

ДИРЕКТИВА 98/57/ЕО НА СЪВЕТА

От 20 юли 1998 година

за контрол на *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et.al.

СЪВЕТАТ НА ЕВРОПЕЙСКИЯ СЪЮЗ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност, и по-специално член 43,

като взе предвид предложението на Комисията¹,

като взе предвид становището на Европейския парламент²,

като взе предвид становището на Икономическия и социален комитет³,

като има предвид, че патогенният организъм *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. преди е бил известен като *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith; като има предвид, че *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. вероятно ще стане общоприето наименование на този организъм; като има предвид, че настоящата директива следва да вземе под внимание това развитие в науката;

като има предвид, че производството на картофи и домати заема важно място в селското стопанство на Общността; като има предвид, че добивът на картофи и домати е постоянно застрашен от вредители;

като има предвид, че чрез предпазване на картофовите и домати култури от вредители, не само ще се запази производствения капацитет, но ще се повиши и производителността в селското стопанство;

като има предвид, че защитните мерки за предотвратяване внасянето на вредители на територията на държавите-членки биха имали само ограничен ефект, ако такива

¹ ОВ С 124, 21.4.1997 г., стр. 12 и ОВ С 108, 7.4.1998, стр. 85

² ОВ С 14, 19.1.1998 г., стр. 34.

³ ОВ С 206, 7.7.1997 г., стр. 57.

организми не се контролират едновременно и методично навсякъде в Общността и не се предотвратява тяхното разпространение;

като има предвид, че един от вредителите по картофите и домати е *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., патогена на кафявото гниене по картофите и на бактериалното изсъхване по картофите и домати; като има предвид, че в някои части на Общността възникнаха огнища на заболяване, причинено от този патогенен агент и все още съществуват някои ограничени източници на инфекция;

като има предвид, че съществува значителен риск за отглеждането на картофи и домати навсякъде в Общността, ако не се вземат ефективни мерки по отношение на тези култури, за да се установи местонахождението на този организъм и да се определи разпространението му, да се предотврати появата и разпространението му, а в случай че бъде открит, да се предотврати разпространението му и да се осъществи контрол с цел унищожаването му;

като има предвид, че с цел да се постигне това, трябва да бъдат взети определени мерки в рамките на Общността; като има предвид, че в допълнение държавите-членки трябва да могат, при необходимост, да предприемат допълнителни или по-строги мерки, при условие, че не се възпрепятства движението на картофи или домати в рамките на Общността, с изключение на случаите, посочени в Директива 77/93/ЕИО на Съвета от 21 декември 1976 относно защитните мерки срещу внасяне в Общността на организми, вредни за растенията или растителните продукти и срещу тяхното разпространение в рамките на Общността⁴; като има предвид, че другите държави-членки и Комисията трябва да бъдат уведомени за тези мерки;

като има предвид, че мерките трябва да бъдат съобразени с необходимостта от провеждане на систематични официални обследвания за да се установи местонахождението на патогена; като има предвид, че такива обследвания следва да включват процедури за инспектиране и, при необходимост, като се има предвид, че при определени условия на околната среда заболяването може да остане латентно и незабелязано както при развиващите се картофови култури, така и при съхраняваните картофови клубени, процедури по вземане на проби и извършване на тестове; като има предвид, че разпространението на патогена сред развиващите се култури не е най-важният фактор, но имайки предвид, че патогенът може да се разпространява чрез надземните води и някои сродни диви картофови растения, и по тази причина напояването на картофовите и домати култури чрез използване на замърсена вода изглежда поставя риск от инфектиране на тези култури; като има предвид, че патогенът може да преживее зимата в саморасли картофови и домати растения, които могат да бъдат източник на инфекция, която се пренася във всеки следващ сезон; като има предвид, че патогенът се разпространява също чрез замърсяване на картофи при контакт

⁴ ОВ L 26, 31.1.1977 г., стр. 20. Директива, последно изменена с Директива 98/2/ЕО на Комисията (ОВ L 15, 21.1.1998 г., стр. 34).

с инфектирани картофи и чрез контакт със съоръженията за засаждане, прибиране на реколтата и обработка или чрез контейнерите за транспорт и съхранение, които са били замърсени с организма при предишен контакт с инфектирани картофи;

като има предвид, че разпространението на патогена може да бъде намалено или предотвратено чрез обеззаразяването на тези обекти, като има предвид, че всяко такова замърсяване на картофите за семе поставя значителен риск от разпространението на патогена; по същия начин латентната инфекция при картофите за семе поставя значителен риск от разпространението на патогена и това може да бъде предотвратено чрез използването на картофи за семе, произведени по официално одобрена програма, съгласно която картофите за семе са изследвани и е констатирано, че не носят инфекцията;

като има предвид, че сегашните познания по отношение биологията и епидемиологията на *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. в условията на Европа са непълни и се очаква, че в рамките на няколко сезона ще е необходимо преразглеждане на предложените мерки; също така се очакват подобрения в процедурите по извършване на тестове, като се има предвид по-нататъшната изследователска работа, особено по отношение на чувствителността и специфичността на тест методите, с цел да се изберат и стандартизират оптимални валидни тест методи;

като има предвид, че за определяне на подробностите на такива общи мерки, както и на по-стриктните или допълнителни мерки взети от държавите-членки, за да се предотврати внасяне на патогена на тяхна територия, е желателно държавите-членки да осъществяват тясно сътрудничество с Комисията в рамките на Постоянния комитет за здравето на растенията (наричан оттук нататък „Комитетът”),

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

Настоящата директива се отнася до мерките, които ще се вземат в рамките на държавите-членки срещу *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., преди известен като *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith (наричан оттук нататък „организмът”), с цел, по отношение на растенията-гостоприемници за организма, изброени в приложение I, раздел 1, (наричани оттук нататък „изброения растителен материал”) да:

- а) установят местонахождението му и да определят разпределението му;
- б) предотвратят появата и разпространението му, и

в) в случай, че бъде открит, да предотвратят разпространението му и да осъществят контрол с цел унищожаването му.

Член 2

1. Държавите-членки провеждат ежегодни систематични официални обследвания за организма върху изброения растителен материал, произхождащ от тяхната територия. С цел да се открият други възможни източници на замърсяване, представляващи заплаха за производството на изброения растителен материал, държавите-членки извършват оценка на риска и, освен ако при оценката не е установен риск от разпространение на организма, провеждат, в районите на производство на изброения растителен материал, контролни официални обследвания за организма върху растения, различни от изброения растителен материал, включително диви картофови растения-гостоприемници, както и на повърхностните води, които се използват за напояване или пръскане на изброения растителен материал и на отпадъчните води, отделяни от предприятията за промишлена преработка или пакетиране, в които се обработва изброения растителен материал, и които се използват за напояване или пръскане на изброения растителен материал. Обхватът на тези контролни обследвания се определя съгласно установения риск. Държавите-членки могат също така да извършват официални обследвания за организма върху материали, като среди за отглеждане, почва и твърди отпадъци от предприятията за промишлената преработка или пакетиране.

2. Официалните обследвания, предвидени в параграф 1, се извършват:

а) за изброения растителен материал, съгласно критериите, изложени в точка 1 от раздел II, приложение I; и

б) за растения-гостоприемници, различни от изброения растителен материал, както и на водата, включително отпадъчните води, в съответствие с подходящи методи и, при необходимост, се вземат проби, които се подлагат на официални лабораторни изпитвания или такива под официален надзор;

в) при необходимост, за друг материал, в съответствие с подходящи методи.

Допълнителните подробности за тези обследвания, по отношение на процедурите на инспектиране и броя, произхода, напластяването и времето за вземане на проби, се решават от отговорните официални органи, по смисъла на Директива 77/93/ЕИО на базата на обосновани научни и статистически принципи и биологията на организма, като се вземат под внимание специфичните системи за производство на изброения растителен

материал в засегнатата държава-членка и, при необходимост, на други растения-гостоприемници за организма.

3. Останалите държави-членки и Комисията се уведомяват за подробностите и резултатите от официалните обследвания, предвидени в параграф 1, всяка година, в съответствие с разпоредбите на точка 2 от раздел II, приложение I. Тези уведомявания се предоставят до 1 юни, освен относно използването на картофите, запазени във фермата за семе, за които уведомяването се предоставя до 1 септември. Подробностите и резултатите за културите се отнасят за продукцията от предходната година. Подробностите от тези уведомявания може да се предоставят на Комитета.

4. Приема се следната разпоредба в съответствие с процедурата, определена в член 16 а от Директива 77/93/ЕИО:

- подходящите методи за обследвания и за лабораторни тестове, предвидени в параграф 2, параграф първи, точка б).

5. Могат да бъдат приети следните разпоредби в съответствие с процедурата, определена в член 16 а от Директива 77/93/ЕИО:

- подходящите методи за обследвания, предвидени в параграф 2, алинея първа, точка в,
- допълнителни подробности за обследвания, предвидени в параграф 2, алинея втора, с оглед да се гарантират сравними нива на осигуряване между държавите-членки.

Член 3

Държавите-членки вземат мерки, така че техните собствени отговорни официални органи да получават информация за предполагаема поява или потвърдено наличие на организма на тяхната територия..

Член 4

1. Във всеки случай на предполагаема поява, отговорните официални органи на засегнатите държави-членки осигуряват извършване на официално или под официален надзор лабораторно изследване, като за изброения растителен материал използват съответния метод, определен в приложение II и в съответствие с условията, посочени в точка 1 от приложение III, или, във всички останали случаи, който и да е друг официално

одобрен метод, с цел да се потвърди или отхвърли предполагаемото наличие. В случай на потвърждаване, се прилагат изискванията, посочени в точка 2 от приложение III.

2. До потвърждаване или отхвърляне на предполагаема поява съгласно параграф 1, във всеки случай на предполагаема поява, в който:

(i) са забелязани диагностични симптоми на заболяването, причинено от организма и е получен положителен резултат при бързия скринингов тест (-ове), в съответствие с предвиденото в приложение II, раздел I, точка 1 и раздел II; или

(ii) е получен положителен резултат при скрининговия (-ите) тест (-ове), в съответствие с предвиденото в приложение II, раздел I, точка 2 и раздел III,

отговорните официални органи на държавите-членки, във връзка със собственото си производство:

а) забраняват движението на растения и клубени от всички култури, партиди или пратки от които са взети пробите, освен ако то не се извършва под техен контрол и при условие, че е установено отсъствието на риск от разпространение на организма;

б) предприемат мерки за проследяване произхода на предполагаемата поява;

в) въвеждат подходящи допълнителни предохранителни мерки на базата на нивото на прогнозирания риск, особено във връзка с производството на изброения растителен материал и движението на партиди от картофи за семе, различни от тези, посочени в точка а), получени на мястото на производство, откъдето са взети пробите, посочени в точка а), с цел да се предотврати всякакво разпространение на организма.

3. В тези случаи на предполагаема поява, при която има риск от замърсяване на изброения растителен материал или надземните води от или към друга (и) държава-членка (и), държавата-членка, в която е докладвано за предполагаемата поява, незабавно уведомява другите засегнати държави-членки, съобразно установения риск, за подробностите относно споменатата предполагаема поява и се осъществява подходящо сътрудничество между споменатите държави-членки. Уведомените държави-членки въвеждат предохранителни мерки в съответствие с параграф 2 точка в и при необходимост, предприемат по-нататъшни действия, съгласно параграфи 1 и 2.

4. Може да се приема следната разпоредба в съответствие с процедурата, предвидена в член 16а от Директива 77/93/ЕИО:

- Мерките, посочени в параграф 2 буква в).

Член 5

1. Ако в резултат на официално или извършено под официален надзор лабораторно изследване, използващо за изброения растителен материал определения в приложение II метод, или, във всички останали случаи, който и да е друг официално одобрен метод, се потвърди наличие на организма в проба, взета съгласно настоящата директива, тогава отговорните официални органи на държавата-членка, като вземат предвид обосноващите научни принципи, биологията на организма и специфичните системи на производство, пускане на пазара и обработка на растенията-гостоприемници за организма в тази държава-членка:

а) за изброения растителен материал;

(i) започват разследване за да определят обхвата и първоначалния (-ите) източник (-ци) на замърсяване, в съответствие с разпоредбите на приложение IV, с последващо извършване на тестове, в съответствие с член 4, параграф 1, на поне всички видове картофи за семе от един генетичен клон, и

(ii) обозначават като замърсен изброения растителен материал, пратката и/или партидата, от която е взета пробата, както и машините, превозните средства, съдовете, складовете или участъци от тях, и всички други предмети, включително опаковъчния материал, който е бил в контакт с изброения растителен материал, от който е взета пробата; също така, по целесъобразност, обозначава като замърсени полето(-ата), участъка (-ците) за производство на защитени култури и мястото (местата) за производство, от които е получен изброения растителен материал и от които е взета пробата; а при пробите, взети по време на вегетация, обозначава като замърсени полето (-ата), мястото (местата) за производство и, при необходимост, участъка (-ците) за производство на защитени култури, от които е взета пробата, и,

(iii) определят, в съответствие с разпоредбите на точка 1 от приложение V, обхвата на вероятното замърсяване чрез контакт преди или след прибиране на реколтата, чрез производствени, напоителни или оросителни връзки или чрез клонингова връзка с обявеното замърсяване, и,

(iv) разграничават зона на базата на обявеното замърсяване по точка (ii), определения обхват на вероятното замърсяване по точка (iii) и възможното разпространение на организма, в съответствие с разпоредбите на точка 2 (i) от приложение V;

б) за култури от растения-гостоприемници, различни от споменатите в точка а), когато е установен риск за производството на изброения растителен материал,

(i) започват разследване, в съответствие с буква а)(i); и

(ii) обозначават като замърсени растенията-гостоприемници за организма, от които е взета пробата; и

(iii) определят вероятното замърсяване и разграничават зона, в съответствие с буква а)(iii) и (iv) съответно, във връзка с производството на изброения растителен материал;

в) за повърхностни води (включително отпадъчни води, от предприятията за промишлена преработка или пакетиране, в които обработват изброения растителен материал) и сродни диви картофови растения-гостоприемници, когато производството на изброения растителен материал е изложено на риск чрез напояване, пръскане или наводняване от повърхностните води,

(i) започват разследване, включващо официално обследване през подходящи интервали от време на проби от повърхностни води и, ако присъстват диви картофови растения гостоприемници, установяват обхвата на замърсяването; и

(ii) обозначават като замърсени повърхностните води, от които са взети пробите, до подходящата степен и на базата на разследването по точка (i); и

(iii) определят вероятното замърсяване и разграничават зона на базата на обявеното замърсяване по точка (ii) и възможното разпространение на организма, като вземат под внимание разпоредбите на точки 1 и 2 (ii) от приложение V.

