

ALLEGATO I

SEZIONE I

Elenco delle piante ospiti di *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. di cui all'articolo 1

Piante (compresi i tuberi) diverse dai semi veri di *Solanum tuberosum* L. Patata

Piante diverse dai semi di *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw. Pomodoro

SEZIONE II

Accertamenti

1. Gli accertamenti ufficiali di cui all'articolo 2, paragrafo 2, lettera a), debbono essere basati sulla biologia del microrganismo nocivo e sul particolare sistema di produzione nello Stato membro interessato. Essi debbono comprendere:
 - i) nel caso delle patate,
 - a momenti appropriati, l'ispezione visuale della pianta durante la crescita e/o il prelievo di campioni di tuberi-seme e di altre patate durante la stagione di crescita oppure in magazzino. Questi campioni debbono essere sottoposti a ispezione visuale ufficiale o sotto sorveglianza ufficiale, comportante il sezionamento dei tuberi,
 - e inoltre,
 - nel caso dei tuberi-seme e, se del caso, di altre patate, esami di laboratorio, ufficiali o sotto sorveglianza ufficiale secondo il metodo di cui all'allegato II;
 - ii) nel caso del pomodoro,
 - l'ispezione visuale, a momenti appropriati, almeno durante la crescita delle piante destinate al reimpianto, ad usi professionali.
2. La notifica degli accertamenti ufficiali di cui all'articolo 2, paragrafo 3, deve comprendere:
 - i) nel caso delle patate,
 - la superficie totale, valutata in ettari, coltivata a patate da seme e ad altri tipi di patata,
 - la stratificazione per categoria (patate da seme e da consumo), e se del caso, per regione,
 - il numero dei campioni prelevati per l'esame e il calendario dei prelievi,
 - il numero di ispezioni visuali sul terreno,
 - il numero delle ispezioni visuali sui tuberi (e l'entità dei campioni);
 - ii) nel caso delle piante di pomodori, almeno durante la crescita, destinate al reimpianto ad usi professionali,
 - numero totale stimato delle piante,
 - il numero delle ispezioni visuali;
 - iii) nel caso delle piante ospiti diverse dalla patata e dal pomodoro, comprese le solanacee selvatiche ospiti,
 - la specie,
 - il numero e la cadenza dei campioni prelevati,
 - la zona/il corso d'acqua sottoposti a prelievo, secondo i casi,
 - il metodo di analisi;
 - iv) nel caso degli accertamenti sull'acqua e sugli scarichi di reflui degli impianti di trasformazione industriale o di imballaggio,
 - il numero e la cadenza dei campioni,
 - la zona/il corso d'acqua/l'ubicazione dell'impianto sottoposti a prelievo, secondo i casi,
 - il metodo di analisi;

ALLEGATO II

SCHEMA PER LA DIAGNOSI, IL RILEVAMENTO E L'IDENTIFICAZIONE DI *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI ET AL.

SCOPO DELLO SCHEMA DIAGNOSTICO

Questo schema descrive i vari procedimenti da usare per:

- i) la diagnosi del marciume bruno nei tuberi di patata e della verticillosi batterica nelle piante di patata e di pomodoro;
- ii) il rilevamento di *Ralstonia solanacearum* nei campioni di tuberi di patata,
- iii) l'identificazione di *Ralstonia solanacearum*.

Nelle appendici vengono descritte le modalità per la preparazione dei materiali per i saggi, cioè terreni di coltura, tamponi, soluzioni, reagenti.

INDICE

SEZIONE I:	Applicazione dello schema	9
	1. Diagnosi del marciume bruno nei tuberi di patata e di verticillosi batterica nelle piante di patata e di pomodoro	9
	2. Rilevamento e identificazione di <i>Ralstonia solanacearum</i> in campioni di tuberi di patata	11
SEZIONE II:	Diagnosi del marciume bruno nei tuberi di patate e di verticillosi batterica nelle piante di patata e di pomodoro	13
	1. Sintomi del marciume bruno	13
	2. Saggi rapidi per selezione preliminare	13
	3. Procedimento di isolamento	14
	4. Saggi di conferma	14
SEZIONE III:	Rilevamento e identificazione di <i>Ralstonia solanacearum</i> in campioni di tuberi di patata	17
	1. Preparazione del campione per i saggi	17
	2. Colorazione di immunofluorescenza (IF)	18
	3. Saggio immunoenzimatico (Elisa)	20
	4. Reazione a catena del DNA polimerasi (PCR)	20
	5. Isolamento selettivo in piastra	22
	6. Saggio biologico	23
	7. Prove di arricchimento	23
	8. Prova di patogenicità	23
Appendice 1:	Substrati nutritivi per l'isolamento e la coltura di <i>Ralstonia solanacearum</i>	24
Appendice 2:	Materiali per la preparazione del campione	25
Appendice 3:	Materiali per il saggio IF	26
Appendice 4:	Determinazione del livello di contaminazione nella prova IF	27
Appendice 5:	Materiali per il saggio Elisa	28
Appendice 6:	Materiali per la prova PCR	29
Appendice 7:	Materiali per l'isolamento selettivo su piastra	29
Bibliografia	30

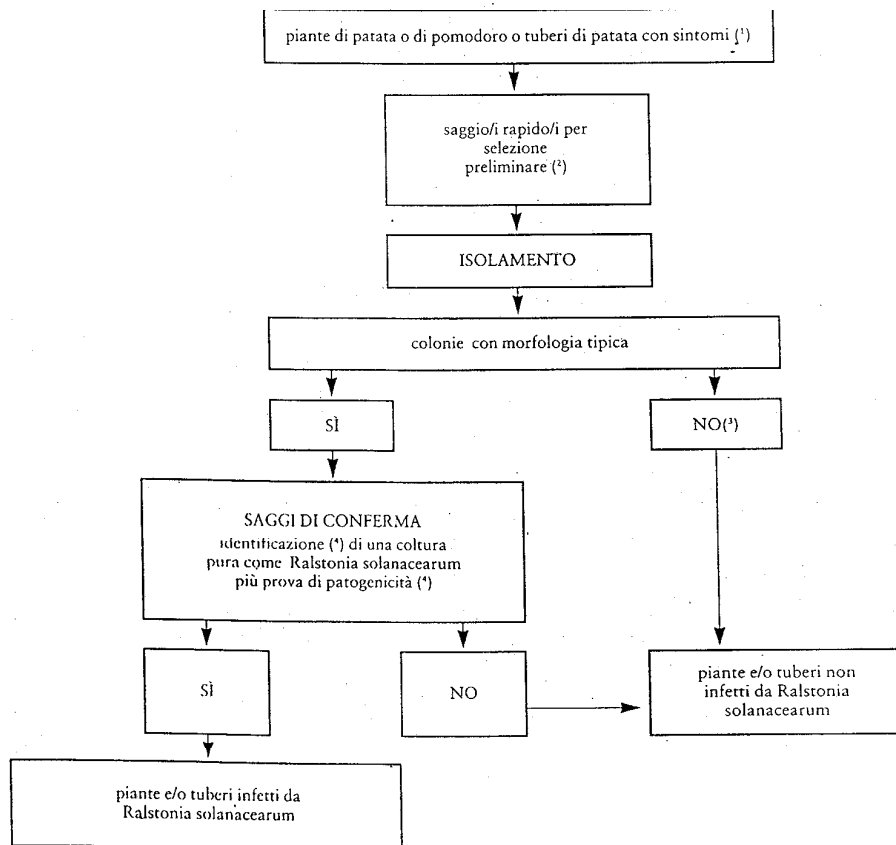
SEZIONE I

APPLICAZIONE DELLO SCHEMA

Diagnosi del marciume bruno nei tuberi di patata e di verticilliosi batterica nelle piante di patata e di pomodoro

Il procedimento qui indicato è da applicarsi alle piante e ai tuberi con sintomi tipici o sospetti di marciume bruno. Esso comporta una prova rapida di selezione preliminare, l'isolamento dell'agente patogeno dal tessuto vascolare infetto su terreni di coltura diagnostici e, in caso di esito positivo, l'identificazione della coltura come *Ralstonia solanacearum*.

Diagramma di flusso



Riferimenti del diagramma di flusso:

(*) La descrizione dei sintomi è fornita nella sezione II, paragrafo 1.

(*) I saggi rapidi di selezione preliminare permettono di formulare una diagnosi presunta.

I saggi idonei sono:

- fuoriuscita a filamenti della massa batterica dal tessuto vascolare del fusto (sezione II, paragrafo 2),
- saggio dei granuli di poli-beta-idrossibutirrato (sezione II, paragrafo 2),
- colorazione IF (sezione III, paragrafo 2),
- Saggio Elisa (sezione III, paragrafo 3),
- PCR (sezione III, paragrafo 4).

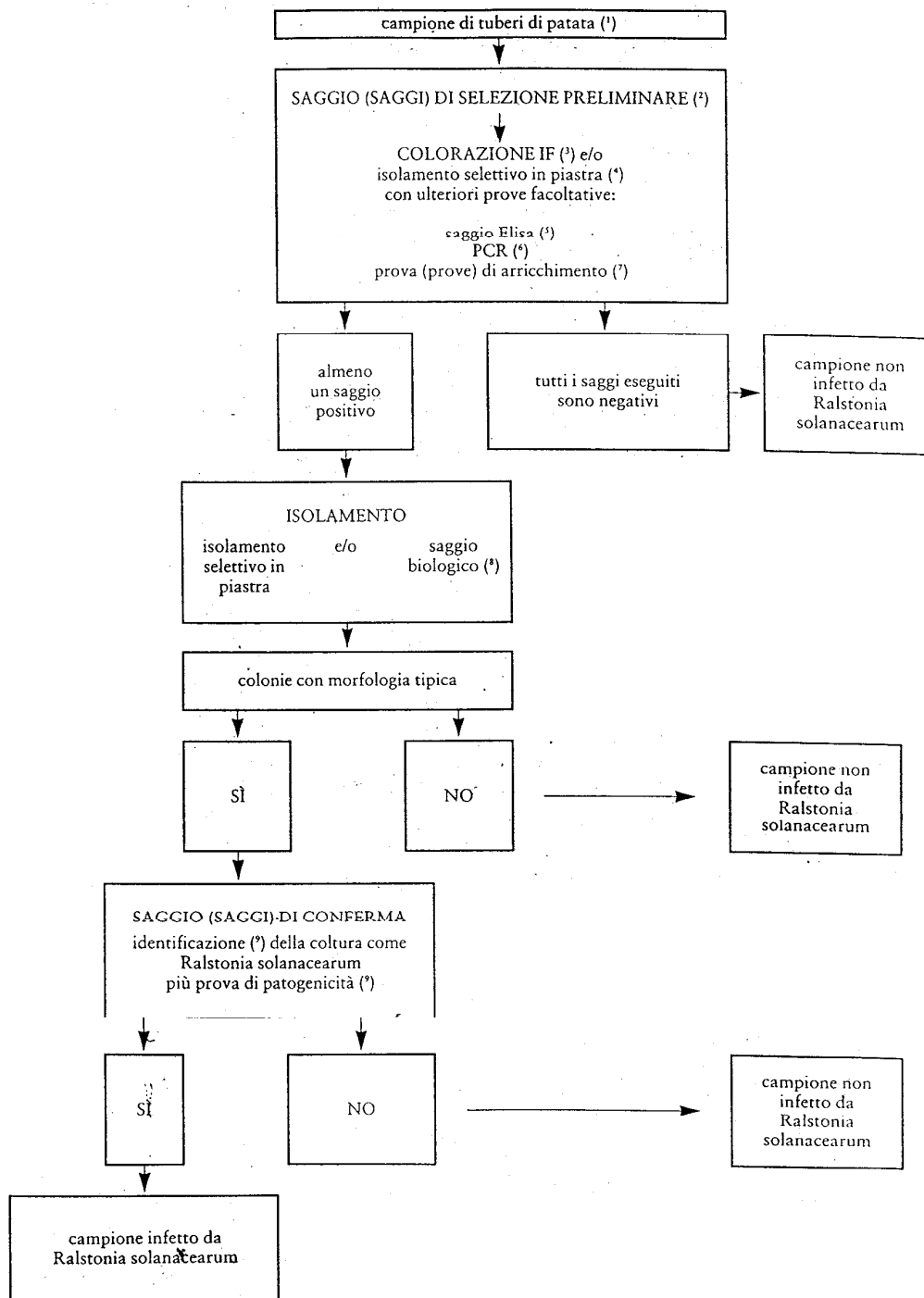
(*) Sebbene l'isolamento del patogeno da materiali con sintomi tipici mediante la tecnica della diluizione in piastra sia immediato, in fasi avanzate di infezione la crescita delle sue colonie può non aver luogo. I batteri caprofiti che si sviluppano nel tessuto malato possono eliminare o inibire il patogeno sul substrato di isolamento. Se l'isolamento è negativo, ma i sintomi della malattia sono tipici, l'isolamento deve essere ripetuto, preferibilmente su un substrato selettivo.

