ZBIERKA ZÁKONOV
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

Ročník 2004

Vyhlásené: 14. 02. 2004 Vyhlásená verzia v Zbierke zákonov Slovenskej republiky

Obsah tohto dokumentu má informatívny charakter.

66

NARIADENIE VLÁDY

Slovenskej republiky

z 21. januára 2004,

ktorým sa ustanovujú opatrenia na ochranu proti zavlečeniu hnedej hniloby zemiaka

Vláda Slovenskej republiky podľa § 2 ods. 1 písm. k) zákona č. 19/2002 Z. z., ktorým sa ustanovujú podmienky vydávania aproximačných nariadení vlády Slovenskej republiky v znení zákona č. 207/2002 Z. z. a na vykonanie § 30b zákona Národnej rady Slovenskej republiky č. 285/1995 Z. z. o rastlinolekárskej starostlivosti v znení zákona č. 471/2001 Z. z. (ďalej len „zákon“) nariaďuje:

§ 1

Toto nariadenie ustanovuje opatrenia na ochranu proti zavlečeniu hnedej hniloby zemiaka [Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al., synonymum Pseudomonas solanacearum (Smith) Smith] (ďalej len „hnedá hniloba“).

§ 2

(1) V prípade výskytu hnedej hniloby toto nariadenie ustanovuje opatrenia smerujúce k

a) určeniu miesta výskytu a rozsahu rozšírenia,

b) zamedzeniu výskytu a ďalšiemu rozširovaniu,

c) jej obmedzeniu s cieľom zničenia.

(2) Každý, kto zistí výskyt alebo má podozrenie na výskyt hnedej hniloby, je povinný ohlásiť túto skutočnosť Ústrednému kontrolnému a skúšobnému ústavu poľnohospodárskemu (ďalej len „kontrolný ústav“), ktorý zabezpečí odber vzoriek a ich diagnostikovanie.

§ 3

(1) Prieskum a vyhodnotenie nebezpečenstva výskytu hnedej hniloby na hľuzách dovážaných sadivových zemiakov a ostatných zemiakov dovážaných na územie Slovenskej republiky a na hľuzách a rastlinách zemiakov pestovaných a uvádzaných do obehu na území Slovenskej republiky vykonáva kontrolný ústav podľa osobitného predpisu.[1]) V miestach produkcie vykonáva kontrolný ústav vyhodnotenie nebezpečenstva, a ak sa pri tom zistí nebezpečenstvo rozširovania hnedej hniloby, aj prieskumy zamerané na zistenie výskytu hnedej hniloby a prieskumy burinného spoločenstva z čeľade ľuľkovité, v povrchových vodách používaných na zavlažovanie hostiteľských rastlín, v odpadových vodách vypúšťaných z prevádzkových priestorov priemyselného spracovania alebo balenia, v ktorých sa rastlinný materiál spracúva, a vo vodách používaných na zavlažovanie alebo pri postreku rastlinného materiálu. Rozsah týchto cielených prieskumov určí kontrolný

ústav na základe zistenej miery nebezpečenstva. Prieskumy výskytu hnedej hniloby môže kontrolný ústav vykonať aj v záhradníckom substráte, zemine a v pevnom odpade z prevádzkových priestorov priemyselného spracovania alebo balenia.

(2) Prieskum uvedený v odseku 1 sa vykonáva v

a) rastlinnom materiáli podľa prílohy č. 1 časti B bodu 1,

b) hostiteľských rastlinách iných ako v rastlinnom materiáli uvedenom v písmene a) a vo vode vrátane tekutých odpadov, z ktorých sa odoberajú vzorky, ktoré sa podrobujú laboratórnym testom.

(3) Vzorky testujú laboratóriá kontrolného ústavu alebo iné laboratóriá poverené kontrolným ústavom.

(4) Výsledky prieskumu uvedené v odseku 1 oznamuje kontrolný ústav jedenkrát ročne Ministerstvu pôdohospodárstva Slovenskej republiky (ďalej len „ministerstvo“). Ministerstvo každoročne zasiela výsledky prieskumu Komisii Európskych spoločenstiev (ďalej len „komisia“) a členským štátom. Tieto oznámenia sa odovzdávajú do 1. júna kalendárneho roka okrem oznámení týkajúcich sa zemiakov používaných výrobcom ako ponechané sadivové zemiaky, pre ktoré sa oznámenia odovzdávajú do 1. septembra kalendárneho roka.

(5) Kontrolný ústav vydá metodický postup na vykonávanie prieskumu a testovanie hnedej hniloby.

§ 4

(1) Kontrolný ústav v prípade podozrenia alebo potvrdeného výskytu hnedej hniloby na rastlinách a hľuzách zemiakov alebo na hľuzách skladovaných a uvádzaných do obehu na území Slovenskej republiky okamžite informuje ministerstvo. Pri podozrení na výskyt hnedej hniloby zabezpečí laboratórne testovanie rastlinného materiálu podľa postupov ustanovených v prílohe č. 2, aby sa podozrenie na výskyt hnedej hniloby potvrdilo alebo vyvrátilo.

(2) Kontrolný ústav do potvrdenia alebo vyvrátenia podozrenia na výskyt hnedej hniloby podľa odseku 1 a v prípade podozrenia na výskyt hnedej hniloby, keď sa spozorovali diagnostické príznaky alebo sa testmi rýchleho skríningu uvedenými v prílohe č. 2 časti A bode 1 a časti B dospelo k pozitívnym výsledkom alebo sa skríningovými testmi popísanými v prílohe č. 2 časti A bode 2 a časti C došlo k pozitívnym výsledkom,

a) zakáže premiestňovanie rastlín a hľúz zo všetkých porastov, dávok alebo zásielok, z ktorých sa odoberali vzorky, okrem rastlín a hľúz, ktoré sú pod kontrolou kontrolného ústavu, aby nevzniklo žiadne nebezpečenstvo rozširovania hnedej hniloby,

b) zistí pôvod podozrivého výskytu,

c) na základe vyhodnotenia nebezpečenstva určí ďalšie predbežné opatrenia, aby sa zabránilo premiestňovaniu dávok sadivových zemiakov z miesta produkcie podľa písmena a) s cieľom zabrániť rozširovaniu hnedej hniloby.

(3) Kontrolný ústav v prípadoch podozrenia na výskyt, ak hrozí kontaminácia rastlinného materiálu alebo povrchovej vody z iného členského štátu alebo v inom členskom štáte, oznámi podľa osobitného predpisu[2]) bezodkladne v závislosti od identifikovaného nebezpečenstva podrobnosti o podozrení príslušnému členskému štátu.

§ 5

(1) Ak sa pri laboratórnom testovaní podľa postupov ustanovených v prílohe č. 2 pri rastlinnom materiáli a v ostatných prípadoch s použitím iných schválených postupov s ohľadom na uznávané

vedecké zásady, biológiu hnedej hniloby a príslušné produkčné, spracovateľské a distribučné systémy potvrdí prítomnosť hnedej hniloby vo vzorke, kontrolný ústav

a) na rastlinnom materiáli

1. vykoná testovanie s cieľom zistiť rozsah a prvotný zdroj alebo zdroje kontaminácie v súlade s prílohou č. 3 a súčasne s ďalšími testmi v súlade s § 5 ods. 1 aj všetkých porastov sadivových zemiakov klonovo príbuzných,
2. označí za kontaminované rastlinný materiál, dávku alebo zásielku, z ktorej bola vzorka odobratá; označí aj strojové zariadenie, dopravný prostriedok, plavidlo, sklad alebo jeho časť, ktoré boli v styku s napadnutým rastlinným materiálom, miesto produkcie rastlinného materiálu, z ktorého bol rastlinný materiál pozberaný a z ktorého bola odobratá vzorka; ak ide o vzorky odobraté počas vegetačného obdobia, za kontaminované sa musia označiť aj miesta produkcie, z ktorých bola vzorka odobratá,
3. určí v súlade s ustanoveniami prílohy č. 4 bodu 1 rozsah pravdepodobnej kontaminácie v dôsledku styku s uvedeným rastlinným materiálom v priebehu zberovej či pozberovej manipulácie v dôsledku spoločného pestovania, zavlažovania alebo postrekovania alebo v dôsledku klonovej príbuznosti,
4. vyznačí v súlade s ustanoveniami prílohy č. 4 bodu 2 písm. a) a na základe označenia kontaminácie podľa bodov 2 a 3 a možného rozšírenia hnedej hniloby bezpečnostné pásmo,

b) v plodinách alebo hostiteľských rastlinách okrem rastlinného materiálu uvedeného v písmene a), ak je produkcia rastlinného materiálu identifikovaná ako nebezpečná,

1. začne testovanie v súlade s písmenom a) bodom 1,
2. označí ako kontaminované hostiteľské rastliny hnedej hniloby, z ktorých bola vzorka odobratá,
3. určí v súlade s písmenom a) bodmi 3 a 4 pravdepodobnú kontamináciu a vyznačí bezpečnostné pásmo vzťahujúce sa na produkciu rastlinného materiálu,

c) v povrchových vodách vrátane kvapalného odpadu z podnikov priemyselného spracovania alebo balenia, v ktorých sa uvedený rastlinný materiál spracúva, a v burinnom spoločenstve hostiteľských rastlín z čeľade ľuľkovité, kde sa produkcia uvedeného rastlinného materiálu identifikuje ako nebezpečná v dôsledku zavlažovania, postrekovania alebo zaplavenia povrchovou vodou,

1. začne testovanie vrátane primerane načasovaného úradného prieskumu vzoriek povrchových vôd a v prípade prítomnosti burinného spoločenstva aj hostiteľských rastlín z čeľade ľuľkovité s cieľom stanoviť rozsah ich kontaminácie,
2. označí v primeranom rozsahu a na základe výsledkov testovania podľa bodu 1 povrchovú vodu, z ktorej boli odobraté vzorky, za kontaminovanú,
3. určí pravdepodobný rozsah kontaminácie a na základe označenia kontaminácie podľa bodu 2 a možného šírenia hnedej hniloby vyznačí bezpečnostné pásmo podľa prílohy č. 4 bodu 1 a bodu 2 písm. a) bodu 2.

(2) Kontrolný ústav v súlade s ustanoveniami prílohy č. 4 bodu 3 bezodkladne oznámi ministerstvu akúkoľvek kontamináciu označenú podľa odseku 1 písm. a) bodu 2 a písm. c) bodu 2, ako aj podrobnosti o vyznačení bezpečnostného pásma vykonanom podľa odseku 1 písm. a) bodu 4 a podľa potreby písmena c) bodu 3. Kontrolný ústav súčasne odovzdá ministerstvu dodatočné oznámenie podľa prílohy č. 4 bodu 4.

(3) Ministerstvo bezodkladne informuje komisiu a členské štáty o oznámení získanom od kontrolného ústavu podľa odseku 2.

(4) Na základe oznámenia od iného členského štátu, že hrozí kontaminácia rastlinného materiálu alebo povrchovej vody na území Slovenskej republiky z tohto členského štátu, kontrolný ústav vykoná prieskum podľa § 3 a podľa potreby aj opatrenia podľa odseku 1.

§ 6

(1) Ak sa postupom uvedeným v § 5 potvrdí výskyt hnedej hniloby, kontrolný ústav

a) zakáže[3]) pestovanie rastlinného materiálu, ktorý bol podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 2 označený za kontaminovaný,

b) zakáže pestovanie rastlinného materiálu, ktorý bol podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 4 a písm. c) bodu 3 označený za pravdepodobne kontaminovaný vrátane rastlinného materiálu, pre ktorý už bolo identifikované nebezpečenstvo, a ktorý bol vyprodukovaný na miestach produkcie označených za pravdepodobne kontaminované podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 3,

c) nariadi,[3]) aby nedošlo k žiadnemu identifikovateľnému nebezpečenstvu rozširovania hnedej hniloby,

1. spálenie,
2. použitie ako krmivo pre zvieratá po tepelnom spracovaní, ktoré vylučuje nebezpečenstvo prežitia hnedej hniloby,
3. hlboké zahrabanie materiálu do skládok, pri ktorých neexistuje žiadne nebezpečenstvo priesaku na poľnohospodársky využívané plochy alebo do povrchovej vody, ktoré sa využívajú na zavlažovanie poľnohospodárskej pôdy,
4. priemyselné spracovanie priamym a okamžitým dodaním do spracovateľského podniku vybaveného schválenými zariadeniami na zneškodňovanie odpadov, ktoré spĺňajú podmienky uvedené v prílohe č. 5 bode 5, alebo
5. iné opatrenie, ak preukázateľne neexistuje žiadne nebezpečenstvo rozširovania hnedej hniloby,

d) nariadi, aby sa materiál pod dohľadom kontrolného ústavu podľa prílohy č. 5 bodu 1 využil a zneškodnil, aby nevzniklo identifikovateľné nebezpečenstvo šírenia hnedej hniloby,

e) nariadi zničenie alebo dezinfekciu metódami ustanovenými v prílohe č. 5 bode 2 strojového zariadenia, dopravných prostriedkov, plavidiel, skladov a ich častí a ostatných predmetov vrátane obalového materiálu, ktoré boli podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 2 označené za kontaminované alebo ktoré boli podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 3 a písm. c) bodu 3 označené za pravdepodobne kontaminované; po dezinfekcii sa tieto predmety viac nepovažujú za kontaminované,

f) prijme v bezpečnostnom pásme vymedzenom podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 4 a písm. c) bodu 3 opatrenia uvedené v prílohe č. 5 bode 3.

(2) Ministerstvo bezodkladne informuje komisiu a členské štáty o opatreniach prijatých podľa odseku 1.

§ 7

Šľachtiteľ[4]) v rámci dodržiavania opatrení na predchádzanie výskytu škodlivých organizmov, na ich likvidáciu a zamedzenie ich šírenia podľa osobitného predpisu[5]) preukáže, že sadivové zemiaky v priamej línii a počiatočného klonového výberu pochádzajú z materiálu získaného v rámci schváleného šľachtiteľského programu a sú bez výskytu hnedej hniloby na základe testovania podľa prílohy č. 2. Tieto testy sa vykonajú

a) v prípade potvrdenia výskytu hnedej hniloby v sadivových zemiakoch v priamej línii a počiatočnom klonovom výbere

1. testovaním vyšších množiteľských stupňov vrátane klonového východiskového materiálu a systematického testovania klonov základného sadivového materiálu alebo
2. v prípadoch, v ktorých preukázateľne neexistuje žiadna klonová príbuznosť, testovaním všetkých klonov základného sadivového materiálu alebo vyšších množiteľských stupňov vrátane klonového východiskového materiálu,

b) v ostatných prípadoch buď na každej rastline klonového východiskového materiálu, alebo na reprezentatívnych vzorkách základného sadivového materiálu alebo vyšších množiteľských stupňov.

