

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 PRSTENASTE TRULEŽI KRTOLA KROMPIRA KOJU UZROKUJE BAKTERIJA *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (SMITH) DAVIS *ET AL.* SSP. *SEPEDONICUS* (SPIECKERMANN *ET* KOTTHOFF) DAVIS *ET AL.*

Član 1.

(Predmet)

Ovim Pravilnikom se propisuje način provođenja sistemske kontrole koja se provodi u svrhu utvrđivanja prisustva i određivanja rasprostranjenosti bakterije *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann *et* Kotthoff) Davis *et al.*, uzročnika prstenaste truleži krtola krompira (u daljnjem tekstu: štetni organizam), sprječavanje pojave i širenja i, ukoliko se utvrdi, sprječavanje širenja i kontrola u cilju iskorjenjivanja, kao i šema testiranja za dijagnosticiranje, detekciju i identifikaciju štetnog organizma.

Član 2.

(Definicije)

Izrazi upotrijebljeni u Zakonu o zaštiti zdravlja bilja ("Službeni 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 12 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 organizama na osnovu jasnih naučnih i statističkih principa i biologije štetnog organizma.
- (2) Ove sistemske kontrole vrše fitosanitarne inspekcije entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine i ovlaštene laboratorije.

Član 4.

(Način vršenja sistemske kontrole)

- (1) Prisustvo štetnog organizma se utvrđuje provjerom krtola krompira (u daljnjem tekstu: krtole), i gdje je to primjenjivo, biljki krompira (*Solanum tuberosum* L.), (u daljnjem tekstu: biljke).
- (2) Pri pregledu krtola fitosanitarni inspektor uzima uzorke sjemenskog krompira i krompira koji nije namijenjen sadnji (u daljnjem tekstu: merkantilni krompir), prvenstveno iz partija koje se nalaze u skladištima i dostavlja ih u ovlaštenu laboratoriju radi testiranja. U slučaju potrebe fitosanitarni inspektor može uzeti i dodatne uzorke krtola kako bi obavio vizuelni pregled prerezanih krtola.
- (3) Za ovaj pregled, u slučaju kontrole biljaka, fitosanitarni inspektor uzima uzorke krtola ili biljaka i šalje ih u ovlaštenu laboratoriju radi testiranja.
- (4) Laboratorijsko testiranje iz st. (2) i (3) ovog člana provodi se u skladu sa postupkom iz Priloga II koji je sastavni dio ovog Pravilnika, (u daljnjem tekstu: propisani postupak).
- (5) Broj, porijeklo, dinamika i vrijeme uzimanja uzoraka se utvrđuje godišnjim programom koji je propisan u članu 3. stav (1) ovog Pravilnika.
- (6) 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.
- (7) Uprava, u saradnji sa nadležnim organima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, propisuje uslove u pogledu opremljenosti i osposobljenosti za testiranje ovog štetnog organizma i izdaje ovlaštenja.

Član 5.

(Izvjštavanje u slučaju zaraze ili sumnje na zarazu)

Ukoliko vlasnik ili bilo koje lice koje posumnja na prisustvo štetnog organizma na krompiru koji raste ili koji je izvađen, uskladišten ili se nalazi u prodaji, obavezno je bez odlaganja izvijestiti nadležnog fitosanitarnog inspektora.

Član 6.

(Postupanje sa uzorcima)

(1) Tokom izvođenja godišnjeg sistemskog nadzora i u slučaju sumnje na prisustvo štetnog organizma, fitosanitarni inspektor uzima uzorke krtola ili biljaka i šalje ih u ovlaštenu laboratoriju na testiranje.

(2) U slučaju sumnje na prisustvo štetnog organizma, sve količine ili pošiljke iz kojih su uzeti uzorci ostaju pod kontrolom fitosanitarnog inspektora. Ukoliko se radi o uvoznjoj pošiljci primjenjuju se odredbe Pravilnika o mjerama za sprječavanje unošenja, širenja i suzbijanja štetnih organizama na bilju, biljnim proizvodima i reguliranim objektima sve dok se ne saznaju rezultati imunofluorescentnog testa, kao dijela propisanog postupka ili drugih odgovarajućih testiranja.

(3) U slučaju sumnje na postojanje štetnog organizma za koji je identificiran pozitivan imunofluorescentni test, ovlaštena laboratorija zadržava i prikladno konzervira krompir, dok se ne završi laboratorijsko testiranje za:

a) sve krtole ili biljke koje su uzete kao uzorci;

b) sve preostale ekstrakte i dodatno pripremljene imunofluorescentne slajdove ili bilo koji drugi relevantni materijal biljke koji je korišten u laboratorijskim testiranjima.

Član 7.

(Sumnja na zarazu)

(1) Na zarazu štetnim organizmom sumnja se:

a) ako su uočeni simptomi bolesti ili;

b) ako je rezultat imunofluorescentnog ili nekog drugog brzog testa provjere sukladan s propisanim postupkom pozitivan.

(2) Da bi se potvrdila ili opovrgnula 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 svih proizvoda, količina ili pošiljki odakle su uzeti uzorci. U slučaju uvozne pošiljke 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, u cilju sprječavanja širenja štetnog organizma. Ove mjere mogu obuhvatiti zvaničnu kontrolu i ograničenja prenošenja svih ostalih krtola krompira ili biljaka unutar ili izvan mjesta koja su povezana sa sumnjivom pojavom.

Član 8.

(Čuvanje dokaznog materijala)

U slučaju sumnje na pojavu štetnog organizma, do dobijanja konačnog rezultata laboratorijskog testiranja provedenog u skladu sa propisanim postupkom, ovlaštena laboratorija obavezna je zadržati i na primjeren način čuvati:

- a) sve uzorkovane krtole i, kada je to moguće, sve uzorkovane biljke;
- b) sav preostali ekstrakt i dodatno pripremljen materijal za brze testove provjere, npr. stakalca za imunofluorescenciju i;
- c) svu pripadajuću dokumentaciju.

Član 9.

(Postupak u slučaju potvrđene zaraze)

(1) Ako se prilikom zvaničnog laboratorijskog testiranja iz člana 4. stav (4) ovog Pravilnika, u uzorku krtola, biljaka ili dijelova biljaka potvrdi prisustvo štetnog organizma, Uprava, u saradnji sa fitosanitarnim službama ima obavezu da:

- a) označi kao zaražene krtole ili biljke, pošiljke ili partije, mašine, prijevozna sredstva, skladišta ili njegove dijelove ili bilo koje druge objekte i predmete uključujući materijale za pakiranje iz kojih je uzet uzorak, kao i, gdje je to praktično, mjesta proizvodnje i polja sa kojih su krtole ili biljke izvađene;
- b) odredi obim moguće zaraze;
- c) odredi obim potvrđene zaraze i;
- d) odredi područje mogućeg širenja štetnog organizma.

(2) Na osnovu obima potvrđene zaraze, obima moguće zaraze i područja mogućeg širenja organizma, Uprava, u saradnji sa fitosanitarnom službom, po hitnom postupku određuje posebno regulirano područje u kojem se provode mjere propisane ovim Pravilnikom.

Član 10.

(Obim moguće zaraze)

Uprava, u saradnji sa fitosanitarnim službama, na osnovu podataka zasnovanih na naučnim principima i biologiji štetnog organizma, kao i podataka o sistemu proizvodnje, marketinga i prerade, utvrđuje obim moguće zaraze, na osnovu informacija o mogućem kontaktu krtola s utvrđenom zarazom prije i poslije njihovog vadenja ili tokom njihove proizvodnje, uzimajući u obzir:

- a) krtole ili biljke koji su rasle na mjestu proizvodnje koje je označeno kao zaraženo;
- b) mjesto(a) proizvodnje ili prostorije koje imaju neku vezu sa proizvodnjom krtola ili biljaka koje su označene kao zaražene, uključujući i ona koja dijele proizvodnu opremu i/ili uređaje, bilo kakve mašine, prijevozna sredstva, posude, skladišta ili njihove jedinice, ili bilo koje druge objekte uključujući materijal za pakiranje;
- c) krtole ili biljke proizvedene na mjestu(ima) navedenim u tački b) ovog člana, ili su se nalazili na tim mjestu(ima) proizvodnje u vrijeme dok su krtole ili biljke koje su označene kao zaražene bile prisutne u prostorijama ili na mjestima proizvodnje navedenim u tački a) ovog člana;
- d) centralna skladišta u kojima se skladišti ili doraduje krompir sa mjesta proizvodnje navedenim u tč. a), b) i c) ovog člana;

e) bilo koju mašinu, prijevozno sredstvo, posudu, skladište ili njihove jedinice i bilo koje objekte, uključujući materijal za pakiranje, koji su mogli doći u dodir sa krtolama ili biljkama koje su označene kao zaražene, u toku prethodnog perioda od 12 mjeseci ili koliko je to potrebno;

f) sve krtole ili biljke koje su bile uskladištene ili u kontaktu s nekim od objekata ili predmeta iz tačke e) ovog člana, prije čišćenja i dezinfekcije tih objekata i predmeta;

g) krtole ili biljke koje se smatraju vjerovatno zaraženima zbog istog klonskog porijekla s krtolama ili biljkama koje su označene kao zaražene, iako su rezultati testiranja provedeni u skladu sa propisanim postupkom negativni. Kada je potrebno, može se provesti i test sortnosti da bi se provjerio identitet zaraženih i klonski srodnih krtola ili biljaka krompira i;

h) mjesta proizvodnje krtola ili biljaka iz tačke g) ovoga člana.

Član 11.

(Testiranje klonski srodnog krompira)

(1) Partije krompira koje su istog klonskog porijekla s krtolama ili biljkama koje su označene kao zaražene u skladu sa članom 4. stav (4) ovog Pravilnika, podliježu obaveznom laboratorijskom testiranju u skladu sa propisanim postupkom.

(2) Fitosanitarni inspektor na osnovu podataka dobijenih od Uprave određuje testiranje onolikog broja uzoraka krtola ili biljaka koliko je potrebno da bi se odredio mogući primarni izvor zaraze i obim moguće zaraze, pri čemu redoslijed testiranja ovisi od stepena opasnosti.

(3) Nakon dobijanja rezultata laboratorijskog testiranja iz stava (1) ovog člana, Uprava, u saradnji sa fitosanitarnom službom, provodi dalje utvrđivanje obima potvrđene zaraze i obima moguće zaraze, te posebno reguliranog područja. Fitosanitarni inspektor obilježava posebno regulirano područje.

Član 12.

(Mjere i postupci sa zaraženim krompirom)

(1) Sadnja krtola koje su označene kao zaražene u skladu sa članom 9. stav (1) ovog Pravilnika nije dopuštena, već se one kao i zaražene biljke moraju, pod nadzorom fitosanitarnog inspektora:

a) uništiti ili;

b) upotrijebiti kao hrana za životinje nakon odgovarajuće termičke obrade koja ne ostavlja nikakvu mogućnost preživljavanja štetnog organizma ili;

c) 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 cijedenjem kroz pore tla do poljoprivrednog zemljišta ili;

d) spaliti ili;

e) 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;

f) podvrgnuti drugim mjerama, pod uslovom da nema opasnosti od širenja štetnog organizma.

(2) Sav preostali otpad koji je nastao kao rezultat provedbe mjera iz stava (1) ovog člana, mora biti zbrinut u skladu sa službeno odobrenim postupkom u skladu sa članom 13. ovog Pravilnika.

Član 13.

(Mjere i postupci sa moguće zaraženim krompirom)

(1) Krtole ili biljke označene kao moguće zaražene štetnim organizmom u skladu sa članom 7. ovog Pravilnika se ne smiju saditi, nego se pod kontrolom fitosanitarnog inspektora moraju:

a) koristiti kao merkantilni krompir namijenjen za potrošnju, pri čemu mora biti pakiran na mjestima koja raspolažu odgovarajućom opremom za zbrinjavanje otpada, na način da je spreman za neposrednu dostavu i upotrebu bez naknadnog repakiranja. Sa sjemenskim krompirom dozvoljeno je rukovati na tim istim mjestima samo ako se radi odvojeno ili nakon čišćenja i dezinfekcije ili;

b) koristiti kao merkantilni krompir namijenjen za industrijsku preradu, uz direktnu i brzu dostavu do pogona za preradu, koji mora raspolagati odgovarajućom opremom za zbrinjavanje otpada i opremom za čišćenje i dezinfekciju barem onih prijevoznih sredstava koja napuštaju mjesto prerade ili;

c) koristiti u druge svrhe ili raspolagati na neki drugi službeno odobren način, pod uslovom da nema opasnosti od širenja štetnog organizma.

(2) Mjere navedene u stavu (1) ovog člana se također primjenjuju na krtole istog klonskog porijekla i biljke, bez obzira na rezultate testiranja, navedene u članu 11. ovog Pravilnika.

Član 14.

(Čišćenje i dezinfekcija)

(1) Fitosanitarni inspektor donosi rješenje kojim se naređuje da se svaka mašina, prijevozno sredstvo, posuda, skladište ili njihove jedinice ili bilo koji drugi objekti označeni kao zaraženi u skladu sa članom 8. ovog Pravilnika moraju ili uništiti ili očistiti i dezinficirati primjenom odgovarajućih postupaka kojima se otklanja opasnost od širenja štetnog organizma.

(2) Nakon izvršene dezinfekcije, objekti i predmeti iz stava (1) ovoga člana više se ne smatraju zaraženima.

Član 15.

