

6422 ORDRE APA/719/2007, de 15 de març, per la qual es modifiquen els annexos II a VII del Reial decret 1644/1999, de 22 d'octubre, sobre el control de l'organisme nociu denominat *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. («BOE» 74, de 27-3-2007.)

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

La Directiva 98/57/CE del Consell, de 20 de juliol de 1998, sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., estableix les mesures detallades que s'han d'adoptar en el si de la Comunitat per a la lluita contra aquest organisme nociu, i es va incorporar a l'ordenament jurídic espanyol mitjançant el Reial decret 1644/1999, de 22 d'octubre, sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Aquestes mesures tenen com a finalitat localitzar l'organisme i determinar-ne la distribució, impedir-ne l'aparició i, en cas que tingui lloc, evitar que es propagui i combatre'l amb la finalitat d'eradicar-lo.

Tenint en compte que els últims anys el coneixement d'aquesta malaltia i els seus mètodes de detecció i identificació han avançat considerablement i que l'experiència adquirida en el seguiment i la lluita contra aquest organisme aconsellen la revisió de determinades disposicions tècniques relacionades amb les mesures de control, ha estat necessari modificar alguns annexos d'aquesta Directiva amb l'aprovació de la Directiva 2006/63/CE de la Comissió, de 14 de juliol de 2006, per la qual es modifiquen els annexos II a VII de la Directiva 98/57/CE del Con-

sell sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

En conseqüència, mitjançant aquesta Ordre s'incorpora a l'ordenament intern la Directiva 2006/63/CE de la Comissió, de 14 de juliol de 2006, en exercici de la facultat que la disposició final primera del Reial decret 1644/1999, de 22 d'octubre, atribueix al ministre d'Agricultura, Pesca i Alimentació.

En l'elaboració de la present disposició han estat consultades les comunitats autònomes i les entitats representatives dels sectors afectats.

En virtut d'això, dispenso:

Article únic. *Modificació dels annexos II a VII del Reial decret 1644/1999, de 22 d'octubre, sobre el control de Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al.*

Els annexos II a VII del Reial decret 1644/1999, de 22 d'octubre, sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., se substitueixen pels que figuren com a annex de la present Ordre.

Disposició final primera. *Incorporació del dret comunitari al dret nacional.*

Mitjançant aquesta Ordre s'incorpora a l'ordenament intern la Directiva 2006/63/CE de la Comissió, de 14 de juliol de 2006, per la qual es modifiquen els annexos II a VII de la Directiva 98/57/CE del Consell sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

Disposició final segona. *Entrada en vigor.*

La present Ordre entra en vigor el dia 1 d'abril de 2007.

Madrid, 15 de març de 2007.–La ministra d'Agricultura, Pesca i Alimentació, Elena Espinosa Mangana.

ANNEX

Modificació dels annexos II a VII del Reial decret 1644/1999, de 22 d'octubre, sobre el control de l'organisme nociu denominat *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

«ANNEX II

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

ÀMBIT D'APLICACIÓ DEL MÈTODE

El present mètode descriu els diversos procediments relacionats amb:

- i) el diagnòstic de la podridura marró en els tubercles de patata i de la marçiment bacterià en les plantes de patata, tomàquet i altres plantes hoste,
- ii) la detecció de *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) en mostres de tubercles de patata, plantes de patata, tomàquet i altres plantes hoste, aigua i terra,
- iii) la identificació de *R. solanacearum*.

PRINCIPIS GENERALS

Als apèndixs es presenten protocols optimitzats per als diferents mètodes i reactius validats, així com informació detallada per a la preparació de materials de prova i control. A l'apèndix 1 es presenta una llista dels laboratoris que es van incloure en l'optimització i la validació dels protocols.

Tenint en compte que els protocols impliquen la detecció d'un organisme de quarantena i que inclouran la utilització de cultius viables de *R. solanacearum* com a materials de control, és necessari portar a terme els procediments sota condicions de quarantena apropiades, amb instal·lacions adequades d'eliminació de residus i en aplicació de les condicions d'obtenció dels permisos apropiats emesos per les autoritats oficials de quarantena de les plantes.

Els paràmetres de les proves han de garantir una detecció coherent i reproduïble de nivells de *R. solanacearum* en els límits establerts en els mètodes seleccionats.

És imprescindible una preparació precisa dels controls positius.

Així mateix, la realització de proves d'acord amb els nivells requerits implica la utilització dels paràmetres correctes, el manteniment i el calibratge de l'equip, una preservació i manipulació acurada dels reactius i totes les mesures per evitar la contaminació entre les mostres, com per exemple la separació dels controls positius de les mostres d'assaig. S'han d'aplicar normes de control de la qualitat per evitar errors administratius i d'un altre tipus, especialment d'etiquetatge i documentació.

Una sospita de brot, tal com s'esmenta a l'article 5, apartat 2, d'aquest Reial decret, implica l'obtenció d'un resultat positiu de les proves de diagnòstic o selecció efectuades a una mostra tal com especifiquen els diagrames de flux següents. Un resultat positiu en la primera prova de selecció (prova IF, PCR/FISH, aïllament selectiu) s'ha de confirmar amb una segona prova de selecció basada en un principi biològic diferent.

Si la primera prova de selecció proporciona un resultat positiu, aleshores se sospita la contaminació amb *R. solanacearum* i s'ha d'efectuar una segona prova de selecció. Si la segona prova de selecció proporciona un resultat positiu, llavors es confirma la sospita (sospita de presència) i la prova ha de continuar d'acord amb el mètode. Si la segona prova de selecció proporciona un resultat negatiu, llavors es considera que la mostra no està contaminada amb *R. solanacearum*.

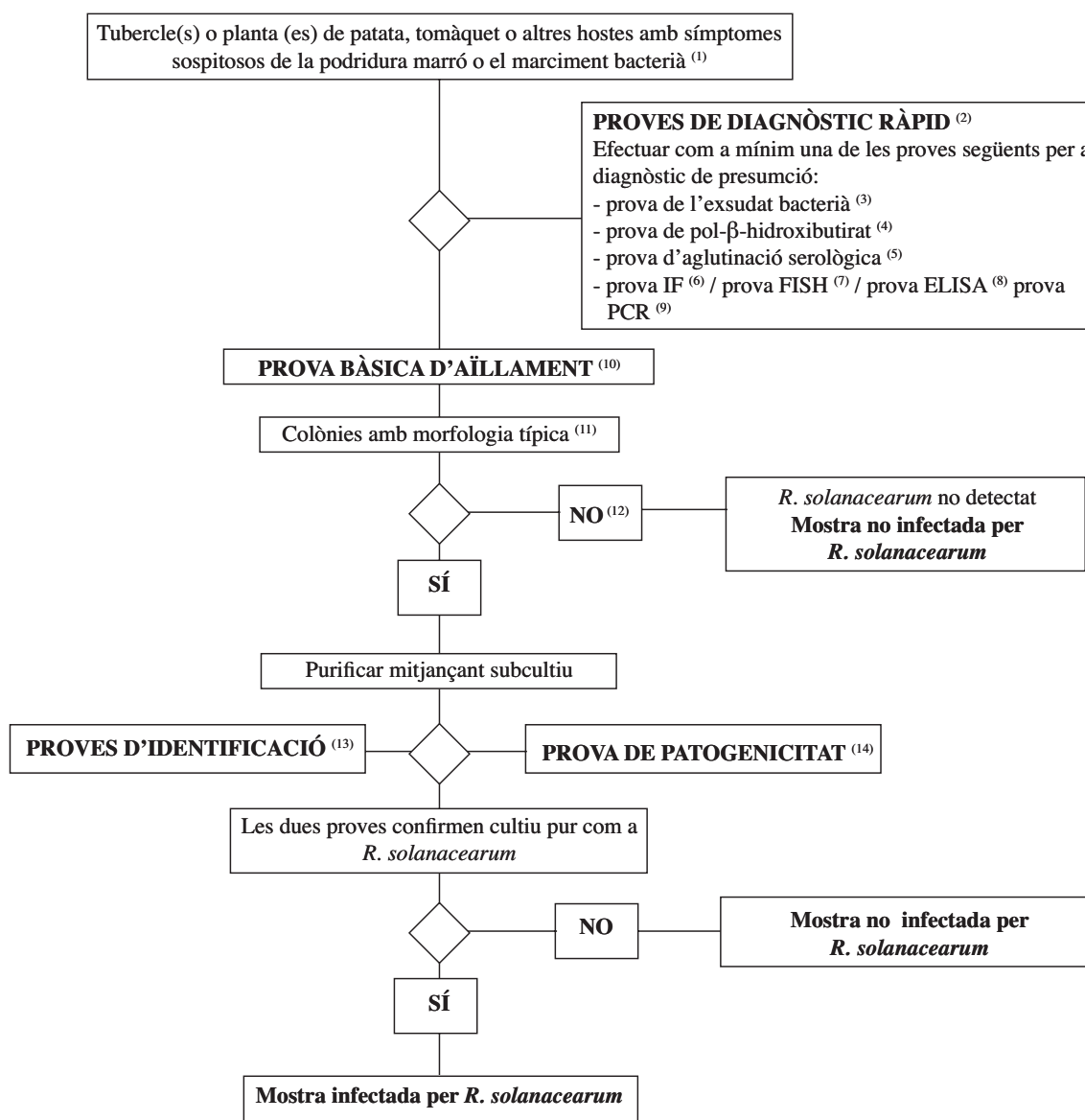
Una presència confirmada, tal com s'esmenta a l'article 6, apartat 1, d'aquest Reial decret, implica l'aïllament i la identificació d'un cultiu pur de *R. solanacearum* amb confirmació de patogenicitat.

SECCIÓ I

APLICACIÓ DEL MÈTODE

1. Mètode de detecció per al diagnòstic de la podridura marró i la marçiment bacterià (*R. solanacearum*) en tubercles de patata i plantes de patata, tomàquet o altres plantes hoste amb símptomes de podridura marró o marçiment bacterià.

El procediment d'anàlisi està destinat als tubercles de patata i a les plantes que presenten símptomes típics de la podridura marró o el marçiment vascular o que permeten la sospita de la seva presència. Inclou una prova de selecció ràpida, l'aïllament del patògen del teixit vascular infectat en un medi (selectiu) i, en cas de resultat positiu, la identificació del cultiu com a *R. solanacearum*.

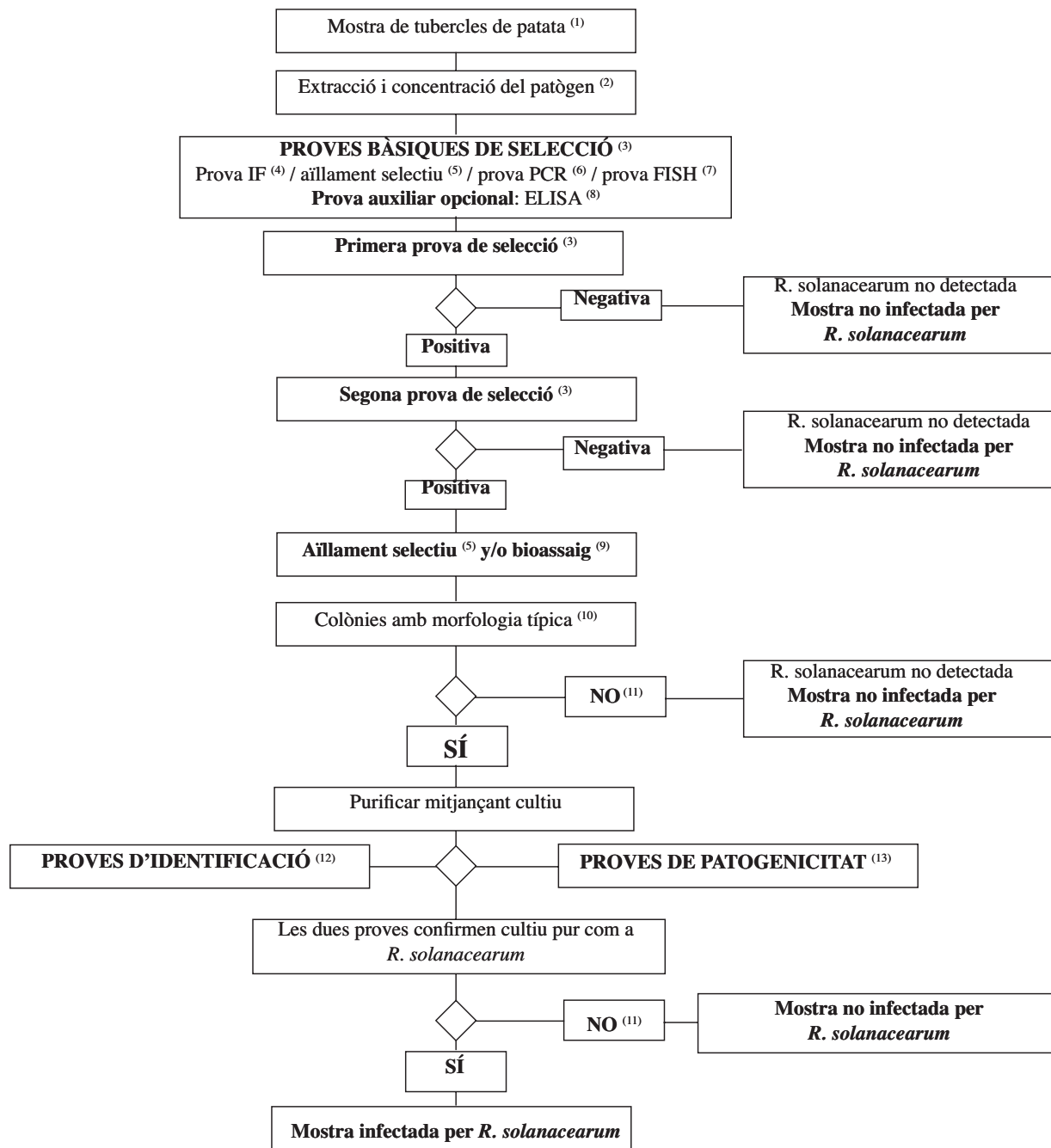


- (1) Per a la descripció dels símptomes, vegeu la secció II.1.
- (2) Les proves de diagnòstic ràpid faciliten el diagnòstic de presumpció, però no són essencials. Un resultat negatiu no garanteix en tots els casos la inexistència del patògen.
- (3) A la secció VI.A.1 es descriu la prova de l'exsudat per al líquid bacterià del teixit vascular de la tija.
- (4) A la secció VI.A.2 es descriu la prova de detecció de grànuls de poli-β-hidroxitiriat en cèl·lules bacterianes.
- (5) A la secció VI.A.3 es descriuen les proves d'aglutinació serològica en líquid bacterià o extractes de teixit simptomàtic.
- (6) A la secció VI.A.5 es descriu la prova IF en líquid bacterià suspès en aigua o extractes de teixit simptomàtic.
- (7) A la secció VI.A.7 es descriu la prova FISH en líquid bacterià suspès en aigua o extractes de teixit simptomàtic.
- (8) A la secció VI.A.8 es descriu la prova ELISA en líquid bacterià suspès en aigua o extractes de teixit simptomàtic.
- (9) A la secció VI.A.6 es descriu la prova PCR en líquid bacterià suspès en aigua o extractes de teixit simptomàtic.
- (10) El patògen sol aïllar-se amb facilitat del material vegetal simptomàtic mitjançant dilució en plaques (secció II.3).
- (11) La morfologia típica de la colònia es descriu a la secció II.3.d.
- (12) L'aïllament pot fallar en estats avançats d'infecció a causa de la competència o l'emascament per bacteris sapròfits. Si els símptomes de la malaltia són els típics, però l'aïllament és negatiu, s'ha de repetir l'aïllament, preferentment valent-se d'una sembra en medi selectiu.
- (13) La identificació fiable de cultius purs possibles aïllats de *R. solanacearum* s'efectua utilitzant les proves que descriu la secció VI.B. La caracterització subespecífica de les soques és optativa, però es recomana en cada nou cas.
- (14) La prova de patogenicitat es descriu a la secció VI.C.

2. Mètode de detecció i identificació de *R. solanacearum* en mostres asimptomàtiques de tubercles de patata
Fonament

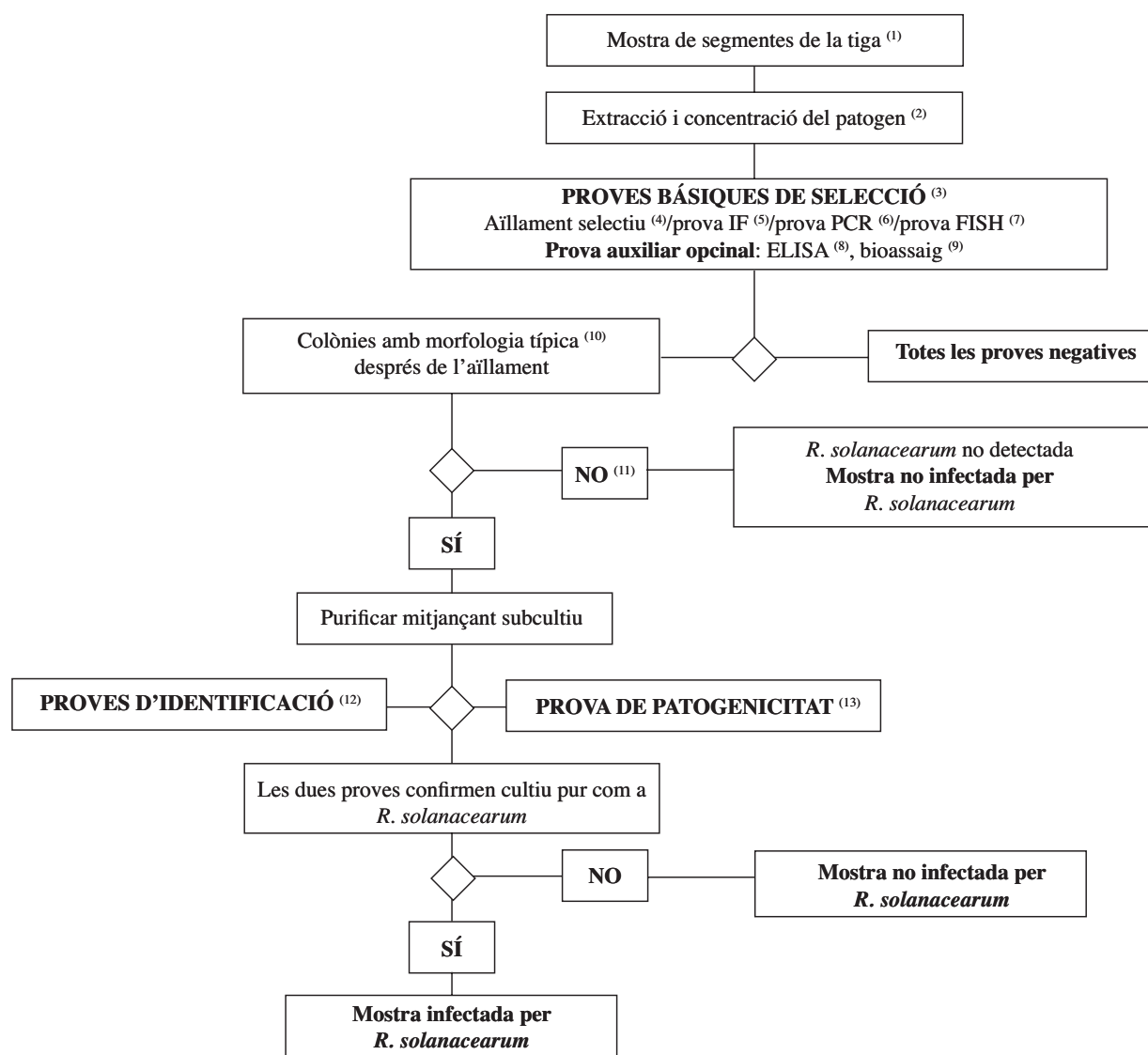
El protocol d'anàlisi té per objecte la detecció d'infeccions latents en tubercles de patata. Un resultat positiu d'un mínim de dues proves de selecció, basades en diferents principis biològics, s'ha de complementar amb l'aïllament del patògen, seguit, en cas d'aïllament de colònies típiques, per la confirmació d'un cultiu pur com a *R. solanacearum*. Un resultat positiu de només una de les proves de selecció no és suficient per considerar la mostra sospitosa.

Les proves de selecció i les proves d'aïllament han de permetre la detecció de 10^3 a 10^4 cèl·lules/ml de precipitat resuspès, incloses com a controls positius en cada sèrie de proves.



- (1) La mida normal de la mostra és de 200 tubercles, encara que el procediment es pot utilitzar amb mostres més petites si no es disposa de 200 tubercles.
- (2) A la secció III.1.1 es descriuen els mètodes d'extracció i concentració de patògens.
- (3) Si un mínim de dues proves basades en diferents principis biològics proporcionen resultats positius, se n'ha de fer l'aïllament i la confirmació. S'ha d'efectuar, com a mínim, una prova de selecció. Quan aquesta prova doni resultats negatius, es considera que la mostra és negativa. En cas que la prova doni resultats positius, s'ha d'efectuar una segona prova de selecció, o algunes més, basades en diferents principis biològics, amb la finalitat de verificar el primer resultat positiu. Si la segona prova o les proves següents proporcionen resultats negatius, la mostra es considera negativa. No cal efectuar altres proves.
- (4) A la secció VI.A.5 es descriu la prova IF.
- (5) A la secció VI.A.4 es descriu la prova d'aïllament selectiu.
- (6) A la secció VI.A.6 es descriuen les proves PCR.
- (7) A la secció VI.A.7 es descriu la prova FISH.
- (8) A la secció VI.A.8 es descriuen les proves ELISA.
- (9) A la secció VI.A.9 es descriu la prova del bioassaig.
- (10) La morfologia típica de la colònia es descriu a la secció II.3.d.
- (11) L'aïllament o els bioassaigs poden fallar a causa de la competència o la inhibició per bacteris sapròfits. Si s'obtenen resultats positius clars en les proves de selecció, però les proves d'aïllament donen resultats negatius, llavors s'han de repetir les proves d'aïllament a partir del mateix precipitat o prenent més teixit vascular a prop de la part basal de tubercles tallats de la mateixa mostra i, en cas que sigui necessari, analitzar-ne altres mostres.
- (12) La identificació fiable de cultius purs aïllats possibles de *R. solanacearum* s'efectua emprant les proves que descriu la secció VI.B.
- (13) La prova de patogenicitat es descriu a la secció VI.C.

