

MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, RIBARSTVA I RURALNOG RAZVOJA

2843

Na temelju članka 10. stavka 4., članka 11. stavka 5., članka 14. stavka 4. i članka 50. Zakona o biljnom zdravlju (»Narodne novine«, br. 75/05), ministar poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja donosi

PRAVILNIK

O IZMJENAMA I DOPUNAMA PRAVILNIKA O PROVOĐENJU SUSTAVNOG ISTRAŽIVANJA I MJERA ZA SPRJEČAVANJE ŠIRENJA I SUZBIJANJE SMEĐE TRULEŽI GOMOLJA KRUMPIRA I BAKTERIJSKOG VENUĆA KRUMPIRA I RAJČICE, KOJU PROUZROKUJE BAKTERIJA RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL.

Članak 1.

U Pravilniku o provođenju sustavnog istraživanja i mjera za sprječavanje širenja i suzbijanje smeđe truleži gomolja krumpira i bakterijskog venuća krumpira i rajčice, koju prouzrokuje bakterija *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (»Narodne novine« br. 119/06) u članku 1. briše se točka i dodaju se riječi: »i postupci laboratorijskog testiranja za dijagnosticiranje, detekciju i identifikaciju bakterije *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.«.

Članak 2.

Članak 4. stavak 2. mijenja se i glasi:

»(2) Laboratorijska testiranja iz stavka 1. točke 1. i 3. ovoga članka provode se sukladno postupcima iz Priloga II »SHEMA TESTIRANJA ZA DIJAGNOSTICIRANJE, DETEKCIJU I IDENTIFIKACIJU BAKTERIJE *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.« koji je tiskan uz ovaj Pravilnik i njegov je sastavni dio (u daljnjem tekstu: propisani postupci).«

Članak 3.

Prilog tiskan uz Pravilnik o provođenju sustavnog istraživanja i mjera za sprječavanje širenja i suzbijanje smeđe truleži gomolja krumpira i bakterijskog venuća krumpira i rajčice, koju prouzrokuje bakterija *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. postaje Prilog I.

Članak 4.

Ovaj Pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objave u »Narodnim novinama«.
Klasa: 011-02/08-01/19

Urbroj: 525-2-08-1
Zagreb, 16. srpnja 2008.

Ministar poljoprivrede,
ribarstva i ruralnog razvoja
mr. sc. Božidar Pankreć, v. r.

PRILOG II.

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

Prikazana shema testiranja opisuje različite postupke za:

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

OPĆA NAČELA

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

S obzirom da protokoli uključuju detekciju karantenskog organizma i uključivat će uporabu vijabilnih kultura *R. solanacearum* kao kontrolnih materijala, postupci će se morati izvoditi u primjerenim karantenskim uvjetima s odgovarajućom opremom za zbrinjavanje otpada te prema uvjetima dozvola koje izdaju nadležna tijela za biljnu karantenu.

Parametri testiranja moraju osigurati dosljednu i ponovljivu detekciju onih razina *R. solanacearum* prema propisanim pragovima detekcije za pojedine metode.

Precizna priprema pozitivnih kontrola je nužna.

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

Sumnja na zarazu, kao što je navedeno u članku 6. Pravilnika o provođenju sustavnog istraživanja i mjera za sprečavanje širenja i suzbijanje smeđe truleži gomolja krumpira i bakterijskog venuća krumpira i rajčice, koju prouzrokuje bakterija *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (u daljnjem tekstu: Pravilnik), podrazumijeva pozitivan rezultat testa za dijagnosticiranje ili brzog testa provjere provedenog na uzorku kao što je prikazano u dijagramima toka. Pozitivan rezultat dobiven u prvom brzom testu provjere (IF test, PCR/FISH, selektivna izolacija) mora se potvrditi drugim testom provjere koji se temelji na drugom biološkom načelu.

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

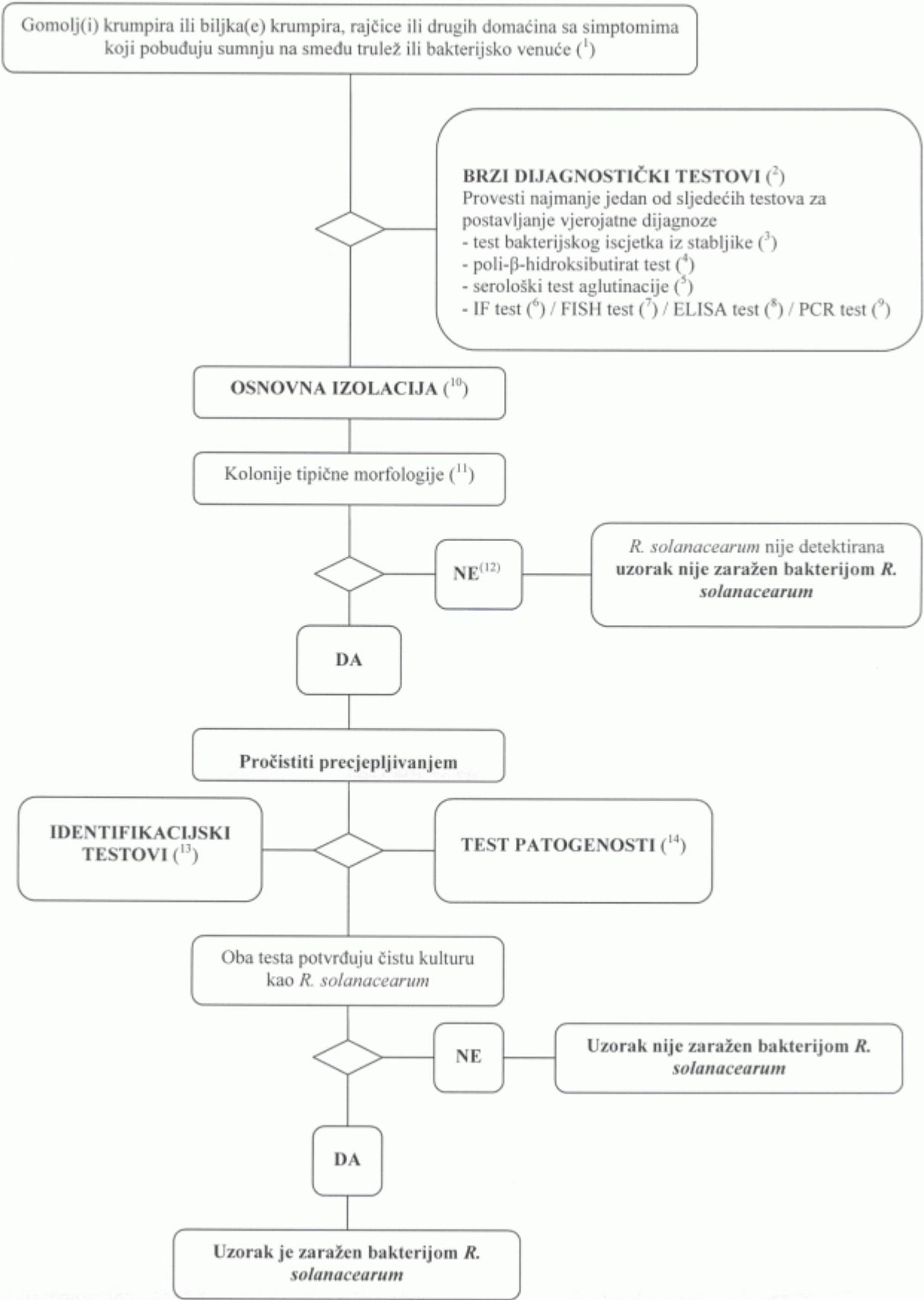
R. solanacearum.

