

Na osnovu člana 9. stav (3) člana 10. stav (5), člana 12. stav (3) člana 41. stav (4) i člana 60. stav (5) Zakona o zaštiti zdravlja bilja ("Službeni glasnik BiH", broj 23/03), Ministarstvo vanjske trgovine i ekonomskih odnosa Bosne i Hercegovine, na prijedlog Uprave Bosne i Hercegovine za zaštitu zdravlja bilja, donosi

PRAVILNIK

O PROVOĐENJU SISTEMSKE KONTROLE I PREDUZIMANJU MJERA U CILJU SPRJEČAVANJA UNOŠENJA, ŠIRENJA I KONTROLE SMEĐE TRULEŽI KROMPIRA I BAKTERIJSKOG UVENUČA NA KROMPIRU I PARADAJZU PROUZROKOVANIH BAKTERIJOM *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI *ET AL.*

Član 1.

(Predmet)

Ovim Pravilnikom se propisuje način provođenja sistemske kontrole radi utvrđivanja prisutnosti i određivanja rasprostranjenosti smeđe truleži krtola krompira i bakterijskog uvenuća krompira i paradajza, koju prouzrokuje fitopatogena bakterija *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, ranije poznata pod nazivom *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith (u daljnjem tekstu: "štetni organizam"), te, u slučaju pojave štetnog organizma, mjere za sprječavanje širenja i suzbijanja radi iskorjenjivanja, kao i postupci laboratorijskog testiranja za dijagnosticiranje, detekciju i identifikaciju ovog štetnog organizma.

Član 2.

(Definicije)

Izrazi upotrijebljeni u Zakonu o zaštiti zdravlja bilja ("Sl.glasnik BiH", broj 23/03), (u daljnjem tekstu: "Zakon"), upotrebljavaju se i u ovom Pravilniku, a specifični izrazi upotrijebljeni u ovom Pravilniku imaju slijedeće značenje:

- a) **prostorije** - bilo koje zgrade, zemljište, prijevozna sredstva ili drugi objekti koje upotrebljava isti proizvođač;
- b) **jedinica zaštićene proizvodnje usjeva** - odnosi se na rasadnike, staklenike, plastenike, plastične tunele i tople lijehe za biljke;
- c) **mjesto proizvodnje** - znači polje ili više polja ili jedinica zaštićene proizvodnje usjeva koji funkcioniraju kao jedinstvena proizvodna ili poljoprivredna jedinica;
- d) **godina rasta** - znači period od dvanaest mjeseci koji počinje kada klimatski uslovi u izvjesnim oblastima dozvoljavaju početak proizvodnje krompira;
- e) **sezona proizvodnje** - odnosi se na period od sadnje biljaka ili krtola do njihovog skladištenja;
- f) **fitosanitarne službe** - nadležni organi u entitetima i Brčko Distriktu Bosne i Hercegovine;
- g) **ovlaštena laboratorija** - laboratorija koja je osposobljena za testiranje ovog štetnog organizma i koja je dobila ovlaštenje u skladu sa članom 68. stav (1) Zakona;
- h) **stručno ovlašteno lice** - lice koje obavlja poslove po ovlaštenju iz člana 68. stav (6) Zakona.

Član 3.

(Sistemska kontrola)

(1) Uprava Bosne i Hercegovine za zaštitu zdravlja bilja (u daljnjem tekstu: "Uprava"), u saradnji sa nadležnim organima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, propisuje godišnji program sistemske kontrole za potvrđivanje odsustva ili prisustva štetnog organizma na osnovu jasnih naučnih i statističkih

principa i biologije štetnog organizma. Ova sistemska kontrola provodi se nad slijedećim biljkama domaćinima:

- a) krompirom (*Solanum tuberosum* L.), uključujući krtole, isključujući sjeme u botaničkom smislu;
 - b) paradajzom (*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw, isključujući plodove i sjeme, (u daljnjem tekstu: "glavne biljke domaćini").
- (2) Sistemska kontrolu iz stava (1) ovog člana vrše fitosanitarne inspekcije entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine i ovlaštene laboratorije.
- (3) Uprava, u saradnji sa fitosanitarnim službama i ovlaštenim laboratorijama vrši procjenu rizika na prisustvo štetnog organizma radi utvrđivanja drugih mogućih izvora zaraze koji prijete proizvodnji glavnih biljaka domaćina. Ukoliko se procijeni da postoji rizik od širenja štetnog organizma, utvrđenog za vrijeme procjene, propisuje u proizvodnim područjima glavnih biljaka domaćina, da se sistemska kontrola na štetni organizam vrši i na biljkama koje nisu glavne biljke domaćini, uključujući samonikle biljke iz porodice *Solanaceae* (u daljnjem tekstu: "druge biljke domaćini"), kao i na površinskim vodama koje se upotrebljavaju za navodnjavanje ili prskanje glavnih biljaka domaćina i na tekućem otpadu od industrijske prerade ili prostorija za pakiranje glavnih biljaka domaćina koji se upotrebljava za navodnjavanje ili prskanje glavnih biljaka domaćina. Sistemska kontrola za štetni organizam može se vršiti i na različitim materijalima, kao što su supstrati koji se koriste za rast biljaka, zemljište i čvrsti otpad od industrijske prerade ili prostorija za pakiranje glavnih biljaka domaćina.
- (4) Inspekcijska kontrola, broj, porijeklo, distribucija i vrijeme uzimanja uzoraka određuje se godišnjim programom sistemske kontrole propisanim u stavu (1) ovog člana.
- (5) Godišnjim programom sistemske kontrole određuje se finansiranje, na nivou entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine kao i državnom nivou, laboratorijskih uzoraka po zahtjevu fitosanitarnih inspektora bilo da su nalazi pozitivni ili negativni.

Član 4.

(Način provođenja sistemske kontrole)

Za vrijeme provođenja programa godišnje sistemske kontrole ili u slučaju sumnje na prisustvo štetnog organizma, fitosanitarni inspektor:

- a) u slučaju krompira:
 - 1) obavlja, u odgovarajuće vrijeme, vizuelni inspekcijski pregled sjemenskog krompira i krompira koji se ne namjerava saditi (u daljnjem tekstu: "merkantilni krompir") i uzima uzorke tokom vegetacijskog perioda ili iz skladišta. Ovi uzorci se podvrgavaju vizuelnoj inspekciji rezanjem krtola;
 - 2) uzorke sjemenskog krompira i merkantilnog krompira dostavlja u ovlaštenu laboratoriju. Testiranje se vrši u skladu sa metodologijom testiranja koju je propisala Evropska unija (u daljnjem tekstu: "propisana procedura"), a detaljna metodologija objašnjena je u prilogima koji su sastavni dio ovog Pravilnika;
- b) u slučaju paradajza obavlja vizuelni inspekcijski pregled, u odgovarajuće vrijeme, presadnica koje su namijenjene tržišnoj proizvodnji i, gdje je potrebno, uzima uzorke za testiranje u ovlaštenoj laboratoriji u skladu sa propisanom procedurom;
- c) u slučaju drugih biljaka domaćina, površinskih voda uključujući tekući otpad, i gdje je potrebno, i drugog materijala, kao što su supstrati koji se koriste za rast biljaka, zemljište i čvrsti otpad od industrijske prerade ili prostorija za pakiranje glavnih biljaka domaćina, u skladu sa sistemskom kontrolom koja je propisana u članu 3. stav (3) ovog Pravilnika, uzima uzorke za testiranje u ovlaštenoj laboratoriji u skladu sa propisanom procedurom.

Član 5.

(Evidencije)

- (1) Uprava vodi evidenciju o pojavi i nalazima o štetnim organizmima, evidenciju o kontroli u svrhu pružanja informacija na nivou Bosne i Hercegovine i na međunarodnom nivou.
- (2) Nadležne institucije entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine vode evidencije u svrhu pružanja informacija na entitetskom nivou.
- (3) Godišnja evidencija o detaljima i rezultatima sistemske kontrole sadrži slijedeće podatke:
 - a) u slučaju nadzora krompira:
 - 1) ukupno procijenjeno područje na kojem se uzgaja sjemenski i merkantilni krompir u hektarima;
 - 2) raspodjela po sjemenskim kategorijama i proizvodnji, gdje je potrebno, po regionima;
 - 3) broj i vrijeme uzimanja uzoraka za testiranje;
 - 4) broj vizuelnih inspekcijskih pregleda na parceli;
 - 5) broj i veličina uzorka za vizuelni inspekcijski pregled krtola;
 - b) u slučaju kontrole presadnica paradajza namijenjenog za dalju sadnju:
 - 1) procijenjeni ukupni broj biljaka;
 - 2) broj vizuelnih inspekcija;
 - c) u slučaju sistemske kontrole drugih biljaka domaćina, uključujući samonikle biljke iz porodice *Solanaceae*:
 - 1) vrste biljaka;
 - 2) broj i vrijeme uzimanja uzoraka;
 - 3) područje sa kojeg je uzet uzorak ili površinska voda;
 - 4) način analize;
 - d) u slučaju sistemske kontrole vode i tekućeg otpada usljed industrijske prerade ili prostorija za pakiranje glavnih biljaka domaćina:
 - 1) broj i vrijeme uzimanja uzoraka;
 - 2) područje sa kojeg je uzet uzorak, površinske vode, lokacije prostorija;
 - 3) način analize.

Član 6.

(Izveštavanje u slučaju zaraze ili sumnje na zarazu)

Ukoliko vlasnik ili bilo koje lice koje posumnja na prisustvo štetnog organizma u uzgojenim usjevima glavnih biljaka domaćina u ubranim, uskladištenim ili krtolama krompira koje su u prometu, na drugim biljkama domaćinima ili samoniklim biljkama iz porodice *Solanaceae*, obavezni su, bez odlaganja, obavijestiti nadležnog fitosanitarnog inspektora.

Član 7.

(Sumnja na zarazu)

- (1) Na zarazu štetnim organizmom opravdano se sumnja:
 - a) ako su uočeni simptomi bolesti;

b) ako je rezultat brzog skrining testa ili drugih relevantnih metoda pozitivan, u skladu sa propisanim procedurama.

(2) Da bi se potvrdila ili opovrgla sumnja na zarazu štetnim organizmom, fitosanitarni inspektor odmah uzima uzorak i dostavlja ga ovlaštenoj laboratoriji.

(3) Do dobijanja konačnih rezultata laboratorijskog testiranja iz stava (2) ovog člana fitosanitarni inspektor rješenjem naređuje slijedeće mjere:

a) zabranjuje prijevoz/prijenos i promet biljaka i krtola svih proizvoda, količina ili pošiljki odakle su uzeti uzorci. Ukoliko se radi o uveznoj pošiljci primjenjuju se odredbe Pravilnika o mjerama za sprječavanje unošenja, širenja i suzbijanja štetnih organizama na bilju, biljnim proizvodima i reguliranim objektima;

b) određuje druge mjere koje je propisala Uprava u cilju utvrđivanja porijekla sumnjive pojave;

c) određuje odgovarajuće dodatne preventivne mjere koje je propisala Uprava na osnovu nivoa procijenjenog rizika da bi spriječila širenje štetnog organizma. Ove mjere se posebno primjenjuju kod proizvodnje glavnih biljaka domaćina i prijevoza količina sjemenskog krompira proizvedenog na mjestu proizvodnje odakle su uzeti uzorci iz tačke a) ovog stava.

Član 8.

(Čuvanje dokaznog materijala)

U slučaju sumnje na pojavu štetnog organizma za koji je dobijen pozitivan rezultat skrining testa, a dok se ne završi laboratorijsko testiranje, ovlaštena laboratorija čuva i konzervira na odgovarajući način:

a) sve uzorkovane krtole, i kada je to moguće, sve uzorkovane biljke;

b) bilo koji ostatak ekstrakta i dodatno pripremljeni materijal za skrining test ili za druge metode testiranja, npr. imunofluorescentni slajdovi ili bilo koji odgovarajući materijal koji se upotrebljava u laboratorijskim testiranjima;

c) svu odgovarajuću dokumentaciju.

Član 9.

(Postupak u slučaju potvrđene zaraze)

Ako se laboratorijskim testiranjem iz člana 7. stav (2) ovog Pravilnika potvrdi prisustvo štetnog organizma u uzorku glavnih biljaka domaćina Uprava, u saradnji sa fitosanitarnim službama, ima obavezu, na osnovu jasnih naučnih principa i biologije štetnog organizma:

a) provesti istraživanje u skladu sa članom 10. ovog Pravilnika da bi se utvrdio obim, te jedan ili više primarnih izvora zaraze;

b) označiti kao zaražene:

1) glavne biljke domaćine, pošiljku ili partiju iz koje je uzet uzorak;

2) mašine, opremu, prijevozna sredstva, skladišta ili njihove dijelove, i sve druge objekte i predmete, uključujući materijal za pakiranje, koji su bili u dodiru sa glavnim biljkama domaćinima od kojih je uzet uzorak;

3) mjesta proizvodnje, polja i, kada je to primjereno, zaštićene prostore namijenjene proizvodnji bilja, bilo da je uzorak uzet u vrijeme uzgoja ili nakon vađenja ili berbe glavnih biljaka domaćina;

c) odrediti obim moguće zaraze;

d) na osnovu obima potvrđene zaraze, obima moguće zaraze i područja mogućeg širenja organizma, po hitnom postupku, odrediti posebno regulirano područje u kojem se provode mjere propisane ovim Pravilnikom.

Član 10.

(Obim i primarni izvor zaraze glavnih biljaka domaćina)

Uprava, u saradnji sa fitosanitarnim službama, ima obavezu da naloži provođenje istraživanja iz člana 9. ovog Pravilnika da bi se utvrdio obim, te jedan ili više primarnih izvora zaraze glavnih biljaka domaćina uzimajući u obzir:

a) mjesta proizvodnje:

1) na kojima se proizvodi ili je bio proizveden krompir, koji je klonski srodan sa krompirom na kojem je utvrđena zaraza štetnim organizmom;

2) na kojima se proizvodi ili je bio proizveden paradajz koji potiče iz istog izvora kao i paradajz za koji je ustanovljeno da je zaražen štetnim organizmom;

3) na kojima se proizvodi ili je bio proizveden krompir ili paradajz koji je bio pod kontrolom fitosanitarnog inspektora zbog sumnje na prisustvo štetnim organizmom;

4) na kojima se proizvodi ili je bio proizveden krompir koji potiče od klonski srodnog krompira koji je uzgajan na mjestu proizvodnje za koje je utvrđeno da je zaraženo štetnim organizmom;

5) na kojima se proizvodi ili je bio proizveden krompir ili paradajz na parcelama u susjedstvu zaraženog mjesta proizvodnje, uključujući i ona mjesta proizvodnje koja dijele proizvodnu opremu i prostorije;

6) na kojima se koriste upotrebljavanje površinske vode za navodnjavanje i prskanje iz bilo kojeg izvora za koji je potvrđeno ili za koji se sumnja da je zaražen štetnim organizmom;

7) koja su poplavljena ili su nekada bila poplavljena površinskom vodom za koju je potvrđeno ili postoji sumnja da je zaražena štetnim organizmom;

b) površinske vode koje se upotrebljavaju za navodnjavanje ili prskanje ili koje su poplavile polje(a) ili mjesto(a) proizvodnje za koje je potvrđeno da je zaraženo štetnim organizmom.

Član 11.

(Obim moguće zaraze glavnih biljaka domaćina)

Fitosanitarni inspektor određuje za glavne biljke domaćine obim moguće zaraze iz člana 7. stav (3) tačka c) ovog Pravilnika, na osnovu mogućih doticaja prije, poslije i tokom proizvodnje, navodnjavanja ili prskanja ili na osnovu klonske srodnosti sa biljkama ili krtolama koje su označene kao zaražene, uzimajući u obzir:

a) glavne biljke domaćine uzgojene na mjestu proizvodnje koje je označeno kao zaraženo;

b) mjesto ili mjesta proizvodnje koja su u bilo kakvoj vezi sa proizvodnjom glavnih biljaka domaćina koje su označene kao zaražene, uključujući i ona na kojima su se koristili ista oprema za proizvodnju i objekti;

c) glavne biljke domaćine koje su proizvedene na mjestima proizvodnje iz stava (2) ovog člana ili su se nalazile na tim mjestima proizvodnje u vrijeme dok su glavne biljke domaćini koje su označene kao zaražene u skladu sa članom 7. stav (3) tačka a) ovog Pravilnika bile prisutne na mjestima proizvodnje iz tačke a) ovog člana;

d) posjede na kojima se nalaze ili dorađuju glavne biljke domaćini koje potiču sa mjesta proizvodnje navedenim u tč. a), b) i c) ovoga člana;

- e) svaku mašinu, prijevozno sredstvo, skladište, ili njihov dio, te druge objekte ili predmete, uključujući i materijal za pakiranje, koji su mogli doći u dodir sa glavnim biljkama domaćinima koje su označene kao zaražene u skladu sa članom 9. tačka b) alineja 2) ovog Pravilnika;
- f) sve glavne biljke domaćine koje su bile uskladištene ili u dodiru sa nekim od objekata ili predmeta iz tačke e) ovog člana prije njihovog čišćenja i dezinfekcije;
- g) biljke paradajza koje potiču iz istih izvora kao i paradajz koji je označen kao zaražen, odnosno krtole ili biljke krompira koji su sestrinski ili roditeljski klonski povezani sa krtolama i/ili biljkama krompira koji je označen kao zaražen štetnim organizmom, i koji se, iako su rezultati testiranja provedenih u skladu sa propisanim procedurama negativni, smatraju vjerovatno zaraženima radi klonske srodnosti sa krompirom označenim kao zaraženim, a kod paradajza, radi istog izvora kao i paradajz označen kao zaražen. Kada je potrebno, može se provesti i test sortnosti da bi se provjerio identitet zaraženih i klonski srodnih krtola ili biljaka krompira;
- h) mjesta proizvodnje glavnih biljaka domaćina navedenih u tački g) ovog člana;
- i) mjesta proizvodnje glavnih biljaka domaćina na kojima se za navodnjavanje ili prskanje upotrebljava voda koja je označena kao zaražena;
- j) glavne biljke domaćine proizvedene na poljima koja su bila poplavljena površinskom vodom za koju je utvrđeno da je zaražena štetnim organizmom.

Član 12.

(Posebno regulirano područje)

- (1) Posebno regulirano područje za glavne biljke domaćine, iz člana 9. tačka d) ovog Pravilnika određuje se na osnovu obima i izvora primarne zaraze, obima moguće zaraze i mogućeg širenja štetnog organizma.
- (2) Moguće širenje štetnog organizma iz stava (1) ovog člana određuje se uzimajući u obzir:
 - a) blizinu drugih mjesta proizvodnje glavnih biljaka domaćina;
 - b) zajedničku proizvodnju i upotrebu zaliha sjemenskog krompira;
 - c) mjesta proizvodnje koja koriste površinsku vodu za navodnjavanje ili prskanje glavnih biljaka domaćina u slučajevima gdje ima ili je postojao rizik da površinska voda isteče, odnosno poplavi sa mjesta proizvodnje koja se smatraju zaraženim.
- (3) Na osnovu određenog posebno reguliranog područja za glavne biljke domaćine iz stava(1) ovog člana fitosanitarni inspektor označava mjesto zaraze.

Član 13.

(Postupak u slučaju zaraze drugih biljaka domaćina)

Ako se laboratorijskim testiranjem provedenim u skladu sa propisanim procedurama potvrdi zaraza štetnim organizmom u usjevu drugih biljaka domaćina, u područjima gdje je ugrožena proizvodnja glavnih biljaka domaćina, fitosanitarni inspektor treba:

- a) provesti istraživanje u/na glavnim biljkama domaćinima u skladu sa članom 10. ovog Pravilnika;
- b) označiti kao zaražene biljke domaćine iz kojih je uzet uzorak;
- c) označiti moguću zarazu i posebno regulirano područje u skladu sa čl. 11. i 12. ovog Pravilnika.

Član 14.

(Postupak u slučaju zaraze površinskih voda)

(1) Ako se laboratorijskim testiranjem provedenim u skladu sa propisanim procedurama potvrdi prisutnost štetnog organizma u površinskoj vodi (uključujući i tekući otpad koji nastaje u industrijskoj preradi glavnih biljaka domaćina ili u pogonima za njihovo pakiranje) ili u samoniklom bilju iz porodice *Solanaceae* koje u njoj raste, a proizvodnja glavnih biljaka domaćina je ugrožena zbog korištenja te vode za navodnjavanje, prskanje ili zbog plavljenja, fitosanitarni inspektor ima obavezu:

a) uzeti uzorak površinskih voda i prisutnih samoniklih biljaka iz porodice *Solanaceae*, u odgovarajućim vremenskim periodima, radi utvrđivanja obima zaraze;

b) označiti, u dovoljno velikom obimu, kao zaraženu površinsku vodu iz koje je uzet uzorak, na osnovu provedene analize iz tačke a) ovog stava;

c) označiti moguću zarazu i posebno regulirano područje na osnovu označene zaraze iz tačke b) ovoga stava i mogućeg širenja štetnog organizma uzimajući u obzir odredbe iz člana 11. ovog Pravilnika.

