

1419

На основу члана 36, а у вези за чланом 43. Закона о заштити здравља биља у Републици Српској ("Службени гласник Републике Српске", број 25/09), и члана 76. став 2. Закона о републичкој управи ("Службени гласник Републике Српске", број 115/18), министар пољопривреде, шумарства и водопривреде доноси

ПРАВИЛНИК

**О МЈЕРАМА ЗА ОТКРИВАЊЕ, СПРЕЧАВАЊЕ
ШИРЕЊА И СУЗБИЈАЊЕ ШТЕТНОГ ОРГАНИЗМА
Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. spp. *sepedonicus*
(Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., ПРОУЗРОКОВАЧА
ПРСТЕНАСТЕ ТРУЛЕЖИ КРОМПИРА**

Члан 1.

Овим правилником прописују се мјере за откривање, спречавање ширења и сузбијање штетног организма *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. spp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., проузроковача прстенасте трулежи кртола кромпира, начин одређивања граница зараженог, угроженог и подручја без штетног организма, услови за окончање наложених мјера, као и начин обавјештавања о предузетим мјерама и престанак мјера.

Члан 2.

(1) Ради откривања штетног организма *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. spp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., проузроковача прстенасте трулежи кртола кромпира (у даљем тексту: штетни организам), спроводи се посебан надзор над штетним организмом који обухвата прегледе биљака и кртола кромпира (*Solanum tuberosum* L.) и прегледе регулисаних објеката.

(2) Број, поријекло, метод и вријеме узимања узорака приликом прегледа биљака и кртола кромпира и регулисаних објеката одређује се у зависности од специфичних система производње кромпира и биологије штетног организма.

Члан 3.

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

(2) При прегледу кртола кромпира узимају се узорци кртола сјеменског кромпира и осталог кромпира који није намијењен садњи (у даљем тексту: меркантилни кромпир), првенствено из лотова у складиштима и дистрибутивним центрима ради обављања визуелног прегледа сјечењем кртола, односно достављања лабораторији ради лабораторијског испитивања.

(3) Сјеменски кромпир мора да потиче директно од материјала произведеног у складу са званичним програмом контроле и за који је лабораторијским испитивањем утврђено да није заражен штетним организмом.

(4) Лабораторијско испитивање из ст. 1. и 2. овог члана спроводи се у складу са међународно прихваћеним процедурама, на начин описан у Шеми тестирања за дијагностику, детекцију и идентификацију проузроковача прстенасте трулежи кромпира, која је се налази у Прилогу овог правилника и чини његов саставни дио.

Члан 4.

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

(2) Да би се потврдила или отклонила сумња на појаву штетног организма, спроводи се лабораторијско испитивање на начин описан у Прилогу овог правилника.

(3) Приликом спровођења лабораторијских испитивања, на одговарајући начин, чувају се узорковане кртоле и,

када је то могуће, узорковане биљке, преостали екстракт и додатно припремљен материјал за брзе тестове провјере (screening test), нпр. стакалца за имунофлуоресценцију и сву релевантну документацију.

(4) У случајевима када је то потребно, сачувани узорак кртола омогућава и испитивање сортности.

(5) Када је лабораторијским испитивањем потврђено присуство штетног организма, најмање мјесец дана од дана потврђене заразе чува се, на одговарајући начин, узорак вјештачки заражених тест биљака плавог патлићана и изолована култура штетног организма.

Члан 5.

(1) У случају сумње на појаву штетног организма, предузимају се следеће мјере:

1) забрана премјештања свих лотова или пошиљака кромпира из којих су узети узорци,

2) додатне превентивне мјере ради спречавања ширења штетног организма, у зависности од процијењеног степена ризика.

(2) Додатне превентивне мјере из става 1. тачка 2) овог члана посебно укључују надзор над премјештањем свих осталих кртола или биљака повезаних са сумњивом појавом, унутар и ван објеката, ограничавање употребе могуће заражених машина и опреме.

Члан 6.

Ако држалац биља, биљних производа и регулисаних објеката или било која друга особа уочи симптоме заразе или посумња на појаву штетног организма, обавезан је да о томе одмах обавијести Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде (у даљем тексту: Министарство) и Републичку управу за инспекцијске послове (у даљем тексту: Инспекторат).

Члан 7.

Када се на основу резултата лабораторијског испитивања потврди присуство штетног организма, Министарство у сарадњи са Инспекторатом одређује границе зараженог, угроженог или подручја без штетног организма, тако што:

1) означава као заражене кртоле или биљке, пошиљке, односно лотове, машине, превозна средства, складишта или њихове дијелове и друге објекте и предмете, укључујући и материјал за паковање из којих је сваки од узорака узет, као и мјеста производње и парцеле са којих потичу биљке и кртоле,

2) одређује обим могуће заразе евидентирањем чињеница о свим контактима у производном процесу са извором заразе (прије и после вађења кртола) с циљем одређивања обима могуће заразе и ширења штетног организма,

3) разграничава заражено, угрожено и подручје без штетног организма на основу означене и потврђене заразе, обима могуће заразе, као и могућег ширења штетног организма.

Члан 8.

(1) Министарство у сарадњи са Инспекторатом, на основу података заснованих на научним принципима и биологији штетног организма, као и података о систему производње, маркетинга и прераде, утврђује обим могуће заразе на основу информација о могућем контакту кртола са утврђеном заразом прије и после њиховог вађења или током њихове производње, узимајући у обзир:

1) кртоле или биљке произведене на мјесту производње које је означено као заражено,

2) друга мјеста производње која су у било каквој вези са кртолама или биљкама које су означене као заражене, као и заједнички коришћена опрема и објекти,

3) кртоле или биљке које су произведене на мјестима производње из тачке 2) овог става или су се налазиле на тим мјестима истовремено са кртолама и биљкама које су означене као заражене,

4) простор и објекте у којима се обавља манипулација кромпира који потиче са мјеста производње из т. 1) до 3) овог става,

5) машине, превозна средства, складишта или њихове дијелове, као и друге објекте или предмете, укључујући и материјал за паковање, који су могли да дођу у додир са кртолама или биљкама које су означене као заражене,

6) кртоле или биљке које су биле ускладиштене или у додиру са неким од регулисаних објеката или са предметима из тачке 5) овог става прије њиховог чишћења и дезинфекције,

7) кртоле или биљке које се сматрају могуће зараженим због клонске повезаности са кртолама или биљкама које су означене као заражене, иако су резултати тестирања негативни, а када је потребно, спроводи се и тест сортности да би се провјерио идентитет заражених и клонски сродних кртола или биљака кромпира,

8) мјесто производње кртола или биљака из тачке 7) овог става.

(2) Одређивање могућег ширења штетног организма врши се на основу близине других мјеста производње кромпира и других биљака домаћина, као и заједничке производње и употребе залиха сјеменског кромпира.

Члан 9.

(1) Партије кромпира које су клонски сродне са кртолама или биљкама које су означене као заражене подлијежу обавезном лабораторијском испитивању на начин описан у Прилогу овог правилника.

(2) Након добијања резултата лабораторијског тестирања из става 1. овог члана, Министарство у сарадњи са Инспекторатом спроводи даље утврђивање обима потврђене заразе и обима могуће заразе, те посебно регулисаног подручја.

(3) Министарство у сарадњи са Инспекторатом објелажива посебно регулисано подручје.

Члан 10.

(1) Кртоле или биљке које су означене као заражене се уништавају, односно спаљују или на други начин одлажу на мјесту за одлагање отпада на коме не постоји ризик од ширења штетног организма.

(2) Ако је утврђено да не постоји ризик од ширења штетног организма, кртоле или биљке које су означене као заражене могу се употребљавати на следећи начин:

1) као храна за животиње послје термичке обраде на начин који не оставља никакву могућност преживљавања штетног организма,

2) индустријски прерађивати, под условом да се директно допреме до мјеста прераде на коме постоји опрема за одлагање отпада чијим коришћењем је отклоњена опасност од ширења штетног организма и које има систем за чишћење и дезинфекцију превозних средстава која напуштају мјесто прераде,

3) подвргавати и другим мјерама под условом да нема опасности од ширења штетног организма.

Члан 11.

Кртоле или биљке које се сматрају могуће зараженим штетним организмом и кртоле или биљке кромпира које су клонски повезане са онима које су означене као заражене, без обзира на резултате тестирања, не смију се користити за садњу, већ се могу:

1) употребити као меркантилни кромпир намијењен исхрани, при чему кромпир мора да буде пакован на мјестима која располажу одговарајућом опремом за одлагање отпада и који је пакован за директну испоруку без препакивања, а са сјеменским кромпиром дозвољено је руковати на тим истим мјестима само ако се ради одвојено или након чишћења и дезинфекције, или

2) употребити као меркантилни кромпир намијењен индустријској преради, уз директну и брзу испоруку до

погона за прераду, који мора да располаже одговарајућом опремом за одлагање отпада и системом за чишћење и дезинфекцију превозних средстава која напуштају мјесто прераде, или

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

Члан 12.

(1) Отпад који је настао као резултат спровођења мјера из чл. 10. и 11. овог правилника и отпад који настаје током руковања, одстрањивања и прераде заражених партија кромпира одлаже се на начин да се избјегне свака опасност од ширења штетног организма, и то:

1) отпаци кромпира (укључујући одбачени кромпир и кору) и сви други чврсти отпаци који су у вези с кромпиром (укључујући земљу, камење и друге остатке) уклањају се на следећи начин:

1. одлагањем на за то службено одобреном мјесту на којем не постоји опасност од неконтролисаног ширења штетног организма у околину, нпр. испирањем кроз поре земље до пољопривредног земљишта, на начин да се отпаци превозе директно до одређеног мјеста у затвореном превозном средству тако да не постоји опасност од губитка отпада,

2. спаљивањем,

3. примјеном неке друге мјере за које је утврђено да не постоји опасност од ширења штетног организма;

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

(2) Течни дио отпада неопходно је загријати на температури од најмање 60 °C у трајању најмање 30 минута или одстранити под службеним надзором на начин који онемогућава да отпаци дођу на било који начин у додир са пољопривредним земљиштем или изворима воде која може бити коришћена за наводњавање пољопривредног земљишта.

Члан 13.

(1) Маchine, превозна средства, складишта и њихови дијелови и други објекти и предмети, укључујући и материјал за паковање, који су означени као заражени или се сматрају зараженима, чисте се и дезинфикују примјеном одговарајућих метода за чишћење и дезинфекцију којима се отклања опасност од ширења штетног организма.

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

Члан 14.

(1) На пољу које је означено као заражено спроводе се следеће мјере:

1) за вријеме од најмање три вегетационе године послје године у којој је утврђена зараза није дозвољена садња кртола и биљака, као ни сјетва сјемена кромпира у ботаничком смислу и других биљака домаћина штетног организма или усјева за које је утврђено да омогућују ширење штетног организма и обавезно се уклањају самоникле биљке кромпира и других биљака домаћина штетног организма,

2) током четири вегетационе године послје године у којој је утврђена зараза спроводе се мјере одржавања поља на угару или коришћење поља као трајног пашњака са интензивном испашом или честом ниском косидбом и уклањање самониклих биљака кромпира и других самониклих биљака домаћина штетног организма.

(2) У првој сезони производње кромпира која сlijеди послје периода из става 1. тачка 1) овог члана, под условом да на пољу најмање двије последње вегетационе године током спровођења прегледа нису пронађене самоникле биљке кромпира и друге биљке домаћини, дозвољава се

производња искључиво меркантилног кромпира и спровође се лабораторијско испитивање кртола приликом вађења.

(3) У сезони производње кромпира која слиједи послје сезоне из става 2. овог члана дозвољава се, уз одговарајући плодоред, који мора бити најмање двогодишњи за производњу сјеменског кромпира, производња сјеменског или меркантилног кромпира, уз спровођење прегледа.

(4) Послије спровођења мјера из става 1. тачка 2) овог члана, у сљедећој вегетационој години дозволиће се производња сјеменског или меркантилног кромпира, уз лабораторијско испитивање извађених кртола, ако на пољу које је означено као заражено у току спровођења прегледа нису пронађене самоникле биљке кромпира и друге биљке домаћини најмање двије узастопне вегетационе године.

Члан 15.

(1) На осталим пољима унутар мјеста производње које је означено као заражено у вегетационој години која слиједи послје године у којој је утврђена зараза није дозвољена садња кртола и биљака кромпира, као ни сјетва сјемена кромпира у ботаничком смислу и налаже се уклањање самониклих биљака домаћина штетног организма.

(2) Изузетно од става 1. овог члана, ако је прије садње утврђено да је отклоњена опасност од самониклих биљака кромпира, може се дозволити садња сертификованог сјеменског кромпира намијењеног искључиво производњи меркантилног кромпира, уз обавезно лабораторијско испитивање извађених кртола.