(*) Si può perseguire una identificazione affidabile di una coltura pura di *Ralstonia solanacearum* per mezzo di almeno uno dei saggi elencati nella sezione II, paragrafo 4.1 abbinata a una prova di patogenicità (sezione II, paragrafo 4.3). La caratterizzazione del ceppo è facoltativa ma è consigliabile per ogni nuovo caso.

2.

Rilevamento e identificazione di *Ralstonia solanacearum* in campioni di tuberi di patata

Il procedimento è inteso a rilevare le infezioni latenti nei tuberi di patata mediante uno o, preferibilmente, più saggi di selezione preliminare che, se positivi, vengono confermati dall'isolamento del patogeno e quindi, in caso di isolamento di colonie tipiche, dall'identificazione di una coltura pura di *Ralstonia solanacearum*.

Diagramma di flusso

*Riferimenti del diagramma di flusso***(¹) Campione**

Il campione standard è di 200 tuberi. Tuttavia il procedimento può essere convenientemente applicato anche a campioni aventi meno di 200 tuberi.

(²) Saggio (saggi) di selezione preliminare

Un singolo saggio di selezione preliminare può non essere sufficientemente sensibile o affidabile per rilevare *Ralstonia solanacearum* in un campione. È quindi consigliabile eseguire più di un saggio. Se possibile, tali saggi dovrebbero essere fatti con metodologie differenti.

(³) Colorazione di immunofluorescenza (IF)

La colorazione IF (metodo indiretto) è un saggio di selezione preliminare ben collaudato. Esso ha pertanto vantaggi rispetto ad altre prove non ancora pienamente sviluppate o convalidate. Secondo i parametri di lettura specificati in tale metodo si tratta di un saggio censibile (soglia di 10^3 - 10^4 cellule per ml di pellet di estratto di patata).

Il fattore critico per l'affidabilità dell'esito del saggio è la qualità dell'antisiero. Solo un antisiero ad alto titolo (minimo 2000 per l'antisiero grezzo) è accettabile e tutte le prove devono essere eseguite con antisiero a tale titolo o con una diluizione inferiore a detto titolo. Il metodo indiretto è preferibile. Il metodo diretto può essere usato se il saggio ha un livello di sensibilità e di specificità equivalente a quello del metodo indiretto.

Il saggio IF ha il vantaggio di consentire una interpretazione soggettiva della morfologia di colorazione della cellula e dell'intensità della fluorescenza che forniscono le informazioni sulla specificità della reazione. Sono frequenti le reazioni incrociate con batteri sierologicamente affini provenienti dal suolo o associati a tessuti della patata con morfologia cellulare di *Ralstonia solanacearum*. Il saggio IF può essere usato come unico saggio di selezione preliminare sebbene, qualora si sospettino reazioni incrociate, dovrebbe essere fatto un saggio preliminare addizionale basato su differente base biologica. In questi casi l'isolamento selettivo è il più appropriato.

(⁴) Isolamento selettivo in piastra

Si tratta di un saggio sensibile e selettivo per *Ralstonia solanacearum* se fatto con substrato SMSA modificato e con la metodologia specificata in questo schema. Il risultato è disponibile da 3 a 6 giorni dopo la preparazione del campione. Il patogeno viene ottenuto direttamente in coltura e può essere facilmente identificato. Ai fini di un perfetto sfruttamento del suo potenziale, il saggio richiede un'accurata preparazione di coni ombelicali piccoli per eliminare i batteri secondari associati al tessuto della patata che sono competitori di *Ralstonia solanacearum* sul terreno di coltura e ne possono influenzare la crescita. Alcuni ceppi possono stentare a crescere in quanto anche i componenti del terreno possono condizionare l'organismo obiettivo. Occorre particolare attenzione anche per distinguere *Ralstonia solanacearum* da altri batteri che si possono sviluppare sul terreno di coltura. L'isolamento selettivo in piastra può essere usato come unico saggio di selezione preliminare sebbene, nel caso in cui si ottenga un risultato negativo e si sospetti l'inibizione di *Ralstonia solanacearum* da parte di altri batteri presenti sul terreno di coltura, dovrebbe essere fatto un saggio di selezione preliminare di altro tipo per confermare o confutare la diagnosi. In tali casi, la colorazione IF è la più appropriata.

(⁵) Saggio Elisa

Il saggio Elisa è generalmente meno sensibile della colorazione IF (soglia di 10^4 - 10^5 cellule/ml di pellet di estratto di patata). Il saggio è economico e veloce ma, generalmente, è più soggetto a falsi risultati positivi (reazioni incrociate) e a falsi risultati negativi (inibizione da parte di molecole fenoliche nell'estratto di patata). È richiesta una specificità dell'antisiero estremamente alta. Il saggio Elisa non può essere usato come unico saggio di selezione preliminare.

(⁶) PCR

Il saggio PCR ha potenzialmente un'elevata sensibilità di rilevamento. Il saggio viene facilmente inibito da componenti presenti nell'estratto di pianta o di tubero che portano a una falsa negatività. Alcune cultivar di patata contengono più inibitori di altre. È pertanto necessario rimuovere tali inibitori. Gli inibitori possono essere evitati con la diluizione, ma in tal modo anche le popolazioni di *Ralstonia solanacearum* vengono diluite. È necessario prestare molta attenzione in tutte le fasi di preparazione del campione e del saggio per impedire la contaminazione che porterebbe a risultati falsamente positivi. Falsi risultati positivi possono derivare anche da sequenze omologhe presenti in altri organismi. Per tali motivi la PCR diretta non può essere usata come unico saggio di selezione preliminare.

(⁷) Prova di arricchimento

L'incubazione di campioni di sedimenti di centrifuga di estratto di patata in un brodo di coltura semiselettivo, come un brodo SMSA modificato, consente la moltiplicazione di *Ralstonia solanacearum*. Inoltre, cosa forse ancora più importante, diluisce i potenziali inibitori dei saggi Elisa o PCR. *Ralstonia solanacearum* può in tal modo essere rilevato nel brodo di arricchimento con i saggi IF, Elisa o PCR. Non consigliamo di fare l'isolamento diretto in piastra usando i brodi arricchiti. Questi metodi di arricchimento non sono stati ancora sperimentati e provati in modo approfondito. Sono stati inclusi in questo schema per il loro buon potenziale. Tuttavia, data la relativa mancanza di esperienza nella loro esecuzione, non possono essere utilizzati come unici metodi di rilevamento.

(⁸) Saggio biologico

Il saggio biologico è usato per l'isolamento di *Ralstonia solanacearum* dai sedimenti di centrifuga di estratti di patata sfruttando una pianta ospite come mezzo selettivo di arricchimento e può essere fatto su piante di pomodoro o di melanzana. Il saggio richiede condizioni ottimali di incubazione, come specificato in tale metodo. È molto probabile che in tale saggio i batteri inibitori di *Ralstonia solanacearum* sul mezzo SMSA non interferiscono.

(⁹) Saggio(i) di conferma

È possibile ottenere una identificazione affidabile di coltura pura di *Ralstonia solanacearum* almeno con uno dei saggi elencati nella sezione II, paragrafo 4.1, abbinata a una prova di patogenicità (sezione II, paragrafo 4.3). La caratterizzazione del ceppo è facoltativa, anche se consigliabile per ogni nuovo caso.

SEZIONE II

DIAGNOSI DEL MARCIUME BRUNO NEI TUBERI DI PATATA E DI VERTICILLOSI BATTERICA NELLE PIANTE DI PATATA E DI POMODORO

1. Sintomi del marciume bruno

1.1. Sintomi nella patata

Pianta di patata. La fase iniziale dell'infezione consiste nella perdita di turgore delle foglie della parte superiore della pianta con le alte temperature diurne e loro ripresa durante la notte. La flaccidezza si aggrava, diventa presto irreversibile e porta a morte la pianta. Il tessuto vascolare dei fusti di piante avvizzite tagliato trasversalmente può diventare bruno e un liquido lattiginoso può essudare dalla superficie tagliata o può essere facilmente fatto uscire per compressione. Quando uno stelo tagliato viene immerso verticalmente in acqua, filamenti di mucillagine colano dai fasci vascolari.

Tubero di patata. I tuberi di patata devono essere tagliati trasversalmente vicino all'ombelico (punto di attacco dello stolone). La fase iniziale dell'infezione consiste in una alterazione di colore da giallo vitreo a marrone chiaro dell'anello vascolare da cui fuoriesce spontaneamente un liquido color crema chiaro dopo pochi minuti o quando viene esercitata una lieve pressione delle dita sulla buccia vicino alla superficie sezionata. In seguito lo scolorimento vascolare diventa di un marrone più netto e la necrosi può estendersi al tessuto parenchimatico. Nelle fasi avanzate l'infezione si espande centrifugamente sino ad emergere in corrispondenza dell'ombelico e degli occhi dove causa tacche bruno-rossastre, leggermente infossate e fuoriuscita di goccioline di essudato cui rimangono aderenti particelle di terreno.

1.2. Sintomi nel pomodoro

Pianta di pomodoro. Il primo sintomo visibile è l'aspetto flaccido delle foglie più giovani. In condizioni ambientali favorevoli per l'agente patogeno (temperatura del suolo di circa 25 °C, umidità satura), epinastia e flaccidezza di un lato della pianta o dell'intera pianta seguono in pochi giorni portando alla rovina totale. In condizioni meno favorevoli (temperatura al suolo inferiore a 21 °C) possono svilupparsi sullo stelo molte radici avventizie. Si può osservare un cordone di grasso lungo lo stelo che indica la necrosi del sistema vascolare. Quando lo stelo è tagliato trasversalmente, dai tessuti vascolari bruni scoloriti dello stelo essudano gocce di liquido batterico bianco o giallastro.

2. Saggi rapidi per selezione preliminare

Un saggio di selezione preliminare facilita la formulazione di una diagnosi presunta. Usare uno o più dei seguenti saggi:

Prova dell'essudato batterico sul fusto

La presenza di *Ralstonia solanacearum* nei fusti di patata aventi foglie flaccide può essere accertata mediante la seguente prova presuntiva.