§ 8

Kontrolný ústav v rámci vykonávania rozborov rastlín a rastlinných produktov vykonáva systematicky laboratórne testovanie na výskyt hnedej hniloby sadivových zemiakov z dovozu a z uznávacieho konania v kategóriách základného a certifikovaného sadiva.

§ 9

(1) Zakazuje sa udržiavanie hnedej hniloby a narábanie s ňou.

(2) Ustanovenie odseku 1 sa nevzťahuje na dovoz, prevoz, prechovávanie alebo akúkoľvek manipuláciu s hnedou hnilobou na vedecké, výskumné alebo šľachtiteľské účely, ktoré upravuje osobitný predpis.[6])

§ 10

Ministerstvo môže všeobecne záväzným právnym predpisom ustanoviť ďalšie podrobnosti na ochranu proti zavlečeniu hnedej hniloby.

§ 11

Týmto nariadením sa transponuje právny akt Európskych spoločenstiev uvedený v prílohe č. 6.

§ 12

Toto nariadenie nadobúda účinnosť 15. februára 2004.

v z. Pál Csáky v. r.

Príloha č. 1
k nariadeniu vlády č. 66/2004 Z. z.

Zoznam hostiteľských rastlín Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al. a podrobnosti pre vykonávanie prieskumov

ČASŤ A
Zoznam hostiteľských rastlín Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al.

1. Rastliny ľuľka zemiakového (Solanum tuberosum L.) vrátane hľúz, okrem semien.
2. Rastliny rajčiaka jedlého [Lycopersicon lycopersicum (L.) Karsten ex. Farw.] okrem plodov a semien.

ČASŤ B
Vykonávanie prieskumov

1. Prieskumy uvedené v § 3 ods. 2 písm. a) sa zakladajú na biológii príslušného organizmu a konkrétnych produkčných systémoch členských štátov a pozostávajú, ak ide o
   a) zemiaky,
      1. z vizuálnych kontrol porastov počas vhodných období a odoberania vzoriek sadivových, ako aj inak využívaných zemiakov počas vegetačného obdobia alebo zo skladov. Na týchto vzorkách sa potom rezom hľúz vykonajú vizuálne kontroly alebo vizuálne kontroly pod dohľadom kontrolného ústavu,
      2. z prieskumov sadivových zemiakov a inak využívaných zemiakov laboratórnymi testmi alebo laboratórnymi testmi pod dohľadom kontrolného ústavu metódou ustanovenou v prílohe č. 2,
   b) rajčiaky, z vizuálnych kontrol počas vhodných období aspoň tých porastov, ktoré sú určené na výsadbu na účely ďalšieho použitia.
2. Oznámenia o prieskumoch uvedené v § 3 ods. 4 obsahujú,
   a) ak ide o zemiaky,
      1. odhad celkovej vysadenej plochy pre sadivové a ostatné zemiaky v hektároch,
      2. rozvrstvenie podľa kategórií sadivových zemiakov a konzumných zemiakov a podľa regiónov,
      3. počet vzoriek odobratých na testovanie a termín ich odobratia,
      4. počet vizuálnych kontrol v teréne,
      5. počet vizuálnych kontrol hľúz (a veľkosť odobratých vzoriek),
   b) ak ide o rajčiaky, ktoré sú určené na výsadbu na účely ďalšieho použitia,
      1. odhad celkového počtu rastlín,
      2. počet vizuálnych kontrol,
   c) ak ide o hostiteľské rastliny okrem zemiakov a rajčiakov, vrátane burinného spoločenstva z čeľade ľuľkovité,
      1. druhy,
      2. počet odobratých vzoriek a termín ich odobratia,
      3. oblasť alebo podľa vhodnosti rieku pôvodu vzoriek,
      4. metódu rozboru,
   d) ak ide o vodu a tekutý odpad vypúšťaný z prevádzkových priestorov priemyselného spracovania alebo balenia,
      1. počet odobratých vzoriek a termín ich odobratia,
      2. oblasť, rieku alebo podľa vhodnosti miesto prevádzkových priestorov pôvodu vzoriek,

3. metódu rozboru.

Príloha č. 2
k nariadeniu vlády č. 66/2004 Z. z.

Testovacia schéma pre diagnostiku, určovanie prítomnosti a identifikáciu Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al.

Rozsah testovacej schémy
Predložená schéma popisuje rozličné postupy používané pri

a) diagnostike hnedej hniloby v hľuzách zemiakov a baktériového vädnutia v rastlinách zemiakov a rajčiakov,

b) určovaní prítomnosti Ralstonia solanacearum vo vzorkách hľúz zemiakov,

c) identifikácii Ralstonia solanacearum.

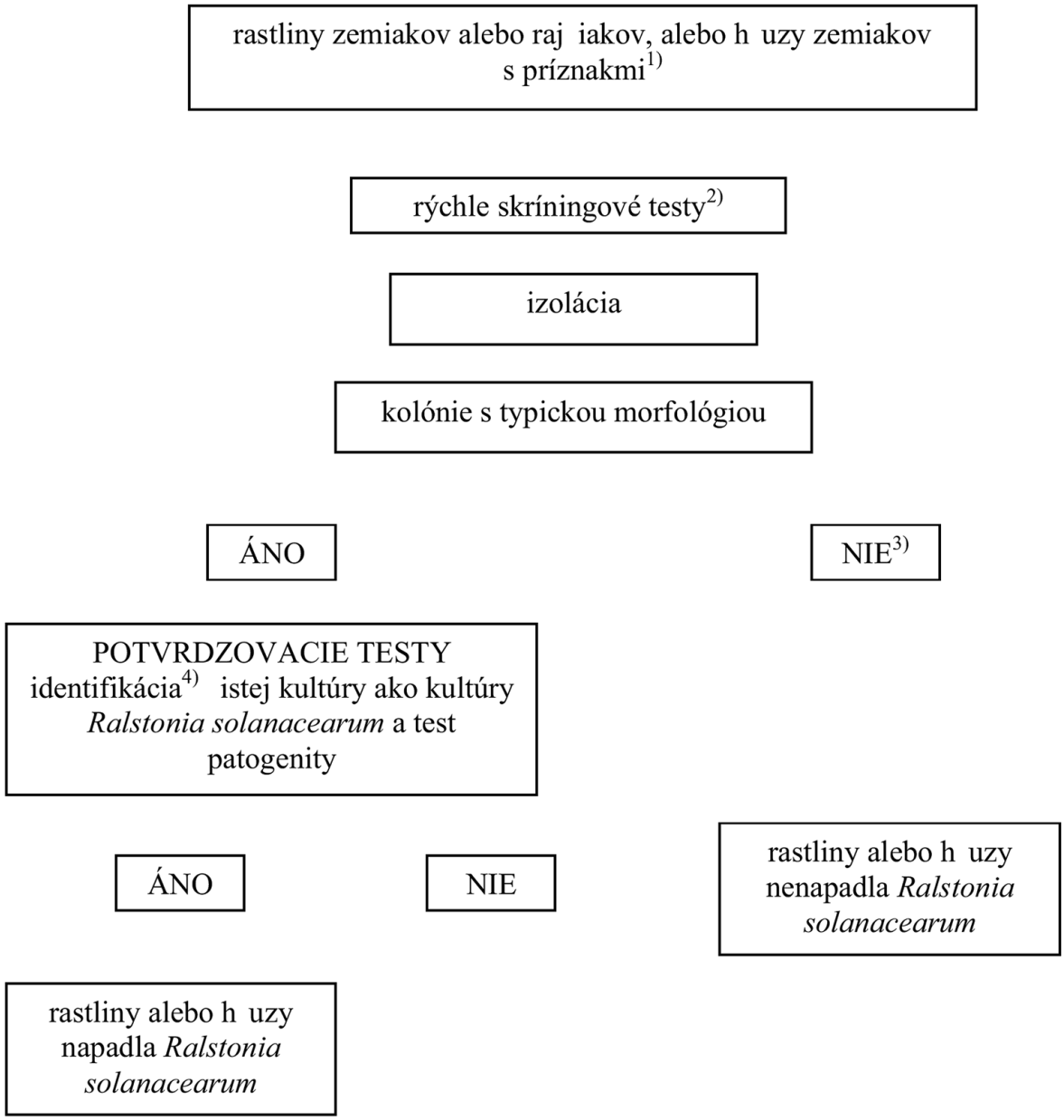
ČASŤ A

Použitie testovacej schémy

1. Diagnostika hnedej hniloby zemiakov a baktériového vädnutia rastlín zemiakov a rajčiakov

Tento testovací postup je určený pre hľuzy zemiakov s príznakmi typickými pre hnedú hnilobu alebo vzbudzujúcimi podozrenie na hnedú hnilobu a pre rastliny zemiakov a rajčiakov s príznakmi typickými pre baktériové vädnutie alebo vzbudzujúcimi podozrenie na baktériové vädnutie. Skladá sa zo skríningového testu, z izolácie patogéna z nakazeného cievneho pletiva na diagnostickom médiu a v prípade pozitívneho výsledku z identifikácie kultúry ako Ralstonia solanacearum.

Diagram pre postup



Poznámky k diagramu pre postup

1) Popis príznakov je uvedený v časti B bode 1.

2) Rýchle skríningové testy uľahčujú predbežnú diagnostiku.
Vhodnými testmi sú
– test výtoku slizu z cievnych zväzkov (časť B bod 2),
– test prítomnosti granúl poly-ß-hydroxybutyrátu (časť B bod 2),
– test IF (časť C bod 2),
– test ELISA (časť C bod 3),
– test PCR (časť C bod 4).

3) Hoci je izolácia patogéna z rastlinného materiálu s typickými príznakmi prostredníctvom zrieďovacích rozterov priama, zakladanie kultúr môže v pokročilých štádiách nákazy zlyhať. Saprofytické baktérie, ktoré rastú v odumretom pletive, môžu v izolačnom médiu patogén prerásť alebo inhibovať. Ak je test izoláciou negatívny, ale príznaky hnedej hniloby sú typické, treba izoláciu opakovať, najlepšie testom selektívneho platňového rozteru.

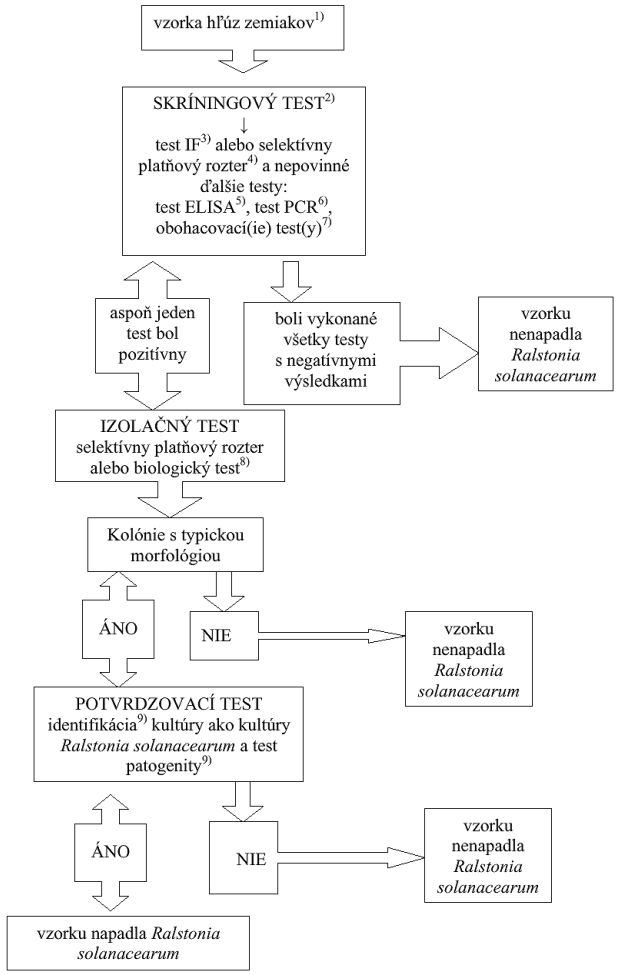
4) Čistá kultúra Ralstonia solanacearum sa spoľahlivo identifikuje minimálne jedným z testov uvedených v časti B bode 4.1., a to v spojení s testom patogenity (časť B bod 4.3.). Stanovenie biovaru a rás nie je

povinné, ale ich uskutočnenie sa odporúča vykonať pre každý nový prípad.

2. Určovanie a identifikácia Ralstonia solanacearum vo vzorkách hľúz zemiakov

Cieľom tohto testovacieho postupu je určovanie prítomnosti latentných infekcií hľúz zemiakov jedným alebo viacerými (preferovaná možnosť) skríningovými testmi, ktoré sa v prípade ich pozitívneho výsledku dopĺňajú o izoláciu patogéna. V prípade izolácie typických kolónií nasleduje identifikácia kultúry ako Ralstonia solanacearum.

Diagram pre postup



Poznámky k diagramu pre postup

1) Veľkosť vzorky

Štandardná veľkosť vzorky je 200 hľúz. Metóda je však vhodná aj pre vzorky obsahujúce menej ako 200 hľúz.

2) Skríningový(é) test(y)

Len jediný test nemusí byť dostatočne citlivý alebo spoľahlivý na dokázanie prítomnosti Ralstonia solanacearum vo vzorke. Preto sa odporúča uskutočniť viaceré testy, ktoré sa zakladajú pokiaľ možno na rôznych biologických princípoch.

3) Imunofluorescenčný test (test IF) (nepriama metóda) je osvedčeným skríningovým testom. To je oproti iným, nie ešte celkom vyvinutým alebo overeným typom testov výhodou. Tento test sa používa pri mnohých iných karanténnych baktériách, napríklad Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus. Podľa parametrov uvádzaných pre túto metódu ide o citlivý test (prah citlivosti 10^3 – 10^4 buniek v 1 ml peletu zemiakového extraktu). Pre spoľahlivosť výsledku testu je rozhodujúca kvalita antiséra. Dá sa akceptovať iba antisérum s vysokým titrom (minimálne 2 000 pre surové sérum) a všetky testy sa musia vykonávať pri titre antiséra alebo pri zriedení pod úroveň titra. Prednosť sa dáva nepriamej metóde. Priamu metódu možno použiť, ak je citlivosť a špecifickosť testu rovnaká ako pri nepriamej metóde.

Imunofluorescenčný test má výhodu subjektívneho vyhodnotenia bunkovej morfológie a intenzity fluorescencie, čo umožňuje úsudok o špecifickosti reakcie. Časté sú krížové reakcie so sérologicky

príbuznými baktériami rovnakej bunkovej morfológie, ako má Ralstonia solanacearum, vyskytujúcimi sa na povrchu hľuzy alebo pochádzajúcimi z okolitej pôdy. Test IF možno vykonávať ako jediný kontrolný test, no v prípade podozrenia na výskyt krížových reakcií by sa mal vykonať ďalší test založený na inom biologickom princípe. V takomto prípade je najvhodnejším selektívny platňový rozter.