(3) У другој и трећој вегетационој години које слиједе послје године у којој је зараза утврђена, послје спровођења мјера из ст. 1. и 2. овог члана, дозволиће се садња искључиво сертификованог сјеменског кромпира за сјеменску или меркантилну производњу.

(4) Поред мјера из ст. 1, 2. и 3. овог члана, најмање три вегетационе године спроводи се уклањање самониклих биљака кромпира и других биљака домаћина штетног организма ако су присутне, као и лабораторијско испитивање извађеног кромпира са сваког поља.

Члан 16.

(1) У заштићеним просторима на мјесту производње које је означено као заражено и који су намијењени производњи биља није дозвољена садња кртола и биљака кромпира, као ни сјетва сјемена кромпира у ботаничком смислу све док се не спроведу мјере уништавања штетног организма и не уклоне остаци биљака домаћина, при чему се као минимална мјера спроводи замјена супстрата за гајење, чишћење и дезинфекција производне јединице и цјелокупне опреме.

(2) Послије спровођења мјера из става 1. овог члана дозвољава се садња искључиво сертификованог сјеменског кромпира или мини-кртола или микробиљака добијених из културе биљног ткива које потиче из тестираних извора.

Члан 17.

Ради праћења здравственог стања биља, биљних производа и регулисаних објеката у зараженом или угроженом подручју и утврђивања услова за престанак наложених мјера, поред спровођења мјера из чл. 10. до 16. овог правилника, у току најмање три вегетационе године које слиједе послје године у којој је зараза утврђена врши се:

1) надзор мјеста на којима се производе, складиште, налазе или дорађују кртоле кромпира, укључујући и парцеле, површине, уређаје и опрему,

2) садња искључиво сертификованог сјеменског кромпира унутар зараженог или угроженог подручја и обавезно испитивање послје вађења сјеменског кромпира који је произведен на могуће зараженим мјестима производње,

3) на свим производним површинама унутар зараженог и угроженог подручја са произведеним сјеменским кромпиром поступа се одвојено од меркантилног кромпира или се врши чишћење и дезинфекција објеката, уређаја и опреме између поступања са сјеменским и меркантилним кромпиром.

Члан 18.

(1) Подаци и информације о потврђеној зарази, као и подаци и информације о престанку мјера, достављају се надлежним органима у складу са међународним конвенцијама и споразумима.

(2) Министарство води евиденцију која укључује документоване доказе о обиму потврђене заразе, обиму могуће заразе и о подручју могућег ширења, са сљедећим информацијама:

1) датум када је зараза потврђена,

2) опис елемената који су довели до одлуке да се прогласи зараза и подручје могућег ширења штетног организма, укључујући и податке о узимању узорака и о лабораторијском налазу,

3) за било коју количину или пошиљку кромпира означену као заражену, податке о фитосанитарном сертификату, увјерењу о здравственом стању у случају домаће производње кромпира и, када је могуће, податке о биљном пасошу, регистарском броју произвођача, збирним складиштима и диспечерским центрима,

4) информације о идентификованим или могућим изворима заразе,

5) појединости о обиму означене заразе, укључујући број мјеста производње и број партија са називом сорте, а када се ради о сјеменском кромпиру, и о његовој категорији,

6) појединости о посебно регулисаном подручју, укључујући мјеста производње која нису означена као заражена, али су укључена у посебно регулисано подручје.

Члан 19.

Овај правилник ступа на снагу осмог дана од дана објављивања у "Службеном гласнику Републике Српске".

Број: 12.03.3-330-1904/20

29. јуна 2020. године

Бањалука

Министар,
Др Борис Пашалић, с.р.

ПРИЛОГ

ШЕМА ТЕСТИРАЊА ЗА ДИЈАГНОСТИКУ, ДЕТЕКЦИЈУ И ИДЕНТИФИКАЦИЈУ ПРОУЗРОКОВАЧА ПРСТЕНАСТЕ ТРУЛЕЖИ КРОМПИРА

Поглавље I

ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ ШЕМЕ ТЕСТИРАЊА

Приказана шема тестирања описује различите поступке укључене у:

1) дијагнозу прстенасте трулежи на кртолама и биљкама кромпира,

2) детекцију *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* у узорцима кртола кромпира и биљкама,

3) идентификацију *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (C. m. subsp. *sepedonicus*).

Поглавље II

ОПШТА НАЧЕЛА

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

С обзиром на то да протоколи укључују методе детекције карантинског организма, што подразумијева и употребу живих референтних култура C.m. subsp. *sepedonicus*, процедура се мора изводити у прописаним карантинским условима са одговарајућим објектима за одлагање, чување и уништавање отпада у складу са Правилником.

Параметри тестирања морају обезбиједити уједначене и поновљиве нивое детекције C. m. subsp. *sepedonicus* према прописаним праговима осјетљивости појединих метода.

Обавезна је прецизна припрема позитивних контрола.

Тестирање у складу са захтијеваним прагом осјетљивости подразумијева правилно постављање, одржавање и калибрисање опреме, пажљиво руковање и чување реагенаса, као и предузимање мјера за спречавање контаминације између узорака, нпр. ра-

здвајање позитивних контрола од узорка за тестирање. Да би се избегле административне или друге грешке, морају се примјењивати стандарди контроле квалитета, посебно при означавању узорака и вођењу документације.

Сумња на присуство патогена у узорку подразумева позитиван резултат теста провјере узорака, као што је приказано у дијаграму тока.

Ако је резултат првог теста провјере (IF или PCR/FISH) позитиван, тада се сумња на присуство *C. m. subsp. sepedonicus* и потребно је примјенити и други тест провјере. Ако је резултат и другог теста позитиван, тада је сумња потврђена и тестирање се наставља према описаној шеми. Ако је резултат другог теста негативан, тада се сматра да *C. m. subsp. sepedonicus* није присутан у узорку.

Позитиван резултат IF теста дефинише се као позитивно читање IF теста потврђено и другим тестом провјере (PCR/FISH).

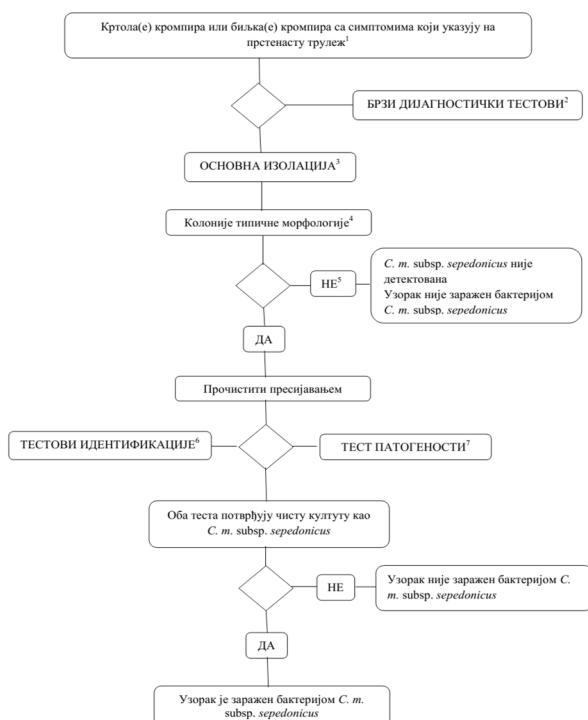
Потврђено присуство патогена подразумева изолацију и идентификацију чисте културе *C. m. subsp. sepedonicus* и потврду патогености.

1. Приказ дијаграма тока

1.1. Шема утврђивања присуства проузроковача прстенасте трулежи у кртолама и биљкама кромпира са типичним симптомима прстенасте трулежи (Шема 1)

Поступак тестирања се примјењује за кртоле и биљке кромпира са типичним симптомима или симптомима који изазивају сумњу на присуство проузроковача прстенасте трулежи. Поступак укључује тест провјере, изолацију патогена из зараженог спроводног ткива на хранљиву подлогу и, у случају позитивног резултата, идентификацију чисте културе *C. m. subsp. sepedonicus*.

Шема 1.



1) Опис симптома наведен је у тачки 2. овог поглавља.

2) Одговарајући тестови су:

- IF тест (тачка 4. овог поглавља),
- PCR тест (тачка 6. овог поглавља),
- FISH тест (тачка 5. овог поглавља).

3) Иако је изолација патогена из биљног материјала са типичним симптомима примјеном методе разрјеђења и засијавања на хранљиву подлогу једноставна, овај поступак може бити значајно отежан у узорцима у подмаклој фази инфекције. Сапрофитне бактерије које се развијају на обољелом ткиву могу прерасти или инхибирати патогена на хранљивој подлози. Зато се препоручује коришћење и неселективне и селективне хранљиве подлоге (најбоље MTNA) или примјена биолошког теста из тачке 7. овог поглавља.

4) Опис типичне морфологије колоније наведен је у тачки 8. овог поглавља.

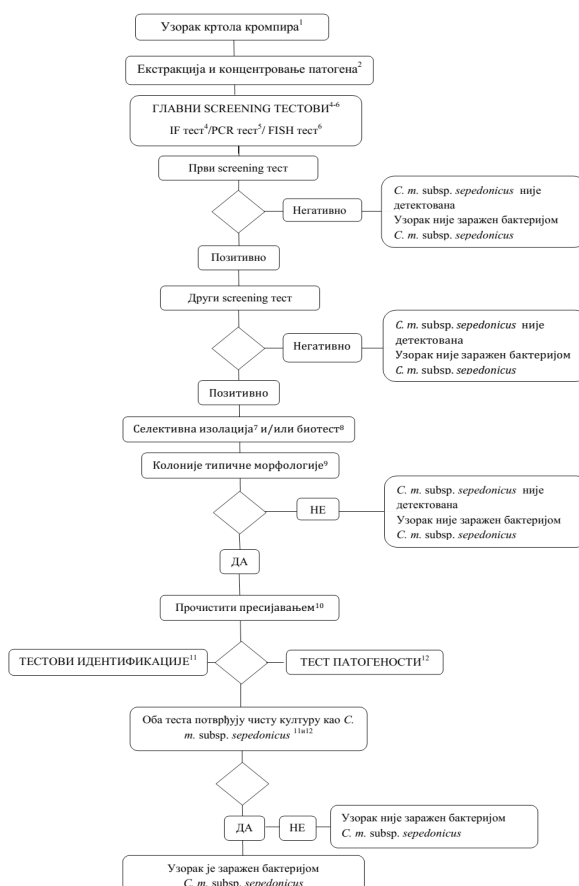
5) Ако је резултат изолације негативан, а симптоми болести типични, тада је потребно поновити поступак изолације патогена.

6) Поуздана идентификација чисте културе *C. m. subsp. sepedonicus* постиже се примјеном тестова наведених у тачки 9. овог поглавља.

7) Тест патогености описан је у тачки 10. овог поглавља.

1.2. Шема за утврђивање присуства и идентификацију *C. m. subsp. sepedonicus* у узорцима кртола кромпира без видљивих симптома (Шема 2)

Шема 2.



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

2) Методе екстракције и концентровања патогена описане су у тачки 3. овог поглавља.

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

4) Тест имунофлуоресценције (IF) - користити поликлонална антијела за IF тест, а додатна моноклонална антијела омогућавају већу специфичност (тачка 4. овог поглавља).

5) PCR тест - користити потврђене и одобрене реагенсе и протоколе за PCR (тачка 6. овог поглавља).

6) FISH тест - користити потврђене реагенсе и протоколе (тачка 5. овог поглавља).

7) Селективна изолација: У многим случајевима коришћење MTNA или NCP-88 хранљивих подлога и 1/100 разрјеђења ресуспендованог талога је одговарајућа метода за директну изолацију *C. m. subsp. sepedonicus*. Типичне колоније се појављују три до десет дана после засијавања на хранљиву подлогу, када их је могуће пречистити и идентификовати патогена. Пажљивим вађењем и припремом конуса пулчаног дијела кртоле кромпира избјегава се

појава сапрофитних бактерија са кртола кромпира, које на хранљивој подлози конкуришу колонији *C. m. subsp. sepedonicus* и могу је прерастати. Ако се патоген не може изоловати на хранљивој подлози, потребно је поновити поступак изолације коришћењем биљака из биолошког теста (тачка 8. овог поглавља).

8) Биолошки тест се користи за изолацију *C. m. subsp. sepedonicus* из екстракта селективним обогаћивањем у биљкама плавог патлиџана (*Solanum melongena*). Тест захтијева оптималне услове инкубације као што је наведено у овој методи. Током примјене овог теста, највјероватније је да неће доћи до појаве бактерија које инхибирају раст и развој *C. m. subsp. sepedonicus* на хранљивим подлогама MTNA или NCP-88 (тачка 7. овог поглавља).

9) Типична морфологија колоније описана је у тачки 8. овог поглавља.

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

11) Поуздана идентификација чистих култура *C. m. subsp. sepedonicus* постиже се извођењем тестова описаних у тачки 9. овог поглавља.

12) Тест патогености описан је у тачки 10. овог поглавља.

