

На основу члана 43. став 2. Закона о здрављу биља („Службени гласник РС”, број 41/09),

Министар пољопривреде, шумарства и водопривреде доноси

ПРАВИЛНИК

**о мерама откривања, спречавања ширења и сузбијања
штетног организма *Ralstonia***

***solanacearum*(Smith) Yabuuchi et al. проузроковача мрке
трулежи кртола**

**кромпира и бактеријског увенућа кромпира и парадајза,
начину одређивања**

**граница зараженог, угроженог и подручја без штетног
организма, условима за**

**окончање наложених мера, као и начину обавештавања о
предузетим мерама и**

престанак мера

“Службени гласник РС, број 107 од 23. децембра 2009.

I. УВОДНА ОДРЕДБА

Члан 1.

Овим правилником прописују се мере откривања, спречавања ширења и сузбијања штетног организма *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., проузроковача мрке трулежи кртола кромпира и бактеријског увенућа кромпира и парадајза (у даљем тексту: штетни организам), начин одређивања граница зараженог, угроженог и подручја без штетног организма, услови за окончање наложених мера, као и начин обавештавања о предузетим мерама и престанак мера.

II. МЕРЕ ОТКРИВАЊА ШТЕТНОГ ОРГАНИЗМА

Прегледи ради откривања штетног организма

Члан 2.

Ради откривања појаве штетног организма спроводе се прегледи биљака и кртола кромпира (*Solanum tuberosum* L.) и прегледи биљака парадајза (*Lycopersicon lycopersicum*(L.) Karsten ex Farw), осим семена и плодова парадајза (у даљем тексту: главне биљке домаћини), као и прегледи прописаних објеката.

Ради откривања других могућих извора заразе који могу угрозити производњу главних биљака домаћина, врши се процена опасности од ширења штетног организма (анализа ризика). Ако се анализом ризика утврди опасност од ширења штетног организма у производним подручјима главних биљака домаћина спроводе се мере откривања штетног организма, и то преглед:

1) на другим биљкама домаћинима, укључујући самоникле биљке из фамилије *Соланацеае*;

2) површинских вода које се користе за наводњавање или прскање главних биљака домаћина;

3) течног отпада који настаје у индустријској преради или у погонима за паковање главних биљака домаћина и користи се за наводњавање или прскање главних биљака домаћина;

4) супстрата који се користи за раст биљака, земљишта и чврстих отпадака који настају у индустријској преради или у погонима за паковање главних биљака домаћина.

Начин вршења прегледа и лабораторијских испитивања

Члан 3.

При визуелном прегледу биљака кромпира у пољу, у одговарајућем временском периоду у току вегетације, врши се преглед на присуство штетног организма, узимају се узорци биљака кромпира и достављају овлашћеној лабораторији (у даљем тексту: лабораторија), ради лабораторијског испитивања.

При визуелном прегледу кртола кромпира из лотова у складиштима и дистрибутивним центрима, врши се преглед кртола семенског кромпира и кромпира који није намењен садњи (у даљем тексту: меркантилни кромпир), као и визуелни преглед кртола које су сечене чији узорци се достављају лабораторији, ради лабораторијског испитивања. Семенски кромпир мора да потиче од материјала који испуњава услове у погледу здравствене исправности и за који је лабораторијским испитивањем утврђено да није заражен штетним организмом.

При визуелном прегледу парадајза у одговарајућем временском периоду током вегетације врши се преглед расада на присуство штетног организма који је намењен тржишној производњи.

Када се прегледи врше на другим биљкама домаћинима, у површинским водама, укључујући течни отпад и у осталом материјалу, посебно супстратима, земљишту и чврстим отпаcima индустријских постројења за прераду и паковање, узимају се узорци и достављају лабораторији, ради лабораторијског испитивања.

Лабораторијско испитивање из ст. 1, 2. и 4. овог члана спроводи се на начин описан у Прилогу– Шема тестирања за дијагностику, детекцију и идентификацију проузроковача мрке трулежи кртола кромпира и бактеријског увенућа кромпира и парадајза (у даљем тексту: Прилог), који је одштампан уз овај правилник и чини његов саставни део.

Сумња на појаву штетног организма

Члан 4.

Сумња на појаву штетног организма постоји ако су визуелним прегледом уочени типични симптоми болести или је резултат једног од брзих тестова провере (screening тест) позитиван.

Да би се потврдила или отклонила сумња на појаву штетног организма, спроводе се даља лабораторијска испитивања, на начин описан у Прилогу.

При лабораторијском испитивању, на одговарајући начин чувају се узорковане кртоле и када је то могуће узорковане биљке, преостали екстракт и додатно припремљен материјал за брзе тестове провере (screening тест), нпр. стакалца за имунофлуоресценцију и пратећа документација.

Сачувани узорак кртоле обезбеђује тестирање сортности, када је то потребно.

Ако је лабораторијским испитивањем потврђено присуство штетног организма, на одговарајући начин чува се материјал из става 3. овога члана, узорак вештачки заражених тест биљака парадајза и патлиџана, као и изолована култура штетног организма најмање месец дана од дана потврђене заразе.

Спровођење мера у случају сумње на појаву штетног организма

Члан 5.

У случају сумње на појаву штетног организма, поред мера из чл. 2. и 3. овог правилника, спроводе се следеће мере:

1) забрана премештања биљака парадајза, као и биљака и кртола кромпира из свих усева, лотова или пошиљака из којих су узети узорци;

2) предузимање потребних радњи ради откривања извора заразе штетним организмом;

3) додатне превентивне мере ради спречавања ширења штетног организма, у зависности од процењеног степена ризика.

Мере из става 1. тачка 3) овог члана примењују се нарочито у случају производње главних биљака домаћина и премештања свих осталих кртола или биљака повезаних са сумњивом појавом, унутар и ван објеката, ограничавање употребе потенцијално контаминираних машина и опреме.

Обавештавање у случају сумње на појаву штетног организма

Члан 6.

У случају сумње на заразу штетним организмом, када постоји опасност од преношења заразе са главних биљака домаћина или површинским водама у другу државу, Министарство о томе обавештава службено тело надлежно за заштиту биља те државе и међународну организацију, у складу са међународним конвенцијама и споразумима обавезујућим за Републику Србију.

III. НАЧИН ОДРЕЂИВАЊА ГРАНИЦА ЗАРАЖЕНОГ, УГРОЖЕНОГ И ПОДРУЧЈА БЕЗ ШТЕТНОГ

ОРГАНИЗМА, КАО И МЕРЕ СПРЕЧАВАЊА ШИРЕЊА И СУЗБИЈАЊА ШТЕТНОГ ОРГАНИЗМА

1. Начин одређивања граница зараженог, угроженог и подручја без штетног организма

Одређивање граница

Члан 7.

Када се на основу резултата лабораторијских испитивања, спроведених на начин описан у Прилогу, потврди присуство штетног организма, границе зараженог, угроженог или подручја без штетног организма, одређују се тако што се:

- 1) утврђује обим једног или више примарних извора заразе;
- 2) означавају као заражене главне биљке домаћини, пошиљке или лотови из којих је узет узорак, машине, опрема, превозна средства, складишта или њихови делови, и сви други објекти и предмети, укључујући материјал за паковање, који су били у контакту са главним биљкама домаћинима који су означени као заражени, места производње, поља, заштићене просторе намењене производњи биља, било да је узорак узет у току вегетације или након вађења или бербе главних биљака домаћина;
- 3) одређује обим могуће заразе на основу података о свим контактима у производном процесу са извором заразе (пре и после вађења или скупљања биљака);
- 4) разграничава заражено, угрожено и подручје без штетног организма, и то на основу означене и потврђене заразе, обима могуће заразе, као и могућег ширења штетног организма.

Обим примарних извора заразе главних биљака домаћина

Члан 8.

Обим примарних извора заразе главних биљака домаћина из члана 7. тачка 1) овог правилника утврђује се у зависности од:

- 1) места производње, на којем се:

– производи или је био произведен кромпир, који је клонски сродан са кромпиром на којем је потврђена зараза штетним организмом,

– производи или је био произведен парадајз, који потиче из истог извора као и парадајз на коме је потврђена зараза штетним организмом,

– производе или су били произведени кромпир или парадајз, који су под надзором фитосанитарног инспектора због сумње на заразу штетним организмом,

– производи или је био произведен кромпир који је клонски сродан с кромпиром произведеним на месту производње где је потврђена зараза штетним организмом,

– производе кромпир или парадајз, а која се налазе у близини заражених места производње укључујући и она места производње на којима се користе иста опрема за производњу и објекти,

– користе површинске воде за наводњавање или прскање из извора за који се сумња на заразу или је потврђена да је заражен штетним организмом,

– користе површинске воде за наводњавање или прскање из истог извора који се користи и на местима производње на којима је потврђена зараза или постоји сумња на заразу штетним организмом,

– производе главне биљке домаћини, а која су поплавлена или су била поплавлена површинским водама у којима је потврђена зараза или постоји сумња на заразу штетним организмом;

2) површинских вода које се користе за наводњавање, прскање или су поплавиле поља или места производње на којима је потврђена зараза штетним организмом.

При утврђивању обима примарних извора заразе главних биљака домаћина спроводи се лабораторијско испитивање свих партија семенског кромпира који је клонски сродан са зараженим кромпиром, на начин описан у Прилогу.

Обим могуће заразе главних биљака домаћина

Члан 9.

Обим могуће заразе из члана 7. тачка 3) овог правилника одређује на основу података о:

1) главним биљкама домаћинима гајених на месту производње које је означено као заражено;

2) другим местима производње која су у било каквој вези са производњом главних биљака домаћина које су означене као заражене, као и заједнички коришћене опреме и објеката;

3) главним биљкама домаћинима произведеним на местима производње из тачке 2) овог става или су се налазиле на тим местима производње истовремено са главним биљкама домаћинима које су означене као заражене или су се налазиле на местима производње која су означена као заражена;

4) простору и објектима на којима се налазе или дорађују главне биљке домаћини које потичу са места производње из тач. 1) до 3) овог става;

5) машинама, превозним средствима, складиштима или њиховим деловима и другим прописаним објектима или предметима, укључујући и материјал за паковање, који су могли да дођу у контакт са главним биљкама домаћинима које су означене као заражене;

6) главним биљкама домаћинима које су биле ускладиштене или у додиру са неким од прописаних објеката или предметима из тачке 5) овог става пре њиховог чишћења и дезинфекције;

7) биљкама парадајза које потичу из истих извора као и парадајз који је означен као заражен, односно кртола или биљака кромпира које су клонски повезане са кртолама, односно биљкама кромпира које су означене као заражене и који се, и ако су резултати лабораторијских испитивања негативни, сматрају могуће зараженим због клонске сродности са кромпиром означеним као зараженим. Када је потребно, може да се спроведе и тест сортности да би се проверио идентитет заражених и клонски сродних кртола или биљака кромпира,

8) местима производње главних биљака домаћина наведених у тачки 7) овога става;

9) местима производње главних биљака домаћина на којима се за наводњавање или прскање употребљава вода која је означена као заражена;

10) главним биљкама домаћинима произведеним на пољима која су била поплављена површинском водом за коју је утврђено да је заражена штетним организмом.

Обим могућег ширења штетног организма

Члан 10.

Обим могућег ширења штетног организма из члана 7. тачка 4) овог правилника, одређује се на основу података о:

1) близини других места производње главних биљака домаћина;

2) заједничкој производњи и заједничкој употреби залиха семенског кромпира;

3) месту производње на којем се употребљава површинска вода за наводњавање или прскање главних биљака домаћина, на којима постоји или је постојала могућност површинског дотицања воде са

места производње која су означена као заражена или могућност поплављивања водом са места производње која су означена као заражена.

*Одређивање граница зараженог, угроженог и подручја
без штетног организма у случају заразе других биљака
домаћина*

Члан 11.

Када се на основу резултата лабораторијских испитивања, спроведених на начин описан у Прилогу, потврди присуство штетног организма у усеву других биљака домаћина у подручјима где је угрожена производња главних биљака домаћина одређују се границе зараженог, угроженог и подручја без штетног организма, тако што се:

- 1) утврђује обим примарних извора заразе главних биљака домаћина, у складу са чланом 8. овог правилника;
- 2) означавају као заражене биљке домаћини из којих је узет узорак;
- 3) одређује обим могуће заразе и разграничава заражено и угрожено подручје у складу са чл.9. и 10. овог правилника.

*Одређивање граница зараженог, угроженог и подручја без
штетног организма у случају заразе површинских вода*

Члан 12.

Када се на основу резултата лабораторијских испитивања, спроведених на начин описан у Прилогу, потврди присуство штетног организма у површинској води (укључујући и течни отпад који настаје у индустријској преради главних биљака домаћина или у погонима за њихово паковање) или у самониклим биљкама из фамилије *Соланацеае* које у њој расту, а производња главних биљака домаћина је угрожена због коришћења те воде за наводњавање, прскање или због поплављивања, одређују се границе зараженог, угроженог и подручја без штетног организма, тако што се:

- 1) означава као заражена површинска вода из које је узет узорак;
- 2) одређује обим могуће заразе и разграничава посебно регулисано подручје на основу означене заразе и могуће ширење штетног организма.

Обим могућег ширења штетног организма у површинској води из става 1. тачка 2) овог члана одређује се на основу података о:

- 1) близини места производње главних биљака домаћина која су угрожена поплављивањем или се граниче са површинском водом која је означена као заражена;

2) сваком засебном подручју наводњавања које је у вези с површинском водом која је означена као заражена;

3) воденим токовима повезаним са површинском водом која је означена као заражена, узимајући у обзир смер и брзину тока воде означене као заражене и присутност самониклих биљака домаћина из фамилије *Соланацеае*.

2. Мере спречавања ширења и сузбијања штетног организма

Мере спречавања ширења и сузбијања штетног организма на главним биљкама домаћинима које су означене као заражене

Члан 13.

Главне биљке домаћини које су означене као заражене не смеју се користити за садњу.

Када су главне биљке домаћини из става 1. овог члана означене као заражене, спроводе се следеће мере:

1) уништавање,односно спаљивање, или

2) одлагање на службено одобрено место за одлагање отпада, за које је утврђено да не постоји опасност од ширења штетног организма, или

3) употребљавање тих биљака као хране за животиње након одговарајуће топлотне обраде, која не оставља никакву могућност преживљавања штетног организма, или

4) коришћење тих биљака за индустријску прераду, под условом да се директно допреме до места прераде које има опрему за одлагање отпада, чиме је отклоњена опасност од ширења штетног организма и ако је обезбеђено чишћење и дезинфекција превозних средстава која напуштају место прераде, или

5) друге мере,под условом да нема опасности од ширења штетног организма.

Мере спречавања ширења и сузбијања штетног организма на главним биљкама домаћинима које се сматрају могуће зараженим

Члан 14.

Главне биљке домаћини које се сматрају могуће зараженим штетним организмом, главне биљке домаћини гајене на местима производње која се сматрају могуће зараженима, као и кртоле или биљке кромпира које су клонски повезане са онима које су означене као заражене без обзира на резултате лабораторијских испитивања не смеју се користити за садњу.

Кртоле кромпира из става 1. овог члана, могу се:

1) употребити као меркантилни кромпир намењен за исхрану, који се мора паковати на местима са одговарајућом опремом за одлагање отпада, и који је спреман за непосредну доставу и употребу без накнадног препакивања. Са семенским кромпиром дозвољено је да се рукује на тим истим местима само ако се ради одвојено или након чишћења и дезинфекције;

2) употребити као меркантилни кромпир намењен индустријској преради, под условом да се директно допреме до места прераде које има опрему за одлагање отпада, чиме је отклоњена опасност од ширења штетног организма, и ако је обезбеђено чишћење и дезинфекција превозних средстава која напуштају место прераде;

3) употребити или одложити на други одобрени начин, под условом да нема опасности од ширења штетног организма.

Остали делови главних биљака домаћина, укључујући и остатке стабљика и лишћа, могу се уништити или употребити или одложити на други одобрени начин, под условом да нема опасности од ширења штетног организма.

Мере поступања са отпадом ради спречавања ширења и сузбијања штетног организма

Члан 15.

Ради спречавања ширења штетног организма отпадом који је настао као резултат спровођења мера из чл. 13. и 14. овог правилника и отпада који настаје током руковања, одстрањивања и прераде заражених партија, спроводе се следеће мере:

1) отпаци кромпира и парадајза (укључујући одбачени кромпир, кору и парадајз) и сви други чврсти отпаци који су у вези са кромпиром и парадајзом (укључујући земљу, камење и друге остатке), морају да се:

– одлажу на службено одобреном месту, на којем не постоји опасност од неконтролисаног ширења штетног организма у околину (нпр. испирањем кроз поре земље до пољопривредног земљишта или дотицајем са водом која би могла да се употреби за наводњавање пољопривредног земљишта). Отпаци се превозе директно до одређеног места, у затвореном превозном средству, тако да не постоји опасност од губитка отпада,

– спаљују,

– одстране применом других мера за које је утврђено да не постоји опасност од ширења штетног организма;

2) течни отпад настао у преради који садржи чврсте честице, пре уклањања се филтрира или обрађује поступком седиментације ради одстрањивања чврстих честица, које се након тога уклањају на начин из тачке 1) овог става.

Течни део отпада из става 1. тачка 2) овог члана третира се на следећи начин:

1) пре одстрањивања загрева се на температури од најмање 60° C у трајању најмање 30 минута, или

2) се одстрањује на начин који онемогућава да отпаци дођу на било који начин у додир са пољопривредним земљиштем или водом која се може употребити за наводњавање пољопривредног земљишта.

Мере чишћења и дезинфекције

Члан 16.

Машине, превозна средства, складишта и њихови делови, други објекти и предмети, укључујући и материјал за паковање, који су означени као заражени или се сматрају могуће зараженим морају да се очисте и дезинфикују применом одговарајућих поступака за чишћење и дезинфекцију којима се отклања опасност од ширења штетног организма.

У случају када материјал за паковање из става 1. овог члана није могуће очистити и дезинфиковати тако да се отклони опасност од ширења штетног организма налаже се његово уништавање.

Мере спречавања ширења и сузбијања штетног организма на пољу

Члан 17.

На пољу намењеном за производњу главних биљака домаћина, које је означено као заражено за време од најмање четири вегетационе године после године у којој је утврђена зараза налаже се спровођење следећих мера:

1) уклањање самониклих биљака кромпира и парадајза, као и других самониклих биљака домаћина штетног организма, укључујући корове из породице *Соланацеае*;

2) забрана садње кртола или биљака кромпира, као и сетве семена кромпира у ботаничком смислу, садње биљака парадајза и сетве семена парадајза, садње или сетве других биљака домаћина, садње или сетве биљних врста из рода Брассица за које је утврђено да омогућавају преживљавање штетног организма и садње или сетве биљака за које је утврђено да омогућавају ширење штетног организма.

У првој сезони производње кромпира или парадајза која следи после периода из става 1. овог члана, под условом да на пољу најмање две последње вегетационе године током спровођења прегледа нису пронађене самоникле биљке кромпира и парадајза, као и друге биљке домаћини, укључујући корове из породице *Соланацеае*, у случају производње кромпира, допушта се производња искључиво

меркантилног кромпира и спроводи лабораторијско испитивање кртола приликом вађења.