3. Mètode de detecció i identificació de *R. solanacearum* en mostres asimptomàtiques de patates, tomàquets i altres plantes hoste



(1) Vegeu la secció III.2.1 per a les mides recomanades de les mostres.

(2) A la secció III.2.1 es descriuen els mètodes d'extracció i concentració de patògens.

(3) Si un mínim de dues proves basades en diferents principis biològics proporcionen resultats positius, se n'ha d'efectuar l'aïllament i la confirmació. S'ha d'efectuar com a mínim una prova de selecció. Quan aquesta prova doni resultats negatius, es considera que la mostra és negativa. En cas que la prova doni resultats positius, s'ha de fer una segona prova de selecció, o algunes més, basades en diferents principis biològics, amb la finalitat de verificar el primer resultat positiu. Si la segona prova o les proves següents proporcionen resultats negatius, la mostra es considera negativa. No cal efectuar altres proves.

(4) A la secció VI.A.4 es descriu la prova d'aïllament selectiu.

(5) A la secció VI.A.5 es descriu la prova IF.

(6) A la secció VI.A.6 es descriuen les proves PCR.

(7) A la secció VI.A.7 es descriu la prova FISH.

(8) A la secció VI.A.8 es descriuen les proves ELISA.

(9) A la secció VI.A.9 es descriu la prova del bioassaig.

(10) La morfologia típica de la colònia es descriu a la secció II.3.d.

(11) L'aïllament o els bioassaigs poden fallar a causa de la competència o la inhibició per bacteris sapròfits. Si s'obtenen resultats positius en les proves de selecció, però les proves d'aïllament donen resultats negatius, llavors s'han de repetir les proves d'aïllament.

(12) La identificació fiable de cultius purs possibles aïllats de *R. solanacearum* s'efectua fent servir les proves descrites a la secció VI.B.

(13) La prova de patogenicitat es descriu a la secció VI.C.

SECCIÓ II

MÈTODES DETALLATS DE DETECCIÓ DE *R. SOLANACEARUM* EN TUBERCLES DE PATATA I PLANTES DE PATATA, TOMÀQUET O ALTRES PLANTES HOSTE AMB SÍMPTOMES DE LA PODRIDURA MARRÓ O EL MARCIMENT BACTERIÀ

1. Símtomes (vegeu el lloc web:
<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

1.1. Símtomes en la patata:

En la planta de la patata. La fase inicial de la infecció en el camp es reconeix per un marciment 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. En les primeres fases del marciment, les fulles segueixen estant verdes, però posteriorment es desenvolupa necrosi marró i esgrogueïment. També es produeix epinàstia. El marciment d'un brot o de plantes senceres es fa ràpidament irreversible i ocasiona el col·lapse i la mort de la planta. El teixit vascular de les tiges de les plantes marcides tallades transversalment acostuma a ser marró, i de la superfície del tall brolla un exsudat mucós bacterià o se'n pot extreure prement la tija. Si es col·loca verticalment una tija tallada en aigua, dels feixos vasculars surten fils viscosos.

En el tubercle de la patata. Els tubercles de patata s'han de tallar transversalment a prop de la part basal (estoló) o bé longitudinalment sobre l'estoló. Posteriorment, el descoloriment vascular adquireix un to marró 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, per les quals poden fluir exsudats bacterians, que fan que s'hi adhereixin partícules de la terra. Poden aparèixer a la pell lesions lleugerament enfonsades de color marró rogenc per causa del col·lapse intern dels teixits vasculars. En les fases avançades de la malaltia és habitual el desenvolupament secundari de podridures toves causades per fongs i bacteris.

1.2. Símtomes en el tomàquet

En la planta del tomàquet. El primer símptoma visible és l'aspecte flàccid de les fulles més joves. En condicions mediambientals favorables per al patogen (temperatures de la terra de 25°C; humitat saturada), en un termini de pocs dies es produeix epinàstia i marciment d'una banda de la planta o de tota sencera, fet que desemboca en un col·lapse total de la planta. En condicions menys favorables (temperatura de la terra per sota de 21°C), es produeix menys marciment, però poden sorgir nombroses arrels adventícies de la tija. En ocasions s'observen estries humides des de la base de la tija, fet que demostra l'existència de necrosi en el sistema vascular.

En tallar la tija transversalment, els teixits vasculars que presenten un descoloriment marró exsuden gotes de líquid bacterià blanc o groguenc.

1.3. Símtomes en altres hostes

Plantes de *Solanum dulcamara* i *S. nigrum*. En condicions naturals, en pocs casos s'observen símptomes de marciment en aquests hostes herbacis, tret que la temperatura de la terra superi els 25°C o els nivells d'inòcul siguin extremadament elevats (per exemple, per al *S. nigrum* que

creix vora plantes malaltes de patates o tomàquets). Quan es produeix el marciment, els símptomes són com els descrits per al tomàquet. Les plantes de *S. dulcamara*, que no es marceixen i que creixen amb tiges i arrels a l'aigua, poden mostrar un descoloriment intern marró clar dels teixits vasculars en una secció transversal de la base de la tija, o de les parts de la tija que hi ha sota l'aigua. Poden fluir bacteris dels teixits vasculars tallats, o formar fils viscosos, si la tija tallada es col·loca verticalment a l'aigua, fins i tot en cas d'inexistència de símptomes de marciment.

2. Proves de selecció ràpida

Les proves de selecció ràpida faciliten el diagnòstic de presumpció, però no són essencials. S'han de fer una o més de les proves validades següents:

2.1. Prova de l'exsudació de la tija (vegeu la secció VI.A.1.)

2.2. Prova de la detecció de grànuls de poli-β-hidroxibutirat (PHB)

Els grànuls de PHB característics en les cèl·lules de *R. solanacearum* es visualitzen tenyint frotis d'exsudat bacterià fixat amb calor procedent de teixit infectat en un portaobjectes amb blau Nil A o negre Sudan B (vegeu la secció VI.A.2).

2.3. Proves d'aglutinació serològica (vegeu la secció VI.A.3.)

2.4. Altres proves

Altres proves de selecció ràpida apropiades inclouen la prova IF (vegeu la secció VI.A.5), la prova FISH (vegeu la secció VI.A.7), les proves ELISA (vegeu la secció VI.A.8) i les proves PCR (vegeu la secció VI.A.6).

3. Procés d'aïllament

a) Agafar exsudació o seccions de teixit decolorat de l'anell vascular del tubercle o dels feixos vasculars de la tija de la planta de patata, de tomàquet o d'altres plantes hoste en procés de marciment. Posar en suspensió en un volum reduït d'aigua destil·lada estèril o en tampó fosfat 50 mM (apèndix 4) i deixar-ho entre cinc i deu minuts.

b) Preparar una sèrie de dilucions decimals de la suspensió.

c) Afegir 50-100 µl de la suspensió i les dilucions en un medi nutritiu general (NA, YPGA o SPA; vegeu l'apèndix 2) i/o en un medi de tetrazole de Kelman (apèndix 2) i/o un medi selectiu validat (per exemple, SMSA; vegeu l'apèndix 2). Estendre o fer-hi 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 de *R. solanacearum* biovar 2 com a control positiu.

d) Incubar les plaques entre dos i sis dies a 28°C.

— En un medi nutritiu general, els aïllats virulents de *R. solanacearum* desenvolupen colònies de color blanc nacrat, planes, irregulars i fluides, que amb freqüència presenten els verticils característics al centre. Les formes avirulentes de *R. solanacearum* formen colònies butiroses petites, rodones i no fluides, que són completament blanques.

— En els medis de tetrazole de Kelman i SMSA, els verticils són de color vermell sang. Les formes avirulentes

de *R. solanacearum* formen colònies butiroses petites, rodones i no fluides, que són totalment de color vermell fosc.

4. Proves d'identificació de *R. solanacearum*

Les proves per confirmar la identitat de presumptes aïllats de *R. solanacearum* es mostren a la secció VI.B.

SECCIÓ III

1. Mètodes detallats de detecció i identificació de *R. solanacearum* en mostres asimptomàtiques de tubercles de patata

1.1. Preparació de la mostra

Nota:

— La mida normal de la mostra és de 200 tubercles. Un mostratge més intensiu requereix més proves en mostres d'aquesta mida. Un nombre superior de tubercles en la mostra produirà inhibició o una interpretació difícil dels resultats. Tanmateix, el procediment es pot aplicar convenientment a mostres de menys de 200 tubercles, quan es disposi de pocs tubercles.

— La validació de tots els mètodes de detecció descrits a continuació es basa en la realització de proves a mostres de 200 tubercles.

— L'extracte de patata descrit a continuació també es pot utilitzar per detectar el bacteri de la necrosi bacteriana de la patata, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Pretractament opcional previ a la preparació de la mostra:

a) incubació de mostres a 25-30°C, fins a un màxim de dues setmanes abans de la realització de la prova, amb la finalitat de fomentar la multiplicació de qualsevol població de *R. solanacearum*;

b) rentar els tubercles. Fer servir desinfectants apropiats (compostos de clor quan s'hagi d'utilitzar la prova PCR a fi d'eliminar l'ADN patògen) i detergents entre cada mostra. Assecar a l'aire els tubercles. Aquest procediment de rentatge és especialment útil (però no obligatori) per a les mostres amb excés de terra i si s'ha de dur a terme una prova PCR o un procediment d'aïllament directe.

1.1.1. Treure l'epidermis de la part basal (estoló) del tubercle amb un bisturí o un ganivet net i desinfectat, de manera que els teixits vasculars quedin a la vista. Extreure amb compte una falca cònica petita de teixit vascular de la part basal i extreure el mínim volum possible de teixit no vascular.

(vegeu el lloc web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Nota: Retirar els tubercles (podrits) que presentin símptomes sospitosos de "podridura marró" i analitzar-los per separat.

Si durant l'extracció de la falca de la part basal s'observen símptomes sospitosos de podridura marró, s'ha d'efectuar una inspecció visual del tubercle, i aquest s'ha de tallar a prop de la part basal. Tot tubercle tallat amb símptomes sospitosos s'ha de guardar durant un mínim de dos dies a temperatura ambient a fi de permetre la suberització i emmagatzemar-lo refrigerat (a 4-10°C) en condicions de quarantena apropiades. Tots els tubercles, inclosos els que presentin símptomes sospitosos, s'han de mantenir d'acord amb el que estableix l'annex III.

1.1.2. Col·locar les falques de la part basal en recipients

no reutilitzables no utilitzats que es puguin tancar i/o segellar (en cas de reutilització dels recipients, s'han de netejar i desinfectar completament utilitzant compostos de clor). És convenient processar les falques immediatament. Si això no és possible, s'han d'emmagatzemar en el recipient, sense afegir-hi cap tampó, refrigerades durant un període màxim de 72 hores o de 24 hores a temperatura ambient.

Processar les falques per un dels mètodes següents:

a) o bé cobrir les falques amb un volum suficient (aproximadament 40 ml) de tampó d'extracció (apèndix 4) i remenar en un agitador rotatori (50-100 rpm) durant quatre hores per sota de 24°C o refrigerades entre 16 i 24 hores,

o bé

b) homogeneïtzar les falques amb un volum suficient (aproximadament 40 ml) de tampó d'extracció (apèndix 4) en una trituradora (per exemple, Waring o Ultra Thurax) o aixafant-les en una bossa de maceració no reutilitzable segellada (per exemple, Stomacher o Bioreba de polítil de gran calibre, 150 mm x 250 mm; esterilitzada per radiació) fent servir un mall de goma o un aparell de trituració adequat (per exemple, Homex).

Nota: Hi ha un elevat risc de contaminació encreuada de mostres quan s'homogeneïtzen utilitzant una trituradora. Cal prendre precaucions a fi d'evitar la generació d'aerosols o l'abocament durant el procés d'extracció. Cal assegurar que per a cada mostra s'empren recipients i ganivets de trituradora esterilitzats. Si s'utilitza la prova PCR, s'ha d'evitar la transferència d'ADN als recipients o a l'aparell de trituració. Si s'utilitza PCR, es recomana aixafar el material en bosses d'un sol ús i fer servir tubs no reutilitzables.

1.1.3. Es decanta el sobrenedant. Si és massa tèrbol, s'ha de clarificar amb una centrifugació a baixa velocitat (no més de 180 g durant deu minuts a una temperatura entre 4-10°C) o mitjançant filtració al buit (40-100 µm), rentant el filtre amb tampó d'extracció addicional (10 ml).

1.1.4. Concentrar els bacteris per centrifugació a 7.000 g durant 15 minuts (o 10.000 g durant deu minuts) a una temperatura entre 4-10°C i descartar el sobrenedant sense pertorbar el sediment.

1.1.5. Resuspendre el precipitat en 1,5 ml de tampó de precipitat (apèndix 4). Utilitzeu 500 µl per a proves de *R. solanacearum*, 500 µl per a *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* i 500 µl per a referència. Afegir-hi glicerol estèril a la concentració final de 10-25% (v/v) als 500 µl de l'aliquota de referència i a la restant alíquota de prova, barrejar i emmagatzemar a una temperatura compresa entre -16°C a -24°C (setmanes) o entre -68°C a -86°C (mesos). Mantenir les alíquotes de prova entre 4-10°C durant la prova.

No s'aconsella congelar-ho i descongelar-ho repetidament.

Si s'ha de transportar l'extracte, s'ha de lliurar en un recipient fred en un termini de 24 a 48 hores.

1.1.6. És d'una importància capital tractar per separat tots els controls i mostres positius de *R. solanacearum* per evitar la contaminació. Això s'aplica als portaobjectes IF i a totes les proves.

1.2. Anàlisis

Vegeu el diagrama de flux i la descripció de les proves i els protocols optimitzats als apèndixs pertinents:

Aïllament selectiu (vegeu la secció VI.A.4)

Prova IF (vegeu la secció VI.A.5)

Proves PCR (vegeu la secció VI.A.6)

Prova FISH (vegeu la secció VI.A.7)
Proves ELISA (vegeu la secció VI.A.8)
Bioassaig (vegeu la secció VI.A.9)

2. Mètodes detallats de detecció i identificació de *R. solanacearum* en mostres asimptomàtiques de patates, tomàquets i altres plantes hoste

2.1 Preparació de la mostra

Nota: Per a la detecció de poblacions latents de *R. solanacearum* s'aconsella sotmetre mostres mixtes a prova. El procediment es pot aplicar convenientment a mostres mixtes de fins a 200 parts de la tija. Quan s'efectuïn exàmens, s'han de basar en una mostra estadísticament representativa de la població de plantes investigada.

2.1.1. Col·locar segments de tija d'1-2 cm en un recipient estèril tancat d'acord amb els procediments de mostratge següents:

Plàntules de tomàquet de viver: amb un ganivet net i desinfectat, tallar un segment d'1 cm de la base de cada tija, just per damunt del nivell de la terra.

Plantes de tomàquet conreades en el camp o en un hivernacle: amb un ganivet net i desinfectat, arrencar el brot lateral més inferior de cada planta tallant just per damunt de la unió amb la tija principal. Tallar un segment d'1 cm de l'extrem inferior de cada brot lateral.

Altres hostes: amb un ganivet net i desinfectat o amb tisores de podar, tallar un segment d'1 cm de la base de cada tija, just per damunt del nivell de la terra. En el cas de *S. dulcamara* o d'altres plantes hoste que creixen a l'aigua, tallar seccions d'1-2 cm de les tiges sota l'aigua o estolons amb arrels aquàtiques.

Quan es mostregi un lloc específic, es recomana analitzar una mostra estadísticament representativa d'un mínim de deu plantes per punt de mostratge de cada hoste herbaci potencial. La detecció del patogen serà més fiable al final de la primavera, a l'estiu i a la tardor, encara que les infeccions naturals es poden detectar durant tot l'any a *Solanum dulcamara* perenne que creix en els cursos d'aigua. Els hostes coneguts inclouen plantes de patata espontànies (*ground-keepers*), *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* i altres membres de la família *Solanaceae*. Altres hostes són *Pelargonium* spp. i *Portulaca oleracea*. Entre les espècies herbàcies europees que poden albergar potencialment poblacions de *R. solanacearum* biovar 2/raça 3 en arrels i/o rizosferes, en condicions mediambientals específiques, s'inclouen: *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans.*, *Tussilago farfara* i *Urtica dioica*.

Nota: Es pot efectuar en aquest moment l'examen visual per detectar símptomes interns (coloració vascular o líquid bacterià). Retirar tots els segments de la tija amb símptomes i analitzar-los per separat (vegeu la secció II).

2.1.2. Desinfectar breument els segments de la tija amb etanol al 70% i assecar immediatament amb un mocador de paper. A continuació, processar els segments de la tija mitjançant un dels procediments següents:

a) cobrir els segments amb un volum suficient (aproximadament 40 ml) de tampó d'extracció (apèndix 4) i remenar en un agitador rotatori (50-100 rpm) durant quatre hores per sota de 24°C o refrigerats entre 16 i 24 hores, o bé

b) processar immediatament aixafant els segments en una bossa de maceració resistent (per exemple, Stomacher o Bioreba) amb un volum apropiat de tampó d'extracció (apèndix 4) fent servir un mall de goma o un aparell de trituració adequat (per exemple, Homex). Si no és possible, emmagatzemar els segments de la tija refrigerats durant un màxim de 72 hores o un màxim de 24 hores a temperatura ambient.

2.1.3. Rebutjar el sobrenedant després de 15 minuts de sedimentació.

2.1.4. No sol ser necessària una altra clarificació de l'extracte o la concentració de la fracció bacteriana, però es pot aconseguir per filtració i/o centrifugació tal com descriu la secció III.1.1.3 a 1.1.5.

2.1.5. Dividir l'extracte de la mostra pura o concentrada en dues parts iguals. Mantenir una meitat entre 4 i 10°C durant l'anàlisi i emmagatzemar l'altra meitat amb glicerol estèril al 10-25% (v/v) entre -16°C i -24°C (setmanes) o entre -68°C i -86°C (mes) en cas que s'hagin d'efectuar noves proves.

2.2. Anàlisis

Vegeu el diagrama de flux i la descripció de les proves i els protocols optimitzats en els apèndixs pertinents:

Aïllament selectiu (vegeu la secció VI.A.4)

Prova IF (vegeu la secció VI.A.5)

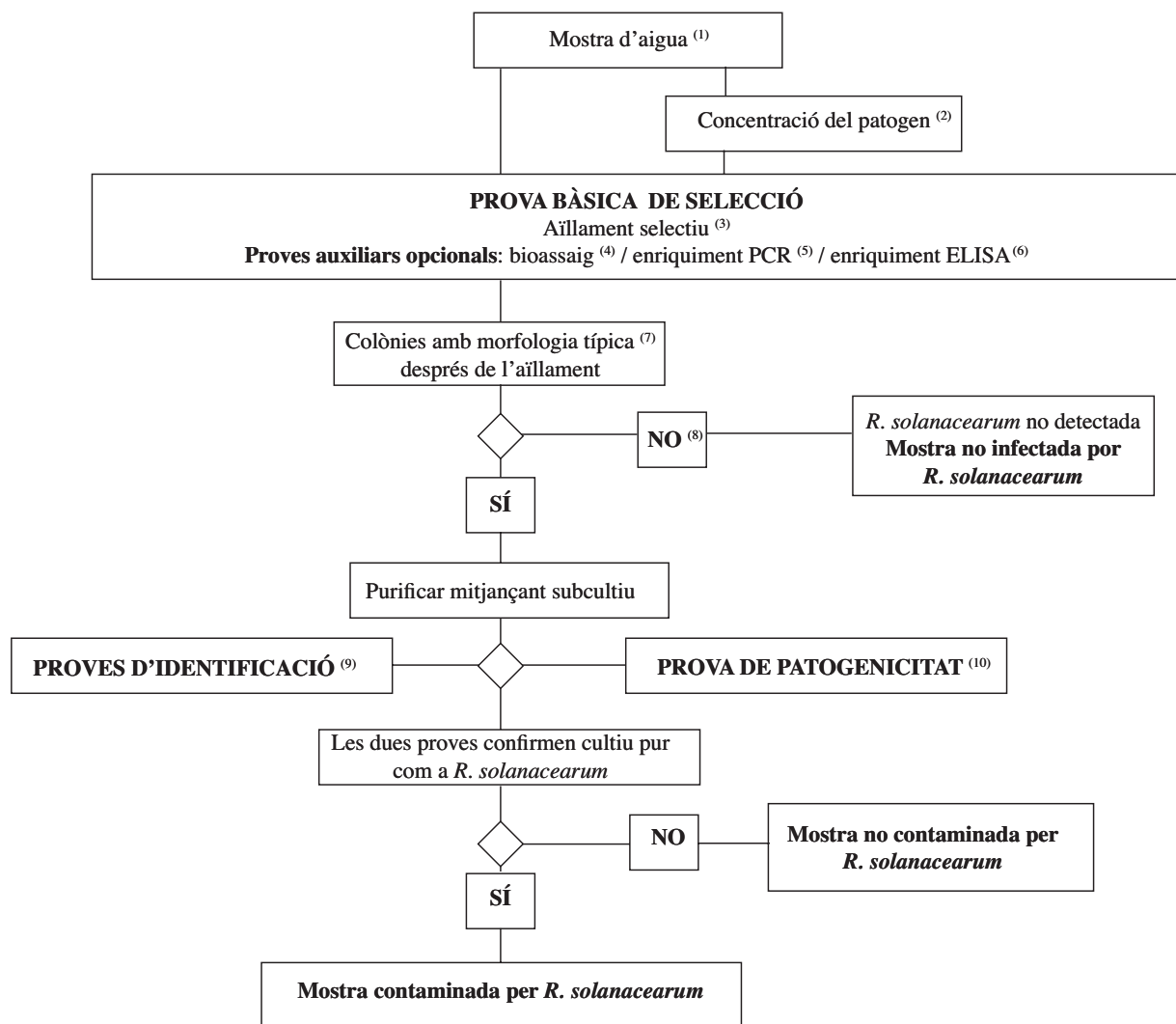
Proves PCR (vegeu la secció VI.A.6)

Prova FISH (vegeu la secció VI.A.7)

Proves ELISA (vegeu la secció VI.A.8)

Bioassaig (vegeu la secció VI.A.9)

SECCIÓ IV

1. Esquema del mètode de detecció i identificació de *R. solanacearum* a l'aigua

(1) Vegeu la secció IV.2.1 per a les mides recomanades de les mostres.