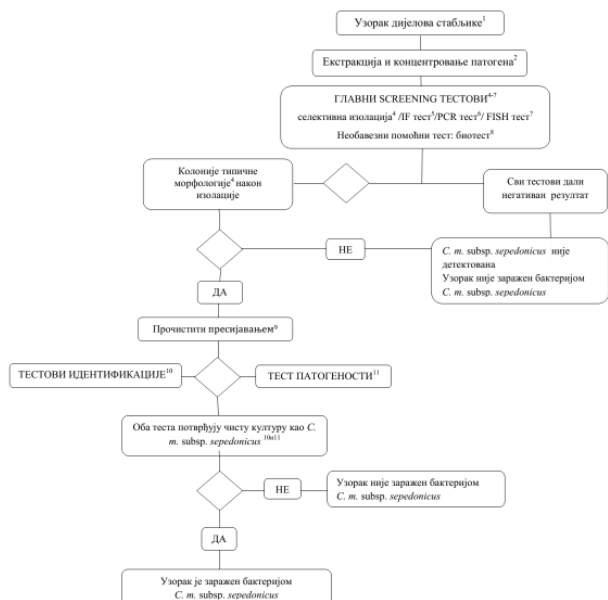
Начело - Поступак тестирања намијењен је за откривање присуства скривене заразе у кртолама кромпира.

Позитиван резултат најмање два теста провере, заснован на различитим биолошким начелима, допуњује се изолацијом патогена, последице чега, у случају изолације типичних колонија, слиједи потврда чисте културе *C. m. subsp. sepedonicus*. Позитиван резултат само једног од тестова провере није довољан да би се узорак сматрао вјероватно зараженим.

Тестови провере и изолација морају омогућити ниво осјетљивости детекције 10^3 до 10^4 ћелија/ml ресуспендованог талога, укљученог као позитивна контрола у свакој серији тестова.

1.3. Шема за утврђивање присуства и идентификацију *C. m. subsp. sepedonicus* у узорцима биљака кромпира без симптома (Шема 3)

Шема 3.



1) Препоручене величине узорка наведене су у тачки 3. подтачка 3.2. овог поглавља.

2) Екстракција патогена и методе концентровања описане су у тачки 3. подтачка 3.2. овог поглавља.

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

резултат. Ако су резултати осталих тестова негативни, сматра се да је тај узорак негативан. Даље тестирање није потребно.

4) Селективна изолација и типична морфологија колоније описани су у тачки 8. овог поглавља.

5) IF тест описан је у тачки 4. овог поглавља.

6) PCR тестови описани су у тачки 6. овог поглавља.

7) FISH тест описан је у тачки 5. овог поглавља.

8) Биолошки тест описан је у тачки 7. овог поглавља.

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

10) Поуздана идентификација чистих култура *C. m. subsp. sepedonicus* постиже се извођењем тестова описаних у тачки 9. овог поглавља.

11) Тест патогености описан је у тачки 10. овог поглавља.

2. Визуелни преглед за откривање симптома прстенасте трулежи

2.1. Биљке кромпира

У европским климатским условима симптоми се ријетко проналазе у пољу, и то често тек на крају сезоне. Осим тога, симптоми су често прикривени или се могу замијенити са симптомима других биљних болести, старења биљака или механичким оштећењима. Зато се симптоми могу врло лако превидјети приликом прегледа у пољу. Симптоми увенућа разликују се од оних код проузроковача мрке трулежи; увенуће је обично споро и у почетку ограничено на ивице листова. Млади заражени листови често настављају раст, мада у зараженим дијеловима спорије, што доводи до формирања листова необичног облика. Због блокаде спроводног ткива у доњем дијелу стабљике, на листовима се између лисних нерава често појављују хлоротичне, жуто-наранџасте површине. Временом пропадају заражени дијелови листа, листови, па чак и стабљике. Често долази само до смањења величине листова и кртола. Повремено су биљке закржљале.

2.2. Кртоле кромпира

У најранијој фази појаве симптома ткиво кртоле је стакласто или прозирно, без омекшавања око спроводног ткива, посебно у близини пупчаног дијела кртоле. У пупчаном дијелу кртоле, прстен спроводног система може бити мало тамнији од уобичајеног. Први лако уочљив симптом је жућкаста боја спроводног прстена, а када се кртола благо стисне, из спроводних судова излазе мале количине материје сирасте конзистенције, која садржи милионе бактерија. Могућ је развој појаве браон (смеђе, мрке) боје спроводног ткива и симптоми на кртоли су у овом стадијуму слични симптомима мрке трулежи коју проузрокује *Ralstonia solanacearum*. У почетку, симптоми су ограничени на један дио спроводног прстена, не обавезно близу пупка, а касније се постепено проширују на цијели прстен. Како инфекција напредује, долази до потпуног пропадања спроводног ткива; спољни и унутрашњи дио кртоле могу се раздвојити. У каснијим фазама инфекције на површини кртола појављују се пукотине, које су често црвенкастосмеђе боје по ивицама. Недавно је у Европи забиљежено неколико случајева појаве симптома гдје је средиште кртоле трунуло истовремено са спроводним прстеном, што је довело до секундарног напада патогена са стварањем унутрашњих шупљина и некроза. Присуство секундарних гљива или бактерија може прикрити симптоме, услед чега може бити тешко, чак и немогуће, разликити узнапредовале симптоме прстенасте трулежи од других трулежи кртола. Могућа је појава и нетипичних симптома прстенасте трулежи.

3. Припрема узорка

3.1. Кртоле кромпира

Напомена

1. стандардна величина узорка је 200 кртола по тесту. Интензивније узорковање захтијева извођење већег броја тестова на узорцима те величине. Већи број кртола у узорку довешће до инхибиције или ће отежати тумачење резултата. Када је на располагању мање кртола, поступак се може примијенити и за узорке са мање од 200 кртола;

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

3. екстракт кромпира који је описан у даљем тексту може се користити и за утврђивање присуства проузроковача мрке трулежи кромпира бактерије *Ralstonia solanacearum*.

Процедура која претходи припреми узорка: опрати кртоле, употријебити одговарајућа дезинфекциона средства (при ко-

ришћењу PCR теста употребити једињења хлора ради уклањања евентуално присутног ДНК патогена) и детергенте између сваког узорка, те осушити кртоле на ваздуху.

Поступак прања је посебно користан, али не и обавезан за случајеве обраде узорака са већом количином земље при извођењу PCR теста или процедуре директне изолације.

3.1.1. Чистим и дезинфикованим скалпелом или ножем за поврхе уклонити покожицу са пупчаног дијела кртоле тако да се виде спроводни судови. Пажљиво изрезати мали конусни дио спроводног ткива на пупчаном дијелу, захватајући што мање околног, неспроводног ткива.

Напомена

- све кртоле са потенцијално сумњивим симптомима прстенасте трулежи одвојити посебно и тестирати;

- ако се приликом вађења конуса из пупчаног дијела уоче потенцијални симптоми прстенасте трулежи, кртоле треба визуелно прегледати. Сваку пресећену кртолу са оваквим симптомима треба оставити два дана на собној температури, а потом чувати у карантинским условима (на 4 °C до 10 °C) до спровођења тестирања. Све кртоле у узорку (укључујући и оне са сумњивим симптомима) треба чувати на начин прописан овим правилником.

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

3.1.3. Извађене конусе из пупчаног дијела кртоле обрадити коришћењем једног од следећих поступака:

а) извађене конусе прекрити довољном количином (око 40 ml) екстракционог пуфера (Поглавље V овог прилога) и центрифугирати на 50 до 100 обртаја/мин. четири часа на температури испод 24 °C или од 16 до 24 часа уз хлађење;

б) извађене конусе хомогенизовати са довољном количином (око 40 ml) екстракционог пуфера (Поглавље V овог прилога), било у мјешалици (нпр. Waring или Ultra Thux) било дробљењем у затвореној кеси за мацерацију за једнократну употребу (нпр. кесе Stomacher или Bioreba од чврстог политена, 150 mm × 250 mm, стерилизоване зрачењем), користећи гумени чекић или одговарајући апарат за мацерирање (нпр. Nomex).

Напомена

Ако се узорци хомогенизују у блендеру, постоји велика опасност од њихове унакрсне контаминације. Предузети мјере опреза с циљем спречавања настајања аеросола или просипања током екстракције. За сваки узорак употребити стерилизоване ножиће и посуде. Током процедуре PCR, спријечити пренос ДНК на контејнере или апаратуру за мацерирање. За PCR тест препоручује се мацерирање узорака у кесицама за једнократну употребу и даље коришћење епрувета и туба за једнократну употребу.

3.1.4. Одлити супернатант. Ако је превише мутан, разбистрити га ултрацентрифугирањем на мањем броју обртаја (највише 180 g, 10 минута на температури од 4 °C до 10 °C) или вакуумском филтрацијом (40 µm до 100 µm), током које се филтер додатно испира екстракционим пуфером (око 10 ml) - (Поглавље V овог прилога).

3.1.5. Извршити концентрисање фракције бактерије центрифугирањем на 7.000 g 15 минута (или 10.000 g 10 минута) на температури од 4 °C до 10 °C, после чега се пажљиво, без мијешања са талогом, одлива супернатант.

3.1.6. Ресуспендовање талог у 1,5 ml пелет пуфера (пуфера за раставање талог), (Поглавље V овог прилога). Од ове количине користити 500 µl за тестирање на присуство *C. m. subsp. sepedonicus*, 500 µl за тестирање на присуство *Ralstonia solanacearum* и 500 µl као референтни материјал за чување. У посљедњи, референтни дио од 500 µl додати стерилни глицерол у коначној концентрацији од 10% до 25% (v/v), промијешати и чувати на температури од -16 °C до -24 °C (недјељама) или на температури од -68 °C до -86 °C (мјесецима). Дијелове одвојене за утврђивање присуства бактерије током тестирања чувати на температури од 4 °C до 10 °C. Не препоручује се вишеструко замрзавање и одмрзавање. У случају потребе за транспортом узорака, узорке доставити у преносивом фрижидеру у року од 24 до 48 часова.

3.1.7. Важно је да се све позитивне контроле *C. m. subsp. sepedonicus* и узорци држе одвојено да би се избјегла контаминација. Ово се односи и на IF плочице и друге тестове.

3.2. Биљке кромпира

Напомена

За откривање латентних популација *C. m. subsp. sepedonicus* препоручује се тестирање збирних узорака. Поступак се може погодни примјенити на збирне узорке са највише 200 дијелова стабљике (узимање узорака током спровођења надзора се мора заснивати на статистички репрезентативном узорку испитиване биљне популације).

3.2.1. Чистим дезинфикованим ножем или маказама за резидбу одрезати 1 cm до 2 cm доњег дијела сваке стабљике, одмах изнад површине земљишта. Дијелове стабљике дезинфиковати кратким потапањем у 70% етанола и одмах осушити упијајућим папиром. Ставити дијелове стабљике у затворену стерилну посуду.

3.2.2. Обрадити дијелове стабљике помоћу једног од следећих поступака:

а) дијелове стабљике прекрити довољном количином (приближно 40 ml) екстракционог пуфера (Поглавље V овог прилога) и ултрацентрифугирати на 50 до 100 обрт/мин четири часа на температури испод 24 °C или 16 до 24 часа уз хлађење;

б) дијелове стабљике измацерирати у чврстој кеси за мацерацију (нпр. Stomacher или Bioreba) са одговарајућом количином екстракционог пуфера (Поглавље V овог прилога), користећи гумени чекић или одговарајућу опрему за мацерирање (нпр. Nomex). Ако то није могуће, дијелове стабљике чувати у фрижидеру најдуже 72 часа или на собној температури најдуже 24 часа.

3.2.3. Након 15 минута таложења, одлити супернатант.

3.2.4. Даље избистравање екстракта или концентровање фракције бактерија обично није потребно, али се може постићи филтрирањем и/или центрифугирањем.

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

4. IF тест

Начело: Употреба IF теста као главног теста провјере препоручује се због његове доказане уједначености у постизању захтијевањих прагова осјетљивости методе.

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

Напомена

Када се IF тест користи као главни тест провјере, увијек користити поликлонална антиијела. У случају позитивног IF читавања с поликлоналним антиијелима, даља провјера употребом моноклоналних антиијела може повећати специфичност, али и умањити осјетљивост теста.

Употребити антиијела за референтни сој *C. m. subsp. sepedonicus*. Препоручује се одређивање титра за сваку нову серију антиијела. Титар се дефинише као највеће раздржење у коме долази до оптималне реакције при тестирању суспензије која садржи 10⁸ до 10⁶ ћелија по ml одговарајућег соја *C. m. subsp. sepedonicus* уз коришћења флуоресценцијно-изотопијанат (FITC) конјугата у складу с препорукама произвођача. Неразријеђена поликлонална и моноклонална антиијела треба да имају IF титар најмање 1 : 2.000. Током тестирања користити радна раздржења антиијела, која су близу или једнака титру. Користити потврђена и одобрена антиијела.

