

Disposició final primera. *Facultat de desplegament i aplicació.*

Es faculta el ministre d'Agricultura, Pesca i Alimentació per dictar, en l'àmbit de la seva competència, les mesures que calgui per al desplegament i el compliment d'aquest Reial decret.

Disposició final segona. *Entrada en vigor.*

Aquest Reial decret entra en vigor l'endemà de la publicació en el «Butlletí Oficial de l'Estat».

Madrid, 22 d'octubre de 1999.

JUAN CARLOS R.

El ministre d'Agricultura,  
Pesca i Alimentació,  
JESÚS POSADA MORENO

**21483** REIAL DECRET 1644/1999, de 22 d'octubre, sobre el control de l'organisme nociu denominat *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. («BOE» 265, de 5-11-1999.)

L'organisme nociu *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., conegut anteriorment per *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, és causa de les malalties de la «podridura bruna» en els tubercles de patata i de la «mustiguesa bacteriana» a les plantes de patata, tomàquet i altres espècies de solanàcies, i representa una amenaça greu per a les produccions d'aquests cultius.

Atès que en els últims anys hi han hagut brots d'aquestes malalties en algunes parts de la Comunitat Europea i que encara hi subsisteixen alguns focus d'infecció aïllats, i en particular respecte a Espanya se n'han produït algunes intercepcions a Castella i Lleó i Galícia, i que aquest bacteri és present amb una distribució localitzada a l'illa de La Palma a les Canàries; considerant la importància econòmica d'aquests productes vegetals; i tenint en compte que el coneixement actual de la biologia i l'epidemiologia de *Ralstonia solanacearum* en les condicions europees és incomplet i que es pot preveure la necessitat de revisar en el futur les mesures i els procediments d'anàlisi establerts aquí, cal adoptar les mesures mínimes necessàries que preveu la Directiva 98/57/CE del Consell, de 20 de juliol de 1998, sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. mitjançant el programa corresponent d'eradicació i control, sens perjudici que s'adoptin les mesures addicionals més estrictes que siguin necessàries.

En conseqüència, mitjançant aquest Reial decret, s'incorpora a l'ordenament intern la Directiva 98/57/CE, del Consell, de 20 de juliol, d'acord amb les competències que atribueix a l'Estat amb caràcter exclusiu l'article 149.1.13a de la Constitució espanyola en matèria de bases i coordinació de la planificació general de l'activitat econòmica.

En l'elaboració d'aquesta disposició han estat consultades les comunitats autònomes i els sectors afectats.

En virtut d'això, a proposta del ministre d'Agricultura, Pesca i Alimentació, amb l'informe previ del ministre d'Administracions Públiques, d'acord amb el Consell d'Estat, i amb la deliberació prèvia en el Consell de Ministres del dia 22 d'octubre de 1999,

DISPOSO:

Article 1. *Objecte.*

Aquesta disposició estableix el programa d'eradicació i control de l'organisme *Ralstonia solanacearum* (Smith)

Yabuuchi et al., anteriorment denominat *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith (denominat d'ara endavant «l'organisme») d'acord amb l'article 12 del Reial decret 1190/1998, de 12 de juny, pel qual es regulen els programes nacionals d'eradicació o control d'organismes nocius dels vegetals que encara no estan establerts en el territori nacional, amb la finalitat que, pel que fa a les plantes hoste de l'organisme indicades en la secció I de l'annex I d'aquest Reial decret (denominades d'ara endavant «el material vegetal indicat»), s'adoptin les mesures necessàries per:

- localitzar l'organisme i determinar-ne la distribució;
- impedir-ne l'aparició i la propagació; i
- en cas que aparegui, evitar-ne la propagació i controlar-lo amb vista a la seva eradicació.

2. Es declaren d'utilitat pública les mesures que preveu aquest Reial decret, de conformitat amb el que estableix el Reial decret 1190/1998.

Article 2. *Àmbit d'aplicació i vigència del programa.*

1. El programa que s'aprova i les mesures que en dimanen són aplicables en tot el territori nacional.

2. Mentre la Comissió de les Comunitats Europees no es pronuncii sobre això, la durada del programa es preveu il·limitada. En tot moment, i com a conseqüència de la situació de la malaltia, el Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació pot introduir les modificacions que consideri necessàries o determinar-ne la conclusió.

Article 3. *Exàmens oficials.*

1. Els organismes oficials responsables de cada comunitat autònoma, als quals fa referència l'article 11.2 b) del Reial decret 2071/1993, de 26 de novembre, relatiu a les mesures de protecció contra la introducció i la difusió, en el territori nacional i de la Comunitat Europea, d'organismes nocius per als vegetals o els productes vegetals; així com per a l'exportació i el tràfic cap a països tercers i l'òrgan competent de la Comunitat Autònoma de les Canàries, han de portar a terme anualment exàmens oficials sistemàtics per detectar la possible presència de l'organisme en el material vegetal indicat originari del seu territori.

Amb l'objecte de determinar altres possibles fonts de contaminació existents per al cultiu del material vegetal indicat, els organismes oficials responsables de cada comunitat autònoma han de portar a terme una avaluació de risc i, llevat que no s'hagi detectat cap risc de propagació durant l'esmentada avaluació, han d'efectuar, en les zones productores d'aquest material, exàmens oficials orientats específicament a la detecció de l'organisme en plantes diferents d'aquell material, incloses les solanàcies silvestres hoste, així com en les aigües de superfície que s'utilitzin per regar aquest material i en els residus líquids abocats per les instal·lacions industrials de transformació o d'embalatge en què es manipuli el material indicat i que s'utilitzin per regar el material vegetal indicat. L'extensió d'aquests exàmens orientats es determina en funció del risc observat.

Els organismes oficials responsables de cada comunitat autònoma també poden fer exàmens oficials destinats a la detecció de l'organisme en altres materials, com el medi de cultiu, el sòl i els residus sòlids procedents de les instal·lacions industrials de transformació o d'embalatge.

2. Els exàmens oficials que preveu l'apartat 1 de l'article 3 s'han d'efectuar:

- en el cas del material vegetal indicat, d'acord amb les normes que estableix el punt 1 de la secció II de l'annex I d'aquest Reial decret; i,

b) en el cas de les plantes hoste de l'organisme diferents del material vegetal indicat i en el de les aigües, inclosos els residus líquids, aplicant mètodes apropiats i, quan sigui procedent, prenent mostres i sotmetent-les a anàlisis de laboratori oficials o sota supervisió oficial;

c) quan sigui escaient, en el cas d'altres materials, utilitzant mètodes adequats.

Per dur a terme els exàmens, els detalls dels procediments d'inspecció i el nombre, l'origen i la classificació de les mostres així com el calendari de la recollida, els han de decidir els organismes oficials responsables de cada comunitat autònoma sobre la base de principis científics i estadístics sòlids i la biologia de l'organisme i tenint en compte, segons la regió de què es tracti, els sistemes concrets que s'utilitzin per a la producció del material vegetal indicat i, si s'escau, altres plantes hoste de l'organisme.

3. Els detalls i els resultats dels exàmens oficials que preveu l'apartat 1 de l'article 3 han de ser notificats al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació, i aquest, al seu torn, per mitjà de la via corresponent, als altres estats membres i a la Comissió Europea cada any, seguint, a aquest efecte, les disposicions del punt 2 de la secció II de l'annex I d'aquest Reial decret. Aquestes notificacions s'han de presentar, com a molt tard, el 15 de maig, excepte en el cas de les patates utilitzades per a sembra en la mateixa explotació, que s'han de presentar, com a molt tard, el 15 d'agost. Els detalls i els resultats relatius als cultius s'han de referir a la producció de l'any anterior.

#### Article 4. *Obligació de notificació.*

Els productors, els magatzems col·lectius i els centres d'expedició dels materials que preveu la secció I de l'annex I d'aquest Reial decret han de notificar immediatament als organismes oficials responsables de cada comunitat autònoma, en què estiguin situades les seves parcel·les o els seus establiments, l'aparició sospitosa o la presència confirmada de l'organisme en el material que produeixi o comercialitzi.

#### Article 5. *Mesures cautelars.*

1. En tots els casos de sospita de brot, els organismes oficials responsables de cada comunitat autònoma afectada han de vetllar per la realització d'anàlisis de laboratori oficials o sota supervisió oficial en els quals s'apliqui, per al material vegetal indicat, el mètode pertinent que estableix l'annex II i en les condicions que determina el punt 1 de l'annex III d'aquest Reial decret o, en tots els altres casos, qualsevol altre mètode aprovat oficialment que permeti confirmar o esvair la sospita en qüestió. En cas de confirmació, són aplicables els requisits que disposa el punt 2 de l'annex III d'aquest Reial decret.

2. A l'espera de la confirmació o la dissipació de la sospita a què es refereix l'apartat 1 de l'article 5, en tots els casos en què:

- i) s'hagin observat símptomes de les malalties causades per l'organisme i s'hagin obtingut resultats positius en la prova o les proves de detecció ràpida que preveuen el punt 1 de la secció I i el punt 1 de la secció II de l'annex II d'aquest Reial decret; o
- ii) s'hagi obtingut un resultat positiu en la prova o les proves de detecció que preveuen el punt 2 de la secció I i la secció III de l'annex II d'aquest Reial decret.

Els organismes oficials responsables de cada comunitat autònoma, pel que fa a la producció pròpia:

- a) han de prohibir la circulació de les plantes i els tubercles de tots els cultius, els lots o les partides dels

quals s'hagin pres les mostres, llevat que la circulació tingui lloc sota el seu control i sempre que s'hagi comprovat que no hi ha cap risc identificable de propagació de l'organisme;

- b) han de prendre les mesures necessàries per descobrir l'origen del presumpte brot;

- c) han d'establir, especialment pel que fa a la producció del material vegetal indicat i al moviment de lots de patata d'una sembra diferents dels esmentats en la lletra a), produïts en el lloc de producció dels quals s'hagin obtingut les mostres esmentades en la lletra a), mesures preventives complementàries que, sobre la base del nivell de risc estimat, siguin adequades per prevenir qualsevol propagació de l'organisme.

3. En els casos de sospita de brot en què hi hagi un risc de contaminació del material vegetal indicat o de les aigües de superfície que procedeixin o es dirigeixin a una altra o unes altres comunitats autònomes o, si s'escau, a un altre Estat membre, la comunitat autònoma en què s'hagi observat el presumpte brot ha d'informar immediatament el Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació dels detalls d'aquest brot i del nivell de risc identificat perquè aquest, al seu torn, per mitjà de la via corresponent, informi les comunitats autònomes o els estats membres afectats, i aquestes comunitats autònomes han de cooperar en conseqüència. Les comunitats autònomes a les quals s'informi així han d'aplicar mesures preventives d'acord amb el que disposa la lletra c) de l'apartat 2 de l'article 5 i han de prendre qualsevol altra mesura adequada d'acord amb el que disposen els apartats 1 i 2 del mateix article.

#### Article 6. *Confirmació de la presència de l'organisme.*

1. Si la presència de l'organisme en una mostra, presa en compliment d'aquest Reial decret, és confirmada per anàlisis de laboratori oficials o sota supervisió oficial en què s'utilitzi, per al material vegetal indicat, el mètode que estableix l'annex II d'aquest Reial decret o, per a tots els altres casos, qualsevol altre mètode oficialment aprovat, els organismes oficials responsables de cada comunitat autònoma, sobre la base, a aquest efecte, de principis científics sòlids, de la biologia de l'organisme i dels sistemes concrets de producció, comercialització i transformació que s'utilitzin en el seu territori per a les plantes hoste de l'organisme, han d'adoptar les mesures següents:

- a) en el cas del material vegetal indicat:
  - i) han d'emprendre una investigació per determinar l'àbast i la font o les fonts primàries de la contaminació, d'acord amb les disposicions de l'annex IV d'aquest Reial decret i efectuar noves anàlisis, d'acord amb l'apartat 1 de l'article 4, com a mínim, en totes les existències de patata de sembra relacionades clònicament;
  - ii) han de declarar contaminats el material vegetal indicat, la partida o el lot dels quals s'hagi pres la mostra, així com la maquinària, el vehicle, la nau, el magatzem, o les seves unitats, i qualsevol altre objecte, inclòs el material d'embalatge, que hagi estat en contacte amb el material vegetal indicat al qual pertany la mostra presa; així mateix, han de declarar contaminats, si s'escau, el camp o els camps, la unitat o les unitats de producció de cultius protegits i el lloc o els llocs de producció en què s'hagi fet la collita del material vegetal indicat i dels quals procedeixi la mostra; a més a més, en cas de les mostres preses durant la fase de cultiu, han de declarar contaminats el camp o els camps, el lloc o els llocs de producció i, si escau, la unitat o les unitats de producció de cultius protegits dels quals s'hagi pres la mostra;
  - iii) han de determinar, d'acord amb les disposicions del punt 1 de l'annex V d'aquest Reial decret, l'àbast

de la contaminació que s'hagi produït probablement per contactes anteriors o posteriors a la collita, per nexes en la producció, reg o per relacions clonals amb la contaminació declarada; i

iv) han de delimitar una zona en funció de tres factors: la declaració de contaminació que preveu l'incís ii) anterior, l'abast de la contaminació probable que es determini en el marc de l'incís iii) anterior i la possible propagació de l'organisme, d'acord amb les disposicions de l'incís i) del punt 2 de l'annex V d'aquest Reial decret.

b) en el cas dels cultius de plantes hoste diferents del material esmentat en la lletra a) en què s'hagi identificat un risc per a la producció del material vegetal indicat:

i) han d'emprendre una investigació d'acord amb el que disposa l'incís i) de la lletra a);

ii) han de declarar contaminades les plantes hoste de l'organisme de les quals s'hagi pres la mostra; i

iii) en relació amb la producció del material vegetal indicat, han de determinar l'abast de la contaminació probable i delimitar una zona d'acord amb els incisos iii) i iv) de la lletra a), respectivament.

c) en el cas de les aigües de superfície (inclosos els abocaments de residus líquids procedents d'instal·lacions industrials de transformació o envasament en què es manipuli el material vegetal indicat) i en el de les solanàcies silvestres hoste de l'organisme associades en què, per causa del reg, l'aspersió o la inundació amb aquestes aigües, s'hagi identificat un risc per a la producció del material vegetal indicat:

i) han d'emprendre una investigació per determinar l'abast de la contaminació, i han de fer, en els moments oportuns, un examen oficial de mostres de les aigües de superfície i, si s'escau, de les solanàcies silvestres hoste de l'organisme;

ii) han de procedir, en la mesura que escaigui i sobre la base de la investigació esmentada en l'incís i), a declarar contaminades les aigües de superfície de les quals s'hagin pres la mostra o les mostres; i,

iii) han de determinar l'abast de la contaminació probable i delimitar una zona en funció de la declaració de contaminació que preveu l'incís ii) anterior i de la possible propagació de l'organisme, tenint en compte les disposicions del punt 1 i de l'incís ii) del punt 2 de l'annex V d'aquest Reial decret.