(Postupci zbrinjavanja otpada)

(1) Službeno odobreni postupak zbrinjavanja otpada nastalog u procesu industrijske prerade iz člana 13. ovog Pravilnika mora se izvršiti tako da se izbjegne svaka opasnost od širenja štetnog organizma:

a) otpaci krompira (uključujući odbačeni krompir i koru) i svi drugi kruti otpaci koji su vezani za krompir (uključujući zemlju, 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 okolišu, na primjer cijedenjem kroz pore do 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 tački a) ovog stava. Tekući dio otpada se mora:
- 1) u cijelosti prije odstranjivanja zagrijati na temperaturu od najmanje 60°C u trajanju od najmanje 30 minuta ili;
 - 2) odstraniti pod službenim nadzorom na neki drugi službeno odobren način koji onemogućava da otpaci dođu na bilo koji način u dodir s poljoprivrednim zemljištem.
- (2) Postupci propisani u stavu (1) ovog člana primjenjuju se i na otpad koji nastaje tokom rukovanja, odstranjivanja i prerade zaraženih partija.

Član 16.

(Mjere u posebno reguliranom području)

U posebno reguliranom području određenom u skladu sa članom 9. stav (2) ovog Pravilnika, fitosanitarni inspektor naređuje provođenje mjera navedenih u Prilogu I koji je sastavni dio ovog Pravilnika.

Član 17.

(Postupak sa sjemenskim krompirom)

- (1) Sjemenski krompir mora poticati direktno od materijala dobijenog prema zvanično odobrenom programu kontrole i za koji službenim laboratorijskim testiranjem provedenim u skladu sa propisanim postupkom utvrđeno da nije zaražen štetnim organizmom.
- (2) Pomenuta testiranja se obavljaju:
 - a) u slučajevima u kojima zaraza ugrožava proizvodnju sjemenskog krompira na biljkama iz početne faze klonske selekcije;
 - b) u ostalim slučajevima, ili na biljkama iz početne faze klonske selekcije, ili na reprezentativnim uzorcima osnovnog sjemena krompira, odnosno ranijih generacija u lancu vegetativnog razmnožavanja.

Član 18.

(Zabrana posjedovanja i korištenja štetnog organizma)

Zabranjeno je posjedovanje i bilo kakvo korištenje štetnog organizma.

Član 19.

(Izuzeci od propisanih mjera)

Uprava će dozvoliti izuzetke u pogledu provođenja mjera propisanih čl. 12., 13., 14., 16. i 18. ovog Pravilnika u eksperimentalne, naučne svrhe ili selekcijski rad, pod uslovom da se tim osigura nadzor nad štetnim organizmom i da nema opasnosti od njegovog širenja

Član 20.

(Vođenje evidencije)

Uprava vodi evidenciju koja uključuje dokumentirane dokaze o obimu potvrđene zaraze, obimu moguće zaraze i o području mogućeg širenja, 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 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 s nazivom sorte, a kada se radi o sjemenskom krompiru, i o njegovoj kategoriji;
- f) pojedinosti o posebno reguliranom području, uključujući broj mjesta proizvodnje koja nisu označena kao zaražena, ali su uključena u posebno regulirano područje.

Član 21.

(Dodatne i strožije mjere)

- (1) Uprava može propisati dodatne ili strožije mjere koje su potrebne u cilju borbe protiv štetnog organizma ili sprječavanja njegovog širenja.
- (2) Dodatne mjere iz stava (1) ovog člana mogu uključivati i zahtjev da se sadi samo onaj sjemenski krompir koji ima zvanični certifikat.
- (3) U slučajevima kada proizvođač ima ovlaštenje da koristi na svom vlastitom imanju sjemenski krompir koji je dobijen iz vlastite proizvodnje, kao i u drugim slučajevima kada se sadi vlastito proizveden sjemenski krompir, njegova upotreba se dozvoljava samo ukoliko je krompir zvanično pregledan i ukoliko je utvrđeno da zadovoljava zdravstvene standarde

Član 22.

(Fitosanitarni inspektor)

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 23.

(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 07-01-02-7175-2/09
30. septembra 2009. godine
Sarajevo

Ministar
Mladen Zirojević, s. r.

PRILOG I

Mjere koje naređuje fitosanitarni inspektor i koje se provode u posebno reguliranom području uspostavljenom u skladu sa članom 6. stav (2) ovog Pravilnika su slijedeće:

I. NA MJESTIMA PROIZVODNJE KOJA SU OZNAČENA KAO ZARAŽENA:

1. Na polju koje je označeno kao zaraženo:
 - 1.1.1. u iduće, najmanje tri vegetacijske godine nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza:
 - obavezno je uklanjanje samoniklih biljaka krompira i drugih biljaka domaćina štetnog organizma, i
 - zabranjena je sadnja krtola i biljaka te sjetva sjemena krompira u botaničkom smislu kao i sjetva i sadnja drugih biljaka domaćina štetnog organizma ili usjeva za koje je utvrđeno da omogućavaju širenje štetnog organizma,
 - 1.1.2. u prvoj sezoni proizvodnje krompira 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 druge biljke domaćini, dopušta se proizvodnja isključivo merkantilnog krompira, uz testiranje krtola u skladu sa propisanim postupkom;
 - 1.1.3. u sezoni proizvodnje krompira koja slijedi nakon one iz podtačke 1.1.2., dopušta se, uz odgovarajući plodored, koji mora biti najmanje dvogodišnji za proizvodnju sjemenskog krompira, proizvodnja sjemenskog ili merkantilnog krompira, uz provođenje sistemskog istraživanja iz člana 3. ovog Pravilnika; ili
 - 1.2.1. tokom četiri vegetacijske godine koje slijede nakon godine u kojoj je zaraza utvrđena:
 - provode se mjere uklanjanja samoniklih biljaka krompira i drugih samoniklih biljaka domaćina štetnog organizma, i
 - polje se održava na ugaru ili kao trajni pašnjak s intenzivnom ispašom ili čestom niskom košnjom,
 - 1.2.2. u prvoj sezoni proizvodnje krompira 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 druge samonikle biljke domaćini, dopušta se proizvodnja sjemenskog ili merkantilnog krompira, uz testiranje izvađenih krtola u skladu sa propisanim postupkom.

2. Na ostalim poljima unutar zaraženog mjesta proizvodnje pod uslovom da je fitosanitarni inspektor utvrdio da je otklonjena opasnost od samoniklih biljaka krompira te drugih biljaka domaćina štetnog organizma:

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

- zabranjuje se sadnja krtola i biljaka krompira, te sjetva sjemena krompira u botaničkom smislu ili drugih samoniklih biljaka domaćina štetnog organizma, ili se
- dopušta sadnja certificiranog sjemenskog krompira namijenjenog isključivo proizvodnji merkantilnog krompira,

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

2.3. najmanje još u trećoj vegetacijskoj godini koja slijedi nakon godine u kojoj je utvrđena zaraza dopušta se sadnja samo certificiranog sjemenskog krompira ili sjemenskog krompira proizvedenog pod stručnim nadzorom iz certificiranog sjemenskog krompira, za sjemensku ili merkantilnu proizvodnju,

2.4. u svakoj vegetacijskoj godini iz podtačke 2.1., 2.2. i 2.3. ove tačke preduzimaju se mjere uklanjanja samoniklih biljaka krompira i drugih biljaka domaćina štetnog organizma ako su prisutne i provodi se službeno testiranje izvađenog krompira sa svakog polja u skladu sa propisanim postupkom.

3. Odmah nakon utvrđivanja zaraze štetnim organizmom i nakon slijedeće vegetacijske godine, sve mašine, oprema i skladišni prostori na mjestu proizvodnje koji su se koristili u proizvodnji krompira moraju se očistiti i dezinficirati primjenom odgovarajućih postupaka u skladu sa članom 12. ovog Pravilnika.

4. U zaštićenim prostorima namijenjenim proizvodnji bilja gdje je moguća potpuna zamjena supstrata za uzgoj:

- zabranjuje se sadnja krtola i biljaka krompira te sjetva sjemena krompira u botaničkom smislu, sve dok se u tom zaštićenom prostoru, pod nadzorom fitosanitarnog inspektora, ne provedu mjere uništavanja štetnog organizma i ukloni sav biljni materijal koji potiče od biljaka domaćina, pri čemu se, kao minimalna mjera, obavezno provodi potpuna zamjena supstrata za uzgoj te čišćenje i dezinfekcija proizvodne jedinice i cjelokupne opreme, i sve dok nakon toga fitosanitarni inspektor ne odobri proizvodnju krompira, i
- dopušta se sadnja isključivo certificiranog sjemenskog krompira ili mini-krtola ili mikro biljaka dobijenih iz kulture biljnog tkiva, koje potiču iz testiranih izvora.

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

1. Odmah nakon utvrđivanja zaraze fitosanitarni inspektor naređuje, prema potrebi, čišćenje i dezinfekciju svih mašina, opreme i skladišnih prostora koji su se koristili na takvim posjedima u proizvodnji krompira primjenom odgovarajućih postupaka u skladu sa članom 12. ovog Pravilnika.

2. Odmah i tokom najmanje tri vegetacijske godina koje slijede iza one u kojoj je zaraza utvrđena, fitosanitarni inspektor:

- nadzire posjede na kojima se uzgajaju, skladište, nalaze ili doraduju krtole krompira, uključujući i posjede s kojih i na kojima su se koristile mašine za obavljanje radnji vezanih za nabrojene djelatnosti,
- unutar cijelog posebno reguliranog područja naređuje sadnju isključivo certificiranog sjemenskog krompira ili sjemenskog krompira proizvedenog pod stručnim nadzorom, i testiranje nakon vađenja onog sjemenskog krompira koji je uzgojen na mjestima proizvodnje koja se smatraju vjerovatno zaraženima, u skladu sa članom 7. ovog Pravilnika,
- naređuje da se na svim posjedima unutar tog područja s proizvedenim sjemenskim krompirom postupa odvojeno od merkantilnog krompira, ili da se obavi čišćenje i dezinfekcija između postupanja sa sjemenskim i merkantilnim krompirom,
- provodi sistemsko istraživanje iz člana 3. ovog Pravilnika.

3. U slučaju potrebe, ministar može narediti zamjenu svih zaliha sjemenskog krompira u odgovarajućem vremenskom periodu.

PRILOG II.

ŠEMA TESTIRANJA ZA DIJAGNOSTICIRANJE, DETEKCIJU I IDENTIFIKACIJU UZROČNIKA PRSTENASTE TRULEŽI KRTOLA KROMPIRA, BAKTERIJE

***Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann *et* Kotthoff)
Davis *et al.***

PODRUČJE PRIMJENE ŠEME TESTIRANJA

Prikazana šema testiranja opisuje različite postupke za:

- dijagnosticiranje prstenaste truleži u krtolama i biljkama krompira;
- detekciju bakterije *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (u daljem tekstu: *C. m.* ssp. *sepedonicus*) u uzorcima krtola i biljaka krompira;
- identifikaciju bakterije *C. m.* ssp. *sepedonicus*.

OPĆA NAČELA

Optimizirani 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 da podrazumijevaju upotrebu živih kultura *C. m.* ssp. *sepedonicus* kao kontrolnih materijala, postupci će se morati izvoditi u primjerenim karantinskim uslovima s odgovarajućom opremom za zbrinjavanje otpada te prema uslovima dozvole koju izdaju nadležna tijela za biljni karantin.

Parametri testiranja moraju osigurati dosljednu i ponovljivu detekciju onih nivoa prisustva *C. m.* ssp. *sepedonicus* 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 kalibriranje opreme, pažljivo pohranjivanje i rukovanje reagensima 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 4. stav (1) Pravilnika o provođenju sistemskog istraživanja i mjera za sprječavanje širenja i suzbijanje prstenaste truleži krtola krompira koju prouzrokuje bakterija *C. m. ssp. sepedonicus* (u daljnjem tekstu: Pravilnik), podrazumijeva pozitivan rezultat testa za dijagnosticiranje ili testa provjere provedenog na uzorku kao što je prikazano u dijagramima toka.

Ako je rezultat prvog testa provjere (IF ili PCR/FISH) pozitivan, tada se sumnja na zarazu bakterijom *C. m. ssp. sepedonicus* 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 *C. m. ssp. sepedonicus*.