Тестирање треба извршити на свјеже припремљеним екстрактима узорака, а по потреби, тестирање се може успјешно извршити и на екстрактима који су били чувани на температури од -68 °C до -86 °C са додатком глицерола. Глицерол уклонити додавањем 1 ml пелет пуфера (пуфера за раставање талог), поновним центрифугирањем на 7.000 g у трајању од 15 минута и ресуспендовањем талог у једнакој запремини пелет пуфера. Овај дио процедуре често није потребан, нарочито ако су узорци фиксирани на микроскопска IF стакла пламеном.

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

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

Негативну контролу могу представљати и дијелови екстракта узорака који су у ранијем тестирању показали негативан резултат.

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

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

4.1. Припремити IF плочице за тестирање једним од сљедећих поступака:

а) за талог са релативно малом количином наталоженог скроба: у први бунарчић пипетом одмјерити стандардну запремину разријеђења од 1/100 ресуспендованог талог кромпира (15 µl је довољно за бунарчиће пречника 6 mm - повећати запремину за веће бунарчиће). Потом, у остале бунарчиће у истом реду пипетом одмјерити сличну запремину неразријеђене суспензије (1/1) талог. Други ред може се користити као дупликат првог или за други узорак као што је приказано на Шеми 4;

б) за остале суспензије талог: припремити децимална разријеђења (1/10 и 1/100) ресуспендованог талог у пуферу за талог. У један ред бунарчића пипетом одмјерити стандардну запремину ресуспендованог талог и сваког разријеђења (15 µl је довољно за бунарчиће пречника 6 mm - повећати запремину за веће). Други ред може се користити као дупликат првог или за други узорак као што је приказано на Шеми 5.

4.2. Оставити да се капљице осуше на собној температури или их загријати до температуре од 40 °C до 45 °C. Ћелије бактерија фиксирати на IF плочицу загријавањем (15 минута на 60 °C), провлачењем кроз пламен, 95% етанолом или према посебним упутствима произвођача антиитијела.

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

Припрема плочица у складу са т. 4.1. а) и 4.3. а)

Разријеђење ресуспендованог талог

1/100 1/1 1/1 1/1 1/1 □ разријеђење ресуспендованог талог

(Т - титар) T2 T4 T2 T 2T □ двоструко разријеђење серума/антиитијела

Узорак 1	●	●	●	●	●
Дупликат узорка 1 или узорак 2	●	●	●	●	●
	1	2	3	4	5
	6	7	8	9	10

Шема 4.

4.3. IF поступак:

а) у складу са поступком за припрему плочица за тестирање, како је описано у 4.1. а), припремити двоструки низ разријеђења антиитијела у IF пуферу. Први бунарчић мора имати 1/2 титра (T/2), а остали 1/4 титра (T/4), 1/2 титра (T/2), титар (T) и двоструки титар (2T);

б) у складу с поступком за припрему плочица за тестирање, како је описано у 4.1. б), припремити радно разријеђење антиитијела у IF пуферу. Радно разријеђење утиче на специфичност.

Припрема плочица у складу са т. 4.1. б) и 4.3. б)

Радна разријеђења серума/антиитијела

1/1 1/10 1/100 празно празно □ децимална разријеђења ресуспендованог талог

Узорак 1	●	●	●	●	●
Дупликат узорка 1 или узорак 2	●	●	●	●	●
	1	2	3	4	5
	6	7	8	9	10

Шема 5.

4.3.1. Поређати плочице на навлажени папир. Сваки бунарчић потпуно испунити разријеђењем антиитијела. Запремина антиитијела мора бити једнака запремини нанесеног екстракта.

Уколико не постоје посебна упутства произвођача антиитијела, потребно је сlijедити сљедећу процедуру.

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

Капљице са сваке плочице отрести и плочице пажљиво испрати IF пуфером. Потопити плочице у IF пуфер Tween (Поглавље V овог прилога) па у IF пуфер, у трајању од по пет минута. Спријечити стварање аеросола или пренос капљица, јер би могло доћи до унакрсне контаминације узорака. Плочице пажљиво осушити упијајућим папиром.

4.3.3. Поређати плочице на навлажени упијајући папир. Бунарчиће попуњити разријеђеним FITC конјугатом који се користи

за одређивање титра. Запремина конјугата нанесеног на бунарчић мора бити једнака запремини нанесеног антиитијела.

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

4.3.5. Отрести капљице конјугата са плочица. Испрати и опрати плочице како је претходно описано (4.3.3). Плочице пажљиво осушити.

4.3.6. На сваки бунарчић пипетом нанијети од 5 µl до 10 µl 0,1 M глицерола са фосфатним пуфером (Поглавље V овог прилога) или комерцијално доступно средство против избљеживања и ставити покривно стакло.

4.4. Очитавање IF теста

4.4.1. Прегледати припремљене плочице под епифлуоресцентним микроскопом са одговарајућим филтерима за ексцитацију FITC, под улном или воденом имерзијом и увећањем од 500 до 1.000 пута.

Прегледати сваки бунарчић уздуж и попрјекко, под правим углом и дуж спољне ивице. За узорке у којима је видљив мали број ћелија или их уопште нема прегледати најмање 40 микроскопских видних поља.

Прво треба прегледати плочицу с позитивном контролом.

Ћелије морају бити изразито флуоресцентне и потпуно обојене на утврђеном титру антиитијела или радног разријеђења. У случају да код обојености дође до одступања, IF тест се мора поновити.

4.4.2. Утврдити да ли јасно флуоресцентне ћелије које се уочавају у бунарчићима имају морфологију карактеристичну за *C. m. subsp. sepeponicus*.

Интензитет флуоресценције мора бити једнак или бољи од оног који даје позитивни контролни изолат при једнаком разријеђењу антиитијела. Занемарити непотпуно обојене или слабо флуоресцентне ћелије.

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

4.4.3. Постоји неколико проблема у вези са специфичношћу теста имунофлуоресценције. У концентрованом екстракту из двојених конуса пупчаних дијелова кртоле или дијелова стабљике увијек се очекује и присуство популација флуоресцентних ћелија са нетипичном морфологијом или унакрсна реакција са сапрофитним бактеријама сличне величине и грађе као *C. m. subsp. sepeponicus*.

4.4.4. Приликом очитавања у обзир се узимају само флуоресцентне ћелије типичне величине и морфологије у титру или радном разријеђењу антиитијела како је описано у тачки 4. подтачка 4.3. овог поглавља.

4.4.5. Тумачење очитавања IF теста:

а) уколико се утврди присуство јасно флуоресцентних ћелија карактеристичне морфологије, одредити просјечан број типичних ћелија по микроскопском видном пољу и израчунати број типичних ћелија по ml ресуспендованог талог (Поглавље VI овог прилога); Очитавање IF теста је позитивно за узорке који имају најмање $5 \cdot 10^3$ типичних ћелија по ml ресуспендованог талог. Овакав узорак сматра се потенцијално контаминираним и потребно је извршити даље тестирање;

б) очитавање IF теста је негативно за узорке који имају мање од $5 \cdot 10^3$ ћелија по ml ресуспендованог талог и узорак се сматра негативним. Није потребно даље тестирање.

5. FISH тест

Начело: Уколико се у FISH тесту као првом тесту провере добије позитиван резултат, IF тест се користи као други обавезни тест провере. Ако се FISH тест користи као други тест провере и ако се њиме добије позитиван резултат, за постављање коначне дијагнозе треба обавити даље тестирање према дијаграму тока.

Напомена

Користити потврђене и одобрене олиго-пробе специфичне за бактерију *C. m. subsp. sepeponicus* (Поглавље IX овог прилога). Прелиминарна тестирања примјеном ове методе треба да омогуће поновљиву детекцију најмање 10^3 до 10^4 ћелија *C. m. subsp. sepeponicus* по ml додатих екстракту узорка претходно доказаног као негативног.

Поступак треба извршити на свјеже припремљеним екстрактима узорака, али се успјешно може примјенити и на екстракт узорка који је био чуван са глицеролом на температури од -16 °C до -24 °C или од -68 °C до -86 °C.

За негативну контролу употребити дијелове екстракта узорака који су у ранијем тестирању на *C. m. subsp. sepeponicus* доказани као негативни.

За позитивну контролу припремити суспензије које садрже 10^5 до 10^6 ћелија/ml 0,01M фосфатног пуфера (PB) *C. m. subsp. sepedonicus* (нпр. сој NCPPB 4053 или PD 406) из културе старе три до пет дана (за припрему видјети Поглавље IV овог прилога). Припремити одвојене плочице за позитивну контролу са хомологим или неким другим референтним изолатом *C. m. subsp. sepedonicus*, раствореним у екстракту кромпира као што је наведено у Поглављу IV овог прилога.

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

Контролни материјал тестирати примјеном исте процедуре као и узорке.

5.1. Фиксирање екстракта кромпира

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

5.1.1. Припремити раствор за фиксирање (Поглавље IX овог прилога).

5.1.3. Пипетом одмјерити 100 μ l екстракта сваког узорка у Eppendorf епрувету, па центрифугирати осам минута на 7.000 g.

5.1.4. Уклонити супернатант и растворити талог у 500 μ l фиксатива припремљеног највише 24 часа раније, промијешати и инкубирати преко ноћи на 4 °C. Алтернативни фиксатив је 96% етанол. При томе је потребно растворити талог у 50 μ l 0,01 M PB и 50 μ l 96% етанола, промијешати и инкубирати на 4 °C 30 до 60 минута.

5.1.5. Центрифугирати осам минута на 7.000 g, уклонити супернатант и ресуспендовати талог у 75 μ l 0,01 M PB (Поглавље V овог прилога).

5.1.6. У бунарчиће чистих плочица нанијети 16 μ l фиксираних суспензија како је приказано на Шеми 6. На сваку плочицу нанијети два различита, неразриједена узорка и употријебити 10 μ l за припремање разриједња 1 : 100 (у 0,01 M PB). Преостали фиксирани раствор узорка (49 μ l) чувати на -20 °C после додавања једнаке запремине 96% етанола. Ако FISH тест треба поновити, центрифугирањем уклонити етанол и додати једнаку запремину 0,01 PB (уз мијешање).

Приказ плочице за FISH тест

Шема 6.

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

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

5.2. Претхибридизација и хибридизација

5.2.1. Припремити раствор лизозима који садржи 10 mg лизозима (Sigma L-6876) у 10 ml пуфера (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Тај се раствор може чувати, али се само једном смије замрзнути и одмрзнути. Сваки узорак добро прекрити са приближно 50 μ l раствора лизозима и инкубирати десет минута на собној температури. Затим само једном потопити плочицу у деминерализовану воду и пажљиво осушити филтер-папиром.

Алтернативно, уместо лизозима додати 50 μ l 40 до 400 μ g ml⁻¹ протеиназе К у пуферу (20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4) на сваки бунарчић и инкубирати на 37 °C 30 минута.

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

5.2.3. Припремити влажну комору за инкубацију тако што се дно херметички затворене кутије прекрива упијајућим или филтер-папиром потопљеним у 1 : hybmix (Поглавље IX овог прилога).

Кутију претходно инкубирати у апарату за хибридизацију нуклеинских киселина на 55 °C најмање десет минута.

5.2.4. Припремити раствор за хибридизацију, и то 45 μ l по плочици (Поглавље IX овог прилога) и претходно инкубирати пет минута на 55 °C.

5.2.5. Ставити плочице на термоблок на 45 °C и нанијети по 10 μ l хибридизованог раствора на сваки од четири бунарчића.

5.2.6. Ставити два покривна стакалца (24 mm · 24 mm) на сваку плочицу, пазећи притом да у бунарчићима не остане ваздух. Ставити плочицу у претходно загријану влажну комору и хибридизовати у апарату за хибридизацију на 55 °C, у мраку (преко ноћи).

5.2.7. Припремити три посуде са 1 l ултрачисте воде, 1 l 1 : hybmix (334 ml 3 : hybmix и 666 ml ултрачисте воде) и 1 l 1/2 : hybmix (167 ml 3 : hybmix и 833 ml ултрачисте воде). Сваку посуду претходно инкубирати у воденом купатилу на 55 °C.

5.2.8. Скинути покривна стакалца, а предметне плочице ставити на држач.

5.2.9. Вишак пробе уклонити инкубирањем у трајању од 15 минута на 55 °C у посуду са 1 : hybmix.

5.2.10. Пренијети држач плочица у раствор за прање (1/2 : hybmix) и инкубирати још 15 минута.

5.2.11. Плочице накратко уронити у ултрачисту воду и ставити на филтер-папир. Вишак влаге уклонити филтер-папиром. У сваки бунарчић пипетом нанијети од 5 μ l до 10 μ l заштитног раствора против избљеживања (нпр. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA или еквивалентна), па цијелу предметну плочицу покрити великим покривним стаклом (24 mm · 60 mm).