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

ODJELJAK I. PRIMJENA SCHEME TESTIRANJA

1. Shema za detekciju i dijagnosticiranje uzročnika smeđe truleži i bakterijskog venuća (R. solanacearum) u gomoljima krumpira te biljkama krumpira, rajčice ili drugim biljkama domaćinima sa simptomima smeđe truleži ili bakterijskog venuća

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



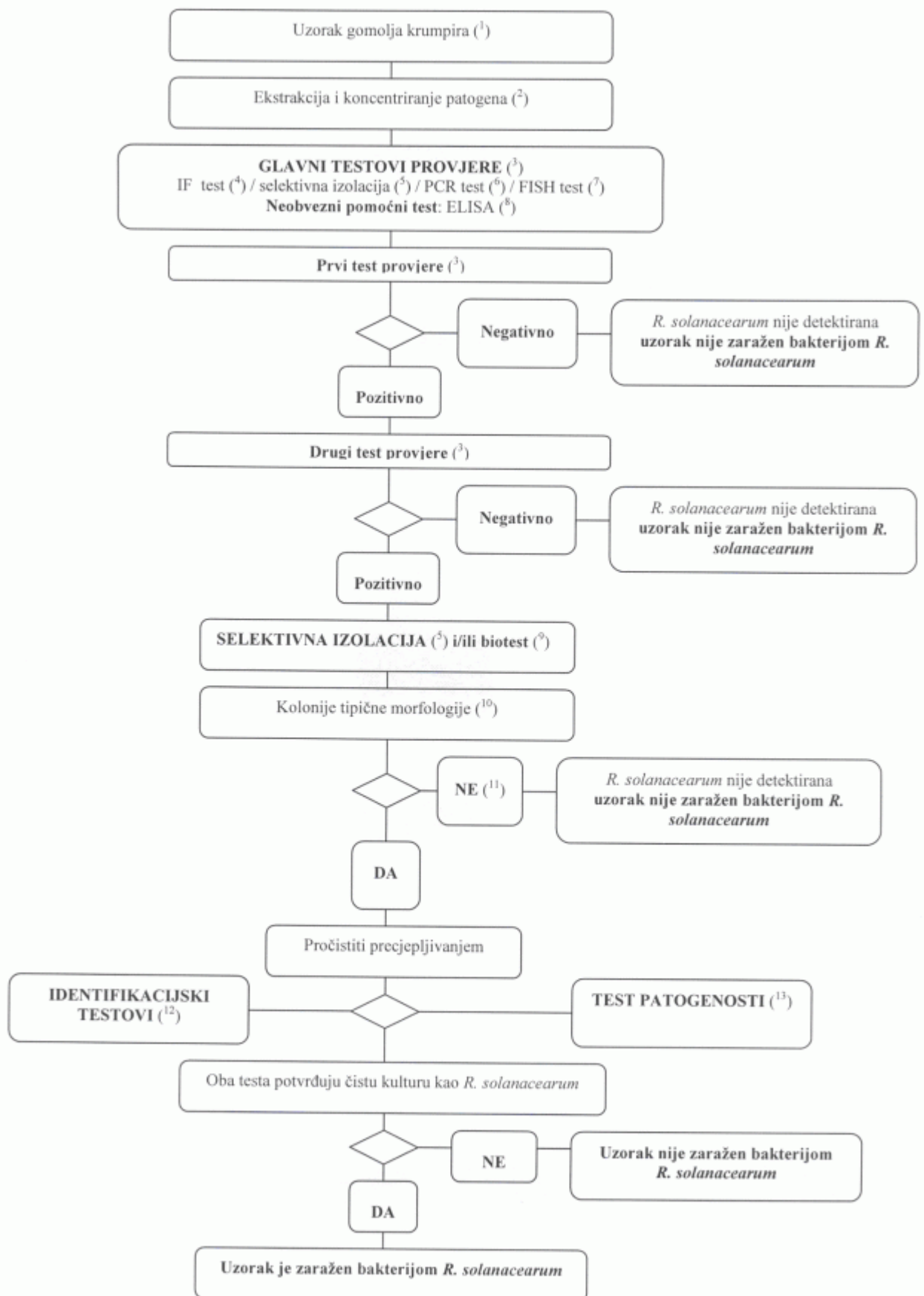
- (1) Opis simptoma naveden je u Odjeljku II.1.
- (2) Brzi dijagnostički testovi olakšavaju postavljanje vjerojatne dijagnoze, ali nisu nužni. Negativan rezultat ne jamči uvijek odsutnost patogena.
- (3) Test bakterijskog iscjetka iz provodnog tkiva stabljike opisan je u Odjeljku VI.A.1.
- (4) Test za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

2. Shema detekcije i identifikacije bakterije *R. solanacearum* u uzorcima gomolja krumpira bez simptoma

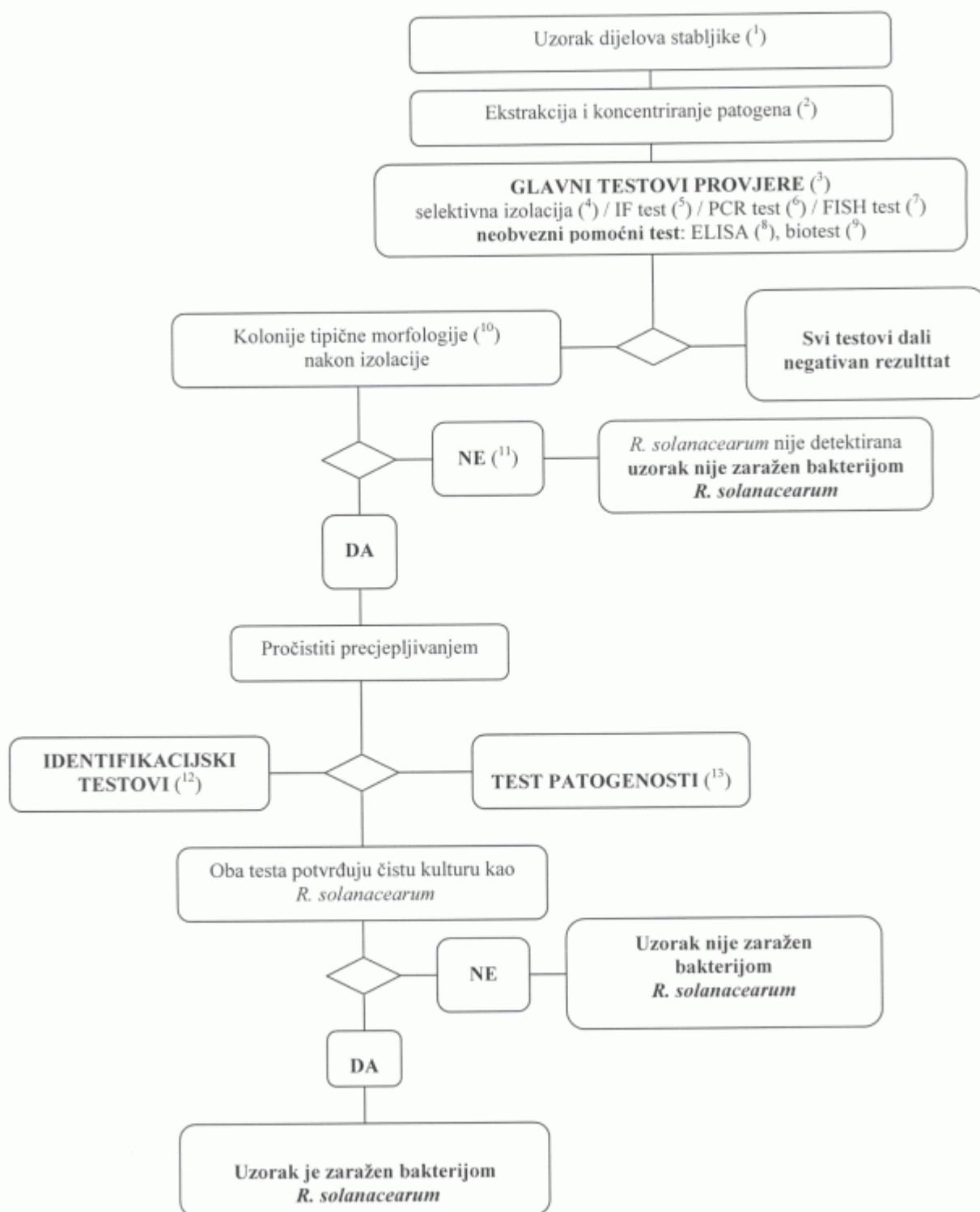
Načelo:

Postupak testiranja namijenjen je za detekciju skrivene zaraze u gomoljima krumpira. Pozitivan rezultat iz najmanje dva testa provjere (3), koji se temelje na različitim biološkim načelima, mora se dopuniti izolacijom patogena nakon čega slijedi, u slučaju izolacije tipičnih kolonija, potvrda čiste kulture kao *R. solanacearum*. Pozitivan rezultat dobiven samo jednog od testova provjere nije dovoljan da bi se uzorak smatrao zaraženim.