4) Selektívny platňový rozter

Citlivý a selektívny test pre Ralstonia solanacearum sa vykonáva na modifikovanej živnej pôde SMSA. Výsledok sa dostaví v priebehu 3 – 6 dní po príprave vzoriek. Pôvodca hnedej hniloby sa získa priamo z kultúry a dá sa ľahko identifikovať. Na plné využitie potenciálu testu je potrebná starostlivá príprava pupkových koncov hľúz, aby sa vylúčili sekundárne baktérie z hľúz, ktoré si na živnej pôde s Ralstonia solanacearum navzájom konkurujú a môžu tak vývoj patogéna ovplyvňovať. Je možné, že niektoré kmene môžu zle rásť, keďže zložky živnej pôdy môžu ovplyvňovať cieľový organizmus. Rovnako starostlivo treba postupovať pri odlišovaní Ralstonia solanacearum od iných baktérií, ktoré na živnej pôde môžu narásť. Selektívny platňový rozter možno použiť ako jediný skríningový test, ale pri negatívnom výsledku, pri ktorom je podozrenie, že ide o blokovanie Ralstonia solanacearum zo strany iných baktérií nachádzajúcich sa v živnej pôde, treba vzorku opäť testovať s použitím odlišného testu, aby sa diagnóza buď potvrdila, alebo vyvrátila. V takýchto prípadoch je najlepšie použiť test IF.

5) Test ELISA

Test ELISA je v zásade menej citlivý ako test IF (prah citlivosti 10^4 – 10^5 baktérií na 1 ml peletu zemiakového extraktu). Tento test je lacný a rýchly, ale všeobecne častejšie vykazuje falošné pozitívne výsledky (krížové reakcie) a rovnako aj falošné negatívne výsledky (brzdenie rastu fenolickými molekulami v zemiakovom extrakte). Požiadavky na špecifickosť antiséra sú neobyčajne vysoké. Test ELISA nemožno vykonávať samostatne ako jediný skríningový test.

6) Test PCR

Test PCR je potenciálne veľmi citlivým detekčným testom, i keď ho pomerne ľahko môžu inhibovať niektoré zložky extraktu z rastlín alebo z hľúz, čím vznikajú falošné negatívne výsledky testu. Keďže niektoré odrody zemiakov obsahujú viac inhibítorov ako iné, treba tieto inhibítory najprv odstrániť. Jednou z možností je riedenie, pričom však nastane aj zriedenie populácie Ralstonia solanacearum. Vo všetkých fázach prípravy vzorky a testu sa musí postupovať neobyčajne obozretne, aby sa zabránilo kontaminániám, ktoré vedú k získaniu falošne pozitívnych výsledkov. Falošne pozitívne výsledky sa môžu vyskytnúť i v dôsledku homológnych sekvencií iných organizmov. Preto sa nedá ani test PCR používať ako jediný skríningový test.

7) Obohacovací test

Inkubácia vzoriek peletu zo zemiakového extraktu v semiselektívnej živnej pôde, ako je napríklad modifikovaný živný roztok SMSA, umožňuje namnoženie Ralstonia solanacearum. Dôležitým faktom je, že tým sa zriedia potenciálne inhibítory testov ELISA a PCR. Prítomnosť baktérií Ralstonia solanacearum možno v obohatenom živnom roztoku určovať s pomocou testov IF, ELISA a PCR. Vykonávanie priamych rozterov z obohatených živných roztokov sa neodporúča. Tieto obohacovacie metódy však nie sú dostatočne dôkladne vyskúšané a otestované. Zahrnuté medzi metódy testovania boli len vďaka svojmu vysokému potenciálnemu významu. Keďže je k dispozícii len málo skúseností s týmito testmi, nedajú sa použiť ako jediné detekčné metódy.

8) Biotest

Tento test sa používa na izoláciu Ralstonia solanacearum z peletov zemiakového extraktu na hostiteľských rastlinách a vykonáva sa na rastlinách rajčiakov alebo baklažánov. Vyžadujú sa také optimálne inkubačné podmienky, aké sa pri tejto metóde špecifikujú. Baktérie inhibujúce Ralstonia solanacearum na médiu SMSA tento test s najvyššou pravdepodobnosťou nebrzdia.

9) Potvrdzovací(e) test(y)

Čistú kultúru Ralstonia solanacearum možno spoľahlivo identifikovať minimálne jedným z testov uvedených v časti B bode 4.1. v kombinácii s testom patogenity (časť B bod 4.3.). Charakterizácia kmeňa nie je povinná, odporúča sa však pre každý nový prípad.

ČASŤ B

Diagnostika hnedej hniloby hľúz zemiakov a baktériového vädnutia rastlín rajčiakov

1. Príznaky

1.1. Príznaky na zemiakoch

Rastlina zemiaka. V ranej fáze infekcie vädnú listy vo vrchnej časti rastlín pri vysokých teplotách v priebehu dňa a v priebehu noci regenerujú. Vädnutie sa však rýchlo stáva nezvratným a vedie k odumretiu rastliny. Vodivé pletivo na priečnych rezoch stonky zvädnutých rastlín môže zhnednúť a z reznej plochy vyteká mliečny slizovitý exkrét alebo ho odtiaľ možno ľahkým stlačením vytlačiť. Ak sa drží rozrezaná stonka vo vode vo zvislej polohe, vytekajú z cievnych zväzkov slizové vlákna.

Hľuza zemiaka. Hľuzy zemiakov sa musia v blízkosti pupkového (stolónového) konca priečne rozrezať. V ranej fáze infekcie sa nákaza prejavuje sklovito žltou až svetlohnedou farbou prstenca cievnych zväzkov, z ktorého po niekoľkých minútach buď samovoľne, alebo po vyvinutí ľahkého tlaku palcov na šupku v blízkosti reznej plochy vyteká bledý, krémovo sfarbený slizovitý exkrét. Neskôr je sfarbenie cievnych zväzkov výrazne hnedé a nekróza sa môže rozšíriť do parenchymatického pletiva. V pokročilom štádiu sa infekcia šíri od pupkového konca a očiek, čo vedie k vzniku ľahko vtlačených, červenkasto hnedých lézií na šupke. Z nich môže vytekať baktériový sliz, na ktorý sa nalepujú pôdne častice.

1.2. Príznaky na rajčiakoch

Rastlina rajčiaka. Prvým viditeľným príznakom je mierne zvädnutý vzhľad najmladších listov. Za podmienok priaznivých pre patogény (teplota pôdy asi 25 °C pri nasýtenej vzdušnej vlhkosti) je jedna strana rastliny alebo celá rastlina v priebehu niekoľkých dní postihnutá epinastiou a vädnutím a nastáva jej úplné odumretie. Za menej priaznivých podmienok (teplota pôdy pod 21 °C) sa na stonke môže začať tvoriť veľké množstvo postranných výhonkov. Na stonke možno pozorovať slizovitý pás, čo je viditeľným znakom nekrózy cievneho systému. Ak stonku priečne rozrežeme, vytekajú z jej hnedo sfarbeného vodivého pletiva kvapky bieleho alebo žltkastého baktériového slizu.

2. Rýchle skríningové testy

Rýchle skríningové testy umožňujú stanovenie predbežnej diagnózy. Treba vykonať jeden alebo viaceré z nasledujúcich testov.

2.1. Test cievnych zväzkov

Prítomnosť Ralstonia solanacearum vo vädnúcich stonkách zemiakov alebo rajčiakov sa dá preukázať týmto jednoduchým predbežným testom.

Odreže sa stonka tesne nad zemou a rezná plocha sa vloží do kadičky s vodou. Krátko potom začnú z cievnych zväzkov samovoľne prúdiť vlákna baktériového slizu. Žiadny iný druh baktérie spôsobujúci infekciu cievnych zväzkov pri zemiakoch a rajčiakoch takýto príznak nevyvoláva.

2.2. Určovanie prítomnosti granúl poly--hydroxybutyrátu (PHB)

Granuly PHB v bunkách Ralstonia solanacearum sa zviditeľnia sfarbením nílskou modrou A alebo sudánskou čiernou B.

Pripraví sa buď rozter slizovitého exkrétu či suspendovaného pletiva na podložnom sklíčku, alebo rozter zo 48-hodinovej kultúry na živnej pôde YPGA (časť D bod 1). Pripravia sa roztery pre pozitívne kontroly kmeňa rasy 3 biovaru 2 a v prípade potreby aj pre negatívny kontrolný rozter heterologného kmeňa. Rozter sa nechá vyschnúť. Spodná strana

podložného sklíčka sa niekoľkokrát rýchlo fixuje nad plameňom až do zasušenia.

2.3. Test nílskou modrou

2.3.1. Fixovaný rozter sa zaleje 1 % vodným roztokom nílskej modrej. Udržuje sa počas 10 minút pri teplote 55 °C.

2.3.2. Roztok farbiva sa nechá odtiecť. Krátko sa opláchne pod tečúcou vodou. Zvyšná voda sa odsaje pijavým papierom.

2.3.3. Rozter sa zaleje 8 % vodným roztokom kyseliny octovej. Udržuje sa počas 1 minúty pri laboratórnej teplote.

2.3.4. Opláchne sa pod slabo tečúcou vodou. Osuší sa pijavým papierom.

2.3.5. Znovu sa navlhčí kvapkou vody. Prikryje sa krycím sklíčkom.

2.3.6. Sfarbený rozter sa pozoruje ako preparát v epifluorescenčnom mikroskope pri vlnovej dĺžke 450 nm a olejovej imerzii pri zväčšení 1 : 1 000.

Pozorne sa sleduje prítomnosť sýtooranžovo sfarbených granúl PHB. Pozorovanie sa uskutočňuje i pri normálnom svetle, aby sa uistilo, že granuly sú vnútrobunkové a morfológia bunky je typická pre Ralstonia solanacearum.

2.4. Test sudánskou čiernou

2.4.1. Fixovaný rozter sa zaleje 0,3 % roztokom sudánskej čiernej B v 70 % etanole. Udržuje sa pri laboratórnej teplote 10 minút.

2.4.2. Roztok farbiva sa nechá odtiecť. Rozter sa potom krátko oplachuje pod tečúcou vodou. Prebytočná voda sa odsaje pijavým papierom.

2.4.3. Rozter sa nakrátko ponorí do xylolu. Po vytiahnutí sa opäť osuší pijavým papierom. (Upozornenie: Xylol je zdraviu škodlivá látka, nevyhnutne sa musí pracovať v digestore.)

2.4.4. Rozter sa zaleje 0,5 % (hmotnosť/objem) vodným roztokom safranínu a nechá sa počas 10 sekúnd stáť pri laboratórnej teplote. (Upozornenie: Safranín je zdraviu škodlivá látka, nevyhnutne sa musí pracovať v digestore.)

2.4.5. Rozter sa opláchne pod slabo tečúcou vodou. Osuší sa pijavým papierom. Priloží sa krycie sklíčko.

2.4.6. Sfarbený rozter sa pozoruje ako preparát v mikroskope s prechádzajúcim svetlom, s olejovou imerziou pri zväčšení 1 : 1 000. Granuly PHB v bunkách Ralstonia solanacearum sú modro-čierno sfarbené. Bunkové steny majú farbu ružovo-červenú.

2.5. Iné testy

Z iných testov sú vhodnými test IF (časť C bod 2), test ELISA (časť C bod 3) a test PCR (časť C bod 4).

3. Postup pri izolácii

3.1. Odoberie sa slizovitý exkrét alebo časti diskolorovaného pletiva z prstenca cievnych zväzkov zemiakovej hľuzy alebo z vodivých pletív stonky rastliny zemiaka alebo rajčiaka. Urobí sa suspenzia v malom objeme sterilizovanej destilovanej vody alebo v 50 $mmol.l^{-1}$ fosfátovom tlmivom roztoku, ktorá sa nechá 5 až 10 minút stáť.

3.2. Zo suspenzie sa pripravia minimálne dve desatinné riedenia (1/10 a 1/100), v prípade potreby aj viacero.

3.3. Štandardizovaný objem suspenzie a jednotlivých riedení sa prenesie na univerzálne živné médium (NA, YPGA a SPA, časť D bod 1) alebo na Kelmanovo tetrazóliové médium (časť D bod 1), alebo na selektívne médium SMSA (časť D bod 7). Riedenie sa rozotrie na platne s použitím primeranej metódy. Vhodné je pripraviť si samostatné platne z každého použitého média so zriedenou kultúrou bunkovej suspenzie rasy 3 biovaru 2 kmeňa Ralstonia solanacearum ako pozitívnu kontrolu.

3.4. Platne sa nechajú inkubovať pri teplote 28 °C 3 dni. Pri pomalom raste možno dobu

inkubácie predĺžiť na 6 dní, pričom sa však kolónie baktérií na médiu SMSA často stávajú atypickými a odumierajú.

Na univerzálnych živných substrátoch virulentné izoláty Ralstonia solanacearum vytvárajú perlovobiele, ploché, nepravidelné a fluidné kolónie, často s charakteristickými špirálkami.

Na Kelmanovom tetrazóliovom médiu vytvárajú virulentné izoláty Ralstonia solanacearum typické krémovo sfarbené, ploché, nepravidelné fluidné kolónie s krvavočerveno zafarbeným stredom.

Nevirulentné formy Ralstonia solanacearum naproti tomu vytvárajú maslovité, tmavočervené kolónie.

Na médiu SMSA vytvárajú virulentné izoláty Ralstonia solanacearum mliečnobiele, ploché, nepravidelné a fluidné kolónie s krvavočerveno zafarbeným stredom.

Nevirulentné formy Ralstonia solanacearum vytvárajú na médiu SMSA kolónie menej fluidné, ktoré sú úplne ružové až červené.

3.5. Kolónie s charakteristickou morfológiou sa subkultivujú až do čistej kultúry na niektorom univerzálnom médiu. Treba sa vyhnúť pravidelnému preočkovávaniu, ktoré by mohlo viesť až k strate virulencie.

4. Potvrdzovacie testy

4.1. Identifikácia Ralstonia solanacearum

Čisté kultúry Ralstonia solanacearum sa identifikujú minimálne jedným z nasledujúcich postupov.

Vyživovacie a enzymatické testy

4.1.1. Do každého použitého testu treba zahrnúť vhodné kontrolné kmene.
Vždy sú buď prítomné, alebo chýbajú nasledujúce univerzálne fenotypové vlastnosti Ralstonia solanacearum:

fluorescenčné pigmenty	-
inklúzie PHB	+
oxidačno-fermentačný (O/F) test	O+/F-
kataláza	+
oxidáza podľa Kovácsa	+
redukcia dusičnanov	+
využitie citranov	+

rast pri 40 °C	-
rast v 1 % roztoku NaCl	+
rast v 2 % roztoku NaCl	-
arginin-dihydroláza	-
skvapalnenie želatíny	-
hydrolýza škrobu	-
hydrolýza aezulínu	-
produkcia leváu	-

Médiá a metódy podľa Lelliott & Stead (1987)

4.1.2. Test IF

Pripraví sa suspenzia s hustotou 10^6 buniek na 1 ml z testovanej kultúry a kontrolného kmeňa (kontrolných kmeňov). Pripraví sa rad dvojnásobných riedení

antiséra. Použije sa metóda IF (časť C bod 2). IF titer kultúry musí zodpovedať IF titru pozitívnej kontroly.