(2) Moguće širenje štetnog organizma iz stava (1) tačka c) ovoga člana određuje se uzimajući u obzir:

a) mjesta proizvodnje glavnih biljaka domaćina koja su ugrožena plavljenjem ili graniče sa površinskom vodom koja je označena kao zaražena;

b) svako zasebno područje navodnjavanja koje je vezano za površinsku vodu koja je označena kao zaražena;

c) vodene tokove povezane sa površinskom vodom koja je označena kao zaražena, uzimajući u obzir:

1) smjer i brzinu toka vode označene kao zaražene;

2) prisutnost samoniklih biljaka domaćina iz porodice *Solanaceae*.

Član 15.

(Vođenje evidencije)

Uprava vodi evidenciju koja uključuje dokumentirane dokaze o obimu potvrđene zaraze, obimu moguće zaraze i o području mogućeg širenja štetnog organizama na glavne biljke domaćine i površinsku vodu, sa slijedećim informacijama:

a) datum kada je zaraza potvrđena;

b) opis elemenata koji su doveli do odluke da se proglasi zaraza i područje mogućeg širenja štetnog organizma, uključujući i podatke o uzimanju uzoraka i o laboratorijskom nalazu;

c) za bilo koju količinu ili pošiljku krompira i paradajza i/ili drugih domaćina označenu kao zaraženu, podatke o fitosanitarnom certifikatu, uvjerenje o zdravstvenom stanju u slučaju domaće proizvodnje krompira, i kada je moguće podatke o biljnom pasošu, registarskom broju proizvođača, zbirnim skladištima i dispečerskim centrima;

d) informacije o identificiranim ili mogućim izvorima zaraze;

e) pojedinosti o obimu označene zaraze, uključujući broj mjesta proizvodnje i broj partija sa nazivom sorte, a kada se radi o sjemenskom krompiru, i o njegovoj kategoriji, kao i za biljke paradajza naziv sorte ili hibrida i partiju;

f) pojedinosti o posebno reguliranom području, uključujući broj mjesta proizvodnje koja nisu označena kao zaražena, ali su uključena u posebno regulirano područje;

- g) pojedinih o zaraženoj vodi, uključujući naziv i lokaciju vode i područje u kojem se zabranjuje navodnjavanje;
- h) svaku drugu informaciju o potvrđenoj iznenadnoj pojavi štetnog organizma.

Član 16.

(Mjere i postupci sa zaraženim glavnim biljkama domaćinima)

(1) Sadnja glavnih biljaka domaćina koje su označene kao zaražene u skladu sa članom 9. stav (1) tačka b) alineja 1) ovog Pravilnika nije dopuštena, već se one moraju pod nadzorom fitosanitarnog inspektora:

- a) upotrijebiti kao hrana za životinje nakon odgovarajuće toplotne obrade, koja ne ostavlja nikakvu mogućnost preživljavanja štetnog organizma ili;
 - b) odložiti na službeno odobrenom mjestu za zbrinjavanje otpada, za koje je utvrđeno da ne postoji opasnost od nekontroliranog širenja štetnog organizma u okoliš, na primjer cijeđenjem kroz pore tla do poljoprivrednog zemljišta ili dodiranjem sa vodom koja bi mogla da se upotrijebi za navodnjavanje poljoprivrednog zemljišta ili;
 - c) spaliti ili;
 - d) industrijski preraditi, pod uslovom da se direktno i odmah dopreme do mjesta prerade, na kojem mora postojati službeno odobrena oprema za zbrinjavanje otpada, čijim je korištenjem otklonjena opasnost od širenja štetnog organizma, i na kojem postoji sistem za čišćenje i dezinfekciju barem onih prijevoznih sredstava koja napuštaju mjesto prerade ili;
 - e) podvrgnuti drugim mjerama, pod uslovom da nema opasnosti od širenja štetnog organizma. O takvim mjerama i njihovoj opravdanosti, Uprava je obavezna da izvijesti nadležnu evropsku organizaciju za zaštitu zdravlja bilja.
- (2) Sav preostali otpad koji je nastao kao rezultat provedenih mjera iz stava (1) ovog člana, mora biti zbrinut u skladu sa službeno odobrenim postupkom u skladu sa članom 19. ovog Pravilnika.

Član 17.

(Mjere i postupci sa moguće zaraženim glavnim biljkama domaćinima)

Sadnja glavnih biljaka domaćina koje se smatraju moguće zaraženim štetnim organizmom u skladu sa članom 11. i članom 14. stav (1) tačka c) ovog Pravilnika, uključujući i glavne biljke domaćine gajene na mjestima proizvodnje koje se smatraju moguće zaraženim u skladu sa članom 11. ovog Pravilnika nije dopuštena, već se one moraju, pod nadzorom fitosanitarnog inspektora:

a) *kad se radi o krtolama krompira:*

- 1) upotrijebiti kao merkantilni krompir namijenjen ishrani, pri čemu mora biti pakiran na mjestima koja raspolažu odgovarajućom opremom za zbrinjavanje otpada, i koji je spreman za neposrednu dostavu i upotrebu bez naknadnog repakiranja. Sa sjemenskim krompirom dozvoljeno je rukovati u tim istim mjestima samo ako se radi odvojeno ili nakon čišćenja i dezinfekcije ili;
- 2) upotrijebiti kao merkantilni krompir namijenjen industrijskoj preradi, uz direktnu i brzu dostavu do pogona za preradu, koji mora raspolagati odgovarajućom opremom za zbrinjavanje otpada i sistemom za čišćenje i dezinfekciju barem onih prijevoznih sredstava koji napuštaju mjesto prerade ili;
- 3) upotrijebiti ili zbrinuti na neki drugi službeno odobreni način, pod uslovom da nema opasnosti od širenja štetnog organizma.

b) kada se radi o ostalim dijelovima glavnih biljaka domaćina, uključujući ostatke stabljika i lišća:

- 1) uništiti ili;
- 2) upotrijebiti ili zbrinuti na neki drugi službeno odobreni način, pod uslovom da nema opasnosti od širenja štetnog organizma.

Član 18.

(Čišćenje i dezinfekcija)

(1) Fitosanitarni inspektor će narediti da se mašine, prijevozna sredstva, skladišta i njihovi dijelovi, ili drugi objekti i predmeti, uključujući materijal za pakiranje, koji su označeni kao zaraženi u skladu sa članom 9. stav (1) tačka b) alineja 2) ovog Pravilnika ili se smatraju moguće zaraženima u skladu sa članom 11. i članom 14. stav (1) tačka c) ovog Pravilnika, ili unište ili očiste i, kada je to primjereno, dezinficiraju primjenom odgovarajućih postupaka kojima se otklanja opasnost od širenja štetnog organizma.

(2) Nakon dezinfekcije, objekti i predmeti iz stava (1) ovog člana više se ne smatraju zaraženim.

Član 19.

(Procedura zbrinjavanja otpada)

(1) Službeno odobreni postupak zbrinjavanja otpada nastalog u procesu industrijske prerade iz člana 14. ovog Pravilnika, mora se izvršiti tako da se izbjegne svaka opasnost od širenja štetnog organizma:

a) otpaci krompira i paradajza (uključujući odbačeni krompir, koru i paradjz) i svi drugi kruti otpaci koji su vezani za krompir i paradajzrajcic (uključujući tlo, kamenje i druge ostatke), moraju se odstraniti na slijedeći način:

- 1) odložiti na za to službeno odobrenom mjestu, na kojem ne postoji opasnost od nekontroliranog širenja štetnog organizma u okoliš, na primjer cijedenjem kroz pore tla do poljoprivrednog zemljišta ili dodirom sa vodom koja bi mogla da se upotrijebi za navodnjavanje poljoprivrednog zemljišta. Otpaci se prevoze direktno do određenog mjesta, u zatvorenom prijevoznom sredstvu, tako da ne postoji opasnost od gubitka otpada ili;
- 2) spaliti ili;
- 3) primijeniti neke druge mjere za koje je utvrđeno da ne postoji opasnost od širenja štetnog organizma.

b) tekući otpad nastao u preradi, a koji sadrži raspršene krute čestice, mora se prije uklanjanja filtrirati ili obraditi postupkom sedimentacije radi odstranjivanja krutih čestica. Krute čestice se nakon toga uklanjaju na način naveden u stavu (1) ovoga člana. Tekući dio otpada mora se:

- 1) u cijelosti prije odstranjivanja zagrijati na temperaturu od najmanje 60 °C u trajanju najmanje 30 minuta ili;
- 2) odstraniti pod službenim nadzorom na neki drugi službeno odobreni način koji onemogućava da otpaci dođu, na bilo koji način, u dodir sa poljoprivrednim zemljištem ili vodom koja se može upotrijebiti za navodnjavanje poljoprivrednog zemljišta.

(2) Postupci propisani u stavu (1) ovog člana primijenjuju se i na otpad koji nastaje tokom rukovanja, odstranjivanja i prerade zaraženih partija.

Član 20.

(Mjere u posebno reguliranom području)

U posebno reguliranom području određenom u skladu sa članom 12. i članom 14. stav (1) tačka c) ovog Pravilnika, fitosanitarni inspektor će narediti mjere navedene u Prilogu I koji je sastavni dio ovog Pravilnika.

Član 21.

(Postupak sa sjemenskim krompirom)

(1) Sjemenski krompir mora voditi porijeklo direktno od materijala dobijenog u skladu sa službeno odobrenom procedurom kontrole i za koji je službenim laboratorijskim testiranjem, provedenim u skladu sa propisanim procedurama, utvrđeno da nije zaražen štetnim organizmom.

(2) Laboratorijsko testiranje iz stava (1) ovog člana provodi se:

- a) u slučajevima kada je zaraza bila potvrđena u vlastitoj proizvodnji sjemenskog krompira testiranjem ranijih generacija u lancu vegetativnog razmnožavanja, uključujući početnu fazu klonske selekcije i sistematsko testiranje klonova osnovnog sjemena;
- b) u slučajevima kada je utvrđeno da ne postoji klonska srodnost, testiranjem svih klonova osnovnog sjemena ili ranijih generacija u lancu vegetativnog razmnožavanja, uključujući biljke iz početne faze klonske selekcije i;
- c) u drugim slučajevima, ili na svakoj biljci koja se nalazi u početnoj fazi klonske selekcije, ili na reprezentativnim uzorcima osnovnog sjemena ili ranije generacije u lancu vegetativnog razmnožavanja.

Član 22.

(Zabrana posjedovanja i korištenja štetnog organizma)

Zabranjeno je posjedovanje i bilo kakvo korištenje štetnog organizma.

Član 23.

(Izuzeci od propisanih mjera)

Uprava može odobriti izuzetke od mjera propisanih u čl. 16., 17., 18., 20. i 22. ovog Pravilnika, za ogledne, naučne ili selekcijske namjene, pod uslovom da se time osigura nadzor nad štetnim organizmom i da nema opasnosti od njegovog širenja.

Član 24.

(Dodatne i strožije mjere)

Uprava može propisati dodatne ili strožije mjere koje su potrebne u cilju borbe protiv štetnog organizma ili sprječavanja njegovog širenja.

Član 25.

(Nadležni inspektori)

Do uspostave fitosanitarnog inspektora posao fitosanitarnog inspektora u Republici Srpskoj obavljaju republički poljoprivredni inspektori a u Federaciji Bosne i Hercegovine posao fitosanitarnog inspektora obavljaju poljoprivredni inspektori.

Član 26.

(Stupanje na snagu)

Ovaj Pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom glasniku BiH", a primjenjuje se od 01. januara 2010. godine.

Broj 07-01-02-7174-1 /09
21. septembra 2009. godine
Sarajevo

PRILOG I

Mjere koje naređuje fitosanitarni inspektor i koje se provode u posebno regulirano područje uspostavljeno u skladu sa članom 12. i članom 14. stav (1) tačka c) ovog Pravilnika su slijedeće:

I. NA MJESTIMA PROIZVODNJE KOJA SU OZNAČENA KAO ZARAŽENA:

1. na polju ili u zaštićenom prostoru namijenjenom proizvodnji bilja koji je označen kao zaražen:

1.1.1. u iduće, najmanje četiri vegetacijske godine nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza:

- obavezno je uklanjanje samoniklih biljaka krompira i paradajza te drugih samoniklih biljaka domaćina štetnog organizma, uključujući korove iz porodice *Solanaceae*, i
- zabranjena je:
 - sadnja krtola ili biljaka krompira te sjetva sjemena u botaničkom smislu,
 - sadnja biljaka i sjetva sjemena paradajza,
 - uzimajući u obzir biologiju štetnog organizma,
 - sadnja drugih biljaka domaćina,
 - sadnja onih biljnih vrsta iz roda *Brassica* za koje je utvrđeno da omogućavaju preživljavanje štetnog organizma,
 - sadnja biljaka za koje je utvrđeno da omogućavaju širenje štetnog organizma;

1.1.2. u prvoj sezoni proizvodnje krompira ili paradajza koja slijedi nakon perioda iz podtačke 1.1.1., pod uslovom da na polju najmanje dvije uzastopne vegetacijske godine prije sadnje tokom provođenja sistemskog istraživanja nisu nađene samonikle biljke krompira i paradajza te druge biljke domaćini, uključujući korove iz porodice *Solanaceae*,

– u slučaju proizvodnje krompira, dopušta se proizvodnja isključivo merkantilnog krompira,

– proizvedene krtole krompira ili biljke paradajza, kada je to potrebno, testiraju se u skladu sa propisanim procedurama;

1.1.3. u sezoni proizvodnje krompira ili paradajza koja slijedi nakon one iz podtačke 1.1.2., uz odgovarajući plodored, koji mora biti najmanje dvogodišnji ako se želi proizvoditi sjemenski krompir, provodi se sistemsko istraživanje u skladu sa članom 3. ovoga Pravilnika;

ili

1.2.1. u idućih, najmanje pet vegetacijskih godina nakon godine kada je utvrđena zaraza:

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

1.2.2. u prvoj sezoni proizvodnje krompira ili paradajza, koja slijedi nakon perioda iz podtačke 1.2.1., pod uslovom da tokom provođenja sistemskog istraživanja u najmanje dvije uzastopne vegetacijske godine prije sadnje na polju nisu nađene samonikle biljke krompira i paradajza te drugih biljaka domaćina, uključujući korove iz porodice *Solanaceae*,

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

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

2.1. u vegetacijskoj godini koja slijedi nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza:

- zabranjuje se sadnja krtola ili biljaka krompira i sjetva sjemena krompira u botaničkom smislu, te sjetva ili sadnja drugih biljaka domaćina štetnog organizma, ili
- u slučaju proizvodnje krompira, dopušta se sadnja certificiranog sjemenskog krompira namijenjenog isključivo proizvodnji merkantilnog krompira, ili
- u slučaju proizvodnje paradajza, dopušta se sadnja biljaka paradajza uzgojenih iz sjemena koje udovoljava zahtjevima iz Pravilnika o mjerama za sprječavanje unošenja i širenja organizama štetnih za bilje, biljne proizvode i druge nadzirane predmete i mjerama suzbijanja tih organizama, isključivo za proizvodnju plodova;

2.2. u drugoj vegetacijskoj godini koja slijedi nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza:

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

- u slučaju proizvodnje paradajza, dopušta se sadnja samo onih biljaka paradajza koje su uzgojene iz sjemena koje udovoljava zahtjevima iz Pravilnika o mjerama za sprječavanje unošenja i širenja organizama štetnih za bilje, biljne proizvode i druge nadzirane predmete i mjerama suzbijanja tih organizama, ili iz biljaka dobijenih vegetativnim razmnožavanjem biljaka paradajza proizvedenih iz takvog sjemena i uzgojenih pod stručnim nadzorom na mjestima proizvodnje koja nisu označena kao zaražena, za proizvodnju rasada ili plodova;

2.3. najmanje još u trećoj vegetacijskoj godini koja slijedi nakon utvrđene zaraze:

- u slučaju proizvodnje krompira, dopušta se sadnja samo certificiranog sjemenskog krompira ili sjemenskog krompira proizvedenog pod stručnim nadzorom iz certificiranog sjemenskog krompira, za sjemensku ili merkantilnu proizvodnju,
- u slučaju proizvodnje paradajza, dopušta se sadnja samo onih biljaka paradajza koje su uzgojene iz sjemena koje udovoljava zahtjevima iz Pravilnika o mjerama za sprječavanje unošenja i širenja organizama štetnih za bilje, biljne proizvode i druge nadzirane predmete i mjerama suzbijanja tih organizama, ili iz biljaka paradajza uzgojenih pod stručnim nadzorom iz takvih biljaka, za proizvodnju rasada ili plodova;

2.4. u svakoj vegetacijskoj godini iz podtačke 2.1, 2.2. i 2.3. preduzimaju se mjere uklanjanja samoniklih biljaka krompira i drugih biljaka domaćina štetnog organizma ako su prisutni, i provodi se službeni pregled usjeva tokom uzgoja u odgovarajućim vremenskim periodima, svih polja na kojima se uzgaja krompir; proizvedeni krompir sa svakog polja mora biti testiran u skladu sa propisanim procedurama.

3. Odmah nakon utvrđivanja zaraze štetnim organizmom i nakon prve iduće vegetacijske godine:

- sve mašine, oprema i skladišni prostori na mjestu proizvodnje koji su se koristili u proizvodnji krompira ili paradajza moraju se očistiti i, kada je to potrebno, dezinficirati u skladu sa članom 18. ovoga Pravilnika,
- fitosanitarni inspektor nadzire provođenje programa navodnjavanja i prskanja, koji može zabraniti, kada je to potrebno, radi sprječavanja širenja štetnog organizma.

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

- zabranjuje se sadnja krtola ili biljaka krompira i sjetva sjemena krompira u botaničkom smislu, te sjetva ili sadnja drugih biljaka domaćina štetnog organizma, uključujući biljke i sjeme paradajza, sve dok se u tom zaštićenom prostoru, pod nadzorom fitosanitarnog inspektora, ne provedu mjere uništavanja štetnog organizma i uklone sve biljke domaćini i njihovi dijelovi, pri čemu se, kao minimalna mjera, obavezno provodi potpuna zamjena supstrata za uzgoj te čišćenje i dezinfekcija tog zaštićenog prostora i cjelokupne opreme, i sve dok fitosanitarni inspektor nakon provođenja tih mjera ne odobri proizvodnju krompira i paradajza,
- dopušta se proizvodnja krompira iz certificiranog sjemenskog krompira proizvedenog pod stručnim nadzorom ili mini-krtola ili mikro-biljaka dobijenih iz kulture biljnog tkiva koje potiču iz testiranih izvora,
- dopušta se proizvodnja paradajza iz sjemena koje udovoljava zahtjevima iz Pravilnika o mjerama za sprječavanje unošenja i širenja organizama štetnih za bilje, biljne proizvode i druge nadzirane predmete i mjerama suzbijanja tih organizama, ili iz biljaka dobijenih vegetativnim razmnožavanjem biljaka paradajza uzgojenih iz takvog sjemena pod stručnim nadzorom,
- fitosanitarni inspektor nadzire provođenje programa navodnjavanja i prskanja, kojeg može zabraniti, kada je to potrebno, radi sprječavanja širenja štetnog organizma.

II. U ČITAVOM POSEBNO REGULIRANOM PODRUČJU, PORED MJERA OPISANIH U GLAVI I. OVOGA PRILOGA:

1. Odmah nakon utvrđivanja zaraze fitosanitarni inspektor naređuje, prema potrebi, čišćenje i dezinfekciju svih mašina, opreme i skladišnih prostora na posjedima na kojima su se koristili u proizvodnji krompira ili paradajza primjenom odgovarajućih postupaka, kao što je navedeno u glavi I. stav 3. tačka 1 ovog Priloga.