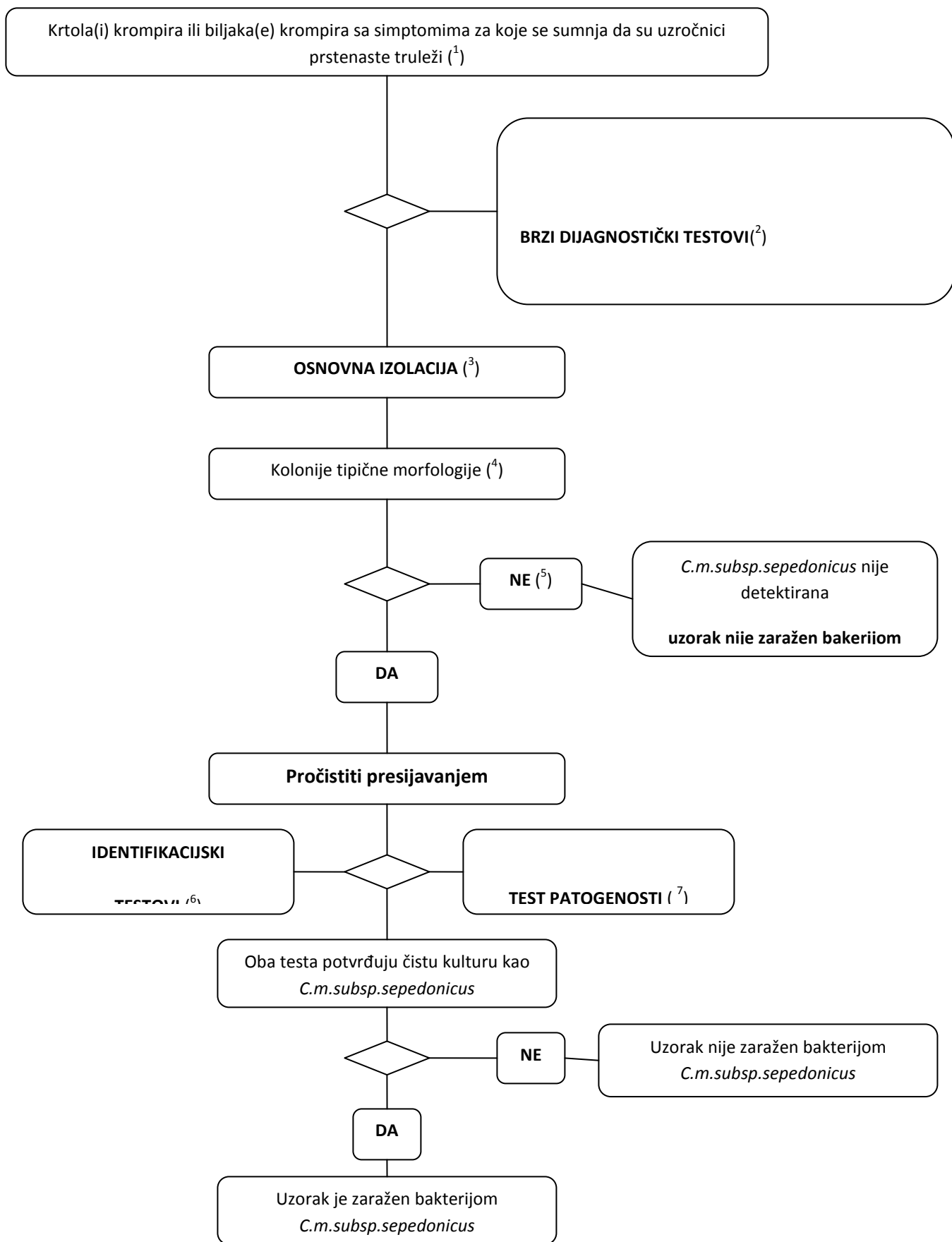
Dakle, pozitivan rezultat IF testa, kao što je navedeno u članu 6. stav (2) definiramo kao pozitivno očitavanje IF testa koje je potrebno potvrditi drugim testom provjere (PCR/FISH).

Potvrđena zaraza, kao što je navedeno u članu 8. stav (2) Pravilnika, podrazumijeva izolaciju i identifikaciju čiste kulture *C. m. ssp. sepedonicus*, te potvrdu patogenosti.

1. PRIKAZ DIJAGRAMA TOKA

1.1. Šema za detekciju i dijagnosticiranje uzročnika prstenaste truleži u krtolama i biljkama krompira sa simptomima prstenaste truleži

Postupak testiranja je namijenjen za krtole i biljke krompira sa simptomima tipičnim za ili koji pobuđuju sumnju na prstenastu trulež. Postupak uključuje brzi test provjere, izolaciju patogena iz zaraženog provodnog tkiva na dijagnostičkoj hranjivoj podlozi i u slučaju pozitivnog rezultata, identifikaciju čiste kulture kao bakterije *C. m. ssp. sepedonicus*.



- (1) Opis simptoma naveden je u Dijelu 2.
- (2) Prikladni testovi su:
 - IF test (Dio 4),
 - PCR test (Dio 6),
 - FISH test (Dio 5).
- (3) Iako je izolacija patogena iz biljnog materijala s tipičnim simptomima metodom razrjeđivanja i zasijavanja na hranjivu podlogu jednostavna, uzgoj može biti neuspješan iz uzoraka u naprednom stadiju infekcije. Saprofitske bakterije koje rastu na oboljelom tkivu mogu prerasti ili inhibirati razvoj patogena na hranjivoj podlozi. Stoga se preporučuje korištenje neselektivne i selektivne hranjive podloge, najbolje MTNA (Odjeljak 8) ili biotest (Odjeljak 7).
- (4) Opis tipične morfologije kolonije *C. m. ssp. sepedonicus* naveden je u Dijelu 8.
- (5) Ako je rezultat izolacije negativan, ali su simptomi bolesti tipični, tada je potrebno ponoviti postupak izolacije.
- (6) Pouzdana identifikacija čiste kulture *C. m. ssp. sepedonicus* postiže se provođenjem testova navedenih u Dijelu 9.
- (7) Test patogenosti opisan je u Dijelu 10.

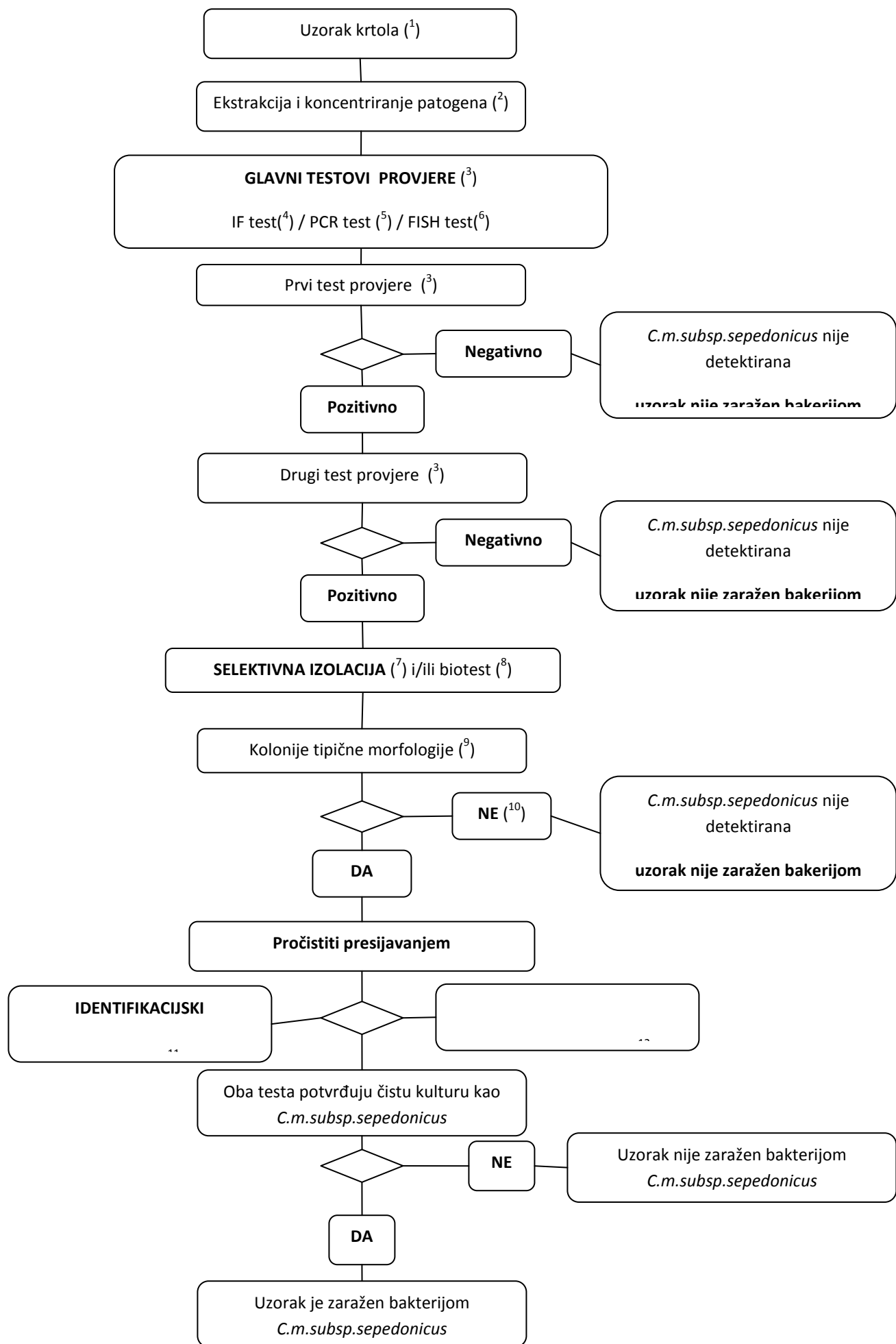
1.2. Šema detekcije i identifikacije bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* u uzorcima krtola krompira bez simptoma

Načelo

Postupak testiranja namijenjen je za detekciju skrivene zaraze u krtolama krompira.

Pozitivan rezultat iz najmanje dva testa provjere, koji se zasnivaju na različitim biološkim načelima, mora se dopuniti izolacijom patogena, nakon kojeg slijedi, u slučaju izolacije tipičnih kolonija, potvrda čiste kulture kao *C. m. ssp. sepedonicus*. Pozitivan rezultat samo jednog od testova provjere nije dovoljan da bi se uzorak smatrao vjerovatno 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 Dijelu 3.1.

(3) Ako su rezultati najmanje dva testa, koji su zasnovani 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) Test imunofluorescencije (IF).

Uvijek koristite poliklonska antitijela za IF provjeru, dodatna monoklonska antitijela mogu omogućiti veću specifičnost (vidi Dio 4).

(5) PCR test.

Koristite validirane reagense i protokole za PCR (vidi Dio 6).

(6) FISH test.

Koristite validirane reagense i protokole (vidi Dio 5).

(7) Selektivna izolacija.

Korištenje MTNA ili NCP-88 hranjivih podloga i 1/100 razrijeđenja resuspendiranog taloga je u mnogim slučajevima prikladna metoda za direktnu izolaciju *C. m. ssp. sepedonicus*. Tipične kolonije mogu se dobiti 3 do 10 dana nakon zasijavanja na hranjivu podlogu. Patogen se tada može prečistiti i identificirati. Kako bi se u cijelosti iskoristile mogućnosti testa, potrebna je pažljiva priprema i uklanjanje kore sa pupčanog dijela krtole kako bi se izbjegle sekundarne bakterije s krtola krompira, koje na hranjivoj podlozi konkuriraju bakteriji *C. m. ssp. sepedonicus*. i mogu prerasti u patogena. Ako izolacija na hranjivoj podlozi ne uspije, mora se napraviti iz biljaka koje su korištene u biotestu (vidi Dio 8).

(8) Biotest se koristi za izolaciju bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* iz macerata vještački inokuliranog patlidžana (*Solanum melongena*). Test zahtijeva optimalne uslove inkubacije kao što je navedeno u ovoj metodi. Bakterije koje inhibiraju bakteriju *C. m. ssp. sepedonicus* na MTNA ili NCP-88 hranjivim podlogama najvjerojatnije neće smetati u ovom testu (vidi Dio 7).

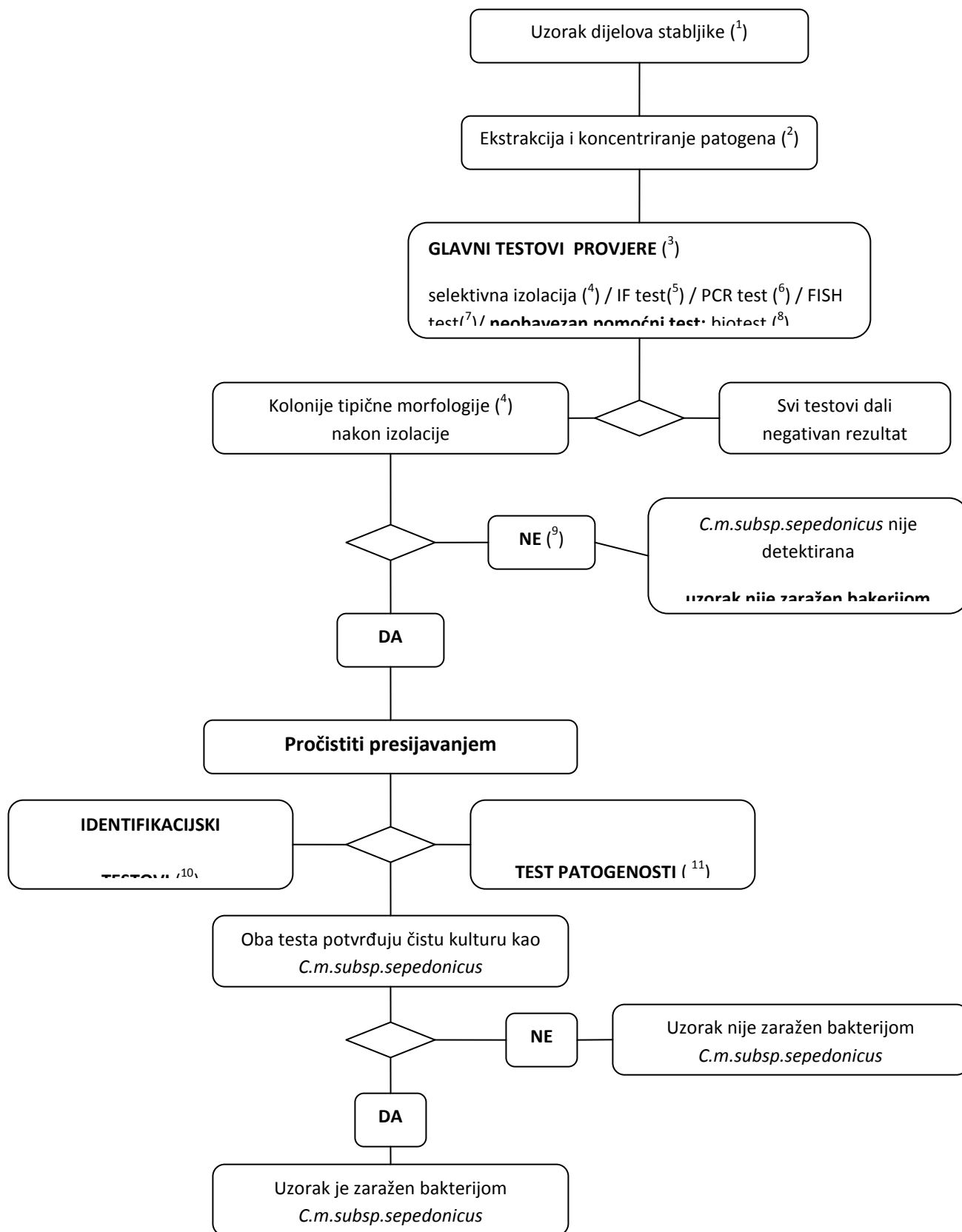
(9) Tipična morfologija kolonije opisana je u Dijelu 8.

