

31998L0057

21.8.1998

URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI

L 235/1

DIREKTIVA SVETA 98/57/ES

z dne 20. julija 1998

o obvladovanju bakterije *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

SVET EVROPSKE UNIJE JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti in zlasti člena 43 Pogodbe,

ob upoštevanju predloga Komisije ⁽¹⁾,

ob upoštevanju mnenja Evropskega parlamenta ⁽²⁾,

ob upoštevanju Ekonomsko-socialnega odbora ⁽³⁾,

ker je bil škodljivi organizem *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* prvotno poznan kot *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith; ker bo *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* verjetno postalo splošno sprejeto ime za ta organizem; ker mora ta direktiva upoštevati ta razvoj dogodkov v znanosti;

ker pridelava krompirja in paradižnika zaseda pomembno mesto v kmetijstvu Skupnosti; ker škodljivi organizmi nenehno ogrožajo donos krompirja in paradižnika;

ker je treba z varstvom pridelave krompirja in paradižnika pred tovrstnimi škodljivimi organizmi ne samo ohranjati proizvodno zmogljivost, ampak tudi povečati kmetijsko produktivnost;

ker bi varstveni ukrepi za preprečitev vnosa škodljivih organizmov na ozemlje države članice imeli le omejen učinek, če se takšni organizmi ne bi istočasno in metodično zatirali v vsej Skupnosti in če se ne bi preprečevalo njihovo širjenje;

ker je eden izmed organizmov, škodljivih za krompir in paradižnik, *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, povzročiteljica krompirjeve rjave gnilobe ter bakterijskega venenja krompirja in paradižnika; ker je bolezen, ki jo povzroča ta patogen, izbruhnila v nekaterih predelih Skupnosti in ker še vedno obstaja nekaj omejenih virov okužbe;

ker je lahko pridelava krompirja in paradižnika resno ogrožena po vsej Skupnosti, če se za te pridelke ne sprejmejo učinkoviti ukrepi za detekcijo tega organizma in ugotavljanje njegove razširjenosti, da se prepreči njegovo pojavljanje in širjenje ter, če se odkrije, da se prepreči njegovo širjenje in se ga obvladuje z namenom izkoreninjenja;

ker je treba v Skupnosti sprejeti nekatere ukrepe, da se to zagotovi; ker mora biti poleg tega državam članicam omogočeno, da po potrebi sprejmejo dodatne ali strožje ukrepe, pod pogojem da premeščanje krompirja in paradižnika v Skupnosti ni ovirano, razen kolikor to določa Direktiva Sveta 77/93/EGS z dne 21. decembra 1976 o varstvenih ukrepih proti vnosu organizmov, škodljivih za rastline ali rastlinske proizvode, v Skupnost in proti njihovem širjenju v Skupnosti ⁽⁴⁾; ker je o takšnih ukrepih treba obvestiti druge države članice in Komisijo;

ker morajo ti ukrepi upoštevati, da so za detekcijo tega patogena potrebne uradne sistematične raziskave; ker morajo takšne raziskave vključevati preglede ter, kadar je to primerno, postopke vzorčenja in testiranja, saj je v določenih okoljskih pogojih ta bolezen lahko latentna in neopažena tako pri rastočem pridelku krompirja kot pri uskladiščenih krompirjevih gomoljih; ker širjenje tega patogena med rastočim pridelkom ni najpomembnejši dejavnik, saj se ta patogen lahko širi s površinskimi vodami in določenimi povezanimi samoniklimi razhudnikovkami in zato namakanje krompirja in paradižnika z okuženo vodo predstavlja nevarnost okužbe teh pridelkov; ker poleg tega ta patogen lahko preživi zimo v krompirjevih in paradižnikovih samosevcih, ti pa so tako vir prenosa okužbe iz ene sezone v naslednjo; ker se ta patogen širi tudi prek stika z okuženim krompirjem ter opremo za sajenje, spravilo in obdelovanje ali transportnimi in skladiščnimi zabojniki, ki so se kontaminirali z organizmom pri predhodnem stiku z okuženim krompirjem;

⁽¹⁾ UL C 124, 21.4.1997, str. 12 in UL C 108, 7.4.1998, str. 85.

⁽²⁾ UL C 14, 19.1.1998, str. 34.

⁽³⁾ UL C 206, 7.7.1997, str. 57.

⁽⁴⁾ UL L 26, 31.1.1977, str. 20. Direktiva, nazadnje spremenjena z Direktivo Komisije 98/2/ES (UL L 15, 21.1.1998, str. 34).

ker se širjenje tega patogena lahko omeji ali prepreči z razkuževanjem takšnih predmetov; ker lahko vsaka takšna kontaminacija semenskega krompirja predstavlja veliko nevarnost širjenja tega patogena; podobno predstavlja veliko nevarnost širjenja patogena latentna okužba semenskega krompirja, kar pa je mogoče preprečiti z uporabo semenskega krompirja, proizvedenega v okviru uradno odobrenih programov, pri katerih se je semenski krompir testiral in je bilo ugotovljeno, da je neokužen;

ker je trenutno poznavanje biologije in epidemiologije bakterije *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* v evropskih pogojih nepopolno in je pričakovati, da bo v nekaj sezonah potreben ponovni pregled predlaganih ukrepov; podobno je zaradi nadaljnjih raziskav pričakovati izboljšave postopkov testiranja, zlasti glede občutljivosti in specifičnosti testnih metod, da se izberejo in standardizirajo optimalne razpoložljive testne metode;

ker je za opredelitev podrobnosti takšnih splošnih in tudi strožjih ali dodatnih ukrepov, ki jih sprejmejo države članice, da bi preprečile vnos tega patogena na njihovo ozemlje, zaželeno, da države članice tesno sodelujejo s Komisijo v okviru Stalnega odbora za zdravstveno varstvo rastlin (v nadaljnjem besedilu „Odbor“),

SPREJEL NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Ta direktiva zadeva ukrepe, ki jih mora sprejeti vsaka država članica proti bakteriji *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, prvotno poznani kot *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith (v nadaljnjem besedilu „organizem“), da se, upoštevajoč gostiteljske rastline organizma, navedene v oddelku I Priloge I (v nadaljnjem besedilu „navedeni rastlinski material“):

- (a) organizem odkrije in ugotovi njegova razširjenost;
- (b) prepreči njegovo pojavljanje in širjenje; in
- (c) če se odkrije, prepreči njegovo širjenje in da se obvladuje z namenom izkoreninjenja.

Člen 2

1. Države članice opravljajo letne uradne sistematične raziskave za detekcijo organizma na navedenem rastlinskem materialu, ki izvira z njihovega ozemlja. Da bi se prepoznali drugi možni viri okužbe, ki ogrožajo pridelavo navedenega rastlinskega materiala, države članice izvedejo oceno nevarnosti in, razen če pri oceni ni ugotovljena nevarnost širjenja organizma, na pridelovalnih območjih navedenega rastlinskega materiala opravijo ciljno naravnane uradne sistematične raziskave za detekcijo organizma tudi na rastlinah, ki niso med navedenim rastlinskim materialom, vključno s samoniklimi gostiteljskimi rastlinami razhudnikovk, ter v površinski vodi, ki se uporablja za namakanje ali škropljenje navedenega rastlinskega materiala, in odpadnih vodah, ki se odvajajo iz obratov za industrijsko predelavo ali pakiranje, kjer se opravlja delo z navedenim rastlinskim materialom, in se uporabljajo za namakanje ali škropljenje navedenega rastlinskega materiala. Obseg teh ciljno naravnanih sistematičnih raziskav se določi glede na ugotovljeno nevarnost. Države članice lahko izvedejo tudi uradne sistematične raziskave za detekcijo organizma na materialih, kot so rastni substrat, zemlja in trdni odpadki iz obratov za industrijsko predelavo ali pakiranje.

2. Uradne sistematične raziskave, predvidene v odstavku 1, se opravijo:

- (a) za navedeni rastlinski material v skladu s podrobnostmi iz točke 1 oddelka II Priloge I; in,
- (b) za gostiteljske rastline, ki niso med navedenim rastlinskim materialom, in vode, vključno z odpadnimi vodami, v skladu z ustreznimi metodami, in kadar je to primerno, se odvzamejo vzorci, na katerih se opravi uradno ali uradno nadzorovano laboratorijsko testiranje;
- (c) kadar je to primerno, za druge materiale v skladu z ustreznimi metodami.

Podrobnosti postopkov pregledovanja ter število, izvor, stratifikacijo in čas odvzema vzorcev za te sistematične raziskave določijo pristojni uradni organi v skladu z Direktivo 77/93/EGS, na podlagi tehničnih znanstvenih in statističnih načel in biologije organizma ter ob upoštevanju posebnih sistemov pridelave navedenega rastlinskega materiala in, če je to primerno, drugih gostiteljskih rastlin organizma v zadevni državi članici.

3. O podrobnostih in rezultatih uradnih preiskav, predvidenih v odstavku 1, se vsako leto obvestijo druge države članice in Komisija v skladu z določbami točke 2 oddelka II Priloge I. Ta uradna obvestila se predložijo do 1. junija razen za krompir, uporabljen za seme na lastnih kmetijah, za katerega se obvestila predložijo do 1. septembra. Podrobnosti in rezultati za pridelke se nanašajo na pridelavo predhodnega leta. Podrobnosti o teh uradnih obvestilih se lahko predložijo Odboru.

4. Naslednja določba se sprejme v skladu s postopkom, določenim v členu 16a Direktive 77/93/EGS:

— ustrezne metode za sistematične preglede in laboratorijsko testiranje, predvideno v točki (b) prvega pododstavka odstavka 2.

5. Naslednji določbi se lahko sprejmeta v skladu s postopkom iz člena 16a Direktive 77/93/EGS:

— ustrezne metode za sistematične preglede, predvidene v točki (c) prvega pododstavka odstavka 2,

— nadaljnje podrobnosti o preiskavah, predvidenih v drugem pododstavku odstavka 2, z namenom zagotoviti primerljivo raven zanesljivosti med državami članicami.

Člen 3

Države članice zagotovijo, da se domnevni pojav ali potrjena navzočnost organizma na njenem ozemlju prijavi njenim pristojnim uradnim organom.

Člen 4

1. Pri vsakem primeru domnevnega pojava pristojni uradni organi zadevne ali zadevnih držav članic zagotovijo dokončanje uradnega ali uradno nadzorovanega laboratorijskega testiranja, ki za navedeni rastlinski material uporablja primerno metodo iz Priloge II v skladu s pogoji iz točke 1 Priloge III ali, v vseh drugih primerih, katero koli drugo uradno odobreno metodo, da se domnevni pojav potrdi ali ovrže. V primeru potrditve se uporabljajo zahteve iz točke 2 Priloge III.

2. Do potrditve ali ovržbe domnevnega pojava iz odstavka 1 pri vseh primerih domnevne navzočnosti, pri katerih bodisi:

(i) so bili opaženi simptomi bolezni, ki jo povzroča organizem, in je bil s hitrim presejalnim testom ali testi, kakor jih opredeljuje točka 1 oddelka I in oddelka II Priloge II, ugotovljen pozitiven rezultat; ali

(ii) je bil s presejalnim testom oziroma testi, kakor jih opredeljuje točka 2 oddelka I in oddelka III Priloge II, ugotovljen pozitiven rezultat,

pristojni uradni organi držav članic za svojo lastno pridelavo:

(a) prepovejo premeščanje rastlin in gomoljev iz vseh nasadov, partij ali pošiljk, iz katerih so bili vzeti vzorci, razen če se izvede pod njihovim nadzorom in je bilo dokazano, da ni nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma;

(b) odredijo ukrepe za izsleditev izvora domnevnega pojava;

(c) vpeljejo ustrezne dodatne varnostne ukrepe na podlagi ocenjene nevarnosti, zlasti v zvezi s pridelavo navedenega rastlinskega materiala in premeščanjem partij semenskega krompirja, razen tistega iz točke (a), proizvedenega na mestu pridelave, kjer so bili odvzeti vzorci iz točke (a), da se prepreči kakršno koli širjenje organizma.

3. Pri tistih primerih domnevnega pojava, pri katerih obstaja nevarnost prenosa okužbe navedenega rastlinskega materiala ali površinske vode iz drugih držav članic ali v druge države članice, država članica, v kateri je bil domnevni pojav prijavljen, v skladu z ugotovljenim tveganjem takoj obvesti druge zadevne države članice o podrobnostih navedenega domnevnega pojava, čemur sledi vzpostavitev ustreznega sodelovanja med navedenimi državami članicami. Tako obveščene države članice vpeljejo varnostne ukrepe v skladu z odstavkom 2(c) in, če je to primerno, nadalje ukrepajo v skladu z odstavkoma 1 in 2.

4. Naslednja določba se lahko sprejme v skladu s postopkom iz člena 16a Direktive 77/93/EGS:

— ukrepi iz odstavka 2(c).

