

Decreto-Lei n.º 494/99
de 18 de Novembro

A doença provocada pelo agente patogénico *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., anteriormente denominada por *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith e vulgarmente designada «mal murcho da batateira e do tomateiro», é um factor de redução da produção da cultura da batateira e do tomateiro, representando um risco para estas culturas não só no nosso país como também em todo o território comunitário, se não forem tomadas medidas de protecção eficazes.

Com a aprovação da Directiva n.º 98/57/CE, do Conselho, de 20 de Julho, foram estabelecidas as medidas de controlo fitossanitário a adoptar pelos Estados membros em relação àquele organismo prejudicial, pelo que importa proceder à transposição da referida directiva para a ordem jurídica interna.

Assim, nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 198.º da Constituição, o Governo decreta, para valer como lei geral da República, o seguinte:

Artigo 1.º

Objecto

O presente diploma estabelece as medidas de controlo fitossanitário a adoptar em relação à bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., anteriormente designada por *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, que para efeitos do presente diploma é a seguir designada por organismo prejudicial, no sentido de evitar o seu aparecimento e, uma vez detectada, localizá-la e determinar a sua distribuição, evitar a sua dispersão e combatê-la com vista à sua erradicação.

Artigo 2.º

Prospecção oficial

1 - Para efeitos do disposto no artigo anterior, a Direcção-Geral de Protecção das Culturas (DGPC) define, elabora e coordena a aplicação do programa nacional de prospecção do organismo prejudicial, cuja execução se realiza anualmente.

2 - A execução do programa de prospecção referido no número anterior cabe aos serviços competentes das direcções regionais de agricultura (DRA), nas respectivas áreas de actuação.

3 - As prospecções previstas no programa nacional de prospecção incidem obrigatoriamente sobre as seguintes plantas, que para efeitos do presente diploma são designadas «materiais vegetais»:

a) No caso da batata: plantas, incluindo tubérculos, com excepção da semente verdadeira, de *Solanum tuberosum* L.:

i) Em alturas apropriadas, inspecção visual da cultura em desenvolvimento ou colheita de amostras de batata de semente e de batata de consumo durante a época de cultura ou em armazém. Essas amostras serão sujeitas a uma inspecção visual oficial ou oficialmente controlada, com corte dos tubérculos;

ii) No caso da batata de semente e, quando apropriado, da batata de consumo, análises laboratoriais oficiais ou oficialmente controladas, utilizando o método constante do anexo I ao presente diploma e que dele faz parte integrante;

b) No caso do tomate: plantas, com excepção de frutos e sementes, de *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw.:

i) Inspeção visual em alturas apropriadas, pelo menos da cultura em desenvolvimento de plantas destinadas a replantação para utilização profissional.

4 - De acordo com a avaliação do risco de dispersão do organismo prejudicial efectuada no decurso da execução do programa referido no n.º 1, as prospecções podem ser realizadas em

zonas de produção de batata, tomate e outras solanáceas e em viveiros de tomateiro, assim como em locais de transformação industrial e centros de embalagem.

5 - De acordo com a avaliação do risco de dispersão do organismo prejudicial efectuada no decurso da execução do programa referido no n.º 1, as prospekções podem incidir sobre outras plantas solanáceas para além dos materiais vegetais referidos no n.º 3 e infestantes da mesma família, águas superficiais utilizadas para rega dos materiais vegetais, resíduos líquidos de descarga e resíduos sólidos provenientes de instalações de transformação industrial de batata e tomate ou de embalagem de batata, meios de cultura e solo, que para efeitos do presente diploma são a seguir designados por outros materiais.

6 - O método de diagnóstico, detecção e identificação do organismo prejudicial nos materiais vegetais será o referido no anexo I ao presente diploma e que dele faz parte integrante, devendo ser utilizado qualquer outro método adequado e aprovado pelos órgãos competentes para os outros materiais.

7 - A DGPC procederá anualmente ao envio dos resultados da execução do programa nacional de prospekção do organismo prejudicial à Comissão das Comunidades Europeias.

Artigo 3.º

Dever de informação em relação ao organismo prejudicial

Qualquer pessoa que saiba ou suspeite da presença do organismo prejudicial em qualquer dos materiais vegetais ou outros materiais definidos no presente diploma deve dar conhecimento do facto à DGPC.

Artigo 4.º

Procedimentos no caso de suspeita da presença do organismo prejudicial

1 - Qualquer pessoa que detenha, produza, importe ou comercialize materiais vegetais ou outros materiais suspeitos de estarem contaminados pelo organismo prejudicial é notificada desse facto pela DRA competente e não poderá utilizá-los para qualquer fim até que seja comprovado oficialmente, através dos testes laboratoriais referidos no n.º 6 do artigo 2.º, que aqueles materiais não apresentam risco de dispersão do organismo prejudicial em questão.

2 - Na pendência da confirmação da presença do organismo prejudicial, através dos testes laboratoriais referidos no n.º 6 do artigo 2.º, deve, desde logo, ser garantida a retenção e conservação adequada:

- a) Do lote ou parte do mesmo em que foi colhida a amostra com a embalagem e rótulo originais;
- b) Da parte restante das amostras;
- c) De qualquer extracto restante e outro material preparado para o(s) teste(s) de rastreio, por exemplo, lâminas de imunofluorescência;
- d) De toda a documentação.

Artigo 5.º

Procedimentos no caso de confirmação da presença do organismo prejudicial

1 - Sempre que a presença do organismo prejudicial seja confirmada através dos testes laboratoriais referidos no n.º 6 do artigo 2.º, deverá ser garantida a retenção e conservação adequada, durante pelo menos um mês após a obrigatória notificação à Comissão das Comunidades Europeias e aos restantes Estados membros a realizar pela DGPC, dos seguintes elementos:

- a) Do material especificado no n.º 2 do artigo anterior;
- b) De uma amostra do material contaminado da planta de tomate ou de beringela inoculada com o extracto do tubérculo ou da planta, se for caso disso;
- c) De uma cultura isolada do referido organismo prejudicial.

2 - A confirmação da presença do organismo prejudicial obriga à notificação das pessoas definidas no n.º 1 do artigo anterior que estejam implicadas, a efectuar pela DRA competente, na qual constará a informação adequada de acordo com o previsto no artigo 6.º

3 - A confirmação da presença do organismo prejudicial implica a realização de investigações oficiais para determinar a extensão e fonte primária da contaminação, nos termos do disposto no anexo II ao presente diploma e que dele faz parte integrante.

4 - Com base na possível extensão da contaminação será demarcada uma zona, a qual será objecto de divulgação oficial.

5 - Os elementos a ter em conta para a determinação da extensão provável da contaminação serão os constantes no anexo III ao presente diploma e que dele faz parte integrante.

Artigo 6.º

Medidas de protecção fitossanitária

1 - Os materiais vegetais e outras plantas solanáceas são declarados contaminados pela DRA competente sempre que confirmada a presença do organismo prejudicial nos termos do artigo anterior, não podendo ser plantados e ficando sujeitos a um dos procedimentos constantes do anexo IV ao presente diploma, que dele faz parte integrante, sob controlo e aprovação oficiais.

2 - As águas superficiais são declaradas contaminadas pela DRA competente sempre que confirmada a presença do organismo prejudicial, não podendo ser utilizadas para irrigação, aspersão ou inundação de locais de produção de materiais vegetais e outras plantas solanáceas.

3 - Os materiais vegetais e outras plantas solanáceas são considerados como provavelmente contaminados pela DRA competente quando tenham estado em contacto pré ou pós-colheita ou por relação de produção, irrigação ou relação clonal com a contaminação declarada, não podendo ser plantados e ficando sujeitos a um dos procedimentos constantes do anexo V ao presente diploma, que dele faz parte integrante, sob controlo e aprovação oficial.

4 - Todas as máquinas, veículos, recipientes, armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo material de embalagem, declarados contaminados ou considerados provavelmente contaminados nos termos dos números anteriores devem ser destruídos ou descontaminados segundo os métodos adequados a que se refere o artigo 7.º

5 - Nos casos previstos no n.º 1, são automaticamente declarados contaminados os locais de produção, aplicando-se as medidas previstas no anexo VI ao presente diploma e que dele faz parte integrante.

6 - As medidas a aplicar na eventual zona demarcada são as que se encontram igualmente dispostas no anexo VI ao presente diploma.

7 - Os equipamentos de eliminação de resíduos devem obedecer às disposições constantes do anexo VII ao presente diploma e que dele faz parte integrante.

Artigo 7.º

Métodos de descontaminação

Os métodos adequados para a descontaminação dos objectos referidos no n.º 4 do artigo anterior serão a lavagem e a desinfecção, quando necessário, de forma a garantir que não existe qualquer risco reconhecido de dispersão do organismo prejudicial, devendo a sua aplicação ter lugar sob supervisão dos serviços competentes da respectiva DRA.

Artigo 8.º

Proibição

É proibida a posse e manuseamento do organismo prejudicial.

Artigo 9.º

Excepções

A DGPC poderá autorizar excepções às medidas previstas nos artigos 6.º e 7.º nos termos do disposto no Decreto-Lei n.º 91/98, de 14 de Abril, para fins experimentais ou científicos e trabalhos de selecção de variedades.

Artigo 10.º

Infracções

1 - As infracções ao disposto nos artigos 4.º, n.º 1, e 8.º, o não cumprimento dos termos da notificação prevista no n.º 2 do artigo 5.º, o não cumprimento das medidas indicadas nos anexos ao presente diploma e o não cumprimento dos termos da autorização prevista no artigo 9.º constituem contra-ordenações puníveis com coima cujo montante mínimo é de 10000\$00 e máximo de 750000\$00 ou 9000000\$00, consoante se trate de pessoa singular ou colectiva.

2 - A tentativa e a negligência são puníveis.