2. D'acord amb les disposicions dels punts 3 i 4 de l'annex V d'aquest Reial decret, les comunitats autònomes han de notificar immediatament el Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació, i aquest, al seu torn, per mitjà de la via corresponent, els altres estats membres i la Comissió Europea, qualsevol cas de contaminació declarada en virtut de l'incís ii) de la lletra a) i de l'incís ii) de la lletra c) de l'apartat 1 de l'article 6, així com les dades relatives a la zona que s'hagi delimitat d'acord amb l'incís iv) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6 i, si s'escau, a l'incís iii) de la lletra c) d'aquell mateix apartat.

3. Com a resultat de la notificació que disposa l'apartat 2 i de les dades que aquesta contingui, les comunitats autònomes afectades han d'emprendre una investigació d'acord amb l'incís i) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6 i, si s'escau, amb l'incís i) de la lletra c) del mateix apartat, i han de prendre les mesures complementàries que siguin adequades d'acord amb els apartats 1 i 2 de l'article 6.

4. Es crea en el Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació un registre de les explotacions, els magatzems col·lectius i els centres d'explotació afectats.

**Article 7. Mesures fitosanitàries que cal adoptar sobre el material contaminat.**

1. Es prohibeix la plantació del material vegetal indicat que s'hagi declarat contaminat en virtut de l'incís ii)

de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6 i, sota el control i l'aprovació dels organismes oficials responsables de cada comunitat autònoma, aquest material ha de ser sotmès a una de les disposicions del punt 1 de l'annex VI d'aquest Reial decret amb la finalitat que es pugui establir que no hi ha cap risc identificable de propagació de l'organisme.

2. Es prohibeix la plantació del material vegetal indicat que, en virtut de l'incís iii) de la lletra a) i de l'incís iii) de la lletra c) de l'apartat 1 de l'article 6, s'hagi considerat probablement contaminat, inclòs el material vegetal indicat respecte del qual s'hagi detectat l'existència d'algun risc, produït en llocs de producció que d'acord amb l'incís iii) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6 s'hagin considerat probablement contaminats, i, sota el control dels organismes oficials responsables de cada comunitat autònoma, l'esmentat material s'ha de destinar a un ús adequat o s'ha d'eliminar d'acord amb el punt 2 de l'annex VI d'aquest Reial decret per tal de que es pugui establir que no hi ha cap risc identificable de propagació de l'organisme.

3. Qualsevol maquinària, vehicle, nau, magatzem o unitats d'aquests i qualsevol altre objecte, inclòs el material d'emballatge, que s'hagi declarat contaminat en virtut de l'incís ii) de la lletra a) i de l'incís iii) de la lletra c) de l'apartat 1 de l'article 6, o que s'hagi considerat probablement contaminat en virtut de l'incís iii) de la lletra a) de l'apartat 1 del mateix article, ha de ser destruït o descontaminat, aplicant-hi els mètodes apropiats, d'acord amb el punt 3 de l'annex VI d'aquest Reial decret. Després de descontaminar-lo, l'objecte deixa de considerar-se contaminat.

4. Sens perjudici de les mesures que es duguin a terme en virtut dels apartats 1, 2 i 3 de l'article 7, a la zona delimitada d'acord amb els incisos iv) de la lletra a) i iii) de la lletra c) de l'apartat 1 de l'article 6 s'han d'aplicar una sèrie de mesures d'acord amb el que disposen els punts 4.1 i 4.2 de l'annex VI d'aquest Reial decret. Cada any s'han de notificar els detalls d'aquestes mesures al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació, i aquest, al seu torn, per mitjà de la via corresponent, als altres estats membres i a la Comissió Europea.

5. Les mesures fitosanitàries ordenades pels organismes oficials responsables de cada comunitat autònoma que preveuen els apartats 1, 2, 3 i 4 de l'article 7, les ha d'aplicar, sota control oficial, el propietari del material afectat.

En cas que els afectats no apliquin en el moment adequat i de la forma escaient les mesures a què es refereix el paràgraf anterior, la comunitat autònoma les ha d'aplicar, amb els seus propis mitjans o mitjançant serveis aliens, carregant les despeses corresponents als interessats, l'import de les quals se'ls pot exigir per la via de constrenyiment, amb independència de les sancions que se'ls puguin imposar.

**Article 8. Mesures aplicables per evitar la contaminació mitjançant patata de sembra.**

1. Les patates de sembra han de complir els requisits del Reial decret 2071/1993 i procedir, en línia directa, de patates que, havent-se obtingut en el marc d'un programa oficialment aprovat, hagin donat resultats negatius quant a la presència de l'organisme en anàlisis oficials o oficialment supervisats en què s'hagi utilitzat el mètode pertinent que estableix l'annex II d'aquest Reial decret.

2. Aquestes anàlisis s'han de fer:

a) en els casos en què s'hagi confirmat la presència de l'organisme en la producció pròpia de patates de sembra,

i) analitzant el material propagat anteriorment, inclosa la selecció clonal inicial i analitzant sistemàticament els clons de patates de sembra de base, o

ii) en els casos en què s'hagi demostrat que no hi ha relació clonal, analitzant tots els clons de patates de sembra de base o el material propagat anteriorment, inclosa la selecció clonal inicial, i

b) en els altres casos, analitzant en cada una de les plantes de la selecció clonal inicial o mostres representatives de les patates de sembra de base o del material propagat anteriorment.

#### Article 9. *Prohibició.*

Es prohibeix la conservació i la manipulació de l'organisme a què es refereix aquest Reial decret.

#### Article 10. *Excepcions amb finalitats científiques.*

Sens perjudici de les disposicions del Reial decret, 2071/1993, es poden autoritzar excepcions al que disposen els articles 7 i 9 d'aquest Reial decret, d'acord amb les normes que estableixen, per efectuar proves i investigacions científiques o estudis en matèria de seleccions de varietats, el Reial decret 401/1996, d'1 de març, pel qual s'estableixen les condicions per a la introducció en el territori nacional de determinats organismes nocius, vegetals, productes vegetals i altres objectes, amb finalitats d'assaig, científiques i per a l'activitat de selecció de varietats, i el Reial decret 39/1998, de 16 de gener, pel qual es modifica el Reial decret 401/1996, d'1 de març, pel qual s'estableixen les condicions per a la introducció en el territori nacional de determinats organismes nocius vegetals, productes vegetals i altres objectes, amb finalitats d'assaig, científiques i per a l'activitat de selecció de varietats.

#### Article 11. *Mesures addicionals.*

1. Els òrgans competents de les comunitats autònomes poden adoptar les mesures complementàries o més estrictes que siguin necessàries per combatre l'organisme o impedir-ne la propagació, sempre que aquestes mesures s'ajustin a les disposicions del Reial decret 2071/1993.

2. Els detalls d'aquestes mesures han de ser notificats al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació, i aquest Ministeri, al seu torn, els ha de notificar, per mitjà de la via corresponent, als altres estats membres i a la Comissió.

#### Article 12. *Indemnitzacions.*

1. S'ha d'aplicar el sistema d'indemnitzacions que preveu l'article 18 del Reial decret 1190/1998, de 12 de juny, pel qual es regulen els programes nacionals d'eradicació o control d'organismes nocius dels vegetals encara no establerts en el territori nacional.

2. No són indemnitzables les despeses ocasionades ni el material vegetal destruït en aplicació d'una mesura oficial, quan el propietari dels vegetals o els productes vegetals afectats hagi incomplert la normativa vigent i, especialment, el que determina el Reial decret 2071/1993, de 26 de novembre, relatiu a les mesures de protecció contra la introducció i la difusió en el territori nacional i de la Comunitat Econòmica Europea d'organismes nocius per als vegetals o els productes vegetals; així com per a l'exportació i el tràfic cap a països tercers.

3. En cas que l'afectat per la contaminació d'un lot subministrat per un productor, un magatzemista o un operador que hagi incomplert el que determina la legislació vigent, percebi una indemnització per part de qualsevol d'aquests subjectes, i per part de l'Administració,

ha de reemborsar a l'Administració la indemnització percebuda.

4. El Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació, dins dels límits establerts per als crèdits disponibles per aquestes finalitats, ha de participar, amb càrrec als seus pressupostos, en la quantia del 50 per 100 de les despeses ocasionades en l'execució del programa.

#### Disposició transitòria única. *Mesures provisionals.*

Mentre no es pronunciï la Comissió Europea i per tal de garantir uns nivells de seguretat comparables entre les diferents comunitats autònomes, es poden adoptar, amb l'informe favorable del Comitè Fitosanitari Nacional:

Els mètodes apropiats per als exàmens i les anàlisis que preveuen les lletres b) i c) del paràgraf primer de l'apartat 2 de l'article 3 i qualsevol precisió dels procediments que preveu el paràgraf segon de l'apartat 2 del article.

Les mesures complementàries que preveu la lletra c) de l'apartat 2 de l'article 5.

Les normes de desplegament de la lletra a) de l'apartat 2 de l'article 8 i les disposicions aplicables a les mostres representatives a què es refereix la lletra b) del mateix apartat i article.

El Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació ha de sol·licitar-ne l'adopció a la Comissió Europea per mitjà de la via que estableix l'article 16 bis de la Directiva 77/93/CEE, del Consell, de 21 de desembre de 1976, relativa a les mesures de protecció contra la introducció en la Comunitat d'organismes nocius per als vegetals o els productes vegetals i contra la seva propagació a l'interior de la Comunitat.

#### Disposició addicional primera. *Comunicació al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació.*

Sens perjudici de les notificacions que estableixen els apartats 3 dels articles 3 i 5, l'apartat 2 de l'article 6 i l'article 11, els òrgans competents de les comunitats autònomes han de comunicar al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació:

a) Els resultats de les investigacions a què es refereix l'apartat 3 de l'article 6 d'aquest Reial decret.

b) Les dades del registre d'explotacions, magatzems col·lectius i centres d'expedició afectats en cada comunitat autònoma.

c) Les mesures fitosanitàries aplicades per les comunitats autònomes a què es refereix l'article 7 d'aquest Reial decret.

d) Les anàlisis que estableix l'article 8 d'aquest Reial decret, efectuades pels òrgans competents de les comunitats autònomes.

#### Disposició addicional segona. *Normativa general aplicable.*

El Reial decret 2071/1993, de 26 de novembre, relatiu a les mesures de protecció contra la introducció en el territori nacional i de la Comunitat Econòmica Europea d'organismes nocius per als vegetals o els productes vegetals, i el Reial decret 1190/1998, de 12 de juny, pel qual es regulen els programes nacionals d'eradicació o control d'organismes nocius dels vegetals encara no establerts en el territori nacional són aplicables sens perjudici de les normes específiques d'aquest Reial decret.

#### Disposició addicional tercera. *Caràcter bàsic.*

El que disposa aquest Reial decret té caràcter de normativa bàsica, a l'empara del que estableix l'article 149.1.13a

de la Constitució, que reserva a l'Estat la competència en matèria de bases i coordinació de la planificació general de l'activitat econòmica.

Disposició final primera. *Facultat de desplegament.*

Es faculta el ministre d'Agricultura, Pesca i Alimentació per dictar, en l'àmbit de les seves competències, les disposicions necessàries per al desplegament i l'aplicació d'aquest Reial decret i, en particular, amb l'informe previ del Comitè Fitosanitari Nacional, les normes provisionals de desplegament de les lletres a) i b) de l'apartat 2 de l'article 8 i, a la vista de l'evolució dels coneixements científics o tècnics, les modificacions que sigui necessari introduir en els annexos d'aquest Reial decret, mentre la Comissió Europea no emeti resolució sobre aquest tema.

Disposició final segona. *Entrada en vigor.*

Aquest Reial decret entra en vigor l'endemà de la publicació en el «Butlletí Oficial de l'Estat».

Madrid, 22 d'octubre de 1999.

JUAN CARLOS R.

El ministre d'Agricultura,  
Pesca i Alimentació,  
JESÚS POSADA MORENO

## ANNEX I

### SECCIÓ I

**Llista de plantes hoste de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* a què es refereix l'article 1**

Plantes (inclosos els tubercles), excepte les llavors verdaderes, de *Solanum tuberosum* L.: Patata.

Plantes, excepte les llavors i els fruits, de *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw.: Tomàquet.

### SECCIÓ II

#### Exàmens

1. Els exàmens oficials que estableix la lletra a) de l'apartat 2 de l'article 3 s'han de basar en la biologia de l'organisme, i també en els sistemes de producció concrets que s'utilitzin en la comunitat autònoma de què es tracti, i han d'incloure el següent:

i) en el cas de les patates:

en els moments oportuns, una inspecció visual del cultiu en creixement, i/o mostres de patates de sembra i d'altres patates durant la fase de creixement o emmagatzemades; aquestes mostres s'han de sotmetre a una inspecció visual oficial o sota supervisió oficial, per la qual cosa s'han de seccionar els tubercles, i

en el cas de les patates de sembra i, si escau, d'altres patates, anàlisis de laboratori oficials o sota supervisió oficial en què s'utilitzi el mètode que estableix l'annex II d'aquest Reial decret;

ii) en el cas dels tomàquets:

en els moments oportuns, una inspecció visual com a mínim del cultiu en creixement de plantes destinades a la replantació per a utilització professional.

2. La notificació dels exàmens oficials que disposa l'apartat 3 de l'article 3 ha d'incloure les dades següents:

i) en el cas dels exàmens de patates:

la superfície total estimada, en hectàrees, dels cultius de patates de sembra i d'altres patates,

la classificació per categories (de sembra i de consum) i, si s'escau, per regions,

la quantitat de mostres preses per a les anàlisis i el moment de la seva recollida,

el nombre d'inspeccions visuals efectuades en el camp,

el nombre d'inspeccions visuals efectuades en tubercles (i la quantitat de mostres);

ii) en el cas dels exàmens, com a mínim del cultiu en creixement de plantes de tomàquet destinades a la replantació per utilització professional:

la quantitat total estimada de plantes,  
el nombre d'inspeccions visuals;

iii) en el cas dels exàmens de plantes hoste d'un organisme diferents de la patata i el tomàquet, incloses les solanàcies silvestres hoste:

l'espècie,  
la quantitat de mostres preses i el moment de la recollida,

la zona o el riu objecte del mostreig, segons escaigui,  
el mètode d'anàlisi;

iv) en el cas dels exàmens d'aigües i dels abocaments de residus líquids procedents de les instal·lacions industrials de transformació o d'embalatge:

la quantitat de mostres preses i el moment de la recollida,

la zona, el riu o la ubicació de la instal·lació objecte del mostreig, segons correspongui,  
el mètode d'anàlisi.