Člen 5

1. Če uradno ali uradno nadzorovano laboratorijsko testiranje, ki za navedeni rastlinski material uporablja primerno metodo iz Priloge II ali, v vseh drugih primerih, katero koli drugo uradno odobreno metodo, potrdi navzočnost organizma v vzorcu, odvzetem v skladu s to direktivo, pristojni uradni organi države članice, ob upoštevanju tehtnih znanstvenih načel, biologije organizma in posebnih sistemov pridelave, trženja in predelave gostiteljskih rastlin tega organizma v tej državi članici:

(a) za navedeni rastlinski material;

(i) sprožijo preiskavo, da se določijo obseg in prvotni vir ali viri okužbe v skladu z določbami Priloge IV, z nadaljnjim testiranjem v skladu s členom 4(1) vsaj vseh klonsko sorodnih zalog semenskega krompirja, in

- (ii) določijo za kužen navedeni rastlinski material, pošiljko in/ali partijo, iz katere je bil odvzet vzorec, ter stroje, vozilo, posodo, skladišče ali njihove dele in katere koli druge predmete, vključno s pakirnim materialom, ki so bili v stiku z navedenim rastlinskim materialom, iz katerega je bil vzorec odvzet; prav tako, kadar je to primerno, določijo kot kužna polja, enote pridelave zavarovanega pridelka in mesta pridelave, kjer je bil pospravljen navedeni rastlinski material in odvzet vzorec; in pri vzorcih, odvzetih v rastni dobi, določijo kot kužne polja, mesta pridelave ter, kadar je to primerno, enote zavarovane pridelave rastlin, kjer je bil odvzet vzorec, in
- (iii) v skladu z določbami točke 1 Priloge V ugotovijo obseg verjetne okužbe prek stika pred ali po pravilu pridelka, v času pridelave, namakanja ali škropljenja ali prek klonske sorodnosti z določeno okužbo, in
- (iv) razmejijo območje na podlagi določitve kužnosti iz točke (ii), ugotovitve obsega verjetne okužbe iz točke (iii) in možnega širjenja organizma v skladu z določbami točke 2(i) Priloge V;
- (b) za pridelek gostiteljskih rastlin, ki niso navedene v točki (a), kadar je ugotovljena nevarnost za pridelavo navedenega rastlinskega materiala,
- (i) sprožijo preiskavo v skladu s točko (a)(i); in
- (ii) določijo kot kužne gostiteljske rastline organizma, iz katerih je bil odvzet vzorec; in
- (iii) ugotovijo verjetnost okužbe in razmejijo območje v zvezi s pridelavo navedenega rastlinskega materiala v skladu s točkama (a)(iii) in (iv);
- (c) za površinsko vodo (vključno z odpadnimi vodami iz obratov za industrijsko predelavo ali pakiranje, kjer se opravlja delo z navedenim rastlinskim materialom) in z njimi povezane samonikle gostiteljske rastline razhudnikov, kadar je pridelava navedenega rastlinskega materiala ogrožena zaradi namakanja, škropljenja ali poplavljanja površinske vode,
- (i) sprožijo preiskavo, vključno z uradnimi sistematičnimi pregledi v primernih časovnih obdobjih, na vzorcih površinske vode in navzočih samoniklih gostiteljskih rastlin razhudnikov, da se ugotovi obseg okužbe; in
- (ii) določijo kot kužno površinsko vodo, iz katere so bili odvzeti vzorci, v ustreznem obsegu in na podlagi preiskave iz točke (i); in
- (iii) ugotovijo verjetnost okužbe in razmejijo območje na podlagi določitve kužnosti iz točke (ii) in možnega širjenja organizma, upoštevajoč določbe točk 1 in 2(ii) Priloge V.
2. Države članice v skladu z določbami točke 3 Priloge V takoj uradno obvestijo druge države članice in Komisijo o vsaki kontaminaciji, določeni v skladu z odstavkom 1(a)(ii) in 1(c)(ii), ter o podrobnostih razmejitve območij v skladu z odstavkom 1(a)(iv) in, po potrebi, z odstavkom 1(c)(iii). Podrobnosti o obvestilu iz tega odstavka se lahko predložijo Odboru.
- Države članice Komisiji hkrati predložijo tudi dodatno obvestilo iz točke 4 Priloge V. Podrobnosti o obvestilu iz tega pododstavka se takoj predložijo članom Odbora.
3. Na podlagi obvestila iz odstavka 2 in v njem navedenih elementov druge države članice, navedene v obvestilu, sprožijo preiskavo v skladu z odstavkom 1(a)(i) in, po potrebi, z odstavkom 1(c)(i) ter, če je to primerno, nadalje ukrepajo v skladu z odstavkom 1 in 2.

Člen 6

1. Države članice predpišejo, da se navedeni rastlinski material, ki je določen kot kužen v skladu s členom 5(1)(a)(ii), ne sme saditi in da se pod nadzorom in z odobritvijo njihovih pristojnih uradnih organov zanj uporabi ena izmed določb točke 1 Priloge VI, tako da se zagotovi, da ni nobene prepoznavne nevarnosti širjenja organizma.

2. Države članice predpišejo, da se navedeni rastlinski material, ki je določen za verjetno okuženega v skladu s členom 5(1)(a)(iii) in (c)(iii), vključno z navedenim rastlinskim materialom, pri katerem je bila ugotovljena nevarnost in ki je bil pridelan na mestih pridelave, določenih za verjetno okužena v skladu s členom 5(1)(a)(iii), ne sme saditi in da se pod nadzorom njihovih pristojnih uradnih organov ustrezno uporabi ali odstrani, kakor je določeno v točki 2 Priloge VI, tako da se zagotovi, da ni nobene prepoznavne nevarnosti širjenja organizma.

3. Države članice predpišejo, da se vsi stroji, vozilo, posoda, skladišče ali njihovi deli ter vsi drugi predmeti, vključno s pakirnim materialom, ki so določeni kot kužni v skladu s členom 5(1)(a)(ii) ali za verjetno kužni v skladu s členom 5(1)(a)(iii) in (c)(iii), uničijo ali razkužijo z uporabo ustreznih metod, določenih v točki 3 Priloge VI. Po razkuževanju vsi ti predmeti ne veljajo več za kužne.

4. Brez poseganja v ukrepe, ki se izvajajo v skladu z odstavki 1, 2 in 3, države članice predpišejo, da se na območju, razmejenem po členu 5(1)(a)(iv) in (c)(iii), izvede niz ukrepov, kakor jih določata točki 4.1 in 4.2 Priloge VI. O podrobnostih teh ukrepov se vsako leto uradno obvestijo druge države članice in Komisija. Podrobnosti o tem obvestilu se lahko predložijo Odboru.

Člen 7

1. Države članice predpišejo, da mora semenski krompir izpolnjevati zahteve Direktive 77/93/EGS in izvirati neposredno iz materiala, ki je bil pridobljen v skladu z uradno odobrenim programom in za katerega je bilo z uradnim ali uradno nadzoranim testiranjem po primerni metodi iz Priloge II ugotovljeno, da ni okužen z organizmom.

Navedeno testiranje država članica opravi:

- (a) v primeru potrjenih odkritij organizma pri svoji lastni pridelavi semenskega krompirja,
 - (i) s testiranjem zgodnejših stopenj razmnoževanja, vključno z začetno stopnjo klonske selekcije, in sistematičnim testiranjem klonov osnovnega semenskega krompirja; ali
 - (ii) kadar je bilo ugotovljeno, da ni klonske sorodnosti, s testiranjem vseh klonov osnovnega semenskega krompirja ali zgodnejših stopenj razmnoževanja, vključno z začetno stopnjo klonske selekcije, ter
- (b) v drugih primerih, bodisi na vsaki rastlini začetne klonske selekcije bodisi na reprezentativnih vzorcih osnovnega semenskega krompirja ali zgodnejših stopnjah razmnoževanja.

2. Naslednji določbi se lahko sprejmeta v skladu s postopkom iz člena 16a Direktive 77/93/EGS:

- podrobna pravila za uporabo točke (a) drugega pododstavka odstavka 1,
- pravila v zvezi z reprezentativnimi vzorci, predvidenimi v točki (b) drugega pododstavka odstavka 1.

Člen 8

Države članice prepovejo posedovanje organizma in ravnanje z njim.

Člen 9

Države članice lahko brez poseganja v določbe Direktive 77/93/EGS dovolijo odstopanja od ukrepov iz členov 6 in 8 te direktive v skladu z določbami Direktive 95/44/ES⁽¹⁾ za poskusne ali znanstvene namene in za delo na področju žlahtnenja.

Člen 10

Države članice lahko za lastno pridelavo sprejmejo dodatne ali strožje ukrepe, ki bi lahko bili potrebni za zatiranje organizma ali za preprečevanje njegovega širjenja, če je to v skladu z določbami Direktive 77/93/EGS.

O podrobnostih v zvezi s temi ukrepi se uradno obvestijo druge države članice in Komisija. Podrobnosti o tem obvestilu se lahko predložijo Odboru.

Člen 11

Spremembe prilog k tej direktivi, potrebne zaradi razvoja znanstvenega in tehničnega znanja, se sprejmejo v skladu s postopkom iz člena 16a Direktive 77/93/EGS. V zvezi z metodami iz Priloge II in ukrepi iz odstavkov 4.1 in 4.2 Priloge VI k tej direktivi Komisija pripravi poročilo, v katerem te metode in ukrepe analizira na podlagi pridobljenih izkušenj, in ga predloži Odboru do 1. januarja 2002.

Člen 12

1. Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, z začetkom veljavnosti od 21. avgusta 1999. O tem nemudoma obvestijo Komisijo.

Države članice se v sprejetih predpisih sklicujejo na to direktivo ali pa sklic nanjo navedejo ob njihovi uradni objavi. Način sklicovanja določijo države članice.

2. Države članice takoj predložijo Komisiji temeljne predpise nacionalne zakonodaje, sprejete na področju, ki ga ureja ta direktiva. Komisija o tem obvesti druge države članice.

⁽¹⁾ UL L 184, 3.8.1995, str. 34. Direktiva, kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo Komisije 97/46/ES (UL L 204, 31.7.1997, str. 43).

Člen 13

V Bruslju, 20. julija 1998

Ta direktiva začne veljati na dan njene objave v *Uradnem listu*
Evropskih skupnosti.

Za Svet

Predsednik

W. MOLTERER

Člen 14

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

PRILOGA I

ODDELEK I

Seznam gostiteljskih rastlin bakterije *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. iz člena 1

Rastline (vključno z gomolji), razen semena v botaničnem smislu, vrste <i>Solanum tuberosum</i> L.	krompir
Rastline, razen plodov in semena, vrste <i>Lycopersicon lycopersicum</i> (L.) Karsten ex Farw.	paradižnik

ODDELEK II

Preiskave

1. Uradne sistematične raziskave iz člena 2(2)(a) temeljijo na biologiji organizma in posebnih sistemih pridelave v zadevni državi članici ter zajemajo:
 - (i) v primeru krompirja,
 - vizualni pregled rastočega nasada v ustreznih časovnih obdobjih in/ali odvzem vzorcev semenskega in drugega krompirja v rastni sezoni ali v skladišču. Pri teh vzorcih se opravi uradni ali uradno nadzorovani vizualni pregled z rezanjem gomoljev, in
 - v primeru semenskega krompirja in, kadar je to primerno, drugega krompirja, uradno ali uradno nadzorovano laboratorijsko testiranje z uporabo metode iz Priloge II,
 - (ii) v primeru paradižnika,
 - vizualni pregled v ustreznih časovnih obdobjih, vsaj rastočih rastlin, ki so namenjene presajanju za tržno pridelavo.
2. Obvestilo o uradnih sistematičnih raziskavah iz člena 2(3) vsebuje:
 - (i) za sistematične raziskave krompirja,
 - oceno skupne posajene površine semenskega in drugega krompirja v hektarih,
 - razdelitev po kategorijah semenskega in merkantilnega krompirja in, kadar je to primerno, po regijah,
 - število vzorcev za testiranje in čas vzorčenja,
 - število vizualnih pregledov na polju,
 - število vizualnih pregledov gomoljev (in velikost vzorca);
 - (ii) za sistematične raziskave vsaj rastočih rastlin paradižnika, ki so namenjene presajanju za tržno pridelavo,
 - oceno skupnega števila rastlin,
 - število vizualnih pregledov;
 - (iii) za sistematične raziskave gostiteljskih rastlin, razen krompirja in paradižnika, vključno s samoniklimi gostiteljskimi rastlinami razhudnikovk,
 - vrsto,
 - število vzorcev in čas vzorčenja,
 - vzorčeno območje/reko,
 - analitsko metodo;
 - (iv) za sistematične raziskave površinske vode in odpadnih voda iz obratov za industrijsko predelavo ali pakiranje,
 - število vzorcev in čas vzorčenja,
 - območje/reko/lokacijo vzorčenih obratov,
 - analitsko metodo.

PRILOGA II

PRESKUSNA SHEMA ZA DIAGNOSTICIRANJE, DETEKCIJO IN IDENTIFIKACIJO BAKTERIJE RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL.

PODROČJE UPORABE TESTNE SHEME

Ta shema opisuje različne postopke, povezane z:

- (i) diagnozo rjave gnilobe pri gomoljih krompirja ali bakterijskega venenja pri rastlinah krompirja in paradižnika;
- (ii) detekcijo bakterije *Ralstonia solanacearum* v vzorcih gomoljev krompirja;
- (iii) identifikacijo bakterije *Ralstonia solanacearum*.

V dodatkih so navedene podrobnosti za pripravo testnih materialov, t.j. rastnih gojišč, pufrov, raztopin, reagentov.

VSEBINA:

ODDELEK I:	Uporaba testne sheme	9
	1. Diagnoza rjave gnilobe pri gomoljih krompirja in bakterijskega venenja pri rastlinah krompirja in paradižnika	9
	2. Detekcija in identifikacija bakterije <i>Ralstonia solanacearum</i> v vzorcih gomoljev krompirja	11
ODDELEK II:	Diagnoza rjave gnilobe pri gomoljih krompirja ter bakterijskega venenja pri rastlinah krompirja in paradižnika	13
	1. Simptomi	13
	2. Hitri presejalni test(-i)	13
	3. Izolacija	14
	4. Potrditveni test(-i)	14
ODDELEK III:	Detekcija in identifikacija bakterije <i>Ralstonia solanacearum</i> v vzorcih gomoljev krompirja	17
	1. Priprava vzorca za testiranje	17
	2. Imunofluorescenčni (IF) test	18
	3. Encimsko-immunski test (ELISA)	20
	4. Verina reakcija s polimerazo (PCRTM)	20
	5. Testiranje z razmazom na selektivno gojišče	22
	6. Biološki test	23
	7. Obogatitveni testi	23
	8. Testi patogenosti	23
Dodatek 1	Hranilna gojišča za izolacijo in gojenje bakterije <i>Ralstonia solanacearum</i>	24
Dodatek 2	Material za pripravo vzorcev	25
Dodatek 3	Material za IF test	26
Dodatek 4	Določanje stopnje okube pri IF testu	27
Dodatek 5	Material za test ELISA	28
Dodatek 6	Material za test PCR	29
Dodatek 7	Material za testiranje z razmazom na selektivno in obogatitveni test	29
Viri		30