3 - Podem ser aplicadas simultaneamente com as coimas as seguintes sanções acessórias:

- a) Interdição do exercício de profissões ou actividades cujo exercício dependa de título público ou de autorização ou homologação de autoridade pública;
- b) Privação do direito a subsídio ou benefício outorgado por entidades ou serviços públicos;
- c) Privação do direito de participar em feiras ou mercados.

4 - O produto das coimas reverte:

- a) Em 20% para a DGPC;
- b) Em 20% para a DRA;
- c) O restante para o Estado.

Artigo 11.º

Competência em matéria contra-ordenacional

A iniciativa e a instrução dos processos de contra-ordenação são da competência da DRA em cuja área de actuação foi praticada a contra-ordenação, cabendo ao director-geral de Protecção das Culturas a competência para aplicação das coimas e sanções acessórias.

Visto e aprovado em Conselho de Ministros de 1 de Outubro de 1999. - António Manuel de Oliveira Guterres - Joaquim Augusto Nunes de Pina Moura - Luís Medeiros Vieira.

Promulgado em 22 de Outubro de 1999.

Publique-se.

O Presidente da República, JORGE SAMPAIO.

Referendado em 26 de Outubro de 1999.

O Primeiro-Ministro, António Manuel de Oliveira Guterres.

ANEXO I

Esquema de ensaio para diagnóstico, detecção e identificação de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

Conteúdo do esquema de ensaio

O esquema de ensaio apresentado descreve os vários procedimentos envolvidos:

- i) No diagnóstico do mal murcho em tubérculos de batateira e em plantas de batateira e de tomateiro;
- ii) Na detecção de *Ralstonia solanacearum* em amostras de tubérculos de batateira;
- iii) Na identificação de *Ralstonia solanacearum*.

Nos apêndices ao presente anexo, são fornecidos pormenores para a preparação dos materiais a utilizar nas análises, isto é, meios de cultura, tampões, soluções e reagentes.

Quadro síntese do esquema de ensaio

(ver quadro no documento original)

SECÇÃO I

Aplicação do esquema de ensaio

1 - Diagnóstico do mal murcho em tubérculos de batateira e em plantas de batateira e de tomateiro. - Este procedimento destina-se a tubérculos de batateira e a plantas de batateira e de tomateiro com sintomas típicos ou suspeitos de mal murcho. Implica um teste rápido de rastreio, isolamento do agente patogénico a partir do tecido vascular infectado em meios de cultura adequados e, em caso de resultado positivo, identificação da cultura como *Ralstonia solanacearum*.

Apresentação do fluxograma

(ver esquema no documento original)

2 - Detecção e identificação de *Ralstonia solanacearum* em amostras de tubérculos de batateira. - Este procedimento destina-se à detecção de infecções latentes em tubérculos de batateira por um ou, de preferência, mais testes de rastreio que, se positivos, são complementados pelo isolamento do patógeno, seguido, no caso do isolamento de colónias típicas, da identificação de uma cultura pura como *Ralstonia solanacearum*.

Apresentação do fluxograma

(ver esquema no documento original)

SECÇÃO II

Diagnóstico do mal murcho em tubérculos de batateira e em plantas de batateira e de tomateiro

1 - Sintomas:

1.1 - Sintomas em batateira:

Planta da batateira. - Na fase inicial de infecção, verifica-se uma murchidão das folhas na parte superior da planta a temperaturas elevadas e durante o dia, com recuperação à noite. A murchidão torna-se rapidamente irreversível, resultando na morte da planta. O tecido vascular dos caules de plantas afectadas cortados transversalmente pode tornar-se castanho e uma exsudação leitosa escorre da superfície cortada ou pode ser facilmente extraída apertando o caule com os dedos. Quando um caule cortado é colocado verticalmente em água, há um corrimento viscoso a partir dos feixes vasculares.

Tubérculo de batateira. - Os tubérculos de batateira têm de ser cortados transversalmente junto do hilo (estolho). Na fase inicial da infecção há uma coloração amarelo-vítrea ou castanho-clara no anel vascular, pelo qual emerge espontaneamente, após alguns minutos ou quando é aplicada uma ligeira pressão com os polegares junto da superfície cortada, uma exsudação de cor creme-clara. Mais tarde, a coloração torna-se castanha mais evidente e a necrose pode alastrar ao parênquima. Nas fases mais avançadas, a infecção alastra a partir do hilo e dos olhos, podendo observar-se lesões na casca, de cor vermelho-acastanhada e em ligeira depressão, a partir das quais se pode manifestar exsudação bacteriana que origina a adesão de partículas de terra.

1.2 - Sintomas no tomateiro:

Planta do tomateiro. - Os primeiros sintomas visíveis são o aspecto flácido das folhas mais jovens. Em condições ambientais favoráveis ao agente patogénico (temperatura do solo de cerca de 25°C, humidade saturada), segue-se dentro de dias a epinastia e a murchidão de um lado ou da planta inteira, que resulta no colapso total da planta. Em condições menos favoráveis (temperatura do solo de cerca de 21°C), pode desenvolver-se no caule um grande número de raízes adventícias. Pode observar-se um cordão gorduroso ao longo do caule, que põe em evidência a necrose do sistema vascular. Quando o caule é cortado transversalmente, os tecidos vasculares do caule, com uma coloração acastanhada, exsudam gotas de líquido amarelo ou branco, que contêm bactérias.

2 - Testes rápidos de rastreio:

Os testes rápidos de rastreio facilitam o diagnóstico inicial. Utilizar um ou mais dos seguintes testes:

a) Teste de exsudação do caule:

A presença de *Ralstonia solanacearum* em caules de batateira com sintomas de murchidão pode ser avaliada através de um simples teste inicial: cortar o caule imediatamente acima do nível do solo. Colocar a superfície cortada num recipiente com água. Pouco tempo depois, haverá uma exsudação bacteriana espontânea a partir do anel vascular. Qualquer outra bactéria que provoque infecção vascular em plantas de batateira não exhibirá este fenómeno.

b) Detecção de grânulos de poli-(beta)-hidroxibutirato (PHB):

Os grânulos de PHB nas células de *Ralstonia solanacearum* são visualizados através da coloração com azul-de-nilo A ou com negro-de-sudão B.

Preparar um esfregaço a partir do exsudado ou com uma suspensão do tecido necrosado numa lâmina de microscópio, ou então preparar um esfregaço de uma cultura de quarenta e oito horas em YPGA ou SPA, tal como descrito no apêndice n.º 1. Preparar esfregaços de controlo positivo da estirpe Biovar 2/Raça 3 e, se necessário, um esfregaço de uma estirpe heteróloga como controlo negativo. Deixar secar. Passar rapidamente a parte de baixo da lâmina à chama várias vezes até que o esfregaço esteja fixado.

c) Teste do azul-de-nilo:

- 1) Corar o esfregaço fixado na lâmina com uma solução aquosa a 1% de azul-de-nilo A. Incubar durante dez minutos a uma temperatura de 55°C;
- 2) Escorrer a solução corante. Lavar brevemente e com cuidado em água corrente. Retirar o excesso de água com papel de filtro;
- 3) Lavar o esfregaço com uma solução aquosa a 8% de ácido acético. Incubar durante um minuto à temperatura ambiente;
- 4) Lavar com cuidado em água da torneira corrente. Secar com papel de filtro;
- 5) Voltar a humedecer com uma gota de água. Cobrir com uma lamela;
- 6) Examinar o esfregaço corado em microscópio de epifluorescência a 450 nm com lente de imersão em óleo e uma ampliação de 1000 vezes.

Os grânulos de PHB apresentam uma fluorescência laranja-viva. Observar também com luz normal para verificar se os grânulos são intracelulares e se a morfologia das células é típica de *Ralstonia solanacearum*.

d) Teste do negro-de-sudão:

- 1) Corar o esfregaço fixado na lâmina com uma solução a 0,3% de negro-de-sudão B em etanol a 70%. Incubar durante dez minutos à temperatura ambiente;
- 2) Escorrer a solução corante. Lavar brevemente e com cuidado em água da torneira corrente. Retirar o excesso de água com papel de filtro;
- 3) Mergulhar o esfregaço brevemente em xilol. Secar com papel de filtro;
- 4) Lavar o esfregaço com uma solução aquosa a 0,5% (p/v) de safranina e deixar durante dez segundos à temperatura ambiente;

Nota. - Cuidado! O xilol é um produto nocivo. Trabalhar em «hotte».

- 5) Lavar com cuidado em água corrente. Secar com papel de filtro. Cobrir com uma lamela;
- 6) Examinar o esfregaço corado em microscópio com luz transmitida com lente de imersão em óleo e uma ampliação de 1000 vezes. Os grânulos de PHB em células de *Ralstonia solanacearum* apresentam uma coloração azul-negra. As paredes celulares apresentam uma coloração rosa.

e) Outros testes:

Outros testes de rastreio considerados apropriados são o teste IF, descrito no n.º 2 da secção III do presente anexo, o teste ELISA, como indicado no n.º 3 da secção III do presente anexo, e o teste PCR, descrito no n.º 4 da secção III do presente anexo.

3 - Isolamento:

3.1 - Retirar o exsudado ou secções do tecido necrosado do anel vascular do tubérculo ou da zona vascular do caule da planta de batateira ou de tomateiro. Preparar uma suspensão num pequeno volume de água destilada esterilizada ou de tampão fosfato 50 mM. Deixar em repouso durante cinco a dez minutos.

3.2 - Preparar uma série de diluições decimais de suspensão, por exemplo 1/10 e 1/100, ou mais, se consideradas necessárias.