У сезони производње кромпира или парадајза која следи после сезоне из става 2. овог члана, дозволиће се, уз одговарајући плодород, који мора бити најмање двогодишњи за производњу семенског кромпира, производња семенског или меркантилног кромпира, као и биљака парадајза, уз спровођење прегледа.

У току пет вегетационих година после године у којој је зараза утврђена, спроводе се следеће мере:

1) уклањање самониклих биљака кромпира и парадајза као и других биљака домаћина штетног организма, укључујући корове из фамилије *Solanaceae*;

2) у прве три године, одржавање поља на угару или као трајни пашњак са интензивном испашом или честом ниском кошњом или се сеју житарице или се користи за производњу семенских трава. У следеће две узастопне године допуштена је производња биљака које нису домаћини штетног организма и за које је познато да не омогућавају преживљавање или ширење штетног организма.

После спровођења мера из става 1. тачка 2) овог члана, у следећој вегетационој години дозволиће се производња семенског или меркантилног кромпира или парадајза, уз лабораторијско испитивање извађених биљака и кртола, ако на пољу које је означено као заражено у току спровођења прегледа нису пронађене самоникле биљке кромпира и парадајза, као и других биљака домаћина, укључујући корове из фамилије *Соланацеае*, најмање две узастопне вегетационе године.

Мере спречавања ширења и сузбијања штетног организма на пољима унутар места производње које је означено као заражено

Члан 18.

На осталим пољима унутар места производње које је означено као заражено у вегетационој години која следи после године у којој је утврђена зараза, под условом да је утврђено да је отклоњена опасност од самониклих биљака кромпира и парадајза, као и других биљака домаћина штетног организма, укључујући корове из фамилије *Соланацеае*, забрањује се садња кртола и биљака кромпира, сетва семена кромпира у ботаничком смислу, као и сетва и садња других биљака домаћина штетног организма.

Ако је пре садње утврђено да је отклоњена опасност од самониклих биљака домаћина штетног организма, може се дозволити садња сертифициваног семенског кромпира намењеног искључиво производњи меркантилног кромпира, односно садња биљака парадајза произведених из семена које испуњава услове у погледу здравствене исправности. Током вегетације мора се спроводити

надзор, као и лабораторијско испитивање, извађених биљака и кртола на присуство штетног организма на начин описан у Прилогу.

У другој и трећој вегетационој години која следи после године у којој је зараза утврђена, после спровођења мера из ст. 1. и 2. овог члана, дозвољава се садња искључиво сертификованог семенског кромпира за семенску или меркантилну производњу, односно садња само оних биљака парадајза које су произведене из семена које испуњава услове у погледу здравствене исправности, или из биљака добијених вегетативним размножавањем биљака парадајза произведених из таквог семена и произведених под стручним надзором на местима производње која нису означена као заражена, за производњу расада или плодова.

Поред мера из ст. 1, 2. и 3. овог члана на осталим пољима унутар места производње које је означено као заражено најмање три вегетационе године спроводи се уклањање самониклих биљака главног домаћина и других биљака домаћина штетног организма и преглед усева током производње, у одговарајућим временским периодима, свих поља на којима се гаји кромпир као и лабораторијско испитивање извађених биљака и кртола са сваког поља.

Мере чишћења и дезинфекције на местима производње која су означена као заражена

Члан 19.

На местима производње која су означена као заражена после утврђивања заразе штетним организмом, произвођач мора очистити и дезинфиковати, све машине, опрему и складишне просторе који су коришћени за производњу кромпира или парадајза, како у првој години када је дозвољена производња кромпира и парадајза, тако и у свакој наредној производној години.

Када је то потребно ради спречавања ширења штетног организма на местима производње која су означена као заражена може се забранити наводњавање и прскање.

Мере спречавања ширења и сузбијања штетног организма у заштићеном простору

Члан 20.

У заштићеном простору које је означено као заражено, а намењено ја за производњу биља, није дозвољена садња кртола или биљака кромпира и сетва семена кромпира у ботаничком смислу, као ни сетва и садња других биљака домаћина штетног организма, укључујући и биљке и семе парадајза, све док се у том заштићеном простору, не спроведу мере уништавања штетног организма и не уклоне све биљке домаћини и њихови делови, при чему се, као минимална мера, обвезно спроводи потпуна замена супстрата за

гајење, као и чишћење и дезинфекција тог заштићеног простора и целокупне опреме.

После спровођења мера из става 1. овог члана може се одобрити производња кромпира и парадајза, и то:

1) производња кромпира из сертифициваног семенског кромпира произведеног под стручним надзором или мини-кртола или микро-биљака добијених из културе биљног ткива које потичу из тестираних извора;

2) производња парадајза из семена које испуњава услове у погледу здравствене исправности или из биљака добијених вегетативним размножавањем биљака парадајза произведених из таквог семена под стручним надзором.

Када је то потребно ради спречавања ширења штетног организма на местима производње која су означена као заражена може се забранити наводњавање и прскање.

IV. УСЛОВИ ЗА ОКОНЧАЊЕ НАЛОЖЕНИХ МЕРА

Члан 21.

Ради праћења здравственог стања главних биљака домаћина, биљних производа и прописаних објеката у посебно регулисаном подручју и обезбеђивања услова за престанак наложених мера у току најмање три вегетационе године које следе после оне у којој је зараза утврђена:

1) врши се надзор места на којима се производе, складиште, налазе или дорађују кртоле кромпира или биљке парадајза, укључујући и парцеле (површине) са којих потичу и на којима су се користили исти уређаји;

2) врши се садња унутар зараженог и угроженог подручја искључиво сертифициваног семенског кромпира и обавезно испитивање после вађења семенског кромпира који је произведен на могуће зараженим местима производње;

3) на свим производним површинама унутар зараженог и угроженог подручја са произведеним семенским кромпиром поступа се одвојено од меркантилног кромпира или се врши чишћење и дезинфекција између поступања са семенским и меркантилним кромпиром;

4) врши се садња само оних биљака парадајза произведених из семена које испуњава услове у погледу здравствене исправности или из биљака добијених вегетативним размножавањем биљака парадајза произведених из таквог семена и гајених под стручним надзором, у свим усевима парадајза унутар зараженог и угроженог подручја;

5) обављају се прегледи из чл. 2. и 3. овог правилника.

Ради праћења површинских вода које су биле означене као заражене у зараженом и угроженом подручју и обезбеђивања услова за престанак наложених мера у току најмање три вегетационе године које следе после године у којој је зараза утврђена:

1) обављају се прегледи у одговарајућем временском периоду и узимају узорци површинске воде, а када је то потребно, узорци биљака домаћина штетног организма из фамилије *Соланацеае* из те воде, ради лабораторијског испитивања;

2) врши се надзор при спровођењу наводњавања и прскања главних биљака домаћина.

Ако је на основу резултата лабораторијског испитивања узорака утврђено да вода која је била означена као заражена више није заражена може се дозволити њена употреба за наводњавање и прскање.

V. НАЧИН ОБАВЕШТАВАЊА О ПРЕДУЗЕТИМ МЕРАМА И ПРЕСТАНАК МЕРА

Члан 22.

Подаци и информације о потврђеној зарази, као и подаци и информације о престанку мера, достављају се другим државама и међународним организацијама, у складу са међународним конвенцијама и споразумима обавезујућим за Републику Србију.

Министарство ће доставити службеном телу надлежном за заштиту биља државе у којој постоји опасност од ширења заразе следеће податке:

- 1) назив сорте кромпира или парадајза и партије;
- 2) намену (меркантилни или семенски), и када је могуће, категорију семенског кромпира;
- 3) назив и адресу пошиљаоца и примаоца;
- 4) датум доспећа партије кромпира или парадајза;
- 5) величину испоручене партије кромпира или парадајза;
- 6) копију фитоцертификата.

VI. ЗАВРШНА ОДРЕДБА

Члан 23.

Овај правилник ступа на снагу осмог дана од дана објављивања у „Службеном гласнику Републике Србије”.

Број 110-00-267/2009-09

У Београду, 3. децембра 2009. године

Министар,

ПРИЛОГ

ШЕМА ТЕСТИРАЊА ЗА ДИЈАГНОСТИКУ,
ДЕТЕКЦИЈУ И ИДЕНТИФИКАЦИЈУ
ПРОУЗРОКОВАЧА МРКЕ ТРУЛЕЖИ КРТОЛА
КРОМПИРА И БАКТЕРИЈСКОГ УВЕНУЋА
КРОМПИРА И ПАРАДАЈЗА

Поглавље I.

ОБЛАСТ ПРИМЕНЕ ШЕМЕ ТЕСТИРАЊА

Приказана шема тестирања описује различите поступке укључене у:

1) дијагнозу проузроковача мрке трулежи кромпира и бактеријског увенућа кромпира, парадајза и других биљака домаћина;

2) детекцију *Ralstonia solanacearum* у узорцима кртола кромпира, биљака кромпира, парадајза и других биљака домаћина, у води и у земљишту;

3) идентификацију *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

Поглавље II.

ОПШТА НАЧЕЛА

У поглављима IX–XVI овог прилога се налазе стандардни протоколи за поједине методе, потврђени и одобрени реагенси и појединости везане за припрему материјала за тестирање и референтног материјала. У Поглављу IX овог прилога се налази списак лабораторија укључених у процес оптимизације и валидације протокола.

С обзиром да протоколи укључују методе детекције карантинског организма, што подразумева и употребу живих референтних култура *R. solanacearum*, процедура се мора изводити у прописаним карантинским условима са одговарајућим објектима за одлагање, чување и уништавање отпада у складу са условима које прописује институција одговорна за карантинске прописе.

Параметри тестирања морају обезбедити уједначене и поновљиве нивое детекције *R. solanacearum* према прописаним праговима осетљивости појединих метода.

Обавезна је прецизна припрема позитивних контрола.

Тестирање у складу са захтеваним прагом осетљивости подразумева правилно постављање, одржавање и калибрирање опреме, пажљиво руковање и чување реагенса као и предузимање мера за спречавање контаминације између узорака, нпр. раздавање позитивних контрола од узорака за тестирање. Како би се избегле административне или друге грешке, морају се примењивати стандардни контроле квалитета, посебно при означавању узорака и вођењу документације.

Сумња на присуство патогена у узорку подразумева позитиван резултат теста провере узорка, као што је приказано у дијаграмима тока.

Позитиван резултат добијен у првом извршеном тесту провере (IF тест, PCR/FISH, селективна изолација) се мора потврдити и другим тестом провере који се базира на другом биолошком начелу.

Ако је резултат првог теста провере (IF или PCR/FISH) позитиван, тада се сумња на присуство *R. solanacearum* и потребно је применити и други тест провере. Ако је резултат и другог теста позитиван, тада је сумња потврђена и тестирање се наставља према описаној шеми. Ако је резултат другог теста негативан, тада се сматра да *R. solanacearum* није присутна у узорку. Позитиван резултат IF теста се дефинише као позитивно очитавање IF теста потврђено и другим тестом провере (PCR/FISH).

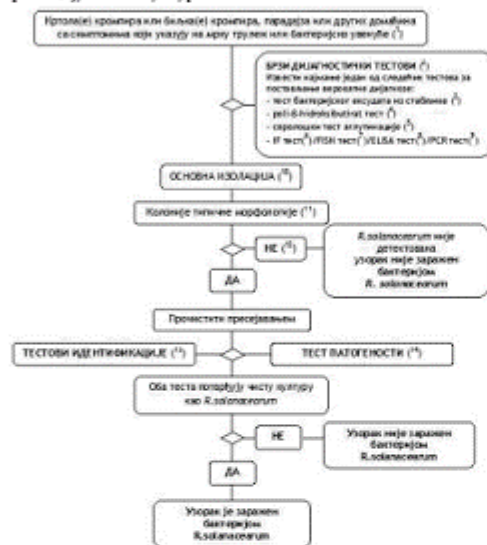
Потврђено присуство патогена подразумева изолацију и идентификацију чисте културе *R. solanacearum* и потврду патогености.

Поглавље III

1. Приказ дијаграма тока

1.1. Шема утврђивања присуства проузроковача мрке трулежи кртола и бактеријског уснућа (*Ralstonia solanacearum*) у кртолама и биљкама кромпира, парадајза или другим биљкама домаћинима са симптомима мрке трулежи или бактеријског уснућа (Шема 1)

Поступак тестирања се примењује за кртоле и биљке кромпира, парадајза или друге биљке домаћине са типичним симптомима или симптомима који упућују на присуство проузроковача мрке трулежи. Поступак укључује тест провере, изолацију патогена из зараженог спроводног ткива на хранљиву подлогу и у случају позитивног резултата идентификацију чисте културе *R. solanacearum*.



Шема 1.

(1) Опис симптома наведен је у Поглављу IV, овог прилога.

(2) Брзи дијагностички тестови олакшавају постављање дијагнозе, али нису неопходни. Негативан резултат не гарантује увек одсуство патогена.

(3) Тестирање присуства патогена у бактеријском екседату из спроводног ткива стабљике описан је у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.1, овог прилога.

(4) Тест за откривање гранула поли-β-хидроксибутирата у бактеријским ћелијама описан је у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.2, овог прилога.

(5) Серолошки тестови аглутинације на бактеријском екседату или екстракту из ткива са симптомима описани су у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.3, овог прилога.

(6) IF тест на суспензији бактеријског екседата у води или на екстракту из ткива са симптомима описан је у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.5, овог прилога.

(7) FISH тест на суспензији бактеријског екседата у води или на екстракту из ткива са симптомима описан је у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.7, овог прилога.

(8) ELISA тест на суспензији бактеријског екседата у води или на екстракту из ткива са симптомима описан је у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.8, овог прилога.

(9) PCR тест на суспензији бактеријског екседата у води или на екстракту из ткива са симптомима описан је у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.6, овог прилога.

(10) Патоген се обично може лако изоловати из биљног материјала са симптомима методом разређења и изолације на хранљиву подлогу (Поглавље IV, тачка 1, подтачка 1.3, овог прилога).

(11) Опис типичне морфологије колоније наведен је у Поглављу IV, тачка 1, подтачка 1.3, овог прилога.

(12) Гајење бактеријске културе може бити неуспешно у напредном стадијуму инфекције због конкуренције или претераног развоја сапрофитних бактерија. Ако су симптоми болести типични, а тест изолације негативан, тест изолације се мора поновити, најбоље на селективној хранљивој подлози.

(13) Поуздана идентификација чистих култура изолата бактерије *R. solanacearum* постиже се извођењем тестова описаних у Поглављу VIII, тачка 2, овог прилога.

(14) Тест патогености описан је у Поглављу VIII, тачка 3, овог прилога.

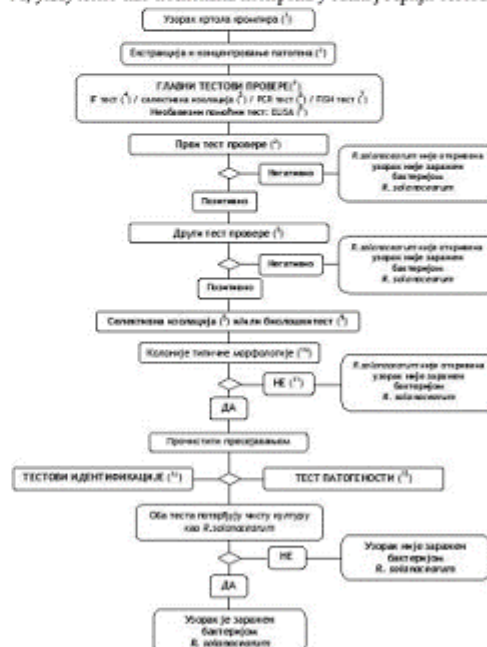
1.2. Шема за утврђивање присуства и идентификацију *R. solanacearum* у узорцима кртола кромпира без видљивих симптома (Шема 2)

Начело:

Поступак тестирања намењен је за откривање присуства скривене заразе у кртолама кромпира.

Позитиван резултат најмање два теста провере, који се базирају на различитим биолошким начелима, допуњује се изолацијом патогена, после чега, у случају изолације типичних колонија, следи потврда чисте културе *R. solanacearum*. Позитиван резултат само једног од тестова провере није довољан да би се узорак сматрао вероватно зараженим.

Тестови провере и изолација морају омогућити ниво осетљивости детекције 103 до 104 ћелија/ml ресуспендованог талога, укљученог као позитивна контрола у свакој серији тестова.



Шема 2.

(1) Стандардна величина узорка је 200 кртола; ако на располагању нема 200 кртола, поступак се може спровести и на мањим узорцима.

(2) Методе екстракције и концентровања патогена описане су у Поглављу V тачка 1, овог прилога.

(3) Ако су резултати најмање два теста, који се темеље на различитим биолошким начелима, позитивни, потребно је извршити изолацију и потврдити присуство патогена. Извршити бар један тест провере. Када је резултат теста негативан, сматра се да је узорак негативан. У случају да је резултат тог теста позитиван, потребно је извршити други или више тестова провере, који се темеље на различитим биолошким начелима, како би се потврдио позитиван резултат. Ако су резултати осталих тестова негативни, сматра се да је тај узорак негативан. Даље тестирање није потребно.

(4) Тест имунофлуоресценције (IF) је описан у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.5. овог прилога.

(5) Селективна изолација је описана у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.4. овог прилога.

(6) PCR тест је описан у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.6. овог прилога.

(7) FISH тест је описан у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.7. овог прилога.

(8) ELISA тестови су описани у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.8. овог прилога.

(9) Биолошки тест је описан у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.9. овог прилога.

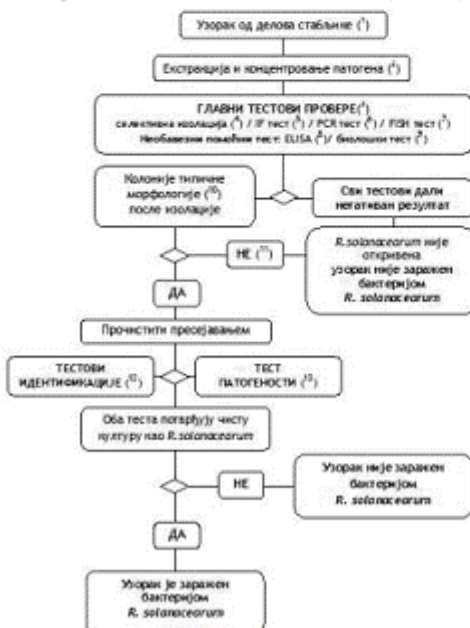
(10) Типична морфологија колоније описана је у Поглављу IV, тачка 1, подтачка 1.3. овог прилога.

(11) Гајење бактеријске културе или биолошки тест могу бити неуспешни због компетиције или инхибиције сапрофитним бактеријама. Ако се у тестовима провере добију јасно позитивни резултати, а резултати изолације су негативни, поновити тестове изолације из истог ресуспендираног талога или поновити узимање спроводног ткива на месту везивања столона код кртола из истог узорака и, ако је потребно, тестирати додатне узорке.

(12) Поуздана идентификација чистих култура *R. solanacearum* постиже се извођењем тестова описаних у Поглављу VIII, тачка 2. овог прилога.

(13) Тест патогености описан је у Поглављу VIII, тачка 3. овог прилога.

1.3. Шема за уједињавање присуства и идентификацију *R. solanacearum* у узорцима билака кромпира, парадајза или других билака домаћиница без симптома (Шема 3)



Шема 3.

(1) За препоручене величине узорака видети Поглавље V, тачка 2, подтачка 2.1. овог прилога.