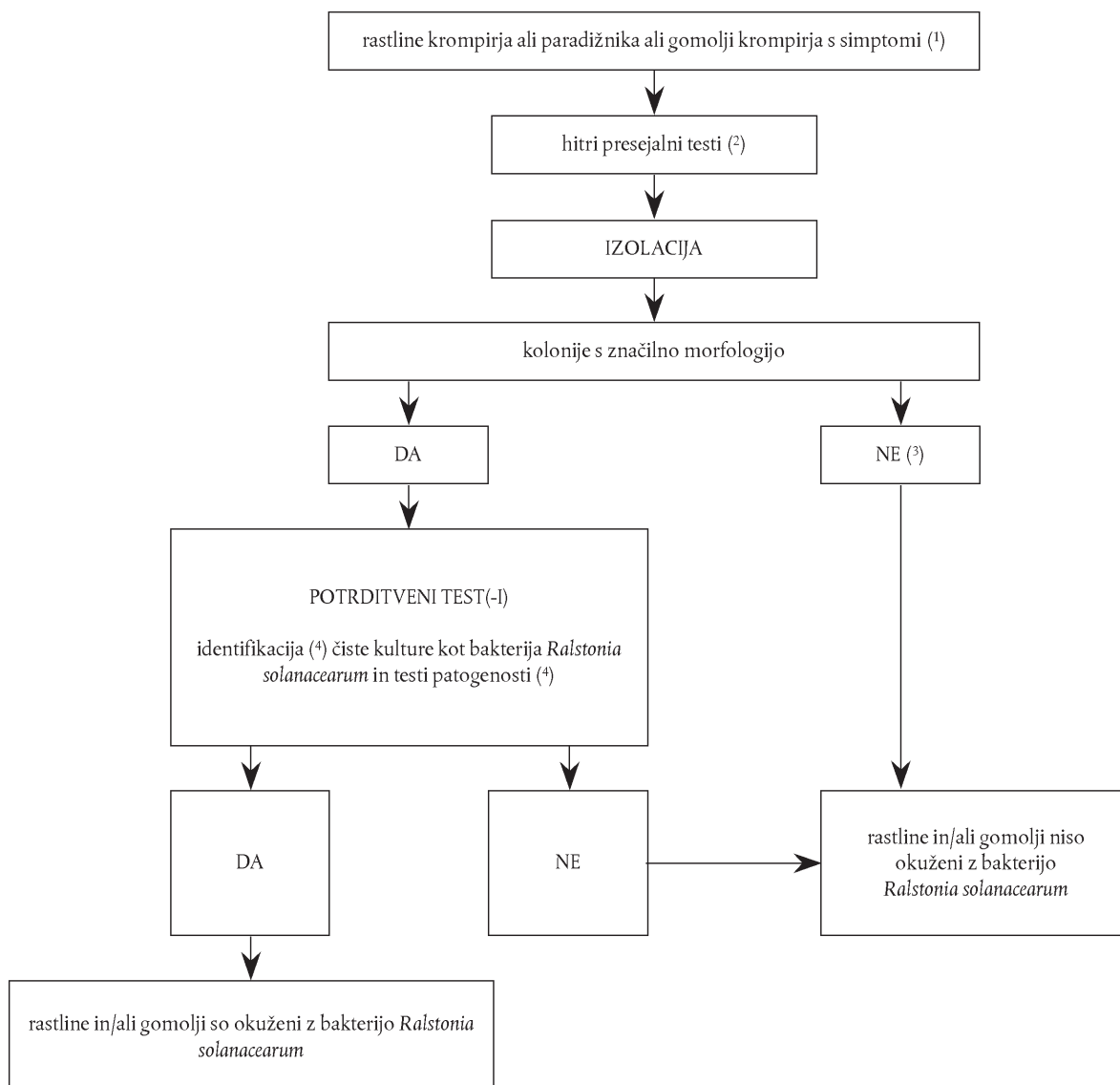
ODDELEK I

UPORABA TESTNE SCHEME

1. Diagnoza rjave gnilobe pri gomoljih krompirja in bakterijskega venenja pri rastlinah krompirja in paradižnika

Postopek testiranja je namenjen za gomolje krompirja s simptomi, ki so značilni za ali nakazujejo sum na rjavo gnilobo, in za rastline krompirja in paradižnika s simptomi, ki so značilni za ali nakazujejo sum na bakterijsko venenje. Vključuje hitri presejalni test, izolacijo patogena iz okuženega žilnega tkiva na diagnostičnem gojišču in, v primeru pozitivnega rezultata, identifikacijo kulture kot bakterije *Ralstonia solanacearum*.

Diagram poteka



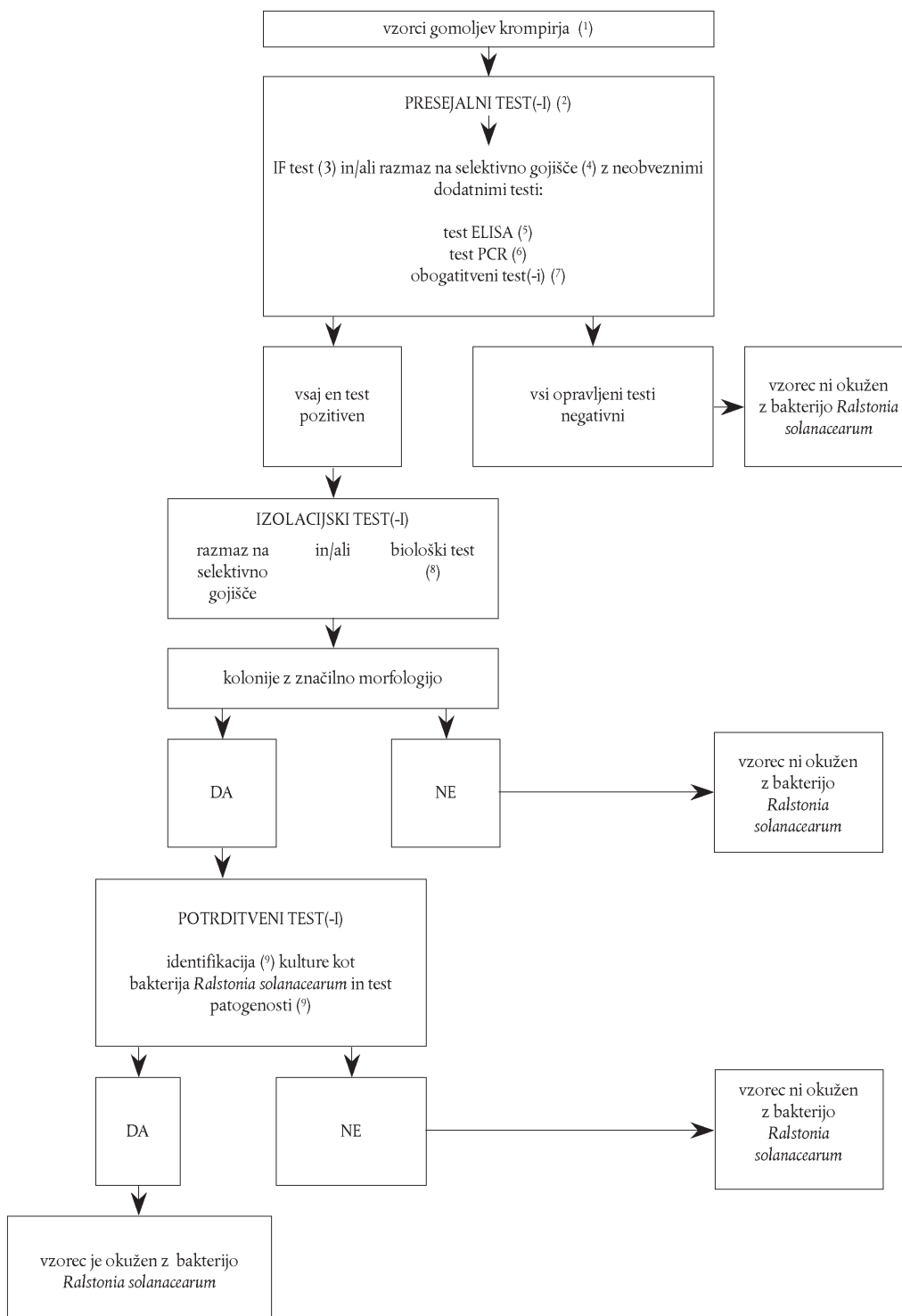
Opombe k diagramu:

- (¹) Opis simptomov je naveden v oddelku II.1.
- (²) Hitri presejalni testi pospešijo domnevno diagnozo.
Ustrezni testi so:
 - test eksudacije na žilnem tkivu stebela (oddelek II.2),
 - test za zrnca poli- β -hidroksibutirata (oddelek II.2),
 - IF-test (oddelek III.2),
 - test ELISA (oddelek III.3),
 - test PCR (oddelek III.4).
- (³) Čeprav je izolacija patogena iz rastlinskega materiala z značilnimi simptomi z razmazom razredčine preprosta, lahko kultiviranje spodleti pri naprednih fazah okužbe. Saprofitske bakterije, ki rastejo na obolelem tkivu, lahko prerastejo ali inhibirajo patogen na izolacijskem gojišču. Če je izolacijski test negativen, bolezenski simptomi pa značilni, je treba postopek izolacije ponoviti, najbolje s testiranjem z razmazom na selektivno gojišče.
- (⁴) Zanesljiva identifikacija čiste kulture bakterije *Ralstonia solanacearum* se doseže z vsaj enim izmed testov, ki so navedeni v oddelku II.4.1, v kombinaciji s testom patogenosti (oddelek II.4.3). Opredelitev seva je neobvezna, vendar je priporočljiva za vsak nov primer.

2. Detekcija in identifikacija bakterije *Ralstonia solanacearum* v vzorcih gomoljev krompirja

Postopek je namenjen detekciji latentne okužbe v gomoljih krompirja z uporabo enega ali, še bolje, več presejalnih testov, ki jih v primeru pozitivnega rezultata dopolnjuje izolacija patogena; v primeru izolacije tipičnih kolonij, temu sledi še identifikacija čiste kulture kot bakterije *Ralstonia e solanacearum*.

Diagram poteka



Opombe k diagramu:

(1) Velikost vzorca

Standardna velikost je 200 gomoljev. Vendar je ta postopek mogoče ustrezno uporabiti tudi za vzorce z manj kot 200 gomolji.

(2) Presejalni test(-i)

En sam test ni nujno dovolj občutljiv ali zanesljiv za odkritje bakterije *Ralstonia solanacearum* v vzorcu. Zato je priporočljivo opraviti več testov in zaželeno, da ti testi temeljijo na različnih bioloških načelih.

(3) Imunofluorescenčni (IF) test

IF-test je splošno priznan presejalni test. To mu daje prednost pred drugimi testi, ki še niso docela razviti ali validirani. Uporablja se za mnoge druge karantenske bakterije, npr. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Pri parametrih za odčitavanje, določenih v tej metodi, je to občutljiv test (prag občutljivosti je 10^3 – 10^4 celic na ml pelete krompirjevega ekstrakta).

Kritični dejavnik zanesljivosti rezultata testa je kakovost antiseruma. Sprejemljiv je samo antiserum z visokim titrom (najmanj 2000 za surov antiserum), vse teste pa je treba izvesti pri titru antiseruma ali pri eni razredčini pod tem titrom. Indirektna metoda je primernejša. Direktno metodo je mogoče uporabiti, če je raven občutljivosti in specifičnosti testa enaka ravni indirektnih metod.

Prednost IF-testa je subjektivno interpretiranje morfologije celic in intenzitete fluorescenčnosti, ki dajeta informacije o specifičnosti reakcije. Pogoste so navzkrižne reakcije s serološko sorodnimi bakterijami, prisotnimi v prsti ali povezanimi s krompirjevimi tkivi, s celično morfologijo bakterije *Ralstonia solanacearum*. IF-test je mogoče uporabiti kot edini presejalni test, čeprav je treba, kadar se pričakujejo navzkrižne reakcije, opraviti še dodatni presejalni test, ki temelji na drugačnih bioloških načelih. V takšnih primerih je najustreznejši razmaz na selektivno gojišče.

(4) Razmaz na selektivno gojišče

Z modificiranim gojiščem SMSA in testnim postopkom, opredeljenim v tej metodi, je to občutljiv in selektiven test za bakterije *Ralstonia solanacearum*. Rezultat se doseže 3–6 dni po pripravi vzorca. Patogen se pridobi neposredno v kulturi in ga je mogoče zlahka identificirati. Za popolnoma izkoriščeno zmogljivost testa, je potrebna natančna priprava območja stolona, da se izognemo sekundarnim bakterijam, povezanim z gomoljem krompirja, ki na gojišču tekmujejo z bakterijo *Ralstonia solanacearum* in lahko vplivajo na razvoj patogena. Nekateri sevi se lahko slabo razrastejo, saj sestavine gojišča lahko vplivajo na ciljni organizem. Paziti je treba tudi, da se *Ralstonia solanacearum* razloči od drugih bakterij, ki se lahko razvijejo na gojišču. Razmaz na selektivno gojišče je mogoče uporabiti kot edini presejalni test, pod pogojem da se ob sumu, da druge bakterije na gojišču inhibirajo bakterijo *Ralstonia solanacearum*, in ob negativnem rezultatu testa vzorec ponovno testira z uporabo drugega testa, da se diagnoza potrdi ali ovrže. V takšnih primerih je najustreznejši IF-test.

(5) Test ELISA

Test ELISA je na splošno manj občutljiv od IF-testa (prag občutljivosti je 10^4 – 10^5 celic na ml pelete krompirjevega ekstrakta). Test je poceni in hiter, vendar na splošno bolj dovzeten za lažno pozitivne (navzkrižne reakcije) in lažno negativne rezultate (inhibicija s fenolnimi molekulami v ekstraktu krompirja). Zahteve za specifičnost antiseruma so zelo visoke. Testa ELISA ni mogoče uporabiti kot edini presejalni test.

(6) Test PCR

Test PCR nudi možnosti za zelo občutljivo detekcijo, čeprav ga hitro inhibirajo sestavine ekstraktov rastlin ali gomoljev, zaradi česar je rezultat lažno negativen. Nekateri kultivarji krompirja vsebujejo več inhibitorjev kot drugi. Zato je treba te inhibitorje odstraniti. Inhibicija se lahko zmanjša z redčenjem, vendar se tako razredčijo tudi populacije bakterije *Ralstonia solanacearum*. V vseh fazah priprave vzorcev in testa je treba zelo paziti, da se prepreči okužba, ki bi lahko povzročila lažno pozitiven rezultat. Do lažno pozitivnih rezultatov lahko pride tudi zaradi homolognih zaporedij drugih organizmov. Zato direktnega testa PCR ni mogoče uporabiti kot edini presejalni test.

(7) Obogatitveni test

Inkubiranje pelete krompirjevega ekstrakta v polselektivnem bujonu, kakršen je modificirani bujon SMSA, omogoča množenje bakterije *Ralstonia solanacearum*. Verjetno je še bolj pomembno to, da se s tem tudi razredčijo možni inhibitorji testa ELISA ali PCR. Bakterijo *Ralstonia solanacearum* v obogatitvenem bujonu je tako mogoče odkriti s testi IF, ELISA in PCR. Ni priporočljivo pripravljati razmazov neposredno iz obogatitvenih bujonov. Te obogatitvene metode namreč še niso povsem preverjene in testirane. Tu so navedene, ker so zelo obetavne. Vendar pa jih prav zaradi pomanjkanja izkušenj ni mogoče uporabljati kot edino metodo detekcije.

(8) Biološki test

Biološki test se uporablja za izolacijo bakterije *Ralstonia solanacearum* iz pelet krompirjevega ekstrakta s selektivno obogatitvijo v gostiteljski rastlini in se lahko opravi na rastlinah paradižnika ali jajčevca. Test zahteva optimalne pogoje inkubacije, kakor jih opredeljuje metoda. Bakterije, ki inhibirajo bakterijo *Ralstonia solanacearum* na gojišču SMSA, testa najverjetneje ne bodo motile.