3.3 - Transferir um volume padrão da suspensão para um meio nutritivo geral NA, YPGA e SPA, referido no apêndice n.º 1 deste anexo, e ou para o meio de tetrazólio de Kelman

(apêndice n.º 1) e ou para o meio selectivo SMSA, descrito no apêndice n.º 7 deste anexo. Espalhar ou riscar com uma técnica adequada de diluição em placas. Se se considerar necessário, preparar um conjunto separado de placas com cada um dos meios de cultura utilizados e com uma suspensão diluída de células de uma estirpe virulenta de Biovar 2/Raça 3 de *Ralstonia solanacearum* como controlo positivo.

3.4 - Incubar as placas durante três dias a uma temperatura de 28°C. A incubação pode ser prolongada até seis dias se o crescimento for lento, mas, frequentemente, as colónias em placas com SMSA tornam-se atípicas e as células bacterianas morrem.

Em meios nutritivos gerais, os isolamentos virulentos de *Ralstonia solanacearum* produzem colónias de cor pérola, achatadas, irregulares e fluidas, exibindo muitas vezes espirais características.

Em meio de tetrazólio de Kelman, as colónias típicas de isolamentos virulentos de *Ralstonia solanacearum* são cremes, achatadas, irregulares e fluidas, com espirais de cor vermelho-viva no centro. Formas avirulentas de *Ralstonia solanacearum* desenvolvem colónias butirosas vermelho-escuras.

Em meio SMSA, os isolamentos virulentos de *Ralstonia solanacearum* produzem colónias branco-leitosas, achatadas, irregulares e fluidas, com centros vermelho-vivos bem distintos.

As formas avirulentas de *Ralstonia solanacearum* desenvolvem no meio SMSA colónias menos fluidas, completamente rosas a vermelhas.

3.5 - Purificar as colónias com morfologia característica através de subcultura num meio nutritivo. Evitar a repicagem regular de subculturas, que pode induzir uma perda de virulência.

4 - Teste(s) de confirmação:

4.1 - Identificação de *Ralstonia solanacearum*:

Identificar as culturas puras de *Ralstonia solanacearum* através de, pelo menos, um dos seguintes procedimentos:

a) Testes nutricionais e enzimáticos:

Nota. - Incluir estirpes apropriadas de controlo para cada teste utilizado.

As seguintes características fenotípicas de *Ralstonia solanacearum* estão universalmente presentes ou ausentes:

(ver quadro no documento original)

Os meios de cultura e métodos de ensaio estão descritos em Lelliott & Stead, 1987.

b) Teste IF:

Preparar uma suspensão de 10(elevado a 6) células por mililitro a partir da cultura e de uma estirpe de controlo. Preparar um série de diluições de anti-soro, com duas ordens de diluição. Aplicar o procedimento IF descrito no n.º 2 da secção III do presente anexo. O título de IF da cultura tem de ser equivalente ao do controlo positivo.

c) Teste ELISA:

Preparar uma suspensão com uma concentração superior a 10(elevado a 6) células por mililitro a partir da cultura e de uma estirpe de controlo. Aplicar o procedimento ELISA (secção III, n.º 3). O valor ELISA da cultura tem de ser equivalente ao do controlo positivo.

d) Teste PCR:

Preparar uma suspensão de 10(elevado a 6) células por mililitro a partir da cultura e de uma estirpe de controlo positivo. Aplicar o procedimento da PCR descrito no n.º 4 da secção III do presente anexo. O produto da PCR da cultura tem de ter a mesma dimensão e perfil de restrição (REA) do controlo positivo.

e) Hibridização fluorescente in situ (FISH):

Preparar uma suspensão de 10(elevado a 6) células por mililitro da cultura e de uma estirpe de controlo. Aplicar o procedimento FISH (Van Beuningen et al., 1995) com o «primer» OLI-1 (Seal et al., 1993). A cultura tem de manifestar a mesma reacção que o controlo positivo.

f) Perfil proteico:

As proteínas desnaturadas de células inteiras são separadas através de electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (Stead, 1992a).

g) Perfil de ácidos gordos (FAP):

Incubar a cultura e uma estirpe de controlo positivo durante quarenta e oito horas a uma temperatura de 28°C em agar de soja tripticase e aplicar o procedimento FAP (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead, 1992b). O perfil da cultura tem de ser idêntico ao do controlo positivo. Nas condições especificadas, os ácidos gordos característicos são 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH e 18:1 2OH.

4.2 - Caracterização da estirpe:

A caracterização da estirpe é opcional mas recomendada para cada novo caso, utilizando, pelo menos, um dos testes seguintes:

a) Determinação da biovar:

A *Ralstonia solanacearum* é dividida em biovars com base na capacidade de produzir ácido a partir de três álcoois de hexose e três açúcares (Hayward, 1964 & 1994):

(ver quadro no documento original)

Testes suplementares diferenciam a biovar 2 em subfenótipos (Hayward, 1994):

(ver quadro no documento original)

b) Determinação da raça:

A raça (Buddenhagen et al., 1962) é determinada com base no teste de patogenicidade em plantas de tomateiro ou beringela e em plantas de tabaco, bem como através de um teste de avaliação da reacção de hipersensibilidade (HR) em folhas de tabaco (Lozano & Sequeira, 1970):

(ver quadro no documento original)

A caracterização da raça através de testes de patogenicidade ou hipersensibilidade em folhas de tabaco pode não ser muito fiável, pelo que poderá ser deduzida a partir da biovar e do hospedeiro natural de origem.

A cultura pode ser ainda caracterizada através de impressão genómica.

A diferenciação molecular das estirpes do complexo *Ralstonia solanacearum* pode ser feita através de:

Análise do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) (Cook et al., 1989);

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

4.3 - Teste de patogenicidade:

A finalidade deste teste é a confirmação da virulência das culturas identificadas como *Ralstonia solanacearum*.

Preparar inóculos de 10 (elevado a 6) células por mililitro a partir da cultura e de uma estirpe de controlo positivo. Inocular 5-10 plantas de tomateiro ou beringela de preferência no estágio de terceira folha verdadeira ou mais velha como descrito no n.º 6 da secção III deste anexo. Incubar até duas semanas a uma temperatura de 22°C-28°C e elevada humidade relativa, regando diariamente. Observar sintomas de murchidão ou epinastia, clorose, nanismo.

Proceder ao isolamento a partir de plantas com sintomas:

Remover uma secção de tecido do caule 2 cm acima do ponto de inoculação;

Fragmentá-la e suspendê-la num pequeno volume de água destilada esterilizada ou tampão de fosfato 50 mM e semear em placas, incubar e observar a presença de colónias típicas de *Ralstonia solanacearum*.

SECÇÃO III

Detecção e identificação de *Ralstonia solanacearum* em amostras de tubérculos de batateira

Nota. - A dimensão normal da amostra é de 200 tubérculos; contudo, este procedimento pode ser aplicado a amostras com menos de 200 tubérculos.

1 - Preparação da amostra para o teste:

Nota. - Os sedimentos de extracto de batata obtidos através deste protocolo também podem ser utilizados para a detecção de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Opções anteriores à realização do teste, se consideradas úteis:

- i) Incubar a amostra a uma temperatura de 25°C-30°C durante um período de até duas semanas, para favorecer a multiplicação das baixas populações de *Ralstonia solanacearum*;
- ii) Lavar os tubérculos em água corrente com desinfectantes e detergentes adequados e secá-los ao ar.

1.1 - Retirar a pele na zona do hilo do tubérculo com um bisturi ou faca de cortar legumes, limpos e desinfetados, de forma que os tecidos vasculares fiquem visíveis. Retirar cuidadosamente um núcleo cónico (3 mm-5 mm de diâmetro) de tecido vascular na zona do hilo de cada tubérculo. Limitar ao máximo a quantidade de tecido não vascular. Processar cada um dos tubérculos que constituem a amostra.

Nota. - O exame visual dos tubérculos (secção II, n.º 1) pode ser feito nesta fase. Pôr de lado qualquer tubérculo que exiba sintomas ou severas podridões e testá-los separadamente (secção II).

1.2 - Recolher os hilos num recipiente fechado. Os hilos devem ser, de preferência, processados de imediato. Se tal não for possível, guardá-los durante vinte e quatro horas ou nunca mais de setenta e duas horas, a uma temperatura de 4°C.

1.3 - Processar os hilos de acordo com um dos seguintes procedimentos:

- i) Transferir os hilos para um recipiente adequado.

Adicionar um volume adequado de tampão de maceração como indicado no apêndice n.º 2 deste anexo, de forma a cobrir o material.

Fragmentar o material num misturador Waring Blender ou Ultra Thurrax até à homogeneização completa. Evitar uma homogeneização exagerada.

Deixar o macerado repousar durante quinze a trinta minutos;

- ii) Transferir os hilos para um recipiente adequado.

Adicionar um volume adequado de tampão de maceração de forma a cobrir o material.

Colocar o recipiente num agitador rotativo.

Incubar a uma velocidade de 50 r.p.m. a 100 r.p.m. durante quatro horas a uma temperatura de 20°C-22°C ou durante dezasseis a vinte e quatro horas a uma temperatura de 4°C;

- iii) Transferir os hilos para um saco de maceração descartável forte (por exemplo, um saco Stomacher com 105 mm x 50 mm, esterilizado por radiação).

Esmagar cuidadosamente os hilos com uma ferramenta adequada, por exemplo, um martelo, até à homogeneização completa.

Adicionar um volume suficiente de tampão de maceração, de forma a cobrir o material.

Deixar o macerado sedimentar durante quinze a trinta minutos.

1.4 - Extrair as bactérias dos hilos processados através de um dos seguintes procedimentos:

- i) Decantar o líquido de maceração com cuidado para um tubo de centrifugação, deixando os resíduos no recipiente ou saco. Se o macerado estiver turvo após decantação, centrifugar a não mais de 180 g durante dez minutos, a uma temperatura inferior a 10°C.