(10) 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 baznog dijela blizu stolona krtola iz istog uzorka te, ako je potrebno, testirajte dodatne uzorke.

(11) Pouzdana identifikacija čistih kultura *C. m. ssp. sepedonicus* postiže se provođenjem testova opisanih u Dijelu 9.

(12) Test patogenosti opisan je u Dijelu 10.

1.3. Šema za detekciju i identifikaciju bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* u uzorcima biljaka krompira bez simptoma



- (1) Za preporučene veličine uzoraka vidi Dio 3.2.
- (2) Metode ekstrakcije i koncentriranja patogena opisane su u Dijelu 3.2.
- (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 i tipična morfologija kolonije opisani su u Dijelu 8.

(5) IF test opisan je u Dijelu 4.

(6) PCR testovi opisani su u Dijelu 6.

(7) FISH test opisan je u Dijelu 5.

(8) Biotest opisan je u Dijelu 7.

(9) 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 i, ako je potrebno, testirajte dodatne uzorke.

(10) Pouzdana identifikacija čistih kultura *C. m. ssp. sepedonicus* postiže se provođenjem testova opisanih u Dijelu 9.

(11) Test patogenosti opisan je u Dijelu 10.

2. VIZUELNI PREGLED ZA OTKRIVANJE SIMPTOMA PRSTENASTE TRULEŽI

2.1. Biljke krompira

U evropskim klimatskim uslovima simptomi se rijetko pronalaze u polju i to često tek na kraju sezone. Osim toga, simptomi su često prikriveni ili se mogu zamijeniti s drugim bolestima, starenjem ili mehaničkim oštećenjima. Stoga možemo vrlo lako previdjeti simptome prilikom pregleda u polju. Simptomi venuća vrlo su različiti od onih smeđe truleži; venuće je obično polagano i u početku ograničeno na rubove listova. Mladi zaraženi listovi često nastavljaju rasti, iako manje u zaraženim dijelovima, te su listovi neobičnog oblika. Listovi zbog blokade provodnog tkiva u donjem dijelu stabljike često imaju hlorotične, žuto-narančaste dijelove između lisnih žila. Zaraženi listići, listovi, čak i stabljike mogu vremenom odumrijeti. Često su listovi i krtole samo manje veličine. Povremeno su biljke zakržljale.

2.2. Krtole krompira

Najraniji simptomi su lagana staklenost ili prozirnost tkiva bez omekšanja oko provodnog sistema, posebno u blizini pupčanog dijela krtole. Provodni prsten na pupčanom dijelu krtole može biti malo tamnije boje od uobičajene. Prvi lako uočljiv simptom je žućkasta boja provodnog prstena, a kada se krtola nježno stisne, iz žila izlaze male količine sirastog materijala. Taj iscedak sadrži milijone bakterija. Provodno tkivo može posmeđiti i simptomi na krtolu u ovom stadiju slični su simptomima smeđe truleži koju uzrokuje *Ralstonia solanacearum*. U početku, ti simptomi mogu biti ograničeni na jedan dio provodnog prstena, ne nužno blizu pupčanog dijela krtole, i mogu se postupno proširiti na cijeli prsten. Kako infekcija napreduje, dolazi do propadanja provodnog tkiva; vanjska i unutrašnja kora se mogu razdvojiti. U naprednim stadijima infekcije, na površini krtola pojavljuju se pukotine, koje su često crvenkasto-smeđe po rubovima. Nedavno se u Evropi pojavilo nekoliko slučajeva u kojima je središte krtole truhnulo istovremeno s provodnim prstenom što je dovelo do sekundarnog napada i unutrašnjim stvaranjem šupljina i nekroza. Sekundarni napad gljiva ili bakterija može prikriti

simptome i može biti teško, čak nemoguće, razlikovati uznapredovale simptome prstenaste truleži od drugih truleži krtola. Mogući su netipični simptomi.

3. PRIPREMA UZORKA

3.1. Krtole krompira

Napomena:

- Standardna veličina uzorka je 200 krtola po testu. Intenzivnije uzorkovanje zahtijeva testiranje više uzoraka iste veličine. Veći broj krtola u uzorku dovodi do inhibicije ili će otežati tumačenje rezultata. Međutim, postupak se može prikladno primijeniti za uzorke s 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 uzročnika smeđe truleži krompira, bakterije *Ralstonia solanacearum*.

Neobavezna obrada krtola prije pripreme uzorka

Operite krtole. Upotrijebite prikladna dezinfekcijska sredstva (spojeve 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 s previše tla i ako će se provesti PCR test ili direktna izolacija.

3.1.1. Čistim i dezinficiranim skalpelom ili nožem uklonite koru na krajevima pupčanog dijela krtole tako da provodno tkivo bude vidljivo. Pažljivo izrežite mali isječak provodnog tkiva na kraju pupčanog dijela krtole (u daljem tekstu: isječak) pazeći da zahvatite što manje okolnog, neprovodnog tkiva.

Napomena:

Odvojite sve krtole s mogućim simptomima prstenaste truleži i testirajte posebno.

Ako prilikom odstranjivanja isječka opazite moguće simptome prstenaste truleži, krtole treba vizuelno pregledati nakon što se prereže blizu pupka. Svaku prerezanu krtolu s mogućim simptomima treba ostaviti na sobnoj temperaturi dva dana da suberizira i pohraniti u karantinskim uslovima (na 4 do 10°C) sve dok se ne dovrše svi testovi. Sve krtole u uzorku (uključujući one sa sumnjivim simptomima) trebaju se čuvati u skladu s članom 8. Pravilnika.

3.1.2. Stavite isječke u neupotrijebljene posude za jednokratnu upotrebu koje se mogu zatvoriti i/ili hermetički zatvoriti (ako su posude već upotrebljavane, moraju se temeljito 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. Sušenje i suberizacija isječka, kao i rast saprofita tokom pohrane mogu ometati detekciju bakterije uzročnika prstenaste truleži.

3.1.3. Obradite isječke jednim od slijedećih postupaka:

(a) dodati dovoljnu količinu (oko 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 3) da pokrije isječke i tresti na rotacijskoj tresilici (50 do 100 okretaja/min) četiri sata na temperaturi ispod 24°C ili 16 do 24 sata uz hlađenje,

ili

(b) homogenizirajte isječke s dovoljnom količinom (oko 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 3), bilo u miješalici (npr. Waring ili Ultra Thurax) bilo 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 čekić ili prikladnu drobilicu (npr. Homex).

Napomena:

Ako se uzorci homogeniziraju u miješalici, 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 miješalice. 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.

3.1.4. 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) (Dodatak 3).

3.1.5. Koncentrirajte bakterijsku frakciju centrifugiranjem na 7 000 g 15 minuta (ili 10 000 g 10 minuta) na temperaturi od 4 do 10°C te odlijte supernatant pazeći pri tom da se ne pomiješa talog.

3.1.6. Resuspendirajte talog u 1,5 ml pufera za talog (Dodatak 3). Upotrijebite 500 µl za testiranje na *C. m. ssp. sepedonicus*, 500 µl za *Ralstonia solanacearum* i 500 µl kao referentni materijal. Dodajte sterilni glicerol konačnoj koncentraciji od 10 do 25% (v/v) 500 µl referentnog alikvota i preostalom testnom alikvotu, promiješajte i uskladištite na temperaturi od –16 do –24 °C (mjesecima) ili na –68 do –86 °C (mjesecima). Testne alikvote čuvajte na 4 do 10°C tokom testiranja.

Ne preporučuje se višekratno zamrzavanje i otapanje.

Ako je potreban transport ekstrakta, osigurajte dostavu u prijenosnome hladnjaku u roku od 24 do 48 sati.

3.1.7. Sve pozitivne kontrole i uzorci *C. m. ssp. sepedonicus* moraju se odvojeno pripremiti i obraditi kako bi se izbjegla kontaminacija. To vrijedi za stakalca za imunofluorescenciju, kao i za sve ostale testove.

3.2. Biljke krompira

Napomena:

Za detekciju latentnih populacija bakterije *Ralstonia solanacearum* preporučuje se testiranje sastavljenih uzoraka. Postupak se može prikladno primijeniti na sastavljene uzorke s najviše 200 dijelova stabljika. (Ako se provodi sistemski nadzor, on se mora zasnivati na statistički reprezentativnom uzorku biljne populacije koja se ispituje).

3.2.1. Čistim dezinficiranim nožem ili vrtlarskim makazama odrežite dio dug 1 do 2 cm s donjeg dijela svake stabljike, odmah iznad površine tla.

Kratko dezinficirajte dijelove stabljika 70% etanolom i odmah posušite papirnatim ubrusom.

Stavite dijelove stabljika u zatvorenu sterilnu posudu prema jednom od slijedećih postupaka:

3.2.2. Obradite dijelove stabljika pomoću jednog od slijedećih postupaka:

(a) prekrijte ih dovoljnom količinom (približno 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 3) i tresite na rotacijskoj tresilici (50 do 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) s odgovarajućom količinom ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4) koristeći gumeni čekić ili prikladnu drobilicu (npr. Homex). Ako to nije moguće, dijelove stabljika čuvajte u hladnjaku najduže 72 sata ili na sobnoj temperaturi najduže 24 sata.

3.2.3. Nakon 15 minuta taloženja, izlijte supernatant.

3.2.4. Dodatno bistrenje ekstrakta ili koncentriranje bakterijske frakcije obično nije potrebno, ali se može postići filtriranjem i/ili centrifugiranjem kako je opisano u dijelu 3.1.4 do 3.1.6.

3.2.5. 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 s 10-25% (v/v) sterilnog glicerola na temperaturi od –16 do –24°C (sedmicama) ili na –68 do –86 °C (mjesecima) u slučaju da je potrebno daljnje testiranje.

4. IF TEST

Načelo

Upotreba IF testa kao glavnog 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 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:

Uvijek koristite poliklonska antitijela kada se IF test koristi kao glavni test provjere. U slučaju pozitivnog IF očitavanja s poliklonskim antitijelima, daljnja provjera uzorka s monoklonskim antitijelima može omogućiti veću specifičnost, ali može biti manje osjetljiva.

Upotrijebite antitijela na referentni soj *C. m. ssp. sepedonicus*. Preporučuje se da se titar odredi za svaku novu seriju antitijela. Titar se definira kao najveće razrijeđenje kod kojeg dolazi do optimalne reakcije pri testiranju suspenzije koja sadrži 10^5 do 10^6 ćelija po ml homolognog soja *C. m. ssp. sepedonicus* uz korištenje fluorescein-izotiocijanata (FITC) konjugiranih antitijela u skladu s preporukama proizvođača. Nerazrijeđena poliklonska i monoklonska antitijela trebaju imati IF titar najmanje 1:2000. Tokom testiranja treba koristiti radna razrijeđenja antitijela, koja su blizu ili jednaka titru. Koristite validirana antitijela.

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 s 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 (vidi 2.2).

Za pozitivnu kontrolu pripremite odvojena stakalca s homolognim sojem ili nekim drugim referentnim sojem bakterije *C. m. ssp. sepedonicus*, suspendiranim u ekstraktu krompira kako je navedeno u Dodatku 2, ili 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 pokazali negativan rezultat.

Koristite predmetna stakalca sa više otvora, po mogućnosti s 10 otvora promjera najmanje 6 mm.

Kontrolni materijal testirajte jednako kao i uzorke.

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

(i) Za taloge s 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 se red 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 kao što je prikazano na slici 2.

4.2. 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.