Tagliare lo stelo appena al di sopra del livello del suolo. Porre la superficie tagliata in un bicchiere contenente acqua. Poco dopo, filamenti di mucillagine batterica coleranno spontaneamente dai fasci vascolari. Altri batteri che causano infezione vascolare nelle piante di patate non provocheranno questo fenomeno.

Rilevamento dei granuli di poli-beta-idrossibutirrato (PHB)

I granuli PHB nelle cellule di *Ralstonia solanacearum* sono resi visibili con la colorazione blu Nilo A o nero Sudan R.

Preparare uno striscio dell'essudato o della sospensione di tessuto su un vetrino da microscopio oppure preparare uno striscio di una coltura di 48 ore su YPGA o SPA (appendice 1). Preparare strisci di controllo positivo di un ceppo bio-var 2, razza 3. Lasciare seccare. Passare rapidamente diverse volte la parte inferiore del vetrino sopra la fiamma fino a quando lo striscio sia fissato.

Colorazione blu Nilo

- 1) Coprire lo striscio fissato con una soluzione acquosa all'1 % di blu Nilo A. Mantenere in incubazione per 10 minuti a 55 °C.
- 2) Far sgocciolare la soluzione colorante. Lavare rapidamente sotto un getto leggero di acqua corrente. Eliminare l'acqua in eccesso con carta bibula.
- 3) Coprire lo striscio con una soluzione di acido acetico all'8 %. Mantenere in incubazione per 1 minuto a temperatura di laboratorio.
- 4) Lavare sotto un getto leggero di acqua corrente. Asciugare tamponando con carta bibula.
- 5) Riumidificare con una goccia d'acqua. Applicare un vetrino coprioggetto.
- 6) Esaminare lo striscio colorato con un microscopio a epifluorescenza a 450 nm in olio da immersione a 1 000 ingrandimenti.

Osservare se vi sia una fluorescenza arancio vivo dei granuli PHB. Osservare anche a luce normale per accertare che i granuli siano intracellulari e che la morfologia della cellula sia tipica di *Ralstonia solanacearum*.

Colorazione nero Sudan

- 1) Coprire lo striscio fissato con una soluzione allo 0,3 % di nero Sudan B in 70 % di etanolo. Mantenere in incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente.
- 2) Far sgocciolare la soluzione colorante. Lavare rapidamente in acqua corrente. Eliminare l'acqua in eccesso con carta bibula.
- 3) Immergere rapidamente lo striscio in xilolo. Asciugare tamponando con carta bibula.
Attenzione: Lo xilolo è un prodotto nocivo. Operare in ambiente provvisto di cappa a tiraggio forzato.
- 4) Coprire lo striscio con una soluzione acquosa di safranina allo 0,5 % (p/v) e lasciare per 10 secondi a temperatura ambiente.
Attenzione: La safranina è un prodotto nocivo. Operare in ambiente provvisto di cappa a tiraggio forzato.
- 5) Lavare sotto un getto leggero di acqua corrente. Asciugare tamponando con carta bibula. Applicare un vetrino coprioggetto.
- 6) Esaminare lo striscio colorato con un microscopio ottico a luce trasmessa con olio da immersione a 1000 ingrandimenti.

I granuli PHB in cellule di *Ralstonia solanacearum* si colorano di blunero. La parete della cellula si colora di rosa.

Altri saggi

Altri saggi appropriati per la selezione preliminare sono la colorazione IF (sezione III.2), il saggio Elisa (sezione III.3) e il saggio PCR (sezione III.4).

3. Procedimento di isolamento

- 3.1. Rimuovere l'essudato o le parti di tessuto cromaticamente alterate dall'anello vascolare del tubero di patata e dai fasci vascolari dello stelo delle piante di patata o di pomodoro. Sospenderlo in una piccola quantità di acqua distillata sterile o in tampone fosfato a 50 mM. Lasciare riposare per 5-10 minuti.
- 3.2. Della sospensione preparare almeno due diluizioni decimali, 1/10 e 1/100, od altre se opportune.
- 3.3. Trasferire un volume standard della sospensione su un substrato nutritivo generale (NA, YPGA, SPA, appendice 1) e/o sul substrato di Kelman al tetrazolio (appendice 1) e/o sul substrato selettivo SMSA (appendice 7) e inseminare le piastre con tecnica appropriata o con un'ansa, arroventandola tra un'inseminamento e l'altro. Se viene usato SMSA, preparare a parte una serie di piastre con una coltura diluita in sospensione di cellule di *Ralstonia solanacearum* di ceppo virulento biovar 2, razza 3, come controllo positivo.
- 3.4. Mantenere le piastre in incubazione per 3 giorni a 28 °C. L'incubazione può essere prolungata fino a 6 giorni se la crescita è lenta, ma le colonie su piastre di SMSA spesso divengono atipiche e muoiono.
Sul terreno nutritivo generale gli isolati virulenti di *Ralstonia solanacearum* sviluppano colonie bianco-perlacee, piatte, irregolari e fluide, spesso con caratteristici vortici.
Sul substrato di Kelman le colonie tipiche degli isolati virulenti di *Ralstonia solanacearum* sono fluide, irregolari, piatte, bianco-latte, con vortici color rosso sangue al centro. Le forme avirulente di *Ralstonia solanacearum* divengono butirrose di color rosso scuro.
Sul substrato SMSA gli isolati virulenti di *Ralstonia solanacearum* sviluppano colonie bianco latte, piatte, irregolari e fluide con centri color rosso sangue.
Le forme non virulente di *Ralstonia solanacearum* sviluppano colonie meno fluide che sono completamente di colore tra il rosa e il rosso.
- 3.5. Purificare le colonie con morfologia caratteristica mediante subcoltura su un terreno nutritivo generale. Evitare di fare subcolture ripetute che possono portare a perdita di virulenza.

4. Saggi di conferma**4.1. Identificazione di *Ralstonia solanacearum***

Identificare le colture pure di *Ralstonia solanacearum* con almeno uno dei seguenti procedimenti:

Saggi nutrizionali ed enzimatici

Nota: includere appropriati ceppi di controllo in ogni saggio che si effettua.

Sono universalmente presenti o assenti le seguenti proprietà fenotipiche della *Ralstonia solanacearum*:

Pigmento fluorescente	-
Inclusioni PHB	+
Prova O/F	O+/F-
Catalasi	+
Ossidasi di Kovacs	+
Riduzione dei nitrati	+
Utilizzazione del citrato	+
Crescita a 40°C	-
Crescita in NaCl dell'1 %	+
Crescita in NaCl del 2 %	-
Arginina deidrolasi	-
Liquefazione della gelatina	-
Idrolisi dell'amido	-
Idrolisi dell'esculina	-
Produzione di levano	-

Substrati e metodi reperibili su Lelliott e Stead (1987).

Colorazione IF

Preparare una sospensione di concentrazione: a 10^6 cellule per ml dalla coltura in esame e da un ceppo di controllo positivo. Preparare una serie di diluizioni 1:2 dell'antisiero. Applicare il procedimento IF (sezione III, paragrafo 2). Il titolo IF della coltura in esame deve essere equivalente a quella del controllo positivo.

Saggio Elisa

Preparare una sospensione di concentrazione superiore a 10^6 cellule per ml dalla coltura in esame e da un ceppo di controllo positivo. Applicare il procedimento Elisa (sezione III, paragrafo 3). Il valore Elisa della coltura in esame deve essere equivalente a quello del controllo positivo.

Saggio PCR

Preparare una sospensione di 10^6 cellule per ml dalla coltura in esame e da un ceppo di controllo positivo. Applicare la PCR (sezione III, paragrafo 4). Il prodotto PCR della coltura in esame deve avere le stesse dimensioni e profilo enzimatico di restrizione (REA) del controllo positivo.

Ibridazione fluorescente in situ (FISH)

Preparare una sospensione di 10^6 cellule per ml dalla coltura in esame e da un ceppo di controllo positivo. Applicare il procedimento FISH (Van Beuningen et al., 1995) con il primer OLI-1 PCR (Seal et al., 1993). La coltura in esame deve manifestare la stessa reazione del controllo positivo.

Profilo delle proteine

Le proteine cellulari totali denaturate vengono separate mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide — PAGE (Stead, 1992a).

Profilo degli acidi grassi (FAP)

Far crescere la coltura in esame e un ceppo di controllo positivo per 48 ore a 28°C su TSA e applicare il procedimento FAP (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead, 1992b). Il profilo della coltura in esame deve essere identico a quello del controllo positivo. In base alle condizioni specificate, gli acidi grassi caratteristici sono: 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH e 18:1 2OH.

4.2.

Caratterizzazione del ceppo

La caratterizzazione del ceppo è opzionale, ma si raccomanda per ogni nuovo caso usando almeno uno dei seguenti schemi:

Determinazione delle biovar

Ralstonia solanacearum è suddiviso in biovar in base alla capacità di produrre acidità da tre alcoli esosi e tre zuccheri (Hayward, 1964 & 1994).

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Utilizzo di:					
— maltosio	-	+	+	-	+
— lattosio	-	+	+	-	+
— cellobiosio	-	+	+	-	+
— mannitolo	-	-	+	+	+
— sorbitolo	-	-	+	+	-
— dulcitol	-	-	+	+	-

Ulteriori saggi differenziano la biovar 2 in subfenotipi (Hayward, 1994):

	Biovar 2	Biovar 2-A	Biovar 2-T
utilizzo di trealosio	-	+	+
utilizzo di inositol	+	-	+
utilizzo di D-ribosio	-	-	+
attività pectolitica	bassa	bassa	alta

Determinazione della razza

La razza (Buddenhagen et al., 1962) viene determinata con prova di patogenicità su piante di pomodoro o melanzana e su piante di tabacco e con la reazione di ipersensibilità (HR) nelle foglie di tabacco (Lozano e Sequeira, 1970):

	Razza (*)		
	1	2	3
Reazione in:			
— piante di pomodoro melanzana	avvizzimento	nessuna reazione	avvizzimento
— piante di tabacco	avvizzimento	nessuna reazione	nessuna reazione
— foglie di tabacco	necrosi (48 ore) e avvizzimento (7-8 gg)	HR (12-24 ore)	clorosi (2-8 giorni)

(*) Non sono incluse la razza 4 (patogena su zenzero e su pochi altri ospiti) e la razza 5 (patogena solo su gelso).

La caratterizzazione della razza in base ai saggi di patogenicità o di ipersensibilità su tabacco può non essere molto affidabile ed allora può essere dedotta dalla biovar e dall'ospite naturale di origine.

La coltura in esame può essere ulteriormente caratterizzata mediante le seguenti tecniche.

Impronte genomiche

La differenziazione molecolare dei ceppi nel complesso di *Ralstonia solanacearum* può essere effettuata mediante:

- analisi RFLP (Cook et al., 1989).
- PCR su sequenze ripetute [REP-, ERIC- & BOX-PCR (Louws et al., 1995; Smith et al., 1995)].

Prova di patogenicità

Questa prova è intesa per confermare la diagnosi di *Ralstonia solanacearum* e per valutare la virulenza delle colture identificate come *Ralstonia solanacearum*.

Preparare un inoculo di 10^6 cellule per ml dalla coltura in esame e da un ceppo di controllo positivo. Inoculare 5-10 piante di pomodoro o melanzana preferibilmente allo stadio fogliare 3 (sezione III, paragrafo 6). Mantenere in incubazione per un massimo di due settimane a temperatura tra 22°C e 28°C ed alta umidità relativa e innaffiare giornalmente. Tenere in osservazione per sintomi di collasso e/o epinastia, clorosi e nanismo.