5.3. Очитавање FISH теста

5.3.1. Плочице прегледати под епифлуоресцентним микроскопом, коришћењем уљане имерзије, с увећањем 630 или 1.000 пута. Са филтером прикладним за флуоресцеин-изотиоцијанат (FITC) еубактеријске ћелије (укључујући већину Грам-негативних ћелија) у узорку се виде као флуоресцентно зелене. Употребом филтера за тетраметилродамин-5-изотиоцијанат ћелије *C. m. subsp. sepedonicus*, обојене са Cu3, виде се као флуоресцентно црвене. Упоредити морфологију ћелија узорка с морфологијом ћелија позитивних контрола. Ћелије морају бити јасно флуоресцентне и у потпуности обојене. Ако дође до одступања у обојености, FISH тест се мора поновити. Прегледати сваки бунарчић уздуж и попречно под нормалним углом и дуж спољне ивице. За узорке у којима је видљив мали број ћелија или их уопште нема прегледати најмање 40 микроскопских видних поља.

5.3.2. Уочити да ли су видљиве јасно флуоресцентне ћелије у бунарчићима морфологије карактеристичне за *C. m. subsp. sepedonicus* (види веб-страницу).

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

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

5.3.4. Постоји неколико проблема у вези са специфичношћу FISH теста. У концентрованом екстракту издвојених конуса пупчаних дијелова кртоле или стабљике увијек се очекује и присуство популација флуоресцентних ћелија са нетипичном морфологијом или унакрсна реакција са сапрофитним бактеријама сличне величине и грађе као *C. m. subsp. sepedonicus*, мада знатно рјеђе него код IF теста.

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

5.3.6. Тумачење резултата FISH теста:

а) резултати FISH теста сматрају се важећим ако се у свим позитивним и ни у једној негативној контроли примјеном FISH филтера уочава присуство јасно зелених флуоресцентних ћелија чија је величина и морфологија типична за *C. m. subsp. sepedonicus* и ако се примјеном филтера за родамин уочавају јасне црвене флуоресцентне ћелије. Ако се уоче јасне ћелије карактеристичне морфологије, одредити просјечан број типичних флуоресцентних ћелија по микроскопском видном пољу и израчунати број типичних ћелија по ml ресуспендованог талога (Поглавље VI овог прилога). Потенцијално позитивним сматрају се узорци са најмање $5 \cdot 10^3$ типичних ћелија по ml ресуспендованог талога и потребна су им даља тестирања. Негативним се сматрају узорци с мање од $5 \cdot 10^3$ типичних ћелија по ml ресуспендованог талога;

б) FISH тест је негативан ако се примјеном филтера за родамин не уоче снажно флуоресцентне црвене ћелије чија је величина и морфологија типична за *C. m. subsp. sepedonicus*, под условом да се примјеном филтера за родамин уоче типичне изразито флуоресцентне црвене ћелије у препаратима позитивне контроле.

6. PCR тест

Начело: Када се употребом PCR теста као првог теста провере добије позитиван резултат, IF тест се користи као други обавезни тест провере. Ако се коришћењем PCR теста као другог теста про-

вјере добије позитиван резултат, за постављање коначне дијагнозе треба обавити даље тестирање према дијаграму тока.

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

Напомена

ПРЕЛИМИНАРНА ТЕСТИРАЊА примјеном ове методе треба да омогуће поновљиву детекцију најмање 10^3 до 10^4 ћелија *C. m. subsp. sepedonicus* по ml које су додате екстракту узорка претходно доказаног као негативног.

За постизање највећег степена осјетљивости и специфичности у свим лабораторијама, потребно је извођење огледа за стандардизацију (оптимизацију) методе. Користити потврђене и одobreне реагенсе и протоколе за PCR. Пожељно је одабрати метод који подлијеже интерној контроли. Предузети одговарајуће мјере опреза да би се избјегла контаминација узорка циљном ДНК. PCR тест треба да обављају искусни стручњаци, у специјализованим лабораторијама за молекуларну биологију.

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

У PCR тест укључити следеће негативне контроле:

1. екстракт узорка у коме претходно током тестирања није доказано присуство *C. m. subsp. sepedonicus*;
2. пуфер коришћен за екстракцију бактерије и ДНК из узорка;
3. PCR реакциони микс.

У PCR тест укључити следеће позитивне контроле:

- аликоте ресуспендованих талогова у које је додата *C. m. subsp. sepedonicus* (Поглавље IV овог прилога),
- суспензију од 10^6 ћелија по ml вирулентног изолата *C. m. subsp. sepedonicus* у води (нпр. NCPPB 2140 или NCPPB 4053);
- 4. ако је могуће, у PCR тесту користити и ДНК екстрахован из позитивних контролних узорка.

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

С обзиром на то да примјена PCR протокола захтијева коришћење екстракта узорка са што мање земље, прије почетка процедуре извођења теста узорке кромпира је пожељно добро опрати.

6.1. Методе пречишћавања ДНК

Позитивну и негативну контролу користити на претходно описан начин. Контролни материјал припремити на исти начин као и узорке.

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

Метода која слиједи је стандардизована за коришћење са потврђеном и одобреном PCR методом у (Поглавље VIII овог прилога).

а) Метода према Pastriku (2000)

1. Пипетом одмјерити 220 μ l лизис пуфера [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] у Eppendorf тубу од 1,5 ml;
2. Додати 100 μ l екстракта узорка и ставити у термоблок или водено купатило на 95 °C 10 минута;
3. Ставити тубу на лед у трајању од пет минута;
4. Додати 80 μ l основног шток раствора Lysozyme (50 mg лизозима по ml у 10 mM Tris HCl, pH 8,0) и инкубирати на 37 °C 30 минута;
5. Додати 220 μ l раствора Easy DNA® A (Invitrogen), добро измијешати на вортексу и инкубирати на 65 °C 30 минута;
6. Додати 100 μ l раствора Easy DNA® A (Invitrogen) и снажно измијешати на вортексу до постизања униформног вискозитета узорка;
7. Додати 500 μ l хлороформа, измијешати на вортексу док се вискозитет не умањи и смјеса постане хомогена;
8. Центрифугирати на 15.000 g 20 минута на 4 °C да се подијеле фазе и створи међуфаза;
9. Пренијети горњу фазу у нову Eppendorf тубу;
10. Додати 1 ml 100% етанола (-20 °C), кратко промијешати на вортексу и инкубирати на леду 10 минута;
11. Центрифугирати на 15.000 g 20 минута на 4 °C и уклонити етанол од талогова;
12. Додати 500 μ l 80% етанола (-20 °C) и промијешати окретањем тубе;

13. Центрифугирати на 15.000 g 10 минута на 4 °C, сачувати талог а уклонити етанол;

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

15. Ресуспендовати талог у 100 μ l стерилне ултрачисте воде и оставити на собној температури најмање 20 минута;

16. Чувати на -20 °C до извођења PCR;

17. Било који бијели талог издвојити центрифугирањем и за PCR употребити 5 μ l супернатанта који садржи ДНК;

б) Друге методе

За екстракцију ДНК могу се примјенити и друге методе (нпр. Qiagen DNeasy Plant Kit) уколико је доказана еквивалентност у прочишћавању ДНК из контролних узорка који садрже 10^3 до 10^4 патогених ћелија по ml.

6.2. PCR

6.2.1. Припремити узорке за тестирање и контролне узорке за PCR према одобреним протоколима (Поглавље VIII овог прилога). Припремити разријеђење екстракта ДНК из узорка 1 : 10 у ултрачистој води.

6.2.2. У неконтаминираним простору припремити одговарајући реакциони микс за PCR према објављеним протоколима (Поглавље VIII овог прилога). Одобрени PCR протокол је мултиплекс реакција која такође укључује унутрашњу PCR контролу.

6.2.3. Додати 5 μ l екстракта ДНК у стерилне епрувете за PCR за PCR реакцију која се изводи у 25 μ l.

6.2.4. Укључити и негативну контролу која садржи само PCR реакциони микс, а умјесто узорка додати исти извор ултрачисте воде који је коришћен за припрему PCR реакционог микса.

6.2.5. Ставити епрувете у уређај за PCR (thermal cycler) и покренути стандардизовани PCR програм (Поглавље VIII овог прилога).

6.3. Анализа PCR продуката

6.3.1. Умножене PCR продукте раздвојити електрофорезом у агарозном гелу. У сваки бунарчић 2% (v/v) агарозног гела у трис-ацетат EDTA пуферу (ТАЕ) нанијети најмање 12 μ l ампликона ДНК из сваког узорка, помијешане с 3 μ l боје и пропустити уз напон од 5 до 8 В V/cm. Употребити одговарајући ДНК маркер, нпр. 100 bp ladder (Поглавље VIII овог прилога).

6.3.2. Обојити електрофоретске траке ДНК у гелу потапањем гела у етидијум бромид (0,5 mg/l) у трајању од 30 до 45 минута. Предузети одговарајуће мјере опреза при раду са овим мутагеном.

6.3.3. Обојени гел прегледати на краткоталасном UV трансилуминатору (нпр. $\lambda = 302$ nm) и потражити умножене фрагменте очекиване дужине (Поглавље VIII овог прилога) и документовати их.

6.3.4. Приликом сваког новог налаза/случаја проверити аутентичност умноженог PCR продукта извођењем анализе уз помоћ рестрикционих ензима на узорку преостале умножене ДНК, и то инкубацијом при оптималној температури и у оптималном времену с одговарајућим ензимом и пуфером (Поглавље VIII овог прилога). Настале фрагменте раздвојити електрофорезом у агарозном гелу како је претходно наведено и послје бојења етидијум бромидом на UV трансилуминатору посматрати карактеристичну матрицу (образца) рестрикционих фрагмената и упоредити је са позитивном контролом прије и послје раздвајања.

Тумањење резултата PCR теста

PCR тест је негативан ако у тестираном узорку није видљив PCR продукт очекиване дужине, који је специфичан за *C. m. subsp. sepedonicus*, али је видљив у свим позитивним контролним узорцима (код мултиплекс PCR са прајмерима за унутрашњу контролу који су специфични за биљку домаћина: у тестираном узорку се мора умножити други продукт PCR очекиване величине).

PCR тест је позитиван ако је видљив PCR продукт који је специфичан за *C. m. subsp. sepedonicus* и који је очекиване дужине и рестрикционог обрасца, под условом да није умножен ни у једном узорку који представља негативну контролу. Поуздана потврда позитивног резултата представља и успјешно понављање теста с другим паром PCR прајмера (тачка 9. подтачка 9.3. овог поглавља).

Напомена

Уколико се очекивани фрагмент (позитивна реакција) добије у узорку позитивне контроле која садржи *C. m. subsp. sepedonicus* у води, а негативни резултат добије у узорку позитивне контроле која садржи *C. m. subsp. sepedonicus* у екстракту кромпира, претпоставља се да је дошло до инхибиције PCR реакције. У мултиплекс PCR протоколима који се изводе употребом унутрашњих PCR контрола сматра се да је дошло до инхибиције реакције ако није добијен ни један од два продукта.

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

7. Биолошки тест

Напомена

ПРЕЛИМИНАРНО ТЕСТИРАЊЕ ОВОМ МЕТОДОМ ТРЕБА ДА ОМОГУЋИ ПОНОВЉИВО ОТКРИВАЊЕ ПРИСУСТВА 10^3 ДО 10^4 cfu *C. m. subsp. sepedonicus* ПО ml, ДОДАТИХ ЕКСТРАКТИМА УЗОРАКА КОЈИ СУ У РАНИЈЕМ ТЕСТИРАЊУ БИЛИ НЕГАТИВНИ (ЗА ПРИПРЕМУ ВИДЈЕТИ ПОГЛАВЉЕ IV ОВОГ ПРИЛОГА).

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

Неке сорте плавог патлициана представљају одличну селективну подлогу за обogaћење и раст *C. m. subsp. sepedonicus*, чак и у одсуству симптома, а уједно су и одличне за утврђивање биљака домаћина. Услови раста треба да су оптимални да би се умањило ризик од добијања лажно негативних резултата.

Детаљи у вези са гајењем биљака (Поглавље X овог прилога).

7.1. На преосталу количину ресуспендованог талога остављеног за тестирање из 3.1.6. или 3.2.5. примјенити методу инокулације зарезивањем или методом инокулације инјекцијом. Користити само биљке плавог патлициана у стадијуму два до три права листа, до потпуне развијености трећег правог листа. По једном узорку потребно је 15 до 25 биљака патлициана да би се у потпуности искористило ресуспендовани талог и осигурала ефикасна инокулација.

7.2. С циљем смањења тургора, биљке патлициана не залијевају један до два дана прије инокулације.