## ANNEX II

**Mètode de diagnòstic, detecció i identificació de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.***

Aquest mètode descriu els diversos procediments involucrats en:

i) el diagnòstic de la podridura bruna en tubercles de patata i de la mustiguessa bacteriana en plantes de patata i de tomàquet;

ii) la detecció de *Ralstonia solanacearum* en mostres de tubercles de patata;

iii) la identificació de *Ralstonia solanacearum*.

En els apèndixs es donen detalls per preparar els materials per a les proves, entre altres, mitjans nutritius, tampons, solucions i reactius.

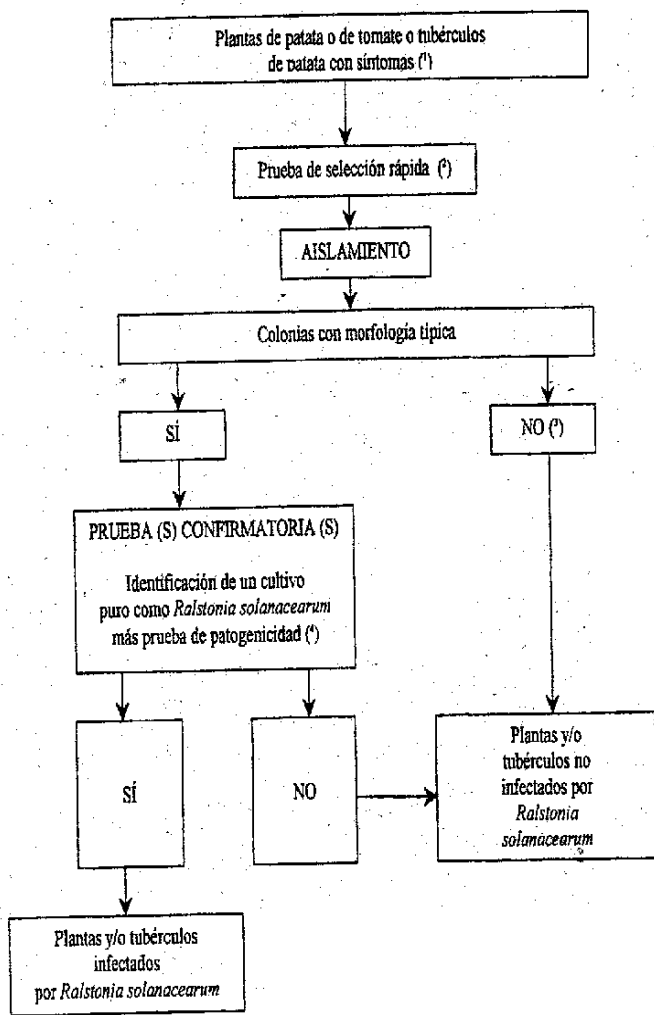
### SECCIÓ I

#### Aplicació del mètode

1. Diagnòstic de la podridura bruna en els tubercles de patata i de la mustiguessa bacteriana en les plantes de patata i de tomàquet:

El procediment d'anàlisi es refereix als tubercles de patata que presenten símptomes típics de la podridura bruna i en les plantes de patata i de tomàquet que presenten símptomes típics o que permeten la sospita de mustiguessa bacteriana, i inclou una prova de selecció ràpida, l'aïllament del patògen del teixit vascular infectat en un medi de cultiu apropiat i, en cas de resultat positiu, la identificació del cultiu com a *Ralstonia solanacearum*.

## Organigrama



## Notes:

(1) La descripció dels símptomes es presenta en el punt 1 de la secció II.

(2) Les proves de selecció ràpida faciliten un diagnòstic presumptiu.

Són proves adequades:

la prova de l'exsudació del teixit vascular de la tija (punt 2 de la secció II),

la prova de detecció de grànuls de poli- $\beta$ -hidroxibutirat (punt 2 de la secció II),

la prova IF (punt 2 de la secció III),

la prova ELISA (punt 3 de la secció III),

la prova PCR (punt 4 de la secció III).

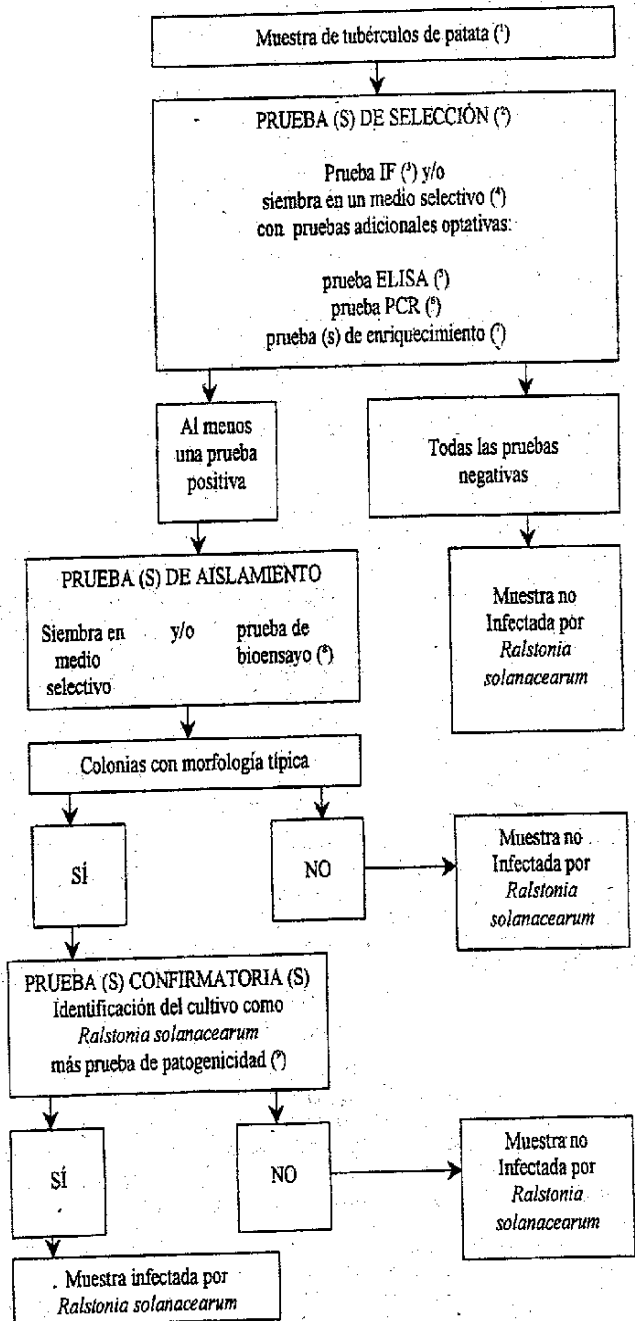
(3) Tot i que l'aïllament del patògen de material vegetal amb símptomes típics és senzill mitjançant la sembra de dilucions, el cultiu pot fallar en estats avançats d'infecció. Els bacteris sapròfits que creixen en el teixit malalt poden emmascarar o inhibir el patògen en el medi d'aïllament. Si l'aïllament és negatiu, però els símptomes de la malaltia són els típics, s'ha de repetir l'aïllament, preferentment utilitzant una sembra en medi selectiu.

(4) La identificació fiable d'un cultiu pur de *Ralstonia solanacearum* s'aconsegueix utilitzant com a mínim una de les proves que s'enumeren en el punt 4.1 de la secció II, en combinació amb una prova de patogenicitat (punt 4.3 de la secció II). La caracterització de la soca és facultativa, tot i que es recomana cada vegada que es presenti un cas nou.

2. Detecció i identificació de *Ralstonia solanacearum* en mostres de tubercles de patata:

El procediment es destina a la detecció d'infeccions latents en tubercles de patata mitjançant una o, preferiblement, diverses proves de selecció que, si són positives, es complementen amb l'aïllament del patògen; en cas d'aïllament de colònies típiques, es procedeix a continuació a la identificació d'un cultiu pur com a *Ralstonia solanacearum*.

## Organigrama



## Notes:

(1) Mida de la mostra: La mida normal de la mostra és de 200 tubercles. No obstant això, el procediment es pot adaptar convenientment per a mostres amb menys de 200 tubercles.

(2) Proves de selecció: És possible que una única prova no sigui prou sensible o fiable per detectar *Ralstonia solanacearum* en una mostra. Per això es recomana

fer més d'una prova i que es basin en principis biològics diferents.

(<sup>3</sup>) Prova d'immunofluorescència (IF): La prova IF és una prova de selecció reconeguda plenament, cosa que suposa un avantatge davant d'altres proves que encara no han estat posades a punt o convalidades completament. La prova es fa servir per a molts altres bacteris, per exemple el *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Els paràmetres de lectura que s'especifiquen en aquest mètode fan que sigui una prova sensible (amb límits de detecció de 10-10 cèl·lules per ml de precipitació en suspensió). Es prefereix el mètode indirecte. El mètode directe es pot aplicar si la prova té un grau de sensibilitat i especificitat equivalent al del mètode indirecte.

El factor crític en què es basa la fiabilitat dels resultats és la qualitat de l'antisèrum. Només és acceptable un antisèrum amb un títol elevat (2000, com a mínim, per a l'antisèrum cru) i totes les proves s'han de fer a la dilució del títol de l'antisèrum o amb una dilució per sota d'aquest.

La prova IF té l'avantatge de la interpretació subjectiva de la morfologia del tenyiment cel·lular i de la intensitat de la fluorescència, que faciliten informació sobre l'especificitat de la reacció. Són freqüents les reaccions creuades produïdes per bacteris serològicament afins, procedents del terra o associats a teixits de la patata, amb una morfologia cel·lular de *Ralstonia solanacearum*. Tot i que la prova IF es pot utilitzar com a única prova de selecció, quan se sospiti que s'han produït reaccions creuades convé efectuar una prova de selecció alternativa basada en principis biològics diferents. En aquests casos la sembra en un medi selectiu és la prova més adequada.

(<sup>4</sup>) Proves de sembra en un medi selectiu: El medi SMSA modificat i el procediment que s'especifica en aquest mètode fan que aquesta sigui una prova sensible i selectiva per a la detecció de *Ralstonia solanacearum*, els resultats de la qual es poden conèixer de tres a sis dies després de la sembra. L'agent patògen s'obté directament en cultiu i es pot identificar fàcilment. Per poder aprofitar plenament el potencial de la prova, cal preparar amb cura les falques per evitar uns altres bacteris associats al tubercle de la patata que competeixen amb *Ralstonia solanacearum* en el medi i poden afectar el desenvolupament de l'agent patògen. Algunes soques poden créixer de manera insuficient, perquè els components del medi poden afectar l'organisme buscat. Així mateix, cal anar amb cura a l'hora de diferenciar *Ralstonia solanacearum* d'altres bacteris que es poden desenvolupar en el medi. Tot i que la sembra en el medi selectiu es pot utilitzar com a única prova de selecció, quan s'obtinguin resultats negatius i se sospiti que s'ha produït una inhibició del creixement de *Ralstonia solanacearum*, a causa de la presència d'altres bacteris en el medi, és convenient fer una segona prova de selecció. En aquest cas, la prova IF és la més apropiada.

(<sup>5</sup>) Prova ELISA: En general, la prova ELISA és menys sensible que la prova IF (límits de detecció: 10-10 cèl·lules per ml de precipitació d'extracte de patata). Es tracta d'una prova barata i ràpida, que, tot i això, pel que fa als resultats, en general està més exposada a donar resultats falsos positius (reaccions creuades) i falsos negatius (inhibició causada per molècules fenòliques presents en l'extracte de patata). L'antisèrum ha de tenir una especificitat molt elevada. La prova ELISA no es pot utilitzar com a única prova de selecció.

(<sup>6</sup>) Prova PCR: Aquesta prova té el potencial necessari per a una gran sensibilitat de detecció, però pot ser inhibida fàcilment per components de l'extracte de planta o tubercle, amb el consegüent resultat fals negatiu. Alguns cultius de patata contenen més inhibidors

que altres, que cal eliminar. La inhibició es pot reduir mitjançant dilució, per bé que amb això també es dilueixen les poblacions de *Ralstonia solanacearum*. Cal anar molt amb compte en totes les fases de preparació de les mostres i de la prova per evitar contaminacions que donarien lloc a resultats positius falsos. També es poden donar resultats falsos positius a causa de seqüències homòlogues d'altres organismes. D'aquí que la prova PCR directa no es pugui utilitzar com a única prova de selecció.

(<sup>7</sup>) Prova d'enriquiment: La incubació de mostres d'extracte de patata en un medi semiselectiu, com el medi SMSA modificat, permet la multiplicació de *Ralstonia solanacearum* i, el que potser és més important, també dilueix els inhibidors potencials de les proves ELISA o PCR. D'aquesta manera, *Ralstonia solanacearum* es pot detectar mitjançant les proves IF, ELISA i PCR en un medi d'enriquiment. No recomanem fer cultius directes a partir del medis enriquits, perquè aquests mètodes d'enriquiment no s'han assajat ni provat a fons. Si s'inclouen aquí és perquè tenen un potencial considerable. No obstant això, a causa de la relativa falta d'experiència que se'n té, no es poden utilitzar com a mètodes de detecció únics.

(<sup>8</sup>) Prova de bioassaig: La prova de bioassaig es fa servir per aïllar *Ralstonia solanacearum* a partir de l'extracte de patates mitjançant l'enriquiment selectiu del bacteri en una planta hoste, i es pot fer en plantes de tomàquet o en albergínies. Exigeix que les condicions d'incubació siguin òptimes, segons s'especifiquen en aquest mètode. Es molt probable que els bacteris inhibidors de *Ralstonia solanacearum* en un medi SMSA no interfereixin en aquesta prova.

(<sup>9</sup>) Proves confirmatòries: La identificació fiable d'un cultiu pur de *Ralstonia solanacearum* s'efectua mitjançant alguna de les proves que s'enumeren en el punt 4.1 de la secció II, en combinació amb una prova de patogenicitat (punt 4.3 de la secció II). Tot i que la caracterització de la soca és optativa, es recomana en cada cas nou.

## SECCIÓ II

### Diagnòstic de la podridura bruna en els tubercles de patata i de la mustiguessa bacteriana en les plantes de la patata i del tomàquet

#### 1. Síntomes:

##### 1.1 Síntomes en la patata:

En la planta. La fase inicial de la infecció es caracteritza per un emmusteïment de les fulles en progressió ascendent cap a l'extrem superior de la planta, sota l'efecte de les temperatures diürnes altes, amb una recuperació durant la nit. L'emmusteïment es fa ràpidament irreversible i ocasiona la mort de la planta. El teixit vascular de les tiges de les plantes marcides tallades de manera transversal es pot tornar bru, i en la superfície del tall s'hi sol observar un exsudat mucós blanquinós o aquest es pot extreure pressionant la tija. Si es col·loca verticalment una tija tallada en aigua, dels feixos vasculars surten fils viscosos de l'exsudat.

