

764.

Na osnovu člana 12 stav 5 Zakona o zdravstvenoj zaštiti bilja („Službeni list RCG” broj 28/06), Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, donijelo je

P R A V I L N I K
O FITOSANITARNIM MJERAMA ZA OTKRIVANJE, SPRJEČAVANJE ŠIRENJA I SUZBIJANJE
SMEĐE TRULEŽI KRTOLA KROMPIRA I BAKTERIJSKOG UVENUĆA KROMPIRA I PARADAJZA
(POTATO BROWN ROT) KOJU PROUZROKUJE BAKTERIJA *Ralstonia solanacearum* (Smith)
Yabuuchi et al.*

I. OSNOVNE ODREDBE

Predmet
Član 1

Ovim pravilnikom propisuju se fitosanitarne mjere za sprovođenje sistematskog istraživanja, utvrđivanje prisustva, rasprostranjenosti, sprječavanje širenja, suzbijanje i iskorjenjivanje smeđe truleži krtola krompira i bakterijskog uvenuća krompira i paradajza, koju prouzrokuje bakterija *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (u daljem tekstu: štetni organizam), ranije poznata pod nazivom *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, kao i postupci laboratorijskog testiranja za dijagnozu, detekciju i identifikaciju štetnog organizma.

Značenje izraza
Član 2

Izrazi upotrijebljeni u ovom pravilniku imaju sljedeća značenja:

- **vjerovatno prisustvo ili vjerovatna zaraza** označava utvrđeno prisustvo štetnog organizma potvrđeno prvobitnim testiranjem, a konačni rezultati su negativni, u kom slučaju se smatra da je organizam još uvijek prisutan ili da je zaraza vjerovatna zbog biološke odnosno klonske srodnosti ili u slučaju kada mehaničkim sredstvima koja se koriste na parceli može doći do kontakta sa biljkama domaćinima ili vodom, zbog mogućnosti kontaminacije;
- **zaražena parcela** je parcela na kojoj je laboratorijskom analizom zemljišta ili bilja utvrđeno prisustvo bakterije *Ralstonia solanacearum*;
- **sigurnosna zona (safety zone)** je područje koje okružuje zaraženu parcelu, a određuje se u skladu sa standardima o fitosanitarnim postupcima Evropske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (EPPO) u zavisnosti od procjene rizika od širenja štetnog organizma;
- **partija (lot)** je broj jedinica jedne vrste bilja, biljnih proizvoda i objekata pod nadzorom koja se može identifikovati po homogenosti svog sadržaja i porijeklu;
- **posjed** su zemljište, objekti i prevozna sredstva proizvođača bilja.

II. SISTEMATSKO ISTRAŽIVANJE

Sistematsko istraživanje
Član 3

Radi utvrđivanja prisustva uzročnika smeđe truleži krtola krompira, Fitosanitarna uprava donosi operativni program posebnog nadzora kroz godišnja sistematska istraživanja u skladu sa godišnjim programom.

Program iz stava 1 ovog stava donosi se na osnovu jasnih naučnih, statističkih principa i biologije štetnog organizma.

Sistematska istraživanja iz stava 1 ovog člana sprovode se na sljedećim biljkama domaćinima (u daljem tekstu: glavne biljke domaćini):

- na krompiru (*Solanum tuberosum* L.), uključujući krtole, isključujući sjeme u botaničkom smislu; i
- na paradajzu (*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw), isključujući plodove i sjeme.

Radi utvrđivanja drugih izvora zaraze koji mogu ugroziti proizvodnju glavnih biljaka domaćina, Fitosanitarna uprava vrši procjenu rizika od štetnog organizma.

Ukoliko se procijeni da postoji rizik od širenja štetnog organizma, u proizvodnim područjima glavnih biljaka domaćina, sprovode se i ciljana sistematska istraživanja:

- na drugim biljkama domaćinima, uključujući samoniklo bilje iz porodice *Solanaceae*;
- u površinskim vodama koje se koriste za navodnjavanje ili prskanje glavnih biljaka domaćina;
- u tečnom otpadu koji nastaje u industrijskoj preradi ili u pogonima za pakovanje glavnih biljaka domaćina i koristi se za navodnjavanje ili prskanje glavnih biljaka domaćina; i
- prema potrebi na supstratima koji se koriste za rast bilja, zemljištu, čvrstim otpacima koji nastaju u industrijskoj preradi ili u pogonima za pakovanje glavnih biljaka domaćina.

Postupak sprovođenja sistematskog istraživanja Član 4

Tokom sprovođenja godišnjeg sistematskog istraživanja ili u slučaju sumnje na prisustvo štetnog organizma,:

- 1) u slučaju krompira:
 - u odgovarajućim vremenskim razdobljima obavlja se vizuelni pregled (rezanjem krtola) usjeva sjemenskog krompira i krompira koji nije namijenjen sadnji odnosno merkantilnog krompira i ako je potrebno, uzimaju se uzorci radi laboratorijskog testiranja, tokom vegetacijskog perioda ili iz skladišta;
- 2) u slučaju paradajza:
 - u odgovarajućim vremenskim razdobljima tokom vegetacionog perioda obavljaju se vizuelni pregledi biljaka namenjenih sadnji (u daljem tekstu: sadnica) a koje su za tržišnu proizvodnju;
- 3) na drugim biljkama domaćinima, u površinskim vodama, uključujući tečni otpad, kao i u ostalom materijalu, posebno supstratima, zemljištu i čvrstim otpacima industrijskih postrojenja za preradu i pakovanje:
 - uzimaju se uzorci i dostavljaju laboratoriji radi testiranja.

Laboratorijska testiranja iz ovog člana sprovode se u skladu sa standardnim postupcima za dijagnozu, otkrivanje i identifikaciju bakterije *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., datim u Prilogu 1 koji je odštampan uz ovaj pravilnik i čini njegov sastavni dio.

Evidencija sistematskih istraživanja Član 5

O postupcima sprovođenja i rezultatima sistematskih istraživanja vodi se godišnja evidencija i to za:

- 1) krompir:
 - procjena ukupne površine na kojoj se uzgaja krompir (sjemenski i merkantilni) u hektarima;
 - površine, prikazane odvojeno za sjemenski (po kategorijama) i merkantilni krompir i prema potrebi po područjima;
 - broj i vrijeme uzimanja uzoraka namijenjenih testiranju;
 - broj vizuelnih pregleda na parceli tokom uzgoja;
 - broj vizuelnih pregleda krtola i veličina uzorka;
- 2) paradajz:
 - procjena ukupnog broja sadnica namijenjenih tržišnoj proizvodnji paradajza;
 - broj vizuelnih pregleda i uzoraka;
- 3) druge biljke domaćine uključujući samonikle biljke iz familije *Solanaceae*:
 - biljna vrsta;
 - broj i vrijeme uzimanja uzoraka;

- naziv područja ili vode iz kojih su uzorci uzeti;
 - postupak testiranja;
- 4) površinske vode i tečni otpad koji nastaje u industrijskoj preradi i pogonima za pakovanje glavnih biljaka domaćina:
- broj i vrijeme uzimanja uzoraka;
 - naziv područja ili vode ili lokacija posjeda iz kojih su uzorci uzeti;
 - postupak testiranja.

Radi daljeg izvještavanja država članica Evropske unije i Evropske Komisije, informacije o pojedinostima i rezultatima sistematskog istraživanja iz stava 1 ovog člana, sprovedenog prethodne proizvodne godine, sakupljaju se i arhiviraju do 1. juna tekuće godine, osim za krompir koji se čuva za sadnju na vlastitom gazdinstvu, za koji se podaci moraju sakupiti do 1. septembra tekuće godine.

III. SUMNJA NA ZARAZU

Utvrđivanje sumnje na zarazu

Član 6

Sumnja na zarazu štetnim organizmom postoji ako:

- su tokom vizuelnog pregleda uočeni simptomi bolesti a rezultat testa prosijavanja odnosno screening testova je pozitivan ili
- je testiranjem na latentnu zarazu dobijen pozitivan rezultat testom prosijavanja odnosno screening testom.

Da bi se potvrdila ili otklonila sumnja na zarazu štetnim organizmom, sprovode se dalja laboratorijska testiranja u skladu sa propisanim postupkom.

U slučaju sumnje na zarazu štetnim organizmom iz stava 1 ovog člana, do dobijanja konačnog rezultata laboratorijskog testiranja, laboratorija je dužna da zadrži i na propisan način čuva:

- sve uzorkovane krtole, ako je moguće sve uzorkovane biljke;
- sav preostali ekstrakt i dodatno pripremljen materijal za testove provjere(npr. stakalca za imunofluorescenciju i sl.) i
- odgovarajuću dokumentaciju.

Na osnovu uzoraka iz stava 3 alineja 1 ovog člana, u slučaju potrebe, vrši se testiranje sortnosti, da bi se provjerio identitet zaraženih i klonski srodnih krtola ili biljaka krompira.

U slučaju kada je laboratorijskim testiranjem, potvrđena zaraza štetnim organizmom, laboratorija je dužna da najmanje mjesec dana nakon obavješćavanja država članica Evropske unije i Evropske Komisije, o potvrđenoj zarazi štetnim organizmom, zadrži i na propisan način čuva:

- materijal iz stava 3 ovog člana;
- uzorak vještački zaraženih test biljaka paradajza i patlidžana i
- izolovanu kulturu štetnog organizma.

Mjere u slučaju sumnje na zarazu

Član 7

Do dobijanja konačnih rezultata laboratorijskog testiranja iz člana 6 stav 2 ovog pravilnika, fitosanitarni inspektor:

- 1) zabranjuje premještanje biljaka i krtola iz svih usjeva, partija i pošiljaka iz kojih su uzeti uzorci, osim ako se to premještanje obavlja pod njegovim nadzorom, pod uslovom da ne postoji rizik od širenja štetnog organizma;
- 2) preduzima potrebne radnje radi otkrivanja izvora zaraze štetnim organizmom;
- 3) nalaže odgovarajuće dodatne mjere radi sprječavanja širenja štetnog organizma u zavisnosti od procijenjenog stepena rizika, a mjere se primjenjuju posebno u slučaju proizvodnje glavnih biljaka domaćina i premještanja partija sjemenskog krompira proizvedenih na mjestu proizvodnje iz kojeg su uzeti uzorci iz tačke 1 ovog stava.

Obavješćavanje u slučaju sumnje na zarazu

Član 8

U slučaju sumnje na zarazu štetnim organizmom i kada postoji rizik od prenošenja zaraze sa glavnih biljaka domaćina ili putem površinskih voda iz Crne Gore u druge države, Fitosanitarna uprava obavještava i uspostavlja saradnju sa nadležnim organom za zdravstvenu zaštitu bilja te države.

IV. POTVRĐENA ZARAZA

Postupak u slučaju potvrđene zaraze glavnih biljaka domaćina

Član 9

Ako se laboratorijskim testiranjem uzorka glavnih biljaka domaćina potvrdi zaraza štetnim organizmom, fitosanitarni inspektor:

- 1) sprovodi istraživanje radi utvrđivanja obima i primarnog izvora zaraze (jedan ili više);
- 2) označava kao zaražene:
 - glavne biljke domaćine, pošiljku ili partiju iz koje je uzet uzorak;
 - uređaje, opremu, prevozna sredstva, skladišta ili njihove dijelove, i sve druge objekte i predmete, uključujući materijal za pakovanje, koji su bili u dodiru sa glavnim biljkama domaćinima od kojih je uzet uzorak i
 - mjesta proizvodnje, parcele i ako je potrebno, zaštićene prostore namijenjene proizvodnji bilja, bilo da je uzorak uzet u vrijeme uzgoja ili nakon vađenja ili berbe glavnih biljaka domaćina;
- 3) određuje obim vjerovatne zaraze;
- 4) određuje sigurnosnu zonu na osnovu obima potvrđene zaraze, obima vjerovatne zaraze i mogućeg širenja organizma, u kojoj se sprovede mjere date u Prilogu 2 koji je odštampan uz ovaj pravilnik i čini njegov sastavni dio.

O preduzetim mjerama iz stava 1 ovog člana, fitosanitarni inspektor obavještava Fitosanitarnu upravu radi razgraničenja područja odnosno proglašavanja zaražene parcele i određivanja granica zaražene parcele i sigurnosne zone, za mjesta proizvodnje, parcele i kada je potrebno, zaštićene prostore namijenjene proizvodnji bilja, za koje je inspektor utvrdio da su zaraženi.

Sigurnosna zona mora biti dovoljno velika da osigura zaštitu okolnih površina.

U slučaju zaraze više parcela, određuje se izvor primarne zaraze i obim vjerovatne zaraze, u skladu sa rezultatima sistematskog istraživanja i procjene rizika za širenje štetnog organizma.

Obavještenje o pojavi bakterije *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., Fitosanitarna uprava objavljuje na svojoj web stranici i u najmanje jednom štampanom mediju, koji se distribuira na teritoriji Crne Gore.

Obim i primarni izvor zaraze glavnih biljaka domaćina

Član 10

Fitosanitarni inspektor prilikom sprovođenja istraživanja iz člana 9 stav 1 tačka 1 ovog pravilnika, radi utvrđivanja obima zaraze i jednog ili više primarnih izvora zaraze glavnih biljaka domaćina, uzima u obzir:

- 1) mjesta proizvodnje:
 - na kojima se proizvodi ili je bio proizveden krompir, koji je klonski srodan sa krompirom na kojem je utvrđena zaraza štetnim organizmom;
 - na kojima se proizvodi ili je bio proizveden paradajz, koji potiče iz istog izvora kao i paradajz na kome je utvrđena zaraza štetnim organizmom;
 - na kojima se proizvode ili su bili proizvedeni krompir ili paradajz, koji su pod nadzorom fitosanitarnog inspektora zbog sumnje na zarazu štetnim organizmom;
 - na kojima se proizvodi ili je bio proizveden krompir koji je klonski srodan sa krompirom proizvedenim na mjestu proizvodnje gdje je utvrđena zaraza štetnim organizmom;
 - na kojima se proizvode krompir ili paradajz, a koja se nalaze u blizini zaraženih mjesta proizvodnje uključujući i mjesta na kojima su se koristili isti objekti i oprema za proizvodnju;
 - na kojima se koriste površinske vode za navodnjavanje ili prskanje iz izvora za koji se sumnja na zarazu ili je utvrđeno da je zaražen štetnim organizmom;
 - na kojima se koriste površinske vode za navodnjavanje ili prskanje iz istog izvora koji se koristi i na mjestima proizvodnje na kojima je utvrđena zaraza ili postoji sumnja na zarazu štetnim organizmom;

- koja su poplavljena ili su bila poplavljena površinskim vodama u kojima je utvrđena zaraza ili postoji sumnja na zarazu štetnim organizmom i
- 2) površinske vode koje se koriste za navodnjavanje, prskanje ili su poplavile parcele ili mjesta proizvodnje na kojima je utvrđena zaraza štetnim organizmom.

Istraživanje iz stava 1 ovog člana uključuje dalja laboratorijska testiranja u skladu sa propisanim postupcima iz Priloga 2 ovog pravilnika, najmanje svih partija sjemenskog krompira koji je klonski srodan sa zaraženim krompirom.

Obim vjerovatne zaraze glavnih biljaka domaćina Član 11

Fitosanitarni inspektor određuje za glavne biljke domaćine obim vjerovatne zaraze iz člana 9 stav 1 tačka 3 ovog pravilnika, na osnovu mogućih kontakata prije, poslije i tokom proizvodnje, navodnjavanja ili prskanja ili na osnovu klonske srodnosti sa biljkama ili krtolama koji su označeni kao zaraženi, uzimajući u obzir:

- 1) glavne biljke domaćine uzgajane na mjestu proizvodnje koje je označeno kao zaraženo mjesto;
- 2) mjesto ili mjesta proizvodnje koja su u bilo kakvoj vezi sa proizvodnjom glavnih biljaka domaćina koje su označene kao zaražene, uključujući i ona na kojima se koristi ista oprema i objekti za proizvodnju;
- 3) glavne biljke domaćine koje su proizvedene na mjestima proizvodnje iz tačke 2 ovog stava ili su se nalazile na tim mjestima proizvodnje u vrijeme dok su glavne biljke domaćini koje su označene kao zaražene, bile prisutne na mjestima proizvodnje koje je označeno kao zaraženo;
- 4) posjede na kojima se nalaze ili dorađuju glavne biljke domaćini koje potiču sa mjesta proizvodnje iz tač. 1 do 3 ovog stava;
- 5) sve uređaje, prevozna sredstva, skladišta, ili njihove dijelove, kao i druge objekte ili predmete, uključujući i materijal za pakovanje, koji su mogli doći u dodir sa glavnim biljkama domaćinima koje su označene kao zaražene;
- 6) sve glavne biljke domaćine koje su bile uskladištene ili u dodiru sa nekim od objekata ili predmeta iz tačke 5 ovog stava prije njihovog čišćenja i dezinfekcije;
- 7) biljke paradajza koje potiču iz istih izvora kao i paradajz koji je označen kao zaražen, odnosno krtole ili biljke krompira koje su sestrinski ili roditeljski klonski povezane sa krtolama i/ili biljkama krompira koji je označen kao zaražen štetnim organizmom, i koji se, iako su rezultati testiranja sprovedeni u skladu sa propisanim postupcima iz Priloga 2 negativni, smatraju vjerovatno zaraženim zbog klonske srodnosti sa krompirom označenim kao zaraženim, a kod paradajza, zbog istog izvora kao i paradajz označen kao zaražen. Kada je potrebno, može se sprovesti i test sortnosti da bi se provjerio identitet zaraženih i klonski srodnih krtola ili biljaka krompira;
- 8) mjesta proizvodnje glavnih biljaka domaćina iz tačke 7 ovog stava;
- 9) mjesta proizvodnje glavnih biljaka domaćina na kojima se za navodnjavanje ili prskanje upotrebljava voda koja je označena kao zaražena;
- 10) glavne biljke domaćine proizvedene na parcelama koja su bila poplavljena površinskom vodom za koju je utvrđeno da je zaražena štetnim organizmom.

Sigurnosna zona Član 12

Fitosanitarni inspektor određuje sigurnosnu zonu iz člana 9 stav 1 tačka 4 ovog pravilnika, na predlog Fitosanitarne uprave, na osnovu obima i izvora primarne zaraze, obima vjerovatne zaraze i mogućeg širenja štetnog organizma.

Moguće širenje štetnog organizma iz stava 1 ovog člana određuje se na osnovu:

- blizine drugih mjesta proizvodnje glavnih biljaka domaćina;
- zajedničke proizvodnje i zajedničke upotrebe zaliha sjemenskog krompira;
- mjesta proizvodnje na kojima se upotrebljava površinska voda za navodnjavanje ili prskanje glavnih biljaka domaćina, na kojima postoji ili je postojala mogućnost površinskog doticanja vode sa mjesta proizvodnje koja su označena kao zaražena ili mogućnost poplave vodom sa mjesta proizvodnje koja su označena kao zaražena.

Postupak u slučaju zaraze drugih biljaka domaćina Član 13

Ako se laboratorijskim testiranjem sprovedenim u skladu sa propisanim postupcima iz Priloga 2 ovog pravilnika, potvrdi zaraza štetnim organizmom u usjevu drugih biljaka domaćina, u područjima gdje je ugrožena proizvodnja glavnih biljaka domaćina, fitosanitarni inspektor:

- sprovodi istraživanje glavnih biljaka domaćina u skladu sa članom 10 ovog pravilnika;
- označava kao zaražene biljke domaćine iz kojih je uzet uzorak;
- određuje vjerovatnu zarazu i sigurnosnu zonu u skladu sa čl. 11 i 12 ovog pravilnika.

Postupak u slučaju zaraze površinskih voda Član 14

Ako se laboratorijskim testiranjem sprovedenim u skladu sa postupcima iz Priloga 2 ovog pravilnika, potvrdi prisustvo štetnog organizma u površinskoj vodi (uključujući i tečni otpad koji nastaje u industrijskoj preradi glavnih biljaka domaćina ili u pogonima za njihovo pakovanje) ili u samoniklom bilju iz porodice *Solanaceae* koje u njoj raste, a proizvodnja glavnih biljaka domaćina je ugrožena zbog korišćenja vode za navodnjavanje, prskanja ili zbog poplava, fitosanitarni inspektor:

- uzima uzorak površinskih voda i prisutnih samoniklih biljaka iz porodice *Solanaceae*, u odgovarajućim vremenskim periodima, radi utvrđivanja obima zaraze;
- označava, u dovoljno velikom obimu, kao zaraženu površinsku vodu iz koje je uzet uzorak, na osnovu sprovedene analize uzorka iz alineje 1 ovog stava;
- određuje vjerovatnu zarazu i sigurnosnu zonu na osnovu označene zaraze iz alineje 2 ovog stava i mogućeg širenja štetnog organizma u skladu sa članom 11 ovog pravilnika.

Moguće širenje štetnog organizma određuje se na osnovu:

- mjesta proizvodnje glavnih biljaka domaćina koja su ugrožena poplavom ili se graniče sa površinskom vodom koja je označena kao zaražena;
- svakog zasebnog područja navodnjavanja koje je u vezi sa površinskom vodom koja je označena kao zaražena;
- vodenih tokova povezanih sa površinskom vodom koja je označena kao zaražena, uzimajući u obzir:
 - a) smjer i brzinu toka vode označene kao zaražene;
 - b) prisustvo samoniklih biljaka domaćina iz porodice *Solanaceae*.

Obavješćavanje u slučaju potvrđene zaraze Član 15

U slučaju potvrđene zaraze štetnim organizmom obavješćavaju se države članice Evropske Unije i Evropska Komisija sa podacima o:

1) za krompir:

- nazivu sorte i partiji,
- namjeni (merkantilni ili sjemenski), odnosno kategoriji sjemenskog krompira,

2) za biljke paradajza

- nazivu sorte i partiju, odnosno kategoriji.

Fitosanitarna uprava obavješćava organ nadležan za zdravstvenu zaštitu bilja druge države kojoj prijeti rizik od širenja zaraze na glavne biljke domaćine i to o:

- nazivu sorte krompira ili paradajza i partije,
- nazivu i adresi pošiljaoca i primaoca,
- datumu prispjeća partije krompira ili paradajza,
- veličini isporučene partije krompira ili paradajza,
- podacima iz biljnog pasoša odnosno otpremnice (kopija biljnog pasoša odnosno kopija otpremnice) ili o broju pasoša, registarskom broju uvoznika, proizvođača, distributera i skladištara.

O obavješćavanju iz stava 2 ovog člana, izvještava se Evropska Komisija.

Nakon završetka svih istraživanja o utvrđivanju zaraze štetnim organizmom, Evropskoj Komisiji dostavljaju se sljedeći podaci:

- datum kada je zaraza potvrđena;
- kratak opis istraživanja sprovedenog radi identifikacije izvora i mogućeg širenja zaraze, uključujući i podatke o uzimanju uzoraka;
- o identifikovanim ili mogućim izvorima zaraze;
- o obimu označene zaraze, uključujući broj mjesta proizvodnje i, za krompir, broj partija sa nazivom sorte i, kada se radi o sjemenskom krompiru, kategorija;
- o sigurnosnoj zoni, uključujući broj mjesta proizvodnje koja nisu označena kao zaražena, ali su uključena u sigurnosnu zonu;
 - o zaraženoj vodi, uključujući naziv i lokaciju vode i područje u kojem se zabranjuje navodnjavanje;
 - fitosertifikat i broj biljnog pasoša za sve pošiljke ili partije biljaka paradajza označene kao zaražene,
 - i druge podatke o potvrđenoj iznenadnoj pojavi štetnog organizma koje može zatražiti Evropska Komisija.

V. MJERE

Mjere i postupci sa zaraženim glavnim biljkama domaćinima Član 16

Glavne biljke domaćini koje se smatraju zaraženim u skladu sa članom 9 stav 1 tačka 2 alineja 1 ovog pravilnika ne smiju se saditi, već se pod nadzorom fitosanitarnog inspektora moraju podvrgnuti jednoj od sljedećih mjera i postupaka, pod uslovom da ne postoji rizik od širenja štetnog organizma i to:

- upotreba kao hrana za životinje nakon odgovarajuće toplotne obrade, koja ne ostavlja nikakvu mogućnost preživljavanja štetnog organizma; ili
- odlaganje na mjestu odobrenom za odlaganje otpada, za koje je utvrđeno da ne postoji rizik od nekontrolisanog širenja štetnog organizma u okolinu (cijedenjem kroz pore zemljišta do poljoprivrednog zemljišta ili kontaktom sa vodom koja bi se mogla upotrijebiti za navodnjavanje poljoprivrednog zemljišta; ili
- spaljivanje ili
- industrijska prerada pod uslovom da se direktno i odmah dopreme do mjesta prerade, na kojem mora postojati službeno odobrena oprema za odlaganje otpada, čijim je korišćenjem uklonjena rizik od širenja štetnog organizma i na kojem postoji sistem za čišćenje i dezinfekciju barem onih prevoznih sredstava koja napuštaju mjesto prerade; ili
- druge mjere pod uslovom da nema rizika od širenja štetnog organizma.