7.3. Инокулација зарезивањем:

7.3.1. Држећи биљку међу прстима, пипетом нанијети капљицу (око 5-10 μl) ресуспендованог талога на стабљику, и то између котиледона и првог листа;

7.3.2. Стерилним скапелом направити дијагонални рез, дуг око 1 cm и дубок око 2/3 дебљине стабљике, почевши од нанесене капљице ресуспендованог талога;

7.3.3. Чврсто затворити рез стерилним вазелином из шприца.

7.4. Инокулација инјекцијом.

Стабљике плавог патлициана инокулисати непосредно изнад котиледона инјекцијом с танком иглом (не мањом од 23 G). Узорак подијелити на биљке плавог патлициана тако да свака биљка добије одговарајућу количину.

7.5. Позитивна контрола: пет биљака инокулисати суспензијом од 10^5 до 10^6 ћелија по ml воде познате културе *C. m. subsp. sepedonicus* и, када је могуће, екстрактом природно зараженог ткива кртола (тачка 4. овог поглавља) истом методом инокулације.

7.6. Негативна контрола: пет биљака инокулисати истом методом инокулације користећи стерилни пелет пуфер (пуфер за раставање талога).

Биљке гајити у карантинским просторијама до четири седмице на 18°C до 24°C , уз довољну количину свјетла и високу влажност (од 70% до 80%) и адекватно залијевати како би се спријечило накупљање воде или увенуће због недостатка воде. *C. m. subsp. sepedonicus* се не развија на температурама изнад 30°C , а оптимална температура је 21°C .

7.7. С циљем спречавања унакрсне контаминације, биљке позитивне и негативне контроле гајити на јасно одвојеним столовима у стакленику или полицима у комори за раст или, у случају да је простор ограничен, побринути се да су биљке јасно одвојене између појединих поступака у току извођења процедуре. Ако се биљке за различите узорке морају гајити близу једна другој, раздвојите их погодним платном. Пазити да не дође до унакрсне контаминације приликом прихрањивања, залијевања, прегледања и сваког другог поступка с биљкама. Од кључне важности је да у стакленицима и коморама за гајење не буде никаквих инсеката јер они могу пренијети бактерију с узорка на узорак.

7.8. Појаву симптома редовно провјеравати послје седам дана од инокулације. Пребројати биљке које показују симптоме. *C. m. subsp. sepedonicus* изазива увенуће листова патлициана које може почети као увенулоост ивица или између нерава листова. Увенуло ткиво у почетку изгледа тамнозелено или прошарано, али касније постаје бјело па некротично. Увела површина између лисних нерава често изгледа масно, као да је натопљена водом. Некротично ткиво често има свијетложуту ивицу. Биљке не угину увијек; што је период прије него што се симптоми почну развијати дужи, већа је могућност преживљавања. Биљке могу прерасти заразу. Младе биљке патлициана много су осјетљивије на присуство ниског нивоа популација *C. m. subsp. sepedonicus* него старије биљке; због тога се користе биљке у фази три права листа или непосредно прије фазе три права листа.

Увенуће може бити изазвано и популацијом других бактерија или гљивица које су присутне у екстракту ткива кртола. То

cy: *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* i *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata*, као и популације великог броја сапрофитних бактерија. Нарочито *Erwinia chrysanthemi* може изазвати симптоме на листовима и увенуће које је врло слично симптомима *C. m. subsp. sepedonicus*. Једину разлику представља појава тамњења/црњења стабљика у случају инфекција бактеријом *Erwinia chrysanthemi*. Друге врсте увенућа се разликују од оних које проузрокује *C. m. subsp. sepedonicus*, зато што цијели листови или цијеле биљке врло брзо вену. *C. m. subsp. sepedonicus* се од *Erwinia* spp. може брзо и лако раздвојити и извођењем бојења и/или реакције по Граму.

7.9. Одмах по уочавању присуства симптома на биљкама патлициана потребно је извршити реизолацију, користећи дијелове увенулог ткива лишћа или ткива стабљике. Листове и стабљике биљака патлициана површински дезинфиковати брисањем са 70% етанолом. Ткиво измачерирати и примјенити IF или PCR тест на соку патлициана и изолацију патогена на погодну (селективну) хранљиву подлогу (тачка 8. овог поглавља). Такође, може се примјенити и бојење/реакција по Граму (Поглавље XI овог прилога). Извршити идентификацију чисте културе *C. m. subsp. sepedonicus* и провјеру патогености (т. 9. и 10. овог поглавља).

7.10. У одређеним околностима, нарочито у условима неповољним за раст и развој биљака, могуће је да се чак и послје периода инкубације од четири недеље *C. m. subsp. sepedonicus* налази латентно у биљкама патлициана. Ако ни послје четири недеље од инокулације не дође до појаве симптома, на биљкама треба извести IF/PCR тест на збирном узорку састављеном од дијелова стабљике (1 cm од сваке биљке за тестирање, узетом изнад мјеста инокулације). Ако је тест позитиван, поновно извршити изолацију патогена на одговарајућу (селективну) хранљиву подлогу, према поступку из тачке 8. овог прилога. Извршити идентификацију чисте културе *C. m. subsp. sepedonicus* и провјеру патогености (т. 9. и 10. овог поглавља).

Тумачење резултата биолошког теста - валидни резултати биолошког теста добијају се ако биљке у позитивној контроли показују типичне симптоме, ако се из тих биљака може поново издвојити бактерија и ако на биљкама негативне контроле не дође до појаве симптома.

Биолошки тест је негативан ако тестиране биљке нису заражене *C. m. subsp. sepedonicus*, а под условом да је утврђено присуство *C. m. subsp. sepedonicus* у позитивним контролама.

Биолошки тест је позитиван ако су тестиране биљке заражене *C. m. subsp. sepedonicus*.

8. ИЗОЛАЦИЈА *C. m. subsp. sepedonicus*

Напомена

Дијагноза се може потврдити само ако се *C. m. subsp. sepedonicus* изолује, а затим изврши и идентификација добијеног изолата (тачка 9. овог поглавља) и ако се потом потврди и патогеност добијеног изолата (тачка 10. овог поглавља). Иако је *C. m. subsp. sepedonicus* захтијевајан организам, може се изоловати из ткива са карактеристичним симптомима. Приликом изолације лако може доћи до прерастања колоније овог патогена са колонијама брзорастућих сапрофитних бактерија, па је зато изолација директно из екстракта ткива кртола или стабљике тешка. Директна изолација *C. m. subsp. sepedonicus* могућа је коришћењем одговарајуће селективне хранљиве подлоге и разрјеђења ресуспендованог талога добијеног из издвојеног конуса пупчаног дијела кртоле или из стабљика кромпира.

Изолације је потребно извршити из свих кртола или дијелова стабљике кромпира са симптомима, као и из тестираних биљака патлициана код којих нису примјенјени симптоми или је IF/PCR тест из збирног узорка био позитиван (тачка 7. подтачка 7.10). По потреби, треба да се користи и мацерирање стабљика патлициана према прописаној процедури.

Позитивна контрола: припремити децимална разрјеђења суспензије 10^6 cfu по ml *C. m. subsp. sepedonicus* (нпр. NCPRB 4053 или PD 406). Позитивне контроле припремити потпуно одвојено од узорака који се тестирају да би се избјегла могућност контаминарања узорака.

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

8.1. Гајење на селективној хранљивој подлози

8.1.1. Из одвојене количине од 100 μl ресуспендованог талога добијеног из кртоле кромпира или биљног сока биљака патлициана припремити децимална разрјеђења у пелет пуферу (пуфер за раставање талога из тачке 3. овог поглавља).

8.1.2. Изолација из ресуспендованог талога без претходног разрјеђивања обично не успијева због тешког гајења *C. m. subsp. sepedonicus* и велике конкурентске способности сапрофита. С

обзиром на то да је у зараженом ткиву биљке бактерија обично присутна у популацијама високог нивоа, сапрофити се могу одстранити разријеђивањем, док патоген остаје. Стога се препоручује наношење 100 µl из сваког узорка (код употребе Петријевих посуда пречника 90 mm, док за Петријеве посуде других величина треба прилагодити количину), 1/100 до 1/10.000 разријеђене суспензије на хранљиву подлогу MTNA или на NCP-88 (Поглавље VII овог прилога), техником размаза.

Напомена

Алтернативна могућност је размаз почетне количине од 100 µl ресуспендованог талог на прву подлогу, а затим прављење размаза истим штапићем на другој и трећој подлози, при чему се на њих наносе остаци екстракта с претходне подлоге. На овај начин добија се ефекат сличан ефекту коришћења разријеђања.

8.1.3. Засијану подлогу инкубирати у мраку на температури од 21 °C до 23 °C.

8.1.4. Прва провјера подлога и процјена појаве и развоја колонија налик *C. m. subsp. sepedonicus* у поређењу са подлогама позитивне контроле врши се после три дана, а наредне процјене после пет, седам и евентуално десет дана.

8.2. Пречишћавање сумњивих колонија

Напомена

Колоније сличне *C. m. subsp. sepedonicus* треба даље пренијети на хранљиву подлогу YGM ако ће се користити за инокулацију патлициана и/или даљу идентификацију. То треба учинити прије него на подлогама дође до прерастања колонија, односно најбоље после три до пет дана.

8.2.1. Размазом нанијети колоније сличне *C. m. subsp. sepedonicus* на једну од следећих хранљивих подлога: хранљиви агар с додатком декстрозе (користи се само за пресијавање изолата), агар са додатком квасца, пептона и глукозе, агар са додатком екстракта квасца и минералних соли. Састав хранљивих подлога наведен је у Поглављу VII овог прилога.

Засијану подлогу инкубирати на 21 °C до 24 °C у трајању до 10 дана. *C. m. subsp. sepedonicus* споро расте, обично ствара кремaste, куполасте колоније са шилатим врхом. Пречишћавање изолата постиже се поновним размазима и исцрпљивањем на одговарајућим хранљивим подлогама. Ниво пораста се повећава пресијавањем. Типичне колоније су кремастобијеле или боје слоноваче, понекад жуте, заокружене, глатке, повишене, конвексно-куполасте, слузаво-течне, с цијелим ивицама и обично од 1 до 3 mm у пречнику. Једноставно бојење по Граму (Поглавље XI овог прилога) може помоћи при избору колонија за даље тестирање.

8.2.2. Извршити идентификацију изабраних колонија (тачка 9. овог поглавља) и провјерити патогеност изолата (тачка 10. овог поглавља).

9. Идентификација

Идентификација чисте културе добијених изолата *C. m. subsp. sepedonicus* врши се коришћењем најмање два теста од наведених тестова који се заснивају на различитим биолошким принципима. Према потреби, укључити познате референтне изолате за сваки тест.

9.1. Одгајивачки и ензимски тестови за идентификацију

Фенотипска својства универзално присутна или одсутна код бактерије *C. m. subsp. sepedonicus* утврдити према методама Lelliott i Stead (1987), Klement i cap. (1990), Schaad i cap. (2001), непознати аутор (1987) и сл.

Све хранљиве подлоге инкубирати на 21 °C и прегледати након шест дана. Ако не дође до раста колонија, инкубирати до 20 дана. У све тестове треба укључити познату контролу *C. m. subsp. sepedonicus*. Одгајивачке и физиолошке тестове изводити коришћењем културе са хранљивог агара. Морфолошка упоређења извршити у односу на културу на хранљивом агару са додатком декстрозе.

Тестови	Очекивани резултати
Тест оксидације/ферментације (О/Ф)	инертан или слабо оксидативан
Активност оксидазе	-
Раст на 37 °C	-
Активност уреазе	-
Хидролиза ескулина	+
Хидролиза скроба	- или слаба
Толерантност на 7% раствора NaCl	-
Стварање индола	-
Активност каталазе	+

Стварање H ₂ S	-
Коришћење цитрата	-
Растварање желатина	-
Стварање киселине из глицерола	-
Стварање киселине из лактозе	- или слаба
Стварање киселине из рамнозе	-
Стварање киселине из салицина	-
Бојење по Граму (Поглавље XI)	+

9.2. IF тест

Припремити суспензију од приближно 10⁶ ћелија по ml у IF пуферу (Поглавље V овог прилога).

Припремити двострука разријеђања раствора погодног антисептика.

Примијенити IF поступак (тачка 4. овог поглавља).

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

9.3. PCR тест

Припремити суспензију од приближно 10⁶ ћелија по ml у ултрачистој води.

Загријати 100 µl суспензије ћелија бактерије у затвореним епруветама у термоблоку или у врелом воденом купатилу четири минута на 100 °C. Разлагање ћелија, по потреби, може се убрзати додавањем свјеже припремљеног NaOH до коначне концентрације од 0,05 M. До употребе узорци се могу чувати на температури од -16 °C до -24 °C.

Употриједити одговарајуће PCR процедуре за умножавање специфичних фрагмената *C. m. subsp. sepedonicus* (нпр. Pastrik, 2000; видјети Поглавље VIII овог прилога; Li i de Boer, 1995; Mills i cap., 1997; Pastrik i Raineu, 1999; Schaad i cap., 1999).