En el tubercle. Els tubercles de la patata s'han de tallar de manera transversa a prop de la part basal (estoló). En la fase inicial de la infecció es produeix un descoloriment entre groc vitri i bru clar de la línia vascular, de la qual sol fluir espontàniament un exsudat mucós crema pàl·lid després d'uns minuts o quan es fa una lleugera pressió amb els polzes a la pell propera a la superfície del tall. Posteriorment, el descoloriment vascular adquireix un to bru més marcat i la necrosi es pot estendre al teixit parenquimàtic. En les fases avançades, la infecció progressa des de la part basal i els

ulls, i pot donar lloc al fet que es produeixen a la pell lesions lleugerament enfonsades de color bru rogenc per les quals flueixen bacteris, cosa que fa que s'hi adhereixin partícules del terra.

### 1.2 Síntomes en el tomàquet:

En la planta. El primer símptoma visible és l'aspecte flàccid de les fulles més joves. En condicions mediamambientals favorables per al patogen (temperatura del terra d'uns 25 °C, humitat saturada) es produeix l'epinàstia i l'emmusteïment d'una part o de la totalitat de la planta en pocs dies, que desemboca en el col·lapse total de la planta. En condicions menys favorables (temperatura del terra per sota de 21 °C) poden sorgir nombroses arrels adventícies de la tija. En ocasions s'observa un cordó greixós al llarg de la tija que demostra l'existència de necrosi en el sistema vascular. En tallar la tija transversalment, els seus teixits vasculars, que presenten un descoloriment bru, hi exsuden gotes de líquid bacterià blanc o groguenc.

2. Proves de selecció ràpida: Les proves de selecció ràpida faciliten un diagnòstic presumptiu. Feu una o més de les proves següents:

Prova de l'exsudació de la tija: La presència de *Ralstonia solanacearum* en tiges de patata o de tomàquet marcats es pot avaluar utilitzant la senzilla prova que s'indica tot seguit.

Tallar la tija just per sobre del nivell del terra. Col·locar la superfície del tall en un got de precipitacions que contingui aigua. Poc després, dels feixos vasculars han de sortir de manera espontània fils d'exsudat bacterià. Aquest fenomen no es produeix amb cap altre bacteri que causi infeccions vasculars a les plantes de patata o de tomàquet.

Prova de la detecció de grànuls de poli-β-hidroxibutirat (PHB): Els grànuls de PHB de les cèl·lules de *Ralstonia solanacearum* es visualitzen tenyint de color blau Nil A o negre Sudan B.

Preparar un frotis de l'exsudat o del teixit sospitós en un portaobjectes, o un frotis d'un cultiu de 48 hores en YPGA o SPA (apèndix 1). Preparar frotis de control positiu d'una soca de biovar 2 i raça 3 i, si es considera útil, un frotis d'un control negatiu. Deixar assecat. Passar amb rapidesa diverses vegades per la flama la cara inferior del portaobjectes fins que el frotis quedi fixat.

Prova del blau Nil:

1. Banyar el frotis fixat amb una solució aquosa a l'1 per 100 de blau Nil A. Incubar durant 10 minuts a 55 °C.

2. Escórrer la solució de tenyiment. Rentar suauement sota l'aixeta durant uns instants. Eliminar l'aigua sobrant amb un mocador de paper.

3. Banyar el frotis amb àcid acètic aquós al 8 per 100. Incubar durant 1 minut a temperatura ambient.

4. Rentar suauement sota l'aixeta durant uns instants. Assecat amb un mocador de paper.

5. Tornar a humitejar amb una gota d'aigua. Tapar amb un cobreobjectes.

6. Examinar el frotis tenyit amb un microscopi equipat amb epifluorescència a 450 nm amb oli d'immersió, a 1.000 augments.

Observar si es produeix la fluorescència taronja brillant dels grànuls de PHB. Observar-ho també amb la llum normal per assegurar-se que els grànuls són intracel·lulars i que la morfologia cel·lular és la típica de *Ralstonia solanacearum*.

Prova del negre Sudan:

1. Banyar el frotis fixat amb una solució de negre Sudan B al 0,3 per 100 en etanol del 70 per 100. Deixar en incubació durant 10 minuts a temperatura ambient.

2. Escórrer la solució de tenyiment. Rentar suauement amb aigua de l'aixeta durant uns instants. Eliminar l'aigua sobrant amb un mocador de paper.

3. Submergir breument el frotis en xilol. Assecat amb un mocador de paper. Cal anar amb precaució en fer servir el xilol perquè és un producte nociu. Treballar en una campana de fums.

4. Banyar el frotis amb safranina aquosa al 0,5 per 100 (p/v) i deixar durant 10 minuts a temperatura ambient. Cal anar amb precaució en fer servir la safranina perquè és un producte nociu. Treballar en una campana de fums.

5. Rentar suauement sota l'aixeta durant uns instants. Assecat amb un mocador de paper. Tapar amb un cobreobjectes.

6. Examinar el tenyiment amb un microscopi òptic amb llum transmesa amb oli d'immersió, a 1.000 augments.

Els grànuls de PHB de les cèl·lules de *Ralstonia solanacearum* es tenyeixen de negre blavós, mentre que les parets de les cèl·lules ho fan de rosa.

Altres proves: Altres proves adequades per a una selecció ràpida són la prova IF (punt 2 de la secció III), la prova ELISA (punt 3 de la secció III) i la prova PCR (punt 4 de la secció III).

### 3. Procés d'aïllament:

3.1 Agafar exsudat o petites seccions de teixit decolorat de l'anell vascular del tubercle o dels feixos vasculars de la tija de la planta de la patata o del tomàquet. Posar en suspensió en un volum reduït d'aigua destil·lada estèril o en tampó fosfat 50mM. Deixar reposar de 5 a 10 minuts.

3.2 Preparar sèries de dilucions decimals de la suspensió, per exemple 1/10 i 1/100, o més si es considera necessari.

3.3 Afegir un volum normalitzat de la suspensió i de les dilucions a un medi nutritiu general (NA, YPGA i SPA; apèndix 1) i/o a un medi de tetrazole de Kelman (apèndix 1) i/o a un medi selectiu SMSA (apèndix 7). Estendre o fer estries amb una tècnica adequada de dilució en plaques. Si es considera útil, preparar un conjunt de plaques diferents amb un cultiu d'una suspensió cel·lular diluïda d'una soca virulenta de *Ralstonia solanacearum* de biovar 2 i raça 3 que s'ha d'utilitzar com a control positiu.

3.4 Deixar en incubació les plaques tres dies a 28 °C. La incubació es pot prolongar fins a sis dies si el creixement és lent, però les colònies en SMSA amb freqüència es tornen atípiques i moren.

En un medi nutritiu general, els aïllats virulents de *Ralstonia solanacearum* desenvolupen colònies de color blanc nacrat, planes, irregulars i fluides, que sovint presenten els verticils característics.

En el medi de tetrazole de Kelman, les colònies típiques d'aïllats virulents de *Ralstonia solanacearum* són de color crema, planes, irregulars, amb anells de color vermell sang al centre. Les colònies avirulentes de *Ralstonia solanacearum* són butiroses i de color vermell fort.

En el medi SMSA, les colònies típiques dels aïllats virulents de *Ralstonia solanacearum* són de color blanc lletós, planes, irregulars i fluides, i presenten centres d'un marcat color vermell sang.

Les formes avirulentes de *Ralstonia solanacearum* desenvolupen colònies menys fluides, d'un color que oscil·la entre completament rosa i vermell en el medi SMSA.

3.5 Purificar les colònies de morfologia característica mitjançant subcultiu en un medi nutritiu general. Evitar els subcultius continus que poden donar lloc a una pèrdua de virulència.



## 4. Proves de confirmació:

4.1 Identificació de *Ralstonia solanacearum*: Identificar els cultius purs de *Ralstonia solanacearum* mitjançant un, com a mínim, dels procediments següents.

Nota: Incloure els controls adequats en cada prova.

Proves nutricionals i enzimàtiques: Les propietats fenotípiques següents de *Ralstonia solanacearum* estan universalment presents o absents:

Pigment fluorescent .....	-
Inclusions de PHB .....	+
Prova O/F .....	O+/F-
Catalasa .....	+
Oxidasa de Kovacs .....	+
Reducció de nitrats .....	+
Utilització de citrat .....	+
Creixement a 40 °C .....	-
Creixement en NaCl a l'1 per 100 .....	+
Creixement en NaCl al 2 per 100 .....	-
Dihidrolasa d'arginina .....	-
Liquació de gelatina .....	-
Hidròlisi del midó .....	-
Hidròlisi de l'esculina .....	-
Producció de levà .....	-

Els mitjans i els mètodes es troben en Lelliott i Stead (1987)

Prova IF: Preparar una suspensió de  $10^6$  cèl·lules per ml del cultiu i de les soques de control positiu. Preparar una sèrie de dilucions a 1/2 de l'antisèrum. Aplicar el procediment d'IF (punt 2 de la secció III). El títol IF del cultiu ha de ser equivalent al del control positiu.

Prova ELISA: Preparar una suspensió de més de  $10^6$  cèl·lules per ml del cultiu i de les soques de control positiu. Aplicar el procediment ELISA (punt 3 de la secció III). El valor ELISA del cultiu ha de ser equivalent al del control positiu.

Prova PCR: Preparar una suspensió de  $10^6$  cèl·lules per ml del cultiu i de les soques de control positiu. Aplicar el procediment PCR (punt 4 de la secció III). El producte de PCR del cultiu ha de tenir la mateixa mida i posteriorment les mateixes bandes en l'anàlisi amb l'enzim de restricció (REA), que el control positiu.

Hibridació fluorescent in situ (*Fluorescent in situ hybridization* o FISH): Preparar una suspensió de 10 cèl·lules per ml del cultiu i de les soques de control positiu. Aplicar el procediment FISH (Van Beuningen et al., 1995) amb l'iniciador OLI-1 PCR (Seal et al., 1993). El cultiu ha de mostrar la mateixa reacció que el control positiu.

Perfils de proteïnes: Les proteïnes de cèl·lules senceres desnaturades se separen mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida (PAGE) segons Stead (1992a).

Perfils d'àcids grassos (*Fatty acid profiling* o FAP): Mantenir el cultiu i la soca de control positiu en agar de tripticasa de soja durant 48 hores a 28 °C i aplicar el procediment FAP (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead 1992b). El perfil del cultiu ha de ser idèntic al del control positiu. En les condicions especificades, els àcids grassos característics són 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH i 18:1 2OH.

4.2 Caracterització de les soques: La caracterització de les soques és optativa, però es recomana que en cada cas nou s'utilitzi, com a mínim, una de les proves següents:

Determinació de les biovars: *Ralstonia solanacearum* es divideix en biovars en funció de la capacitat de produir àcid de tres hexoses alcohòliques i tres sucres (Hayward, 1964 i 1994).

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Utilització de:					
Maltosa .....	-	+	+	-	+
Lactosa .....	-	+	+	-	+
Cel·lobiosa ...	-	+	+	-	+
Mannitol .....	-	-	+	+	+
Sorbitol .....	-	-	+	+	-
Dulcitol .....	-	-	+	+	-

La biovar 2 es diferencia en subfenotips per mitjà de proves addicionals (Hayward, 1994):

	Biovar 2	Biovar 2-A	Biovar 2-T
Utilització de trehalosa.	-	+	+
Utilització d'inositol ....	+	-	+
Utilització de D-ribosa .	-	-	+
Activitat pectolítica ....	baixa	baixa	alta

Determinació de les races: La raça (Buddenhagen et al., 1962) es pot determinar amb una prova de patogenicitat en plantes de tomàquet o en alberginies i en plantes de tabac, i mitjançant una reacció d'hipersensibilitat (HR) en fulles de tabac (Lozano i Sequeira, 1970):

	Raça (*)		
	1	2	3
Reacció en:			
Plantes de tomàquet/alberginies.	Emmusteïment	Sense reacció	Emmusteïment
Plantes de tabac.	Emmusteïment	Sense reacció	Sense reacció
Fulles de tabac.	Necrosi (48 h) emmusteïment (7-8 dies)	HR (12-24 h)	Clorosi (2-8 dies)

(\*) La raça 4 (patògena en el gingebre i en algun altre hoste) i la raça 5 (patògena només en la morera) no hi estan incloses.

La caracterització de la raça per mitjà de proves de patogenicitat o hipersensibilitat en fulles de tabac pot no ser gaire fiable, però pot ser deduïda a partir de la biovar i de l'hoste original.

El cultiu es pot caracteritzar encara més mitjançant el següent:

Obtenció de l'empremta dactilar genòmica.

La diferenciació molecular de les soques en el complex de *Ralstonia solanacearum* es pot fer de la manera següent:

Anàlisi RFLP (Cook et al., 1989).

PCR de seqüència repetitiva [REP-, ERIC- & BOX-PCR (Louws et al., Smith et al., 1995)].

4.3 Prova de patogenicitat: Aquesta prova es destina a confirmar el diagnòstic de *Ralstonia solanacearum* i a comprovar la virulència dels cultius identificats com a *Ralstonia solanacearum*.

Preparar un inòcul de  $10^6$  cèl·lules per ml de cultiu i una soca de control positiu. Inocular de 5 a 10 plantes de tomàquet o alberginies, preferentment en la fase de

la tercera fulla verdadera o posterior (punt 6 de la secció III). Deixar en incubació fins a dues setmanes entre 22 i 28 °C amb una humitat relativa alta i reg diari. Observar si es produeix emmusteïment i/o epinàstia, clorosi o nanisme.

Aïllar el bacteri de les plantes simptomàtiques de la manera següent:

separar seccions de la tija 2 cm per sobre del punt d'inoculació,

dilacerar i suspendre en un petit volum d'aigua estèril o en tampó fosfat 50mM. Sembrar, deixar en incubació i buscar colònies amb una morfologia típica de *Ralstonia solanacearum*.

### SECCIÓ III

#### Detecció i identificació de *Ralstonia solanacearum* en mostres de tubercles de patata

Nota: La mida normal de la mostra és de 200 tubercles. No obstant això, el procediment es pot adaptar convenientment per a mostres amb menys de 200 tubercles.

##### 1. Preparació de la mostra per a l'anàlisi:

Observació: L'extracte de patata obtingut amb aquest procediment també es pot fer servir per a la detecció de *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Opcions prèvies a l'anàlisi, en què es considerin útils:

i) incubar la mostra a 25-30 °C durant un període de fins a dues setmanes per afavorir la multiplicació de les poblacions latents de *Ralstonia solanacearum*;

ii) rentar els tubercles amb aigua corrent utilitzant desinfectants i detergents apropiats. Assecar a l'aire els tubercles.

1.1 Treure l'epidermis de la part basal (melic) del tubercle amb un bisturí o un ganivet net i desinfectat, de manera que els teixits vasculars quedin a la vista. Extreure amb cura una petita falca cònica (de 3 a 5 mm de diàmetre) de teixit vascular de la part basal de cada tubercle. Extreure el mínim volum possible de teixit no vascular. Processar cada un dels tubercles de la mostra.