2. Държавите-членки незабавно уведомяват останалите държави-членки и Комисията, в съответствие с разпоредбите на точка 3 от приложение V, за всяко замърсяване, обявено съгласно параграфи 1 буква а)(ii) и 1 буква в)(ii) и за подробностите относно разграничаването на зоната, съгласно параграф 1 в)(iv) и, при необходимост, съгласно параграф 1 буква в)(iii). Подробностите от тези уведомления могат да се предоставят на Комитета.

Държавите-членки в същото време предоставят на Комисията допълнителното известие, упоменато в точка 4 от приложение V. Подробностите от известието по тази алинея незабавно се предоставят на членовете на Комитета.

. В резултат на известието по параграф 2 и споменатите там елементи, други държави-членки, които са изброени в известието, започват разследване съгласно параграф 1а)(i) и, при необходимост, по параграф 1, буква в)(i) и предприемат по целесъобразност по-нататъшни действия, в съответствие с параграфи 1 и 2.

Член 6

1. Държавите-членки отправят предписание, този изброен растителен материал, обявен като замърсен по член 5, параграф 1, буква а)(i), да не се засажда и, под контрола и одобрението на техните отговорни официални органи, да е предмет на една от разпоредбите в точка 1 от приложение IV, така че да не се установява съществуването на риск от разпространение на организма.

2. Държавите-членки отправят предписание, този изброен растителен материал, определен като вероятно замърсен съгласно член 5, параграф 1, буква а) (iii) и в)(iii), включително изброения растителен материал, за който е установен риск и който е произведен на места, определени като вероятно замърсени по член 5 параграф 1 а)(iii), да не се засажда и, под контрола на техните отговорни официални органи, да бъде подходящо оползотворен или ликвидиран, в съответствие с предвиденото в точка 2 от приложение VI, така че да не се установява съществуването на риск от разпространение на организма.

3. Държавите-членки отправят предписание, така че всички машини, превозни средства, съдове, складове или участъци от тях и всички други предмети, включително опаковъчен материал, обозначени като замърсени по член 5 параграф 1, буква а)(ii) или определени като вероятно замърсени по член 5 параграф 1, буква а)(iii) и в)(iii), да бъдат или унищожени или обеззаразени чрез използване на подходящи методи, в съответствие с предвиденото в точка 3 от приложение VI. След обеззаразяване, всички тези предмети не се считат вече за замърсени.

4. Без да накърняват мерките, осъществени съгласно параграфи 1, 2 и 3, държавите-членки отправят предписание, в зоната разграничена съгласно член 5, параграф 1, буква а)(iv) и в)(iii), да бъде изпълнена серия от мерки, в съответствие с предвиденото в точки 4.1 и 4.2 от приложение VI. Останалите държави-членки и Комисията се уведомяват ежегодно за подробностите във връзка с тези мерки. Подробностите от това известие могат да бъдат предоставени на Комитета.

Член 7

1. Държавите-членки отправят предписание, картофите за семе да отговарят на изискванията от Директива 77/93/ЕИО и да са добити по пряка линия от картофов

материал, получен съгласно официално одобрена програма, за който е констатирано, че няма наличие на организма чрез официално изследване, или такова извършено под официален надзор с използване на съответния метод, определен в приложение II.

Споменатото изследване се извършва от държава-членка:

а) в случаи, когато е потвърдено наличие на организма в нейна собствена продукция от картофи за семе,

(i) чрез изследване на по-ранния размножителен материал, включително първоначалната клонингова селекция и систематично изследване на основните картофови клонове за семе; или

(ii) в случаи, когато е установено, че няма клонингова връзка, чрез изследване на всички основни клонове картофи за семе или по-ранния размножителен материал, включително първоначалната клонингова селекция, и

б) в останалите случаи, или на всяко растение от първоначалната клонингова селекция или на представителни проби от основните картофи за семе или на по-ранния размножителен материал.

2. Следните разпоредби могат да бъдат приети в съответствие с процедурата, определена в член 16а от Директива 77/93/ЕИО:

- подробните правила за прилагане на параграф 1, алинея втора, буква а),
- правилата относно представителните проби, предвидени в параграф 1, алинея втора, точка б).

Член 8

Държавите-членки забраняват притежаването и извършването на манипулации с организма.

Член 9

Без да накърняват разпоредбите на Директива 77/93/ЕИО, държавите-членки могат да разрешат изключения от мерките, посочени в членове 6 и 8 от настоящата директива, в

съответствие с разпоредбите, определени в Директива 95/44/ЕО⁵ за експериментални или научни цели и за работа върху селекция на нови сортове.

Член 10

Държавите-членки могат да приемат, във връзка със собственото си производство, такива допълнителни или по-строги мерки, каквито може да са необходими за борба срещу организма или за да се предотврати неговото разпространение, доколкото те са в съответствие с разпоредбите на Директива 77/93/ЕИО.

Член 11

Изменения и допълнения към приложенията на настоящата директива, изготвени съобразно развитието в научното и техническото познание, се приемат в съответствие с процедурата, определена в член 16а от Директива 77/93/ЕИО. По отношение на методите, определени в приложение II и по отношение на мерките в параграфи 4.1 и 4.2 от приложение VI към настоящата директива, Комисията изготвя доклад за преразглеждане на тези методи и мерки на базата на натрупания опит, като докладът се предоставя на Комитета преди 1 януари 2002.

Член 12

1. Държавите-членки въвеждат необходимите законови, подзаконови и административни разпоредби, за да приведат своето законодателство в съответствие с настоящата директива, в сила от 21 август 1999 г. Те незабавно уведомяват Комисията за това.

Когато държавите-членки приемат тези разпоредби, в тях се съдържа позоваване на настоящата директива или то се извършва при официалното им публикуване. Условиата и редът на позоваване се определят от държавите-членки.

2. Държавите-членки незабавно уведомяват Комисията за приетите разпоредби от вътрешното законодателство в областта, регулирана от настоящата директива. Комисията уведомява останалите държави-членки за тези разпоредби.

Член 13

⁵ ОВ L 184, 3.8.1995 г., стр. 34. Директива, последно изменена с Директива 97/46/ЕО на Комисията (ОВ L 204, 31.7.1997 г., стр. 43).

Настоящата директива влиза в сила в деня на нейното публикуване в Официален вестник на Европейските общности.

Член 14

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 20 юли 1998 година.

За Съвета:
Президент
W. MOLTERER

ПРИЛОЖЕНИЕ I

РАЗДЕЛ I

Списък на растения-гостоприемници за *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., посочен в член 1

Растения (включително клубени), освен същинските семена,

от вида *Solanum tuberosum* L. *Картоф*

Растения, освен плодовете и семената, от вида *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw. *Домат*

РАЗДЕЛ II

Обследвания

1. Официалните обследвания, посочени в член 2 , параграф 2, буква а) се основават върху биологията на организма и специфичните системи на производство в засегнатата държава-членка и включват:

(i) при картофи,

- през подходящи интервали от време, визуален преглед на растящата култура, и/или вземане на проби, както от картофите за семе, така и от останалите картофи по време на вегетация или в склада. Тези проби се подлагат на официален или извършен под официален надзор визуален преглед, чрез разрязване на клубените, и

- при картофите за семе, а при необходимост и при други картофи, официално или извършено под официален надзор лабораторно изследване по метод, определен в приложение II,

(ii) при домати,

- визуален преглед през подходящи интервали от време поне на растящите култури от растенията, предназначени за пресаждане с професионална цел.

2. Известяването на официалните обследвания, посочени в член 2, параграф 3) включва:

(i) в случай на обследвания върху картофи,

- предполагаема обща площ, в хектари, засадена с картофи за семе и други картофи,

- класифициране по категории за семе и продукция и, при необходимост, по район,

- брой и обозначаване времето на взетите за изследване проби,

- брой визуални прегледи на полето,

- брой (и размер на пробата) визуални прегледи върху клубени;

(ii) в случай на обследвания поне върху растящите култури от домати растения, предназначени за пресаждане с професионална цел,

- предполагаем общ брой растения,

- брой визуални прегледи;

(iii) в случай на обследвания върху растения-гостоприемници, различни от картофи и домати, включително диви картофови растения-гостоприемници,

- вид,

- брой и обозначаване времето на взетите проби,

- по целесъобразност, район/река, откъдето е взета пробата,

- метод на изследване;

(iv) в случай на обследвания на вода и течни отпадъци, отделяни от помещения за промишлена преработка или пакетиране,

- брой и обозначаване времето на взетите проби,

- по целесъобразност, район/река/местоположение на помещенията, откъдето е взета пробата,

- метод на изследване.

ПРИЛОЖЕНИЕ II

СХЕМА ЗА ИЗПИТВАНЕ ЗА ДИАГНОСТИЦИРАНЕ, ОТКРИВАНЕ И ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI ET AL

ОБХВАТ НА ТЕСТ СХЕМАТА

Представената схема описва различните процедури, включени в:

- (i) диагностициране на кафяво гниене по картофови клубени и на бактериално изсъхване по картофови и домати растения;
- (ii) откриване на *Ralstonia solanacearum* в проби от картофови клубени;
- (iii) идентифициране на *Ralstonia solanacearum*.

В приложенията са дадени подробности относно подготовката на материалите за теста, т. е. среда на култивиране, буфери, разтвори, реактиви.

СЪДЪРЖАНИЕ:

РАЗДЕЛ I: Прилагане на тест схемата

1. Диагностициране на кафяво гниене по картофови клубени и на бактериално изсъхване по картофови и домати растения
2. Откриване и идентифициране на *Ralstonia solanacearum* в проби от картофови клубени

РАЗДЕЛ II: Диагностициране на кафяво гниене по картофовите клубени и на бактериално изсъхване по картофови и домати растения

1. Симптоми
2. Бърз(и) скринингов(и) тест (-ове)

3. Процедура по изолиране

4. Тест (-ове) за доказване

РАЗДЕЛ III: Откриване и идентифициране на *Ralstonia solanacearum* в проби от картофови клубени

1. Подготовка на пробите за изследване

2. Имунофлуоресцентен тест (IF)

3. Тест с ензимно-свързан имуно-сорбентен анализ (ELISA)

4. Тест с верижно-полимеразна реакция (PCR™)

5. Тест в селективни блюда

6. Биологичен тест

7. Обогатителни тестове

8. Тест за патогенност

Приложение 1 Хранителни среди за изолиране и култивиране на *Ralstonia solanacearum*

Приложение 2 Материали за подготовка на пробите

Приложение 3 Материали за IF тест

Приложение 4 Определяне степента на замърсяване при IF тест

Приложение 5 Материали за ELISA тест

Приложение 6 Материали за PCR тест

Приложение 7 Материали за тестове върху селективни и обогатителни среди

Литература

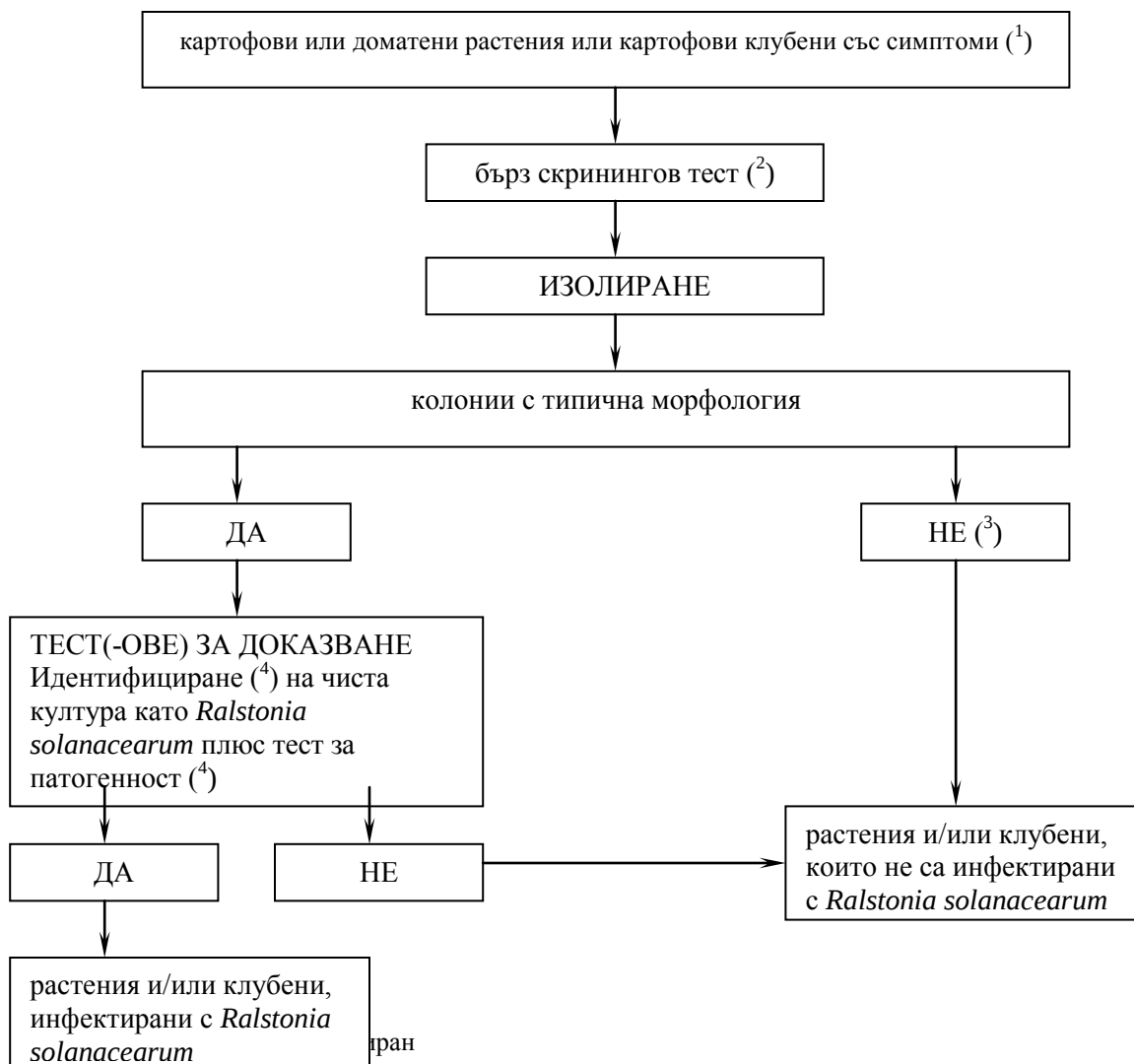
РАЗДЕЛ I

ПРИЛАГАНЕ НА ТЕСТ СХЕМАТА

1. Диагностициране на кафяво гниене по картофите клубени и на бактериално изсъхване по картофови и домати растения

Процедурата по тестването е предназначена за картофови клубени с характерни или предполагаеми симптоми на кафяво гниене и за картофови и домати растения с характерни или предполагаеми симптоми на бактериално изсъхване. Тя включва бърз скринингов тест, изолиране на патогена от инфектираната васкуларна тъкан върху диагностични среди и в случай, че се получи положителен резултат, идентифициране на културата като *Ralstonia solanacearum*.