(2) Екстракција патогена и методе концентрација описане су у Поглављу V, тачка 2, подтачка 2.1. овог прилога.

(3) Ако су резултати најмање два теста, који се темеље на различитим биолошким начелима, позитивни, потребно је извршити изолацију и потврду присуства патогена. Извршити бар један тест провере. Када је резултат теста негативан, сматра се да је узорак негативан. У случају да је резултат тог теста позитиван, потребно је извршити други или више тестова провере, који се темеље на различитим биолошким начелима, како би се потврдио позитиван резултат. Ако су резултати осталих тестова негативни, сматра се да је тај узорак негативан. Даље тестирање није потребно.

(4) Селективна изолација описана је Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.4. овог прилога.

(5) IF тест описан је у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.5. овог прилога.

(6) PCR тестови описани су у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.6. овог прилога.

(7) FISH тест описан је у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.7. овог прилога.

(8) ELISA тест описан је у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.8. овог прилога.

(9) Биолошки тест описан је у Поглављу VIII, тачка 1, подтачка 1.9. овог прилога.

(10) Типична морфологија колоније описана је у Поглављу IV, тачка 1, подтачка 1.3. овог прилога.

(11) Гајење бактеријске културе или биолошки тест могу бити неуспешни због компетиције или инхибиције сапрофитним бактеријама. Ако се у тестовима провере добију јасно позитивни резултати, а резултати изолације су негативни, поновити тестове изолације из истог ресуспендираног талога или поновити узимање спроводног ткива на месту везивања столона код кртола из истог узорака и, ако је потребно, тестирати додатне узорке.

(12) Поуздана идентификација чистих култура *R. solanacearum* постиже се извођењем тестова описаних у Поглављу VIII, тачка 2. овог прилога.

(13) Тест патогености описан је у Поглављу VIII, тачка 3. овог прилога.

Поглавље IV.

ДЕТЕКЦИЈА БАКТЕРИЈЕ *R. SOLANACEARUM* У КРТОЛАМА И БИЉКАМА КРОМПИРА, ПАРАДАЈЗА И ДРУГИМ БИЉКАМА ДОМАЋИНИМА

I. Детаљне методе за детекцију *R. solanacearum* у кртолама и билима кромпира, парадајза или другим биљкама домаћиница са симптомима мрке трулежи и бактеријског увенућа

1.1. Симптоми ([видети web сајраницу http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main))

1.1.1. Симптоми на кромпиру

Билка кромпира. Почетна фаза инфекције у пољу препознаје се по увенућу лишћа при врху биљке на високим температурама током дана, али које се опорављају током ноћи. У раним фазама увенућа лишће остаје зелено али касније почиње да жути и развија се смеђа некроза. Такође, долази и до појаве епинестије. Убрзо долази до неповратног увенућа изданка или целе биљке што резултира пропадањем и одумирањем биљке. Попречни пресек спроводног ткива увенуле стабљике обично је смеђе боје, а из пресека места се лако може испелити млечни бактеријски ексулат. Кад се пресечено место стабљике стави усправно у воду, из спроводних судова истиче бактеријски ексулат.

Кртола кромпира. Кртоле кромпира треба пререзати попречно или уздужно у близини пупка кртола. Почетна фаза инфекције препознаје се по промени боје спроводног

прстена од стакласто-жуте до светлосмеђе из којег се спонтано, након неколико минута, појављује бели кремасти бактеријски ексудат. Касније, спроводно ткиво постаје изразито смеђе и некроза се може проширити на паренхимско ткиво. У узнапредовалим фазама инфекције бактеријски ексудат може цурети и из пупчаног дела и из окова и на њу се лепе честичке земље. На pokožици кртоле могу се појавити црвенкасто-смеђа улегнућа због пропадана спроводног ткива изнутра. У узнапредовалим фазама болести уобичајен је и секундарни развој меке трулежи коју проузрокују гљиве и бактерије.

1.1.2. Симптоми на парадајзу

Билка парадајза. Први видљиви симптом је увеност најмлађих листова. У условима који су повољни за патогена (температура земљишта око 25°C; zasiћеност влагом) у року од неколико дана долази до епифитије и увенућа само једне стране или целе билке што доводи до потпуног пропадана билке. У мање повољним условима (температура земљишта мања од 21°C) увенуће се ређе појављује, али се на стабљичи може развити велики број адвентивног корена. Могуће је уочити пруге које изгледају као наплатене водом и протежу се дуж стабљике, од њене базе, а доказ су некротирана спроводног ткива. Ако се стабљика пресеке унакрсно, из спроводног ткива чија је боја променена у смеђу, цури бели или жућкасти бактеријски ексудат.

1.1.3. Симптоми на другим биљкама домаћинима

Билке *Solanum dulcamara* и *S. nigrum*. Код ових биљака домаћина се, у природним условима ретко уочавају симптоми увенућа, осим ако температура земљишта прелази 25°C или ако је ивице инокулума изузетно висок (нпр. *S. nigrum* који расте близу оболеле билке кромпира или парадајза). Ако дође до увенућа, симптоми су исти као и код парадајза. Билке *S. dulcamara* расту са стабљикама и кореном у води и на њима није видљиво увенуће, али је на попречном пресеку основе стабљике или деловима стабљике који су под водом видљива светлосмеђа обојеност спроводног ткива. Уколико пресечену стабљичку усправно ставимо у воду, из спроводног ткива на месту пресека може цурити бактеријски ексудат, чак и ако нема симптома увенућа.

1.2. Брзи тестови провере

Брзи тестови провере олакшавају, али нису пресудни у постављању почетне дијагнозе. Применити један или више следећих одобрених тестова:

1.2.1. Тест бактеријског ексудата из стабљике (Поглавље VIII, тачка 1. подтачка 1.1. овог прилога).

1.2.2. Детекција гранула poli-β-hidroksibutirata (PHB). Карактеристичне грануле PHB-а у ћелијама *R. solanacearum* постају видљиве при бојењу термички фиксираним размазом бактеријског ексудата из зараженог ткива на микроскопској плочици Нилском плавом бојом А и Суданском црном бојом Б (Поглавље VIII, тачка 1. подтачка 1.2. овог прилога).

1.2.3. Серолошки тестови аглутинације (Поглавље VIII, тачка 1. подтачка 1.3. овог прилога).

1.2.4. Остали тестови. У остале одговарајуће брзе тестове провере спадају IF тест, FISH тест, ELISA тестови и PCR тестови.

1.3. Поступак изолације

У мањој количини стерилне дестиловане воде или 50 mM фосфатног пуфера направити суспензију бактеријског ексудата или делова ткива променене боје из спроводног прстена кртола кромпира или из спроводних судова стабљика кромпира, парадајза или других биљака домаћина са симптомима увенућа и оставити 5 до 10 минута.

Припремити низ децималних разређања суспензије.

Пренети 50-100 µl суспензије и разређања на општу хранљиву подлогу (NA, YPGA или SPA; и/или на Келманову тетразолиум-подлогу и/или на одобрену селективну подлогу

гу (нпр. SMSA; видети Поглавље X. овог прилога). Суспензију и/или разређење размазати по подлози примењујући одговарајућу технику наношења разређања на подлогу. Уколико је потребно, наношењем разређања суспензије колонија на одвојеним подлогама припремити позитивну контролу *R. solanacearum* биљар 2.

Инкубирати подлоге од два до шест дана на 28°C.

На општој хранљивој подлози вирулентни изолати бактерије *R. solanacearum* стварају пљоснате, неправилне и течне колоније бисерне кремасто-беле боје, често са карактеристичним спиралама у средини. Невирulentни облици бактерије *R. solanacearum* стварају мале, округле, не-флуидне колоније, путерасте конзистенције и кремасто-беле боје.

На Келмановој тетразолиум-подлози и на SMSA подлози спирале су криво црвене боје. Невирulentни облици бактерије *R. solanacearum* стварају мале, округле, не-флуидне колоније, путерасте конзистенције које су целе и тамно црвене боје.

1.4. Тестови за идентификацију бактерије *R. solanacearum*

Тестови за потврду идентитета изолата за које се сматра да су изолати *R. solanacearum* наведени су Поглавље VIII, тачка 2. овог прилога.

Поглавље V.

МЕТОДЕ ЗА ДЕТЕКЦИЈУ И ИДЕНТИФИКАЦИЈУ БАКТЕРИЈЕ *R. SOLANACEARUM* У УЗОРЦИМА КРТОЛА КРОМПИРА БЕЗ СИМПТОМА

1. Детаљне методе за детекцију и идентификацију бактерије *R. solanacearum* у узорцима кртола кромпира без симптома

1.1. Припрема узорка

Стандардна величина узорка је 200 кртола по тесту. Интензивније узорковање захтева извођење већег броја тестова на узорцима те величине. Већи број кртола у узорку доводи до инхибиције или ће отежати тумачење резултата. Међутим, поступак се може применити и за узорке са мање од 200 кртола, када је на располагању мање кртола.

Валидација свих метода за утврђивање присуства патогена, које су описане у даљем тексту, базира се на тестирању узорка од 200 кртола.

Екстракт кромпира који је описан у даљем тексту може се користити и за утврђивање присуства проузроковача прстенасте трулежи кромпира, бактерије *Clavibacter michiganensis subsp. sepe-donicus*.

Процедура која претходи припреми узорка (опциона): Инкубирати узорак на на 25-30 °C у периоду до две недеље пре извођења тестова, како би се изазвало умножавање популација бактерија *R. solanacearum*.

Опрати кртоле. Употребити одговарајућа дезинфекциона средства (при коришћењу PCR теста употребити једињена хлора ради уклањања евентуално присутне ДНК патогена) и детергенте између сваког узорка. Осушити кртоле на ваздуху. Поступак прања је посебно користан (али не обавезан) за случајеве обраде узорка са већом количином земље, при извођењу PCR теста или процедуре директне изолације.

Чистим и дезинфикованим скалпелом или ножем за поврће уклонити pokožину са пупчаног дела кртоле тако да се виде спроводни судови. Пажљиво изрезати мали конусни део спроводног ткива на пупчаном делу захватајући што мање околног, неспроводног ткива (видети web страницу: <http://forum.europanet.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Све кртоле са потенцијално сумњивим симптомима мрке трулежи одвојити посебно и тестирати.

Ако се приликом вађења конуса из пупчаног дела уоче потенцијални симптоми мрке трулежи, кртоле треба изузетно прегледати. Сваку пресечену кртолу са оваквим симптомима треба оставити два дана на собној температури, а

потом чувати у карантинским условима (на 4 до 10 °C) до спровођења тестирања. Све кртоле у узорку (укључујући и оне са сумњивим симптомима) треба чувати у складу с одговарајућим одредбама Правилника.

Извађене конусе из пупчаног дела кртоле који садрже делове спороводног ткива ставити у стерилне посуде које се могу запечатити и/или херметички затворити (ако су посуде већ употребљаване, морају се темељито очистити и дезинфиковати употребом средстава на бази једињења хлора). Узорке је пожељно одмах обрадити. Ако то није могуће, чувати их у посуди без додатка пуфера, најдуже 72 сата у фрижидеру или најдуже 24 сата на собној температури. Током чувања долази до сушења и суберизације сличног дела конуса, као и до раста и развоја сапрофита, што може ометати утврђивање присуства бактерије проузроковача прстенасте трулежи.

Извађене конусе из пупчаног дела кртоле обрадити коришћењем једног од следећих поступака:

- извађене конусе прекрити довољном количином (око 40 ml) екстракционог пуфера и ултрацентрифугирати на 50 до 100 обртаја/мин, четири сата на температури испод 24 °C или 16 до 24 сата уз хлађење,

или

- извађене конусе хомогенизовати са довољном количином (око 40 ml) екстракционог пуфера било у мешалници (нпр. Waring или Ultra Thux) било дробљењем у затвореној кеси за мацерацију за једнократну употребу (нпр. кесе Stomacher или Bioreba од чврстог полиетена, 150 mm x 250 mm, стерилизоване зрачењем) користећи гумени чекић или одговарајући апарат за мацерацију (нпр. Homex).

Ако се узорци хомогенизују у блендеру, постоји велика опасност од њихове унакрсне контаминације. Предузети мере опреза у циљу спречавања настајања аеросола или просипања током екстракције. За сваки узорак употребити стерилизоване њжиће и посуде. Током процедуре PCR-а, спречити пренос ДНК на контејнере или апаратуру за мацерацију. За PCR тест препоручује се мацерација узорака у кесицама за једнократну употребу и даље коришћење епрувета и туба за једнократну употребу.

Одлити супернатант. Ако је превисше мутан, раздистрићи га ултрацентрифугирањем на мањем броју обртаја (највише 180 g/10 минута на температури од 4 до 10 °C) или вакуумском филтрацијом (40 до 100 μm) током које се филтер додатно испира екстракционим пуфером (око 10 ml).

Извршити концентрисање фракције бактерије центрифугирањем на 7000 g 15 минута (или 10000 g 10 минута) на температури од 4 до 10 °C, после чега се пажљиво, без мешања са талогом одлива супернатант.

Ресуспендовати талог у 1,5 ml пуфера (пуфера за растварање талоба). Од ове количине користити 500 μl за тестирање на присуство *Ralstonia solanacearum*, 500 μl за тестирање на присуство *C. m. subsp. sepedonicus* и 500 μl као референтни материјал за чување. У последњи, референтни део од 500 μl додати стерилни глицерол у коначној концентрацији од 10 до 25 % (v/v), промешати и чувати на температури од -16 до -24 °C (недељама) или на -68 до -86 °C (месецима). Делове одвојене за утврђивање присуства бактерије, током тестирања чувати на температури од 4 до 10 °C. Не препоручује се вишеструко замрзавање и одмрзавање. У случају потребе за транспортом узорака, исти до- ставити у преносивом фрижидеру у року од 24 до 48 сати.

Важно је да се све позитивне контроле *Ralstonia solanacearum* и узорци држе одвојено да би се избегла контаминација. Ово се односи и на IF плочице и друге тестове.

1.2. Тестирање

Видети дијаграм и опис тестова и оптимизоване протоколе у одговарајућим додацима.

Селективна изолација (Поглавље VIII, тачка 1, подтачка 1.4, овог прилога).

IF тест (Поглавље VIII, тачка 1, подтачка 1.5, овог прилога).

PCR тестови (Поглавље VIII, тачка 1, подтачка 1.6, овог прилога).

FISH тест (Поглавље VIII, тачка 1, подтачка 1.7, овог прилога).

ELISA тестови (Поглавље VIII, тачка 1, подтачка 1.8, овог прилога).

Биолошки тест (Поглавље VIII, тачка 1, подтачка 1.9, овог прилога).

2. Методе за детекцију и идентификацију бактерије *R. solanacearum* у узорцима биљака кромпира, парадајза или других биљака домаћина без симптома

2.1. Припрема узорака

За откривање латентних популација *R. solanacearum* препоручује се тестирање збирних узорака. Поступак се може погоднио применити на збирне узорке са највише 200 делова стабљике (узимање узорака током спровођења надзора се мора базирати на статистички репрезентативном узорку испитиване биљне популације).

Чистим дезинфикованим ножем или маказама за резидбу одрезати 1 до 2 cm доњег дела сваке стабљике, одмах изнад површине земљишта. Делове стабљике дезинфиковати кратким потапањем у 70% етанол и одмах осушити упијајућим папиром.

Ставити делове стабљике у затворену стерилну посуду. Расад парадајза из расадника: чистим дезинфикованим ножем одсећи део величине 1 cm од доњег дела стабљике, непосредно изнад површине земље.

Биљке парадајза из поља или стакленика чистим, дезинфикованим ножем одсећи најнижи бочни изданак на свакој биљци и то непосредно изнад споја са стабљиком. Са сваког бочног изданка одсећи доњи део величине 1 cm.

Са осталих биљака домаћина чистим, дезинфикованим ножем или баштенским маказама одсећи део величине 1 cm са доњег дела стабљике, непосредно изнад нивоа земље. Ако се узоркује *S. dulcamara* или друге биљке домаћина које расту у јоли, одсеците део величине 1-2 cm са подводног дела стабљике или столона са воденим кореном.

При узорковању на одређеној локацији, препоручује се тестирање статистички репрезентативног узорака од најмање десет биљака по месту узорковања за сваку врсту самониклог биља која је потенцијални домаћин. Детекција патогена најпоузданија је крајем пролећа и током лета и јесени, иако се природне инфекције могу открити током целе године код вишегодишње биљке *Solanum dulcamara* која расте у јодотоконима. Познати домаћини су самоникле биљке кромпира (кртоле остале у земљишту), *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* и други врсте породице *Solanaceae*. Остале биљке домаћини су *Pelargonium spp.* и *Portulaca oleracea*. Европске врсте самониклог биља које у специфичним условима средине могу бити потенцијални домаћини популација *R. solanacearum* биовар 2 / раса 3 у корену и/или ризосфери су *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa spp.*, *Rumex spp.*, *Silene alba*, *S. nutans*, *Tussilago farfara* и *Urtica dioica*.

У овој се фази може обавити визуелни преглед биљака (обојеност спороводног система или појава бактеријског екссудата). Одвојити све делове стабљика са симптомима и тестирати их посебно.

Кратко дезинфикује делове стабљика 70%-тним етанолом и одмах осушите упијајућим папиром. Делове стабљика затим обрадите једним од следећих поступака:

- делове стабљике прекрити довољном количином (приближно 40 ml) екстракционог пуфера и ултрацентрифугирати на 50 до 100 обртаја/мин четири сата на температури испод 24 °C или 16 до 24 сата уз хлађење,

или

- делове стабљике измацерирати у чврстој кеси за мацерацију (нпр. Stomacher или Bioreba) са одговарајућом количином екстракционог пуфера користећи гумени чекић или одговарајућу опрему за мацерацију (нпр. Homex). Ако то није могуће, делове стабљике чувати у фрижидеру најдуже 72 сата или на собној температури најдуже 24 сата.

После 15 минута таложења, одлити супернатант. Даље избистравање екстракта или концентровање фракције бактерија обично није потребно, али се може постићи филтрирањем и/или центрифугирањем како је описано у тачки 1. овог поглавља.

Поделили чисти или концентровани екстракт узорка на два једнака дела. Једну половину чувати на температури од 4 до 10°C током тестирања, а другу половину оставити за случај употребе у додатним тестирањима: у екстракт се додаје 10-25% (w/v) стерилног глицерола и чува на температури од -16 до -24 °C (недељама) или на -68 до -86 °C (месецима).

2.2. Тестирање

Видети дијаграм и опис тестова и оптимизоване протоколе у одговарајућим додацима:

Селективна изолација (Поглавље VIII, тачка 1. подтачка 1.4. овог прилога).

IF тест (Поглавље VIII, тачка 1. подтачка 1.5. овог прилога).

PCR тестови (Поглавље VIII, тачка 1. подтачка 1.6. овог прилога).

FISH тест (Поглавље VIII, тачка 1. подтачка 1.7. овог прилога).