Идентификација *C. m. subsp. sepedonicus* је позитивна ако су PCR продукти исте величине и имају исти полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената, као и позитивни контролни изолат.

9.4. FISH тест

Припремити суспензију од приближно 10⁶ ћелија по ml ултрачисте воде.

Примијенити FISH поступак (тачка 5. овог поглавља).

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

9.5. Профилирање масних киселина (FAP)

Културу гајити на триптиказа-соја-агару (Oxoid) 72 часа на 21 °C (+/- 1 °C).

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

FAP тест је позитиван ако је профил тестиране културе идентичан профилу позитивне контроле. Присуство карактеристичних масних киселина: 15 : 1 Anteiso A, 15 : 0 Iso, 15 : 0 Anteiso, 16 : 0 Iso, 16 : 0 и 17 : 0 Anteiso у великој мјери указује да се ради о *C. m. subsp. sepedonicus*. Родови бактерија као *Curtobacterium*, *Arthrobacter* и *Micrococcus*, такође, имају неке од ових киселина, али 15 : 1 Anteiso A је киселина која се ријетко може пронаћи у овим бактеријама, али се појављује у свим бактеријама рода *Clavibacter*, и то између 1% до 5%. Код *C. m. subsp. sepedonicus* вредност је обично око 5%.

9.6. BOX-PCR

Припремити суспензију од приближно 10⁶ ћелија по ml ултрачисте воде.

Примијенити тест у складу с процедуром (Smith i cap., 2001).

10. Тест потврде

Тест провјере патогености користи се за коначно потврђивање присуства *C. m. subsp. sepedonicus* и за процјену вирулентности култура идентификованих као *C. m. subsp. sepedonicus*.

10.1. Припремити инокулум од приближно 10⁶ ћелија по ml из култура изолата који се тестира, старости три дана и одговарајућег изолата позитивне контроле *C. m. subsp. sepedonicus*.

10.2. Инокулисати стабљике пет до десет младих сијанаца плавог патлициана у фази три прва листа (тачка 7. подт. 7.3. или 7.4. овог поглавља).

10.3. Инокулисано сијанце инкубирати на температури од 18 °C до 24 °C, уз довољну количину свјетла и високу релативну влажност и адекватно залијевати како би се избјегло накупљање воде или стрес од суше (тачка 7. подтачка 7.7. овог поглавља). Код инокулације чистим културама типично увенуће појављује се у

року од двије недјеље, док се биљке које не испољавају симптоме (видјети тачка 7. подтачка 7.8. овог поглавља) послје тог времена инкубирају још недјељу дана на температурама повољним за раст плавог патлиџана, али не вишим од 25 °C (Поглавље X овог прилога). Ако симптоми нису присутни ни послје три недјеље, добијена култура се не може потврдити као патогени изолат *C. m. subsp. sepedonicus*.

10.4. Изолацију из биљака са симптомима извршити одстрањивањем дијела стабљике дужине 2 cm изнад мјеста инокулације, који се потом уситни и раствори у малој количини стерилне дестиловане воде или 50 mM фосфатном пуферу (Поглавље V овог прилога). Изолација патогена потом се врши размазом добијеног мацерата на MTNA и YPGA подлоге (Поглавље VII овог прилога), инкубирањем три до пет дана на 21 °C до 23 °C и утврђивањем да ли су формиране типичне колоније бактерије *C. m. subsp. sepedonicus*.

Поглавље III ЛАБОРАТОРИЈЕ УКЉУЧЕНЕ У ОПТИМИЗАЦИЈУ И ВАЛИДАЦИЈУ ПРОТОКОЛА

Лабораторија ⁽¹⁾	Мјесто	Држава
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Беч и Линц	Аустрија
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Белгија
Plantedirektoratet	Lingby	Данска
Central Science Laboratory	York	Енглеска
Scottish Agricultural Science Agency	Единбург	Шкотска
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Француска
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terr	Le Rheu	Француска
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Њемачка
Pflanzenschutzamt Hannover	Хановер	Њемачка
State Laborator	Даблин	Ирска
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Холандија
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Ас	Норвешка
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Лисабон	Португалија
Nacionalni institut za biologijo	Љубљана	Словенија
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Шпанија

Поглавље IV ПРИПРЕМА ПОЗИТИВНИХ И НЕГАТИВНИХ КОНТРОЛА ЗА ОСНОВНЕ ТЕСТОВЕ ПРОВЈЕРЕ

PCR/IF и FISH тестови

Направити суспензију културе вирулентног изолат *C. m. subsp. sepedonicus* (NCPPB 4053 или PD 406) гајеног 72 часа на MTNA основној хранљивој подлози у 10 mM фосфатном пуферу концентрације приближно $1-2 \cdot 10^8$ cfu/ml. То је обично слабо мутна суспензија оптичке густине 0,20 на 600 nm.

Издавити конус пупчаног дијела из 200 кртола бијеле сорте кромпира за које је познато да нису заражене бактеријом *C. m. subsp. sepedonicus*.

Обрадити конусе уобичајеном методом и ресуспендовати талог у 10 ml.

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

У прву микропрувету додати 100 µl суспензије *C. m. subsp. sepedonicus* и измијешати на вортексу.

У следећих пет микропрувета припремити децимална разједиња бактеријске суспензије.

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

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

Присуство и количину присутне *C. m. subsp. sepedonicus* у контролним узорцима прво потврдити IF тестом.

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

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

Поглавље V ПУФЕРИ ЗА ТЕСТ ПРОЦЕДУРЕ

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

1. Пуфери за екстракцију

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

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

Na₂HPO₄ (анхидровани) 4,26 g

KH₂PO₄ 2,72 g

Дестилована вода 1 l

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

Сљедећи састојци могу бити корисни:

	Намјена	Количина (по l)
Пахуљице Lubrol	Дефлокулант*	0,5 g
DC силикон против стварања пјене	Средство против стварања пјене*	1 ml
Тетранатријум-пирофосфат	Антиоксидант	1 g
Polivinilpirolidon-40.000 (PVP-40)	Везивање PCR инхибитора	50 g
* За употребу код методе екстракције хомогенизацијом.		

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

Овај пуфер користи се за ресуспендовање и разједињавање екстракта конуса извађених из пупчаних дијелова кртола кромпира, послје концентровања талог центрифугирањем.

Na₂HPO₄ · 12H₂O 2,7 g NaH₂PO₄ · 2H₂O 0,4 g

Дестилована вода 1 l

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

2. Пуфери за IF тест

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

Овај пуфер се користи за разједињавање антибијела.

Na₂HPO₄ · 12H₂O 2,7 g

NaH₂PO₄ · 2H₂O 0,4 g

NaCl 8 g

Дестилована вода 1 l

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

2.2. IF пуфер - Tween

Овај пуфер користи се за испирање IF плочица. IF пуферу додати 0,1% Tween 20.

2.3. Фосфатни пуфер с глицеролом pH 7,6

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

Na₂HPO₄ · 12H₂O 3,2 g

NaH₂PO₄ · 2H₂O 0,15 g, глицерол 50 ml

Дестилована вода 100 ml

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

Поглавље VI ОДРЕЂИВАЊЕ НИВОА КОНТАМИНАЦИЈЕ У IF И FISH ТЕСТОВИМА

1. Избројати просјечан број типичних флуоресцентних ћелија по видном пољу (с).

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

$$C = c \cdot S/s,$$

гдје је:

S = површина бунарчића IF плочице са више бунарчића,

s = површина поља објектива.

$$s = \pi i^2 / 4G^2 K^2,$$

гдје је:

i = коефицијент поља (варира од осам до 24, зависно од типа окулар),

K = коефицијент тубе - цијеви (1 или 1,25),

G = повећање објектива (100 пута, 40 пута итд.).

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

$$N = C \cdot 1000/u \cdot F,$$

гдје је:

u = запремина ресуспендованог талога у сваком бунарчићу,

F = фактор разријеђења ресуспендованог талога.

Поглавље VII

ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ ЗА ИЗОЛАЦИЈУ И ГАЈЕЊЕ *C. m. subsp. sepedonicus*

1. Опште хранљиве подлоге

1.1. Хранљиви агар (NA)

Хранљиви агар (Difco) 23 g

Дестилована вода 1 l

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

1.2. Хранљиви агар са декстрозом (NDA)

Difco басто хранљиви агар који садржи 1% D (+) глукозе (монохидрата). Стерилисати у аутоклаву на 115 °C 20 минута.

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

Екстракт квасца (Difco) 5 g

Васто пептон (Difco) 5 g

D (+) глукоза (монохидрат) 10 g

Агар басто (Difco) 15 g

Дестилисана вода 1 l

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

1.4. Агар са екстрактом квасца и минералним солима (YGM)

Васто екстракт квасца (Difco) 2 g

D (+) глукоза (монохидрат) 2,5 g

K₂HPO₄ 0,25 g KH₂PO₄ 0,25 g

MgSO₄ · 7H₂O 0,1 g MnSO₄ · H₂O 0,015 g NaCl 0,05 g

FeSO₄ · 7H₂O 0,005 g

Васто агар (Difco) 18 g

Дестилована вода 1 l

Растворити састојке и стерилисати 0,5 литара хранљиве подлоге у аутоклаву на 121 °C 15 минута.

2. Селективне хранљиве подлоге које су прошле валидацију

2.1. MTNA хранљива подлога

Осим ако није другачије наведено, сви састојци су из BDH.

Екстракт квасца (Difco) 2 g

Манитол 2,5 g

K₂HPO₄ 0,25 g

KH₂PO₄ 0,25 g

NaCl 0,05 g

MgSO₄ · 7H₂O 0,1 g

MnSO₄ · H₂O 0,015 g

FeSO₄ · 7H₂O 0,005 g

Агар (Oxoid no.1) 16 g

Дестилована вода 1 l

Растворити састојке и подесити pH на 7,2. Након стерилизације у аутоклаву (на 121 °C у трајању од 15 минута) и хлађења на 50 °C, додати антибиотике: триметоприм 0,06 g, налидиксилну киселину 0,002 g, амфотерицин Б 0,01 g киселина (Sigma), (оба 5 mg/ml), у 96% етанолу, амфотерицин Б (Sigma), (1 mg/ml), у диметил сулfoxиду. Шток раствори стерилишу се филтрацијом.

Концентровани раствори антибиотика: триметоприм (Sigma) и налидиксилна киселина (Sigma), (оба 5 mg/ml), у 96% метанолу, амфотерицин Б (Sigma), (1 mg/ml), у диметил сулfoxиду.

Напомена

Рок трајања основне хранљиве подлоге је три мјесеца. Након што се додају антибиотици, рок трајања је мјесец дана, и то уколико се припремљена подлога чува у фрижидеру.

2.2. NCP-88

Хранљиви (Difco) 23 g

Екстракт квасца (Difco) 2 g

Д-манитол 5 g

K₂HPO₄ 2 g

KH₂PO₄ 0,5 g

MgSO₄ · 7H₂O 0,25 g

Дестилована вода 1 l

Растворите састојке и подесите pH на 7,2. Након стерилизације у аутоклаву (на 121 °C 15 минута и хлађења на 50 °C), додајте следеће антибиотике: полимиксин Б сулфат (Sigma) 0,003 g, налидиксилна киселина (Sigma) 0,008 g, циклохексимид (Sigma) 0,2 g.

Шток растворе антибиотика направити на следећи начин: растворити налидиксилну киселину у 0,01 M NaOH циклохексимид у 50% етанолу, полимиксин Б сулфат у дестилованој води. Основни раствори су стерилисани филтрирањем.

Напомена

Рок трајања основне хранљиве подлоге је три мјесеца. Након што се додају антибиотици, рок трајања је мјесец дана, и то када се чува у фрижидеру.

Поглавље VIII

ПОТВРЂЕНИ И ОДОБРЕНИ ПРОТОКОЛИ И РЕАГЕНСИ ЗА PCR

Напомена

ПРЕЛИМИНАРНА ТЕСТИРАЊА ТРЕБА ДА ОМОГУЋЕ ПОНОВЉИВУ ДЕТЕКЦИЈУ ОД НАЈМАЊЕ 10³ ДО 10⁴ ЋЕЛИЈА *C. m. subsp. sepedonicus* ПО ml ЕКСТРАКТА УЗОРКА.

Током прелиминарних тестирања не смије доћи до појаве лажно позитивних резултата код одабраних бактеријских изолата.

1. Протокол за мултиплекс PCR са унутрашњом PCR контролом (Patrik, 2000)

1.1. Олигонуклеотидни прајмери

Узводни прајмер PSA-1 5' - ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa - 3'.

Низводни прајмер PSA-R 5' - tac tga gat gtt tca ctt ccc c - 3'.

Узводни прајмер NS-7-F 5' - gag gca ata aca ggt ctg tga tgc - 3'.

Низводни прајмер NS-8-R 5' - tcc gca ggt tca cct acg ga - 3'.