Представяне във вид на диаграма



Забележки по диаграмата:

(¹) Описание на симптомите е дадено в раздел II.1

(²) Бързите скринингови тестове улесняват предварителната диагноза

Подходящи тестове са:

- Тест за изтечения от васкуларна тъкан на стебло (Раздел II.2),
- Тест за гранули от поли- β -хидроксibuтират (Раздел II.2),
- IF тест (раздел II.2),
- ELISA тест (раздел III.3),
- PCR тест (раздел III.4)

(³) Въпреки че изолирането на патогена от растителен материал с характерни симптоми чрез посеви от разреждания е просто, култивирането може да е неуспешно в напреднали стадии на инфекцията. Сапрофитни бактерии, които растат върху поразените тъкани могат да се развият или да забавят растежа на патогена върху средата за изолирането му. Ако тестът за изолиране е отрицателен, но симптомите на заболяването са характерни, изолирането трябва да се повтори, за предпочитане чрез тест в селективни блюда.

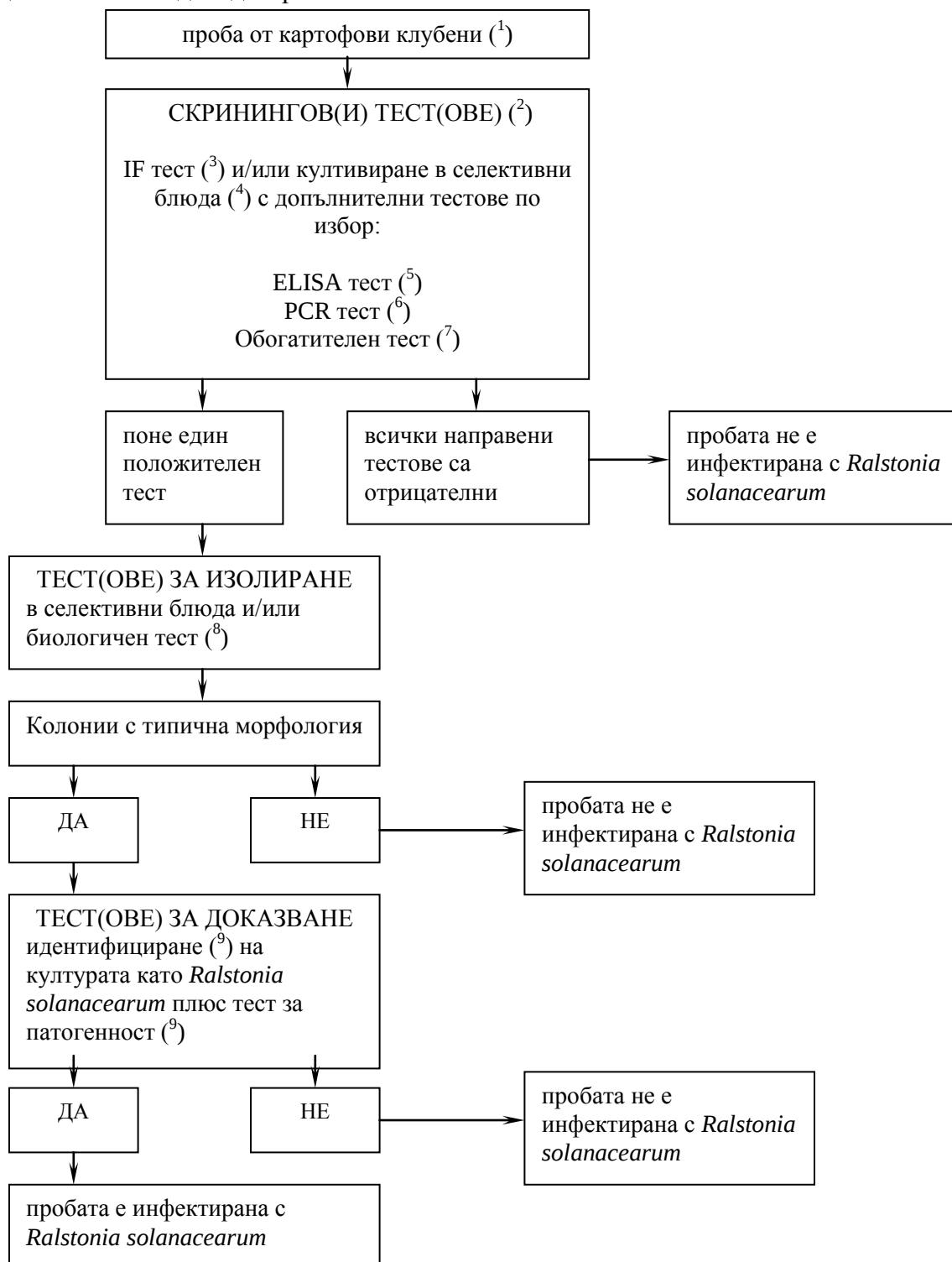
(⁴) Надеждно идентифициране на чиста култура от *Ralstonia solanacearum* се осъществява чрез поне един от изброените в раздел II.4.1 тестове в комбинация с тест за патогенност (раздел II.4.3). Определянето на щам не е задължително, но се препоръчва за всеки нов случай.

2. Откриване и идентифициране на *Ralstonia solanacearum* в проби от картофови клубени

Процедурата е предназначена за откриване на латентна инфекция при картофови клубени чрез един, или за предпочитане, повече скринингови тестове, които, в случай че дадат положителен резултат, се допълват от изолиране на патогена; последвано от

идентифициране на чиста култура *Ralstonia solanacearum*, в случай на изолиране на типични колонии.

Представяне във вид на диаграма



Забележки по диаграмат:

(¹) Размер на пробата

Стандартният размер е 200 клубена. Независимо от това, процедурата може да бъде приложена и за проби с по-малко от 200 клубена.

(²) Скринингови тестове

Само един тест може да не е достатъчно чувствителен или надежден за откриване на *Ralstonia solanacearum* в проба. Поради това се препоръчва повече от един тест, като е за предпочитане тези тестове да се основават на различни биологични принципи.

(³) Имунотлуоресцентен (IF) тест

IF тестът е добре доказан скринингов тест. Това е предимство пред други тестове, които не са все още напълно развити или утвърдени. Тестът се използва за много други установени бактерии, като например *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Определените в този метод параметри за отчитане го правят чувствителен тест (праг на чувствителност $10^3 - 10^4$ клетки/ml гранулиран картофов екстракт).

Критичният фактор за надеждността на резултата от теста е качеството на антисерума. Допуска се само антисерум с висок титър (най-малко 2000 за непречистения антисерум), като всички тестове трябва да се извършват при титъра на антисерума или едно разреждане под титъра. Предпочита се индиректният метод. Директният метод може да се прилага, ако тестът има ниво на чувствителност и специфичност еднакво с това на индиректният метод.

IF тест има предимството, че морфологията на клетъчното оцветяване и интензитета на флуоресценцията, които дават информация за специфичността на реакцията, се тълкуват субективно. Често се срещат кръстосани реакции със серологично сходни бактерии от почвата или свързани с картофови тъкани, чиито клетки имат морфологията на *Ralstonia solanacearum*. IF тестът може да бъде използван като единствен скринингов тест, въпреки че в случай на предполагаема кръстосана реакция, трябва да се направи допълнителен скринингов тест основан на различен биологичен принцип. В такива случаи най-подходящ е тестът в селективни блюда.

(⁴) Посявка в селективни блюда

Модифицираната среда SMSA и установената в този метод методология на тестване го правят чувствителен и селективен за *Ralstonia solanacearum*. Резултатът е готов за 3 – 6 дни след подготовка на пробата. Патогенът се получава директно в култура и лесно може да бъде идентифициран. За пълно използване на възможностите му, тестът изисква внимателна подготовка на столоновите краища, за да се избегнат вторичните бактерии свързани с картофовия клубен, които са конкуренти на *Ralstonia solanacearum* върху средата и могат да повлияят на растежа на патогена. Някои щамове може да растат слабо, тъй като компонентите на средата е възможно да повлияят върху целевия организъм. Необходимо е внимателно да се разграничи *Ralstonia solanacearum* от други бактерии, които могат да се развият върху средата. Посевка в селективни блюда може да бъде използвана като единствен скринингов тест, при условие, че в случаи на подозирано инхибиране на *Ralstonia solanacearum* от други бактерии и получен отрицателен резултат при теста, пробата се тества отново с различен тест, за да се потвърди или отхвърли диагнозата. В тези случаи, най-подходящ е IF тест.

(⁵) ELISA тест

Тестът ELISA като цяло е по-малко чувствителен от IF тест (праг на чувствителност 10^4 – 10^5 клетки/ml гранулиран картофов екстракт). Тестът е евтин и бърз, но като цяло по-податлив на лъжлив положителен резултат (кръстосани реакции) и лъжлив отрицателен резултат (инхибиране от фенолни молекули в екстракта от картоф). Изискванията за специфичността на антисерума са изключително високи. Тестът ELISA не може да бъде използван като единствен скринингов тест.

(⁶) PCR тест

Тестът PCR има възможности за много чувствително откриване, въпреки че лесно се инхибира от компоненти на екстракта от растенията или клубените и дава лъжлив отрицателен резултат. Някои видове картофи съдържат повече инхибитори от други. Поради тази причина е необходимо тези инхибитори да се премахнат. Инхибирането може да се намалени чрез разреждане, но популациите на *Ralstonia solanacearum* също се разреждат. Голямо внимание трябва да се обърне на всяка стъпка от приготвянето на пробите и теста, за да се предотврати замърсяване, което би довело до лъжливи положителни резултати. Лъжливи положителни резултати могат да се получат и от хомоложни последователности на други организми. По тези причини директния PCR тест не може да се използва като единствен скринингов тест.

(⁷) Обогастителен тест

Инкубирането на проби гранулиран картофов екстракт в полу-селективен бульон, като модифициран SMSA бульон, позволява размножаване на *Ralstonia solanacearum*. По-важно е може би, че той също разтваря евентуални инхибитори на тестовете ELISA или

PCR. По този начин *Ralstonia solanacearum* може да бъде открита в обогатителен бульон чрез IF, ELISA и PCR. Не препоръчваме да се прави директна посевка от обогатените бульони. Тези обогатителни методи не са изпробвани и тествани задълбочено. Тук са включени, тъй като притежават потенциал. Поради относителната липса на опит с тях, обаче, не могат да бъдат използвани като единствени методи за откриване.

(⁸) Биологичен тест

Биологичният тест се използва за изолиране на *Ralstonia solanacearum* от екстракт от картоф чрез селективно обогатяване в растение гостоприемник и може да бъде извършен върху домати растения или патладжани. Тестът изисква оптимални условия за инкубиране, както е определено в този метод. Бактерии инхибитори на *Ralstonia solanacearum* върху хранителна среда SMSA, най-вероятно няма да повлияят този тест.

(⁹) Тест(ове) за доказване

Надеждно идентифициране на чиста култура от *Ralstonia solanacearum* се постига, чрез използване на поне един от изброените в раздел II.4.1. тестове в комбинация с тест за патогенност (раздел II.4.3). Определянето на щама не е задължително, но се препоръчва за всеки нов случай.

РАЗДЕЛ II

Диагностициране на кафяво гниене по картофови клубени и на бактериално изсъхване по картофови и домати растения

1. Симптоми

1.1 Симптоми при картофите

Картофовото растение. Ранният стадий на инфекцията се характеризира с изсъхване на листата към върха на растението при високи температури през деня и възстановяване през нощта. Изсъхването бързо става необратимо и в резултат растението умира. Васкуларната тъкан в напречно прерязани стебла от изсъхнали растения може да стане кафява, а от разрезната повърхност да се отделя или да бъде лесно изцедена чрез притискане подобна на мляко течност. Когато прерязано стебло се постави вертикално във вода от проводящите снопчета се отделят нишки слуз.

Картофеният клубен. Картофовите клубени трябва да се прережат напречно близо до края на столона. Ранният стадий на инфекцията се характеризира с прозрачно жълто до светлокафяво обезцветяване на проводящия пръстен, от който спонтанно след няколко минути или след като се приложи лек натиск с палците върху обвивката близо до разрезната повърхност се отделя бледокремава течност. Впоследствие обезцветяването на проводящата тъкан става по-силно кафяво и некрозата може да се разпространи в паренхимната тъкан. В напреднали стадии инфекцията се разпространява навън от края на столона и очите, което може да доведе до появата на червеникаво-кафяви, леко вдлъбнати изменения по обвивката, от които може да се отделят капки съдържащи бактерии, предизвиквайки слепване на почвените частици.