Observació: l'examen visual dels tubercles (punt 1 de la secció II) es pot efectuar en aquesta fase. Retirar els tubercles que presentin símptomes o estiguin molt podrits i analitzar-los individualment (secció II).

1.2 Col·locar les falques en un recipient tancat. És convenient processar-les immediatament. Si no és possible, es poden emmagatzemar durant un període de 24 hores com a màxim o, si es mantenen a 4 °C, que no superi les 72 hores.

1.3 Processar les falques per un dels mètodes següents:

i) Col·locar les falques en un recipient adequat.

Afegir solució tampó de maceració (apèndix 2) en quantitat suficient perquè les cobreixi.

Esmicolar-les en una trituradora Waring Blender o Ultra Thurrax fins a aconseguir una homogeneïtzació completa però no excessiva.

Deixar el macerat en remull de 15 a 30 minuts.

ii) Col·locar les falques en un recipient adequat.

Afegir solució tampó de maceració en una quantitat suficient perquè les cobreixi.

Col·locar el recipient en un agitador rotatori.

Incubar a 50-100 rpm durant 4 hores a 20-22 °C o durant 16-24 hores a 4 °C.

iii) Col·locar les falques dins d'una bossa de maceració d'un sol ús que sigui resistent (per exemple, una bossa Stomacher, de 105 x 150 mm, estèril per radiació).

Matxucar amb cura les falques amb un instrument adequat, com, per exemple, un martell, fins a aconseguir una homogeneïtzació completa.

Afegir solució tampó de maceració en una quantitat suficient perquè cobreixi les falques.

Deixar reposar el macerat durant 15-30 minuts.

1.4 Extreure els bacteris de les falques processades mitjançant un dels procediments següents:

i) Decantar suaument el macerat en un tub de centrifugar i deixar els residus en el recipient o la bossa. Si la decantació presenta un aspecte tèrbol, centrifugar a 180 g, com a màxim, durant 10 minuts, a una temperatura inferior a 10 °C.

Centrifugar la decantació o el sobrenedant obtingut en la primera centrifugació, a 7.000 g durant 15 minuts o a 10.000 g durant 10 minuts a una temperatura inferior a 10 °C.

Eliminar el sobrenedant sense pertorbar la precipitació.

ii) Filtrar el macerat mitjançant un sistema de filtració els porus del qual tinguin una mida de 40-100 mm. Accelerar la filtració utilitzant una bomba de buit.

Recollir el filtrat en un tub de centrifugar.

Rentar el filtre amb un tampó de maceració.

Centrifugar el filtrat a 7.000 g durant 15 minuts o a 10.000 g durant 10 minuts a una temperatura inferior a 10 °C.

Descartar el sobrenedant sense pertorbar la precipitació.

1.5 Posar en suspensió la precipitació en 1 ml de tampó de precipitació (apèndix 2).

Dividir en dues parts iguals i posar cada part en un microvial.

Utilitzar un sol microvial per a la prova. Conservar l'extracte sobrant a 4 °C durant l'anàlisi.

Afegir glicerol estèril al 10-25 per 100 (v/v) a l'altre microvial. Homogeneïtzar per agitació. Guardar a -18 °C (setmanes) o a -70 °C (mesos).

2. Prova d'immunofluorescència (IF): Utilitzar un antisèrum per *Ralstonia solanacearum*, de preferència per raça 3 i biovar 2. Determinar el títol en una suspensió de 10<sup>6</sup> cèl·lules per ml de la soca homòloga de *Ralstonia solanacearum* amb una dilució apropiada del conjugat d'isotiocianat de fluoresceïna (FITC), segons les recomanacions del fabricant. L'antisèrum cru hauria de presentar un títol IF d'almenys 1:2.000.

Utilitzar portaobjectes de vasets múltiples, de preferència amb 10 recipients de 6 mm de diàmetre com a mínim.

Incloure en cada portaobjectes un control de conjugat FITC. S'ha de repetir la prova amb el control PBS inclòs, si s'observa alguna cèl·lula positiva en el control FITC.

Preparar en un altre portaobjectes controls positius amb una suspensió de 10 cèl·lules per ml d'una soca de raça/biovar adequades de *Ralstonia solanacearum*. Incloure un portaobjectes en cada sèrie de proves.

2.1 Preparar els portaobjectes segons un dels procediments següents:

i) Per a precipitacions amb una quantitat relativament petita de midó:

Posar amb una pipeta un volum determinat (amb 15 ml n'hi ha prou per a vasets de 6 mm de diàmetre; augmentar el volum si el diàmetre és més gran) de la precipitació en suspensió en una fila de vasets. L'altra fila es pot utilitzar com a duplicat o per a una segona mostra, tal com s'indica en la figura 1.

ii) Per a altres precipitacions:

Preparar dilucions decimals, per exemple 1/10, 1/100 i 1/1.000, de la precipitació en suspensió en tampó de precipitació. Posar amb una pipeta un volum

normalitzat mesurat (15 ml és suficient per a vasos de 6 mm de diàmetre; augmentar el volum si el diàmetre és més gran) de la precipitació en suspensió i de cada dilució en una fila de vasos. L'altra fila es pot utilitzar com a duplicat o per a una segona mostra, tal com indica la figura 2.

2.2 Deixar assecat les gotetes. Fixar les cèl·lules bacterianes al portaobjectes escalfant-lo, flamejant-lo o mitjançant etanol del 95 per 100.

2.3 Procediment IF:

i) Si el portaobjectes s'ha preparat segons l'incís i) del punt 2.1: Preparar un conjunt de dilucions a 1/2 de l'antisèrum en el tampó IF (apèndix 3): 1/4 del títol (T/4), 1/2 del títol (T/2), el títol (T) i dues vegades el títol (2T).

ii) Si el portaobjectes s'ha preparat segons l'incís ii) del punt 2.1: Preparar la dilució de treball (DT) de l'antisèrum en el tampó IF. La dilució de treball és la dilució de l'antisèrum amb especificitat òptima, i normalment és a la meitat del títol.

FIGURA 1

**Preparació del portaobjectes segons l'incís i) dels punts 2.1 i 2.3**

DILUCIÓ NORMALITZADA DE LA PRECIPITACIÓ EN SUSPENSIO

(T= títol)

	FITC	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/> Dilucions a 1/2 d'antisèrum
Mostra 1	•1	•2	•3	•4	•5	
Duplicat de la mostra 1 o mostra 2	•6	•7	•8	•9	•10	

FIGURA 2

**Preparació del portaobjectes segons l'incís ii) dels punts 2.1 i 2.3**

FITC DILUCIÓ NORMALITZADA D'ANTISÈRUM

	Res	Res 1/10	1/100	1/1.000	<input type="checkbox"/> Dilució decimal precipitat suspès
Mostra 1	•1	•2	•3	•4	•5
Duplicat de la mostra 1 o mostra 2	•6	•7	•8	•9	•10

2.3.1 Col·locar els portaobjectes en un mocador de paper humitejat.

Afegir als vasos corresponents la dilució o les dilucions d'antisèrum. Aplicar PBS en els vasos FITC. El volum de l'antisèrum aplicat en els vasos ha de ser equivalent al volum d'extracte aplicat.

2.3.2 Tapar i deixar incubar durant 30 minuts a temperatura ambient.

2.3.3 Sacsejar les gotetes d'antisèrum del portaobjectes i esbandir acuradament els portaobjectes amb tampó IF. Rentar durant 5 minuts amb tampó IF-Tween. Repetir l'operació amb tampó IF (apèndix 3). Eliminar acuradament l'excés d'humitat.

2.3.4 Col·locar els portaobjectes en un mocador de paper humitejat.

Cobrir els vasos en qüestió i el vaset FITC amb la dilució del conjugat FITC utilitzat per determinar el títol. El volum de conjugat aplicat en els vasos ha de ser idèntic al volum d'antisèrum aplicat.

2.3.5 Tapar i deixar en incubació durant 30 minuts a temperatura ambient.

2.3.6 Sacsejar les gotetes de conjugat del portaobjectes. Esbandir i rentar com abans (2.3.3). Eliminar acuradament l'excés d'humitat.

2.3.7 Posar amb una pipeta de 5 a 10 µl de tampó fosfat glicerol de 0,1 M (apèndix 3) o un volum similar en cada vaset i col·locar un cobreobjectes.

2.4 Lectura de la prova IF:

Examinar els portaobjectes en un microscopi epifluorescent amb filtres adequats perquè es produeixi l'excitació del FITC, amb oli d'immersió i a 500-1.000 augmentos. Fer recórrer els vasos al llarg de dos diàmetres perpendiculars entre si i al voltant del perímetre.

En primer lloc, comprovar el control positiu. Les cèl·lules han de ser fluorescents brillants i estar completament tenyides.

Nota: La prova s'ha de repetir si el tenyiment no és bo en el control positiu.

Llegir els portaobjectes. Observar primer l'absència de cèl·lules fluorescents en els vasos FITC. Si n'hi ha, cal indicar una unió no específica del conjugat, autofluorescència o contaminació.

Nota: En aquest cas, repetir la prova.

Comprovar si hi ha cèl·lules fluorescents brillants amb una morfologia característica de *Ralstonia solanacearum* en els vasos problema. La intensitat de la fluorescència ha de ser equivalent a la de la soca de control positiu a la mateixa dilució de l'antisèrum. Cal descartar les cèl·lules que presentin un tenyiment incomplet o amb una fluorescència que sigui escassa, tret que hi hagi moltes cèl·lules d'aquest tipus (vegeu la interpretació dels resultats de la prova IF).

Interpretació dels resultats de la prova IF:

i) La prova és negativa si en la mostra no es troben cèl·lules fluorescents brillants amb una morfologia característica.

ii) Si hi ha cèl·lules fluorescents brillants amb una morfologia característica, cal determinar el nombre mitjà de cèl·lules per camp microscòpic i calcular el nombre de cèl·lules (N) per ml de precipitació en suspensió (apèndix 4).

Es considera que el límit de detecció per a la prova IF se situa al voltant de 10 cèl·lules per ml de precipitació en suspensió:

en les mostres amb  $N > 10^3$  cèl·lules per ml, la prova IF es considera positiva,

en les mostres amb  $N \leq 10^3$  cèl·lules per ml, la prova IF es pot considerar positiva.

iii) Si hi ha un gran nombre de cèl·lules ( $> 10^5$  cèl·lules per ml) incompletament tenyides o amb fluorescència feble en el títol, s'ha de fer una segona prova:

o bé una prova basada en un principi biològic diferent, o bé repetir la prova IF, ja sigui amb un segon antisèrum o amb una dilució decimal de la precipitació.

3. Prova d'immunoabsorció enzimàtica (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* o ELISA) (basada en Robinson-Smith et al., 1995).

Utilitzar antisèrum per a *Ralstonia solanacearum*, preferiblement de la raça 3 i biovar 2. Determinar el títol en una suspensió de  $10^6$  cèl·lules per ml de la soca homòloga de *Ralstonia solanacearum*.

Es recomana utilitzar plaques de microtitulació NUNC Polysorp.

Incloure un control negatiu d'extracte de patata i un control de tampó fosfat salí (PBS).

Utilitzar una suspensió de més de  $10^6$  cèl·lules per ml d'una soca de *Ralstonia solanacearum* biovar 2, raça 3, com a control positiu. Processar-lo de la mateixa manera que la mostra o les mostres, però ben separat d'aquestes en la placa de microtitulació.

3.1 Posar amb una pipeta de 100 a 200  $\mu$ l de la precipitació en suspensió en un microvial.

Escalfar durant 4 minuts a 100 °C. Col·locar el microvial en gel.

3.2 Afegir un volum igual de tampó d'entapissat de carbonat de doble concentració (apèndix 5). Homogeneïtzar per agitació.

3.3 Afegir alíquotes de 100  $\mu$ l a cada un de dos vasos, com a mínim, de la placa de microtitulació.

Deixar en incubació durant una hora a 37 °C o durant una nit a 4 °C.

3.4 Treure els extractes dels vasos. Rentar-los tres vegades amb PBS-Tween (apèndix 5), deixant-hi l'última solució de rentat durant 5 minuts com a mínim.

3.5 Preparar la dilució adequada d'antisèrum de *Ralstonia solanacearum* en un tampó de bloqueig (apèndix 5). Posar 100  $\mu$ l de dilució d'antisèrum en els vasos.

Deixar en incubació durant una hora a 37 °C.

3.6 Treure l'antisèrum dels vasos. Rentar-los com en el punt 3.4.

3.7 Preparar la dilució adequada de conjugat de fosfatasa alcalina en un tampó de bloqueig. Posar 100  $\mu$ l de dilució de conjugat en els vasos.

Deixar en incubació durant una hora a 37 °C.

3.8 Treure el conjugat dels vasos. Rentar-los com en els punts 3.4 i 3.6.

3.9 Preparar la solució de substrat de fosfatasa alcalina (apèndix 5). Posar 100  $\mu$ l en els vasos. Deixar en incubació de 30 minuts a una hora en la foscor a temperatura ambient.

3.10 Llegir l'absorbància a 405 nm.

Interpretació de la prova ELISA: La prova ELISA és negativa si la densitat òptica (DO) de la mostra és  $<2$  x DO del control negatiu.

La prova ELISA és positiva si la DO de la mostra és  $>2$  x DO del control negatiu.

4. Prova de polimerització en cadena (*Polymerase Chain Reaction* o PCR) (Basat en Seal *et al.*, 1993).

Observació: S'han de fer servir puntes de pipeta ajustades amb un filtre en totes les fases de preparació de la mostra i sempre que s'hagi de manejar PCR.

Preparar una suspensió de  $10^6$  cèl·lules per ml d'una soca de *Ralstonia solanacearum* de raça 3 i biovar 2 com a control positiu. Actuar de la mateixa manera que amb la mostra o les mostres.

4.1 Posar amb una pipeta 100  $\mu$ l de la precipitació en suspensió en un microvial.

Una altra alternativa és posar 90  $\mu$ l de la precipitació en suspensió en un microvial que contingui 10  $\mu$ l de NaOH 0,5 M. Mesclar invertint el vial repetidament.

4.2 Escalfar durant 4 minuts a 100 °C. Col·locar el microvial en gel immediatament.

4.3 Preparar, almenys, dues dilucions decimals, per exemple 1/10 i 1/100, o més si es considera útil, en aigua destil·lada estèril o ultrapura (UPW).

4.4 Preparar la barreja de reacció PCR (apèndix 6) en un vial estèril afegint-hi els components següents en l'ordre en què se citen:

#### Volum de reacció de 50 $\mu$ l

Component	Quantitat — $\mu$ l	Concentració final
Aigua destil·lada estèril o ultrapura.	30,8-33,8	
10 x tampó PCR .....	5,0	1 x
d-ATP .....	1,0	0,2 mM
d-CTP .....	1,0	0,2 mM
d-GTP .....	1,0	0,2 mM
d-TTP .....	1,0	0,2 mM
Iniciador OLI-1 (20 $\mu$ M) .....	2,5	1 mM
Iniciador Y-2 (20 $\mu$ M) .....	2,5	1 mM
Polimerasa Taq (5 U/ $\mu$ l) .....	0,2	1,0 U
Volum total .....	45-48	

Per a més reaccions:

Calcular la quantitat de cada component per al nombre de reaccions necessari.