(9) Potrditveni testi

Zanesljiva identifikacija čiste kulture bakterije *Ralstonia solanacearum* se doseže z vsaj enim od testov, navedenih v oddelku II.4.1, v kombinaciji s testom patogenosti (oddelek II.4.3). Opredelitev seva je neobvezna, vendar je priporočljiva za vsak nov primer.

ODDELEK II

*Diagnoza rjave gnilobe pri gomoljih krompirja ter bakterijskega venenja pri rastlinah krompirja in paradižnika*1. **Simptomi**1.1 **Simptomi pri krompirju**

Rastlina krompirja. Zgodnja stopnja okužbe se kaže kot venenje listov proti vrhu rastline pri visokih dnevniških temperaturah, ponoči pa si rastlina opomore. Venenje hitro postane nepovratno in se konča z odmrtjem rastline. Žilno tkivo prečno prerezanih stebel uvelih rastlin lahko porjavi, na površini prereza pa je mogoče opaziti ali z lahkoto iztisniti mlečni izcedek. Če prerezano steblo postavimo navpično v vodo, iz žilnih snopov pritečejo sluzaste niti.

Gomolj krompirja. Gomolje krompirja je treba prečno prerezati blizu območja stolona. Zgodnja stopnja okužbe se kaže kot steklasto rumeno do svetlo rjavo razbarvanje žilnega obroča, iz katerega se po nekaj minutah pocedi bled, kremast izcedek, bodisi spontano bodisi ob nežnem pritisku s palci na povrhnjici v bližini prereza. Pozneje postane razbarvanost žilnega tkiva bolj izrazito rjava, nekroza pa lahko zajame parenhimatično tkivo. V napredovalih stopnjah okužba izbruhne navzven od stolona in očes, kar lahko povzroči rdečkasto-rjave, nekoliko udrtne razpoke na povrhnjici, iz katerih lahko meži bakterijski izcedek, na katerega se začnejo lepiti grudice prsti.

1.2 **Simptomi pri paradižniku**

Rastlina paradižnika. Prvi vidni simptom je uvel videz najmlajših listov. V ugodnih okoljskih pogojih za patogen (temperatura tal okrog 25 °C, nasičenost z vlago) sledita v nekaj dneh epinastija in venenje ene strani ali cele rastline, kar pripelje do njenega popolnega odmrtja. V manj ugodnih pogojih (temperatura tal pod 21 °C) lahko iz stebela požene večje število adventivnih korenin. Mogoče je opaziti mastno izboklino vzdolž stebela, ki je dokaz nekroze žilnega sistema. Če steblo prečno prerežemo, iz razbarvanega rjavega žilnega tkiva stebela pritečejo kaplje belega ali rumenkastega bakterijskega izcedka.

2. **Hitri presejalni testi**

Hitri presejalni testi pospešijo domnevno diagnozo. Uporabimo enega ali več od naslednjih testov:

Testi eksudacije na steblih

Prisotnost bakterije *Ralstonia solanacearum* v uvelih steblih krompirja ali paradižnika je mogoče oceniti na podlagi naslednjega preprostega testa verjetnosti:

Steblo prerežemo tik nad površino tal. Prerezano površino postavimo v čašo z vodo. Kmalu zatem iz žilnih snopov spontano pritečejo sluzaste niti bakterijskega izcedka. Če žilno okužbo rastlin krompirja ali paradižnika povzroči katera koli druga bakterija, tega pojava ni.

Detekcija zrnca poli-β-hidroksibutirata (PHB)

Zrnca PHB v celicah *Ralstonie solanacearum* postanejo vidna po obarvanju z nilsko modrim A ali sudan-črnim B.

Pripravimo razmaz izcedka ali suspendiranega tkiva na objektnem stekelcu ali razmaz 48-urne kulture na YPGA ali SPA (Dodatek 1). Pripravimo razmaze seva biovar 2/biotip 3 za pozitivno kontrolo in, če se zdi uporabno, razmaz heterolognega seva za negativno kontrolo. Razmaze pustimo, da se posušijo. Spodnjo površino stekelca nekajkrat hitro povlečemo prek plamena, da se razmaz fiksira.

Test z nilsko modrim

(1) Fiksiran razmaz zalijemo z 1-odstotno vodno raztopino nilsko modrega A.

Inkubiramo 10 minut pri 55 °C.

(2) Odcedimo raztopino barvila. Na hitro speremo pod počasi tekočo vodovodno vodo. Odstranimo odvečno vodo z vpojnim papirjem.

(3) Razmaz zalijemo z 8-odstotno vodno raztopino oetne kisline.

Inkubiramo 1 minuto pri sobni temperaturi.

(4) Speremo pod počasi tekočo vodovodno vodo. Posušimo z vpojnim papirjem.

(5) Ponovno navlažimo s kapljo vode. Pokrijemo s krovnim stekelcem.

(6) Obarvani razmaz opazujemo pod epifluorescenčnim mikroskopom pri 450 nm v imerzijskem olju pri povečavi 1 000.

Iščemo svetlo oranžna fluorescenčna zrnca PHB. Opazujemo tudi pri dnevni svetlobi, da se prepričamo, da so zrnca znotraj celic in da je morfologija celic značilna za bakterijo *Ralstonia solanacearum*.

Test s sudan črnim

- (1) Fiksiran razmaz zalijemo z 0,3-odstotno raztopino sudan črnega B v 70-odstotnem etanolu. Inkubiramo 10 minut pri sobni temperaturi.
- (2) Odcedimo raztopino barvila. Na hitro speremo pod tekočo vodo. Odstranimo odvečno vodo z vpojnim papirjem.
- (3) Razmaz na kratko potopimo v ksilol. Popivnemo z vpojnim papirjem.
Pozor! Ksilol je zdravju škodljiv. Delajte v digestoriju.
- (4) Razmaz zalijemo z 0,5-odstotno (w/v) vodno raztopino safranina in pustimo 10 sekund pri sobni temperaturi.
Pozor! Safranin je zdravju škodljiv. Delajte v digestoriju.
- (5) Speremo pod počasi tekočo vodovodno vodo. Popivnemo z vpojnim papirjem. Pokrijemo s krovnim stekelcem.
- (6) Obarvani razmaz opazujemo pod svetlobnim mikroskopom s presežno svetlobo v imerzijskem olju pri povečavi 1 000.
Zrnca PHB v celicah bakterije *Ralstonia solanacearum* se obarvajo modro-črno. Celične stene se obarvajo rožnato.

Drugi testi

Drugi ustrezni presejalni testi so IF-test (oddelek III.2), test ELISA (oddelek III.3) in test PCR (oddelek III.4).

3. Izolacija

- 3.1 Odvzamemo izcedek ali dele razbarvanega tkiva z žilnega obroča v gomolju krompirja ali z žilnih trakov v stebelu rastlin krompirja ali paradižnika. Suspendiramo v majhni količini sterilne destilirane vode ali 50 mM fosfatnega pufra. Pustimo 5–10 minut.
- 3.2 Pripravimo niz desetkratnih razredčin suspenzije, npr. 1/10 in 1/100 ali več, kolikor je ustrezno.
- 3.3 Standardno količino suspenzije in razredčin prenesemo na splošno hranilno gojišče (NA, YPGA in SPA, Dodatek 1) in/ali tetrazolno gojišče po Kelmanu (Dodatek 1) in/ali selektivno gojišče SMSA (Dodatek 7). Razmažemo ali načrtamo z ustrezno tehniko razmaza razredčine. Če se zdi uporabno, pripravimo posamezne plošče vsakega uporabljenega gojišča z razredčeno kulturo celične suspenzije virulentnega seva bakterije *Ralstonia solanacearum* biovar 2/biotip 3 za pozitivno kontrolo.
- 3.4 Plošče tri dni inkubiramo pri 28 °C. Inkubacija se lahko podaljša na šest dni, če je rast počasna, vendar kolonije na ploščah SMSA pogosto postanejo atipične in odmrejo.

Na splošnem hranilnem gojišču virulentni izolati bakterije *Ralstonia solanacearum* tvorijo biserno bele, ploske, nepravilne in tekoče kolonije, ki imajo pogosto značilne spirale.

Na tetrazolnem gojišču po Kelmanu so tipične kolonije virulentnih izolatov bakterije *Ralstonia solanacearum* smetanaste, ploske, nepravilne in tekoče s krvavo rdeče obarvanimi spiralami na sredini. Nevirulentne oblike bakterije *Ralstonia solanacearum* tvorijo maslaste, temno rdeče kolonije.

Na gojišču SMSA so tipične kolonije virulentnih izolatov bakterije *Ralstonia solanacearum* mlečno bele, ploske, nepravilne in tekoče, na sredini krvavo rdeče obarvane.

Nevirulentne oblike bakterije *Ralstonia solanacearum* tvorijo manj tekoče kolonije, ki so na SMSA gojišču povsem rožnate do rdeče.

- 3.5 Kolonije z značilno morfologijo prečistimo s precepljanjem na splošno hranilno gojišče. Izogibamo se rednemu precepljanju, ki lahko povzroči izgubo virulentnosti.

4. Potrditveni test(-i)

- 4.1 Identifikacija bakterije *Ralstonia solanacearum*

Identificiramo čiste kulture bakterije *Ralstonia solanacearum* z vsaj enim od naslednjih postopkov:

Hranilni in encimski testi

Opomba V vsak uporabljeni test vključimo ustrezne kontrolne seve.

Naslednje fenotipske lastnosti bakterije *Ralstonia solanacearum* so splošno prisotne ali odsotne:

Fluorescenčni pigment	–
Vključki PHB	+
Oksidacijski/fermentacijski (O/F) test	O +/F –
Katalaza	+
Oksidaza po Kovacsu	+
Redukcija nitrata	+
Izraba citrata	+
Rast pri 40 °C	–
Rast v 1 % NaCl	+
Rast v 2 % NaCl	–
Arginin-dihidrolaza	–
Utekočinjenje želatine	–
Hidroliza škroba	–
Hidroliza ezulina	–
Proizvodnja levana	–

Gojišča in metode so navedeni v Lelliott & Stead (1987)

IF - test

Pripravimo suspenzije 10^6 celic na ml iz kulture in kontrolnega(-ih) seva(-ov). Pripravimo niz dvakratnih razredčin antiseruma. Izvedemo postopek IF (oddelek III.2). IF-titer kulture mora biti enakovreden titru pozitivne kontrole.

Test ELISA

Pripravimo suspenzije $>10^6$ celic na ml iz kulture in kontrolnega(-ih) seva(-ov). Izvedemo postopek ELISA (oddelek III.3). Vrednost ELISA kulture mora biti enakovredna vrednosti pozitivne kontrole.

Test PCR

Pripravimo suspenzije 10^6 celic na ml iz kulture in kontrolnega(-ih) seva(-ov). Izvedemo postopek PCR (oddelek III.4). Produkt PCR kulture mora biti po velikosti in vzorcu restrikcijske analize (REA) enak produktu pozitivne kontrole.

Fluorescenčna hibridizacija *in-situ* (FISH)

Pripravimo suspenzije 10^6 celic na ml iz kulture in kontrolnega(-ih) seva(-ov). Izvedemo postopek FISH (van Beuningen *et al*, 1995) z začetnim oligonukleotidom OLI-1 PCR (Seal *et al*, 1993). Kultura mora reagirati enako kot pozitivna kontrola.

Profiliranje proteinov

Denaturirane proteine celih celic ločimo z elektroforezo v poliakrilamidnem gelu – PAGE (Stead, 1992a).

Profiliranje maščobnih kislin (FAP)

Kulturo in sev pozitivne kontrole kultiviramo 48 ur pri 28 °C na triptikaznem sojinem agarju in izvedemo postopek FAP (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead, 1992b). Profil kulture mora biti enak profilu pozitivne kontrole. Pri določenih pogojih so značilne maščobne kisline 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH in 18:1 2OH.

4.2 Opredelitev seva

Opredelitev seva ni obvezna, vendar je priporočljiva za vsak nov primer z uporabo vsaj enega od naslednjih postopkov:

Določanje biovarja

Ralstonia solanacearum se deli na biovarje na podlagi zmožnosti proizvodnje kisline iz treh heksoznih alkoholov in treh sladkorjev (Hayward, 1964 & 1994):

	Biovar				
	1	2	3	4	5
— Izraba:	—	+	+	—	+
— maltoze	—	+	+	—	+
— laktoze	—	+	+	—	+
— celobioze	—	+	+	—	+
— manitola	—	—	+	+	+
— sorbitola	—	—	+	+	—
— dulcitol					

Dodatni testi delijo biovar 2 na podfenotipe (Hayward, 1994):

	biovar 2	biovar 2-A	biovar 2-T
izraba trehaloze	—	+	+
izraba inozitola	+	—	+
izraba D-riboze	—	—	+
pektolitična aktivnost	nizka	nizka	visoka

Določanje biotipa

Biotip (Buddenhagen *et al.*, 1962) je mogoče določiti na podlagi testa patogenosti na rastlinah paradižnika ali jajčevca in na rastlinah tobaka ter s testom hipersenzitivne reakcije (HR) na listih tobaka (Lozano in Sequeira, 1970):

	Biotip (*)		
	1	2	3
Reakcija na:			
— rastlinah paradižnika/jajčevca	venenje	ni reakcije	venenje
— rastlinah tobaka	venenje	ni reakcije	ni reakcije
— listih tobaka	nekroza (48 ur) in venenje (7–8 dni)	HR (12–24 ur)	kloroza (2–8 dni)

(*) Biotip 4 (patogen na ingverju in nekaterih drugih gostiteljih) in biotip 5 (patogen samo na murvi) nista vključena.

Opredelitev biotipa s testom patogenosti ali hipersenzitivnosti na tobaku ni nujno najbolj zanesljiva in biotip lahko določimo tudi s sklepanjem na podlagi biovarja in naravnega gostitelja izvora.

Kulturo lahko nadalje opredelimo z:

Iskanjem prstnih odtisov genoma

Molekularno razlikovanje sevov v kompleksu bakterije *Ralstonia solanacearum* je mogoče opraviti z:

analizo RFLP (Cook *et al.*, 1989)

ponavljajočim zaporedjem PCR [REP-, ERIC- & BOX-PCR (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995)]

4.3 Test patogenosti

S tem testom se potrdi diagnoza bakterije *Ralstonia solanacearum* in oceni virulenca kultur, identificiranih kot bakterija *Ralstonia solanacearum*.

Pripravimo inokulum 10^6 celic na ml iz kulture in pozitivnega kontrolnega seva. Inokuliramo 5–10 rastlin paradižnika ali jajčevca, najbolje v fazi treh pravih listov ali v kasnejši fazi (oddelek III.6). Inkubiramo največ dva tedna pri 22–28 °C in visoki relativni vlažnosti ter dnevno zalivamo. Opazujemo, če se pojavi venenje in/ali epinastija, kloroza, krnjenje.