Testovi provjere i izolacija moraju omogućiti prag detekcije 103 do 104 stanica/ml resuspendiranog taloga uključenog kao pozitivna kontrola u svakoj seriji testova.



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



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

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

(3) Ako su rezultati najmanje dva testa, koji se temelje na različitim biološkim načelima, pozitivni, potrebno je provesti izolaciju i potvrdu. Provedite barem jedan test provjere. Kada

je rezultat tog testa negativan, smatra se da je taj uzorak negativan. U slučaju da je rezultat tog testa pozitivan, potrebno je provesti drugi ili više testova provjere, koji se temelje na različitim biološkim načelima, kako bi se potvrdio pozitivan rezultat. Ako su rezultati drugih ili ostalih testova negativni, smatra se da je taj uzorak negativan. Daljnji testovi nisu potrebni.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ODJELJAK II.

PODROBNE METODE ZA DETEKCIJU BAKTERIJE *R. SOLANACEARUM* U GOMOLJIMA KRUMPIRA, TE BILJKAMA KRUMPIRA, RAJČICE ILI DRUGIM BILJAKAMA DOMAĆINIMA SA SIMPTOMIMA SMEĐE TRULEŽI ODNOSNO BAKTERIJSKOG VENUĆA

1. Simptomi

(vidi mrežnu stranicu <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

1.1. Simptomi na krumpiru

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

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

1.2. Simptomi na rajčici

Biljka rajčice. Prvi vidljivi simptom je povenulost najmladih listova. U uvjetima koji su povoljni za patogen (temperatura tla oko 25 °C; zasićenost vlagom) u roku od nekoliko dana dolazi do epinastije i venuća samo jedne strane ili cijele biljke što dovodi do potpunog propadanja. U manje povoljnim uvjetima (temperatura tla manja od 21 °C) venuće se rjeđe pojavljuje, ali se na stabljici može razviti veliki broj adventivnog korijenja. Moguće je uočiti

kao vodom natopljene pruge koje se protežu duž stabljike, od njene baze, koje su trag nekroze u provodnom sustavu. Ako se stabljika unakrsno prereže, iz provodnog tkiva čija je boja promijenjena u smeđu, curi bijeli ili žućkasti bakterijski iscjedak.

1.3. Simptomi na drugim biljkama domaćinima

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

2. Brzi testovi provjere

Brzi testovi provjere olakšavaju postavljanje vjerojatne dijagnoze, ali nisu presudni.

Primijenite jedan ili više sljedećih validiranih testova:

2.1. Test iscjetka iz stabljike

(vidi Odjeljak VI.A.1.)

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

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

2.3. Serološki testovi aglutinacije

(vidi Odjeljak VI.A.3.)

2.4. Ostali testovi

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

3. Postupak izolacije

(a) Uzmite bakterijski iscjedak ili dijelove tkiva promijenjene boje iz provodnog prstena gomolja krumpira ili iz provodnih snopova stabljike krumpira, rajčice ili drugih venućih biljaka domaćina. Suspendirajte u manjoj količini sterilne destilirane vode ili 50 mM fosfatnog pufera (Dodatak 4) te ostavite 5 do 10 minuta.

(b) Pripremite niz decimalnih razrjeđenja suspenzije.

(c) Prenesite 50-100 μl suspenzije i razrjeđenja na uobičajenu hranjivu podlogu (NA, YPGA ili SPA; vidi Dodatak 2.) i/ili na Kelmanovu tetrazolij-podlogu (Dodatak 2.) i/ili na validiranu selektivnu podlogu (npr. SMSA; vidi Dodatak 2.). Razmažite primjenjujući odgovarajuću tehniku nanošenja razrjeđenja na podlogu. Ako se smatra korisnim, pripremite odvojene podloge s razrijeđenom staničnom suspenzijom bakterije *R. solanacearum* biovar 2 za pozitivnu kontrolu.

(d) Inkubirajte podloge od dva do šest dana na 28 °C.

– Na uobičajenoj hranjivoj podlozi virulentni izolati bakterije *R. solanacearum* stvaraju plosnate, nepravilne i tekuće kolonije biserne kremasto-bijele boje, često s karakterističnim spiralama u sredini. Nevirulentni oblici bakterije *R. solanacearum* stvaraju male, okrugle, netekuće, maslaste kolonije koje su u cijelosti kremasto-bijele boje.

– Na Kelmanovoj tetrazolij-podlozi i na SMSA podlozi spirale su krvavo crvene boje. Nevirulentni oblici bakterije *R. solanacearum* stvaraju male, okrugle, netekuće, maslaste kolonije koje su u cijelosti tamno crvene boje.

4. Identifikacijski testovi za bakteriju *R. solanacearum*

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

ODJELJAK III.

1. Podrobne metode za detekciju i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u uzorcima gomolja krumpira bez simptoma

1.1. Priprema uzorka

Napomena:

- standardna veličina uzorka je 200 gomolja po testu. Intenzivnije uzorkovanje zahtijeva više testova na uzorcima ove veličine. Veći broj gomolja u uzorku dovest će do inhibicije ili će otežati tumačenje rezultata. Međutim, postupak se može prikladno primijeniti za uzorke s manje od 200 gomolja, kada je na raspolaganju manje gomolja;
- validacija svih metoda za detekciju, koje su opisane u daljnjem tekstu, temelji se na testiranju uzoraka od 200 gomolja;
- ekstrakt krumpira koji je opisan u daljnjem tekstu može se koristiti i za detekciju bakterije *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* koja uzrokuje prstenastu trulež gomolja krumpira.

Neobvezna obrada prije pripreme uzorka:

(a) Inkubirajte uzorak na 25-30 °C u razdoblju do dva tjedna prije provođenja testova, kako bi se potaklo umnožavanje populacija bakterije *R. solanacearum*.

(b) Operite gomolje. Upotrijebite prikladna dezinfekcijska sredstva (spojeve klora kada će se provesti PCR test kako bi se uklonila moguća DNK patogena) i deterdžente između svakog uzorka. Osušite gomolje na zraku. Postupak pranja je posebice koristan (ali ne obavezan) za uzorke s previše tla i ako će se provesti PCR test ili direktna izolacija.

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

(vidi mrežnu stranicu <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Napomena:

Odvojite sve (trule) gomolje s mogućim simptomima smeđe truleži i testirajte ih posebno.

Ako se pri izrezivanju jezgre pupka uoče mogući simptomi smeđe truleži, taj se gomolj mora vizualno pregledati i prerezati blizu pupka. Svaki prerezani gomolj sa sumnjivim simptomima treba držati najmanje dva dana na sobnoj temperaturi kako bi suberizirao, te čuvati u hladnjaku (na temperaturi od 4 do 10 °C) u odgovarajućim karantenskim uvjetima. Svi se gomolji, uključujući i one sa sumnjivim simptomima, trebaju čuvati u skladu s člankom 7. Pravilnika.