(2) A la secció IV.2.1 es descriuen els mètodes de concentració de patògens. La concentració incrementa les poblacions de patògens i de bacteris sapròfits competidors, i únicament es recomana si no provoca una inhibició de la prova d'aïllament.

(3) A la secció VI.A.4 es descriu la prova d'aïllament selectiu.

(4) A la secció VI.A.9 es descriu la prova del bioassaig.

(5) A les seccions VI.A.4.2 i VI.A.6 es descriuen els mètodes d'enriquiment PCR.

(6) A les seccions VI.A.4.2 i VI.A.8 es descriuen els mètodes d'enriquiment ELISA.

(7) La morfologia típica de la colònia es descriu a la secció II.3.d.

(8) L'aïllament pot fallar a causa de la competència o la inhibició per bacteris sapròfits. Si se sospita que una elevada població sapròfita afecta la fiabilitat de l'aïllament, llavors cal repetir les proves d'aïllament després de la dilució de la mostra en aigua estèril.

(9) La identificació fiable de cultius purs possibles aïllats de *R. solanacearum* s'efectua utilitzant les proves descrites a la secció VI.B.

(10) La prova de patogenicitat es descriu a la secció VI.C.

2. Mètodes de detecció i identificació de *R. solanacearum* a l'aigua

Principi

El mètode validat de detecció que es descriu en la present secció és aplicable a la detecció del patogen en mostres d'aigües superficials i es pot aplicar, així mateix, a les mostres per a anàlisi del procés de transformació de la patata o d'aigües residuals. No obstant això, és important assenyalar que la sensibilitat previsible de la detecció variarà en funció del substrat. La sensibilitat de la prova d'aïllament està afectada per les poblacions de bacteris sapròfits competidors, que són generalment molt superiors en el procés de transformació de la patata i les aigües residuals que en les aigües superficials. Si bé s'espera que el mètode que es descriu a continuació només detecti 10^3 cèl·lules per litre d'aigües superficials, la sensibilitat de la detecció en el procés de transformació de la patata o les aigües residuals serà molt menor amb tota probabilitat. Per aquest motiu, es recomana analitzar les aigües residuals després de qualsevol tractament de purificació (per exemple, sedimentació o filtració), durant el qual les poblacions de bacteris sapròfits es redueixen. S'han de tenir en compte les limitacions de sensibilitat del mètode de prova a l'hora d'avaluar la fiabilitat de qualsevol resultat negatiu obtingut. Si bé s'ha utilitzat amb èxit aquest mètode en treballs d'investigació per determinar la presència o l'absència del patogen en les aigües superficials, s'han de tenir en compte les seves limitacions quan s'empri en investigacions similars del procés de transformació de la patata o d'aigües residuals.

2.1. Preparació de la mostra

Nota:

— La detecció de *R. solanacearum* en les aigües superficials és més fiable al final de la primavera, a l'estiu i a la tardor, quan la temperatura de l'aigua supera els 15°C.

— Un mostratge repetit en diferents moments durant els períodes esmentats en punts de mostratge designats incrementa la fiabilitat de la detecció en reduir els efectes de la variació climàtica.

— S'han de tenir en compte els efectes de les fortes precipitacions i la geografia del curs d'aigua a fi d'evitar que es produeixin importants efectes de dilució que puguin ocultar la presència del patogen.

— Prendre mostres d'aigua superficial vora les plantes hoste si aquests hostes hi són presents.

2.1.1. Recollir mostres d'aigua en punts de mostratge seleccionats omplint ampolles o tubs estèrils no reutilitzables, a una profunditat, si és possible, per sota de 30 cm i a 2 m de la riba. Per als efluents resultants de la transformació de la patata i les aigües residuals, recollir mostres en el punt d'abocament de les aigües residuals. Es recomanen les mostres de fins a 500 ml per punt de mostratge. Si es prefereixen mostres més petites, s'aconsella prendre mostres com a mínim en tres ocasions per punt de mostratge, cadascuna de les quals consistirà en dues submostres duplicades d'un mínim de 30 ml. Per a un treball d'investigació intensiu, cal seleccionar com a mínim tres punts de mostratge per 3 km de curs d'aigua i assegurar-se que també es prenen mostres en els afluents que desemboquen en el curs d'aigua.

2.1.2. Transportar les mostres en un entorn fresc i fosc (4-10°C) i analitzar-les en un termini de 24 hores.

2.1.3. Si és necessari, es pot concentrar la fracció bacteriana fent servir un dels mètodes següents:

a) centrifugar 30-50 ml de submostres de 10.000 g durant deu minuts (o 7.000 g durant 15 minuts), preferiblement a 4-10°C, descartar el sobrenedant i resuspendre el precipitat en 1 ml de tampó de precipitat (apèndix 4);

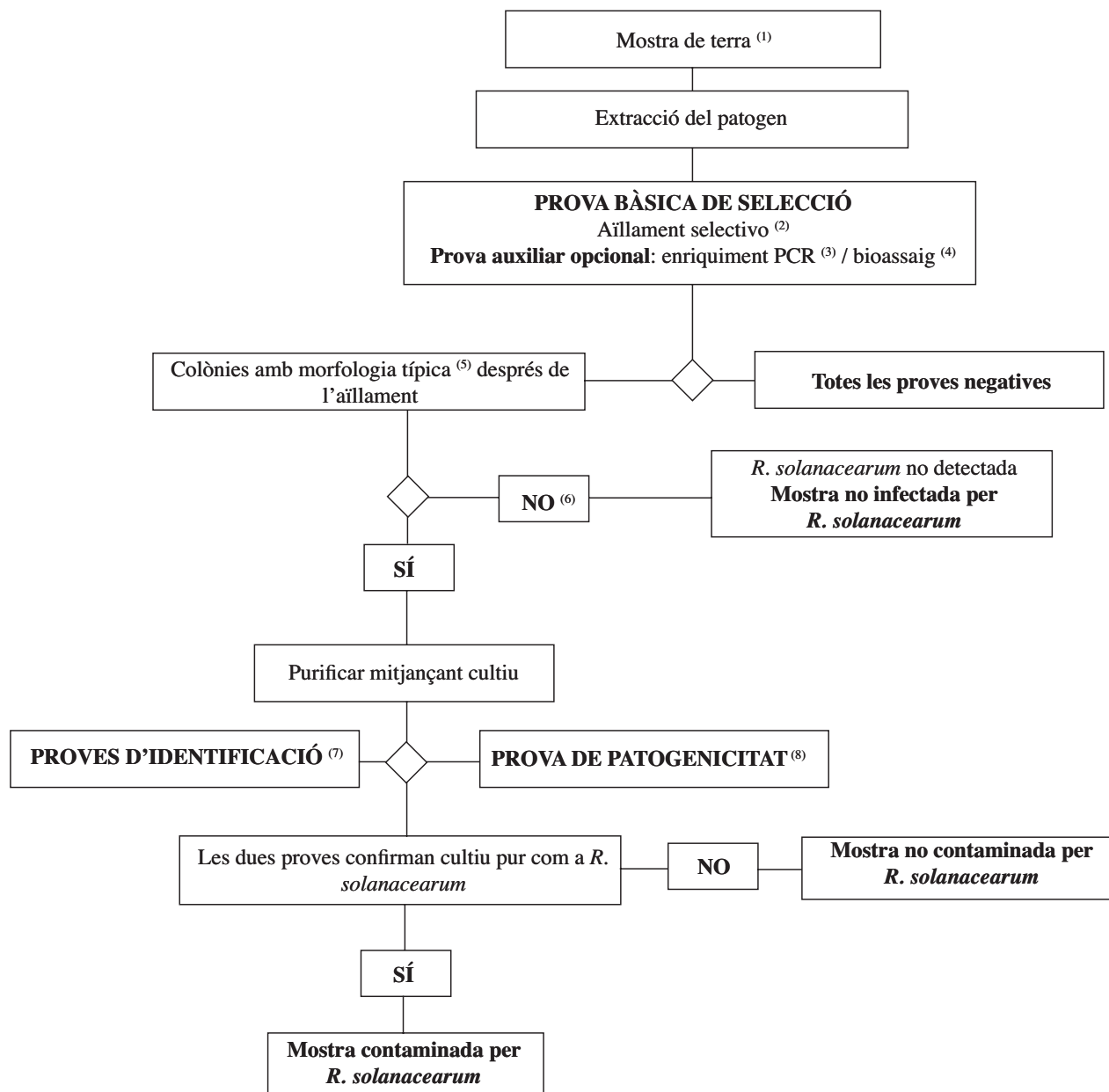
b) filtració per membrana (mida mínima dels porus de 0,45 µm) i a continuació rentatge del filtre en 5-10 ml de tampó de precipitat i retenció dels rentatges. Aquest mètode és adequat per a grans volums d'aigua que continguin baixos nivells de sapròfits.

No se sol aconsellar la concentració per a mostres del procés de transformació de la patata o d'aigües residuals, ja que unes poblacions més grans de bacteris sapròfits competidors inhibirien la detecció de *R. solanacearum*.

2.2. Anàlisi

Vegeu el diagrama de flux i la descripció de les proves en els apèndixs pertinents.

SECCIÓ V

1. Esquema del mètode de detecció i identificació de *R. solanacearum* en la terra

(1) Vegeu la secció V.2.1 per a les mides recomanades de les mostres.

(2) A la secció VI.A.4 es descriu la prova d'aïllament selectiu.

(3) A les seccions VI.A.4.2 i VI.A.6 es descriuen els mètodes d'enriquiment PCR.

(4) A la secció VI.A.9 es descriu la prova del bioassaig.

(5) La morfologia típica de la colònia es descriu a la secció II.3.d.

(6) L'aïllament pot fallar a causa de la competència o la inhibició per bacteris sapròfits. Si se sospita que una elevada població sapròfita afecta la fiabilitat de l'aïllament, llavors cal repetir les proves d'aïllament després de la dilució de la mostra.

(7) La identificació fiable de cultius purs possibles aïllats de *R. solanacearum* s'efectua utilitzant les proves descrites a la secció VI.B.

(8) La prova de patogenicitat es descriu a la secció VI.C.

2. Mètodes de detecció i identificació de *R. solanacearum* en la terra

Principis

El mètode validat de detecció que descriu la present secció és aplicable a la detecció del patògen en mostres de terra, però també es pot utilitzar per analitzar mostres de residus sòlids de la transformació de la patata o de fang de depuradora. No obstant això, cal assenyalar que aquests mètodes no són prou sensibles per assegurar la detecció de poblacions petites i/o irregularment distribuïdes de *R. solanacearum* que hi pot haver en mostres naturalment infectades d'aquests substrats.

S'han de tenir en compte les limitacions de sensibilitat d'aquest mètode de prova a l'hora d'avaluar la fiabilitat de qualsevol resultat negatiu obtingut, així com quan s'empri en investigacions per determinar la presència o absència del patògen en la terra o en el fang. El mètode més fiable per determinar la presència del patògen en la terra del camp és plantar-ne un possible hoste i supervisar si es produeix infecció, però fins i tot amb aquest mètode no es detectaran nivells baixos de contaminació.

2.1. Preparació de la mostra

2.1.1. El mostratge de la terra del camp ha de seguir els principis habituals utilitzats per al mostratge de nematodes. Per mostrejar 0,3 ha, cal recollir mostres de 0,5 a 1 kg de terra en 60 punts a una profunditat de 10 a 20 cm (o d'una quadrícula de 7 x 7 metres). Si se sospita la presència del patògen, incrementar el nombre de punts de recollida a 120 per 0,3 ha. Mantenir les mostres a una temperatura compresa entre 12°C i 15°C abans de l'anàlisi. Prendre mostres de la transformació de la patata i de fang de depuradora, recollint un total d'1 kg de llocs que representin el volum total de fang que s'analitzarà. Barrejar adequadament cada mostra abans de l'anàlisi.

2.1.2. Dispersar submostres de 10 a 25 g de terra o fang mitjançant agitació rotatòria (250 rpm) en 60-150 ml de tampó d'extracció (apèndix 4) durant un màxim de dues hores. En cas que sigui necessari, afegir-hi 0,02% de Tween-20 estèril i de 10 a 20 g de grava estèril pot contribuir a la dispersió.

2.1.3. Mantenir la suspensió a 4°C durant l'anàlisi.

2.2. Anàlisi

Vegeu el diagrama de flux i la descripció de les proves en els apèndixs pertinents.

SECCIÓ VI

PROTOCOLS OPTIMITZATS PER A LA DETECCIÓ I IDENTIFICACIÓ DE *R. solanacearum*

A. PROVES DE DIAGNÒSTIC I DETECCIÓ

1. Prova de l'exsudació de la tija

La presència de *R. solanacearum* en tiges de patata, tomàquet o altres plantes hoste marcides es pot observar mitjançant la senzilla prova de presumpció que s'indica a continuació: tallar la tija just per damunt del nivell de la terra. Suspènere la superfície del tall en un tub d'aigua neta. Observar si es produeix la característica exsudació esponjània de fils de flux bacterià dels feixos vasculars tallats uns quants minuts després.

2. Prova de la detecció de grànuls de poli-β-hidroxi-butirat

1. Preparar un frotis d'exsudació bacteriana procedent del teixit infectat o d'un cultiu de 48 hores en un medi YPGA o SPA (apèndix 2) en un portaobjectes.

2. Preparar frotis de control positius d'una soca de biovar 2 de *R. solanacearum* i, si es considera útil, un frotis de control negatiu d'un PHB sp. negatiu conegut.

3. Deixar que s'assequi a l'aire i passar amb rapidesa diverses vegades per la flama la cara inferior del portaobjectes per fixar els frotis.

4. Tenyir el preparat amb blau Nil A o negre Sudan B i observar microscòpicament tal com es descriu a continuació.

Prova del blau Nil

a) Banyar cada portaobjectes amb una solució aquosa de blau Nil A a l'1% i incubar durant deu minuts a 55°C.

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

c) Banyar el frotis amb àcid acètic aquós al 8% i incubar durant un minut a temperatura ambient.

d) Rentar suaument sota l'aixeta durant uns instants. Eliminar l'aigua sobrant amb un mocador de paper.

e) Rehumitejar amb una gota d'aigua i tapar amb un cobreobjectes.

f) Examinar el frotis tenyit amb un microscopi epifluorescent a 450 nm amb gota d'oli d'immersió, a 600-1.000 augments, fent servir un objectiu d'immersió en oli o aigua.

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

Prova del negre Sudan

a) Banyar cada portaobjectes amb una solució aquosa de negre Sudan B al 0,3% en etanol al 70% i incubar durant deu minuts a temperatura ambient.

b) Escórrer la solució de tenyiment i rentar suaument amb aigua de l'aixeta durant uns instants, eliminant l'aigua sobrant amb un mocador de paper.

c) Submergir breument els portaobjectes en xilol i eixugar amb un mocador de paper. *Atenció! el xilol és nociu, s'han de prendre les precaucions de seguretat necessàries i s'ha de treballar en una campana extractora de fums.*

d) Banyar el frotis amb safranina aquosa al 0,5% (p/v) i deixar-ho durant deu minuts a temperatura ambient. *Atenció! la safranina és nociva, s'han de prendre les precaucions de seguretat necessàries i s'ha de treballar en una campana extractora de fums.*

e) Rentar suaument sota l'aixeta durant uns instants, eixugar amb un mocador de paper i tapar amb un cobreobjectes.

f) Examinar els frotis tenyits amb un microscopi òptic que utilitzi llum transmesa amb oli d'immersió, a 1.000 augments, fent servir un objectiu d'immersió en oli.

g) Observar si els grànuls de PHB de les cèl·lules de *R. solanacearum* es tenyeixen de negre blavós amb un tenyiment rosaci de les parets de les cèl·lules.

3. Proves d'aglutinació serològica

La millor manera d'observar l'aglutinació de cèl·lules de *R. solanacearum* en líquid bacterià o extractes de teixit simptomàtic és utilitzant anticossos validats (vegeu l'apèndix 3) etiquetats amb marcadors acolorits apropiats, com ara cèl·lules vermelles de *Staphylococcus aureus* o partícules acolorides de làtex. Si s'utilitza un equip comercialitzat (vegeu l'apèndix 3), cal seguir les instruccions del fabricant. En cas contrari, s'ha d'aplicar el procediment següent:

- barrejar gotes d'una suspensió d'anticossos etiquetats i líquid bacterià (d'aproximadament 5 µl) en vasos de portaobjectes de vasos múltiples;
- preparar controls positius i negatius emprant suspensions de *R. solanacearum* biovar 2 i una soca heteròloga;
- observar si es produeix aglutinació en les mostres positives després de remenar-les suaument durant 15 segons.

4. Aïllament selectiu

4.1. Sembrar en medi selectiu

Nota: Abans d'utilitzar aquest mètode per primera vegada, s'han d'efectuar proves preliminars a fi de garantir una detecció reproduïble de 10^3 a 10^4 unitats formadores de colònies de *R. solanacearum* per ml afegit a extractes de mostres que anteriorment hagin donat resultats negatius.

Utilitzar un medi selectiu validat adequat com ara SMSA (modificat per Elphinstone et al., 1996; vegeu l'apèndix 2).

Cal diferenciar *R. solanacearum* d'uns altres bacteris que poden desenvolupar colònies en el medi. A més, les colònies de *R. solanacearum* poden mostrar morfologies atípiques si les plaques estan superpoblades o si també contenen bacteris antagonistes. Quan se sospiti l'existència d'efectes la competència o l'antagonisme, s'ha de tornar a analitzar la mostra amb un altre mètode.

Per aconseguir la màxima sensibilitat amb aquest mètode, s'han d'emprar extractes preparats de mostres recent. Però aquest mètode també es pot aplicar a extractes que s'hagin emmagatzemat amb glicerol entre -68°C i -86°C .

Com a controls positius, preparar dilucions decimals d'una suspensió de 10^6 cfu per ml d'una soca virulenta biovar 2 de *R. solanacearum* (per exemple, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Per evitar tota possibilitat de contaminació, preparar controls positius totalment separats de les mostres que s'analitzaran.

S'ha d'examinar l'adequació per al creixement del patògen de cada lot acabat de preparar d'un medi selectiu abans d'utilitzar-lo per analitzar mostres rutinàries.

Processar el material de control de la mateixa manera que la mostra o mostres.

4.1.1. Aplicar una tècnica de dilució en plaques apropiada a fi de garantir la dilució de qualsevol població sapròfita formadora de colònies que hi pugui haver. Estendre 50-100 µl per placa d'extracte de mostra i de cada dilució.

4.1.2. Incubar les plaques a 28°C . Llegir les plaques 48 hores després, i posteriorment diàriament fins a un màxim de sis dies. Les colònies típiques de *R. solanacearum* en el medi SMSA són de color blanc lletós, planes, irregulars i

fluides i, després de tres dies d'incubació, es tornen de color rosa a vermell sang al mig amb ratlles o espirals internes (vegeu el lloc web:

<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Nota: En alguns casos es formen colònies atípiques de *R. solanacearum* en aquest medi. Poden ser petites, rodones, completament vermelles i no fluides, o només parcialment fluides i, per tant, difícils de distingir dels bacteris sapròfits formadors de colònies.

4.1.3. Purificar les presumptes colònies de *R. solanacearum* després de l'estriament o la dilució en plaques en un medi nutritiu general a fi d'obtenir colònies aïllades (vegeu l'apèndix 2).

4.1.4. Emmagatzemar els cultius a curt termini en aigua estèril (pH 6-8, sense clor) a temperatura ambient en la foscor, o a llarg termini en un medi crioprotector adequat entre -68°C i -86°C o liofilitat.

4.1.5. Identificar els presumptes cultius (vegeu la secció VI. B) i efectuar una prova de patogenicitat (vegeu la secció VI. C).

Interpretació dels resultats de la sembra en medi selectiu

La sembra en medi selectiu és negativa si no s'observen colònies bacterianes al cap de sis dies es troben presumptes colònies típiques de *R. solanacearum*, sempre que no hagi sospites d'inhibició produïda per la competència o antagonisme d'altres bacteris i que en els controls positius hi hagi colònies típiques de *R. solanacearum*.

La sembra en medi selectiu és positiva si s'aïllen presumptes colònies de *R. solanacearum*.

4.2. Procediment d'enriquiment

Utilitzar un medi d'enriquiment validat com el caldo Wilbrink modificat (vegeu l'apèndix 2).

Aquest procediment es pot utilitzar per incrementar selectivament les poblacions de R. solanacearum en extractes de mostres i incrementar la sensibilitat de la detecció. Així mateix, aquest procediment dilueix efectivament els inhibidors de la reacció PCR (1:100). Tanmateix, s'ha d'assenyalar que l'enriquiment de R. solanacearum pot fallar a causa de la competència o l'antagonisme d'organismes sapròfits, que en molts casos s'enriqueixen simultàniament. Per aquest motiu, l'aïllament de R. solanacearum a partir de cultius de caldos enriquits pot resultar difícil. A més, per tal com es poden incrementar les poblacions de sapròfits serològicament afins, es recomana la utilització d'anticossos monoclonals específics en comptes d'anticossos policlonals quan s'apliqui la prova ELISA.

4.2.1. Per a l'enriquiment PCR, transferir 100 µl d'extracte de mostres a 10 ml de caldo d'enriquiment (apèndix 2) prèviament al·lucotats en tubs o matrassos sense ADN. Per a l'enriquiment ELISA, es poden utilitzar proporcions més elevades d'extracte de mostres en el caldo (per exemple, 100 µl en 1,0 ml de caldo d'enriquiment).

4.2.2. Incubar durant 72 hores entre 27°C i 30°C en un cultiu remenat o en un cultiu estàtic mantenint el tap del tub sense prémer perquè hi hagi aireig.

4.2.3. Barrejar adequadament abans de fer-lo servir en les proves ELISA o PCR.

4.2.4. Tractar el caldo enriquit de manera idèntica a la mostra o les mostres de les proves abans esmentades.

Nota: Si es preveu una inhibició o un enriquiment de *R. solanacearum* a causa de les elevades poblacions de determinats bacteris sapròfits competidors, es poden aconseguir resultats millors amb l'enriquiment d'extractes de mostres abans de qualsevol centrifugació o amb altres mesures de concentració.

5. Prova d'immunofluorescència (prova IF)

Principi

Es recomana utilitzar la prova IF com a principal prova de selecció atesa la capacitat demostrada per assolir els límits requerits.

Quan s'utilitzi la prova IF com a principal prova de selecció i la seva lectura sigui positiva, s'ha d'efectuar la prova d'aïllament, PCR o FISH com a segona prova de selecció. Quan s'utilitzi la prova IF com a segona prova de selecció i la seva lectura sigui positiva, s'ha d'efectuar una nova prova d'acord amb el diagrama de flux per completar l'anàlisi.

