym,
  - w przypadku ziemniaka, jedynie urzędowo dopuszczony kwalifikowany materiał siewny ziemniaka lub materiał siewny ziemniaka wyhodowany pod nadzorem upoważnionego organu urzędowego są uprawiane albo na materiał siewny albo do celów przetwórstwa,
  - w ciągu wszystkich lat wegetacji, omawianych w poprzednich tირет, zostaną podjęte środki, zmierzające do wyeliminowania samosiewów ziemniaka i pomidora oraz innych roślin żywicielskich organizmu, łącznie z chwastami psiankowatymi, ponadto będą prowadzone kontrole urzędowe, zgodnie z art. 2 ust. 1, a w przypadkach uprawy materiału siewnego ziemniaka na produkcję materiału siewnego, będzie prowadzona kontrola bulw;
- c) niezwłocznie po stwierdzeniu zarażenia, na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii), a także w każdym następnym roku wegetacji, aż do pierwszego sezonu dopuszczenia do uprawy ziemniaka lub pomidora, łącznie z tym rokiem, na polach(-u) uprawnych(-m), uznanym za zakazane, zgodnie z lit. a):
- wszelkie maszyny i urządzenia magazynowe znajdujące się w miejscu produkcji oraz wykorzystywane do produkcji ziemniaka lub pomidora, zostaną oczyszczone i w razie potrzeby, zostaną poddane dezynfekcji, przy użyciu właściwych metod, wyszczególnionych w ust. 3,
  - urzędowe kontrole programów nawadniania i zraszania, łącznie z zakazem tych czynności, zostaną wprowadzone jako zabezpieczenie przed rozprzestrzenieniem się organizmu;
- d) w jednostkach produkcji roślinnej chronionej upraw uznanych za zarażone na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt ii), w których możliwe jest pełne zastąpienie podłoża uprawowego,
- nie będą sadzone bulwy, rośliny ziemniaka i inne rośliny żywicielskie dla danego organizmu, łącznie z roślinami i nasionami pomidora, dopóki dana jednostka nie zostanie poddana urzędowo uznanym środkom, prowadzącym do wyeliminowania organizmu i usunięcia wszelkiego materiału roślinnego żywicielskiego dla danego organizmu, łącznie - z pełnym zastąpieniem podłoża uprawowego - oczyszczeniem, a w razie potrzeby - dezynfekcją podejrzaną jednostki oraz wszelkiego wyposażenia. Następnie trzeba uzyskać zgodę na produkcję ziemniaka lub pomidora ze strony upoważnionych organów urzędowych, oraz
  - w przypadku produkcji ziemniaka, odbywa się ona z wykorzystaniem urzędowo dopuszczonego kwalifikowanego materiału siewnego ziemniaków, albo z wykorzystaniem minibulw lub mikrobulw, pochodzących ze zbadanych źródeł,
  - zostaną wprowadzone urzędowe kontrole programów nawadniania i zraszania, oraz – w razie potrzeby – ich zakaz, w celu zapobieżenia rozprzestrzenieniu się danego organizmu.
- 4.2 W obrębie ochronnej strefy skażenia, bez uszczerbku dla środków podjętych zgodnie z pkt 4.1. Państwa Członkowskie:
- a) niezwłocznie i przez najbliższe trzy lata po wykryciu zarażenia:
- (aa) w przypadkach określenia strefy ochronnej ustalonej na mocy art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt iv),
- zapewniać nadzór, sprawowany przez własne upoważnione organy urzędowe, plantacji ziemniaka lub pomidorów w fazie wegetacji, zmagazynowanych bulw i owoców lub w fazie produkcji, razem z zabudowaniami, w których pracują maszyny do zakontraktowanej produkcji ziemniaka lub pomidora,
  - wymagać czyszczenia, lub w razie potrzeby – dezynfekcji maszyn oraz magazynów w budynkach, z użyciem właściwych metod, zgodnie z pkt 3,