1.2 Симптоми при домати

Доматено растение. Първият явен симптом е отпуснат вид на по-младите листа. При благоприятни за патогена условия на околната среда (температура на почвата около 25°C и висока влажност) до няколко дни настъпва епинастия и изсъхване на едната страна или на цялото растение, което води до загиване на растението. При по-неблагоприятни условия (температура на почвата под 21°C) върху стеблото може да се развият голям брой добавъчни корени. Възможно е да се забележи размекната връв по дължина на стеблото, което е доказателство за некротизиране на васкуларната система. Когато стеблото се пререже на кръст, обезцветените кафяви васкуларни тъкани на стеблото отделят капки бяла или жълтеникава течност, съдържаща бактерии.

2. Бързи скринингови тестове

Бързите скринингови тестове улесняват предварителната диагноза. Използват се един или повече от следните тестове:

Тест за изтечения от стеблото

Наличието на *Ralstonia solanacearum* в изсъхващи стебла от картоф или домати може да се определи чрез следния елементарен предварителен тест:

Стеблото се прерязва точно над почвената повърхност. Прерязаната повърхност се поставя в мензура с вода. След кратко време от проводящите снопчета спонтанно започват да се отделят нишки от слуз, съдържаща бактерии. Никоя друга бактерия, която причинява инфекция на проводящата тъкан при картофови или домати растения, не показва този феномен.

Откриване на гранули от поли-β-хидроксибутират (ПХБ)

Гранулите ПХБ в клетките на *Ralstonia solanacearum* стават видими след боядисване с Нилско синьо А или със суданово черно Б

Приготвя се намазка от течността или суспендираната тъкан върху предметно стъкло или намазка от 48 часова култура върху YPGA или SPA. (приложение 1) Приготвят се положителни контролни намазки от щам биовариант 2/раса 3 и ако сметете за полезно, отрицателна контролна намазка от хетероложен щам. Остава се да изсъхне. Долната повърхност на предметното стъкло се прекарва няколко пъти бързо през пламъка докато намазката се фиксира.

Тест с Нилско синьо

(1) Залива се фиксираната намазка с 1% воден разтвор на Нилско синьо А. Инкубира се 10 минути при 55 °С.

(2) Отлива се оцветяващия разтвор. Промива се за кратко време под леко течаща водна струя. Излишната вода се отстранява с книжна салфетка.

(3) Намазката се залива с 8% воден разтвор на оцетна киселина. Инкубира се една минута при стайна температура.

(4) Промива се под леко течаща водна струя. Подсушава се върху книжна салфетка.

(5) Навлажнява се отново с капка вода. Постава се фпокривно стъкло.

(6) Боядисаната намазка се разглежда с епифлуоресцентен микроскоп при 450 nm под маслена имерсия и увеличение 1000

Наблюдава се за светло-оранжева флуоресценция от гранули ПХБ. Също така се наблюдава при обикновена светлина, за да се провери, дали гранулите са вътреклетъчни и че морфологията на клетките е типична за *Ralstonia solanacearum*.

Тест със Суданово черно

(1) Фиксираната намазка се залива с 0,3% разтвор на Суданово черно В в 70% етанол. Инкубира се 10 минути при стайна температура.

(2) Отлива се оцветяващия разтвор. Промива се за кратко време под течаща водна струя. Излишната вода се отстранява с книжна салфетка.

(3) Намазката се потапя за кратко време в ксилол. Подсушава се върху книжна салфетка.

Внимание! Ксилолът е вреден продукт. Работете в камина.

(4) Залейте намазката с 0,5% (тегловно-обемн) воден разтвор на сафранин и оставете 10 секунди на стайна температура.

Внимание! Сафранинът е вреден продукт. Работете в камина.

(5) Промива се под леко течаща водна струя. Подсушава се върху филтърна хартия. Поставя се покривно стъкло.

(6) Боядисаната намазка се разглежда със светлинен микроскоп под насочена светлина, под маслена имерсия и увеличение 1000.

Гранулите ПХБ в клетките на *Ralstonia solanacearum* се оцветяват в синьо-черно. Клетъчната стена се оцветява в розово.

Други тестове

Други подходящи скринингови изпитвания са IF тест (раздел III.2), ELISA тестът (раздел III.3), и PCR тестът (раздел III.4).

3. Процедура по изолиране

3.1 Отстранява се течността или участъците с обезцветена тъкан от проводящия пръстен в картофовия клубен или от проводящите нишки в стеблото от картофовите или домати растения. Суспендира се в малко количество стерилна дестилирана вода или 50 mM фосфатен буфер и се оставя 5 – 10 минути върху масата.

3.2 Извършва се поредица от десетократни разреждания на суспензията, напр. 1/10 и 1/100 или повече, ако е необходимо.

3.3 Стандартно количество от суспензията и разрежданията се прехвърля върху обикновена хранителна среда (NA, YPGA и SPA, приложение 1) и/или върху тетразолна среда на Келман (приложение 1) и/или върху селективна среда SMSA (приложение 7). Разстила се или се нанася на резки с подходяща техника за посевка от разтвор. При необходимост се извършват отделни посеви върху всяка използвана среда с разреждана клетъчна суспензия от култура на вирулентен щам биовариант 2/паса 3 на *Ralstonia solanacearum* като положителна контрола.

3.4 Блюдата се инкубират три дни при 28°C. Инкубирането може да продължи до шест дни, ако растежът е бавен, но колонии в блюда със SMSA често стават атипични и отмират.

Върху обикновените хранителни среди, вирулентните изолати от *Ralstonia solanacearum* развиват бисерно-бели, плоски, неправилни и разляти колонии, често с характерни извивки.

Върху тетразолна среда на Келман, типичните колонии на вирулентните изолати от *Ralstonia solanacearum* са кремави, плоски, неправилни и разляти с кървавочервени извивки в центъра. Авирулентните форми на *Ralstonia solanacearum* развиват маслоподобни тъмно-червени колонии.

Върху SMSA среда, типичните колонии на вирулентните изолати от *Ralstonia solanacearum* са млечно-бели, плоски, неправилни и разлети с кърваво-червено оцветяване в центъра.

Авирулентните форми на *Ralstonia solanacearum* развиват по-слабо разлети колонии, които са изцяло розови до червени върху средата SMSA.

3.5 Пречисват се колонии с характерна морфология, чрез рекултивиране върху обикновена хранителна среда. Многократно рекултивиране трябва да се избягва, защото може да предизвика загуба на вирулентност.

4. Тестове за доказване

4.1 Идентифициране на *Ralstonia solanacearum*

Идентифицира се чиста култура от *Ralstonia solanacearum*, чрез поне една от следните процедури:

Хранителни и ензимни тестове

Забележка: Включват се подходящи контролни щамове при всеки използван тест.

Следните фенотипни качества на *Ralstonia solanacearum* присъстват или отсъстват при всички случаи:

Флуоресцентен пигмент	-
Включения от ПХБ	+
Окислително-ферментационен тест (О/Ф)	O+/Ф-
Каталаза	+
Оксидаза на Kovacs	+
Редукция на нитрати	+
Използване на цитрат	+
Растеж при 40°C	-
Растеж при 1% NaCl	+
Растеж при 2% NaCl	-
Аргинин дихидролаза	-
Разтапяне на желатин	-

Хидролиза на скорбяла -

Хидролиза на езулин -

Образуване на леван -

Хранителните среди и методите са дадени в Lelliott & Stead (1987)

IF тест

Изготвя се суспензия с 10^6 клетки/ml от културата и контролния щам (-ове). Провежда се поредица от двукратни разреждания на антисерума и се прилага процедурата за IF тест (раздел III.2). IF титрите за културата и положителната контрола трябва да бъдат равни.

тест ELISA.

Изготвя се суспензия с $>10^6$ клетки/ml от културата и контролния щам (-ове) и се прилага процедурата за ELISA теста. (раздел III.3). ELISA стойностите от теста за културата и положителната контрола трябва да бъдат равни.

тест PCR

Изготвя се суспензия с 10^6 клетки/ml от културата и контролния щам (-ове) и се прилага процедурата за PCR теста (раздел III.4). Културата и положителната контрола трябва да имат един и същ размер на PCR продукта и еднаква структура при рестриктазно-ензимния анализ (REA).

Флуоресцентна in-situ хибридизация (FISH)

Изготвя се суспензия с 10^6 клетки/ml от културата и контролния щам(-ове). При ага се прилага процедурата за FISH (van Beuningen *et al*, 1995) с PCR праймер OLI-1 (Seal *et al*, 1993). Културата и положителната контрола трябва да дадат еднаква реакция.

Протеинов профил

Протеини от денатурирани цели клетки се разделят чрез електрофореза в полиакриламиден гел - PAGE (Stead, 1992a)

Мастнокиселинен профил (FAP)

Изготвя се посевка от културата и щам за положителна контрола върху соев агар и се инкубира 48 часа при 28°C, след което се прилага процедурата за FAP. (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead, 1992b). Профилът на културата трябва да бъде идентичен с този на положителната култура. При описаните условия, характерните мастни киселини са 14:0 3ОН, 16:0 2ОН, 16:1 2ОН и 18:1 2ОН.

4.2 Определяне на щама

Определянето на щама не е задължително, но се препоръчва за всеки нов случай чрез използване на поне някое от следните:

Определяне на биоварианта

Ralstonia solanacearum се разделя на биоварианти въз основа на способността да произвежда киселина от три хексозни алкохола и три въглехидрата (Hayward, 1964 & 1994):

Използване на:	Биовариант				
	1	2	3	4	5
- малтоза	-	+	+	-	+
- лактоза	-	+	+	-	+
- целобиоза	-	+	+	-	+
- манитол	-	-	+	+	+
- сорбитол	-	-	+	+	-
- дулцитол	-	-	+	+	-

Допълнителни тестове разграничават биовариант 2 на субфенотипове (Hayward, 1994)

	Биовариант 2	Биовариант 2-А	Биовариант 2-Т
използване на трехалоза	-	+	+
използване на инозитол	+	-	+
използване на D-рибоза	-	-	+
пектолитична активност	ниска	ниска	висока

Определяне на расата

Расата (Buddenhagen *et al.*, 1962) може да бъде определена въз основа на тест за патогенност в домати растения или патладжани и в тютюневи растения и чрез тест за реакция на свръхчувствителност (HR) в тютюневи листа (Lozano и Sequeira, 1970):

Реакция в:	Раса (*)		
	1	2	3
- домати растения/патладжани	изсъхване	няма реакция	изсъхване
- тютюневи растения	изсъхване	няма реакция	няма реакция
- тютюневи листа	некроза (48 h) и изсъхване (7 – 8 дни)	HR (12 – 24 h)	хлороза (2 – 8 дни)
(*) Раса 4 (патогенна за джинджифил и няколко други гостоприемника) и раса 5 (патогенна само за черница) не са включени.			

Определянето на расата чрез теста за патогенност или теста за тютюнева свръхчувствителност може да не е много сигурно и вместо това за нея може да се съди по биоварианта и първоначалния естествен гостоприемник.

Освен това, културата може да бъде характеризирана чрез:

Типизиране на генома

Молекулно разграничаване на щамове в комплекс от *Ralstonia solanacearum* може да се направи чрез:

RFLP анализ (Cook *et al.*, 1989)

PCR за серийни последователности [REP-, ERIC- & BOX-PCR (Louws *et al*, 1995; Smith *et al*, 1995)]

4.3 Тест за патогенност

Тестът служи за потвърждаване на диагнозата и оценка на вирулентността на културите, идентифицирани като *Ralstonia solanacearum*

Изготвя се ваксина с 10^6 клетки/ml от културата и щам служещ като положителна контрола. Заразяват се 5 – 10 доматени растения или патладжани на стадий трети същински лист, за предпочитане, или по-възрастни (Раздел III.6). Инкубира се до две седмици при 22°C - 28 °C и висока относителна влажност с ежедневно напояване. Наблюдава се за изсъхване и/или епинастия, хлороза, спиране на растежа.

Изолират се растения със симптоми, както следва:

- Отстранява се парче тъкан от стеблото два cm над мястото на заразяване.

- Раздробява се и се суспендира в малко количество стерилна дестилирана вода или 50 mM фосфатен буфер. След това се извършват посевки, инкубират се и се проверяват за типични колонии на *Ralstonia solanacearum*.

РАЗДЕЛ III

ОТКРИВАНЕ И ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА *RALSTONIA SOLANACEARUM* В ПРОБИ ОТ КАРТОФОВИ КЛУБЕНИ

Забележка: Стандартният размер на пробата е 200 клубена. Независимо от това, процедурата може да бъде приложена и за проби с по-малко от 200 клубена.

1. Подготовка на пробата за изследване

Забележка: Полученият при тази процедура гранулиран картофов екстракт може също да бъде използван за откриване на *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*.

При необходимост, преди теста :

(i) се инкубира пробата при 25 – 30°C до две седмици, за стимулиране на размножаването на малобройните популации на *Ralstonia solanacearum*.

(ii) измиват се клубените под течаща вода с подходящи дезинфектанти и детергенти и клубените се изсушават на въздух.

1.1 С чист и дезинфекциран скалпел или нож за зеленчуци се отстранява обвивката при края на столоната на клубена, така че първо да се видят васкуларните тъкани. Внимателно се изрязва малка конична сърцевина (диаметър 3 – 5 mm) от васкуларната тъкан при края на столоната. Запазва се колкото може по-малко количество непроводяща тъкан. Всеки от клубените се обработва в пробата.

Забележка: Визуалният оглед на клубените (раздел II.1) може да се направи на този етап. Отделят се всички клубени със симптоми или напреднало гниене и се изследват отделно (раздел II.).

1.2 Столоновите краища се събират в затворен съд. За предпочитане е столоновите краища да се обработят незабавно. Ако не е възможно, се съхраняват ги за не повече от 24 часа или при 4°C за не повече от 72 часа

1.3 Столоновите краища се обработват по някоя от следните процедури

(i) Столоновите краища се прехвърлят в подходящ съд.

Добавя се достатъчно количество мацериращ буфер (приложение 2), за да се покрият столоновите краища.

Раздробяват се столоновите краища в Waring Blender или Ultra Thurrax докато се постигне пълно хомогенизиране. Трябва да се избягва прекомерното хомогенизиране.

Мацератът се оставя да кисне 15 – 30 минути.

(ii) Столоновите краища се прехвърлят в подходящ съд.

Добавя се достатъчно количество мацериращ буфер, за да се покрият столоновите краища.