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

Obradite jezgre pupaka jednim od sljedećih postupaka:

(a) dodajte dovoljnu količinu (oko 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4) da pokrije jezgre pupaka i tresite na rotacijskoj tresilici (50-100 okretaja/min) 4 sata na temperaturi ispod 24 °C ili 16 do 24 sata uz hlađenje,

ili

(b) homogenizirajte jezgre pupaka s dovoljnom količinom (oko 40 ml) ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4), bilo u miješalici (npr. Waring ili Ultra Thurax) ili drobljenjem u dobro zatvorenoj vrećici za maceraciju za jednokratnu uporabu (npr. vrećice Stomacher ili Bioreba

od čvrstog politena, 150 mm x 250 mm, sterilizirane zračenjem) koristeći gumeni bat ili prikladnu drobilicu (npr. Homex).

Napomena:

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

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

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

1.1.5. Resuspendirajte talog u 1.5 ml pufera za talog (Dodatak 4). Upotrijebite 500 µl za testiranje na *R. solanacearum*, 500 µl za *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* i 500 µl kao referentni materijal. U referentni alikvot od 500 µl i u preostale alikvote koji se testiraju dodajte sterilni glicerol do konačne koncentracije od 10 do 25 % (v/v), snažno promiješajte u vrtložnoj mješalici te pohranite na temperaturi od –16 do –24 °C (tjednima) ili od –68 do –86 °C (mjesecima). Tijekom testiranja, alikvote koji se koriste čuvajte na temperaturi od 4 do 10 °C.

Ne preporučuje se višekratno zamrzavanje i odmrzavanje.

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

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

1.2. Testiranje

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

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

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

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

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

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

Biotest (vidi Odjeljak VI.A.9.)

2. Podrobne metode za detekciju i identifikaciju bakterije *R. solanacearum* u uzorcima biljaka krumpira, rajčice ili drugih biljaka domaćina bez simptoma

2.1. Priprema uzorka

Napomena:

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

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

Presadnice rajčice iz rasadnika. Čistim dezinficiranim nožem odrežite dio veličine 1 cm s donjeg dijela svake stabljike, neposredno iznad razine tla.

Biljke rajčice iz polja ili staklenika. Čistim, dezinficiranim nožem odrežite najniži postrani izdanak na svakoj biljci režući tik iznad spoja sa stabljikom. Sa svakog bočnog izdanka

odrežite donji dio veličine 1 cm.

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

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

Napomena:

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

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

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

ili

(b) odmah obradite drobljenjem u čvrstoj vrećici za maceraciju (npr. Stomacher ili Bioreba) s odgovarajućom količinom ekstrakcijskog pufera (Dodatak 4) koristeći gumeni bat ili prikladnu drobilicu (npr. Homex). Ako to nije moguće, dijelove stabljika čuvajte u hladnjaku najdulje 72 sata ili na sobnoj temperaturi najdulje 24 sata.

2.1.3. Nakon 15 minuta taloženja, izlijte supernatant.

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

1.1.5.

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

2.2. Testiranje

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

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

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

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

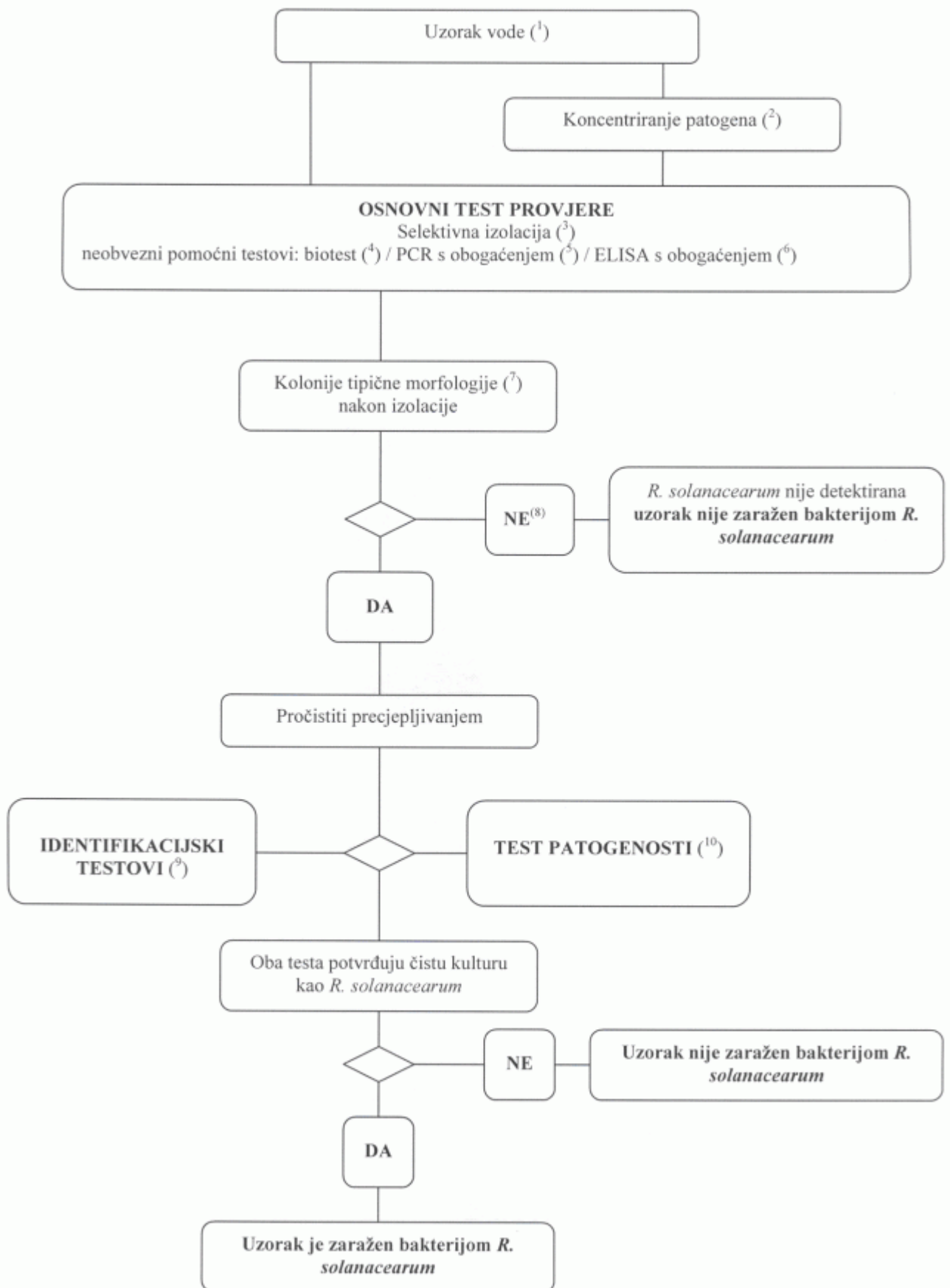
FISH test (vidi Odjeljak VI.A.7.)

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

Biotest (vidi Odjeljak VI.A.9.)

ODJELJAK IV.

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



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

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

Načelo

Validirani postupak opisan u ovom odjeljku može se primijeniti za detekciju patogena u uzorcima površinske vode kao i za ispitivanje uzoraka tekućeg otpada nastalog pri preradi krumpira ili otpadnih voda. Međutim, važno je napomenuti da će očekivana osjetljivost detekcije ovisiti o supstratu. Na osjetljivost izolacije utječu populacije konkurentnih saprofitnih bakterija koje su općenito veće u otpadnim vodama nastalim pri preradi i obradi krumpira nego u površinskim vodama. Dok se može očekivati da će se dalje opisanim postupkom detektirati tek 103 stanica po litri površinske vode, osjetljivost detekcije u tekućem otpadu nastalom pri preradi krumpira i u otpadnim vodama bit će vjerojatno znatno niža. Stoga se preporučuje testirati otpadne vode poslije svakog postupka pročišćavanja (npr. sedimentiranja ili filtriranja) tijekom kojega se smanjuju populacije saprofitnih bakterija. Kada ocjenjujemo pouzdanost dobivenih negativnih rezultata, treba uzeti u obzir ograničenja u osjetljivosti postupka testiranja. Iako se ovaj postupak uspješno primjenjuje u istraživanjima čiji je cilj utvrditi prisutnost ili odsutnost patogena u površinskim vodama, treba biti svjestan njegovog ograničenja ako se koristi u sličnim istraživanjima tekućeg otpada nastalog pri preradi krumpira ili otpadnih voda.