Nota: Utilitzar una font validada d'anticossos de *R. solanacearum* (vegeu el lloc web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Es recomana determinar-ne el títol per a cada nou lot d'anticossos. El títol es defineix com la dilució més elevada en la qual es produeix una reacció òptima quan s'analitza una suspensió que contingui de 105 a 106 cèl·lules per ml de la soca homòloga de *R. solanacearum*, utilitzant un conjugat d'isotiocianat de fluoresceïna (FITC) apropiat, segons les recomanacions del fabricant. Tot l'antisèrum policlonal validat ha de presentar un títol IF almenys d'1:2.000. Durant l'anàlisi, s'han d'utilitzar els anticossos en dilucions de treball pròximes o equivalents al títol.

La prova s'hauria d'efectuar en extractes de mostres acabades de preparar. En cas que sigui necessari, també es pot fer amb èxit en extractes emmagatzemats entre -68°C i -86°C en glicerol. El glicerol es pot eliminar de la mostra si s'afegeix 1 ml de tampó de precipitat (vegeu l'apèndix 4), es recentrifuga durant 15 minuts a 7.000 g i es resuspèn en un volum equivalent de tampó de precipitat. En molts casos no és necessari efectuar aquest procediment, especialment si les mostres s'han fixat en els portaobjectes mitjançant flameig.

Preparar en un altre portaobjectes controls positius de la soca homòloga o de qualsevol altra soca de referència de *R. solanacearum*, suspesa en extracte de patata, tal com especifica l'apèndix 3, punt B, i opcionalment en tampó.

Quan sigui possible, s'ha d'utilitzar un teixit naturalment infectat (mantingut per liofilització o congelació entre -16°C i -24°C) com a control similar en el mateix portaobjectes.

Es poden utilitzar com a controls negatius alíquotes d'extracte de mostres que abans hagin donat resultats negatius de *R. solanacearum*.

A l'apèndix 3 s'enumeren els materials normalitzats de control positiu i negatiu que es poden utilitzar en aquesta prova.

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

Processar el material de control de la mateixa manera que la mostra o les mostres.

5.1. Preparar els portaobjectes segons un dels procediments següents

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

Abocar amb una pipeta un volum normalitzat mesurat (15 µl és suficient per a vasets de 6 mm de diàmetre; augmentar el volum si el diàmetre és més gran) d'una dilució d'1/100 del precipitat de patata resuspès en el primer vaset. A continuació, abocar amb una pipeta un volum similar de precipitat sense diluir (1/1) en els vasets restants de la filera. La segona filera es pot utilitzar com a duplicat o per a una segona mostra, tal com s'indica a la figura 1.

ii) Per a altres precipitats:

Preparar dilucions decimals (1/10 i 1/100) del precipitat resuspès en tampó de precipitat. Abocar amb una pipeta un volum normalitzat mesurat (15 µl és suficient per a vasets de 6 mm de diàmetre; augmentar el volum si el diàmetre és més gran) del precipitat resuspès i de cada dilució en una filera de vasets. La segona filera es pot utilitzar com a duplicat o per a una segona mostra, tal com s'indica a la figura 2.

5.2. Assecar les gotetes a temperatura ambient o escalfar-les entre 40 i 45°C. Fixar les cèl·lules bacterianes al portaobjectes escalfant-lo (15 minuts a 60°C), flamejar-lo amb etanol del 95% o d'acord amb les instruccions específiques dels subministradors dels anticossos.

En cas que sigui necessari, a continuació es poden emmagatzemar portaobjectes fixos en un recipient dessecat durant el mínim de temps que resulti necessari (fins a un màxim de 3 mesos) abans d'efectuar noves proves.

5.3. Procediment IF

i) Si el portaobjectes s'ha preparat segons el punt 5.1.i):

Preparar un conjunt de dilucions a 1/2. El primer vaset ha de contenir 1/2 del títol (T/2), els altres 1/4 del títol (T/4), 1/2 del títol (T/2), el títol (T) i el doble del títol (2T).

ii) Si el portaobjectes s'ha preparat segons el punt 5.1.ii):

Preparar la dilució de treball (DT) de l'anticòs en el tampó IF. La dilució de treball afecta l'especificitat.

Figura 1. Preparació del portaobjectes d'acord amb els punts 5.1.i) i 5.3.i).

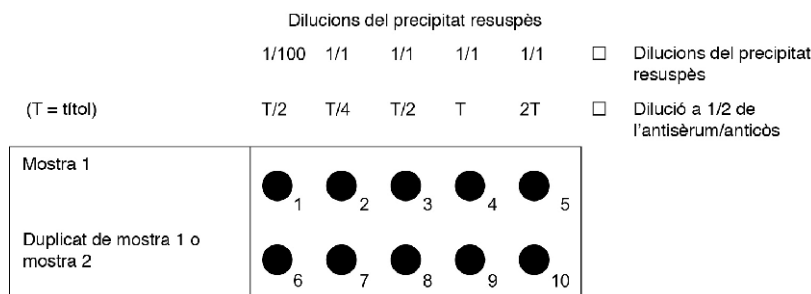
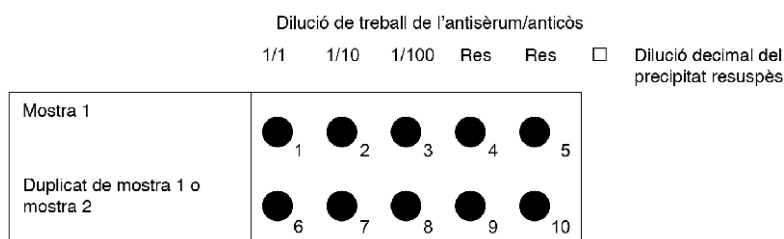


Figura 2. Preparació del portaobjectes d'acord amb els punts 5.1.ii) i 5.3.ii).



5.3.1. Col·locar els portaobjectes en un mocador de paper humitejat. Cobrir completament cada vaset amb la dilució o dilucions d'anticossos. El volum d'anticossos aplicat a cada vaset ha de ser com a mínim equivalent al volum d'extracte aplicat.

En cas que no hi hagi instruccions específiques dels subministradors dels anticossos, s'ha d'aplicar el procediment següent:

5.3.2. Deixar en incubació els portaobjectes en paper humit durant 30 minuts a temperatura ambient (18-25°C).

5.3.3. Espolsar les gotetes de cada portaobjectes i esbandir acuradament amb tampó IF. Rentar per immersió durant cinc minuts en tampó IF-Tween (apèndix 4) i posteriorment en tampó IF. Evitar la transferència d'aerosols o gotetes que pugui provocar contaminacions encreuades. Eliminar-ne acuradament l'excés d'humitat eixugant-lo suament.

5.3.4. Col·locar els portaobjectes en paper humit. Cobrir els vasets amb la dilució del conjugat FITC utilitzat per determinar el títol. El volum de conjugat aplicat en els vasets ha de ser idèntic al volum d'anticossos aplicat.

5.3.5. Deixar en incubació els portaobjectes en paper humit durant 30 minuts a temperatura ambient (18-25°C).

5.3.6. Espolsar les gotetes de conjugat del portaobjectes. Esbandir i rentar com abans (5.3.3).

Eliminar acuradament l'excés d'humitat.

5.3.7. Abocar amb una pipeta 5 a 10 µl de tampó fosfat glicerol de 0,1 M (apèndix 4) o un volum de solució comercial que protegeixi la fluorescència (*antifading*) en cada vaset i col·locar-hi un cobreobjectes.

5.4. Lectura de la prova IF

5.4.1. Examinar els portaobjectes en un microscopi epifluorescent amb filtres adequats perquè es produeixi l'excitació del FITC, amb oli o aigua d'immersió i a 500-1.000 augments. Recórrer els vasets al llarg de dos diàmetres perpendiculars entre si i al voltant del perímetre. En el cas de mostres que presentin un baix nombre de cèl·lules o no en presentin cap, s'han d'observar com a mínim 40 camps microscòpics.

En primer lloc, comprovar el control positiu. Les cèl·lules han de ser fluorescents brillants i estar completament tenyides en el títol d'anticossos o la dilució de treball determinats. La prova IF (secció VI.A.5) s'ha de repetir si el tenyiment no és correcte.

5.4.2. Comprovar si hi ha cèl·lules fluorescents brillants amb morfologia característica de *R. solanacearum* en els vasos dels portaobjectes (vegeu el lloc web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). La intensitat de la fluorescència ha de ser equivalent a la de la soca de control positiu a la mateixa dilució d'anticossos. S'han de descartar les cèl·lules que presentin un tenyiment incomplet o una fluorescència escassa.

Cal repetir la prova si se sospita que s'ha produït qualsevol possible contaminació. Aquest pot ser el cas quan tots els portaobjectes d'un lot presentin cèl·lules positives a causa de la contaminació del tampó o si es troben cèl·lules positives (fora dels vasos dels portaobjectes) a la superfície.

5.4.3. Hi ha diversos problemes inherents a les característiques específiques de la prova d'immunofluorescència. En els precipitats de falques basals de patata i els precipitats de segments de la tija poden aparèixer poblacions de base de cèl·lules fluorescents de morfologia atípica i bacteris sapròfits amb reacció encreuada la mida i morfologia dels quals siguin similars als de *R. solanacearum*.

5.4.4. Tenir només en compte les cèl·lules fluorescents amb mida i morfologia típiques en el títol o la dilució de treball dels anticossos, tal com es descriu en 5.3.

5.4.5. Interpretació de la lectura de la prova IF:

i) si es troben cèl·lules fluorescents brillants amb morfologia característica, estimar el nombre mitjà de cèl·lules típiques per camp microscòpic i calcular el nombre de cèl·lules típiques per ml de precipitat resuspès (apèndix 5).

La lectura IF és positiva en les mostres amb un mínim de 5×10^3 cèl·lules típiques per ml de precipitat resuspès. Es considera llavors que la mostra pot estar contaminada i s'han de efectuar altres proves,

ii) la lectura IF és negativa en les mostres amb menys de 5×10^3 cèl·lules per ml de precipitat resuspès, i es considera negativa la mostra. No cal efectuar més proves.

6. Prova de reacció en cadena de la polimerasa (prova PCR)

Principis

Quan s'utilitzi la prova PCR com a principal prova de selecció i doni resultats positius, s'ha de efectuar la prova d'aïllament o la IF com a segona prova obligatòria de selecció. Quan s'utilitzi la PCR com a segona prova de selecció i doni resultats positius, s'han de fer les proves que estableix el diagrama de flux per completar el diagnòstic.

L'aplicació d'aquest mètode com a principal mètode de selecció només es recomana en cas que s'hagin adquirit coneixements especialitzats d'aquest mètode.

Nota: Les proves preliminars fetes amb aquest mètode haurien de permetre la detecció reproducible de 10^3 a 10^4

cèl·lules de *R. solanacearum* per ml afegides als extractes de mostres que prèviament van proporcionar resultats negatius. Pot ser necessari portar a terme experiments d'optimització per aconseguir nivells màxims de sensibilitat i especificitat en tots els laboratoris.

Utilitzar reactius i protocols PCR validats (vegeu l'apèndix 6). Seleccionar preferiblement un mètode amb control intern.

Prendre les precaucions adequades per evitar la contaminació de la mostra amb l'ADN buscat. La prova PCR ha de ser efectuada per tècnics experimentats, en laboratoris especialitzats en biologia molecular, amb la finalitat de reduir al màxim la possibilitat de contaminació amb l'ADN buscat.

Com a mostres finals del procediment sempre s'han d'efectuar controls negatius (per a l'extracció d'ADN i els procediments PCR) que deixin constància de si s'ha produït arrossegament d'ADN.

A la prova PCR s'han de incloure els controls negatius següents:

- extracte de la mostra que prèviament hagi proporcionat resultats negatius per a *R. solanacearum*,
- controls dels tampons utilitzats per extreure el bacteri i l'ADN de la mostra,
- barreja per a la reacció PCR.

S'han de incloure els controls positius següents:

- alíquotes de precipitats resuspesos als quals s'ha afegit *R. solanacearum* (per a la preparació, vegeu l'apèndix 3, punt B),
- una suspensió de 10^6 cèl·lules per ml de *R. solanacearum* en aigua d'un aïllat virulent (per exemple, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vegeu l'apèndix 3, punt B),
- sempre que sigui possible, utilitzar també ADN extret de les mostres de control positives en la prova PCR.

Per evitar una possible contaminació, preparar els controls positius en un entorn diferent del de les mostres que s'analitzaran.

Els extractes de mostres han de contenir la quantitat mínima de terra possible. En determinats casos pot ser recomanable preparar els extractes a partir de patates rentades quan s'hagin emprat protocols PCR.

A l'apèndix 3 s'enumeren els materials normalitzats de control positiu i negatiu que es poden utilitzar en aquesta prova.

6.1. Mètodes de purificació de l'ADN

Utilitzar mostres de control positives i negatives com s'indica més amunt (vegeu l'apèndix 3).

Processar el material de control de la mateixa manera que la mostra o mostres.

Hi ha diferents mètodes per purificar l'ADN buscat a partir de substrats de mostres complexes, separant d'aquesta manera els inhibidors de PCR i altres reaccions enzimàtiques i concentrant l'ADN buscat en l'extracte de la mostra. S'ha optimitzat el mètode següent per utilitzar-lo amb els mètodes PCR validats mostrats a l'apèndix 6.

- a) Mètode de Pstrik (2000)

- 1) abocar amb una pipeta 220 µl de tampó de lisi [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] en un tub eppendorf d'1,5 ml;
- 2) afegir 100 µl d'extracte de mostra i col·locar-ho en un escalfador o al bany maria a 95°C durant deu minuts;
- 3) col·locar el tub en gel durant cinc minuts;
- 4) afegir 80 µl de solució estàndard de lisozima (50 mg de lisozima per ml en 10 mM Tris HCl, pH 8,0) i incubar a 37°C durant 30 minuts;
- 5) afegir 220 µl de solució A Easy DNA® (Invitrogen), barrejar adequadament per agitació i incubar a 65°C durant 30 minuts;
- 6) afegir 100 µl de solució B Easy DNA® (Invitrogen) i agitar vigorosament fins que el precipitat es mogui lliurement en el tub i la mostra sigui uniformement viscosa;
- 7) afegir 500 µl de cloroform i agitar fins que disminueixi la viscositat i la barreja sigui homogènia;
- 8) centrifugar a 15.000 g durant 20 minuts a 4°C per separar les fases i formar la interfase;
- 9) transferir la fase superior a un tub eppendorf sense utilitzar;
- 10) afegir 1 ml d'etanol al 100% (-20°C), agitar breument i incubar en gel durant deu minuts;
- 11) centrifugar a 15.000 g durant 20 minuts a 4°C i retirar l'etanol del precipitat;
- 12) afegir 500 µl d'etanol al 80% (-20°C) i barrejar invertint el tub;
- 13) centrifugar a 15.000 g durant deu minuts a 4°C, guardar el precipitat i retirar l'etanol;
- 14) deixar que el precipitat s'assequi a l'aire o en un Speed Vac d'ADN;
- 15) resuspendre el precipitat en 100 µl d'aigua ultrapura estèril i deixar-ho a temperatura ambient durant un mínim de 20 minuts;
- 16) emmagatzemar a -20°C fins que es necessiti per a la prova PCR;
- 17) centrifugar tot precipitat blanc i utilitzar 5 µl del sobrenedant que contingui ADN per a la prova PCR.

b) Altres mètodes

Es poden aplicar altres mètodes d'extracció de l'ADN, com per exemple Qiagen DNeasy Plant Kit, sempre que s'hagi demostrat que són igual d'eficaços en la purificació de l'ADN a partir de mostres de control que continguin de 10^3 a 10^4 cèl·lules patògenes per ml.

6.2. PCR

6.2.1. Preparar plantilles d'assaig i de control per a la prova PCR d'acord amb els protocols validats (secció VI.A.6). Preparar una dilució decimal d'extracte d'ADN de la mostra (1:10 en aigua ultrapura).

6.2.2. Preparar la barreja de reacció PCR apropiada en un entorn sense contaminació d'acord amb els protocols publicats (apèndix 6). Quan sigui possible, es recomana utilitzar un protocol PCR multiplex que també incorpori un control intern de la prova PCR.

6.2.3. Afegir de 2 a 5 µl d'extracte d'ADN per 25 µl de reacció PCR en tubs PCR estèrils d'acord amb els protocols PCR (vegeu l'apèndix 6).

6.2.4. Incorporar una mostra de control negatiu que contingui només barreja de reacció PCR i afegir la mateixa

font d'aigua ultrapura utilitzada en la barreja PCR en lloc de la mostra.

6.2.5. Col·locar els tubs en el mateix termociclador utilitzat en les proves preliminars i aplicar el programa PCR optimitzat adequat (apèndix 6).

6.3. Anàlisi del producte de la PCR

6.3.1. Resoldre les ampliacions PCR mitjançant electroforesi en gel d'agarosa. Aplicar com a mínim 12 µl de barreja de reacció d'ADN amplificada de cada mostra barrejada amb 3 µl de tampó de càrrega (apèndix 6) en 2,0% (w/v) de gels d'agarosa en un tampó de tris-acetat-EDTA (TAE) (apèndix 6) a 5-8 V per cm. Utilitzar un casella d'ADN adequat, per exemple, 100 pb *ladder*.

6.3.2. Revelar les bandes d'ADN tenyint-les amb bromur d'etidi (0,5 mg/l) durant 30 a 60 minuts, prenent les precaucions adequades per al maneig d'aquest mutagen.

6.3.3. Observar el gel tenyit mitjançant transil·luminació en UV d'ona curta ($\lambda = 302$ nm) per a productes de la PCR amplificats de la mida esperada (apèndix 6) i apuntar-ne els resultats.

6.3.4. En relació amb tots els nous descobriments o casos, per verificar l'autenticitat de l'amplicó PCR, efectuar una anàlisi de l'enzim de restricció en una mostra de l'ADN i l'amplicat s'ha de quedar incubant a la temperatura òptima i durant el temps necessari amb una enzima i un tampó apropiats (vegeu l'apèndix 6). Resoldre els fragments digerits mitjançant electroforesi en gel d'agarosa, de la mateixa manera que abans, i observar el patró característic del fragment de restricció amb transil·luminació UV una vegada tenyit amb bromur d'etidi i comparar amb el control positiu no digerit i digerit.

Interpretació dels resultats de la prova PCR

La prova PCR és negativa si l'amplicó PCR específic de *R. solanacearum* de la mida esperada no es detecta en la mostra en qüestió, però sí que es detecta en totes les mostres de controls positius (en cas de PCR multiplex amb encebadors de control intern específics de la planta, s'ha d'amplificar amb la mostra en qüestió un segon producte PCR de la mida esperada).

La prova PCR és positiva si es detecta l'amplicó PCR específic de *R. solanacearum* de la mida i patró de restricció esperat (quan s'exigeixi), sempre que no s'amplifiqui a partir de cap de les mostres de control negatiu. La confirmació fiable d'un resultat positiu es pot obtenir també repetint la prova amb un segon conjunt d'encebadors de la PCR (apèndix 6).

Nota: Es pot sospitar la inhibició de la PCR si l'amplicó esperat s'obté a partir de la mostra de control positiu que conté *R. solanacearum* en aigua, però s'obtenen resultats negatius dels controls positius amb *R. solanacearum* en extracte de patata. En protocols PCR multiplex amb controls PCR interns, la inhibició de la reacció s'indica quan no s'obté cap dels dos amplicons.

Es pot sospitar l'existència de contaminació si l'amplicó esperat s'obté a partir d'un o alguns dels controls negatius.

7. Prova d'hibridació fluorescent «in situ» (prova FISH)

Principi

Quan s'utilitzi la prova FISH com a primera prova de selecció i proporcioni resultats positius, s'ha d'efectuar la prova d'aïllament o la prova IF com a segona prova obligatòria de selecció. Quan s'utilitzi la prova FISH com a segona prova de selecció i doni resultats positius, s'han d'efectuar les proves que estableix el diagrama de flux per completar el diagnòstic.

Nota: Fer servir oligosondes específiques per a *R. solanacearum* validades (vegeu l'apèndix 7). Les proves preliminars realitzades amb aquest mètode haurien de permetre la detecció reproduïble de com a mínim 10³ a 10⁴ cèl·lules de *R. solanacearum* per ml afegides als extractes de mostres que abans hagin donat resultats negatius.

El procediment següent s'hauria d'efectuar, si pot ser, amb extracte de mostra acabat de preparat, però també es pot realitzar amb èxit amb extracte de mostra que s'hagi emmagatzemat en glicerol a una temperatura compresa entre -16°C i -24°C o entre -68°C i -86°C.

Utilitzar com a controls negatius alíquotes d'extracte de mostres que hagin donat prèviament resultats negatius per a *R. solanacearum*.

Com a controls positius, preparar suspensions que continguin de 10⁵ a 10⁶ cèl·lules per ml de *R. solanacearum* biovar 2 (per exemple la soca NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vegeu l'apèndix 3) en tampó de fosfat de 0,01 M d'un cultiu de tres a cinc dies. Preparar en un altre portaobjectes controls positius de la soca homòloga o de qualsevol altra soca de referència de *R. solanacearum*, suspesa en extracte de patata, tal com especifica l'apèndix 3, punt B.

L'ús d'una oligosonda eubacteriana amb etiqueta FITC ofereix un control per al procés d'hibridació, ja que tenyirà tots els eubacteris presents a la mostra.

A l'apèndix 3, punt A, s'enumeren els materials normalitzats de control positiu i negatiu que es poden utilitzar en aquesta prova.

Processar el material de control de la mateixa manera que la mostra o mostres.

7.1. Fixació de l'extracte de patata

El protocol següent es basa en Wullings *et al.* (1998).

7.1.1. Preparar la solució de fixació (vegeu l'apèndix 7).

7.1.2. Abocar 100 µl de cada extracte de mostra en un tub eppendorf i centrifugar durant set minuts a 7.000 g.

7.1.3. Separar el sobrenedant i dissoldre el precipitat en 200 µl de solució fixadora preparada amb menys de 24 hores d'antelació. Agitar i incubar durant una hora en el refrigerador.

7.1.4. Centrifugar durant set minuts a 7.000 g, separar el sobrenedant i resuspendre el precipitat en 75 µl de tampó de fosfat de concentració 0,01 M (vegeu l'apèndix 7).