Mesclar els components i posar 45-48  $\mu$ l de la mescla en vials PCR estèrils.

Col·locar els vials amb la mescla de la reacció PCR en gel.

Per a volums de reacció de 25  $\mu$ l.

Reduir els components proporcionalment.

4.5 Amplificació de la PCR.

4.5.1 Optatiu: centrifugar amb impulsos els vials que contenen la mostra bullida i el control positiu.

Afegir, en l'ordre indicat, 2-5  $\mu$ l de la mostra o les mostres, el control d'aigua i el control positiu als vials que contenen la barreja de la reacció PCR. Col·locar els vials a l'escalfador del termociclador d'ADN.

4.5.2 Aplicar el programa següent:

Un cicle de:

i) Dos minuts a 96 °C: desnaturalització de la cadena motlle;

50 cicles de:

ii) Vint segons a 94 °C: desnaturalització,

iii) Vint segons a 68 °C: hibridació d'iniciador,

iv) Trenta segons a 72 °C: extensió de la còpia;

Un cicle de:

v) Deu minuts a 72 °C: nova extensió;

Un cicle de:

vi) Manteniment de la temperatura a 4 °C.

Observació: Aquests paràmetres són per a un aparell Perkin Elmer 9600. Per a altres termocicladors pot ser que calgui una capa d'oli mineral en els vials de la reacció PCR i/o modificar la durada de les fases ii), iii) i iv) d'amplificació.

4.5.3 Retirar els vials del termociclador. Analitzar el producte de la PCR. Si aquesta operació no es fa immediatament, emmagatzemar els vials a 4 °C si se n'han d'utilitzar el mateix dia o a -18 °C, si el període d'espera és més gran.

4.6 Anàlisi del producte de la PCR:

Els fragments de la PCR es detecten mitjançant electroforesi en gel d'agarosa i tenyiment amb bromur d'etidi.

4.6.1 Preparar un gel d'agarosa apropiat portant suaument l'agarosa a ebullició en un tampó de tris-acetat per electroforesi (TAE).

4.6.2 Refredar l'agarosa fosa a 50-60 °C, abocar-la en el motlle de la unitat d'electroforesi i inserir-hi la pinta. Deixar que el gel se solidifiqui.

4.6.3 Retirar la pinta. Submergir el gel en TAE de manera que quedi cobert (2-3 mm) amb el tampó.

4.6.4 Posar gotetes de 3 µl de tampó de càrrega en Parafilm. Afegir 12 µl del producte de la PCR procedents de les mostres, del control positiu o del control d'aigua, i mesclar aspirant suaument per la punta de la pipeta abans de la càrrega. Els volums donats es poden modificar perquè s'ajustin a la capacitat dels vasos en el gel d'agarosa.

4.6.5 Carregar amb cura els vasos del gel. Incloure un marcador ADN apropiat com a mínim en un vaset, perquè serveixi de referència.

4.6.6 Connectar els cables al generador d'electricitat i a l'equip d'electroforesi. Deixar córrer el gel a 5-8 V/cm fins que la part davantera de l'indicador de seguiment estigui a 1 cm del final del gel.

4.6.7 Tallar el subministrament d'electricitat. Desconnectar els cables de la unitat d'electroforesi.

Retirar el gel amb cura. Submergir-lo en una solució de bromur d'etidi durant un període comprès entre trenta i quaranta-cinc minuts.

Observació: S'han de portar guants d'un sol ús cada vegada que es manipuli bromur d'etidi, perquè és un mutagen molt fort.

4.6.8 Destenyir-ho en aigua destil·lada durant 10-15 minuts.

4.6.9 Visualitzar el fragment o els fragments d'ADN amplificats mitjançant transil·luminació UV. El producte de la PCR de *Ralstonia solanacearum* amb el conjunt d'iniciadors OLI-1 i I-2 té una longitud de 288 bp. Comparar amb el marcador d'ADN i amb el control positiu.

Observació: El control d'aigua ha de ser negatiu en qualsevol cas. Si no és així, cal repetir la prova.

4.6.10 Fer una fotografia del gel, en cas que es necessiti una prova permanent.

4.6.11 Confirmar l'autenticitat del fragment amplificat mitjançant una anàlisi de l'enzim de restricció (REA).

#### 4.7 Anàlisi de l'enzim de restricció (REA):

4.7.1 Posar 8,5 µl del producte de la PCR (4.5.3) en un microvial nou. Afegir-hi 1 µl de tampó d'enzim 10 × i 0,5 µl d'enzim de restricció *A*vall.

4.7.2 Mesclar-ho aspirant suaument per la punta de la pipeta. Si queden gotes a les parets del vial, sotmetre'l a una microcentrifuga. Deixar-ho incubar durant una hora a 37 °C.

4.7.3 Analitzar el fragment de la PCR digerit mitjançant electroforesi en gel d'agarosa, tal com indica el punt 4.6.

#### Interpretació dels resultats de la prova PCR:

La prova PCR és negativa si no es detecta el fragment 288 bp característic i si es detecta per a la soca de control positiu de *Ralstonia solanacearum*.

La prova PCR és positiva si es detecta el fragment 288 bp i l'anàlisi REA del fragment amplificat és idèntic al de la soca de control positiu de *Ralstonia solanacearum*.

#### 5. Proves de sembra en medi selectiu (basades en Elphinstone *et al.*, 1996):

5.1 Fer la prova mitjançant una tècnica de dilució en plaques apropiada, com ara:

i) Preparar, com a mínim, dues dilucions decimals, per exemple 1/10 i 1/100, o més, si es considera necessari, del sediment en suspensió en un tampó de precipitació. Posar amb una pipeta un volum normalitzat

mesurat (50-100 µl) del sediment en suspensió i de cada dilució en el medi selectiu SMSA modificat (apèndix 7) i estendre-ho amb una vareta de vidre per tota la superfície del medi.

Si es considera útil, fer també una estria de dilució amb una nansa carregada amb 10 µl del sediment en suspensió. Flamejar la nansa entre cada sembra.

ii) Posar un volum estàndard mesurat (50-100 µl) del sediment en suspensió en el medi selectiu SMSA modificat i estendre-ho amb una vareta de vidre per tota la superfície del medi. Passar la vareta sense flamejar-la com a mínim per dues plaques més de SMSA modificat.

5.2 Afegir, mitjançant la mateixa tècnica de dilució en plaques, una suspensió de 10<sup>6</sup> cèl·lules per ml d'una soca de *Ralstonia solanacearum* de raça 3 i biovar 2 com a control positiu a un conjunt diferent de plaques de SMSA modificat.

5.3 Deixar incubar les plaques a 28 °C. Iniciar-ne la lectura al cap de tres dies. Si el resultat és negatiu, esperar fins a sis dies com a màxim. Els aïllats virulents de *Ralstonia solanacearum* desenvolupen colònies de color blanc lletós, planes, irregulars i fluides, amb uns centres de color vermell sang que poden presentar ratlles o espirals internes.

5.4 Purificar les colònies d'una morfologia característica mitjançant subcultiu en un medi nutritiu general (apèndix 1).

5.5 Identificar els cultius purs (punt 4.1 de la secció II) i confirmar els cultius de *Ralstonia solanacearum* mitjançant una prova de patogenicitat (punt 4.3 de la secció II).

Interpretació dels resultats de la sembra en un medi selectiu:

La sembra en un medi selectiu és negativa si no s'aïllen colònies bacterianes al cap de sis dies ni s'aïllen colònies típiques de *Ralstonia solanacearum*, sempre que no hi hagi sospites d'inhibició produïda per colònies d'altres bacteris i que en els controls positius hi hagi colònies típiques de *Ralstonia solanacearum*.

La sembra en un medi selectiu és positiva si s'aïllen colònies típiques de *Ralstonia solanacearum*.

#### 6. Proves de bioassaig (basades en Janse, 1988):

6.1 Utilitzar en cada mostra 10 plàntules de tomàquet o d'albergínia de varietats que siguin sensibles a la *Ralstonia solanacearum*, en la fase de la tercera fulla verdadera. Les plantes no s'han de regar durant les 24 hores prèvies a la inoculació.

6.2 Distribuir entre les plantes 100 µl de sediment en suspensió, i inocular-lo a la tija, entre els cotilèdons, i en un o diversos punts més.

6.3 Utilitzant aquesta mateixa tècnica, inocular 10 plàntules amb una suspensió de 10<sup>6</sup> cèl·lules per ml d'una soca virulenta de *Ralstonia solanacearum* de raça 3 i biovar 2 com a control positiu i amb tampó de precipitació com a control negatiu. Separar físicament les plantes inoculades amb el control positiu de les altres per evitar contaminacions.

6.4 Deixar que les plantes segueixin creixent fins a quatre setmanes a 22-28 °C amb una humitat relativa alta i reg diari. Comprovar si s'hi aprecien símptomes d'emmusteïment, epinàstia, clorosi i/o creixement reduït.

6.5 Aïllar-les de les plantes infectades (secció II). Identificar els cultius purs de morfologia característica (punt 4.1 de la secció II) i confirmar els cultius de *Ralstonia solanacearum* mitjançant una prova de patogenicitat (punt 4.3 de la secció II).

6.6 Si es considera útil, comprovar si s'ha produït infecció en els lots que no presentin símptomes. Separar de la tija de cada planta una secció d'1 cm que estigui 2 cm per sobre del punt d'inoculació. Homogeneïtzar

els teixits en un tampó de maceració. Portar a terme la sembra per dilució en plaques (punt 5.1 de la secció III). Si se n'obté un resultat positiu, identificar els cultius purs de morfologia característica (punt 4.1 de la secció II) i confirmar la presència de cultius de *Ralstonia solanacearum* mitjançant una prova de patogenicitat (punt 4.3 de la secció II).

Interpretació dels resultats de la prova del bioassaig:

La prova del bioassaig és negativa si les plantes no estan infectades per *Ralstonia solanacearum*, sempre que es detecti *Ralstonia solanacearum* en els controls positius.

La prova del bioassaig és positiva si les plantes estan infectades per *Ralstonia solanacearum*.

7. Proves d'enriquiment (basades en Elphinstone *et al.*, 1996):

7.1 Posar 100 ml de sediment en suspensió en 3 ml de medi SMSA modificat (apèndix 7).

7.2 Deixar incubar a 28 °C durant 48 hores i, en qualsevol cas, durant 72 hores com a màxim, mantenint el tap del tub sense prémer perquè hi hagi aireig.

7.3 Ajustar el tap i mesclar. Fer parts alíquotes per a la prova IF (punt 2 de la present secció), la prova ELISA (punt 3 de la present secció) i/o la prova PCR (punt 4 de la present secció).

8. Proves de patogenicitat:

Vegeu el punt 4.3 de la secció II.

## APÈNDIX 1

### Mitjans nutritius per a l'aïllament i el cultiu de *Ralstonia solanacearum*

Agar nutritiu (NA):

Agar nutrient (Difco): 23 g.

Aigua destil·lada: 1 l.

Preparar volums de 0,5 litres del medi en matrassos d'1 l.

Dissoldre els ingredients.

Esterilitzar en una autoclau a 121 °C durant 15 minuts.

Refredar fins a 50 °C. Distribuir en plaques.

Agar llevat peptona glucosa (YPGA):

Extracte de llevat (Difco): 5 g.

Bacto-peptona (Difco): 5 g.

D (+) glucosa (monohidrat): 10 g.

Bacto-agar (Difco): 15 g.

Aigua destil·lada: 1 l.

Preparar volums de 0,5 l del medi en matrassos d'1 l.

Dissoldre els ingredients.

Esterilitzar en una autoclau a 121 °C durant 15 minuts.

Refredar fins a 50 °C. Distribuir en plaques.

Agar de sacarosa i peptona (SPA):

Sacarosa: 20 g.

Peptona: 5 g.

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,5 g.

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O: 0,25 g.

Bacto-agar (Difco): 15 g.

Aigua destil·lada: 1 l.

Preparar volums de 0,5 l del medi en matrassos d'1 l.

Dissoldre els ingredients. Si cal, ajustar el pH a 7,2-7,4.

Esterilitzar en una autoclau a 121 °C durant 15 minuts.

Refredar fins a 50 °C. Distribuir en plaques.

Medi de tetrazole de Kelman:

Casaminoàcids (Difco): 1 g.

Bacto-peptona (Difco): 10 g.

Dextrosa: 5 g.

Bacto-agar (Difco): 15 g.

Aigua destil·lada: 1 l.

Preparar volums de 0,5 litres del medi en matrassos d'1 l.

Dissoldre els ingredients.

Esterilitzar en una autoclau a 121 °C durant 15 minuts.

Refredar fins a 50 °C.

Afegir una solució aquosa de clorur de trifeníl tetrazole (Sigma), esterilitzada per filtració, per aconseguir una concentració final de 50 mg/l.

Distribuir en plaques.

## APÈNDIX 2

### Materials per preparar les mostres

Tampó de maceració: tampó fosfat 50 mM, pH 7,0:

Aquest tampó s'utilitza per macerar teixits.

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 4,26 g.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2,72 g.

Aigua destil·lada: 1 l.

Dissoldre els ingredients i comprovar el pH. Preparar les alíquotes necessàries.

Esterilitzar en una autoclau a 121 °C durant 15 minuts.

Per fer la prova PCR directa, es recomana afegir polivinilpirrolidona-40.000 MWT (PVP-40) al 5 per 100, per reduir la incidència de la inhibició d'amplificació per molècules aromàtiques presents en l'extracte.

En cas que s'utilitzin els procediments d'homogeneïtzació amb Waring Blender o amb Ultra Turrax per macerar els teixits de patata, es recomana utilitzar un desfloculant, un agent antiescumejant o un antioxidant.

Flocs de lubrol: 0,5 g/l.

Antiescumejant DC silicona: 1,0 ml/l.

Pirofosfat tetrasòdic: 1,0 g/l.

Esterilitzar separatament en una autoclau. Afegir fins a obtenir la concentració desitjada.

Tampó de la precipitació: tampó fosfat 10 mM, pH 7,2:

Aquest tampó s'utilitza per a la suspensió i la dilució de les precipitacions i de les falques de patata.

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O: 2,7 g.

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O: 0,4 g.

Aigua destil·lada: 1 l.

Dissoldre els ingredients i comprovar el pH. Preparar les alíquotes necessàries.

Esterilitzar en una autoclau a 121 °C durant 15 minuts.

## APÈNDIX 3

### Materials per a la prova IF

Tampó IF: tampó fosfat salí (PBS) 10 mM, pH 7,2:

Aquest tampó s'utilitza per a la dilució d'antisèrums.