2.1. Priprema uzorka

Napomena:

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

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

te osigurajte uzimanje uzoraka i iz pritoka te tekućice.

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

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

(a) centrifugirajte 30 do 50 ml poduzorka na 10 000 g 10 minuta (ili 7 000 g 15 minuta) po mogućnosti na temperaturi od 4 do

10 °C, uklonite supernatant i resuspendirajte talog u 1 ml pufera za talog (Dodatak 4.);

(b) membranskom filtracijom (najmanja veličina pora 0,45 µm) nakon koje se filter ispiru u 5 do 10 ml pufera za talog, koji se sakuplja. Ova je metoda prikladna za veće količine vode koja sadrži mali broj saprofita.

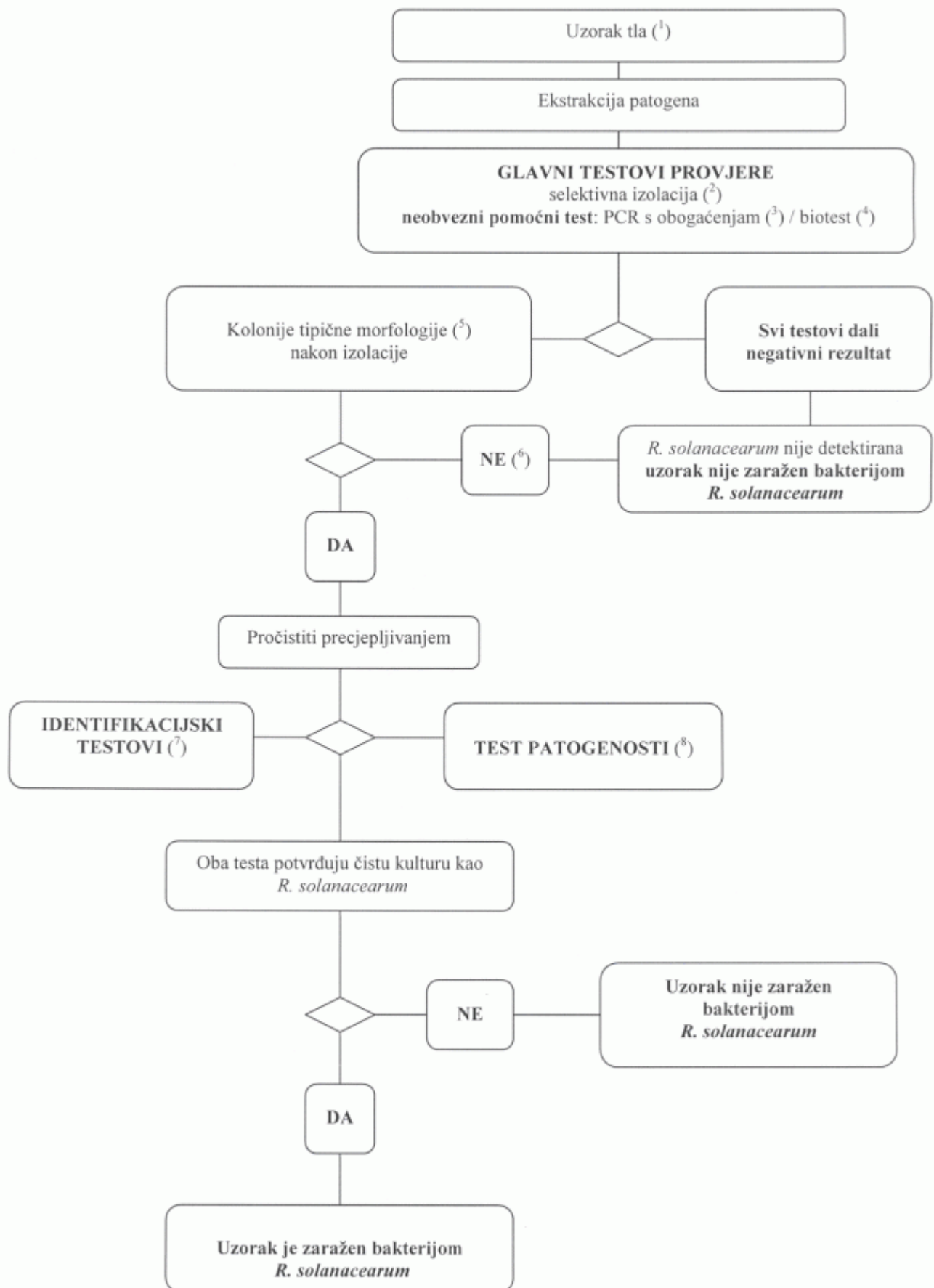
Koncentriranje se obično ne preporučuje za uzorke tekućeg otpada nastalog pri preradi krumpira ili uzorke otpadnih voda jer će veće populacije konkurentnih saprofitnih bakterija spriječiti detekciju bakterije *Ralstonia solanacearum*.

2.2. Testiranje

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

ODJELJAK V.

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



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

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

Načela

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

Treba uzeti u obzir ograničenja u osjetljivosti ovog postupka testiranja pri ocjenjivanju pouzdanosti dobivenih negativnih rezultata kao i kada ovaj postupak primjenjujemo u istraživanjima čiji je cilj utvrditi prisutnost ili odsutnost patogena u tlu ili mulju.

Najpouzdaniji način utvrđivanja prisutnosti patogena u tlu na polju je taj da posadimo biljku domaćina koja je osjetljiva na taj patogen te pratimo hoće li doći do infekcije, ali čak ni ovom metodom neće se otkriti niske razine kontaminacije.

2.1. Priprema uzorka

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

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

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

2.2. Testiranje

Vidi dijagram i opis testova u odgovarajućim dodacima.

ODJELJAK VI.

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

A. DIJAGNOSTIČKI TESTOVI I TESTOVI ZA DETEKCIJU

1. Test iscjetka iz stabljike

Vjerojatna prisutnost bakterije *R. solanacearum* u stabljikama uvelih biljaka krumpira, rajčice ili drugih biljaka domaćina može se utvrditi sljedećim jednostavnim testom: odrežite stabljiku neposredno iznad razine tla. Odrezani kraj stavite u epruvetu s čistom vodom. Pratite hoće li

nakon nekoliko minuta iz prerezanih provodnih snopova početi spontano izlaziti karakteristične niti bakterijske sluzi.

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

1. Na mikroskopskom stakalcu pripremite razmaz bakterijskog iscjetka iz zaraženog tkiva ili iz 48-satne kulture sa hranjive podloge YPGA ili SPA (vidi Dodatak 2).

2. Za pozitivnu kontrolu pripremite razmaze biovara 2, bakterije *R. solanacearum* i, ako smatrate korisnim, za negativnu kontrolu razmaz bakterijske vrste za koju je poznato da je negativna na PHB.

3. Razmaze ostavite da se osuše na zraku i donju stranu svakog stakalca brzo povucite iznad plamena da se razmazi fiksiraju.

4. Obojite preparat ili Nilskim plavilom ili Sudanskim crnilom te promatrajte pod mikroskopom kako je opisano u daljnjem tekstu:

Nilsko plavilo test:

(a) Prelijte svako stakalce s 1 %-tnom vodenom otopinom Nilskog plavila A i inkubirajte 10 minuta na 55 °C.

(b) Ocijedite otopinu boje. Isperite kratko pod blagim mlazom vode iz slavine. Višak vode uklonite upijajućim papirom.

(c) Prelijte razmaz 8 %-tnom vodenom otopinom octene kiseline i inkubirajte jednu minutu na sobnoj temperaturi.