Centrifugar o líquido de maceração decantado, ou o sobrenadante resultante da primeira etapa de centrifugação, a 7000 g durante quinze minutos ou a 10000 g durante dez minutos a uma temperatura inferior a 10°C.

Desprezar o sobrenadante sem perturbar o sedimento;

- ii) Filtrar o líquido de maceração através de um sistema de filtração com dimensão de poro de 40 (µm)-100 (µm). Intensificar a filtração utilizando uma bomba de vácuo.

Recolher o filtrado num tubo de centrifugação.

Lavar o filtro com tampão de maceração.

Centrifugar o filtrado a 7000 g durante quinze minutos ou a 10000 g durante dez minutos, a uma temperatura inferior a 10°C.

Desprezar o sobrenadante sem perturbar o sedimento.

1.5 - Ressuspender o sedimento em 1 ml de tampão de ressuspensão, tal como indicado no apêndice n.º 2 deste anexo.

Dividir em duas partes iguais e transferir cada parte para um microtubo.

Utilizar um microtubo para os testes. Durante o ensaio, conservar o extracto restante a uma temperatura de 4°C.

Adicionar 10%-25% (v/v) de glicerol esterilizado ao outro microtubo. Agitar em vortex. Armazenar a uma temperatura de -18°C (semanas) ou de -70°C (meses).

2 - Teste IF:

Utilizar anti-soro para *Ralstonia solanacearum*, de preferência para a biovar 2/raça 3. Determinar o título com uma suspensão de 10(elevado a 6) células por mililitro da estirpe homóloga de *Ralstonia solanacearum*, com uma diluição adequada do conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC), de acordo com as recomendações do fabricante. O anti-soro não purificado deverá ter um título de IF de, pelo menos, 1:2000.

Utilizar lâminas de microscópio com vários poços, de preferência 10, com, pelo menos, 6 mm de diâmetro.

Incluir um controlo de conjugado FITC em cada lâmina. O teste deverá ser repetido, com um controlo de PBS incluído, no caso de ser observado qualquer resultado positivo no controlo de FITC.

Preparar lâminas de controlo positivo em separado, com uma suspensão de 10(elevado a 6) células por mililitro de uma estirpe de *Ralstonia solanacearum* de biovar/raça apropriadas. Incluir uma lâmina em cada conjunto de testes.

2.1 - Preparar as lâminas através de um dos seguintes processos:

i) Para sedimentos com relativamente pouco amido - pipetar um volume padrão de sedimento ressuspensão para cada um dos poços de uma fila (15 (mi)l é adequado para um poço com 6 mm de diâmetro - aumentar o volume à escala para poços maiores). A fila de poços restante pode ser utilizada como um duplicado ou para outra amostra, como indicado na figura n.º 1;

ii) Para outros sedimentos - preparar diluições decimais, isto é, 1/10, 1/100 e 1/1000, do sedimento ressuspensão em tampão de ressuspensão. Pipetar um volume padrão (15 (mi)l é adequado para poços com 6 mm de diâmetro - aumentar o volume à escala para poços maiores) do sedimento ressuspensão e de cada uma das diluições numa fila de poços. A fila de poços restante pode ser utilizada como um duplicado ou para uma segunda amostra, como indicado na figura n.º 2.

2.2 - Deixar secar as gotículas. Fixar as células bacterianas na lâmina através de aquecimento, à chama ou com etanol a 95%.

2.3 - Procedimento para IF:

i) De acordo com a preparação da lâmina descrita na alínea i) do n.º 2.1 - preparar um conjunto de diluições do anti-soro em tampão IF, como indicado no apêndice n.º 3 deste anexo: um quarto do título (T/4), metade do título (T/2), o título (T) e duas vezes o título (2T);

ii) De acordo com a preparação da lâmina descrita na alínea ii) do n.º 2.1 - preparar a diluição de trabalho (DT) do anti-soro em tampão IF. A diluição de trabalho é a diluição do anti-soro com especificidade óptima e é normalmente igual a metade do título.

Figura n.º 1

Preparação da lâmina de acordo com os n.os 2.1, alínea i), e 2.3, alínea i)

Uma diluição padrão do sedimento ressuspensão

(T = título)

(ver figura no documento original)

Figura n.º 2

Preparação da lâmina de acordo com os n.ºs 2.1, alínea ii), e 2.3, alínea ii)

FITC - Diluição padrão do anti-soro

(ver figura no documento original)

2.3.1 - Dispor as lâminas sobre papel de filtro humedecido.

Cobrir os poços da amostra com a(s) diluição(ões) de anti-soro. Juntar PBS aos poços de FITC. O volume de anti-soro adicionado aos poços deve ser equivalente ao volume de extracto utilizado.

2.3.2 - Incubar na obscuridade durante trinta minutos à temperatura ambiente.

2.3.3 - Eliminar as gotículas de anti-soro da lâmina e enxaguar as lâminas cuidadosamente com tampão IF.

Lavar durante cinco minutos em tampão IF-Tween e subsequentemente durante cinco minutos em tampão IF, como indicado no apêndice n.º 3 deste anexo.

Retirar cuidadosamente o excesso de humidade.

2.3.4 - Dispor as lâminas sobre papel de filtro humedecido.

Cobrir os poços da amostra e o poço FITC com a diluição do conjugado FITC utilizada para determinar o título. O volume de conjugado FITC adicionado aos poços deve ser idêntico ao volume de anti-soro utilizado.

2.3.5 - Incubar na obscuridade durante trinta minutos à temperatura ambiente.

2.3.6 - Eliminar as gotículas de conjugado FITC. Enxaguar e lavar como anteriormente (n.º 2.3.3).

Retirar cuidadosamente o excesso de humidade.

2.3.7 - Pipetar 5 (mi)l-10 (mi)l de uma solução 0,1 M de tampão fosfato com glicerol, como referido no apêndice n.º 3 deste anexo, ou líquido de montagem similar para cada poço e cobrir com uma lamela.

2.4 - Leitura do teste IF:

Examinar as lâminas do teste num microscópio de epifluorescência, com filtros adequados para a excitação do FITC, sob lente de imersão em óleo, a uma ampliação de 500-1000 vezes. Examinar os poços ao longo de dois diâmetros perpendiculares e à volta do perímetro.

Observar primeiro a lâmina do controlo positivo. As células devem apresentar-se com uma fluorescência brilhante e completamente coradas.

Nota. - O teste deve ser repetido se a coloração for aberrante.

Ler as lâminas do teste. Observar primeiro a ausência de células fluorescentes nos poços de controlo FITC. Células fluorescentes no controlo de FITC indicam ligação não específica do conjugado, autofluorescência ou contaminação.

Nota. - Repetir o teste se tal for observado.

Observar células fluorescentes brilhantes e com a morfologia característica de *Ralstonia solanacearum* nos poços das lâminas. A intensidade de fluorescência deve ser equivalente à da estirpe do controlo positivo, para a mesma diluição do anti-soro. As células com coloração incompleta ou com fluorescência fraca não devem ser consideradas, a não ser que sejam muito abundantes (ver interpretação dos resultados do teste IF). Interpretação dos resultados do teste IF:

i) Se não forem detectadas células fluorescentes brilhantes e com a morfologia característica, o teste IF é negativo;

ii) Se forem detectadas células fluorescentes brilhantes e com a morfologia característica, determinar o número médio de células por cada campo do microscópio e calcular o número de células por mililitro (N) de sedimento ressuspensão, como referido no apêndice n.º 4 deste anexo;

Uma população de aproximadamente 10(elevado a 3) células por mililitro de sedimento ressuspensão é considerada como sendo o limite de detecção para o teste IF:

Para as amostras com $N > 10$ (elevado a 3) células por mililitro, o teste IF é considerado positivo;

Para as amostras com $N < 10$ (elevado a 3) células por mililitro, o teste IF pode ser considerado positivo;

iii) Se os números mais elevados ($N > 10$ (elevado a 5) células por mililitro) de células, desigual ou incompletamente coradas ou fracamente fluorescentes forem observadas com o anti-soro no seu título, um segundo teste deve ser realizado:

Ou um teste baseado num princípio biológico distinto;

Ou uma repetição do teste IF, utilizando um segundo anti-soro ou uma diluição decimal do sedimento.

3 - Teste ELISA (baseado em Robinson-Smith et al., 1995):

Utilizar anti-soro para a *Ralstonia solanacearum*, de preferência para a biovar 2/raça 3. Determinar o título com uma suspensão de 10 (elevado a 6) células por mililitro de uma estirpe homóloga de *Ralstonia solanacearum*.

Recomenda-se a utilização de microplacas NUNC Polysorp.

Incluir um controlo negativo constituído pelo extracto de batata e um controlo de tampão fosfato salino (PBS).

Utilizar uma suspensão de >10 (elevado a 6) células por mililitro de uma estirpe de *Ralstonia solanacearum* de biovar/raça apropriadas como controlo positivo. Testar de forma idêntica à da(s) amostra(s), mas dela(s) bem separada na microplaca.

3.1 - Pipetar 100 (mi)l-200 (mi)l do sedimento ressuspensão para um microtubo.

Aquecer durante quatro minutos a uma temperatura de 100°C. Retirar o microtubo e colocá-lo em gelo.

3.2 - Adicionar um volume igual de tampão carbonato de revestimento 2 x concentrado, como referido no apêndice n.º 5 deste anexo. Homogeneizar em vortex.

3.3 - Colocar alíquotas de 100 (mi)l em pelo menos dois dos poços da microplaca. Incubar durante uma hora a uma temperatura de 37°C ou de um dia para o outro a uma temperatura de 4°C.

3.4 - Retirar os extractos dos poços. Lavar os poços três vezes com PBS-Tween, como referido no apêndice n.º 5 deste anexo, deixando a última solução de lavagem dentro dos poços durante, pelo menos, cinco minutos.