2. Fitosanitarni inspektor odmah i tokom najmanje tri vegetacijske godine koje slijede iza one u kojoj je utvrđena zaraza:

a) u posebno reguliranom području određenom u skladu sa članom 12. ovog Pravilnika:

- nadzire posjede na kojima se uzgajaju, skladište, nalaze ili dorađuju krtole krompira ili paradajza, uključujući i posjede na kojima se koriste iste mašine za obavljanje radnji vezanih za nabrojene djelatnosti,
- naređuje sadnju samo certificiranog sjemenskog krompira ili sjemenskog krompira proizvedenog pod stručnim nadzorom unutar cijelog posebno reguliranog područja i testiranje sjemenskog krompira nakon vađenja, proizvedenog na mjestima proizvodnje koja se smatraju moguće zaraženima, u skladu sa članom 11. ovog Pravilnika,
- naređuje da se na svim posjedima unutar tog područja sa proizvedenim sjemenskim krompirom postupi odvojeno od merkantilnog krompira, ili da se obavi čišćenje i, prema potrebi, dezinfekcija između postupanja sa sjemenskim i merkantilnim krompirom,

- naređuje sadnju samo onih biljaka paradajza uzgojenih iz sjemena koje udovoljavaju zahtjevima iz provedbenog propisa o mjerama za sprječavanje unošenja i širenja organizama štetnih za bilje, biljne proizvode i druge regulirane predmete i mjerama suzbijanja tih štetnih organizama, ili iz biljaka dobijenih vegetativnim razmnožavanjem biljaka paradajza proizvedenih iz takvog sjemena i uzgajanih pod stručnim nadzorom, u svim usjevima paradajza unutar sigurnosnog područja,
 - provodi sistemsko istraživanje iz člana 3. ovog Pravilnika;
 - b) za površinsku vodu koja je bila označena kao zaražena u skladu sa članom 14. stav (1) tačka b) ovog Pravilnika ili predstavlja jedan od faktora, iz člana 12. stava (2) tačka c) i člana 14. stav (2) ovog Pravilnika, koji utiču na moguće širenje štetnog organizma:
 - obavlja sistemsko istraživanje iz člana 3. stav (2) ovog Pravilnika u skladu sa godišnjim programom u odgovarajućim vremenskim periodima te uzima uzorke površinske vode i, kada je to potrebno, biljaka domaćina štetnog organizma iz porodice *Solanaceae*, iz odgovarajućih izvora vode, radi testiranja. Testiranje glavnih biljaka domaćina i svih drugih uzetih uzoraka mora biti provedeno u skladu sa propisanim procedurama,
 - nadzire provođenje programa navodnjavanja i prskanja te može zabraniti upotrebu vode koja je označena kao zaražena za navodnjavanje i prskanje glavnih biljaka domaćina i, gdje je potrebno, drugih biljaka domaćina radi sprječavanja širenja štetnog organizma. Fitosanitarni inspektor može opozvati tu zabranu, ako je na osnovu rezultata provedenog sistemskog istraživanja iz člana 3. stava (2) ovog Pravilnika u skladu sa godišnjim programom utvrdio da površinska voda više nije zaražena. Korištenje vode za navodnjavanje i prskanje biljaka domaćina čija je upotreba zabranjena može se dopustiti pod službenim nadzorom, primjenom službeno odobrenih postupaka kojima se odstranjuje štetni organizam i sprječava njegovo širenje,
 - u slučaju kada je tekući otpad zaražen, zbrinjavanje krutog ili tekućeg otpada koji nastaje pri industrijskoj preradi ili pakiranju glavnih biljaka domaćina obavlja se pod nadzorom fitosanitarnog inspektora.
3. U slučaju potrebe, Uprava može narediti zamjenu svih zaliha sjemenskog krompira u odgovarajućem vremenskom periodu.

PRILOG II.

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

Prikazana šema testiranja opisuje različite postupke za:

- (i) dijagnosticiranje smeđe truleži krtola krompira i bakterijskog venuća krompira, paradajza i drugih biljaka domaćina;
- (ii) detekciju bakterije *Ralstonia solanacearum* u uzorcima krtola krompira, biljaka krompira, paradajza i drugih biljaka domaćina te u vodi i tlu;
- (iii) identifikaciju bakterije *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

OPĆA NAČELA

Optimalni protokoli za pojedine metode, validirani reagensi i pojedinosti za pripremu materijala za testiranje i kontrolnih materijala navedeni su u Dodacima. Popis laboratorija koje su učestvovala u optimizaciji i validaciji protokola nalazi se u Dodatku 1.

Obzirom da protokoli uključuju detekciju karantinskog organizma i uključivat će upotrebu vijabilnih kultura *R. solanacearum* kao kontrolnih materijala, procedura će se morati izvoditi u primjerenim karantinskim uslovima sa odgovarajućom opremom za zbrinjavanje otpada te prema uslovima dozvola koje izdaju nadležna tijela za biljnu karantinu.

Parametri testiranja moraju osigurati dosljednu i ponovljivu detekciju onih nivoa *R. solanacearum* prema propisanim pragovima detekcije za pojedine metode. Precizna priprema pozitivnih kontrola je nužna.

Testiranje u skladu sa potrebnim pragovima detekcije podrazumijeva pravilno postavljanje, održavanje i kalibraciju opreme, pažljivo pohranjivanje i rukovanje reagenasima te preduzimanje mjera za sprječavanje kontaminacije među uzorcima, npr. razdvajanje pozitivnih kontrola od uzoraka za testiranje. Moraju se primijeniti standardi kontrole kvalitete kako bi se izbjegle administrativne i druge pogreške, posebno pri označavanju uzoraka i vođenju dokumentacije.

Sumnja na zarazu, kao što je navedeno u članu 6. Pravilnika o provođenju sistemskog istraživanja i mjera za sprječavanje širenja i suzbijanje smeđe truleži krtola krompira i bakterijskog venuća krompira i paradajza, koju prouzrokuje bakterija *R. solanacearum* (u daljnjem tekstu: Pravilnik), podrazumijeva pozitivan rezultat testa za dijagnosticiranje ili brzog testa provjere provedenog na uzorku kao što je prikazano u dijagramima toka. Pozitivan rezultat dobijen u prvom brzom testu provjere (IF test, PCR/FISH, selektivna izolacija) mora se potvrditi drugim testom provjere koji se zasniva na drugom biološkom načelu.

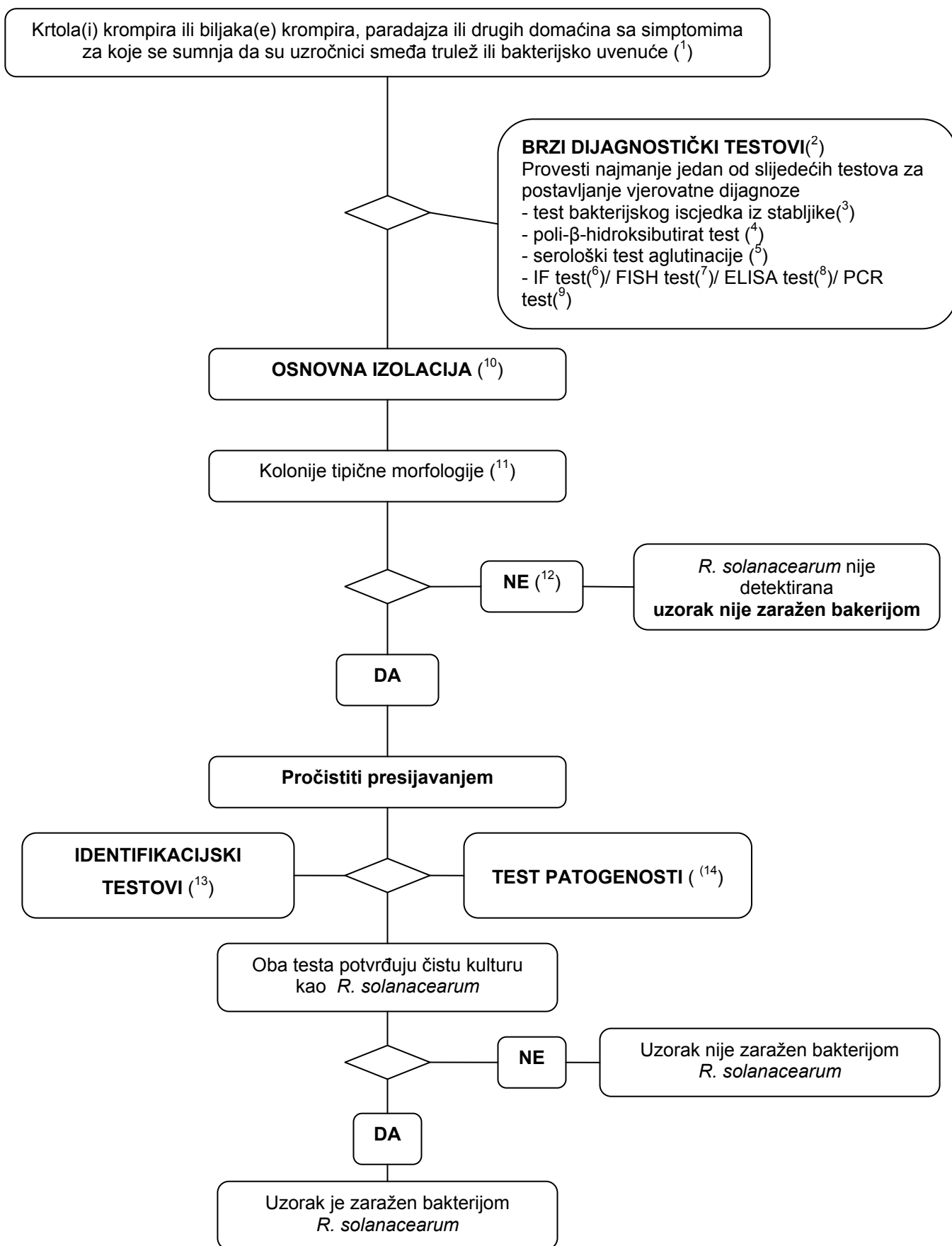
Ako je rezultat prvog testa provjere pozitivan, tada se sumnja na zarazu bakterijom *R. solanacearum* i mora se provesti drugi test provjere. Ako je rezultat drugog testa provjere pozitivan, tada je sumnja potvrđena i testiranje se mora nastaviti prema šemi testiranja. Ako je rezultat drugog testa provjere negativan, tada se smatra da uzorak nije zaražen bakterijom *R. solanacearum*.

Potvrđena zaraza, kao što je navedeno u članu 9. Pravilnika, podrazumijeva izolaciju i identifikaciju čiste kulture *R. solanacearum* te potvrdu patogenosti.

ODJELJAK I.
PRIMJENA ŠEME TESTIRANJA

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

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



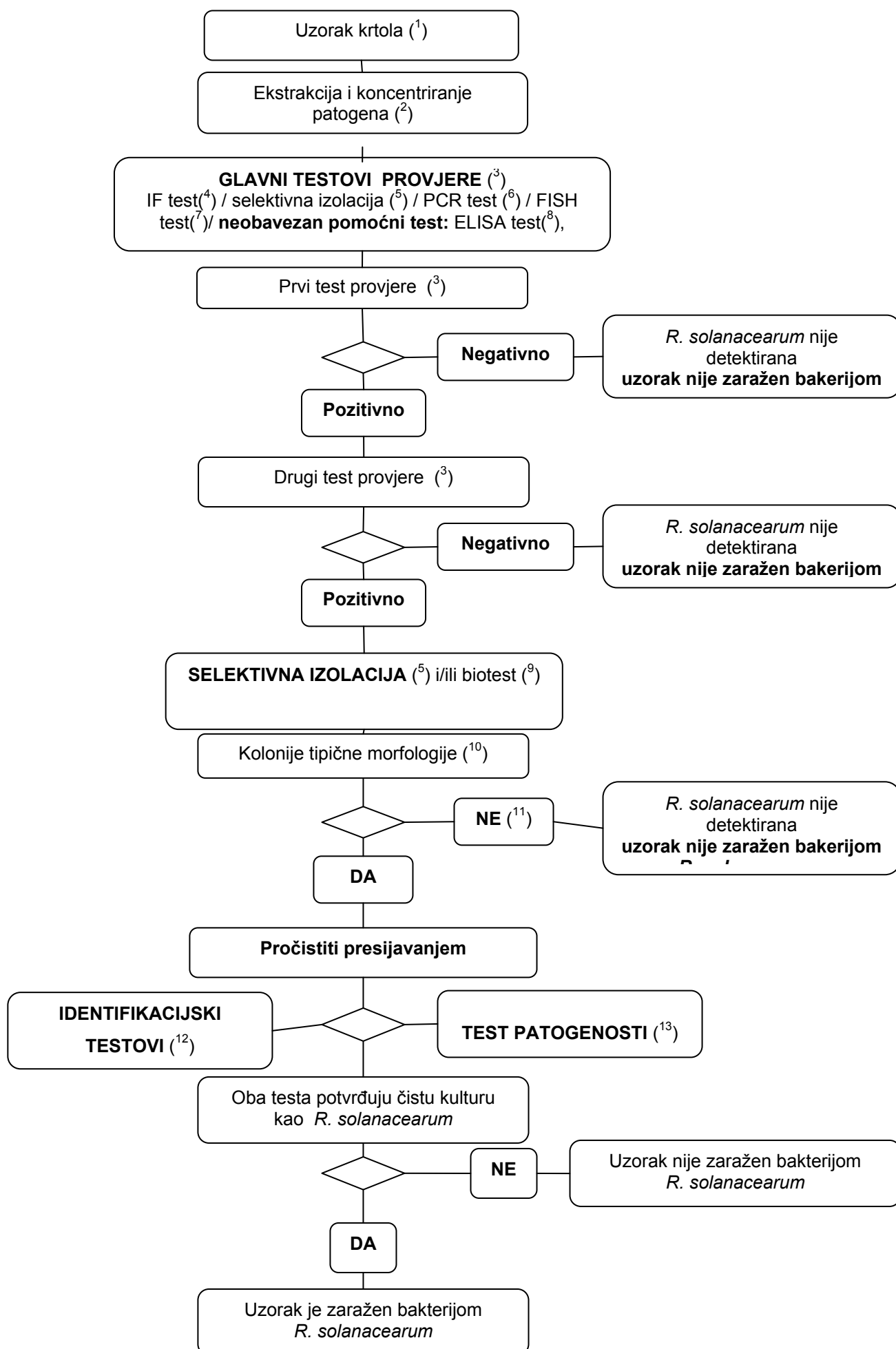
- (1) Opis simptoma naveden je u Odjeljku II.1.
- (2) Brzi dijagnostički testovi olakšavaju postavljanje vjerovatne dijagnoze, ali nisu nužni. Negativan rezultat ne garantira uvijek odsutnost patogena.
- (3) Test bakterijskog iscjetka iz provodnog tkiva stabljike opisan je u Odjeljku VI.A.1.
- (4) Test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

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

Načelo:

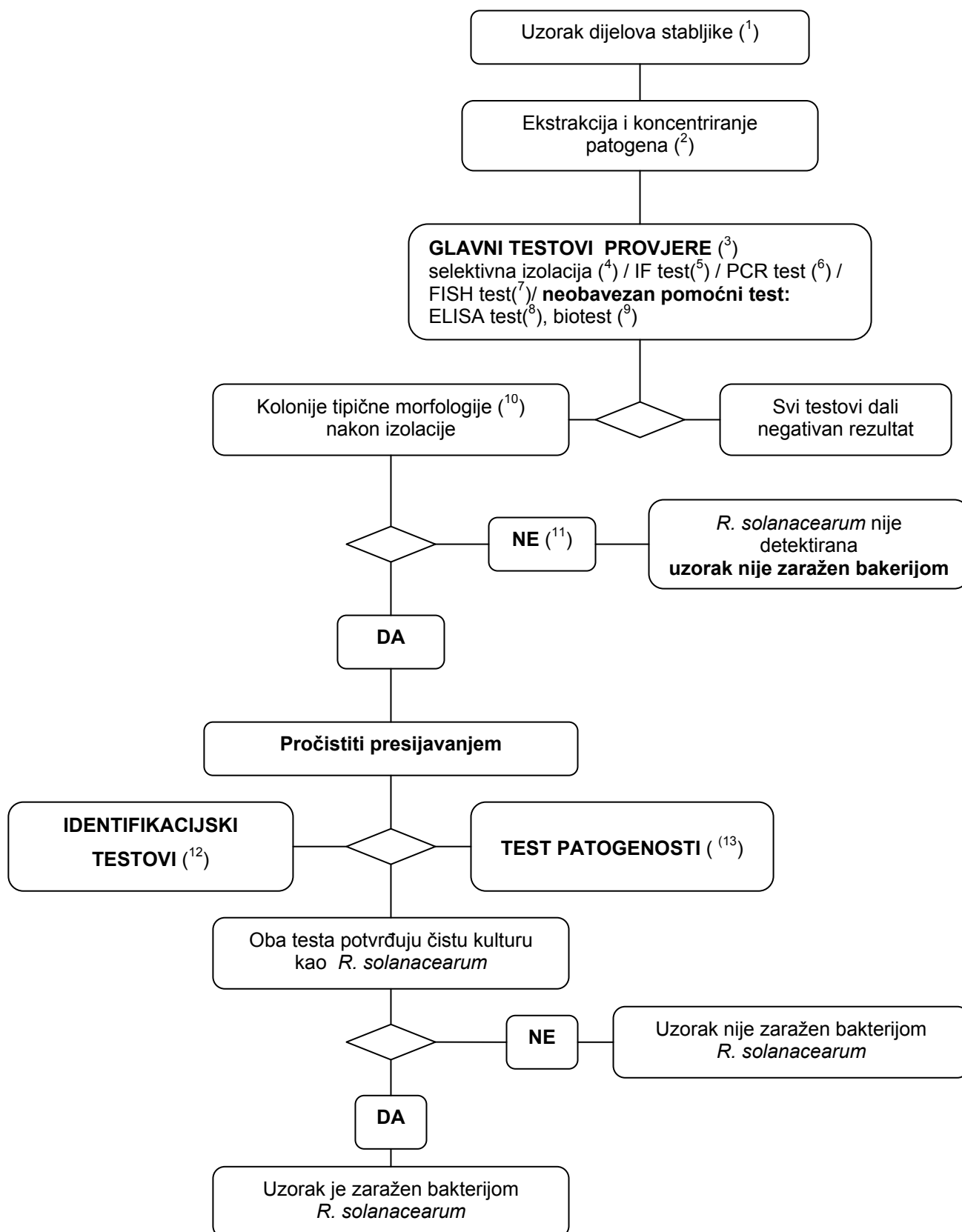
Postupak testiranja namijenjen je za detekciju skrivene zaraze u krtolama krompira. Pozitivan rezultat iz najmanje dva testa provjere (3), koji se zasniva na različitim biološkim načelima, mora se dopuniti izolacijom patogena nakon čega slijedi, u slučaju izolacije tipičnih kolonija, potvrda čiste kulture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

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



- (1) Standardna veličina uzoraka je 200 krtola, iako se postupak može provesti i na manjim uzorcima ako nije na raspolaganju 200 krtola.
- (2) Metode ekstrakcije i koncentriranja patogena opisane su u Odjeljku III.1.1.
- (3) Ako su rezultati najmanje dva testa, koji se zasnivaju na različitim biološkim načelima, pozitivni, potrebno je provesti izolaciju i potvrdu. Provedite barem jedan test provjere. Kada je rezultat tog testa negativan, smatra se da je taj uzorak negativan. U slučaju da je rezultat tog testa pozitivan, potrebno je provesti drugi ili više testova provjere, koji se zasnivaju na različitim biološkim načelima, kako bi se potvrdio pozitivan rezultat. Ako su rezultati drugih ili ostalih testova negativni, smatra se da je taj uzorak negativan. Daljnji testovi nisu potrebni.
- (4) IF test opisan je u Odjeljku VI.A.5.
- (5) Selektivna izolacija opisana je u Odjeljku VI.A.4.
- (6) PCR testovi opisani su u Odjeljku VI.A.6.
- (7) FISH test opisan je u Odjeljku VI.A.7.
- (8) ELISA testovi opisani su u Odjeljku VI.A.8.
- (9) Biotest opisan je u Odjeljku VI.A.9.
- (10) Tipična morfologija kolonije opisana je u Odjeljku II.3.d.
- (11) Uzgoj bakterijske kulture ili biotest mogu biti neuspješni zbog kompeticije ili inhibicije saprofitnim bakterijama. Ako se testovima provjere dobiju jasno pozitivni rezultati, a rezultati izolacije su negativni, ponovite testove izolacije iz istog resuspendiranog taloga ili ponovite uzimanje provodnog tkiva iz pupka krtola iz istog uzorka te, ako je potrebno, testirajte dodatne uzorke.
- (12) Pouzdana identifikacija čistih kultura vjerovatnih izolata bakterije *R. solanacearum* postiže se provođenjem testova opisanih u Odjeljku VI.B.
- (13) Test patogenosti opisan je u Odjeljku VI.C.