Съдът се поставя в ротативен вибратор.

Инкубира се при 50 – 100 оборота за минута в продължение на 4 часа при 20 – 22 °C или 16 – 24 часа при 4°C.

(iii) Столоновите се прехвърлят краища в здрава торба за мацериране за еднократна употреба (напр. торба Stomacher, с размери 105 mm x 105 mm, стерилизирана чрез облъчване).

Столоновите краища се смачкват внимателно с подходящ инструмент, напр. чук, докато се постигне пълно хомогенизиране.

Добавя се достатъчно количество мацериращ буфер, за да се покрият столоновите краища.

Мацератът се оставя да престои 15 – 30 минути.

1.4 Бактериите се извличат от обработените столоновите краища чрез някоя от следните процедури:

(i) Отлива се внимателно мацерата в центрофужна епруветка, оставяйки късчетата в съда или торбата. Ако отлетият мацерат е мътен, се центрофугира при не повече от 180 g за 10 минути при температура под 10°C.

Центрофугира се отлетия мацерат, или супернатанта от първото центрофугиране при 7000 g за 15 минути или 10000 g за 10 минути при температура под 10°C.

Изхвърля се супернатанта без да повреждате гранулата.

(ii) Филтрира се мацерата през филтрационна система с размер на порите 40 – 100 µm. Ускорява се филтрацията с вакуумна помпа.

Филтратът се събира в центрофужна епруветка.

Филтърът се измива с мацериращ буфер.

Филтратът се центрофугира при 7000 g за 15 минути или 10000 g за 10 минути при температура под 10°C.

Изхвърля се супернатанта без да се поврежда гранулата.

1.5 Суспендира се повторно гранулата в 1 ml буфер за гранули (приложение 2).

Разделя се на две равни части и се прехвърля всяка в малко шишенце.

За изследване се използва едно шишенце. Запазва се остатъкът от този екстракт при 4°C докато трае изследването.

Добавят се 10 – 25% (обемно/обемен) стерилен глицерол към другото шишенце. Разклаща се кръгообразно и се съхранява при -18°C (седмици) или при -70 °C (месеци).

2. Имунофлуоресцентен тест (IF)

Използва се антисерум за *Ralstonia solanacearum*, за предпочитане срещу раса 3/ биовариант 2. Титърът се определя върху суспензия от 10⁶ клетки/ml от хомоложен щам на *Ralstonia solanacearum* с подходящо разреждане на флуоресцеин-изотиоцианатния

(FITC) конюгат, в съответствие с препоръките на производителя. Непречистеният антисерум трябва да има титър поне 1:2000.

Използват се многокладенчови предметни стъкла, за предпочитане с 10 прозорчета с диаметър най-малко 6 mm.

Контролът от FITC-конюгат се поставя върху всяко предметно стъкло. Тестът трябва да се повтори с включване на контрола от PBS, ако се наблюдават положително реагиращи клетки във FITC контролата.

Подготвят се отделни предметни стъкла с положителни контроли от суспензия с 10^6 клетки/ml от щам на подходяща раса/биовариант на *Ralstonia solanacearum*. Използва се едно предметно стъкло за всяка серия проби.

2.1 Предметните стъкла се подготвят с пробите по някоя от следните процедури:

(i) За гранули с относително малко скорбяла:

Отпипетира се отмерено стандартно количество (15 μ l е подходящо за прозорчета с диаметър 6 mm – за по-големи прозорчета се увеличава количеството) от повторно суспендираната гранула върху един ред прозорчета. Другият ред може да бъде използван за повтаряне на същата или за втора проба, както е представено на фиг. 1.

(ii) За други гранули:

Приготвят се десетократни разреждания, т.е. 1/10, 1/100 и 1/1000 от повторно суспендираната гранула в буфер за гранули. Отпипетира се отмерено стандартно количество (15 μ l е подходящо за прозорчета с диаметър 6 mm – за по-големи прозорчета увеличете количеството) от повторно суспендираната гранули и всяко разреждане върху един ред прозорчета. Другият ред може да бъде използван за повтаряне на същата или за втора проба, както е представено на фиг. 2.

2.2 Капчиците се оставят да изсъхнат. Бактериалните клетки се фиксират към предметното стъкло чрез загряване, на пламък или с 95% етанол.

2.3 IF процедура

(i) В съответствие с начина на подготовка на предметните стъкла с пробите в 2.1 (i):

Изготвя се серия двукратни разреждания на антисерума в IF буфер (приложение 3):

$\frac{1}{4}$ от титъра (T/4), $\frac{1}{2}$ от титъра (T/2), титъра (T) и два пъти титъра (2T).

(ii) В съответствие с начина на подготовка на предметните стъкла с пробите в 2.1 (ii):

Изготвя се работния разтвор (WD) на антисерума в IF буфер. Работният разтвор представлява разреждане на антисерума с оптимална специфичност, като обикновено е половината от титъра.

Фиг 1

Подготовка на предметното стъкло с пробите в съответствие с 2.1(i) и 2.3(i)

Едно стандартно разреждане на повторно суспендираната гранула

T = титър

	FITC	T/4	T/2	T	2T	⇒ Двукратни разреждания на антисерума
Проба 1	• 1	• 2	• 3	• 4	• 5	
Повтаряне на проба 1 или проба 2	• 6	• 7	• 8	• 9	• 10	

Фиг 2

Подготовка на предметното стъкло с пробите в съответствие с 2.1(ii) и 2.3(ii)

	FITC	Стандартно разреждане на антисерума				
	Неразред ен	Неразред ен	1/10	1/100	1/1000	⇒ Десетични разреждания на повторно суспендираната гранула
Проба 1	• 1	• 2	• 3	• 4	• 5	

Повтаряне на
проба 1 или

• 6

• 7

• 8

• 9

• 10

проба 2

2.3.1 Предметните стъкла се подреждат върху влажна книжна салфетка.

Прозорчетата с пробите с разреждането (разрежданията) на антисерума се покриват. PBS върху прозорчетата се поставя FITC. Количеството на прибавения върху прозорчетата антисерум трябва да бъде еднакво с количеството на поставения екстракт.

2.3.2 Инкубира се под похлупак за 30 минути при стайна температура.

2.3.3 Изтръскват се капчиците антисерум от предметното стъкло и се изплакват внимателно в IF буфер. Промива се в IF-Твин-буфер за 5 минути и след това в IF буфер за 5 минути (приложение 3). Внимателно се отстранява излишната влага.

2.3.4 Предметните стъкла се подреждат върху влажна филтърна хартия. Прозорчетата с пробите се покриват и прозорчето с FITC с разтвора от FITC-конюгата, използван за определяне на титъра. Количеството на прибавения върху прозорчетата конюгат трябва да бъде еднакво с количеството на поставения антисерум.

2.3.5 Инкубира се под похлупак за 30 минути при стайна температура.

2.3.6 Изтръскват се капчиците конюгат от предметното стъкло. Изплакват се и се промиват както преди (2.3.3). Внимателно се отстранява излишната влага.

2.3.7 Отпипетират се 5 – 10 µl 0,1 M глицерол във фосфатен буфер (приложение 3) или подобен обемозаместител върху всяко прозорче и поставете покривно стъкло.

2.4 Отчитане на IF тест

Предметните стъкла с пробите се разглеждат под епифлуоресцентен микроскоп с филтри подходящи за възбуждане на FITC под маслена имерсия и увеличение 500 – 1000.

Прозорчетата се преглеждат на кръст през два диаметъра, включващи прав ъгъл и по периферията.

Проверява се първо предметното стъкло с положителната контрола. Клетките трябва да бъдат ярко флуоресцентни и напълно оцветени. *Забележка: Тестът трябва да се повтори, ако оцветяването е нетипично.*

Пробите се отчитат върху предметните стъкла. Наблюдава се първо за отсъствие на флуоресциращи клетки в прозорчетата с FITC-контролата. Флуоресциращи клетки в прозорчетата с FITC-контролата означават неспецифично свързване на конюгата, автофлуоресценция или замърсяване. *Забележка: Ако това се наблюдава, тестът се повтаря.*

Наблюдава се за ярко флуоресциращи клетки с характерна за *Ralstonia solanacearum* морфология в прозорчетата с пробите. Интензивността на флуоресценцията трябва да е еднаква с тази на щама, който служи за положителна контрола, при същото разреждане на антисерума. Клетките с непълно оцветяване или слаба флуоресценция не трябва да се вземат под внимание, освен ако няма много такива клетки (вж. тълкуване на резултатите от IF тест).

Тълкуване на резултатите от IF тест:

(i) Ако не се открият клетки с ярка флуоресценция и характерна морфология, то IF тест е отрицателен.

(ii) Ако се открият клетки с ярка флуоресценция и характерна морфология, се определя средния брой клетки за зрително поле и се изчислява броя клетки (N) за ml от повторно суспендираната гранула. (приложение 4).

Популация от приблизително 10^3 клетки/ml от повторно суспендираната гранула се счита за границата за откриване при IF тест,

- за проби с $N > 10^3$ клетки/ml от повторно суспендираната гранула, IF тест се счита за положителен,

- за проби с $N > 10^3$ клетки/ml от повторно суспендираната топчица, IF тест може да се счита за положителен.

(iii) Ако се наблюдават голям брой ($>10^3$ клетки/ml) непълно или слабо флуоресциращи клетки при титъра на антисерума, трябва да се извърши втори тест:

- или тест на базата на различен биологичен принцип, или
- повторен IF тест, с втори антисерум или с десетократно разреждане на топчицата.

3. ELISA тест

По Robinson-Smith *et al*, 1995

Използва се антисерум за *Ralstonia solanacearum*, за предпочитане срещу раса 3/биовариант 2. Титърът се определя върху суспензия от 10^6 клетки/ml от хомоложен щам на *Ralstonia solanacearum*

Препоръчва се използването на микротитърни плаки NUNC-Polysorb.

Включва се отрицателна контрола от картофов екстракт и контрола от физиологичен разтвор с фосфатен буфер (PBS).

Използва се суспензия с $>10^6$ клетки/ml от щам на подходяща раса/биовариант на *Ralstonia solanacearum* като положителната контрола. Тества се по същия начин както пробата(-ите), но добре отделени от пробите върху микротитърната плака.

3.1 Отпипетират се 100 – 200 μ l от повторно суспендираната гранула в малко шишенце.

Загрява се 4 минути на 100°C. Шишенцето се премества върху лед.

3.2 Добавя се същото количество покриващ карбонатен буфер с двойна сила (приложение 5) и се разклаща кръгообразно.

3.3 Поставят по 100 μ l във всяко от най-малко две кладенчета в микротитърната плака. Инкубира се 1 час при 37 °C или една нощ при 4 °C.

3.4 С лек удар се отделят екстрактите от кладенчетата. Кладенчетата се промиват три пъти с PBS-Твин (приложение 5), като се задържа последният промиващ разтвор в кладенчетата най-малко пет минути.

3.5 Изготвят се съответните разреждания на антисерума срещу *Ralstonia solanacearum* в блокиращ буфер (приложение 5). В кладенчетата се поставят 100 µl от разтвора на антисерума.

Инкубира се един час при 37 °C.

3.6 С лек удар се отделя антисерумът от кладенчетата. Кладенчетата се промиват както е указано по-горе (3.4).

3.7 Изготвят се съответните разреждания на алкално-фосфатазния конюгат в блокиращ буфер (приложение 5) и в кладенчетата се поставят 100 µl от разтвора на конюгата.

Инкубира се един час при 37 °C.

3.8 С лек удар се отделя конюгата от кладенчетата. Кладенчетата се промиват както е указано по-горе (3.4 и 3.6).

3.9 Изготвя се разтвора на алкално-фосфатазния субстрат (приложение 5). В кладенчетата се поставят 100 µl. Инкубира се 30 минути до един час на тъмно при стайна температура.

3.10 Отчета се абсорбцията при 409 nm.

Тълкуване на ELISA теста:

ELISA тестът е отрицателен, ако оптичната плътност (OD) на пробата е < 2хOD на отрицателната контрола.

ELISA тестът е положителен, ако оптичната плътност (OD) на пробата е > 2хOD на отрицателната контрола.

4. PCR тест

По Seal *et al.*, 1993

Забележка: По време на всички етапи от подготовката на пробите и други манипулации включващи PCR, трябва да се използват връхчета за пипети с филтри.

Изготвя се суспензия с 10^6 клетки/ml от шам на *Ralstonia solanacearum* раса 3/биовариант 2 като положителната контрола. Тества се по същия начин както пробата(-ите).

4.1 Отпипетират се 100 μ l от повторно суспендираната гранула в малко шишенце или се прехвърлят 90 μ l от повторно суспендираната гранула в малко шишенце, съдържащо 10 μ l 0,5M NaOH. Разбърква се, като шишенцето се обръща многократно.

4.2 Загрява се 4 минути при 100°C. Шишенцето се премества незабавно върху лед.

4.3 Изготвя се най-малко две десетократни разреждания, напр. 1/10 и 1/100 или повече, ако е необходимо, в стерилна дестилирана или свръхчиста вода (UPW).

4.4 Изготвя се сместа за реакцията PCR (приложение 6) в стерилно шишенце, като се прибавят следните компоненти в следния ред:

За 50 μ l обем на реакцията:

Компонент	Количество	Крайна концентрация
стерилна дестилирана вода или UPW	30,8 μ l – 33,8 μ l	
10 x PCR буфер	5,0 μ l	1x
d-АТФ	1,0 μ l	0,2 mM
d-ЦТФ	1,0 μ l	0,2 mM
d-ГТФ	1,0 μ l	0,2 mM
d-ТТФ	1,0 μ l	0,2 mM
OLI-1 праймер (20 μ M)	2,5 μ l	1 μ M

Y-2 праймер (20 μ M)	2,5 μ l	1 μ M
Таг-полимераза (5 U/ μ l)	0,2 μ l	1,0 U
Общ обем	45 μ l – 48 μ l	

За повече реакции:

Изчислява се количеството на всеки компонент за необходимия брой реакции.

Компонентите се смесват и се прехвърлят 45 μ l – 48 μ l от сместа в стерилни шишенца за PCR.

Шишенцата със сместа се съхраняват за PCR реакцията върху лед.