O mjerama iz stava 1 ovog člana i njihovoj opravdanosti, obavještava se Evropska Komisija i države članice Evropske Unije.

Preostali otpad koji je nastao kao rezultat sprovedenih mjera iz stava 1 ovog člana, odlaže se u skladu sa postupkom o odlaganju otpada iz člana 19 ovog pravilnika.

Mjere i postupci sa vjerovatno zaraženim glavnim biljkama domaćinima Član 17

Glavne biljke domaćini koje se smatraju vjerovatno zaraženim štetnim organizmom u skladu sa čl. 11 i 14 stav 1 alineja 3 ovog pravilnika, uključujući i glavne biljke domaćine koje su uzgajane na mjestima proizvodnje koja se smatraju vjerovatno zaraženim u skladu sa članom 11 ovog pravilnika ne smiju se saditi, već se pod nadzorom fitosanitarnog inspektora mogu:

1) u slučaju krtola krompira:

- koristiti kao merkantilni krompir namijenjen ishrani, pri čemu mora biti pakovan na mjestima koja raspolažu odgovarajućom opremom za odlaganje otpada i koji je spreman za neposrednu dostavu i upotrebu bez naknadnog prepakovanja a sa sjemenskim krompirom dozvoljeno je rukovati na istim mjestima samo ako se radi odvojeno ili nakon čišćenja i dezinfekcije ili
- koristiti kao merkantilni krompir namijenjen industrijskoj preradi, uz direktnu i brzu dostavu do pogona za preradu, koji mora raspolagati odgovarajućom opremom za

- odlaganje otpada i sistemom za čišćenje i dezinfekciju onih prevoznih sredstava koji napuštaju mjesto prerade ili
- odložiti na propisan način, pod uslovom da nema rizika od širenja štetnog organizma.
- 2) u slučaju ostalih djelova glavnih biljaka domaćina, uključujući ostatke stabljika i lišća:
- uništiti ili
 - odložiti na propisan način, pod uslovom da nema rizika od širenja štetnog organizma.

Čišćenje i dezinfekcija Član 18

Uređaji, prevozna sredstva, skladišta i njihovi dijelovi, ili drugi objekti i predmeti, uključujući materijal za pakovanje, koji su označeni kao zaraženi ili se smatraju vjerovatno zaraženim, moraju se uništiti ili očistiti ili na odgovarajući način dezinfikovati radi otklanjanja rizika od širenja štetnog organizma.

Objekti i predmeti, nakon izvršene dezinfekcije iz stava 1 ovog člana, ne smatraju se zaraženim.

Postupci odlaganja otpada Član 19

Odlaganje otpada nastalog u postupku industrijske prerade iz člana 14 ovog pravilnika, vrši se na način da se izbjegne svaki rizik od širenja štetnog organizma i to:

- 1) otpad krompira i paradajza (uključujući odbačeni krompir, koru i paradajz) i drugi čvrsti otpad koji je u vezi sa krompirom i paradajzom (uključujući zemljište, kamenje i druge ostatke):
 - odlaže se na mjestu određenom za odlaganje otpada, na kojem ne postoji rizik od nekontrolisanog širenja štetnog organizma u okolinu (cijedenjem kroz pore tla do poljoprivrednog zemljišta ili kontaktom sa vodom koja bi se mogla upotrijebiti za navodnjavanje poljoprivrednog zemljišta), takođe se otpad prevozi direktno, u zatvorenom prevoznom sredstvu ili
 - spaljuje ili
 - se odstranjuje primjenom drugih mjera koje ne dovode do rizika od širenja štetnog organizma.
- 2) tečni otpad nastao u preradi koji sadrži čvrste čestice u rasutom stanju, prije uklanjanja mora se filtrirati ili obraditi postupkom sedimentacije radi odstranjivanja čvrstih čestica, nakon čega se čestice uklanjaju na način iz tačke 1 ovog stava, a tečni dio otpada mora se:
 - prije odstranjivanja u cjelosti zagrijati na temperaturu od najmanje 60° C u trajanju najmanje 30 minuta ili
 - odstraniti pod službenim nadzorom na drugi službeno odobreni način koji onemogućava da otpad dođe u dodir sa poljoprivrednim zemljištem ili vodom koja se može upotrijebiti za navodnjavanje poljoprivrednog zemljišta.

O preduzimanju mjera iz stava 1 ovog člana obavještava se Evropska Komisija i države članice Evropske Unije.

Postupci iz stava 1 ovog člana primjenjuju se i na otpad koji nastaje tokom rukovanja, odstranjivanja i prerade zaraženih partija paradajza i krtola krompira.

Mjere u sigurnosnoj zoni Član 20

U sigurnosnoj zoni primjenjuju se mjere iz Priloga 2 ovog pravilnika.

Nakon završetka svih istraživanja, podaci o preduzetim mjerama iz stava 1 ovog člana sakupljaju se i arhiviraju, jednom godišnje, radi daljeg izvještavanja država članica Evropske unije i Evropske Komisije.

Postupak sa sjemenskim krompirom Član 21

Sjemeni krompir mora da vodi porijeklo od materijala dobijenog u skladu sa propisanim postupkom kontrole za koji je sprovedenim laboratorijskim testiranjem utvrđeno da nije zaražen štetnim organizmom.

Testiranje sjemenskog krompira iz stava 1 ovog člana sprovodi se:

1) u slučajevima potvrđene zaraze u vlastitoj proizvodnji sjemenskog krompira:

- na ranijim generacijama u lancu vegetativnog razmnožavanja, uključujući početnu fazu klonske selekcije i sistematsko testiranje klonova osnovnog sjemena;
- na svim klonova osnovnog sjemena ili ranijim generacijama u lancu vegetativnog razmnožavanja, uključujući biljke iz početne faze klonske selekcije, kada je utvrđeno da ne postoji klonska srodnost;

2) u drugim slučajevima:

- ili na svakoj biljci koja se nalazi u početnoj fazi klonske selekcije;
- ili na reprezentativnim uzorcima osnovnog sjemena;
- ili na ranijim generacijama u lancu vegetativnog razmnožavanja.

Posjedovanje i korišćenje štetnog organizma

Član 22

Štetni organizam se ne smije posjedovati i na bilo koji način koristiti.

Izuzeci

Član 23

Izuzetno od člana 22 ovog pravilnika, štetni organizam se može posjedovati i koristiti samo za eksperimentalne, naučne i selekcijske svrhe, pod uslovom da se time ne narušava nadzor nad štetnim organizmom i da nema rizika od njegovog širenja.

Druge mjere

Član 24

Radi suzbijanja ili sprječavanja širenja štetnog organizma mogu se primjeniti i druge dodatne mjere, o čemu se obavještavaju države članice Evropske unije i Evropska Komisija.

VI. ZAVRŠNA ODREDBA

Član 25

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom listu Crne Gore".

Broj:

Podgorica, 16. novembra. 2010.godine

Ministar

mr **Milutin Simović**, s.r.

* Pravilnik je usaglašen sa Direktivom Savjeta **98/57/EC** od 20. Jula 1998 o kontroli ***Ralstonia solanacearum*** (Smith) Yabuuchi et al., prouzrokovaca smeđe truleži krtola krompira i bakterijskog uvenuća krompira i paradajza

**ŠEMA TESTIRANJA ZA DIJAGNOZA, DETEKCIJU I IDENTIFIKACIJU
BAKTERIJE *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*
PODRUČJE PRIMJENE ŠEME TESTIRANJA**

Prikazana šema testiranja opisuje različite postupke za:

- dijagnoza smeđe truleži krtola krompira i bakterijskog uvenuća krompira, paradajza i drugih biljaka domaćina;
- detekciju bakterije *Ralstonia solanacearum* u uzorcima krtola krompira, biljaka krompira, paradajza i drugih biljaka domaćina kao i u vodi i tlu;
- identifikaciju bakterije *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

Ovaj prilog sadrži optimalne protokole za pojedine metode, validne (potvrđene i odobrene) reagense i pojedinosti za pripremu materijala za testiranje i kontrolnog (referentnog) materijala.

Popis laboratorija koje su učestvovala u optimizaciji i validaciji protokola nalazi se u Dodatku 1.

S obzirom da protokoli uključuju detekciju karantinskog organizma i upotrebu živih kultura *R. solanacearum* kao kontrolnih (referentnih) materijala, procedura se mora izvoditi u propisanim karantinskim uslovima sa odgovarajućim objektima za odlaganje otpada u skladu sa ovim pravilnikom.

Parametri testiranja moraju osigurati ujednačene i ponovljive nivoe detekcije *R. solanacearum* prema propisanim pragovima osjetljivosti za pojedine metode.

Precizna priprema pozitivnih kontrola je obavezna.

Testiranje u skladu sa zahtjevanim pragom osjetljivosti podrazumijeva pravilno postavljanje, održavanje i kalibriranje opreme, pažljivo čuvanje i rukovanje reagensima kao i preduzimanje mjera za sprječavanje kontaminacije među uzorcima, npr. razdvajanje pozitivnih kontrola od uzoraka za testiranje. Moraju se primijeniti standardi kontrole kvaliteta kako bi se izbjegle administrativne i druge greške, posebno pri označavanju uzoraka i vođenju dokumentacije.

Sumnja na prisustvo patogena u uzorku podrazumijeva pozitivan rezultat testa provjere uzorka, kao što je prikazano u dijagramima toka.

Pozitivan rezultat dobijen u prvom brzom testu provjere (IF test, PCR/FISH, selektivna izolacija) mora se potvrditi drugim testom provjere koji se zasniva na drugom biološkom načelu.

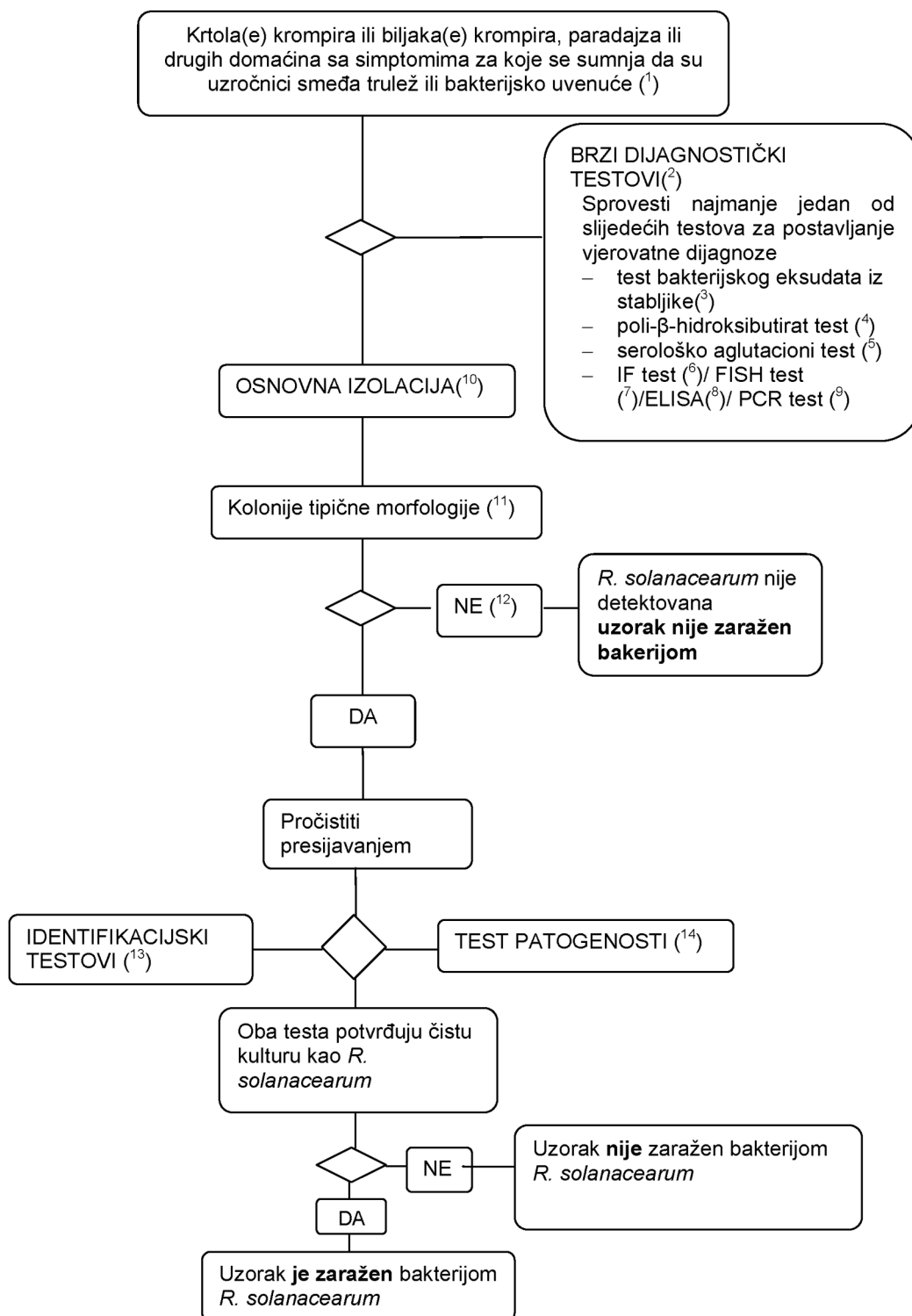
Ako je rezultat prvog testa provjere (IF test, PCR/FISH) pozitivan, tada se sumnja na prisustvo bakterije *R. solanacearum* i mora se sprovesti drugi test provjere. Ako je rezultat drugog testa provjere pozitivan, tada je sumnja potvrđena i testiranje se mora nastaviti prema šemi testiranja. Ako je rezultat drugog testa provjere negativan, tada se smatra da bakterija *R. Solanacearum* nije prisutna u uzorku. Pozitivan rezultat IF testa se definiše kao pozitivno očitavanje IF testa potvrđeno i drugim testom provjere (PCR/FISH).

Potvrđeno prisustvo patogena podrazumijeva izolaciju i identifikaciju čiste kulture *R. solanacearum* kao i potvrdu pojedinosti.

ODJELJAK I PRIMJENA ŠEME TESTIRANJA

- 1) **Šema za detekciju i dijagnozu uzročnika smeđe truleži i bakterijskog uvenuća (*R. solanacearum*) u krtolama krompira i biljkama krompira, paradajza ili drugim biljkama domaćinima sa simptomima smeđe truleži ili bakterijskog uvenuća.**

Postupak testiranja je namijenjen za krtole i biljke krompira sa simptomima tipičnim za ili koji upućuju na smeđu trulež ili bakterijsko uvenuće. Postupak uključuje brzi test provjere, izolaciju patogena iz zaraženog provodnog tkiva na (selektivnu) hranjivu podlogu i u slučaju pozitivnog rezultata, identifikaciju čiste kulture kao bakterije *R. solanacearum*.



- (¹) Opis simptoma naveden je u Odjeljku II. 1.
- (²) Brzi dijagnostički testovi olakšavaju postavljanje vjerovatne dijagnoze, ali nisu nužni. Negativan rezultat ne garantuje uvijek odsutnost patogena.
- (³) Test bakterijskog eksudata iz sprovodnog tkiva stabljike opisan je u Odjeljku VI. A. 1.
- (⁴) Test za detekciju zrnaca poli-β-hidroksibutirata u bakterijskim ćelijama opisan je u Odjeljku VI.A.2.
- (⁵) Serološki testovi aglutinacije na bakterijskom eksudatu ili ekstraktu iz tkiva sa simptomoma opisani su u Odjeljku VI.A.3.
- (⁶) IF test na bakterijskom eksudatu suspendovanom u vodi ili na ekstraktu iz tkiva sa simptomoma opisan je u Odjeljku VI.A.5.
- (⁷) FISH test na bakterijskom eksudatu suspendovanom u vodi ili na ekstraktu iz tkiva sa simptomoma opisan je u Odjeljku VI.A.7.
- (⁸) ELISA test na bakterijskom eksudatu suspendovanom u vodi ili na ekstraktu iz tkiva sa simptomima opisan je u Odjeljku VI.A.8.
- (⁹) PCR test na bakterijskom eksudatu suspendovanom u vodi ili na ekstraktu iz tkiva sa simptomima opisan je u Odjeljku VI.A.6.
- (¹⁰) Patogen se obično može lako izolovati iz biljnog materijala sa simptomima metodom razrjeđivanja i izolacije na hranjivu podlogu (Odjeljak II.3.)
- (¹¹) Tipična morfologija kolonije opisana je u Odjeljku II.3.d.
- (¹²) Gajenje bakterijske kulture može biti neuspješno u naprednom stadijumu infekcije zbog kompeticije ili pretjeranog razmnožavanja saprofitnih bakterija. Ako su simptomi bolesti tipični, a test izolacije negativan, test izolacije se mora ponoviti, najbolje na selektivnoj hranjivoj podlozi.
- (¹³) Pouzdana identifikacija čistih kultura vjerovatnih izolata bakterije *R. solanacearum* postiže se sprovođenjem testova opisanih u Odjeljku VI.B. Nespecifična karakterizacija je neobavezna ali se preporučuje za svaki novi slučaj.
- (¹⁴) Test patogenosti opisan je u Odjeljku VI.C.

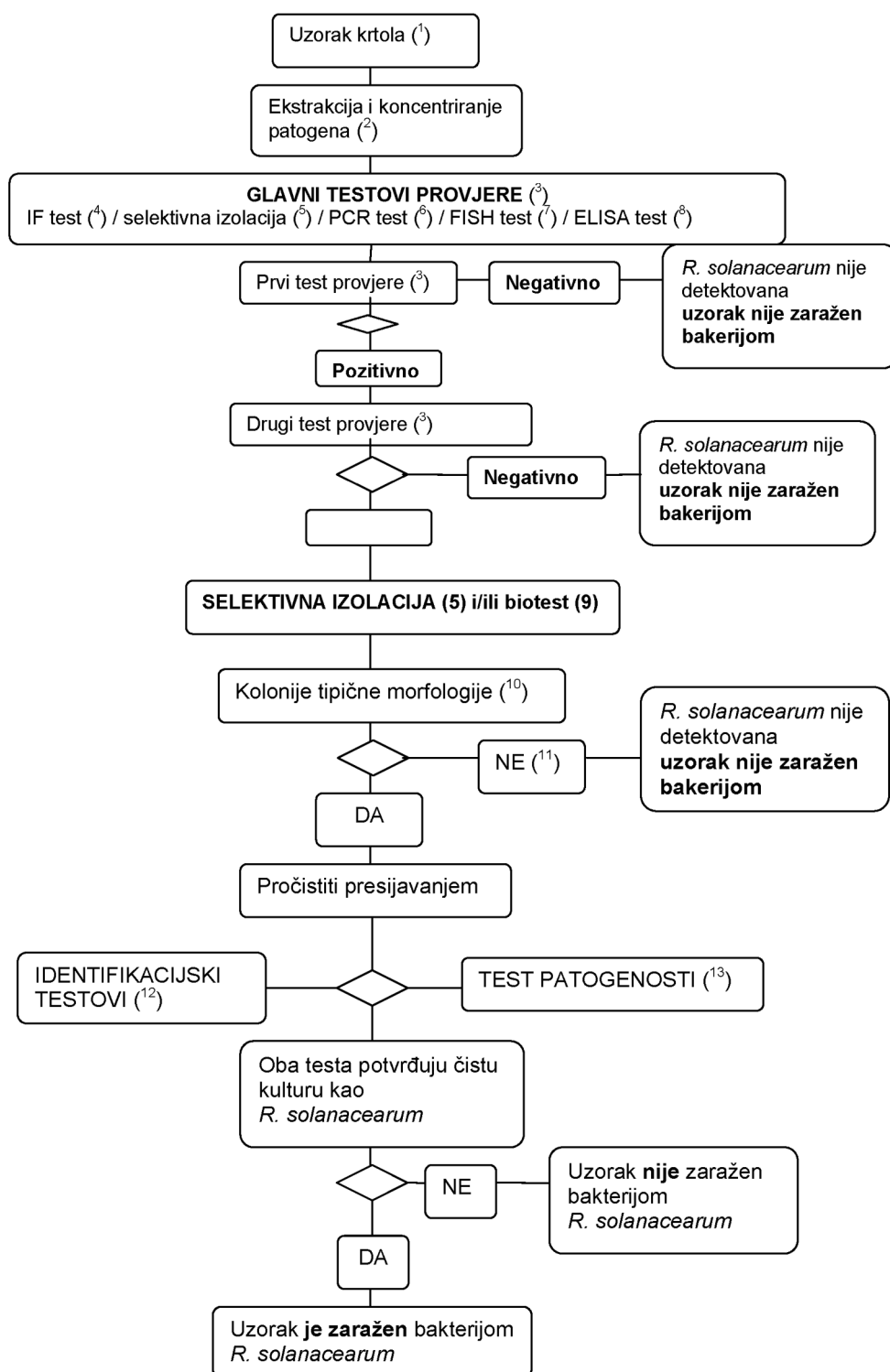
2). Šema detekcije i identifikacije bakterije *R. solanacearum* u uzorcima krtola krompira bez simptoma

Načelo:

Postupak testiranja namijenjen je za detekciju skrivene zaraze u krtolama krompira. Pozitivan rezultat najmanje dva testa provjere (³), koji se zasnivaju na različitim biološkim načelima, mora se dopuniti izolacijom patogena nakon čega slijedi, u slučaju izolacije tipičnih kolonija, potvrda čiste kulture kao *R. solanacearum*.

Pozitivan rezultat dobijen na bazi samo jednog od testova provjere nije dovoljan da bi se uzorak smatrao zaraženim. Testovi provjere i izolacija moraju omogućiti prag detekcije 10^3 do 10^4 ćelija/ml resuspendovanog taloga uključenog kao pozitivna kontrola u svakoj seriji testova.

(¹)



Standardna veličina uzoraka je 200 krtola, iako se postupak može sprovesti i na manjim uzorcima, ako nije na raspolaganju 200 krtola.

(²) Metode ekstrakcije i koncentrovanja patogena opisane su u Odjeljku III. 1.1.

(³) Ako su rezultati najmanje dva testa, koji se zasnivaju na različitim biološkim načelima, pozitivni, potrebno je sprovesti izolaciju i potvrdu. Sprovesti barem jedan test provjere. Kada je rezultat tog testa negativan, smatra se da je taj uzorak negativan. U slučaju da je rezultat tog testa pozitivan, potrebno je sprovesti drugi ili više testova provjere, koji se zasnivaju na različitim biološkim načelima, kako bi se potvrdio pozitivan rezultat. Ako su rezultati drugih ili ostalih testova negativni, smatra se da je taj uzorak negativan. Dalji testovi nisu potrebni.

(⁴) IF test opisan je u Odjeljku VI.A.5.

(⁵) Selektivna izolacija opisana je u Odjeljku VI.A.4.

(⁶) PCR testovi opisani su u Odjeljku VI.A.6.

(⁷) FISH test opisan je u Odjeljku VI.A.7.

(⁸) ELISA testovi opisani su u Odjeljku VI.A.8.

(⁹) Biotest opisan je u Odjeljku VI.A.9.