4.1.3. Test ELISA

Pripraví sa suspenzia s hustotou $>10^6$ buniek na 1 ml z testovanej kultúry a kontrolného kmeňa (kontrolných kmeňov). Použije sa metóda ELISA (časť C bod 3). Extinkčná hodnota kultúry musí zodpovedať extinkčnej hodnote pozitívnej kontroly.

4.1.4. Test PCR

Pripraví sa suspenzia s hustotou 10^6 na 1 ml z testovanej kultúry a kontrolného kmeňa (kontrolných kmeňov). Použije sa metóda PCR (časť C bod 4). PCR produkt kultúry musí mať rovnakú veľkosť a rovnaký vzor reštrikčnej analýzy enzýmov (REA), ako má produkt pozitívnej kontroly.

4.1.5. Fluorescenčná hybridizácia in situ (FISH)

Pripraví sa suspenzia s hustotou 10^6 na 1 ml z testovanej kultúry a kontrolného kmeňa (kontrolných kmeňov). Použije sa metóda FISH (van Beuningen et al., 1995) s PCR primerom OLI-1 (Seal et al. 1993). Kultúra musí vykazovať rovnakú reakciu ako pozitívna kontrola.

4.1.6. Profilácia bielkovín

Denaturované bielkoviny celých buniek sú rozdelené polyakrylamidovou gélovou elektroforézou (PAGE) (Stead, 1992a).

4.1.7. Profilácia mastných kyselín (FAP)

Kultúra a pozitívna kontrola sa nechajú rásť 48 hodín pri teplote 28 °C na tryptikáznom sójovom agare s použitím metódy FAP (Fatty acid profilling) (Janse 1991; Stead 1992a, Stead 1992b). Profil kultúry sa musí zhodovať s profilom pozitívnej kontroly. Charakteristickými mastnými kyselinami za daných podmienok sú: 14 : 0 3OH, 16 : 0 2OH, 16 : 1 2OH a 18 : 1 2OH.

4.2. Charakteristika kmeňa

Charakterizácia kmeňa je fakultatívna, ale sa odporúča uskutočniť ju pre každý nový prípad s použitím aspoň jedného z nasledujúcich testov.

4.2.1. Určenie biovaru

Ralstonia solanacearum sa člení na biovary, a to podľa schopnosti vytvárať z troch hexózových alkoholov a troch cukrov kyseliny (Hayward 1964 & 1994).

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Využitie: 1					
- maltózy	-	+	+	-	+
- laktózy	-	+	+	-	+
- celobiózy	-	+	+	-	+
- manitolu	-	-	+	+	+
- sorbitolu	-	-	+	+	-
- dulcitolu	-	-	+	+	-

Ďalšími testmi sa dá biovar 2 rozčleniť na subfenotypy (Hayward 1994).

	biovar 2	biovar 2-A	biovar 2-T
Použitie trehalózy	-	+	+
Použitie inozitolu	+	-	+

Použitie D-ribózy	-	-	+
Pektolytická aktivita	nízka	nízka	vysoká

4.2.2. Určenie rás

Určenie rasy (Buddenhagen et al., 1962) sa vykoná na základe testov patogenity na rastlinách rajčiaka alebo baklažánu, na rastlinách tabaku a taktiež hypersenzitívnou reakciou (HR) na listoch tabaku (Lozano & Sequiera, 1970).

	rasa (*)		
	1	2	3
Reakcia na:			
rastlinách rajčiakov/baklažánov	vädnutie	žiadna reakcia	vädnutie
rastlinách tabaku	vädnutie	žiadna reakcia	žiadna reakcia
listoch tabaku	nekróza (48 hodín)	HR (12-24 hodín)	chloróza (za 2 - 8 dní)
	a vädnutie (7-8 dní)		

(*) Rasa 4 (patogénna na zázvorovníku a niektorých ďalších hostiteľoch) a rasa 5 (patogénna iba na moruši) nie sú v tejto tabuľke zahrnuté.

4.2.3. Určenie rasy testom patogenity alebo testom hypersenzitívnej reakcie tabaku nemusí byť príliš spoľahlivé a namiesto toho sa dá na príslušnosť k rase usudzovať podľa biovaru a pôvodného hostiteľa.
Kultúru možno ďalej charakterizovať týmito znakmi:

Genómová peptidová mapa

Molekulárne odlíšenie kmeňov v rámci komplexu Ralstonia solanacearum sa dá vykonať analýzou RFLP (Cook et al., 1989).

Repetitívna sekvencia PCR (REP-, ERIC- & BOX-PCR (Louws et al., 1995; Smith et al., 1995).

4.3 Test patogenity

Tento test je zameraný na potvrdenie správnosti určenia Ralstonia solanacearum a na vyhodnotenie virulencie kultúr identifikovaných ako Ralstonia solanacearum.

Z kultúry a pozitívneho kontrolného kmeňa sa pripraví inokulum s hustotou 10^6 buniek na 1 ml. Potom sa naočkuje 5 – 10 rastlín rajčiaka alebo baklažánu, a to najlepšie v štádiu tretieho pravého listu alebo v neskoršom štádiu (časť C bod 6). Dĺžka kultivácie je dva týždne pri teplotách 22 °C až 28 °C a vysokej relatívnej vzdušnej vlhkosti. Denne sa zavlažuje. Treba sledovať výskyt vädnutia alebo epinastií, chloróz a zakrpatievania rastlín. Z rastlín vykazujúcich charakteristické príznaky sa pripravia nasledujúcim postupom izoláty:

4.3.1. zo stonky sa vo výške asi 2 cm nad miestom očkovania odoberie pletivo,

4.3.2. odobraté pletivo sa rozotrie a suspenduje v sterilizovanej destilovanej vode alebo v 50 $mmol.l^{-1}$ fosfátovom tlmivom roztoku, potom sa suspenzia rozotrie na platne, inkubuje a nasledujúco sa vyhodnotí výskyt typických kolónií Ralstonia solanacearum.

ČASŤ C

Určovanie a identifikácia Ralstonia solanacearum vo vzorkách hľúz zemiakov

Štandardná veľkosť vzorky je 200 hľúz. Postup je však vhodný i pre vzorky s menej ako 200 hľuzami.

1. Príprava vzorky pre test

Pelet zemiakového extraktu získaný týmto postupom možno použiť i na detekciu baktérie Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus.

a) Vzorky sa nechajú inkubovať 2 týždne pri teplote 25 – 30 °C, aby sa podporilo pomnoženie malých populácií Ralstonia solanacearum.

b) Hľuzy sa očistia pod tečúcou vodou vhodným dezinfekčným a čistiacim prostriedkom a nechajú sa na vzduchu vyschnúť.

1.1. Čistým, dezinfikovaným skalpelom alebo zeleninovým nožom sa odstráni šupka hľuzy na jej pupkovom konci tak, aby bolo vidieť vodivé pletivo. Z vodivého pletiva na pupkovom konci každej hľuzy sa opatrne vyreže na jej pupkovom konci malý kužeľovitý kúsok (3 – 5 mm v priemere). Pritom treba dbať súčasne na to, aby sa vyrezalo čo najmenej nevodivých pletív. To sa uskutoční na každej hľuze vo vzorke.

V tejto fáze možno hľuzy dôkladne vizuálne prehliadnuť (časť B bod 1). Hľuzy vykazujúce symptómy alebo silnú hnilobu treba vyradiť a skúmať oddelene (časť B).

1.2. Pupkové konce hľuzy sa dajú do uzatvorenej nádoby. Vzorka by mala byť urýchlene spracovaná. Ak to nie je možné, nemala by sa skladovať dlhšie ako 24 hodín alebo pri teplote 4 °C dlhšie ako 72 hodín.

1.3. Pupkové konce hľúz sa spracujú jedným z nasledujúcich postupov:

1.3.1. Pupkové konce hľúz sa vložia do vhodnej nádoby.

Pridá sa dostatočný objem maceračného pufra (časť D bod 2), aby boli pupkové konce hľúz prikryté (40 ml 0,05 mol.l^{-1} PBS).

Kúsky hľúz sa v mixéri Waring Blender alebo Ultra Turrax homogenizujú.

Je však potrebné zabrániť príliš silnej homogenizácii.

Macerát necháme 15 – 30 minút lúhovať.

1.3.2. Pupkové konce hľúz sa vložia do vhodnej nádoby.

Pridá sa dostatočný objem maceračného pufra, aby sa pupkové konce hľúz prekryli (40 ml 0,05 mol.l^{-1} PBS).

Nádoba sa dá do rotačnej trepačky.

Udržovať pri 50 – 100 otáčkach za minútu 4 hodiny pri teplote 20 °C/22 °C alebo 16 – 24 hodín pri teplote 4 °C.

1.3.3. Pupkové konce hľúz sa vložia do pevného jednorazového maceračného vrecúška (napríklad Stomacher s rozmermi 105 x 150 mm a sterilizovaného ožiarením).

Pupkové konce hľúz sa rozmelnia vhodným nástrojom, napríklad kladivom, až do ich úplnej homogenizácie.

Pridá sa dostatočné množstvo maceračného pufra, aby boli pupkové konce hľúz prekryté.

Macerát sa nechá 15 – 30 minút odstáť.

1.4. Z takto pripravených pupočných koncov hľúz sa baktérie extrahujú niektorým z nasledujúcich postupov:

1.4.1. Macerát sa opatrne naleje do centrifugačnej skúmavky, tuhý zvyšok sa pritom ponechá v nádobe alebo vo vrecúšku.

Ak je zliaty macerát kalný, potom sa odstreďuje pri teplote pod 10 °C 10 minút pri odstredivej sile nie väčšej ako 180 g.

Zliaty macerát alebo supernatant z prvého odstreďovania sa odstredí 15 minút pri 7 000 g alebo 10 minút pri 10 000 g pri teplote pod 10 °C.

Supernatant sa vyleje tak, aby sa neporušil vzniknutý pelet.

1.4.2. Macerát sa prefiltruje cez filtračný systém so šírkou pórov 40 – 100 mm. Filtráciu treba posilniť vákuovým čerpadlom.

Filtrát sa zhromaždí v centrifugačnej skúmavke.

Filtrát sa premyje maceračným pufrom.

Filtrát sa odstredí 15 minút pri 7 000 g alebo 10 minút pri 10 000 g pri teplote pod 10 °C.

Supernatant sa vyleje tak, aby sa neporušil vzniknutý pelet.

1.5. Pelet sa resuspenduje v 1 ml peletového pufra (časť D bod 2).

Rozdelí sa na dva rovnaké diely a každý z nich sa naleje do jednej mikroskúmavky.

Pre test sa používa len jedna mikroskúmavka.

Zvyšok tohto extraktu sa skladuje počas testovania pri teplote 4 °C.

Do druhej mikroskúmavky sa prileje 10 – 25 % sterilný glycerín. Pretrepe sa. Skladuje sa pri teplote –18 °C (niekoľko týždňov) alebo pri teplote –70 °C (niekoľko mesiacov).

2. Test IF

Použije sa antisérum Ralstonia solanacearum, najlepšie rasa 3 biovar 2. Určí sa titer pri suspenzii s hustotou 10^6 buniek na ml homologického kmeňa Ralstonia solanacearum s vhodným zriedením konjugátu fluorescenčného isothiokyanátu (FITC) podľa odporúčania výrobcu. Surové sérum by malo mať IF titer minimálne 1 : 2 000.

Použije sa viacobjektové podložné sklíčko najlepšie s 10 jamkami s minimálnym priemerom 6 mm.

Na každé podložné sklíčko sa nanesie kontrola konjugátu FITC. Ak sa pracuje s veľkým množstvom podložných sklíčok, môže sa vynechať kontrola s fosfátovým pufrom (PBS). Test by sa však mal opakovať s kontrolou PBS, ak sa v kontrole FITC nenájde žiadna pozitívna bunka.

Osobitne sa pripraví kontrolné pozitívne podložné sklíčko so suspenziou s hustotou 10^6 buniek na mililiter niektorého kmeňa Ralstonia solanacearum príslušnej rasy a biovaru. V každej sérii testovaní sa musí použiť jedno podložné sklíčko.

2.1. Podložné sklíčka sa pripravia jedným z nasledujúcich postupov:

2.1.1. Pri pelete s relatívne malým obsahom škrobu:

Odmeraný štandardný objem (15 µl je postačujúci pre jamku s priemerom 6 mm – pri väčších jamkách treba použiť zodpovedajúci väčší objem resuspendovaného peletu) sa nanesie pipetou na rad jamiek. Ďalší rad sa môže použiť ako duplikát alebo pre druhú vzorku, ako je znázornené na obrázku č. 1.

2.1.2. Pri iných peletoch

Pripraví sa desatinné riedenie, to znamená 1/10, 1/100 a 1/1 000 resuspendovaného peletu v peletovom pufri. Odmeraný štandardný objem (15 µl je postačujúci pre jamku s priemerom 6 mm – pri väčších jamkách treba použiť zodpovedajúci väčší objem) resuspendovaného peletu a z každého zriedenia sa nanesie pipetou na rad jamiek. Ďalší rad sa môže použiť ako duplikát alebo pre druhú vzorku, ako je znázornené na obrázku č. 2.

2.2. Kvapky sa nechajú vyschnúť. Baktériové bunky sa fixujú na podložnom sklíčku buď zahriatím, flambovaním, alebo 95 % etanolom.

2.3. Postup pri IF

2.3.1. Pri príprave podložného sklíčka podľa bodu 2.1.1.

Pripraví sa sada dvojnásobných zriedení antiséra v IF pufri (časť D bod 3):

1/4 titra (T/4), 1/2 titra (T/2), jeden titer (T) a dvojnásobok titra (2T).

2.3.2. Pri príprave podložného sklíčka podľa bodu 2.1.2.

Pripraví sa pracovné riedenie antiséra v IF pufri. Pracovné riedenie je riedenie antiséra s optimálnou špecifickosťou a normálne má polovicu hodnoty titra.

Obrázok 1

Príprava podložného sklíčka postupom podľa bodov 2.1.1 a 2.3.1.

Jedno štandardné riedenie resuspendovaného peletu
T = titer

	FITC	T/4	T/2	T	2T	=> dvojnásobné riedenia antiséra
vzorka 1	• 1	•2	• 3	•4	• 5	
duplikát vzorky 1 alebo vzorka 2	• 6	• 7	• 8	•9	• 10	

Obrázok 2

Príprava podložného sklíčka postupom podľa bodov 2.1.2. a 2.3.2.