4.3. IF postupak:

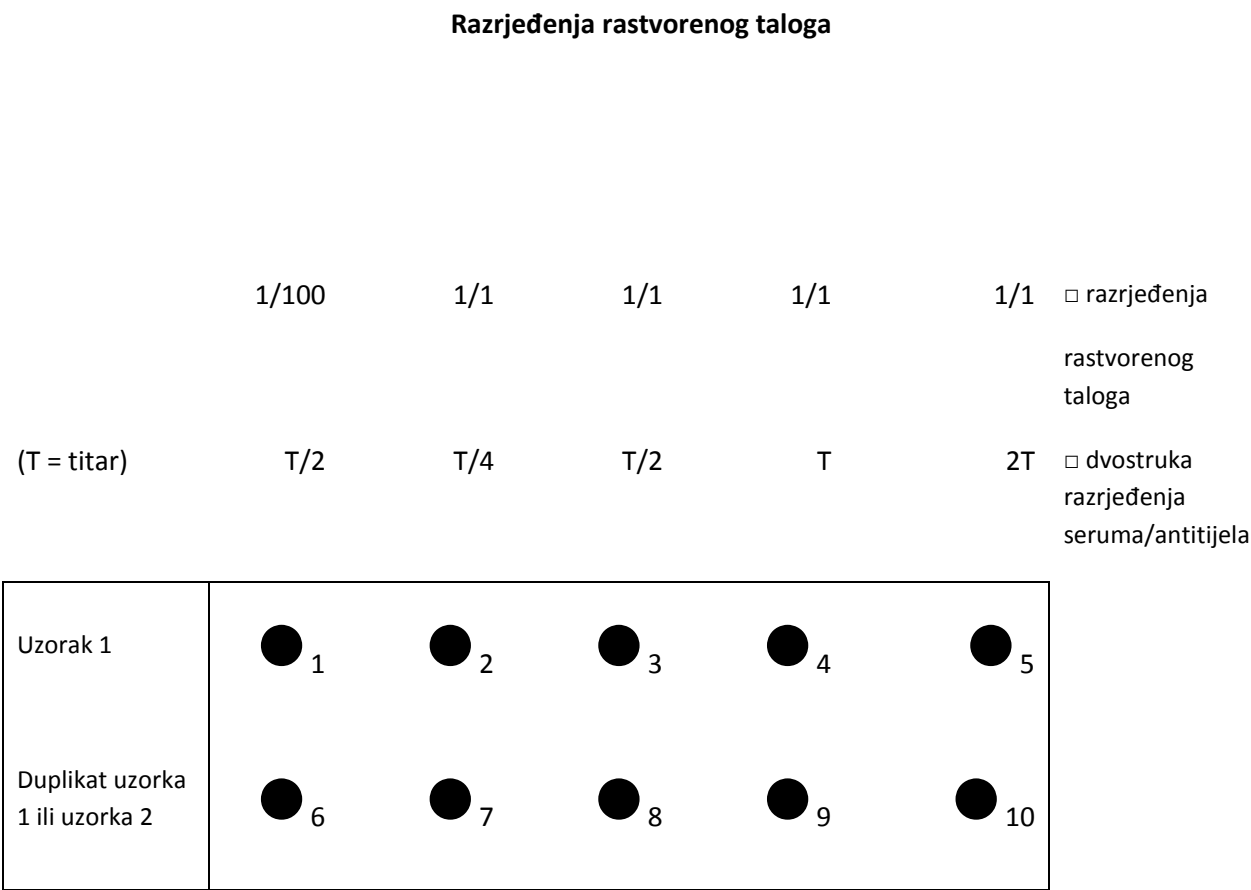
(i) U skladu s postupkom za pripremu stakalaca za testiranje kako je opisano pod 4.1(i):

Pripremite niz dvostrukih razrjeđenja antitijela u IF puferu. Prvi otvor mora imati 1/2 titra ($T/2$), a ostali 1/4 titra ($T/4$), 1/2 titra ($T/2$), titar (T) i dvostruki titar ($2T$).

(ii) U skladu s postupkom za pripremu stakalaca za testiranje kako je opisano pod 4.1(ii):

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

Slika 1. Priprema stakalca u skladu sa tačkama 4.1.(i) i 4.3.(i)



Slika 2. Priprema stakalaca u skladu sa tačkama 4.1. (ii) i 4.3.(ii)

Radna razrjeđenja seruma/antitijela

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

rastvorenog
taloga

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

4.3.1. Posložite stakalca na navlaženi upijajući papir. Svaki otvor potpuno prekrijte razrijeđenjem antitijela. Volumen antitijela koji se stavlja u pojedini otvor mora biti jednak volumenu stavljenog ekstrakta.

Slijedite slijedeći postupak ako nema posebnih uputa dobavljača antitijela:

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

4.3.3. Otresite kapljice sa svakog stakalca i pažljivo ih isperite IF puferom. Potopite ih 5 minuta u IF pufer-Tween (Dodatak 3) 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.

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

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

4.3.6. Otresite kapljice konjugata sa stakalca. Isperite i operite kako je prethodno opisano (4.3.3).

Pažljivo osušite.

4.3.7. Na svaki otvor pipetom nanesite 5-10 μ l 0,1 M glicerola s fosfatnim puferom (Dodatak 3) ili sredstvo protiv izbljeđivanja koje je dostupno na tržištu te stavite pokrovno stakalce.

4.4. Očitavanje IF testa:

4.4.1. Pregledajte pripremljena stakalca pod epifluorescentnim mikroskopom s odgovarajućim filtrima 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 s 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 (Dio 4).

4.4.2. Pregledajte da li su u otvorama vidljive jasno fluorescirajuće ćelije karakteristične morfologije za bakteriju *C. m. ssp. sepedonicus*.

Intenzitet fluorescencije mora biti jednak ili bolji kao i kod pozitivnog kontrolnog soja pri jednakom razrjeđenju antitijela. Ćelije s nepotpunim obojenjem ili sa slabom fluorescencijom moraju se zanemariti.

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

4.4.3. Postoji nekoliko problema vezanih uz specifičnost testa imunofluorescencije. U koncentriranom ekstraktu isječaka krompira ili dijelova stabljika mogu se nalaziti populacije fluorescirajućih ćelija netipične morfologije i saprofitne bakterije s kojima dolazi do unakrsne reakcije i koje su po veličini i morfologiji slične bakteriji *C. m. ssp. sepedonicus*.

4.4.4. U obzir uzmite samo fluorescirajuće ćelije tipične veličine i morfologije u titru ili radnom razrjeđenju antitijela kako je opisan u tački u 4.3.

4.4.5. Tumačenje očitavanja IF testa:

(i) Ako nađete 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).

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.

5. FISH TEST

Načelo

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

Napomena:

Koristite validirane oligo-probe specifične za bakteriju *C. m. ssp. sepedonicus* (Dodatak 7). Preliminarna testiranja ovom metodom trebaju omogućiti ponovljivu detekciju najmanje 10^3 do 10^4 ćelija bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* po ml koje su dodane ekstraktima uzoraka koji su u ranijim testiranjima bili negativni.

Slijedeći je postupak najbolje provesti na svježe pripremljenim ekstraktima uzoraka, ali se može uspješno primijeniti i na ekstraktu uzorka koji je bio pohranjen s glicerolom na temperaturi od -16 do -24°C ili od -68 do -86°C .

Za negativnu kontrolu upotrijebite alikvote ekstrakta uzoraka koji su u ranijem testiranju na prisustvo *C. m. ssp. sepedonicus* bili negativni.

Za pozitivnu kontrolu pripremite suspenzije koje sadrže 10^5 do 10^6 ćelija/ml 0,01 M fosfatnog pufera (PB) bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* (npr. soj NCPPB 4053, ili PD 406) iz kulture stare 3-5 dana (za pripremu vidi Dodatak 2). Pripremite odvojena stakalca za pozitivnu kontrolu s homolognim sojem ili nekim drugim referentnim sojem bakterije *C. m. ssp. sepedonicus*, suspendiranim u ekstraktu krompira, kao što je navedeno u Dodatku 2.

Korištenje eubakterijske oligo-probe obilježene FITC-om omogućava kontrolu procesa hibridizacije jer će se obojiti sve eubakterije koje su prisutne u uzorku.

Kontrolni materijal testirajte jednako kao i uzorke.

5.1. Fiksiranje ekstrakta krompira

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

5.1.1. Pripremite otopinu za fiksiranje (vidi Dodatak 7.).

5.1.2. Pipetom odmjerite 100 μl svakog ekstrakta uzorka u Eppendorf tubu te centrifugirajte 8 minuta na 7000 g.

5.1.3. Uklonite supernatant i resuspendirajte talog u 500 μl fiksativa pripremljenog prije najviše 24 sata. Promiješajte na vortex miješalici i inkubirajte jedan sat u hladnjaku.

Alternativni fiksativ je 96% etanol. Pri tome je potrebno resuspendirati talog iz koraka 5.1.2 u 50 μl 0,01M PB i 50 μl 96 % etanola. Promiješajte na vortex miješalici i inkubirajte na 4°C 30 do 60 minuta.

5.1.4. Centrifugirajte 8 minuta na 7000 g, uklonite supernatant te resuspendirajte talog u 75 μl 0,01M PB (vidi Dodatak 3).

5.1.5. U otvore čistog stakalca nanosite 16 μl fiksiranih suspenzija kako je prikazano na slici 3. Na svako stakalce nanosite nerazrijeđena dva različita uzorka i upotrijebite 10 μl za pripremanje razrjeđenja 1:100 (u 0,01 M PB). Preostalu fiksiranu otopinu 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 PB (promiješati na vortex miješalici).

Slika 3. 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		

5.1.6. Stakalca osušite na zraku (ili u sušioniku na 37 °C) te ih fiksirajte provlačenjem kroz plamen.

Na ovom se koraku postupak može prekinuti i nastaviti slijedeći dan. Stakalca se trebaju pohraniti na sobnoj temperaturi u suhom prostoru bez prašine.

5.2. Predhibridizacija i hibridizacija

5.2.1. Pripremite otopinu lizozima koja sadrži 10 mg lizozima (Sigma L-6876) u 10 ml pufera (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Ta se otopina može pohraniti, ali se smije samo jednom odmrznuti i otopiti. Dobro prekrijte svaki uzorak s približno 50 µl otopine lizozima i inkubirajte 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim samo jednom umočite objektna stakalca u demineraliziranu vodu i pažljivo osušite filter papirom.

Alternativno umjesto lizozima dodajte 50 µl 40 do 400 µg ml⁻¹ proteinaze K u puferu (20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4) na svaki otvor i inkubirajte na 37°C 30 minuta.

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

5.2.3. 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 na 55°C najmanje 10 minuta.

5.2.4. Pripremite 45 µl hibridizacijske otopine po stakalcu (Dodatak 7) i prethodno inkubirajte pet minuta na 55°C.

5.2.5. Stavite stakalca na grijaću podlogu na 45°C i nanesite po 10 µl hibridizacione otopine na svaki od četiri otvora.

5.2.6. Stavite dva pokrovna stakalca (24×24 mm) na svako stakalce pazeći pri tom da u otvorima ne ostane zraka. Stavite stakalca u prethodno zagrijanu vlažnu komoru i hibridizirajte preko noći u pećnici na 55°C.

5.2.7. Pripremite tri posude sa 1 l ultra čiste vode, 1 l 1x hybmix (334 ml 3x hybmix i 666 ml ultra čiste vode) i 1 l 1/2x hybmix (167 ml 3x hybmix i 833 ml ultra čiste vode). Svaku posudu prethodno inkubirajte u vodenom kupatilu pri 55°C.

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

5.2.9. Višak probe isperite inkubiranjem 15 minuta na 55°C u posudi s 1x hybmixa.

5.2.10. Prenesite držač stakalaca u otopinu za pranje (1/2 x hybmix) i inkubirajte još 15 minuta.

5.2.11. Stakalca nakratko uronite u ultra čistu 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 zaštitne otopine protiv izbljeđivanja (npr. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA ili ekvivalentna) te cijelo predmetno stakalce pokrijte velikim pokrovnim stakalcem (24 x 60 mm).

5.3. Očitavanje FISH testa

5.3.1. Stakalca odmah pregledajte epifluorescentnim mikroskopom uz uljnu imerziju, s povećanjem od 630 ili 1000 x. S filterom prikladnim za fluorescein-izotiocijanat (FITC), eubakterijske ćelije (uključujući većinu gram negativnih ćelija) u uzorku vide se kao fluorescentno zelene. Upotrebom filtra za tetrametilrodamin-5-izotiocijanat ćelije bakterije *C. m. ssp. sepedonicus*, obojene s Cy 3, vide se kao fluorescentno crvene. Usporedite morfologiju ćelije s morfologijom pozitivnih kontrola. Ćelije moraju biti jasno fluorescentne i u cijelosti obojene. Ako dođe do odstupanja u obojenosti, FISH test (Dio 9.4) se mora ponoviti. Pregledajte svaki otvor duž dva međusobno vertikalna promjera i duž vanjskog ruba. Za uzorke u kojima je vidljiv mali broj ćelija ili ih uopće nema pregledajte najmanje 40 mikroskopskih vidnih polja.

5.3.2. Pregledajte da li su u otvorima vidljive jasno fluorescirajuće ćelije karakteristične morfologije za bakteriju *C. m. ssp. sepedonicus* (vidi mrežnu stranicu: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

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

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

5.3.4. Postoji nekoliko problema vezanih za specifičnosti FISH testa. U koncentriranom ekstraktu isječaka krompira 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 *C. m. ssp. sepedonicus*.

5.3.5. U obzir uzmite samo fluorescirajuće ćelije tipične veličine i morfologije, vidi 5.3.2.

5.3.6. Tumačenje rezultata FISH testa:

(i) Rezultati FISH testa smatraju se valjanima ako se primjenom FITC filtra opaze zeleno fluorescirajuće ćelije čija je veličina i morfologija tipična za bakteriju *C. m. ssp. sepedonicus* i ako se primjenom filtra 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 s najmanje 5×10^3 tipičnih ćelija po ml resuspendiranog taloga smatraju se potencijalno kontaminiranim. Potrebni su dalji testovi. Uzorci s manje od 5×10^3 tipičnih ćelija po ml resuspendiranog taloga smatraju se negativnim.

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

6. PCR TEST

Načela

Kada se PCR test koristi kao glavni test provjere i rezultat je pozitivan, mora se provesti IF test 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 daljnije 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 *C. m. ssp. sepedonicus* po ml, koje su dodane ekstraktima uzoraka koji su u prethodnim testiranjima dali negativni rezultat. Kako bi se postigao najveći stepen osjetljivosti i specifičnosti u svim laboratorijama, mogu biti potrebni ogledi za optimizaciju metode.

Koristite validirane reagense i protokole za PCR. Poželjno je odabrati metodu s internom kontrolom.

Preduzmite odgovarajuće mjere opreza kako biste izbjegli kontaminaciju uzorka ciljnom DNK. Da bi se spriječila kontaminacija ciljnom DNK, PCR test treba da obavljaju 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 je li došlo do prijenosa DNK.

U PCR test treba uključiti slijedeće negativne kontrole:

- 1) ekstrakt uzorka koji je u ranijem testiranju na *C. m. ssp. sepedonicus* bio negativan,
- 2) pufer korišten za ekstrakciju bakterije i DNK iz uzorka,
- 3) reakcijsku smjesu za PCR.