3.5 - Preparar uma diluição adequada de anti-soro de *Ralstonia solanacearum* em tampão de bloqueio, como referido no apêndice n.º 5 deste anexo.

Adicionar 100 (mi)l da diluição de anti-soro aos poços.

Incubar durante uma hora a uma temperatura de 37°C.

3.6 - Retirar o anti-soro dos poços e lavá-los como anteriormente referido no n.º 3.4.

3.7 - Preparar uma diluição adequada de conjugado de fosfatase alcalina em tampão de bloqueio.

Adicionar 100 (mi)l da diluição do conjugado aos poços.

Incubar durante uma hora a uma temperatura de 37°C.

3.8 - Retirar o conjugado dos poços e lavá-los como anteriormente referido nos n.os 3.4 e 3.6.

3.9 - Preparar a solução do substrato de fosfatase alcalina, como referido no apêndice n.º 5 deste anexo.

Adicionar 100 (mi)l aos poços. Incubar entre trinta minutos e uma hora, na obscuridade, à temperatura ambiente.

3.10 - Ler a absorvância a 409 nm.

Interpretação do teste ELISA:

O teste ELISA é negativo se a densidade óptica (DO) da amostra for $< 2 \times$ DO do controlo negativo;

O teste ELISA é positivo se a densidade óptica (DO) da amostra for $> 2 \times$ DO do controlo negativo.

4 - Teste PCR (baseado em Seal et al., 1993).

Nota. - Têm de se utilizar pontas de pipeta com filtro durante todas as etapas de preparação das amostras e durante outras manipulações que envolvam a PCR.

Preparar uma suspensão de 10 (elevado a 6) células por mililitro de uma estirpe de biovar 2/raça 3 de *Ralstonia solanacearum* como controlo positivo e testar de forma idêntica à da(s) amostra(s).

4.1 - Pipetar 100 (mi)l do sedimento ressuspensão para um microtubo.

Em alternativa, transferir 90 (mi)l do sedimento ressuspensão para um microtubo contendo 10 (mi)l de hidróxido de sódio 0,5 M. Misturar invertendo repetidamente o microtubo.

4.2 - Aquecer durante quatro minutos a uma temperatura de 100°C. Retirar de imediato o microtubo e colocá-lo em gelo.

4.3 - Preparar pelo menos duas diluições decimais, por exemplo, 1/10 e 1/100 ou mais, se consideradas necessárias, em água destilada esterilizada ou ultrapura (UPW).

4.4 - Preparar a mistura de reacção de PCR, como referido no apêndice n.º 6 deste anexo, num tubo esterilizado adicionando os componentes pela ordem que se segue:

a) Para um volume de reacção de 50 (mi)l:

(ver quadro no documento original)

b) Para mais reacções:

Calcular a quantidade de cada componente para o número de reacções necessário;

Misturar os componentes e transferir 45(mi)l-48(mi)l da mistura para tubos de PCR esterilizados;

Manter os tubos com a mistura da PCR em gelo;

c) Para volumes de reacção de 25(mi)l - reduzir proporcionalmente a quantidade dos componentes.

4.5 - Amplificação pela PCR:

4.5.1 - Facultativo: centrifugar de forma intermitente os tubos com a amostra fervida e o controlo positivo.

Adicionar, pela ordem especificada, 2(mi)l-5(mi)l da(s) amostra(s), controlo de água e controlo positivo aos tubos contendo a mistura de reacção PCR. Colocar os tubos no bloco de aquecimento do termociclador de DNA.

4.5.2 - Correr o seguinte programa:

a) Um ciclo de:

i) Dois minutos a uma temperatura de 96°C: desnaturação da amostra original;

Cinquenta ciclos de:

ii) Vinte segundos a uma temperatura de 94°C: desnaturação;

iii) Vinte segundos a uma temperatura de 68°C: emparelhamento dos «primers»;

iv) Trinta segundos a uma temperatura de 72°C: extensão da cópia;

b) Um ciclo de:

v) Dez minutos a uma temperatura de 72°C: continuação da extensão;

c) Um ciclo de:

vi) Manter a uma temperatura de 4°C.

Nota. - Estes são os parâmetros para o aparelho Perkin Elmer 9600. Outros termocicladores poderão necessitar de uma camada de óleo mineral nos tubos de reacção da PCR e ou modificação da duração das etapas ii), iii) e iv) do programa de amplificação.

4.5.3 - Retirar os tubos do termociclador. Analisar o produto da PCR. Se não for analisado de imediato, armazenar os tubos a uma temperatura de 4°C para utilização no próprio dia ou a uma temperatura de -18°C durante mais tempo.

4.6 - Análise do produto da PCR:

Os fragmentos da PCR são detectados através de electroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídio.

4.6.1 - Preparar um gel de agarose adequado, fervendo a agarose cuidadosamente em tampão tris acetato de electroforese (TAE).

4.6.2 - Arrefecer a agarose fundida a uma temperatura de 50°C-60°C. Deitar no molde da unidade de electroforese e inserir o pente. Deixar a solução solidificar.

4.6.3 - Retirar o pente. Submergir o gel em TAE de forma que fique ligeiramente coberto (2 mm-3 mm) pelo tampão.

4.6.4 - Colocar gotículas de 3(mi)l de tampão de carregamento em parafilme. Adicionar 12(mi)l do produto da PCR de qualquer das amostras, do controlo positivo e do controlo de água e misturar através de aspiração ligeira na ponta da pipeta antes de carregar. Os volumes indicados podem ser modificados de acordo com a capacidade dos poços do gel de agarose.

4.6.5 - Encher cuidadosamente os poços de gel. Como referência, incluir pelo menos num dos poços um marcador de DNA adequado.

4.6.6 - Ligar os cabos à fonte de alimentação e à tina de electroforese. Submeter o gel a uma carga de 5 V/cm-8 V/cm até que a frente de corrida esteja a 1 cm da extremidade do gel.

4.6.7 - Desligar a fonte de alimentação. Desligar os cabos da tina de electroforese. Retirar cuidadosamente o gel. Mergulhá-lo numa solução de brometo de etídio durante trinta a quarenta e cinco minutos.

Nota. - Utilizar luvas descartáveis sempre que manusear o brometo de etídio, pois é um potente agente mutagénico!

4.6.8 - Retirar o corante em excesso em água destilada durante dez a quinze minutos.

4.6.9 - Visualizar o(s) fragmento(s) de DNA num transiluminador com UV. O produto PCR de *Ralstonia solanacearum* com o conjunto de «primers» OLI-1 e Y-2 tem 288 bp de comprimento. Comparar com o marcador de DNA e o controlo positivo.

Nota. - O controlo da água tem de ser sempre negativo. Se for positivo, repetir o teste.

4.6.10 - Se for necessário um registo permanente, tirar uma fotografia ao gel.

4.6.11 - Confirmar a autenticidade do fragmento amplificado através de análise de restrição enzimática (REA - restriction enzyme analysis).

4.7 - Análise de restrição enzimática (REA):

4.7.1 - Transferir 8,5(mi)l do produto da PCR, como referido no n.º 4.5.3, para um microtubo novo. Adicionar 1(mi)l de tampão da enzima 10 x concentrado e 0,5(mi)l da enzima de restrição Ava II.

4.7.2 - Misturar através de ligeira aspiração na ponta da pipeta. Se permanecerem gotículas nas paredes do tubo, centrifugar de forma intermitente na microcentrifugadora. Incubar durante uma hora a uma temperatura de 37°C.

4.7.3 - Analisar o fragmento da PCR digerido através de electroforese em gel de agarose, como anteriormente, tal como referido no n.º 4.6.

Interpretação do resultado do teste PCR:

O teste PCR é negativo se o fragmento característico de 288 bp não for detectado e se o fragmento for detectado para a estirpe do controlo positivo de *Ralstonia solanacearum*;

O teste PCR é positivo se o fragmento característico de 288 bp for detectado e se a análise REA do fragmento amplificado for idêntica à da estirpe do controlo positivo de *Ralstonia solanacearum*.

5 - Teste de sementeira em placas com meio selectivo (baseado em Elphinstone et al., 1996):

5.1 - Efectuar o teste através de uma técnica de diluição em placas adequada, por exemplo:

i) Preparar, pelo menos, duas diluições decimais, ou seja, 1/10 e 1/100 ou mais, se consideradas necessárias, de sedimento ressuspense em tampão de ressuspensão. Pipetar um volume padrão (50(mi)l-100(mi)l) do sedimento ressuspense e de cada diluição para meio

selectivo SMSA modificado (apêndice n.º 7) e espalhar com uma vareta de vidro sobre toda a superfície do meio.

Se for considerado útil, fazer uma diluição através de riscado com uma ansada de 10(mi)l de sedimento ressuspense, passando a ansa pela chama entre cada uma das inoculações;

ii) Transferir um volume padrão (50(mi)l-100(mi)l) do sedimento ressuspense para o meio selectivo SMSA modificado e espalhar com uma vareta de vidro sobre toda a superfície do meio. Repetir o procedimento, sem passar a vareta pela chama, em mais duas placas de SMSA modificado.

5.2 - Inocular, através da mesma técnica de diluição em placas, uma suspensão de 10(elevado a 6) células por mililitro obtida a partir de uma estirpe de *Ralstonia solanacearum* biovar 2/raça 3, como controlo positivo, num conjunto de placas de SMSA modificado.

5.3 - Incubar as placas a uma temperatura de 28°C. Começar a ler as placas após três dias de incubação. Se negativo, incubar mais tempo, até seis dias. As colónias de isolamentos virulentos de *Ralstonia solanacearum* apresentam-se brancas, de aspecto leitoso, achatadas, irregulares e fluidas, com centros vermelho-vivos e apresentando estrias ou espirais internas.

5.4 - Purificar as colónias com morfologia típica através de subcultura em meio nutritivo geral, tal como referido no apêndice n.º 1 deste anexo.