(d) Isperite kratko pod blagim mlazom vode iz slavine. Višak vode uklonite upijajućim papirom.

(e) Ponovo navlažite kapljicom vode i pokrijte pokrovnim stakalcem.

(f) Pregledajte obojeni razmaz epifluorescentnim mikroskopom na 450 nm, imerzijskim objektivom povećanja od 600 do 1000 x (uljna ili vodena imerzija).

(g) Pregledajte da li je prisutna svijetlonarančasta fluorescencija zrnaca PHB-a. Također pregledajte pod normalnim svjetlom kako biste se uvjerali da su zrnca unutarstanična i da je stanična morfologija tipična za bakteriju *R. solanacearum*.

Sudansko crnilo test:

(a) Prelijte svako stakalce 0,3 %-tnom otopinom Sudanskog crnila B u 70 %-tnom etanolu i inkubirajte 10 minuta na sobnoj temperaturi.

(b) Ocijedite otopinu boje, kratko isperite pod mlazom vode iz slavine i višak vode uklonite upijajućim papirom.

(c) Stakalca nakratko umočite u ksilol te ih osušite na upijajućem papiru. Oprez! Ksilol je opasan za zdravlje. Poduzmite potrebne sigurnosne mjere i radite u digestoru.

(d) Prelijte stakalca 0,5 %-tnom (w/v) vodenom otopinom safranina i ostavite 10 sekundi na sobnoj temperaturi. Oprez! Safranin je opasan za zdravlje. Poduzmite potrebne sigurnosne mjere i radite u digestoru.

(e) Isperite pod blagim mlazom vode iz slavine, osušite na upijajućem papiru te pokrijte pokrovnim stakalcem.

(f) Pregledajte obojene razmaze pod mikroskopom koji koristi prolazno svjetlo, uljnim imerzijskim objektivom povećanja od 1000 x.

(g) Pregledajte uočavaju li se plavo-crno obojena zrnca PHB-a u stanicama *R. solanacearum* s ružičasto obojenim staničnim stjenkama.

3. Serološki test aglutinacije

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

(a) pomiješajte kapljice suspenzije obilježenog antitijela i bakterijskog iscjetka (oko 5 μ l

svakog) na predmetnim stakalcima s više jažica;

(b) pripremite pozitivne i negativne kontrole koristeći suspenzije *R. solanacearum* biovar 2 i heterolognog soja;

(c) promatrajte hoće li doći do aglutinacije u pozitivnim uzorcima nakon 15 sekundi laganog miješanja.

4. Selektivna izolacija

4.1. Nasađivanje na selektivnu podlogu

Napomena:

Prije nego ovu metodu prvi put primijenite, obavite prethodne testove kako biste osigurali ponovljivu detekciju 10³ do 10⁴ jedinica koje stvaraju kolonije (CFU) bakterije *R. solanacearum* po ml, a koje su dodane ekstraktima uzoraka koji su prema ranijim testiranjima negativni.

Koristite primjereno validiranu selektivnu hranjivu podlogu kao što je SMSA (prilagođenu prema Elphinstone i sur., 1996; vidi Dodatak 2).

Trebate dobro paziti da razlikujete *R. solanacearum* od drugih bakterija čije kolonije mogu rasti na toj hranjivoj podlozi. Nadalje, kolonije *R. solanacearum* mogu biti netipične morfologije ako su podloge prenatrpane ili ako su prisutne antagonističke bakterije. Ako se sumnja na učinke kompeticije ili antagonizma, uzorak treba ponovo testirati drugim testom. Najveća osjetljivost detekcije ovom metodom može se očekivati ako se koriste svježe pripremljeni ekstrakti uzoraka. Međutim, ova se metoda može primjenjivati i na ekstraktima koji su bili pohranjeni s glicerolom na temperaturi od – 68 do – 86 °C.

Za pozitivnu kontrolu pripremite decimalna razrjeđenja suspenzije od 10⁶ CFU/ml virulentnog soja biovara 2, *R. solanacearum* (npr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Kako bi se spriječila svaka mogućnost kontaminacije, pozitivne kontrole pripremite potpuno odvojeno od uzoraka koje ćete ispitivati.

Za svaku novopripremljenu seriju selektivne hranjive podloge treba, prije nego se upotrijebi za testiranje rutinskih uzoraka, provjeriti da li je prikladna za rast patogena.

Kontrolni materijal testirajte na isti način kao i uzorke.

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

4.1.2. Inkubirajte podloge na 28 °C. Očitajte podloge nakon 48 sati, a nakon toga svaki dan u razdoblju do šest dana. Tipične kolonije *R. solanacearum* na hranjivoj podlozi SMSA mliječno-bijele su boje, plosnate, nepravilnog oblika i tekuće, a nakon tri dana inkubacije sredina im postaje ružičasta do krvavo-crvena s unutarnjim prugama ili spiralama (vidi mrežnu stranicu <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Napomena:

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

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

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

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

Tumačenje rezultata selektivne izolacije

Selektivna izolacija je negativna ako se nakon šest dana ne uočavaju nikakve bakterijske

kolonije ili ako se ne pronađu sumnjive kolonije tipične za *R. solanacearum*, pod uvjetom da se ne sumnja na inhibiciju zbog konkurencije ili antagonizma drugih bakterija i da su tipične kolonije *R. solanacearum* pronađene u pozitivnim kontrolama.

Selektivna izolacija je pozitivna ako se izdvoje sumnjive kolonije *R. solanacearum*.

4.2. Postupak obogaćivanja

Upotrijebite validirani medij za obogaćivanje kao što je modificirani Wilbrink tekući medij (vidi Dodatak 2).

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

4.2.1. Za obogaćivanje za PCR test prenesite 100 µl ekstrakta uzorka u 10 ml tekućeg medija za obogaćivanje (Dodatak 2) koji je prethodno podijeljen u alikvote u epruvete ili bočice bez DNK. Za obogaćivanje za ELISA test mogu se koristiti veći udjeli ekstrakta uzorka u tekućem mediju (npr. 100 µl u 1,0 ml tekućeg medija za obogaćivanje).

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

4.2.3. Dobro promiješajte prije korištenja u ELISA ili PCR testovima

4.2.4. S obogaćenim tekućim medijem postupajte isto kao i s uzorcima u prije opisanim testovima.

Napomena:

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

5. IF Test

Načelo

Uporaba IF testa kao osnovnog testa provjere preporuča se zbog njegove dokazane dosljednosti pri postizanju zahtijevanih pragova detekcije.

Kada se IF test koristi kao glavni test provjere i ako je IF očitavanje pozitivno, mora se provesti izolacija, PCR test ili FISH test kao drugi test provjere. Kada se IF test koristi kao drugi test provjere i IF očitavanje je pozitivno, potrebno je daljnje testiranje prema dijagramu toka kako bi se dovršila analiza.

Napomena:

Koristite validirani izvor antitijela za *R. solanacearum*

(vidi mrežnu stranicu <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Preporuča se da se titar odredi za svaku novu seriju antitijela. Titar se definira kao najveće razrjeđenje kod kojeg dolazi do optimalne reakcije pri testiranju suspenzije koja sadrži 10⁵ do 10⁶ stanica po ml homolognog soja bakterije *R. solanacearum* uz korištenje fluorescein-izotiocijanata (FITC) konjugiranih antitijela prema preporukama proizvođača. Svi validirani poliklonski serumi imali su IF titar najmanje 1:2000. Tijekom testiranja, treba koristiti antitijela u radnim razrjeđenjima koja su blizu ili jednaka titru.

Test treba provesti na svježe pripremljenim ekstraktima uzoraka. On se, po potrebi, može uspješno provesti i na ekstraktima koji su bili pohranjeni na temperaturi od – 68 do – 86 °C s dodatkom glicerola. Glicerol se može ukloniti dodavanjem 1 ml pufera za talog (Dodatak 4), ponovnim 15-minutnim centrifugiranjem na 7000 g i resuspendiranjem u jednakom volumenu pufera za talog. To je rijetko potrebno, naročito ako su uzorci plamenom fiksirani

na stakalca.