7.1.5. Col·locar 16 µl de les suspensions fixades en un portaobjectes múltiple net, tal com mostra la figura 7.1. Aplicar dues mostres diferents per portaobjectes sense diluir i utilitzar 10 µl per realitzar una dilució a 1:100 (en tampó de fosfat de concentració 0,01 M). La solució de la mostra restant (49 µl) pot emmagatzemar-se a -20°C després de l'addició d'1 volum d'etanol al 96%. En cas que sigui necessari repetir la prova FISH, separar l'etanol mitjançant centrifugació i afegir un volum equivalent de tampó de fosfat de concentració 0,01 M (barrejar mitjançant agitació).

Figura 7.1. Distribució del portaobjectes per a la prova FISH.

Distribució del portaobjectes per a la prova FISH

| | | | | |
|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|
| Mostra 1 ○ vaset 1 | Res ○ vaset 2 | Res ○ vaset 3 | Res ○ vaset 4 | Mostra 2 ○ vaset 5 |
| Mostra 1 ○ vaset 6 | Res ○ vaset 7 | Res ○ vaset 8 | Res ○ vaset 9 | Mostra 2 ○ vaset 10 |
| Cobreobjectes 1 | | | Cobreobjectes 2 | |

7.1.6. Assecar els portaobjectes a l'aire (o amb assecador de portaobjectes a 37°C) i fixar-los flamejant-los.

El procediment es pot interrompre en aquesta fase, i l'endemà es pot prosseguir amb la hibridació. Els portaobjectes s'han d'emmagatzemar secs i sense pols, a temperatura ambient.

7.2. Hibridació

7.2.1. Deshidratar cadascuna de les cèl·lules en sèries d'etanol escalonades al 50%, 80% i 96% durant un minut. Assecar les preparacions en un portaobjectes.

7.2.2. Preparar una cambra d'incubació humida recobrint el fons d'una caixa hermètica amb paper de seda o de filtre amarat en 1x hybmix (apèndix 7). Preincubar la caixa en el forn d'hibridació a 45°C durant un mínim de deu minuts.

7.2.3. Aplicar 10 µl de solució d'hibridació (apèndix 7) a vuit vasos (vasets 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 i 10; vegeu la figura 7.1) de cada portaobjectes deixant buits els dos vasos centrals (3 i 8).

7.2.4. Aplicar cobreobjectes (24 × 24 mm) al primer i als quatre últims vasos evitant l'entrada d'aire. Col·locar els portaobjectes en la cambra humida preescalfada i deixar que es produeixi la hibridació durant cinc hores a 45°C en la foscor.

7.2.5. Preparar tres vasos de precipitat que continguin 1 l d'aigua Milli Q (grau molecular), 1 l d'1x hybmix (334 ml 3x hybmix i 666 ml aigua Milli Q) i 1 l d'1/8x hybmix (42 ml 3x hybmix i 958 ml aigua Milli Q). Preincubar-los al bany maria a 45°C.

7.2.6. Treure els cobreobjectes de les preparacions i col·locar-les en un portaobjectes.

7.2.7. Rentar l'excés de sonda mitjançant incubació durant 15 minuts en el got de precipitat amb 1x hybmix a 45°C.

7.2.8. Transferir el portaobjectes a una solució de rentatge d'hybmix a 1/8 i incubar durant altres 15 minuts.

7.2.9. Submergir les preparacions breument en aigua Milli Q i col·locar-les en paper de filtre. Eliminar l'excés d'humitat cobrint la superfície amb compte amb paper de filtre. Abocar de 5 a 10 µl de solució de muntatge protectora de la fluorescència (per exemple Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA, o equivalent) en cada vaset i aplicar un cobreobjectes gran (24 × 60 mm) sobre tota la preparació.

7.3. Lectura de la prova FISH

7.3.1. Els portaobjectes s'han d'examinar immediatament fent servir un microscopi epifluorescent a 630 o 1.000 augments amb oli d'immersió. Amb un filtre adequat per a isotiocianat de fluoresceïna (FITC), les cèl·lules eubacterianes (inclosa la majoria de les cèl·lules gramnegatives) de la mostra apareixen tenyides de verd fluorescent. Utilitzant un filtre per a tetrametilrodamina-5-isotiocianat, les cèl·lules de *R. solanacearum* marcades amb Cy3 apareixen tenyides de vermell fluorescent. Comparar la morfologia de les cèl·lules amb la dels controls positius. Les cèl·lules han de ser fluorescents brillants i estar completament tenyides. La prova FISH (secció VI.A.7) s'ha de repetir si el tenyiment és aberrant. Recórrer els vasos al llarg de dos diàmetres perpendiculars entre si i al voltant del perímetre. En el cas de mostres que presentin un nombre baix de cèl·lules o no

en presentin cap, s'han d'observar com a mínim 40 camps microscòpics.

7.3.2. Comprovar si hi ha cèl·lules fluorescents brillants amb la morfologia característica de *R. solanacearum* en els vasos dels portaobjectes (vegeu el lloc web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). La intensitat de la fluorescència ha de ser equivalent a la de la soca de control positiu o millor. S'han de descartar les cèl·lules que presentin un tenyiment incomplet o una fluorescència escassa.

7.3.3. S'ha de repetir la prova si se sospita que s'ha produït qualsevol possible contaminació. Aquest pot ser el cas quan tots els portaobjectes d'un lot presentin cèl·lules positives a causa de la contaminació del tampó o si es troben cèl·lules positives (fora dels vasos dels portaobjectes) en la superfície.

7.3.4. Hi ha diversos problemes inherents a l'especificitat de la prova FISH. En els precipitats de falques basals de patata i de segments de la tija poden aparèixer poblacions de base de cèl·lules fluorescents de morfologia atípica i bacteris sapròfits amb reacció encreuada que tinguin la mida i morfologia similars als de *R. solanacearum*, encara que amb molt menys freqüència que en la prova IF.

7.3.5. Únicament s'han de tenir en compte les cèl·lules fluorescents de mida i morfologia típiques.

7.3.6. Interpretació dels resultats de la prova FISH

i) S'obtindran resultats vàlids en la prova FISH sempre que en tots els controls positius i en cap dels controls negatius s'observin cèl·lules tenyides de verd fluorescent brillant, la mida i morfologia de les quals siguin les típiques de les de *R. solanacearum*, quan s'utilitzi el filtre FITC, i cèl·lules tenyides de vermell fluorescent brillant quan s'utilitzi el filtre de rodamina. Si es troben cèl·lules fluorescents brillants amb morfologia característica, cal estimar el nombre mitjà de cèl·lules típiques per camp microscòpic i calcular el nombre de cèl·lules típiques per ml de precipitat resuspès (apèndix 4). Les mostres que presentin almenys 5×10^3 cèl·lules típiques per ml de precipitat resuspès es consideren potencialment contaminades. Cal efectuar noves proves. Les mostres que presentin menys de 5×10^3 cèl·lules típiques per ml de precipitat resuspès es consideren negatives.

ii) Els resultats de la prova FISH són negatius quan no s'observin cèl·lules tenyides de vermell fluorescent brillant amb una mida i morfologia típics de *R. solanacearum* utilitzant el filtre de rodamina, sempre que s'observin cèl·lules tenyides de vermell fluorescent brillant típiques en les preparacions de control positiu quan s'utilitzi el filtre de rodamina.

8. Proves d'assaig de immunoabsorció enzimàtica (ELISA)

Principi

Les proves ELISA només es poden utilitzar com a prova opcional a més de les proves IF, PCR o FISH, a causa de la sensibilitat relativament baixa d'aquesta prova. Quan s'utilitzi ELISA-DASI, és obligatori efectuar un enriquiment i utilitzar anticossos monoclonals (vegeu el lloc web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Pot resultar útil efectuar un enriquiment de les mostres abans

d'emprar la prova ELISA, a fi d'incrementar la sensibilitat de la prova, però pot fracassar atesa la competència d'altres organismes en la mostra.

Nota: Utilitzar una font validada d'anticossos de *R. solanacearum* (vegeu el lloc web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Es recomana determinar el títol per a cada nou lot d'anticossos. El títol es defineix com la dilució més elevada en què produeix una reacció òptima quan s'analitza una suspensió que contingui de 10^5 a 10^6 cèl·lules per ml de la soca homòloga de *R. solanacearum*, utilitzant conjugats d'anticossos secundaris apropiats, segons les recomanacions del fabricant. Durant l'anàlisi, s'han d'utilitzar els anticossos en dilucions de treball pròximes o equivalents a la formulació comercial.

Determinar el títol dels anticossos en una suspensió de 10^5 a 10^6 cèl·lules per ml de la soca homòloga de *R. solanacearum*.

Incloure una mostra d'extracte que hagi donat prèviament resultats negatius per a *R. solanacearum* i una suspensió d'un bacteri que no tingui reacció encreuada en tampó fosfat salí (PBS) com a controls negatius.

Com a control positiu utilitzar alíquotes d'extracte de mostra que hagi donat prèviament resultats negatius, barrejades amb 10^3 a 10^4 cèl·lules per ml de *R. solanacearum* biovar 2 (per exemple, soca NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vegeu l'apèndix 3, punts A i B). Per a la comparació dels resultats de cada placa, utilitzar una suspensió normalitzada de 10^5 a 10^6 cèl·lules per ml en PBS de *R. solanacearum*. Cal assegurar que els controls positius estiguin ben separats en la placa de microtitulació de la mostra o les mostres analitzades.

A l'apèndix 3, punt A, s'enumeren els materials normalitzats de control positiu i negatiu que es poden utilitzar en aquesta prova.

Processar el material de control de la mateixa manera que la mostra o les mostres.

S'han validat dos protocols ELISA:

a) ELISA indirecte (Robinson Smith *et al.*, 1995):

1) utilitzar de 100 a 200 μ l d'alíquotes d'extracte de mostra. (Si s'escalfa a 100°C durant quatre minuts al bany maria o un escalfador es poden reduir en alguns casos els resultats no específics.);

2) afegir un volum igual de tampó d'entapissat de doble concentració (apèndix 4) i agitar;

3) aplicar 100 μ l d'alíquotes almenys en dos vasos d'una placa de microtitulació (per exemple, Nunc-Polysorp o equivalent) i incubar durant una hora a 37°C o durant una nit a 4°C ;

4) treure els extractes dels vasos. Rentar-los tres vegades amb PBS-Tween (apèndix 4), deixant-hi l'última solució de rentatge durant almenys cinc minuts;

5) preparar la dilució adequada d'anticossos contra *R. solanacearum* en tampó de bloqueig (apèndix 4). Per a anticossos comercials validats, utilitzar les dilucions recomanades (normalment una concentració que dupliqui el títol);

6) afegir 100 μ l a cada vaset i incubar durant una hora a 37°C ;

7) treure la solució d'anticossos dels vasos i rentar com es descriu en el punt 4;

8) preparar la dilució adequada de conjugat de fosfatasa alcalina d'anticossos secundaris en tampó de bloqueig. Afegir 100 μ l a cada vaset i incubar durant una hora a 37°C ;

9) treure els anticossos conjugats de els vasos i rentar com es descriu en el punt 4;

10) afegir 100 μ l de solució de substrat de fosfatasa alcalina (apèndix 4) a cada vaset. Incubar en la foscor a temperatura ambient i llegir l'absorbència a 405 nm a intervals regulars durant 90 minuts.

b) ELISA-DASI (doble sandvitx d'anticossos indirecte):

1) preparar la dilució adequada de immunoglobulines policlonals contra *R. solanacearum* en tampó de bloqueig de pH 9,6 (apèndix 4). Afegir 200 μ l a cada vaset. Incubar a 37°C de quatre a cinc hores o a 4°C durant 16 hores;

2) rentar tres vegades els vasos amb PBS-Tween (apèndix 4).

Afegir 190 μ l d'extracte de mostra almenys en dos vasos. Afegir també controls positius i negatius en dos vasos de cada placa. Incubar durant 16 hores a 4°C ;

3) rentar tres vegades els vasos amb PBS-Tween (apèndix 4);

4) preparar una dilució apropiada d'anticossos monoclonals específics de *R. solanacearum* en PBS (apèndix 4) que contingui, així mateix, 0,5% de seroalbúmina bovina (BSA), i afegir 190 μ l a cada vaset. Incubar a 37°C durant dues hores;

5) rentar tres vegades els vasos amb PBS-Tween (apèndix 4);

6) preparar una dilució apropiada d'immunoglobulines anti-ratolí conjugades amb fosfatasa alcalina en PBS. Afegir 190 μ l a cada vaset. Incubar a 37°C durant dues hores;

7) rentar tres vegades els vasos amb PBS-Tween (apèndix 4);

8) preparar una solució de substrat de fosfatasa alcalina que contingui 1 mg de p-nitrofenil fosfat per ml de tampó de substrat (apèndix 4). Afegir 200 μ l a cada vaset. Incubar en la foscor a temperatura ambient i llegir l'absorbència a 405 nm a intervals regulars durant 90 minuts.

Interpretació dels resultats de la prova ELISA

La prova ELISA és negativa si la lectura mitjana de la densitat òptica (DO) dels vasos de cada mostra duplicada és < 2 vegades la DO del vaset de control de l'extracte de mostra negativa, sempre que totes les DO dels controls positius siguin superiors a 1,0 (després de 90 minuts d'incubació amb el substrat) i siguin més de dues vegades superiors a la DO obtinguda a partir d'extractes de mostra negativa.

La prova ELISA és positiva si les lectures mitjanes de la DO de els vasos de cada mostra duplicada és > 2 vegades la DO en el vaset de l'extracte de mostra negativa, sempre que les lectures de DO a tots els vasos de control negatiu siguin < 2 vegades les de els vasos de control positiu.

Les lectures ELISA negatives en vasos de control positiu indiquen que no s'ha efectuat correctament la prova o que ha estat inhibida. Les lectures ELISA positives en vasos de control negatiu indiquen que s'ha produït contaminació encreuada o unió d'anticossos no específics.

9. Prova de bioassaig

Nota: Les proves preliminars realitzades amb aquest mètode haurien de permetre la detecció reproduïble de 10^3 a 10^4 unitats formadores de colònies de *R. solanacearum* per ml afegides als extractes de mostres que prèviament van proporcionar resultats negatius (per a la preparació, vegeu l'apèndix 3).

Es pot assolir la màxima sensibilitat de detecció quan s'utilitzin extractes de mostres que s'acabin de preparar i quan les condicions de cultiu siguin les òptimes. No obstant això, aquest mètode també es pot aplicar amb èxit a extractes que s'hagin emmagatzemat en glicerol a una temperatura compresa entre -68°C i -86°C .

El protocol següent es basa en Janse (1988):

9.1. Emprar deu plantes de prova d'un conreu de tomàquet sensible (per exemple, Moneymaker o conreu amb sensibilitat equivalent determinat pel laboratori d'anàlisi) en la fase de la tercera fulla vertadera per a cada mostra. Per més detalls de cultiu, vegeu l'apèndix 8. Una altra alternativa és utilitzar albergínies (per exemple, conreu Black Beauty o conreus amb sensibilitat equivalent), únicament plantes en fase de fulla 2-3 fins a la plena expansió de la tercera fulla vertadera. S'ha observat que els símptomes són menys greus i que es desenvolupen més lentament en l'albergínia. Per tant, quan sigui possible es recomana utilitzar plàntules de tomàquet.

9.2. Distribuir 100 μl d'extracte de mostra entre les plantes analitzades.

9.2.1. Inoculació amb xeringa.

9.2.2. Inocular les tiges de les patates just per damunt dels cotilèdons amb una xeringa proveïda d'una agulla hipodèrmica (no menys de 23G). Distribuir la mostra entre les plantes analitzades.

9.2.2. Inoculació en estries

Sostenint la planta entre dos dits, aplicar amb una pipeta una gota (d'uns 5-10 μl) del precipitat en suspensió en la tija situada entre els cotilèdons i la primera fulla.

Amb un bisturí estèril practicar una incisió diagonal d'aproximadament 1,0 cm de llarg i una profunditat d'aproximadament 2/3 del gruix de la tija, començant el tall a partir de la gota del precipitat.

Segellar el tall amb vaselina estèril fent servir una xeringa.

9.3. Inocular amb la mateixa tècnica cinc plançons amb una suspensió aquosa de 10^5 a 10^6 cèl·lules per ml preparada a partir d'un cultiu de 48 hores d'una soca biovar 2 virulenta de *R. solanacearum* com a control positiu i amb també de precipitat (apèndix 4) com a control negatiu. Separar les plantes de control positiu i negatiu de les altres per evitar la contaminació encreuada.

9.4. Cultivar les plantes de prova en instal·lacions de quarantena fins a un màxim de quatre setmanes entre 25°C i 30°C amb una elevada humitat relativa, regant-les adequadament per evitar que es neguin o es marceixin per deficiència hídrica. Per evitar la contaminació s'han d'incubar les plantes de control positiu i negatiu en bancs clarament separats en un hivernacle o cambra de cultiu; en cas que es disposi d'un espai reduït, garantir l'estricta separació entre tractaments. En cas que s'hagin d'incubar juntes plantes per a diferents mostres, s'han de separar amb les pantalles

adequades. Durant la fertilització, el reg, la inspecció i qualsevol altra manipulació, s'han d'extremar les precaucions per evitar la contaminació encreuada. És essencial mantenir els hivernacles i les cambres lliures de qualsevol plaga d'insectes, ja que poden transmetre el bacteri d'una mostra a una altra.

Comprovar si s'aprecien símptomes de marciment, epinàstia, clorosi i/o creixement reduït.

9.5. Aïllar-les de les plantes infectades (secció II.3) i identificar cultius purificats de presumpta *R. solanacearum* (secció VI. B).

9.6. Si no s'observen símptomes després de tres setmanes, efectuar una prova IF/PCR/Aïllament en una mostra mixta de seccions d'1 cm de la tija de cada planta analitzada, preses per damunt del punt d'inoculació. Si la prova és positiva, efectuar una dilució en plaques (secció 4.1).

9.7. Identificar qualsevol cultiu purificat de presumpta *R. solanacearum* (secció VI. B).

Interpretació dels resultats de la prova de bioassaig

S'obtenen resultats vàlids de la prova de bioassaig quan les plantes del control positiu mostren símptomes típics, es poden reaïllar els bacteris d'aquestes plantes i no es troben símptomes en els controls negatius.

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

La prova de bioassaig és positiva si les plantes analitzades estan infectades per *R. solanacearum*.

B. PROVES D'IDENTIFICACIÓ

Identificar cultius purs d'aïllats de presumpta *R. solanacearum* utilitzant almenys dues de les proves següents basades en principis biològics diferents.

Quan escaigui, incloure soques de referència conegudes per a cada prova efectuada (vegeu l'apèndix 3).

1. Proves d'identificació nutricional i enzimàtica

Determinar les propietats fenotípiques següents que estiguin universalment presents o absents en *R. solanacearum*, d'acord amb els mètodes de Lelliott i Stead (1987), Klement *et al.* (1990) i Schaad (2001).

| Proves | Resultat esperat |
|---|------------------|
| Producció de pigment fluorescent | - |
| Inclusions de poli- β -hidroxibutirat | + |
| Prova de l'oxidació/fermentació..... (O/F) | O+/F- |
| Activitat catalasa | + |
| Prova d'oxidasa de Kovac | + |
| Reducció de nitrats | + |
| Utilització de citrats | + |
| Creixement a 40°C | - |
| Creixement en NaCl a l'1% | + |
| Creixement en NaCl al 2% | - |
| Activitat de dihidrolasa d'arginina | - |
| Liqüefacció de la gelatina | - |
| Hidròlisi del midó | - |

| Proves | Resultat esperat |
|-------------------------------|------------------|
| Hidròlisi de l'esculina | - |
| Producció de levà | - |

2. Prova IF

2.1. Preparar una suspensió d'aproximadament 10⁶ cèl·lules per ml en tampó IF (apèndix 4).

2.2. Preparar una sèrie de dilucions a 1/2 d'un antisèrum adequat (vegeu el lloc web: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

2.3. Aplicar el procediment IF (secció VI.A.5).

2.4. La prova IF serà positiva si el títol IF del cultiu és equivalent al del control positiu.

3. Prova ELISA

Nota: Si només s'efectuen dues proves d'identificació, no s'ha d'utilitzar cap altra prova serològica a més d'aquest mètode.

3.1. Preparar una suspensió d'aproximadament 10⁸ cèl·lules per ml en 1X PBS (apèndix 4).

3.2. Portar a terme un procediment ELISA adequat amb un anticòs monoclonal específic de *R. solanacearum*.

3.3. La prova ELISA serà positiva si la lectura ELISA obtinguda del cultiu és com a mínim la meitat de l'obtinguda per al control positiu.

4. Prova PCR

4.1. Preparar una suspensió d'aproximadament 10⁶ cèl·lules per ml en aigua estèril de grau molecular.

4.2. Escalfar 100 µl de la suspensió cel·lular en tubs tancats en un escalfador o al bany maria a 100°C durant quatre minuts. Llavors les mostres es poden emmagatzemar a una temperatura de -16°C a -24°C fins que sigui necessari.

4.3. Aplicar els procediments PCR adequats per amplificar els amplicons específics de *R. solanacearum* [per exemple, Seal *et al.* (1993); Pastrik i Maiss (2000); Pastrik *et al.* (2002); Boudazin *et al.* (1999); Opina *et al.* (1997); Weller *et al.* (1999)].

4.4. S'aconsegueix la identificació positiva de *R. solanacearum* si els amplicons de la PCR són de la mateixa mida i tenen els mateixos polimorfismes de la longitud del fragment de restricció que els de la soca de control positiu.

5. Prova FISH

5.1. Preparar una suspensió d'aproximadament 10⁶ cèl·lules per ml en aigua ultrapura.

5.2. Aplicar el procediment FISH (secció VI.A.7) amb almenys dues oligosondes específiques per a *R. solanacearum* (apèndix 7).

5.3. La prova FISH és positiva si s'obtenen les mateixes reaccions del cultiu i el control positiu.

6. Perfils d'àcids grassos (Fatty acid profiling o FAP)

6.1. Mantenir el cultiu en agar de tripticasa de soja (Oxoid) durant 48 hores a 28°C.

6.2. Aplicar un procediment FAP adequat (Janse, 1991; Stead, 1992).

6.3. La prova FAP serà positiva si el perfil del presumpte cultiu és idèntic al del control positiu. Els àcids grassos la presència dels quals és característica són 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH i 18:1 2OH, i l'absència de 16:0 3OH és altament indicativa de *Ralstonia* sp.