5.5 - Identificar as culturas puras, tal como referido no n.º 4.1 da secção II do presente anexo, e confirmar as culturas de *Ralstonia solanacearum* através de um teste de patogenicidade, como indicado no n.º 4.3 da secção II do presente anexo.

Interpretação do resultado da sementeira em placas com meio selectivo:

O teste de sementeira em placas com meio selectivo é negativo se não for isolada nenhuma colónia ao fim de seis dias ou não forem isoladas colónias características de *Ralstonia solanacearum*, desde que não se suspeite de inibição por colónias de outras bactérias e que colónias características de *Ralstonia solanacearum* sejam detectadas nos controlos positivos;

O teste de sementeira em placas com meio selectivo é positivo se forem isoladas colónias características de *Ralstonia solanacearum*.

6 - Bio-ensaio (baseado em Janse, 1988):

6.1 - Para cada amostra, utilizar 10 plântulas susceptíveis de tomateiro ou beringela no estágio de terceira folha verdadeira. Não regar as plântulas nas vinte e quatro horas anteriores à inoculação.

6.2 - Distribuir 100(mi)l do sedimento ressuspense entre as plântulas. Inocular o caule, entre os cotilédones e em um ou mais locais.

6.3 - Inocular, através da mesma técnica, 10 plântulas com uma suspensão de 10(elevado a 6) células por mililitro de uma estirpe de biovar 2/raça 3 de *Ralstonia solanacearum*, como controlo positivo, e com tampão de sedimentação, como controlo negativo. Separar as plântulas que constituem o controlo positivo das outras plântulas a fim de evitar contaminações cruzadas.

6.4 - Deixar crescer as plântulas durante quatro semanas a uma temperatura de 22°C-28°C e elevada humidade relativa, com rega diária. Observar o desenvolvimento de sintomas de murchidão, epinastia, clorose e ou nanismo.

6.5 - Fazer isolamentos a partir das plântulas infectadas, como referido na secção II do presente anexo. Identificar culturas puras com morfologia característica, tal como referido no n.º 4.1 da secção II do presente anexo, e confirmar as culturas de *Ralstonia solanacearum* através de um teste de patogenicidade de acordo com o disposto no n.º 4.3 da secção II do presente anexo.

6.6 - Se se considerar necessário, verificar a ausência de infecção nos lotes de plântulas ensaiadas que não demonstram sinais de infecção. Retirar de cada plântula uma secção de 1 cm de caule, 2 cm acima do ponto de inoculação. Homogeneizar os tecidos em tampão de maceração. Proceder à diluição em placas, conforme indicado no n.º 5.1 da secção III do

presente anexo. Se o resultado for positivo, identificar culturas puras com morfologia característica, conforme descrito no n.º 4.1 da secção II do presente anexo, e confirmar as culturas de *Ralstonia solanacearum* através de um teste de patogenicidade, conforme indicado no n.º 4.3 da secção II do presente anexo.

Interpretação do resultado do bio-ensaio:

O bio-ensaio é negativo se as plântulas ensaiadas não estiverem infectadas por *Ralstonia solanacearum* e se *Ralstonia solanacearum* for detectada no controlo positivo;

O bio-ensaio é positivo se as plântulas ensaiadas estiverem infectadas por *Ralstonia solanacearum*.

7 - Teste de enriquecimento (baseado em Elphinstone et al., 1996):

7.1 - Transferir 100(mi)l do sedimento ressuspenso para 3 ml de meio líquido SMSA modificado, como referido no apêndice n.º 7 deste anexo.

7.2 - Incubar durante quarenta e oito horas, e nunca mais de setenta e duas horas, a uma temperatura de 28°C, com a tampa do tubo apertada frouxamente para permitir o arejamento.

7.3 - Apertar a tampa e agitar em vortex. Separar em alíquotas para o teste IF, tal como referido no n.º 2 da presente secção, teste ELISA, tal como referido no n.º 3 da presente secção, e ou teste PCR, tal como referido no n.º 4 da presente secção.

8 - Teste de patogenicidade (v. secção II, n.º 4.3).

APÊNDICE N.º 1

Meios nutritivos para isolamento e cultura de *Ralstonia solanacearum*

Ágar nutritivo (NA)

(ver quadro no documento original)

Preparar volumes de 0,5 l de meio em frascos de 1 l.

Dissolver os ingredientes.

Esterilizar em autoclave a 121°C durante quinze minutos.

Arrefecer a 50°C. Preparar placas.

Ágar de levedura-peptona-glucose (YPGA)

(ver quadro no documento original)

Preparar volumes de 0,5 l de meio em frascos de 1 l.

Dissolver os ingredientes.

Esterilizar em autoclave a 121°C durante quinze minutos.

Arrefecer a 50°C. Preparar placas.

Ágar de sacarose e peptona (SPA)

(ver quadro no documento original)

Preparar volumes de 0,5 l de meio em frascos de 1 l.

Dissolver os ingredientes. Se necessário, acertar o pH a 7,2-7,4.

Esterilizar em autoclave a 121°C durante quinze minutos.

Arrefecer a 50°C. Preparar placas.

Meio de tetrazólio de Kelman

(ver quadro no documento original)

Preparar volumes de 0,5 l de meio em frascos de 1 l.

Dissolver os ingredientes.

Esterilizar em autoclave a 121°C durante quinze minutos.

Arrefecer a 50°C.

Adicionar o volume necessário de solução aquosa de cloreto de trifetil tetrazólio (Sigma), esterilizada por filtração, para obter uma concentração final de 50 mg/l.

Preparar placas.

APÊNDICE N.º 2

Materiais para a preparação das amostras

Tampão de maceração: tampão fosfato 50 mM, pH 7,0

Este tampão é utilizado para maceração dos tecidos.

(ver quadro no documento original)

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Preparar as alíquotas que forem consideradas necessárias.

Esterilizar em autoclave a 121°C durante quinze minutos.

Para a realização do teste PCR directo, recomenda-se a adição de polivinilpirrolidona 40000 MWT (PVP-40) a 5%, para reduzir a incidência de inibição da amplificação por moléculas aromáticas presentes no extracto.

No caso de se utilizarem os procedimentos de homogeneização com Waring Blender ou com Ultra Turrax para a maceração dos hilos de batata, recomenda-se a adição de um antifloculante, antiespuma ou antioxidante.

(ver quadro no documento original)

Esterilizar separadamente em autoclave. Adicionar de forma a obter a concentração desejada.

Tampão de ressuspensão: tampão fosfato 10 mM, pH 7,2

Este tampão é utilizado para a ressuspensão e diluição dos sedimentos dos hilos de batata.

(ver quadro no documento original)

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Preparar as alíquotas que forem consideradas necessárias.

Esterilizar em autoclave a 121°C durante quinze minutos.

APÊNDICE N.º 3

Materiais para o teste IF

Tampão IF: tampão fosfato salino (PBS) 10 mM, pH 7,2

Este tampão é utilizado para a diluição dos anti-soros.

(ver quadro no documento original)

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Preparar as alíquotas que forem consideradas necessárias.

Esterilizar em autoclave a 121°C durante quinze minutos.

Tampão IF-Tween

Este tampão é utilizado para lavar as lâminas. Adicionar 0,1% de Tween 20 ao tampão IF.

Tampão fosfato com glicerol 0,1 M, pH 7,6

Este tampão é utilizado como fluido de montagem sobre os poços das lâminas de IF, para aumentar a fluorescência.

(ver quadro no documento original)

APÊNDICE N.º 4

Determinação do nível de contaminação no teste IF

1 - Área (S) de cada poço da lâmina de poços múltiplos:

$$(\pi)D^2/4$$

em que D = diâmetro do poço.

2 - Área (S) do campo da objectiva:

$$(\pi)d^2/4$$

em que d = diâmetro do campo.

3 - Calcular o diâmetro do campo (d) quer por medição directa quer através das seguintes fórmulas:

$$S = ((\pi)i^2)/(G^2K^2 \times 4)$$

em que:

i = coeficiente de campo (depende do tipo de ocular e varia entre 8 e 24);

K = coeficiente do tubo (1 ou 1,25);

G = ampliação da objectiva (100 vezes, 40 vezes, etc.).

4 - De 2, vem que:

(ver fórmula no documento original)

de 3, vem que:

(ver fórmula no documento original)

Contar o número de células fluorescentes típicas por campo (c).

Calcular o número de células fluorescentes típicas por poço (C):

$$C = c(S/s)$$

Calcular o número de células fluorescentes típicas por mililitro de sedimento (N):

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

em que:

y = volume de sedimento no poço;

F = factor de diluição do sedimento.

APÊNDICE N.º 5

Materiais para o teste ELISA

Tampão carbonato 2 x concentrado para revestimento, pH 9,6

(ver quadro no documento original)

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Preparar as alíquotas que forem consideradas necessárias.

Esterilizar em autoclave a 121°C durante quinze minutos.

Pode ser acrescentado, como antioxidante, sulfito de sódio com uma concentração final de 0,2%, caso o extracto contenha uma grande fracção de moléculas aromáticas.

Tampão fosfato salino (PBS) 10 x concentrado, pH 7,4

(ver quadro no documento original)

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Preparar as alíquotas que forem consideradas necessárias.

Esterilizar em autoclave a 121°C durante quinze minutos.

Tampão fosfato salino - Tween (PBS-T)

(ver quadro no documento original)

Tampão de bloqueio (anticorpo) - deve ser preparado na altura da utilização

(ver quadro no documento original)

Solução de substrato de fosfatase alcalina, pH 9,8

(ver quadro no documento original)

Misturar e acertar a pH 9,8 com HCl concentrado.

Completar até 1 l com água destilada.

Juntar 0,2 g de MgCl(índice 2).