За 25 μ l обем на реакцията:

Компонентите се намаляват пропорционално.

4.5 PCR увеличаване

4.5.1 По желание: Шишенцата със сварената проба и положителната контрола се центрофугират.

В указания ред, се прибавят 2 – 5 μ l от пробата(-ите), водна контрола и положителна контрола към шишенцата със сместа за PCR реакцията. Шишенцата се поставят в загряващия блок на ДНК-термосайклера.

4.5.2 Стартира се следната програма:

1 цикъл от:

(i) 2 минути при 96°C: денатурация на структурата

50 цикъла от :

(ii) 20 секунди при 94°C: денатурация

(iii) 20 секунди при 68°C: свързване на праймерите

(iv) 30 секунди при 72°C: удължаване на копието

1 цикъл от:

(v) 10 минути при 72°C: последващо удължаване

1 цикъл от:

(vi) задържане при 4°C

Забележка: Тези параметри са за Perkin Elmer 9600. Други термосайклери може да изискват слой от минерално масло в шишенцата за PCR реакцията и/или промяна в продължителността на стъпки (ii), (iii) и (iv) и профилът за увеличаване.

4.5.3 Шишенцата се отстраняват от термосайклера. Анализира се PCR продукта. Ако не се извърши незабавно, шишенцата се съхраняват при 4°C, за употреба в същия ден или при -18°C за по-дълъг период.

4.6 Анализ на PCR продукта

PCR фрагментите се откриват чрез електрофореза в агарозен гел и оцветяване с етидиев бромид.

4.6.1 Подготвя се подходящ агарозен гел, като внимателно се загрява агарозата до завиране в трис-ацетат-електрофорезов (ТАЕ) буфер.

4.6.2 Разтопената агароза се охлажда до 50 – 60 °C и се излива във формата на уреда за електрофореза и пъхнете гребена. Разтворът се оставя да се втвърди.

4.6.3 Отстранява се гребена. Гелът се потапя в трис-ацетат-електрофорезовия буфер, така че да се покрие (2 – 3 mm) с буфера.

4.6.4 Поставят се капчици по 3 µl от зареден буфер върху парафилм. Добавят се по 12 µl PCR продукт от пробите, от положителната или водната контрола и смесете чрез леко всмукване във върха на пипетата преди да заредите. Дадените обеми могат да бъдат променени, в зависимост от вместимостта на кладенчетата в агарозния гел.

4.6.5 Зареждат се кладенчетата на гела. Като еталон се включва подходящ ДНК маркер в поне едно от кладенчетата.

4.6.6 Проводниците на електрическото захранване се свързват с уреда за електрофореза. Герът се стартира при 5 – 8 V/cm докато предната част на индикатора за проследяване достигне на 1 cm от края на гела.

4.6.7 Изключва се електрическото захранване и се разкачват проводниците от уреда за електрофореза.

Внимателно се отстранява гелът И се потапя в разтвор на етидиев бромид за 30 – 45 минути.

Забележка: Използват се ръкавици за еднократна употреба по време на работа с етидиев бромид, който е мощен мутаген!

4.6.8 Просветлява се в дестилирана вода за 10 – 15 минути.

4.6.9 Увеличените ДНК фрагмент (-и) се наблюдават при УВ осветление. PCR продуктът на *Ralstonia solanacearum* с комплект праймери OLI-1 и Y-2 е с дължина 288 bp. Сравнява се с ДНК маркера и с положителната контрола.

Забележка: Водната контрола трябва да е отрицателна при всички случаи. Ако е положителна, повторете теста.

4.6.10 Фотографира се гела, ако се изисква постоянен регистър.

4.6.11 Достоверността на увеличените фрагменти се потвърждава чрез рестриктазно-ензимен анализ (REA).

4.7 Рестриктазно-ензимен анализ (REA)

4.7.1 Прехвърля се 8,5 µl от PCR продукта (4.5.3) в ново шишенце. Добавя се 1 µl от 10x ензимен буфер и 0,5 µl от рестриктазния ензим *Ava II*.

4.7.2 Смесва се чрез леко всмукване във върха на пипетата. Ако останат капки върху стените на шишенцето се обработва в микроцентрофуга. Инкубира се един час при 37°C.

4.7.3 Разградените PCR фрагменти се анализират чрез електрофореза в агарозен гел както преди (4.6).

Тълкуване на резултатите от PCR теста:

PCR тестът е отрицателен, ако не се открие характерния 288 bp фрагмент, а фрагментът е открит в положителната контрола от щам на *Ralstonia solanacearum*.

PCR тестът е положителен, ако се открие 288 bp фрагмент и рестриктазно-ензимният анализ на увеличения фрагмент е идентичен с положителната контрола от щам на *Ralstonia solanacearum*.

5. Тест в селективни блюда

По Elphinstone *et al.*, 1996

5.1 Тестът се провежда чрез подходящата техника за посевка от разреждания, напр.:

(i) Приготвят се най.малко две десетократни разреждания, т.е. 1/10, 1/100 или повече, ако сметнете за необходимо, от повторно суспендираната гранула в буфер за гранули. Отпипетира се отмерено стандартно количество (50 – 100 µl) от повторно суспендираната гранула и от всяко разреждане върху модифицирана селективна среда SMSA (приложение 7) и се разстила със стъклена пръчица върху цялата повърхност на средата. Ако е необходимо, същото се извършва с разтвора на повторно суспендираната гранула резки с 10 µl уху. Обгаря се ухото между резките.

(ii) Отмерено стандартно количество (50 – 100 µl) от повторно суспендираната топчица се прехвърля върху модифицирана селективна среда SMSA и се разстила със стъклена пръчица върху цялата повърхност на средата. Правят се резки с пръчицата, без да се обгарят, върху поне две други модифицирани SMSA среди.

5.2 По същата техника за посевка от разреждания се нанася суспензия от 10^6 клетки/ml от вирулентен щам раса 3/биовариант 2 на *Ralstonia solanacearum* като положителна контрола върху серия от отделни модифицирани SMSA среди.

5.3 Посевките се инкубират при 28°C. Посевките се отчитат след три дни. Ако са отрицателни се инкубират допълнително до шест дни. Колониите на вирулентните изолати от *Ralstonia solanacearum* са млечно-бели, плоски, неправилни и разлети с кървавочервено оцветяване в центъра и показващи резки или извивки във вътрешността.

5.4 Колониите с характерна морфология се пречистват чрез рекултивиране върху обикновени хранителни среди. (приложение 1).

5.5 Идентифицират се чисти култури (раздел II, 4.1) и се доказват култури на *Ralstonia solanacearum* чрез тест за патогенност (раздел II, 4.3).

Тълкуване на резултатите от теста в селективни блюда:

Тестът в селективни блюда е отрицателен, ако след шест дни не се изолират никакви бактериални колонии или не се изолират никакви колонии характерни за *Ralstonia solanacearum*, при условие, че не се очаква инхибиране от колонии на други бактерии и колониите характерни за *Ralstonia solanacearum* се откриват в положителните контроли.

Тестът в селективни блюда е положителен, ако се изолират колонии характерни за *Ralstonia solanacearum*.

6. Биологичен тест

По Janse, 1988.

6.1 Използват се 10 опитни растения от възприемчиви стръкчета домати или патладжан на стадий трети същински лист за всяка проба. Опитните растения не се поливат 24 часа преди заразяването.

6.2 Разпределят се 100 µl от повторно суспендираната топчица между опитните растения. Стеблата между котиледоните се заразяват и на едно или повече други места.

6.3 Заразяват се по същия начин 10 стръкчета със суспензия от 10^6 клетки/ml от вирулентен щам биовариант 2/раса 3 на *Ralstonia solanacearum* като положителна

контрола и с буфер за гранули като отрицателна контрола. Растенията на положителната контрола се отделят от останалите растения за да се избегне кръстосаното замърсяване.

6.4 Опитните растения се отглеждат до четвъртата седмица при 22°C - 28°C и висока относителна влажност с ежедневно поливане. Наблюдава се за изсъхване, епинастия, хлороза, и/или спиране на растежа.

6.5 Изолират се от заразените растения (раздел II). Идентифицират се чисти култури с характерна морфология (раздел II.4.1) и се потвърждават култури на *Ralstonia solanacearum* чрез тест за патогенност (раздел II.4.3).

6.6 Ако е необходимо се проверява за липса на инфекция в групи от опитни растения, които не показват никакви признаци на инфекция. Отстраняват се от всяко опитно растение участък от стеблото с големина 1 cm от два сантиметра над мястото на заразяване. тъканите се хомогенизират в мацериращ буфер. Изготвят се посевки от разреждания (раздел III.5.1) Ако са положителни, се идентифицират чисти култури с характерна морфология (раздел II.4.1) и се потвърждават култури на *Ralstonia solanacearum* чрез тест за патогенност (раздел II.4.3).

Тълкуване на резултатите от биологичния тест:

Биологичният тест е отрицателен, ако опитните растения не са инфектирани с *Ralstonia solanacearum* и при условие, че *Ralstonia solanacearum* е открита в положителните контроли.

Биологичният тест е положителен, ако опитните растения са инфектирани с *Ralstonia solanacearum*.

7. Обогатителен тест

По Elphinstone et al., 1996

7.1 Прехвърлят се 100 µl от повторно суспендираната гранула в 3 ml от модифициран бульон SMSA (приложение 7)

7.2 Инкубират се 48 часа и в никакъв случай повече от 72 часа при 28°C с разхлабена тапа на епруветката за проветряване.

7.3 Тапата се затяга и съдът се разклаща кръгообразно. Разделя се по равно за IF тест (този раздел, 2), ELISA тест (този раздел, 3) и/или PCR тест (този раздел, 4).

8. Тест за патогенност

Отнесете се към раздел II.4.3.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Хранителни среди за изолиране и култивиране на *Ralstonia solanacearum*

Хранителен агар (NA)

Хранителен агар (Difco)	23 g
-------------------------	------

Дестилирана вода	1 литър
------------------	---------

Приготвя по ½ литър от средата в еднолитрови колби

Съставките се разтварят

Стерилизира се чрез автоклавиране при 121°C за 15 min

Охлажда се до 50 °C и се разлива в блюда.

Дрождено-пептонно-глюкозен агар (YPGA)

Дрождев екстракт (Difco)	5 g
--------------------------	-----

Бакто пептон (Difco)	5 g
----------------------	-----

D(+) глюкоза (монохидрат)	10 g
---------------------------	------

Бакто агар (Difco)	15 g
--------------------	------

Дестилирана вода	1 l
------------------	-----

Приготвя се по ½ литър от средата в еднолитрови колби

Съставките се разтварят

Стерилизира се чрез автоклавиране при 121°C за 15 min

Охлажда се до 50 °C и се разлива в блюда.

Захарно-пептонен агар (SPA)

Захар	20 g
-------	------

Пептон	5 g
--------	-----

K ₂ HPO ₄	0,5 g
---------------------------------	-------

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
--------------------------------------	--------

Бакто агар (Difco)	15 g
--------------------	------

Дестилирана вода	1 l
------------------	-----

Приготвя се по ½ литър от средата в еднолитрови колби

Съставките се разтварят

Стерилизира се чрез автоклавиране при 121°C за 15 min

Охлажда се до 50 °C и се разлива в блюда.

Тетразолна среда на Келман

Казамино киселини (Difco)	1 g
---------------------------	-----

Бакто пептон (Difco)	10 g
----------------------	------

Декстроза	5 g
-----------	-----

Бакто агар (Difco)	15 g
--------------------	------

Дестилирана вода	1 литър
------------------	---------

Приготвя се по ½ литър от средата в еднолитрови колби.

Съставките се разтварят. Стерилизира се чрез автоклавиране при 121°C за 15 min.

Охлажда се до 50 °C.

Добавя се воден разтвор на трифенил тетразолиев хлорид (Sigma) стерилизиран чрез филтриране, за да получите крайна концентрация 50 mg/l.

Разлива се в блюда.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Материали за подготовка на пробите

Мацериращ буфер: 50 mM фосфатен буфер, pH 7,0

Този буфер се използва за размекване на тъканите.

Na_2HPO_4	4,26 g
---------------------------	--------

KH_2PO_4	2,72 g
--------------------------	--------

Дестилирана вода	1 литър
------------------	---------

Съставките се разтварят и си проверява pH. Разделя се на равни части, както е уместно.

Стерилизира се чрез автоклавиране при 121°C за 15 min.

Когато се извършва директен PCR тест, се препоръчва добавянето на 5% поливинилпиролидон-40000 MWT (PVP-40), за да се намалят случаите на инхибиране на увеличаването от ароматни молекули в екстракта.

Добавянето на противоутаечно средство, противопенест агент или антиоксидант се препоръчва, когато се използва процедура за хомогенизация Waring Blender или Ultra Turrax за размекване на сърцевини от картофова тъкан.

Люспи луброл	0,5 g/l
--------------	---------

DC силиконов противопенест агент	1,0 ml/l
----------------------------------	----------

Тетранатриев пирофосфат	1,0 g/l
-------------------------	---------

Автоклавира се поотделно и се добавя до желаната концентрация.

Буфер за гранули: 10 mM фосфатен буфер, pH 7,2

Този буфер се използва за повторно суспендиране и разреждане на картофови столони и гранули.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2,7 g
---	-------

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,4 g
--	-------

Дестилирана вода	1 литър
------------------	---------

Съставките се разтварят и се проверява рН. Разделя се на равни части, както е уместно.

Стерилизира се чрез автоклавиране при 121°C за 15 min.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Материали за IF теста

IF буфер: 10 mM физиологичен разтвор с фосфатен буфер (PBS), pH 7,2

Този буфер се използва за разреждане на антисерумите.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	2,7 g
--	-------

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,4 g
---	-------

NaCl	8,0 g
---------------	-------

Дестилирана вода	1 литър
------------------	---------

Съставките се разтварят и се проверява pH. Разделя се на равни части, както е уместно.

Стерилизира се чрез автоклавиране при 121°C за 15 min.

IF-Твин-буфер

Този буфер се използва за промиване на предметните стъкла. Добавете 0,1 % твин-20 към IF буфера.