7. Mètodes de caracterització de les soques

Es recomana efectuar la caracterització de les soques amb un dels mètodes següents per a cada nou cas d'aïllament de *R. solanacearum*.

Quan escaigui, incloure soques de referència conegudes per a cada prova efectuada (vegeu l'apèndix 3).

7.1. Determinació dels biovars

R. solanacearum se separa en biovars en funció de la capacitat per utilitzar i/o oxidar tres disacàrids i tres hexoses alcohòliques (Hayward, 1964 i Hayward *et al.*, 1990). Els mitjans nutritius per a la prova del biovar es descriuen a l'apèndix 2. Aquesta prova es pot efectuar amb èxit inoculant els mitjans per perforació amb cultius purs d'aïllats de *R. solanacearum* i incubant a 28°C. Si els mitjans es distribueixen en plaques estèrils de cultiu de cèl·lules de 96 vasos (200 µl per vas) es pot observar en un termini de 72 hores un canvi de color, del verd oliva al groc, fet que indica un resultat positiu de la prova.

| | Biovar | | | | |
|-------------------------|--------|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Utilització de: | | | | | |
| Maltosa | - | + | + | - | + |
| Lactosa | - | + | + | - | + |
| D (+) Cel·lobiosa | - | + | + | - | + |
| Mannitol | - | - | + | + | - |
| Sorbitol | - | - | + | + | - |
| Dulcitol | - | - | + | + | - |

El biovar 2 es diferencia en subfenotipus per mitjà de proves addicionals

| | Biovar 2A (distribució mundial) | Biovar 2A (a Xile i Colòmbia) | Biovar 2T (en àrees tropicals) |
|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Utilització de trehalosa | - | + | + |
| Utilització de meso-inositol | + | - | + |
| Utilització del D (-) ribosa ... | - | - | + |
| Activitat pectolítica | baixa | baixa | alta |

(1) Vegeu Lelliott i Stead (1987).

7.2. Obtenció de l'empremta dactilar genòmica

La diferenciació molecular de les soques en el complex de *R. solanacearum* es pot aconseguir mitjançant diferents tècniques, entre les quals s'inclouen:

7.2.1. Anàlisi dels polimorfismes de la longitud del fragment de restricció (RFLP) (Cook *et al.*, 1989).

7.2.2. PCR de seqüència repetitiva utilitzant encebadors REP, BOX i ERIC (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995).

7.2.3. Anàlisi dels polimorfismes de la longitud del fragment amplificat (AFLP) (Van der Wolf *et al.*, 1998).

7.3. Mètodes PCR

Es poden utilitzar encebadors específics de PCR (Patrik *et al.*, 2002; vegeu l'apèndix 6) per diferenciar soques que pertanyin a la divisió 1 (biovars 3, 4 i 5) i la divisió 2 (biovars 1, 2A i 2T) de *R. solanacearum*, tal com es defineix originalment amb l'anàlisi RFLP (Cook *et al.*, 1989) i la seqüenciació de 16S rADN (Taghavi *et al.*, 1996).

C. PROVA DE CONFIRMACIÓ DE PATOGENICITAT

Com a confirmació final del diagnòstic de *R. solanacearum* i per a l'avaluació de la virulència de cultius identificats com a *R. solanacearum* s'ha de realitzar la prova de patogenicitat:

1) preparar un inòcul d'aproximadament 106 cèl·lules per ml de cultius de 24 a 48 hores a partir de l'aïllat que s'hagi de sotmetre a prova i una soca de control positiu

adequada de *R. solanacearum* (per exemple, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vegeu l'apèndix 3);

2) inocular entre cinc i deu tiges de plàntules de tomàquet o albergínia sensibles en la fase de la tercera fulla vertadera (vegeu la secció VI.A.9);

3) incubar durant un màxim de dues setmanes a una temperatura de 25°C a 28°C, amb humitat relativa alta i reg adequat, evitant tant l'estancament de l'aigua com l'estrés provocat per la sequera. Amb els cultius purs s'ha d'obtenir el marciment típic en el termini de 15 dies. Si després d'aquest període no es presenten els símptomes, no es pot confirmar que el cultiu és una forma patògena de *R. solanacearum*;

4) comprovar si s'aprecien símptomes de marciment i/o epinàstia, clorosi i creixement reduït;

5) aïllar les plantes simptomàtiques separant una secció de tija que estigui 2 cm per damunt del punt d'inoculació. Dilacerar i suspendre en un petit volum d'aigua destil·lada estèril o en tampó fosfat 50 mm (apèndix 4). Aïllar de la suspensió mitjançant dilució, estenent o fent estries en un medi adequat, preferentment en un medi selectiu (apèndix 2), incubar entre 48 i 72 hores a 28°C i examinar la formació de colònies típiques de *R. solanacearum*.

Apèndix 1

Laboratoris que han participat en l'optimització i la validació dels protocols

| Laboratori (1) | Ciutat | País |
|---|--------------|---------------|
| Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit..... | Viena i Linz | Àustria |
| Departement Gewasbescherming | Merelbeke | Bèlgica |
| Plantedirektoratet..... | Lyngby | Dinamarca |
| Central Science Laboratory | York | Anglaterra |
| Scottish Agricultural Science Agency | Edimburg | Escòcia |
| Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité Bactériologie..... | Angers | França |
| Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre.. | Le Rheu | França |
| Biologische Bundesanstalt | Kleinmachnow | Alemanya |
| Pflanzenschutzamt Hannover | Hannover | Alemanya |
| State Laboratory | Dublín | Irlanda |
| Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali | Bolonya | Itàlia |
| Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari | Verona | Itàlia |
| Nederlandse Algemene Keuringsdienst | Emmeloord | Països Baixos |
| Plantenziektenkundige Dienst | Wageningen | Països Baixos |
| Direcção-Geral de Protecção das Culturas | Lisboa | Portugal |
| Centre de Diagnòstic d'Aldearrubia | Salamanca | Espanya |
| Institut Valencià d'Investigacions Agràries | València | Espanya |
| Swedish University of Agricultural Sciences..... | Uppsala | Suècia |

(1) Científics de contacte: vegeu el lloc web <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

Apèndix 2

Medi per a l'aïllament i el cultiu de *R. solanacearum*

a) Medi de cultiu en general

Agar nutritiu (NA)

Agar nutritiu (Difco) 23,0 g
Aigua destil·lada 1,0 l

Dissoldre els ingredients i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

Agar de llevat, glucosa, peptona (YPGA)

Extracte de llevat (Difco) 5,0 g
Bacto-peptona (Difco) 5,0 g
D(+)-glucosa (monohidrat) 10,0 g
Bacto-agar (Difco) 15,0 g

Aigua destil·lada 1,0 l
Dissoldre els ingredients i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

Agar de sacarosa i peptona (SPA)

Sacarosa 20,0 g
Bacto-peptona (Difco) 5,0 g
K₂HPO₄ 0,5 g
MgSO₄·7H₂O 0,25 g
Bacto-agar (Difco) 15,0 g
Aigua destil·lada 1,0 l
pH 7,2-7,4

Dissoldre els ingredients i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

Medi de tetrazole de Kelman

Casaminoàcids (Difco) 1,0 g
Bacto-peptona (Difco) 10,0 g
Dextrosa 5,0 g
Bacto-agar (Difco) 15,0 g
Aigua destil·lada 1,0 l
Cristall violeta (Sigma) 5 mg per l
Polimixina-B-Sulfat (Sigma P-1004) 600.000 U (aproximadament 100 mg) per l
Bacitracina (Sigma B-0125) 1.250 U (aproxim. 25 mg) per l
Cloramfenicol (Sigma C-3175) 5 mg per l
Penicil·lina-G (Sigma P-3032) 825 U (aproximadament 0,5 mg) per l
Clorur de 2,3,5-terfenil tetrazole (Sigma) 50 mg per l

Nota:

1. La utilització de reactius diferents dels especificats damunt pot afectar al creixement de *R. solanacearum*.

2. Es pot utilitzar agar oxoide #1 en lloc de bacto-agar (Difco). En aquest cas, el creixement de *R. solanacearum* serà més lent, encara que també es pot reduir el creixement de sapròfits competidors. Les colònies típiques de *R. solanacearum* poden necessitar un o dos dies més per formar-se i la coloració rogenca pot ser més lleugera i difusa que en bacto-agar.

3. Si s'incrementa la concentració de bacitracina a 2.500 U per l es poden reduir les poblacions de bacteris competidors sense que s'afecti el creixement de *R. solanacearum*.

Emmagatzemar els medis i les solucions estàndard d'antibiòtics a 4°C a les fosques i utilitzar-les en el termini d'un mes.

Les plaques no han de tenir condensació de superfície abans que es facin servir.

Evitar un assecament excessiu de les plaques.

S'ha d'efectuar un control de qualitat després de la preparació de cada nou lot de medi mitjançant sembra d'una suspensió d'un cultiu de referència de *R. solanacearum* (vegeu l'apèndix 3) i observació de la formació de colònies típiques després d'incubació a 28°C de dos a cinc dies.

c) Medis d'enriquiment validats

Caldo SMSA (Elphinstone et al., 1996)

Preparar-ho com per al medi d'agar selectiu SMSA, però ometre bacto- agar i clorur de 2,3,5-tetrazole.

Dissoldre els ingredients i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

Refredar a 50°C i afegir una solució de clorur de 2,3,5-trifenil tetrazole (Sigma), esterilitzada per filtració, per aconseguir una concentració final de 50 mg/l.

b) Medis de cultiu selectiu validats

Medi SMSA (Englebrecht, 1994, modificat per Elphinstone et al., 1996)

Medi de base

Casaminoàcids (Difco) 1,0 g
Bacto-peptona (Difco) 10,0 g
Glicerol 5,0 ml
Bacto-agar (Difco) (vegeu la nota 2) 15,0 g
Aigua destil·lada 1,0 l

Dissoldre els ingredients i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

Refredar a 50°C i afegir solucions estàndard acuoses, esterilitzades per filtració, dels ingredients següents, a fi d'obtenir les concentracions finals especificades:

5 mg per l
(Sigma P-1004) 600.000 U (aproximadament 100 mg) per l
1.250 U (aproxim. 25 mg) per l
5 mg per l
825 U (aproximadament 0,5 mg) per l
50 mg per l

Caldo Wilbrink modificat (Caruso et al., 2002)

Sacarosa 10 g
Peptona proteosa 5 g^o
K₂HPO₄ 0,5 g
MgSO₄ 0,25 g
NaNO₃ 0,25 g
Aigua destil·lada 1 l

Esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts i refredar a 50°C.

Afegir-hi solucions estàndard d'antibiòtics com per al caldo SMSA.

Apèndix 3

A. Material de control normalitzat comercialment disponible

a) *Aïllats bacterians*

Es recomanen els següents aïllats bacterians per utilitzar-los com a material normalitzat de referència, ja sigui com a controls positius (quadre 1) o durant l'optimització de les proves per evitar reaccions encreuades (quadre 2). Totes les soques estan comercialitzades per:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteri (NCPBP), Central Science Laboratory, York, Regne Unit.
2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Països Baixos.
3. Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP) — INRA Station Phytobactériologie, Angers, França.

Quadre 1. Panell de referència SMT d'aïllats de *R. solanacearum*

| Codi NCPPB | SMT# | Altres codis | País d'origen | Biovar |
|----------------|-------|---|---------------|--------|
| NCPPB 4153 | 6 | CFBP 4582, Pr 3020, EURS11 | Egipte | 2 |
| NCPPB 4154 | 10 | CFBP 4585, 550, EURS21 | Turquia | 2 |
| NCPPB 3857 | 12 | CFBP 4587, Pr 1140, EURS26 | Anglaterra | 2 |
| NCPPB 1584 | 23 | CFBP 4598, EURS49 | Xipre | 2 |
| NCPPB 2505 | 24 | CFBP 4599, EURS50 | Suècia | 2 |
| NCPPB 4155 | 26 | CFBP 4601, 502, EURS55 | Bèlgica | 2 |
| NCPPB 4156 (*) | 71(*) | PD 2762, CFBP 3857 | Països Baixos | 2 |
| NCPPB 4157 | 66 | LNPV 15.59 | França | 2 |
| NCPPB 4158 | 39 | CFBP 4608, Port 448, EURS80, NCPPB 4066 | Portugal | 2 |
| NCPPB 4160 | 69 | IVIA-1632-2 | Espanya | 2 |
| NCPPB 4161 | 76 | B3B | Alemanya | 2 |
| NCPPB 325 | 41 | CFBP 2047, KEL60-1, R842 | Estats Units | 1 |
| NCPPB 3967 | 42 | CFBP 4610, R285, GONG7 | Costa Rica | 1 |
| NCPPB 4028 | 43 | CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205 | Colòmbia | 2 |
| NCPPB 3985 | 44 | CFBP 4612, R578, CIP312 | Perú | 2T |
| NCPPB 3989 | 45 | CFBP 4613, R568, CIP226 | Brasil | 2T |
| NCPPB 3996 | 46 | CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225 | Perú | 3 |
| NCPPB 3997 | 47 | CFBP 4614, R280/363, CIP49, HI HA0131a | Austràlia | 3 |
| NCPPB 4029 | 48 | CFBP 4615, R297/349, CIP121, CMIb2861 | Sri Lanka | 4 |
| NCPPB 4005 | 49 | CFBP 4616, R470 | Filipines | 4 |
| NCPPB 4011 | 50 | CFBP 4617, R288, HEmp2 | Xina | 5 |

(*) Utilitzar-ho com a soca normalitzada de referència de *R. solanacearum* biovar 2 (raça 3).

Nota: L'autenticitat de les soques esmentades només es pot garantir

Quadre 2. Panell de referència SMT de bacteris serològicament o genèticament relacionats per utilitzar-los en l'optimització de les proves de detecció

| Codi NCPPB | SMT # | Un altre codi | Identificació |
|------------|-------|---------------|---|
| NCPPB 4162 | 51 | CFBP 1954 | <i>Bacillus polymyxa</i> (1) |
| NCPPB 4163 | 52 | CFBP 1538 | <i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>Marginalis</i> (1) |
| NCPPB 4164 | — | CFBP 2227 | <i>Burkholderia cepacia</i> (2) |
| NCPPB 4165 | — | CFBP 2459 | <i>Ralstonia pickettii</i> (2) |
| NCPPB 4166 | 58 | CFBP 3567 | <i>Ralstonia pickettii</i> (1) |
| | | CSLPr1150 | |
| NCPPB 4167 | 60 | CFBP 4618 | <i>Ralstonia</i> sp. (1) |
| | | PD 2778 | |
| NCPPB 1127 | 53 | CFBP 3575 | <i>Burkholderia andropogonis</i> (1) |
| NCPPB 353 | 54 | CFBP 3572 | <i>Burkholderia caryophylli</i> (1) |
| NCPPB 945 | 55 | CFBP 3569 | <i>Burkholderia cepacia</i> (1) |
| NCPPB 3708 | 56 | CFBP 3574 | <i>Burkholderia glumae</i> (1) |
| NCPPB 3590 | 57 | CFBP 3573 | <i>Burkholderia plantarii</i> (1) |
| NCPPB 3726 | 59 | CFBP 3568 | <i>Banana Blood Disease Bacterium</i> (1) (2) (3) |
| NCPPB 4168 | 61 | CFBP 4619 | <i>Enterobacter</i> sp. (1) |
| | | IPO S339 | |
| NCPPB 4169 | 62 | IPO 1695 | <i>Enterobacter</i> sp. (1) |
| NCPPB 4170 | 63 | CFBP 4621 | <i>Ochrobactrum anthropi</i> (1) (2) |
| | | IPO S306 | |
| NCPPB 4171 | 64 | CFBP 4622 | <i>Curtobacterium</i> sp. (1) (2) |
| | | IPO 1693 | |

| Codi NCPPB | SMT # | Un altre codi | Identificació |
|------------|-------|---------------|-----------------------------------|
| NCPPB 4172 | 65 | IPO 1 696a | <i>Pseudomonas</i> sp. (1) |
| NCPPB 4173 | – | PD 2318 | <i>Aureobacterium</i> sp. (2) |
| NCPPB 4174 | 81 | IVIA 1844.06 | <i>Flavobacterium</i> sp. (1) (2) |

- (1) Soca que pot presentar reacció encreuada en proves serològiques (IF i/o ELISA) amb antisèrums policlonals.
- (2) Soca de la qual es pot amplificar el producte de la PCR en alguns laboratoris d'una mida similar a l'esperat fent servir encebadors específics OLI-1 i Y-2 (vegeu l'apèndix 6).
- (3) Probablement tindrà reaccions encreuades en la major part de les proves, però només se'n coneix l'aparició en bananes a Indonèsia.

b) *Material de control normalitzat comercialment disponible*

El següent material de control normalitzat es pot obtenir a partir d'un cultiu NCPPB:

Congelar precipitat sec d'extracte de patata a partir de 200 tubercles de patata sans com a control negatiu per a totes les proves.

Congelar precipitat sec d'extracte de patata a partir de 200 tubercles de patata sans que continguin de 10_3 a 10_4 i 10_4 a 10_6 cèl·lules de *R. solanacearum* biovar 2 (per exemple, soca NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) com a controls positius per a proves serològiques i PCR. Tenint en compte que la viabilitat de les cèl·lules es veu afectada durant el criodessecament, no són adequats com a controls normalitzats per a proves d'aïllament o de bioassaig.

Utilitzar suspensions fixades amb formalina de *R. solanacearum* biovar 2 (soca NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) de 106 cèl·lules per ml com a controls positius per a proves serològiques.

B. Preparació de controls positius i negatius

Preparar un cultiu de 48 hores d'una soca virulenta de *R. solanacearum* raça 3/biovar 2 (per exemple, soca NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) en medi base SMSA i suspendre en tampó fosfat 10 mM per obtenir una densitat cel·lular d'aproximadament 2×10^8 cfu per ml. Això s'obté normalment mitjançant una suspensió lleugerament tèrbola equivalent a una densitat òptica de 0,15 a 600 nm.

Separar les falques basals de 200 tubercles d'una varietat de pell blanca coneguda perquè està exempta de *R. solanacearum*.

Processar les falques basals com és habitual i resuspendre el precipitat en 10 ml.

Preparar deu microvials estèrils d'1,5 ml amb 900 µl del precipitat resuspès.

Transferir 100 µl de la suspensió de *R. solanacearum* al primer microvial. Homogeneïtzar per agitació.

Establir nivells decimals de contaminació realitzant noves dilucions en els cinc microvials següents.

Els sis microvials contaminats s'han de fer servir com a controls positius. Els quatre microvials no contaminats s'han de fer servir com a controls negatius. Etiquetar els microvials com correspongui.

Preparar alíquotes de 100 µl en microvials estèrils d'1,5 ml per obtenir d'aquesta manera nou rèpliques de cada mostra de control. Emmagatzemar a una temperatura de -16°C a -24°C fins que s'hagin de fer servir.

La presència i la quantificació de *R. solanacearum* en les mostres de control s'ha de confirmar en primer lloc mitjançant una prova IF.

Per a la prova PCR, extreure ADN de les mostres de control positives i negatives per a cada sèrie de mostres d'assaig.

Per a les proves IF i FISH, realitzar assaigs amb les mostres de control positives i negatives per a cada sèrie de mostres d'assaig.

En les proves IF, FISH i PCR s'ha de detectar *R. solanacearum* almenys en 106 i 104 cèl·lules/ml dels controls positius i en cap dels controls negatius.

Apèndix 4

Tampons per a procediments d'assaig

GENERAL: Els tampons esterilitzats que no s'hagin oberts es poden emmagatzemar fins a un any.

1. Tampons per al procediment d'extracció

1.1. Tampó d'extracció (tampó fosfat 50 mM, pH 7,0)

Aquest tampó s'utilitza per a l'extracció del bacteri del teixit de les plantes mitjançant l'homogeneïtzació o l'agitació.

| | |
|--|--------|
| Na ₂ HPO ₄ (anhidre) | 4,26 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2,72 g |
| Aigua destil·lada | 1,00 l |

Dissoldre els ingredients, verificar el pH i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

Els components addicionals següents poden resultar útils:

| | Finalitat | Quantitat (per l) |
|---|-------------------------------|-------------------|
| Flocs de Lubrol | Defloculant (*) | 0,5 g |
| Compost DC silicona antiescumant | Antiescumant (*) | 1,0 ml |
| Pirofosfat tetrasòdic | Antioxidant | 1,0 g |
| Polivinilpirrolidona-40000 (PVP-40) | Unir els inhibidors PCR | 50 g |

(*) Per utilitzar-lo en el mètode d'extracció per homogeneïtzació.

1.2. Tampó de precipitat (tampó fosfat 10 mm, pH 7,2)

Aquest tampó s'utilitza per a la resuspensió i la dilució d'extractes de falques basals de tubercles de patata després de la concentració en un precipitat mitjançant centrifugació.

| | |
|--|-------|
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 2,7 g |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 0,4 g |
| Aigua destil·lada | 1,0 l |

Dissoldre els ingredients, verificar el pH i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

2. Tampons per a la prova IF

2.1. Tampó IF [tampó fosfat salí (PBS) 10 mm, pH 7,2]

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

| | |
|--|-------|
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 2,7 g |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 0,4 g |
| NaCl | 8,0 g |
| Aigua destil·lada | 1,0 l |

Dissoldre els ingredients, verificar el pH i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

2.2. Tampó IF-Tween

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

2.3. Solució de glicerol amb tampó de fosfat, pH 7,6

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

| | |
|--|--------|
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 3,2 g |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 0,15 g |
| Glicerol | 50 ml |
| Aigua destil·lada | 100 ml |

Al mercat poden trobar-se solucions de muntatge que protegeixen la fluorescència, com, per exemple, Vectashield® (Vector Laboratories) o Citifluor® (Leica).

3. Tampons per a la prova ELISA-indirecta

3.1. Tampó força doble per a entapissat, pH 9,6

| | |
|---------------------------------|---------|
| Na ₂ CO ₃ | 6,36 g |
| NaHCO ₃ | 11,72 g |
| Aigua destil·lada | 1,00 l |

Dissoldre els ingredients, verificar el pH i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

Es pot afegir com a antioxidant sulfit de sodi (0,2%) si és necessari per evitar l'acumulació de compostos aromàtics oxidats.