Jedno štandardné riedenie resuspendovaného peletu
T = titer

	FITC	Štandardné riedenie antiséra				
	Neriedené	Neriedené	1/10	1/100	1/1000	=> desaťnásobné riedenia antiséra
vzorka 1	• 1	•2	•3	•4	• 5	
duplikát vzorky 1						
alebo vzorka 2	• 6	• 7	•8	•9	• 10	

2.3.3. Všetky podložné sklíčka sa vyložia na vlhké hodvábne papiere.

Všetky testovacie jamky sa pokryjú riedeniami antiséra. Na pole FITC sa nanesie fosfátový pufer PBS. Objem antiséra nanášaný na políčka musí zodpovedať objemu naneseného extraktu.

2.3.4. Nechá sa zakryté 30 minút pri izbovej teplote.

2.3.5. Kvapky antiséra sa opatrne strasú z podložného sklíčka a podložné sklíčka sa opatrne opláchnu IF pufrom. Preplachuje sa 5 minút v roztoku IF pufri Tween

a potom 5 minút v IF pufri (časť D bod 3).

Prebytočná vlhkosť sa starostlivo odstráni.

2.3.6. Podložné sklíčka sa položia na vlhké hodvábne papiere.

Testovacie jamky a jamka s FITC sa pokryje riedením konjugátu FITC použitým na stanovenie titra. Objem konjugátu nanášaný na jamky musí zodpovedať objemu aplikovaného antiséra.

2.3.7. Nechá sa zakryté 30 minút pri laboratórnej teplote.

2.3.8. Kvapky konjugátu sa opatrne strasú z podložného sklíčka. Opláchnu sa a prepláchnu rovnako ako v bode 2.3.3. Prebytočná vlhkosť sa starostlivo odstráni.

2.3.9. Na každú jamku sa napipetuje 5 až 10 µl 0,1 $mol.l^{-1}$ glycerolu pufrovaného fosfátom (časť D bod 3) alebo inej podobnej krycej kvapaliny a priloží sa krycie sklíčko.

2.4. Hodnotenie testu IF

Podložné sklíčka sa prehliadajú pod epifluorescenčným mikroskopom s filtrami vhodnými na excitáciu FITC pod olejovou imerziou pri zväčšení 500 – 1000 x. Každé políčko sa mikroskopicky prehliada vo dvoch navzájom kolmých priemeroch a taktiež po obvode.

Najprv sa prehliadajú podložné sklíčka s pozitívnou kontrolou. Bunky musia jasne fluoreskovať a musia byť plne sfarbené. (Pri odlišnom sfarbení treba test opakovať.)

Vyhodnotenie podložných sklíčok s testovanými vzorkami. Najprv sa preskúmajú preparáty z hľadiska absencie fluoreskujúcich buniek v jamkách s kontrolou FITC. Fluoreskujúce bunky v kontrolnej jamke FITC ukazujú na nešpecifickú väzbu konjugátu, na autofluorescenciu alebo na kontamináciu. (Ak sa dôjde k tomuto záveru, treba test opakovať.)

V testovacích jamkách sa pozorujú silne fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou Ralstonia solanacearum. Intenzita fluorescencie musí zodpovedať pozitívnemu kontrolnému kmeňu pri rovnakom riedení antiséra. Na bunky s neúplným sfarbením alebo so slabou fluorescenciou sa neberie ohľad, iba ak by bolo takýchto buniek prítomných veľmi mnoho (pozri vyhodnotenie výsledkov testov IF).

2.5. Vyhodnotenie výsledkov testu IF

2.5.1. Ak nie sú nájdené silne fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou, test IF je negatívny.

2.5.2. Ak sú nájdené jasne fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou, je potrebné určiť priemerný počet buniek na mikroskopickom poli a ten prepočítať na jeden mililiter (hodnota N) resuspendovaného peletu (časť D bod 4).
Hustotu baktérií v hodnote asi 10^3 buniek na jeden mililiter resuspendovaného peletu možno považovať za hranicu detekcie testu IF
– pri vzorkách s $N > 10^3$ buniek na 1 ml resuspendovaného peletu sa výsledok testu IF hodnotí ako pozitívny,
– pri vzorkách s $N < 10^3$ buniek na 1 ml resuspendovaného peletu sa výsledok testu IF môže hodnotiť ako pozitívny.

2.5.3. Ak je zistený vysoký počet ($>10^5$ buniek na 1 mililiter) s neúplne alebo slabo fluoreskujúcimi bunkami pri titre antiséra, treba uskutočniť druhý test
– buď test na základe niektorého iného biologického princípu, alebo
– opakovaný test IF buď s druhým antisérom, alebo s desaťnásobným zriedením peletu.

3. Test ELISA

(Podľa Robinsona-Smitha et al., 1995)

Použije sa antisérum pre Ralstonia solanacearum, najlepšie k rase 3 biovaru 2. Titer sa stanovuje v suspenzii s hustotou 10^6 na 1 ml buniek homologického kmeňa Ralstonia solanacearum.

Odporúča sa používať mikrotitračné doštičky NUNC-Polysorb.

Test by mal zahŕňať negatívnu kontrolu zemiakového extraktu a kontrolu fosfátového pufra (PBS).

Ako pozitívna kontrola sa použije suspenzia s hustotou 10^6 buniek na 1 ml z kmeňa vhodnej rasy alebo biovaru Ralstonia solanacearum. Test sa uskutoční rovnako ako pri vzorke, ale oddelene od vzoriek na mikrotitračnej doštičke.

3.1. Do mikroskúmavky sa napipetuje 100 – 200 µl resuspendovaného peletu. Obsah mikroskúmavky sa zahrieva štyri minúty pri teplote 100 °C. Potom sa mikroskúmavka položí na ľad.

3.2. Pridá sa alikvotný objem dvojnásobne silného uhličitanového krycieho pufra (časť D bod 5) a premieša sa.

3.3. Do najmenej dvoch jamiek mikrotitračnej doštičky sa dá vždy po 100 µl objemu zmesi. Inkubuje sa jednu hodinu pri teplote 37 °C alebo cez noc pri teplote 4 °C.

3.4. Extrakty z jamiek sa celkom odstránia. Jamky sa vymyjú trikrát fosfátovým pufrom (PBS) s Tweenom (časť D bod 5), pričom by posledný premývací roztok mal v jamkách zostať aspoň 5 minút.

3.5. Pripraví sa vhodné riedenie antiséra Ralstonia solanacearum v blokačnom (protilátkovom) pufri (časť D bod 5). Do jamiek sa dá po 100 µl riedeného antiséra.

Inkubuje sa jednu hodinu pri teplote 37 °C.

3.6. Antisérum z jamiek sa celkom odstráni. Jamky sa vymyjú rovnakým spôsobom, ako je už opísané (3.4.).

3.7. Pripraví sa vhodné riedenie konjugátu alkalickej fosfatázy v blokačnom pufri. Do jamiek sa dá po 100 µl riedeného konjugátu.

Inkubuje sa jednu hodinu pri teplote 37 °C.

3.8. Konjugát z jamiek sa celkom odstráni. Jamky sa vymyjú rovnakým, už opísaným spôsobom (3.4., 3.6.).

3.9. Pripraví sa substrátový alkalický roztok fosfatázy (časť D bod 5). Pipetuje sa po 100 µl do jamiek. Uchováva sa v tme pri laboratórnej teplote 30 až 60 minút.

3.10. Absorbancia sa odčíta pri vlnovej dĺžke 409 nm.

3.11. Vyhodnotenie výsledkov testu ELISA

Výsledok testu ELISA je negatívny vtedy, ak je optická hustota (OD) vzorky < 2 x OD negatívnej kontroly.

Výsledok testu ELISA je pozitívny vtedy, ak je optická hustota (OD) vzorky > 2 x OD negatívnej kontroly.

4. Test PCR

(Podľa Seala et al., 1993)

Pri všetkých krokoch prípravy vzorky aj všetkých ostatných činnostiach pri PCR sa musia používať špičky pipiet s filtrom.

Ako pozitívna kontrola sa pripraví suspenzia kmeňa Ralstonia solanacearum rasy 3 biovaru 2

s hustotou 10^6 buniek na 1 ml. Test pri tejto kontrole sa uskutoční úplne rovnakým postupom ako pri vzorke.

4.1. Napipetuje sa 100 µl resuspendovaného peletu do mikroskúmavky. Alternatívne možno pipetovať 90 µl resuspendovaného peletu do mikroskúmavky, ktorá obsahuje 10 ml 0,5 $mol.l^{-1}$ NaOH. Mieša sa opakovaným prevracaním mikroskúmavky.

4.2. Zahrieva sa 4 minúty pri teplote 100 °C. Mikroskúmavka sa potom ihneď premiestni na ľad.

4.3. Pripravia sa minimálne dve decimálne riedenia, napr. 1/10 a 1/100, alebo v prípade potreby viacnásobné v sterilizovanej destilovanej vode alebo ultračistej vode (UPW).

4.4. V sterilnej skúmavke sa pripraví reakčná zmes pre PCR (časť D bod 6) tak, že sa pridávajú nasledujúce zložky v tomto poradí:

4.4.1. Pre reakčný objem 50 µl:

Zložka	Množstvo	Konečná koncentrácia
sterilizovaná destilovaná voda alebo UPW	30,8 až 33,8 µl	
10 x PCR pufer	5,0 µl	1 x
d-ATP	1,0 µl	0,2 $mmol.l^{-1}$
d-CTP	1,0 µl	0,2 $mmol.l^{-1}$
d-GTP	1,0 µl	0,2 $mmol.l^{-1}$
d-TTP	1,0 µl	0,2 $mmol.l^{-1}$
Primer OLI-1 (20 µM)	2,5 µl	1 $mol.l^{-1}$
Primer Y-2 (20 µM)	2,5 µl	1 $mol.l^{-1}$
Taq-polymeráza (5 U/µl)	0,2 µl	1,0 U
Celkový objem	45 až 48 µl	

4.4.2. Pre viac reakcií

Treba vypočítať množstvo každej zložky pre požadovaný počet reakcií.

Zložky sa zmiešajú a 45 až 48 µl zmesi sa dá do sterilných skúmaviek na PCR.

Skúmavky s reakčnou zmesou PCR sa položia na ľad.

4.4.3. Pre reakčný objem 25 µl

Množstvo zložiek sa zodpovedajúcim spôsobom zmenší.

4.5. PCR amplifikácia

4.5.1. Fakultatívne: Skúmavky s povarenou vzorkou a pozitívnou kontrolou sa odstredia na pulznej centrifúge.

Do skúmaviek s reakčnou zmesou PCR sa pridá v uvedenom poradí 2 – 5 µl vzorky, vodná kontrola a pozitívna kontrola. Skúmavky sa postavia do ohrievacieho bloku termocyklera DNA.

4.5.2. Spustí sa nasledujúci program

1 cyklus

a) 2 minúty pri teplote 96 °C (denaturácia matrice);

50 cyklov

b) 20 sekúnd pri teplote 94 °C (denaturácia),

c) 20 sekúnd pri teplote 68 °C (pripájanie primerov),

d) 30 sekúnd pri teplote 72 °C (predlžovanie kópie);

1 cyklus

e) 10 minút pri teplote 72 °C (ďalšie predlžovanie kópie);

1 cyklus

f) uchovávať pri teplote 4 °C.

Tieto parametre sa vzťahujú na teplotný cykler Perkin Elmer 9600. Pri iných termocykleroch je prípadne nevyhnutná vrstva minerálneho oleja v reakčnej skúmavke PCR alebo zmena trvania v amplifikačnom profile.

4.5.3. Skúmavky sa vyberú z termocyklera. Analyzuje sa PCR produkt. Ak sa to nedá uskutočniť hneď, uložia sa skúmavky na použitie v tom istom dni pri teplote 4 °C a na neskoršie použitie sa skladujú pri teplote –18 °C.

4.6. Analýza PCR produktu

Fragmenty PCR sa detekujú agarózovou gélovou elektroforézou a sfarbením ethidiumbromidom.

4.6.1. Pripraví sa vhodný agarózový gél tak, že agaróza sa opatrne povarí v elektroforetickom tris-octanovom pufri (TAE).

4.6.2. Rozvarená agaróza sa ochladí na teplotu asi 50 – 60 °C, naplní sa ňou gélová nalievacia komora elektroforetickej aparatúry a nasadí sa hrebeň. Roztok sa nechá stuhnúť.

4.6.3. Hrebeň sa vyberie. Gél sa ponorí do pufra TAE tak, aby bol pokrytý vrstvou pufra silnou asi 2 – 3 mm.

4.6.4. Na parafilm sa nanesie kvapka nanášacieho pufra s objemom 3 µl. Pridá sa 12 µl PCR produktu zo vzoriek, z pozitívnej kontroly alebo vodnej kontroly a pred naplnením sa zamieša jemným odsatím do špičky pipety. Uvedené objemy sa môžu v závislosti od kapacity jamiek v agarózovom géli upraviť.

4.6.5. Jamky v géli sa opatrne naplnia. Do najmenej jednej jamky sa dá na porovnanie príslušný DNA marker.

4.6.6. Elektroforetická aparatúra sa pripojí k napájaciemu zdroju. Elektroforéza sa robí pri hodnotách 5 až 8 $V.cm^{-1}$, pokiaľ sa čelo značeného indikátora nebude nachádzať vo vzdialenosti do 1 cm od konca gélu.

4.6.7. Vypne sa prívod prúdu do elektroforetickej aparatúry. Gél sa opatrne vyberie a nechá 30 – 45 minút presycovať roztokom ethidiumbromidu.

(Pri manipulácii s ethidiumbromidom, ktorý je silno mutagénnou látkou, sa používajú vždy jednorazové rukavice.)

4.6.8. Farbivo z gélu sa vymýva v destilovanej vode 10 až 15 minút.

4.6.9. Zosilnený fragment DNA sa zviditeľní ultrafialovou transiluináciou. PCR produkt Ralstonia solanacearum s primermi OLI-1 a Y-2 má dĺžku 288 párov báz. Porovná sa s DNA markerom a s pozitívnou kontrolou.

(Vodná kontrola musí byť v každom prípade negatívna. Ak by vychádzala ako pozitívna, musí sa test opakovať.)

4.6.10. Gél možno z dokumentačných dôvodov vyfotografovať.

4.6.11. Pravosť zosilneného fragmentu sa potvrdí analýzou reštrikčných fragmentov (REA).

4.7. Analýza reštrikčným enzýmom (REA)

4.7.1. 8,5 µl PCR produktu (4.5.3.) sa dá do novej mikroskúmavky. Pridá sa 1 µl 10x enzýmového pufra a 0,5 µl reštrikčného enzýmu Avall.