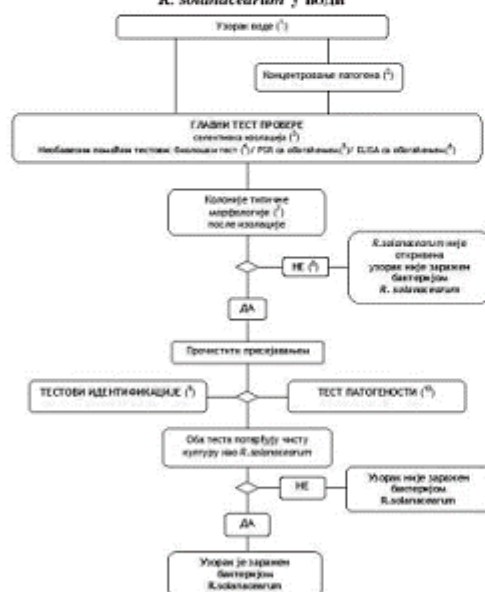
ELISA тестови (Поглавље VIII, тачка 1. подтачка 1.8. овог прилога).

Биолошки тест (Поглавље VIII, тачка 1. подтачка 1.9. овог прилога).

Поглавље VI.

ДЕТЕКЦИЈА И ИДЕНТИФИКАЦИЈА У ВОДИ

1. Шема за детекцију и идентификацију бактерије *R. solanacearum* у води



Шема 4.

(1) За препоручене поступке узорковања видети тачку 2. подтачка 2.1. овог поглавља.

(2) Методе концентрисања патогена описане су у тачки 2. подтачка 2.1. овог поглавља. Овај поступак се препоручује само ако неће довести до инхибиције изолације, јер се концентрисањем повећавају популације и патогена и конкурентних сапрофитних бактерија.

(3) Селективна изолација описана је у Поглављу VIII, тачка 1. подтачка 1.4. овог прилога.

(4) Биолошко тестирање је описано у Поглављу VIII, тачка 1. подтачка 1.9. овог прилога.

(5) Методе обогаћивања за PCR тест описане су у Поглављу VIII, тачка 1. подтачка 1.4. и Поглављу VIII, тачка 1. подтачка 1.6. овог прилога.

(6) Методе обогаћивања за ELISA тест описане су у Поглављу VIII, тачка 1. подтачка 1.4. и Поглављу VIII, тачка 1. подтачка 1.8. овог прилога.

(7) Типична морфологија колоније описана је у Поглављу IV, тачка 1. подтачка 1.3. овог прилога.

(8) Гајење бактеријске културе може бити неуспешно због конкуренције или инхибиције сапрофитних бактерија. Ако се сумња да ће велике популације сапрофитних бактерија утицати на поузданост изолације, поновити изолацију после разређивања узорка у стерилној води.

(9) Поуздана идентификација чистих култура *R. solanacearum* постиже се извођењем тестова описаних у Поглављу VIII, тачка 2. овог прилога.

(10) Тест патогености описан је Поглављу VIII, тачка 3. овог прилога.

Идентификациона шема описана у овом поглављу се може применити за детекцију патогена у узорцима површинске (текуће воде), као и у узорцима индустријских (отпадних) вода. Ипак, важно је нагласити да ће осетљивост детекције варирати у зависности од субстрата. На осетљивост теста изолације утичу популације конкурентних сапрофитних бактерија, чија је бројност најчешће много већа у случају индустријских (отпадних) вода него у случају површинских (текућих) вода. Иако се поштовањем и реализовањем поменутих идентификационих шема очекује детекција популације бактерије концентрације 10^3 б/литру површинске (текуће) воде, очекује се да је осетљивост детекције много нижа код индустријске (отпадне) воде. Из овог разлога се препоручује да се популација ове бактерије утирђује у узорку отпадне воде тек после процеса прочишћавања (нпр. седиментација или филтрација), током којег се редукује број бактерија сапрофитне популације. Ово ограничавање осетљивости метода треба узети у обзир када се проценује поузданост било ког добијеног негативног резултата анализе. Иако се ова шема веома успешно примењује код утирђивања присуства ове бактерије у текућим водама, њена ограничења треба узети у обзир приликом сличних надзора индустријских (отпадних) вода.

2. Методе за детекцију и идентификацију *R. Solanacearum* у води

2.1. Припрема узорка

– детекција *R. solanacearum* у текућим водама је најпоузданија током касног пролећа, лета и јесени, када је температура воде изнад 15°C;

– поновљено узимање узорка на одабраним местима неколико пута током наведеног периода ће повећати поузданост детекције умањивањем климатских варијација;

– узети у обзир утицај јаких падавина и географске параметре водотока у циљу избегавања ефекта разређивања који могу умањити могућност детекције патогена;

– узорке узимати у текућим водама у близини биљака домаћина, уколико исте постоје.

На одабраним местима узорковати воду захватањем одређене количине воде у рехиклабилне стерилне епрувете или боце и то са дубине испод 30 cm и у оквиру 2 m од обале; индустријску и отпадну воду узорковати на месту испуштања; препоручује се величина узорка од 500 ml по месту узорковања. Уколико је потребно да узорци буду мањи, препоручује се да исти буду узети са три различите тачке по одабраном месту узорковања и да се сваки састоји од два подузорка од најмање 30 ml. У условима интензивног надзора, изабрати најмање три места узорковања на свака 3 km водотока; у узорковање укључити и места уливања других водотока.

Узорак транспортовати у тамним и хладним контејнерима (4 до 10°C) и тестирати у периоду од 24 часа од узорковања.

Уколико је потребно, бактеријска фракција се може концентровати коришћењем једне од следећих метода:

- центрифугирати 30 до 50 ml подузорака на 10000 g у трајању од 10 минута (или 7000 g у трајању од 15 минута), најпожељније на температури од 4 до 10°C; одлити супернатант и ресуспендовати пелет у 1 ml пуфера;
- извршити мембранску филтрацију (минимална величина поре 0.45 µm), а потом и испирање филтера са 5 до 10 ml пуфера и сакупљање онога што се испере; овај метод је погодан за веће запремине воде које садрже мању концентрацију сапрофита;

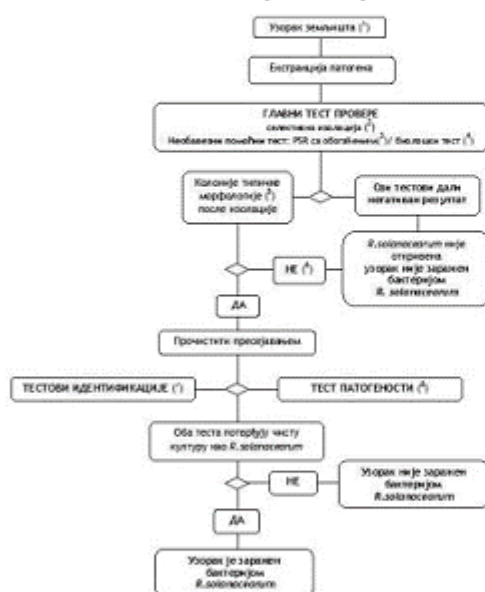
Концентрисање растиора се не препоручује за узорке индустријске (отпадне) воде, јер би повећана популација сапрофитних бактерија инхибирала развој *Ralstonia solanacearum*.

2.2. Тестирање у лабораторији се изводи према одговарајућој идентификационој шеми у складу са овим прилогом.

Поглавље VII.

ДЕТЕКЦИЈА И ИДЕНТИФИКАЦИЈА У ЗЕМЉИШТУ

1. Шема за детекцију и идентификацију бактерије *R. solanacearum* у земљишту



Шема 5.

(1) За препоручене поступке узорковања видети у Поглављу VI, тачка 2. подтачка 2.1. овог прилога.

(2) Селективна изолација описана је у Поглављу VIII, тачка 1. подтачка 1.4. овог прилога.

(3) Методе обогаћивања за PCR тест описане су у Поглављу VIII, тачка 1. подтачка 1.4. и 1.6. овог прилога.

(4) Биолошки тест је описан у Поглављу VIII, тачка 1. подтачка 1.9. овог прилога.

(5) Типична морфологија колоније је описана је у Поглављу IV, тачка 1. подтачка 1.3. овог прилога.

(6) Гајење бактерије може бити неуспешно због конкуренције или инхибиције сапрофитних бактерија. Ако се сумња да ће велике популације сапрофитних бактерија ути-

цати на поузданост изолације, поновити изолацију после додатног разређивања узорка.

(7) Поуздана идентификација чистих култура *R. solanacearum* постиже се применом тестова описаних у Поглављу VIII, тачка 2. овог прилога.

(8) Тест патогености описан је у Поглављу VIII, тачка 3. овог прилога.

2. Методе за детекцију и идентификацију бактерије *R. solanacearum* у земљишту

Начелас

Вализовани поступак описан у овом делу се може применити за детекцију патогена у узорцима земљишта, као и за испитивање узорка чистог индустријског отпада насталог при преради кромпира или узорка канализацијског муља. Међутим, важно је напоменути да ове методе нису довољно осетљиве да би гарантовале детекцију мањих и/или неравномерно распоређених популација бактерије *R. solanacearum* које могу бити природно присутне у узорцима тих супстрата.

Треба узети у обзир ограничења у осетљивости овог поступка тестирања при оцењивању поузданости добијених негативних резултата као и при примени поступка у истраживањима чији је циљ утврдити присуство или одсуство патогена у земљишту или муљу. Најпоузданији начин утврђивања присуства патогена у земљишту на пољу је сетва/садња осетљивих биљака домаћина и праћење појаве инфекције, али се ни коришћењем ове методе неће открити ниски нивои контаминације.

2.1. Припрема узорка

Узорковање земљишта у пољу треба обављати у складу с основним начелима која се примењују код узорковања за испитивање нематода. Са 60 места на сваких 0,3 ha узети 0,5 до 1 kg земљишта по узорку, с дубине од 10 до 20 cm (или на мрежи од 7 x 7 m). Ако се сумња на присуство патогена, повећати број места узорковања на 120 (на сваких 0,3 ha). Пре тестирања узорке чувати на температури од 12 до 15 °C. Узорковање чистог индустријског отпада насталог при преради кромпира или узорковање канализацијског муља извршити узимањем укупно 1 kg на местима која представљају укупну количину муља коју треба тестирати. Сваки узорак добро промешати пре тестирања.

Подузорке од 10 до 25 g земљишта или муља измешати у 60 до 150 ml екстракционог пуфера на ротационој мешалици (250 обртаја/мин), у трајању од максимално 2 сата. Мешави, по потреби, може помоћи додавање 0,02%-тног стерилног Tween-20 и 10 до 20 g стерилног песка.

Суспензију одржавати на температури од 4°C током тестирања.

Тестирање се изводи према одговарајућој идентификационој шеми у складу са овим прилогом.

Поглавље VIII.

ОПТИМИЗОВАНИ ПРОТОКОЛИ ЗА ДЕТЕКЦИЈУ И ИДЕНТИФИКАЦИЈУ *R. SOLANACEARUM*

I. Дијагностички тестови и тестови за идентификацију

1.1. Тестирање бактеријског ексадата из стабљике

Присуство *R. solanacearum* у стабљикама уелих биљака кромпира, парадајза или других биљака домаћина може се утврдити следећим једноставним тестом: сасећи стабљику непосредно изнад површине земљишта и тај крај ставити у спрувету са чистом водом. После неколико минута, из пресечених спроводних судова пратити појаву карактеристичног бактеријског ексадата.

1.2. Детекција гранула поли-β-хидроксибутирата (PHB)

На микроскопској плочици припремити размаз бактеријског ексадата из зараженог ткива или из 48-часовне културе са хранљиве подлоге YPGA или SPA (Поглавље X овог прилога).

За позитивну контролу припремити размазе биовара 2, бактерије *R. solanacearum*, а за негативну контролу размаз бактеријске прсте за коју је познато да је негативна на РНВ, уколико се овај поступак сматра потребним.

Размазе оставити да се осуше на ваздуху и потом их фиксирати на пламену.

Обојити препарат или Нилском плавом или Суданском црном бојом и посматрати под микроскопом следеће:

1.2.1. Тест са Нилском плавом бојом:

Прелити сваку плочицу с 1%-тним воденим раствором Нилско плаве боје А и инкубирати 10 минута на 55°C.

Осудити раствор боје. Испрати кратко под благим млазом воде из славине. Вишак воде уклонити упијајућим папиром.

Прелити размаз 8%-тним воденим раствором сирћетне киселине и инкубирати један минут на собној температури.

Испрати кратко под благим млазом воде из славине. Вишак воде уклонити упијајућим папиром.

Поновно навлажити капицом воде и покрити покровним стаклом.

Прегледати обојени размаз епифлуоресцентним микроскопом на 450 пм, имерзијским објективом повећана од 600 до 1000 x (уљна или водена имерзија).

Прегледати да ли је присутна светло наранџаста флуоресценција гранула РНВ-а. Такође, прегледати плочицу и под нормалним светлом да би се потврдио присуство гранула РНВ у ћелијама и да је ћелијска морфологија типична за *R. solanacearum*.

1.2.2. Тест са бојом Суданско црно:

Прелити сваку плочицу 0.3%-тним воденим раствором боје Суданско црно Б у 70%-тним етанолу и инкубирати 10 минута на собној температури.

Осудити раствор боје, кратко испрати под млазом воде из славине и вишак воде уклонити упијајућим папиром.

Плочнице накратко умочити у киселу и осушити их на упијајућем папиру. Киселу је опасан за здравље, предузети потребне сигурносне мере и радити у дигестору.

Прелити плочице 0.5%-тним (w/v) воденим раствором шафранина и оставити 10 секунди на собној температури. Шафранин је опасан за здравље, предузети потребне сигурносне мере и радити у дигестору.

Испрати под благим млазом воде из славине, осушити на упијајућем папиру и покрити покровним стаклом.

Прегледати обојене размазе под микроскопом који користи пролазно светло, уљним имерзијским објективом повећана од 1000 x.

Прегледати да ли се уочавају плаво-црво обојене грануле РНВ-а у ћелијама *R. solanacearum* с ћелијским зидовима обојеним ружичасто.

1.3. Серолошки тестови аглутинације

Аглутинација ћелија *R. solanacearum* у бактеријском екседату или екстрактима ткива са симптомима, најбоље се уочава коришћењем потврђених и одобрених антитела обележених одговарајућим обојеним ознакама као што су црвене ћелије *Staphylococcus aureus* или обојене честице латекса. Ако се користи комплет који је доступан на тржишту, следити упутства произвођача. У супротном применити следећи поступак:

- помешати капице суспензије обележеног антитела и бактеријског екседата (око 5 µl сваког) на предметним плочицама са више бунарића;
- припремити позитивне и негативне контроле користећи суспензије *R. solanacearum* биовар 2 и хетерологног соја;
- уочити да ли долази до аглутинације у позитивним узорцима после 15 секунди лаганог мешања.

1.4. Изолација *R. solanacearum*

1.4.1. Изолација на селективној подлози

Напомена:

Пре примене ове методе, обавити претходне тестове како би се осигурала поновљива детекција 10^3 до 10^4 једи-

ница које стварају колоније (CFU) бактерије *R. solanacearum* по мл, а које су додате екстрактима узорака који су у претходним тестирањима доказани као негативни.

Користити потврђену и одобрену селективну хранјиву подлогу као што је SMSA (прилагођену према Elphinstone и сар., 1996; – Поглавље X овог прилога).

Приликом прегледа засејане хранјиве подлоге, обратити пажњу на разликовање *R. solanacearum* од других бактерија чије колоније могу расти на тој хранјивој подлози, јер колоније *R. solanacearum* могу бити нетипичне морфологије ако је интензиван пораст разних бактерија на подлози или ако су присутне антагонистичке бактерије. Уколико се посумња да је дошло до негативног утицаја конкуренције или антагонизма, узорак треба поново тестирати другим тестом.

Највећа осетљивост детекције овом методом може се очекивати ако се користе свеже припремљени екстракти узорака. Међутим, ова се метода може примењивати и на екстрактима чуваним с глицеролом на температури од -68 до -86 °C.

Позитивна контрола: припремити децимална разређења суспензије 10^6 cfu по мл вирulentног соја биовара 2 *R. solanacearum* (штр. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Позитивне контроле припремити потпуно одвојено од узорака који се тестирају, да би се избегла могућност контаминација узорака.

Пре употребе за рутинско тестирање узорака, проверити погодност сваке серије селективне хранјиве подлоге за раст и развој патогена. Контролни материјал подвргнути истим принципима тестирања као и узорак или узорке.

Применити одговарајућу технику напомена разређења како би се осигурала довољна разређеност полулазија сапрофитних бактерија. Нанети 50–100 µl екстракта узорака по подлози и по сваком разређењу.

Инкубирати подлоге на 28°C и прочитати их после 48 сати, а после тога сваки дан у периоду од шест дана. Типичне колоније *R. solanacearum* на хранјивој подлози SMSA су млечно-беле боје, плоскате, неправилног облика и воденасте, а после три дана инкубације средина им постаје ружичаста до крваво-црвена с унутрашњим пругама или спиралама (видети веб страницу: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Напомена:

На овој хранјивој подлози понекад расту и нетипичне колоније *R. solanacearum* које могу бити мале, округле, потпуно црвене боје и неводенасте или само деломично воденасте, због чега их је тешко разликовати од колонија сапрофитних бактерија.

Колоније за које се сматра да су колоније *R. solanacearum*, треба пренети на уобичајену хранјиву подлогу и пречистити како би се добиле појединачне издвојене колоније.

Културе се кратко време могу чувати у стерилној води (pH 6 до 8, без хлора) на собној температури у тами или дуже време на температури од -68 до -86 °C или лиофилизације.

Изолате идентификовати (Поглавље VIII, тачка 2. овог прилога) и проверити патогеност (Поглавље VIII, тачка 3. овог прилога).

Тумачење резултата селективне изолације

Селективна изолација је негативна ако се после шест дана не уочавају никакве бактеријске колоније или ако се не пронађу сумњиве колоније типичне за *R. solanacearum*, под условом да се не сумња на инхибицију због конкуренције или антагонизма других бактерија и да су типичне колоније *R. solanacearum* пронађене у позитивним контролама.

Селективна изолација је позитивна ако се издвоје сумњиве колоније *R. solanacearum*.

1.4.2. Поступак обогаћивања

За обогаћивање употребити потврђену и одобрену подлогу што је модификована Wilbrink течна подлога (Поглавље X овог прилога).

Овај поступак се може применити за селективно повећање популације *R. solanacearum* у екстрактима узорака, услед чега се повећава и осетљивост детекције. На овај начин се такође значајно разређују инхибитори PCR реакције (1:100). Међутим, треба напоменути да обогаћивање *R. solanacearum* може бити неуспешно због компетитивне или антагонизма сапрофитних организама који се често истовремено обогаћују. Због тога може бити тешко издвојити *R. solanacearum* из култура обогаћених у течућој подлози. Поред тога, у случају употребе ELISA testa, с обзиром да се популације серолошки сродних сапрофита могу повећати, препоручује се употреба специфичних моноклоналних антитела уместо поликлоналних антитела.

За обогаћивање за PCR тест пренесите 100 μ l екстракта узорка у 10 ml течне подлоге за обогаћивање који је претходно подељен у аликвоте у епрувете или бочице без ДНК. За обогаћивање за ELISA тест могу се користити већи делови екстракта узорка у текућој подлози (нпр. 100 μ l у 1,0 ml текуће подлоге за обогаћивање).

Инкубирати 72 сата на температури од 27 до 30°C са или без протресања, с чепом који није до краја затегнут како би се омогућило проветравање.

Добро промешати пре коришћења у ELISA или PCR тестовима.

С обогаћеном текућом подлогом поступати исто као и с узорцима у претходно описаним тестовима.