3.2. Tampó fosfat salí (PBS), 10X pH 7,4

| | |
|--|--------|
| NaCl | 80,0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2,0 g |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 29,0 g |
| KCl | 2,0 g |
| Aigua destil·lada | 1,0 l |

3.3. PBS-Tween

| | |
|---------|--------|
| PBS 10X | 100 ml |
|---------|--------|

| | |
|-------------------|--------|
| Tween 20 al 10% | 5 ml |
| Aigua destil·lada | 895 ml |

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

| | |
|-------------------------------------|---------|
| PBS 10X | 10,0 ml |
| Polivinilpirrolidona-44000 (PVP-44) | 2,0 g |
| Tween 20 al 10% | 0,5 ml |
| Llet en pols | 0,5 g |
| Aigua destil·lada, completar fins a | 100 ml |

3.5. Solució de substrat fosfatasa alcalina, pH 9,8

| | |
|-------------------|--------|
| Dietanolamina | 97 ml |
| Aigua destil·lada | 800 ml |

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

Completar fins a 1 litre amb aigua destil·lada.

Afegir 0,2 g de MgCl₂.

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

4. Tampons per a la prova ELISA-DASI

4.1. Tampó d'entapissat, pH 9,6

| | |
|---------------------------------|---------|
| Na ₂ CO ₃ | 1,59 g |
| NaHCO ₃ | 2,93 g |
| Aigua destil·lada | 1.000ml |

Dissoldre els ingredients i comprovar el pH.

4.2. Tampó fosfat salí (PBS), 10X pH 7,2-7,4

| | |
|--|----------|
| NaCl | 80,0 g |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 4,0 g |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 27,0 g |
| Aigua destil·lada | 1.000 ml |

4.3. PBS-Tween

| | |
|-------------------|--------|
| 10X PBS | 50 ml |
| Tween 20 al 10% | 5 ml |
| Aigua destil·lada | 950 ml |

4.4. Tampó de substrat, pH 9,8

| | |
|-------------------|--------|
| Dietanolamina | 100 ml |
| Aigua destil·lada | 900 ml |

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

Apèndix 5

Determinació del nivell de contaminació en les proves IF i FISH

1. Comptar el nombre mitjà de cèl·lules fluorescents típiques per camp de visió (c).
2. Calcular el nombre de cèl·lules fluorescents típiques per vaset del portaobjectes del microscopi (C):

$$C = c \times S/s$$

on

S = superfície del vaset del portaobjectes múltiple
s = superfície del camp de l'objectiu

$$s = \pi^2/4G^2K^2$$

on

i = coeficient de camp (varia de 8 a 24 depenent del tipus ocular)

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

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

3. Calcular el nombre de cèl·lules fluorescents típiques per ml de precipitat resuspès (N):

$$N = C \times 1000/y \times F$$

on

1. Protocol PCR de Seal *et al.* (1993)

1.1. Encebadors de l'oligonucleòtid

Encebador directe OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'

Encebador revers I-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Mida esperada de l'amplicó dels motllos d'ADN de *R. solanacearum* = 288 pb.

1.2. Barreja per a la reacció PCR

| Reactiu | Quantitat per reacció | Concentració final |
|---|-----------------------|--------------------------------|
| Aigua ultrapura estèril | 17,65 µl | |
| 10x tampó PCR (1) (15 mM MgCl ₂)..... | 2,5 µl | 1x (1,5 mM MgCl ₂) |
| Barreja dNTP (20 mM) | 0,25 µl | 0,2 mM |
| Encebador OLI-1 (20 µM)..... | 1,25 µl | 1µM |
| Encebador I-2 (20 µM) | 1,25 µl | 1µM |
| Polimerasa Taq (5 U/µl) (1)..... | 0,1 µl | 0,5 U |
| Volum de mostra..... | 2,0 µl | |
| Volum total..... | 25 µl | |

(1) El mètode es va validar fent servir polimerasa Taq de Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL.

1.3. Condicions de reacció PCR

Aplicar el programa següent:

1 cicle de:

i) 2 minuts a 96°C (desnaturalització del motllo d'ADN)

35 cicles de:

ii) 20 segons a 94°C (desnaturalització del motllo d'ADN)

iii) 20 segons a 68°C (hibridació dels encebadors)

iv) 30 segons a 72°C (extensió de la còpia)

1 cicle de:

v) 10 minuts a 72°C (extensió final)

vi) mantenir a 4°C.

Nota: Aquest programa es va optimitzar per utilitzar-lo amb un termociclador Perkin Elmer 9600. Pot ser necessari

2.2. Barreja per a la reacció PCR

| Reactiu | Quantitat per reacció | Concentració final |
|------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Aigua ultrapura estèril..... | 16,025 µl | |
| 10x tampó PCR (1)..... | 2,5 µl | 1x (1,5 mM MgCl ₂) |

y = volum de precipitat resuspès a cada vaset

i

F = factor de dilució del precipitat resuspès

Apèndix 6

Protocols i reactius PCR validats

Nota: Les proves preliminars han de permetre la detecció reproducible d'almenys 10³ a 10⁴ cèl·lules de *R. solanacearum* per ml d'extracte de mostra.

D'altra banda, les proves preliminars no han de proporcionar resultats positius falsos respecte a un conjunt de soques bacterianes seleccionades (vegeu l'apèndix 3).

modificar la durada dels cicles ii), iii) i iv) per utilitzar-lo amb altres models.

1.4. Anàlisi de l'enzim de restricció de l'amplicó

Els productes PCR amplificats a partir d'ADN de *R. solanacearum* produeixen un polimorfisme de la longitud del fragment de restricció característic amb l'enzim *Ava II* després de la incubació a 37°C.

2. Protocol PCR de Pastrok i Maiss (2000)

2.1. Encebadors de l'oligonucleòtid

Encebador directe Ps-1 5'- agt cga acg gca gcg ggg g -3'

Encebador revers Ps-2 5'- ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca -3'

Mida esperada de l'amplicó dels motllos d'ADN de *R. solanacearum* = 553 pb.

| Reactiu | Quantitat per reacció | Concentració final |
|----------------------------------|-----------------------|--------------------|
| BSA (fracció V) (10%)..... | 0,25 µl | 0,1% |
| Barreja d-nTP (20 mM)..... | 0,125 µl | 0,1 mM |
| Encebador Ps-1 (10 µM)..... | 0,5 µl | 0,2 µM |
| Encebador Ps-2 (10 µM)..... | 0,5 µl | 0,2 µM |
| Polimerasa Taq (5 U/µl) (1)..... | 0,1 µl | 0,5 U |
| Volum de mostra | 5,0 µl | |
| Volum total..... | 25,0 µl | |

(1) Els mètodes es van validar utilitzant polimerasa *Taq* de Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL.

Nota: Originalment optimitzat per a termociclador MJ Research PTC 200 amb polimerasa Gibco Taq.

També es poden utilitzar Perkin Elmer AmpliTaq i també amb les mateixes concentracions.

2.3. Condicions de reacció PCR

Aplicar el programa següent:

1 cicle de:

i) 5 minuts a 95°C (desnaturalització del motllo d'ADN)

35 cicles de:

ii) 30 segons a 95°C (desnaturalització del motllo d'ADN)

iii) 30 segons a 68°C (hibridació dels encebadors)

iv) 45 segons a 72°C (extensió de la còpia)

1 cicle de:

v) 5 minuts a 72°C (extensió final)

vi) mantenir a 4°C.

3. Protocol PCR multiplex amb control PCR intern (Patrik et al., 2002)

3.1. Encebadors de l'oligonucleòtid

Encebador directe RS-1-F 5'- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3'

Encebador revers RS-1-R 5'- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3'

Encebador directe NS-5-F 5'- AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G -3'

Encebador revers NS-6-R 5'- GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC -3'

Mida esperada de l'amplicó dels motllos d'ADN de *R. solanacearum* = 718 pb (conjunt d'encebadors RS).

Mida esperada de l'amplicó de control PCR intern 18S rARN = 310 pb (conjunt d'encebadors NS).

3.2. Barreja per a la reacció PCR

| Reactiu | Quantitat per reacció | Concentració final |
|---|-----------------------|--------------------------------|
| Aigua ultrapura estèril..... | 12,625 µl | |
| 10x tampó PCR (1) (15 mM MgCl ₂)..... | 2,5 µl | 1x (1,5 mM MgCl ₂) |
| BSA (fracció V) (10%)..... | 0,25 µl | 0,1% |
| Barreja d-nTP (20 mM)..... | 0,125 µl | 0,1 mM |
| Encebador RS-1-F (10 µM)..... | 2,0 µl | 0,8 µM |
| Encebador RS-1-R (10 µM)..... | 2,0 µl | 0,8 µM |
| Encebador NS-5-F (10 µM) (2)..... | 0,15 µl | 0,06 µM |
| Encebador NS-6-R (10 µM) (2)..... | 0,15 µl | 0,06 µM |
| Polimerasa Taq (5 U/µl) (1)..... | 0,2 µl | 1,0 U |
| Volum de mostra | 5,0 µl | |
| Volum total | 25,0 µl | |

(1) Els mètodes es van validar emprant polimerasa *Taq* de Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL.

(2) La concentració dels encebadors NS-5-F i NS-6-R es va optimitzar per a l'extracció de falques basals de patata utilitzant el mètode d'homogeneïtzació i purificació de l'ADN d'acord amb Patrik (2000) (vegeu la secció VI.A.6.1.a). És necessari procedir a la reoptimització de les concentracions de reactius si s'utilitzen l'extracció per agitació o altres mètodes d'aïllament de l'ADN.

Nota: Aquest programa està optimitzat per utilitzar-lo amb un termociclador MJ Research PTC 200. Pot ser necessari modificar la durada dels cicles ii), iii) i iv) per emprarlos amb altres models.

2.4. Anàlisi de l'enzim de restricció de l'amplicó

Els productes PCR amplificats a partir d'ADN de *R. solanacearum* produeixen un polimorfisme de la longitud del fragment de restricció característic amb l'enzim Taq I després de la incubació a 65°C durant 30 minuts. Els fragments de restricció obtinguts a partir del fragment específic de *R. solanacearum* tenen una mida de 457 pb i 96 pb.

3.3. Condicions de reacció PCR

Aplicar el programa següent:

1 cicle de:

i) 5 minuts a 95°C (desnaturalització del motllo d'ADN)

35 cicles de:

ii) 30 segons a 95°C (desnaturalització del motllo d'ADN)

iii) 30 segons a 58°C (hibridació dels encebadors)

iv) 45 segons a 72°C (extensió de la còpia)

1 cicle de:

v) 5 minuts a 72°C (extensió final)

vi) mantenir a 4°C.

4.1. Encebadors de l'oligonucleòtid

Encebador directe Rs-1-F

5'- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3'

Encebador revers Rs-1-R

5'- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3'

Encebador revers Rs-3-R

5'- TTC ACG GCA AGA TCG CTC -3'

Mida esperada de l'amplicó dels motllos d'ADN de *R. solanacearum*:

amb Rs-1-F/Rs-1-R = 718 pb

amb Rs-1-F/Rs-3-R = 716 pb.

4.2. Barreja per a la reacció PCR

a) Biovar 1/2 específic PCR

| Reactiu | Quantitat per reacció | Concentració final |
|----------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Aigua ultrapura estèril..... | 12,925 µl | |
| 10X tampó PCR (1)..... | 2,5 µl | 1x (1,5 mM MgCl ₂) |
| BSA (fracció V) (10%)..... | 0,25 µl | 0,1% |
| Barreja d-NTP (20 mM)..... | 0,125 µl | 0,1 mM |
| Encebador Rs-1-F (10 µM)..... | 2 µl | 0,8 µM |
| Encebador Rs-1-R (10 µM)..... | 2 µl | 0,8 µM |
| Polimerasa Taq (5 U/µl) (1)..... | 0,2 µl | 1 U |
| Volum de mostra..... | 5,0 µl | |
| Volum total..... | 25,0 µl | |

(1) Els mètodes es van validar utilitzant polimerasa Taq de Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL.

b) Biovar 3/4/5 específic PCR

| Reactiu | Quantitat per reacció | Concentració final |
|----------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Aigua ultrapura estèril..... | 14,925 µl | |
| 10X tampó PCR (1)..... | 2,5 µl | 1x (1,5 mM MgCl ₂) |
| BSA (fracció V) (10%)..... | 0,25 µl | 0,1% |
| Barreja dNTP (20 mM)..... | 0,125 µl | 0,1 mM |
| Encebador Rs-1-F (10 µM)..... | 1 µl | 0,4 µM |
| Encebador Rs-3-R (10 µM)..... | 1 µl | 0,4 µM |
| Polimerasa Taq (5 U/µl) (1)..... | 0,2 µl | 1 U |
| Volum de mostra..... | 5,0 µl | |
| Volum total..... | 25,0 µl | |

(1) Els mètodes es van validar utilitzant polimerasa Taq de Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL.

Nota: Aquest programa està optimitzat per utilitzar-lo amb un termociclador MJ Research PTC 200. Pot ser necessari modificar la durada dels cicles ii), iii) i iv) per utilitzar-lo amb altres models.

3.4. Anàlisi de l'enzim de restricció de l'amplicó

Els productes PCR amplificats a partir d'ADN de *R. solanacearum* produeixen un polimorfisme de la longitud del fragment de restricció característic amb l'enzim *Bsm* I o un *Isoschizomere* (per exemple, *Mva* 1269 I) després de la incubació a 65°C durant 30 minuts.

4. Protocol PCR específic del biovar de *R. solanacearum* (Patrik *et al*, 2001)

4.3. Condicions de reacció PCR

Aplicar el programa següent a les reaccions específiques de biovar 1/2 i biovar 3/4/5:

1 cicle de:

i) 5 minuts a 95°C (desnaturalització del motllo d'ADN)

35 cicles de:

ii) 30 segons a 95°C (desnaturalització del motllo d'ADN)

iii) 30 segons a 58°C (hibridació dels encebadors)

iv) 45 segons a 72°C (extensió de la còpia)

1 cicle de:

v) 5 minuts a 72°C (extensió final)

vi) mantenir a 4°C.

Nota: Aquest programa es va optimitzar per utilitzar-lo amb un termociclador MJ Research PTC 200. Pot ser necessari modificar la durada dels cicles ii), iii) i iv) per emprar-lo amb altres models.

4.4. Anàlisi de l'enzim de restricció de l'amplicó

Els productes PCR amplificats a partir d'ADN de *R. solanacearum* utilitzant encebadors Rs-1-F i Rs-1-R produeixen un polimorfisme de la longitud del fragment de restricció característic amb l'enzim Bsm I o un *Isoschizomere* (per exemple, Mva 1269 I) després de la incubació a 65°C durant 30 minuts. Els productes PCR amplificats a partir d'ADN de *R. solanacearum* utilitzant els encebadors Rs-1-F i Rs-3-R no tenen llocs de restricció.

5. Preparació del tampó de càrrega

5.1. Blau de brom fenol (solució estàndard al 10%)

| | |
|---------------------|-------|
| Blau de brom fenol | 5 g |
| Aigua bidestil·lada | 50 ml |

5.2. Tampó de càrrega

| | |
|--------------------------|--------|
| Glicerol (86%) | 3,5 ml |
| Blau de brom fenol (5,1) | 300 µl |
| Aigua bidestil·lada | 6,2 ml |

6. 10X tampó de tris acetat EDTA (TAE), pH 8,0

| | |
|----------------------|----------|
| Tampó tris | 48,40 g |
| Àcid acètic glacial | 11,42 ml |
| EDTA (sal dissòdica) | 3,72 g |
| Aigua destil·lada | 1,00 l |

Diluir a 1X abans d'utilitzar-lo.

També està disponible en el mercat (per exemple, Invitrogen o equivalent).

Apèndix 7

Reactius validats per a la prova FISH

1. Oligosondes

Sonda específica per a *R. solanacearum* OLI-1-CY3:

5'- GGC AGG TAG CAA GCT ACC CCC-3'

Sonda eubacteriana no específica EUB-338-FITC:

5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'

2. Solució fixadora

ADVERTÈNCIA! LA SOLUCIÓ FIXADORA CONTÉ PARA-FORMALDEHID QUE ÉS TÒXIC. UTILITZAR GUANTS I NO INHALAR. ES RECOMANA TREBALLAR EN UNA CAMPANA EXTRACTORA DE GASOS.

i) Escalfar 9 ml d'aigua de grau molecular, per exemple aigua ultrapura, a 60°C aproximadament i afegir-hi 0,4 g de paraformaldehid. El paraformaldehid es dissol quan s'afegeixen 5 gotes d'1N NaOH i es remou amb un agitador magnètic.

ii) Ajustar el pH a 7,0 mitjançant l'addició d'1 ml de tampó de fosfat de concentració 0,01 M i 5 gotes d'1N HCl. Verificar el pH amb bandes indicadores i ajustar si fos necessari amb HCl o NaOH. **ADVERTÈNCIA! NO UTILITZAR UN MESURADOR DE PH EN SOLUCIONS QUE CONTINGUIN PARA-FORMALDEHID.**

iii) Filtrar la solució amb un filtre de membrana de 0,22 µm i mantenir lliure de pols a 4°C fins a una nova utilització.

3. 3X Hybmix

| | |
|---|----------------|
| NaCl | 2,7 M |
| Tris-HCl | 60 mM (pH 7,4) |
| EDTA (filtre esterilitzat amb autoclau) | 15 mM |

Diluir a 1X com es necessita.

4. Solució d'hibridació

| | |
|---------------------------|---------|
| 1X Hybmix | |
| Dodecilsulfat sòdic (SDS) | 0,01% |
| Formamida | 30% |
| Sonda EUB 338 | 5 ng/µl |
| Sonda OLI-1 o OLI-2 | 5 ng/µl |

Preparar les quantitats de solució d'hibridació d'acord amb els càlculs de la taula 1. Per a cada portaobjectes (que contingui dues mostres diferents per duplicat) es necessiten 90 µl de solució d'hibridació. **IMPORTANT: S'HA DE TENIR EN COMPTE QUE LA FORMAMIDA ÉS MOLT TÒXICA, PER LA QUAL COSA S'HAN DE UTILITZAR GUANTS I PRENDRE'S LES PRECAUCIONS DE SEGURETAT NECESSÀRIES.**

Taula 1: Quantitats suggerides per a la preparació de la barreja d'hibridació

| Nombre de portaobjectes | 1 | 4 | 6 | 8 | 10 |
|---------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|
| Aigua ultrapura estèril..... | 23,1 | 92,4 | 138,6 | 184,8 | 231,0 |
| 3X hybmix..... | 30,0 | 120,0 | 180,0 | 240,0 | 300,0 |
| SDS a l'1% | 0,9 | 3,6 | 5,4 | 7,2 | 9,0 |
| Formamida | 27,0 | 108,0 | 162,0 | 216,0 | 270,0 |
| Sonda EUB 338 (100 ng/µl) | 4,5 | 18,0 | 27,0 | 36,0 | 45,0 |

| Nombre de portaobjectes | 1 | 4 | 6 | 8 | 10 |
|--------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|
| Sonda OLI-1 o OLI-2 (100 ng/µl)..... | 4,5 | 18,0 | 27,0 | 36,0 | 45,0 |
| Volum total (µl) | 90,0 | 360,0 | 540,0 | 720,0 | 900,0 |

Nota: Emmagatzemar totes les solucions que continguin oligosondes fotosensibles a les fosques a -20°C. Protegir de la llum del sol o elèctrica directa durant la seva utilització.

5. Tampó fosfat 0,1 M, pH 7,0

| | |
|----------------------------------|--------|
| Na ₂ HPO ₄ | 8,52 g |
| KH ₂ PO ₄ | 5,44 g |
| Aigua destil·lada | 1,00 l |

Dissoldre els ingredients, verificar el pH i esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 minuts.

Apèndix 8

Condicions de cultiu per al tomàquet i l'albergínia

Semrar llavors de tomàquet (*Lycopersicon esculentum*) o albergínia (*Solanum melongena*) en compost pasteuritzat de llavors. Trasplantar les plàntules amb els cotilèdons completament oberts (10 a 14 dies) en compost pasteuritzat de test.

Les albergínies o tomàquets s'han de cultivar en un hivernacle que compleixi les condicions mediambientals següents abans de la inoculació:

Durada diürna: 14 hores o dia natural si és de més durada

Temperatura:

diürna: 21 a 24°C

nocturna: 14 a 18°C

Varietat de tomàquet sensible: 'Moneymaker'

Varietat d'albergínia sensible: 'Black Beauty'

Proveïdors: vegeu el lloc web: <http://fòrum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

REFERÈNCIES

- Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
- Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Official Journal of the European Communities L235, 1-39.
- Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology* 105; 373-380.
- Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Colom, J.L., Collaret, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3634-3638.
- Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1:113-121.
- Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26; 663-678.
- Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) *Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Austràlia.
- Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27; 265-277.
- Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and D'Afronto, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 69; 269-280.
- Ito, S., I. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. *J. Phytopathology* 146; 379-384.
- Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18, 343-351.
- Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14; 335-345.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazoleum medium. *Phytopathology* 44; 693-695.
- Klement Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
- Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.
- López, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteri. In: H.W. Dehne *et al.*, (eds). *Klewer Academic Publishers*. pp. 117-121.
- Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295.
- Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85; 528-536.
- Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F. Wang, T.-H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia sola-*

nacearum (formerly *Pseudomonas solanacearum*). As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 5; 19-33.

20. Pstrik, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. J. Phytopathology 148; 619-626.

21. Pstrik, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. European Journal of Plant Pathology 108, 831-842.

22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. Food and Agricultural Immunology 7, 67-79.

23. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota: 373 pp.

24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139: 1587-1594.

25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61; 4262-4268.

26. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281-295.

27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 46; 10-15.

28. Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigalalet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.

29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative fluorescent 5'nuclease TaqMan assay. Applied and Environmental Microbiology 66; 2853-2858.

30. Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse and A.D.L. Akkermans. 1998. Detection of *R. solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4546-4554.

ANNEX III

Conservació de les proves analítiques en cas d'aparició d'un brot sospitós

1. En cada cas de focus sospitós per al qual s'hagi realitzat una o diverses proves de selecció amb resultats positius d'acord amb els mètodes que estableix l'annex II per al material vegetal enumerat i per a tots els altres casos, i s'espera rebre confirmació o refutació per aplicació dels esmentats mètodes, s'ha de procedir a la retenció i adequada conservació, fins a completar els mètodes esmentats, de:

- tots els tubercles dels quals s'hagin obtingut mostres i, sempre que sigui possible, totes les plantes de les quals s'hagin obtingut mostres,
- qualsevol extracte sobrant i qualsevol material addicional que s'hagi preparat per a la prova o proves de selecció, com per exemple plaques d'immunofluorescència, i
- tota la documentació pertinent.