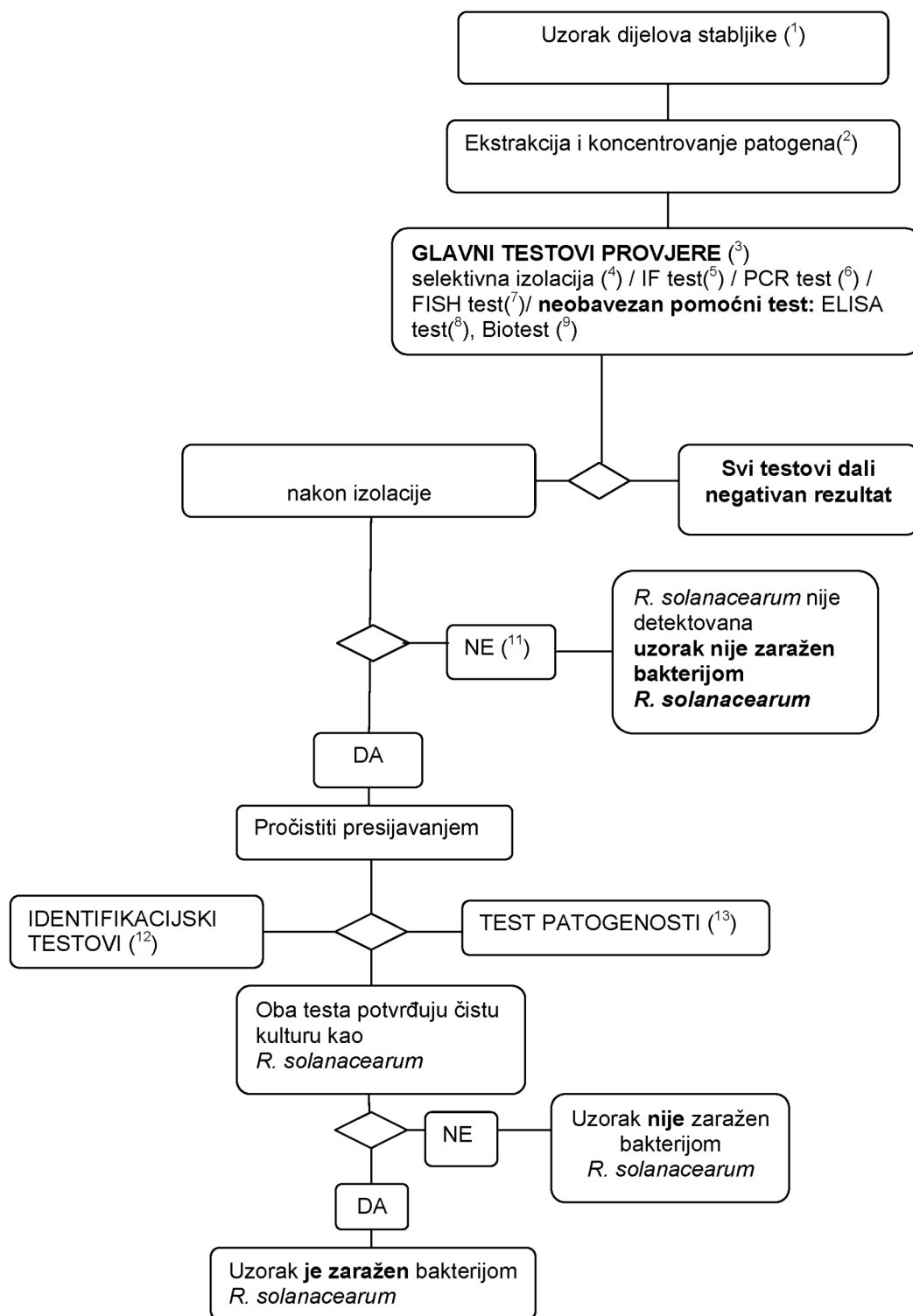
(¹⁰) Tipična morfologija kolonije opisana je u Odjeljku II.3.d.

(¹¹) Gajenje bakterijske kulture ili biotest mogu biti neuspješni zbog kompeticije ili inhibicije saprofitnim bakterijama. Ako se testovima provjere dobiju jasno pozitivni rezultati, a rezultati izolacije su negativni, ponoviti testove izolacije iz istog resuspendovanog taloga ili ponoviti uzimanje sprovednog tkiva na mestu vezivanja stolona kod krtola odnosno iz okaca krtola, iz istog uzorka i ako je potrebno, testirati dodatne uzorke.

(¹²) Pouzdana identifikacija čistih kultura vjerovatnih izolata bakterije *R. solanacearum* postiže se sprovođenjem testova opisanih u Odjeljku VI.B.

(¹³) Test patogenosti opisan je u Odjeljku V

3). Šema za detekciju i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u uzorcima biljaka krompira, paradajza ili drugih biljaka domaćina bez simptoma



(1) Za preporučene veličine uzoraka Odjeljak III.2.1.

(2) Metode ekstrakcije i koncentrovanja patogena opisane su u Odjeljku III.2.1.

(³) Ako su rezultati najmanje dva testa, koji se zasnivaju na različitim biološkim načelima, pozitivni, potrebno je sprovesti izolaciju i potvrdu. Sprovesti barem jedan test provjere. Kada je rezultat tog testa negativan, smatra se da je taj uzorak negativan. U slučaju da je rezultat tog testa pozitivan, potrebno je sprovesti drugi ili više testova provjere, koji se zasnivaju na različitim biološkim načelima, kako bi se potvrdio pozitivan rezultat. Ako su rezultati drugih ili ostalih testova negativni, smatra se da je taj uzorak negativan. Dalji testovi nisu potrebni.

(⁴) Selektivna izolacija opisana je u Odjeljku VI.A.4.

(⁵) IF test opisan je u Odjeljku VI.A.5.

(⁶) PCR testovi opisani su u Odjeljku VI.A.6.

(⁷) FISH test opisan je u Odjeljku VI.A.7.

(⁸) ELISA test opisani su u Odjeljku VI.A.8.

(⁹) Biotest opisan je u Odjeljku VI.A.9.

(¹⁰) Tipična morfologija kolonije opisana je u Odjeljku II.3.d.

(¹¹) Gajenje bakterijske kulture ili biotest mogu biti neuspješni zbog kompeticije ili inhibicije saprofitnim bakterijama. Ako se testovima provjere dobiju jasno pozitivni rezultati, a rezultati izolacije su negativni, ponoviti testove izolacije.

(¹²) Pouzdana identifikacija čistih kultura vjerovatnih izolata bakterije *R. solanacearum* postiže se sprovođenjem testova opisanih u Odjeljku VI.B.

(¹³) Test patogenosti opisan je u Odjeljku VI.C.

ODJELJAK II

DETALJNE METODE ZA DETEKCIJU BAKTERIJE *R. SOLANACEARUM* U KRTOLAMA KROMPIRA I BILJKAMA KROMPIRA, PARADAJZA ILI DRUGIM BILJKAMA DOMAĆINIMA SA SIMPTOMIMA SMEĐE TRULEŽI ODNOSNO BAKTERIJSKOG UVENUĆA

1. Simptomi

1.1. Simptomi na krompiru

Biljka krompira

Početna faza infekcije na parceli prepoznaje se po uvenuću lišća pri vrhu biljke na visokim temperaturama tokom dana, ali koje se oporavlja tokom noći. U ranim fazama uvenuća lišće ostaje zeleno ali kasnije počinje da žuti i razvija se smeđa nekroza. Dolazi i do epinastije. Ubrzo dolazi do nepovratnog uvenuća izdanka ili cijele biljke što dovodi do propadanja i odumiranja. Provodno tkivo poprečno prerezane stabljike uvenule biljke obično je smeđe boje, a iz presječenog mjesta izlazi ili se lako može gnječenjem istisnuti mliječni bakterijski eksudat. Kad se prerezana stabljika stavi uspravno u vodu, iz sprovodnih sudova ističe bakterijski eksudat.

Krtola krompira

Krtole krompira treba prerezati poprečno ili uzdužno u blizini okaca krtola. Početna faza infekcije prepoznaje se po promjeni boje sprovodnog prstena od staklasto-žute do svijetlosmeđe iz kojeg se spontano, nakon nekoliko minuta, pojavljuje blijedi kremasti bakterijski eksudat. Kasnije, sprovodno tkivo postaje izrazitije smeđe i nekroza se može proširiti na parenhimsko tkivo. U uznapredovalim fazama infekcija bakterijski eksudat može cureti i iz pupčanog dijela i iz okaca na koju se lijepe čestice zemljišta. Na kori se mogu pojaviti crvenkasto-smeđa ulegnuća zbog propadanja sprovodnog tkiva iznutra. U uznapredovalim fazama bolesti uobičajen je i sekundarni razvoj gljivične i bakterijske meke truleži.

1.2. Simptomi na paradajzu

Biljka paradajza

Prvi vidljivi simptom je uvenulost najmlađih listova. U uslovima koji su povoljni za patogena (temperatura zemljišta oko 25 °C; zasićenost vlagom) u roku od nekoliko dana dolazi do epinastije i uvenuća samo jedne strane ili cijele biljke što dovodi do potpunog propadanja. U manje povoljnim uslovima (temperatura zemljišta manja od 21 °C) uvenuća se ređe pojavljuje, ali se na stabljici može razviti veliki broj adventivnog korijenja. Moguće je uočiti kao vodom natopljene pruge koje se protežu duž stabljike, od njene baze, koje su dokaz nekroze u sprovodnom sistemu. Ako se stabljika unakrsno prereže, iz provodnog tkiva čija je boja promijenjena u smeđu, curi bijeli ili žućkasti bakterijski eksudat.

1.3. Simptomi na drugim biljkama domaćinima

Biljke *Solanum dulcamara* i *S. Nigrum*

U prirodnim uslovima rijetko se uočavaju simptomi uvenuća kod ovih biljaka domaćina, osim ako temperatura zemljišta prelazi 25 °C ili ako su nivoi inokuluma izuzetno visoki (npr. *S. nigrum* koji raste blizu oboljele biljke krompira ili paradajza). Ako dođe do uvenuća, simptomi su isti kao i kod paradajza. Biljke *S. dulcamara* rastu sa stabljikama i korijenjem u vodi i na njima nije vidljivo uvenuća, ali je na poprečnom prerezu osnove stabljike ili dijelovima stabljike koji su pod vodom vidljiva svijetlosmeđa obojenost sprovodnog tkiva. Bakterije mogu izlaziti iz prerezanog sprovodnog tkiva, u obliku sluzavog eksudata ili niti, ako prerezanu stabljiku stavimo uspravno u vodu, čak i ako nema simptoma uvenuća.

2. Brzi testovi provjere

Brzi testovi provjere olakšavaju postavljanje vjerovatne dijagnoze, ali nisu presudni. Primijeniti jedan ili više sljedećih validnih (odobrenih) testova:

2.1. Test eksudata iz stabljike (Odjeljak VI.A.1.)

2.2. Detekcija zrnaca poli- β -hidroksibutirata (PHB)

Karakteristična zrnca PHB-a u ćelijama *R. solanacearum* postaju vidljiva pri bojenju termički fiksiranog razmaza bakterijskog eksudata iz zaraženog tkiva na mikroskopskom stakalcu nilskim plavilom A i sudanskim crnilom B. (Odjeljak VI.A.2.).

2.3. Serološki testovi aglutinacije(Odjeljak VI.A.3.)

2.4. Ostali testovi

U ostale prikladne brze testove provjere spadaju IF test (Odjeljak VI.A.5.), FISH test (Odjeljak VI.A.7.), ELISA testovi (Odjeljak VI.A.8.) i PCR testovi (Odjeljak VI.A.6.).

3. Postupak izolacije

1) Uzeti bakterijski eksudat ili dijelove tkiva promijenjene boje iz sprovodnog prstena krtola krompira ili iz sprovodnih sudova stabljike krompira, paradajza ili drugih biljaka domaćina sa simptomima uvenuća. Suspendovati u manjoj količini sterilne destilovane vode ili 50 mM fosfatnog pufera (Dodatak 4) i ostaviti 5 do 10 minuta.

2) Pripremiti niz decimalnih razrjeđenja suspenzije.

3) Prenijeti 50-100 μ l suspenzije i razrjeđenja na uobičajenu hranjivu podlogu (NA, YPGA ili SPA; objašnjenje u Dodatku 2.) i/ili na Kelmanovu tetrazolij-podlogu (Dodatak 2.) i/ili na validiranu (odobrenu) selektivnu podlogu (npr. SMS A; pogledi Dodatak 2.). Razmazati primjenjujući odgovarajuću tehniku nanošenja razrjeđenja na podlogu. Ukoliko je potrebno, pripremiti odvojene podloge sa razrijeđenom ćelijskom suspenzijom bakterije *R. solanacearum* biovar 2 za pozitivnu kontrolu.

4) Inkubirati podloge od dva do šest dana na 28 °C.

Na uobičajenoj hranjivoj podlozi virulentni izolati bakterije *R. solanacearum* stvaraju pljosnate, nepravilne i tečne kolonije biserne kremasto-bijele boje, često sa karakterističnim spiralama u sredini. Nevirulentni oblici bakterije *R. solanacearum* stvaraju male, okrugle, ne-fluidne (nisu u tečnom stanju), maslaste kolonije koje su u cijelini kremasto-bijele boje.

Na Kelmanovoj tetrazolij-podlozi i na SMSA podlozi spirale su krvavo crvene boje.

Nevirulentni oblici bakterije *R. solanacearum* stvaraju male, okrugle, ne-fluidne, maslaste kolonije koje su u cijelini tamno crvene boje.

4. Identifikacioni testovi za bakteriju *R. solanacearum*

Testovi za potvrdu identifikacije vjerovatnih izolata *R. solanacearum* navedeni su u Odjeljku VI.B.

ODJELJAK III

1. Detaljne metode za detekciju i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u uzorcima krtola krompira bez simptoma

1.1. Priprema uzorka

Napomena:

- standardna veličina uzorka je 200 krtola po testu. Intenzivnije uzorkovanje zahtijeva više testova na uzorcima ove veličine. Veći broj krtola u uzorku dovodi do inhibicije ili otežava tumačenje rezultata. Međutim, postupak se može odgovarajuće primijeniti za uzorke sa manje od 200 krtola, kada je na raspolaganju manje krtola;
- validacija svih metoda za detekciju, koje su opisane u daljem tekstu, zasniva se na testiranju uzoraka od 200 krtola;
- ekstrakt krompira koji je opisan u daljem tekstu može se koristiti i za detekciju bakterije *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* koja uzrokuje prstenastu trulež krtola krompira.

Neobavezna obrada prije pripreme uzorka:

- (a) Inkubirajte uzorak na 25-30 °C u periodu do dvije sedmice prije sprovođenja testova, kako bi se podstaklo umnožavanje populacija bakterije *R. solanacearum*.
- (b) Oprati krtole. Upotrijebiti odgovarajuća dezinfekciona sredstva (pri korišćenju PCR testa upotrebiti jedinjenja hlora radi uklanjanja eventualno prisutne DNK patogena) i deterdžente između svakog uzorka. Osušiti krtole na vazduhu. Postupak pranja je posebno koristan (ali ne obavezan) za uzorke sa previše zemlje, pri izvođenju PCR testa ili procedure direktne izolacije.

- 1.1.1. Čistim i dezinfikovanim skalpelom ili nožem za povrće ukloniti pokožicu sa pupčanog dijela krtole, tako da provodno tkivo bude vidljivo. Pažljivo izrezati mali konusni dio sprovodnog tkiva (jezgro) zahvatajući što manje okolnog, nesprovodnog tkiva.

Napomena:

Odvojiti sve (trule) krtole sa mogućim simptomima smeđe truleži i testirati ih posebno. Ako se prilikom vađenja konusa iz pupčanog dijela (jezgra pupka) uoče potencijalni simptomi smeđe truleži, onda se krtola mora vizuelno pregledati i prerezati blizu pupka. Svaku prerezanu krtolu sa sumnjivim simptomima treba držati najmanje dva dana na sobnoj temperaturi kako bi suberizirao i čuvati na temperaturi od 4 do 10 °C u odgovarajućim karantinskim uslovima. Sve se krtole, uključujući i one sa sumnjivim simptomima, čuvaju u skladu sa odgovarajućim odredbama ovog pravilnika.

- 1.1.2. Staviti jezgre pupaka u sterilne posude za jednokratnu upotrebu koje se mogu zatvoriti i/ili hermetički zatvoriti (ako su posude već upotrebljavane, moraju se temeljno očistiti i dezinfikovati jedinjenjima hlora). Poželjno ih je odmah obraditi. Ako to nije moguće, čuvati ih u posudi bez dodatka pufera, najduže 72 sata u frižideru ili najduže 24 sata na sobnoj temperaturi.

Obraditi jezgre pupaka jednim od sljedećih postupaka:

- a) dodati dovoljnu količinu (oko 40 ml) ekstrakcionog pufera (Dodatak 4) da pokrije jezgre pupaka i ultracentrifugirati na 50-100 obrtaja/min, 4 sata na temperaturi ispod 24 °C ili 16 do 24 sata uz hlađenje; ili
- b) homogenizovati jezgre pupaka sa dovoljnom količinom (oko 40 ml) ekstrakcionog pufera (Dodatak 4), bilo u mješalici (npr. Waring ili Ultra Thurax) ili drobljenjem u dobro zatvorenoj vrećici za maceraciju za jednokratnu upotrebu (npr. kese Stomacher ili Bioreba od čvrstog polietena, 150 mm x 250 mm, sterilizovane zračenjem) koristeći gumeni čekić ili odgovarajuću drobilicu (npr. Homex).

Napomena:

Ako se uzorci homogenizuju u mješalici (blenderu), postoji velika opasnost od njihove unakrsne kontaminacije. Preduzeti mjere opreza kako bi spriječili nastajanje aerosola ili razlijevanje tokom postupka ekstrakcije. Za svaki uzorak upotrijebiti svježe sterilizovane nožice i posude mješalice. Tokom procedure PCR testa, spriječiti prenos DNK na kontejnere ili aparaturu za maceriranje (drobilicu). Za PCR test preporučuje se maceriranje u kesicama za jednokratnu upotrebu i korišćenje epruveta i tuba za jednokratnu upotrebu.

- 1.1.3. Odliti supernatant. Ako je previše mutan, razbistriti ga sporim centrifugiranjem (na najviše 180 g 10 minuta na temperaturi od 4 do 10 °C) ili vakuumskom filtracijom (40 do 100 µm) i dodatno isprati filter ekstrakcionim puferom (oko 10 ml).
- 1.1.4. Koncentrisati bakterijsku frakciju centrifugiranjem na 7000 g 15 minuta (ili 10000 g 10 minuta) na temperaturi od 4 do 10 °C i odliti supernatant pazeći pri tom da se ne pomiješa talog.
- 1.1.5. Resuspendovati talog u 1.5 ml pufera za talog (Dodatak 4). Upotrijebiti 500 µl za testiranje na *R. solanacearum*, 500 µl za *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* i 500 µl kao referentni materijal. U referentni alikvot (dio) od 500 µl i u preostale alikvote koji se testiraju dodajte sterilni glicerol do konačne koncentracije od 10 do 25 % (v/v), snažno promiješajte u centrifugalnoj mješalici i čuvajte na temperaturi od –16 do –24 °C (nedjeljama) ili od –68 do –86 °C (mjesecima). Tokom testiranja alikvote (dijelove) koji se koriste za utvrđivanje prisustva bakterija, čuvajte na temperaturi od 4 do 10 °C. Ne preporučuje se višestruko zamrzavanje i odmrzavanje. Ako je potreban transport ekstrakta, osigurajte dostavu u prenosivom frižideru u roku od 24 do 48 sati.
- 1.1.6 Sve pozitivne kontrole i uzorci *R. solanacearum* moraju se odvojeno pripremiti i obraditi kako bi se izbjegla kontaminacija. To važi za stakalca za imunofluorescenciju kao i za sve ostale testove.

1.2. Testiranje

Vidjeti dijagram, opis testova i optimalne protokole u odgovarajućim dodacima:

Selektivna izolacija (Vidjeti Odjeljak VI.A.4.)

IF test (Vidjeti Odjeljak VI.A.5.)

PCR testovi (Vidjeti Odjeljak VI.A.6.)

FISH test (Vidjeti Odjeljak VI.A.7.)

ELISA testovi (Vidjeti Odjeljak VI.A.8.)

Biostat (Vidjeti Odjeljak VI.A.9.)

2. Detaljne metode za detekciju i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u uzorcima biljaka krompira, paradajza ili drugih biljaka domaćina bez simptoma

2.1. Priprema uzorka

Napomena:

Za detekciju latentnih populacija bakterije *R. solanacearum* preporučuje se testiranje sastavljenih uzoraka. Postupak se može pogodno primijeniti na zbirne uzorke sa najviše 200 dijelova stabljika. Ako se sprovode sistematska istraživanja, ona se moraju zasnivati na statistički reprezentativnom uzorku biljne populacije koja se ispituje.

2.1.1. Staviti dijelove stabljika veličine 1 do 2 cm u zatvorenu sterilnu posudu prema sljedećim postupcima uzorkovanja:

Rasad paradajza iz rasadnika. Čistim dezinfikovanim nožem odrezati dio veličine 1 cm sa donjeg dijela svake stabljike, neposredno iznad površine zemljišta.

Biljke paradajza sa parcele ili staklenika. Čistim, dezinfikovanim nožem odrezati najniži bočni izdanak na svakoj biljci režući odmah iznad spoja sa stabljikom. Sa svakog bočnog izdanka odrezati donji dio veličine 1 cm.

Ostale biljke domaćini. Čistim, dezinfikovanim nožem ili baštenskim makazama odrezati dio veličine 1 cm sa donjeg dijela svake stabljike, neposredno iznad nivoa zemljišta. Ako se uzorkuje *S. dulcamara* ili druge biljke domaćini koje rastu u vodi, odrezati dio veličine 1-2 cm sa podvodnog dijela stabljike ili sa stolona sa vodenim korijenjem.

Pri uzorkovanju na određenoj lokaciji, preporučuje se testirati statistički reprezentativni uzorak od najmanje 10 biljaka po mjestu uzorkovanja za svaku vrstu samoniklog bilja koje je potencijalni domaćin. Detekcija patogena je najpouzdanija krajem proljeća i tokom ljeta i jeseni, iako se prirodne infekcije mogu otkriti tokom cijele godine kod višegodišnje biljke *Solanum dulcamara* koja raste u vodotokovima. Poznati domaćini su samonikle biljke krompira (krtole ostale u tlu), *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* i druge vrste porodice *Solanaceae*. Ostale biljke domaćini su *Pelargonium* spp. i *Portulaca oleracea*. Evropske vrste samoniklog bilja koje u

specifičnim uslovima okoline mogu biti potencijalni domaćini populacija *R. solanacearum* biovar 2 / rasa 3 u korijenju i/ili rizosferi su *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans.*, *Tussilago farfara* i *Urtica dioica*.

Napomena:

U ovoj fazi može se obaviti vizuelni pregled biljaka (obojenost žila ili bakterijski eksudat). Odvojiti sve dijelove stabljika sa simptomima i testirati ih posebno. (vidjeti Odjeljak II.)

2.1.2. Kratko dezinfikujte dijelove stabljika 70 %-tnim etanolom i odmah osušite upijajućim papirom. Dijelove stabljika potom obradite jednim od sljedećih postupaka:

a) prekrijte ih dovoljnom količinom (oko 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4) i ultracentrifugirajte na 50-100 obrtaja/min četiri sata na temperaturi ispod 24 °C ili 16 do 24 sata uz hlađenje, ili

b) dijelove stabljike izmacerirati (drobljenje) u čvrstoj kesi za maceraciju (npr. Stomacher ili Bioreba) sa odgovarajućom količinom ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4) koristeći gumeni čekić ili odgovarajuću opremu za maceriranje (npr. Homex). Ako to nije moguće, dijelove stabljike čuvati u frižideru najduže 72 sata ili na sobnoj temperaturi najduže 24 sata.

2.1.3. Nakon 15 minuta taloženja, odliti supernatant.

2.1.4. Dodatno izbistravanje ekstrakta ili koncentrovanje bakterijske frakcije obično nije potrebno, ali se može postići filtriranjem i/ili centrifugiranjem kako je opisano u Odjeljku III. 1.1.3. - 1.1.5.

2.1.5. Podijeliti čisti ili koncentrirani ekstrakt uzorka na dva jednaka dijela. Jednu polovinu čuvati na temperaturi od 4 do 10 °C tokom testiranja, a drugu polovinu čuvati sa 10-25 % (v/v) sterilnog glicerola na temperaturi od -16 do -25 °C (sedmicama) ili od -68 do -86 °C (mjesecima) u slučaju da je potrebno dalje testiranje.

2.2. Testiranje

Vidjeti dijagram i opis testova i optimalnih protokola u odgovarajućim dodacima:

Selektivna izolacija (Vidjeti Odjeljak VI.A.4.)

IF test (Vidjeti Odjeljak VI.A.5.)

PCR testovi (Vidjeti Odjeljak VI.A.6.)