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



- (1) Za preporučene veličine uzoraka vidi Odjeljak III.2.1.
- (2) Metode ekstrakcije i koncentriranja patogena opisane su u Odjeljku III.2.1.
- (3) Ako su rezultati najmanje dva testa, koji se zasnivaju na različitim biološkim načelima, pozitivni, potrebno je provesti izolaciju i potvrdu. Provedite barem jedan test provjere. Kada je rezultat tog testa negativan, smatra se da je taj uzorak negativan. U slučaju da je rezultat tog testa pozitivan, potrebno je provesti drugi ili više testova provjere, koji se zasnivaju na različitim biološkim načelima, kako bi se potvrdio pozitivan rezultat. Ako su rezultati drugih ili ostalih testova negativni, smatra se da je taj uzorak negativan. Daljnji testovi nisu potrebni.
- (4) Selektivna izolacija opisana je u Odjeljku VI.A.4.
- (5) IF test opisan je u Odjeljku VI.A.5.
- (6) PCR testovi opisani su u Odjeljku VI.A.6.
- (7) FISH test opisan je u Odjeljku VI.A.7.
- (8) ELISA test opisani su u Odjeljku VI.A.8.
- (9) Biotest opisan je u Odjeljku VI.A.9.
- (10) Tipična morfologija kolonije opisana je u Odjeljku II.3.d.
- (11) Uzgoj bakterijske kulture ili biotest mogu biti neuspješni zbog kompeticije ili inhibicije saprofitnim bakterijama. Ako se testovima provjere dobiju jasno pozitivni rezultati, a rezultati izolacije su negativni, ponovite testove izolacije.
- (12) Pouzdana identifikacija čistih kultura vjerovatnih izolata bakterije *R. solanacearum* postiže se provođenjem testova opisanih u Odjeljku VI.B.
- (13) Test patogenosti opisan je u Odjeljku VI.C.

ODJELJAK II.

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

1. Simptomi

1.1. Simptomi na krompiru

Biljka krompira

Početna faza infekcije u polju prepoznaje se po venuću lišća pri vrhu biljke na visokim temperaturama tokom dana, ali koje se oporavlja tokom noći. U ranim fazama venuća lišće ostaje zeleno ali kasnije počinje žutiti i razvija se smeđa nekroza. Dolazi i do epinastije. Ubrzo dolazi do nepovratnog venuća izdanka ili cijele biljke što dovodi do propadanja i odumiranja. Provodno tkivo popriječno prerezane stabljike uvenule biljke obično je smeđe boje, a iz prereza izlazi ili se lako može gnječanjem istisnuti mliječni bakterijski iscjedak. Kad se prerezana stabljika stavi uspravno u vodu, niti služi će izlaziti iz provodnih snopova.

Krtola krompira

Krtole krompira treba prerezati popriječno ili uzdužno u blizini pupka krtola. Početna faza infekcije prepoznaje se po promjeni boje provodnog prstena od staklasto-žute do svijetlosmeđe iz kojeg se spontano, nakon nekoliko minuta, pojavljuje blijedi kremasti bakterijski iscjedak. Kasnije, provodno tkivo postaje izrazitije smeđe i nekroza se može proširiti na parenhimsko tkivo. U uznapredovalim fazama infekcija izbija prema van od kraja pupka krtola i okaca iz kojih može curiti bakterijska sluz na koju se lijepe čestice tla. Na kori se mogu pojaviti crvenkasto-smeđa ulegnuća zbog propadanja provodnog tkiva iznutra. U uznapredovalim fazama bolesti uobičajen je i sekundarni razvoj gljivične i bakterijske meke truleži.

1.2. Simptomi na paradajzu

Biljka paradajza

Prvi vidljivi simptom je povenulost najmlađih listova. U uslovima koji su povoljni za patogen (temperatura tla oko 25 °C; zasićenost vlagom) u roku od nekoliko dana dolazi do epinastije i venuća samo jedne strane ili cijele biljke što dovodi do potpunog propadanja. U manje povoljnim uslovima (temperatura tla manja od 21 °C) venuće se rjeđe pojavljuje, ali se na stabljici može razviti veliki broj adventivnog korijenja. Moguće je uočiti kao vodom natopljene pruge koje se protežu duž stabljike, od njene baze, koje su trag nekroze u

provodnom sistemu. Ako se stabljika unakrsno prereže, iz provodnog tkiva čija je boja promijenjena u smeđu, curi bijeli ili žućkasti bakterijski iscjedak.

1.3. Simptomi na drugim biljkama domaćinima

Biljke *Solanum dulcamara* i *S. Nigrum*

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

2. Brzi testovi provjere

Brzi testovi provjere olakšavaju postavljanje vjerovatne dijagnoze, ali nisu presudni. Primijenite jedan ili više slijedećih validiranih testova:

2.1. Test iscjetka iz stabljike (vidi Odjeljak VI.A.1.)

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

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

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

2.4. Ostali testovi

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

3. Postupak izolacije

- (1) Uzmite bakterijski iscjedak ili dijelove tkiva promijenjene boje iz provodnog prstena krtola krompira ili iz provodnih snopova stabljike krompira, paradajza ili drugih venućih biljaka domaćina. Suspendirajte u manjoj količini sterilne destilirane vode ili 50 mM fosfatnog pufera (Dodatak 4) te ostavite 5 do 10 minuta.
- (2) Pripremite niz decimalnih razrjeđenja suspenzije.
- (3) Prenesite 50-100 µl suspenzije i razrjeđenja na uobičajenu hranjivu podlogu (NA, YPGA ili SPA; vidi Dodatak 2.) i/ili na Kelmanovu tetrazolij-podlogu (Dodatak 2.) i/ili na validiranu selektivnu podlogu (npr. SMSA; vidi Dodatak 2.). Razmažite primjenjujući odgovarajuću tehniku nanošenja razrjeđenja na podlogu. Ako se smatra korisnim, pripremite odvojene podloge s razrijeđenom ćelijskom suspenzijom bakterije *R. solanacearum* biovar 2 za pozitivnu kontrolu.
- (4) Inkubirajte podloge od dva do šest dana na 28 °C.
 - a. Na uobičajenoj hranjivoj podlozi virulentni izolati bakterije *R. solanacearum* stvaraju pljosnate, nepravilne i tekuće kolonije biserne kremasto-bijele boje, često s karakterističnim spiralama u sredini. Nevirulentni oblici bakterije *R. solanacearum* stvaraju male, okrugle, netekućе, maslaste kolonije koje su u cijelosti kremasto-bijele boje.
 - Na Kelmanovoj tetrazolij-podlozi i na SMSA podlozi spirale su krvavo crvene boje. Nevirulentni oblici bakterije *R. solanacearum* stvaraju male, okrugle, netekućе, maslaste kolonije koje su u cijelosti tamno crvene boje.

4. Identifikacijski testovi za bakteriju *R. solanacearum*

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

ODJELJAK III.

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

1.1. Priprema uzorka

Napomena:

- standardna veličina uzorka je 200 krtola po testu. Intenzivnije uzorkovanje zahtijeva više testova na uzorcima ove veličine. Veći broj krtola u uzorku dovest će do inhibicije ili će otežati tumačenje rezultata. Međutim, postupak se može prikladno primijeniti za uzorke sa manje od 200 krtola, kada je na raspolaganju manje krtola;

- validacija svih metoda za detekciju, koje su opisane u daljnjem tekstu, zasniva se na testiranju uzoraka od 200 krtola;
- ekstrakt krompira koji je opisan u daljnjem tekstu može se koristiti i za detekciju bakterije *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* koja uzrokuje prstenastu trulež krtola krompira.

Neobavezna obrada prije pripreme uzorka:

- (a) Inkubirajte uzorak na 25-30 °C u periodu do dvije sedmice prije provođenja testova, kako bi se podstaklo umnožavanje populacija bakterije *R. solanacearum*.
- (b) Operite krtole. Upotrijebite prikladna dezinfekcijska sredstva (spojewe hlora kada će se provesti PCR test kako bi se uklonila moguća DNK patogena) i deterdžente između svakog uzorka. Osušite krtole na zraku. Postupak pranja je posebno koristan (ali ne obavezan) za uzorke sa previše tla i ako će se provesti PCR test ili direktna izolacija.

1.1.1. Čistim i dezinficiranim skalpelom ili nožem za povrće uklonite koru na pupku krtola tako da provodno tkivo bude vidljivo. Pažljivo izrežite malu jezgru provodnog tkiva iz pupka krtola pazeći da zahvatite što manje okolnog, neprovodnog tkiva.

Napomena:

Odvojite sve (trule) krtole sa mogućim simptomima smeđe truleži i testirajte ih posebno. Ako se pri izrezivanju jezgre pupka uoče mogući simptomi smeđe truleži, ta se krtola mora vizuelno pregledati i prerezati blizu pupka. Svaku prerezanu krtolu sa sumnjivim simptomima treba držati najmanje dva dana na sobnoj temperaturi kako bi suberizirao, te čuvati u hladnjaku (na temperaturi od 4 do 10 °C) u odgovarajućim karantinskim uslovima. Sve se krtole, uključujući i one sa sumnjivim simptomima, trebaju čuvati u skladu sa članom 7. Pravilnika.

1.1.2. Stavite jezgre pupaka u neupotrijebljene posude za jednokratnu upotrebu koje se mogu zatvoriti i/ili hermetički zatvoriti (ako su posude već upotrebljavane, moraju se temeljno očistiti i dezinficirati spojevima hlora). Poželjno ih je odmah obraditi. Ako to nije moguće, čuvajte ih u posudi bez dodatka pufera, najduže 72 sata u hladnjaku ili najduže 24 sata na sobnoj temperaturi.

Obradite jezgre pupaka jednim od slijedećih postupaka:

- a) dodajte dovoljnu količinu (oko 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4) da pokrije jezgre pupaka i tresite na rotacijskoj tresilici (50-100 okretaja/min) 4 sata na temperaturi ispod 24 °C ili 16 do 24 sata uz hlađenje, ili
- b) homogenizirajte jezgre pupaka sa dovoljnom količinom (oko 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4), bilo u mješalici (npr. Waring ili Ultra Thurax) ili drobljenjem u dobro zatvorenoj vrećici za maceraciju za jednokratnu upotrebu (npr. vrećice Stomacher ili Bioreba od čvrstog politena, 150 mm x 250 mm, sterilizirane zračenjem) koristeći gumeni bat ili prikladnu drobilicu (npr. Homex).

Napomena:

Ako se uzorci homogeniziraju u mješalici, postoji velika opasnost od njihove unakrsne kontaminacije. Preduzmite mjere opreza kako biste spriječili nastajanje aerosola ili razlijevanje tokom postupka ekstrakcije. Pobrinite se da za svaki uzorak upotrijebite svježe sterilizirane nožice i posude mješalice. Ako će se provesti PCR test, spriječite prijenos DNK na spremnike ili drobilicu. Za PCR test preporučuje se drobljenje u vrećicama za jednokratnu upotrebu i korištenje epruveta za jednokratnu upotrebu.

1.1.3. Odlijte supernatant. Ako je previše mutan, razbistrite ga sporim centrifugiranjem (na najviše 180 g 10 minuta na temperaturi od 4 do 10 °C) ili vakuumskom filtracijom (40 do 100 µm), i dodatno isperite filter ekstrakcijskim puferom (oko 10 ml).

1.1.4. Koncentrirajte bakterijsku frakciju centrifugiranjem na 7000 g 15 minuta (ili 10000 g 10 minuta) na temperaturi od 4 do 10 °C te odlijte supernatant pazeći pri tom da se ne pomiješa talog.

1.1.5. Resuspendirajte talog u 1.5 ml pufera za talog (Dodatak 4). Upotrijebite 500 µl za testiranje na *R. solanacearum*, 500 µl za *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* i 500 µl kao referentni materijal. U referentni alikvot od 500 µl i u preostale alikvote koji se testiraju dodajte sterilni glicerol do konačne koncentracije od 10 do 25 % (v/v), snažno promiješajte u vrtložnoj mješalici te pohranite na temperaturi od –16 do –24 °C (sedmicama) ili od –68 do –86 °C (mjesecima). Tokom testiranja, alikvote koji se koriste čuvajte na temperaturi od 4 do 10 °C. Ne preporučuje se višekratno zamrzavanje i odmrzavanje. Ako je potreban transport ekstrakta, osigurajte dostavu u prijenosnom hladnjaku u roku od 24 do 48 sati.

1.1.6. Sve pozitivne kontrole i uzorci *R. solanacearum* moraju se odvojeno pripremiti i obraditi kako bi se izbjegla kontaminacija. To vrijedi za stakalca za imunofluorescenciju kao i za sve ostale testove.

1.2. Testiranje

Vidi dijagram te opis testova i optimizirane protokole u odgovarajućim dodacima:

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

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

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

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

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

Biotest (vidi Odjeljak VI.A.9.)

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

2.1. Priprema uzorka

Napomena:

Za detekciju latentnih populacija bakterije *R. solanacearum* preporučuje se testiranje sastavljenih uzoraka. Postupak se može prikladno primijeniti na sastavljene uzorke s najviše 200 dijelova stabljika. Ako se provode sistemska istraživanja, ona se moraju zasnivati na statistički reprezentativnom uzorku biljne populacije koja se ispituje.

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

Presadnice paradajza iz rasadnika. Čistim dezinficiranim nožem odrežite dio veličine 1 cm sa donjeg dijela svake stabljike, neposredno iznad nivoa tla.

Biljke paradajza iz polja ili staklenika. Čistim, dezinficiranim nožem odrežite najniži postrani izdanak na svakoj biljci režući tik iznad spoja sa stabljikom. Sa svakog bočnog izdanka odrežite donji dio veličine 1 cm.

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

Pri uzorkovanju na određenoj lokaciji, preporučuje se testirati statistički reprezentativni uzorak od najmanje 10 biljaka po mjestu uzorkovanja za svaku vrstu samoniklog bilja koje je potencijalni domaćin. Detekcija patogena najpouzdanija je krajem proljeća te tokom ljeta i jeseni, iako se prirodne infekcije mogu otkriti tokom cijele godine kod višegodišnje biljke *Solanum dulcamara* koja raste u tekućicama. Poznati domaćini su samonikle biljke krompira (krtole ostale u tlu), *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* i druge vrste porodice *Solanaceae*. Ostale biljke domaćini su *Pelargonium* spp. i *Portulaca oleracea*. Evropske vrste samoniklog bilja koje u specifičnim uslovima okoliša mogu biti potencijalni domaćini populacija *R. solanacearum* biovar 2 / rasa 3 u korijenju i/ili rizosferi su *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans*, *Tussilago farfara* i *Urtica dioica*.

Napomena:

U ovoj fazi može se obaviti vizuelni pregled biljaka (obojenost žila ili bakterijski iscjedak). Odvojite sve dijelove stabljika sa simptomima i testirajte ih posebno. (vidi Odjeljak II.)

2.1.2. Kratko dezinficirajte dijelove stabljika 70 %-tnim etanolom i odmah posušite papirnatim ručnikom. Dijelove stabljika potom obradite jednim od slijedećih postupaka:

- a) prekrijte ih dovoljnom količinom (oko 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4) i tresite na rotacijskoj tresilici (50-100 okretaja/min) četiri sata na temperaturi ispod 24 °C ili 16 do 24 sata uz hlađenje, ili
- b) odmah obradite drobljenjem u čvrstoj vrećici za maceraciju (npr. Stomacher ili Bioreba) sa odgovarajućom količinom ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4) koristeći gumeni bat ili prikladnu drobilicu (npr. Homex). Ako to nije moguće, dijelove stabljika čuvajte u hladnjaku najduže 72 sata ili na sobnoj temperaturi najduže 24 sata.

2.1.3. Nakon 15 minuta taloženja, izlijte supernatant.

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

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

2.2. Testiranje

Vidi dijagram te opis testova i optimizirane protokole u odgovarajućim dodacima:

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

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

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

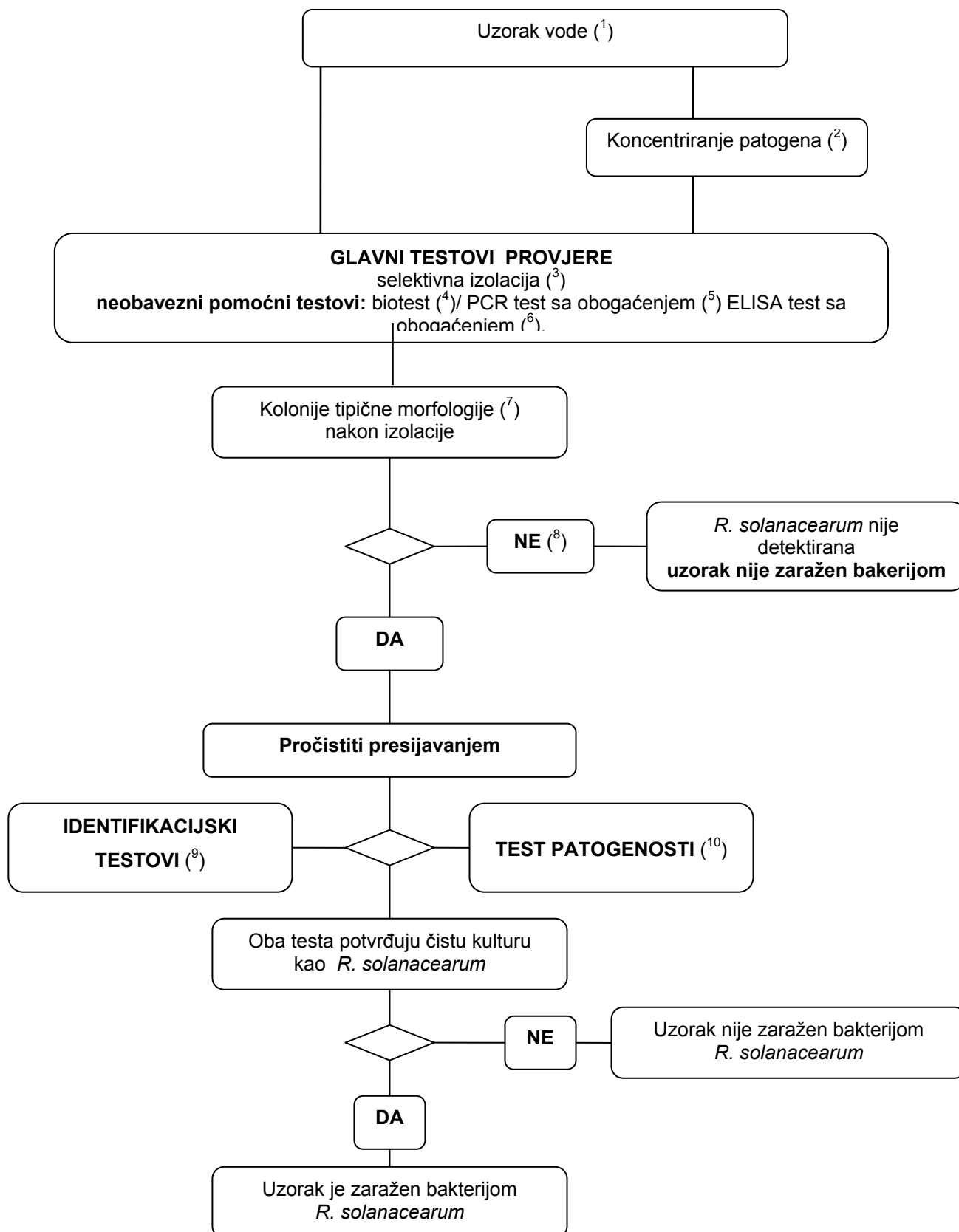
FISH test (vidi Odjeljak VI.A.7.)

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

Biotest (vidi Odjeljak VI.A.9.)

ODJELJAK IV.

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



Za preporučene postupke uzorkovanja vidi Odjeljak IV.2.1.