Effettuare isolamenti dalle piante sintomatiche come segue:

- asportare una sezione di tessuti di fusto, 2 cm sopra il punto di inoculazione,
- ridurla a pezzetti, sospendere il tutto in un piccolo volume di acqua distillata o di tampone fosfato 50 mM, inseminare in piastra, incubare e controllare se si sviluppano colonie di *Ralstonia solanacearum*.

SEZIONE III

RILEVAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI *RALSTONIA SOLANACEARUM* IN CAMPIONI DI TUBERI DI PATATA

Nota: Il campione standard è di 200 tuberi. Tuttavia il procedimento può essere convenientemente applicato anche a campioni aventi meno di 200 tuberi.

1. Preparazione del campione per i saggi

N.B.: Il sedimento di centrifuga di estratto di patata ottenuto in questo procedimento può essere usato anche per il rilevamento di *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Procedere alle seguenti opzioni prima del saggio, se ritenuto utile.

- i) Mantenere in incubazione il campione a 25-30°C per un massimo di 2 settimane per favorire la moltiplicazione di basse popolazioni di *Ralstonia solanacearum*;
- ii) lavare i tuberi in acqua corrente con disinfettanti e detergenti appropriati. Far asciugare i tuberi all'aria.

1.1. Rimuovere la buccia con un bisturi o con un coltello per ortaggi intorno all'ombelico del tubero in modo da rendere visibili i tessuti vascolari. Asportare accuratamente un piccolo cono (3-5 mm di diametro) di tessuto vascolare dall'ombelico di ciascun tubero. Ridurre al minimo la quantità di tessuto non vascolare. Togliere il cono ombelicale da ciascun tubero del campione.

N.B.: L'esame viviso dei tuberi (sezione II, paragrafo 1) può essere effettuato durante questa fase. Mettere da parte i tuberi con sintomi gravemente marcescenti e saggiarli individualmente (sezione II).

1.2. Raccogliere i coni ombelicali in un contenitore chiuso. I coni ombelicali dovrebbero preferibilmente essere trattati immediatamente. Se ciò non fosse possibile, conservarli per non più di 24 ore o, a 4°C, non oltre 72 ore.

1.3. Trattare i coni ombelicali in uno dei seguenti modi:

- i) Trasferire i coni ombelicali in un contenitore idoneo.

Aggiungere un volume sufficiente di tampone di macerazione (appendice 2) per coprire i coni.

Sminuzzare i coni in un Waring Blender o con Ultra Thmix fino a completa omogeneizzazione. Evitare un'omogeneizzazione eccessiva.

Lasciar riposare il macerato per 15-30 minuti.

- ii) Trasferire i coni ombelicali in un contenitore idoneo.

Aggiungere un volume sufficiente di tampone di macerazione per coprire i coni.

Porre il contenitore in un agitatore rotativo.

Mantenere in incubazione a 50-100 giri/m per 4 ore a 20-22°C o per 16-24 ore a 4°C.

- iii) Trasferire i coni ombelicali in un robusto sacchetto monouso (per esempio sacchetti da Stomacher di dimensioni 105 mm x 150 mm, sterile per irradiazione).

Schiacciare accuratamente i coni ombelicali con uno strumento appropriato, per esempio un martello, fino al raggiungimento della completa omogeneizzazione.

Aggiungere un volume sufficiente di tampone di macerazione sino a coprire i coni schiacciati.

Lasciar riposare il macerato per 15-30 minuti.

1.4. Estrarre i batteri dal macerato dei coni ombelicali in uno dei seguenti modi.

- i) Far decantare lentamente il macerato in una provetta da centrifuga lasciando i frammenti nel contenitore o nel sacchetto. Se il macerato decantato è molto torbido, centrifugare a non oltre 180 x g per 10 minuti a una temperatura inferiore a 10°C.

Centrifugare il macerato decantato o il sopranatante della prima fase di centrifugazione a 7 000 x g per 15 minuti o a 10 000 x g per 10 minuti a una temperatura inferiore ai 10°C.

Scartare il sopranatante senza far muovere il sedimento.

- ii) Filtrare il macerato con un sistema di filtraggio avente pori di dimensioni di 40-100 µm.

Accelare il filtraggio utilizzando una pompa a vuoto.

Raccogliere il filtrato in una provetta da centrifuga.

Lavare il filtro con il tampone di macerazione.

Centrifugare il filtrato a 7 000 x g per 15 minuti o a 10 000 x g per 10 minuti a una temperatura inferiore ai 10°C.

Scartare il sopranatante senza far muovere il sedimento.

- 1.5. Risospendere il sedimento in 1 ml di tampone per il sedimento da centrifuga (appendice 2).
Dividere in due parti uguali e trasferire ciascuna parte in una microprovetta.
Utilizzare una microprovetta per la prova. Conservare la parte di estratto non usata a 4°C durante il saggio.
Aggiungere 10-25 % (v/v) di glicerolo sterile all'altra microprovetta. Mescolare nel vortex. Conservare a -18°C (per settimane) o a -70°C (per mesi).
2. Colorazione di immunofluorescenza (IF)
- Usare un antisiero per *Ralstonia solanacearum*, preferibilmente di biovar 2 razza 3. Determinare il titolo di una sospensione di 10^6 cellule per ml da un ceppo omologo di *Ralstonia solanacearum* con un'appropriata diluizione del coniugato di isotiocianato di fluoresceina (FITC), secondo le istruzioni del produttore. L'antisiero grezzo dovrebbe avere un titolo IF almeno 1:2 000.
- Utilizzare vetrini multipli per microscopio preferibilmente con 10 pozzetti di almeno 6 mm di diametro.
- Includere un controllo del coniugato FITC e un controllo del tampone fosfato isototonico (PBS) su ciascun vetrino del saggio. Il saggio dovrebbe essere ripetuto con il controllo PBS incluso se viene notata qualche cellula positiva nel controllo FITC.
- Preparare vetrini separati di controllo positivo con una sospensione di 10^6 cellule per ml da un ceppo di appropriata razza biovar di *Ralstonia solanacearum*. Usare un vetrino in ciascuna serie di prove.
- 2.1. Preparare i vetrini di saggio con uno dei seguenti procedimenti.
- i) Per sedimento con relativamente poco amido:
Trasferire con una pipetta un volume standard misurato (15 μ l è adeguato per un pozzetto di 6 mm di diametro — aumentare il volume per pozzetti più grandi) del sedimento risospeso su una fila di pozzetti. L'altra fila può essere usata come duplicato o per un secondo campione, come illustrato nella figura 1.
- ii) Per altri sedimenti:
Preparare diluizioni decimali (1:10, 1:100 e 1:1 000) del sedimento risospeso nel tampone per sedimento. Trasferire con una pipetta un volume standard misurato (15 μ l è adeguato per un pozzetto di 6 mm di diametro — aumentare il volume per pozzetti più grandi) di sedimento risospeso su una fila di pozzetti. L'altra fila può essere utilizzata come duplicato o per un secondo campione, come illustrato nella figura 2.
- 2.2. Lasciare seccare le goccioline. Fissare le cellule batteriche al vetrino scaldando o passando alla fiamma o con etanolo al 95 %.
- 2.3. Procedimento IF
- i) Secondo la preparazione del vetrino di saggio di cui al paragrafo 2.1 i):
Preparare una serie di diluizioni 1:2 del titolo (T) dell'antisiero nel tampone IF (appendice 3):
1/4 (T/4), 1/2 (T/2), pari al titolo e il doppio del titolo (2T).
- ii) Secondo la preparazione del vetrino di saggio di cui al paragrafo 2.1 ii):
Preparare la diluizione di lavoro (WD) dell'antisiero nel tampone IF. La diluizione WD è la diluizione dell'antisiero con specificità ottimale ed è abitualmente pari alla metà del titolo.

Figura 1

Preparazione del vetrino di saggio secondo i paragrafi 2.1 i) e 2.3 i)

Una diluizione standard del sedimento di centrifuga risospeso

T = Titolo

	FITC	T/4	T/2	T	2T	⇒ Diluizioni 1/2 dell'antisiero
Campione 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplicato del campione 1 o campione 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Figura 2

Preparazione del vetrino di saggio secondo i paragrafi 2.1. ii) e 2.3. ii)

	FITC	Diluizione standard dell'antisiero				⇒ Diluizione decimale del sedimento risospeso
	Puro	Puro	1/10	1/100	1/1 000	
Campione 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplicato del campione 1 o campione 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

2.3.1. Disporre i vetrini su carta bibula umida.

Coprire i pozzetti di saggio con la (le) diluizione (i) di antisiero. Mettere PBS sui pozzetti FITC. Il volume di antisiero messo sui pozzetti deve essere equivalente al volume di estratto.

2.3.2. Mantenere in incubazione sotto copertura per 30 minuti a temperatura ambiente.

2.3.3.ds Scuotere via le goccioline di antisiero dal vetrino e sciacquare accuratamente con tampone IF. Lavare per 5 minuti con tampone IF Tween e poi per 5 minuti nel tampone IF (appendice 3).

Eliminare accuratamente l'umidità in eccesso con carta bibula e lasciar asciugare i pozzetti.

2.3.4. Disporre i vetrini su carta bibula umida.

Coprire i pozzetti di saggio e il pozzetto FITC con la diluizione di coniugato di FITC utilizzato per determinare la concentrazione. Il volume di coniugato messo sui pozzetti deve essere identico al volume dell'antisiero.

2.3.5. Mantenere in incubazione sotto copertura per 30 minuti a temperatura ambiente.

2.3.6. Scuotere via le goccioline di coniugato dal vetrino. Sciacquare e lavare come in precedenza (paragrafo 2.3.3).

Rimuovere accuratamente l'umidità in eccesso.

2.3.7. Trasferire con una pipetta 5-10 μ l di tampone fosfato 0,1 M aggiunto di glicerina o simile liquido di montaggio su ciascun pozzetto e applicare un vetrino coprioggetti (appendice 3).

2.4. Lettura della colorazione IF.

Esaminare i vetrini con un microscopio a epifluorescenza dotato di filtri idonei all'eccitazione del FITC, in olio di immersione, a 500-1000 ingrandimenti. Esaminare attentamente i pozzetti lungo due diametri ad angolo retto e lungo il perimetro.

Esaminare anzitutto il vetrino del controllo positivo. Le cellule devono avere fluorescenza brillante ed essere colorate interamente.

Nota: il saggio deve essere ripetuto se la colorazione è abberrante.

Passare ora ad osservare i vetrini di saggio. Verificare prima l'assenza di cellule fluorescenti nei pozzetti di controllo PBS e FITC. Cellule fluorescenti nel controllo FITC indicano un legame non specifico del coniugato a autofluorescenza o contaminazione.

Nota: in questo caso ripetere il saggio.

Verificare la presenza di cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica di *Ralstonia solanacearum* nei pozzetti di saggio. L'intensità della fluorescenza deve essere equivalente al ceppo di controllo positivo con la stessa diluizione di antisiero. Le cellule con colorazione a pelle di leopardo o incompleta o con debole fluorescenza devono essere ignorate, a meno che non siano numerose. (Vedi interpretazione del risultato della colorazione IF).

Interpretazione del risultato della colorazione IF

- Per ciascun campione in cui non vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica il saggio IF è negativo.
- Per ciascun campione in cui vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica, determinare il numero medio di cellule per campo ottico e calcolare il numero di cellule (N) per ml di sedimento centrifuga risospeso (appendice 4).