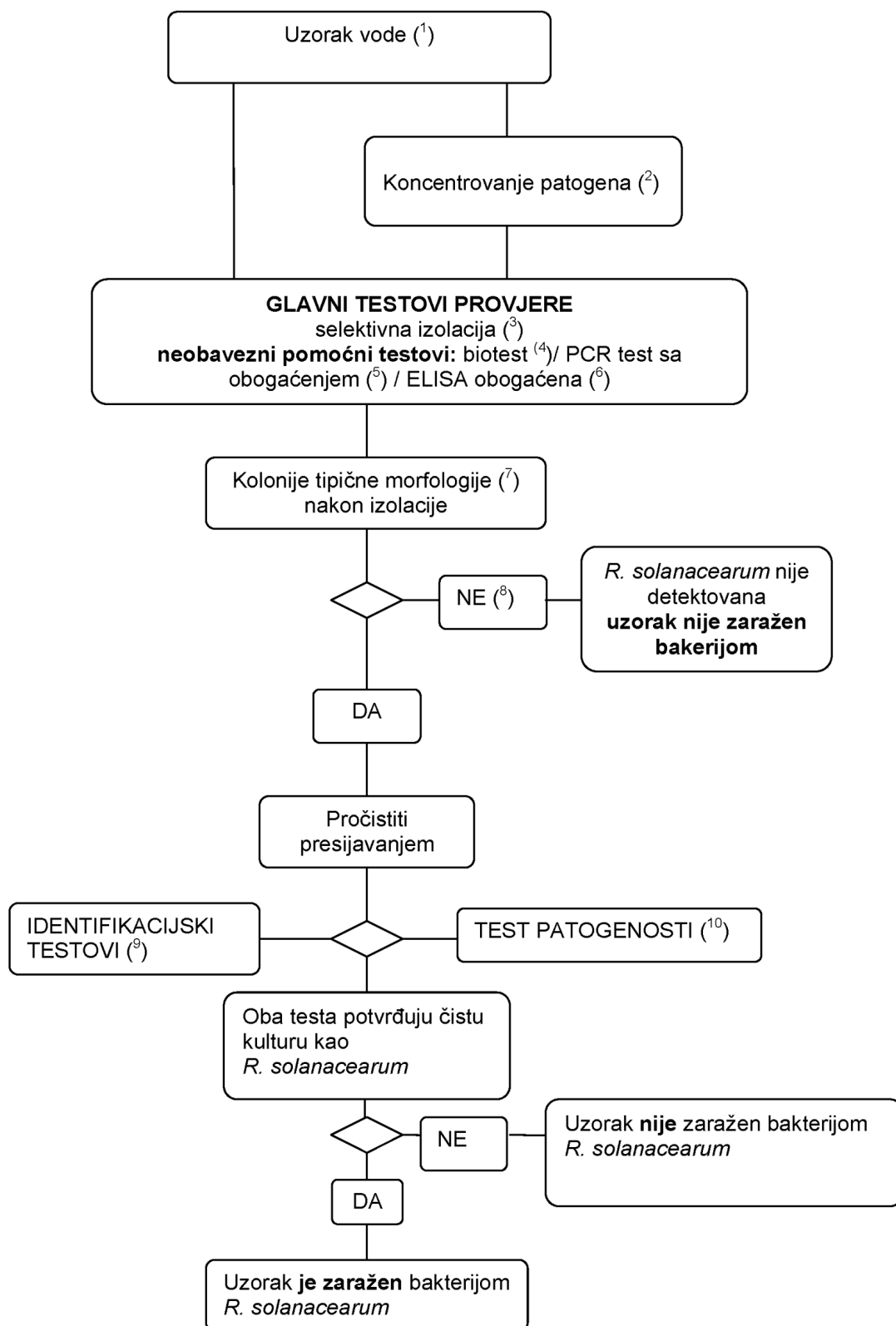
FISH test (Vidjeti Odjeljak VI.A.7.)

ELISA testovi (Vidjeti Odjeljak VI.A.8.)

Biotest (Vidjeti Odjeljak VI.A.9.)

ODJELJAK IV

1) Šema za detekciju i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u vodi



(¹) Za preporučene postupke uzorkovanja vidjeti Odjeljak IV.2.1.

(²) Metode koncentrovanja patogena opisane su u Odjeljku IV.2.1. Koncentrovanjem se povećavaju populacije i patogena i konkurentnih saprofitnih bakterija i taj postupak preporučuje se jedino ako neće inhibirati izolaciju.

(³) Selektivna izolacija opisana je u Odjeljku VI.A.4.

(⁴) Biotest je opisan u Odjeljku VI.A.9.

(⁵) Metode obogaćivanja za PCR test opisane su u Odjeljku VI.A.4.2. i Odjeljku VI.A.6.

(⁶) Metode obogaćivanja za ELISA test opisane su u Odjeljku VI.A.4.2. i Odjeljku VI.A.8.

(⁷) Tipična morfologija kolonije opisana je u Odjeljku II.3.d.

(⁸) Gajenje bakterijske kulture može biti neuspješno zbog kompeticije ili inhibicije saprofitnim bakterijama. Ako se sumnja da će velike populacije saprofitnih bakterija uticati na pouzdanost izolacije, ponoviti izolaciju nakon što se uzorak razrijedi u sterilnoj vodi.

Pouzdana identifikacija čistih kultura vjerovatnih izolata bakterije *R. solanacearum* postiže se sprovođenjem testova opisanih u Odjeljku VI.B.

(⁹) Test patogenosti opisan je u Odjeljku VI.C.

2. Metode za detekciju i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u vodi

Načelo

Validni (odobreni) postupak opisan u ovom odjeljku može se primijeniti za detekciju patogena u uzorcima površinske vode kao i za ispitivanje uzoraka tekućeg otpada nastalog pri preradi krompira ili otpadnih voda. Međutim, važno je napomenuti da će očekivana osjetljivost detekcije zavisiti od supstrata. Na osjetljivost izolacije utiču populacije konkurentnih saprofitnih bakterija koje su uglavnom veće u otpadnim vodama nastalim pri preradi i obradi krompira nego u površinskim vodama.

Iako se može očekivati da će se dalje opisanim postupkom detektovati tek 10^3 ćelija po litru površinske vode, osjetljivost detekcije u tekućem otpadu nastalom pri preradi krompira i u otpadnim vodama vjerovatno će biti znatno niža. Zbog toga se preporučuje da se testiraju otpadne vode poslije svakog postupka pročišćavanja (npr. sedimentacije ili filtriranja) tokom kojeg se smanjuju populacije saprofitnih bakterija. Kada se ocijenjuje pouzdanost dobijenih negativnih rezultata, treba uzeti u obzir ograničenja u osjetljivosti postupka testiranja. Iako se ovaj postupak uspješno primjenjuje u istraživanjima čiji je cilj utvrditi prisutnost ili odsutnost patogena u površinskim vodama, treba biti svjestan njegovog ograničenja ako se koristi u sličnim istraživanjima tekućeg otpada nastalog pri preradi krompira ili otpadnih voda.

2.1. Priprema uzorka

Napomena:

- Detekcija bakterije *R. solanacearum* u površinskim vodama najpouzdanija je u kasno proljeće i tokom ljeta i jeseni kada je temperatura vode iznad 15 °C.
- Ponovljena uzorkovanja u različito vrijeme tokom gore navedenih perioda na određenim mjestima uzorkovanja povećava pouzdanost detekcije jer će se smanjiti uticaj vremenskih promjena.
- Treba uzeti u obzir uticaj obilnih padavina i geografska obilježja tekućih voda kako bi se izbjegao značajni uticaj razrjeđenja koji može prikriti prisutnost patogena.
- Uzorke površinske vode treba uzeti blizu biljaka domaćina ako one postoje.

2.1.1. Na odabranim mjestima uzorkovanja uzeti uzorke vode u sterilne epruvete ili boce za jednokratnu upotrebu, po mogućnosti na dubini većoj od 30 cm i na udaljenosti od najviše 2 m od obale. U slučaju tekućeg otpada nastalog pri preradi krompira i otpadnih voda, uzorke uzeti na mjestu njihovog ispuštanja. Preporučena veličina uzorka je 500 ml po mjestu uzorkovanja. Ako se žele manji uzorci, preporučuje se uzimanje uzoraka najmanje tri puta na svakom mjestu uzorkovanja, pri čemu se svaki uzorak sastoji od dva poduzorka od najmanje 30 ml. Za intenzivno istraživanje odaberite najmanje tri mjesta uzorkovanja na svaka 3 km tekućih voda i osigurajte uzimanje uzoraka i iz pritoka i tekućih voda.

2.1.2. Uzorke transportovati u tamnim uslovima (kontejnerima) i pri niskim temperaturama (4 do 10 °C) i testirajte ih u roku od 24 sata od uzorkovanja.

2.1.3. Bakterijska frakcija može se, po potrebi, koncentrovati pomoću jedne od sljedećih metoda:

- (a) centrifugirati 30 do 50 ml poduzoraka na 10 000 g 10 minuta (ili 7 000 g u trajanju od 15 minuta) po mogućnosti na temperaturi od 4 do 10 °C, odliti supernatant i resuspendovati talog (pelet) u 1 ml pufera za talog (Dodatak 4.);
- (b) izvršiti membransku filtraciju (najmanja veličina pora 0,45 µm), nakon koje se filter ispira sa 5 do 10 ml pufera za talog, i sakupljanje onoga što se ispere. Ova je metoda prikladna za veće količine (zapremine) vode koja sadrži mali broj saprofita.

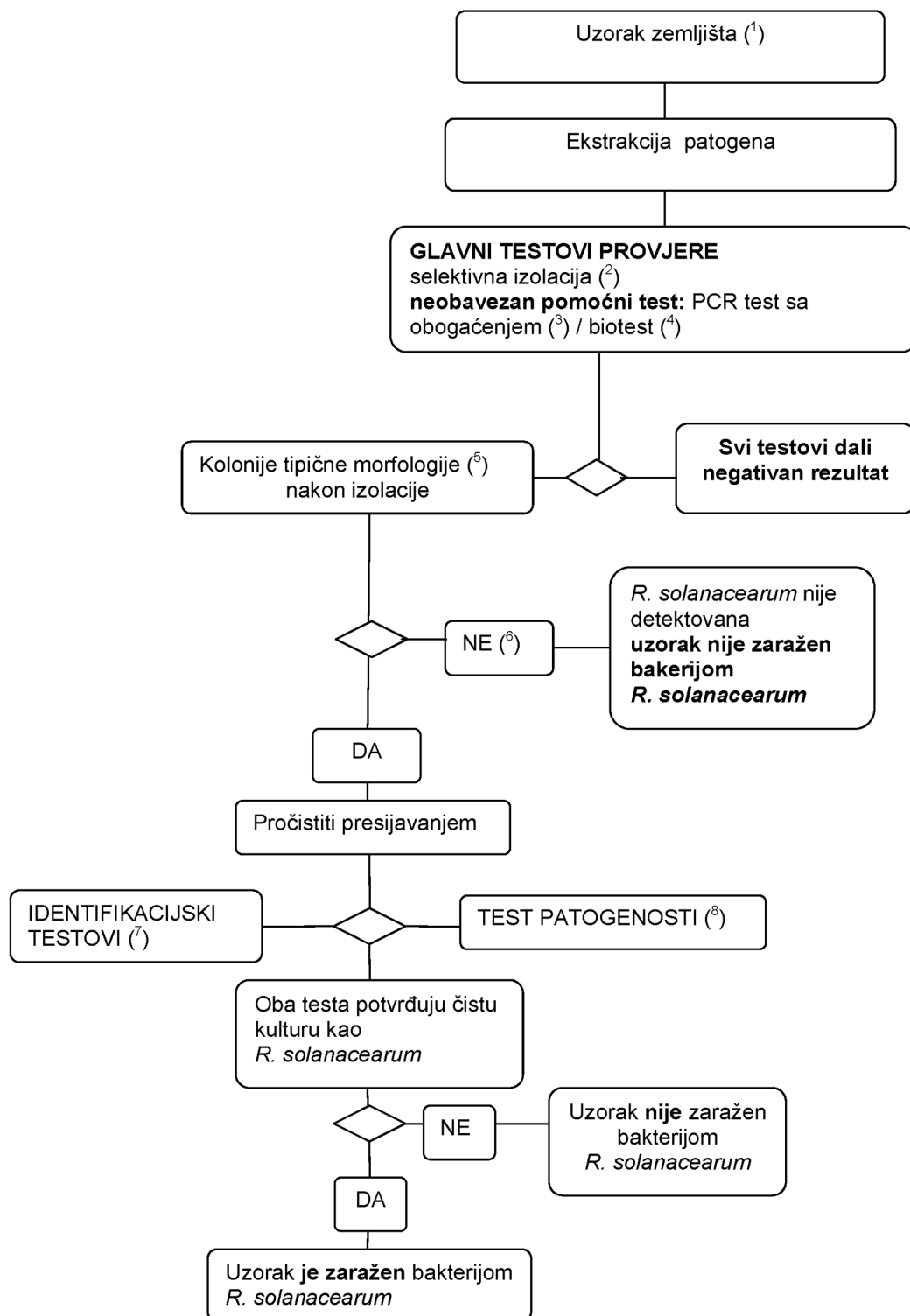
Koncentrisanje rastvora se obično ne preporučuje za uzorke tekućeg otpada (industrijskog) nastalog pri preradi krompira ili za uzorke otpadnih voda, jer će veće populacije konkurentnih saprofitnih bakterija spriječiti detekciju bakterije *R. solanacearum*.

2.2. Testiranje

Vidjeti dijagram i opis testova i optimalnih protokola u odgovarajućim dodacima.

ODJELJAK V

1. Šema za detekciju i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u tlu



- (¹) Za preporučene postupke uzorkovanja Odjeljak IV.2.1.
(²) Selektivna izolacija opisana je u Odjeljku VI.A.4.
(³) Metode obogaćivanja za PCR test opisane su u Odjeljku VI.A.4.2. i Odjeljku VI.A.6.
(⁴) Biotest je opisan u Odjeljku VI.A.9.
(⁵) Tipična morfologija kolonije opisana je u Odjeljku II.3.d.
(⁶) Uzgoj bakterijske kulture može biti neuspješan zbog kompeticije ili inhibicije saprofitnih bakterija. Ako se sumnja da će velike populacije saprofitnih bakterija uticati na pouzdanost izolacije, ponovite izolaciju nakon što uzorak dodatno razrijedite.
(⁷) Pouzdana identifikacija čistih kultura vjerovatnih izolata bakterije *R. solanacearum* postiže se primjenom testova opisanih u Odjeljku VI.B.
(⁸) Test patogenosti opisan je u Odjeljku VI.C.

2. Metode za detekciju i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u tlu

Načela:

Validni postupak opisan u ovom odjeljku može se primijeniti za detekciju patogena u uzorcima zemljišta kao i za ispitivanje uzoraka čvrstog otpada nastalog pri preradi krompira ili uzoraka kanalizacijskog mulja. Međutim, važno je napomenuti da ove metode nisu dovoljno osjetljive da bi garantovale detekciju manjih i/ili neravnomjerno raspoređenih populacija bakterije *R. solanacearum* koje mogu biti prirodno prisutne u uzorcima tih supstrata.

Treba uzeti u obzir ograničenja u osjetljivosti ovog postupka testiranja pri ocjenjivanju pouzdanosti dobijenih negativnih rezultata kao i kada ovaj postupak primjenjujemo u istraživanjima čiji je cilj da se utvrdi prisutnost ili odsutnost patogena u zemljištu ili mulju. Najpouzdaniji način utvrđivanja prisutnosti patogena u zemljištu na parceli je taj da posadimo biljku domaćina koja je osjetljiva na taj patogen i pratimo hoće li doći do infekcije, ali čak ni ovom metodom neće se otkriti niski nivoi kontaminacije.

2.1. Priprema uzorka

2.1.1. Uzorkovanje zemljišta sa parcele treba obavljati u skladu sa osnovnim načelima koja se primjenjuju kod uzorkovanja za ispitivanje nematoda. Sa 60 mjesta na svaka 0,3 ha uzeti 0,5 do 1 kg zemlje po uzorku, sa dubine od 10 do 20 cm (ili na mreži od 7 x 7 metara). Ako se sumnja na prisutnost patogena, povećati broj mjesta uzorkovanja na 120, na svakih 0,3 ha.

Prije testiranja uzorke čuvati na temperaturi od 12 do 15 °C. Uzorkovanje čvrstog otpada nastalog pri preradi krompira ili uzorkovanje kanalizacijskog mulja, obaviti tako što se uzme ukupno 1 kg na mjestima koja predstavljaju ukupnu količinu mulja koju treba testirati. Svaki uzorak dobro promiješati prije testiranja.

2.1.2. Rastresti poduzorke od 10 do 25 g zemljišta ili mulja na rotacionoj mješalici (250 o/min) u 60 do 150 ml ekstrakcionog pufera (Dodatak 4) najduže dva sata. Dodavanje 0,02 %-tnog sterilnog Tween -20 i 10 do 20 g sterilnog pijeska može, po potrebi, doprinjeti rastresanju.

2.1.3. Suspenziju održavati na temperaturi od 4 °C tokom testiranja.

2.2. Testiranje

Vidjeti dijagram i opis testova u odgovarajućim dodacima.

ODJELJAK VI
OPTIMALNI PROTOKOLI ZA DETEKCIJU I IDENTIFIKACIJU BAKTERIJE
R. SOLANACEARUM

A. DIJAGNOSTIČKI TESTOVI I TESTOVI ZA DETEKCIJU

1. Testiranje bakterijskog eksudata iz stabljike

Vjerovatna prisutnost bakterije *R. solanacearum* u stabljikama uvelih biljaka krompira, paradajza ili drugih biljaka domaćina, može se utvrditi sljedećim jednostavnim testom: odrezati stabljiku neposredno iznad nivoa zemljišta. Odrezani kraj staviti u epruvetu sa čistom vodom. Pratiti hoće li nakon nekoliko minuta iz prerezanih provodnih snopova početi spontano izlaziti karakteristične niti bakterijskog eksudata.

2. Detekcija zrnaca poli- β -hidroksibutirata (PHB)

1. Na mikroskopskom stakalcu pripremiti razmaz bakterijskog eksudata iz zaraženog tkiva ili iz 48-časovne kulture sa hranjive podloge YPGA ili SPA (Dodatak 2).
2. Za pozitivnu kontrolu pripremiti razmaze biovara 2, bakterije *R. solanacearum* i ako smatrate korisnim, za negativnu kontrolu razmaz bakterijske vrste za koju je poznato da je negativna na PHB.
3. Razmaze ostaviti da se osuše na vazduhu i donju stranu svakog stakalca brzo povucite iznad plamena da se razmazi fiksiraju.
4. Obojiti preparat ili Nilskom plavom ili Sudanskom crnom bojom i posmatrati pod mikroskopom kako je opisano u daljem tekstu:

Test sa Nilskom plavom bojom:

- a) Preliti svako stakalce sa 1%-tnim vodenim rastvorom Nilsko plave boje A i inkubirati 10 minuta na 55 °C.
- b) Ocijediti rastvor boje. Isprati kratko pod blagim mlazom vode iz slavine. Višak vode ukloniti upijajućim papirom.
- c) Preliti razmaz 8 %-tnim vodenim rastvorom sirćetne kiseline i inkubirati jedan minut na sobnoj temperaturi.
- d) Isprati kratko pod blagim mlazom vode iz slavine. Višak vode ukloniti upijajućim papirom.
- e) Ponovo navlažiti kapljicom vode i pokriti pokrovnim stakalcem.
- f) Pregledati obojeni razmaz epifluorescentnim mikroskopom na 450 nm, imerzijskim objektivom povećanja od 600 do 1000 x (uljna ili vodena imerzija).
- g) Pregledati da li je prisutna svijetlonarandžasta fluorescencija zrnaca PHB-a. Takođe pregledati stakalce i pod normalnim svjetlom da bi se potvrdilo prisustvo granula PHB u ćelijama i da li je ćelijska morfologija tipična za bakteriju *R. solanacearum*.

Test sa bojom Sudansko crno:

- (a) Preliti svako stakalce sa 0,3 %-tnim vodenim rastvorom Sudansko crno B u 70 %-tnom etanolu i inkubirati 10 minuta na sobnoj temperaturi.
- (b) Ocijediti rastvor boje, kratko isprati pod mlazom vode iz slavine i višak vode ukloniti upijajućim papirom.
- (c) Stakalca nakratko umočiti u ksilol i osušiti ih na upijajućem papiru.
Oprez! Ksilol je opasan za zdravlje. Preduzeti potrebne sigurnosne mjere i raditi u digestoru.
- (d) Preliti stakalca 0,5 %-tnom (w/v) vodenom rastvorom šafranina i ostaviti 10 sekundi na sobnoj temperaturi. Oprez! Šafranin je opasan za zdravlje. Preduzeti potrebne sigurnosne mjere i raditi u digestoru.
- (e) Isprati pod blagim mlazom vode iz slavine, osušiti na upijajućem papiru i pokriti pokrovnim stakalcem.
- (f) Pregledati obojene razmaze pod mikroskopom koji koristi prolazno svjetlo, uljnim imerzijskim objektivom povećanja od 1000 x.
- (g) Pregledati da li se uočavaju plavo-crno obojena zrnca PHB-a u ćelijama *R. solanacearum* sa ćelijskim zidovima obojenim pužičasto.

3. Serološki test aglutinacije

Aglutinacija čelija bakterije *R. solanacearum* u bakterijskom eksudatu ili ekstraktima tkiva sa simptomima, najbolje se uočava korišćenjem potvrđenih i odobrenih antitijela (Dodatak 3) obilježenih odgovarajućim obojenim oznakama kao što su crvene čelije *Staphylococcus aureus* ili obojene čestice lateksa. Ako se koristi komplet koji je dostupan na tržištu (Dodatak 3), slijediti uputstva proizvođača. U suprotnom, primijeniti sljedeći postupak:

- (a) pomiješati kapljice suspenzije obilježenog antitijela i bakterijskog eksudata (oko 5 μ l svakog) na predmetnim stakalcima sa više otvora;
- (b) pripremiti pozitivne i negativne kontrole koristeći suspenzije *R. solanacearum* biovar 2 i heterolognog soja;
- (c) posmatrati da li dolazi do aglutinacije u pozitivnim uzorcima nakon 15 sekundi laganog miješanja.

4. Selektivna izolacija

4.1. Izolacija na selektivnoj podlozi

Napomena:

Prije primjene ove metode, obaviti prethodne testove kako bi se osigurala ponovljiva detekcija 10^3 do 10^4 jedinica koje stvaraju kolonije (CFU) bakterije *R. solanacearum* po ml, a koje su dodate ekstraktima uzoraka koji su prema ranijim testiranjima negativni. Koristiti potvrđenu i odobrenu selektivnu hranjivu podlogu kao što je SMSA (prilagođenu prema Elphinstone i sur., 1996; Dodatak 2). Prilikom pregleda zasijane hranjive podloge, obratiti pažnju na razlikovanje *R. solanacearum* od drugih bakterija čije kolonije mogu rasti na toj hranjivoj podlozi. Naime kolonije *R. solanacearum* mogu biti netipične morfologije ako je intenzivan porast raznih bakterija na podlozi ili ako su prisutne antagonističke bakterije. Ako se sumnja da je došlo do negativnog uticaja kompeticije ili antagonizma, uzorak treba ponovo testirati drugim testom.

Najveća osjetljivost detekcije ovom metodom može se očekivati ako se koriste svježe pripremljeni ekstrakti uzoraka. Međutim, ova se metoda može primjenjivati i na ekstraktima koji su čuvani sa glicerolom na temperaturi od -68 do -86 °C. Za pozitivnu kontrolu pripremiti decimalna razređenja suspenzije od 10^6 CFU/ml virulentnog soja biovara 2, *R. solanacearum* (npr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Da bi se spriječila svaka mogućnost kontaminacije, pozitivne kontrole pripremiti potpuno odvojeno od uzoraka koji se ispituju. Za svaku novopripremljenu seriju selektivne hranjive podloge treba, prije nego se upotrijebi za testiranje rutinskih uzoraka, provjeriti da li je prikladna za rast patogena. Kontrolni materijal testirati na isti način kao i uzorke.

4.1.1. Primijeniti odgovarajuću tehniku nanošenja razređenja kako bi se osiguralo da su sve populacije saprofitnih bakterija dovoljno razređene. Nanijeti 50 – 100 μ l ekstrakta uzorka po podlozi i po svakom razređenju.

4.1.2. Inkubirati podloge na 28 °C. Očitati podloge nakon 48 sati, a nakon toga svaki dan u periodu do šest dana. Tipične kolonije *R. solanacearum* na hranjivoj podlozi SMSA su mliječno-bijele boje, pljosnate, nepravilnog oblika i vodenaste, a nakon tri dana inkubacije sredina im postaje ružičasta do krvavo-crvena sa unutrašnjim prugama ili spiralama.

Napomena:

Na ovoj hranjivoj podlozi ponekad rastu i netipične kolonije *R. solanacearum*. One mogu biti malene, okrugle, potpuno crvene boje i nevodenaste ili samo djelimično vodenaste pa ih je, zbog toga, teško razlikovati od kolonija saprofitnih bakterija.

4.1.3. Kolonoje za koje sesmatra da su kolonije *R. solanacearum*, treba prenijeti na uobičajenu hranjivu podlogu i prečistiti kako bi se dobile pojedinačne izdvojene kolonije (Dodatak 2).

4.1.4. Kulture se kratko vrijeme mogu čuvati u sterilnoj vodi (pH 6 do 8, bez hlora) na sobnoj temperaturi u tami ili duže vrijeme na temperaturi od -68 do -86 °C ili liofilizovane.

4.1.5. Identifikovati vjerovatne kulture (Odjeljak VI.B) i sprovesti test patogenosti (Odjeljak VI.C).

Tumačenje rezultata selektivne izolacije

Selektivna izolacija je negativna ako se nakon šest dana ne uočavaju nikakve bakterijske kolonije ili ako se ne pronađu sumnjive kolonije tipične za *R. solanacearum*, pod uslovom da se ne sumnja na inhibiciju zbog konkurencije ili antagonizma drugih bakterija i da su tipične kolonije *R. solanacearum* pronađene u pozitivnim kontrolama. Selektivna izolacija je pozitivna ako se izdvoje sumnjive kolonije *R. solanacearum*.