- (1) Metode koncentriranja patogena opisane su u Odjeljku IV.2.1. Koncentriranjem se povećavaju populacije i patogena i konkurentnih saprofitnih bakterija te se taj postupak preporučuje jedino ako neće inhibirati izolaciju.
- (2) Selektivna izolacija opisana je u Odjeljku VI.A.4.
- (3) Biotest je opisan u Odjeljku VI.A.9.
- (4) Metode obogaćivanja za PCR test opisane su u Odjeljku VI.A.4.2. i Odjeljku VI.A.6.
- (5) Metode obogaćivanja za ELISA test opisane su u Odjeljku VI.A.4.2. i Odjeljku VI.A.8.
- (6) Tipična morfologija kolonije opisana je u Odjeljku II.3.d.
- (7) Uzgoj bakterijske kulture može biti neuspješan zbog kompeticije ili inhibicije saprofitnim bakterija. Ako se sumnja da će velike populacije saprofitnih bakterija uticati na pouzdanost izolacije, ponovite izolaciju nakon što uzorak razrijedite u sterilnoj vodi.
- (8) Pouzdana identifikacija čistih kultura vjerovatnih izolata bakterije *R. solanacearum* postiže se provođenjem testova opisanih u Odjeljku VI.B.
- (9) Test patogenosti opisan je u Odjeljku VI.C.

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

Načelo

Validirani postupak opisan u ovom odjeljku može se primijeniti za detekciju patogena u uzorcima površinske vode kao i za ispitivanje uzoraka tekućeg otpada nastalog pri preradi krompira ili otpadnih voda. Međutim, važno je napomenuti da će očekivana osjetljivost detekcije ovisiti o supstratu. Na osjetljivost izolacije utiču populacije konkurentnih saprofitnih bakterija koje su uopćeno veće u otpadnim vodama nastalim pri preradi i obradi krompira nego u površinskim vodama. Dok se može očekivati da će se dalje opisanim postupkom detektirati tek 10^3 ćelija po litru površinske vode, osjetljivost detekcije u tekućem otpadu nastalom pri preradi krompira i u otpadnim vodama bit će vjerovatno znatno niža. Zbog toga se preporučuje da se testiraju otpadne vode poslije svakog postupka pročišćavanja (npr. sedimentacije ili filtriranja) tokom kojega se smanjuju populacije saprofitnih bakterija. Kada ocjenjujemo pouzdanost dobijenih negativnih rezultata, treba uzeti u obzir ograničenja u osjetljivosti postupka testiranja. Iako se ovaj postupak uspješno primjenjuje u istraživanjima čiji je cilj utvrditi prisutnost ili odsutnost patogena u površinskim vodama, treba biti svjestan njegovog ograničenja ako se koristi u sličnim istraživanjima tekućeg otpada nastalog pri preradi krompira ili otpadnih voda.

2.1. Priprema uzorka

Napomena:

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

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

2.1.2. Uzorke prevozite u tami i pri niskim temperaturama (4 do 10 °C) i testirajte ih u roku od 24 sata.

2.1.3. Bakterijska frakcija može se, po potrebi, koncentrirati pomoću jedne od slijedećih metoda:

- (a) centrifugirajte 30 do 50 ml poduzorka na 10 000 g 10 minuta (ili 7 000 g 15 minuta) po mogućnosti na temperaturi od 4 do 10 °C, uklonite supernatant i resuspendirajte talog u 1 ml pufera za talog (Dodatak 4.);
- (b) membranskom filtracijom (najmanja veličina pora 0,45 µm) nakon koje se filter ispira u 5 do 10 ml pufera za talog, koji se sakuplja. Ova je metoda prikladna za veće količine vode koja sadrži mali broj saprofita.

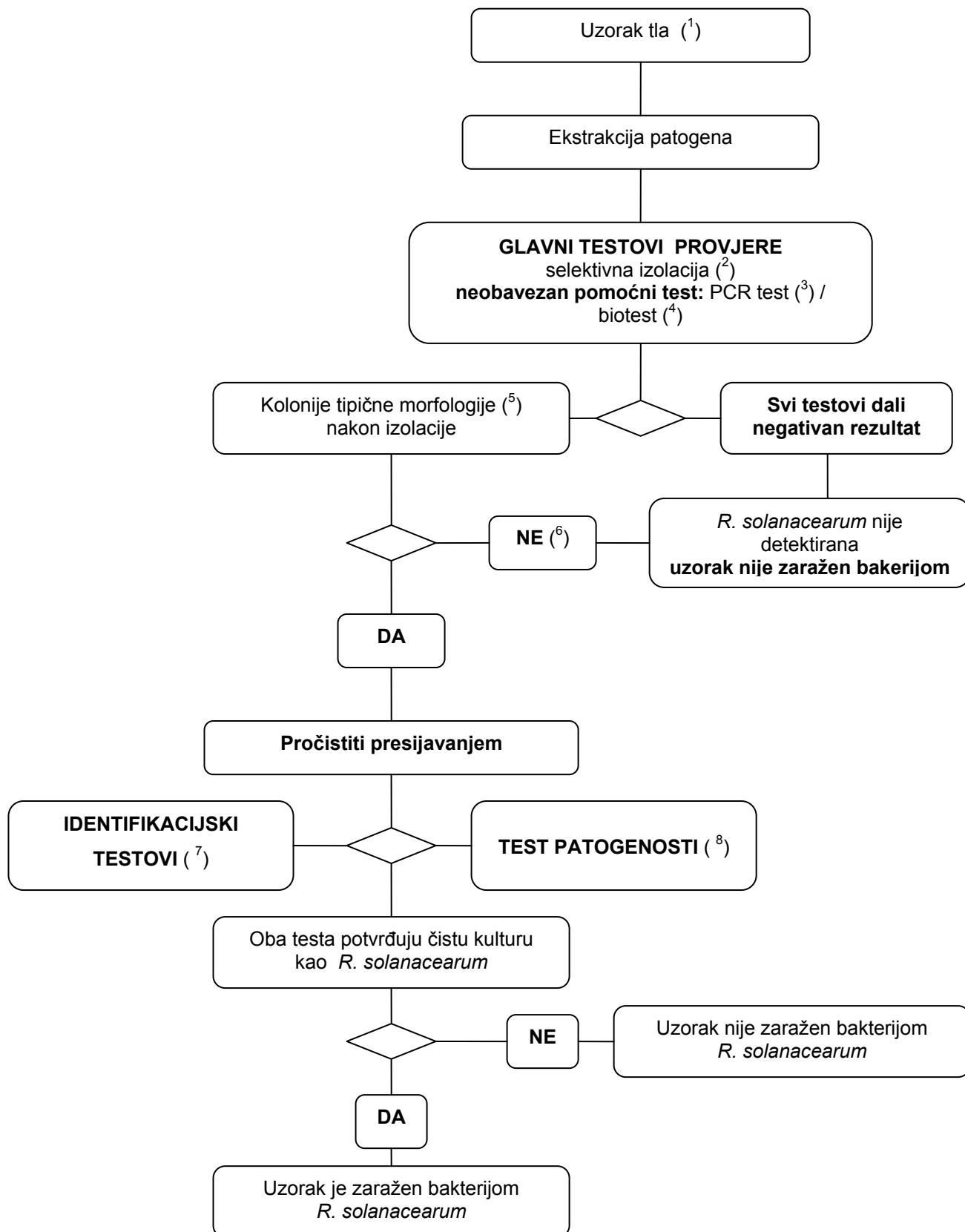
Koncentriranje se obično ne preporučuje za uzorke tekućeg otpada nastalog pri preradi krompira ili uzorke otpadnih voda jer će veće populacije konkurentnih saprofitnih bakterija spriječiti detekciju bakterije *R. solanacearum*.

2.2. Testiranje

Vidi dijagram te opis testova i optimizirane protokole u odgovarajućim dodacima.

ODJELJAK V.

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



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

Načela:

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

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

2.1. Priprema uzorka

2.1.1. Uzorkovanje tla u polju treba obavljati u skladu sa osnovnim načelima koja se primjenjuju kod uzorkovanja za ispitivanje nematoda. Sa 60 mjesta na svaka 0,3 ha uzmite 0,5 do 1 kg tla po uzorku, sa dubine od 10 do 20 cm (ili na mreži od 7 x 7 metara). Ako se sumnja na prisutnost patogena, povećajte broj mjesta uzorkovanja na 120 na svakih 0,3 ha. Prije testiranja uzorke čuvajte na temperaturi od 12 do 15 °C. Uzorkovanje krutog otpada nastalog pri preradi krompira ili uzorkovanje kanalizacijskog mulja obavite tako što ćete uzeti ukupno 1 kg na mjestima koja predstavljaju ukupnu količinu mulja koju treba testirati. Svaki uzorak dobro promiješajte prije testiranja.

2.1.2. Rastresite poduzorke od 10 do 25 g tla ili mulja na rotacijskoj tresilici (250 o/min) u 60 do 150 ml ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4) najduže dva sata. Dodavanje 0,02 %-tnog sterilnog Tween -20 i 10 do 20 g sterilnog pijeska može, po potrebi, pridonijeti rastresanju.

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

2.2. Testiranje

Vidi dijagram i opis testova u odgovarajućim dodacima.

ODJELJAK VI.

OPTIMALIZIRANI PROTOKOLI ZA DETEKCIJU I IDENTIFIKACIJU BAKTERIJE *R. SOLANACEARUM*

A. DIJAGNOSTIČKI TESTOVI I TESTOVI ZA DETEKCIJU

B.

1. Test iscjetka iz stabljike

Vjerovatna prisutnost bakterije *R. solanacearum* u stabljikama uvelih biljaka krompira, paradajza ili drugih biljaka domaćina može se utvrditi slijedećim jednostavnim testom: odrežite stabljiku neposredno iznad nivoa tla. Odrezani kraj stavite u epruvetu sa čistom vodom. Pratite hoće li nakon nekoliko minuta iz prerezanih provodnih snopova početi spontano izlaziti karakteristične niti bakterijske sluzi.

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

1. Na mikroskopskom stakalcu pripremite razmaz bakterijskog iscjetka iz zaraženog tkiva ili iz 48-satne kulture sa hranjive podloge YPGA ili SPA (vidi Dodatak 2).
2. Za pozitivnu kontrolu pripremite razmazu biovara 2, bakterije *R. solanacearum* i, ako smatrate korisnim, za negativnu kontrolu razmaz bakterijske vrste za koju je poznato da je negativna na PHB.
3. Razmazu ostavite da se osuše na zraku i donju stranu svakog stakalca brzo povucite iznad plamena da se razmazi fiksiraju.
4. Obojite preparat ili Nilskim plavilom ili Sudanskim crnilom te promatrajte pod mikroskopom kako je opisano u daljnjem tekstu: Nilsko plavilo test:
 - a) Prelijte svako stakalce s 1 %-tnom vodenom otopinom Nilskog plavila A i inkubirajte 10 minuta na 55 °C.
 - b) Ocijedite rastvor boje. Isperite kratko pod blagim mlazom vode iz slavine. Višak vode uklonite upijajućim papirom.
 - c) Prelijte razmaz 8 %-tnim vodenim rastvorom sirćetne kiseline i inkubirajte jednu minutu na sobnoj temperaturi.
 - d) Isperite kratko pod blagim mlazom vode iz slavine. Višak vode uklonite upijajućim papirom.
 - e) Ponovo navlažite kapljicom vode i pokrijte pokrovnim stakalcem.
 - f) Pregledajte obojeni razmaz epifluorescentnim mikroskopom na 450 nm, imerzijskim objektivom povećanja od 600 do 1000 x (uljna ili vodena imerzija).
 - g) Pregledajte da li je prisutna svijetlonarančasta fluorescencija zrnaca PHB-a. Također pregledajte pod normalnim svjetlom kako biste se uvjerali da su zrnca unutarćelijska i da je ćelijska morfologija tipična za bakteriju *R. solanacearum*.

Sudansko crnilo test:

- (a) Prelijte svako stakalce 0,3 %-tnom otopinom Sudanskog crnila B u 70 %-tnom etanolu i inkubirajte 10 minuta na sobnoj temperaturi.
- (b) Ocijedite otopinu boje, kratko isperite pod mlazom vode iz slavine i višak vode uklonite upijajućim papirom.
- (c) Stakalca nakratko umočite u ksilol te ih osušite na upijajućem papiru. Oprez! Ksilol je opasan za zdravlje. Preduzmite potrebne sigurnosne mjere i radite u digestoru.
- (d) Prelijte stakalca 0,5 %-tnom (w/v) vodenom otopinom safranina i ostavite 10 sekundi na sobnoj temperaturi. Oprez! Safranin je opasan za zdravlje. Preduzmite potrebne sigurnosne mjere i radite u digestoru.
- (e) Isperite pod blagim mlazom vode iz slavine, osušite na upijajućem papiru te pokrijte pokrovnim stakalcem.
- (f) Pregledajte obojene razmazu pod mikroskopom koji koristi prolazno svjetlo, uljnim imerzijskim objektivom povećanja od 1000 x.
- (g) Pregledajte uočavaju li se plavo-crno obojena zrnca PHB-a u stanicama *R. solanacearum* sa ružičasto obojenim ćelijskim stjenkama.

3. Serološki test aglutinacije

Aglutinacija ćelija bakterije *R. solanacearum* u bakterijskom iscjetku ili ekstraktima simptomatskih tkiva najbolje se opaža korištenjem validiranih antitijela (vidi Dodatak 3) obilježenih odgovarajućim obojenim oznakama kao što su crvene ćelije *Staphylococcus aureus* ili obojene čestice lateksa. Ako koristite komplet koji je dostupan na tržištu (vidi Dodatak 3), slijedite upute proizvođača. U protivnom, primijenite slijedeći postupak:

- (a) pomiješajte kapljice suspenzije obilježenog antitijela i bakterijskog iscjetka (oko 5 µl svakog) na predmetnim stakalcima sa više otvora;
- (b) pripremite pozitivne i negativne kontrole koristeći suspenzije *R. solanacearum* biovar 2 i heterolognog soja;
- (c) posmatrajte hoće li doći do aglutinacije u pozitivnim uzorcima nakon 15 sekundi laganog miješanja.

4. Selektivna izolacija

4.1. Nasađivanje na selektivnu podlogu

Napomena:

Prije nego ovu metodu prvi put primijenite, obavite prethodne testove kako biste osigurali ponovljivu detekciju 10^3 do 10^4 jedinica koje stvaraju kolonije (CFU) bakterije *R. solanacearum* po ml, a koje su dodane ekstraktima uzoraka koji su prema ranijim testiranjima negativni. Koristite primjereno validiranu selektivnu hranjivu podlogu kao što je SMSA (prilagođenu prema Elphinstone i sur., 1996; vidi Dodatak 2). Trebate dobro paziti da razlikujete *R. solanacearum* od drugih bakterija čije kolonije mogu rasti na toj hranjivoj podlozi.

Nadalje, kolonije *R. solanacearum* mogu biti netipične morfologije ako su podloge prenatrpane ili ako su prisutne antagonističke bakterije. Ako se sumnja na učinke kompeticije ili antagonizma, uzorak treba ponovo testirati drugim testom. Najveća osjetljivost detekcije ovom metodom može se očekivati ako se koriste svježe pripremljeni ekstrakti uzoraka. Međutim, ova se metoda može primjenjivati i na ekstraktima koji su bili pohranjeni sa glicerolom na temperaturi od – 68 do – 86 °C. Za pozitivnu kontrolu pripremite decimalna razrjeđenja suspenzije od 106 CFU/ml virulentnog soja biovara 2, *R. solanacearum* (npr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Kako bi se spriječila svaka mogućnost kontaminacije, pozitivne kontrole pripremite potpuno odvojeno od uzoraka koje ćete ispitivati. Za svaku novopripremljenu seriju selektivne hranjive podloge treba, prije nego se upotrijebi za testiranje rutinskih uzoraka, provjeriti da li je prikladna za rast patogena. Kontrolni materijal testirajte na isti način kao i uzorke.

4.1.1. Primijenite odgovarajuću tehniku nanošenja razrjeđenja kako biste osigurali da su sve populacije saprofitnih bakterija dovoljno razrijeđene. Nanesite 50 – 100 µl ekstrakta uzorka po podlozi i po svakom razrjeđenju.

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

Napomena:

Na ovoj hranjivoj podlozi ponekad rastu i netipične kolonije *R. solanacearum*. One mogu biti malene, okrugle, potpuno crvene boje i netekuće ili samo djelimično tekuće te ih je, stoga, teško razlikovati od kolonija saprofitnih bakterija.

4.1.3. Vjerovatne kolonije *R. solanacearum*, nakon što ste ih nanijeli ili razrijedili i precijepili na uobičajenu hranjivu podlogu, pročistite kako biste dobili pojedinačne izdvojene kolonije (vidi Dodatak 2).

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

4.1.5. Identificirajte vjerovatne kulture (vidi Odjeljak VI.B) i provedite test patogenosti (vidi Odjeljak VI.C).

Tumačenje rezultata selektivne izolacije

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

4.2. Postupak obogaćivanja

Upotrijebite validirani medij za obogaćivanje kao što je modificirani Wilbrink tekući medij (vidi Dodatak 2). Ovaj se postupak može primijeniti za selektivno povećanje populacije *R. solanacearum* u ekstraktima uzoraka te da se poveća osjetljivost detekcije. Ovim se postupkom, također, djelotvorno razrjeđuju inhibitori PCR reakcije (1:100). Međutim, treba napomenuti da obogaćivanje *R. solanacearum* može biti neuspješno zbog kompeticije ili antagonizma saprofitnih organizama koji se često istovremeno obogaćuju. Zbog toga može biti teško izdvojiti *R. solanacearum* iz kultura obogaćenih u tekućem mediju. Pored toga, obzirom da se populacije serološki srodnih saprofita mogu povećati, preporučuje se upotreba specifičnih monoklonskih antitijela umjesto poliklonskih antitijela ako će se provesti ELISA test.

4.2.1. Za obogaćivanje za PCR test prenesite 100 µl ekstrakta uzorka u 10 ml tekućeg medija za obogaćivanje (Dodatak 2) koji je prethodno podijeljen u alikvotne epruvete ili bočice bez DNK. Za

obogaćivanje za ELISA test mogu se koristiti veći udjeli ekstrakta uzorka u tekućem mediju (npr. 100 µl u 1,0 ml tekućeg medija za obogaćivanje).

4.2.2. Inkubirajte 72 sata na temperaturi od 27 do 30 °C sa ili bez protresivanja, sa labavim čepom da se omogući prozračivanje.

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

4.2.4. Sa obogaćenim tekućim medijem postupajte isto kao i sa uzorcima u prije opisanim testovima.

Napomena:

Ako očekujete da će obogaćivanje *R. solanacearum* biti onemogućeno zbog velikih populacija određenih konkurentnih saprofitnih bakterija, bolje rezultate ćete možda dobiti ako ekstrakte uzoraka obogatite prije centrifugiranja ili drugih postupaka koncentriranja.

5. IF Test načelo

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

Napomena:

Koristite validirani izvor antitijela za *R. solanacearum*

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

5.1. Pripremite stakalca za testiranje prema jednom od slijedećih postupaka:

(i) Za suspenzije taloga sa relativno malo skroba:

U prvi otvor pipetom odmjerite standardni volumen (15 µl je dovoljno za otvore promjera 6 mm – za veće otvore povećajte volumen) razrjeđenja od 1/100 resuspendiranog taloga krompira. Potom u ostale otvore u istom redu pipetom odmjerite slični volumen nerazrijeđene suspenzije (1/1) taloga. Drugi red se može koristiti za duplikat istog ili za drugi uzorak kako je prikazano na slici 1.

(ii) Za ostale suspenzije taloga:

Pripremite decimalna razrjeđenja (1/10, 1/100) resuspendiranog taloga u puferu za talog. U jedan red otvora pipetom odmjerite standardni volumen (15 µl je dovoljno za otvore promjera 6 mm – za veće otvore povećajte volumen) resuspendiranog taloga i svakog razrjeđenja. Drugi se red može koristiti kao duplikat istog ili za drugi uzorak kako je prikazano na slici 2.

5.2. Ostavite da se kapljice osuše na sobnoj temperaturi ili ih zagrijavajte do temperature od 40 do 45 °C. Fiksirajte bakterijske ćelije na stakalce bilo zagrijavanjem (15 minuta na 60 °C), provlačenjem kroz plamen, 95 %-tnim etanolom ili prema posebnim uputama dobavljača antitijela. Prije daljnjih testiranja, fiksirana se stakalca mogu, po potrebi, kratko vrijeme (najviše do tri mjeseca) čuvati zamrznuta u suhom spremniku.

5.3. IF postupak

(i) U skladu sa postupkom za pripremu stakalaca za testiranje kako je opisan pod 5.1.(i):

Pripremite niz dvostrukih razrjeđenja antitijela. Prvi otvor mora imati 1/2 titra (T/2), a ostale 1/4 titra (T/4), 1/2 titra (T/2), titar (T) i dvostruki titar (2T).

(ii) U skladu sa postupkom za pripremu stakalaca za testiranje kako je opisan pod 5.1.(ii):

Pripremite radno razrjeđenje antitijela u IF puferu. Radno razrjeđenje utiče na specifičnost.