Una popolazione approssimativamente di 10^3 cellule per millilitro di «pellet» in sospensione deve essere considerata quale limite per la diagnosi secondo il metodo dell'immunofluorescenza:

- per i campioni con $N > 10^3$, il saggio IF è positivo,
- per i campioni con $N < 10^3$, il saggio IF può essere considerato positivo.

iii) Se si trova un elevato numero di cellule ($> 10^5$ cellule/ml) aventi fluorescenza incompleta o debole ad una diluizione di antisiero pari al titolo, si deve fare un secondo saggio basato:

- su un differente principio biologico
- o ripetere la colorazione Ir con un altro antisiero o una diluizione decimale del sedimento.

3. Saggio immunoenzimatico (Elisa)

(Secondo Robinson Smith et al., 1995)

Usare un antisiero per *Ralstonia solanacearum*, preferibilmente di razza 3 biovar 2. Determinare il titolo su una sospensione di 10^6 cellule per ml dal ceppo omologo di *Ralstonia solanacearum*.

È consigliato l'uso di piastre da microtitolazione NUNC Polysorp.

Includere un controllo negativo di estratto di patata e un controllo con tampone fosfato isotonico (PBS).

Usare una sospensione di concentrazione superiore a 10^6 cellule per ml di una razza biovar appropriata di *Ralstonia solanacearum* come controllo positivo. Eseguire la prova come per il (i) campione(i), ma tenendo una netta separazione dei campioni sulla piastra da microtitolazione.

- 3.1. Trasferire con una pipetta 100-200 μ l del sedimento risospeso in una microprovetta. Scaldare per 4 minuti a 100 °C. Trasferire la microfiala su ghiaccio.
- 3.2. Aggiungere un volume equivalente di tampone di rivestimento carbonato a doppia forza (appendice 5). Mescolare in agitatore.
- 3.3. Applicare a ciascuno di almeno due pozzetti della piastra da microtitolazione, aliquote di 100 μ l. Mantenere in incubazione per 1 ora a 37 °C o per una notte a 4 °C.
- 3.4. Dare dei colpetti per espellere gli estratti dai pozzetti. Lavare i pozzetti tre volte con PBS-Tween (appendice 5), lasciando l'ultima soluzione di lavaggio nei pozzetti per almeno 5 minuti.
- 3.5. Preparare la diluizione appropriata di antisiero di *Ralstonia solanacearum* in un tampone di bloccaggio (appendice 5). Applicare ai pozzetti 100 μ l di diluizione di antisiero. Mantenere in incubazione per 1 ora a 37 °C.
- 3.6. Dare dei colpetti per espellere l'antisiero dai pozzetti. Lavare i pozzetti come in precedenza (paragrafo 3.4).
- 3.7. Preparare la diluizione appropriata di coniugato di fosfatasi alcalina nel tampone di bloccaggio. Applicare 100 μ l di diluizione di coniugato ai pozzetti. Mantenere in incubazione per 1 ora a 37 °C.
- 3.8. Dare dei colpetti per espellere il coniugato dai pozzetti. Lavare i pozzetti come in precedenza (paragrafi 3.4 e 3.6).
- 3.9. Preparare la soluzione di substrato per la fosfatasi alcalina (appendice 5). Applicare 100 μ l ai pozzetti. Mantenere in incubazione da 30 minuti a un'ora al buio a temperatura di laboratorio.
- 3.10. Leggere l'assorbimento a 409 nm.

Interpretazione del saggio Elisa

Il saggio Elisa è negativo se la densità ottica (D.O.) del campione è minore di $2 \times D.O.$ del controllo negativo.

Il saggio Elisa è positivo se la densità ottica del campione è maggiore di $2 \times D.O.$ del controllo negativo.

4. Reazione a catena del DNA polimerasi (PCR)

(Secondo Seal et al., 1993)

N.B.: Durante tutte le fasi di preparazione della PCR e le relative manipolazioni devono essere utilizzate pipette munite di filtro.

Preparare una sospensione di 10^6 cellule per ml da un ceppo di razza 3, biovar 2 di *Ralstonia solanacearum* come controllo positivo. Eseguire il saggio nello stesso modo del (dei) campione (i).

- 4.1. Trasferire con una pipetta 100 μ l del sedimento risospeso in una microprovetta.

In alternativa, trasferire 90 μ l del sedimento risospeso in una microprovetta contenente 10 μ l di NaOH 0,5 M. Mescolare invertendo ripetutamente la microprovetta.

- 4.2. Scaldare per 4 minuti a 100 °C. Trasferire la microprovetta immediatamente in ghiaccio.
- 4.3.* Preparare almeno due diluizioni decimali, per esempio 1:10 e 1:100, o di più — se si ritengono opportune — in acqua distillata sterile o ultrapura (UPW).
- 4.4. Preparare la miscela di reazione PCR (appendice 6) in una provettina sterile aggiungendo i seguenti componenti nell'ordine indicato.

Per un volume di reazione di 50 µl

Componente	Quantità	Concentrazione finale
Acqua distillata sterile o UPW	30,8 µl-33,8 µl	
10×tampone PCR	5,0 µl	1×
d-ATP	1,0 µl	0,2 mM
d-CTP	1,0 µl	0,2 mM
d-GTP	1,0 µl	0,2 mM
d-TTP	1,0 µl	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Primer Y-2 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Taq Polimerasi (5U/µl)	0,2 µl	1,0 U
Volume totale	45 µl-48 µl	

Per più reazioni

Calcolare la quantità di ciascun componente per il numero voluto di reazioni.

Miscelare i componenti e trasferire 45-48 µl della miscela in provettine da PCR sterili.

Tenere le provettine con la miscela di reazione PCR in ghiaccio.

Per volumi di reazione di 25 µl:

ridurre conseguentemente i componenti.

- 4.5. Amplificazione della PCR
- 4.5.1. Facoltativo! Centrifugare a impulsi le provettine con il campione bollito e il controllo positivo. Aggiungere nelle provettine la miscela di reazione PCR e nell'ordine specificato, 2-5 µl del (i) campione (i), del controllo acqua e del controllo positivo. Porre le provettine nel blocco di riscaldamento della macchina per cicli termici DNA.
- 4.5.2. Eseguire il seguente programma:
- 1 ciclo di:
- i) 2 minuti a 96 °C: denaturazione dello stampo
- 50 cicli di:
- ii) 20 secondi a 94 °C: denaturazione
- iii) 20 secondi a 68 °C: appaiamento dei primer
- iv) 30 secondi a 72 °C: allungamento della copia
- 1 ciclo di:
- v) 10 minuti a 72 °C: ulteriore allungamento
- 1 ciclo di:
- vi) mantenere a 4 °C
- N.B.: Questi sono i parametri di un apparecchio Perkin Elmer 9600. Altre macchine per cicli termici possono richiedere una copertura di olio nelle provettine di reazione PCR e/o modifiche della durata delle fasi ii), iii) e iv) nel profilo di amplificazione.
- 4.5.3. Togliere le provettine dalla macchina per cicli termici. Analizzare il prodotto della PCR. Se non lo si fa immediatamente, mantenere le fiale a 4 °C per un uso nello stesso giorno o a -18 °C se devono essere conservate più a lungo.
- 4.6. Analisi del prodotto della PCR
- I frammenti prodotti dalla PCR vengono evidenziati mediante elettroforesi in gel di agarosio e colorazione con etidio bromuro.
- 4.6.1. Preparare un gel appropriato di agarosio portando lentamente a ebollizione l'agarose in tampone di elettroforesi triacetato (TAE).

- 4.6.2. Raffreddare l'agarosio fuso a 50-60 °C, versarlo nello stampo dell'unità di elettroforesi e inserire il pettine. Lasciare solidificare.
- 4.6.3. Togliere il pettine. Immergere il gel in TAE in modo che sia appena coperto (2-3 mm) con il tampone.
- 4.6.4. Mettere goccioline da 3 µl di tampone di caricamento su parafilm. Aggiungere 12 µl del prodotto della PCR di ciascun campione, del prodotto positivo e del controllo acqua e mescolare aspirando piano con la punta della pipetta prima di caricare. I volumi stabiliti possono essere modificati per adeguarsi alla capacità dei pozzetti nel gel di agarosio.
- 4.6.5. Caricare accuratamente i pozzetti del gel. Includere come riferimento un marcatore DNA appropriato in almeno un pozzetto.
- 4.6.6. Collegare i fili all'alimentatore di corrente e alla cella per l'elettroforesi. Attivare il gel a 5-8 V/cm fino a quando il fronte dell'indicatore della corrente superficiale si trovi a meno di 1 cm dalla fine del gel.
- 4.6.7. Spegnerne l'alimentatore. Scollegare i fili dalla cella per l'elettroforesi. Rimuovere accuratamente il gel. Immergerlo in una soluzione di etidio bromuro per 30-45 minuti.
N.B.: Usare guanti usa e getta ogni volta che si manipola l'etidio bromuro poiché si tratta di un potente mutageno.
- 4.6.8. Decolorare in acqua distillata per 10-15 minuti.
- 4.6.9. Visualizzare il (i) frammento (i) amplificato (i) di DNA con transilluminazione UV. Il prodotto PCR di *Ralstonia solanacearum* con primer OLI-1 e Y-2 ha una lunghezza di 288 bp. Confrontare con il marcatore DNA e con il controllo positivo.
N.B.: Il controllo acqua deve essere comunque negativo. Se positivo, ripetere la prova.
- 4.6.10. Fotografare il gel se è richiesta una documentazione permanente.
- 4.6.11. Confermare l'autenticità del frammento amplificato con l'analisi di restrizione enzimatica (REA).
- 4.7. Analisi di restrizione enzimatica (REA).
- 4.7.1. Trasferire 8,5 µl di prodotto della PCR (paragrafo 4.5.3) in una nuova microprovetta. Aggiungere 1 µl di 10× tampone enzimatico e 0,5 µl di enzima di restrizione Avall.
- 4.7.2. Miscelare aspirando piano nella cima della pipetta. Se rimangono gocce sulle pareti della fiala, far ruotare a impulsi in una microcentrifuga. Mantenere in incubazione per 1 ora a 37 °C.
- 4.7.3. Analizzare il frammento della PCR digerito con elettroforesi in gel di agarosio come in precedenza (paragrafo 4.6).

Interpretazione del risultato della prova PCR

La prova PCR è negativa se non si evidenzia la presenza del caratteristico frammento di 288 bp, mentre il frammento è rilevato per il ceppo di controllo positivo di *Ralstonia solanacearum*.

La prova PCR è positiva se si evidenzia il frammento di 288 bp e l'analisi REA di questo frammento dà risultati identici a quello prodotto dal ceppo di controllo positivo di *Ralstonia solanacearum*.

5. Isolamento selettivo in piastra

(Secondo Elphinstone et al., 1996)

- 5.1. Eseguire la prova con una tecnica appropriata di diluizione in piastra, per esempio come segue:
 - i) Preparare almeno due diluizioni decimali, per esempio 1:10 e 1:100, del sedimento risospeso nel tampone da sedimento. Trasferire con una pipetta un volume standard misurato (50-100 µl) del sedimento risospeso e ciascuna diluizione su substrato selettivo SMSA modificato (appendice 7) e distribuirlo con un bastoncino di vetro sull'intera superficie del substrato.
Se ritenuto utile, inseminare il sedimento risospeso con ansa da 10 µl in aree successive. Arroventare alla fiamma l'ansa tra una inseminazione e l'altra.
 - ii) Trasferire un volume standard misurato (50-100 µl) del sedimento risospeso sul substrato selettivo SMSA modificato e inseminarlo con un bastoncino di vetro sull'intera superficie del mezzo. Far scorrere il bastoncino senza esporlo alla fiamma su almeno altre 2 piastre di SMSA modificato.
- 5.2. Inseminare, con la stessa tecnica di diluizione in piastra, una sospensione di 10⁶ cellule per ml di un ceppo razza 3, biovar 2 di *Ralstonia solanacearum* come controllo positivo su una serie di altre piastre di SMSA modificato.
- 5.3. Tenere in incubazione le piastre a 28 °C. Cominciare a leggere le piastre dopo 3 giorni. Se il risultato è negativo, mantenere ancora in incubazione fino a un massimo di 6 giorni. Gli isolati virulenti di *Ralstonia solanacearum* sviluppano colonie di color bianco-latte, bianche, irregolari e fluide con centri distinti di colore rosso sangue che mostrano delle striature interne e dei vortici.
- 5.4. Purificare le colonie a morfologia caratteristica con subcoltura su un mezzo nutritivo generale (appendice 1).