4.2. Postupak obogaćivanja

Upotrijebiti validnu (potvrđenu i odobrenu) podlogu za obogaćivanje kao što je modificirani Wilbrink tečna podloga (Dodatak 2). Ovaj se postupak može primijeniti za selektivno povećanje populacije *R. solanacearum* u ekstraktima uzoraka i da se poveća osjetljivost detekcije. Ovim se postupkom, takođe, djelotvorno razređuju inhibitori PCR reakcije (1:100). Međutim, treba napomenuti da obogaćivanje *R. solanacearum* može biti neuspješno zbog kompeticije ili antagonizma saprofitnih organizama koji se često istovremeno obogaćuju. Zbog toga može biti teško izdvojiti *R. solanacearum* iz kultura obogaćenih u tečnoj podlozi. Pored toga, s obzirom da se populacije serološki srodnih saprofita mogu povećati, preporučuje se upotreba specifičnih monoklonskih antitijela umjesto poliklonskih antitijela ako će se sprovesti ELISA test.

4.2.1. Za obogaćivanje za PCR test prenijeti 100 µl ekstrakta uzorka u 10 ml tečne podloge za obogaćivanje (Dodatak 2) koji je prethodno podijeljen u alikvot u epruvete ili bočice bez DNK. Za obogaćivanje za ELISA test mogu se koristiti veći dijelovi ekstrakta uzorka u tekućoj podlozi (npr. 100 µl u 1,0 ml tekućeg podloge za obogaćivanje).

4.2.2. Inkubirati 72 sata na temperaturi od 27 do 30 °C sa ili bez protresanja, sa labavim čepom (koji nije do kraja zategnut), da se omogući provetravanje.

4.2.3. Dobro promiješati prije korištenja u ELISA ili PCR testovima.

4.2.4. Sa obogaćenim tekućom podlogom postupati isto kao i sa uzorcima u prethodno opisanim testovima.

Napomena:

Ako se očekuje da će obogaćivanje *R. solanacearum* biti onemogućeno zbog velikih populacija određenih konkurentnih saprofitnih bakterija, bolji rezultati se mogu dobiti ako se ekstrakti uzoraka obogate prije centrifugiranja ili drugih postupaka koncentrovanja.

5. IF Test načelo

Upotreba IF testa kao osnovnog testa provjere preporučuje se zbog njegove dokazane dosljednosti pri postizanju zahtijevanih pragova detekcije. Kada se IF test koristi kao glavni test provjere i ako je IF očitavanje pozitivno, mora se sprovesti izolacija, PCR test ili FISH test kao drugi test provjere. Kada se IF test koristi kao drugi test provjere i IF očitavanje je pozitivno, potrebno je dalje testiranje prema dijagramu toka kako bi se dovršila analiza.

Napomena:

Koristite validna (potvrđena i odobrena) antitijela za *R. Solanacearum*.

Preporučuje se da se titar odredi za svaku novu seriju antitijela. Titar se definiše kao najveće razrjeđenje kod kog dolazi do optimalne reakcije pri testiranju suspenzije koja sadrži 10^5 do 10^6 ćelija po ml odgovarajućeg soja bakterije *R. solanacearum* uz korištenje fluorescein-izotiocijanata (FITC) konjugiranih antitijela prema preporukama proizvođača. Svi validni (potvrđeni i odobreni) poliklonski serumi imali su IF titar najmanje 1:2000. Tokom testiranja, treba koristiti antitijela u radnim razrjeđenjima koja su blizu ili jednaka titru. Test treba sprovesti na svježe pripremljenim ekstraktima uzoraka. On se, po potrebi, može uspješno sprovesti i na ekstraktima koji su bili čuvani na temperaturi od - 68 do - 86 °C sa dodatkom glicerola. Glicerol se može ukloniti dodavanjem 1 ml pufera za rastvaranje taloga (Dodatak 4), ponovnim 15-minutnim centrifugiranjem na 7000 g i resuspendovanjem u jednakoj zapremini pufera za talog (pelet pufera). To je rijetko potrebno, naročito ako su uzorci plamenom fiksirani na stakalca. Za pozitivnu kontrolu pripremiti odvojena stakalca sa homolognim sojem ili nekim drugim referentnim sojem bakterije *R. solanacearum* suspendovanim u ekstraktu krompira kako je navedeno u Dodatku 3B i po izboru, u puferu. Kao sličnu kontrolu na istom stakalcu trebalo bi, po mogućnosti, koristiti prirodno zaraženo tkivo (održavano liofilizacijom ili zamrzavanjem na -16 do - 24°C). Za negativnu kontrolu mogu se upotrijebiti alikvoti (dijelovi) ekstrakta uzoraka koji su u ranijem testiranju na *R. solanacearum* pokazali negativan rezultat. U Dodatku 3. navedeni su Standardizovani pozitivni i negativni kontrolni materijali koji se mogu upotrebljavati u ovom testu. Koristite predmetna stakalca sa više otvora, po mogućnosti sa 10 otvora praprečnika najmanje 6 mm. Kontrolni materijal testirati na isti način kao i uzorke.

- 5.1. Pripremiti stakalca za testiranje prema jednom od sljedećih postupaka:
- (i) Za suspenzije taloga sa relativno malo skroba:
U prvi otvor pipetom odmjeriti standardnu zapreminu (15 μ l je dovoljno za otvore prečnika 6 mm - za veće otvore povećati zapreminu) razređenja od 1/100 resuspendovanog taloga krompira. Zatim u ostale otvore u istom redu pipetom odmjeriti slične nerazređene suspenzije (1/1) taloga. Drugi red se može koristiti kao duplikat istog ili za drugi uzorak kako je prikazano na slici 1.
- (ii) Za ostale suspenzije taloga: Pripremiti decimalna razređenja (1/10, 1/100) resuspendovanog taloga u puferu za talog. U jedan red otvora pipetom odmjeriti standardnu zapreminu (15 μ l je dovoljno za otvore promjera 6 mm – za veće otvore povećati zapreminu) resuspendovanog taloga i svakog razređenja. Drugi se red može koristiti kao duplikat istog ili za drugi uzorak kako je prikazano na slici 2.
- 5.2. Ostaviti da se kapljice osuše na sobnoj temperaturi ili ih zagrijavati do temperature od 40 do 45 °C. Fiksirati bakterijske ćelije na stakalce bilo zagrijavanjem (15 minuta na 60 °C), provlačenjem kroz plamen, 95 %-tnim etanolom ili prema posebnim upustvima dobavljača antitijela. Prije daljih testiranja, fiksirana se stakalca mogu, po potrebi, kratko vrijeme (najviše do tri mjeseca) čuvati zamrznuta u desikatoru.
- 5.3 IF postupak
- (i) U skladu sa postupkom za pripremu stakalaca za testiranje koji je opisan pod 5.1.(i): Pripremiti niz dvostrukih razređenja antitijela. Prvi otvor mora imati 1/2 titra (T/2), a ostale 1/4 titra (T/4), 1/2 titra (T/2), titar (T) i dvostruki titar (2T).
- (ii) U skladu sa postupkom za pripremu stakalaca za testiranje koji je opisan pod 5.1.(ii): Pripremiti radno razređenje antitijela u IF puferu. Radno razređenje utiče na specifičnost.

Slika1.

Priprema stakalca u skladu sa stavovima 5.1.(i) i 5.3.(i)

Razređenja resuspendovanog taloga					
resuspendovanog	1/100	1/1	1/1	1/1	1/1 □ razređenja taloga
(T=titar)	T/2	T/4	T/2	T	2T □ dvostruka razređenja seruma/antitijela
Uzorak 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5
Duplikat uzorka 1 ili uzorka 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10

Slika 2. Priprema stakalaca u skladu sa tačkama 5.1. (ii) i 5.3.(ii)

Radna razrjeđenja seruma/antitijela

1/1 1/10 1/100 prazno prazno ☐ decimalna
razrjeđenja
rastvorenog taloga

Uzorak 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5
Duplikat uzorka 1 ili uzorka 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10

5.3.1. Poređati stakalca na navlaženi upijajući papir. Svaki otvor potpuno prekriti razređenjem antitijela. Zapremina antitijela koja se stavlja u pojedini otvor mora biti jednaka zapremini stavljenog ekstrakta. Slijediti sljedeći postupak ako nema posebnih upustava dobavljača antitijela:

5.3.2. Inkubirati stakalca na vlažnom papiru, pokrivena, 30 minuta na sobnoj temperaturi (18 do 25 °C).

5.3.3. Otresti kapljice sa svakog stakalca i pažljivo ih isprati IF puferom. Potopiti ih 5 minuta u IF pufer-Tween (Dodatak 4) i nakon toga u IF pufer. Paziti da ne dođe do stvaranja aerosola ili prijenosa kapljica jer bi to moglo dovesti do unakrsne kontaminacije. Stakalca pažljivo osušiti upijajućim papirom.

5.3.4. Poređati stakalca na navlaženi upijajući papir. Otvore prekriti razređenim FITC konjugatom koji se koristi za određivanje titra. Zapremina konjugata nanesenog na otvore mora biti jednaka zapremini nanesenog antitijela.

5.3.5. Inkubirati stakalca na vlažnom papiru, pokrivena, 30 minuta na sobnoj temperaturi (18 do 25 °C).

5.3.6. Otresti kapljice konjugata sa stakalca. Isprati i oprati kako je prethodno opisano (5.3.3). Pažljivo osušite stakalca.

5.3.7. Na svaki otvor pipetom nanosite 5-10 µl 0,1 M glicerola sa fosfatnim puferom (Dodatak 4) ili sredstvo protiv izbljeđivanja koje je dostupno na tržištu i staviti pokrovno stakalce.

5.4. Očitavanje IF testa

5.4.1. Pregledati pripremljena stakalca pod epifluorescentnim mikroskopom sa odgovarajućim filterima za ekscitaciju FITC-a, pod uljnom ili vodenom imerzijom i uvećanjem od 500-1000 x. Pregledati svaki otvor uzduž i popreko, pod pravim uglom i duž spoljne ivice. Za uzorke u kojima je vidljiv mali broj ćelija ili ih uopšte nema pregledati najmanje 40 mikroskopskih vidnih polja. Najprije pregledati stakalce sa pozitivnom kontrolom. Čelije moraju biti izrazito fluorescentne i moraju biti potpuno obojene na utvrđenom titru antitijela ili radnog razređenja. U slučaju da kod obojenosti dođe do odstupanja, IF test se mora ponoviti (Odjeljak VI.A.5).

5.4.2. Pregledati da li su u otvorima vidljive jasno fluorescentne ćelije karakteristične morfologije za bakteriju *R. solanacearum*

Intenzitet fluorescencije mora biti jednak kao i kod pozitivnog kontrolnog soja pri jednakom razređenju antitijela. Čelije koje su nepotpuno obojene ili sa slabom fluorescencijom moraju se zanemariti. Test se mora ponoviti ako se sumnja na kontaminaciju. Može se sumnjati ako sva stakalca u seriji pokazuju pozitivne ćelije zbog kontaminacije pufera ili ako su pozitivne ćelije pronađene (izvan otvora) na površini stakalca.

5.4.3. Postoji nekoliko problema u vezi sa specifičnošću testa imunofluorescencije. U koncentrovanom ekstraktu izdvojenih konusa pupčanih dijelova krtole ili dijelova stabljike, mogu se nalaziti i populacije fluorescirajućih ćelija netipične morfologije i saprofitne bakterije sa kojima dolazi do unakrsne reakcije i koje su po veličini i morfologiji slične bakteriji *R. solanacearum*.

5.4.4. U obzir uzmite samo fluorescentne ćelije tipične veličine i morfologije u titru ili radnom razređenju antitijela kako je opisano u stavu 5.3

5.4.5. Tumačenje očitavanja IF testa

(i) Ako se nađu jasno fluorescentne ćelije karakteristične morfologije, odrediti prosječan broj tipičnih ćelija po mikroskopskom vidnom polju i izračunati broj tipičnih ćelija po ml resuspendovanog taloga (Dodatak 5). Očitavanje IF testa je pozitivno za uzorke koji imaju najmanje 5×10^3 tipičnih ćelija po ml resuspendovanog taloga. Uzorak se smatra potencijalno kontaminiranim i potrebno je dalje testiranje.

(ii) Očitavanje IF testa je negativno za uzorke koji imaju manje od 5×10^3 ćelija po ml resuspendovanog taloga i uzorak se smatra negativnim. Nije potrebno dalje testiranje.

6. PCR Testovi

Načela

Kada se PCR test koristi kao glavni test provjere i rezultat je pozitivan, mora se sprovesti IF test ili izolacija kao drugi obavezni test provjere. Kada se PCR test koristi kao drugi test provjere i rezultat je pozitivan, za postavljanje konačne dijagnoze potrebno je dalje testiranje prema dijagramu. Korišćenje ove metode kao glavnog testa provjere preporučuje se samo ako je dostupna specijalizovana ekspertiza.

Napomena:

Preliminarna testiranja primjenom ove metode treba da omoguće ponovljivu detekciju 10^3 do 10^4 ćelija bakterije *R. solanacearum* po ml, koje su dodate ekstraktima uzoraka koji su u prethodnim testiranjima dali negativan rezultat. Da bi se postigao najveći stepen osjetljivosti i specifičnosti u svim laboratorijama, potrebno je izvođenje oglada za optimizaciju (standardizaciju) metode. Koristiti validne (potvrđene i odobrene) reagense i protokole za PCR (Dodatak 6). Poželjno je odabrati metodu sa internom kontrolom. Preduzeti odgovarajuće mjere opreza kako bi se izbjegla kontaminacija uzorka ciljnom DNK. Da bi se spriječila kontaminacija ciljnom DNK, PCR test trebali bi obavljati iskusni stručnjaci, u specijaliziranim laboratorijama za molekularnu biologiju. Negativne kontrole (za ekstrakciju DNK i PCR postupak) treba uvijek obraditi kao zadnje uzorke u postupku kako bi se utvrdilo da li je došlo do prenošenja DNK.

U PCR test treba uključiti slijedeće negativne kontrole:

- ekstrakt uzorka koji je u ranijem testiranju na *R. solanacearum* bio negativan
- pufer korišćen za ekstrakciju bakterije i DNK iz uzorka
- reakcijsku smjesu za PCR.

Treba uključiti slijedeće pozitivne kontrole:

- alikvot resuspendovanih taloga u koje je dodata bakterija *R. solanacearum* (za pripremu, Dodatak 3B).
- suspenziju u vodi od 10^6 ćelija/ml bakterije *R. solanacearum* virulentnog izolata (npr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; Dodatak 3 B).
- ako je moguće, u PCR testu upotrijebiti i DNK ekstrahovanu iz pozitivnih kontrolnih uzoraka.

Da bi se izbjegla moguća kontaminacija, pozitivne kontrole pripremiti prostorno odvojeno od uzoraka za testiranje. Ekstrakti uzoraka moraju sadržavati što je moguće manje zemlje. Ako se namjerava primijeniti PCR protokol, u nekim bi slučajevima bilo preporučljivo oprati krtole prije pripreme ekstrakta. U Dodatku 3. navedeni su Standardizovani pozitivni i negativni kontrolni materijali koji se mogu koristiti u ovim testovima.

6.1. Metode pročišćavanja DNK

Koristiti uzorke za pozitivnu i negativnu kontrolu kako je prethodno opisano (Dodatak 3). Testirati kontrolni materijal na isti način kao i uzorke. Postoje različite metode za pročišćavanje ciljane DNK iz kompleksnih uzoraka, kojima se uklanjaju inhibitori PCR reakcije i drugih enzimskih reakcija i metode koncentrovanja ciljane DNK u ekstraktu uzorka.

Slijedeća metoda je optimalna (standardizovana) za korišćenje sa validnim (potvrđenim i odobrenom) PCR metodama koje su navedene u Dodatku 6.

a) Metoda prema Pastroku (2000)

- 1) Pipetom odmjjeriti 220 μ l pufera za lizu – lizis pufera [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] u Eppendorf epruvetu od 1,5 ml.
- 2) Dodati 100 μ l ekstrakta uzorka i staviti u termoblok ili vodeno kupatilo na 95 °C 10 minuta.
- 3) Staviti epruvetu na led 5 minuta.
- 4) Dodati 80 μ l osnovnog štok rastvora Lysozyme (50 mg lizozima na ml u 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) i inkubirati 30 minuta na 37 °C. Dodati 220 μ l Easy DNA® rastvora A (Invitrogen), dobro promiješati na vorteksu odnosno centrifugalnoj mješalici i inkubirati 30 minuta na 65 °C.
- 5) Dodati 100 μ l Easy DNA® rastvora B (Invitrogen), snažno promiješati na centrifugalnoj mješalici (vorteksu) do postizanja uniformnog viskoziteta uzorka.
- 6) Dodati 500 μ l hloroforma i miješajte na centrifugalnoj mješalici (vorteksu) dok se viskoznost ne smanji i smješa postane homogena.
- 7) Centrifugirati na 15000 g 20 minuta na 4 °C da se odijele faze i stvori interfaza (međufaza).
- 8) Gornju fazu prenijeti u novu Eppendorf epruvetu.
- 9) Dodati 1 ml 100 %-tnog etanola (- 20 °C), kratko promiješati na centrifugalnoj mješalici (vorteksu) i inkubirati na ledu 10 minuta.
- 10) Centrifugirati na 15000 g 20 minuta na 4 °C i ukloniti etanol iz taloga.
- 11) Dodati 500 μ l 80 %-tnog etanola (- 20 °C) i promiješati okretanjem epruvete.
- 12) Centrifugirati na 15000 g 10 minuta na 4 °C, sačuvati talog, a etanol ukloniti.
- 13) Ostaviti talog da se suši na vazduhu ili u vakuumskoj centrifugi (DNA speed vac).
- 14) Resuspendovati talog u 100 μ l sterilne ultra čiste vode i ostaviti na sobnoj temperaturi najmanje 20 minuta.
- 15) Čuvati na - 20 °C dok ne bude potrebno za PCR.
- 16) Centrifugiranjem izdvojiti mogući bijeli precipitat (talog) i za PCR upotrijebiti 5 μ l supernatanta koji sadrži DNK.

(b) Druge metode

Mogu se primijeniti druge metode ekstrakcije DNK, npr. Qiagen DNeasy Plant Kit, ako je dokazana jednaka djelotvornost u pročišćavanju DNK iz kontrolnih uzoraka koji sadrže 10^3 do 10^4 patogenih ćelija po ml.

6.2. PCR

- 6.2.1. Pripremiti kalupe (uzorke) za testiranje i kontrolu za PCR prema validnim (odobrenim) protokolima (Odjeljak VI.A.6). Pripremiti jedno decimalno razrjeđenje ekstrakta DNK iz uzorka (1:10 u ultra čistoj vodi).
- 6.2.2. U nekontaminiranom prostoru pripremiti odgovarajuću reakcijsku smjesu za PCR prema objavljenim protokolima (Dodatak 6). Preporučuje se da se, ako je moguće, koristi protokol za multipleks PCR koji uključuje i unutarašnju PSR kontrolu.
- 6.2.3. Prema protokolu za PCR (Dodatak 6) dodati 2-5 μ l ekstrakta DNK na 25 μ l reakcijske smješe u sterilne epruvete za PCR.
- 6.2.4. Uključiti i uzorak za negativnu kontrolu koji sadrži samo reakcijsku smjesu za PCR i umjesto uzorka, dodati isti izvor ultra čiste vode koji je korišćen za pripremu reakcijske smješe za PCR.
- 6.2.5. Staviti epruvete u uređaj za PCR (thermal cycler) koji je korišćen u preliminarnom testiranju i pokrenuti optimalni (standardizovani) PCR program (Dodatak 6).

6.3. Analiza PCR produkata

- 6.3.1. Elektroforezom u agaroznom gelu razdvojiti umnožene PCR proizvode. Najmanje 12 µl reakcijske smješe umnožene DNK iz svakog uzorka, pomiješane sa 3 µl pufera za nanošenje (Dodatak 6), nanijeti u 2,0 %-tni (w/v) agarozni gel u tris-acetat EDTA puferu (TAE) (Dodatak 6), i propustiti uz napon od 5 do 8 V po cm. Upotrijebiti odgovarajući DNK standard, npr. 100 bp ljestvicu.
- 6.3.2. Obojiti elektroforetske pruge DNK u gelu potapanjem gela u etidijum bromid (0,5 mg/l) 30 do 60 minuta preduzimajući pri tome odgovarajuće mjere opreza za rad sa ovim mutagenom.
- 6.3.3. Obojeni gel pregledati na kratkotalasnom UV transiluminatoru ($\lambda = 302 \text{ nm}$) i tražiti umnožene fragmente očekivane dužine (Dodatak 6) pa ih dokumentovati.
- 6.3.4. Za svaki novi nalaz/slučaj provjeriti autentičnost umnoženog PCR proizvoda analizom restrikcionim enzimima preostale umnožene DNK uzorka i to inkubacijom pri optimalnoj temperaturi i u optimalnom vremenu sa odgovarajućim enzimom i puferom (Dodatak 6). Nastale fragmente razdvojiti elektroforezom u agaroznom gelu kako je predhodno navedeno i nakon bojenja etidijevim bromidom na UV transiluminatoru posmatrati karakteristični restrikcioni obrazac i uporediti ga sa pozitivnom kontrolom prije i poslije razdvajanja.

Tumačenje rezultata PCR testa

PCR test je negativan ako u testiranom uzorku nije vidljiv PCR proizvod očekivane dužine koji je specifičan za bakteriju *R. solanacearum*, ali je vidljiv u svim pozitivnim kontrolnim uzorcima (kod multipleks PCR -a sa prajmerima za unutrašnju kontrolu koje su specifične za biljku domaćina: u testiranom uzorku se mora umnožiti drugi proizvod PCR -a očekivane veličine).

PCR test je pozitivan ako je vidljiv PCR proizvod koji je specifičan za bakteriju *R. solanacearum* i koji je očekivane dužine i restrikcionog obrasca, pod uslovom da nije umnožen ni jednom uzorku negativne kontrole. Pouzdana potvrda pozitivnog rezultata može se dobiti i ponavljanjem testa sa drugim parom PCR prajmera (Dodatak 6).

Napomena:

Može se sumnjati da je došlo do inhibicije PCR reakcije ako se iz uzorka pozitivne kontrole koji sadrži *R. solanacearum* u vodi dobije očekivani proizvod, a iz pozitivnih kontrola sa *R. solanacearum* u ekstraktu krompira dobiju negativni rezultati. U multipleks PCR protokolima sa unutrašnjim kontrolama, inhibicija reakcije je indicirana ako nije dobijen niti jedan od dva proizvoda. Ako se iz jedne ili više negativnih kontrola dobije očekivani proizvod, može se sumnjati da je došlo do kontaminacije.

7. FISH test načelo

Kada se FISH test koristi kao prvi test provjere i ako se njim dobije pozitivan rezultat, mora se sprovesti IF test ili izolacija kao drugi obavezni test provjere. Ako se FISH test koristi kao drugi test provjere i ako se njime dobije pozitivan rezultat, za postavljanje konačne dijagnoze treba obaviti dalje testiranje prema dijagramu.

Napomena:

Koristiti validne (potvrđene i odobrene) oligo-probe specifične za bakteriju *R. solanacearum* (Dodatak 7). Preliminarna testiranja ovom metodom treba da omoguće ponovljivu detekciju najmanje 10^3 do 10^4 ćelije bakterije *R. Solanacearum* po ml koje su dodate ekstraktima uzoraka koji su u ranijim testiranjima bili negativni. Sljedeći je postupak najbolje sprovesti na svježe pripremljenim ekstraktima uzoraka, ali se može uspješno primijeniti i na ekstraktu uzorka koji je bio čuvan sa glicerolom na temperaturi od -16 do -24 °C ili od -68 do -86 °C.

Za negativnu kontrolu upotrijebiti alikvote (dijelove) ekstrakta uzoraka koji su u ranijem testiranju na *R. solanacearum* bili negativni.

Za pozitivnu kontrolu pripremiti suspenzije koje sadrže 10^5 do 10^6 ćelija/ml 0,01 M fosfatnog pufera (PB) bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (npr. soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; Dodatak 3) iz kulture stare 3 – 5 dana. Pripremiti odvojena stakalca za pozitivnu kontrolu sa homologim sojem ili nekim drugim referentnim sojem bakterije *R. solanacearum* rastvorenim u ekstraktu krompira kako je navedeno u

Dodatku 3B. Korišćenje eubakterijske oligo-probe obilježene FITC -om omogućava kontrolu procesa hibridizacije jer će se obojiti sve eubakterije koje su prisutne u uzorku. U Dodatku 3A. navedeni su Standardizovani pozitivni i negativni kontrolni materijali koji se mogu upotrebljavati u ovom testu. Kontrolni materijal testirati na isti način kao i uzorke.

7.1. Fiksiranje ekstrakta krompira

Sljedeći protokol se zasniva na Wullings i sur. (1998):

7.1.1. Pripremiti rastvor za fiksiranje (Dodatak 7).

7.1.2. Pipetom odmjeriti 100 µl svakog ekstrakta uzorka u Eppendorf epruvetu pa centrifugirati 7 minuta na 7000 g.

7.1.3. Ukloniti supernatant i rastvoriti talog u 200 µl fiksativa pripremljenog najviše 24 sata ranije. Promiješati na centrifugalnoj mješalici i inkubirati jedan sat u frižideru.