U PCR test treba uključiti i slijedeće pozitivne kontrole:

- 4) alikvote resuspendiranih taloga u koje je dodana bakterija *C. m. ssp. sepedonicus* (za pripremu vidi Dodatak 2),
- 5) suspenziju u vodi od 10^6 ćelija po ml *C. m. ssp. sepedonicus* virulentnog izolata (npr. NCPPB 2140 ili NCPPB 4053),

- 6) ako je moguće, u PCR testu upotrijebite i DNK ekstrahiranu iz ranijih 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, stoga, bilo preporučljivo oprati krtule prije pripreme ekstrakta.

6.1. Metode prečišćavanja DNK

Koristite uzorke za pozitivnu i negativnu kontrolu kako je gore opisano. Pripremite kontrolni materijal na jednaki način kao i uzorke.

Postoje različite metode za prečišćavanje ciljne 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 s validiranom PCR metodom koja je navedena u Dodatku 6.

6.1.(a) Metoda prema Pastriku (2000)

- 1) Pipetom odmjerite 220 µl pufera za lizu [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] u Eppendorf tubu (u daljem tekstu: tubu) od 1,5 ml.
- 2) Dodajte 100 µl ekstrakta uzorka i stavite u blok za zagrijavanje ili vodeno kupatilo na 95°C 10 minuta.
- 3) Stavite tube na led na pet minuta.
- 4) Dodajte 80 µl osnovne otopine lizozima (50 mg lizozima po ml u 10 mM Tris HCl, pH 8,0) i inkubirajte na 37°C 30 minuta.
- 5) Dodajte 220 µl Easy DNA® otopine A (Invitrogen), dobro promiješajte na vortex miješalici i inkubirajte na 65°C 30 minuta.
- 6) Dodajte 100 µl Easy DNA® otopine B (Invitrogen), snažno miješajte na vortex miješalici sve dok precipitat ne bude slobodno kružio po tubi i dok uzorak ne bude jednoliko viskozan.
- 7) Dodajte 500 µl hloroforma te miješajte na vortex miješalici dok se viskoznost ne smanji i smjesa postane homogena.
- 8) Centrifugirajte na 15000 g 20 minuta na 4°C da se odijele faze i stvori interfaza.
- 9) Prenesite gornju fazu u novu Eppendorfov tubu.
- 10) Dodajte 1 ml 100% etanola (−20°C), kratko promiješajte na vortex miješalici i inkubirajte na ledu 10 minuta.
- 11) Centrifugirajte na 15000 g 20 minuta na 4°C te uklonite etanol.
- 12) Dodajte 500 µl 80% etanola (−20°C) i promiješajte okretanjem tube.
- 13) Centrifugirajte na 15000 g 10 minuta na 4°C, sačuvajte talog, a etanol uklonite.
- 14) Ostavite talog da se suši na zraku ili u vakuumskoj centrifugi (DNA speed vac).
- 15) Resuspendirajte talog u 100 µl sterilne ultra čiste vode i ostavite na sobnoj temperaturi najmanje 20 minuta.
- 16) Čuvajte na −20°C sve dok nije potreban za PCR.
- 17) Centrifugiranjem izdvojite mogući bijeli precipitat te za PCR upotrijebite 5 µl supernatanta koji sadrži DNK.

6.1.(b) Druge metode

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

6.2. PCR

6.2.1. Pripremite test i kontrolne uzorke za PCR prema validiranim protokolima (Dodatak 6). Pripremite jedno decimalno razrjeđenje 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). Validirani protokol za multipleks PCR uključuje unutrašnju kontrolu.

6.2.3. Dodajte 5 μ l ekstrakta DNK na 25 μ l reakcijske smjese u sterilne tube 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 tube 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 μ l reakcijske smjese umnožene DNK iz svakog uzorka, pomiješane s 3 μ l pufera za nanošenje (Dodatak 6), nanosite u 2%-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 dužinski standard, npr. 100 bp.

6.3.2. Obojite elektroforetske pruge DNK u gelu etidijum bromidom (0,5 mg/l) 30 do 45 minuta preduzimajući pri tome odgovarajuće mjere opreza za rad s ovim mutagenom.

6.3.3. Obojeni gel pregledajte na kratkotalasnom UV transiluminatoru (npr. $\lambda = 302$ 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 s odgovarajućim enzimom i puferom (vidi Dodatak 6). Pocijepane fragmente razdvojite elektroforezom u agaroznom gelu kako je gore navedeno te nakon bojenja etidijum bromidom na UV transiluminatoru posmatrajte karakteristični restrikcijski obrazac i usporedite ga s 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 *C. m. ssp. sepedonicus*, ali je vidljiv u svim pozitivnim kontrolnim uzorcima (kod multipleks PCR-a s prajmerama za unutrašnju kontrolu koje su specifične za biljku domaćina: u testiranom se uzorku mora umnožiti drugi produkt PCR-a očekivane veličine).

PCR test je pozitivan ako je vidljiv PCR produkt koji je specifičan za bakteriju *C. m. ssp. sepedonicus* 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 s drugim parom prajmera (Dio 9.3).

Napomena:

Može se sumnjati da je došlo do inhibicije PCR reakcije ako se iz uzorka pozitivne kontrole koji sadrži *C. m. ssp. sepedonicus* u vodi dobije očekivani produkt, a iz pozitivnih kontrola s *C. m. ssp. sepedonicus* u ekstraktu krompira dobiju negativni rezultati. U multipleks PCR protokolima s 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. BIOTEST

Napomena:

Preliminarno testiranje ovom metodom treba omogućiti ponovljivu detekciju 10^3 do 10^4 jedinica koje stvaraju kolonije (CFU) bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* po ml, a koje su dodane ekstraktima uzoraka koji su u ranijem testiranju bili negativni (za pripremu vidi Dodatak 2).

Najveća osjetljivost detekcije može se očekivati ako se koriste svježe pripremljeni ekstrakti uzoraka te optimalni uslovi rasta. Međutim, ova se metoda može uspješno primijeniti i s ekstraktima koji su bili pohranjeni s glicerolom na temperaturi od -68 do -86°C .

Neke sorte patlidžana su odlične kao selektivni medijum za rast *C. m. ssp. sepedonicus*, čak i kad nema simptoma, a ujedno su i odlične kao domaćini za test potvrde.

Uslovi rasta trebaju biti optimalni kako bi se smanjio rizik od lažno negativnih rezultata.

Za detalje o uzgoju vidi Dodatak 8.

7.1. Na patlidžane rasporedite sav preostali alikvot resuspendiranog taloga ostavljen za testiranje iz dijela 3.1.6 ili 3.2.5 jednom od metoda koje su navedene niže u tekstu (7.3 ili 7.4). Koristite samo biljke u stadiju dva do tri prava lista, do potpune razvijenosti trećeg pravog lista. Kako bi se u potpunosti iskoristio resuspendirani talog te osigurala djelotvorna inokulacija, za postupke navedene niže u tekstu bit će potrebno 15 do 25 biljaka patlidžana po jednom uzorku.

7.2. Nemojte zalijevati patlidžane jedan do dva dana prije inokulacije kako bi se smanjio turgor.

7.3. Inokulacija zarezivanjem

7.3.1. Držeći biljku među prstima, pipetom nanesite kapljicu (oko 5-10 μl) resuspendiranog taloga na stabljiku između kotiledona i prvog lista.

7.3.2. Sterilnim skalpelom napravite dijagonalni rez, dug oko 1 cm i dubok oko 2/3 debljine stabljike, počevši od nanešene kapljice resuspendiranog taloga.

7.3.3. Čvrsto zatvorite rez sterilnim vazelinom iz štrcaljke.

7.4. Inokulacija injekcijom

Inokulirajte stabljike patlidžana neposredno iznad kotiledona injekcijom s potkožnom iglom (najmanje 23G). Uzorak rasporedite na testne patlidžane.

7.5. Za pozitivnu kontrolu, inokulirajte 5 biljaka suspenzijom u vodi od 10^5 do 10^6 ćelija po ml poznate kulture *C. m. ssp. sepedonicus* i, kada je moguće, ekstraktom prirodno zaraženih tkiva krtola (vidi Dio 4) istom metodom inokulacije (7.3 ili 7.4).

7.6. Za negativnu kontrolu, inokulirajte 5 biljaka sterilnim puferom za talog istom metodom inokulacije (7.3 ili 7.4).

7.7. Uzgajajte biljke u karantinskim prostorijama do četiri sedmice na 18 do 24°C , uz dovoljnu količinu svjetla i visoku vlagu (70 do 80%) i primjereno zalijevajte kako bi spriječili

nakupljanje vode ili uvenuće zbog nedostatka vode. Čelije *C. m. ssp. sepedonicus* ugibaju na temperaturama iznad 30°C, a optimalna temperatura je 21°C. Kako bi izbjegli unakrsnu kontaminaciju, biljke pozitivne i negativne kontrole uzgajajte na jasno odvojenim stolovima u stakleniku ili policama u komori za rast ili, u slučaju da je prostor ograničen, pobrinite se da su strogo odvojene između pojedinih postupaka. Ako se biljke za različite uzorke moraju uzgajati blizu jedna drugoj, razdvojite ih prikladnim zaslonima. Kod prihrane, zalijevanja, pregledavanja i svakog drugog postupka s 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 s uzorka na uzorak.

7.8. Nakon jedne sedmice redovno provjeravajte pojavu simptoma. Prebrojite biljke koje pokazuju simptome. *C. m. ssp. sepedonicus* uzrokuje venuće lišća kod patlidžana koje može početi kao uvelost rubova ili između žila listova. Uvenulo tkivo može u početku izgledati tamnozeleno ili prošarano, ali postaje blijedo prije nego što postane nekrotično. Uvenulost između lisnih žila često izgleda masno, kao da su natopljeni vodom. Nekrotično tkivo često ima svjetložuti rub. Biljke ne ugibaju uvijek; što je period prije nego što se simptomi razviju duže, to je veća mogućnost preživljavanja. Biljke mogu prerasti zarazu. Mlade biljke patlidžana mnogo su osjetljivije na niske koncentracije *C. m. ssp. sepedonicus* nego starije biljke; zbog toga se koriste biljke u ili neposredno prije faze tri prava lista.

Uvenuće može biti uzrokovano populacijama drugih bakterija ili gljiva koje su prisutne u ekstraktu tkiva krtola. To su: *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* i *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata*, kao i širok spektar saprofitnih bakterija. Posebno *Erwinia chrysanthemi* može uzrokovati simptome na listovima i venuće koje je vrlo slično simptomima koje prouzrokuje *C. m. ssp. sepedonicus*. Jedina razlika je crnjenje stabljika u slučaju infekcija bakterijom *Erwinia chrysanthemi*. Druga venuća mogu se razlikovati od onih koje uzrokuje *C. m. ssp. sepedonicus* zato što cijeli listovi ili cijele biljke vrlo brzo venu. Može se pripremiti i bojenje po Gramu: time će se razlučiti *C. m. ssp. sepedonicus* od *Erwinia* spp.

7.9. Čim primijetite simptome kod patlidžana, potrebno je ponovo izvršiti izolaciju, koristeći dijelove uvenulog tkiva lišća ili tkiva stabljike (vidi 3.1.3 za maceraciju tkiva). Površinski dezinficirajte lišće i stabljike patlidžana tako da ih obrišete 70%-tnim etanolom. Provedite IF ili PCR test na soku patlidžana i izolirajte na prikladnoj (selektivnoj) hranjivoj podlozi (vidi Dio 8). Može se pripremiti i bojenje po Gramu (Dodatak 9). Identificirajte prečišćene kulture za koje se pretpostavlja da su *C. m. ssp. sepedonicus* i potvrdite patogenost (vidi Dio 9 i 10).

7.10. U određenim okolnostima, posebno kad uslovi za rast nisu optimalni, moguće je da *C. m. ssp. sepedonicus* postoji kao latentna infekcija u patlidžanima čak i nakon perioda inkubacije do 4 sedmice. Ako se simptomi ne primijete nakon 4 sedmice, provedite IF/PCR test na sastavljenom uzorku dijelova stabljike od 1 cm svake testne biljke, uzetih iznad mjesta inokulacije. Ako je test pozitivan, potrebno je provesti ponovnu izolaciju na prikladnoj (selektivnoj) hranjivoj podlozi, prema postupku iz Dijela 8. Identificirajte prečišćene kulture za koje se pretpostavlja da su *C. m. ssp. sepedonicus* i potvrdite patogenost (vidi Dio 9 i 10).

Tumačenje rezultata biotesta

Rezultati biotesta su prihvatljivi 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 *C. m. ssp. sepedonicus*, pod uslovom da je bakterija *C. m. ssp. sepedonicus* detektirana u pozitivnim kontrolama.

Biotest je pozitivan ako su testne biljke zaražene bakterijom *C. m. ssp. sepedonicus*.

8. IZOLACIJA *C. m. ssp. sepedonicus*

Napomena:

Dijagnoza se može potvrditi samo ako se *C. m. ssp. sepedonicus* izolira i zatim identificira (vidi Dio 9), te ako se potvrdi patogenost (Dio 10). Iako je *C. m. ssp. sepedonicus* fastidiozna bakterija, može se izolirati iz tkiva sa ispoljenim simptomima.

Međutim, mogu ga prerasti brzo rastuće saprofitne bakterije te su stoga izolacije direktno iz ekstrakta tkiva krtola ili stabljike teške (Dio 3.1.6 ili 3.2.5). Selektivnom hranjivom podlogom i prikladno razrijeđenom otopinom resuspendiranog taloga iz isječaka ili stabljika krompira moguća je direktna izolacija *C. m. ssp. sepedonicus*.