- 5.5. Identificare le colture pure (sezione II, paragrafo 4.1) e confermare che le colture siano di *Ralstonia solanacearum* con una prova di patogenicità (sezione II, paragrafo 4.3).

Interpretazione del risultato dell'isolamento selettivo in piastra

L'isolamento selettivo in piastra è negativo se non si trovano colonie dopo sei giorni o se non si trovano colonie caratteristiche di *Ralstonia solanacearum*, purché non si sospetti inibizione da parte di colonie di altri batteri e che nel controllo positivo trovino le caratteristiche colonie di *Ralstonia solanacearum*.

L'isolamento in piastra è positivo se si trovano colonie caratteristiche di *Ralstonia solanacearum*.

6. Saggio biologico

(Secondo JARST, 1988)

- 6.1. Usare 10 piante, di saggio (piantine suscettibili di pomodoro o di melanzana) ciascuna allo stadio di tre foglie vere. Non innaffiare le piante nelle 24 ore precedenti l'inoculazione.
- 6.2. Distribuire 100 µl di sedimento risospeso tra le piante. Inoculare il fusto tra i cotiledoni e in uno o due altri punti.
- 6.3. Inoculare, con la stessa tecnica, 10 piantine con una sospensione di 10⁶ cellule per ml di un ceppo di *Ralstonia solanacearum* di razza 3, biovar 2 come controllo negativo. Separare le piante del controllo positivo dalle altre per evitare contaminazione.
- 6.4. Far crescere le piantine a una temperatura di 22 °C e 28 °C per quattro settimane ad alta umidità relativa con innaffiature giornaliere. Vedere se si sviluppano sintomi di collasso, epinastia, clorosi e/o rallentamento della crescita.
- 6.5. Fare isolamenti dalle piante infettate (sezione II). Identificare le colture pure con morfologia caratteristica (sezione II, paragrafo 4.1) e confermare le colture positive con una prova di patogenicità (sezione II, paragrafo 4.3).
- 6.6. Se si ritiene utile, verificare l'assenza di infezione nei lotti di piante asintomatiche usate per la prova. Rimuovere da ciascuna pianta una sezione di 1 cm di fusto a 2 cm al di sopra del punto di inoculazione. Omogeneizzare i tessuti in un tampone di macerazione. Effettuare l'isolamento per diluizione in piastra paragrafo 5.1). Se positiva, identificare le colture con morfologia caratteristica (sezione II, paragrafo 4.1) e confermare le colture di *Ralstonia solanacearum* con una prova di patogenicità (sezione II, paragrafo 4.3).

Interpretazione del risultato del saggio biologico

Il saggio biologico è negativo se le piante inoculate non risultano infettate da *Ralstonia solanacearum*.

Il saggio biologico è positivo se le piante inoculate risultano infettate da *Ralstonia solanacearum*.

7. Prove di arricchimento

(J. G. Elphinstone et al., 1996)

- 7.1. Trasferire 100 µl del sedimento di centrifuga risospeso in 3 ml del brodo SMSA modificato (appendice 7).
- 7.2. Mantenere in incubazione per 48 ore e, comunque, non oltre 72 ore a 28 °C con il tappo della provetta non chiuso perfettamente per consentire l'aerazione.
- 7.3. Chiudere bene il tappo e mescolare nel vortex. Prendere frazioni del liquido per la colorazione IF (la presente sezione, paragrafo 2), il saggio Elisa (la presente sezione, paragrafo 3), e/o per la PCR (la presente sezione, paragrafo 4).

8. Prova di patogenicità

Si faccia riferimento a sezione II, paragrafo 4.3.

Appendice 1

Substrati nutritivi per l'isolamento e la coltura di *Ralstonia solanacearum*

Agar nutritivo (NA)

Agar nutritivo (Difco)	23 g
Acqua distillata	1 litro

Preparare volumi da mezzo litro del terreno in matracci da 1 litro.

Disciogliere gli ingredienti.

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Portare a 50°C. Versare nelle piastre.

Lievito peptone glucosio agar (YPGA)

Estratto di lievito (Difco)	5 g
Bacto peptone (Difco)	5 g
D(+) glucosio (monoidrato)	10 g
Bacto Agar (Difco)	15 g
Acqua distillata	1 litro

Preparare volumi da mezzo litro del terreno in matracci da 1 litro.

Disciogliere gli ingredienti.

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Portare a 50°C. Versare nelle piastre.

Saccarosio-peptone-agar (SPA)

Saccarosio	20 g
Peptone	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Bacto Agar (Difco)	15 g
Acqua distillata	1 litro

Preparare volumi da mezzo litro del terreno in matracci da 1 litro.

Disciogliere gli ingredienti. Se necessario, regolare a pH 7,2-7,4.

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Portare a 50°C. Versare nelle piastre.

Substrato Kelman al tetrazolio

Casaminoacidi (Difco)	1 g
Bactopeptone (Difco)	10 g
Destrosio	5 g
Bacto Agar (Difco)	15 g
Acqua distillata	1 litro

Preparare volumi da mezzo litro del terreno in matracci da 1 litro.

Disciogliere gli ingredienti. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Portare a 50°C.

Aggiungere una soluzione acquosa di cloruro di trifinitetrazolo (Sigma), sterilizzata per filtrazione, fino a concentrazione finale di 50 mg/litro.

Versare nelle piastre.

Appendice 2

Materiali per la preparazione del campione

Tampone di macerazione: tampone fosfato 50 mM, pH 7,0

Questo tampone è impiegato per la macerazione dei tessuti.

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Acqua distillata	1 litro

Disciogliere gli ingredienti e controllare il pH. Distribuire secondo opportunità. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Quando si effettua la PCR diretta, è raccomandabile aggiungere il 5% di Polivinilpirrolinone p.m. 40 000 (PVP-40), per limitare l'effetto inibitore sull'amplificazione dovuto alla presenza delle molecole aromatiche nell'estratto.

Quando si adoperano il miscelatore Waring o il procedimento di omogenizzazione Ultra Turrax per la macerazione dei coni ombelicali delle patate, si raccomanda di aggiungere un defloculante, un antischiuma od un antiossidante.

Lubrol in scaglie	0,5 g per litro
Antischiuma DC al silicone	1,0 ml per litro
Pirofosfato tetrasodico	1,0 g per litro

Sterilizzare separatamente in autoclave. Aggiungere fino alla concentrazione desiderata.

Tampone per il sedimento: tampone fosfato 10 mM, pH 7,2

Questo tampone va impiegato per riportare in sospensione e diluire il sedimento di centrifuga ottenuto dai coni ombelicali.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
Acqua distillata	1 litro

Disciogliere gli ingredienti e verificare il pH. Distribuire secondo opportunità. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Appendice 3

Materiali per il saggio IF

Tampone IF: soluzione fisiologica tamponata al fosfato (PBS), 10 mM, pH 7,2

Questo tampone viene impiegato per la diluizione degli antisieri.

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

Disciogliere gli ingredienti e verificare il pH. Distribuire secondo opportunità.

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Tampone IF — Tween

Questo tampone viene impiegato per lavare i vetrini. Aggiungere lo 0,1% di Tween 20 al tampone IF.

Glicerolo tamponato al fosfato 0,1 M, pH 7,6

Questo tampone viene impiegato come fluido di montaggio sui pozzetti dei vetrini IF, per incrementare la fluorescenza

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3,2 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
Glicerolo	50 ml
Acqua distillata	100 ml

Appendice 4

Determinazione del livello di contaminazione nella prova IF

Superficie del pozzetto (S) del vetrino multiplo per immunofluorescenza

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

dove: D = diametro del pozzetto.

(1)

Superficie del campo (s) dell'obiettivo

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

dove: d = diametro del campo.

(2)

Calcolare d misurando direttamente o mediante le seguenti formule:

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

(3)

dove i = coefficiente di campo (dipende dal tipo di oculare e varia da 8 a 24),

K = coefficiente del microscopio (1 o 1,25),

G = ingrandimento dell'obiettivo (100x, 40x, ecc.).

Dalla (2) si ricava:

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

(4)

Dalla (3):

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

Conteggiare il numero di cellule IF tipiche per campo (c).

Calcolare il numero di cellule IF tipiche per pozzetto (C).

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

Calcolare il numero di cellule IF tipiche per ml di precipitato (N)

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

dove y = volume del precipitato sul pozzetto,

F = fattore di diluizione del precipitato.

Appendice 5

Materiali per il saggio Elisa

Tampone di ricopertura al carbonato (pH 9,6), a doppia forza

Na_2CO_3 6,36 g

NaHCO_3 11,72 g

Acqua distillata 1 litro

Disciogliere gli ingredienti e controllare il pH. Suddividere in aliquote secondo convenienza.

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Se l'estratto contiene una percentuale elevata di molecole aromatiche, si può aggiungere solfito sodico come antiossidante, fino a concentrazione dello 0,2 %.

Soluzione fisiologica tamponata al fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS) 10 ×, pH 7,4

NaCl 80 g

KH_2PO_4 2 g

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

KCl 2 g

Acqua distillata 1 litro

Disciogliere gli ingredienti e verificare il pH. Suddividere in aliquote secondo convenienza.

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Soluzione fisiologica tamponata fosfato Tween (PBS-T)

PBS 10 × 100 ml

Soluzione al 10 % di Tween 20 5 ml

Acqua distillata 895 ml

Tampone bloccante (anticorpi) (da preparare al momento dell'uso)

PBS 10 × 10 ml

Polivinilpirrolinone (44000 MWT) (PVP-44) 2 g

Soluzione al 10 % di Tween 20 0,5 g

Polvere di latte 0,5 g

Acqua distillata q.b. a 100 ml

Soluzione substrato fosfatasi alcalina pH 9,8

Dietanolammina 97 ml

Acqua distillata 800 ml

Mescolare e regolare a pH 9,8 con HCl concentrato.

Portare a 1 litro acqua distillata.

Aggiungere 0,2 g di MgCl_2 .

Disciogliere due compresse di substrato 5 mg pasticche alla fosfatasi (Sigma) per ogni 15 ml di soluzione.

Appendice 6

Materiali per la prova PCR

Sequenze dei primer:

primer OLI-1 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

primer Y-2 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Seal et al. (1993).

Appendice 7

Materiali per l'isolamento selettivo su piastra

Substrato selettivo SMSA (Engelbrecht, 1994, modificato da Elphinstone et al., 1996)

Terreno di base

Casaminoacidi (Difco) 1 g

Bactopeptone (Difco) 10 g

Glicerolo 5 ml

Agar (Difco) 15 g

Acqua distillata 1 litro

Preparare volumi da mezzo litro in matracci da 1 litro.