0,1 M глицерол с фосфатен буфер pH 7,6

Този буфер се използва като обемозаместителна течност върху прозорчетата на IF предметно стъкло, за да се усили флуоресценцията.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	3,2 g
--	-------

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,15 g
Глицерол	50 ml
Дестилирана вода	100 ml

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Определяне степента на замърсяване в IF тест

Повърхност (S) на прозорчето при многоместното предметно стъкло

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

където D = диаметъра на прозорчето (1)

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

Повърхност (s) на зрителното поле

където d = диаметъра на полето (2)

Изчислява се d или чрез директно измерване или чрез следната формула: (3)

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

където i = коефициент на полето (зависи от типа на очуляра и варира от 8 до 24),

K = коефициент на тубуса (1 или 1,25),

G = увеличение от 100x, 40x и т.н. на обектива.

от (2)

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

(4)

от (3)

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

Преброяват се типично флуоресциращи клетки в поле (с).

Изчислява се броя типично флуоресциращи клетки за прозорче (C).

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

Изчислява се броя типично флуоресциращи клетки в ml за гранулата (N)

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

където y = обема на гранулата в прозорче,

F = фактор за разреждане на гранулата.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Материали за ELISA теста

Покриващ карбонатен буфер с двойна сила, pH 9,6

Na_2CO_3	6,36 g
NaHCO_3	11,72 g
Дестилирана вода	1 литър

Съставките се разтварят и се проверява pH. Разделя се на равни части, както е уместно.

Стерилизира се чрез автоклавиране при 121°C за 15 min.

Ако екстрактът съдържа висок фактор ароматни молекули, като антиоксидант може да бъде добавен натриев сулфит с крайна концентрация 0,2%.

10 x Физиологичен разтвор с фосфатен буфер (PBS), pH 7,4

NaCl	80 g
KH_2PO_4	2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	29 g

KCl	2 g
-----	-----

Дестилирана вода	1 литър
------------------	---------

Съставките се разтварят и се проверява рН. Разделя се на равни части, както е уместно.

Стерилизира се чрез автоклавиране при 121°C за 15 min.

Физиологичен разтвор с фосфатен буфер-твин (PBS-T)

10 x PBS	100 ml
----------	--------

10% твин-20	5 ml
-------------	------

Дестилирана вода	895 ml
------------------	--------

Блокиращ (антителата) буфер (трябва да бъде прясно приготвен)

10 x PBS	10 ml
----------	-------

Поливинилпиролidon-4400 MWT (PVP-44)	2,0 g
--------------------------------------	-------

10% твин-20	0,5 g
-------------	-------

Мляко на прах	0,5 g
---------------	-------

Дестилирана вода	до 100 ml
------------------	-----------

Разтвор на алкално-фосфатазния субстрат рН 9,8

Диетаноламин 97 ml

Дестилирана вода 800 ml

Смесва се и се коригира до рН 9,8 с концентрирана НСl.

Долива се до един литър с дестилирана вода.

Добавя се 0,2 g MgCl_2 .

Разтварят се по две таблетки от фосфатазния субстрат по 5 mg (Sigma) на 15 ml от разтвора.

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

Материали за PCR теста

Олигонуклеотидна последователност на праймерите

Праймер OLI-1 5''-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3''

Праймер Y-2 5''-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3''

За материали вж. Seal *et al* (1993)

ПРИЛОЖЕНИЕ 7

Материали за тестовете върху селективни и обогатителни среди

Селективна среда SMSA (Engelbrecht, 1994, модифицирана по Elphinstone *et al.*, 1996), но се премахва агарът и тетразолиевите соли.

Основна среда

Аминокиселини (Difco)	1 g
Бакто пептон (Difco)	10 g
Глицерол	5 ml
Агар (Difco)	15 g
Дестилирана вода	1 литър

Приготвя се по ½ литър от средата в еднолитрови колби.

Съставките се разтварят и се проверява рН. Кorigира се рН, ако е необходимо, до 6,5 преди да автоклавиране. *Ralstonia solanacearum* не дава добър растеж върху среда с рН>7,0. Стерилизира се чрез автоклавиране при 121°C за 15 min.

Охлажда се до 50 °C.

Добавят се следните съставки (всички от Sigma), за получаване определените крайни концентрации:

Кристал виолет	5 mg/l		
Полимиксинов В сулфат	100 mg/l	(приблизително 600 000 единици)	Sigma P-1004

Бацитрацин (*)	25 mg/l (приблизително 1 250 единици)	Sigma B-0125
Хлорамфеникол	5 mg/l	Sigma C-3175
Пеницилин-G	0,5 mg/l (приблизително 825 единици)	Sigma P-3032
Тетразолиеве соли	50 mg/l	

Съставките се разтварят в 70% етанол до дадените концентрации за обема на приготвената среда.

Някои съставки, напр. полимиксин В и хлорамфеникол изискват леко затопляне и разклащане.

Хранителна среда SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996)

Приготвя се както селективната среда SMSA, но се премахва агарът.

Разпределят се наравни количества от по 3 ml в 30 ml универсални епруветки за еднократна употреба .

* Ако е необходимо, увеличаването на концентрацията на бацитрацина до 300 ppm може да намали замърсяването със сапрофитни бактерии без да се намали възстановяването на *Ralstonia solanacearum*.

Литература

Buddenhagen, I.W.; Sequeira, L. и Kelman, A. 1962. Описание на расите на *Pseudomonas solanacearum*. *Фитопатология* 52, 726

Cook, D.; Elizabeth B. и Sequeira L., 1989. Генетично разнообразие на *Pseudomonas solanacearum*: откриване на полиморфизмът в дължината на рестриктазните фрагменти с ДНК-сонди, които определят вирулентността и свръхчувствителния отговор. *Молекулни растително-микробни взаимодействия* 2, 113 – 121.

Dinesen I.G. и DeBoer, S.H. 1995. Извличане на *Clavibacter michiganensis subsp. Sepeidonicus* от смесени проби на картофиви клубени. *Американско списание за картофите* 72, 133 – 142.

Elphinstone, J.G.; Hennessy, J.; Wilson, J. и Stead, D.E. 1996. Чувствителност на различни методи за откриване на *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith в екстракти от картофиви клубени. *EPPO Бюлетин* 26.

Engelbrecht, M.C. 1994. Модифициране на полу-селективна среда за изолирането и количественото определяне на *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith. *ACIAR бюлетин Бактериално изсъхване* 10, 3 – 5.

Hayward, A.C. 1964. Отличителни черти на *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith *Списание за приложна бактериология* 27, 265 – 277.

Hayward, A.C. 1994. Систематика и филогенеза на *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith и сродни бактерии. Във: *Бактериално изсъхване: заболяването и неговият причинител, Pseudomonas solanacearum* (eds. A.C.Hayward и G.L.Hartman) CAB International Oxford, 127-135.

Janse, J.D. 1988. Метод за откриване на *Pseudomonas solanacearum* при картофиви клубени без симптоми и някои данни относно неговата чувствителност и специфичност. *EPPO Бюлетин* 18, 343 - 351.

Janse, J.D. 1991. Под- и вътревидова класификация на щамове на *Pseudomonas solanacearum* , чрез анализ на мастни киселини от цели клетки. *Систематична и приложна микробиология* 14, 335 – 345.

Kelman, A. 1954. Връзката между патогенност и вид на колонииите върху тетразолна среда при *Pseudomonas solanacearum*. *Фитопатология* 64, 293 – 695.

Lelliot, R.A. и Stead, D.E., 1987. *Методи за диагностицирането на бактериални заболявания при растения.* (T.F.Preece ed.) Научни публикации Блекуел, Оксфорд 216.

Louws, F.J.; Fulbright, D.W.; Stephens, C.T. и De Bruijn, F.J., 1995.

Диференциране на геномна структура чрез PCR типизиране за бързо класифициране на *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Фитопатология* 85, 528 – 536.

Lozano, J.C. и Sequeira, L., 1970. Диференциране на раси от *Pseudomonas solanacearum* чрез техника за листова инфилтрация. *Фитопатология* 60, 838.

Mirza, M.S.; Rademaker, J.W.L.; Janse, J.D. и Akkermans, A.D.L. 1993, Олигонуклеотидна сонда срещу *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*, насочена срещу специфична 16S рибозомна РНК. *Канадско списание за микробиология* 39, 1029 - 1034.

Robinson-Smith, A.; Jones, P.; Elphinstone, J.G. и Forde, S.M.D., 1995. Производство на антитела срещу *Pseudomonas solanacearum*, причинителят на бактериалното изсъхване. *Хранителна и селскостопанска имунология* 7, 67 – 79.

Seal, S.E.; Jackson, L.A.; Young, J.P.W. и Daniels, M.J., 1993. Диференциране на *Pseudomonas solanacearum*, *P. syzygii*, *P. picketti* и бактериите, причиняващи заболявания на кръвта чрез частично секвениране на 16S рРНК: строеж на олигонуклеотидните праймери за чувствително откриване чрез верижно-полимеразна реакция. *Списание за обща микробиология*. 139, 1587 - 1594

Smith, J.J.; Offord, L.C.; Holderness, M. и Saddler, G.S., 1995. Генетичен вариант на *Burkholderia solanacearum* (синоним *Pseudomonas solanacearum*) раса 3 в Кения. *Приложна микробиология и микробиология на околната среда* 61, 4262-4268.

Stead, D.E., 1992a. Техники за откриване и идентифициране на растителни патогенни бактерии. Във: *Техники за бързо откриване на растителни патогени* (eds. J.M.Duncan и L.Torrance). Научни публикации Блекуел, Оксфорд, 76-111.

Stead, D.E., 1992b. Групиране на растителни патогени и някои други видове *Pseudomonas* spp., чрез използване на профили от клетъчни мастни киселини. *Международно списание за систематична бактериология* 42, 281 – 295

Van Beuningen, A.; Derks, H. и Janse J.D., 1995. Откриване и идентифициране на *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* с особено внимание към флуоресцентната *in-situ* хибридизация (FISH), чрез използване на олигонуклеотидна сонда насочена срещу 16S рибозомна РНК. Züchtungsforschung 2, 266 - 269.

ПРИЛОЖЕНИЕ III

1. При всяка подозирана поява, за която е идентифициран положителен резултат в скрининговия тест (-ове), съгласно посочения в приложение II съответен метод за изброения растителен материал, или съгласно който и да е официално одобрен метод, при всички останали случаи, като се очаква потвърждение или отхвърляне при завършване на споменатия метод, трябва да има задържане и подходящо консервиране на:

- където е възможно, партидата, или част от нея (от която е взета пробата) в оригиналната ѝ опаковка с етикет,

- където е възможно, останалата част от пробите,

- всеки останал екстракт и допълнително приготвен материал за скрининговия тест(-ове), напр. предметни стъкла за имунофлуоресценция, и

- цялата съответстваща документация,

до завършване на споменатия метод.

2. В случай на потвърждаване наличието на организма, трябва да има задържане и подходящо консервиране на:

- материала, определен в параграф 1, и

- проба от инфектирания доматиен или патладжанов материал, заразен с екстракта от клубен или растение, по целесъобразност, и

- изолираната култура от организма,

най-малко до един месец след процедурата по уведомяване съгласно член 5, параграф 2.

ПРИЛОЖЕНИЕ IV

Елементите от разследването, посочено в член 5, параграф 1, буква а), (i) включват, по целесъобразност:

(i) места на производство,

- където се отглеждат или са се отглеждали картофи, имащи клонингова връзка с картофи, за които е установено, че са заразени с организма,
- където се отглеждат или са се отглеждали домати, които са от същия източник като домати, за които е установено, че са заразени с организма,
- където се отглеждат или са се отглеждали картофи или домати, които са били поставени под официален контрол, поради подозирана поява на организма,
- където се отглеждат или са се отглеждали картофи, които имат клонингова връзка с картофи, отглеждани в места на производство, за които е установено, че са заразени от организма,
- където се отглеждат картофи или домати, и които са разположени в съседство със заразени места на производство, включително такива места на производство, които използват едни и същи производствени съоръжения и оборудване, пряко или чрез общ контрактор,
- където се използват повърхностни води за напояване или пръскане от всеки източник, за който е потвърдено или се подозира, че е заразен с организма,
- където се използват повърхностни води за напояване или пръскане от източник, който се използва съвместно с места на производство, за които е потвърдено или се подозира, че са заразени с организма,
- които са наводнени или са били наводнявани с повърхностни води, за които е потвърдено или се подозира, че са заразени с организма; и

(ii) повърхностни води, които се използват за напояване или пръскане или които са наводнили полето(-ата) или мястото(-ата) на производство, за които е потвърдено, че са заразени с организма.

ПРИЛОЖЕНИЕ V

1. Елементите при определяне на степента на вероятно замърсяване съгласно член 5, параграф 1, буква а)(iii) и 5, параграф 1, буква в)(iii), включват, по целесъобразност:

- изброения растителен материал, който се отглежда на място на производство, обявено като замърсено съгласно член 5, параграф 1, точка буква а)(ii),
- място (а) на производство, имащо(и) производствена връзка с изброения растителен материал, обозначен като замърсен съгласно член 5, параграф 1, буква а)(ii), включително тези, които използват едни и същи производствени съоръжения и оборудване, пряко или чрез общ контрактор,
- изброения растителен материал, който е произведен на мястото(ата) на производство, посочено в предходния абзац, или който присъства на такова място (а) на производство през периода, когато изброения растителен материал, обозначен като замърсен по член 5, параграф 1, точка буква а)(ii) се е намирал на мястото на производство, посочено в първия абзац,
- складове, където се обработва изброения растителен материал от по-горе споменатите места на производство,
- всяка машина, превозно средство, съд, склад или участъци от тях, и всички други предмети, включително опаковъчен материал, които може да са били в контакт с изброения растителен материал, обозначен като замърсен по член 5, параграф 1, буква а)(ii),
- всеки от изброения растителен материал, който се съхранява във, или в контакт с някоя от структурите или предметите, изброени в предходния абзац, преди почистването и дезинфекцирането на тези структури и предмети,
- като резултат от разследването и изследването съгласно член 5, параграф 1, буква а)(i), при картофите, тези клубени или растения със сестринска или родителска клонингова връзка със, а при домати, тези растения със същия източник като изброения растителен материал, обозначен като замърсен по член 5, параграф 1), буква а)(ii), и за които съществува вероятност от замърсяване по клонингова връзка, въпреки че може да са дали отрицателна проба за организма,
- място (а) на производство на изброения растителен материал, посочени в предходния абзац,

- място (а) на производство на изброения растителен материал, които използват за напояване или пръскане вода, обозначена като замърсена съгласно член 5, параграф 1, буква в)(ii),

- изброения растителен материал, който е произведен на полета, наводнени с повърхностни води, за които е потвърдено, че са заразени с организма.