7.1.4. Centrifugirati 7 minuta na 7000 g, ukloniti supernatant i resuspendovati talog u 75 µl 0,01 M PB (Dodatak 7).

7.1.5. U otvore čistog stakalca nanijeti 16 µl fiksnih suspenzija kako je prikazano na slici 7.1. Na svako stakalce nanijeti nerazređena dva različita uzorka i upotrijebiti 10 µl za pripremanje razređenja 1:100 (u 0,01 M PB). Preostali fiksirani rastvor uzorka (49 µl) može se čuvati na - 20 °C nakon dodavanja jedne zapremine 96 %-tnog etanola. Ako FISH test treba ponoviti, centrifugiranjem ukloniti etanol i dodati jednaku zapreminu 0,01 PB (promiješati na centrifugalnoj mješalici).

Slika 7.1. Prikaz stakalca za FISH test

Uzorak 1	Prazno	Prazno	Prazno	Uzorak 2
				
Otvor 1	Otvor 2	Otvor 3	Otvor 4	Otvor 5
Uzorak 1	Prazno	Prazno	Prazno	Uzorak 2
				
Otvor 6	Otvor 7	Otvor 8	Otvor 9	Otvor 10
Pokrovno stakalce 1			Pokrovno stakalce 2	

7.1.6. Stakalca osušite na vazduhu (ili u sušnici na 37 °C) pa ih fiksirati provlačenjem kroz plamen. Na ovom koraku se postupak može prekinuti i nastaviti hibridizaciju sljedeći dan. Stakalca treba čuvati na sobnoj temperaturi u suvom prostoru bez prašine.

7.2. Hibridizacija

7.2.1. Dehidraciju ćelija izvršiti uzastopnim jednogminutnim potapanjem stakalca u 50 %-tni, 80 %-tni i 90 %-tni etanol. Stakalca postaviti na držač i osušiti na vazduhu.

7.2.2. Pripremiti vlažnu komoru za inkubaciju tako što se dno hermetičke kutije prekrije upijajućim ili filter papirom namočenim u 1x hybmix (Dodatak 7). Kutiju prethodno inkubirati u aparatu za hibridizaciju najmanje 10 minuta na 45 °C.

7.2.3. Nanijeti po 10 µl rastvora za hibridizaciju (Dodatak 7) u osam otvora (otvori 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 i 10; slika 7.1.) svakog stakalca, a dva središnja otvora (3 i 8) ostaviti prazna.

7.2.4. Prva i zadnja četiri otvora pokriti pokrovnim stakalcem (24 x 24 mm) pazeći pri tome da u otvorima ne ostane vazduha. Staviti stakalca u prethodno zagrijanu vlažnu komoru i hibridizovati pet sati u aparatu za hibridizaciju na 45 °C u tami.

7.2.5. Pripremiti tri posude sa 1 L ultra čiste vode (za upotrebu u molekularnoj biologiji), 1 L 1x hybmix (334 ml 3x hybmix i 666 ml ultra čiste vode) i 1 L 1/8x hybmix (42 ml 3x hybmix i 958 ml ultra čiste vode). Svaku posudu prethodno inkubirati u vodenom kupatilu na 45 °C.

7.2.6. Skinuti pokrovna stakalca, a predmetna stakalca staviti na držač.

7.2.7. Višak probe isprati inkubiranjem 15 minuta na 45 °C u posudi sa 1x hybmixa.

7.2.8. Prenijeti držač stakalaca u rastvor za pranje (1/8x hybmix) i inkubirati još 15 minuta.

7.2.9. Stakalca nakratko uroniti u ultra čistu vodu pa ih staviti na filter papir. Višak vlage ukloniti tako što se površina lagano pokrije filter papirom. U svaki otvor pipetom nanijeti 5 do 10 µl zaštitnog rastvora protiv izbljeđivanja (npr. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA ili ekvivalentna) i cijelo predmetno stakalce pokriti velikim pokrovnim stakalcem (24 x 60 mm).

7.3. Očitavanje FISH testa

7.3.1. Stakalca odmah pregledati epifluorescentnim mikroskopom uz uljnu imerziju, sa povećanjem od 630 ili 1000 x. Sa filterom prikladnim za fluorescein-izotiocijanat (FITC), eubakterijske ćelije (uključujući većinu gram negativnih ćelija) u uzorku vide se kao fluorescentno zelene. Upotrebom filtera za tetrametilrodamin-5-izotiocijanat ćelije bakterije *R. solanacearum*, obojene sa Cy3, vide se kao fluorescentno crvene. Uporediti morfologiju ćelije sa morfologijom pozitivnih kontrola. Ćelije moraju biti jasno fluorescentne i u cijelini obojene. Ako dođe do odstupanja u obojenosti, FISH test (Odjeljak VI.A.7) se mora ponoviti. Pregledati svaki otvor uzduž i popreko pod normalnom uglom i duž spoljne ivice. Za uzorke u kojima je vidljiv mali broj ćelija ili ih uopšte nema pregledati najmanje 40 mikroskopskih vidnih polja.

7.3.2. Pregledati da li su u otvorima vidljive jasno fluorescentne ćelije karakteristične morfologije za bakteriju *R. Solanacearum*.

Intenzitet fluorescencije mora biti jednak ili jači nego kod pozitivne kontrole. Ćelije koje nisu u potpunosti obojene ili su slabe fluorescencije ne smiju se uzeti u obzir.

7.3.3. Test se mora ponoviti ako se sumnja na kontaminaciju. Može se sumnjati ako sva stakalca u seriji pokazuju pozitivne ćelije zbog kontaminacije pufera ili ako su pozitivne ćelije pronađene (izvan otvora) na površini stakalca.

7.3.4. Postoji nekoliko problema vezanih uz specifičnost FISH testa. U koncentrovanom ekstraktu izdvojenih konusa pupčanih dijelova krtole ili dijelova stabljika mogu se pojaviti, iako ređe nego kod IF testa, populacije fluorescentnih ćelija netipične morfologije i saprofitne bakterije koje su po veličini i morfologiji slične bakteriji *R. solanacearum*.

7.3.5. U obzir uzeti samo fluorescentne ćelije tipične veličine i morfologije.

7.3.6. Tumačenje rezultata FISH testa

(i) Rezultati FISH testa smatraju se važećim ako se primjenom FITC filtera opaze zeleno fluorescentne ćelije čija je veličina i morfologija tipična za bakteriju *R. solanacearum* i ako se primjenom filtera za rodamin uočavaju crveno fluorescentne ćelije i to u svim pozitivnim kontrolama i ni u jednoj negativnoj kontroli.

Ako se pronađu jasno fluorescentne ćelije karakteristične morfologije, odrediti prosječni broj tipičnih ćelija po mikroskopskom vidnom polju i izračunati broj tipičnih ćelija po ml resuspendovanog taloga (Dodatak 4).

Uzorci sa najmanje 5 x 10³ tipičnih ćelija po ml resuspendovanog taloga smatraju se potencijalno kontaminiranim. Potrebni su dalji testovi.

Uzorci sa manje od 5 x 10³ tipičnih ćelija po ml resuspendovanog taloga smatraju se negativnim.

(ii) FISH Test je negativan ako se primjenom filtera za rodamin ne uoče izrazito fluorescentne crvene ćelije čija je veličina i morfologija tipična za bakteriju *R. solanacearum*, pod uslovom da se primjenom filtera za rodamin uoče tipične izrazito fluorescentne crvene ćelije u preparatima pozitivne kontrole.

8. ELISA Testovi

Načelo

Zbog relativno niske osjetljivosti, ELISA se može primijeniti samo kao neobavezni dodatni test pored IF, PCR ili FISH testova. Ako se primjenjuje DAS ELISA, obavezno je prethodno obogaćivanje ekstrakta i upotreba monoklonalnih antitijela.

Obogaćivanje uzoraka prije primjene ELISA testa može biti korisno u svrhu povećanja osjetljivosti testa, ali može biti i neuspješno zbog kompeticije ostalih organizama u uzorku.

Napomena: Koristiti validni (potvrđeni i odobreni) izvor antitijela za *R. solanacearum*

Preporučljivo je da se titar odredi za svaku novu seriju antitijela. Titar se definiše kao najveće razređenje kod kojeg dolazi do optimalne reakcije pri testiranju suspenzije koja sadrži 10^5 do 10^6 ćelija/ml homolognog soja bakterije *R. solanacearum* uz korišćenje odgovarajućih konjugata sekundarnih antitijela prema preporukama proizvođača.

Tokom testiranja, treba koristiti antitijela u radnim razređenjima koja su blizu ili jednaka titru formulacije dostupne na tržištu. Odrediti titar antitijela na suspenziji od 10^5 do 10^6 ćelija po ml homolognog soja bakterije *R. solanacearum*.

Za negativnu kontrolu koristiti ekstrakt uzorka koji je u ranijem testiranju na *R. solanacearum* bio negativan i suspenziju bakterije, sa kojom ne dolazi do unakrsne reakcije, u fosfatnom puferu sa dodatkom soli (PBS). Za pozitivnu kontrolu koristiti alikvot ekstrakta uzorka koji je u ranijem testiranju bio negativan, pomiješane sa 10^3 do 10^4 ćelija/ml bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (npr. soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; Dodatak 2A i B). Za poređenje rezultata na svakoj mikrotitarskoj ploči koristiti standardnu suspenziju od 10^5 do 10^6 ćelija/ml bakterije *R. solanacearum* u PBS-u. Pobrinuti se da pozitivne kontrole na mikrotitarskoj ploči budu dobro odvojene od uzoraka koji se testiraju. U Dodatku 3A. navedeni su Standardizovani pozitivni i negativni kontrolni materijali koji se mogu upotrebljavati u ovom testu. Kontrolni materijal testirati na isti način kao i uzorke. Validna su dva protokola za ELISA test.

(a) INDIREKTNA ELISA (Robinson Smith i sur., 1995)

- 1) Upotrijebiti alikvot od 100 do 200 μ l ekstrakta uzorka. (Zagrijavanjem četiri minute na 100 °C u vodenom kupatilu ili bloku za zagrijavanje u nekim se slučajevima mogu smanjiti nespecifični rezultati).
- 2) Dodati jednaku zapreminu pufera za oblaganje dvostruke jačine (Dodatak 4) i promiješati na centrifugalnoj mješalici (vorteksu).
- 3) Nanijeti alikvot od 100 μ l u svaki od najmanje dva otvora na mikrotitarskoj ploči (npr. Nunc-Polysorp ili ekvivalentna) i inkubirati jedan sat na 37 °C ili preko noći na 4 °C.
- 4) Ukloniti ekstrakte iz otvora. Isprati otvore tri puta rastvorom PBS-Tween (Dodatak 4), a poslednji rastvor za ispiranje ostaviti u otvorima najmanje pet minuta.
- 5) Pripremiti odgovarajuće razređenje antitijela za *R. solanacearum* u puferu za blokiranje (Dodatak 4). Za validna antitijela koja su dostupna na tržištu koristiti preporučena razređenja (obično dvostruka koncentracija titra).
- 6) Dodati 100 μ l u svaki otvor i inkubirati jedan sat na 37 °C.
- 7) Ukloniti rastvor antitijela iz otvora i oprati otvore tri puta rastvorom PBS-Tween, a poslednji rastvor za ispiranje ostaviti u otvorima najmanje pet minuta.
- 8) Pripremiti odgovarajuće razređenje sekundarnih antitijela-konjugata alkalne fosfataze u puferu za blokiranje. Dodati 100 μ l u svaki otvor i inkubirati jedan sat na 37 °C.
- 9) Ukloniti konjugat antitijela iz otvora i oprati otvore kao što je predhodno objašnjeno.
- 10) U svaki otvor dodati 100 μ l rastvora supstrata alkalne fosfataze (Dodatak 4), inkubirati u tami na sobnoj temperaturi i očitati apsorbenciju pri 405 nm u pravilnim razmacima tokom 90 minuta.

(b) DASI ELISA

- 1) Pripremiti odgovarajuće razrjeđenje poliklonalnih imunoglobulina za bakteriju *R. solanacearum* u puferu za oblaganje pH 9,6 (Dodatak 4). Nanijeti 200 µl u svaki otvor. Inkubirati četiri do pet sati na 37 °C ili 16 sati na 4 °C.
- 2) Otvore isprati tri puta rastvorom PBS-Tween (Dodatak 4). U najmanje dva otvora nanijeti 190 µl ekstrakta uzorka. Na svakoj ploči dodati pozitivnu i negativnu kontrolu, i to svaku u po dva otvora. Inkubirati 16 sati na 4 °C.
- 3) Otvore isprati tri puta rastvorom PBS-Tween (Dodatak 4).
- 4) Pripremiti odgovarajuće razrjeđenje monoklonskih antitijela specifičnih za bakteriju *R. solanacearum* u PBS -u (Dodatak 4) koji sadrži i 0,5 % goveđeg serumskog albumina (BSA) i nanijeti 190 µl u svaki otvor. Inkubirati dva sata na 37 °C.
- 5) Otvore isprati tri puta rastvorom PBS-Tween (Dodatak 4).
- 6) Pripremiti odgovarajuće razrjeđenje antimišjih imunoglobulina konjugiranih sa alkalnom fosfatazom u PBS -u. Nanijeti 190 µl u svaki otvor. Inkubirati dva sata na 37 °C.
- 7) Otvore isprati tri puta rastvorom PBS-Tween (Dodatak 4).
- 8) Pripremiti rastvor supstrata alkalne fosfataze koja sadrži 1 mg p-nitrofenil fosfata po ml pufera supstrata (Dodatak 4). Nanijeti 200 µl u svaki otvor. Inkubirati u tami na sobnoj temperaturi i očitati apsorbiciju pri 405 nm u pravilnim razmacima tokom 90 minuta.

Tumačenje rezultata ELISA testova

ELISA test je negativan ako je prosječna optička gustina (OD) u otvorima sa duplikatom uzorka $< 2 \times OD$ u otvoru sa negativnom kontrolom ekstrakta uzorka, pod uslovom da su sve vrijednosti OD pozitivnih kontrola iznad 1,0 (nakon 90 minuta inkubacije sa supstratom) i da su veće od dvostruke vrijednosti OD dobijene za negativne ekstrakte uzorka. ELISA test je pozitivan ako je prosječna optička gustina (OD) u otvorima sa duplikatom uzorka $> 2 \times OD$ u otvoru sa negativnom kontrolom ekstrakta uzorka, pod uslovom da su vrijednosti OD za sve otvore sa negativnom kontrolom $< 2 \times OD$ u otvorima sa pozitivnom kontrolom. Ako se u ELISA testu očitaju negativni rezultati u otvorima sa pozitivnom kontrolom, to ukazuje da test nije pravilno sproveden ili da je došlo do inhibicije. Ako se u ELISA testu očitaju pozitivni rezultati u otvorima sa negativnom kontrolom, to ukazuje da je došlo do unakrsne kontaminacije ili do nespecifičnog vezanja antitijela.

9. BIOTEST

Napomena:

Preliminarno testiranje ovom metodom treba da omogući ponovljivu detekciju 10^3 do 10^4 jedinica koje stvaraju kolonije (CFU) bakterije *R. solanacearum* po ml, a koje su dodate ekstraktima uzoraka koji su u ranijem testiranju bili negativni (za pripremu- Dodatak 3). Najveća osjetljivost detekcije može se očekivati ako se koriste svježe pripremljeni ekstrakti uzoraka i optimalni uslovi rasta. Međutim, ova se metoda može uspješno primijeniti i sa ekstraktima koji su bili čuvani sa glicerolom na temperaturi od -68 do -86 °C. Sljedeći se protokol zasniva na Janse (1988):

- 9.1. Za svaki uzorak koristiti 10 biljaka osjetljive sorte paradajza (npr. Moneymaker ili druga sorta za koju je u laboratoriji utvrđeno da je jednako osjetljiva) u fazi trećeg pravog lista. Za pojedinosti o gajenju pogledati Dodatak 8. Moguće je upotrijebiti i patlidžane (npr. sorta Black Beauty ili sorta ekvivalentne osjetljivosti), ali samo biljke u fazi 2-3 lista do potpunog razvoja trećeg pravog lista. Pokazalo se da su kod patlidžana simptomi slabiji i da se sporije razvijaju. Zato se preporučuje, po mogućnosti koristiti mlade biljke paradajza.
- 9.2. 100 µl ekstrakta uzorka rasporediti na test biljke.
 - 9.2.1. Inokulacija injekcijom.

Inokulisati stabljike neposredno iznad kotiledona injekcijom sa tankom iglom (najmanje 23G). Uzorak rasporediti na test biljke, tako da svaka biljka dobije odgovarajuću količinu.
 - 9.2.2. Inokulacija zarezivanjem.

Držeći biljku među prstima, pipetom nanijeti kapljicu (oko 5-10 µl) resuspendovanog taloga na stabljiku između kotiledona i prvog lista. Sterilnim skalpelom napraviti dijagonalni rez, dug oko 1

cm i dubok oko 2/3 debljine stabljike, počevši od nanešene kapljice resuspendovanog taloga. Čvrsto zatvoriti rez sterilnim vazelinom iz šprica.

- 9.3. Koristeći istu metodu, inokulisati pet biljaka suspenzijom u vodi od 10^5 do 10^6 ćelija/ml pripremljenom iz 48-satne kulture virulentnog soja biovara 2, bakterije *R. solanacearum* za pozitivnu kontrolu, a puferom za talog za negativnu kontrolu (Dodatak 4). Da ne bi došlo do unakrsne kontaminacije, odvojiti biljke za pozitivnu i negativnu kontrolu od ostalih biljaka.

- 9.4. Test biljke gajiti u karantinskim uslovima do četiri sedmice na temperaturi od 25 do 30 °C i uz visoku relativnu vlažnost pa ih adekvatno zalijevati pazeći da ne dođe do zasićenja vodom ili uvenuća zbog nedostatka vode. Da ne bi došlo do kontaminacije, biljke za pozitivnu i negativnu kontrolu uzgajati na jasno odvojenim policama u stakleniku ili komori za gajenje ili, ako je prostor ograničen, osigurati da pojedini postupci budu jasno odvojeni. Ako se biljke za različite uzorke moraju inkubirati jedne blizu drugih, odvojiti ih pogodnim zaslonima (platnom). Kod prihrane, zalijevanja, pregledavanja i svakog drugog postupka sa biljkama dobro paziti da ne dođe do unakrsne kontaminacije. Od ključne je važnosti da u staklenicima i komorama za gajenje ne bude nikakvih insekata jer oni mogu prenijeti bakteriju sa uzorka na uzorak. Pratiti javljaju li se simptomi uvenuća, epinastije, hloroze i/ili zaostajanja u rastu.

- 9.5. Iz inficiranih biljaka izolovati (Odjeljak II.3) i identifikovati prečišćene kulture vjerovatne bakterije *R. solanacearum* (Odjeljak VI.B).

- 9.6. Ako se nakon tri sedmice ne uoče nikakvi simptomi, obaviti IF/PCR test /izolaciju na sastavljenom uzorku dijelova stabljike dugih 1 cm, uzetih iznad mjesta inokulacije, sa svake testne biljke. Ako test bude pozitivan, primijeniti metodu zasijavanja razređenja na selektivnu podlogu (odjeljak 4.1.)

- 9.7. Identifikovati sve pročišćene kulture vjerovatne bakterije *R. solanacearum* (Odjeljak VI.B).

Tumačenje rezultata biotesta

Rezultati biotesta su vaalidni ako biljke pozitivne kontrole pokazuju tipične simptome, ako se iz tih biljaka može ponovo izdvojiti bakterija, i ako se na negativnim kontrolama ne pronađu nikakvi simptomi. Biotest je negativan ako test biljke nisu zaražene bakterijom *R. solanacearum*, pod uslovom da je bakterija *R. solanacearum* detektovana u pozitivnim kontrolama. Biotest je pozitivan ako su test biljke zaražene bakterijom *R. solanacearum*.

B. TESTOVI ZA IDENTIFIKACIJU

Identifikovati čiste kulture vjerovatnih izolata bakterije *R. solanacearum* pomoću najmanje dva od sljedećih testova koja se zasnivaju na različitim biološkim načelima. Prema potrebi, u svaki test uključiti poznate referentne sojeve-izolate (Dodatak 3).

1. Nutritivni (odgajivački) i enzimatski testovi za identifikaciju

Odrediti fenotipska svojstva, univerzalno prisutna ili odsutna, kod bakterije *R. solanacearum*, prema metodama Lelliot i Stead (1987), Klement i sur. (1990), Schaad (2001).

Test	Očekivani rezultat
Stvaranje fluorescentnog pigmenta	–
Inkluzije poli-β-hidroksibutirata	+
Oksidacijski/fermentacijski (O/F) test	O+/F–
Aktivnost katalaze	+
Test oksidaze po Kovacu	+
Redukcija nitrata	+
Korišćenje citrata	+
Rast na 40 °C	–
Rast u 1 % NaCl	+
Rast u 2 % NaCl	–
Aktivnost arginin-dihidrolaze	–
Likvefikacija (razlaganje) želatina	–
Hidroliza skroba	–
Hidroliza eskulina	–
Stvaranje levana	–

2. IF test

- 2.1. Pripremiti suspenziju od oko 10^6 ćelija/ml u puferu za IF (Dodatak 4).
- 2.2. Pripremiti niz dvostrukih razrjeđenja odgovarajućeg seruma
- 2.3. Sprovesti IF test (Odjeljak VI.A.5).
- 2.4. IF test je pozitivan ako je IF titar kulture jednak onom pozitivne kontrole.

3. ELISA test

Napomena:

Ako se primjenjuju samo 2 identifikacijska testa, ne primjenjuje se drugi serološki test uz ovaj.

- 3.1. Pripremiti suspenziju od oko 10^8 ćelija/ml u 1x PBC (Dodatak 4).
- 3.2. Sprovesti odgovarajući postupak ELISA sa monoklonalnim antitijelima specifičnim za bakteriju *R. solanacearum*.
- 3.3. ELISA test je pozitivan ako je ELISA vrijednost očitavanja kulture jednaka najmanje polovini vrijednosti pozitivne kontrole.

4. PCR testovi

- 4.1. Pripremiti suspenziju od oko 10^6 ćelija/ml u sterilnoj vodi namijenjenoj upotrebi u molekularnoj biologiji (ultra čista voda).
- 4.2. Zagrijati 100 μ l ćelijske suspenzije u zatvorenim epruvetama u termobloku ili vreloom vodenom kupatilu četiri minuta na 100 °C. Uzorci se mogu potom, do upotrebe, čuvati na - 16 do - 24 °C.
- 4.3. Primijeniti odgovarajuće PCR postupke za umnožavanje specifičnih fragmenata *R. solanacearum* [npr. Seal i sur. (1993), Pstrik & Maiss (2000), Pstrik i sur. (2002), Boudazin i sur. (1999), Opina i sur. (1997), Weller i sur. (1999)].
- 4.4. Smatra se da je *R. solanacearum* identifikovana ako su umnoženi PCR proizvodi iste dužine i imaju isti polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata kao i pozitivni kontrolni soj (izolat).

5. FISH test

- 5.1. Pripremiti suspenziju od oko 10^6 ćelija/ml u ultra čistoj vodi.
- 5.2. Primijeniti postupak FISH (Odjeljak VI.A.7.) sa najmanje dvije oligo-probe specifične za *R. solanacearum* (Dodatak 7).
- 5.3. FISH test je pozitivan ako se i kod kulture i kod pozitivne kontrole dobiju iste reakcije.

6. Profiliranje masnih kiselina (FAP)

- 6.1. Gajiti kulturu 48 sati na 28 °C na triptikaza-soja-agaru (Oxoid).
- 6.2. Primijeniti odgovarajući FAP postupak (Janse, 1991; Stead, 1992).
- 6.3. FAP test je pozitivan ako je profil vjerovatne kulture identičan profilu pozitivne kontrole. Prisutnost karakterističnih masnih kiselina 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH i 18:1 2OH i odsutnost 16:0 3OH u velikoj mjeri ukazuje na *Ralstonia* sp.

7. Metode karakterizacije soja

Kod svakog novog slučaja izolacije *R. solanacearum* preporučuje se da se obavi karakterizacija soja jednom od sljedećih metoda. Prema potrebi, u svaki korišćeni test uključiti poznate referentne sojeve (Dodatak 3).

7.1. Određivanje biovara

R. solanacearum se dijeli na biovare na osnovu sposobnosti iskorišćavanja i/ili oksidacije tri disaharida i tri heksozna alkohola (Hayward, 1964 i Hayward i sur., 1990). Hranjive podloge za određivanje biovara opisane su u Dodatku 2. Test se može uspješno obaviti inokulacijom podloge čistim kulturama izolata *R. solanacearum* i inkubiranjem na 28 °C. Ako se podloga rasporedi u 96 sterilnih otvora na ploči za gajenje ćelija (200 μ l po otvoru), u roku od 72 sata može se uočiti promjena boje od maslinasto-zelene na žutu, što znači da je rezultat testa pozitivan.