Za pozitivnu kontrolu pripremite odvojena stakalca s homolognim sojem ili nekim drugim referentnim sojem bakterije *R. solanacearum* suspendiranim u ekstraktu krumpira kako je navedeno u Dodatku 3B te, po izboru, u puferu.

Kao sličnu kontrolu na istom stakalcu trebalo bi, po mogućnosti, koristiti prirodno zaraženo tkivo (održavano liofilizacijom ili zamrzavanjem na -16 do -24 °C).

Za negativnu kontrolu mogu se upotrijebiti alikvoti ekstrakta uzoraka koji su u ranijem testiranju na *R. solanacearum* pokazali negativan rezultat.

U Dodatku 3. navedeni su standardizirani pozitivni i negativni kontrolni materijali koji se mogu upotrebljavati u ovom testu.

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

Kontrolni materijal testirajte jednako kao i uzorke.

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

(i) Za suspenzije taloga s relativno malo škroba:

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

(ii) Za ostale suspenzije taloga:

Pripremite decimalna razrjeđenja (1/10, 1/100) resuspendiranog taloga u puferu za talog. U jedan red jažica pipetom odmjerite standardni volumen (15 μ l je dovoljno za jažice promjera 6 mm – za veće jažice povećajte volumen) resuspendiranog taloga i svakog razrjeđenja.

Drugi se red može koristiti kao duplikat istog ili za drugi uzorak kako je prikazano na slici 2.

5.2 Ostavite da se kapljice osuše na sobnoj temperaturi ili ih zagrijavajte do temperature od 40 do 45 °C. Fiksirajte bakterijske stanice na stakalce bilo zagrijavanjem (15 minuta na 60 °C), provlačenjem kroz plamen, 95 %-tnim etanolom ili prema posebnim uputama dobavljača antitijela.

Prije daljnjih testiranja, fiksirana se stakalca mogu, po potrebi, kratko vrijeme (najviše do tri mjeseca) čuvati zamrznuta u suhom spremniku.

5.3. IF postupak

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

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

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

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

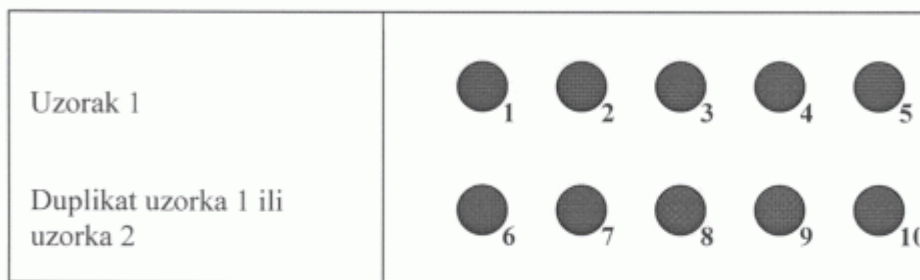
Slika 1. Priprema stakalca u skladu s točkama 5.1.(i) i 5.3.(i)

Razrjeđenja resuspendiranog taloga

Slika 1. Priprema stakalca u skladu s točkama 5.1.(i) i 5.3.(i)

Razrjeđenja resuspendiranog taloga

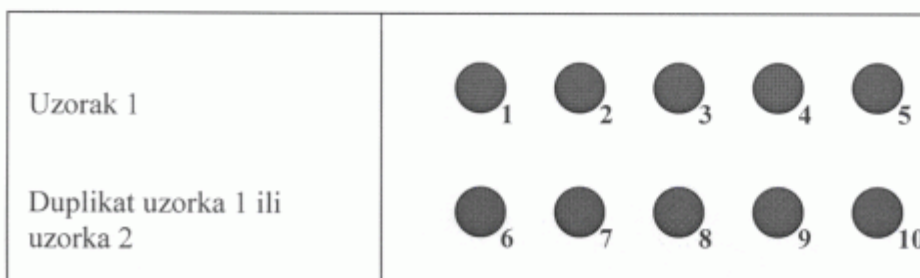
1/100 1/1 1/1 1/1 1/1 razrjeđenja resuspendiranog taloga
 (T = titar) T/2 T/4 T/2 T 2T dvostruka razrjeđenja seruma/antitijela



Slika 2. Priprema stakalca u skladu s točkama 5.1.(ii) i 5.3.(ii)

Radna razrjeđenja seruma/antitijela

1/100 1/1 1/1 1/1 1/1 decimalna razrjeđenja resuspendiranog taloga



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

5.3.1. Posložite stakalca na navlaženi upijajući papir. Svaku jažicu potpuno prekritje razrjeđenjem antitijela. Volumen antitijela koji se stavlja u pojedinu jažicu mora biti jednak volumenu stavljenog ekstrakta.

Slijedite sljedeći postupak ako nema posebnih uputa dobavljača antitijela:

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

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

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

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

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

Pažljivo osušite.

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

5.4. Očitavanje IF testa

5.4.1. Pregledajte pripremljena stakalca pod epifluorescentnim mikroskopom s odgovarajućim filtrima za ekscitaciju FITC-a, uz uljnu imerziju i povećanje od 500-1000 x. Pregledajte svaku jažicu preko dva međusobno okomita promjera i duž vanjskog ruba. Za uzorke u kojima je vidljiv mali broj stanica ili ih uopće nema pregledajte najmanje 40 mikroskopskih vidnih polja.

Najprije pregledajte stakalce s pozitivnom kontrolom. Stanice moraju snažno fluorescirati i moraju biti potpuno obojene na utvrđenom titru antitijela ili radnog razrjeđenja. U slučaju da kod obojenosti dođe do odstupanja, IF test se mora ponoviti (Odjeljak VI.A.5).

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

(vidi mrežnu stranicu <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

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

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

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

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

5.4.5. Tumačenje očitavanja IF testa

(i) Ako nađete jasno fluorescirajuće stanice karakteristične morfologije, odredite prosječni broj tipičnih stanica po mikroskopskom vidnom polju i izračunajte broj tipičnih stanica po ml resuspendiranog taloga (Dodatak 5).

Očitavanje IF testa je pozitivno za uzorke koji imaju najmanje 5×10^3 tipičnih stanica po ml resuspendiranog taloga. Uzorak se smatra potencijalno kontaminiranim i potrebno je daljnje testiranje.

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

6. PCR Testovi

Načela

Kada se PCR test koristi kao glavni test provjere i rezultat je pozitivan, mora se provesti IF test ili izolacija kao drugi obvezni test provjere. Kada se PCR test koristi kao drugi test provjere i rezultat je pozitivan, za postavljanje konačne dijagnoze potrebno je daljnje testiranje prema dijagramu.

Korištenje ove metode kao glavnog testa provjere preporučuje se samo ako ste stručno osposobljeni.

Napomena:

Preliminarno testiranje ovom metodom treba omogućiti ponovljivu detekciju 10^3 do 10^4 stanica bakterije *R. solanacearum* po ml, koje su dodane ekstraktima uzoraka koji su u prethodnim testiranjima dali negativni rezultat. Kako bi se postigao najveći stupanj osjetljivosti i specifičnosti u svim laboratorijima, mogu biti potrebni pokusi za optimizaciju metode.

Koristite validirane reagense i protokole za PCR (vidi Dodatak 6). Poželjno je odabrati metodu s internom kontrolom.

Poduzmite odgovarajuće mjere opreza kako biste izbjegli kontaminaciju uzorka ciljnom DNK. Da bi se spriječila kontaminacija ciljnom DNK, PCR test trebali bi obavljati iskusni stručnjaci, u specijaliziranim laboratorijima za molekularnu biologiju.

Negativne kontrole (za ekstrakciju DNK i PCR postupak) treba uvijek obraditi kao zadnje uzorke u postupku kako bi se vidjelo je li došlo do prijenosa DNK.