Очекивана дужина умноженог производа из ДНК *C. m. subsp. sepedonicus* = 502 bp (пар прајмера PSA).

Очекивана дужина умноженог производа из 18S рРНА унутрашње контроле = 377 bp (пар прајмера NS).

1.2. PCR реакциони микс

Реагенс	Количина по реакцији	Конечна концентрација
Стерилна ултрачиста вода	15,725 µl	
10 · PCR пуфер ¹ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1 · (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (фракција V) (10%)	0,25 µl	0,1%
Смјеса d-NTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Прајмер PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Прајмер PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Прајмер NS-7-F (10 µM) ²	0,1 µl	0,04 µM
Прајмер NS-8-R (10 µM) ²	0,1 µl	0,04 µM
Тақ полимераза (5 U/µ) ¹	0,2 µl	1 U
Запремина узорка	5 µl	
Укупна запремина	25 µl	

⁽¹⁾ Валидација методе је извршена уз коришћење Тақ полимеразе Perkin Elmer (Ampli Taq ili Gold) и Gibco BRL.

⁽²⁾ Оптимизација концентрације прајмера NS-7F и NS-8-R извршена је за екстракцију из пупчаног конуса кромпира методом хомогенизације и пречишћавања ДНК према Patrik (2000), (Поглавље II тачка 6. подт. 6.1. и 6.2).

Уколико се користи екстракција тресењем или нека друга метода изолације ДНК, потребно је извршити поновну оптимизацију концентрације реагенса.

1.3. Услови PCR реакције

Извести следећи програм:

- а) један циклус: три минута на 95 °C (денатурација ланца ДНК);
 б) десет циклуса: један минут на 95 °C (денатурација ланца ДНК);
 в) један минут на 64 °C (везивање прајмера);
 г) један минут на 72 °C (хибридизација);
 д) 25 циклуса: 30 секунди на 95 °C (денатурација ланца ДНК);
 ђ) 30 секунди на 62 °C (денатурација ланца ДНК);
 е) један минут на 72 °C (продућавање копије);
 ж) циклус: пет минута на 72 °C (коначно продужавање);
 з) држати на 4 °C.

Напомена

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

1.4. Анализа продукта умножавања рестрикционим ензимом

PCR производи умножени из ДНК *S. m. subsp. sepedonicus* испољавају карактеристичне полиморфизме у дужини рестрикционих фрагмената са ензимом Bgl II после инкубације на 37 °C 30 минута. Рестрикциони фрагменти добијени из специфичног фрагмента *S. m. subsp. sepedonicus* су величине 282 bp и 220 bp.

2. Припрема боје за електрофорезу

2.1. Бромфенол плаво (10% концентровани раствор)

Бромфенол плаво 5 g

Дестилована вода (бидестилована) 50 ml

2.2. Пуфер за бојење

Глицерол (86%) 3,5 ml

Бромфенол плаво (5.1) 300 µl

Дестилована вода (бидестилована) 6,2 ml

3. 10 · Трис-ацетатни и EDTA пуфер (TAE), pH 8,0

Трис пуфер 48 g

Глацијална сирћетна киселина 11,42 ml

EDTA (динатријумова со) 3,72 g

Дестилована вода 1 l

Разриједити једанпут прије употребе (нпр. Invitrogen или замјена).

Поглавље IX

ПОТВРЂЕНИ И ОДОБРЕНИ РЕАГЕНСИ ЗА FISH ТЕСТ

1. Олиго-пробе

Специфична проба за *S. m. subsp. sepedonicus* CMS-CY3-01: 5' - ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg - 3'.

Неспецифична еубактеријска проба EUB-338-FITC: 5' - gct gcc tcc cgt agg agt - 3'.

2. Раствор за фиксирање

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

Загријати 9 ml воде за употребу у процедурама молекуларне биологије (нпр. ултрачисте воде) на око 60 °C и додати 0,4 g параформалдехида. Параформалдехид се раствара после додавања пет капи 1N NaOH и мијешања на магнетној мјешалици.

Подесити pH на 7 додајући 1 ml 0,1 M фосфатног пуфера (PB; pH 7,0) и пет капи 1 N HCl. Вриједност pH провјерити и помоћу индикатор трака и ако је потребно подесити pH помоћу HCl или NaOH. У растворима са параформалдехидом не употребљавати pH метар.

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

Напомена

Алтернативни раствор за фиксирање је 96% етанол.

3. 3 · Hybmix

NaCl 2,7 M

Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)

EDTA (филтер стерилисани у аутоклавама) 15 mM

Разриједити до једанпут према потреби.

4. Раствор за хибридизацију

1 · Hybmix

Натријум-додецил-сулфат (SDS) 0,01%

Проба EUB 338 5 ng/µl

Проба CMSCY301 5 ng/µl

Припремити количине раствора за хибридизацију према прорачунима у Табели 1. Предложене количине за припремање смјесе за хибридизацију (у даљем тексту: Табела 1). За сваку плочицу (са два различита узорка у дупликату) треба 90 µl раствора за хибридизацију.

Табела 1.

	двје плочице	осам плочица
Стерилна ултрачиста вода	50,1	200,4
3 · Hybmix	30	120
1% SDS	0,9	3,6
Проба EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18
Проба CMSCY301 (100 ng/µl)	4,5	18
Укупна запремина (µl)	90	360

Напомена

Све растворе који садрже олиго-пробе осјетљиве на свјетлост чувати у мраку на -20 °C. Током употребе заштитити их од директне сунчеве свјетлости или електричног свјетла.

5. 0,1 M фосфатни пуфер, pH 7,0

Na₂HPO₄ 8,52gKH₂PO₄ 5,44 g

Дестилована вода

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

Поглавље X

ГАЈЕЊЕ ПЛАВОГ ПАТЛИЦИЈАНА

Посијати сјеме плавог патлицијана (*Solanum melongena*) у пастеризовани компост за сјеме. Пресадити сијанце са потпуно развијеним котиледонима (10 до 14 дана) у пастеризован компост у саксијама.

Плави патлицијани треба да се гаји у стакленику под следећим условима:

1) дужина дана: 14 часова или природна дужина дана, ако је дужа од 14 часова,

2) температура: дан: од 21 °C до 24 °C, ноћ: 15 °C.

Осјетљиве сорте плавог патлицијана: Black Beauty, Long Tom, Rima, Balsas.

Поглавље XI

ПОСТУПАК БОЈЕЊА ПО ГРАМУ (HUCKEROVA
МОДИФИКАЦИЈА), (DOETSCH, 1981)

а) Раствор кристал виолет

Растворите 2 g кристал виолет у 20 ml 95% етанола. Растворите 0,8 g амонијум-оксалата у 80 ml дестиловане воде. Помијешати два раствора.

б) Луголов раствор

Јод 1 g

Калијум-јодид 2 g

Дестилована вода 300 ml

Уситнити састојке користећи тучак и аван. Додати састојке води и промијешати да се растворе у затвореној посуди.

в) Раствор шафранина за контраст

Основни раствор:

- шафранин О 2,5g,

- 95% етанол 100 ml.

Промијешати и чувати.

Разриједити 1 : 10 за добијање радног раствора.

Поступак бојења:

1. припремити размазе, осушити на ваздуху и фиксирати их загријавањем,

2. плочицу прелити раствором кристал виолет и држати један минут,

3. кратко испрати текућом водом,

4. прелити Луголовим раствором један минут,

5. испрати текућом водом и просушити филтер-папиром,
6. боју уклонити 95% етанолом, који се додаје кап по кап или се размаз урони на 30 секунди и лагано протресе,
7. испрати текућом водом и просушити филтер-папиром,
8. прелити раствором шафранина 10 секунди,
9. испрати текућом водом и осушити филтер-папиром,
10. Грам-позитивне бактерије боје се љубичасто-плаво, а Грам негативне бактерије боје се ружичасто-црвено.

1420

На основу члана 117. став 3. Закона о водама ("Службени гласник Републике Српске", бр. 50/06, 92/09, 121/12 и 74/17) и члана 76. став 2. Закона о републичкој управи ("Службени гласник Републике Српске", број 115/18), министар пољопривреде, шумарства и водопривреде д о н о с и

ПРАВИЛНИК

О ВОДНОМ ИНФОРМАЦИОНОМ СИСТЕМУ

Члан 1.

Овим правилником прописују се успостављање и управљање Водним информационом системом, елементи и садржај и начин прикупљања, чувања, дистрибуције и презентације података Водног информационог система.

Члан 2.

Водни информациони систем је мрежно оријентисан, модуларни систем који обезбјеђује прикупљање, уношење, одржавање, анализу, презентацију и дистрибуцију података о: површинским и подземним водама, класама и категоријама водних тијела, коришћењу вода, водном земљишту, водним грађевинама, заштити од вода, заштити вода, мониторингу, метеоролошким станицама, водној документацији, водној карактеризацији, мапама опасности и ризика од поплава, плановима управљања ризиком од поплава, научно-техничким и другим подацима значајним за управљање водама.

Члан 3.

Појмови коришћени у овом правилнику имају сљедеће значење:

- 1) просторни подаци су сви они подаци који имају директну или индиректну везу са специфичном локацијом или географским подручјем,
- 2) алфанумерички подаци су сви они подаци који за начин представљања и обраду информација, поред цифара, користе и слова и специјалне симболе.

Члан 4.

Јавна установа "Воде Српске" организује, успоставља и управља Водним информационом системом, који обухвата обласни ријечни слив ријеке Саве и обласни ријечни слив ријеке Требишњице.

Члан 5.

Водни информациони систем успоставља се у складу са техничким нормама и стандардима за развој и управљање информационом системима, с циљем:

- 1) формирања јединственог система прикупљања, евидентирања и чувања података из сектора вода,
- 2) лакше размјене података, ефикаснијег претраживања и анализе база података, надзора над процесима и појавама у простору ради доношења одговарајућих одлука,
- 3) повећања продуктивности и ефикасности у процесу послова управљања водама и побољшања комуникације међу субјектима,
- 4) унапређивања општег квалитета процеса планирања и одлучивања,
- 5) увођења јединствених стандарда, метода и поступака обраде података из сектора вода.

Члан 6.

(1) Водни информациони систем садржи сљедеће модуле података о:

1) површинским водама (подаци о водотоцима, водама стајајницама, класама и категоријама, ријечним базенима и др.),

2) коришћењу вода (подаци о захватима воде, системима за снабдијевање водом, хидротехничким објектима, пловним путевима и праћењу концесија и др.),

3) подземним водама (подаци о изворима, бушеним објектима, копанним објектима, геоморфолошким објектима, трасирању подземних вода, цјелинама подземних вода и др.),

4) водним грађевинама (подаци о документацији, уздужним водним грађевинама, попречним водним грађевинама и др.),

5) заштити од вода (подаци о одбрани од поплава, заштитним објектима и баријерама, уређењу водотока, поплавама, геометрији водотока и др.),

6) заштити вода (подаци о заштићеним подручјима, потенцијалним загађивачима, системима одводње, инцидентним загађењима вода и др.),

7) мониторингу (подаци о станицама за посматрање вода, хидролошким станицама, станицама за посматрање квалитета воде, станицама за посматрање нивоа воде, биолошком мониторингу и др.),

8) метеоролошким станицама (подаци о метеоролошким станицама, локацијама, документација о метеоролошким мјерењима, карактеристичним мјерењима, временским подацима о метеоролошким мјерењима и др.),

9) водној карактеризацији (подаци о карактеристикама водних подручја и ријечних базена за потребе израде плана управљања ријечним базенима),

10) мапама опасности и мапама ризика од поплава (подаци о плавним зонама и ризицима за различите вјероватноће поплава),

11) водној документацији (подаци о захтјевима за издавање водних аката, издатим водним смјерницама, водним сагласностима и водним дозволама, управним процесима и др.),

12) водном земљишту (подаци о катастарским општинама и катастарским парцелама које обухвата водно земљиште, власничким односима, врсти водног добра и коришћењу водног земљишта и др.),

13) регистру евиденција о инспекцијском прегледу,

14) одводњавању и наводњавању (подаци о системима за одводњавање, системима за наводњавање, о земљишту, мелиорационом и сливним подручјима и др.),

15) катастру бујица и модела осјетљивости (подаци о ерозији, типовима, категоријама, предузетим мјерама и др.),

16) плановима управљања ризиком од поплава (подаци добијени из планова управљања ризиком од поплава, неграђевинске мјере за заштиту од вода, правилници и остали акти и др.),

17) остало (подаци о адресару, организацији управљања, локацијама, научно-техничким и другим стварима битним за управљање водама).

(2) Подаци из става 1. овог члана разврстају се на просторне и алфанумеричке.

Члан 7.

Подаци који се уносе у Водни информациони систем прикупљају се од:

- 1) републичких органа и организација,
- 2) јединица локалне самоуправе,
- 3) привредних субјеката чије активности имају утицај на водни режим,
- 4) јавних предузећа из области водопривреде.