Напомена:

Уколико се очекује да ће обогаћивање *R. solanacearum* бити онемогућено због великих популација одређених конкурентних сапрофитних бактерија, бољи резултате се могу добити обогаћивањем екстракта узорка пре центрифугирања или других поступака концентрисања.

1.5. IF тест

Начело

Употреба IF testa као главног теста провере препоручује се због његове доказане уједињености у постизању захтеваних прагова осетљивости методе.

Када се IF тест користи као главни тест провере и ако је IF читавање позитивно, додатно се као други тест користи PCR или FISH тест. Када се IF тест користи као други тест провере и IF читавање је позитивно, даља тестирања у циљу комплетирања анализа се изводе према дијаграму тока.

Напомена:

Користити потврђена и одобрена антитела *R. solanacearum* (видети веб страницу: <http://forum.europec.eu.int/Public/c/sanco/Home/main>).

Препоручује се одређивање титра за сваку нову серију антитела. Титар се дефинише као највеће разређење у коме долази до оптималне реакције при тестирању суспензије која садржи 10^5 до 10^6 ћелија по ml одговарајућег соја *R. solanacearum* уз коришћење флуоресцентно-изотиоцијанат (FITC) конјугата у складу с препорукама произвођача. Сви потврђени и одобрени поликлонални антисеруми имали су IF титар најмање 1:2000. Током тестирања користити радио разређења антитела, која су близу или једнака титру.

Тестирање треба извршити на свеже припремљеним екстрактима узорка, а по потреби, тестирање се може успешно извршити и на екстрактима који су били чувани на температури од -68 до -86 °C с додатком глицерола. Глицерол укључити додавањем 1 ml пелет пуфера (пуфера за раставање талога) (Поглаве XII. овог прилога), поновним центрифугирањем на 7000 g у трајању од 15 минута и ресуспендовањем талога у једнакој запремини пелет пуфера. Овај део процедуре често није потребан, нарочито ако су узорци фиксирани на микроскопска IF стакла пламеном.

На одвојеним микроскопским стаклима припремити позитивну контролу и то хомологни или неки други референтни изолат *R. solanacearum*, растворен у екстракту кромпира и по избору у пуферу.

На истој IF плочици треба, где год је то могуће, користити и позитивну контролу коју чини природно заражено ткиво (лиофилизовано или замрзнуто на -16 до -24 °C).

Негативну контролу могу представљати и делови екстракта узорка који су у ранијем тестирању показали негативан резултат.

У Поглављу XI. овог прилога су наведени стандардизовани позитивни и негативни контролни материјали који се могу употребљавати у овом тесту.

Користити микроскопске плочице са више бунарчића, по могућности с 10 отвора пречника најмање 6 mm.

Применити идентичан поступак тестирања на узорке и на позитивне и негативне контроле.

1.5.1. Припремити IF плочице за тестирање једним од следећих поступака:

1.5.1.1. За талог с релативно малом количином натакоженог скроба:

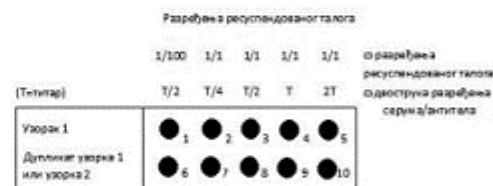
У први бунарчић пинетом одмерити стандардну запремину разређења од 1/100 ресуспендованог талога кромпира (15 μ l је довољно за бунарчиће пречника 6 mm – повећати запремину за веће бунарчиће). Потом у остале бунарчиће у истом реду пинетом одмерити сличну запремину неразређене суспензије (1/1) талога. Други ред се може користити као дупликат првог или за други узорак како је приказано на Шеми 6.

1.5.1.2. За остале суспензије талога:

Припремити децимална разређења (1/10 и 1/100) ресуспендованог талога у пуферу за талог. У један ред бунарчића пинетом одмерити стандардну запремину ресуспендованог талога и сваког разређења (15 μ l је довољно за бунарчиће пречника 6 mm – повећати запремину за веће). Други ред се може користити као дупликат првог или за други узорак као што је приказано на Шеми 7.

1.5.2. Оставити да се капљице осуше на собној температури или их загревати до температуре од 40 до 45°C. Ћелије бактерија фиксирати на IF плочицу загревањем (15 минута на 60 °C), провлачењем кроз пламен, 95%-тним етанолом или према посебним упутствима произвођача антитела.

Уколико је то неопходно, фиксирани плочице се могу чувати замрзнуте у десикатору у краћем временском интервалу (највише до три месеца).



Шема 6. Припрема плочица у складу са 1.5.1.1. и 1.5.3.1.

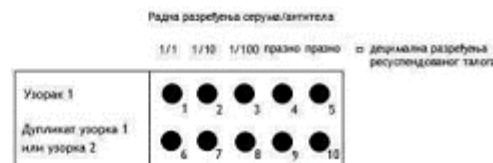
1.5.3. IF поступак:

1.5.3.1. У складу са поступком за припрему плочица за тестирање како је описано у 1.5.1.1.:

Припремити двојструки низ разређења антитела у IF пуферу. Први бунарчић мора имати 1/2 титра (T/2), а остали 1/4 титра (T/4), 1/2 титра (T/2), титар (T) и двојструки титар (2T).

1.5.3.2. У складу с поступком за припрему плочица за тестирање како је описано у 1.5.1.2.

Припремити радио разређење антитела у IF пуферу. Радио разређење утиче на специфичност.



Шема 7. Припрема плочица у складу са 1.5.1.2. и 1.5.3.2.

Поређати плочице на навлажени упијајући папир. Сваки бунарчић потпуно испунити разређењем антитела. Запремина антитела мора бити једнака запремини нанесеног екстракта.

Уколико не постоје посебна упутства произвођача антитела, следити следећу процедуру:

Инкубирати прекривене плочице на влажном папиру 30 минута на собној температури (18 до 25°C).

Капљице са сваке плочице отрести и плочице пажљиво испрати IF пуфером. Потопити плочице у IF пуфер-Tween па у IF пуфер, у трајању од по 5 минута. Спречити стварање аеросола или пренос капљица јер би могло доћи до унакрсне контаминације узорка. Плочице пажљиво осушити упијајућим папиром.

Поређати плочице на навлажени упијајући папир. Бунарчиће потпуно испунити разређеним FITC конјугатом који се користи за одређивање титра. Запремина конјугата нанесеног на бунарчић мора бити једнака запремини нанесеног антитела.

Инкубирати покривене плочице на влажном папиру, 30 минута на собној температури (18 до 25°C).

Отрести капљице конјугата са плочица. Испрати и опрати плочице како је претходно описано. Плочице пажљиво осушити.

На сваки бунарчић шплетом нанети 5-10 μ л 0,1M глицерола са фосфатним пуфером или комерцијално доступно средство против изблеђивања и ставити покривно стакло.

1.5.4. Очитавање IF теста:

Прегледати припремљене плочице под епифлуоресцентним микроскопом с одговарајућим филтерима за ексцитацију FITC-а, под улажном или воденом имерзијом и увећањем од 500-1000 $\times$. Прегледати сваки бунарчић уздуж и попречно, под правим углом и дуж спољне ивице. За узорке у којима је видљив мали број ћелија или их уопште нема прегледати најмање 40 микроскопских видних поља.

Прво треба прегледати плочицу с позитивном контролом. Ћелије морају бити изразито флуоресцентне и потпуно обојене на утврђеном титру антитела или радног разређена. У случају да код обојености дође до одступања, IF тест се мора поновити (Поглање VIII, тачка 1. подтачка 1.5. овог прилога).

Утврдити да ли јасно флуоресцентне ћелије које се уочавају у бунарчићима имају морфологију карактеристичну за *R. solanacearum* (видети веб страницу: <http://forum.euro-pa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Интензитет флуоресценције мора бити једнак или бољи од оног који даје позитивни контролни изолат, при једнаком разређењу антитела. Запамтити непотпуно обојене или слабо флуоресцентне ћелије.

Уколико се посумња на контаминацију, тест се мора поновити (нпр. ако због контаминације пуфера све плочице у серији показују позитивне ћелије или ако су позитивне ћелије пронађене (изван бунарчића) на површини плочице).

Постоји неколико проблема у вези са специфичношћу теста имунофлуоресценције. У концентрованој екстракту издвојених конуса пупчаних делова кртоле или делова стабљике увек се очекује и присуство популација флуоресцентних ћелија са нетипичном морфологијом или унакрсна реакција са сапрофитним бактеријама сличне величине и грађе као *R. solanacearum*.

Приликом очитавања у обзир се узимају само флуоресцентне ћелије типичне величине и морфологије у титру или радном разређењу антитела.

Тумачење очитавања IF теста:

Уколико се утврди присуство јасно флуоресцентних ћелија карактеристичне морфологије, одредити просечан број типичних ћелија по микроскопском видном пољу и израчунати број типичних ћелија по мл ресуспендованог талог (Поглање XIII, овог прилога).

Очитавање IF теста је позитивно за узорке који имају најмање 5 $\times 10^3$ типичних ћелија по мл ресуспендованог талог. Овакав узорак се сматра потенцијално контаминираним и потребно је извршити даље тестирање.

Очитавање IF теста је негативно за узорке који имају мање од 5 $\times 10^3$ ћелија по мл ресуспендованог талог и узорак се сматра негативним. Није потребно даље тестирање.

1.6. PCR тест

Начела

Када се употребом PCR теста као прилог теста провере добије позитиван резултат, IF тест или изолација на подлогу се користе као други обавезни тест провере. Ако се коришћењем PCR теста као другог теста провере добије позитиван резултат, за постављање коначне дијагнозе треба обавити даље тестирање према дијаграму тока.

Коришћење ове методе као главног теста провере препоручује се само уколико је доступна специјализована експертиза.

Напомена:

Прелиминарна тестирања применом ове методе треба да омогуће поновљиву детекцију најмање 10^3 до 10^4 ћелија *R. solanacearum* по мл, које су додате екстракту узорка претходно доказаног као негативног.

За постизање највећег степена осетљивости и специфичности у свим лабораторијама, потребно је извођење огледа за стандардизацију (оптимизацију) методе. Користити потврђене и одобрене реактенте и протоколе за PCR. (Поглање XIV, овог прилога). Пожељно је одабрати метод са интерном контролом. Предузети одговарајуће мере опреза како би се избегла контаминација узорка циљном ДНК. PCR тест треба да обављају искусни стручњаци, у специјализованим лабораторијама за молекуларну биологију.

Негативне контроле (за екстракцију ДНК и PCR поступак) треба увек у поступку обрадити последње како би се утврдило да ли је евентуално дошло до било каквог преношења ДНК.

У PCR тест укључити следеће негативне контроле:

- екстракт узорка у коме претходно током тестирања није доказано присуство *R. solanacearum*;
- пуфер коришћен за екстракцију бактерије и ДНК из узорка;

- PCR-реакциони микс.

У PCR тест укључити следеће позитивне контроле:

- аликоте ресуспендованих талог у које је додата бактерија *R. solanacearum* (за припрему видети Поглање XI, тачка 2. овог прилога);

- суспензију од 10⁶ ћелија по мл вирулентног изолата *R. solanacearum* у води (нпр NCPPB 4156=PD 2762=CFBP 3857; видети

- ако је могуће, у PCR тесту користити и ДНК екстраховану из позитивних контролних узорка.

Да би се избегла могућа контаминација, позитивне контроле припремити просторно одвојено од узорка за тестирање.

С обзиром да примена PCR протокола захтева коришћење екстракта узорка са што мање земље, пре почетка процедуре извођења теста, узорке кромпира је пожељно добро опрати.

У поглављу XI, овог прилога наведени су стандардизовани позитивни и негативни контролни материјали који се могу користити у овим тестовима.

1.6.1. Методе пречишћавања ДНК

Позитивну и негативну контролу користити како је претходно описано (видети у Поглављу XI, овог прилога). Контролни материјал припремити на исти начин као и узорке.

Доступне су различите методе пречишћавања циљане ДНК из комплексних супстрата узорка у циљу уклањања инхибитора PCR реакције и других ензимских реакција и методе концентровања циљане ДНК у екстракту узорка.

Метода која следи је стандардизована за коришћење са потврђеном и одобреном PCR методом у Поглављу XIV, овог прилога.

1.6.1.1. Метода према Пастрику (2000)

Пипетом одмерити 220 µl лизис пуфера [100 mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0)] у Eppendorf тубу од 1,5 ml.

Додати 100 µl екстракта узорка и ставити у термоблок или водено купатило на 95 °C 10 минута.

Ставити тубу на лед у трајању од пет минута.

Додати 80 µl основног шток раствора Lysozyme (50 mg лизозима по ml у 10 mM Tris HCl, pH 8,0) и инкубирати на 37 °C 30 минута.

Додати 220 µl раствора Easy DNA® А (Invitrogen), добро измешати на вортексу и инкубирати на 65°C 30 минута.

Додати 100 µl раствора Easy DNA® В (Invitrogen) и снажно измешати на вортексу до постизања униформног вискозитета узорка.

Додати 500 µl хлороформа, измешати на вортексу док се вискозитет не умани и смеша постане хомогена.

Центрифугирати на 15000 g 20 минута на 4°C да се поделе фазе и створи меџуфаза.

Пренети горњу фазу у нову Eppendorf тубу.

Додати 1 ml 100% етанола (-20°C), кратко промешати на вортексу и инкубирати на леду 10 минута.

Центрифугирати на 15000 g 20 минута на 4 °C и укло- нити етанол од талога.

Додати 500 µl 80% етанола (-20 °C) и промешати окре- тањем тубе.

Центрифугирати на 15000 g 10 минута на 4 °C сачува- ти талог, а уклопити етанол.

Оставити талог да се суши на ваздуху или у вакуумској центрифуги (DNA speed vac).

Ресуспендовати талог у 100 µl стерилне Ултра чисте воде и оставити на собној температури најмање 20 минута.

Чувати на -20 °C до извођења PCR-а.

Било који бели талог издвојити центрифугирањем и за PCR употребити 5 µl супернатанта који садржи ДНК.

1.6.1.2. Друге методе

За екстракцију ДНК могу се применити и друге мето- де (нпр. Qiagen DNeasy Plant Kit), уколико је доказана екви- валентност у прочишћавању ДНК из контролних узорка који садрже 10⁵ до 10⁴ патогених ћелија по ml.

1.6.2. PCR

Припремити узорке за тестирање и контролне узорке за PCR према одобреним протоколима (Поглавље VIII, тачка 1, подтачка 1.6. овог прилога). Припремити разређе- не екстракта ДНК из узорка 1:10 у Уатра чистој води.

У неконтаминираном простору припремити одговара- јући реакциони микс за PCR према објављеним протоколи- ма (Поглавље XIV, овог прилога). Одобрени PCR прото- кол је мултиплекс реакција која такође укључује унутрашњу PCR контролу.

Према протоколу за PCR, додати 5 µl екстракта ДНК на 25 µl реакционог микса у стерилне епрувете за PCR.

Укључити и негативну контролу која садржи само PCR реакциони микс, а уместо узорка додати исти извор Ултра чисте воде који је коришћен за припрему PCR реак- ционог микса.

Ставити епрувете у уређај за PCR (thermal cycler) и по- кренути стандардизовани PCR програм.

1.6.3. Анализа PCR производа

Умножене PCR производе развијити електрофорезом у агарозном гелу. У сваки бунарчић 2,0%-тног (w/v) агаро- зног гела у трис-ацетат EDTA пуферу (TAE) (Поглавље XIV, овог прилога) нанети најмање 12 µl ампликона ДНК из сваког узорка, помешане с 3 µl боје и пропустити уз на- пон од 5 до 8 V по cm. Употребити одговарајући ДНК мар- кер, нпр. 100 bp ladder.

Обојити електрофоретске траке ДНК у гелу потапа- њем гела у етидиум бромид (0,5 mg/l) у трајању од 30 до 60

минута. Предузети одговарајуће мере опреза при раду са овим мутагеном.

Обојени гел прегледати на краткоталасном UV тран- сдлуминатору (нпр. λ = 302 nm), и потражити умножене фрагменте очекиване дужине и документовати их.

Приликом сваког новог налаза/случаја проверити ау- тентичност умноженог PCR производа извођењем анализе уз помоћ рестрикционих ензима на узорку преостале умноже- не ДНК и то инкубацијом при оптималној температури и у оптималном времену с одговарајућим ензимом и пуфером. Настале фрагменте развијити електрофорезом у агаро- зном гелу како је претходно наведено и после бојења ети- диум бромидом на UV трансдлуминатору посматрати кар- рактеристичну матрицу (образци) рестрикционих фрагме- ната и упоредити је с позитивном контролом пре и после раздвајања.

Тумачење резултата PCR теста:

PCR тест је негативан ако у тестираном узорку није ви- дљив PCR продукт очекиване дужине који је специфичан за *R.solanacearum*, али је видљив у свим позитивним кон- тролним узорцима (код мултиплекса PCR-а с прајмерима за унутрашњу контролу који су специфични за биљку домаћина; у тестираном узорку се мора умножити други продукт PCR-а очекиване величине).

PCR тест је позитиван ако је видљив PCR продукт ко- ји је специфичан за *R.solanacearum* и који је очекиване ду- жине и рестрикционог обрасца, под условом да није умно- жен ни у једном узорку која представља негативну контро- лу. Поуздана потврда позитивног резултата представља и и успешно понављање теста с другим паром PCR прајмера (Поглавље XIV овог прилога).

Напомена:

Уколико се очекивани фрагмент (позитивна реакција) добије у узорку позитивне контроле која садржи *R.solanacearum* у води, а негативни резултат добије у узорку позитив- не контроле која садржи *R.solanacearum* у екстракту кром- пира, претпоставља се да је дошло до инхибиције PCR ре- акције. У мултиплекс PCR протоколима који се изводе упо- требом унутрашњих PCR контрола, сматра се да је дошло до инхибиције реакције ако није добијен ни један од два производа.

Такође, ако се из једне или више негативних контрола добије очекивани производ, може се сумњати да је дошло до контаминације.

1.7. FISH тест

Начело

Када се FISH тест као први тест провере и ако се њи- ме добије позитиван резултат, мора се спровести IF тест или изолација као други обавезни тест провере. Ако се FISH тест користи као други тест провере и ако се њиме добије позитиван резултат, за постављање коначне дијагно- зе треба обавити даље тестирање према дијаграму тока.

Напомена:

Користити потврђене и одobreне олиго-пробе специ- фичне за бактерију *R. solanacearum* (Поглавље XV, овог прилога). Прелиминарна тестирања применом ове методе треба да омогуће поновљиву детекцију најмање 10⁵ до 10⁴ ћелија *R. solanacearum* по ml додатих екстракту узорка прет- ходно доказаног као негативног.

Поступак треба извршити на свеже припремљеним екстрактима узорка, али се успешно може применити и на екстракт узорка који је био чуван са глицеролом на темпе- ратури од -16 до -24 °C или од -68 до -86 °C.

За негативну контролу употребити делове екстракта узорка који су у ранијем тестирању на *R. solanacearum* до- казани као негативни.

За позитивну контролу припремити суспензије које са- држе 10⁵ до 10⁶ ћелија/ml 0,01M фосфатног пуфера (PB) бактерије *R. solanacearum* биовар 2 (нпр. сој NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBR 3857; видети Додатак 3) из културе старе 3-5 дана. Припремити одвојене плочице за позитивну кон- тролу са хомологним или неким другим референтним изола-

том бактерије *R. solanacearum*, раствореним у екстракту кромпира, као што је наведено у Поглављу XI, тачка 2. овог прилога.