Dissolver duas pastilhas de 5 mg de substrato de fosfatase (Sigma) por cada 15 ml de solução.

APÊNDICE N.º 6

Materiais para o teste PCR

Sequência dos oligonucleótidos

«Primer» OLI-1 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

«Primer» Y-2 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Os materiais encontram-se referidos em Seal et al., 1993.

APÊNDICE N.º 7

Materiais para os testes de sementeira em placas com meio selectivo e testes de enriquecimento

Meio selectivo SMSA (Engelbrecht, 1994, modificado por Elphinstone et al., 1996)

(ver quadro no documento original)

Preparar volumes de 0,5 l de meio em frascos de 1 l.

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Se necessário, acertar o pH a 6,5 antes de esterilizar.

Ralstonia solanacearum não se desenvolve bem a pH > 7,0.

Esterilizar em autoclave a 121°C durante quinze minutos.

Arrefecer a 50°C.

Juntar os ingredientes seguintes (todos Sigma) para obter as concentrações finais especificadas:

Violeta cristal - 5 mg/l;

Sulfato de polimixina B - 100 mg/l (cerca de 600000 unidades) Sigma P-1004;

Bacitracina - 25 mg/l (ver nota *) (cerca de 1250 unidades) Sigma B-0125;

Cloranfenicol - 5 mg/l Sigma C-3175;

Penicilina-G - 0,5 mg/l (cerca de 825 unidades) Sigma P-3032;

Sais de tetrazólio - 50 mg/l.

Dissolver os ingredientes em etanol a 70% de forma a obter as concentrações indicadas para o volume de meio preparado. Alguns desses ingredientes, como por exemplo o sulfato de polimixina B e o cloranfenicol, exigem ligeiro aquecimento e agitação.

Caldo SMSA (Elphinstone et al., 1996):

Preparar de forma idêntica à do meio selectivo SMSA excluindo a adição de ágar e de sais de tetrazólio.

Distribuir em alíquotas de 3 ml por tubos universais de 30 ml descartáveis.

(nota *) Se for considerado necessário, o aumento da concentração de bacitracina para 300 ppm pode reduzir a contaminação por bactérias saprófitas, sem reduzir a recuperação de *Ralstonia solanacearum*.

Bibliografia

Buddenhagen, I. W.; Sequeira, L., e Kelman, A., 1962, «Description of races», in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 52, 726.

Cook, D.; Elizabeth B., e Sequeira L., 1989, «Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive responses», *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2, 113-121.

Dinesen, I. G., e 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., e 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., 1994, «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 e 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 in *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, 693-695.

Lelliot, R. A., e 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.; Fulbrigh, D. W.; Stephens, C. T., e 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., e 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., e 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., e 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., e Daniels, M. J., 1993, «Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *P. syzygii*, *P. picketti* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction», *Journal of General Microbiology*, 139, 1587-1594.
- Smith, J. J.; Offord, L. C.; Holderness, M., e 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., e 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», *Zuchtungsforchung*, 2, 266-269.

ANEXO II

Nos termos do n.º 3 do artigo 5.º do presente diploma, os elementos da investigação oficial deverão incluir, consoante o caso:

a) Locais de produção que:

- i) Cultivem ou tenham cultivado batata que tenha uma relação clonal com batata que se verificou estar contaminada pelo organismo prejudicial;
- ii) Cultivem ou tenham cultivado tomate da mesma origem que o tomate que se verificou estar contaminado pelo organismo prejudicial;
- iii) Cultivem ou tenham cultivado batata ou tomate que tenham sido colocados sob controlo oficial por se suspeitar da ocorrência do organismo prejudicial;
- iv) Cultivem ou tenham cultivado batata que tenha uma relação clonal com batata cultivada em locais de produção que se verificou estarem contaminados pelo organismo prejudicial;
- v) Cultivem batata ou tomate e se encontrem localizados na vizinhança de locais de produção contaminados pelo organismo prejudicial, incluindo os locais de produção que partilhem entre si equipamentos e instalações de produção, directamente ou através de um contratante comum;
- vi) Utilizem, para irrigação ou aspersão, águas superficiais provenientes de qualquer fonte de que se suspeite ou esteja confirmada a contaminação pelo organismo prejudicial;
- vii) Utilizem, para irrigação ou aspersão, águas superficiais provenientes de uma fonte partilhada com locais de produção de que se suspeite ou esteja confirmada a contaminação pelo organismo prejudicial;

viii) Estejam ou tenham sido inundados por águas superficiais de que se suspeite ou esteja confirmada a contaminação pelo organismo prejudicial;

b) Águas superficiais utilizadas para irrigação ou aspersão do(s) campo(s) ou local(is) de produção, ou que tenham inundado os mesmos, de que esteja confirmada a contaminação pelo organismo prejudicial.

ANEXO III

Nos termos do n.º 5 do artigo 5.º do presente diploma:

1 - Os elementos para determinação da extensão da provável contaminação deverão incluir, consoante o caso:

a) Os materiais vegetais cultivados num local de produção que tenha sido declarado contaminado ao abrigo do n.º 5 do artigo 6.º;

b) Local(is) de produção com ligações de produção aos materiais vegetais declarados contaminados, nos termos do n.º 1 do artigo 6.º, incluindo os que partilham equipamentos e instalações de produção, directamente ou através de um contratante comum;

c) Os materiais vegetais produzidos no(s) local(is) de produção referido(s) na alínea anterior, ou que tenham estado presentes nesse(s) local(is) durante o período em que os materiais vegetais declarados contaminados se encontravam nos locais de produção referidos na alínea a);

d) Armazéns que lidem com os materiais vegetais dos locais de produção acima referidos;

e) Quaisquer máquinas, veículos, recipientes, armazéns ou respectivas partes e quaisquer outros objectos, incluindo material de embalagem, que possam ter estado em contacto com os materiais vegetais declarados contaminados;

f) Quaisquer materiais vegetais que tenham estado armazenados em, ou em contacto com, qualquer das estruturas ou objectos referidos na alínea anterior, antes da lavagem e desinfecção dessas estruturas e objectos;

g) Em resultado das investigações e dos testes referidos no n.º 3 do artigo 5.º e no n.º 6 do artigo 2.º do presente diploma, no caso da batata, os tubérculos ou plantas que tenham uma relação clonal colateral ou parental e, no caso do tomate, as plantas que tenham a mesma origem que os materiais vegetais declarados contaminados e em relação aos quais, embora os testes se tenham revelado negativos no que diz respeito ao organismo prejudicial, a contaminação se afigure provável através de uma ligação clonal;

h) Local(is) de produção dos materiais vegetais referidos na alínea anterior;

i) Local(is) de produção dos materiais vegetais que tenham usado, para irrigação ou aspersão, águas declaradas contaminadas ao abrigo do n.º 2 do artigo 6.º;

j) Materiais vegetais produzidos em campos inundados por águas superficiais de que esteja confirmada a contaminação pelo organismo prejudicial.

2 - A determinação da possível extensão da contaminação deverá contemplar os seguintes elementos:

a) Proximidade de outros locais de produção que cultivem materiais vegetais da lista;

b) Produção ou utilização comuns de lotes de batata de semente;

c) Locais de produção que utilizem águas superficiais para irrigação ou aspersão dos materiais vegetais, nos casos em que haja ou tenha havido risco de escorrência de ou inundação por essas águas a partir de locais de produção declarados contaminados;

d) Nos casos em que as águas superficiais tenham sido declaradas contaminadas:

i) Local(is) de produção adjacente(s) de, ou que esteja(m) em perigo de ser inundado(s) por, águas superficiais declaradas contaminadas, em que sejam produzidos materiais vegetais;

ii) Qualquer bacia de irrigação contida que esteja associada às águas superficiais declaradas contaminadas.

ANEXO IV

Nos termos do n.º 1 do artigo 6.º do presente diploma, aplicar-se-á um dos seguintes procedimentos:

- a) Incineração;
- b) Utilização para a alimentação de gado após tratamento térmico que garanta a impossibilidade de sobrevivência do organismo prejudicial;
- c) Enterramento profundo num local em que não existam riscos de escorrência para terras agrícolas ou de contacto com fontes de água que possam ser utilizadas para a irrigação de terras agrícolas;
- d) Transformação industrial através de entrega directa e imediata a uma instalação de transformação que disponha de equipamentos de eliminação de resíduos oficialmente aprovados que estejam em conformidade com o disposto no anexo VIII ao presente diploma;
- e) Outras medidas, desde que tenha sido comprovado que não existe qualquer risco reconhecido de dispersão do organismo prejudicial.

ANEXO V

Nos termos do n.º 3 do artigo 6.º do presente diploma, aplicar-se-á um dos seguintes procedimentos:

- a) Para os tubérculos de batata:
 - i) Utilização como batata destinada ao consumo, embalada, em locais que disponham de equipamentos de eliminação de resíduos oficialmente aprovados que estejam em conformidade com o disposto no anexo VII ao presente diploma, pronta e destinada a entrega e utilização imediatas, sem mudança de embalagem;
 - ii) Utilização como batata destinada a transformação industrial e a entrega directa e imediata a uma instalação industrial que disponha de equipamentos de eliminação de resíduos oficialmente aprovados que estejam em conformidade com o disposto no anexo VII ao presente diploma;
 - iii) Qualquer outra utilização ou forma de eliminação, desde que seja comprovado que não existe qualquer risco reconhecido de dispersão do organismo prejudicial;
- b) Para outras partes das plantas, incluindo fragmentos de caules e folhas:
 - i) Destruição;
 - ii) Qualquer outra utilização ou forma de eliminação, desde que seja comprovado que não existe qualquer risco reconhecido de dispersão do organismo prejudicial.