Slika 1. Priprema stakalca u skladu sa stavovima 5.1.(i) i 5.3.(i) Razrjeđenja resuspendiranog taloga.

Slika 1. Priprema stakalca u skladu sa tačkama 5.1.(i) i 5.3.(i)

Razrjeđenja rastvorenog taloga

	1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	☐ razrjeđenja rastvorenog taloga ☐ dvostruka razrjeđenja seruma/antitijela
(T = titar)	T/2	T/4	T/2	T	2T	
Uzorak 1	●1	●2	●3	●4	●5	
Duplikat uzorka 1 ili uzorka 2	●6	●7	●8	●9	●10	

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

Radna razrjeđenja seruma/antitijela

	1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	☐ decimalna razrjeđenja rastvorenog taloga
Uzorak 1	●1	●2	●3	●4	●5	
Duplikat uzorka 1 ili uzorka 2	●6	●7	●8	●9	●10	

Slika 2. Priprema stakalca u skladu sa stavovima 5.1.(ii) i 5.3.(ii) Radna razrjeđenja seruma/antitijela.

5.3.1. Posložite stakalca na navlaženi upijajući papir. Svaki otvor potpuno prekriti razrjeđenjem antitijela. Volumen antitijela koji se stavlja u pojedini otvor mora biti jednak volumenu stavljenog ekstrakta. Slijedite slijedeći postupak ako nema posebnih uputa dobavljača antitijela:

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

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

5.3.4. Posložite stakalca na navlaženi upijajući papir. Otvore prekriti razrijeđenim FITC konjugatom koji se koristi za određivanje titra. Volumen konjugata nanesenog na otvore mora biti jednak volumenu nanesenog antitijela.

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

5.3.6. Otresite kapljice konjugata sa stakalca. Isperite i operite kako je prethodno opisano (5.3.3). Pažljivo osušite.

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

5.4. Očitavanje IF testa

5.4.1. Pregledajte pripremljena stakalca pod epifluorescentnim mikroskopom sa odgovarajućim filterima za ekscitaciju FITC-a, uz uljnu imerziju i povećanje od 500-1000 x. Pregledajte svaki otvor preko dva međusobno okomita promjera i duž vanjskog ruba. Za uzorke u kojima je vidljiv mali broj ćelija ili ih uopće nema pregledajte najmanje 40 mikroskopskih vidnih polja. Najprije pregledajte stakalce sa pozitivnom kontrolom. Ćelije moraju snažno fluorescirati i moraju biti potpuno obojene na utvrđenom titru antitijela ili radnog razrjeđenja. U slučaju da kod obojenosti dođe do odstupanja, IF test se mora ponoviti (Odjeljak VI.A.5).

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

Intenzitet fluorescencije mora biti jednak kao i kod pozitivnog kontrolnog soja pri jednakom razrjeđenju antitijela. Ćelije sa nepotpunim obojenjem ili sa slabom fluorescencijom moraju se zanemariti. Test se mora ponoviti ako se sumnja na kontaminaciju. Može se sumnjati ako sva stakalca u seriji pokazuju

pozitivne ćelije zbog kontaminacije pufera ili ako su pozitivne ćelije pronađene (izvan otvora) na površini stakalca.

5.4.3. Postoji nekoliko problema vezanih uz specifičnost testa imunofluorescencije. U koncentriranom ekstraktu jezgri pupaka ili dijelova stabljika mogu se nalaziti populacije fluorescirajućih ćelija netipične morfologije i saprofitne bakterije sa kojima dolazi do unakrsne reakcije i koje su po veličini i morfologiji slične bakteriji *R. solanacearum*.

5.4.4. U obzir uzmite samo fluorescirajuće ćelije tipične veličine i morfologije u titru ili radnom razrjeđenju antitijela kako je opisan u stavu 5.3.

5.4.5. Tumačenje očitavanja IF testa

(i) Ako nađete jasno fluorescirajuće ćelije karakteristične morfologije, odredite prosječan broj tipičnih ćelija po mikroskopskom vidnom polju i izračunajte broj tipičnih ćelija po ml resuspendiranog taloga (Dodatak 5). Očitavanje IF testa je pozitivno za uzorke koji imaju najmanje 5×10^3 tipičnih ćelija po ml resuspendiranog taloga. Uzorak se smatra potencijalno kontaminiranim i potrebno je daljnje testiranje.

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

6. PCR Testovi

Načela

Kada se PCR test koristi kao glavni test provjere i rezultat je pozitivan, mora se provesti IF test ili izolacija kao drugi obavezni test provjere. Kada se PCR test koristi kao drugi test provjere i rezultat je pozitivan, za postavljanje konačne dijagnoze potrebno je daljnje testiranje prema dijagramu. Korištenje ove metode kao glavnog testa provjere preporučuje se samo ako ste stručno osposobljeni.

Napomena:

Preliminarno testiranje ovom metodom treba omogućiti ponovljivu detekciju 10^3 do 10^4 ćelija bakterije *R. solanacearum* po ml, koje su dodate ekstraktima uzoraka koji su u prethodnim testiranjima dali negativan rezultat. Kako bi se postigao najveći stepen osjetljivosti i specifičnosti u svim laboratorijama, mogu biti potrebni eksperimenti za optimizaciju metode. Koristite validirane reagense i protokole za PCR (vidi Dodatak 6). Poželjno je odabrati metodu sa internom kontrolom. Preduzmite odgovarajuće mjere opreza kako biste izbjegli kontaminaciju uzorka ciljom DNK. Da bi se spriječila kontaminacija ciljom DNK, PCR test trebali bi obavljati iskusni stručnjaci, u specijaliziranim laboratorijama za molekularnu biologiju. Negativne kontrole (za ekstrakciju DNK i PCR postupak) treba uvijek obraditi kao zadnje uzorke u postupku kako bi se vidjelo da li je došlo do prijenosa DNK. U PCR test treba uključiti slijedeće negativne kontrole:

- ekstrakt uzorka koji je u ranijem testiranju na *R. solanacearum* bio negativan
- pufer korišten za ekstrakciju bakterije i DNK iz uzorka
- reakcijsku smjesu za PCR treba uključiti slijedeće pozitivne kontrole:
- alikvot resuspendiranih taloga u koje je dodata bakterija *R. solanacearum* (za pripremu vidi Dodatak 3B).
- suspenziju u vodi od 10^6 ćelija/ml bakterije *R. solanacearum* virulentnog izolata (npr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vidi Dodatak 3 B).
- ako je moguće, u PCR testu upotrijebite i DNK ekstrahiranu iz pozitivnih kontrolnih uzoraka.

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

6.1. Metode pročišćavanja DNK

Koristite uzorke za pozitivnu i negativnu kontrolu kako je gore opisano (vidi Dodatak 3). Testirajte kontrolni materijal na isti način kao i uzorke. Postoje različite metode za pročišćavanje ciljane DNK iz kompleksnih uzoraka, kojima se uklanjaju inhibitori PCR reakcije i drugih enzimskih reakcija te se u ekstraktu uzorka koncentrira ciljna DNK. Slijedeća je metoda optimizirana za korištenje sa validiranim PCR metodama koje su navedene u Dodatku 6.

a) Metoda prema Pastriku (2000)

- 1) Pipetom odmjerite 220 μ l pufera za lizu [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] u Eppendorf epruvetu od 1,5 ml.
- 2) Dodajte 100 μ l ekstrakta uzorka i stavite u blok za zagrijavanje ili vodeni kupelj na 95 °C 10 minuta.
- 3) Stavite epruvetu na led 5 minuta.

- 4) Dodajte 80 µl osnovnog rastvora lizozima (50 mg lizozima na ml u 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) te inkubirajte 30 minuta na 37 °C.5) Dodajte 220 µl Easy DNA® rastvora A (Invitrogen), dobro promiješajte na vrtložnoj mješalici i inkubirajte 30 minuta na 65 °C.
- 5) Dodajte 100 µl Easy DNA® rastvora B (Invitrogen), snažno miješajte na vrtložnoj mješalici sve dok precipitat ne bude slobodno kružio po epruveti i dok uzorak ne bude jednoliko viskozan.
- 6) Dodajte 500 µl hloroforma te miješajte na vrtložnoj mješalici dok se viskoznost ne smanji i smjesa postane homogena.
- 7) Centrifugirajte na 15000 g 20 minuta na 4 °C da se odijele faze i stvori interfaza.
- 8) Gornju fazu prenesite u novu Eppendorf epruvetu.
- 9) Dodajte 1 ml 100 %-tnog etanola (– 20 °C), kratko promiješajte na vrtložnoj mješalici i inkubirajte na ledu 10 minuta.
- 10) Centrifugirajte na 15000 g 20 minuta na 4 °C te uklonite etanol iz taloga.
- 11) Dodajte 500 µl 80 %-tnog etanola (– 20 °C) te promiješajte okretanjem epruvete.
- 12) Centrifugirajte na 15000 g 10 minuta na 4 °C, sačuvajte talog, a etanol uklonite.
- 13) Ostavite talog da se suši na vazduhu ili u vakuumskoj centrifugi (DNA speed vac).
- 14) Resuspendirajte talog u 100 µl sterilne ultra čiste vode i ostavite na sobnoj temperaturi najmanje 20 minuta.
- 15) Pohranite na – 20 °C dok ne bude potrebno za PCR.
- 16) Centrifugiranjem izdvojite mogući bijeli precipitat te za PCR upotrijebite 5 µl supernatanta koji sadrži DNK.

(b) Druge metode

Mogu se primijeniti druge metode ekstrakcije DNK, npr. Qiagen DNeasy Plant Kit, ako su dokazano jednako djelotvorne u pročišćavanju DNK iz kontrolnih uzoraka koji sadrže 10^3 do 10^4 patogenih ćelija po ml.

6.2. PCR

6.2.1. Pripremite kalupe za testiranje i kontrolu za PCR prema validiranim protokolima (Odjeljak VI.A.6). Pripremite jedno decimalno razrijeđenje ekstrakta DNK iz uzorka (1:10 u ultra čistoj vodi).

6.2.2. U nekontaminiranom prostoru pripremite odgovarajuću reakcijsku smjesu za PCR prema objavljenim protokolima (Dodatak 6). Preporučuje se da, ako je moguće, koristite protokol za multipleks PCR koji uključuje i unutarašnju kontrolu.

6.2.3. Prema protokolu za PCR (Dodatak 6) dodajte 2-5 µl ekstrakta DNK na 25 µl reakcijske smjese u sterilne epruvete za PCR.

6.2.4. Uključite i uzorak za negativnu kontrolu koji sadrži samo reakcijsku smjesu za PCR te, umjesto uzorka, dodajte isti izvor ultra čiste vode koji je korišten za pripremu reakcijske smjese za PCR.

6.2.5. Stavite epruvete u uređaj za PCR (thermal cycler) koji je korišten u preliminarnom testiranju te pokrenite optimizirani PCR program (Dodatak 6).

6.3. Analiza PCR produkata

6.3.1. Elektroforezom u agaroznom gelu razdvojite umnožene PCR produkte. Najmanje 12 µl reakcijske smjese umnožene DNK iz svakog uzorka, pomiješane sa 3 µl pufera za nanošenje (Dodatak 6), nanosite u 2,0 %-tni (w/v) agarozni gel u tris-acetat EDTA puferu (TAE) (Dodatak 6), uz napon od 5 do 8 V po cm. Upotrijebite odgovarajući DNK standard, npr. 100 bp ljestvicu.

6.3.2. Obojite elektroforetske pruge DNK u gelu etidijevim bromidom (0,5 mg/l) 30 do 60 minuta preduzimajući pri tome odgovarajuće mjere opreza za rad sa ovim mutagenom.

6.3.3. Obojeni gel pregledajte na kratkotalasnom UV transiluminatoru ($\lambda = 302$ nm) i tražite umnožene fragmente očekivane dužine (Dodatak 6) te ih dokumentirajte.

6.3.4. Za svaki novi nalaz/slučaj provjerite autentičnost umnoženog PCR produkta analizom restrikcijskim enzimima preostale umnožene DNK uzorka i to inkubacijom pri optimalnoj temperaturi i u optimalnom vremenu sa odgovarajućim enzimom i puferom (vidi Dodatak 6). Pocijepane fragmente razdvojite elektroforezom u agaroznom gelu kako je gore navedeno te nakon bojenja etidijevim bromidom na UV transiluminatoru posmatrajte karakteristični restrikcijski obrazac i uporedite ga sa pozitivnom kontrolom prije i poslije cijepanja.

Tumačenje rezultata PCR testa

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

PCR test je pozitivan ako je vidljiv PCR produkt koji je specifičan za bakteriju *R. solanacearum* i koji je očekivane dužine i restrikcijskog obrasca, pod uslovom da nije umnožen u nijednom uzorku negativne kontrole. Pouzdanu potvrdu pozitivnog rezultata možete dobiti i ponavljanjem testa sa drugim parom početnica (Dodatak 6).

Napomena:

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

7. FISH test načelo

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

Napomena:

Koristite validirane oligo-probe specifične za bakteriju *R. solanacearum* (vidi Dodatak 7). Preliminarna testiranja ovom metodom trebaju omogućiti ponovljivu detekciju najmanje 10^3 do 10^4 ćelije bakterije *R. solanacearum* po ml koje su dodate ekstraktima uzoraka koji su u ranijim testiranjima bili negativni. Slijedeći je postupak najbolje provesti na svježije pripremljenim ekstraktima uzoraka, ali se može uspješno primijeniti i na ekstraktu uzorka koji je bio pohranjen sa glicerolom na temperaturi od -16 do -24 °C ili od -68 do -86 °C.

Za negativnu kontrolu upotrijebite alikvot ekstrakta uzoraka koji su u ranijem testiranju na *R. solanacearum* bili negativni.

Za pozitivnu kontrolu pripremite suspenzije koje sadrže 10^5 do 10^6 ćelija/ml 0,01 M fosfatnog pufera (PB) bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (npr. soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vidi Dodatak 3) iz kulture stare 3 – 5 dana. Pripremite odvojena stakalca za pozitivnu kontrolu sa homolognim sojem ili nekim drugim referentnim sojem bakterije *R. solanacearum* suspendiranim u ekstraktu krompira kako je navedeno u Dodatku 3B. Korištenje eubakterijske oligo-probe obilježene FITC -om omogućava kontrolu procesa hibridizacije jer će se obojiti sve eubakterije koje su prisutne u uzorku. U Dodatku 3A. navedeni su standardizirani pozitivni i negativni kontrolni materijali koji se mogu upotrebljavati u ovom testu. Kontrolni materijal testirajte jednako kao i uzorke.

7.1. Fiksiranje ekstrakta krompira

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

7.1.1. Pripremite rastvor za fiksiranje (vidi Dodatak 7).

7.1.2. Pipetom odmjerite 100 µl svakog ekstrakta uzorka u Eppendorf epruvetu te centrifugirajte 7 minuta na 7000 g.

7.1.3. Uklonite supernatant i resuspendirajte talog u 200 µl fiksativa pripremljenog prije najviše 24 sata. Promiješajte na vrtložnoj mješalici i inkubirajte jedan sat u hladnjaku.

7.1.4. Centrifugirajte 7 minuta na 7000 g, uklonite supernatant te resuspendirajte talog u 75 µl 0,01 M PB (vidi Dodatak 7).

7.1.5. U otvore čistog stakalca nanosite 16 µl fiksiranih suspenzija kako je prikazano na slici 7.1. Na svako stakalce nanosite nerazrijeđena dva različita uzorka i upotrijebite 10 µl za pripremanje razrijeđenja 1:100 (u 0,01 M PB). Preostali fiksirani rastvor uzorka (49 µl) možete pohraniti na -20 °C nakon dodavanja jednog volumena 96 %-tnog etanola. Ako FISH test trebate ponoviti, centrifugiranjem uklonite etanol i dodajte jednaki volumen 0,01 M PB (promiješati na vrtložnoj mješalici).

Slika 7.1. Prikaz stakalca za FISH test

Uzorak 1	Prazno	Prazno	Prazno	Uzorak 2
○	○	○	○	○
Otvor 1	Otvor 2	Otvor	Otvor	Otvor
Uzorak 1	Prazno	Prazno	Prazno	Uzorak 2
○	○	○	○	○
Otvor	Otvor	Otvor	Otvor	Otvor
Pokrovno stakalce 1		Pokrovno stakalce 2		

7.1.6. Stakalca osušite na zraku (ili u sušioniku na 37 °C) te ih fiksirajte provlačenjem kroz plamen. Na ovom koraku se postupak može prekinuti i nastaviti hibridizaciju slijedeći dan. Stakalca se trebaju pohraniti na sobnoj temperaturi u suhom prostoru bez prašine.

7.2. Hibridizacija

7.2.1. Dehidrirajte ćelije uzastopnim jednominutnim uranjanjem u 50 %-tni, 80 %-tni i 90 %-tni etanol. Stakalca postavite na držač i osušite na zraku.

7.2.2. Pripremite vlažnu komoru za inkubaciju tako što ćete dno hermetičke kutije prekriti upijajućim ili filter papirom namočenim u 1x hybmix (Dodatak 7). Kutiju prethodno inkubirajte u hibridizacijskoj pećnici najmanje 10 minuta na 45 °C.

7.2.3. Nanesite po 10 µl otopine za hibridizaciju (Dodatak 7) u osam otvora (otvori 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 i 10; vidi sliku 7.1.) svakog stakalca, a dva središnja otvora (3 i 8) ostavite prazna.

7.2.4. Prva i zadnja četiri otvora pokrijte pokrovnim stakalcem (24 x 24 mm) pazeći pri tome da u otvorima ne ostane zraka. Stavite stakalca u prethodno zagrijanu vlažnu komoru i hibridizirajte pet sati u pećnici na 45 °C u tami.

7.2.5. Pripremite tri posude sa 1 L Milli Q vode (za upotrebu u molekularnoj biologiji), 1 L 1x hybmix (334 ml 3x hybmix i 666 ml Milli Q vode) i 1 L 1/8x hybmix (42 ml 3X hybmix i 958 ml Milli Q vode). Svaku posudu prethodno inkubirajte u vodenj kupelji na 45 °C.

7.2.6. Skinite pokrovna stakalca, a predmetna stakalca stavite na držač.

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

7.2.8. Prenesite držač stakalaca u otopinu za pranje (1/8x hybmix) i inkubirajte još 15 minuta.

7.2.9. Stakalca nakratko uronite u Milli Q vodu te ih stavite na filter papir. Višak vlage uklonite tako što ćete površinu lagano pokriti filter papirom. U svaki otvor pipetom nanesite 5 do 10 µl zaštitnog rastvora protiv izbljeđivanja (npr. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA ili ekvivalentna) te cijelo predmetno stakalce pokrijte velikim pokrovnim stakalcem (24 x 60 mm).

7.3. Očitavanje FISH testa

7.3.1. Stakalca odmah pregledajte epifluorescentnim mikroskopom uz uljnu imerziju, sa povećanjem od 630 ili 1000 x. Sa filterom prikladnim za fluorescein-izotiocijanat (FITC), eubakterijske ćelije (uključujući većinu gram negativnih ćelija) u uzorku vide se kao fluorescentno zelene. Upotrebom filtera za tetrametilrodamin-5-izotiocijanat ćelije bakterije *R. solanacearum*, obojene sa Cy 3, vide se kao fluorescentno crvene. Uporedite morfologiju ćelije sa morfologijom pozitivnih kontrola. Ćelije moraju biti jasno fluorescentne i u cijelosti obojene. Ako dođe do odstupanja u obojenosti, FISH test (Odjeljak VI.A.7) se mora ponoviti. Pregledajte svaki otvor duž dva međusobno okomita promjera i duž vanjskog ruba. Za uzorke u kojima je vidljiv mali broj ćelija ili ih uopće nema pregledajte najmanje 40 mikroskopskih vidnih polja.

7.3.2. Pregledajte da li su u otvorima vidljive jasno fluorescirajuće ćelije karakteristične morfologije za bakteriju *R. solanacearum*

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

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

7.3.4. Postoji nekoliko problema vezanih uz specifičnost FISH testa. U koncentriranom ekstraktu jezgri pupaka i dijelova stabljika mogu se pojaviti, iako rjeđe nego kod IF testa, populacije fluorescirajućih ćelija netipične morfologije i saprofitne bakterije koje su po veličini i morfologiji slične bakteriji *R. solanacearum*.