Disciogliere gli ingredienti e verificare il pH. Se necessario, prima di sterilizzare in autoclave regolare il pH a 6,5. Su un terreno a pH > 7,0 *Ralstonia solanacearum* non si svilupperebbe adeguatamente.

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Portare a 50°C.

Aggiungere i seguenti ingredienti (tutti di produzione Sigma), in modo da ottenere le concentrazioni finali specificate:

Cristalvioletto	5 mg par litro		
Polimixina B solfato	100 mg par litro	(circa 600 000 unità)	Sigma P-1004
Bacitracina (*)	25 mg par litro	(circa 1 250 unità)	Sigma B-0125
Cloramfenicolo	5 mg par litro		Sigma C-3175
Penicillina G	0,5 mg par litro	(circa 825 unità)	Sigma P-3032
Sali di tetrazolio	50 mg par litro		

Disciogliere gli ingredienti in etanolo al 70% fino alle concentrazioni indicate per il volume di terreno preparato. Per disciogliere alcuni ingredienti (polimixina B e cloramfenicolo) è necessario riscaldare leggermente ed agitare.

Brodo SMSA (Elphinstone et al., 1996), ma eliminando l'agar o i sali di tetrazolio.

Preparare come per il terreno selettivo SMSA, eliminando l'agar o i sali di tetrazolio.

Distribuire in porzioni da 3 ml, in provette a perdere «Universal» da 30 ml.

(*) Se necessario, aumentando la concentrazione della bacitracina fino a 300 ppm si può ridurre la contaminazione da batteri saprofiti senza ridurre il recupero di *Ralstonia solanacearum*.

Bibliografia

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

ALLEGATO III

1. Per ogni presenza sospetta per la quale le prove di screening, eseguite secondo il metodo appropriato di cui all'allegato II nel caso del materiale vegetale elencato, oppure, in tutti gli altri casi, secondo un qualunque altro metodo ufficialmente approvato, abbiano dato un risultato positivo, di cui si attende la conferma o la smentita attraverso l'applicazione completa del metodo stesso, è necessario mantenere e conservare in condizioni adeguate, fino al termine delle prove:
 - ove possibile, la partita o parte di essa (da cui è stato prelevato il campione) nel suo imballaggio originale, con l'etichetta,
 - ove possibile, la parte rimanente dei campioni,
 - ogni estratto residuo ed ogni ulteriore materiale (es.: vetrini di immunofluorescenza) preparato in vista delle prove di screening,ed inoltre:
 - tutta la documentazione.
2. Qualora venga confermata la presenza dell'organismo nocivo, è necessario mantenere e conservare in condizioni adeguate, per almeno un mese dalla procedura di notifica di cui all'articolo 5, paragrafo 2:
 - il materiale di cui al paragrafo 1,
 - un campione del materiale infetto di pomodoro o melanzana infetto inoculato con il tubero o con l'estratto, se del caso, ed inoltre:
 - la coltura isolata dell'organismo nocivo.

ALLEGATO IV

Gli accertamenti di cui all'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto 1), comprendono i seguenti elementi, se del caso:

- i) luoghi di produzione,
 - dove sono o sono state coltivate patate in relazione clonale con patate risultate infette dall'organismo nocivo,
 - dove sono o sono stati coltivati pomodori che provengono dalla stessa fonte dei pomodori risultati infetti dall'organismo nocivo,
 - dove sono o sono stati coltivati patate o pomodori posti sotto controllo ufficiale per sospetta presenza dell'organismo nocivo,
 - dove sono o sono stati coltivati patate in relazione clonale con patate coltivate in luoghi di produzione sospetti di infestazione da parte dell'organismo nocivo,
 - dove vengono coltivate patate o pomodori e che sono ubicati in vicinanza di luoghi di produzione infestati, compresi quelli dove vengono condivisi attrezzature di produzione e impianti, sia direttamente, sia attraverso un imprenditore comune,
 - dove l'irrigazione o l'irrorazione siano praticate con acque superficiali originarie di qualunque fonte confermata o sospetta di infestazione da parte dell'organismo nocivo,
 - che per l'irrigazione o l'irrorazione condividono acque superficiali di qualsiasi origine con luoghi di produzione dove l'infestazione da parte dell'organismo nocivo è confermata o sospetta,
 - che sono inondati o sono stati inondati con acque superficiali confermate o sospette di infestazione da parte dell'organismo nocivo,e
- ii) acque superficiali impiegate per l'irrigazione, l'irrorazione o l'inondazione di uno o più terreni o luoghi di produzione, dove l'infestazione da parte dell'organismo nocivo è confermata.

ALLEGATO V

1. La determinazione dell'entità della contaminazione probabile di cui all'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii) e lettera c), punto iii), comprende i seguenti elementi, se del caso:
 - materiale vegetale elencato coltivato in un luogo di produzione dichiarato contaminato ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii);
 - luogo o luoghi di produzione che abbiano un collegamento nel ciclo produttivo con il materiale vegetale elencato dichiarato contaminato ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii), compresi quelli dove vengono condivisi macchinari e dispositivi di produzione direttamente o attraverso un imprenditore comune;
 - materiale vegetale elencato prodotto in un luogo o nei luoghi di produzione di cui al precedente trattino, o presenti in tale luogo o luoghi di produzione durante il periodo in cui il materiale vegetale elencato dichiarato contaminato ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii), era presente nei luoghi di produzione di cui al primo trattino;
 - magazzini adibiti alla manipolazione del materiale vegetale elencato proveniente dai luoghi di produzione di cui sopra;
 - macchinari, veicoli, contenitori, magazzini, o relative parti, e qualsiasi altro oggetto, compresi i materiali d'imballaggio, che possano essere venuti a contatto con il materiale vegetale elencato dichiarato contaminato ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii);
 - materiale vegetale elencato immagazzinato o entrato in contatto con una qualsiasi delle strutture o degli oggetti elencati nel precedente trattino prima della pulizia e della disinfezione di tali strutture od oggetti;
 - dopo gli accertamenti e gli esami di cui all'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii), nel caso delle patate, tuberi o piante con una relazione clonale parentale o collaterale e, nel caso dei pomodori, piante con la stessa fonte del materiale vegetale elencato dichiarato contaminato ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii), e per le quali, malgrado abbiano dato risultati negativi nei test per l'individuazione dell'organismo nocivo, risulti che la contaminazione sia probabile per legami di carattere clonale;
 - luogo o luoghi di produzione del materiale vegetale elencato al precedente trattino;
 - luogo o luoghi di produzione di materiale vegetale elencato, che per l'irrigazione o l'irrorazione impiegano acque dichiarate contaminate ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera c), punto ii);
 - materiale vegetale elencato prodotto in appezzamenti inondati con acque superficiali confermate essere infestate dall'organismo nocivo.
2. La determinazione della potenziale disseminazione ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto iv) e lettera c), punto iii), tiene conto dei seguenti elementi:
 - i) nei casi di cui all'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto iv):
 - vicinanza di altri luoghi di produzione in cui è coltivato il materiale vegetale elencato,
 - produzione e utilizzo comuni di scorte di tuberi-seme di patate,
 - luoghi di produzione che per l'irrigazione o l'irrorazione del materiale vegetale elencato impiegano acque superficiali, nei casi in cui esiste od è esistito un rischio di fughe di acque superficiali o di inondazione dal luogo o dai luoghi di produzione dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii);
 - ii) nei casi in cui le acque superficiali sono state dichiarate contaminate ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera c), punto ii):
 - luogo o luoghi di produzione del materiale vegetale elencato adiacenti alle acque superficiali dichiarate contaminate, o a rischio di inondazione,
 - bacini di irrigazione separati associati alle acque superficiali dichiarate contaminate.

3. I dati contenuti nella notifica di cui all'articolo 5, paragrafo 2, primo comma, comprendono:

- la data di segnalazione della presenza sospetta ai sensi dell'articolo 4 e le date del campionamento e della conferma della presenza dell'organismo nocivo ai sensi dell'articolo 5, secondo i casi;
- una descrizione degli elementi relativi alla dichiarazione di contaminazione e alla delimitazione della zona.

4. I dati contenuti nella notifica supplementare di cui all'articolo 5, paragrafo 2, secondo comma, comprendono:

- per ogni spedizione o partita di patate dichiarate contaminate, i certificati prescritti dagli articoli 7 e 8 della direttiva 77/93/CEE, il numero di passaporto o il numero di registrazione dei produttori di patate, dei depositi collettivi e dei centri di spedizione, secondo i casi;
- per ogni spedizione o partita di piante di pomodoro dichiarate contaminate, i certificati di cui agli articoli 7 o 8 della direttiva 77/93/CEE ed il numero di passaporto, conformemente all'elenco di cui all'allegato V, parte A, sezione I, paragrafo 2.2, della direttiva 77/93/CEE;
- la denominazione varietale e la categoria per le scorte di tuberi-seme di patate e, ove possibile, in tutti gli altri casi;
- ogni altra informazione eventualmente richiesta dalla Commissione sulla confermata comparsa della malattia.

ALLEGATO VI

1. Con riferimento all'articolo 6, paragrafo 1, le disposizioni sono:
 - incenerimento, o
 - utilizzo, per l'alimentazione animale, previo idoneo trattamento termico, tale che non sussista alcun rischio di sopravvivenza dell'organismo nocivo, o
 - interrimento profondo in un luogo di smaltimento dove non sussistano rischi di infiltrazione del terreno agricolo o di contatti con sorgenti d'acqua che potrebbero essere usate per l'irrigazione del terreno agricolo, o
 - destinazione alla trasformazione industriale, attraverso la consegna diretta ed immediata a stabilimenti dotati di apposite strutture ufficialmente approvate per l'eliminazione dei rifiuti, che corrispondano alle disposizioni dell'allegato VII della presente direttiva, o
 - altre misure, sempre che sia stato accertato che non esiste alcun rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo; tali misure debbono essere immediatamente notificate alla Commissione e agli altri Stati membri.
2. L'utilizzazione o l'eliminazione idonee del materiale vegetale elencato di cui all'articolo 6, paragrafo 2, da effettuarsi sotto il controllo degli organismi ufficiali competenti dello Stato o degli Stati membri interessati, prevedendo uno scambio di informazioni fra gli organismi ufficiali tale da assicurare la costanza di tale controllo, e l'approvazione da parte degli organismi ufficiali competenti degli Stati membri dove le patate sono imballate o trattate in relazione agli impianti destinati all'eliminazione dei rifiuti di cui al primo e secondo trattino, comprendono:
 - i) per i tuberi di patata:
 - il loro impiego quali patate da conservazione destinate al consumo, purché vengano imballati in luoghi provvisti di adeguati impianti di eliminazione dei rifiuti, in imballaggi pronti per la consegna diretta e l'utilizzazione senza necessità di reimballaggio, e siano destinati alla consegna e all'utilizzazione dirette, o
 - il loro impiego quali patate da conservazione destinate alla trasformazione industriale e consegnate direttamente e immediatamente ad uno stabilimento dotato di adeguate strutture per l'eliminazione dei rifiuti e la disinfezione, o
 - altri impieghi o forme di eliminazione, sempre che sia accertato che non esiste alcun rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo, e fatta salva l'approvazione di detti organismi ufficiali competenti. Tali misure devono essere notificate immediatamente alla Commissione e agli altri Stati membri;
 - ii) per altre parti di piante, compresi gli steli e i cascami del fogliame:
 - la distruzione, o
 - altre forme di impiego o di eliminazione, sempre che sia accertato che non esiste alcun rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo; queste misure sono notificate alla Commissione e agli altri Stati membri.
3. I metodi adeguati per la decontaminazione degli oggetti di cui all'articolo 6, paragrafo 3 consistono nella pulizia e, se del caso, nella disinfezione, in modo da escludere qualsiasi rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo, e sono applicati sotto la sorveglianza degli organismi ufficiali competenti degli Stati membri.
4. La serie di misure che gli Stati membri debbono applicare entro le zone delimitate identificate ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto iv), e lettera c), punto iii), cui si fa riferimento nell'articolo 6, paragrafo 4, comprendono:
 - 4.1. nei casi in cui i luoghi di produzione sono stati dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii):
 - a) in un campo o unità di produzione protetta del vegetale dichiarati contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii),