Biovar	1	2	3	4	5
Iskorišćavanje:					
Maltoza	–	+	+	–	+
Laktoza	–	+	+	–	+
D (+) celobioza	–	+	+	–	+
Manitol	–	–	+	+	+
Sorbitol	–	–	+	+	–
Dulcitol	–	–	+	+	–

Biovar 2 se dijeli na podfenotipove pomoću dodatnih testova.

	Biovar 2A(proširen u cijelom svijetu)	Biovar 2A(nađen u Čileu i Kolumbiji)	Biovar 2T(nađen u tropskim područjima)
Iskorišćavanje trehaloze	–	+	+
Iskorišćavanje mezo-inozitola	+	–	+
Iskorišćavanje D-riboze	–	–	+
Pektolitička aktivnost ⁽¹⁾	slaba	slaba	visoka

⁽¹⁾ Pogledati Lelliot i Stead (1987)

7.2. Genomski otisak prsta

Molekularna diferencijacija sojeva u kompleksu *R. solanacearum* može se postići primjenom nekoliko metoda, uključujući slijedeće:

7.2.1. Analiza polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) (Cook i sur., 1989).

7.2.2. PCR ponavljajućih nizova, korišćenjem prajmera REP, BOX i ERIC (Louws i sur., 1995, Smith i sur., 1995).

7.2.3. Analiza polimorfizma dužine umnoženih fragmenata (AFLP) (Van der Wolf i sur., 1998).

7.3. PCR metode

Specifični PCR prajmeri (Pastrik i sur., 2002; Dodatak 6) mogu se upotrijebiti za diferencijaciju sojeva koji pripadaju grupi 1 (biovari 3, 4 i 5) i grupi 2 (biovari 1, 2A i 2T) bakterije *R. solanacearum*, kako je prvobitno bilo utvrđeno metodom RFLP (Cook i sur., 1989) i sekvenconiranjem 16S rDNK (Taghavi i sur., 1996).

C. TEST POTVRDE (PROVJERA PATOGENOSTI)

Test patogenosti mora se sprovesti kao konačna potvrda dijagnoze *R. solanacearum* i za ocjenu virulentnosti kultura identificiranih kao *R. solanacearum*.

- 1) Pripremiti inokulum od oko 10^6 ćelija/ml iz 24 do 48 sati stare kulture izolata koji se namjeravaju testirati i odgovarajući pozitivni kontrolni soj bakterije *R. solanacearum* (npr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; pogledati Dodatak 3).
- 2) Inokulisati 5 do 10 mladih sejanaca osjetljivih sorti paradajza ili patlidžana u fazi trećeg pravog lista (vidjeti Odjeljak VI.A.9).
- 3) Inkubirati do dvije sedmice na 25 do 28 °C i uz visoku relativnu vlažnost pa ih adekvatno zalijevati pazeći da ne dođe do zasićenja vodom ili uvenuća zbog nedostatka vode. Kod čistih kultura bi trebalo da se pojavi tipično uvenuće u roku od 14 dana. Ako nakon ovog perioda simptomi nisu prisutni, ne može se potvrditi da je kultura patogeni oblik bakterije *R. solanacearum*.
- 4) Pratiti javljaju li se simptomi uvenuća i/ili epinastije, hloroze i zaostajanja u rastu.
- 5) Iz biljaka sa simptomima izdvojiti dio stabljike oko 2 cm iznad mjesta inokulacije. Usitniti i rastvoriti u manjoj zapremini sterilne destilovane vode ili 50 mM fosfatnog pufera (Dodatak 4). Izolaciju iz suspenzije izvršiti razmazom razređenja na odgovarajuću hranjivu podlogu, po mogućnosti selektivnu (Dodatak 2), inkubirati 48 do 72 sati na 28 °C i pratiti rast kolonija tipičnih za *R. solanacearum*.

Dodatak 1**Laboratorije uključene u optimizaciju i validaciju protokola**

Laboratorija ⁽¹⁾	Mjesto	Država
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Bec i Linz	Austrija
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgija
Plantedirektoratet	Lyngby	Danska
Central Science Laboratory	York	Engleska
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Škotska
Laboratoire national de la protection des végétaux, unité de bactériologie	Angers	Francuska
Laboratoire national de la protection des végétaux, Station de quarantaine de la pomme de terre	Le Rheu	Francuska
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Njemačka
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Njemačka
State Laboratory	Dublin	Irska
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	Italija

Regione Veneto Unita Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Italija
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Nizozemska
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nizozemska
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabon	Portugal
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Španija
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Španija
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Švedska

Dodatak 2.

Podloge za izolaciju i gajenje bakterije *R. Solanacearum*

(a) Uobičajene hranljive podloge

Hranljivi agar (NA)

Hranljivi agar (Difco) 23,0 g
Destilovana voda 1,0 L
Rastvoriti sastojke i sterilisati u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Agar sa kvascem, peptonom i glukozom (YPGA)

Ekstrakt kvasca (Difco) 5,0 g
Bacto pepton (Difco) 5,0 g
D (+) glukoza (monohidrat) 10,0 g
Bacto agar (Difco) 15,0 g
Destilovana voda 1,0 L
Rastvoriti sastojke i sterilisati u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Agar sa saharozom i peptonom (SPA)

Saharoza 20,0 g
Bacto pepton (Difco) 5,0 g
K₂HPO₄ 0,5 g
MgSO₄·7H₂O 0,25 g
Bacto agar (Difco) 15,0 g
Destilovana voda 1,0 L
pH 7,2 – 7,4
Rastvoriti sastojke i sterilisati u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Kelmanova tetrazolium-podloga

Casamino kiseline (Difco) 1,0 g
Bacto pepton (Difco) 10,0 g
Dekstroza 5,0 g
Bacto agar (Difco) 15,0 g
Destilovana voda 1,0
Rastvoriti sastojke i sterilisati u autoklavu na 121 °C 15 minuta.
Ohladiti na 50 °C i dodati rastvoru 2,3,5-trifenil-tetrazolium-hlorida (Sigma), steriliziranu filtriranjem, kako bi se dobila konačna koncentracija od 50 mg/l.

(b) Validne (potvrđene i odobrene) selektivne hranjive podloge

SMSA podloga (Englebrecht, 1994, izmjene prema Elphinstone i sur., 1996)

Osnovna podloga

Casamino kiseline (Difco) 1,0 g
Bacto pepton (Difco) 10,0 g
Glicerol 5,0 ml
Bacto agar (Difco), (pogledati napomenu 2) 15,0 g
Destilovana voda 1,0 L

Rastvoriti sastojke i sterilisati u autoklavu na 121 °C 15 minuta. Ohladiti na 50 °C i dodati osnovne vodene rastvore sljedećih sastojaka, sterilisane filtriranjem, kako bi se dobile predviđene konačne koncentracije:

Kristal violet (Sigma)	5 mg na L
Polimiksin-B-sulfat(Sigma P-1004)	600 000 U (oko100mg) na L
Bacitracil (Sigma B-0125)	1 250 U (oko 25 mg) na L
Hloramfenikol (Sigma C-3175)	5 mg na L
Penicilin-G(Cigma P-3032)	825 U(oko0,5mg) na L
2,3,5-trifenil-tetrazolium-hlorid (Sigma)	50 mg na L

Napomena:

1. Reagensi drugačiji od gore navedenih mogu uticati na rast bakterije *R. solanacearum*.
 2. Umjesto Bacto agara (Difco) može se koristiti Oxoid agar br. 1. U tom će slučaju *R. solanacearum* sporije rasti, ali se može smanjiti i rast konkurentnih saprofita. Za formiranje tipičnih kolonija bakterije *R. solanacearum* možda će trebati 1 do 2 dana više, a crveno obojenje može biti svjetlije i difuznije nego na Bacto agaru.
 3. Povećanjem koncentracije bacitracina na 2500 U/L mogu se smanjiti populacije konkurentnih bakterija, a da se ne utiče na rast bakterije *R. solanacearum*.
- Čuvati hranjivu podlogu i osnovni rastvor antibiotika na 4 °C na tamno mjesto i upotrijebiti u roku od jednog mjeseca. Prije upotrebe, sa podloga se mora ukloniti površinska kondenzacija. Podloge se ne smiju pretjerano osušiti. Nakon pripremanja svake nove serije hranjive podloge, treba obaviti kontrolu kvaliteta tako što se nanese suspenzija referentne kulture *R. solanacearum* (pogledati Dodatak 3) i prati hoće li doći do stvaranja tipičnih kolonija nakon dva do pet dana inkubacije na 28 °C.

(c) Validne (potvrđene i odobrene) hranljive podloge obogaćivanje

SMSA tečna podloga (Elphinstone i sur., 1996)

Pripremiti kao za selektivnu podlogu SMSA sa agarom, ali izostaviti Bacto agar i 2,3,5-trifenil-tetrazol-hlorid.

Modifikovana Wilbrink tečna podloga (Caruso i sur., 2002)

Saharoza	10 g
Proteoza pepton	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,25 g
NaNO ₃	0,25 g
Destilovana voda	1 L

Sterilizovati u autoklavu na 121 °C 15 minuta i ohladiti na 50 °C. Dodati osnovne rastvore antibiotika kao za SMSA tečnu podlogu.

Dodatak 3.

A. Standardizovani kontrolni materijali dostupni na tržištu

(a) Bakterijski izolati.

Preporučuje se korišćenje sljedećih bakterijskih izolata kao standardnog referentnog materijala bilo za pozitivne kontrole (Tabela 1) ili tokom optimizacije testova u svrhu izbjegavanja unakrsnih reakcija (Tabela 2). Svi su sojevi dostupni na tržištu i mogu se nabaviti kod:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Central Science Laboratory, York, UK

2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Nizozemska

3. Collection française de bactéries phytopathogènes (CFBP), INRA – Station de phytobactériologie, Angers, Francuska

Tabela 1. SMT popis referentnih izolata bakterije *R. solanacearum*

Oznaka NCPBP	Br. SMT	Ostale oznake	Država porijekla	Biovar
NCPBP 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egipat	2
NCPBP 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turska	2
NCPBP 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Engleska	2
NCPBP 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Kipar	2
NCPBP 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Švedska	2
NCPBP 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgija	2
NCPBP 4156*	71 *	PD 2762, CFBP 3857	Nizozemska	2
NCPBP 4157	66	LNPV 15.59	Francuska	2
NCPBP 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS55	Portugal	2
NCPBP 4160	69	IVIA -1632-2	Španija	2
NCPBP 4161	76	B3B	Njemacka	2
NCPBP 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	SAD	1
NCPBP 3967	42	CFBP 4610, R285, GONg7	Kostarika	1
NCPBP 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Kolumbija	2
NCPBP 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPBP 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brazil	2T
NCPBP 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPBP 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Australija	3
NCPBP 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Šri Lanka	4
NCPBP 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipini	4
NCPBP 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmp2	Kina	5

* Upotrebljavati kao standardni referentni soj bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (rasa 3)

Napomena: Autentičnost gore navedenih sojeva može se garantovati samo ako su oni dobijeni iz autentične zbirke kultura.

Tabela 2. SMT popis referentnih serološki ili genetski srodnih bakterija za upotrebu pri optimizaciji testova detekcije.

Oznaka NCPPB	Br. SMT	Ostale oznake	Identifikacija
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4164	–	CFBP 2227	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽²⁾
NCPPB 4165	–	CFBP 2459	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽²⁾
NCPPB 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	<i>Ralstonia</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	<i>Burkholderia andropogonis</i> ⁽¹⁾
NCPPB 353	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia caryophylli</i> ⁽¹⁾
NCPPB 945	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia glumae</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia plantarii</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	<i>Banana Blood Disease Bacterium</i> ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ⁽³⁾
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4169	62	IPO 1695	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ⁽¹⁾ ⁽²⁾
NCPPB 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	<i>Curtobacterium</i> sp. ⁽¹⁾ ⁽²⁾
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	<i>Pseudomonas</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4173	–	PD 2318	<i>Aureobacterium</i> sp. ⁽²⁾
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	<i>Flavobacterium</i> sp. ⁽¹⁾ ⁽²⁾

⁽¹⁾ Soj koji u serološkim testovima (IF i/ili ELISA) može unakrsno reagovati sa poliklonskim serumima.

⁽²⁾ Soj od kojeg se u nekim laboratorijama može umnožiti PCR proizvod dužine slične dužini koja se očekuje pri upotrebi specifičnih prajmer OLI-1 i Y-2 (pogledati Dodatak 6).

⁽³⁾ U većini testova mogao bi unakrsno reagovati, ali je poznato da se javlja samo na bananama u Indoneziji.

(b) Standardizovani kontrolni materijali dostupni na tržištu.

Dolje navedeni standardni kontrolni materijal može se dobiti iz zbirke kultura NCPPB. Liofilizovane granule ekstrakta krompira iz 200 zdravih krtola krompira kao negativna kontrola za sve testove.

Liofilizovane granule ekstrakta krompira iz 200 zdravih krtola krompira sa 10^3 do 10^4 i 10^4 do 10^6 ćelija *R. solanacearum* biovar 2 (soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) kao pozitivna kontrola za serološke i PCR testove. S obzirom da liofilizacija utiče na vitalnost ćelija, one nisu prikladne kao standardna kontrola za izolaciju ili biotestove. Formalinom fiksirane suspenzije bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) sa 10^6 ćelija /ml kao pozitivna kontrola za serološke testove.

B. Pripremanje pozitivnih i negativnih kontrola za osnovne testove provjere (PCR/IF i FISH)

Napraviti suspenziju kulture virulentnog soja *R. solanacearum* rasa 3/biovar 2 (npr. soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) gajene 48 sati na j SMS A osnovno podlozi u 10 mM fosfatnom puferu da se dobije gustina ćelija od oko 2×10^8 cfu/ml. Ovo je obično blago zamućena suspenzija optičke gustine 0,15 na 600 nm.

Izvaditi konus pupčanog dijela iz 200 krtola krompira sorte bijele sorte krompira za koje je poznato da nisu zaražene bakterijom *R. Solanacearum*. Obraditi konuse uobičajenom metodom i resuspendovati talog u 10 ml. Napuniti 10 sterilnih mikroepruveta od 1,5 ml s 900 µl resuspendovanog taloga. U prvu mikroepruvetu dodati 100 µl suspenzije *R. Solanacearum*.

Promiješati na centrifugalnoj mješalici odnosno vorteksu. U sljedećih pet mikroepruveta pripremiti decimalna razrjeđenja. Ovih šest mikroepruveta sa kontaminiranim ekstraktom koristiti za pozitivnu kontrolu. Četiri mikroepruvete sa nekontaminiranim ekstraktom koristiti za negativnu kontrolu. U skladu sa tim, označiti mikroepruvete. Pripremiti alikvote od 100 µl u mikroepruvetama od 1,5 ml tako da se dobije devet kopija svakog kontrolnog uzorka. Do upotrebe ih čuvati na – 16 do – 24 °C. Prisutnost i količinu *R. Solanacearum* u kontrolnim uzorcima potvrditi najprije IF testom. Za PCR test, obaviti ekstrakciju DNK na pozitivnim i negativnim kontrolnim uzorcima za svaku seriju uzoraka za testiranje. Za IF i FISH testove, obaviti testove na pozitivnim i negativnim kontrolnim uzorcima za svaku seriju uzoraka za testiranje. Kod IF, FISH i PCR testova, *R. Solanacearum* se mora detektirati u najmanje 10^6 i 10^4 ćelija/ml pozitivnih kontrola i ni u jednoj negativnoj kontroli.

Dodatak 4

Puferi za postupke testiranja

Uopšteno: Neotvoreni sterilni puferi mogu se čuvati do jedne godine.

1. Puferi za postupak ekstrakcije

1.1. Ekstrakcioni pufer (50 mM fosfatni pufer, pH 7,0)

Ovaj se pufer koristi za ekstrakciju bakterije iz biljnog tkiva homogenizacijom ili trešenjem.

Na ₂ HPO ₄ (bezvodni)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Destilovana voda	1,00 L
Rastvoriti sastojke, provjeriti pH i sterilisati u autoklavu 15 minuta na 121 °C. sljedeći dodatni sastojci mogu biti korisni:	

	<i>Svrha</i>	<i>Količina(po litru)</i>
Pahuljice Lubrol	deflokulant (*)	0,5 g
DC silikon protiv pjenjenja	sredstvo protiv pjenjenja(*)	1,0 ml
Tetranatrijev pirofosfat	antoksidans	1,0 g
Polivinilpirolidon—40000 (PVP-40)	vezanje PCR inhibitora	50 g

(*) Upotrebljavati za metodu ekstrakcije homogenizacijom

1.2. Pufer za talog-pelet pufer (10 mM fosfatni pufer, pH 7,2)

Ovaj se pufer koristi za resuspendovanje i razređivanje ekstrakta konusa izvađenih iz pupčanih djelova krtola krompira nakon koncentrovanja u talog centrifugiranjem.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
Destilovana voda	1,0 L

Rastvoriti sastojke, provjeriti pH i sterilisati u autoklavu 15 minuta na 12 °C.

2. Puferi za IF test

2.1. IF pufer (10 mM fosfatni pufer sa dodatkom soli (PBS), pH 7,2). Ovaj se pufer koristi za razređivanje antitijela

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destilovana voda	1,0 L

Rastvoriti sastojke, provjeriti pH i sterilisati u autoklavu 15 minuta na 121 °C.

2.2. IF pufer Tween. Ovaj pufer se koristi za pranje stakalaca. IF puferu dodati 0,1 % Tween 20.

2.3. Glicerol sa fosfatnim puferom, pH 7,6

Ovaj se pufer koristi kao tečnost za prekrivanje otvora u IF testu kako bi se pojačala fluorescencija.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,2 g
--	-------

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15 g
Glicerol	50 ml
Destilovana voda	100 ml

Pokrivni rastvori protiv izbljeđivanja dostupni su na tržištu, npr. Vectashield® (Vector Laboratories) ili Citifluor® (Leica).

3. Puferi za indirektni ELISA test

3.1. Pufer za oblaganje dvostruke jačine, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
Destilovana voda	1,00 L

Rastvoriti sastojke, provjeriti pH i sterilisati u autoklavu 15 minuta na 121°C.

Može se dodati natrijev sulfit (0,2 %) kao antioksidans ako je potrebno spriječiti stvaranje oksidovanih aromatičnih jedinjenja.

3.2. 10X fosfatni pufer sa dodatkom soli (PBS), pH 7,4

NaCl	80,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	29,0 g
KCl	2,0 g
Destilovana voda	1,0 L

3.3. PBS-Tween

10X PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilovana voda	895 ml

3.4. Blokirajući (za antitijela) pufer (mora biti svježe pripremljen)

10X PBS	10,0 ml
Polivinilpirolidon-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Mlijeko u prahu	0,5 g
Destilovana voda	dopunite do 100 ml

- | | |
|--|--------------|
| 3.5. Rastvor supstrata alkalne fosfataze, pH 9,8 | Dietanolamin |
| 97 ml Destilovana voda | 800 ml |

4. Puferi za DASI ELISA test

- | | |
|---|----------|
| 4.1. Pufer za oblaganje, pH 9,6 | |
| Na ₂ CO ₃ | 1,59 g |
| NaHCO ₃ | 2,93 g |
| Destilovana voda | 1 000 ml |
| Rastvorite sastojke i podesite pH na 9,6. | |
| 4.2. 10X fosfatni pufer sa dodatkom soli (PBS), pH 7,2 do 7,4 | |
| NaCl | 80,0 g |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 4,0 g |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 27,0 g |
| Destilovana voda | 1 000 ml |
| 4.3. PBS-Tween | |
| 10X PBS | 50 ml |
| 10 % Tween 20 | 5 ml |
| Destilovana voda | 950 ml |

Dodatak 5

Određivanje stepena kontaminacije u IF i FISH testovima

1. Odrediti srednji broj tipičnih fluorescentnih ćelija po vidnom polju (c).
2. Izračunati broj tipičnih fluorescentnih ćelija po otvoru mikroskopskog stakalca (C).
$$C = c \times S/s$$

gdje je S = površina otvora stakalca sa više otvora
i s = površina polja objektiva
 $s = \pi i^2 / 4G^2K^2$ gdje je i = koeficijent polja (ovisi o vrsti okulara i iznosi od 8 do 24)
K = koeficijent tubusa (1 ili 1,25)
G = povećanje objektiva (100x, 40 x itd.)

Dodatak 6

Validni (potvrđeni i odobreni) protokoli i reagensi za PCR

Napomena: Preliminarna testiranja treba da omoguće ponovljivu detekciju 10^3 do 10^4 ćelija bakterije *R. solanacearum* po ml ekstrakta uzorka. Preliminarna testiranja ne smiju dati lažno pozitivne rezultate kod određenih odabranih bakterijskih sojeva odnosno izolata (pogledati Dodatak 3).

1. Protokol za PCR prema Seal i sur. (1993)

1.1. Oligonukleotidni prajmeri

Uzvodni prajmer OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'

Nizvodni prajmer Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Očekivana dužina umnoženog proizvoda iz kalupa DNK bakterije *R. solanacearum* = 288 bp (par prajmera PSA).

1.2. Reakcijska smješa za PCR

Reagens	Količina po reakciji	Konačna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	17,65 µl	
10X PCR pufer (1) (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
dNTP smješa (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Prajmer OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Prajmer Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Taq polimeraza (5U/µl)	0,1 µl	0,5 U
Zapremina uzorka	2,0 µl	
Ukupna zapremina	25 µl	
(1) Metoda je bila validna Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL		

1.3. Uslovi za PCR reakcije

Izvesti sljedeći program:

1 ciklus od: (i) 2 minute na 96 °C (denaturacija lanca DNK)

35 ciklusa od: (ii) 20 sekundi na 94 °C (denaturacija lanca DNK)

(iii) 20 sekundi na 68 °C (vezivanje prajmera)

(iv) 30 sekundi na 72 °C (produžavanje kopije - hibridizacija)

1 ciklus od: (v) 10 minuta na 72 °C (završno produžavanje)

(vi) držati na 4 °C

Napomena:

Optimalni uslovi korišćenja ovog programa su definisani za korišćenje na PCR (thermal cycler) Perkin Elmer 9600. Modifikacija trajanja koraka ciklusa (ii), (iii) i (iv) je vjerovatno potrebna u slučaju upotrebe drugih modela thermal cycler-a.

1.4. Analiza produkata umnožavanja restrikcijskim enzimima

PCR proizvodi umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* daju karakteristične polimorfizme u dužini restrikcionih fragmenata sa enzimom Ava II posle inkubacije na 37 °C.

2. Protokol za PCR prema Pastrik i Maiss (2000)

2.1. Oligonukleotidni prajmeri

Uzvodni prajmer Ps-1 5'- agt cga acg gca gcg ggg g -3'

Nizvodni prajmer Ps-2 5'- ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca -3'

Očekivana dužina umnoženog proizvoda iz lanca DNK bakterije *R solanacearum* = 553bp.

2.2. Reakcijska smješa za PCR (reakcioni miks)

Reagens	Količina po reakciji	Konačna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	16,025 µl	
10X PCR pufer ⁽¹⁾	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-NTP smješa (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Prajmer Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Prajmer Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq polimeraza (5U/µl)	0,1 µl	0,5 U
Zapremina uzorka	5,0 µl	
Ukupna zapremina	25,0 µl	
(1)Validacija metode je izvršena uz korišćenje Taq polimeraze Perkin Elmer (AmpliTaq ili Gold) i Gibco BRL.		

Napomena:Optimalni uslovi korišćenja ovog programa su definisani za korišćenje na PCR MJ Research PTC 200 thermal cycler-y sa Gibco Taq polimerazom. Pri istim koncentracijama može se koristiti i Perkin Elmer AmpliTaq i pufer.

2.3. Uslovi za PCR reakcije

Izvesti sljedeći program:

- 1 ciklus od: (i) 5 minuta na 95°C (denaturacija lanca DNK)
35 ciklusa od: (ii) 30 sekundi na 95°C (denaturacija lanca DNK)
(iii) 30 sekundi na 68°C (vezivanje prajmera)
(iv) 45 sekundi na 72°C (produžavanje kopije)
1 ciklus od: (v) 5 minuta na 72°C (konačno produžavanje)
(vi) držati na 4 °C

Napomena:

Optimalni uslovi korišćenja ovog programa su definisani za korišćenje na PCR MJ Research PTC 200 thermal cycler-y.Modifikacija trajanja koraka ciklusa (ii), (iii) i (iv) je možda potrebna u slučaju upotrebe drugih modela thermal cycler-a.

2.4. Analiza produkta umnožavanja restrikcionim enzimom

PCR proizvodi umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* ispoljavaju karakteristične polimorfizme u dužini restrikcionih fragmenata sa enzimom Taq I nakon inkubacije od 30 minuta na 65 °C. Restrikcioni fragmenti dobijeni iz fragmenta specifičnog za *R. solanacearum* su veličine 457 bp i 96 bp.

3. Protokol za multipleks PCR s unutrašnjom PCR kontrolom (Pastrik i sur., 2002)

3.1. Oligonukleotidno prajmeri

Uzvodni prajmer RS-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Nizvodni prajmer RS-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Uzvodni prajmer NS-5-F 5'-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3'

Nizvodni prajmer NS-6-R 5'-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3'

Očekivana dužina umnoženog proizvoda iz DNK bakterije *R. solanacearum* = 718 bp (par prajmera RS).