La retenció dels tubercles permet que es puguin portar a terme proves de varietats quan es consideri oportú.

2. En el cas de confirmació de la presència de l'organisme, s'ha de procedir a la retenció i adequada conservació fins a un mes després, com a mínim, en virtut del procediment que estableix l'article 6, apartat 2:

- del material que especifica el punt 1, i
- d'una mostra de les albergínies o els tomàquets infectats inoculats amb extracte de tubercle o de planta, quan sigui adequat, i
- del cultiu aïllat de l'organisme.

ANNEX IV

Elements que s'han de tenir en compte per a la determinació de la probable contaminació

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

- i) llocs de producció:
 - on s'estiguin cultivant o s'hagin cultivat patates que estiguin relacionades clònicament amb aquelles en què s'hagi comprovat la infecció per l'organisme,
 - on s'estiguin cultivant o s'hagin cultivat tomàquets que procedeixin de les mateixes fonts que aquelles en què s'hagi comprovat la infecció per l'organisme,
 - on s'estiguin cultivant o s'hagin cultivat patates o tomàquets que s'hagin posat sota control oficial perquè se sospita la presència de l'organisme,
 - on 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,
 - on es cultivin patates o tomàquets i que estiguin localitzats a 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,
 - on s'utilitzin per a les tasques de reg o ruïment aigües de superfície de qualsevol font en què s'hagi confirmat o de la qual se sospita la infecció per l'organisme,

— on s'utilitzin per a les tasques de reg o ruixament aigües de superfície d'una font explotada en comú amb llocs de producció on s'hagi confirmat o dels quals se sospiti la infecció per l'organisme,

— que estiguin o hagin estat negats amb aigües de superfície en què s'hagi confirmat o de les quals se sospiti la infecció per l'organisme, i

ii) les aigües de superfície que s'utilitzin per al reg o ruixament, o per a la inundació, d'un camp o camps o d'un lloc o llocs de producció en els quals s'hagi confirmat la infecció

ANNEX V

Mesures sota control oficial

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

— el material vegetal indicat obtingut en un lloc de producció que hagi estat declarat contaminat en virtut de l'article 6, apartat 1, lletra a), incís ii),

— el lloc o llocs de producció que tinguin una relació de producció amb el material vegetal indicat que hagi estat declarat contaminat en virtut de l'article 6, apartat 1, lletra a), incís ii), 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 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'article 6, apartat 1, lletra a), incís ii), estigui present en el lloc de producció que esmenta el primer guió,

— les instal·lacions que hagin manipulat el material vegetal indicat procedent dels llocs de producció a què es refereixen els guions anteriors,

— qualsevol maquinària, vehicle, vaixell, magatzem o unitats d'aquests i qualssevol altres objectes, inclòs el material d'embalatge, que puguin haver estat en contacte amb el material vegetal indicat declarat contaminat en virtut de l'article 6, apartat 1, lletra a), incís ii),

— 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 netejar-los i desinfectar-los,

— com a resultat de la investigació i de l'anàlisi que preveu l'article 6, apartat 1, lletra a), incís i), en el cas de les patates, els tubercles o plantes que tinguin una relació clonal fraterna o parental i, en el cas del tomàquet, les plantes que procedeixin de les mateixes fonts que el material vegetal indicat declarat contaminat en virtut de l'article 6, apartat 1, lletra a), incís ii), i per a les quals, encara que les proves de detecció de l'organisme hagin estat negatives, sembli probable la contaminació a través d'un vincle clonal. Es pot efectuar una prova de varietats per verificar la identitat dels tubercles o plantes contaminats que estiguin relacionades clònicament,

— el lloc o llocs de producció del material vegetal indicat a què es refereix el guió anterior,

— el lloc o llocs de producció del material vegetal indicat en què s'utilitzin per a les tasques de reg o ruixament aigües que hagin estat declarades contaminades en virtut de l'article 6, apartat 1, lletra c), incís ii),

— el material vegetal indicat produït en camps negats amb aigües de superfície en què s'hagi confirmat la contaminació.

2. Per determinar la possible propagació a què es refereixen l'article 6, apartat 1, lletra a), incís iv), i l'article 6, apartat 1, lletra c), incís iii), s'han de tenir en compte els elements següents:

i) en els casos que preveu l'article 6, apartat 1, lletra a), incís iv):

— la proximitat d'altres llocs de producció en què es cultivi el material vegetal indicat,

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

— els llocs de producció en què s'utilitzin aigües de superfície per al reg o ruixament del material vegetal indicat quan hi hagi o hagi existit el risc d'escorrentia, o d'inundació, d'aigües superficials procedents d'un lloc o llocs de producció que hagin estat declarats contaminats en virtut de l'article 6, apartat 1, lletra a), incís ii),

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

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

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

— masses d'aigua connectades amb l'aigua superficial declarada contaminada, tenint en compte:

- la direcció i el nivell de flux de l'aigua declarada contaminada,
- la presència de solanàcies silvestres hoste.

3. La notificació a què refereix l'article 6, apartat 2:

— s'ha d'efectuar de manera immediata una vegada que la presència de l'organisme hagi estat confirmada per les proves de laboratori d'acord amb els mètodes exposats a l'annex II, i ha de recollir, com a mínim:

- per a les patates:
 - a) el nom de la varietat del lot,
 - b) el tipus (de consum, de sembra, etc.) i, si s'escau, la categoria de sembra,
- per a les tomaqueres: el nom de la varietat del lot i, si s'escau, la categoria,

— sense perjudici dels requisits de notificació de la sospita de la presència de l'organisme que preveu l'article 5, apartat 3:

- la comunitat autònoma en què s'hagi confirmat la presència de l'organisme, quan hi hagi un risc de contaminació del material vegetal indicat cap a una altra o altres comunitats autònomes, ha de transmetre immediatament a les comunitats autònomes afectades la informació necessària per complir l'article 6, apartat 3, que inclou:

- a) el nom de la varietat del lot de patates o tomàquets,
- b) el nom i la direcció de l'expedidor i del destinatari,
- c) la data de lliurament del lot de patates o tomàquets,
- d) la mida del lot de patates o tomàquets lliurat,
- e) una còpia del passaport fitosanitari o, com a mínim, del seu número, quan sigui apropiat o, si s'escau, el número de registre del productor o comerciant i una còpia de l'avís de lliurament.

Quan se subministri la informació esmentada, la comunitat autònoma n'ha d'informar immediatament el Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació.

- la Comunitat Autònoma en què s'hagi confirmat la presència de l'organisme, quan hi hagi el risc de contaminació del material vegetal indicat cap a un altre o altres estats membres, ha de transmetre immediatament al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació i aquest al seu torn, a través del curs corresponent als estats membres afectats la informació necessària per complir l'article 6, apartat 3, que inclou:

- a) el nom de la varietat del lot de patates o tomàquets,
- b) el nom i la direcció de l'expedidor i del destinatari,
- c) la data de lliurament del lot de patates o tomàquets,
- d) la mida del lot de patates o tomàquets lliurat,
- e) una còpia del passaport fitosanitari o, com a mínim, del seu nombre, quan sigui apropiat o, si s'escau, el número de registre del productor o comerciant i una còpia de l'avís de lliurament.

Quan se subministri la informació esmentada, el Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació n'ha d'informar immediatament la Comissió.

- quan hi hagi el risc de contaminació del material vegetal indicat procedent d'un altre estat membre o altres estats membres arran de la corresponent notificació o notificacions d'aquests estats, el Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació ha de comunicar la informació rebuda a les comunitats autònomes interessades per tal de complir l'article 6, apartat 3.

4. Quan hagin acabat totes les investigacions, i per tal de possibilitar la notificació addicional (complementària), les comunitats autònomes han de facilitar, per a cada cas:

- a) la data en la que es va confirmar la contaminació;
- b) una breu descripció de la investigació portada a terme per identificar la font i la possible propagació de la contaminació, inclòs el nivell de mostratge efectuat;

- c) informació sobre la font o fonts de contaminació determinades o presumptes;

- d) detalls relatius a l'abast de la contaminació declarada, inclòs el nombre de llocs de producció i, en el cas de les patates, el nombre de lots, amb la indicació de la varietat i, en el cas de les patates de sembra, la categoria;

- e) detalls relatius a la delimitació de la zona, inclòs el nombre de llocs de producció no declarats contaminats, però inclosos en la zona;

- f) detalls relatius a la designació de l'aigua, inclòs el nom i la ubicació de la massa d'aigua i l'abast de la prohibició de reg/designació;

- g) en el cas de qualsevol partida o lot de tomaques declarat contaminat, els certificats que prescriu l'article 10, apartat 1, lletra a), del Reial decret 58/2005, de 21 de gener, pel qual s'adopten mesures de protecció contra la introducció i difusió en el territori nacional i de la Comunitat Europea d'organismes nocius per als vegetals o productes vegetals, així com per a l'exportació i el trànsit cap a països tercers, i el número de passaport, d'acord amb la llista que recull l'annex V, part A, secció I, punt 2.2, del Reial decret 58/2005, de 21 de gener

- h) qualsevol altres dades que requereixi el Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació o, si s'escau, la Comissió, relatius al brot o els brots confirmats.

ANNEX VI

Mètodes oficialment autoritzats per a l'eliminació de residus

1. Les disposicions que esmenta l'article 7, apartat 1, són les següents:

- la utilització com a pinsos, previ tractament tèrmic adequat, de manera que no hagi cap risc de supervivència de l'organisme,

o

- l'eliminació en un abocador d'eliminació de residus autoritzat oficialment on no hi hagi cap risc identificable d'escapament de l'organisme al medi ambient, per exemple, a través de filtració a terres agrícoles ni de contacte amb fonts d'aigua que es puguin utilitzar per al reg de les terres esmentades,

o

- la incineració,

o

- la transformació industrial mitjançant lliurament directe i immediat a una planta de transformació dotada d'instal·lacions d'eliminació de residus autoritzades oficialment, per a les quals s'estableixi l'absència de riscos detectables de propagació de l'organisme, i d'un sistema de neteja i desinfecció dels vehicles de transport, almenys,

o

- altres mesures, sempre que es descarti el possible risc de propagació de l'organisme; aquestes mesures i la seva justificació s'han de notificar immediatament al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació i aquest, al seu torn, a través de la via corresponent, a la Comissió i als altres estats membres.

Qualsevol residu restant associat amb les opcions anteriors i que en derivin s'han d'eliminar amb mètodes autoritzats oficialment de conformitat amb l'annex VII d'aquest Reial decret.

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

- i) en el cas dels tubercles de patata:
 - en la utilització com a patates de consum destinades al consum, envasades per a la seva distribució i venda directa sense canvi d'envàs, en un lloc dotat d'instal·lacions d'eliminació de residus adequades. Les patates destinades a la sembra només es poden manipular en el mateix lloc si això es fa separadament o després de la neteja i desinfecció,
 - o
 - L'ús com a patates de consum per a la transformació industrial i destinades al lliurament directe i immediat a una planta de transformació dotada d'instal·lacions d'eliminació de residus adequades i d'un sistema de neteja i desinfecció dels vehicles de transport, com a mínim,
 - 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,
 - ii) en el cas de les altres parts de les plantes, inclosos els detritus de la tija i de les fulles,
 - la destrucció,
 - o
 - qualsevol altre ús o eliminació, a condició que es garanteixi que no hi ha risc identificable de dispersar l'organisme, i amb l'aprovació prèvia dels esmentats organismes oficials responsables.

3. Els mètodes adequats per a la descontaminació dels objectes a què es refereix l'article 7, apartat 3, consisteixen en una neteja i, si s'escau, una desinfecció que permetin descartar tot 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 que esmenta l'article 7, apartat 4, que han d'aplicar les comunitats autònomes dins la zona o zones delimitades que s'hagin establert en virtut de l'article 6, apartat 1, lletra a), incís iv), i de l'article 6, apartat 1, lletra c), incís iii), són les següents:

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

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

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

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

- i
- no s'han de plantar:
 - tubercles, plantes ni llavors pròpiament dites de patata,
 - tomaqueres i llavors de tomaqueres,
 - 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 de l'organisme,
 - altres cultius per als quals hi haig un risc identificat de propagació de l'organisme,

— en la primera temporada de cultiu de patates o tomàquets següent al període que indica el guió anterior, i sempre que s'hagi comprovat que, durant com a mínim els dos anys de vegetació immediatament anteriors a la plantació, el camp va estar 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, només s'autoritza la producció de patates de consum,
- en el cas de les patates i els tomàquets, els tubercles de patata collits, o les tomaqueres, segons correspongui, han de ser analitzats de conformitat amb el procediment que detalla l'annex II,

— en la temporada de cultiu de patates o tomàquets següent a la que indica el guió anterior i després d'un cicle de rotació adequat, que ha de ser d'un mínim de dos anys si es cultiven patates de sembra, s'ha de fer un examen oficial tal com disposa l'article 3, apartat 1,

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 tomaqueres espontànies així com altres plantes que puguin contenir naturalment l'organisme, incloses les males herbes solanàcies,

i

— durant els tres primers anys, s'ha de deixar i mantenir el camp, bé en guaret complet, bé per al cultiu de cereals, d'acord amb el risc que s'hagi determinat, 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, es plantaran plantes que no siguin hoste de l'organisme 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 que indica 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 va estar lliure de patates i tomaqueres espon-

tànies i d'altres plantes hoste de l'organisme, incloses les males herbes solanàcies:

- en el cas de les patates, s'autoritza la producció de patates de sembra i de consum,
- els tubercles de patata recol·lectats, o les tomaqueres, segons correspongui, han de ser analitzats de conformitat amb el procediment que detalla l'annex II;

b) en la resta dels camps del lloc de producció contaminat i amb la condició que els organismes oficials competents tinguin la certesa que s'ha eliminat adequadament el risc de plantes de patata i de tomàquet espontànies i de qualsevol altra planta que pugui contenir naturalment l'organisme, incloses les males herbes solanàcies:

— durant l'any de cultiu següent al de declaració de contaminació:

— o bé no es plantaran tubercles, plantes ni llavors pròpiament dites de patata, ni qualsevol altra planta que pugui contenir naturalment l'organisme,

o

— en el cas dels tubercles de patata, es pot plantar patata de sembra oficialment certificada, però només per a la producció de patata de consum,

— en el cas de les tomaqueres, només es plantaran tomaqueres obtingudes de llavors que compleixin els requisits de la Directiva 2000/29/CE del Consell, de 8 de maig de 2000, relativa a les mesures de protecció contra la introducció en la Comunitat d'organismes nocius per als vegetals o productes vegetals i contra la seva propagació a l'interior de la Comunitat, per a la producció de fruits,

— durant el segon any de cultiu següent al de declaració de contaminació:

— en el cas de les patates, per a la producció de patates de sembra o de consum, només es plantaran patates de sembra certificades o patates de sembra analitzades per determinar la inexistència de podridura marró i cultivades sota control oficial en llocs de producció diferents dels que esmenta el punt 4.1,

— en el cas dels tomàquets, només es plantaran tomaqueres obtingudes de llavors que compleixin els requisits de la Directiva 2000/29/CE o, si s'han propagat vegetativament, de tomaqueres produïdes a partir d'aquestes llavors i cultivades sota control oficial en llocs de producció diferents dels que esmenta el punt 4.1, per a la producció de plantes o de fruits,

— durant almenys els tres anys de cultiu següents a la declaració de la contaminació:

— en el cas de les patates, per a la producció de patates de sembra o de consum es plantaran exclusivament patates de sembra certificades o patates de sembra que s'hagin cultivat sota control oficial a partir de patates de sembra certificades,

— en el cas dels tomàquets, només es plantaran tomaqueres obtingudes de llavors que compleixin els requisits de la Directiva 2000/29/CE o tomaqueres cultivades sota control oficial a partir d'aquestes plantes, per a la producció de plantes o de fruits,

— en cadascun dels anys de cultiu esmentats en els guions anteriors s'han de prendre mesures per eliminar les plantes de patata espontànies i altres plantes que puguin contenir naturalment l'organisme, si n'hi ha, i s'ha d'efectu-

ar una inspecció oficial del cultiu en creixement en els moments pertinents i, en cada camp de patates, s'han d'efectuar proves oficials de les patates recol·lectades d'acord amb el procediment que detalla l'annex II;

c) immediatament després de la declaració de contaminació que preveu l'article 6, apartat 1, lletra a), incís ii), i després del primer any de cultiu següent:

— tota la maquinària i 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 fent servir mètodes adequats de la manera que disposa el punt 3,

— amb la finalitat d'impedir la propagació de l'organisme, s'han d'efectuar controls oficials dels plans de reg i ruixament i, en cas que sigui necessari, aquests es prohibiran;

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

— no s'han de plantar tubercles, plantes ni llavors pròpiament dites de patata, ni altres plantes que puguin ser hoste de l'organisme, incloses tomaqueres i llavors de tomaqueres, llevat que, d'una banda, la unitat de producció s'hagi sotmès a mesures oficialment supervisades que, tenint per objecte l'eliminació de l'organisme i la retirada de tot el material vegetal hoste, incloguin, com a mínim, un canvi complet dels medis 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 hi hagin donat subsegüentment l'autorització per a la producció de patates o tomàquets,

i

— a més, la producció ha de procedir, en el cas de la patata, de patates de sembra certificades o de minitubercles o microplantes obtingudes de fonts analitzades,

— quant a la producció de tomàquets, la producció ha de procedir de llavors que compleixin els requisits de la Directiva 2000/29/CE o, si s'han propagat vegetativament, de tomaqueres produïdes a partir d'aquestes llavors i cultivades sota control oficial,

— amb la finalitat d'impedir la propagació de l'organisme, s'han d'efectuar controls oficials dels plans de reg i ruixament i, en cas que sigui necessari, aquests s'han de prohibir.

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

a) immediatament després de la declaració de contaminació han de garantir que es netegi i desinfecti tota la maquinària i instal·lacions d'emmagatzematge de l'explotació que s'hagin utilitzat per a la producció de patates i tomàquets, de la manera adequada i amb els mètodes apropiats, segons el que disposa el punt 3;

b) immediatament i durant almenys tres anys de cultiu després de la declaració de contaminació:

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

— han de garantir que els seus organismes oficials responsables supervisin les instal·lacions que cultivin, emmagatzemin o manipulin tubercles de patata o tomàquets,

així com les altres instal·lacions que utilitzin en el marc d'un contracte maquinària per a la producció de patates o tomàquets,

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

— exigiran que es manipulin per separat les existències de patates de sembra i de patates de consum recol·lectades en totes les explotacions de la zona o, quan sigui adequat, que s'efectuï una desinfecció entre la manipulació de les existències de patates de sembra i de patates de consum,

— exigiran que, per a tots els cultius de tomàquet de la zona, només es plantin tomaqueres obtingudes de llavors que compleixin els requisits de la Directiva 2000/29/CE o, si s'han propagat vegetativament, de tomaqueres produïdes a partir d'aquestes llavors i cultivades sota control oficial,

— han d'efectuar l'examen oficial que disposa l'article 3, apartat 1;

bb) en els casos en què, en virtut de l'article 6, apartat 1, lletra c), incís ii), s'hagin declarat contaminades aigües de superfície o en què, de conformitat amb l'annex V, punt 2, s'hagin inclòs les aigües esmentades entre els factors de la possible propagació de l'organisme:

— han d'efectuar un examen anual, en els moments oportuns, amb una presa de mostres de les aigües de superfície i, quan sigui oportú, de les plantes hoste solanàcies a les fonts hídriques pertinents, així com a anàlisi d'acord amb els mètodes pertinents que estableix l'annex II per al material vegetal indicat i per a altres casos,

— amb la finalitat d'impedir la propagació de l'organisme, han d'establir controls oficials dels plans de reg i ruixament, així com una prohibició de l'ús de les aigües declarades contaminades per al reg i ruixament del material vegetal indicat i, si s'escau, d'altres plantes hoste. Aquesta prohibició es pot reexaminar en funció dels resultats obtinguts en l'examen anual esmentat, i se'n poden revocar les declaracions quan els organismes oficials responsables tinguin la certesa que les aigües superficials ja no estan contaminades. Es pot autoritzar l'ús de l'aigua sotmesa a prohibició, sota control oficial, per al reg i el ruixament de les plantes hoste, quan s'utilitzin tècniques aprovades oficialment que eliminin l'organisme i n'evitin la propagació,

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

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

ANNEX VII

Disposicions que s'han de complir per a l'eliminació dels residus

Els mètodes d'eliminació de residus autoritzats oficialment esmentats a l'annex VI, punt 1, han de complir les disposicions que s'indiquen a continuació amb la finalitat d'evitar qualsevol risc identificable de propagació de l'organisme:

i) els residus de patates i tomàquets (incloses les patates, peladures i tomàquets descartats) i qualsevol altre residu sòlid associat amb les patates i els tomàquets (inclòs el terra, les pedres i altres restes) s'han d'eliminar d'una de les maneres següents:

— en un abocador d'eliminació de residus autoritzat oficialment on no hi hagi cap risc identificable d'escapament de l'organisme en el med ambient, per exemple, a través de filtració a terres agrícoles ni de contacte amb fonts d'aigua que es puguin utilitzar per al reg de les terres esmentades. Els residus s'han de conduir directament a l'abocador en unes condicions de confinament que n'impedeixin qualsevol risc de pèrdua,

— mitjançant incineració,

o

— a través d'altres mesures, sempre que es descarti el possible risc de propagació de l'organisme. Aquestes mesures s'han de notificar immediatament al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació i aquest al seu torn, a través de la via corresponent, a la Comissió i als altres estats membres,

ii) residus líquids: abans d'eliminar-los, els residus líquids que continguin sòlids en suspensió s'han de sotmetre a processos de filtració o sedimentació per eliminar els sòlids esmentats. Aquests sòlids s'han d'eliminar tal com s'estableix l'incís i).

A continuació, els residus líquids:

— s'han d'escalfar a un mínim de 60°C en tot el seu volum durant un mínim de 30 minuts abans d'eliminar-lo,

o

— s'han d'eliminar, amb la prèvia autorització oficial i sota control oficial, de manera que no hi hagi cap risc identificable que els residus puguin entrar en contacte amb terres agrícoles ni fonts d'aigua que es puguin utilitzar per irrigar terres agrícoles. Els detalls d'aquestes mesures s'han de notificar al Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació i aquest, al seu torn, a través de la via corresponent, als altres estats membres i a la Comissió.

Les opcions que descriu el present annex també s'apliquen als residus associats a la manipulació, l'eliminació i el tractament de lots contaminats. »