- i) — per almeno i quattro anni di coltivazione successivi a quello in cui la contaminazione è stata dichiarata,

si attuano interventi intesi ad eliminare le piante spontanee di patata o di pomodoro e le altre piante ospiti dell'organismo nocivo, comprese le solanacee selvatiche, e

— è vietato mettere a dimora:

— tuberi o tuberi-seme di patate

— piante o semi di pomodoro

— tenendo conto della biologia dell'organismo nocivo:

— altre piante ospiti

— pianta della specie Brassica, per le quali è stato individuato il rischio di presenza dell'organismo nocivo

— colture per le quali esiste un rischio identificabile di disseminazione dell'organismo nocivo;

— nel primo periodo di raccolta delle patate o dei pomodori che segue il periodo indicato al trattino precedente, ed a condizione che il terreno sia risultato esente da piante spontanee di patata e di pomodoro e da altre piante ospiti, comprese le solanacee selvatiche, per almeno due anni vegetativi consecutivi precedenti alla messa a dimora:

— nel caso delle patate, sono messi a dimora soltanto tuberi-seme ufficialmente certificati per la produzione di patate da conservazione, e

— si procede ad accertamenti ufficiali come precisato all'articolo 2, paragrafo 1;

— nel periodo di raccolta delle patate o dei pomodori successivo a quello indicato al trattino precedente, e in seguito ad un appropriato ciclo di rotazione, nel caso delle patate sono messi a dimora esclusivamente tuberi-seme ufficialmente certificati per la produzione a scopo sia di conservazione che di semina; nel caso delle patate e dei pomodori viene effettuato un accertamento ufficiale come precisato all'articolo 2, paragrafo 1,

oppure

- ii) nei cinque anni vegetativi successivi a quello in cui la contaminazione è stata dichiarata,

— si attuano interventi atti ad eliminare le piante spontanee di patata e di pomodoro e le altre piante ospiti dell'organismo nocivo, comprese le solanacee selvatiche,

— per i primi tre anni l'appezzamento viene messo e tenuto a maggese completo, oppure a cereali conformemente al rischio identificato, oppure a pascolo permanente, effettuando frequenti falciature a raso, oppure è adibito a pascolo intensivo, oppure ad erba per la produzione di sementi, e nei due anni successivi viene piantato con piante che non ospitano l'organismo nocivo e non comportano rischio identificato di sopravvivenza o disseminazione dell'organismo nocivo,

— nel primo periodo di raccolta delle patate o dei pomodori successivo a quello indicato al trattino precedente:

— nel caso delle patate, sono messi a dimora esclusivamente tuberi-semi ufficialmente certificati per la produzione a scopo di semina o di conservazione.

— ed è effettuato un accertamento ufficiale come precisato nell'articolo 2, paragrafo 1;

negli altri appezzamenti:

— nell'anno di coltivazione successivo a quello della contaminazione dichiarata:

— è vietato mettere a dimora tuberi o piante di patata, od altre piante ospiti dell'organismo nocivo, e vengono attuati interventi per eliminare le piante spontanee di patata e di pomodoro nonché altre piante ospiti, comprese le solanacee selvatiche, secondo i casi;

— nel caso dei tuberi di patata, per la produzione di patate da conservazione vengono messi a dimora esclusivamente tuberi-seme ufficialmente certificati, a condizione che gli organismi ufficiali competenti ritengano che il rischio di piante spontanee di patate e di pomodori e di

altre piante ospiti dell'organismo nocivo, comprese le solanacee selvatiche, sia stato eliminato. La coltivazione in fase vegetativa viene ispezionata al momento appropriato, e sulle piante spontanee di patata viene effettuata la ricerca dell'organismo nocivo; inoltre, per le patate, i tuberi debbono essere soggetti ad ispezione dopo il raccolto;

- nel primo anno di coltivazione successivo a quello di cui al primo trattino:
 - nel caso delle patate, per la produzione di tuberi-seme o di patate da conservazione vengono messi a dimora esclusivamente tuberi-seme ufficialmente certificati;
 - almeno per il secondo anno di coltura successivo a quello di cui al primo trattino:
 - nel caso delle patate, per la produzione di patate da seme o da conservazione vengono messi a dimora esclusivamente tuberi-seme ufficialmente certificati ovvero tuberi-seme coltivati sotto controllo ufficiale e derivanti da tuberi-seme ufficialmente certificati;
 - in ciascuno degli anni di coltura di cui ai precedenti trattini, vengono prese misure per eliminare le piante spontanee di patata e di pomodoro ed altre piante ospiti dell'organismo nocivo, comprese le solanacee selvatiche, e viene effettuato un accertamento ufficiale come precisato all'articolo 2, paragrafo 1 e, nel caso in cui dei tuberi-seme vengano messi a dimora in vista della produzione di patate da seme, viene effettuato un controllo sui tuberi;
- c) non appena è avvenuta la dichiarazione di contaminazione ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii), ed in ognuno degli anni vegetativi successivi, fino al primo periodo incluso di raccolta possibile delle patate o dei pomodori nell'appezzamento o negli appezzamenti dichiarati contaminati, come specificato alla lettera a):
- tutti i macchinari e le strutture di magazzino sul luogo di produzione e associati al ciclo produttivo di patate o di pomodori sono opportunamente puliti e, se del caso, disinfettati con i metodi adeguati, conformemente al punto 3;
 - per prevenire la disseminazione dell'organismo nocivo, sono effettuati controlli ufficiali sui programmi di irrigazione ed irrorazione, che possono arrivare al divieto;
- d) nelle unità di produzione protetta dichiarate contaminate ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto ii), allorché è possibile sostituire completamente il substrato culturale:
- è vietato mettere a dimora tuberi-seme o piante di patata, od altre piante ospiti dell'organismo nocivo, comprese le piante e i semi di pomodoro, a meno che l'unità sia stata sottoposta a misure sotto controllo ufficiale intese ad eliminare l'organismo nocivo ed a rimuovere tutto il materiale vegetale elencato ospite, comprendente almeno il cambiamento completo del substrato culturale nonché la pulizia, e, se del caso, la disinfezione dell'unità di produzione e di tutte le attrezzature, e purché gli organismi ufficiali competenti abbiano successivamente autorizzato la produzione di patate o pomodori;
 - la produzione di patate si effettua a partire da tuberi-seme ufficialmente certificati, o da microtuberi o piantine ottenute da fonti controllate;
 - per prevenire la disseminazione dell'organismo nocivo, vengono attuati secondo necessità controlli ufficiali sui programmi di irrigazione ed irrorazione, che possono arrivare al divieto.
- 4.2. All'interno della zona delimitata, fatti salvi gli interventi previsti al punto 4.1, gli Stati membri:
- a) immediatamente dopo la contaminazione dichiarata, e per almeno tre periodi vegetativi:
- aa) nei casi in cui la zona delimitata è stata determinata ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto iv):
- garantiscono il controllo, attraverso i propri organismi ufficiali responsabili, delle imprese dove viene effettuata la coltivazione, il magazzino o la manipolazione dei tuberi di patata o dei pomodori, nonché delle imprese che gestiscono su base contrattuale i macchinari occorrenti,
 - esigono la pulizia, e se del caso, la disinfezione dei macchinari e dei magazzini presenti in tali imprese, utilizzando i metodi adeguati specificati al punto 3.

- esigono l'impiego esclusivo di semi certificati o semi coltivati sotto controllo ufficiale per tutte le colture di patata comprese in tale zona, e l'esecuzione di prove dopo il raccolto di tuber-seme di patate coltivati in luoghi di produzione dichiarati probabilmente contaminati ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera a), punto iii),
 - esigono che la manipolazione dei tuber-seme di patata raccolti sia separata da quella delle patate da consumo in tutte le imprese della zona,
 - eseguono gli accertamenti ufficiali di cui all'articolo 2, paragrafo 1,
- ab) nei casi in cui le acque superficiali sono state dichiarate contaminate ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera c), punto ii), ovvero incluse fra i fattori di una possibile disseminazione dell'organismo nocivo conformemente all'allegato V, punto 2:
- procedono ad accertamenti annuali ai momenti appropriati, comprendenti il prelievo di campioni di acque superficiali e delle eventuali piante ospiti solanacee nelle sorgenti d'acqua in causa, nonché esami eseguiti in conformità:
 - dei metodi appropriati di cui all'allegato II, per il materiale vegetale elencato;
 - di qualsiasi altro metodo approvato ufficialmente negli altri casi;
 - per prevenire la disseminazione dell'organismo nocivo, attuano controlli sui programmi di irrigazione ed irrorazione, che possono arrivare al divieto d'impiego dell'acqua dichiarata contaminata ai fini dell'irrigazione e dell'irrorazione del materiale vegetale elencato e, se del caso, di altre piante ospiti; questo divieto può essere riveduto sulla base dei risultati dell'accertamento annuale di cui sopra;
 - nei casi in cui gli scarichi di reflui sono contaminati, effettuano controlli ufficiali sull'eliminazione dei rifiuti derivanti da stabilimenti industriali di trasformazione o imballaggio che manipolano il materiale vegetale elencato;
- b) stabiliscono se del caso un programma volto a sostituire tutte le scorte di tuber-seme di patata entro un lasso di tempo adeguato.

ALLEGATO VII

Per ovviare al rischio di disseminazione dell'organismo nocivo, gli impianti ufficialmente approvati di eliminazione dei rifiuti di cui all'allegato VI, paragrafo 1, quarto trattino debbono conformarsi alle seguenti disposizioni:

- i) gli scarti di lavorazione delle patate e dei pomodori (comprese le patate scartate, le bucce di patata e i pomodori scartati) nonché ogni altro rifiuto solido collegato alle patate e ai pomodori, deve essere eliminato in uno dei modi seguenti:
- interrimento profondo in un luogo di smaltimento dove non sussistano rischi di infiltrazione del terreno agricolo o di contatti con sorgenti d'acqua che potrebbero essere usate per l'irrigazione del terreno agricolo. I rifiuti sono trasportati direttamente al sito in condizioni di confinamento tali che non sussistano rischi di perdite dei rifiuti; o
 - incenerimento;
- ii) reflui di lavorazione: prima dell'eliminazione, i reflui liquidi contenenti solidi in sospensione sono sottoposti a procedimenti di filtrazione o di sedimentazione destinati ad allontanare tali solidi. I solidi stessi debbono essere eliminati come indicato al comma i).
- I reflui sono quindi:
- riscaldati a una temperatura minima di 70 °C per almeno 30 minuti prima di essere eliminati, oppure
 - altrimenti eliminati, previa approvazione ufficiale e sotto controllo ufficiale, in modo da escludere il rischio di contatto fra i rifiuti e il terreno agricolo o sorgenti di acqua che potrebbe essere utilizzata per irrigare terreni agricoli. I particolari in merito sono notificati agli altri Stati membri ed alla Commissione.

00A4295