Коришћење еубактеријске олиго-пробе обележене FITC-ом омогућава контролу процеса хибридизације јер ће се обојити све еубактерије присутне у узорку.

У Поглављу XI тачка 1. овог прилога наведени су стандардизирани позитивни и негативни контролни материјали који се могу употребљавати у овом тесту.

Контролни материјал тестирати применом исте процедуре као и узорке.

1.7.1. Фиксирање екстракта кромпира

Следећи протокол се заснива на процедури Wullings и сар., (1998):

Припремити раствор за фиксирање (Поглавље XV, овог прилога).

Пипетом одмерити 100 μ l екстракта сваког узорка у Енлендорф епрувету па центрифугирати 7 минута на 7000 g.

Уклонити супернатант и растворити талог у 200 μ l фиксатива припремљеног највише 24 сата раније, промешати и инкубирати један сат у фрижидеру. Алтернативни фиксатив је 96% етанол. При томе је потребно растворити талог из корака 5.1.2 у 50 μ l 0,01M ПВ и 50 μ l 96% етанола, промешати и инкубирати на 4 °C 30 до 60 минута.

Центрифугирати 7 минута на 7000 g, уклонити супернатант и ресуспендовати талог у 75 μ l 0,01M ПВ.

У бунарчиће чистих плочица нанети 16 μ l фиксираних суспензија како је приказано на шема 8. На сваку плочицу нанети два различита, неразређена узорка и употребити 10 μ l за припремање разређења 1:100 (у 0,01 M ПВ). Преостали фиксирани раствор узорка (49 μ l) чувати на -20 °C после додавања једнаке запремине 96 %-тног етанола. Ако FISH тест треба поновити, центрифугирањем уклонити етанол и додати једнаку запремину 0,01 ПВ (уз мешање).

Узорак 1	Празно	Празно	Празно	Узорак 2
Бунарчић 1	Бунарчић 2	Бунарчић 3	Бунарчић 4	Бунарчић 5
Узорак 1	Празно	Празно	Празно	Узорак 2
Бунарчић 6	Бунарчић 7	Бунарчић 8	Бунарчић 9	Бунарчић 10
Покровна плочица 1			Покровна плочица 2	

Шема 8. Приказ плочице за FISH тест

Плочице осушити на ваздуху (или у сушници на 37 °C) па их фиксирати провлачењем кроз пламен. На овом кораку се може прекинути поступак и наставити следећи дан. Плочице треба чувати на собној температури у сувом простору без прашине.

1.7.2. Хибридизација

Дехидратацију ћелија извршити узастопним потапањем плочица у 50%-тни, 80%-тни и 90%-тни етанол, у трајању од по једног минута. Плочице поставити на држач и осушити на ваздуху.

Припремити влажну комору за инкубацију тако што се дно херметички затворене кутије прекрива упијајућим или филтер папиром потопљеним у 1x hybmix (Поглавље XV, овог прилога). Кутију претходно инкубирати у апарату за хибридизацију нуклеинских киселина на 45°C најмање 10 минута.

Нанесите по 10 μ l хибридизованог раствора у осам бунарчића (бунарчићи 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 и 10; видети Шему 7) сваке плочице, а два средња бунарчића (3 и 8) оставити празне.

Прва и задња 4 бунарчића покривити покривним стаклом (24 x 24 mm), назећи при том да у бунарчићима не остане ваздух. Ставити плочицу у претходно загрејану влажну

комору и хибридизовати 5 сати у апарату за хибридизацију на 45°C, у тами.

Припремити три посуде са 1 l Ултра чисте воде, 1 l 1x hybmix (334 ml 3x hybmix и 666 ml ултра чисте воде) и 1 l 1/8x hybmix (42 ml 3x hybmix и 958 ml ултра чисте воде). Сваку посуду претходно инкубирати у воденом купатилу на 45°C.

Скинути покривна стакла, а предметне плочице ставити на држач.

Вишак пробе уклонити инкубирањем у трајању од 15 минута на 45°C у посуду с 1x hybmix.

Пренети држач плочица у раствор за прање (1/8 x hybmix) и инкубирати још 15 минута.

Плочице накратко уронити у ултра чисту воду и ставити на филтер папир. Вишак воде уклонити филтер папиром. У сваки бунарчић пипетом нанети 5 до 10 μ l заштитног раствора против изблеђивања (нпр. Vectashield, VECTA Laboratories, CA, USA или еквивалентна) на целу предметну плочицу покривити великом покривним стаклом (24 x 60 mm).

1.7.3. Очитавање FISH теста

Плочице прегледати под епифлуоресцентним микроскопом, коришћењем улазне имерзије, с увећањем 630 или 1000 x. Са филтером прикладним за флуоресценци-изотиоцијанат (FITC), еубактеријске ћелије (укључујући већину грам негативних ћелија) се у узорку виде као флуоресцентно зелене. Употребом филтера за тетраметилроламин-5-изотиоцијанат, ћелије *R. solanacearum*, обојене са Су3, виде се као флуоресцентно црвене. Упоредити морфологију ћелија узорка с морфологијом ћелија позитивних контрола. Ћелије морају бити јасно флуоресцентне и у потпуности обојене. Ако дође до одступања у обојености, FISH тест (Поглавље VIII, тачка 1, подтачка 1.7. овог прилога) се мора поновити. Прегледати сваки бунарчић уздуж и попреко под нормалним углом и дуж спољне ивице. За узорке у којима је видљив мали број ћелија или их уопште нема прегледати најмање 40 микроскопских видних поља.

Уочити да ли су видљиве јасно флуоресцентне ћелије у бунарчићима морфологије карактеристичне за *R. solanacearum* (видети веб страницу: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Интензитет флуоресценције мора бити једнак или јачи него код позитивне контроле. Ћелије које нису у потпуности обојене или су слабе флуоресцентне се не узимају у обзир.

Уколико постоји сумња да је дошло до контаминације, тест се мора поновити (нпр. све плочице у серији због контаминације пуфера показују позитивне ћелије или су позитивне ћелије пронађене изван бунарчића, на површини плочице).

Постоји неколико проблема у вези са специфичношћу FISH теста. У концентрованом екстракту издвојених конуса пупчаних делова кртоле или стабљике увек се очекује и присуство популација флуоресцентних ћелија са нетипичном морфологијом или унакрсна реакција са сапрофитним бактеријама сличне величине и грађе као *R. solanacearum*, мада знатно ређе него код IF теста.

У обзир се узимају само флуоресцентне ћелије типичне величине и морфологије.

Тумањење резултата FISH теста

Резултати FISH теста сматрају се важећим ако се у свим позитивним и ни у једној негативној контроли применом FISH филтра уочава присуство јасно зелених флуоресцентних ћелија чија је величина и морфологија типична за *R. solanacearum* и ако се применом филтера за родамин уочавају јасне црвене флуоресцентне ћелије. Ако се уоче јасне ћелије карактеристичне морфологије, одредити просечни број типичних флуоресцентних ћелија по микроскопском видном пољу и израчунати број типичних ћелија по мл ресуспендованог талоба. Потенцијално позитивним се сматрају узорци са најмање 5 x 10³ типичних ћелија по мл ресу-

специфичног талога и потребна су им даља тестирања. Негативни се сматрају узорци с мање од 5×10^3 типичних ћелија по мл ресуспензованог талога.

FISH тест је негативан ако се применом филтера за родамин не уоче снажно флуоресцентне црвене ћелије чија је величина и морфологија типична за *R. solanacearum*, под условом да се применом филтера за родамин уоче типичне изразито флуоресцентне црвене ћелије у препаратима позитивне контроле.

1.8. ELISA тестови

Начело

Због релативно ниске осетљивости, ELISA се може применити само као необавезни додатни тест поред IF, PCR или FISH тестова. Ако се примјењује DAS ELISA, обавезно је претходно обогаћивање екстракта и употреба моноклоналних антитела (видети веб страницу <http://forum.eurora.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Обогаћивање узорака пре примене ELISA теста може бити корисно јер се на тај начин повећава осетљивост теста, али може бити и неуспјешно због конкуренције осталих компоненти у узорку.

Напомена:

Користити потврђени и одобрени извор антитела за *R. solanacearum* (видети веб страницу <http://forum.eurora.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Препоручљиво је да се титар одреди за сваку нову серију антитела. Титар се дефинише као највеће разређење код којег долази до оптималне реакције при тестирању суспензије која садржи 10^5 до 10^6 ћелија/мл хомологног соја бактерије *R. solanacearum* уз коришћење одговарајућих конјугата секундарних антитела према препорукама произвођача. Током тестирања, треба користити антитела у радним разређењима која су близу или једнака титру формулације доступне на тржишту.

Одредити титар антитела на суспензији од 10^5 до 10^6 станица по мл хомологног соја бактерије *R. solanacearum*.

За негативну контролу користити екстракт узорка који је у ранијем тестирању на *R. solanacearum* био негативан и суспензију бактерије, с којом не долази до унакрсне реакције, у фосфатном пуферу с додатком соли (PBS).

За позитивну контролу користити аликвоте екстракта узорка који је у ранијем тестирању био негативан, помешане са 10^5 до 10^6 ћелија/мл бактерије *R. solanacearum* биовар 2 (нпр. сој NCPFB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). За упоређивање резултата на свакој микротитарској плочи користити стандардну суспензију од 10^5 до 10^6 ћелија/мл бактерије *R. solanacearum* у PBS-у. Побрините се да позитивне контроле на микротитарској плочи буду добро одвојене од узорка који се тестирају.

У Поглављу XI, тачка 1, овог прилога наведени су стандардизовани позитивни и негативни контролни материјали који се могу употребљавати у овом тесту.

Контролни материјал тестирати на исти начин као и узорке.

Извршена је валидација два протокола за ELISA тест.

1.8.1. Индиректна ELISA (Robinson Smith и сар., 1995)

Употребити аликвоте од 100 до 200 μ л екстракта узорка (у неким случајевима се, загревањем четири минута на 100°C у воденом купатилу или блоку за загревање могу смањити неспецифични резултати).

Додати једнаку запремину пуфера за облагање двоструке јачине и промешати на вортексу.

Нанети аликвоте од 100 μ л у најмање два бунарчића на микротитарске плоче (нпр. Nunc-Polysopt или еквивалентна) и инкубирати један сат на 37°C или преко ноћи на 4°C .

Уклонити екстракт из бунарчића. Испрати бунарчиће три пута раствором PBS-Tween, а последњи раствор за испирање оставити у бунарчићима најмање пет минута.

Припремити одговарајуће разређење антитела за *R. solanacearum* у пуферу за блокирање. За потврђена и одобрена антитела која су доступна на тржишту користити препоручена разређења (обично двострука концентрација титра).

Додати 100 μ л у сваки бунарчић и инкубирати један сат на 37°C .

Уклонити раствор антитела из бунарчића и испрати бунарчиће, три пута раствором PBS-Tween, а последњи раствор за испирање оставити у бунарчићима најмање пет минута.

Припремити одговарајуће разређење секундарних антитела- конјугата алкалне фосфатазе у пуферу за блокирање. Додати 100 μ л у сваки бунарчић и инкубирати један сат на 37°C .

Уклонити конјугат антитела из бунарчића и испрати бунарчиће, као што је претходно описано.

У сваки бунарчић додати 100 μ л раствора супстрата алкалне фосфатазе, инкубирати у тамни на собној температури и очитати апсорпцију при 405 nm у интервалу од 90 минута.

1.8.2. DAS ELISA

Припремити одговарајуће разређење поликлоналних имуноглобулина за бактерију *R. solanacearum* у пуферу за облагање pH 9,6 (Поглавље XII, овог прилога). Нанети 200 μ л у сваки бунарчић. Инкубирати четири до пет сати на 37°C или 16 сати на 4°C .

Бунарчиће испрати три пута раствором PBS-Tween. У најмање два бунарчића нанети 190 μ л екстракта узорка. На свакој плочи додати позитивну и негативну контролу, и то сваку у по два бунарчића. Инкубирати 16 сати на 4°C .

Бунарчиће испрати три пута раствором PBS-Tween.

Припремити одговарајуће разређење моноклоналних антитела специфичних за бактерију *R. solanacearum* у PBS-у који садржи и 0,5% говеђег серумског албумина (BSA) и нанети 190 μ л у сваки бунарчић. Инкубирати два сата на 37°C .

Бунарчиће испрати три пута раствором PBS-Tween.

Припремити одговарајуће разређење антимисијих имуноглобулина конјугираних са алкалном фосфатазом у PBS-у. Нанети 190 μ л у сваки бунарчић. Инкубирати два сата на 37°C .

Бунарчиће испрати три пута раствором PBS-Tween.

Припремити раствор супстрата алкалне фосфатазе која садржи 1 mg p-nitrophenil фосфата по мл пуфера супстрата. Нанети 200 μ л у сваки бунарчић. Инкубирати у тамни на собној температури и очитати апсорпцију при 405 nm у периоду од 90 минута.

Тумачење резултата ELISA тестова

ELISA тест је негативан ако је просечна оптичка густина (OD) у бунарчићима с дупликатом узорка $< 2 \times \text{OD}$ у бунарчићу с негативном контролом екстракта узорка, под условом да су све вредности OD позитивних контрола изнад 1,0 (након 90 минута инкубације са супстратом) и да су веће од двоструке вредности OD добијених за негативне екстракте узорка.

ELISA тест је позитиван ако је просечна оптичка густина (OD) у бунарчићима с дупликатом узорка $> 2 \times \text{OD}$ у бунарчићу с негативном контролом екстракта узорка, под условом да су вредности OD за све бунарчиће с негативном контролом $< 2 \times \text{OD}$ у бунарчићима с позитивном контролом.

Ако се у ELISA тесту очитају негативни резултати у бунарчићима са позитивном контролом, то указује да тест није правилно изведен или да је дошло до инхибиције. Ако се у ELISA тесту очитају позитивни резултати у бунарчићима с негативном контролом, то указује да је дошло до унакрсне контаминације или до неспецифичног везивања антитела.

1.9. Биолошки тест

Напомена:

ПРЕЛИМИНАРНО ТЕСТИРАЊЕ ОВОМ МЕТОДОМ ТРЕБА ДА ОМОГУЋИ ПОМОЋНО ОТКРИВАЊЕ ПРИСУСТВА 10^3 ДО 10^4 CFU БАКТЕРИЈЕ *R. solanacearum* ПО МЛ, ДОДАТИХ ЕКСТРАКТИМА УЗОРАКА

који су у ранијем тестирању били негативни (Поглавље XI. овог прилога).

Највећа осетљивост детекције може се очекивати ако се користе свеже припремљени екстракти узорака и оптимални услови за раст и развој патогена. Међутим, ова метода може успешно да се примени и употребом екстракта који су чувани са глицеролом на температури од -68 до -86 °C.

Следећи протокол се темељи на Janse (1988):

За сваки узорак користити 10 биљака осетљиве сорте парадајза у фази трећег правог листа. (нпр. MoneyMaker или друге сорте за коју је утврђено у лабораторијским условима да је једнаке осетљивости). Детаљи о гајењу биљака се налазе у Поглављу XVI. овог прилога. За ову сврху се може употребити и плави патлиџан (нпр. сорта Black Beauty или сорте једнаке осетљивости), али само биљке у фази 2-3 листа до потпуног развоја трећег правог листа. Симптомима на плавом патлиџану су слабији и спорије се развијају, па се препоручује коришћење младих биљака парадајза.

Распоредити 100 µl екстракта узорака на биљке за тестирање.

Инокулација инејкцијом

Стабљике инокулисати непосредно изнад котиледона инејкцијом с танком иглом (не мањом од 23G). Узорак поделити на биљке, тако да свака биљка добије одговарајућу количину.

Инокулација зарезивањем

Држећи биљку међу прстима, пинетом нанети капљицу (око 5-10 µl) ресуспендованог талога на стабљичу и то између котиледона и првог листа. Стерилним скалпелом направити дијагонални рез, дуг око 1 cm и дубок око 2/3 дебљине стабљике, почевши од нанесене капљице ресуспендованог талога. Чисто затворити рез стерилним вазелином из шприца.

Позитивна контрола: користећи исту методу инокулисати 5 биљака суспензијом од 10⁸ до 10⁹ ћелија по ml воде познате културе *R. solanacearum*, вирулентног соја бивара 2.

Негативна контрола: инокулисати 5 биљака користећи стерилни вател пуфер (пуфер за растварање талога). Биљке за позитивне и негативне контроле одвојити од осталих биљака.

Биљке гајити у карантинским просторијама до четири седмице на 25 до 30°C, уз довољну количину светла и високу влажност и адекватно заливати како би се спречило накупљање воде или увенуће због недостатка воде. У циљу спречавања унакрсне контаминације, биљке позитивне и негативне контроле гајити на јасно одвојеним столовима у стакленику или полихама у којима за раст или, у случају да је простор ограничен, побринуте се да су биљке јасно одвојене између појединих поступака у току извођења процедуре. Ако се биљке за различите узорке морају гајити близу једна другој, раздвојите их погодним платном. Пазити да не дође до унакрсне контаминације приликом прихрањивања, заливања, прегледања и сваког другог поступка с биљкама. Од кључне важности је да у стакленицима и коморима за гајење не буде никаквих инсеката јер они могу пренети бактерију с узорка на узорак. Пратити појаву симптома увенућа, спинастије, хлорозе и/или заостајање у порасту.

Из заражених биљака изоловати (Поглавље IV, тачка 1, подтачка 1.3. овог прилога) и идентификовати пречишћене културе *R. solanacearum* (Поглавље VIII, тачка 2. овог прилога).

Ако се после 3 недеље не појаве симптоми, обавити IF/PCR/изолацију на узорку делова стабљике дужине 1 cm са сваке биљке за тестирање. Ако тест буде позитиван, применити метод засејавања разређења на хранљиву подлогу.

Идентификовати све пречишћене културе *R. solanacearum*.

Тумачење резултата биолошког теста

Валидни резултати биолошког теста се добијају ако биљке у позитивној контроли показују типичне симптоме, ако се из тих биљака може поново издвојити бактерија и

ако на биљкама негативне контроле не дође до појаве симптома.

Биолошки тест је негативан ако тестиране биљке нису заражене *R. solanacearum*, а под условом да је утврђено присуство *R. solanacearum* у позитивним контролама.

Биолошки тест је позитиван ако су тестиране биљке заражене *R. solanacearum*.

2. Идентификациони тестови

Идентификација чисте културе добијених изолата *R. solanacearum* врши се коришћењем најмање два од наведених тестова који се заснивају на различитим биолошким принципима. Према потреби, укључити познате референтне изолате за сваки тест (Поглавље XI. овог прилога).

2.1. Одајивачки и ензимски тестови за идентификацију

Фенотипска својства универзално присутна или одсутна код бактерије *R. solanacearum* утврдити према методама Lelliott и Stead (1987), Klement и сар. (1990), Schaad и сар. (2001).

Тестови	Очекивани резултати
Стварање флуоресцентног пигмента	-
Гризуле <i>rolA</i> -hidrolizavata	+
Оксидацијски/Ферментацијски (O/F) тест	O+/F-
Активност каталазе	+
Тест оксидације по Kovacs	+
Редукција нитрата	+
Коришћење нитрата	+
Раст на 40 °C	-
Раст у 1% NaCl	+
Раст у 2% NaCl	-
Активност аргинин-диаминлазе	-
Разлагање желатина	-
Хидролиза скроба	-
Хидролиза оскулина	-
Стварање лезина	-

2.2. IF тест

Припремити суспензију од приближно 10⁶ ћелија по ml у IF пуферу.