Očekivana dužina umnoženog proizvoda iz unutrašnje PCR kontrole 18S rRNA = 310 bp (par prajmera NS).

3.2. Reakciona smješa za PCR(reakcioni miks)

Reagens	Količina po reakciji	Konačna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	12,625 µl	
10X PCR pufer ⁽¹⁾ (15mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1%
d-NTP smješa (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Prajmer RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Prajmer RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Prajmer NS-5-F (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Prajmer NS-6-R (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Taq polimeraza (5U/ µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Zapremina uzorka	5,0 µl	
Ukupna zapremina	25,0 µl	

⁽¹⁾ Metoda je potvrđena Taq polimerazom Perkin Elmer (AmpliTaq ili Gold) i Gibco BRL

⁽²⁾ Koncentracije prajmer NS-5-F i NS-6-R su optimizovane za ekstrakciju konusa pupčanih djelova krtola krompira metodom homogenizacije i prečišćavanjem DNK prema Pastriku (2000) (Odjeljak VI.A.6.1.a). Ako se ekstrakcija obavlja trešenjem ili ako se primjenjuju druge metode izdvajanja DNK, potrebno je ponovo optimizovati koncentracije reagenasa.

3.3. Uslovi PCR reakcije

Izvesti sljedeći program:

1 ciklus od: (i) 5 minuta na 95 °C (denaturacija lanca DNK)

35 ciklusa od: (ii) 30 sekundi na 95 °C (denaturacija lanca DNK)

- 1 ciklus od:
- (iii) 30 sekundi na 58 °C (vezivanje prajmera)
 - (iv) 45 sekundi na 72 °C (produžavanje kopije - hibridizacija)
 - (v) 5 minuta na 72 °C (konačno produžavanje)
 - (vi) držanje na 4 °C

Napomena:

Optimalni uslovi korišćenja ovog programa su definisani za korišćenje na PCR MJ Research PTC 200 thermal cycler-y. Modifikacija trajanja koraka ciklusa (ii), (iii) i (iv) je možda potrebna u slučaju upotrebe drugih modela thermal cycler-a.

3.4. Analiza proizvoda umnožavanja restrikcionim enzimom

PCR proizvodi umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* ispoljavaju karakteristične polimorfizme dužine u dužini restrikcionih fragmenata sa enzimom Bsm I ili izoshizomerom (npr. Mva 1269 I) posle inkubacije od 30 minuta na 65 °C.

4. Protokol za specifičan PCR biovara (Pastrik i sar. 2001)

4.1. Oligonukleotidni prajmeri

Uzvodni prajmer Rs-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Nizvodni prajmer Rs-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Nizvodni prajmer Rs-3-R 5'-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3'

Očekivana dužina umnoženog proizvoda iz DNK bakterije *R. solanacearum*:

sa Rs-1-F/Rs-1-R = 718 bp

sa Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp

4.2. Reakciona smjesa za PCR (reakcioni miks)

(a) Specifični PCR za biovar 1/2

Reagens	Količina po reakciji	Konačna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	12,925 µl	
10X PCR pufer (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-NTP smjesa (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Prajmer Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Prajmer Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq polimeraza (5U/µl)(1)	0,2 µl	
Zapremina uzorka	5,0 µl	
Ukupna zapremina	25,0 µl	
(1) Metode su potvrđene Taq polimerazom Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL		

(b) Specifični PCR za biovar 3/4/5

Reagens	Količina po reakciji	Konačna Koncentracija
Sterilna ultra čista voda	14,925 µl	
10X PCR pufer ⁽¹⁾	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP smješa (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Prajmer Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Prajmer Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq polimeraza (5U/µl)	0,2 µl	1,0 U
Zapremina uzorka	5,0 µl	
Ukupna zapremina	25,0 µl	
⁽¹⁾ Metode su potvrđene Taq polimerazom Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL		

4.3. Uslovi za reakciju PCR.

Izvesti sljedeći program za specifične reakcije za biovar 1/2 i biovar 3/4/5:

- 1 ciklus od: (i) 5 minuta na 95 °C (denaturacija lanca DNK)
35 ciklusa od: (ii) 30 sekundi na 95 °C (denaturacija lanca DNK)
(iii) 30 sekundi na 58 °C (vezivanje prajmera)
(iv) 45 sekundi na 72 °C (produžavanje kopije- hibridizacija)
1 ciklus od: (v) 5 minuta na 72 °C (konačno produžavanje)
(vi) držati na 4 °C

Napomena:

Optimalni uslovi korišćenja ovog programa su definisani za korišćenje na PCR MJ Research PTC 200 thermal cycler-y. Modifikacija trajanja koraka ciklusa (ii), (iii) i (iv) je možda potrebna u slučaju upotrebe drugih modela thermal cycler-a.

4.4. Analiza proizvoda umnožavanja restrikcionim enzimom

PCR proizvodi umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* sa prajmerima Rs-1-F i Rs-1-R ispoljavaju karakteristične polimorfizme u dužini restrikcionih fragmenata sa enzimom Bsm I ili izoshizomerom (npr. Mva 1269 I) posle inkubacije od 30 minuta na 65 °C. PCR proizvodi umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* sa prajmerima Rs-1-F i RS-3-R nemaju mjesta restrikcije.

5. Priprema pufera za bojenje za elektroforezu

5.1. Bromfenol plavo (10%-tni koncentrovani rastvor)

Bromfenol plavo 5 g

Destilovana voda (bidestilovana) 50 ml

- 5.2. Pufer za bojenje
Glicerol (86 %) 3,5 ml
Bromfenol plavo (5,1) 300 µl
Destilovana voda (bidestilovana) 6,2 ml
6. 10x Tris-Acetatni i EDTA pufer (TAE), pH 8,0
Tris pufer 48,40 g
Glacijalna sirćetna kiselina 11,42 ml
EDTA (dinatrijumova so) 3,72 g
Destilovana voda 1,00 L
- Prije upotrebe razrijediti 1x.
Dostupan je i na tržištu (npr. Invitrogen ili ekvivalentni).

Dodatak 7 **Validni (potvrđeni i odobreni) reagensi za FISH test**

1. Oligo-probe

Specifična proba za *R. solanacearum* OLI-1-CY3 : 5'-ggc agg tag caa gct acc ccc-3'
Nespecifična eubakterijska proba EUB-338-FITC: 5'- gct gcc tcc cgt agg agt -3'

2. Rastvor za fiksiranje

(UPOZORENJE! RASTVOR ZA FIKSIRANJE SADRŽI PARAFORMALDEHID KOJI JE TOKSICAN. NOSITI RUKAVICE I NE UDISATI GA. PREPORUČUJE SE RAD U DIGESTORU.)

- i) Zagrijati 9 ml vode za molekularnu biologiju (npr. ultra čista voda) na oko 60 °C i dodati 0,4 g paraformaldehida. Paraformaldehid se rastvara nakon dodavanja 5 kapi 1N NaOH i mješanja na magnetskoj mješalici.
- ii) Podesiti pH na 7,0 dodajući 1 ml 0,1M fosfatnog pufera (PB; pH 7,0) i 5 kapi 1N HCl. Indikatorskim papirom provjeriti vrijednost pH i ako je potrebno podesiti je pomoću HCl ili NaOH. (UPOZORENJE! U RASTVORIMA SA PARAFORMALDEHIDOM NE UPOTREBLJAVATI pH-METAR.)
- iii) Profiltrirati rastvor kroz membranski filter od 0,22 µm i do dalje upotrebe čuvati na 4 °C i zaštititi od prašine.

3. 3X Hybmix

NaCl

2,7 M

Tris-HCl

60 mM (pH7,4)

EDTA (sterilizovana filtriranjem i u autoklavu) 15 mM

Po potrebi razrijediti do 1x.

4. Rastvor za hibridizaciju

1X Hybmix

Natrijev dodecil sulfat (SDS) 0,01 %

Formamid 30 %

Proba EUB 338 5 ng/µl

Proba OLI-1 ili OLI-2 5 ng/µl

Pripremiti količine rastvora za hibridizaciju prema proračunima u Tabeli 1. Za svako stakalce (sa 2 različita uzorka u duplikatu) treba 90 µl rastvora za hibridizaciju).

VAŽNO: FORMAMID JE VEOMA TOKSICAN I ZATO NOSITI RUKAVICE I PREDUZETI POTREBNE MJERE OPREZA!

Tabela 1. Predložene količine za pripremanje smjese za hibridizaciju

Broj stakalaca	1	4	6	8	10
Sterilna ultra čista voda	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3 x hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamid	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Proba EUB 338 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Proba OLI-1 ili OLI-2 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Ukupna zapremina (μl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0
Napomena: Sve rastvore koji sadrže oligo-probe osjetljive na svjetlost čuvati u mraku na - 20 °C. Zaštititi ih od direktne sunčeve svjetlosti ili električnog svjetla tokom upotrebe.					

5. 0,1M fosfatni pufer, pH 7,0

Na₂HPO₄ 8,52 g

KH₂PO₄ 5,44 g

Destilovana voda 1,00 L

Rastvoriti sastojke, provjeriti pH i sterilisati u autoklavu na 121 °C ,15 minuta.

Dodatak 8

Uslovi gajenja plavog patlidžana i paradajza

Sjeme paradajza (*Lycopersicon esculentum*) i plavog patlidžana (*Solanum melongena*) posijati u pasterizovani kompost za sjeme. Sejance presaditi u pasterizovani kompost u saksijama nakon što se kotiledoni u cijelini razviju (10 do 14 dana). Prije inokulacije, paradajza i plavog patlidžane treba gajiti u stakleniku pod sljedećim uslovima:

Dužina dana: 14 sati ili prirodna dužina dana, ako je duža od 14 sati;

Temperatura: dnevna 21 do 24 °C , noćna 14 do 18 °C.

Osjetljiva sorta paradajza » Moneymaker «.

Osjetljiva sorta plavog patlidžana » Black Beauty «.

LITERATURA

- 1) Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
- 2) Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Official Journal of the European Communities L235, 1-39.
- 3) Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology* 105; 373-380.
- 4) Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J. L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3634-3638.
- 5) Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1:113-121.
- 6) Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26; 663-678.
- 7) Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) *Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
- 8) Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27; 265-277.
- 9) Hayward, A.C, El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 69; 269-280.
- 10) Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and PCR technique. *J. Phytopathology* 146; 379-384.
- 11) Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18, 343-351.
- 12) Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14; 335-345.
- 13) Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44; 693-695.
- 14) Klement Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
- 15) Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.
- 16) Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne i sur., (eds). *Klewer Academic Publishers*. pp. 117-121.
- 17) Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295.
- 18) Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85; 528-536.
- 19) Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F Wang, T.-H Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5; 19-33.
- 20) Pastrok, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathology* 148; 619-626.
- 21) Pastrok, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. *European Journal of Plant Pathology* 108, 831-842.

- 22) Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67-79.
- 23) 23. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota: 373 pp.
- 24) Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1587-1594.
- 25) Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology* 61; 4262-4268.
- 26) Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42; 281-295.
- 27) Taghavi, M., Hayward, A.C, Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46; 10-15.
- 28) Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigalet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) *Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects*. Springer (Berlin) pp. 44-49.
- 29) Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative fluorescent 5' nuclease TaqMan assay. *Applied and Environmental Microbiology* 66; 2853-2858.
- Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse and A.D.L. Akkermans. 1998. Detection of *R. solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23s rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4546-4554.

MJERE KOJE SE SPROVODE U SIGURNOSNOJ ZONI

1. Mjere na mjestima proizvodnje koja su označena kao zaražena:

1.1 Na parceli ili u zaštićenom prostoru namijenjenom proizvodnji bilja koji je označen kao zaražen:

1.1.1 tokom najmanje četiri uzgojne godine, nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza:

- obavezno je uklanjanje samoniklih biljaka krompira i paradajza, kao i drugih samoniklih biljaka domaćina štetnog organizma, uključujući korove iz porodice *Solanaceae* i
- zabranjena je:
 - sadnja krtola ili biljaka krompira, kao i sjetva sjemena u botaničkom smislu;
 - sadnja biljaka i sjetva sjemena paradajza;
 - uzimajući u obzir biologiju štetnog organizma;
 - sadnja drugih biljaka domaćina;
 - sadnja onih biljnih vrsta iz roda *Brassica* za koje je utvrđeno da omogućavaju preživljavanje štetnog organizma;
 - sadnja biljaka za koje je utvrđeno da omogućavaju širenje štetnog organizma;
- a) u prvoj sezoni proizvodnje krompira ili paradajza koja slijedi nakon perioda iz podtačke 1.1.1, pod uslovom da na parceli najmanje dvije uzastopne uzgojne godine prije sadnje tokom sprovođenja sistematskog istraživanja nijesu nađene samonikle biljke krompira i paradajza, kao ni druge biljke domaćini, uključujući korove iz porodice *Solanaceae*:
 - u slučaju proizvodnje krompira, dopušta se proizvodnja isključivo merkantilnog krompira;
 - proizvedene krtole krompira ili biljke paradajza, kada je to potrebno, testiraju se u skladu sa propisanim postupcima;
- b) u sezoni proizvodnje krompira ili paradajza koja slijedi nakon one iz podtačke a), uz odgovarajući plodored, koji mora biti najmanje dvogodišnji ako se želi proizvoditi sjemenski krompir, sprovodi se sistematskog istraživanja u skladu sa članom 3 ovog pravilnika ili

1.1.2 tokom najmanje pet uzgojnih godina nakon godine kada je utvrđena zaraza:

- sprovode se mjere uklanjanja samoniklih biljaka krompira i paradajza, kao i drugih biljaka domaćina štetnog organizma, uključujući korove iz porodice *Solanaceae* i
- parcela se prve tri godine održava na ugaru ili kao trajni pašnjak sa intenzivnom ispašom ili čestom niskom košnjom ili se siju žitarice, zavisno od procjene rizika od štetnog organizma, ili se koristi za proizvodnju sjemenskih trava; u sljedeće dvije uzastopne godine dopuštena je proizvodnja biljaka koje nijesu domaćini štetnog organizma i za koje je poznato da ne omogućavaju preživljavanje ili širenje štetnog organizma.

U prvoj sezoni proizvodnje krompira ili paradajza, koja slijedi nakon perioda iz podtačke 1.1.2., pod uslovom da tokom sprovođenja sistematskog istraživanja u najmanje dvije uzastopne uzgojne godine prije sadnje na parceli nijesu nađene samonikle biljke krompira i paradajza, kao ni drugih biljaka domaćina, uključujući korove iz porodice *Solanaceae*:

- u slučaju proizvodnje krompira, dopušta se proizvodnja sjemenskog i merkantilnog krompira;
- proizvedene krtole krompira ili biljke paradajza kada je to potrebno, testiraju se u skladu sa propisanim postupcima.

1.2 Na svim ostalim parcelama unutar zaraženog mjesta proizvodnje, pod uslovom da je fitosanitarni inspektor utvrdio da je otklonjena opasnost od samoniklih biljaka krompira i paradajza, kao i drugih biljaka domaćina štetnog organizma, uključujući korove iz porodice *Solanaceae*:

1.2.1 u uzgojnoj godini koja slijedi nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza:

- zabranjuje se sadnja krtola ili biljaka krompira i sjetva sjemena krompira u botaničkom smislu, kao i sjetva ili sadnja drugih biljaka domaćina štetnog organizma; ili
- u slučaju proizvodnje krompira, dopušta se sadnja sertifikovanog sjemenskog krompira namijenjenog isključivo proizvodnji merkantilnog krompira; ili

- u slučaju proizvodnje paradajza, dopušta se sadnja biljaka paradajza uzgajanih iz sjemena koje ispunjava zahtjeve iz Pravilnika o fitosanitarnim mjerama za sprječavanje unošenja i širenja i mjerama suzbijanja štetnih organizama sa listama štetnih organizama bilja, biljnih proizvoda i objekata pod nadzorom, isključivo za proizvodnju plodova;

1.2.2 u drugoj uzgojnoj godini koja slijedi nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza:

- u slučaju proizvodnje krompira, dopušta se sadnja samo sertifikovanog sjemenskog krompira ili sjemenskog krompira za koji je službenim testiranjem potvrđeno da nije zaražen štetnim organizmom i da je proizveden pod stručnim nadzorom na mjestima proizvodnje koja nisu označena kao zaražena, za sjemensku ili merkantilnu proizvodnju,

- u slučaju proizvodnje paradajza, dopušta se sadnja samo onih biljaka paradajza koje su uzgajane iz sjemena koje ispunjava zahtjeve iz Pravilnika o fitosanitarnim mjerama za sprječavanje unošenja i širenja i mjerama suzbijanja štetnih organizama sa listama štetnih organizama bilja, biljnih proizvoda i objekata pod nadzorom, ili iz biljaka dobijenih vegetativnim razmnožavanjem biljaka paradajza proizvedenih iz takvog sjemena i uzgajanih pod stručnim nadzorom na mjestima proizvodnje koja nijesu označena kao zaražena, za proizvodnju rasada ili plodova;

1.2.3 najmanje još u trećoj uzgojnoj godini koja slijedi nakon utvrđene zaraze:

- u slučaju proizvodnje krompira, dopušta se sadnja samo sertifikovanog sjemenskog krompira ili sjemenskog krompira proizvedenog pod stručnim nadzorom iz sertifikovanog sjemenskog krompira, za sjemensku ili merkantilnu proizvodnju;
- u slučaju proizvodnje paradajza, dopušta se sadnja samo onih biljaka paradajza koje su uzgajane iz sjemena koje ispunjava zahtjeve iz Pravilnika o fitosanitarnim mjerama za sprječavanje unošenja i širenja i mjerama suzbijanja štetnih organizama sa listama štetnih organizama bilja, biljnih proizvoda i objekata pod nadzorom, ili iz biljaka paradajza uzgajanih pod stručnim nadzorom iz takvih biljaka, za proizvodnju rasada ili plodova;

1.2.4 u svakoj uzgojnoj godini iz podtački 1.2.1, 1.2.2 i 1.2.3 preduzimaju se mjere uklanjanja samoniklih biljaka krompira i drugih biljaka domaćina štetnog organizma ako su prisutni, i sprovodi se službeni pregled usjeva tokom uzgoja u odgovarajućim vremenskim periodima, svih parcela na kojima se uzgaja krompir; proizveden krompir sa svake parcele mora biti testiran u skladu sa propisanim postupcima.

1.3 Odmah nakon utvrđivanja zaraze štetnim organizmom i nakon prve sledeće uzgojne godine:

- svi uređaji, oprema i skladišni prostori na mjestu proizvodnje koji su se koristili u proizvodnji krompira ili paradajza moraju se očistiti i, kada je to potrebno, dezinfikovati u skladu sa članom 18 ovog pravilnika;
- fitosanitarni inspektor nadzire sprovođenje programa navodnjavanja i prskanja, kojeg može zabraniti, kada je to potrebno, radi sprječavanja širenja štetnog organizma.

1.4 U zaštićenom prostoru namijenjenom proizvodnji bilja koji je označen kao zaražen, gdje je moguća potpuna zamjena supstrata za uzgoj:

- zabranjuje se sadnja krtola ili biljaka krompira i sjetva sjemena krompira u botaničkom smislu, kao i sjetva ili sadnja drugih biljaka domaćina štetnog organizma, uključujući biljke i sjeme paradajza, sve dok se u tom zaštićenom prostoru, pod nadzorom fitosanitarnog inspektora, ne sprovedu mjere uništavanja štetnog organizma i uklone sve biljke domaćini i njihovi dijelovi, pri čemu se, kao minimalna mjera, obavezno sprovodi potpuna zamjena supstrata za uzgoj, kao i čišćenje i dezinfekcija tog zaštićenog prostora i cjelokupne opreme, i sve dok fitosanitarni inspektor nakon sprovođenja tih mjera ne odobri proizvodnju krompira i paradajza;
- dopušta se proizvodnja krompira iz sertifikovanog sjemenskog krompira proizvedenog pod stručnim nadzorom ili mini-krtola ili mikro-biljaka dobijenih iz kulture biljnog tkiva koje potiču iz testiranih izvora;
- dopušta se proizvodnja paradajza iz sjemena koje ispunjava zahtjeve iz Pravilnika o fitosanitarnim mjerama za sprječavanje unošenja i širenja i mjerama suzbijanja štetnih organizama sa listama štetnih organizama bilja, biljnih proizvoda i objekata pod nadzorom ili iz biljaka dobijenih vegetativnim razmnožavanjem biljaka paradajza uzgajanih iz takvog sjemena pod stručnim nadzorom;
- fitosanitarni inspektor nadzire sprovođenje programa navodnjavanja i prskanja, kojeg može zabraniti, kada je to potrebno, radi sprječavanja širenja štetnog organizma.

2. Mjere u čitavoj sigurnosnoj zoni (uključujući i mjere na mjestima proizvodnje koja su označena kao zaražena):

2.1 Odmah nakon utvrđivanja zaraze fitosanitarni inspektor naređuje, prema potrebi, čišćenje i dezinfekciju svih uređaja, opreme i skladišnih prostora na posjedima koji su se koristili u proizvodnji krompira ili paradajza primjenom odgovarajućih postupaka, kao što je navedeno u članu 18 ovog pravilnika.

2.2 Fitosanitarni inspektor odmah i tokom najmanje tri uzgojne godine koje slijede iza one u kojoj je utvrđena zaraza:

2.2.1 u sigurnosnoj zoni određenoj u skladu sa članom 12 ovog pravilnika:

- nadzire posjede na kojima se uzgajaju, skladište, nalaze ili dorađuju krtole krompira ili paradajza, uključujući i posjede na kojima se koriste isti uređaji za obavljanje radnji u vezi sa nabrojenim djelatnostima;
- naređuje sadnju samo sertifikovanog sjemenskog krompira ili sjemenskog krompira proizvedenog pod stručnim nadzorom unutar cijele sigurnosne zone i testiranje sjemenskog krompira nakon vađenja, proizvedenog na mjestima proizvodnje koja se smatraju vjerovatno zaraženim, u skladu sa članom 11 ovog pravilnika;
- naređuje da se na svim posjedima unutar tog područja sa proizvedenim sjemenskim krompirom postupa odvojeno od merkantilnog krompira, ili da se obavi čišćenje i prema potrebi, dezinfekcija između postupanja sa sjemenskim i merkantilnim krompirom;
- naređuje sadnju samo onih biljaka paradajza uzgajanih iz sjemena koje ispunjavaju zahtjeve iz Pravilnika o fitosanitarnim mjerama za sprječavanje unošenja i širenja i mjerama suzbijanja štetnih organizama sa listama štetnih organizama bilja, biljnih proizvoda i objekata pod nadzorom, ili iz biljaka dobijenih vegetativnim razmnožavanjem biljaka paradajza proizvedenih iz takvog sjemena i uzgajanih pod stručnim nadzorom, u svim usjevima paradajza unutar sigurnosne zone;
- sprovodi sistematsko istraživanje iz člana 3 ovog pravilnika;

2.2.2 za površinsku vodu koja je bila označena kao zaražena u skladu sa članom 14 stav 1 alineja 2 ovog pravilnika ili predstavlja jedan od činilaca, iz člana 12 stav 2 alineja 3 i člana 14 stav 2 ovog pravilnika, koji utiču na moguće širenje štetnog organizma:

- obavlja sistematsko istraživanje iz člana 3 ovog pravilnika u skladu s godišnjim programom u odgovarajućim vremenskim razdobljima, kao i uzima uzorke površinske vode i, kada je to potrebno, biljaka domaćina štetnog organizma iz porodice *Solanaceae*, iz odgovarajućih izvora vode, radi testiranja. Testiranje glavnih biljaka domaćina i svih drugih uzetih uzoraka mora biti sprovedeno saglasno propisanim postupcima;
- nadzire sprovođenje programa navodnjavanja i prskanja, i može zabraniti upotrebu vode koja je označena kao zaražena za navodnjavanje i prskanje glavnih biljaka domaćina i, gdje je potrebno, drugih biljaka domaćina radi sprječavanja širenja štetnog organizma. Fitosanitarni inspektor može opozvati tu zabranu, ako je na osnovu rezultata sprovedenog sistematskog istraživanja iz člana 3 ovog pravilnika u skladu sa godišnjim programom utvrdio da površinska voda više nije zaražena. Korišćenje vode za navodnjavanje i prskanje biljaka domaćina čija je upotreba zabranjena može se dopustiti pod službenim nadzorom, primjenom službeno odobrenih postupaka kojima se odstranjuje štetni organizam i sprječava njegovo širenje;
- u slučaju kada je tečni otpad zaražen, odlaganje čvrstog ili tečnog otpada koji nastaje pri industrijskoj preradi ili pakovanju glavnih biljaka domaćina obavlja se pod nadzorom fitosanitarnog inspektora.

2.3 Fitosanitarna uprava, u slučaju potrebe, može narediti zamjenu svih zaliha sjemenskog krompira u odgovarajućem vremenskom periodu.