Izolacije je potrebno izvršiti iz svih krtola ili dijelova stabljike krompira sa simptomima te iz vještački inokuliranih biljaka patlidžana kod kojih nisu primijećeni simptomi ali je IF/PCR test iz sastavljenog uzorka bio pozitivan (vidi Dio 7.10). Maceriranje stabljika patlidžana treba se, prema potrebi, provoditi kao što je navedeno u Dijelu 3.1.3.

Za pozitivne kontrole, pripremite decimalna razrijeđenja suspenzije 10^6 cfu po ml *C. m. ssp. sepedonicus* (npr. NCPPB 4053 ili PD 406). Kako bi izbjegli svaku mogućnost kontaminacije, pripremite pozitivne kontrole potpuno odvojeno od uzoraka koji se testiraju.

Za svaku svježe pripremljenu seriju selektivne hranjive podloge potrebno je provjeriti njenu prikladnost za rast patogena prije nego što se upotrijebi za testiranje rutinskih uzoraka.

Testirajte kontrolni materijal na isti način kao i uzorak ili uzorke.

8.1. Uzgoj na selektiranoj hranjivoj podlozi

8.1.1. Iz 100 μ l alikvota iz uzorka resuspendiranog taloga krompira ili biljnog soka patlidžana pripremite decimalna razrijeđenja u puferu za talog (Dodatak 3).

8.1.2. Izolacija iz nerazrijeđenog resuspendiranog taloga krompira obično ne uspije zbog teškog uzgoja *C. m. ssp. sepedonicus* i kompeticije saprofita. Obzirom da je bakterija obično prisutna u visokim populacijama u zaraženom tkivu, saprofiti se obično mogu odstraniti razrjeđivanjem, dok patogen ostaje. Stoga se preporučuje razmazati 100 μ l iz svakog uzorka (kod upotrebe Petri kutija promjera 90 mm – prilagodite količinu za Petri kutije drugih veličina), 1/100 do 1/10000 razrijeđene suspenzije na hranjivu podlogu MTNA ili na NCP-88 (Dodatak 5), tehnikom razmaza.

Napomena:

Alternativna strategija je da razmažete početni alikvot po 100 μ l resuspendiranog taloga krompira na prvu podlogu, a zatim istim štapićem napravite razmaz na drugu podlogu, pri čemu na drugu podlogu nanosite ostatke ekstrakta s prve podloge. Na kraju to ponovite s trećom podlogom, čime dobijate sličan efekt razrjeđenja.

8.1.3. Inkubirajte podloge u mraku pri 21 do 23°C.

8.1.4. Prva provjera podloga i procjena kolonija sličnih *C. m. ssp. sepedonicus*, u poređenju s kontrolnim podlogama, je nakon 3 dana, a daljnje procjene nakon 5, 7, te eventualno 10 dana.

8.2. Prečišćavanje sumnjivih kolonija

Napomena:

Kolonije slične *C. m. ssp. sepedonicus* treba precijepiti na hranjivu podlogu YGM ako će se koristiti za inokulaciju patlidžana i/ili daljnju identifikaciju; to se treba učiniti prije nego podloge postanu previše zaraštene, odnosno najbolje nakon tri do pet dana.

8.2.1. Razmažite kolonije slične *C. m. ssp. sepedonicus* na jednu od slijedećih hranjivih podloga: (sastavi su navedeni u Dodatku 5):

- hranjivi agar s dodatkom dekstroze (koristi se samo za precjepljivanje)
- agar s dodatkom kvasca, peptona i glukoze,
- agar s dodatkom ekstrakta kvasca i mineralnih soli.

Inkubirajte na 21°C do 24°C do 10 dana.

C. m. ssp. sepedonicus sporo raste, obično stvara kremaste, kupolaste kolonije sa šiljatim vrhom unutar 10 dana.

8.2.2. Ponovno razmažite kako bi postigli čistoću.

Stopa rasta se poboljšava presijavanjem. Tipične kolonije su kremasto-bijele ili poput slonovače, ponekad žute, zaokružene, glatke, povišene, konveksno-kupolaste, sluzavo-tekuće, s cijelim rubovima i obično 1 do 3 mm u promjeru.

Jednostavno bojenje po Gramu (Dodatak 9) može pomoći pri odabiru kolonija za daljnje testiranje.

8.2.3. Identificirajte vjerovatne kulture (vidi Dio 9) i provedite test patogenosti (vidi Dio 10).

9. IDENTIFIKACIJA

Identificirajte čiste kulture izolata za koje se prepostavlja da su *C. m. ssp. sepedonicus* upotrebom najmanje dva od slijedećih testova koja se zasnivaju na različitim biološkim načelima.

Uključite poznate referentne sojeve za svaki test.

9.1. Nutritivni i enzimatski testovi za identifikaciju

Odredite slijedeća fenotipska svojstva koja su univerzalno prisutna ili odsutna kod bakterije *C. m. ssp. sepedonicus*, prema metodama iz Lelliott i Stead (1987), Klement i sar. (1990), Schaad (2001), nepoznati autor (1987).

Sve se hranjive podloge trebaju inkubirati na 21°C i pregledati nakon šest dana. Ako ne dođe do rasta, inkubirajte do 20 dana.

U sve testove treba uključiti poznati kontrolni izolat *C. m. ssp. sepedonicus*. Nutritivni i fiziološki testovi trebaju se provesti koristeći kulture s hranjivog agara. Morfološka poređenja trebaju se napraviti iz kultura na hranjivom agaru s dodatkom dekstroze.

Testovi	Očekivani rezultati
Test oksidacije/fermentacije (O/F)	inertan ili slabo oksidativan
Aktivnost oksidaze	–
Rast na 37 °C	–

Aktivnost ureaze	–
Hidroliza eskulina	+
Hidroliza skroba	– ili slaba
Tolerancija 7% otopine NaCl	–
Stvaranje indola	–
Aktivnost katalaze	+
Stvaranje H ₂ S	–
Iskorištavanje citrata	–
Likvefikacija želatine	–
Kiselina iz glicerola	–
Kiselina iz laktoze	– ili slaba
Kiselina iz ramnoze	–
Kiselina iz salicina	–
Bojenje po Gramu (Dodatak 9)	+

9.2. IF test

- Pripremite suspenziju od približno 10⁶ ćelija po ml u IF puferu (Dodatak 3).
- Pripremite dvostruka razrjeđenja otopine prikladnog antiseruma.
- Primijenite IF postupak (Dio 4).
- IF test je pozitivan ako je IF titar kulture jednak titru pozitivne kontrole.

9.3. PCR test

- Pripremite suspenziju od približno 10⁶ ćelija po ml u ultra čistoj vodi.
- Zagrijte 100 µl ćelijske suspenzije u zatvorenim tubama u bloku za zagrijavanje ili vrelom vodenom kupatilu četiri minute pri 100°C. Prema potrebi, dodavanje svježe pripremljenog NaOH do konačne koncentracije 0,05M može pomoći liziji ćelija. Uzorci se mogu potom, do upotrebe, pohraniti na –16 do –24°C.
- Upotrijebite prikladne PCR postupke za umnožavanje specifičnih fragmenata *C. m. ssp. sepedonicus* (npr. Pastrok, 2000; vidi Dodatak 4; Li i de Boer, 1995; Mills i sar., 1997; Pastrok i Rainey, 1999; Schaad i sar., 1999.)
- Identifikacija *C. m. ssp. sepedonicus* je pozitivna ako su PCR produkti iste veličine i imaju istu dužinu restrikcijskih fragmenata polimorfizma kao i pozitivni kontrolni soj.

9.4. Test FISH

- Pripremite suspenziju od približno 10⁶ ćelija po ml u ultra čistoj vodi.
- Primijenite FISH postupak (Dio 5).
- FISH test je pozitivan ako su postignute iste reakcije iz kulture i pozitivne kontrole.

9.5. Profiliranje masnih kiselina (FAP)

- Uzgajajte kulturu na triptikaza-sojinom-agaru (Oxoid) 72 sata pri 21°C (+/– 1°C).
- Primijenite prikladan FAP postupak (Janse, 1991; Stead, 1992).
- FAP test je pozitivan ako je profil testiranog izolata identičan profilu pozitivne kontrole. Prisutnost karakterističnih masnih kiselina: 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 i 17:0 Anteiso, u velikoj mjeri ukazuje na *C. m. ssp. sepedonicus*. Drugi rodovi kao što su *Curtobacterium*, *Arthrobacter* i *Micrococcus* također imaju neke od ovih kiselina, ali 15:1 Anteiso A je rijetka kiselina u tim

bakterijama, ali se pojavljuje u svim bakterijama iz roda *Clavibacter* između 1 do 5%.
Kod *C. m. ssp. sepedonicus* vrijednost je obično oko 5%.

9.6. BOX-PCR

- (a) Pripremite suspenziju od približno 10^6 ćelija po ml u ultra čistoj vodi.
- (b) Primijenite test u skladu s postupkom (Smith i sar., 2001).

10. TEST POTVRDE

Test patogenosti mora se provesti kao konačna potvrda dijagnoze *C. m. ssp. sepedonicus* i za procjenu virulentnosti kultura identificiranih kao *C. m. ssp. sepedonicus*:

10.1. Pripremite inokulum od približno 10^6 ćelija po ml iz trodnevni kultura izolata koji se testira i prikladan izolat pozitivne kontrole *C. m. ssp. sepedonicus*.

10.2. Inokulirajte stabljike 5 do 10 mladih biljaka patlidžana u fazi 3 prava lista (Dio 7.3 ili 7.4).

10.3. Inkubirajte inokulirane biljke patlidžana pri 18 do 24°C uz dovoljnu količinu svjetla i visoku relativnu vlagu te prikladno zalijevajte kako bi izbjegli nakupljanje vode ili stres od suše (Dio 7.7). Kod čistih kultura, tipično bi se venuće trebalo pojaviti u roku od dvije sedmice, ali biljke koje ne pokazuju simptome (vidi Dio 7.8) nakon tog vremena trebaju se inkubirati do tri sedmice na temperaturama koje su povoljne za rast patlidžana, ali ne više od 25°C (Dodatak 8). Ako simptomi nisu prisutni ni nakon tri sedmice, kultura se ne može potvrditi kao patogeni oblik *C. m. ssp. sepedonicus*.

10.4. Izolirajte patogene iz biljaka sa simptomima tako da odstranite dio stabljike 2 cm iznad mjesta inokulacije. Usitnite i suspendirajte u maloj količini sterilne destilirane vode ili 50 mM fosfatnog pufera (Dodatak 3). Izolirajte bakterije iz suspenzije razmazom na MTNA i YPGA (Dodatak 5), inkubirajte tri do pet dana pri 21 do 23°C i pregledajte jesu li se razvile tipične kolonije bakterije *C. m. ssp. sepedonicus*.

Dodatak 1

Laboratorije koje su uključene u optimizaciju i validaciju protokola

Laboratorija ¹	Lokacija	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
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Holandija
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Ås	Norveška
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisbon	Portugal
Nacionalni institut za biologijo	Ljubljana	Slovenija
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Španija
¹ Za kontakt sa naučnicima vidi mrežnu stranicu		

Dodatak 2

Priprema pozitivnih i negativnih kontrola za osnovne testove provjere, PCR/IF i FISH

- Uzgojite čistu kulturu virulentnog soja bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* starosti 72 sata (NCPPB 4053 ili PD 406) na MTNA osnovnoj hranjivoj podlozi i suspendirajte u 10 mM fosfatnom puferu da dobijete gustoću ćelija od približno $1 \text{ do } 2 \times 10^8$ cfu po ml. To je obično slabo mutna suspenzija optičke gustoće od 0,20 pri 600 nm.
- Izvadite isječke iz 200 krtola krompira sorte s bijelom korom za koje je poznato da nisu zaraženi bakterijom *C. m. ssp. sepedonicus*.
- Obradite isječke uobičajenom metodom i resuspendirajte talog u 10 ml.
- Pripremite 10 sterilnih mikrotuba od 1,5 ml s 900 µl resuspendiranog taloga.
- U prvu mikrotubu dodajte 100 µl suspenzije *C. m. ssp. sepedonicus*. Promiješajte na vortex miješalici.
- U slijedećih pet mikrotuba pripremite decimalna razrjeđenja.
- Ovih šest mikrotuba s kontaminiranim ekstraktom koristite za pozitivnu kontrolu. Četiri mikrotube s nekontaminiranim ekstraktom koristite za negativnu kontrolu. U skladu s tim, označite mikrotube.
- Pripremite alikvote od 100 µl u mikrotubama od 1,5 ml tako da dobijete devet kopija svakog kontrolnog uzorka. Do upotrebe ih pohranite na -16 do -24°C .

- Prisutnost i količinu *C. m. ssp. sepedonicus* 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, bakterija *C. m. ssp. sepedonicus* se mora detektirati u najmanje 10^6 i 10^4 ćelija/ml pozitivnih kontrola i niti u jednoj negativnoj kontroli.

Dodatak 3

Puferi za postupke testiranja

Napomena:

Neotvoreni sterilizirani puferi mogu se čuvati do jedne godine.

1. Puferi za postupak ekstrakcije

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

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

- Na_2HPO_4 (bezvodni) 4,26 g
- KH_2PO_4 2,72 g
- Destilirana voda 1 l

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

Mogu biti korisni i slijedeći dodatni sastojci:

	Namjena	Količina (po l)
Pahuljice Lubrol	Deflokulant*	0,5 g
DC silikon protiv pjenjenja	sredstvo protiv pjenjenja *	1,0 ml
Tetranatrijev pirofosfat	Antioksidans	1,0 g
Polivinilpirolidon-40000 (PVP-40)	Vezanje PCR inhibitora	50 g
*Za upotrebu kod metode ekstrakcije homogenizacijom		

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

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

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

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

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.

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ 2,7 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g
- NaCl 8,0 g
- Destilirana voda 1.0 L

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

2.2. IF pufer – Tween

Ovaj se pufer koristi za ispiranje stakalca.