Припремити двострука разређења раствора погодног антисерума. (види web страницу: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Применити IF поступак (Поглавље VIII тачка 1, подтачка 1.5. овог прилога).

IF тест је позитиван ако је IF титар културе једнак титру позитивне контроле.

2.3. ELISA тест

Напомена:

При примени само 2 теста идентификације, не примењивати други серолошки тест уз овај.

Припремите суспензију од око 10⁸ ћелија по ml у 1x PBS. Спровести одговарајући поступак ELISA са моноклоналним антителима специфичним за бактерију *R. solanacearum*.

ELISA тест је позитиван ако је ELISA вредност очитана културе једнака најмање половини вредности позитивне контроле.

2.4. PCR тест

Припремити суспензију од приближно 10⁶ ћелија по ml у Ултра чистој води.

Загрејати 100 µl суспензије ћелија бактерије у затвореним епруветама у термоблоку или у врелом воденом купатилу четири минута на 100°C. До употребе узорци се могу чувати на -16 до -24 °C.

Употребити одговарајуће PCR процедуре за умножавање специфичних фрагмената *R. solanacearum* (нпр. Seal и сар. (1993), Pastrik & Maiss (2000), Pastrik и сар. (2002), Bodazian и сар. (1999), Opina и сар. (1997), Weller и сар. (1999)).

Идентификација *R. solanacearum* је позитивна ако су PCR продукти исте величине и имају исти полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената као и позитивни контролни изолат.

2.5. FISH тест

Припремити суспензију од приближно 10⁶ ћелија по ml Ултра чисте воде.

Применити FISH поступак (Поглавље VIII, тачка 1, подтачка 1.7. овог прилога) са најмање две олиго-пробе специфичне за *R. solanacearum* (Поглавље XV, овог прилога).

FISH тест је позитиван ако су постигнуте реакције културе и позитивне контроле једнаке.

2.6. Профилување масних киселина (FAP)

Културу гајити на триптиказ-соја-агару (Oxoid) 48 сати на 28 °C.

Применити одговарајући FAP поступак (Janse, 1991; Stead, 1992).

FAP тест је позитиван ако је профил тестиране културе идентичан профили позитивне контроле. Присуство карактеристичних масних киселина: 14:0 3ОН, 16:0 2ОН, 16:1 2ОН и 18:1 2ОН, и одсуство 16:0 3ОН у великој мери указују на *Ralstonia* sp.

2.7. Методе карактеризације соја

Код сваког новог случаја изолације *R. solanacearum*, препоручује се обављање карактеризације соја, применом једне од следећих метода.

Према потреби, у сваки коришћени тест укључити познате референтне сојеве.

2.7.1. Одређивање биовара

R. solanacearum се дели на биоваре на основу способности коришћења и/или оксидације три дисахарида и три хексоза алкохола (Hayward, 1964 и Hayward и сар., 1990). Хранивне подлоге за одређивање биовара описане су у Поглављу X овог прилога. Тест се може успешно обавити инокулацијом подлоге чистим културама изолата *R. solanacearum* и инокуирањем на 28°C. Ако се подлога распореди у 96 стерилних бунарчића на одговарајућој плочи (200 µl по бунарчићу), у року од 72 сата може се уочити промена боје од маслинасто зелене до жуте, што означава позитиван резултат теста.

	Биовар				
	1	2	3	4	5
Коришћење:					
Малтоза	-	+	+	-	+
Лактоза	-	+	+	-	+
Д (+) целобиоза	-	+	+	-	+
Манитол	-	-	+	+	+
Сорбитол	-	-	+	+	+
Дулицитол	-	-	+	+	-

Биовар 2 се дели на подфенотипове помоћу додатних тестова.

	Биовар 2А (проширен у целом свету)	Биовар 2А (нађен у Чилеу и Колумбији)	Биовар 2Т (нађен у тропским подручјима)
Коришћење трезалозе	-	+	+
Коришћење мезо-инозитола	-	+	+
Коришћење Д-рибозе	-	-	+
Пектолитичка активност (1)	слаба	слаба	висока

(1) Видети Leffert и Stead (1987)

2.7.2. Геномски отисак прста

Молекуларна диференцијација сојева у комплексу *R. solanacearum* може се постићи применом неколико метода, укључујући следеће:

Анализа полиморфизма дужине рестрикционих фрагмената (RFLP) (Cook и сар., 1989).

PCR понављајућих низова, коришћењем прајмера REP, BOX и ERIC (Louws и сар., 1995, Smith и сар., 1995).

Анализа полиморфизма дужине умножених фрагмената (AFLP) (Van der Wolf и сар., 1998).

2.7.3. PCR методе

Специфични PCR прајмери (Pastrik и сар., 2002; видети Поглавље XIV овог прилога) могу се употребити за диференцијацију сојева који припадају групи 1 (биовари 3, 4 и 5) и групи 2 (биовари 1, 2А и 2Т) бактерије *R. solanacearum*, како је првобитно било утврђено методом RFLP (Cook и сар., 1989) и секвенционирањем 16S rDNA (Taghavi и сар., 1996).

3. Тест потврде

Тест провере патогености се користи за коначно потврђивање присуства *R. solanacearum* и за процену вирулентности култура идентификованих као *R. solanacearum*.

Припремити инокулум од приближно 10⁶ ћелија по ml из култура изолата који се тестира, старости 24 до 48 сати и одговарајућег изолата позитивне контроле *R. solanacearum* (нпр. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; Поглавље XI овог прилога).

Инокулисати стабљике 5 до 10 младих сејанаца осетљивих сорти парадајза или плавог патлиџана у фази 3 прва листа (Поглавље VIII, тачка 1, подтачка 1.9. овог прилога).

Инокулисане сејанце инокуирати до две недеље на 25 до 28 °C уз високу релативну влажност и адекватно заливати како би се избегло накупљање воде или стрес од суше. Код инокулације чистим културама, типично увенуће се појављује у року од 14 дана. Ако после овог периода симптоми нису присутни, добијена култура се не може потврдити као патогени изолат *R. solanacearum*.

Појаву симптома увенућа и/или епинеатије, хлорозе и заостајања у порасту.

Изолатију из билака са симптомима извршити одстрањивањем дела стабљике дужине 2 cm изнад места инокулације који се затим уситни и раствори у малој количини стерилне дестиловане воде или 50 mM фосфатном пуферу (Поглавље XII, овог прилога). Изолатија патогена се потом врши размазом добијеног мацерата на одговарајућу селективну подлогу (Поглавље X овог прилога), која се инокуира 48 до 72 сата на 28°C после чега се прати раст колонија типичних за бактерију *R. solanacearum*.

Поглавље IX

ЛАБОРАТОРИЈЕ УКЉУЧЕНЕ У ОПТИМИЗАЦИЈУ И ВАЛИДАЦИЈУ ПРОТОКОЛА

Лабораторија (1)	Место	Држава
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Boč i Linc	Аустрија
Departement Oewasbescherming	Merebeke	Белгија
Planteflektoraat	Lyngby	Данска
Central Science Laboratory	York	Енглеска
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Шкотска
Laboratoire national de la protection des végétaux, unité de bactériologie	Angers	Француска
Laboratoire national de la protection des végétaux, Station de quarantaine de la pomme de terre	Le Rheu	Француска
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Немачка
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Немачка
State Laboratory	Dublin	Ирска
Dipartimento di Scienze e Tecnologia		
Agroambiente	Bologna	Италија
Regione Veneto Unit. Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Италија
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Холандија
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Холандија
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisbon	Португал
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Шпанија
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Шпанија
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Шведска

(1) за контакт са истраживачима: видети веб-страницу: <http://forum.euro-pa.eu.int/Public/Info/Source/Home/main>

Поглавље X.

ХРАЊИВЕ ПОДЛОГЕ ЗА ИЗОЛАЦИЈУ И ГАЈЕЊЕ БАКТЕРИЈЕ *R. SOLANACEARUM*

1. Опште хранљиве подлоге

1.1. Хранљиви агар (NA)

Хранљиви агар (Difco) 23,0 g
Дестилована вода 1,0 L
Растворити састојке и стерилисати у аутоклаву на 121 °C 15 минута.

1.2. Агар са квасцем, пептоном и глукозом (YPGA)

Екстракт квасца (Difco) 5,0 g
Басто пептон (Difco) 5,0 g
D(+) глукоза (монохидрат) 10,0 g
Agar Bacto (Difco) 15,0 g
Дестилована вода 1,0 L
Растворити састојке и стерилисати у аутоклаву на 121 °C 15 минута.

1.3. Агар са сахарозом и пептоном (SPA)

Сахароза 20,0 g
Басто пептон (Difco) 5,0 g
K₂HPO₄ 0,5 g
MgSO₄ 7H₂O 0,25 g
Agar Bacto (Difco) 15,0 g
Дестилована вода 1,0 L
pH 7,2-7,4
Растворити састојке и стерилисати у аутоклаву на 121 °C 15 минута.

1.4. Kelmanova tetrazolium-подлога

Casamino киселине (Difco) 1,0 g
Bacto pepton (Difco) 10,0 g
Декстроза 5,0 g
Agar Bacto (Difco) 15,0 g
Дестилована вода 1,0 L
Растворити састојке и стерилисати у аутоклаву на 121 °C 15 минута.
Охладити на 50°C и додати раствор 2,3,5-trifēnil-tetrazolium-hlorida (Sigma), стерилисаног филтрирањем, како би се добила коначна концентрација од 50 mg/l.

2. Потврђене и одобрене селективне хранљиве подлоге

SMSA подлога (Englebrecht, 1994, измене према Elphinstone и сар., 1996)
Основна подлога
Casamino киселине (Difco) 1,0 g
Bacto pepton (Difco) 10,0 g
Глицерол 5,0 ml
Agar Bacto (Difco) (види напомену 2) 15,0 g
Дестилована вода 1,0 L
Растворити састојке и стерилисати у аутоклаву на 121 °C 15 минута.
Охладити на 50°C и додати основни водени раствор следећих састојака, стерилисан филтрирањем, како бисте добили предвиђене коначне концентрације:
Kristal violet (Sigma) 5 mg на L
Polimiksin-B-sulfat (Sigma P-1004) 600 000 U (око 100 mg) на L
Bacitracin (Sigma B-0125) 1 250 U (око 25 mg) на L

Hloramfenikol (Sigma C-3175) 5 mg на L
Penicilin-G (Sigma P-3032) 825 U (око 0,5 mg) на L
2,3,5-trifēnil-tetrazolium-hlorid (Sigma) 50 mg на L
Напомена:

Други реагенси у односу на горе наведене могу утицати на раст бактерије *R. solanacearum*.

Уместо агара Bacto (Difco) може се користити агар Oxoid бр. 1. Раст *R. solanacearum* је у том случају спорији, али се може умањити и раст конкурентних сапрофита. За формирање типичних колонија бактерије *R. solanacearum* можда ће требати 1 до 2 дана више, а црвено обојење може бити светлије и дифузније него на агару Bacto.

Повећањем концентрације бацилтрицина на 2500 U/L умањује се пораст популације конкурентних бактерија, без утицаја на раст бактерије *R. solanacearum*.

Хранљиву подлогу и основни раствор антибиотика чувати на 4°C на тамном месту и употребити у року од месец дана.

Пре употребе, са подлога се уклања површинска кондензација.

Подлоге се не смеју претерано осушити.

Након припремања сваке нове серије хранљиве подлоге, треба обавити контролу квалитета подлоге засејавањем суспензије референтне културе *R. solanacearum* (Поглавље XI овог прилога) и праћењем стварања типичних колонија после два до пет дана инкубације на 28 °C.

3. Потврђене и одобрене хранљиве подлоге за обогаћивање

SMSA течна подлога (Elphinstone и сар., 1996)

Припремити као за селективну подлогу SMSA, али оставити агар Bacto и 2,3,5-trifēnil-tetrazol-hlorid.

Модификована Wilbrink течна подлога (Caruso и сар., 2002)

Сахароза 10 g
Протеоза пептон 5 g
K₂HPO₄ 0,5 g
MgSO₄ 0,25 g
NaNO₃ 0,25 g

Дестилована вода 1 L

Стерилизовати у аутоклаву на 121°C 15 минута и охладити на 50°C.

Додати основни раствор антибиотика као за SMSA течну подлогу.

Поглавље XI.

СТАНДАРДИЗОВАНИ КОНТРОЛНИ МАТЕРИЈАЛИ

1. Стандардизовани контролни материјали доступни на тржишту

Бактеријски изолати

Препоручује се коришћење следећих бактеријских изолата као стандардног референтног материјала било за позитивне контроле (Табела 1) или током оптимизације теста у циљу избегавања унакрсних реакција (Табела 2). Сви су сојеви доступни на тржишту и могу се набавити код:

- 1) National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPB), Central Science Laboratory, York, UK;
- 2) Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Холандија;
- 3) Collection française de bactéries phytopathogènes (CFBP), INRA – Station de phytobactériologie, Angers, Француска.

Табела 1. СМТ попис референтних изолата бактерије *R. solanacearum*

Ознака NCPB	Бр. SMT	Остале ознаке	Држава порекла	Биовар
NCPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Египат	2
NCPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Турска	2
NCPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Енглеска	2

Ознака NCPRB	Бр. SMT	Остале ознаке	Држава порекла	Биовар
NCPRB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Кина	2
NCPRB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Шведска	2
NCPRB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Белгија	2
NCPRB 4156*	71 *	PD 2762, CFBP 3857	Холандија	2
NCPRB 4157	66	LNPV 15.59	Француска	2
NCPRB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Португалија	2
NCPRB 4160	69	IVIA-1632-2	Шпанија	2
NCPRB 4161	76	B3B	Немачка	2
NCPRB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	САД	1
NCPRB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Костарика	1
NCPRB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Колумбија	2
NCPRB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Перу	2T
NCPRB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Бразил	2T
NCPRB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Перу	3
NCPRB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Аустралија	3
NCPRB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Шри Ланка	4
NCPRB 4005	49	CFBP 4616, R470	Филипини	4
NCPRB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Кина	5

* Употребљивати као стандардни референтни сој бактерије *R. solanacearum* биовар 2 (раса 3)

Напомена:

Аутентичност горе наведених сојева може се гарантовати само ако су набављени из аутентичне збирке култура.

Табела 2. SMT попис референтних серолошки или генетски сродних бактерија за употребу при оптимизацији тестова детекције

Ознака NCPRB	Бр. SMT	Остале ознаке	Идентификација
NCPRB 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> ⁽¹⁾
NCPRB 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> ⁽¹⁾
NCPRB 4164	-	CFBP 2227	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽²⁾
NCPRB 4165	-	CFBP 2459	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽²⁾
NCPRB 4166	58	CFBP 3567	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽¹⁾
NCPRB 4167	60	CSL Pr1150	<i>Ralstonia</i> sp. ⁽¹⁾
		D 2778	
NCPRB 1127	53	CFBP 3575	<i>Burkholderia andropogonis</i> ⁽¹⁾
NCPRB 353	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia caryophylli</i> ⁽¹⁾
NCPRB 945	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽¹⁾
NCPRB 3708	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia glumae</i> ⁽¹⁾
NCPRB 3590	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia plantarii</i> ⁽¹⁾
NCPRB 3726	59	CFBP 3568	<i>Banana Blood Disease Bacterium</i> ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
NCPRB 4168	61	CFBP 4619	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾
		IPO 8339	
NCPRB 4169	62	IPO 1695	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾
NCPRB 4170	63	CFBP 4621	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ⁽¹⁾⁽²⁾
		IPO 8306	
NCPRB 4171	64	CFBP 4622	<i>Curtobacterium</i> sp. ⁽¹⁾⁽²⁾
		IPO 1693	
NCPRB 4172	65	IPO 1696a	<i>Pseudomonas</i> sp. ⁽¹⁾
NCPRB 4173	-	PD 2318	<i>Aureobacterium</i> sp. ⁽²⁾
NCPRB 4174	81	IVIA 1844.06	<i>Flavobacterium</i> sp. ⁽¹⁾⁽²⁾

(1) Сој који у серолошким тестовима (IF и/или ELISA) може узакрсно реаговати са поликлоналним серумима.

(2) Сој од кога се у неким лабораторијама може узнети PCR продукт дужине 1,2 kb који се очекује при употреби специфичних праймера OLI-1 и Y-2 (Поглаве XIV овог прилога)

(3) У већини тестова би могао дати узакрсну реакцију, али је познато да се јавља само на бињима у Индонезији.

Доле наведени стандардни контролни материјал може се добити из збирке култура NCPRB.

Лиофилизоване грануле екстракта кромпира из 200 здравих кртола кромпира као негативна контрола за све тестове.

Лиофилизоване грануле екстракта кромпира из 200 здравих кртола кромпира са 10^3 до 10^4 и 10^4 до 10^6 ћелија *R. solanacearum* биовар 2 (сој NCPRB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) као позитивна контрола за серолошке и PCR тестове. С обзиром да лиофилизација утиче на виталност ћелија, оне нису прикладне као стандардна контрола за изолацију или биолошке тестове.

Формалином фиксирани суспензије бактерије *R. solanacearum* биовар 2 (сој NCPRB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) са 10^6 ћелија/ml као позитивна контрола за серолошке тестове.

2. Припрема позитивних и негативних контрола за основне тестове провере (PCR/IF и FISH)

Направити суспензију културе вирулентног соја *R. solanacearum* раса 3/биовар 2 (инр. сој NCPRB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) гајене 48 сати на SMSA основној подлози у 10 mM фосфатном буферу концентрације приближно 2×10^8 cfu/ml. То је обично слабо мутна суспензија оптичке густине 0,15 на 600 nm.

Извадити конус пупчаног дела из 200 кртола беле сорте кромпира за које је познато да нису заражене бактеријом *R. solanacearum*.

Обринути конусе уобичајеном методом и ресуспендовати талог у 10 ml.

Припремити 10 стерилних микропрувета од 1,5 ml са 900 µl ресуспендованог талог.

У прву микропрувету додати 100 µl суспензије *R. solanacearum* и измешати на вортексу. У следећих пет микропрувета припремити децимална разређена бактеријске суспензије.

Ових шест микропрувета са зараженим екстрактом користити за позитивну, а четири микропрувета са незараженим екстрактом користити за негативну контролу. У складу с тим, означити микропрувете.

У микропруветама од 1,5 ml припремити аликоте од 100 µl тако да се добије девет копија сваког контролног узорка. До употребе чувати на -16 до -24 °C.

Присуство и количину присутне *R. solanacearum* у контролним узорцима при потврди IF тестом.

За PCR тест, извршити екстракцију ДНК у позитивним и негативним контролним узорцима за сваку серију узорка за тестирање.

За IF и FISH тестове, извршити тестирање позитивних и негативних контролних узорка за сваку серију узорка за тестирање. Код IF, FISH и PCR тестова, потребно је утврдити присуство *R. solanacearum* у концентрацији од најмање 10^3 и 10^4 ћелија/ml код позитивних контрола и ни у једној негативној контроли.

Поглавље XII.

ПУФЕРИ ЗА ТЕСТ ПРОЦЕДУРЕ

Стерилисани пуфери који нису отворени могу се чувати до једне године.