ANEXO VI

1 - Nos casos em que os locais de produção tenham sido declarados contaminados ao abrigo do n.º 5 do artigo 6.º:

- a) Nos campos ou unidades de produção de culturas protegidas declarados contaminados, será aplicada uma das seguintes opções:
 - i) Durante pelo menos os quatro períodos de cultura subsequentes à declaração de contaminação:
 - 1) Serão tomadas medidas para eliminar as plantas espontâneas de batateira ou tomateiro, bem como outras plantas hospedeiras do organismo prejudicial, incluindo solanáceas infestantes; e
 - 2) Não poderão ser plantados:
 - 2.1) Tubérculos nem plantas de batateira;
 - 2.2) Sementes nem plantas de tomateiro;
 - 3) Tendo em conta a biologia do organismo prejudicial:
 - 3.1) Outras plantas hospedeiras;
 - 3.2) Plantas de espécies do género Brassica para as quais exista um risco reconhecido de sobrevivência do organismo prejudicial;

3.3) Culturas para as quais exista um risco reconhecido de dispersão do organismo prejudicial;

4) Na primeira época de colheita de batata ou tomate subsequente ao período especificado no número anterior, e sob condição de o campo ter sido considerado livre de plantas espontâneas de batateira ou de tomateiro e de outras plantas hospedeiras do organismo prejudicial, incluindo solanáceas infestantes, durante pelo menos os dois períodos de cultura consecutivos anteriores à plantação:

4.1) No caso da batata, só serão plantadas, para culturas destinadas ao consumo, batatas de semente oficialmente certificadas; e

4.2) Será realizada uma prospeção oficial, incluindo análises, nos termos do artigo 2.º do presente diploma;

5) Na época de colheita de batata ou tomate subsequente à referida no número anterior e no seguimento de um ciclo de rotação adequado, no caso da batata, será plantada batata de semente oficialmente certificada para produção de semente ou de batata para consumo e, no caso da batata e do tomate, será realizada uma prospeção oficial, nos termos do artigo 2.º do presente diploma;

ou:

ii) Durante os cinco anos de cultura subsequentes à declaração de contaminação:

1) Serão tomadas medidas para eliminar as plantas espontâneas de batateira ou tomateiro, bem como outras plantas hospedeiras do organismo prejudicial, incluindo solanáceas infestantes; e

2) O campo será tratado e mantido, durante os primeiros três anos, em pousio completo ou plantado com cereais de acordo com o risco reconhecido, ou como pastagem permanente, com frequentes cortes ou com pastorícia intensiva, ou plantado com gramíneas destinadas à produção de semente, a que se seguirão dois anos em que serão plantadas plantas que não sejam hospedeiras do organismo prejudicial e para as quais não exista um risco reconhecido de sobrevivência ou dispersão do organismo prejudicial;

3) Na primeira época de colheita de batata ou tomate subsequente ao período especificado no número anterior:

3.1) No caso da batata, só serão plantadas, para obtenção de semente ou de batata para consumo, batatas de semente oficialmente certificadas; e

3.2) Será realizada uma prospeção oficial, incluindo análises, nos termos do artigo 2.º do presente diploma;

b) Noutros campos:

i) No ano de cultura subsequente à declaração de contaminação:

1) Não serão plantados tubérculos nem plantas de batateira nem outras plantas hospedeiras do organismo prejudicial, sendo tomadas medidas para eliminar as plantas espontâneas de batateira ou tomateiro, e outras plantas hospedeiras do organismo prejudicial, incluindo solanáceas infestantes, quando apropriado; ou

2) No caso dos tubérculos de batata, só poderão ser plantadas batatas de semente oficialmente certificadas, para produção de batata destinada ao consumo, sob condição de que os organismos prejudiciais oficiais responsáveis considerem que foram eliminados de forma satisfatória os riscos decorrentes de plantas espontâneas de batateira ou tomateiro e outras plantas hospedeiras do organismo prejudicial, incluindo solanáceas infestantes. A cultura será inspeccionada ao longo do desenvolvimento, em momentos apropriados, e as plantas espontâneas de batateira serão testadas no que respeita à presença do organismo prejudicial; além disso, no caso da batata, os tubérculos colhidos serão inspeccionados;

ii) No primeiro ano de cultura subsequente ao referido no n.º 2) da subalínea i) anterior:

1) No caso da batata, só serão plantadas, para obtenção de semente ou de batata para consumo, batatas de semente oficialmente certificadas;

iii) Pelo menos no segundo ano de cultura subsequente ao referido no n.º 1) da subalínea i):

1) No caso da batata, só serão plantadas, para obtenção de semente ou de batata para consumo, batatas de semente oficialmente certificadas ou produzidas, sob controlo oficial, a partir de batatas de semente oficialmente certificadas;

iv) Em cada um dos anos de cultura referidos nas subalíneas anteriores, serão tomadas medidas para eliminar as plantas espontâneas de batateira ou tomateiro, e outras plantas hospedeiras do organismo prejudicial, incluindo solanáceas infestantes, e será realizada uma prospecção oficial, nos termos do artigo 2.º do presente diploma; nos casos em que seja plantada batata para produção de semente, os tubérculos serão sujeitos a testes;

c) Imediatamente após a declaração de contaminação e em cada um dos anos de cultura subsequentes até à primeira campanha, inclusive, em que a colheita de batata ou de tomate seja autorizada no(s) campo(s) declarado(s) contaminado(s), nos termos da alínea a):

i) Todas as máquinas e instalações de armazenamento do local e produção que estejam envolvidas na produção de batata ou de tomate devem ser limpas e, quando necessário, desinfectadas através de métodos apropriados, conforme especificado no artigo 7.º do presente diploma;

ii) Serão estabelecidos controlos oficiais dos programas de irrigação e aspersão, que poderão conduzir à sua proibição, quando necessário, para evitar a dispersão do organismo prejudicial;

d) Numa unidade de produção de culturas protegidas declarada contaminada nos casos em que seja possível a total substituição do meio de cultura:

i) Não serão plantados tubérculos nem plantas de batateira nem nenhuma planta hospedeira do organismo prejudicial, incluindo plantas e sementes de tomateiro, a não ser quando a unidade tiver sido sujeita, sob supervisão oficial, a medidas destinadas a eliminar o organismo prejudicial e a remover todo o material vegetal hospedeiro, incluindo, no mínimo, a renovação completa do meio de cultura e a limpeza e, quando necessário, desinfecção da unidade e de todo o equipamento, e quando os organismos prejudiciais oficiais responsáveis tiverem concedido a sua aprovação para fins de produção de batata ou de tomate; e

ii) Para a produção de batata, apenas serão utilizadas batatas de semente oficialmente certificadas ou minitubérculos ou miniplantas provenientes de origens testadas;

iii) Serão estabelecidos controlos oficiais dos programas de irrigação e aspersão, que poderão conduzir à sua proibição, quando necessário, para evitar a dispersão do organismo prejudicial.

2 - Dentro da zona demarcada, prevista no n.º 6 do artigo 6.º, sem prejuízo das medidas definidas no número anterior, deverá efectuar-se o seguinte:

a) Imediatamente e, pelo menos, durante os três anos de cultura subsequentes à declaração de contaminação:

i) Nos casos em que a zona tenha sido demarcada ao abrigo do n.º 4 do artigo 5.º do presente diploma, será:

1) Exigida a limpeza e, caso necessário, a desinfecção das máquinas e locais de armazenamento que se encontrem nas instalações que cultivem, armazenem ou lidem com tubérculos de batata ou com tomate, e também das instalações que operem máquinas destinadas à produção de batata ou tomate sob contrato, utilizando métodos adequados conforme especificado no anexo VI do presente diploma;

2) Exigida, para todas as culturas de batata da zona, que só sejam plantadas batatas de semente certificadas ou sementes cultivadas sob controlo oficial, e que sejam analisadas após colheita as culturas de batata de semente efectuadas em locais de produção ainda não declarados como contaminados;

3) Exigido que, em todas as instalações da zona, a batata de semente colhida seja mantida separada da batata destinada ao consumo;

ii) Nos casos em que as águas tenham sido declaradas contaminadas ao abrigo do n.º 2 do artigo 6.º do presente diploma, será proibida a sua utilização para irrigação e aspersão dos materiais vegetais e, quando necessário, de outros materiais, para evitar a dispersão do

organismo prejudicial. Essa proibição poderá ser objecto de uma revisão com base nos resultados da citada prospecção anual;

b) Estabelecer, quando necessário, um programa de substituição de todas as existências de batata de semente ao longo de um período de tempo adequado.

ANEXO VII

Os equipamentos de eliminação de resíduos a que se refere o anexo IV ao presente diploma deverão obedecer às seguintes disposições:

a) Os resíduos de transformação de batata e tomate, incluindo batatas, cascas e tomates rejeitados, e qualquer outro resíduo sólido associado à batata e ao tomate serão eliminados por:

i) Enterramento profundo num local em que não existam riscos de escorrência para terras agrícolas ou de contacto com fontes de água que possam ser utilizadas para a irrigação de terras agrícolas. Os resíduos serão directamente transportados para os locais em condições que evitem qualquer perda;

ii) Ou incineração;

b) Resíduos líquidos de transformação: antes de serem eliminados, os resíduos líquidos que contenham sólidos em suspensão serão sujeitos a processos de filtração ou decantação para remoção dos mesmos, devendo os sólidos removidos ser eliminados em conformidade com a alínea anterior;

c) Os resíduos líquidos serão depois:

i) Aquecidos a, no mínimo, 70°C durante pelo menos trinta minutos, antes de serem eliminados;

ii) Ou eliminados de outro modo, sujeito a aprovação e controlo oficial, de forma que não exista qualquer risco de que os resíduos venham a entrar em contacto com terras agrícolas ou com fontes de água que possam ser utilizadas para a irrigação de terras agrícolas, devendo os pormenores relativos a esse método ser notificados oficialmente aos restantes Estados membros e à Comissão.