4.7.2. Mieša sa jemným fúkaním do špičky pipety. Ak na stenách mikroskúmavky

zostávajú kvapôčky, vzorka sa pulzným spôsobom odstredí v mikroodstredivke. Udržuje sa asi hodinu pri teplote 37 °C.

4.7.3. Digerovaný fragment PCR sa analyzuje ako predtým (4.6.) agarózovou gélovou elektroforézou.

4.8. Vyhodnotenie výsledkov testu PCR

Test PCR je negatívny, ak nebol dokázaný charakteristický 288 bp fragment a tento fragment bol pritom detekovaný v pozitívnom kontrolnom kmeni Ralstonia solanacearum.

Test PCR je pozitívny, ak bol dokázaný 288 bp fragment a analýza REA ukazuje, že amplifikovaný fragment je identický s pozitívnym kontrolným kmeňom Ralstonia solanacearum.

5. Selektívny platňový rozter

(Podľa Elphinstona et al., 1996)

5.1. Test sa vykoná vhodnou zrieďovacou platňovou technikou rozterov, napríklad

5.1.1. Pripravia sa minimálne dve desatinné riedenia, t. j. 1/10 a 1/100 alebo viac riedení resuspendovaného peletu v peletovom pufri. Odmeraný štandardný objem (50 až 100 µl) resuspendovaného peletu a každého riedenia sa napipetuje na modifikované selektívne SMSA médium (časť D bod 7) a sklenou tyčinkou sa rozprestrie po celej ploche média.

Ak sa to ukáže ako účelné, treba 10 µl očkom vykonať zrieďovací rozter resuspendovaného peletu. Medzi roztermi sterilizovať očko plameňom.

5.1.2. Odmeraný štandardný objem (50 až 100 µl) resuspendovaného peletu sa nanesie na modifikované selektívne SMSA médium a sklenou tyčinkou sa rozotrie na najmenej dve ďalšie platne s modifikovaným substrátom SMSA.

5.2. Rovnakou zrieďovacou platňovou technikou rozteru sa nanesie suspenzia virulentného kmeňa Ralstonia solanacearum rasa 3 biovar 2 s hustotou 10^6 buniek v 1 ml na pozitívnu kontrolu na sadu samostatných platní s modifikovaným SMSA médiom.

5.3. Platne sa nechajú inkubovať pri teplote 28 °C. Po 3 dňoch sa urobí prvá kontrola platní. Pri negatívnom náleze sa nechá inkubovať ďalej, až do 6 dní. Virulentné izoláty Ralstonia solanacearum vytvárajú mliečnobiele, ploché, nepravidelné a fluidné kolónie, ktorých stred je červeno až purpurovo sfarbený s prúžkami alebo so špirálkami.

5.4. Kolónie s charakteristickou morfológiou sa prevádzajú preočkovaním do čistej kultúry na univerzálnom médiu (časť D bod 1).

5.5. Čisté kultúry sa identifikujú (časť B bod 4.1.) a kultúry Ralstonia solanacearum sa potvrdia testom patogenity (časť B bod 4.3.).

5.6. Vyhodnotenie výsledkov testu selektívneho platňového rozteru

Test selektívneho platňového rozteru je negatívny, ak sa po šiestich dňoch nedajú izolovať žiadne kolónie baktérií, alebo ak nie sú izolované žiadne charakteristické kolónie Ralstonia solanacearum, za predpokadu, že sa nepredpokladá inhibícia kolóniami iných baktérií a že v pozitívnych kontrolách neboli nájdené charakteristické kolónie Ralstonia solanacearum.

Test selektívneho platňového rozteru je pozitívny, ak boli izolované charakteristické kolónie Ralstonia solanacearum.

6. Biotest

(Podľa Janseho, 1988)

6.1. Pre každú vzorku je potrebné použiť 10 testovacích rastlín náchylných semenáčikov rajčiaka (odr. Money Maker) alebo baklažánu (odr. Black Beauty) v štádiu tretieho listu.

Testované rastliny pred očkovaním 24 hodín nepolievať.

6.2. 100 µl resuspendovaného peletu sa rozdelí na testované rastliny. Inokuluje sa stopka medzi pošvami na jednom alebo viacerých ďalších miestach.

6.3. Rovnakou technikou sa naočkuje 10 semenáčikov suspenziou virulentného kmeňa Ralstonia solanacearum rasa 3 biovar 2 s hustotou 10^6 buniek v 1 ml na pozitívnu kontrolu a peletovým pufrom na negatívnu kontrolu.

Aby sa predišlo krížovej kontaminácii, oddelia sa pozitívne kontrolné rastliny od ostatných.

6.4. Testované rastliny sa nechajú ďalej rásť pri teplotách 22 až 28 °C a pri vysokej relatívnej vzdušnej vlhkosti až do 4 týždňov. Denne sa rastliny polievajú. Sleduje sa prítomnosť príznakov vädnutia, epinastie, chlorózy alebo zakrpatenia.

6.5. Z infikovaných rastlín sa urobí izolácia (časť B). Identifikujú sa čisté kultúry s charakteristickou morfológiou (časť B. bod 4.1.) a kultúry Ralstonia solanacearum sa potvrdia testom patogenity (časť B. bod 4.3.).

6.6. V prípade potreby sa preskúma, či tie testované rastliny, ktoré nevykazujú žiadne príznaky infekcie, neboli infikované. Z každej testovanej rastliny sa odoberie 2 cm nad miestom naočkovania 1 cm dlhý úsek stonky. Odobrané časti pletív sa homogenizujú v maceračnom pufri. Vykoná sa test zrieďovacou platňovou technikou (časť C. bod 5.1.). V prípade pozitívneho nálezu sa identifikujú čisté kultúry s charakteristickou morfológiou (časť B. bod 4.1.) a pozitívne kultúry sa potvrdia vykonaním testu patogenity (časť B. bod 4.3.).

6.7. Vyhodnotenie výsledkov biotestu

Výsledok biotestu je negatívny, ak rastliny nie sú infikované Ralstonia solanacearum, za predpokladu, že prítomnosť baktérií Ralstonia solanacearum bola zistená v pozitívnych kontrolách.

Výsledok biotestu je pozitívny, ak sú testované rastliny infikované baktériami Ralstonia solanacearum.

7. Obohacovací test

(Podľa Elphinstona et al., 1996)

7.1. 100 µl resuspendovaného peletu sa prenesie do 3 ml modifikovaného bujónu média SMSA (časť D bod 7).

7.2. Nechá sa inkubovať 48 hodín, ale v žiadnom prípade nie dlhšie ako 72 hodín, pri teplote 28 °C, a to pri odkrytom uzávere skúmavky, aby sa zabezpečilo vetranie.

7.3. Skúmavka sa uzavrie viečkom a pretrepe sa. Rozdeliť množstvo pre test IF (bod 2), pre test ELISA (bod 3) alebo test PCR (bod 4).

8. Test patogenity

Platí preň postup uvedený v časti B bode 4.3.

ČASŤ D

Príprava testovacích materiálov, živných pôd, pufrov, iných roztokov a činidiel

1. Živné médiá na izoláciu a kultiváciu Ralstonia solanacearum

1.1. Živný agar (NA)

živný agar (Difco)	23 g
destilovaná voda	1 l

V litrovej banke sa pripraví 0,5 litra objemu média.
Zložky sa rozpustia.
Sterilizuje sa 15 minút v autokláve pri teplote 121 °C.
Ochladí sa na 50 °C. Rozleje sa na platne.

1.2. Kvasničnо-peptónovo-glukózový agar (YPGA)

kvasničný extrakt (Difco)	5 g
baktopeptón (Difco)	5 g
monohydrát D (+) glukózy	10 g
baktoagar (Difco)	15 g
destilovaná voda	1 l

V litrovej banke sa pripraví 0,5 litra objemu média.
Zložky sa rozpustia.
Sterilizuje sa 15 minút v autokláve pri teplote 121 °C.
Ochladí sa na 50 °C. Rozleje sa na platne.

1.3. Sacharózo-peptónový agar (SPA)

sacharóza	20 g
peptón	5 g
K_2BPO_4	0,5 g
$MgSO_4$. 7 H_2O	0,25 g
baktoagar (Difco)	15 g
destilovaná voda	1 l

V litrovej banke sa pripraví 0,5 litra objemu média.
Zložky sa rozpustia. V prípade potreby sa upraví pH na 7,2 - 7,4.
Sterilizuje sa 15 minút v autokláve pri teplote 121 °C.
Ochladí sa na 50 °C. Rozleje sa na platne.

1.4. Kelmanovo tetrazoliové médium

kyseliny kazmĺnové (Difco)	1 g baktopeptón (Difco)
10 g dextróza	5 g baktoagar (Difco)
15 g destilovaná voda	1 l

V litrovej banke sa pripraví 0,5 litra objemu média.
V prípade potreby sa upraví pH na 7,0. Zložky sa rozpustia.
Sterilizuje sa 15 minút v autokláve pri teplote 121 °C.
Ochladí sa na 50 °C. Pridá sa sterilizovaný vodný roztok trifenyl-tetrazoliumchloridu (Sigma) až do dosiahnutia konečnej koncentrácie 50 $mg.l^{-1}$. Rozleje sa na platne.

2. Materiál na prípravu vzoriek

2.1. Maceračný pufer: 50 $mmol.l^{-1}$ fosfátový pufer, pH 7,0
Tento pufer sa používa na macerovanie pletív.

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
NaCl	8 g
destilovaná voda	1 l

Zložky sa rozpustia a skontroluje sa pH. Podľa potreby sa vykoná alikvotácia.
Sterilizuje sa v autokláve 15 minút pri teplote 121 °C.
Pri vykonávaní priameho testu PCR sa odporúča pridať 5 % polyvinylpyrolidonu MWT (PVP-40), aby sa znížil rozsah inhibície amplifikácie aromatickými molekulami v extrakte.

Pri použití homogenizačných metód pomocou Waring Blender alebo Ultra Turrax na maceráciu vykrojeného pletiva zemiaka sa odporúča pridať deflokulačný prostriedok, prostriedok proti tvorbe peny alebo antioxidantu.

lubrolové vločky	0,5 $g.l^{-1}$
protipenivý DC-silikón	l,0 $ml.l^{-1}$
tetrapyrofosfát sodný	1,0 $g.l^{-1}$

Autoklávuje sa oddelene. Pridáva sa až do dosiahnutia žiadanej koncentrácie.

2.2. Peletový pufer: 10 $mmol.l^{-1}$1 fosforečnanový pufer, pH 7,2
Tento pufer sa používa na resuspendovanie a riedenie peletu získaného z pupkových koncov zemiakových hľúz.

Na_2HPO_4 . 12 H_2O	2,7 g
KH_2PO_4 . 2 H_2O	0,4 g
NaCl	8 g
destilovaná voda	1 l

Zložky sa rozpustia a skontroluje sa pH. Podľa potreby sa vykoná alikvotácia.

Sterilizuje sa v autokláve 15 minút pri teplote 121 °C.

3. Materiál na test IF

3.1. IF pufer: 10 mmol.l^{-1} fosforečnanový pufer (PBS), pH 7,2
Tento pufer sa používa na riedenie antiséra.

Na_2HPO_4 . 12 H_2O	2,7 g
KH_2PO_4 . 2 H_2O	0,4 g
NaCl	8 g
destilovaná voda	1 l

Látky sa rozpustia a skontroluje sa pH. Podľa potreby sa vykoná alikvotácia.
Sterilizuje sa v autokláve 15 minút pri teplote 121 °C.

3.2. IF pufer Tween
Tento pufer sa používa na umytie podložných sklíčok. K IF pufru sa pridáva 0,1 % Tween.

3.3. 0,1 mol.l^{-1} fosforečnanový pufer s glycerolom, pH 7,6
Tento pufer sa používa na zvýšenie fluorescencie ako krycia tekutina
na políčkach IF podložného sklíčka.

Na_2HPO_4 . 12 H_2O	3,2 g
Na_2HPO_4 . 2 H_2O	0,15 g
glycerol	50 ml
destilovaná voda	100 ml

4. Stanovenie stupňa kontaminácie v teste IF

Plocha S jedného poľa na podložnom sklíčku s viacerými jamkami

$$S = \frac{\pi D^2}{4} \qquad (1)$$

pričom D = priemer poľa.

Plocha s poľa objektívu

$$s = \frac{\pi d^2}{4} \qquad (2)$$

kde d = priemer poľa objektívu.

Hodnota d sa stanoví buď priamym meraním, alebo na základe nasledujúcich vzorcov

$$s = \frac{\pi . i^2}{G^2 K^2 . 4} \qquad (3)$$

kde: i = koeficient poľa (závisí od typu okulára mikroskopu a môže mať hodnotu od 8 do 24),

K = tubusový koeficient (1 alebo 1,25),

G = zväčšenie objektívu (100-násobné, 40-násobné a pod.).

Zo vzorca č. 2

$$d = \sqrt{\frac{4\,s}{\pi}} \qquad (4)$$

Zo vzorca č. 3

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

Zistí sa počet typických fluoreskujúcich buniek v jednom poli c.

Vypočíta sa počet typických fluoreskujúcich buniek v celom poli (C).

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

Vypočíta sa počet typických fluoreskujúcich buniek na jeden ml peletu (N).

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

kde: y = objem peletu na poli podložného sklíčka,

F = zrieďovací faktor peletu.

5. Materiál na test ELISA

5.1. Uhličitanový kótovací pufer, pH 9,6

Na_2CO_3	6,36 g
$NaHCO_3$	11,72 g
destilovaná voda	1 l

Zložky sa rozpustia a zmeria sa pH. Podľa potreby sa vykoná alikvotácia.
Sterilizuje sa v autokláve 15 minút pri teplote 121 °C.
Ak extrakt obsahuje vysoký podiel aromatických molekúl, možno pridať siričitan sodný s konečnou koncentráciou 0,2 % ako antioxidant.

5.2. Premývací pufer (PBS) (koncentrovaný l0x),	pH 7,4
NaCl	80 g
KH_2PO_4	2 g
Na_2HPO_4. 12 H_2O	29 g
KCl	2 g
destilovaná voda	1 l

Zložky sa rozpustia a zmeria sa pH.
Sterilizuje sa v autokláve 15 minút pri teplote 121 °C.

Podľa potreby sa riedi 10x.

5.3. Fosforečnanový pufer s Tweenom (PBS-T)

10x PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
destilovaná voda	895 ml

5.4. Konjugačný pufer (musí sa použiť čerstvý)

10x PBS	10 ml
polyvinylpropyrolidon 44000 MWT (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 g
sušené mlieko	0,5 g
doplniť destilovanou vodou	do 100 ml

5.5. Substrátový roztok pH 9,8

diethanolamín	97 ml
destilovaná voda	88 ml

Zmieša sa a koncentrovanou HCl sa ustáli na pH 9,8.
Doplní sa destilovanou vodou na objem 1 litra.
Pridá sa 0,2 g $MgCl_2$.
V každých 15 ml roztoku sa rozpustia dve 5 mg tablety p-NPP substrátu fosfatázy (Sigma).