7.3.5. U obzir uzmite samo fluorescirajuće ćelije tipične veličine i morfologije.

7.3.6. Tumačenje rezultata FISH testa

(i) Rezultati FISH testa smatraju se valjanima ako se primjenom FITC filtera opaze zeleno fluorescirajuće ćelije čija je veličina i morfologija tipična za bakteriju *R. solanacearum* i ako se primjenom filtera za rodamin opaze crveno fluorescirajuće ćelije, i to u svim pozitivnim kontrolama i niti jednoj negativnoj kontroli. Ako se pronađu jasno fluorescirajuće ćelije karakteristične morfologije, odredite prosječni broj tipičnih ćelija po mikroskopskom vidnom polju i izračunajte broj tipičnih ćelija po ml resuspendiranog taloga (Dodatak 4). Uzorci sa najmanje 5×10^3 tipičnih ćelija po ml resuspendiranog taloga smatraju se potencijalno kontaminiranim. Potrebni su daljnji testovi. Uzorci sa manje od 5×10^3 tipičnih ćelija po ml resuspendiranog taloga smatraju se negativnim.

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

8. ELISA Testovi

Načelo

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

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

Napomena:

Koristite validirani izvor antitijela za *R. solanacearum*

Preporučljivo je da se titar odredi za svaku novu seriju antitijela. Titar se definira kao najveće razrjeđenje kod kojeg dolazi do optimalne reakcije pri testiranju suspenzije koja sadrži 10^5 do 10^6 ćelija/ml homolognog soja bakterije *R. solanacearum* uz korištenje odgovarajućih konjugata sekundarnih antitijela prema preporukama proizvođača. Tokom testiranja, treba koristiti antitijela u radnim razrjeđenjima koja su blizu ili jednaka titru formulacije dostupne na tržištu. Odredite titar antitijela na suspenziji od 10^5 do 10^6 ćelija po ml homolognog soja bakterije *R. solanacearum*.

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

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

- 1) Upotrijebite alikvot od 100 do 200 µl ekstrakta uzorka. (Zagrijavanjem četiri minute na 100 °C u vodenoj kupelji ili bloku za zagrijavanje u nekim se slučajevima mogu smanjiti nespecifični rezultati).
- 2) Dodajte jednaki volumen pufera za oblaganje dvostruke jačine (Dodatak 4) i promiješajte na vrtložnoj mješalici.
- 3) Nanesite alikvot od 100 µl u svaki od najmanje dva otvora na mikrotitarskoj ploči (npr. Nunc-Polysorp ili ekvivalentna) i inkubirajte jedan sat na 37 °C ili preko noći na 4 °C.
- 4) Uklonite ekstrakte iz otvora. Isperite otvore tri puta rastvorom PBS-Tween (Dodatak 4), a zadnju otopinu za ispiranje ostavite u otvorima najmanje pet minuta.
- 5) Pripremite odgovarajuće razrjeđenje antitijela za *R. solanacearum* u blokirajućem puferu (Dodatak 4). Za validirana antitijela koja su dostupna na tržištu koristite preporučena razrjeđenja (obično dvostruka koncentracija titra).
- 6) Dodajte 100 µl u svaki otvor i inkubirajte jedan sat na 37 °C.
- 7) Uklonite rastvor antitijela iz otvora i operite otvore kao prije (korak 4).

- 8) Pripremite odgovarajuće razrjeđenje sekundarnih antitijela-konjugata alkalne fosfataze u blokirajućem puferu. Dodajte 100 µl u svaki otvor i inkubirajte jedan sat na 37 °C.
- 9) Uklonite konjugat antitijela iz otvora i operite otvore kao prije (korak 4).
- 10) U svaki otvor dodajte 100 µl rastvora supstrata alkalne fosfataze (Dodatak 4), inkubirajte u tami na sobnoj temperaturi i očitavajte apsorbanciju pri 405 nm u pravilnim razmacima tokom 90 minuta.

(b) DASI ELISA

1) Pripremite odgovarajuće razrjeđenje poliklonskih imunoglobulina za bakteriju *R. solanacearum* u puferu za oblaganje pH 9,6 (Dodatak 4). Nanesite 200 µl u svaki otvor. Inkubirajte četiri do pet sati na 37 °C ili 16 sati na 4 °C.

2) Otvorite isperite tri puta rastvorom PBS-Tween (Dodatak 4). U najmanje dva otvora nanesite 190 µl ekstrakta uzorka. Na svakoj ploči dodajte pozitivnu i negativnu kontrolu, i to svaku u po dva otvora. Inkubirajte 16 sati na 4 °C.

3) Otvore isperite tri puta rastvorom PBS-Tween (Dodatak 4).

4) Pripremite odgovarajuće razrjeđenje monoklonskih antitijela specifičnih za bakteriju *R. solanacearum* u PBS -u (Dodatak 4) koji sadrži i 0,5 % goveđeg serumskog albumina (BSA) te nanesite 190 µl u svaki otvor. Inkubirajte dva sata na 37 °C.

5) Otvore i isperite tri puta rastvorom PBS-Tween (Dodatak 4).

6) Pripremite odgovarajuće razrjeđenje antimišjih imunoglobulina konjugiranih sa alkalnom fosfatazom u PBS -u. Nanesite 190 µl u svaki otvor. Inkubirajte dva sata na 37 °C.

7) Otvore isperite tri puta otopinom PBS-Tween (Dodatak 4).

8) Pripremite otopinu supstrata alkalne fosfataze koja sadrži 1 mg p-nitrofenil fosfata po ml pufera supstrata (Dodatak 4). Nanesite 200 µl u svaki otvor. Inkubirajte u tami na sobnoj temperaturi i očitavajte apsorbanciju pri 405 nm u pravilnim razmacima tokom 90 minuta.

Tumačenje rezultata ELISA testova

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

9. Biotest

Napomena:

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

9.1. Za svaki uzorak koristite 10 biljaka osjetljivog kultivara paradajza (npr. Moneymaker ili drugi kultivar za koji je u laboratoriji utvrđeno da je jednako osjetljiv) u fazi trećeg pravog lista. Za pojedinosti o uzgoju, vidi Dodatak 8. Moguće je upotrijebiti i patlidžane (npr. kultivar Black Beauty ili kultivar ekvivalentne osjetljivosti), ali samo biljke u fazi 2-3 lista do potpunog razvoja trećeg pravog lista. Pokazalo se da su kod patlidžana simptomi slabiji i da se sporije razvijaju. Preporučuje se, stoga, po mogućnosti koristiti sadnice paradajza.

9.2. 100 µl ekstrakta uzorka rasporedite na testne biljke.

9.2.1. Inokulacija injekcijom.

Inokulirajte stabljike neposredno iznad supki injekcijom sa potkožnom iglom (najmanje 23G). Uzorak rasporedite na testne biljke.

9.2.2. Inokulacija zarezivanjem.

Držeći biljku među prstima, pipetom nanesite kapljicu (oko 5-10 µl) resuspendiranog taloga na stabljiku između supki i prvog lista. Sterilnim skalpelom napravite dijagonalni rez, dug oko 1 cm i dubok oko 2/3 debljine stabljike, počevši od nanešene kapljice resuspendiranog taloga. Čvrsto zatvorite rez sterilnim vazelinom iz injekcije.

9.3. Koristeći istu metodu, inokulirajte pet biljaka suspenzijom u vodi od 10^5 do 10^6 ćelija/ml pripremljenom iz 48-satne kulture virulentnog soja biovara 2, bakterije *R. solanacearum* za pozitivnu

kontrolu, a puferom za talog za negativnu kontrolu (Dodatak 4). Kako ne bi došlo do unakrsne kontaminacije, odvojite biljke za pozitivnu i negativnu kontrolu od ostalih biljaka.

9.4. Testne biljke uzgajajte u karantinskim uslovima do četiri sedmice na temperaturi od 25 do 30 °C i uz visoku relativnu vlažnost te ih primjereno zalijevajte pazeći da ne dođe do zasićenja vodom ili venuća zbog nedostatka vode. Kako ne bi došlo do kontaminacije, biljke za pozitivnu i negativnu kontrolu uzgajajte na jasno odvojenim policama u stakleniku ili komori za uzgoj ili, ako je prostor ograničen, osigurajte da pojedini postupci budu jasno odvojeni. Ako se biljke za različite uzorke moraju inkubirati jedne blizu drugih, odvojite ih prikladnim zaslonima. Kod prihrane, zalijevanja, pregledavanja i svakog drugog postupka sa biljkama dobro pazite da ne dođe do unakrsne kontaminacije. Od ključne je važnosti da u staklenicima i komorama za uzgoj ne bude nikakvih insekata jer oni mogu prenijeti bakteriju sa uzorka na uzorak. Pratite javljaju li se simptomi venuća, epinastije, kloroze i/ili zaostajanja u rastu.

9.5. Iz inficiranih biljaka izolirajte (Odjeljak II.3) i identificirajte pročišćene kulture vjerovatne bakterije *R. solanacearum* (Odjeljak VI.B).

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

9.7. Identificirajte sve pročišćene kulture vjerovatne bakterije *R. solanacearum* (Odjeljak VI.B).
Tumačenje rezultata biotesta

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

B. TESTOVI ZA IDENTIFIKACIJU

Identificirajte čiste kulture vjerovatnih izolata bakterije *R. solanacearum* pomoću najmanje dva od slijedećih testova koja se zasnivaju na različitim biološkim načelima. Prema potrebi, u svaki test uključite poznate referentne sojeve (vidi Dodatak 3).

1. Nutritivni i enzimatski testovi za identifikaciju

Odredite slijedeće fenotipske osobine koje su sistemno prisutne ili odsutne kod bakterije *R. solanacearum*, prema metodama iz Lelliot i Stead (1987), Klement i sur. (1990), Schaad (2001).

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

2. IF test

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

3. ELISA test

Napomena:

Ako primjenjujete samo 2 identifikacijska testa, ne primjenjujte drugi serološki test uz ovaj.

- 3.1. Pripremite suspenziju od oko 10^8 ćelija/ml u 1x PBC (Dodatak 4).

3.2. Provedite odgovarajući postupak ELISA sa monoklonskim antitijelima specifičnim za bakteriju *R. solanacearum*.

3.3. ELISA test je pozitivan ako je ELISA vrijednost očitavanja kulture jednaka najmanje polovini vrijednosti pozitivne kontrole.

4. PCR testovi

4.1. Pripremite suspenziju od oko 10^6 ćelija/ml u sterilnoj vodi namijenjenoj upotrebi u molekularnoj biologiji.

4.2. Zagrijte 100 μ l ćelijske suspenzije u zatvorenim epruvetama u bloku za zagrijavanje ili vreloj vodenoj kupelji četiri minute na 100 °C. Uzorci se mogu potom, do upotrebe, pohraniti na – 16 do – 24 °C.

4.3. Primijenite odgovarajuće PCR postupke kako biste umnožili fragmente specifične za *R. solanacearum* [npr. Seal i sur. (1993), Pastrik & Maiss (2000), Pastrik i sur. (2002), Boudazin i sur. (1999), Opina i sur. (1997), Weller i sur. (1999)].

4.4. Smatra se da je *R. solanacearum* identificirana ako su umnoženi PCR produkti iste dužine i imaju iste polimorfizme dužine restrikcijskim fragmenata kao i soj pozitivne kontrole.

5. FISH test

5.1. Pripremite suspenziju od oko 10^6 ćelija/ml u ultra čistoj vodi.

5.2. Primijenite postupak FISH (Odjeljak VI.A.7.) sa najmanje dvije oligo-probe specifične za *R. solanacearum* (Dodatak 7).

5.3. FISH test je pozitivan ako se i kod kulture i kod pozitivne kontrole dobiju iste reakcije.

6. Profiliranje masnih kiselina (FAP)

6.1. Uzgajajte kulturu 48 sati na 28 °C na triptikaza-soja-agaru (Oxoid).

6.2. Primijenite odgovarajući FAP postupak (Janse, 1991; Stead, 1992).

6.3. FAP test je pozitivan ako je profil vjerovatne kulture identičan profilu pozitivne kontrole. Prisutnost karakterističnih masnih kiselina 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH i 18:1 2OH te odsutnost 16:0 3OH u velikoj mjeri ukazuje na *Ralstonia* sp.

7. Metode karakterizacije soja

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

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

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

Biovar 2 se dijeli na podfenotipove pomoću dodatnih testova.

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

⁽¹⁾ Vidi Lelliot i Stead (1987)

7.2. Genomski otisak prsta

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

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

7.2.2. PCR ponavljajućih slijedova, korištenjem početnica REP, BOX i ERIC (Louws i sur., 1995, Smith i sur., 1995).

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

7.3. PCR metode

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

C. TEST POTVRDE

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

- 1) Pripremite inokulum od oko 10^6 ćelija/ml iz 24 do 48 sati stare kulture izolata koji namjeravate testirati te odgovarajući pozitivni kontrolni soj bakterije *R. solanacearum* (npr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vidi Dodatak 3).
- 2) Inokulirajte 5 do 10 sadnica osjetljivih paradajz ili patlidžana u fazi trećeg pravog lista (vidi Odjeljak VI.A.9).
- 3) Inkubirajte do dvije sedmice na 25 do 28 °C i uz visoku relativnu vlažnost te ih primjereno zalijevajte pazeći da ne dođe do zasićenja vodom ili venuća zbog nedostatka vode. Kod čistih bi se kultura trebalo pojaviti tipično venuće u roku od 14 dana. Ako nakon ovog perioda simptomi nisu prisutni, ne može se potvrditi da je kultura patogeni oblik bakterije *R. solanacearum*.
- 4) Pratite javljaju li se simptomi venuća i/ili epinastije, kloroze i zaostajanja u rastu.
- 5) Iz biljaka sa simptomima izdvojite dio stabljike oko 2 cm iznad mjesta inokulacije. Smrvite i suspendirajte u manjem volumenu sterilne destilirane vode ili 50 mM fosfatnog pufera (Dodatak 4). Izolaciju iz suspenzije izvedite razmazom razrjeđenja na prikladnu hranjivu podlogu, po mogućnosti selektivnu (Dodatak 2), inkubirajte 48 do 72 sati na 28 °C te pratite rast kolonija tipičnih za *R. solanacearum*.

Dodatak 1. Laboratorije uključene u optimizaciju i validaciju protokola

Laboratorija ⁽¹⁾	Mjesto	Država
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Beč i Linz	Austrija
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgija
Plantedirektoratet	Lyngby	Danska
Central Science Laboratory	York	Engleska
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Škotska
Laboratoire national de la protection des végétaux, unité de bactériologie	Angers	Francuska

Laboratoire national de la protection des végétaux, Station de quarantaine de la pomme de terre	Le Rheu	Francuska
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Njemačka
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Njemačka
State Laboratory	Dublin	Irska
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	Italija
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Italija
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Nizozemska
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nizozemska
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabon	Portugal
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Španija
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Španija
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Švedska
(1) Naučnici za vezu		

Dodatak 2. Podloge za izolaciju i uzgoj bakterije *R. solanacearum*

(a) Uobičajene hranjive podloge

Hranjivi agar (NA)

Hranjivi agar (Difco) 23,0 g

Destilirana voda 1,0 L

Otopite sastojke i sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Agar sa kvascem, peptonom i glukozom (YPGA)

Ekstrakt kvasca (Difco) 5,0 g

Bacto pepton (Difco) 5,0 g

D (+) glukoza (monohidrat) 10,0 g

Bacto agar (Difco) 15,0 g

Destilirana voda 1,0 L

Otopite sastojke i sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Agar sa saharozom i peptonom (SPA)

Saharoza 20,0 g

Bacto pepton (Difco) 5,0 g

K₂HPO₄ 0,5 g

MgSO₄·7H₂O 0,25 g

Bacto agar (Difco) 15,0 g

Destilirana voda 1,0 L

pH 7,2 – 7,4

Otopite sastojke i sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Kelmanova tetrazolium-podloga

Casamino kiseline (Difco) 1,0 g

Bacto pepton (Difco) 10,0 g

Dekstroza 5,0 g

Bacto agar (Difco) 15,0 g

Destilirana voda 1,0 L

Otopite sastojke i sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Ohladite na 50 °C i dodajte otopinu 2,3,5-trifenil-tetrazolium-hlorida (Sigma), steriliziranu filtriranjem, kako biste dobili konačnu koncentraciju od 50 mg/l.

(b) Validirane selektivne hranjive podloge

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

Osnovna podloga

Casamino kiseline (Difco) 1,0 g

Bacto pepton (Difco) 10,0 g

Glicerol 5,0 ml
Bacto agar (Difco); vidi napomenu 2 15,0 g
Destilirana voda 1,0 L

Rastopite sastojke i sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Ohladite na 50 °C i dodajte osnovne vodene rastvore slijedećih sastojaka, sterilizirane filtriranjem, kako biste dobili predviđene konačne koncentracije:

Kristal violet (Sigma) 5 mg na L
Polimiksin-B-sulfat (Sigma P-1004) 600 000 U (oko 100 mg) na L
Bacitracil (Sigma B-0125) 1 250 U (oko 25 mg) na L
Hloramfenikol (Sigma C-3175) 5 mg na L
Penicilin-G (Sigma P-3032) 825 U (oko 0,5 mg) na L
2,3,5-trifenil-tetrazolium-hlorid (Sigma) 50 mg na L

Napomena:

1. Reagensi drugačiji od gore navedenih mogu uticati na rast bakterije *R. solanacearum*.

2. Umjesto Bacto agara (Difco) može se koristiti Oxoid agar br. 1. U tom će slučaju *R. solanacearum* sporije rasti, ali se može smanjiti i rast konkurentnih saprofita. Za formiranje tipičnih kolonija bakterije *R. solanacearum* možda će trebati 1 do 2 dana više, a crveno obojenje može biti svjetlije i difuznije nego na Bacto agaru.

3. Povećanjem koncentracije bacitracina na 2500 U/L mogu se smanjiti populacije konkurentnih bakterija, a da se ne utiče na rast bakterije *R. solanacearum*.

Pohranite hranjivu podlogu i osnovni rastvor antibiotika na 4 °C na tamno mjesto i upotrijebite u roku od jednog mjeseca. Prije upotrebe, sa podloga moramo ukloniti površinsku kondenzaciju. Podloge ne smijete pretjerano osušiti. Nakon pripremanja svake nove serije hranjive podloge, treba obaviti kontrolu kvaliteta tako što se nasadi suspenzija referentne kulture *R. solanacearum* (vidi Dodatak 3) i prati hoće li doći do stvaranja tipičnih kolonija nakon dva do pet dana inkubacije na 28 °C.

(c) Validirani mediji za obogaćivanje

SMSA tekući medij (Elphinstone i sur., 1996)

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

Modificirani Wilbrink tekući medij (Caruso i sur., 2002)

Saharoza 10 g
Proteoza pepton 5 g
K₂HPO₄ 0,5 g
MgSO₄ 0,25 g
NaNO₃ 0,25 g
Destilirana voda 1 L

Sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta te ohladite na 50 °C. Dodajte osnovne rastvore antibiotika kao za SMSA tekući medij.

Dodatak 3.

A. Standardizirani kontrolni materijali dostupni na tržištu

(a) Bakterijski izolati.

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

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

Angers, Francuska

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

Oznaka NCPPB	Br. SMT	Ostale oznake	Država porijekla	Biovar
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egipat	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turska	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Engleska	2
NCPPB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Kipar	2
NCPPB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Švedska	2
NCPPB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgija	2
NCPPB 4156*	71 *	PD 2762, CFBP 3857	Nizozemska	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15.59	Francuska	2
NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS55	Portugal	2
NCPPB 4160	69	IVIA –1632-2	Španija	2
NCPPB 4161	76	B3B	Njemačka	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	SAD	1
NCPPB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONg7	Kostarika	1
NCPPB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Kolumbija	2
NCPPB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPPB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brazil	2T
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Australija	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CMIb2861	Šri Lanka	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipini	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Kina	5
* Upotrebljavati kao standardni referentni soj bakterije <i>R. solanacearum</i> biovar 2 (rasa 3)				

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

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

Oznaka NCPPB	Br. SMT	Ostale oznake	Identifikacija
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4164	–	CFBP 2227	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽²⁾
NCPPB 4165	–	CFBP 2459	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽²⁾
NCPPB 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	<i>Ralstonia</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	<i>Burkholderia andropogonis</i> ⁽¹⁾

NCPPB 353	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia caryophylli</i> ⁽¹⁾
NCPPB 945	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia glumae</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia plantarii</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	<i>Banana Blood Disease Bacterium</i> ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ⁽³⁾
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4169	62	IPO 1695	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ⁽¹⁾ ⁽²⁾
NCPPB 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	<i>Curtobacterium</i> sp. ⁽¹⁾ ⁽²⁾
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	<i>Pseudomonas</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4173	–	PD 2318	<i>Aureobacterium</i> sp. ⁽²⁾
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	<i>Flavobacterium</i> sp. ⁽¹⁾ ⁽²⁾
⁽¹⁾ Soj koji u serološkim testovima (IF i/ili ELISA) može unakrsno reagirati sa poliklonskim serumima.			
⁽²⁾ Soj od kojeg se u nekim laboratorijima može umnožiti PCR produkt dužine slične dužini koja se očekuje pri upotrebi specifičnih početnica OLI-1 i Y-2 (vidi Dodatak 6).			
⁽³⁾ U većini testova mogao bi unakrsno reagirati, ali je poznato da se javlja samo na bananama u Indoneziji.			