Izoliramo iz simptomatičnih rastlin:

— Odvzamemo del tkiva s stebra 2 cm nad mestom inokulacije.

— Zmeljemo in suspendiramo v majhni količini sterilne destilirane vode ali 50 mM fosfatnega pufra. Razmažemo na plošče, inkubiramo in pregledamo, če nastanejo značilne kolonije bakterije *Ralstonia solanacearum*.

ODDELEK III

DETEKCIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJE *RALSTONIA SOLANACEARUM* V VZORCIH GOMOLJEV KROMPIRJA

Opomba: Standardna velikost vzorca je 200 gomoljev. Vendar je postopek mogoče ustrezno uporabiti tudi za vzorce z manj kot 200 gomolji.

1. Priprava vzorca za testiranje

Opomba: Peleta ekstrakta krompirja, pridobljena s tem postopkom, se lahko uporabi tudi za detekcijo bakterije *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Možnosti obdelave pred testiranjem, če se zdijo uporabne:

- (i) Vzorec inkubiramo pri 25–30 °C največ dva tedna, da spodbudimo množenje majhnih populacij bakterije *Ralstonia solanacearum*.
- (ii) Gomolje operemo pod tekočo vodo z ustreznimi razkužili in detergenti. Gomolje posušimo na zraku.

- 1.1 S čistim in sterilnim skalpelom ali nožem za zelenjavo odstranimo povrhnjico gomolja na območju stolona, tako da najprej postanejo vidna žilna tkiva. Previdno izrežemo majhno stožčasto jedro (s premerom 3–5 mm) žilnega tkiva na območju stolona. Količina nežilnega tkiva naj bo čim manjša. Obdelamo vse gomolje v vzorcu.

Opomba: V tej fazi lahko opravimo vizualni pregled gomoljev (oddelek II.1). Vse gomolje s simptomi ali hudo gnilobo damo na stran in testiramo ločeno (oddelek II).

- 1.2 Stolone zberemo v zaprti posodi. Zaželeno je, da se stoloni obdelajo takoj. Če to ni možno, jih shranimo za največ 24 ur oziroma pri 4 °C ne dlje kot 72 ur.

- 1.3 Stolone obdelamo po enem od naslednjih postopkov:

- (i) Stolone prenesemo v ustrezno posodo.

Dodamo zadostno količino maceracijskega pufra (Dodatek 2), da prekrije stolone.

Stolone zmeljemo v mešalniku Waring ali Ultra Thurrax do popolne homogenizacije. Izogibamo se pretirani homogenizaciji.

Pustimo, da se macerat namaka 15–30 minut.

- (ii) Stolone prenesemo v ustrezno posodo.

Dodamo zadostno količino maceracijskega pufra, da prekrije stolone.

Posodo postavimo na rotacijski stresalnik.

Inkubiramo pri 50–100 vrt/min 4 ure pri 20–22 °C ali 16–24 ur pri 4 °C.

- (iii) Stolone prenesemo v močno maceracijsko vrečko za enkratno uporabo (npr. vrečko Stomacher velikosti 105 mm × 150 mm, sterilizirano z obsevanjem).

Stolone previdno zdrobimo z ustreznim orodjem, npr. s kladivom, dokler ne dosežemo popolne homogenizacije.

Dodamo zadostno količino maceracijskega pufra, da prekrije stolone.

Pustimo 15–30 minut, da se macerat posede.

- 1.4 Ekstrahiramo bakterije iz obdelanih stolonov po enem od naslednjih postopkov:

- (i) Macerat previdno odtočimo v centrifugirko, ostanke pa pustimo v posodi ali vrečki. Če je odtočeni macerat moten, ga centrifugiramo pri največ 180 g 10 minut pri temperaturi pod 10 °C.

Centrifugiramo odtočeni macerat ali supernatant iz prvega centrifugiranja, pri 7 000 g 15 minut ali pri 10 000 g 10 minut pri temperaturi pod 10 °C.

Zavržemo supernatant, ne da bi premešali peleta.

- (ii) Macerat prefiltriramo skozi filter z velikostjo por 40–100 µm. Filtriranje pospešimo z vakuumsko črpalko.

Filtrat zberemo v centrifugirki.

Filter speremo z maceracijskim pufrom.

Filtrat centrifugiramo pri 7 000 g 15 minut ali pri 10 000 g 10 minut pri temperaturi pod 10 °C.

Zavržemo supernatant, ne da bi premešali peleta.

1.5 Peleto resuspendiramo v 1 ml peletnega pufru (Dodatek 2).

Razdelimo na dva enaka dela in vsak del prenesemo v mikropruveto.

Eno mikropruveto uporabimo za testiranje. Ostanek tega ekstrakta med testiranjem hranimo pri 4 °C.

V drugo mikropruveto dodamo 10–25 % (v/v) sterilnega glicerola. Močno premešamo. Shranimo pri –18 °C (tedni) ali pri –70 °C (meseci).

2. IF-test

Uporabimo antiserum za bakterijo *Ralstonia solanacearum*, po možnosti proti biotipu 3/biovarju 2. Določimo titer suspenzije 10⁶ celic na ml homolognega seva bakterije *Ralstonia solanacearum* z ustrezno razredčino fluorescein izotiocianatovega (FITC) konjugata v skladu z navodili proizvajalca. Titer IF surovega antisera bi moral biti najmanj 1:2000.

Uporabimo objektna stekelca z več vdolbinicami, po možnosti z 10 okenci premera najmanj 6 mm.

Na vsakem testnem stekelcu uporabimo kontrolo FITC konjugata. Če v kontroli FITC opazimo kakršne koli pozitivne celice, moramo test ponoviti z vključeno kontrolo PBS.

Pripravimo posebna stekelca pozitivne kontrole s suspenzijo 10⁶ celic na ml iz seva bakterije *Ralstonia solanacearum* ustreznega biotipa/biovarja. Za vsak niz testov uporabimo eno stekelce.

2.1 Testna stekelca pripravimo po enem od naslednjih postopkov:

(i) Za pelete z relativno malo škroba:

V eno vrstico okenc odpipetiramo standardno količino (za okence s premerom 6 mm ustreza 15 µl –za večja okenca količino povečamo) resuspendirane pelete. Druga vrstica se lahko uporabi za ponovitev ali za drugi vzorec, kakor prikazuje slika 1.

(ii) Za druge pelete:

Pripravimo desetkratne razredčine, in sicer 1/10, 1/100 in 1/1000, resuspendirane pelete v peletnem pufru. V eno vrstico okenc odpipetiramo standardno količino (za okence s premerom 6 mm ustreza 15 µl –za večja okenca količino povečamo) resuspendirane pelete in vsake posamezne razredčine. Druga vrstica se lahko uporabi za ponovitev ali za drugi vzorec, kakor prikazuje slika 2.

2.2 Počakamo, da se kapljice posušijo. Celice bakterij fiksiramo na stekelce bodisi s segrevanjem, plamenom ali 95-odstotnim etanolom.

2.3 Postopek IF

(i) V skladu s pripravo testnih objektnih stekelc v 2.1(i):

Pripravimo niz dvakratnih razredčin antisera v pufru IF (Dodatek 3):

1/4 titra (T/4), 1/2 titra (T/2), titer (T) in dvakratni titer (2T).

(ii) V skladu s pripravo testnih objektnih stekelc v 2.1(ii):

Pripravimo delovno razredčino antisera v pufru IF. Delovna razredčina je razredčina antisera z optimalno specifičnostjo in je ponavadi enaka pol titra.

Slika 1

Priprava testnega objektnega stekelca v skladu z 2.1(i) in 2.3(i)

Ena standardna razredčina resuspendirane pelete

T = titer

	FITC	T/4	T/2	T	2T	=> dvakratne razredčine antisera
Vzorec 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Ponovitev vzorca 1 ali vzorec 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Slika 2

Priprava testnega objektnega stekelca v skladu z 2.1(ii) in 2.3(ii)

	FITC	Standardna razredčina antiseruma				
	čista	čista	1/10	1/100	1/1000	=> desetkratne razredčine resuspendirane pelete
Vzorec 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Ponovitev vzorca 1 ali vzorec 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

2.3.1 Objektna stekelca razporedimo po vlažnem vpojnem papirju.

Testna okenca prekrijemo z razredčino oziroma razredčinami antiseruma. Na okenca s FITC nanese PBS. Količina antiseruma, nanese-nega na okenca, mora biti enaka količini nanesenega ekstrakta.

2.3.2 Inkubiramo pokrito 30 minut pri sobni temperaturi.

2.3.3 S stekelc otresemo kapljice antiseruma in stekelca previdno speremo s pufrom IF. Pet minut spiramo v pufru IF-Tween in nato še pet minut v pufru IF (Dodatek 3). Previdno odstranimo odvečno vlago.

2.3.4 Stekelca razporedimo na vlažnem vpojnem papirju. Testna okenca in okence s FITC prekrijemo z razredčino konjugata FITC, uporablje-nega za določitev titra. Količina konjugata, nanesenega na okenca, mora biti enaka količini nanesenega antiseruma.

2.3.5 Inkubiramo pokrito 30 minut pri sobni temperaturi.

2.3.6 S stekelc otresemo kapljice konjugata. Speremo, kakor prej (2.3.3). Previdno odstranimo odvečno vlago.

2.3.7 Na vsako okence odpipetiramo 5–10 µl 0,1 M glicerola s fosfatnim pufrom (Dodatek 3) ali podobnim prekrivnim pufrom in pokrijemo s krovnim stekelcem.

2.4 Branje IF-testa

Stekelca pregledamo pod epifluorescenčnim mikroskopom s filtri, primernimi za vzbujanje FITC, v imerzijskem olju pri povečavi 500–1000. Okenca pregledamo vzdolž dveh pravokotnih premerov in po obodu.

Najprej pregledamo stekelce pozitivne kontrole. Celice morajo biti svetlo fluorescenčne in povsem obarvane. *Opomba: Če pri obarvanju pride do odstopanj, je treba test ponoviti.*

Pregledamo testna stekelca. Najprej preverimo, če v okencih s kontrolo FITC ni fluorescentnih celic. Fluorescentne celice v kontroli FITC kažejo na nespecifično vezavo konjugata, avtofluorescenco ali okužbo. *Opomba: če opazimo ta pojav, test ponovimo.*

V testnih okencih iščemo svetle fluorescentne celice z značilno morfologijo bakterije *Ralstonia solanacearum*. Intenziteta fluorescence mora biti enaka kot pri sevu pozitivne kontrole pri enaki razredčini antiseruma. Celice z nepopolnim obarvanjem ali šibko fluorescenco se ne upoštevajo, razen če je takšnih celic veliko (glej: Interpretacija rezultata IF-testa).

Interpretacija rezultata IF-testa:

(i) Če ne najdemo svetlih fluorescentnih celic z značilno morfologijo, je IF-test negativen.

(ii) Če najdemo svetle fluorescentne celice z značilno morfologijo, določimo povprečno število celic na mikroskopsko polje in izračunamo število celic (N) na ml resuspendirane pelete (Dodatek 4).

Populacija približno 10^3 celic na ml resuspendirane pelete se šteje za mejo detekcije IF-testa:

— za vzorce z $N > 10^3$ celic na ml resuspendirane pelete se šteje, da je IF-test pozitiven,

— za vzorce z $N < 10^3$ celic na ml resuspendirane pelete se lahko šteje, da je IF-test pozitiven.

(iii) Če pri titru antiseruma opazimo veliko število ($> 10^5$ celic na ml) nepopolno ali šibko fluorescentnih celic, moramo opraviti drugi test:

- bodisi test, ki temelji na drugačnem biološkem načelu, bodisi
- ponovni IF-test z drugim antiserumom ali desetkratno razredčino pelete.

3. Test ELISA

Temelji na Robinson-Smith *et al.*, 1995

Uporabimo antiserum za bakterije *Ralstonia solanacearum*, po možnosti proti biotipu 3/biovarju 2. Določimo titer suspenzije 10^6 celic na ml homolognega seva bakterije *Ralstonia solanacearum*.

Priporočljiva je uporaba mikrotitrskih ploščic NUNC-Polysorb.

Uporabimo negativno kontrolo s krompirjevim ekstraktom in kontrolo s fosfatom pufrom s soljo (PBS).

Kot pozitivno kontrolo uporabimo suspenzijo z $> 10^6$ celic na ml iz seva bakterije *Ralstonia solanacearum* ustreznega biotipa/biovarja. Testiramo jo na enak način kakor vzorce, vendar mora biti na mikrotitrski ploščici popolnoma ločena od vzorcev.

3.1 V mikroepreveto odpipetiramo 100–200 μ l resuspendirane pelete.

Segrevamo 4 minute pri 100 °C. Mikroepreveto postavimo na led.

3.2 Dodamo enako količino karbonatnega premaznega pufr z dvojno koncentracijo (Dodatek 5). Močno premešamo.

3.3 V vsako od vsaj dveh vdolbinic na mikrotitrski ploščici odmerimo 100 μ l alikvot. Inkubiramo eno uro pri 37 °C ali čez noč pri 4 °C.

3.4 Otresemo ekstrakte iz vdolbinic. Vdolbinice trikrat speremo z raztopino PBS-Tween (Dodatek 5), pri čemer zadnjo izpiralno raztopino pustimo v vdolbinicah vsaj pet minut.

3.5 Pripravimo ustrezno razredčino antiseruma bakterije *Ralstonia solanacearum* v blokirnem pufru (Dodatek 5). V vdolbinice nanese po 100 μ l razredčine antiseruma.

Inkubiramo eno uro pri 37 °C.

3.6 Otresemo antiserum iz vdolbinic. Vdolbinice speremo kakor prej (3.4).

3.7 Pripravimo ustrezno razredčino konjugata alkalne fosfataze v blokirnem pufru. V vdolbinice nanese po 100 μ l razredčine konjugata.

Inkubiramo eno uro pri 37 °C.

3.8 Otresemo konjugat iz vdolbinic. Vdolbinice speremo kakor prej (3.4 in 3.6).

3.9 Pripravimo raztopino substrata alkalne fosfataze (Dodatek 5). V vdolbinice nanese po 100 μ l. Inkubiramo 30 minut do ene ure v temnem prostoru pri sobni temperaturi.

3.10 Odčitamo absorbanco pri 409 nm.

Interpretacija testa ELISA:

Test ELISA je negativen, če je optična gostota (OD) vzorca $< 2 \times$ OD negativne kontrole.

Test ELISA je pozitiven, če je optična gostota (OD) vzorca $> 2 \times$ OD negativne kontrole.

4. Test PCR

Temelji na Seal *et al.*, 1993

Opomba: V vseh stopnjah priprave vzorca in drugih postopkih, ki vključujejo PCR, je treba uporabiti pipete s filtrom v konici.