1. Пуфери за екстракцију

1.1. Екстракциони пуфер (50 mM фосфатни пуфер, pH 7,0)

Овај пуфер се користи за екстракцију бактерије из биљног ткива хомогенизацијом или тресењем.

NaH₂PO₄ (анхидровани) 4,26 g

KH₂PO₄ 2,72 g

Дестилована вода 1,00 L

Растворити састојке, проверити pH и стерилисати у аутоклаву на 121°C 15 минута.

Следећи састојци могу бити корисни:

	Назив	Количина (по L)
Пазулане Labrol	Дефлокуант*	0,5 g
DC сизинон против стварања пене	Средство против стварања пене *	1,0 ml
Тетаналатјум picrobital	Антиоксидант	1,0 g
Potiviniolpidon-4000 (PVP-40)	Везање PCR инхибитора	50 g

* За употребу код методе екстракције хомогенизацијом

1.2. Пелет пуфер (Пуфер за растварање талог-10 mM фосфатни пуфер, pH 7,2)

Овај пуфер се користи за ресуспендовање и разређивање екстракта конуса извађених из пупчаних делова кртола кромпира, после концентровања талог центрифугирањем.

NaH₂PO₄ x 12H₂O 2,7 g

NaH₂PO₄ x 2H₂O 0,4 g

Дестилована вода 1,00 L

Растворити састојке, проверити pH и стерилисати у аутоклаву на 121°C 15 минута.

2. Пуфери за IF тест

2.1. IF пуфер (10 mM фосфатни пуфер с додатком соли (PBS), pH 7,2)

Овај пуфер се користи за разређивање агитела.

NaH₂PO₄ x 12H₂O 2,7 g

NaH₂PO₄ x 2H₂O 0,4 g

NaCl 8,0 g

Дестилована вода 1,0 L

Растворити састојке, проверити pH и стерилисати у аутоклаву на 121 °C 15 минута.

2.2. IF пуфер – Tween

Овај пуфер се користи за испирање IF плочица.

IF пуферу додати 0,1% Tween 20.

2.3. Фосфатни пуфер с глицеролом pH 7,6

Овај пуфер се користи као раствор за прекривање бунарчића у IF тесту како би се појачала флуоресценција.

NaH₂PO₄ x 12H₂O 3,2 g

NaH₂PO₄ x 2H₂O 0,15 g

Глицерол 50 ml

Дестилована вода 100 ml

Комерцијални раствори нпр. Vectashield® (Vector Laboratories) или Citifluor® (Leica).

3. Пуфери за индиректни ELISA тест

3.1. Пуфер за облањање двооструке јачине, pH 9,6

Na₂CO₃ 6,36 g

NaHCO₃ 11,72 g

Дестилована вода 1,0 L

Растворити састојке, проверити pH и стерилисати у аутоклаву на 121 °C 15 минута.

Као антиоксиданс може се додати натријум сулфит (0,2%).

3.2. 10X фосфатни пуфер са додатком соли (PBS), pH 7,4

NaCl 80,0 g

KH₂PO₄ 2,0 g

Na₂HPO₄ x 12H₂O 29,0 g

KCl 2,0 g

Дестилована вода 1,0 L

3.3. PBS-Tween

10X PBS 100 ml

10% Tween 20 5 ml

Дестилована вода 895 ml

3.4. Пуфер за блокирање антитела (мора бити свежег припремљен)

10X PBS 10,0 ml

Potiviniolpidon-44000 (PVP-44) 2,0 g

10 % Tween 20 0,5 ml

Млеко у праху 0,5 g

Дестилована вода Допуните до 100 ml

3.5. Раствор супстрата алкалне фосфатазе, pH 9,8

Dietanolamin 97 ml

Дестилована вода 800 ml

Помешати и подесити pH на 9,8 концентрованом HCl.

Додајте 0,2 g MgCl₂.

Растворите две таблете супстрата фосфатазе од 5 mg (Sigma) на 15 ml раствора.

4. Пуфери за DASI ELISA тест

4.1. Пуфер за облањање, pH 9,6

Na₂CO₃ 1,59 g

NaHCO₃ 2,93 g

Дестилована вода 1000 ml

Растворити састојке и подесити pH на 9,6.

4.2. 10X фосфатни буфер са додатком соли (PBS), pH 7,2 до 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
Дестилована вода	1000 ml

4.3. PBS-Tween

10X PBS	50 ml
10% Tween	20,5 ml
Дестилована вода	950 ml

4.4. Буфер сулфата, pH 9,8

Диетаноламин	100 ml
Дестилована вода	900 ml
Помешати и додесити pH на 9,8 концентрованом HCl.	

Поглавље XIII.

ОДРЕЂИВАЊЕ НИВОА КОНТАМИНАЦИЈЕ У IF И FISH ТЕСТОВИМА

1. Израчунати просечан број типичних флуоресцентних ћелија по пољном пољу (с)

$c = \frac{1}{2} \frac{S}{G} \times 2K2$
 где је
 i = коефицијент поља (варира од 8 до 24 зависно од типа окулар)
 K = коефицијент тубе (цеви) (1 или 1,25)
 G = повећање објектива (100x, 40x итд.).

2. Израчунати број типичних флуоресцентних ћелија по бунарчићу микроскопске плочице (С)

$C = c \times S/s$
 где је
 S = површина бунарчића IF плочице са више бунарчића и
 s = површина поља објектива.

3. Израчунати број типичних флуоресцентних ћелија по ml ресуспендованог талога (N)

$N = C \times 1000/y \times F$
 где је
 y = запремина ресуспендованог талога у сваком бунарчићу, и
 F = фактор разређења ресуспендованог талога.

Поглавље XIV.

ПОТВРЂЕНИ И ОДОБРЕНИ ПРОТОКОЛИ И РЕАГЕНСИ ЗА PCR

Напомена:

Предиминарна тестирања треба да омогуће поновљиву детекцију од најмање 10^3 до 10^4 ћелија *R. solanacearum* по мл екстракта узорка.

Током предиминарних тестирања не сме доћи до појаве лажно позитивних резултата код одабраних бактеријских изолат.

(Поглавље XI овог прилога)

1. Протокол за мултиплекс PCR са унутрашњом PCR контролом (Seal и сар., 1993)

1.1. Олигонуклеотидни прајмери

Узводни прајмер OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'

Низводни прајмер Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Очекивана дужина умноженог производа из ДНК бактерије *R. solanacearum* = 288 bp (пар прајмера PSA).

1.2. PCR реакциони микс

Реагенс	Количина по реакцији	Концентрација
Стерилна Ултра чиста вода	17,65 µl	
10x PCR буфер ¹ (15mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
Смеса d-NTP (20mM)	0,25 µl	0,2 mM
Прајмер OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Прајмер Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Taq полимераза (5 U/µl) ¹	0,1 µl	0,5 U
Запремина узорка	2,0 µl	
Укупна запремина	25,0 µl	

1) алтернатива методе је извршена уз коришћење Taq полимеразе Perkin Elmer (AmpliTag или Gold) и Gibco BRL.

1.3. Услови ПЦР реакције

Извести следећи програм:
 1 циклус: 2 минута на 96 °C (денатурација ланца ДНК)
 35 циклуса: 20 секунди на 94 °C (денатурација ланца ДНК)
 20 секунди на 68 °C (везивање прајмера)
 30 секунди на 72 °C (хипердизаја)
 1 циклус: 10 минута на 72 °C (коначно продужавање)
 држати на 4 °C

Напомена:

Оптимални услови коришћења овог програма су дефинисани за коришћење на PCR Perkin Elmer 9600 thermal cycler-у. Модификација трајања корака циклуса 35 је вероватно потребна у случају употребе других модела thermal cycler-а.

1.4. Анализа продуката умножавања рестрикционим ензимом

PCR производи умножени из ДНК *R. solanacearum* испољавају карактеристичне полиморфизме у дужини рестрикционих фрагмената са ензимом Ava II после инкубације на 37 °C.

2. Протокол за PCR према Pastrik и Maiss (2000)

2.1. Олигонуклеотидни прајмери

Узводни прајмер Ps-1 5'- agt cga acg gca gcg ggg g -3'

Низводни прајмер Ps-2 5'- ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca -3'

Очекивана дужина умноженог производа из ланца ДНК бактерије *R. solanacearum* = 553 bp.

2.2. PCR реакциони микс

Реагенс	Количина по реакцији	Концентрација
Стерилна Ултра чиста вода	16,025 µl	
10x PCR буфер ¹ (15mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (фракција V) (10%)	0,25 µl	0,1%
Смеса d-NTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Прајмер Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Прајмер Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq полимераза (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Запремина узорка	5,0 µl	
Укупна запремина	25,0 µl	

(1) алтернатива методе је извршена уз коришћење Taq полимеразе Perkin Elmer (AmpliTag или Gold) и Gibco BRL.

Напомена:
Оптимални услови коришћења овог програма су дефинисани за коришћење на PCR MJ Research PTC 200 thermal cycler-у са Gibco Taq полимеразом. При истим концентрацијама може се користити и Perkin Elmer AmpliTaq и пуфер.

2.3. Услови PCR реакције

Извести следећи програм:

1 циклус: 5 минута на 95 °C (денатурација ланца ДНК)
35 циклуса: 30 секунди на 95 °C (денатурација ланца ДНК)
30 секунди на 68 °C (везивање прајмера)
45 секунди на 72 °C (продужавање копије)
1 циклус: 5 минута на 72 °C (коначно продужавање)
држати на 4 °C

Напомена:

Оптимални услови коришћења овог програма су дефинисани за коришћење на PCR MJ Research PTC 200 thermal cycler-у. Модификација трајања корака циклуса 35 је можда потребна у случају употребе других модела thermal cycler-а.

2.4. Анализа продукција умножавана рестрикционим ензимом

PCR производи умножени из ДНК *R. solanacearum* испољавају карактеристичне полиморфизме у дужини рестрикционих фрагмената са ензимом Taq I после инкубације на 65°C 30 минута. Рестрикциони фрагменти добијени из специфичног фрагмента *R. solanacearum* су величине 457 bp и 96 bp.

3. Протокол за мултиплекс PCR са унутрашњом PCR контролом (Pastrik и сар, 2000)

3.1. Олигонуклеотидни прајмери

Узводни прајмер RS-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Низводни прајмер RS-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Узводни прајмер NS-5-F 5'-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3'

Низводни прајмер NS-6-R 5'-GCA TCA CAG ACCTGT TAT TGC CTC-3'

Очекивана дужина умноженог производа из ДНК *R. solanacearum* = 718 bp (пар прајмера RS).

Очекивана дужина умноженог производа из 18S rRNA унутрашње контроле = 310 bp (пар прајмера NS).

3.2. ПЦР реакциони микс

Реагенс	Количина по реакцији	Коначна концентрација
Стерилна Ултра чиста вода	12,625 µl	
10x PCR пуфер ⁽¹⁾ (15mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (фракција V) (10%)	0,25 µl	0,1%
Смеса d-NTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Прајмер RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Прајмер RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Прајмер NS-5-F (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Прајмер NS-6-R (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Taq полимераза (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Запремина узорка	5,0 µl	
Укупна запремина	25,0 µl	

(1) Метода је потврђена Taq полимеразом Perkin Elmer (AmpliTaQ или Gold) и Gibco BRL.

(2) Концентрације прајмера NS-5-F и NS-6-R су оптимизоване за екстракцију нуклеуса изопних делова кретања методом хомогенизације и преципитације ДНК према Fاضик-у (2000). Ако се екстракција обавља трешњем или ако се применују друге методе издвајања ДНК, потребно је поново оптимизовати концентрације реагенса.

3.3. Услови PCR реакције

Извести следећи програм:

1 циклус: 5 минута на 95 °C (денатурација ланца ДНК)

35 циклуса: 30 секунди на 95 °C (денатурација ланца ДНК)

30 секунди на 58 °C (везивање прајмера)

45 секунди на 72 °C (хибридизација)

1 циклус: 5 минута на 72 °C (коначно продужавање)
држати на 4 °C

Напомена:

Оптимални услови коришћења овог програма су дефинисани за коришћење на PCR MJ Research PTC 200 thermal cycler-у. Модификација трајања корака циклуса 35 је можда потребна у случају употребе других модела thermal cycler-а.

3.4. Анализа продукција умножавана рестрикционим ензимом

PCR производи умножени из ДНК *R. solanacearum* испољавају карактеристичне полиморфизме у дужини рестрикционих фрагмената са ензимом Bsm I или изосхизомером (нпр. Mva 1269 I) после инкубације на 65°C у трајању од 30 минута.

4. Протокол за специфичан PCR биовара (Pastrik и сар, 2001)

4.1. Олигонуклеотидни прајмери

Узводни прајмер Rs-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Низводни прајмер Rs-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Низводни прајмер Rs-3-R 5'-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3'

Очекивана дужина умноженог производа из ДНК *R. solanacearum*:

са Rs-1-F/Rs-1-R = 718 bp

са Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp

4.2. PCR реакциони микс

Специфични PCR за биовар 1/2

Реагенс	Количина по реакцији	Коначна концентрација
Стерилна Ултра чиста вода	12,925 µl	
10x PCR пуфер ⁽¹⁾ (15mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (фракција V) (10%)	0,25 µl	0,1%
Смеса d-NTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Прајмер Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Прајмер Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq полимераза (5U/µl) (1)	0,2 µl	1,0 U
Запремина узорка	5,0 µl	
Укупна запремина	25,0 µl	

(1) Методе су потврђене Taq полимеразом Perkin Elmer (AmpliTaQ) и Gibco BRL.

Специфични ПЦР за биовар 3/4/5

Реагенс	Количина по реакцији	Коначна концентрација
Стерилна Ултра чиста вода	14,925 µl	
10x PCR пуфер ⁽¹⁾ (15mM MgCl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (фракција V) (10%)	0,25 µl	0,1%
Смеса d-NTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Прајмер Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Прајмер Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq полимераза (5U/µl) (1)	0,2 µl	1,0 U
Запремина узорка	5,0 µl	
Укупна запремина	25,0 µl	

(1) Методе су потврђене Taq полимеразом Perkin Elmer (AmpliTaQ или Gold) и Gibco BRL.

4.3. Услови PCR реакције

Извести следећи програм за специфичне реакције за биовар 1/2 и биовар 3/4/5:

1 циклус: 5 минута на 95°C (денатурација ланца ДНК)
35 циклуса: 30 секунди на 95°C (денатурација ланца ДНК)
30 секунди на 58 °C (везивање прајмера)
45 секунди на 72 °C (хибридизација)
1 циклус: 5 минута на 72 °C (коначно продужавање)
држати на 4 °C

Напомена:

Оптимални услови коришћења овог програма су дефинисани за коришћење на PCR MJ Research PTC 200 thermal cycler-у. Модификација трајања корака циклуса 35 је можда потребна у случају употребе других модела thermal cycler-a.

4.4. Анализа производња умножавана рестрикционим ензимом

PCR производи умножени из ДНК *R. solanacearum* са прајмерима Rs-1-F и Rs-1-R испољавају карактеристичне полиморфизме у дужини рестрикционих фрагмената са ензимом Bsm I или Hae III (нпр. Mva 1269 I) после инкубације на 65 °C у трајању од 30 минута. PCR производи умножени из ДНК бактерије *R. solanacearum* са прајмерима Rs-1-F и Rs-3-R немају места рестрикције.

5. Припрема боје за електрофору

5.1. Бромфенол плаво (10%-тни концентровани раствор)

Бромфенол плаво 5 g
Дестилована вода (бидестилована) 50 ml

5.2. Пуфер за бојење

Глисерол (86%) 3,5 ml
Бромфенол плаво (5.1) 300 µl
Дестилована вода (бидестилована) 6,2 ml

5.3. 10x Tris ацетатни и EDTA пуфер (TAE), pH 8,0

Трис пуфер 48g
Глицијална сирћетна киселина 11,42 ml
EDTA (динатријумова со) 3,72 g
Дестилована вода 1,00 L
Разредите 1x пре употребе.
Доступан је и на тражишту (нпр. Инвитроген или замена).

Поглавље XV.

ПОТВРЂЕНИ И ОДОБРЕНИ РЕАГЕНСИ ЗА FISH ТЕСТ

1. Олиго – пробе

Специфична проба за *R. solanacearum* OLI-1-CY3: 5'-ggc agg tag caa gct acc ccc-3'
Неспецифична еубактеријска проба EUB-338-FITC: 5'-gct gcc tcc cgt agg agt -3'

2. Раствор за фиксирање

Раствор за фиксирање садржи параформалдехид који је токсичан. Носити рукавице и не удисати га. Препоручује се рад у дигестору.

2.1. Загрејати 9 ml воде за употребу у процедурама молекуларне биологије (нпр. Ультра чисте воде) на око 60 °C и додати 0,4 g параформалдехида. Параформалдехид се раствара после додавања 5 капи 1N NaOH и мешања на магнетској мешалици.

2.2. Подесити pH на 7,0 додајући 1 ml 0,1M фосфатног пуфера (PB; pH 7,0) и 5 капи 1N HCl. Вредност pH проверити и помоћу индикатор трака и ако је потребно подесити pH помоћу HCl или NaOH.

У растворима с параформалдехидом не употребљавати pH-метар.

2.3. Профилирати раствор кроз мембрански филтер од 0,22 µm и до даље употребе чувати на 4 °C и заштитити од прашице.

3. 3X Hybmix

NaCl 2,7 M
Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)
EDTA (стерилизована филтрирањем и у аутоклаву) 15 mM

Разредите до 1x према потреби

4. Раствор за хибридизацију

1X Hybmix
Natrijum dodecil sulfat (SDS) 0,01%
Formamid 30%
Проба EUB 338 5 ng/µl
Проба OLI-1 или OLI-2 5 ng/µl

Припремити количине раствора за хибридизацију према прорачунима у Табели 1. За сваку плочицу (са 2 различита узорка у дупликату) треба 90 µl раствора за хибридизацију. Важно: формамид је веома токсичан и зато носити рукавице и предузети потребне мере опреза!

Табела 1. Предложене количине за припремање смесе за хибридизацију

Број стаклица	1	4	6	8	10
Стерилна Ултра чиста вода	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
Проба EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Проба OLI-1 или OLI-2 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Укупна запремина (µl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

Напомена:

Све растворе који садрже олиго-пробе осетљиве на светлост чувати у мраку на -20 °C.

Током употребе заштитите их од директне сунчеве светлости или електричног светла.

5. 0,1M фосфатни пуфер, pH 7,0

Na₂HPO₄ 8,52 g
KH₂PO₄ 5,44 g
Дестилована вода 1,00 L
Растворите састојке, проверите pH и стерилишите у аутоклаву на 121 °C 15 минута.

Поглавље XVI.

УСЛОВИ ГАЈЕЊА ПЛАВОГ ПАТЛИЦАНА И ПАРАДАЈЗА

Посејати семе парадјаја (*Lycopersicon esculentum*) и плавог патлицана (*Solanum melongena*) у пастеризовани компост за семе. Пресајати сејање са потпуно развијеним котиледонима (10 до 14 дана) у пастеризовану компост у саксијама.

Пре инокулације, парадјај и плави патлицан би требало да се гаји у стакленику под следећим условима:

Дужина дана: 14 сати или природна дужина дана, ако је дужа од 14 сати;

Температура:
дневна: 21 до 24 °C
ноћна: 14 до 18 °C

Осетљива сорта парадјаја: „Moneymaker”

Осетљива сорта плавог патлицана „Black Beauty”

Произвођач: web страница: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>