6. Materiál na test PCR

6.1. Sekvencia oligonukleotidových primerov

Primer OLI-1 5´ – GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC - 3´

Primer Y-2 5´ – CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT - 3´

Potrebné chemikálie pozri Seal et al., 1993.

7. Materiál na selektívny platňový rozter a na obohacovací test

7.1.Selektívny substrát SMSA
(Podľa Engelbrechta, 1994, modifikované podľa Elphinstona et al., 1996)

Základný substrát:

kazeínový hydrolyzát (Difco)	1 g
baktopepton (Difco)	10 g
glycerol	5 ml
agar (Difco)	15 g
destilovaná voda	1 l

V litrovej banke sa pripraví 0,5 l substrátu.
Zložky sa rozpustia a skontroluje sa hodnota pH.
V prípade potreby sa pred autoklávovaním ustáli hodnota pH na 6,5.
Pri pH nad 7,0 nerastie Ralstonia solanacearum na tomto substráte dobre.
Sterilizuje sa v autokláve 15 minút pri teplote 121 °C.
Ochladí sa na 50 °C.

Na dosiahnutie konečných koncentrácií sa pridajú nasledujúce zložky (všetky od firmy Sigma):

kryštálová violeť	5 $mg.l^{-1}$	
polymixín-B-sulfát	100 $mg.l^{-1}$ (cca 600 000 jednotiek)	Sigma P-1004
bacitracín	25 $mg.l^{-1}$ (cca 1 250 jednotiek)	Sigma P-0125
chloramfenikol	5 $mg.l^{-1}$	Sigma C-3175
penicilín-G	0,5 $mg.l^{-1}$ (cca 825 jednotiek)	Sigma P-3032
tetrazoliové soli	50 $mg.l^{-1}$	

Zložky sa rozpustia v 70 % etanole na koncentrácie uvedené pre objem pripravovaného média.
Niektoré, ako je napríklad polymixín alebo chloramfenikol, treba pritom ľahko zahriať a pretrepať.

V prípade potreby možno kontamináciu saprofytickými baktériami znížiť zvýšením koncentrácie bacitracínu na 300 ppm bez toho, že by tým bolo negatívne ovplyvnené izolovanie Ralstonia solanacearum.

7.2. SMSA-tekutá živná pôda

(Podľa Elphinstona et al., 1996)

Príprava ako pri selektívnom substráte SMSA, ale bez agaru alebo bez tetrazoliových solí.

Naplní sa alikvotné množstvo 3 ml do 30 ml jednorazovej univerzálnej skúmavky.

ČASŤ E

Uchovávanie a skladovanie vzoriek

1. Každá podozrivá vzorka, v ktorej bol identifikovaný skríningovými testami pozitívny výsledok, pričom sa po ukončení testovania očakáva buď potvrdenie, alebo nepotvrdenie pozitívneho testu, musí byť zadržaná alebo primerane zakonzervovaná až do skončenia laboratórneho testovania
   1.1. pokiaľ je to možné dávka, z ktorej bola odobratá vzorka, alebo jej časť v pôvodnom balení s etiketou,
   1.2. zvyšná časť vzoriek,
   1.3. zvyšné extrakty a ďalší materiál upravený na vykonanie skríningových testov, napr. podložné sklíčka na imunofluorescenčný test,
   1.4. všetky príslušné doklady.
2. V prípade potvrdenia výskytu hnedej hniloby v trvaní najmenej jedného mesiaca po postupe oznamovania podľa § 5 ods. 2 sa musí zachovať
   2.1. materiál uvedený v bode 1,
   2.2. vzorka infikovaných rastlín rajčiaka alebo baklažánu naočkovaných peletom z hľúz alebo rastlín,
   2.3. izolovaná kultúra Ralstonia solanacearum.

Príloha č. 3
k nariadeniu vlády č. 66/2004 Z. z.

Miesta odberu vzoriek na potvrdenie zdroja a rozsahu kontaminácie

Testovanie uvedené v § 5 ods. 1 písm. a) bode 1 sa v jednotlivých prípadoch týka

a) miest produkcie

1. kde sa pestujú alebo sa pestovali zemiaky, ktoré sú klonovo príbuzné so zemiakmi, ktoré boli označené za kontaminované hnedou hnilobou,
2. kde sa pestujú alebo sa pestovali rajčiaky pochádzajúce z rovnakého zdroja ako rajčiaky, ktoré boli označené za kontaminované hnedou hnilobou,
3. kde sa pestujú alebo sa pestovali rajčiaky alebo zemiaky, pri ktorých je nebezpečenstvo pravdepodobnej kontaminácie hnedou hnilobou,
4. kde sa pestujú alebo sa pestovali zemiaky, ktoré sú klonovo príbuzné so zemiakmi, ktoré boli pestované na miestach produkcie, ktoré boli označené za kontaminované hnedou hnilobou,
5. kde sa pestujú alebo sa pestovali rajčiaky alebo zemiaky a ktoré ležia v susedstve napadnutých miest produkcie vrátane tých, kde boli priamo alebo prostredníctvom spoločného zmluvného partnera používané poľnohospodárske stroje alebo zariadenia,
6. na ktorých bola na zavlažovanie alebo postrekovanie používaná povrchová voda zo zdrojov, pri ktorých bola dokázaná kontaminácia hnedou hnilobou alebo pri ktorých existuje podozrenie na kontamináciu hnedou hnilobou,
7. na ktorých bola na zavlažovanie alebo postrekovanie používaná povrchová voda zo zdrojov používaných v mieste produkcie, pri ktorých bola dokázaná kontaminácia hnedou hnilobou alebo pri ktorých existuje podozrenie na kontamináciu hnedou hnilobou,
8. ktoré sú zaplavené alebo boli zaplavené povrchovými vodami, pri ktorých sa ukázalo, že sú kontaminované hnedou hnilobou, alebo pri ktorých existuje podozrenie na kontamináciu hnedou hnilobou a

b) povrchovej vody používanej na zavlažovanie alebo postrek poľa alebo polí a miesta alebo miest produkcie, pri ktorých bola dokázaná kontaminácia hnedou hnilobou, alebo ktorá tieto polia a miesta produkcie zaplavila.

Príloha č. 4
k nariadeniu vlády č. 66/2004 Z. z.

Podrobnosti na stanovenie pravdepodobnej kontaminácie a možného šírenia hnedej hniloby

1. Pri stanovovaní rozsahu pravdepodobnej kontaminácie podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 3 a písm. c) bodu 3 sa podľa vhodnosti prihliada na

   1.1. uvedený rastlinný materiál pestovaný na mieste produkcie, ktoré bolo podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 2 označené za kontaminované hnedou hnilobou,

   1.2. miesto alebo miesta produkcie s produkčným prepojením na uvedený rastlinný materiál označený podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 2 za kontaminovaný hnedou hnilobou vrátane miest, ktoré priamo alebo prostredníctvom spoločného zmluvného partnera používali výrobné stroje alebo zariadenia,

   1.3. uvedený rastlinný materiál, ktorý bol pestovaný na mieste alebo miestach produkcie uvedenom v bode 1.2. alebo bol prítomný na takomto mieste alebo miestach produkcie v čase, keď sa na tomto mieste produkcie vyskytol rastlinný materiál označený za kontaminovaný hnedou hnilobou podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 2,

   1.4. sklady, v ktorých sa manipulovalo s rastlinným materiálom z uvedených miest produkcie,

   1.5. všetky strojové zariadenia, vozidlá, lode, skladovacie priestory alebo ich časti a akékoľvek iné predmety vrátane obalového materiálu, ktoré mohli prísť do styku s rastlinným materiálom, ktorý bol podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 2 označený za kontaminovaný hnedou hnilobou,

   1.6. akýkoľvek rastlinný materiál, ktorý bol v styku so zariadeniami alebo objektmi uvedenými v bode 1.5. alebo v nich bol uskladnený pred ich dezinfekciou alebo vyčistením,

   1.7. v dôsledku testovania podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 1, v prípade zemiakov, tie hľuzy alebo rastliny, ktoré majú príbuzenský klonový pomer k rastlinnému materiálu, ktorý bol podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 2 označený za kontaminovaný a v prípade rajčiakov tie rastliny, ktoré pochádzajú z rovnakého osiva ako daný rastlinný materiál a pri ktorých sa i v prípade negatívneho výsledku testovania prítomnosti patogéna na základe klonovej príbuznosti kontaminácia hnedou hnilobou zdá pravdepodobná,

   1.8. miesto alebo miesta produkcie uvedeného rastlinného materiálu spomínaného v bode 1.7.,

   1.9. miesto alebo miesta produkcie uvedeného rastlinného materiálu, na ktorom sa na zavlažovanie alebo postrek používala voda, ktorá bola podľa § 5 ods. 1 písm. c) bodu 2 označená za kontaminovanú hnedou hnilobou,

   1.10. uvedený rastlinný materiál vyprodukovaný na poliach, ktoré boli zaplavené povrchovou vodou, v ktorej bola dokázaná kontaminácia hnedou hnilobou.

2. Pri stanovovaní možného šírenia hnedej hniloby podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 4 a písm. c) bodu 3 sa prihliada na

   a) v prípadoch podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 4

      1. blízkosť k iným miestam produkcie, na ktorých sa rastlinný materiál pestuje,

      2. bežnú produkciu a použitie porastov sadivových zemiakov,

      3. miesta produkcie, na ktorých sa rastlinný materiál zavlažuje alebo postrekuje povrchovou vodou v prípadoch, keď existuje alebo existovalo nebezpečenstvo odplavenia povrchovej vody alebo zaplavenia povrchovou vodou z miest produkcie, ktoré boli podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 2 označené za kontaminované hnedou hnilobou,

   b) v prípadoch, keď bola povrchová voda označená za kontaminovanú hnedou hnilobou podľa § 5 ods. 1 písm. c) bodu 2

      1. miesto alebo miesta produkcie, kde sa uvedený rastlinný materiál pestuje bezprostredne vedľa povrchovej vody označenej za kontaminovanú hnedou hnilobou alebo ktoré môže

byť touto povrchovou vodou zaplavené,

2. každú samostatnú zavlažovaciu nádrž, ktorá je spojená s povrchovou vodou označenou za kontaminovanú hnedou hnilobou.

3. Medzi podrobnosti oznámenia uvedeného v § 5 ods. 2 patrí

3.1. dátum oznámenia podozrenia na výskyt podľa § 4 a dátumy odberu vzoriek a, podľa vhodnosti, potvrdenia prítomnosti hnedej hniloby podľa § 5,

3.2. opis označenej kontaminácie a vymedzenia bezpečnostného pásma.

4. Medzi podrobnosti dodatočného oznámenia uvedeného v § 5 ods. 2 patrí

4.1. pre každú zásielku alebo dávku zemiakov označenú za kontaminovanú, fytocertifikát, číslo rastlinného pasu alebo, podľa vhodnosti, registračné číslo producenta zemiakov, zberného skladu a zasielateľského centra,

4.2. pre každú zásielku alebo dávku rajčiakov označenú za kontaminovanú hnedou hnilobou, fytocertifikát alebo číslo rastlinného pasu,

4.3. názov odrody a označenie stupňa množenia sadivových zemiakov a, podľa možnosti, aj v ostatných prípadoch,

4.4. iné údaje týkajúce sa potvrdeného výskytu hnedej hniloby, ktoré môže požadovať komisia.

Príloha č. 5
k nariadeniu vlády č. 66/2004 Z. z.

Opatrenia proti šíreniu hnedej hniloby

1. Za vhodné využitie alebo zneškodnenie rastlinného materiálu podľa § 6 pod dohľadom kontrolného ústavu a so súhlasom zodpovedného orgánu krajiny, v ktorej sa zemiaky majú baliť alebo spracúvať v zariadeniach na zneškodňovanie odpadu, sa považuje,

   1.1. ak ide o zemiakové hľuzy

      1.1.1. využitie ako konzumné zemiaky balené na miestach vybavených vhodnými zariadeniami na zneškodňovanie odpadu, pripravené na okamžitú expedíciu a použitie bez potreby ďalšieho prebaľovania a určené na takúto priamu expedíciu a použitie,

      1.1.2. využitie ako zemiaky na priemyselné spracovanie určené na priamu a okamžitú dodávku do spracovateľského zariadenia vybaveného vhodným zariadením na zneškodňovanie odpadu,

      1.1.3. iné využitie alebo zneškodnenie, ak preukázateľne neexistuje žiadne identifikovateľné nebezpečenstvo šírenia hnedej hniloby a po schválení kontrolného ústavu,

   1.2. ak ide o iné časti rastlín vrátane stoniek a listového odpadu

      1.2.1. zničenie,

      1.2.2. iné využitie alebo zneškodnenie, ak preukázateľne neexistuje žiadne identifikovateľné nebezpečenstvo šírenia hnedej hniloby.

2. Vhodné metódy dezinfekcie predmetov uvedených v § 6, ktoré sú kontaminované, zahŕňajú vyčistenie a podľa vhodnosti dezinfekciu tak, aby bolo zabezpečené, že neexistuje žiadne identifikovateľné nebezpečenstvo šírenia hnedej hniloby. Toto opatrenie musí byť vykonané pod dohľadom kontrolného ústavu.