Za pozitivno kontrolo pripravimo suspenzijo 10^6 celic na ml iz seva bakterije *Ralstonia solanacearum* biotip 3/biovar 2. Testiramo jo na enak način kot vzorce.

4.1 V mikroepreveto odpipetiramo 100 μ l resuspendirane pelete.

Lahko pa tudi prenesemo 90 μ l resuspendirane pelete v mikroepreveto, ki vsebuje 10 μ l 0,5 M NaOH. Premešamo, tako da mikroepreveto večkrat obrnemo.

- 4.2 Segrevamo štiri minute pri 100 °C. Mikroepreveto takoj postavimo na led.
- 4.3 Pripravimo vsaj dve desetkratni razredčini, npr. 1/10 in 1/100 ali več, če se zdi uporabno, v sterilni destilirani ali ultra čisti vodi.
- 4.4 V sterilni epruveti pripravimo reakcijsko zmes PCR (Dodatek 6) z dodajanjem naslednjih sestavin v naslednjem vrstnem redu:

Za 50 µl reakcijske zmesi:

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Sterilna destilirana voda ali ultra čista voda	30,8–33,8 µl	
10 × pufer 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
Začetni oligonukleotid OLI-1 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Začetni oligonukleotid Y-2 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Taq polimeraza (5U/µl)	0,2 µl	1,0 U
Skupna prostornina	45 µl – 48 µl	

Za več reakcij:

Preračunamo količino vsake sestavine za zahtevano število reakcij.

Zmešamo sestavine in prenesemo po 45–48 µl zmesi v sterilne epruvete za PCR.

Epruvete z reakcijsko zmesjo PCR hranimo na ledu.

Za 25 µl reakcijske zmesi:

Ustrezno zmanjšamo količino sestavin.

- 4.5 Pomnoževanje PCR
- 4.5.1 Neobvezno: pulzno centrifugiramo epruvete z vrelin vzorcem in pozitivno kontrolo.
- V epruvete z reakcijsko zmesjo PCR v navedenem vrstnem redu dodamo 2–5 µl vzorca ali vzorcev, vodne kontrole in pozitivne kontrole. Epruvete postavimo v grelno enoto cikličnega termostata DNA.
- 4.5.2 Izvedemo naslednji program:
- 1 cikel:
- i. (i) 2 minuti pri 96 °C: denaturacija matrice
- 50 ciklov:
- ii. (ii) 20 sekund pri 94 °C: denaturacija
- iii. (iii) 20 sekund pri 68 °C: prileganje začetnih oligonukleotidov
- iv. (iv) 30 sekund pri 72 °C: podaljševanje kopije
- 1 cikel:
- v. (v) 10 minut pri 72 °C: nadaljnje podaljševanje
- 1 cikel:
- (vi) pustimo pri 4 °C.
- Opomba:* Ti parametri veljajo za napravo Perkin Elmer 9600. Pri drugih cikličnih termostatih je lahko potrebna prekrivna plast mineralnega olja v reakcijskih epruvetah in/ali prilagoditev trajanja faz (ii), (iii) in (iv) pomnoževanja.
- 4.5.3 Epruvete vzamemo iz cikličnega termostata. Analiziramo produkt PCR. Če tega ne storimo takoj, epruvete shranimo pri 4 °C, če jih bomo uporabili še isti dan, ali pri –18 °C za dalj časa.
- 4.6 Analiza produkta PCR
- Fragmente PCR odkrijemo z elektroforezo v agaroznem gelu in barvanjem z etidijevim bromidom.
- 4.6.1 Pripravimo ustrezni agarozni gel, tako da agarozo počasi segrevamo v elektroforeznem tris-acetatnem pufru (TAE) do vrelišča.

- 4.6.2 Staljeno agarozo ohladimo do 50–60 °C, vlijemo v model elektroforezne enote in vstavimo glavnik. Raztopina naj se strdi.
- 4.6.3 Odstranimo glavnik. Gel potopimo v TAE, tako da je ravno prekrit s pufrom (2–3 mm).
- 4.6.4 Na parafilm nanesemo 3 µl kapljice nanašalnega pufra. Dodamo 12 µl produkta PCR vzorcev, pozitivne kontrole ali vodne kontrole in pred polnjenjem premešamo s počasno aspiracijo v pipetni konici. Dane količine lahko prilagodimo, tako da ustrezajo prostornini vdolbinic v agaroznem gelu.
- 4.6.5 Vdolbinice v gelu previdno napolnimo. V vsaj eno vdolbinico dodamo ustrezni označevalec DNA za referenco.
- 4.6.6 Elektroforezno enoto povežemo z virom elektrike. Elektroforeza naj teče pri 5–8 V/cm, dokler fronta sledilnega indikatorja ni 1 cm pred koncem gela.
- 4.6.7 Izklopimo vir elektrike. Odstranimo žice z elektroforezne enote.
- Previdno odstranimo gel. Potopimo ga v raztopino etidijevga bromida za 30–45 minut.
- Opomba: Ves čas ravnanja z etidijevim bromidom, ki je močan mutagen, nosimo rokavice za enkratno uporabo.
- 4.6.8 Razbarvamo v destilirani vodi 10–15 minut.
- 4.6.9 Vizualiziramo pomnožene fragmente DNA z UV presvetlitvijo. Produkt PCR bakterije *Ralstonia solanacearum* z začetnim oligonukleotidom OLI-1 in Y-2 je dolg 288 bp. Preverimo z označevalcem DNA in pozitivno kontrolo.
- Opomba: Vodna kontrola mora biti v vseh primerih negativna. Če je pozitivna, test ponovimo.
- 4.6.10 Če potrebujemo trajno evidenco, gel fotografiramo.
- 4.6.11 Potrdimo avtentičnost namnoženega fragmenta z restrikcijsko encimsko analizo (REA).
- 4.7 Restrikcijska encimska analiza (REA)
- 4.7.1 V novo mikroepreveto prenesemo 8,5 µl produkta PCR (4.5.3). Dodamo 1 µl 10-kratnega encimskega pufra in 0,5 µl restrikcijskega encima *AvaII*.
- 4.7.2 Premešamo s počasno aspiracijo v pipetni konici. Če na stenah epruvete ostanejo kapljice, pulzno centrifugiramo v mikrocentrifugi. Inkubiramo eno uro pri 37 °C.
- 4.7.3 Analiziramo razcepljeni fragment PCR z elektroforezo v agaroznem gelu kakor prej (4.6).

Interpretacija rezultatov testa PCR:

Test PCR je negativen, če ne odkrijemo značilnega fragmenta 288 bp in odkrijemo fragment za sev bakterije *Ralstonia solanacearum* pozitivne kontrole.

Test PCR je pozitiven, če odkrijemo fragment 288 bp in če je analiza REA namnoženega fragmenta enaka sevu bakterije *Ralstonia solanacearum* pozitivne kontrole.

5. Test z razmazom na selektivno gojišče

Temelji na Elphinstone *et al.*, 1996

- 5.1 Test izvedemo z ustrezno tehniko razmaza razredčine, npr.:
- (i) Pripravimo vsaj dve desetkratni razredčini, in sicer 1/10 in 1/100 ali več, če se zdi uporabno, resuspendirane pelete v peletnem pufru. Odpipetiramo standardno količino (50–100 µl) resuspendirane pelete in vsake razredčine na modificirano selektivno gojišče SMSA (Dodatek 7) ter s stekleno palčko razmažemo po celi površini gojišča.
- Če se zdi uporabno, z zanko v redčitveni črti nanesemo 10 µl resuspendirane usedline. Med posameznimi črtami zanko ožgemo v plamenu.
- (ii) Odmerjeno standardno količino (50–100 µl) resuspendirane pelete prenesemo na modificirano selektivno gojišče SMSA in s stekleno palčko razmažemo po celi površini gojišča. S palčko naredimo nanose v črti na vsaj še dve plošči modificiranega gojišča SMSA, ne da bi palčko ožigali v plamenu.
- 5.2 Z isto tehniko razmaza razredčine na niz ločenih plošč modificiranega gojišča SMSA nanesemo suspenzijo 10^6 celic na ml iz virulentnega seva bakterije *Ralstonia solanacearum* biotip 3/biovar 2.
- 5.3 Plošče inkubiramo pri 28 °C. Po treh dneh začnemo z odčitavanjem plošč. Če so negativne, inkubiramo še naprej največ šest dni. Kolonije virulentnih izolatov bakterije *Ralstonia solanacearum* so mlečno bele, ploske, nepravilne in tekoče, na sredini krvavo rdeče obarvane s črtami ali spiralami v notranjosti.
- 5.4 Kolonije z značilno morfologijo prečistimo s precepljanjem na splošno hranilno gojišče (Dodatek 1).

- 5.5 Čiste kulture identificiramo (oddelek II, 4.1) in potrdimo kulture bakterije *Ralstonia solanacearum* s testom patogenosti (oddelek II, 4.3).

Interpretacija testa z razmazom na selektivno gojišče

Test z razmazom na selektivno gojišče je negativen, če po šestih dneh ne izoliramo nobenih bakterijskih kolonij ali nobenih kolonij, značilnih za bakterije *Ralstonia solanacearum*, pod pogojem da inhibicija s strani kolonij drugih bakterij ni verjetna in da smo pri pozitivni kontroli našli kolonije bakterije *Ralstonia solanacearum*.

Test z razmazom na selektivno gojišče je pozitiven, če izoliramo kolonije, značilne za bakterije *Ralstonia solanacearum*.

6. **Biološki test**

Temelji na Janse, 1988.

- 6.1 Za vsak vzorec uporabimo 10 testnih rastlin - dozvetnih sejancev paradižnika ali jajčevca v fazi treh pravih listov. 24 ur pred inokulacijo testnih rastlin ne zalivamo.
- 6.2 Med testne rastline porazdelimo 100 µl resuspendirane pelete. Inokuliramo v steblo med kličnima listoma in na še enem ali več drugih mestih.
- 6.3 Z isto tehniko 10 sejancev inokuliramo s suspenzijo 10^6 celic na ml iz virulentnega seva bakterije *Ralstonia solanacearum* biovar 2/biotip 3 za pozitivno kontrolo ter s peletnim pufrom za negativno kontrolo. Rastline pozitivne kontrole ločimo od ostalih rastlin, da preprečimo medsebojno okužbo.
- 6.4 Rastline gojimo največ štiri tedne pri 22–28 °C in visoki relativni vlažnosti ob dnevnem zalivanju. Opazujemo, če se pojavijo venenje, epinastija, kloroze in/ali krnenje.
- 6.5 Pripravimo izolate iz okuženih rastlin (oddelek II). Identificiramo čiste kulture z značilno morfologijo (oddelek II.4.1) in potrdimo kulture bakterije *Ralstonia solanacearum* s testom patogenosti (oddelek II.4.3).
- 6.6 Če se zdi uporabno, preverimo odsotnost okužbe pri serijah testnih rastlin, ki ne kažejo nobenih znakov okužbe. Z vsake testne rastline odvzamemo en cm dolg del stebela dva cm nad točko inokulacije. Tkiva homogeniziramo v maceracijskem pufru. Pripravimo razmaze razredčin (oddelek III.5.1). Če je rezultat pozitiven, identificiramo čiste kulture z značilno morfologijo (oddelek II.4.1) in potrdimo kulture bakterije *Ralstonia solanacearum* s testom patogenosti (oddelek II.4.3).

Interpretacija rezultata biološkega testa:

Biološki test je negativen, če testne rastline niso okužene z bakterijo *Ralstonia solanacearum*, pod pogojem da smo v pozitivni kontroli odkrili bakterije *Ralstonia solanacearum*.

Biološki test je pozitiven, če so testne rastline okužene z bakterijo *Ralstonia solanacearum*.

7. **Obogatitveni testi**

Temelji na Elphinstone *et al.*, 1996

- 7.1 V 3 ml modificiranega bujona SMSA (Dodatek 7) prenesemo 100 µl resuspendirane pelete.
- 7.2 Inkubiramo 48 ur, vendar v nobenem primeru ne dlje kot 72 ur, pri 28 °C, epruveto naj bo zaradi zračenja le ohlapno zaprta.
- 7.3 Epruveto tesno zapremo in močno premešamo. Pripravimo alikvote za IF-test (ta oddelek, 2.), test ELISA (ta oddelek, 3.) in/ali test PCR (ta oddelek, 4.)

8. **Test patogenosti**

Glej Oddelek II.4.3.

Dodatek 1

Hranilna gojišča za izolacijo in gojenje bakterije *Ralstonia solanacearum*

Hranilni agar (NA)

Hranilni agar (Difco)	23 g
Destilirana voda	1 liter

Pripravimo po 1/2 litra gojišča v litrskih steklenicah.

Raztopimo sestavine.

Steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Ohladimo do 50 °C. Nalijemo na plošče.

Agar s kvasom, peptonom in glukozo (YPGA)

Kvasni ekstrakt (Difco)	5 g
Pepton Bacto (Difco)	5 g
D(+)-glukoza (monohidrat)	10 g
Agar Bacto (Difco)	15 g
Destilirana voda	1 liter

Pripravimo po 1/2 litra gojišča v litrskih steklenicah.

Raztopimo sestavine.

Steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Ohladimo do 50 °C. Nalijemo na plošče.

Agar s saharozo in peptonom (SPA)

Saharoza	20 g
Pepton	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Agar Bacto (Difco)	15 g
Destilirana voda	1 liter

Pripravimo po 1/2 litra gojišča v litrskih steklenicah.

Raztopimo sestavine. Če je potrebno, naravnamo pH na 7,2–7,4.

Steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Ohladimo do 50 °C. Nalijemo na plošče.

Tetrazolno gojišče po Kelmanu

Kazaminske kisline (Difco)	1 g
Pepton Bacto (Difco)	10 g
Dekstroza	5 g
Agar Bacto (Difco)	15 g
Destilirana voda	1 liter

Pripravimo po 1/2 litra gojišča v litrskih steklenicah.

Raztopimo sestavine. Steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Ohladimo do 50 °C.

Dodamo s filtriranjem sterilizirano vodno raztopino trifenil tetrazolijevega klorida (Sigma), tako da dobimo končno koncentracijo 50 mg na liter.

Nalijemo na plošče.

Dodatek 2

Material za pripravo vzorcev

Maceracijski pufer: 50 mM fosfatni pufer, pH 7,0

Ta pufer se uporablja za maceracijo tkiv.

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Destilirana voda	1 liter

Raztopimo sestavine in preverimo pH. Pripravimo ustrezne alikvote.

Steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Pri direktnem testu PCR je priporočljivo dodati 5 % polivinilpirolidona-40 000 MWT (PVP-40), da se zmanjša pojavnost inhibicije pomnoževanja z aromatskimi molekulami v ekstraktu.