2. Определянето на възможното разпространение съгласно член 5, параграф 1, буква а)(iv), и член 5, параграф 1, буква в)(iii), включва:

(i) в случаите по член 5, параграф 1, буква а)(iv), вземане под внимание на следните елементи:

- близостта с други места на производство, където се отглежда изброения растителен материал,

- общото производство и използване на сортове картофи за семе,

- места на производство, където се използват повърхностни води за напояване или пръскане на изброения растителен материал, в случаи в които има или е имало риск от оттичане на повърхностни води от, или наводняване на, място(а) на производство, обозначени като замърсени по член 5, параграф 1, буква а)(ii);

(ii) в случаи, когато повърхностни води са били обозначени като замърсени по член 5, параграф 1), буква в)(ii):

- място (а) на производство, където се произвежда изброения растителен материал, в близост до, или изложени на риск от наводняване с повърхностни води, обозначени като замърсени,

- всеки обособен напоителен басейн, който има връзка с повърхностните води, обозначени като замърсени.

3. Подробностите на уведомяването, посочено в алинея първа от член 5, параграф 2, включват:

- датата на докладване за подозираната поява съгласно член 4 и датите на вземане на проби и потвърждаване наличието на организма по член 5, по целесъобразност,

- описание на елементите на обявеното замърсяване и разграничаването на зоната.

4. Подробностите на допълнителното уведомяване, посочено в алинея втора от член 5, параграф 2, включва:

- за всяка обозначена като замърсена пратка или партида от картофи, сертификатите, определени в членове 7 и 8 от Директива 77/93/ЕИО, паспортните или регистрационните номера на производителите на картофите, сборните складове и центрове за експедиране, по целесъобразност,
- за всяка обозначена като замърсена пратка или партида от домати растения, сертификатите, определени в членове 7 и 8 от Директива 77/93/ЕИО и паспортния номер, в съответствие с изброеното в приложение V, Част А, раздел I.2.2 към Директива 77/93/ЕИО,
- видът и категорията на сортовете картофи за семе, и при възможност, във всички останали случаи,
- такава друга информация във връзка с потвърденото огнище, каквато Комисията може да изиска.

ПРИЛОЖЕНИЕ VI

1. Във връзка с член 6, параграф 1, мерките са:

- изгаряне, или
- оползотворяване като храна за животни след термична обработка, така че да няма риск от оцеляване на организма, или
- дълбоко загробване, на място за отпадъци, където няма риск от стичане към

селскостопанска земя или контакт с водоизточници, които могат да бъдат използвани за напояване на селскостопанска земя, или

- промишлена преработка чрез директна и незабавна доставка до преработваща фабрика с официално одобрени съоръжения за отстраняване на отпадъци, които отговарят на разпоредбите, установени в приложение VII към настоящата директива, или
- други мерки, при условие, че е доказано, че няма установен риск от разпространение на организма; Комисията и останалите държави-членки следва незабавно да бъдат уведомени за такива мерки.

2. Подходящо оползотворяване или депониране на изброения растителен материал, посочен в член 6, параграф 2, под контрола на отговорните официални органи на засегнатите държави-членки, с подходящата връзка между отговорните официални органи, за да се гарантира такъв контрол по всяко време и одобрение от отговорния официален орган на държавата-членка, в която картофите ще се пакетират или обработват във връзка със съоръженията за отстраняване на отпадъци, посочени в първия и втория абзац, е:

(i) за картофови клубени,

- оползотворяване като картофени продукти, предназначени за консумация и пакетирани на места с подходящи съоръжения за отстраняване на отпадъци, готови за директна доставка и употреба без повторно пакетиране и предназначени за такава директна доставка и употреба, или

- оползотворяване като картофени продукти, предназначени за промишлена преработка и предназначени за директна и незабавна доставка до преработващата фабрика с подходящи съоръжения за отстраняване на отпадъци, или

- друг вид оползотворяване или депониране, при условие, че е доказано, че няма установен риск от разпространение на организма и подлежащо на одобрение от споменатите отговорни официални органи. Комисията и останалите държави-членки следва незабавно да бъдат уведомени за такива мерки.

(ii) за други растителни части, включващи парчета от стебла и листа,

- унищожаване, или

- друг вид оползотворяване или депониране, при условие, че е доказано, че няма установен риск от разпространение на организма; Комисията и останалите държави-членки следва незабавно да бъдат уведомени за такива мерки.

3. Подходящите методи за обеззаразяване на обектите, споменати в член 6, параграф 3), са почистване и, при необходимост дезинфекция, така че да няма установен риск от разпространение на организма, които се извършват под надзора на отговорните официални органи на държавите-членки.

4. Поредицата от мерки, които държавите-членки трябва да осъществят в рамките на разграничената(-ите) зона(и), установени съгласно член 5, параграф 1, буква а)(iv) и буква в)(iii) и посочени в член 6, параграф 4, включва:

4.1 В случаи, когато местата на производство са обозначени като замърсени по член 5, параграф 1, буква а)(ii):

а) в поле или участък за производство на защитени култури, обозначени като замърсени съгласно член 5, параграф 1, буква а)(ii), или

(i) в продължение на поне четири години на производство след обявеното замърсяване,

- се вземат мерки за отстраняване на самораслите картофови и домати растения, както и други растения гостоприемници за организма, включително плевели по картофите, и

- не се засаждат следните:

- картофови клубени или растения,
- домати растения и семена,
- вземайки предвид биологията на организма,
- други растения-гостоприемници,

- растения от вида Brassica, при които има установен риск от оцеляване на организма,

- култури, за които има установен риск от разпространяване на организма;

- през първия сезон на производство на картофи или домати след периода, определен в предходния абзац, и при условие, че в полето не са установени саморасли картофови и домати растения и други растения-гостоприемници, включително плевели по картофите, за период поне две последователни години на производство преди засаждането,

- при картофи, засаждат се официално сертифицирани картофи за семе, единствено за стокова продукция, и

- се провежда официално обследване, включващо изследване, съгласно описаното в член 2, параграф 1,

- през сезона на производство на картофи или домати, който следва посочения в предходния абзац и като се съблюдава подходящ цикъл на редуване, при картофите се засажда официално сертифицирано картофово семе, или за производство на семе, или за стокова продукция, а при картофи и домати, се извършва официално обследване, съгласно описаното в член 2, параграф 1; или

(ii) в продължение на петте години на производство, след тази на обявеното замърсяване,

- се вземат мерки за отстраняване на самораслите картофови и домати растения, както и други растения-гостоприемници за организма, включително плевели по картофите, и

- през първите три години полето се установява и поддържа или незасято, или засято с житни култури, в съответствие с установения риск, или като постоянно пасище с често щателно косене или интензивна паша, или като трева за производство на семе, последвано през следващите две години от засаждане на растения, които не са гостоприемници за организма, за които няма установен риск от оцеляване или разпространяване на организма,

- през първия сезон за производство на картофи или домати след периода, описан в предходния абзац,

- при картофите, засажда се официално сертифицирано картофово семе, за производство на семе или стокова продукция,

и се провежда официално обследване, включващо изследване, съгласно описаното в член 2, параграф 1;

б) в други полета:

- през годината на производство след обявеното замърсяване:

- не се засаждат картофови клубени и растения, или други растения-гостоприемници за организма и се вземат мерки за отстраняване на самораслите картофови и домати растения и други растения-гостоприемници, включително картофови плевели, при необходимост, или

- при картофовите клубени, може да се засажда официално сертифицирано картофово семе, предназначено единствено за стокова продукция, при условие, че отговорните официални органи са убедени, че са елиминирани рисковете от саморасли картофови и домати растения и други растения-гостоприемници, включително картофови плевели. Растящата култура се наблюдава през подходящи интервали и самораслите картофови растения се изследват за организма; освен това, при картофите, се преглеждат прибраните като реколта клубени;

- за първата година на производство след описаната в първия абзац,

- при картофите, засажда се само официално сертифицирано картофово семе, предназначено за посев или за стокова продукция,

- през минимум втората година на производство след тази от първия абзац,

- при картофите, засажда се само официално сертифицирано картофово семе или такова, получено под официален контрол от официално сертифицирано картофово семе, предназначено за посев или за стокова продукция,

- през всяка от годините на производство, посочени в предходните абзаци, се вземат мерки за отстраняване на самораслите картофови и домати растения и други растения-гостоприемници, включително картофови плевели, и се извършва официално обследване, съгласно описаното в член 2, параграф 1, като в случаите, когато се засажда картофово семе за производство на посевен материал, се извършва изследване на клубените;

в) незабавно след обозначаването на замърсяване съгласно член 5, параграф 1, буква а)(ii) и през всяка от следващите години на производство до първия разрешен сезон, включително, за отглеждане на картофи и домати върху полето(-ата) обозначени като замърсени, съгласно посоченото в параграф 1:

- всички машини и съоръжения за съхранение на мястото на производство, които са включени в производството на картофи или домати, се почистват и, при необходимост, дезинфекцират чрез използване на подходящи методи, определени в точка 3,

- въвежда се официален контрол върху програмите за напояване и пръскане, включващ забрана на същите, при необходимост, с цел да се предотврати разпространението на организма;

г) в участък за производство на защитени култури, обозначен като замърсена по член 5, параграф 1, буква а)(ii), когато е възможна пълна замяна на средата за отглеждане,

- не се засаждат никакви картофови клубени или растения, или други растения-гостоприемници за организма, включително домати растения и семена, освен ако споменатият участък не е била подложен на мерки под официален надзор за унищожаване на организма и отстраняване на всякакъв материал от растения-гостоприемници, включващи поне пълна подмяна на средата за отглеждане, почистване и, при необходимост, дезинфекция на споменатия участък и цялото оборудване, и впоследствие е дадено одобрение от отговорните официални органи за отглеждане на картофи и домати, и

- при производството на картофи, това производство е от официално сертифицирано картофово семе, или от мини-клубени или микро-растения, произхождащи от проверени източници,

- въвежда се официален контрол върху програмите за напояване и пръскане, включващ забрана на същите, при необходимост, с цел да се предотврати разпространението на организма.

4.2 В рамките на разграничената зона без да се накърняват мерките, посочени в 4.1, държавите-членки:

а) незабавно, и в продължение на минимум три години на производство, след обявеното замърсяване:

(aa) в случаи, когато разграничената зона е определена съгласно член 5, параграф 1, буква а)(iv),

- осигуряват надзор от техните отговорни официални органи върху местата за отглеждане, складиране или обработване на картофови клубени или домати, заедно с местата, които работят с машини за производство на картофи или домати по договор,

- изискват почистване и, при необходимост, дезинфекция на машините и складовете на такива места, с използване на подходящи методи, съгласно определеното в точка 3,

- изискват засаждането само на сертифицирано семе или семе, получено под официален контрол за всички картофови култури в рамките на тази зона, и извършване на изследване след прибиране на реколтата от картофови култури за посев, отглеждани в места на производство, определени като вероятно замърсени съгласно член 5, параграф 1, буква а)(iii),

- изискват отделно обработване на прибраната реколта от сортове картофи за семе и тези за стокова продукция върху всички места в рамките на зоната,

- извършват официално обследване, съгласно предвиденото в член 2, параграф 1,

(ав) в случаи, когато повърхностни води са обозначени като замърсени съгласно член 5, параграф 1, буква в)(ii) или включени в елементите за възможно разпространение на организма в съответствие с приложение V, точка 2,

- извършват ежегодно обследване през подходящи интервали от време, включващо вземане на проби от повърхностни води и подходящи картофови растения-

гостоприемници в съответните водоизточници и извършване на изследване в съответствие със:

- съответния метод, определен в приложение II, за изброения растителен материал, или

- всеки друг официално одобрен метод, в останалите случаи,

- въвеждат официален контрол върху програмите за напояване и пръскане, включително забрана върху използването на вода, обявена за замърсена, за напояването и пръскането на изброения растителен материал и, при необходимост, на други растения-гостоприемници, с цел да се предотврати разпространението на организма. Тази забрана може да се преразглежда на базата на резултатите, получени при споменатото ежегодно обследване,

- в случаи, когато са замърсени отпадъчни води, въвеждат официален контрол върху изхвърлянето на отпадъци от промишлена преработка или предприятия за пакетиране, които обработват изброения растителен материал;

в) създават програма, при необходимост, за подмяна на всички сортове картофи за семе в течение на подходящ период от време.

ПРИЛОЖЕНИЕ VII

Официално одобрените съоръжения за отстраняване на отпадъци, посочени в приложение VI, параграф 1, четвърти абзац, съответстват на следните разпоредби, така че да се избегне рискът от разпространение на организма:

(i) отпадъци от преработка на картофи и домати (включително бракувани картофи, обелки и домати) и всякакви други твърди отпадъци от картофите и домати, се депонират чрез,

- дълбоко заграбване на място за отпадъци, където няма риск от просмукване и стичане към селскостопанска земя или от контакт с водоизточници, които могат да се използват за напояване на селскостопанска земя. Отпадъците се превозват директно до мястото при условия на ограничаване, така че да няма риск от загуба на отпадъците, или

- изгаряне;

(ii) отпадъчни води от преработка: преди депониране, отпадъчни води съдържащи суспендирани твърди частици се подлагат на процес на филтриране или отлежаване, за да се премахнат тези твърди частици. Тези твърди частици се депонират съгласно начина, определен в алинея (i).

Впоследствие отпадъчните води:

- се загряват до минимум 70°C в продължение на най-малко 30 минути, преди депониране, или

- се депонират по друг начин, който подлежи на официално одобрение и се извършва под официален контрол, така че да няма риск отпадъците да влязат в контакт със селскостопанска земя или водоизточници, които могат да се използват за напояване на селскостопанска земя. Комисията и останалите държави-членки се уведомяват за подробностите по това.