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O: 2,7 g.

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O: 0,4 g.

NaCl: 8,0 g.

Aigua destil·lada: 1 l.

Dissoldre els ingredients i comprovar el pH. Preparar les alíquotes necessàries.

Esterilitzar en una autoclau a 121 °C durant 15 minuts.

Tampó IF-Tween:

Aquest tampó s'utilitza per rentar els portaobjectes. Afegir 0,1 per 100 de Tween 20 al tampó IF.

Tampó fosfat glicerol 0,1 M, pH 7,6:

Aquest tampó s'utilitza com a fluid de muntatge en els vasos dels portaobjectes d'IF per augmentar la fluorescència.

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

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0,15 g.

Glicerol: 50 ml.

Aigua destil·lada: 100 ml.

#### APÈNDIX 4

##### Determinació del nivell de contaminació en la prova IF

Superfície (S) del vaset del portaobjectes múltiple

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

en què  $D$  = diàmetre del vaset. [1]

Superfície (s) del camp de l'objectiu

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

en què  $d$  = diàmetre del camp. [2]

Calcular  $d$ , o bé per mesurament directe, o bé amb les fórmules següents:

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

en què

$i$  = coeficient de camp (depèn del tipus de l'ocular i varia de 8 a 24),

$K$  = coeficient del tub (1 o 1,25),

$G$  = augment (100x, 40x, etc.) de l'objectiu.

De [2]:

$$d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}} \quad [4]$$

De [3]:

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

Comptar el nombre de cèl·lules fluorescents típiques per camp ( $c$ ).

Calcular el nombre de cèl·lules fluorescents típiques per vaset ( $C$ ):

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

Calcular el nombre de cèl·lules fluorescents típiques per ml de precipitació ( $N$ ):

$$N = C \times \frac{1.000}{Y} \times F$$

En què = volum de precipitació en el vaset,

$F$  = factor de dilució de la precipitació.

#### APÈNDIX 5

##### Materials per a la prova ELISA

Tampó carbonat doble per a entapissat, pH 9,6:

$\text{Na}_2\text{CO}_3$ : 6,36 g.

$\text{NaHCO}_3$ : 11,72 g.

Aigua destil·lada: 1 l.

Dissoldre els ingredients i comprovar el pH. Preparar les alíquotes necessàries.

Esterilitzar en una autoclau a 121 °C durant 15 minuts.

Si l'extracte conté una alta proporció de molècules aromàtiques, s'hi pot afegir com a antioxidant sulfít de sodi amb una concentració final de 0,2 per 100.

Tampó fosfat salí (PBS) 10 x, pH 7,4:

$\text{NaCl}$ : 80 g.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 2 g.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ : 29 g.

$\text{KCl}$ : 2 g.

Aigua destil·lada: 1 l.

Dissoldre els ingredients i comprovar el pH. Preparar les alíquotes necessàries.

Esterilitzar en una autoclau a 121 °C durant 15 minuts.

Tampó fosfat salí-Tween (PBS-T):

PBS 10 x: 100 ml.

Solució al 10 per 100 de Tween 20: 5 ml.

Aigua destil·lada: 895 ml.

Tampó de bloqueig (anticossos) (s'ha de preparar en el moment d'utilitzar-lo):

PBS 10 x: 10 ml.

Polivinilpirrolidona-44000 MWT (PVP-44): 2,0 g.

Solució al 10 per 100 de Tween 20: 0,5 g.

Llet en pols: 0,5 g.

Aigua destil·lada: Fins a completar 100 ml.

Solució de substrat fosfatasa alcalina, pH 9,8:

Dietanolamina: 97 ml.

Aigua destil·lada: 800 ml.

Mesclar i ajustar el pH a 9,8 amb HCl concentrat.

Completar fins a 1 l amb aigua destil·lada.

Afegir 0,2 g de  $\text{MgCl}_2$ .

Dissoldre dues pastilles de 5 mg de substrat fosfatasa (Sigma) per cada 15 ml de solució.

#### APÈNDIX 6

##### Materials per a la prova PCR

Seqüència de l'oligonucleòtid iniciador:

Iniciador OLI-1: 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

Iniciador Y-2: 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Per als materials vegeu Seal *et al.*, 1993.

## APÈNDIX 7

## Materials per a les proves de sembra en un medi selectiu i d'enriquiment

Medi selectiu SMSA (Engelbrecht, 1994, modificat per Elphinstone *et al.*, 1996):

Medi base

Casaminoàcids (Difco): 1 g.

Bacto-peptona (Difco): 10 g.

Glicerol: 5 ml.

Agar (Difco): 15 g.

Aigua destil·lada: 1 l.

Preparar volums de 0,5 ls del medi en matrassos d'1 l.

Dissoldre els ingredients i comprovar el pH. Si cal, ajustar el pH a 6,5 abans d'esterilitzar. *Ralstonia solanacearum* no es desenvolupa bé amb un pH > 7,0.

Esterilitzar en una autoclau a 121 °C durant 15 minuts.

Refredar fins a 50 °C.

Afegir els ingredients següents (tots de Sigma) per obtenir les concentracions finals especificades:

Violeta vidre: 5 mg/l.

Polimixina B sulfat: 100 mg/l (aproximadament 600.000 unitats) Sigma P-1004.

Bacitracina (\*): 25 mg/l (aproximadament 1.250 unitats) Sigma B-0125.

Cloramfenicol: 5 mg/l Sigma C-3175.

Penicilina G: 0,5 mg/l (aproximadament 825 unitats) Sigma P-3032.

Sals de tetrazole: 50 mg/l.

Dissoldre els ingredients en etanol del 70 per 100 per obtenir les concentracions indicades per al volum de diluent preparat. Alguns ingredients, com ara la polimixina B i el cloramfenicol, exigeixen un lleuger escalfament i agitació.

Medi SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996).

Preparar de manera idèntica en el medi selectiu SMSA, però suprimir l'agar i les sals de tetrazole.

Distribuir en alíquotes de 3 ml, en tubs d'un sol ús Universal de 30 ml.

(\*) Si es considera necessari, l'augment de la concentració de bacitracina fins a 300 ppm pot reduir la contaminació per bacteris sapròfits sense reduir la recuperació de *Ralstonia solanacearum*.

## REFERÈNCIES

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



### ANNEX III

1. En tots els casos en què se sospiti la presència de l'organisme i, havent-se obtingut un resultat positiu en proves de detecció efectuades d'acord amb el mètode corresponent que estableix l'annex II d'aquest Reial decret per al material vegetal indicat o amb qualsevol altre mètode oficialment aprovat, i per a tots els altres casos en què s'espera a la conclusió d'aquest mètode per confirmar o dissipar la sospita, cal retenir i conservar convenientment fins a aquell moment:

- sempre que sigui possible, el lot o la part del lot (del qual s'hagi pres la mostra) en l'embalatge original amb etiqueta,
- sempre que sigui possible, la part restant de les mostres,
- qualsevol extracte que sobri i qualsevol material addicional que s'hagi preparat per a la prova o les proves de detecció (per exemple, les plaques d'immunofluorescència),
- tota la documentació pertinent.

2. En els casos en què finalment es confirmi la presència de l'organisme, s'han de retenir i conservar convenientment com a mínim durant el mes següent al procediment de notificació que disposa l'apartat 2 de l'article 6:

- el material esmentat en el punt 1, i
- una mostra del material de tomàquet o albergínia infectat que s'hagi inoculat amb l'extracte de tubercle o planta si s'escau, i
- el cultiu aïllat de l'organisme.

### ANNEX IV

Els elements de la investigació que disposa l'incís i) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6 han de ser, quan escaigui, els següents:

#### i) els llocs de producció:

- en els quals s'estiguin cultivant o s'hagin cultivat patates que estiguin relacionades clònicament amb aquelles en què s'hagi comprovat la infecció per l'organisme,
- en els quals s'estiguin cultivant o s'hagin cultivat tomàquets que procedeixin de les mateixes fonts que aquells en els quals s'hagi comprovat la infecció per l'organisme,
- en els quals s'estiguin cultivant o s'hagin cultivat patates o tomàquets que estiguin sota control oficial perquè se sospita la presència de l'organisme,
- en els quals s'estiguin cultivant o s'hagin cultivat patates que estiguin relacionades clònicament amb les que hagin estat cultivades en llocs de producció dels quals se sospita la infecció per l'organisme,
- en els quals es cultivin patates o tomàquets i que estiguin localitzats prop dels llocs de producció infectats, inclosos aquells en què es comparteixin equips i instal·lacions de producció directament o per intervenció d'un contractista comú,
- en els quals per a les tasques de reg o aspersió s'utilitzin aigües de superfície de qualsevol font en què s'hagi confirmat o de la qual se sospita la infecció per l'organisme,
- en els quals per a les tasques de reg o aspersió s'utilitzin aigües de superfície d'una font explotada en comú amb llocs de producció en què s'hagi confirmat o dels quals se sospita la infecció per l'organisme,
- que estiguin o hagin estat inundats amb aigües de superfície en les quals s'hagi confirmat o de les quals se sospita la infecció per l'organisme; i

ii) les aigües de superfície que s'utilitzin per al reg o l'aspersió, o per a la inundació, d'un camp o camps o d'un lloc o llocs de producció en què s'hagi confirmat la infecció per l'organisme.

### ANNEX V

1. En determinar, d'acord amb l'incís iii) de la lletra a) i l'incís iii) de la lletra c) de l'apartat 1 de l'article 6, l'abast de la contaminació probable, s'han d'incloure els elements següents, quan sigui procedent:

- el material vegetal indicat obtingut en un lloc de producció que hagi estat declarat contaminat en virtut de l'incís ii) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6,
  - el lloc o els llocs de producció que tinguin una relació de producció amb el material vegetal indicat que hagi estat declarat contaminat en virtut de l'incís ii) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6, inclosos els llocs que comparteixin equips i instal·lacions de producció directament o per intervenció d'un contractista comú,
  - el material vegetal indicat que s'hagi produït en el lloc o els llocs de producció que preveu el guió anterior o que estigui present en aquests llocs durant el temps en què el material vegetal indicat declarat contaminat en virtut de l'incís ii) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6, estigui present en els llocs de producció esmentats en el primer guió,
  - els magatzems que hagin manipulat el material vegetal indicat procedent dels llocs de producció als quals es refereixen els guions anteriors,
  - qualsevol maquinària, vehicle, nau, magatzem o unitats d'aquests i qualssevol altres objectes, inclosos el material d'embalatge, que puguin haver estat en contacte amb el material vegetal indicat declarat contaminat en virtut de l'incís ii) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6,
  - qualsevol material vegetal indicat que hagi estat emmagatzemat o hagi estat en contacte amb qualsevol de les estructures i els objectes esmentats en el guió anterior abans de la seva neteja i desinfecció,
  - com a resultat de la investigació i de les anàlisis que preveu l'incís i) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6: en el cas de les patates, els tubercles o les plantes que tinguin una relació clonal fraterna o parental amb el material vegetal indicat declarat contaminat en virtut de l'incís ii) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6, i que, segons els resultats de la investigació, tinguin probabilitats d'estar contaminats; i, en el cas dels tomàquets, les plantes que procedeixin de les mateixes fonts que el material esmentat i en relació amb les quals, encara que les proves de detecció de l'organisme hagin estat negatius, sembli probable la contaminació per mitjà d'un vincle clonal,
  - el lloc o els llocs de producció del material vegetal indicat a què es refereix el guió anterior,
  - el lloc o els llocs de producció del material vegetal indicat en què per a les tasques de reg o aspersió s'utilitzin aigües que hagin estat declarades contaminades en virtut de l'incís ii) de la lletra c) de l'apartat 1 de l'article 6,
  - el material vegetal indicat produït en camps negats amb aigües de superfície en les quals s'hagi confirmat la infecció per l'organisme.
2. Per a la determinació de la possible propagació a la qual es refereixen l'incís iv) de la lletra a) i l'incís iii) de la lletra c) de l'apartat 1 de l'article 6, s'han de tenir en compte els elements següents:
- i) en els casos que preveu l'incís iv) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6:
    - la proximitat d'altres llocs de producció en què es cultivi el material vegetal indicat,

— la producció i la utilització comunes d'existències de patates de sembra,

— els llocs de producció en què s'utilitzin aigües de superfície per al reg o l'aspersió del material vegetal indicat quan hi hagi risc o hi hagi hagut el risc d'es-correntia o d'inundació d'aigües superficials procedents d'un lloc o uns llocs de producció que hagin estat declarats contaminats en virtut de l'incís ii) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6;

ii) en els casos en què s'hagin declarat contaminades aigües de superfície en virtut de l'incís ii) de la lletra c) de l'apartat 1 de l'article 6:

— el lloc o els llocs productors del material vegetal indicat contigus a les aigües superficials declarades contaminades, o que corrin el risc de ser inundats amb aquestes aigües,

— qualsevol font de reg separada que es comuniqui d'alguna manera amb les aigües superficials declarades contaminades.

3. La notificació a què es refereix el paràgraf primer de l'apartat 2 de l'article 6 ha d'incloure les dades següents:

— la data en què s'hagi tingut notícia de la presumpta presència de l'organisme en virtut de l'article 5 i les dates de la presa de mostres i de la confirmació de la presència d'aquest organisme d'acord amb l'article 6, segons els casos,

— una descripció dels elements de la declaració de contaminació i de la delimitació de zones.

4. La notificació a què es refereix el paràgraf primer de l'apartat 2 de l'article 6 ha d'incloure les dades següents:

— en cas de qualsevol partida o lot de patates declarat contaminat, els documents d'acompanyament que prescriu l'article 7 del Reial decret 2071/1993, el número de passaport o número de registre dels productors de patata, dels magatzems col·lectius i dels centres de distribució, segons escaigui,

— en cas de qualsevol partida o lot de tomaqueres declarat contaminat, els documents d'acompanyament que prescriu l'article 7 del Reial decret 2071/1993 i el número de passaport d'acord amb la llista que recull el punt 2.2 de la secció I de la part A de l'annex V del Reial decret 2071/1993.

— en el cas de les existències de patates de sembra i, si és possible, en tots els altres casos, el nom i la categoria de la varietat,

— qualsevol altra dada que requereixi el Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació relativa al brot confirmat.

## ANNEX VI

1. Respecte a l'apartat 1 de l'article 7, es disposa el següent:

— la incineració,

— la utilització com a pinsos, amb el tractament tèrmic previ adequat, de manera que no hi hagi cap risc de supervivència de l'organisme, o

— l'enterrament profund en un abocador on no hi hagi cap risc de filtració a terres agrícoles ni de contacte amb fonts d'aigua que es puguin utilitzar per a reg d'aquestes terres,

— la transformació industrial, amb l'entrega directa i immediata prèvia del material a una planta de transformació amb instal·lacions que estiguin oficialment autoritzades per a l'eliminació de residus i s'ajustin a les disposicions de l'annex VII d'aquest Reial decret, o,

— altres mesures, sempre que s'hagi establert que no hi ha cap risc identificable de propagació de l'organisme i amb la condició que aquestes mesures s'han de notificar immediatament al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació i aquest, al seu torn, per mitjà de la via corresponent, a la Comissió i als altres estats membres.