- wymagać, by w strefie uprawiano jedynie urzędowo dopuszczony kwalifikowany materiał siewny, albo materiał siewny pochodzące z uprawy pod nadzorem urzędowym. Po zbiorach, uprawy rosnące w miejscach produkcji uznanych za prawdopodobnie zarażone, będą badane zgodnie z art. 5 ust. 1 lit. a) ppkt iii),
  - wymagać oddzielnego przechowywania zbiorów materiału siewnego ziemniaka w odróżnieniu od tych, przeznaczonych do przetwórstwa we wszystkich budynkach wewnątrz strefy ochronnej,
  - prowadzić urzędowe kontrole zgodnie z art. 2 ust. 1.
- (ab) w przypadkach uznania wód powierzchniowych za zakażone na mocy art. 5 ust. 1 lit. c) ppkt ii) lub wód znajdujących się w obszarze możliwego rozprzestrzenienia się organizmu, zgodnie z załącznikiem V pkt 2,
- prowadzić coroczną kontrolę we właściwym czasie, łącznie z pobraniem próbek wody powierzchniowej oraz odpowiednich roślin psiankowatych żywicielskich dla danego organizmu, z odpowiednich źródeł wody oraz wykonać badania zgodnie z
    - dla wyszczególnionego materiału roślinnego, stosowną metodą wymienioną w załączniku II lub,
    - w innych przypadkach – stosując urzędowo zaakceptowaną metodę,
  - prowadzić urzędowe kontrole programów nawadniania i zraszania, łącznie z zakazem, w razie potrzeby, stosowania wody uznanej za zakażoną do nawadniania lub zraszania wyszczególnionego materiału roślinnego, oraz w miarę potrzeb, innych roślin, dla zapobieżenia rozprzestrzeniania się danego organizmu. Zakaz można weryfikować na podstawie wspomianej wyżej kontroli rocznej,
  - w przypadkach zakażenia odpadów płynnych, należy wprowadzić kontrole urzędowe usuwania odpadów z przetwórstwa przemysłowego lub budynków, w których odbywa się pakowanie i przeróbka wyszczególnionego materiału roślinnego.
- b) w miarę potrzeb ustanowić program zastąpienia całego zapasu materiału siewnego w określonym czasie.
-

## ZAŁĄCZNIK VII

Urzędowo zatwierdzone urządzenia do usuwania odpadów, określone w ust. 1 załącznika VI, tiret czwarte, spełniają następujące przepisy, zapobiegające rozprzestrzenianiu się danego organizmu:

- i) stałe odpady z przetwórstwa przemysłowego ziemniaka oraz pomidora (łącznie z odpadami ziemniaków oraz skórką ziemniaków i pomidorów) oraz wszelkie inne stałe odpady związane z tą produkcją, powinny być utylizowane następująco:
  - poprzez głębokie zakopanie na składowisku odpadów, gdzie nie powstaje ryzyko przecieku na użytki rolne lub kontaktu z wodą, która mogłaby być wykorzystana do nawadniania użytków rolnych. Odpady należy przenosić bezpośrednio na miejsce składowania, w takich warunkach, które zabezpieczają przed ryzykiem ich zgubienia, lub
  - przez spalanie;
- ii) odpady płynne z przetwórstwa; przed ich usunięciem należy poddać je filtracji lub sedymentacji, dla usunięcia ciał stałych. Osad ten należy usuwać zgodnie z ppkt i).

Następnie należy odpady płynne:

- ogrzewać do temperatury co najmniej 70 °C przez najmniej 30 minut przed usunięciem, lub
  - za zgodą odpowiednich władz i pod kontrolą urzędową, usunąć w taki sposób, by nie weszła w kontakt z glebą użytków rolnych ani źródłami wody, która mogłaby być użyta do nawadniania użytków rolnych. Komisja i pozostałe Państwa Członkowskie zostaną powiadomione szczegółowo o przeprowadzonych operacjach.
-