Pri postopku homogenizacije z uporabo mešalnika Waring ali Ultra Turrax za maceracijo tkivnih jeder krompirja je priporočljivo dodati deflokulant, sredstvo proti penjenju ali antioksidant.

Kosmiči Lubrol	0,5 g na liter
Protipenilno sredstvo DC silikon	1,0 ml na liter
Tetranatrijev pirofosfat	1,0 g na liter

Ločeno avtoklaviramo. Dodamo do zelene koncentracije.

Peletni pufer: 10 mM fosfatni pufer, pH 7,2

Ta pufer se uporablja za resuspendiranje in redčenje pelet stolonov krompirja.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
Destilirana voda	1 liter

Raztopimo sestavine in preverimo pH. Pripravimo ustrezne alikvote.

Steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Dodatek 3

Material za IF-test

Pufer IF: 10 mM fosfatni pufer s soljo (PBS), pH 7,2

Ta pufer se uporablja za redčenje antiserumov.

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

Raztopimo sestavine in preverimo pH. Pripravimo ustrezne alikvote.

Steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Pufer IF-Tween

Ta pufer se uporablja za spiranje objektnih stekelc. Pufru IF dodamo 0,1 % Tweena 20.

0,1 M glicerol s fosfatnim pufrom pH 7,6

Ta pufer se uporablja kot prekrivna tekočina na okencih objektnih stekelc IF, da se ojači fluorescence.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3,2 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
Glicerol	50 ml
Destilirana voda	1 liter

Dodatek 4

Določanje stopnje okužbe pri IF-testu

$$\begin{aligned} &\text{premer okenca Površina (s)} \\ &= \frac{\pi D^2}{4} \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} &\text{kjer je } D = \text{polja objektiva} \\ &\text{kjer} \\ &= \frac{\pi d^2}{4} \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} &\text{je } d = \text{premer polja} \\ &\text{Izračunamo } d \text{ bodisi z direktnim merjenjem bodisi po naslednjih enačbah:} \\ &s = \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4} \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} &\text{kjer je } i = \text{koeficient polja (odvisen od vrste okularja in znaša od 8 do 24),} \\ &\quad K = \text{koeficient tubusa (1 ali 1,25),} \\ &\quad G = \text{povečava (100\times, 40\times itd.) objektiva.} \\ &\text{iz (2)} \\ &d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}} \end{aligned} \quad (4)$$

$$\begin{aligned} &\text{iz (3)} \\ &d = \sqrt{4 \times \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4}} = \frac{i}{GK} \end{aligned}$$

S štetjem določimo število značilnih fluorescentnih celic na polje (c).

Izračunamo število značilnih fluorescentnih celic na okence (C).

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

Izračunamo število značilnih fluorescentnih celic na ml pelete (N)

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

kjer je y = prostornina pelete na okencu,

F = faktor razredčitve pelete.

Dodatek 5

Material za test ELISA

Karbonatni premazni pufer z dvojno koncentracijo, pH 9,6.

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
Destilirana voda	1 liter

Raztopimo sestavine in preverimo pH. Pripravimo ustrezne alikvote.

Steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Če ekstrakt vsebuje visoko število aromatskih molekul, lahko kot antioksidant dodamo toliko natrijevega sulfita, da bo končna koncentracija 0,2 %.

10× fosfatni pufer s soljo (PBS), pH 7,4

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

Raztopimo sestavine in preverimo pH. Pripravimo ustrezne alikvote.

Steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Fosfatni pufer s soljo-Tween (PBS-T)

10× PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilirana voda	895 ml

Blokirni (protitelo) pufer (mora biti sveže pripravljen)

10× PBS	10 ml
Polivinilpirolidon-44000 MWT (PP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 g
Mleko v prahu	0,5 g
Destilirana voda	do 100 ml

Raztopina substrata alkalne fosfataze, pH 9,8

Dietanolamin	97 ml
Destilirana voda	800 ml

Premešamo in s koncentrirano HCl uravnamo pH na 9,8.

Dopolnimo z destilirano vodo do enega litra.

Dodamo 0,2 g MgCl₂.

Raztopimo dve 5-miligramski tableti fosfataznega substrata (Sigma) na 15 ml raztopine.

Dodatek 6

Materiali za test PCR

Zaporedje začetnega oligonukleotida

Začetni oligonukleotid OLI-1 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

Začetni oligonukleotid Y-2 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Za material glej Seal *et al* (1993).

Dodatek 7

Material za testiranje z razmazom na selektivno gojišče in obogatitveni test

Selektivno gojišče SMSA (Engelbrecht, 1994, kakor ga prilagaja Elphinstone *et al.*, 1996), vendar brez agarja in tetrazolijevih soli.

Osnovno gojišče

Kazaminske kisline (Difco)	1 g
Pepton Bacto (Difco)	10 g
Glicerol	5 ml
Agar (Difco)	15 g
Destilirana voda	1 liter

Pripravimo po 1/2 litra gojišča v litrskih steklenicah.

Raztopimo sestavine in preverimo pH. Če je potrebno, pred avtoklaviranjem prilagodimo pH na 6,5. *Ralstonia solanacearum* na gojišču s pH > 7,0 ne bo lepo rasla.

Steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Ohladimo do 50 °C.

Dodamo naslednje sestavine (vse od Sigme), da dobimo določene končne koncentracije:

Kristalvijolično	5 mg na liter		
Polimiksin B sulfat	100 mg na liter	(približno 600 000 enot)	Sigma P-1004
Bacitracin (*)	25 mg na liter	(približno 1250 enot)	Sigma B-0125
Kloramfenikol	5 mg na liter		Sigma C-3175
Penicilin-G	0,5 mg na liter	(približno 825 enot)	Sigma P-3032
Tetrazolijeve soli	50 mg na liter		

Sestavine raztopimo v 70-odstotnem etanolu do navedenih koncentracij za količino pripravljenega gojišča. Nekaj sestavin, npr. polimiksin B in kloramfenikol, je treba nekoliko segreti in pretresti.

B u j o n S M S A (Elphinstone *et al.*, 1996)

Pripravimo tako kot selektivno gojišče SMSA, vendar brez agarja.

Razdelimo na 3-mililitrske alikvote v 30-mililitrske epruvete Universal za enkratno uporabo.

(*) Če se zdi potrebno, se lahko s povišanjem koncentracije bacitracina na 300 ppm zniža število kužnih saprofitnih bakterij, ne da bi se s tem zmanjšala zmožnost izolacije bakterije *Ralstonia solanacearum*.

Viri

- Buddenhagen, I.W.; Sequeira, L. and Kelman, A., 1962. Description of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52, 726.
- Cook, D.; Elizabeth B. and Sequeira L., 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive respons. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2, 113–121.
- Dinesen I.G. and DeBoer, S.H., 1995. Extraction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from composite samples of potato tubers. *American Potato Journal* 72, 133–142.
- Elphinstone, J.G.; Hennessy, J.; Wilson, J. and Stead, D.E., 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith)Smith in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26.
- Engelbrecht, M.C., 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3–5.
- Hayward, A.C., 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27, 265–277.
- Hayward, A.C., 1994. Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: *Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (eds. A.C. Hayward and G.L. Hartman) CAB International Oxford, 127–135.
- Janse, J.D., 1988. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *EPPO Bulletin* 18, 343–351.
- Janse, J.D., 1991. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14, 335–345.
- Kelman, A., 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 64, 293–695.
- Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants.* (T.F. Preece ed.) Blackwell Scientific Publications, Oxford. 216 pp.
- Louws, F.J.; Fulbright, D.W.; Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85, 528–536.
- Lozano, J.C. and Sequeira, L., 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology* 60, 838.
- Mirza, M.S.; Rademaker, J.W.L.; Janse, J.D. and Akkermans, A.D.L., 1993. Specific 16S ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 1029–1034.
- Robinson-Smith, A.; Jones, P.; Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D., 1995. Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67–79.
- Seal, S.E.; Jackson, L.A.; Young, J.P.W. and Daniels, M.J., 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *P. syzygii*, *P. picketti* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology* 139, 1587–1594.
- Smith, J.J.; Offord, L.C.; Holderness, M. and Saddler, G.S., 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 4262–4268.
- Stead, D.E., 1992a. Techniques for detecting and identifying plant pathogenic bacteria. In: *Techniques for rapid detection of plant pathogens* (eds. J.M. Duncan and L. Torrance). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 76–111.
- Stead, D.E., 1992b. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 281–295.
- Van Beuningen, A.; Derks, H. and Janse J.D., 1995. Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with special attention to fluorescent in-situ hybridisation (FISH) using a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe. *Züchtungsforschung* 2, 266–269.

PRILOGA III

1. Za vsak primer domnevnega pojava, pri katerem je bil s presejalnim testom dobljen pozitiven rezultat v skladu s primerno metodo iz Priloge II za navedeni rastlinski material ali s katero koli drugo uradno odobreno metodo v vseh drugih primerih in se še čaka na potrditev ali ovržbo domnevnega pojava z navedeno metodo, je treba obdržati in ustrezno konzervirati:

- kadar je le mogoče, partijo ali njen del (iz katerega je bil vzet vzorec) v originalni embalaži z etiketo,
- kadar je le mogoče, preostali del vzorcev,
- ves preostali ekstrakt in dodatno pripravljeni material za presejalne teste, npr. imunofluorescenčne preparate, in
- vso pripadajočo dokumentacijo,

do dokončanja navedene metode.

2. V primeru potrjene okužbe z organizmom je treba obdržati in ustrezno konzervirati:

- material iz odstavka 1,
 - vzorec okuženega materiala paradižnika ali jajčevca, inokuliranega z ekstraktom gomoljev ali rastlin, kadar je to ustrezno, in
 - izolirano kulturo organizma, in sicer vsaj en mesec po postopku obveščanja iz člena 5(2).
-

PRILOGA IV

Elementi preiskave iz člena 5(1)(a)(i), kadar je to primerno, vključujejo:

- (i) mesta pridelave,
 - kjer se prideluje ali se je prideloval krompir, ki je klonsko soroden s krompirjem, za katerega je bilo ugotovljeno, da je okužen z organizmom,
 - kjer se prideluje ali se je prideloval paradižnik, ki je iz istega vira kot paradižnik, za katerega je bilo ugotovljeno, da je okužen z organizmom,
 - kjer se prideluje ali se je prideloval krompir ali paradižnik, ki je zaradi domnevnega pojava organizma pod uradnim nadzorom,
 - kjer se prideluje ali se je prideloval krompir, klonsko soroden s krompirjem, ki je bil pridelan na mestih pridelave, za katera je bilo ugotovljeno, da so okužena z organizmom,
 - kjer se prideluje krompir ali paradižnik in ki se nahajajo v bližini okuženih mest pridelave, vključno s tistimi, ki uporabljajo isto opremo in objekte, bodisi neposredno bodisi prek skupnega izvajalca,
 - kjer se za namakanje ali škropljenje uporablja površinska voda iz katerega koli vira, potrjeno ali domnevno okuženega z organizmom,
 - kjer se za namakanje ali škropljenje uporablja površinska voda iz vira, ki ga uporabljajo tudi mesta pridelave, potrjeno ali domnevno okužena z organizmom,
 - ki so ali so bila poplavljeni s površinsko vodo, potrjeno ali domnevno okuženo z organizmom; in
 - (ii) površinsko vodo, ki se uporablja za namakanje ali škropljenje ali je poplavlila polja ali mesta pridelave in je potrjeno okužena z organizmom.
-

PRILOGA V

1. Elementi ugotavljanja obsega verjetne okužbe iz člena 5(1)(a)(iii) in 5(1)(c)(iii), kadar je to primerno, vključujejo:

- navedeni rastlinski material, pridelan na mestih pridelave, določenih za okužene v skladu s členom 5(1)(a)(ii),
- mesta pridelave, prek pridelave povezana z navedenim rastlinskim materialom, določenim za okuženega v skladu s členom 5(1)(a)(ii), vključno s tistimi, ki uporabljajo isto pridelovalno opremo in objekte bodisi neposredno bodisi prek skupnega izvajalca,
- navedeni rastlinski material, ki je bil proizveden na mestih pridelave iz prejšnje alinee ali je bil na teh mestih prisoten v času, ko je bil na mestih pridelave iz prve alinee prisoten navedeni rastlinski material, določen za okuženega v skladu s členom 5(1)(a)(ii),
- skladišča, kjer se opravlja delo z navedenim rastlinskim materialom iz zgoraj navedenih mest pridelave,
- katerikoli stroj, vozilo, posodo, skladišče ali njihov del in katere koli druge predmete, vključno s pakirnim materialom, ki so morda prišli v stik z navedenim rastlinskim materialom, določenim za okuženega v skladu s členom 5(1)(a)(ii),
- katerikoli navedeni rastlinski material, uskladiščen ali v stiku s katerimi koli objekti ali predmeti, navedenimi v prejšnji alinei, pred čiščenjem in razkuževanjem teh objektov in predmetov,
- na podlagi preiskave in testiranja iz člena 5(1)(a)(i) pri krompirju gomolje ali rastline krompirja, sestrsko ali starševsko klonsko sorodne z navedenim rastlinskim materialom, ki je določen za okuženega v skladu s členom 5(1)(a)(ii), ter pri paradižniku rastline paradižnika iz istega vira kot tak navedeni rastlinski material, za katere se kljub morebitnemu negativnemu rezultatu testa na organizem zdi, da so verjetno okuženi zaradi klonske povezave,
- mesta pridelave navedenega rastlinskega materiala iz prejšnje alinee,
- mesta pridelave navedenega rastlinskega materiala, kjer se za namakanje ali škropljenje uporablja voda, ki je bila določena za okuženo v skladu s členom 5(1)(c)(ii),
- navedeni rastlinski material, proizveden na poljih, poplavljenih s površinsko vodo, potrjeno okuženo z organizmom.

2. Določitev možnega širjenja v skladu s členom 5(1)(a)(iv) in 5(1)(c)(iii) vključuje:

(i) v primerih iz člena 5(1)(a)(iv) upoštevanje naslednjih elementov:

- bližina drugih mest pridelave, kjer se prideluje navedeni rastlinski material,
- skupno pridelavo in uporabo zalog semenskega krompirja,
- mesta pridelave, kjer se uporablja površinska voda za namakanje ali škropljenje navedenega rastlinskega materiala, kadar obstaja ali je obstajala nevarnost površinskega otekanja vode z mest pridelave, ki so določena za okužena v skladu s členom 5(1)(a)(ii), ali njihovega poplavljanja,

(ii) kadar je bila površinska voda določena za okuženo v skladu s členom 5(1)(c)(ii):

- mesta pridelave, kjer se proizvaja navedeni rastlinski material, ki mejijo na ali jih ogroža poplavljanje s površinsko vodo, določeno za okuženo,
- kakršno koli zaključeno namakalno zajetje, povezano s površinsko vodo, ki je bila določena za okuženo.