IF puferu dodajte 0,1% Tween 20.

2.3. Glicerol s fosfatnim puferom, pH 7,6

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

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

Pokrivne otopine protiv izbljeđivanja dostupne su na tržištu, npr. Vectashield® (Vector Laboratories) ili Citifluor® (Leica).

Dodatak 4

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 (varira od 8 do 24 ovisno o tipu okulara)

K = koeficijent tubusa (1 ili 1,25)

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

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

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

gdje je

y = volumen resuspendiranog taloga na svakom oknu, i

F = faktor razrjeđenja resuspendiranog taloga.

Dodatak 5

Hranjive podloge za izolaciju i uzgoj *C. m. ssp. sepedonicus*

(a) Opće hranjive podloge

Hranjivi agar (NA)

- Hranjivi agar (Difco) 23,0 g
- Destilirana voda 1,0 L
- Otopite sastojke i sterilizirajte u autoklavu pri 121°C 15 minuta.

Hranjivi agar s dektrozom (NDA)

- Difco bacto hranjivi agar koji sadrži 1% D(+) glukoze (monohidrata). Sterilizirajte u autoklavu pri 115°C 20 minuta.

Agar s kvascem, peptonom i glukozom (YPGA)

- Ekstrakt kvasca (Difco) 5,0 g
- Bacto pepton (Difco) 5,0 g
- D(+) glukoza (monohidrat) 10,0 g
- Agar Bacto (Difco) 15,0 g
- Destilirana voda 1,0 L

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

Agar s ekstraktom kvasca i mineralnim solima (YGM)

- Bacto ekstrakt kvasca (Difco) 2,0 g
- D(+) glukoza (monohidrat) 2,5 g
- K_2HPO_4 0,25 g
- KH_2HPO_4 0,25 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g
- $MnSO_4 \cdot xH_2O$ 0,015 g
- NaCl 0,05 g
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,005 g
- Bacto agar (Difco) 18 g
- Destilirana voda 1,0 L

Otopite sastojke i sterilizirajte 0,5 litara volumena hranjive podloge u autoklavu pri 121°C 15 minuta.

(b) Validirane selektivne hranjive podloge

MTNA

Osim ako nije drugačije navedeno, svi sastojci su iz BDH.

- Ekstrakt kvasca (Difco) 2,0 g
- Manitol 2,5 g
- K_2HPO_4 0,25 g
- KH_2HPO_4 0,25 g
- NaCl 0,05 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g
- $MnSO_4 \cdot xH_2O$ 0,015 g
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,005 g

- Agar (Oxoid br. 1) 16,0 g
- Destilirana voda 1,0 L

Otopite sastojke, podesite pH na 7,2. Nakon sterilizacije u autoklavu (pri 121°C 15 minuta) i hlađenja na 50°C, dodajte antibiotike: trimetoprim 0,06 g, nalidiksičnu kiselinu 0,002 g, amfotericin B 0,01 g.

Osnovne otopine antibiotika: trimetoprim (Sigma) i nalidiksična kiselina (Sigma) (oboje na 5 mg/ml), u 96%-tnom metanolu, amfotericin B (Sigma) (1 mg/ml) u dimetilsulfoksidu. Osnovne otopine su sterilirane filtriranjem.

Napomena:

Rok trajanja osnovne hranjive podloge je tri mjeseca. Nakon što se dodaju antibiotici, rok trajanja je jedan mjesec kada se čuva u hladnjaku.

NCP-88

- Hranjivi agar (Difco) 23 g
- Ekstrakt kvasca (Difco) 2 g
- D-manitol 5 g
- K₂HPO₄ 2 g
- KH₂PO₄ 0,5 g
- MgSO₄·7H₂O 0,25 g
- Destilirana voda 1,0 L

Otopite sastojke, podesite pH na 7,2. Nakon sterilizacije u autoklavu (na 121°C 15 minuta) i hlađenja na 50°C, dodajte slijedeće antibiotike: Polimiksin B sulfat (Sigma) 0,003 g, nalidiksičnu kiselinu (Sigma) 0,008 g, Cikloheksimid (Sigma) 0,2 g.

Pripremite osnovne otopine antibiotika: nalidiksična kiselina u 0,01 M NaOH, cikloheksimid u 50% etanolu, polimiksin B sulfat u destiliranoj vodi. Osnovne otopine su sterilirane filtriranjem.

Napomena:

Rok trajanja osnovne hranjive podloge je tri mjeseca. Nakon što se dodaju antibiotici, rok trajanja je jedan mjesec kada se čuva u hladnjaku.

Dodatak 6

Validirani protokoli i reagensi za PCR

Napomena:

Preliminarna testiranja trebaju omogućiti ponovljivu detekciju 10³ do 10⁴ ćelija bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* po ml ekstrakta uzorka.

Preliminarna testiranja ne smiju dati lažno pozitivne rezultate kod određenih odabranih bakterijskih sojeva.

1. Protokol za multipleks PCR s unutarnjom PCR kontrolom (Patrik, 2000)

1.1. Oligonukleotidni prajmeri

- Uzvodni prajmer PSA-1 5' - ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3'
- Nizvodni prajmer PSA-R 5' - tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3'
- Uzvodni prajmer NS-7-F 5' - gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3'
- Nizvodni prajmer NS-8-R 5' - tcc gca ggt tca cct acg ga -3'

Očekivana dužina umnoženog produkta ciljane DNK *C. m. ssp. sepedonicus* = 502 bp (par prajmera PSA).

Očekivana dužina umnoženog produkta iz 18S rRNA unutrašnje kontrole = 377 bp (par prajmera NS).

1.2. Reakcijska smjesa za PCR

Reagens	Količina po reakciji	Konačna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	15,725 µl	
10x PCR pufer ¹ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Smjesa d-NTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Prajmera PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Prajmera PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Prajmera NS-7-F (10 µM) ²	0,1 µl	0,04 µM
Prajmera NS-8-R (10 µM) ²	0,1 µl	0,04 µM
Taq polimeraza (5 U/µl) ¹	0,2 µl	1,0 U
Volumen uzorka	5,0 µl	
Ukupni volumen	25,0 µl	

¹Metoda je bila validirana Taq polimerazom iz Perkin Elmer (AmpliTaq ili Gold) i Gibco BRL.

²Koncentracija prajmera NS-7 F i NS-8-R je bila optimizirana za ekstrakciju jezgre pupka krompira metodom homogenizacije i prečišćavanja DNK prema Pastriku (2000) (vidi dio 6.1.a i 6.2). Ponovna optimizacija koncentracija reagensa bit će potrebna ako se upotrijebi ekstrakcija tresenjem ili druga metoda izolacije DNK.

1.3. Uslovi PCR reakcije

Izvedite sljedeći program:

- 1 ciklus: (i) 3 minute pri 95°C (denaturacija ciljane DNK)
- 10 ciklusa: (ii) 1 minutu pri 95°C (denaturacija ciljane DNK)
- (iii) 1 minuta pri 64°C (sparivanje prajmera i ciljane DNK)
- (iv) 1 minuta pri 72°C (produživanje kopije)
- 25 ciklusa: (v) 30 sekundi pri 95°C (denaturacija ciljane DNK)
- (vi) 30 sekundi pri 62°C (sparivanje prajmera i ciljane)
- (vii) 1 minuta pri 72°C (produživanje kopije)
- 1 ciklus: (viii) 5 minuta pri 72°C (konačno produživanje)
- (ix) držati pri 4°C.

Napomena:

Ovaj je program optimiziran za upotrebu s uređajem za PCR MJ Research PTC 200. Kod upotrebe s drugim modelima vjerovatno će biti potrebno prilagoditi trajanje ciklusa (ii), (iii) (iv), (v), (vi) i (vii).

1.4. Analiza produkta umnožavanja restrikcijskim enzimom

PCR produkti umnoženi iz DNK bakterije *C. m. ssp. sepedonicus* daju karakteristični obrazac dužine restrikcijskih fragmenata polimorfizma s enzimom Bgl II nakon inkubacije pri 37°C 30 minuta. Restrikcijski fragmenti dobijeni iz specifičnoga fragmenta *C. m. ssp. sepedonicus* su veličine 282 bp i 220 bp.

2. Priprema pufera za nanošenje

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

- Bromfenol plavilo 5 g
- Destilirana voda (bidestilirana) 50 ml

2.2. Pufer za nanošenje

- Glicerol (86%) 3,5 ml
- Bromfenol plavilo (5.1) 300 µl
- Destilirana voda (bidestilirana) 6,2 ml
- 10x Tris acetatni EDTA pufer (TAE), pH 8,0
- Tris pufer 48,4 g
- Ledena sirćetna kiselina 11,42 ml
- EDTA (dinatrijeva so) 3,72 g
- Destilirana voda 1,00 L

Razrijedite do 1× prije upotrebe.

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

Dodatak 7

Validirani reagensi za FISH test

1. Oligo-probe

Specifična proba za Cms CMS-CY3-01: 5′ - ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -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 miješalici.

(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 S 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.

(iv) Napomena:

Alternativna otopina za fiksiranje: 96%-tni etanol.

3. 3x Hybmix

- NaCl 2,7 M
 - Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)
 - EDTA (sterilizirana filtriranjem i u autoklavu) 15 mM
- Razrijedite do 1x prema potrebi.

4. Otopina za hibridizaciju

- 1x Hybmix
- Natrijev dodecil sulfat (SDS) 0,01 %
- Proba EUB 338 5 ng/μl
- Proba CMSCY301 5 ng/μl

Pripremite količine otopine za hibridizaciju prema izračunima u tab. 1. Za svako stakalce (s 2 različita uzorka u duplikatu) treba 90 μl otopine za hibridizaciju.

Tab. 1: Predložene količine za pripremanje smjese za hibridizaciju

	2 stakalca	8 stakalca
Sterilna ultra čista voda	50,1	200,4
3x hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
Proba EUB 338 (100 ng/μl)	4,5	18,0
Proba CMSCY301 (100 ng/μl)	4,5	18,0
Ukupni volumen (μl)	90,0	360,0

Napomena:

Pohranite sve otopine koje sadrže oligo-probe osjetljive na svjetlost u mraku pri –20°C. Zaštitite od direktne sunčeve svjetlosti ili električne rasvjete 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 sterilirajte u autoklavu pri 121°C 15 minuta.

Dodatak 8

Uzgoj patlidžana

Posijte sjeme patlidžana (*Solanum melongena*) u pasteriziranom kompostu za sjeme. Presadite sadnice s potpuno razvijenim kotiledonima (10 do 14 dana) u pasteriziran kompost za lončanice.

Patlidžani se trebaju uzgajati u stakleniku pod slijedećim uslovima:

- Dužina dana: 14 sati ili prirodna dužina dana, ako je duža;
- Temperatura:
 - dan: 21 do 24°C,
 - noć: 15°C.
- Osjetljive sorte patlidžana:
 - »Black Beauty«,
 - »Long Tom«,
 - »Rima«,
 - »Balsas«

Dodatak 9

Postupak bojenja po Gramu (Huckerova modifikacija) (Doetsch, 1981)

Rastvor kristal violeta

- Otopite 2 g kristal violeta u 20 ml 95%-tnog etanola.
 - Otopite 0,8 g amonij-oksalata u 80 ml destilirane vode.
- Pomiješajte dvije otopine.

Rastvor Lugola

Jod 1 g

Kalij-jodid 2 g

Destilirana voda 300 ml

Usitnite zajedno koristeći tučak i avan. Dodajte vodi i promućkajte da se otopi u zatvorenoj posudi.

Rastvor safranina za protubojenje

Osnovna otopina:

Safranin O 2,5 g

95%-tni etanol 100 ml

Promiješajte i pohranite.

Razrijedite: 1:10 da bi dobili radnu otopinu.

Postupak bojenja

1. Pripremite razmaze, posušite na zraku i fiksirajte zagrijavanjem.
2. Prelijte stakalce rastvorom kristal violeta jednu minutu.
3. Kratko isperite tekućom vodom.
4. Prelijte rastvorom Lugola jednu minutu.
5. Isperite tekućom vodom i posušite filter-papirom.
6. Uklonite boju 95%-tnim etanolom, koji se dodaje kap po kap, dok se sva boja ne ukloni ili uronite razmaz na 30 sekundi i lagano tresite.
7. Isperite tekućom vodom i posušite filter-papirom.
8. Prelijte rastvorom safranina 10 sekundi.
9. Isperite tekućom vodom i posušite filter-papirom.

Gram pozitivne bakterije se oboje ljubičasto-plavo; Gram negativne bakterije se oboje ružičasto-crveno.

LITERATURA

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Commission of the European Communities, Luxembourg. Publ EUR 11288 EN, 21 str.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213-218.

3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147-152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
5. Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24-26.
6. 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.
7. Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull., No 17, 1987, str. 1-10.
8. Jansing, H. and K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Diseases and Protection, 105, 590-601.
9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.
10. Klement Z.; Rudolph, K and D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 str.
11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114-118.
12. Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. J. appl. Bact., 29, 470-489.
13. Lelliott, R. A. and P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 (2), 101-106.
14. Li, X. and S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Phytopathology, 85, 837-842.
15. Mills, D., Russell, B., W. and J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology, 87, 8, 853-861.
16. Pastrok, K.-H. and R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147; 687-693.
17. Pastrok, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 106, 155-165.
18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the *Corynebacteria*. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 str.
19. Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. and Knorr, D. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83; 1095-1100.

20. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. — 3. ed.; St. Paul, Minnesota:, 373 str.
21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
22. Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1 *Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. European Journal of Plant Pathology, 107 (7), 739-748.
23. Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481-527.
24. 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.
25. Wullings, B. A.; van Beuningen, A. R.; Janse, J. D. and A. D. L. Akkermans, 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4546–4554.