2. L'ús adequat o l'eliminació del material vegetal indicat que disposa l'apartat 2 de l'article 7 s'han de fer sota el control dels organismes oficials responsables interessats, amb l'oportuna comunicació entre aquests organismes per garantir en tot moment el control esmentat, i amb l'aprovació de l'organisme oficial de cada comunitat autònoma on s'hagin d'envasar o transformar les patates, pel que fa als abocadors esmentats en els guions primer i segon, i que han de consistir en el següent:

i) en cas dels tubercles de patata:

— l'ús com a patates de consum que s'embalin en llocs amb instal·lacions apropiades per a l'eliminació de residus, llistes per a l'entrega i l'ús directes sense que calgui un nou embalatge, i que es destinin a aquesta entrega i ús directes, o

— l'ús com a patates de consum que es destinin a la transformació industrial i a l'entrega directa i immediata a una planta de transformació amb instal·lacions apropiades per a l'eliminació de residus, o

— algun altre tipus d'ús o eliminació, sempre que s'estableixi que no hi ha cap risc identificable de propagació de l'organisme, i amb l'aprovació prèvia dels esmentats organismes oficials responsables. Aquestes mesures s'han de notificar immediatament al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació i aquest, al seu torn, per mitjà de la via corresponent, a la Comissió i als altres estats membres;

ii) en cas de les altres parts de les plantes, inclosos els detritus de la tija i de les fulles:

— la destrucció, o

— algun altre tipus d'ús o eliminació, sempre que s'estableixi que no hi ha cap risc identificable de propagació de l'organisme i amb la condició que aquell ús o aquella eliminació s'han de notificar al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació i aquest, al seu torn, per mitjà de la via corresponent, a la Comissió i als altres estats membres.

3. Els mètodes adequats per a la descontaminació dels objectes als quals es refereix l'apartat 3 de l'article 7 consisteixen en una neteja i, si s'escau, una desinfecció que permetin descartar qualsevol risc identificable de propagació de l'organisme; aquestes operacions s'han d'efectuar sota la supervisió dels organismes oficials responsables de les comunitats autònomes.

4. La sèrie de mesures esmentades a l'apartat 4 de l'article 7 que s'han d'aplicar dins de la zona o les zones delimitades que s'hagin establert en virtut de l'incís iv) de la lletra a) i de l'incís iii) de la lletra c) de l'apartat 1 de l'article 6 han de ser les següents:

4.1. En els casos en què en virtut de l'incís ii) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6, s'hagin declarat contaminats llocs de producció, les mesures han de consistir en el següent:

a) en els camps o les unitats de producció de cultius protegits que s'hagin declarat contaminats en virtut d'aquesta mateixa disposició:

i) com a mínim durant els quatre anys de cultiu següents a la declaració de la contaminació:

— s'han d'adoptar mesures per eliminar les patates i les tomaqueres espontànies, així com altres plantes

hoste de l'organisme, incloses les males herbes solanàcies;

— no s'han de plantar:

patates ni tubercles de patata,  
tomaqueres i llavors de tomàquet,

— tenint en compte la biologia de l'organisme:

altres plantes hoste,

plantes d'espècies de *Brassica* per a les quals hi hagi un risc identificat de supervivència o propagació de l'organisme,

altres cultius per als quals hi hagi un risc identificat de supervivència o propagació de l'organisme;

— en la primera temporada de cultiu de patates o tomàquets següent al període indicat en el guió anterior i, sempre que s'hagi comprovat que com a mínim durant els dos anys de vegetació immediatament anteriors a la plantació, el camp hagi estat lliure de patates i tomaqueres espontànies i d'altres plantes hoste de l'organisme, incloses les males herbes solanàcies:

en el cas de les patates, s'han de plantar patates de sembra certificades oficialment per a la producció de patates de consum exclusivament, i

s'ha d'efectuar un examen oficial, acompanyat de les anàlisis oportunes, segons disposa l'apartat 1 de l'article 3;

— durant la temporada de cultiu de patates o tomàquets següent a la indicada en el guió anterior i després d'un cycle de rotació adequat, s'ha de procedir, en el cas de les patates, a la plantació de patates de sembra certificades oficialment per a la producció de patates de sembra o de consum i, en el cas de les patates i els tomàquets, a la realització de l'examen oficial que disposa l'apartat 1 de l'article 3; o

ii) durant els cinc anys de cultiu següents al de la declaració de la contaminació:

— s'han d'adoptar mesures per eliminar les patates i les tomaqueres espontànies, així com altres plantes que puguin ser hoste de l'organisme, incloses les males herbes solanàcies, i

— durant els tres primers anys, s'ha de deixar i mantenir el camp, o bé en guaret complet, o bé per al cultiu de cereals, d'acord amb el risc que s'hagi determinat, o bé com a pastura permanent, amb segada intensa i freqüent o pasturatge intensiu, o bé com a pastura per a la producció de llavors i, a continuació, en els dos anys subsegüents, s'han de plantar plantes que no siguin hoste de l'organisme i per a les quals no hi hagi cap risc identificat de supervivència o propagació d'aquest organisme;

— en la primera temporada de cultiu de patates o tomàquets següent al període indicat en el guió anterior:

en el cas de les patates, s'han de plantar exclusivament patates de sembra certificades oficialment per a la producció de patates de sembra o de consum, i s'ha d'efectuar l'examen oficial, acompanyat de les anàlisis oportunes, que disposa l'apartat 1 de l'article 3.

b) en altres camps, les mesures han de consistir en el següent:

— durant l'any de cultiu següent a la declaració de la contaminació:

no s'han de plantar patates ni tubercles de patata ni altres plantes que puguin ser hoste de l'organisme, i s'han d'adoptar mesures per eliminar les patates i les tomaqueres espontànies, així com altres plantes que puguin ser hoste de l'organisme, incloses les males herbes solanàcies, o

en el cas dels tubercles de patata, es poden plantar exclusivament patates de sembra certificades oficialment, per a la producció de patates de consum, amb la condició que els organismes oficials responsables hagin quedat plenament convençuts de l'eliminació de riscos per mitjà de plantes espontànies de patates i tomaqueres i altres hospeders de l'organisme, incloses les males herbes solanàcies; durant la fase de creixement, s'han d'inspeccionar els cultius en els moments oportuns, les patates espontànies s'han de sotmetre a anàlisi per a la possible detecció de l'organisme i, al final, s'han d'inspeccionar els tubercles recollits; en el primer any de cultiu següent a l'indicat en el guió anterior:

en cas de les patates, s'han de plantar exclusivament patates de sembra certificades oficialment per a la producció de patates de sembra o de consum;

com a mínim durant el segon any de cultiu següent a l'indicat en el primer guió:

en el cas de les patates, s'han de plantar per a la producció de patates de sembra o de consum exclusivament patates de sembra certificades oficialment o patates de sembra que s'hagin cultivat sota control oficial a partir de patates de sembra certificades oficialment;

en cadascun dels anys de cultiu indicats en els guions anteriors, s'han d'adoptar mesures per eliminar les patates i les tomaqueres espontànies, així com altres plantes que puguin ser hoste de l'organisme, incloses les males herbes solanàcies; a més a més, s'ha de fer l'examen oficial que disposa l'apartat 1 de l'article 3 i, en els casos en què es plantin patates de sembra per a la producció d'aquell mateix tipus de patates, s'han de sotmetre a anàlisi els tubercles.

c) Immediatament després que s'hagi declarat la contaminació en virtut de l'incís ii) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6, i en cadascun dels anys de cultiu subsegüents fins a, inclusivament, la primera temporada de cultiu permisible de patates o tomàquets en el camp o els camps declarats contaminats que preveu la lletra a) anterior:

— tota la maquinària i les instal·lacions d'emmagatzematge del lloc de producció que s'utilitzin en la producció de patates o tomàquets s'han de netejar i, si s'escau, desinfectar utilitzant mètodes adequats de la manera que disposa el punt 3, i

— amb la finalitat d'impedir la propagació de l'organisme, s'han de fer controls oficials dels plans de reg i aspersió i, si cal, s'han de prohibir.

d) En el cas de les unitats de producció de cultius protegits que hagin estat declarades contaminades en virtut de l'incís ii) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6, i en què sigui possible una substitució total dels mitjans de cultiu:

— no s'han de plantar patates ni tubercles de patata ni altres plantes que puguin ser hoste de l'organisme, incloses les tomaqueres i les llavors de tomàquet, llevat que, d'una banda, aquestes unitats s'hagin sotmès a mesures oficialment supervisades que, tenint com a objecte l'eliminació de l'organisme i la retirada de tot el material vegetal hoste, incloguin, com a mínim, un canvi complet dels mitjans de cultiu i una neteja i, si s'escau, una desinfecció d'aquestes unitats i de tot l'equip i que, d'altra banda, els organismes oficials responsables hagin donat subsegüentment l'autorització per a la producció de patates o tomàquets, i

a més a més, la producció ha de procedir, en el cas de la patata, de patates de sembra certificades oficialment o de minitubercles o microplantas obtinguts de fonts analitzades,

així mateix, amb l'objecte d'impedir la propagació de l'organisme, s'han de fer controls oficials dels plans de reg i aspersió i, si s'escau, s'han de prohibir.

4.2 Dins de la zona delimitada i sens perjudici de les mesures que disposa el punt 4.1, les comunitats autònomes:

a) immediatament després de la declaració de contaminació i durant un període de tres anys de cultiu com a mínim:

aa) en els casos en què la delimitació de la zona s'hagi fet en virtut de l'incís iv) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6:

— garantir que els seus organismes oficials responsables supervisin les instal·lacions que cultivin, emmagatzemin o manipulin tubercles de patata o tomàquets, així com aquelles altres instal·lacions que en el marc d'un contracte utilitzin maquinària per a la producció de patates o tomàquets,

— han d'exigir que la maquinària i els magatzems d'aquelles instal·lacions es netegin i, si s'escau, es desinfectin utilitzant mètodes adequats tal com disposa el punt 3,

— han de requerir que, per a tots els cultius de patata dins de la zona delimitada, es plantin exclusivament llavors certificades o llavors cultivades sota control oficial, i s'efectuï una anàlisi després de recollir els cultius de patates de sembra en llocs de producció determinats com a probablement contaminats segons l'incís iii) de la lletra a) de l'apartat 1 de l'article 6,

— han de disposar que en totes les instal·lacions situades a la zona es manipulin separadament les existències recollides de patates de sembra i les de patates de consum,

— s'ha d'efectuar l'examen oficial que disposa l'apartat 1 de l'article 3;

ab) en els casos en què, en virtut de l'incís ii) de la lletra c) de l'apartat 1 de l'article 6, s'hagin declarat contaminades aigües de superfície o en què, per disposició del punt 2 de l'annex V d'aquest Reial decret, s'hagin inclòs les dites aigües entre els factors de la possible propagació de l'organisme:

— han de fer un examen anual, en els moments oportuns, amb una presa de mostres de les aigües de superfície i de les plantes hoste solanàcies presents en les fonts hídriques pertinents, així com anàlisis d'acord amb:

en el cas del material vegetal indicat, el mètode corresponent que estableix l'annex II d'aquest Reial decret, o

en altres casos, qualsevol altre mètode oficialment autoritzat;

— amb la finalitat d'impedir la propagació de l'organisme, han d'establir controls oficials dels plans de reg i aspersió, així com una prohibició (revisable a la vista dels resultats de l'examen anual damunt dit) de l'ús de les aigües declarades contaminades per al reg i l'aspersió del material vegetal indicat i, si s'escau, d'altres plantes hoste,

— en els casos en què s'hagin contaminat per abocaments de residus líquids, han d'establir controls oficials de l'eliminació dels residus procedents de les instal·lacions industrials de transformació o envasament que manipulin el material vegetal indicat;

b) han d'establir, quan sigui procedent, un programa per a la substitució en un termini adequat de totes les existències de patates de sembra.

## ANNEX VII

Les instal·lacions d'eliminació de residus autoritzades oficialment a què fa referència el quart guió del punt 1 de l'annex VI d'aquest Reial decret han de complir les disposicions que s'indiquen a continuació amb la finalitat d'evitar qualsevol risc de propagació de l'organisme:

i) els residus procedents de la transformació de patates i tomàquets (incloses les patates i els tomàquets rebutjats i les peles), així com qualsevol altre residu sòlid que acompanyi les patates i els tomàquets, s'han d'eliminar:

— mitjançant l'enterrament profund en un abocador on no hi hagi cap risc de filtració en terres agrícoles ni de contacte amb fonts d'aigua que es puguin utilitzar per al reg d'aquestes terres; els residus s'han de conduir directament a l'abocador en les condicions necessàries per evitar qualsevol risc de pèrdua, o

— mitjançant la incineració;

ii) els residus líquids procedents de la transformació que continguin elements sòlids en suspensió s'han de filtrar o s'han de sotmetre a processos de sedimentació per a la separació d'aquests elements. S'han d'eliminar tal com disposa l'incís i).

Per la seva part, els residus líquids s'han de sotmetre a alguna de les mesures següents:

— escalfament a una temperatura mínima de 70 °C com a mínim durant trenta minuts abans de l'eliminació, o

eliminació per un altre sistema que, aprovat oficialment i aplicat sota control oficial, descarti qualsevol risc de contacte dels residus amb terres agrícoles o amb fonts d'aigua que es puguin utilitzar per al reg de terres agrícoles. Les característiques d'aquest sistema han de ser notificades al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació i aquest, al seu torn, per mitjà de la via corresponent, als altres estats membres i a la Comissió.

## CAP DE L'ESTAT

**21567** LLEI 38/1999, de 5 de novembre, d'ordenació de l'edificació. («BOE» 266, de 6-11-1999.)

JUAN CARLOS I

REI D'ESPANYA

A tots els qui vegeu i entengueu aquesta Llei, Sapigueu: Que les Corts Generals han aprovat la Llei següent i jo la sanciono.

### EXPOSICIÓ DE MOTIUS

El sector de l'edificació és un dels sectors econòmics principals, amb repercussions evidents en el conjunt de la societat i en els valors culturals que integren el patrimoni arquitectònic i, no obstant això, no disposa d'una regulació d'acord amb aquesta importància.

Així, la regulació tradicional del sòl contrasta amb la falta d'una configuració legal de la construcció dels edificis, bàsicament establerta a través del Codi Civil i d'una varietat de normes el conjunt de les quals té llacunes serioses en l'ordenació del complex procés de l'edificació, tant respecte a la identificació, les obligacions i les responsabilitats dels agents que hi intervenen, com pel que fa a les garanties per protegir l'usuari.