3. Podrobnosti obvestila iz prvega pododstavka člena 5(2) vključujejo:
 - datum prijave domnevnega pojava iz člena 4 ter datum vzorčenja in potrditve navzočnosti organizma v skladu s členom 5, kakor je primerno,
 - opis elementov ugotovljene okužbe in razmejitve območij.
 4. Podrobnosti dodatnega obvestila iz drugega pododstavka člena 5(2) vključujejo:
 - za katero koli pošiljko ali partijo krompirja, ki je bila določena za okuženo, spričevala, predpisana v členih 7 in 8 Direktive 77/93/EGS, številko rastlinskega potnega lista ali registrsko številko proizvajalcev krompirja, zbirnih skladišč in odpremnih centrov, kadar je to primerno,
 - za katero koli pošiljko ali partijo rastlin paradižnika, ki je bila določena za okuženo, spričevala, predpisana v členih 7 in 8 Direktive 77/93/EGS, in številko rastlinskega potnega lista, v skladu s seznamom iz oddelka I.2.2 dela A Priloge V k Direktivi 77/93/EGS,
 - ime sorte in kategorijo pri zalogah semenskega krompirja in, kadar je to mogoče, tudi v ostalih primerih,
 - vse druge informacije v zvezi s potrjenim izbruhom, ki jih lahko zahteva Komisija.
-

PRILOGA VI

1. Določbe, navedene v členu 6(1), so:

- sežig, ali
- uporaba za živalsko krmo po toplotni obdelavi, tako da ni nobene nevarnosti, da bi organizem preživel, ali
- globoko zakopavanje na odlagališču, kjer ni nevarnosti pronicanja na kmetijska zemljišča ali stika z vodnimi viri, ki bi se lahko uporabili za namakanje kmetijskih zemljišč, ali
- industrijska predelava z neposredno in takojšnjo dostavo v predelovalni obrat z uradno odobrenimi napravami za odstranjevanje odpadkov, ki ustrezajo določbam iz Priloge VII k tej direktivi, ali
- drugi ukrepi, pod pogojem da dokazano ne predstavljajo nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma; o takšnih ukrepih je treba takoj obvestiti Komisijo in druge države članice.

2. Ustrezna uporaba ali odstranitev navedenega rastlinskega materiala iz člena 6(2) pod nadzorom pristojnih uradnih organov zadevnih držav članic, pri čemer se pristojni uradni organi ustrezno obveščajo, da se zagotovi stalni nadzor, in pristojni uradni organ države članice, v kateri naj bi se krompir pakiral ali predelal, odobri naprave za odstranjevanje odpadkov iz prve in druge alinee, je:

(i) za gomolje krompirja:

- uporaba kot merkantilni krompir, namenjen za prehrano, pakiran na mestih z ustreznimi napravami za odstranjevanje odpadkov, pripravljen in namenjen za neposredno dostavo in uporabo brez prepakiranja, ali
- uporaba kot merkantilni krompir, namenjen za industrijsko predelavo in za neposredno in takojšnjo dostavo v predelovalni obrat z ustreznimi napravami za odstranjevanje odpadkov, ali
- drugačna uporaba ali odstranitev, pod pogojem da dokazano ne predstavlja nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma in da so to odobrili navedeni pristojni uradni organi. O takšnih ukrepih je treba takoj obvestiti Komisijo in druge države članice.

(ii) za druge dele rastlin, vključno z ostanki stebel in listov,

- uničenje, ali
- drugačna uporaba ali odstranitev, pod pogojem da dokazano ne predstavlja nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma; o takšnih ukrepih je treba obvestiti Komisijo in druge države članice.

3. Ustrezni metodi razkuževanja predmetov iz člena 6(3) sta čiščenje in, kadar je to primerno, razkuževanje, tako da ni nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma, izvajata pa se pod nadzorom pristojnih uradnih organov držav članic.

4. Niz ukrepov, ki jih morajo izvesti države članice znotraj razmejenih območij, določenih v skladu s členom 5(1)(a)(iv) in (c)(iii), iz člena 6(4) vključujejo naslednje:

4.1 Kadar so mesta pridelave določena za okužena v skladu s členom 5(1)(a)(ii):

- (a) se na polju ali enoti pridelave zaščitene pridelke, določeni za okuženo v skladu s členom 5(1)(a)(ii), bodisi

(i) vsaj štiri rastna leta, ki sledijo določitvi okužbe:

- izvajajo ukrepi za odstranjevanje krompirjevih in paradižnikovih samosevcev in drugih gostiteljskih rastlin organizma, vključno s plevelom iz družine razhudnikovk, in
- ne sadijo:
 - gomolji ali rastline krompirja,
 - rastline in semena paradižnika,
 - ob upoštevanju biologije organizma,
 - druge gostiteljske rastline,
 - rastline iz rodu *Brassica*, pri katerih je ugotovljena nevarnost, da omogočajo preživetje organizma,
 - pridelki, pri katerih je ugotovljena nevarnost širjenja organizma;
- v prvi sezoni pridelave krompirja ali paradižnika, ki sledi obdobju iz prejšnje alinee, in pod pogojem da na polju najmanj dve zaporedni rastni leti pred sajenjem niso bili najdeni samosevci krompirja in paradižnika ter drugih gostiteljskih rastlin, vključno s plevelom iz družine razhudnikovk,
- v primeru krompirja uradno certificirani semenski krompir sadi samo za merkantilno pridelavo, in
 - izvede uradna preiskava, vključno s testiranjem, kakor je opredeljeno v členu 2(1),
- v sezoni pridelave krompirja ali paradižnika, ki ob upoštevanju ustreznega kolobarja sledi sezoni iz prejšnje alinee, v primeru krompirja uradno certificirani semenski krompir sadi bodisi za semensko ali merkantilno pridelavo, v primeru krompirja in paradižnika pa izvede uradna preiskava, kakor je opredeljeno v členu 2(1); bodisi

(ii) pet rastnih let, ki sledijo določitvi okužbe,

- izvajajo ukrepi za odstranjevanje krompirjevih in paradižnikovih samosevcev ter drugih gostiteljskih rastlin organizma, vključno s plevelom iz družine razhudnikovk, in
 - polje v prvih treh letih vzpostavi in vzdržuje kot ledina, kot žitno polje v skladu z ugotovljeno nevarnostjo, kot stalni pašnik s pogosto nizko košnjo ali intenzivno pašo, ali kot travnik za pridelavo semena, čemur v naslednjih dveh letih sledi sajenje rastlin, ki niso gostiteljske rastline organizma in za katere ni prepoznavne nevarnosti za preživetje ali širjenje organizma,
 - v prvi sezoni pridelave krompirja ali paradižnika, ki sledi obdobju iz prejšnje alinee,
 - v primeru krompirja sadi uradno certificirani semenski krompir za semensko ali merkantilno pridelavo,
- in izvede uradna preiskava, vključno s testiranjem, kakor je opredeljeno v členu 2(1);

(b) se na drugih poljih:

- v rastnem letu, ki sledi določitvi okužbe:
 - bodisi ne sadijo gomolji in rastline krompirja ali druge gostiteljske rastline in izvedejo ukrepi za odstranjevanje krompirjevih in paradižnikovih samosevcev in drugih gostiteljskih rastlin, vključno s plevelom iz družine razhudnikovk, kadar je to primerno, ali
 - v primeru krompirjevih gomoljev lahko sadi uradno certificirani semenski krompir le za merkantilno pridelavo, pod pogojem da se pristojnim uradnim organom dokaže, da je izključena nevarnost, povezana s krompirjevimi in paradižnikovimi samosevci ter drugimi gostiteljskimi rastlinami organizma, vključno s plevelom iz družine razhudnikovk. Rastoči nasad se pregleda v ustreznih časovnih obdobjih, krompirjevi samosevci pa se testirajo na navzočnost organizma; pregledajo se tudi gomolji krompirja po izkopu;

- v prvem rastnem letu po letu iz prve alinee,
 - v primeru krompirja sadi le uradno certificirani semenski krompir bodisi za semensko ali merkantilno pridelavo,
 - v vsaj drugem rastnem letu po letu iz prve alinee,
 - v primeru krompirja sadi le uradno certificirani semenski krompir ali semenski krompir, pridelan pod uradnim nadzorom iz uradno certificiranega semenskega krompirja, bodisi za semensko ali merkantilno pridelavo,
 - v vsakem od rastnih let iz prejšnjih alinej izvedejo ukrepi za odstranjevanje krompirjevih in paradižnikovih samosevcev in drugih gostiteljskih rastlin organizma, vključno s plevelom iz družine razhudnikovk, ter uradna preiskava, kakor je opredeljeno v členu 2(1), kadar pa se semenski krompir posadi za pridelavo semena, se opravi še testiranje gomoljev;
- (c) se takoj po določitvi okužbe v skladu s členom 5(1)(a)(ii) in v vsakem naslednjem rastnem letu vse do vključno prve sezone pridelovanja, ko je dovoljena pridelava krompirja ali paradižnika na poljih, določenih za okužena, kakor je opredeljeno v odstavku (a):
- vsi stroji in skladiščni prostori na mestu pridelave, ki so vključeni v pridelavo krompirja ali paradižnika, očistijo in, kadar je to primerno, razkužijo z uporabo ustreznih metod iz točke 3,
 - vpelje uradni nadzor namakalnih in škroplilnih programov, vključno z njihovo prepovedjo, kadar je to primerno, da se prepreči širjenja organizma;
- (d) se na enoti pridelave zavarovanega pridelka, določeni za okuženo v skladu s členom 5(1)(a)(ii), kjer je rastni substrat mogoče v celoti zamenjati,
- ne sadijo gomolji in rastline krompirja ali druge gostiteljske rastline organizma, vključno z rastlinami in semenom paradižnika, razen če so bili na navedeni enoti izvedeni uradno nadzorovani ukrepi za izkoreninjenje organizma in odstranitev vsega materiala gostiteljskih rastlin, vključno z vsaj celotno zamenjavo rastnega substrata ter očiščenjem in, kadar je to ustrezno, razkužitvijo navedene enote in vse opreme, ter so nato pristojni uradni organi odobrili pridelavo krompirja ali paradižnika, in
 - krompir prideluje iz uradno certificiranega semenskega krompirja, minigomoljev ali mikro-rastlin, pridobljenih iz testiranih virov,
 - vpelje uradni nadzor namakalnih in škroplilnih programov, vključno z njihovo prepovedjo, kadar je to primerno, da se prepreči širjenje organizma.

4.2 Znotraj razmejenega območja, brez poseganja v ukrepe iz 4.1, države članice:

- (a) takoj in nato še vsaj tri rastna leta po določitvi okužbe:
- (aa) kadar je razmejeno območje določeno v skladu s členom 5(1)(a)(iv),
- zagotovijo, da njihovi pristojni uradni organi nadzorujejo posesti, ki pridelujejo, skladiščijo ali opravljajo delo z gomolji krompirja ali paradižnikom, vključno s posestvi, ki po pogodbi upravljajo s stroji za pridelavo krompirja ali paradižnika,
 - zahtevajo čiščenje in, kadar je to primerno, razkuževanje strojev in skladišč na takšnih posestvih z uporabo ustreznih metod iz točke 3,

- zahtevajo sajenje le uradno certificiranega semenskega krompirja ali semenskega krompirja, ki je bil pridelan pod uradnim nadzorom, za celotno pridelavo krompirja znotraj tega območja ter testiranje po pravilu semenskega krompirja, pridelanega na mestih pridelave, ki so bila določena za verjetno okužena v skladu s členom 5(1)(a)(iii),
 - zahtevajo, da se na vseh posestvih na tem območju delo s spravljanim semenskim krompirjem opravlja ločeno od dela z merkantilnim krompirjem,
 - izvedejo uradno preiskavo iz člena 2(1),
- (ab) kadar je bila v skladu s členom 5(1)(c)(ii) površinske voda določena za okuženo ali v skladu s točko 2 Priloge V vključena med elemente možnega širjenja organizma,
- opravijo letno preiskavo v ustreznih časovnih obdobjih, vključno z vzorčenjem površinske vode in ustreznih gostiteljskih rastlin iz družine razhudnikovk iz primernih vodnih virov ter testiranjem v skladu s
 - primerno metodo iz Priloge II za navedeni rastlinski material, ali
 - katero koli drugo uradno odobreno metodo v vseh drugih primerih,
 - vpeljejo uradni nadzor namakalnih in škroplilnih programov, vključno s prepovedjo uporabe vode, ki je bila določena za okuženo, za namakanje in škropljenje navedenega rastlinskega materiala in, kadar je to primerno, drugih gostiteljskih rastlin organizma, da se prepreči širjenje organizma. Ta prepoved se lahko revidira na podlagi rezultatov navedene letne preiskave,
 - v primeru okuženih odpadnih voda vpeljejo uradni nadzor odstranjevanja odpadkov iz obratov za industrijsko predelavo ali pakiranje, kjer se opravlja delo z navedenim rastlinskim materialom;
- (b) izdelajo program, kadar je to primerno, za zamenjavo celotnih zalog semenskega krompirja v ustreznem časovnem obdobju.
-

PRILOGA VII

Uradno odobrene naprave za odstranjevanje odpadkov iz četrte alinee odstavka 1 Priloge VI morajo biti v skladu z naslednjimi določbami zaradi preprečevanja nevarnosti širjenja organizma:

- (i) odpadki iz predelave krompirja in paradižnika (vključno z izločenim krompirjem, olupki in paradižnikom) in katerikoli drugi trdni odpadki, povezani s krompirjem in paradižnikom, se odstranijo bodisi:
 - tako da se globoko zakopljejo na odlagališču, kjer ni nobene nevarnosti pronicanja na kmetijska zemljišča ali stika z vodnimi viri, ki bi se lahko uporabili za namakanje kmetijskih zemljišč. Odpadki se prepeljejo neposredno na odlagališče v zaprtem sistemu, tako da ni nevarnosti izgube odpadkov, ali
 - s sežigom;
- (ii) odpadne vode iz predelave: pred odstranitvijo se iz odpadnih vod, ki vsebujejo suspendirane trdne delce, ti delci odstranijo s filtracijo ali postopkom posedanja. Ti trdni delci se nato odstranijo tako, kakor je določeno v pododstavku (i).

Odpadne vode se nato bodisi:

 - pred odstranitvijo vsaj 30 minut segrevajo pri vsaj 70 °C, ali
 - z uradno odobritvijo in pod uradnim nadzorom kako drugače odstranijo tako, da ni nobene nevarnosti, da bi odpadki prišli v stik s kmetijskim zemljiščem ali vodnimi viri, ki bi se lahko uporabili za namakanje kmetijskega zemljišča. O podrobnostih v zvezi s tem se obvestijo druge države članice in Komisija.