(b) Standardizirani kontrolni materijali dostupni na tržištu.

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

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

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

Uzgojite 48-satnu kulturu virulentne vrste *R. solanacearum* rasa 3/biovar 2 (npr. soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) na osnovnoj SMSA podlozi i suspendirajte u 10 mM fosfatnom puferu da dobijete gustoću ćelija od oko 2×10^8 cfu/ml. Ovo je obično blago zamućena suspenzija optičke gustine 0,15 na 600 nm.

Izrežite jezgre pupaka iz 200 krtola krompira sorte sa bijelom korom za koje je poznato da nisu zaraženi bakterijom *R. Solanacearum*. Obradite jezgre pupaka uobičajenom metodom i resuspendirajte talog u 10 ml. Napunite 10 sterilnih mikroepreveta od 1,5 ml s 900 µl resuspendiranog taloga. U prvu mikroeprevetu dodajte 100 µl suspenzije *R. Solanacearum*. Promiješajte na vrtložnoj mješalici. U slijedećih pet mikroepreveta pripremite decimalna razrjeđenja. Ovih šest mikroepreveta sa kontaminiranim ekstraktom koristite za pozitivnu kontrolu. Četiri mikroeprevete sa nekontaminiranim ekstraktom koristite za negativnu kontrolu. U skladu sa tim, označite mikroeprevete. Pripremite alikvote od 100 µl u mikroeprevetama od 1,5 ml tako da dobijete devet kopija svakog kontrolnog uzorka. Do upotrebe ih pohranite na – 16 do – 24 °C. Prisutnost i količinu *R. Solanacearum* u kontrolnim uzorcima potvrdite najprije IF testom. Za PCR test, obavite ekstrakciju DNK na pozitivnim i negativnim kontrolnim uzorcima za svaku seriju uzoraka za testiranje. Za IF i FISH testove, obavite testove na pozitivnim i negativnim kontrolnim uzorcima za svaku seriju uzoraka za testiranje. Kod IF, FISH i PCR testova, *R. Solanacearum* se mora detektirati u najmanje 10^6 i 10^4 ćelija/ml pozitivnih kontrola i niti u jednoj negativnoj kontroli.

Dodatak 4

Puferi za postupke testiranja

Upošteno: Neotvoreni sterilni puferi mogu se pohraniti do godinu dana.

1. Puferi za postupak ekstrakcije

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

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

Na_2HPO_4 (bezvodni)	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Destilirana voda	1,00 L

Otopite sastojke, provjerite pH i sterilizirajte u autoklavu 15 minuta na 121 °C. Mogu biti korisni i slijedeći dodatni sastojci:

	Svrha	Količina (na litru)
Pahuljice Lubrol	deflokulant (*)	0,5 g
DC silikon protiv pjenjenja	sredstvo protiv pjenjenja (*)	1,0 ml
Tetranatrijev pirofosfat	Antoksidans	1,0 g
Polivinilpirolidon -40000 (PVP-40)	vezanje PCR inhibitora	50 g

(*) Upotrebljavati za metodu ekstrakcije homogeniziranjem

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

Ovaj se pufer koristi za resuspendiranje i razrjeđivanje ekstrakta jezgri pupaka krtola krompira nakon koncentriranja u talog centrifugiranjem.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
Destilirana voda	1,0 L

Otopite sastojke, provjerite pH i sterilizirajte u autoklavu 15 minuta na 121 °C.

2. Puferi za IF test

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

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

Otopite sastojke, provjerite pH i sterilizirajte u autoklavu 15 minuta na 121 °C.

2.2. IF pufer Tween. Ovaj pufer se koristi za pranje stakalaca.

IF puferu dodajte 0,1 % Tween 20.

2.3. Glicerol s fosfatnim puferom, pH 7,6

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

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

Pokrivne rastvore protiv izbljeđivanja dostupne su na tržištu, npr. Vectashield® (Vector Laboratories) ili Citifluor® (Leica).3. Puferi za nedirektni ELISA test 3.1. Pufer za oblaganje dvostruke jačine, pH 9,6

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

Otopite sastojke, provjerite pH i sterilizirajte u autoklavu 15 minuta na 121°C.

Može se dodati natrijev sulfid (0,2 %) kao antioksidans ako je potrebno spriječiti stvaranje oksidiranih aromatskih spojeva.

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

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

3.3. . PBS-Tween

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

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

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

3.5. Otopina supstrata alkalne fosfataze, pH 9,8

Dietanolamin 97 ml

Destilirana voda 800 ml

Pomiješajte i podesite pH na 9,8 koncentriranom HCl

Dopunite destiliranom vodom do jedne litre.

Dodajte 0,2 g MgCl₂.

Rastopite dvije tablete supstrata fosfataze od 5 miligrama (Sigma) na 15 ml rastvora

4. Puferi za DASi ELISA test

4.1. Pufer za oblaganje, pH 9,6

Na₂CO₃ 1,59 g

NaHCO₃ 2,93 g

Destilirana voda 1 000 ml

Otopite sastojke i podesite pH na 9,6.

4.2. 10X fosfatni pufer sa dodatkom soli (PBS), pH 7,2 do 7,4

NaCl 80,0 g

NaH₂PO₄·2H₂O 4,0 g

Na₂HPO₄·12H₂O 27,0 g

Destilirana voda 1 000 ml

4.3. PBS-Tween
10X PBS 50 ml
10 % Tween 20 5 ml
Destilirana voda 950 ml

4.4. Pufer supstrata, pH 9,8
Dietanolamin 100 ml
Destilirana voda 900 ml

Pomiješajte i podesite pH na 9,8 koncentriranom HCl.

Dodatak 5

Određivanje stepena kontaminacije u IF i FISH testovima

1. Odredite srednji broj tipičnih fluorescentnih ćelija po vidnom polju (c).
2. Izračunajte broj tipičnih fluorescentnih ćelija po otvoru mikroskopskog stakalca (C).

$$C = c \times S/s$$

gdje je S = površina otvora stakalca sa više otvora

i s = površina polja objektiva

$s = \pi i^2 / 4G^2K^2$ gdje je i = koeficijent polja (ovisi o vrsti okulara i iznosi od 8 do 24)

K = koeficijent tubusa (1 ili 1,25)

G = povećanje objektiva (100x, 40 x itd.)

3. Izračunajte broj tipičnih fluorescentnih ćelija po ml resuspendiranog taloga (N).

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

gdje je y = količina resuspendiranog taloga u svakom otvoru

F = faktor razrjeđenja resuspendiranog taloga

Dodatak 6

Validirani protokoli i reagensi za PCR

Napomena:

Preliminarna testiranja trebaju omogućiti ponovljivu detekciju 10^3 do 10^4 ćelija bakterije *R. solanacearum* po ml ekstrakta uzorka. Preliminarna testiranja ne smiju dati lažno pozitivne rezultate kod određenih odabranih bakterijskih sojeva (vidi Dodatak 3).

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

1.1. Oligonukleotidne početnice

Uzvodna početnica OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'

Nizvodna početnica Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Očekivana dužina umnoženog produkta iz kalupa DNK bakterije *R. solanacearum* = 288 bp.

1.2. Reakcijska smjesa za PCR

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

1.3. Uslovi za PCR reakciju

Provedite slijedeći program:

- 1 ciklus od: (i) 2 minute na 96 °C (denaturacija kalupa DNK)
- 35 ciklusa od: (ii) 20 sekundi na 94 °C (denaturacija kalupa DNK)
- (iii) 20 sekundi na 68 °C (sparivanje početnica i kalupa)
- (iv) 30 sekundi na 72 °C (produžavanje kopije)
- 1 ciklus od: (v) 10 minuta na 72 °C (završno produživanje)
- (vi) držati na 4 °C

Napomena:

Ovaj je program optimiziran za korištenje sa uređajem za PCR (thermal cycler) Perkin Elmer 9600. Za rad sa drugim modelima uređaja možda će trebati prilagoditi trajanje ciklusa (ii), (iii) i (iv).

1.4. Analiza produkta umnožavanja restrikcijskim enzimima PCR produkti umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* daju karakteristični obrazac polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata sa enzimom Ava II nakon inkubacije na 37 °C.

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

2.1. Oligonukleotidne početnice

Uzvodna početnica Ps-1 5'- agt cga acg gca gcg ggg g -3'

Nizvodna početnica Ps-2 5'- ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca -3'

Očekivana dužina umnoženog produkta iz kalupa DNK bakterije *R. solanacearum* = 553 bp.

2.2. Reakcijska smjesa za PCR

Reagens	Količina po reakciji	Konačna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	16,025 µl	
10X PCR pufer (¹)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-NTP smjesa (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Početnica Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Početnica Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq polimeraza (5U/µl) (¹)	0,1 µl	0,5 U
Volumen uzorka	5,0 µl	
Ukupni volumen	25,0 µl	
¹) Metoda je bila validirana Taq polimerazom Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL		

Napomena:

Prvobitno optimizirano za uređaj (thermo cycler) MJ Research PTC 200 s

Gibco Taq polimerazom. Pri istim koncentracijama može se koristiti i Perkin Elmer AmpliTaq i pufer

2.3. Uslovi za PCR reakciju

Provedite slijedeći program:

- 1 ciklus od: (i) 5 minuta na 95 °C (denaturacija kalupa DNK)
- 35 ciklusa od: (ii) 30 sekundi na 95 °C (denaturacija kalupa DNK)
- (iii) 30 sekundi na 68 °C (sparivanje početnica i kalupa)
- (iv) 45 sekundi na 72 °C (produžavanje kopije)
- 1 ciklus od: (v) 5 minuta na 72 °C (konačno produživanje)
- (vi) držanje na 4 °C

Napomena:

Ovaj je program optimiziran za korištenje sa uređajem za PCR (thermal cycler) MJ Research PTC 200. Za rad sa drugim modelima uređaja možda će trebati prilagoditi trajanje ciklusa (ii), (iii) i (iv).

2.4. Analiza produkta umnožavanja restrikcijskim enzimima

PCR produkti umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* daju karakteristični obrazac polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata sa enzimom Taq I nakon inkubacije od 30 minuta na 65 °C. Restrikcijski fragmenti dobijeni iz fragmenta specifičnog za *R. solanacearum* veliki su 457 bp i 96 bp.

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

3.1. Oligonukleotidne početnice

Uzvodna početnica RS-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Nizvodna početnica RS-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Uzvodna početnica NS-5-F 5'-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3'

Nizvodna početnica NS-6-R 5'-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3'

Očekivana dužina umnoženog produkta iz kalupa DNK bakterije *R. solanacearum* = 718 bp (par početnica RS).

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

3.2. Reakcijska smjesa za PCR

Reagens	Količina po reakciji	Konačna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	12,625 µl	
10X PCR pufer ⁽¹⁾ (15 Mm MgCl ₂)	2,5 µl	1X (15 Mm MgCl ₂)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-NTP smjesa (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Početnica RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Početnica RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Početnica NS-5-F (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Početnica NS-6-R (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Taq polimeraza (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Volumen uzorka	5,0 µl	
Ukupni volumen	25,0 µl	
⁽¹⁾ Metoda je bila validirana Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL		
⁽²⁾ Koncentracije početnica NS-5-F i NS-6-R bile su optimizirane za ekstrakciju jezgri pupaka metodom homogenizacije i pročišćavanjem DNK prema Pastriku (2000) (vidi Odjeljak VI.A.6.1.a). Ako se ekstrakcija obavlja tresenjem ili ako se primjenjuju druge metode izdvajanja DNK, trebat će ponovo optimizirati koncentracije reagensa.		

3.3. Uslovi za reakciju PCR

Provedite slijedeći program:

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

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

(iii) 30 sekundi na 58 °C (sparivanje početnica i kalupa)

(iv) 45 sekundi na 72 °C (produživanje kopije)

1 ciklus od: (v) 5 minuta na 72 °C (konačno produživanje)

(vi) držanje na 4 °C

Napomena:

Ovaj je program optimiziran za korištenje sa uređajem za PCR (thermal cycler) MJ Research PTC 200. Za rad sa drugim modelima uređaja možda će trebati prilagoditi trajanje ciklusa (ii), (iii) i (iv).

3.4. Analiza produkta umnožavanja restrikcijskim enzimom

PCR produkti umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* daju karakteristični obrazac polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata sa enzimom Bsm I ili izoshizomerom (npr. Mva 1269 I) nakon inkubacije od 30 minuta na 65 °C.

4. Protokol za biovar specifičan PCR (Pastrik i sur. 2001)

4.1. Oligonukleotidne početnice

Uzvodna početnica Rs-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Nizvodna početnica Rs-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Nizvodna početnica Rs-3-R 5'-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3'

Očekivana dužina umnoženog produkta iz kalupa DNK bakterije *R. solanacearum*:

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

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

4.2. Reakcijska smjesa za PCR(a) Specifični PCR za biovar 1/2

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

(b) Specifični PCR za biovar 3/4/5

Reagens	Količina po reakciji	Konačna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	14,925µl	
10X PCR pufer ⁽¹⁾	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP smjesa (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Početnica Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Početnica Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq polimeraza (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Volumen uzorka	5,0 µl	
Ukupni volumen	25,0 µl	
⁽¹⁾ Metode su validirane Taq polimerazom Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL		

4.3. Uslovi za reakciju PCR.

Provedite slijedeći program za specifične reakcije za biovar 1/2 i biovar 3/4/5:

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

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

(iii) 30 sekundi na 58 °C (sparivanje početnica i kalupa)

(iv) 45 sekundi na 72 °C (produživanje kopije)

1 ciklus od: (v) 5 minuta na 72 °C (konačno produživanje)

(vi) držanje na 4 °C

Napomena:

Ovaj je program optimiziran za korištenje s uređajem za PCR (thermal cycler) MJ Research PTC 200. Za rad sa drugim modelima uređaja možda će trebati prilagoditi trajanje ciklusa (ii), (iii) i (iv).

4.4. Analiza produkta umnožavanja restrikcijskim enzimom

PCR produkti umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* sa početnicama Rs-1-F i Rs-1-R daju karakteristični obrazac polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata sa enzimom Bsm I ili izoshizomerom (npr. Mva 1269 I) nakon inkubacije od 30 minuta na 65 °C. PCR produkti umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* sa početnicama Rs-1-F i RS-3-R nemaju mjesta restrikcije.

5. Priprema pufera za nanošenje

5.1. Bromfenol plavilo (10%-tna osnovna otopina)

Bromfenol plavilo 5 g

Destilirana voda (bidestilirana) 50 ml

5.2. Pufer za nanošenje

Glicerol (86 %) 3,5 ml

Bromfenol plavo (5,1) 300 µl

Destilirana voda (bidestilirana) 6,2 ml

6. 10X tris-acetatni EDTA (TAE), pH 8,0

Tris pufer 48,40 g

Ledena sirćetna kiselina 11,42 ml pufer

EDTA (dinatrijeva so) 3,72 g

Destilirana voda 1,00 L

Prije upotrebe razrijedite do 1X.

Dostupan je i na tržištu (npr. Invitrogen ili ekvivalentni).

Dodatak 7

Validirani reagensi za FISH test

1. Oligo-probe

Proba OLI-1-CY3 specifična za *R. solanacearum*: 5'-ggc agg tag caa gct acc ccc-3'

Nespecifična eubakterijska proba EUB-338-FITC: 5'- gct gcc tcc cgt agg agt -3'

2. Otopina za fiksiranje

(UPOZORENJE! OTOPINA ZA FIKSIRANJE SADRŽI PARAFORMALDEHID KOJI JE TOKSIČAN. NOSITE RUKAVICE I NE UDIŠITE GA. PREPORUČUJE SE RADITI U DIGESTORU.)

(i) Zagrijte 9 ml vode za molekularnu biologiju (npr. ultra čiste vode) na oko 60 °C i dodajte 0,4 g paraformaldehida. Paraformaldehid se otapa nakon što dodate 5 kapi 1N NaOH i promiješate na magnetskoj mješalici.

(ii) Podesite pH na 7,0 dodajući 1 ml 0,1M fosfatnog pufera (PB; pH 7,0) i 5 kapi 1N HCl. Indikatorskim papirom provjerite vrijednost pH i ako je potrebno podesite je pomoću HCl ili NaOH. (UPOZORENJE! U OTOPINAMA SA PARAFORMALDEHIDOM NE UPOTREBLJAVAJTE pH-METAR.)

(iii) Profiltrirajte otopinu kroz membranski filter od 0,22 µm te je do daljnje upotrebe pohranite na 4 °C i zaštitite od prašine.

3. 3X Hybmix

NaCl 2,7 M

Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)

EDTA (sterilizirana filtriranjem i u autoklavu) 15 mM

Po potrebi razrijedite do 1X.

4. Otopina za hibridizaciju

1X Hybmix

Natrijev dodecil sulfat (SDS) 0,01 %

Formamid 30 %

Proba EUB 338 5 ng/µl

Proba OLI-1 ili OLI-2 5 ng/µl

Pripremite količine otopine za hibridizaciju prema izračunima u Tablici 1. Za svako stakalce (sa 2 različita uzorka u duplikatu) treba 90 µl otopine za hibridizaciju. VAŽNO: FORMAMID JE VEOMA TOKSIČAN I ZATO NOSITE RUKAVICE I PREDUZMITE POTREBNE MJERE OPREZA!

Tablica 1. Predložene količine za pripremanje smjese za hibridizaciju

Broj stakalaca	1	4	6	8	10
Sterilna ultra čista voda	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3 x hybmix	30,0	120,0	180,0	240,	300,0

1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamid	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Proba EUB 338 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Proba OLI-1 ili OLI-2 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Ukupni volumen (μl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0
Napomena: Sve otopine koje sadrže oligo-probe osjetljive na svjetlost pohranite u tami na – 20 °C. Zaštite ih od direktne sunčeve svjetlosti ili električnog svjetla tokom upotrebe.					

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

Na₂HPO₄ 8,52 g

KH₂PO₄ 5,44 g

Destilirana voda 1,00 L

Otopite sastojke, provjerite pH i sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Dodatak 8

Uzgoj patlidžana i paradajza

Sjeme paradajza (*Lycopersicon esculentum*) i patlidžana (*Solanum melongena*) posijte u pasterizirani kompost za sjeme. Sadnice presadite u pasterizirani kompost za lončanice nakon što se supke u cijelosti razviju (10 do 14 dana). Prije inokulacije, paradajza i patlidžane treba uzgajati u stakleniku pod slijedećim uslovima: Dužina dana 14 sati ili prirodna dužina dana ako je veća. Temperatura dnevna: 21 do 24 °C noćna: 14 do 18 °C.

Osjetljiva vrsta paradajza » Moneymaker «.

Osjetljiva vrsta patlidžana » Black Beauty «.

Dobavljači

POPIS LITERATURE:

1. Amann, R.L., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Official Journal of the European Communities L235, 1-39.
3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology* 105; 373-380.
4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J. L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3634-3638.
5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1:113-121.
6. Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26; 663-678.
7. Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) *Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27; 265-277.
9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 69; 269-280.
10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. *J. Phytopathology* 146; 379-384.
11. Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18, 343-351.
12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14; 335-345.

13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44; 693-695.
14. Klement Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.
16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne i sur., (eds). *Klewer Academic Publishers*. pp. 117-121.
17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295.
18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85; 528-536.
19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F Wang, T.-H Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5; 19-33.
20. Pastrok, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathology* 148; 619-626.
21. Pastrok, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. *European Journal of Plant Pathology* 108, 831-842.
22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67-79.
23. Schaad, W. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota: 373 pp.
24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1587-1594.
25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology* 61; 4262-4268.
26. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42; 281-295.
27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46; 10-15.
28. Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigalet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) *Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects*. Springer (Berlin) pp. 44-49.
29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative fluorescent 5' nuclease TaqMan assay. *Applied and Environmental Microbiology* 66; 2853-2858.
30. Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse and A.D.L. Akkermans. 1998. Detection of *R. solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23s rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4546-4554.