3. Do skupiny opatrení, ktoré musí kontrolný ústav vykonať v bezpečnostnom pásme vymedzenom podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 4 a písm. c) bodu 3, patria

   3.1. v prípadoch, v ktorých boli miesta produkcie označené za kontaminované hnedou hnilobou podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 2

      3.1.1. na poli alebo v mieste produkcie, ktoré boli podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 2 označené za kontaminované hnedou hnilobou, buď

         3.1.1.1. minimálne počas štyroch rokov nasledujúcich po roku označenia kontaminácie

            3.1.1.1.1. uplatňovať opatrenia na likvidáciu samovýsadby alebo samovýsevu rastlín zemiakov a rajčiakov, ako aj iných hostiteľských rastlín hnedej hniloby vrátane burinného spoločenstva z čeľade ľuľkovité,

            3.1.1.1.2. vynechať výsadbu alebo výsev

               3.1.1.1.2.1 hľúz zemiakov alebo rastlín zemiakov,

               3.1.1.1.2.2 rastlín rajčiakov alebo osiva rajčiaka,

               3.1.1.1.2.3 prihliadajúc na biológiu hnedej hniloby,

                  3.1.1.1.2.3.1 iných hostiteľských rastlín hnedej hniloby,

                  3.1.1.1.2.3.2 rastlinných druhov z rodu Brassica, pri ktorých preukázateľne existuje nebezpečenstvo prežívania hnedej hniloby,

               3.1.1.1.2.4 plodín, pri ktorých preukázateľne existuje

. nebezpečenstvo šírenia hnedej hniloby,

3.1.1.1.3 v prvom vegetačnom období zemiakov a rajčiakov po období uvedenom v bode 3.1.1.1.2. a pod podmienkou, že miesto produkcie bolo minimálne počas dvoch pestovateľských rokov pred rokom výsadby bez rastlín zemiakov alebo rajčiakov vyrastených zo samovýsadby alebo samovýsevu a bez iných hostiteľských rastlín vrátane burinného spoločenstva z čeľade ľuľkovité,

3.1.1.1.3.1 v prípade zemiakov pestovanie iba z uznaných (certifikovaných) sadivových zemiakov určených výlučne na produkciu konzumných zemiakov,

3.1.1.1.3.2 vykonanie prieskumu vrátane testovania podľa § 3 ods. 1,

3.1.1.1.4 vo vegetačnom období zemiakov a rajčiakov nasledujúcom po vegetačnom období uvedenom v bode 3.1.1.1.3. pri dodržaní vhodného osevného postupu, v prípade zemiakov, pestovanie iba z uznaných (certifikovaných) sadivových zemiakov buď s cieľom produkovať sadivové zemiaky, alebo konzumné zemiaky a v prípade zemiakov a rajčiakov vykonanie prieskumu pod dohľadom kontrolného ústavu podľa § 3 ods. 1,

3.1.1.2. počas piatich pestovateľských rokov nasledujúcich po roku označenia pozemkov za kontaminované

3.1.1.2.1 uplatňovať opatrenia na likvidáciu samovýsadby alebo samovýsevu rastlín zemiakov, rajčiakov a iných hostiteľských rastlín hnedej hniloby vrátane burinného spoločenstva z čeľade ľuľkovité,

3.1.1.2.2 nariadiť počas prvých troch rokov tohto obdobia buď úhor, alebo pestovanie obilnín alebo trvalý pasienok s častým kosením alebo intenzívnym spásaním, alebo pestovanie tráv s cieľom získania semennej produkcie, po ktorých nasledujú dva roky pestovania nehostiteľských rastlín, ktoré preukázateľne nepredstavujú žiadne nebezpečenstvo prežitia alebo šírenia hnedej hniloby,

3.1.1.2.3 v prvom vegetačnom období zemiakov a rajčiakov nasledujúcom po období uvedenom v bode 3.1.1.2.2. nariadiť,

3.1.1.2.3.1 v prípade zemiakov pestovanie iba z uznaných (certifikovaných) sadivových zemiakov, a to buď s cieľom produkovať sadivové zemiaky, alebo konzumné zemiaky,

3.1.1.2.3.2 vykonať prieskum vrátane testovania podľa § 3 ods. 1;

3.1.2. na iných miestach produkcie

3.1.2.1. v pestovateľskom roku nasledujúcom po roku označenia miesta produkcie za kontaminované hnedou hnilobou nariadiť

3.1.2.1.1 vynechať výsadby zemiakových hľúz alebo rastlín, alebo iných hostiteľských rastlín hnedej hniloby, ako aj opatrenia na likvidáciu samovýsadby alebo samovýsevu rastlín zemiakov a rajčiakov, ako aj iných hostiteľských rastlín hnedej hniloby vrátane burinného spoločenstva z čeľade ľuľkovité,

3.1.2.1.2 v prípade zemiakových hľúz pestovať iba z uznaných (certifikovaných) sadivových zemiakov výlučne s cieľom produkovať konzumné zemiaky, a pod podmienkou, že kontrolný ústav súhlasí, že boli eliminované nebezpečenstvá zemiakov a rajčiakov zo samovýsadby alebo samovýsevu a iných hostiteľských rastlín hnedej hniloby vrátane burinného spoločenstva z čeľade ľuľkovité. Porast sa vo vhodných termínoch kontroluje a v prípade rastlín

zemiakov zo samovýsadby sa vykonáva testovanie na prítomnosť hnedej hniloby; v prípade zemiakov sa navyše kontrolujú i zozbierané hľuzy,

3.1.2.2. počas prvého pestovateľského roku nasledujúceho po pestovateľskom roku uvedenom v bode 3.1.2.1. nariadiť

3.1.2.2.1. v prípade zemiakov pestovanie iba z uznaných (certifikovaných) sadivových zemiakov s cieľom produkcie sadivových zemiakov alebo konzumných zemiakov,

3.1.2.3. minimálne počas druhého pestovateľského roka, nasledujúceho po pestovateľskom roku uvedenom v bode 3.1.2.2. nariadiť,

3.1.2.3.1. v prípade zemiakov pestovanie iba z uznaných (certifikovaných) sadivových zemiakov alebo sadivové zemiaky, ktoré boli vypestované pod dohľadom kontrolného ústavu z uznaných (certifikovaných) sadivových zemiakov s cieľom produkovať sadivové alebo konzumné zemiaky,

3.1.2.4. v každom z pestovateľských rokov uvedených v bode 3.1.2.3. vykonať opatrenia na odstránenie rastlín zo samovýsadby alebo samovýsevu rajčiakov a zemiakov, ako aj ďalších hostiteľských rastlín hnedej hniloby vrátane burinného spoločenstva z čeľade ľuľkovité a vykonať prieskum vrátane testovania podľa § 3 ods. 1 a v prípade, že sa vysádzajú hľuzy zemiakov na produkciu sadivových zemiakov aj vykonanie testovania hľúz;

3.1.3. ihneď po označení miest produkcie za kontaminované podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 2 a v každom nasledujúcom pestovateľskom roku až do prvého prípustného pestovania zemiakov alebo rajčiakov na poli označenom za kontaminované hnedou hnilobou podľa písmena a) vykonať

3.1.3.1. riadne vyčistenie a podľa vhodnosti dezinfekciu všetkých strojov a skladovacích zariadení nachádzajúcich sa na mieste produkcie, ktoré sa používajú pri produkcii zemiakov alebo rajčiakov podľa bodu 2,

3.1.3.2. pod dohľadom kontrolného ústavu kontroly zavlažovacích a postrekových programov a, podľa potreby vyhlásiť zákaz zavlažovania a postrekov s cieľom zabrániť šíreniu hnedej hniloby;

3.1.4. v mieste produkcie, ktoré bolo podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 2 označené za kontaminované hnedou hnilobou a pri ktorom je možná úplná výmena pestovateľského substrátu,

3.1.4.1. vynechať výsadbu zemiakových hľúz alebo rastlín zemiakov alebo iných hostiteľských rastlín hnedej hniloby vrátane rastlín rajčiakov a výsevu semien rajčiakov, pokiaľ sa miesto produkcie pod dohľadom kontrolného ústavu nepodrobí opatreniam na zničenie hnedej hniloby a na odstránenie všetkého materiálu z hostiteľských rastlín vrátane minimálne jednej úplnej výmeny pestovateľského substrátu, vyčistenia a, podľa potreby, dezinfekcie miesta produkcie a všetkých zariadení, pokiaľ nebude následne kontrolným ústavom udelený súhlas na pestovanie rajčiakov a zemiakov,

3.1.4.2. v prípade produkcie zemiakov použiť uznané (certifikované) sadivové zemiaky, minihľuzy alebo meristémové kultúry, ktoré pochádzajú z testovaných zdrojov,

3.1.4.3. pod dohľadom kontrolného ústavu kontroly zavlažovacích a postrekových programov, a podľa potreby vyhlásiť zákaz zavlažovania a postrekov s cieľom zabrániť šíreniu hnedej hniloby.

3.2. Okrem uvedených opatrení sa v bezpečnostnom pásme odporúča oddelená manipulácia so zozbieranými sadivovými a konzumnými zemiakmi a zriadenie programu obnovy všetkých sadivových zemiakov počas primeraného časového obdobia.

4. V prípade oznámenia od iného členského štátu, že hrozí kontaminácia rastlinného materiálu alebo povrchovej vody na území Slovenskej republiky z tohto členského štátu, bez vplyvu na

opatrenia uvedené v bode 3, je kontrolný ústav vo vymedzenej bezpečnostnej zóne povinný

4.1. minimálne počas troch pestovateľských rokov nasledujúcich po roku označenia príslušných pozemkov za kontaminované hnedou hnilobou

4.1.1. v prípadoch, keď bolo bezpečnostné pásmo vymedzené podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 4

4.1.1.1. vykonávať kontrolu prevádzok, ktoré pestujú, skladujú alebo manipulujú so zemiakmi alebo rajčiakmi, ako aj prevádzok, ktoré na zmluvnom základe obsluhujú strojové zariadenia používané pri produkcii zemiakov a rajčiakov,

4.1.1.2. vyžadovať čistenie a podľa vhodnosti dezinfekciu strojových zariadení a skladov týchto podnikov vhodným spôsobom uvedeným v bode 2,

4.1.1.3. vyžadovať, aby boli všetky porasty zemiakov vysádzané výlučne z úradne certifikovaného sadiva, alebo aby bolo používané sadivo vypestované pod úradnou kontrolou a aby sadivové zemiaky, ktoré boli pestované na miestach produkcie, ktoré boli podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 3 označené ako pravdepodobne kontaminované, boli po zbere testované,

4.1.1.4. vyžadovať vo všetkých podnikoch nachádzajúcich sa v bezpečnostnom pásme oddelenú manipuláciu so zozbieranými sadivovými a konzumnými zemiakmi,

4.1.1.5. vykonať prieskum podľa § 3 ods. 1;

4.1.2. v prípadoch, keď bola povrchová voda označená za kontaminovanú podľa § 5 ods. 1 písm. c) bodu 2 alebo keď sa na povrchovú vodu prihliada pri stanovovaní možného šírenia hnedej hniloby podľa bodu 2 prílohy č. 4

4.1.2.1. vykonať každoročne prieskum vrátane odberu vzoriek povrchovej vody a hostiteľských rastlín z čeľade ľuľkovité v týchto zdrojoch vody a testovanie v súlade

4.1.2.1.1. s vhodnou metódou uvedenou v prílohe č. 2 na uvedený rastlinný materiál, alebo

4.1.2.1.2. s inou schválenou metódou v ostatných prípadoch,

4.1.2.2. zaviesť kontroly programov zavlažovania a postrekovania vrátane vyhlásenia zákazu zavlažovania a postrekovania uvedeného rastlinného materiálu a, podľa vhodnosti, iných hostiteľských rastlín vodou označenou za kontaminovanú s cieľom zabrániť rozširovaniu hnedej hniloby; tento zákaz možno následne prehodnotiť na základe výsledkov každoročného prieskumu,

4.1.2.3. zaviesť v prípade kontaminácie odpadových vôd kontrolu zneškodňovania odpadových vôd z prevádzkových priestorov podnikov priemyselného spracovania a balenia, ktoré manipulujú s uvedeným rastlinným materiálom;

4.2. zriadiť podľa potreby program obnovy všetkých sadivových zemiakov počas primeraného časového obdobia.

5. Zariadenia na zneškodňovanie odpadov pod dohľadom kontrolného ústavu podľa § 6 ods. 1 písm. c) bodu 4 musia dodržiavať nasledujúce ustanovenia, aby sa vylúčilo nebezpečenstvo šírenia hnedej hniloby:

5.1. odpady zo spracovania zemiakov a rajčiakov vrátane vyhodených zemiakov, zemiakových šupiek a rajčiakov, ako aj iné tuhé odpady spojené s rajčiakmi a zemiakmi musia byť zneškodňované

5.1.1. hlbokým zahrabaním materiálu do skládok, pri ktorých neexistuje žiadne nebezpečenstvo priesaku na poľnohospodársky využívané plochy alebo do zdrojov vôd, ktoré by mohli byť využívané na zavlažovanie poľnohospodárskej pôdy. Odpad musí byť privezený priamo na skládku a izolovaný tak, aby sa vylúčilo nebezpečenstvo straty odpadu cestou, alebo

5.1.2. spálením,

5.2. tekutý spracovateľský odpad, ktorý obsahuje nerozpustené látky, treba pred zneškodnením prefiltrovať alebo zaviesť do usadzovacej nádrže, aby sa odpad oddelil od nerozpustených látok. Tuhé látky, ktoré z tohto procesu vzídu, musia byť zneškodnené postupom uvedeným v bode 5.1.

Tekutý odpad sa potom

1. pred vypustením zahreje počas minimálne 30 minút na teplotu minimálne 70 °C, alebo
2. v súlade s úradným povolením a pod úradným dohľadom inak zneškodní tak, aby sa vylúčilo nebezpečenstvo, že odpad sa dostane do styku s poľnohospodárskou pôdou alebo vodnými zdrojmi, ktoré by mohli byť používané na zavlažovanie poľnohospodárskej pôdy.

Príloha č. 6
k nariadeniu vlády č. 66/2004 Z. z.

ZOZNAM TRANSPONOVANÝCH PRÁVNYCH AKTOV

Týmto nariadením sa transponuje tento právny akt Európskych spoločenstiev

Smernica Rady 98/57/ES o potláčaní choroby *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Smernica Komisie je preložená do slovenského jazyka, preklad smernice sa nachádza v sídle Inštitútu pre aproximáciu práva Úradu vlády Slovenskej republiky, Námestie slobody 1/29, Bratislava.

1) § 22 zákona Národnej rady Slovenskej republiky č. 285/1995 Z. z. o rastlinolekárskej starostlivosti v znení neskorších predpisov.

2) § 22 ods. 1 písm. e) zákona Národnej rady Slovenskej republiky č. 285/1995 Z. z. v znení neskorších predpisov.

3) § 5 zákona Národnej rady Slovenskej republiky č. 285/1995 Z. z. v znení neskorších predpisov.

4) § 2 písm. g) zákona č. 132/1989 Zb. o ochrane práv k novým odrodám rastlín a plemenám zvierat v znení neskorších predpisov.
§ 9 zákona Národnej rady Slovenskej republiky č. 291/1996 Z. z. o odrodách a osivách v znení neskorších predpisov.

5) § 3 ods. 1 písm. a) zákona Národnej rady Slovenskej republiky č. 285/1995 Z. z. v znení neskorších predpisov.

6) Nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 69/2004 Z. z., ktorým sa ustanovujú podmienky na dovoz a premiestňovanie určitých škodlivých organizmov, rastlín, rastlinných produktov a iných predmetov na vedecké, výskumné alebo šľachtiteľské účely.

Vydavateľ Zbierky zákonov Slovenskej republiky, správca obsahu a prevádzkovateľ právneho a informačného portálu Slov-Lex dostupného na webovom sídle www.slov-lex.sk je
Úrad vlády Slovenskej republiky, Námestie slobody 1, 813 70 Bratislava,
tel.: 02 888 91 131, e-mail: helpdesk@slov-lex.sk.