U PCR test treba uključiti sljedeće negativne kontrole:

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

Treba uključiti sljedeće pozitivne kontrole:

- alikvote resuspendiranih taloga u koje je dodana bakterija *R. solanacearum* (za pripremu vidi Dodatak 3B).
- suspenziju u vodi od 10^6 stanica/ml bakterije *R. solanacearum* virulentnog izolata (npr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vidi Dodatak 3 B).
- ako je moguće, u PCR testu upotrijebite i DNK ekstrahiranu iz pozitivnih kontrolnih uzoraka.

Da bi se izbjegla moguća kontaminacija, pozitivne kontrole pripremite prostorno odvojeno od uzoraka za testiranje.

Ekstrakti uzoraka moraju sadržavati što je moguće manje tla. Ako namjeravate primjenjivati PCR protokole, u nekim bi slučajevima bilo preporučljivo oprati gomolje prije pripreme ekstrakta.

U Dodatku 3. navedeni su standardizirani pozitivni i negativni kontrolni materijali koji se mogu koristiti u ovim testovima.

6.1. Metode pročišćavanja DNK

Koristite uzorke za pozitivnu i negativnu kontrolu kako je gore opisano (vidi Dodatak 3).

Testirajte kontrolni materijal na isti način kao i uzorke.

Postoje različite metode za pročišćavanje ciljne DNK iz kompleksnih uzoraka, kojima se uklanjaju inhibitori PCR reakcije i drugih enzimskih reakcija te se u ekstraktu uzorka koncentrira ciljna DNK. Sljedeća je metoda optimizirana za korištenje s validiranim PCR metodama koje su navedene u Dodatku 6.

(a) Metoda prema Pastriku (2000)

1) Pipetom odmjerite 220 μ l pufera za lizu [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] u Eppendorf epruvetu od 1,5 ml.

2) Dodajte 100 μ l ekstrakta uzorka i stavite u blok za zagrijavanje ili vodenu kupelj na 95 °C 10 minuta.

3) Stavite epruvetu na led 5 minuta.

4) Dodajte 80 μ l osnovne otopine lizozima (50 mg lizozima na ml u 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) te inkubirajte 30 minuta na 37 °C.

5) Dodajte 220 μ l Easy DNA® otopine A (Invitrogen), dobro promiješajte na vrtložnoj miješalici i inkubirajte 30 minuta na 65 °C.

6) Dodajte 100 μ l Easy DNA® otopine B (Invitrogen), snažno miješajte na vrtložnoj miješalici sve dok precipitat ne bude slobodno kružio po epruveti i dok uzorak ne bude jednoliko viskoznan.

7) Dodajte 500 μ l kloroforma te miješajte na vrtložnoj miješalici dok se viskoznost ne smanji i smjesa postane homogena.

8) Centrifugirajte na 15000 g 20 minuta na 4 °C da se odijele faze i stvori interfaza.

9) Gornju fazu prenesite u novu Eppendorf epruvetu.

10) Dodajte 1 ml 100 %-tnog etanola (– 20 °C), kratko promiješajte na vrtložnoj miješalici i inkubirajte na ledu 10 minuta.

11) Centrifugirajte na 15000 g 20 minuta na 4 °C te uklonite etanol iz taloga.

12) Dodajte 500 μ l 80 %-tnog etanola (– 20 °C) te promiješajte okretanjem epruvete.

13) Centrifugirajte na 15000 g 10 minuta na 4 °C, sačuvajte talog, a etanol uklonite.

14) Ostavite talog da se suši na zraku ili u vakuumskoj centrifugi (DNA speed vac).

15) Resuspendirajte talog u 100 μ l sterilne ultra čiste vode i ostavite na sobnoj temperaturi najmanje 20 minuta.

16) Pohranite na – 20 °C dok ne bude potrebno za PCR.

17) Centrifugiranjem izdvojite mogući bijeli precipitat te za PCR upotrijebite 5 μ l supernatanta koji sadrži DNK.

(b) Druge metode

Mogu se primijeniti druge metode ekstrakcije DNK, npr. Qiagen DNeasy Plant Kit, ako su dokazano jednako učinkovite u pročišćavanju DNK iz kontrolnih uzoraka koji sadrže 103 do 104 patogenih stanica po ml.

6.2. PCR

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

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

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

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

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

6.3. Analiza PCR produkata

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

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

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

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

Tumačenje rezultata PCR testa

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

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

Napomena:

Može se sumnjati da je došlo do inhibicije PCR reakcije ako se iz uzorka pozitivne kontrole koji sadrži *R. solanacearum* u vodi dobije očekivani produkt, a iz pozitivnih kontrola s *R. solanacearum* u ekstraktu krumpira dobiju negativni rezultati. U multipleks PCR protokolima s unutarnjim kontrolama, inhibicija reakcije je indicirana ako nije dobiven niti jedan od dva produkta.

Ako se iz jedne ili više negativnih kontrola dobije očekivani produkt, može se sumnjati da je došlo do kontaminacije.

7. FISH test

Načelo

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

Napomena:

Koristite validirane oligo-probe specifične za bakteriju *R. solanacearum* (vidi Dodatak 7). Preliminarna testiranja ovom metodom trebaju omogućiti ponovljivu detekciju najmanje 103 do 104 stanica bakterije *R. solanacearum* po ml koje su dodane ekstraktima uzoraka koji su u ranijim testiranjima bili negativni.

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

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

Za pozitivnu kontrolu pripremite suspenzije koje sadrže 105 do 106 stanica/ml 0,01 M fosfatnog pufera (PB) bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (npr. soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vidi Dodatak 3) iz kulture stare 3 – 5 dana. Pripremite odvojena stakalca za pozitivnu kontrolu s homolognim sojem ili nekim drugim referentnim sojem bakterije *R. solanacearum* suspendiranim u ekstraktu krumpira kako je navedeno u Dodatku 3B.

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

U Dodatku 3A. navedeni su standardizirani pozitivni i negativni kontrolni materijali koji se mogu upotrebljavati u ovom testu.

Kontrolni materijal testirajte jednako kao i uzorke.

7.1. Fiksiranje ekstrakta krumpira

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

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

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

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

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

7.1.5. U jažice čistog stakalca nanosite 16 µl fiksiranih suspenzija kako je prikazano na slici

7.1. Na svako stakalce nanosite nerazrijeđena dva različita uzorka i upotrijebite 10 µl za pripremanje razrijeđenja 1:100 (u 0,01 M PB). Preostalu fiksiranu otopinu uzorka (49 µl) možete pohraniti na – 20 °C nakon dodavanja jednog volumena 96 %-tnog etanola. Ako FISH test trebate ponoviti, centrifugiranjem uklonite etanol i dodajte jednaki volumen 0,01 PB (promiješati na vrtložnoj miješalici).

Slika 7.1. Prikaz stakalca za FISH test

Slika 7.1. Prikaz stakalca za FISH test

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

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

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

7.2. Hibridizacija

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

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

7.2.3. Nanesite po 10 µl otopine za hibridizaciju (Dodatak 7) u osam jažica (jažice 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 i 10; vidi sliku 7.1) svakog stakalca, a dvije središnje jažice (3 i 8) ostavite prazne.

7.2.4. Prve i zadnje četiri jažice pokrijte pokrovnim stakalcem (24 x 24 mm) pazeći pri tom da u jažicama ne ostane zraka. Stavite stakalca u prethodno zagrijanu vlažnu komoru i hibridizirajte pet sati u pećnici na 45 °C u tami.

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

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

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

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

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

7.3. Očitavanje FISH testa

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

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

(vidi mrežnu stranicu <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

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

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

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

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

7.3.6. Tumačenje rezultata FISH testa

(i) Rezultati FISH testa smatraju se valjanima ako se primjenom FITC filtra opaze zeleno

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

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

8. ELISA Testovi

Načelo

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

(vidi mrežnu stranicu <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

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

Napomena:

Koristite validirani izvor antitijela za *R. solanacearum*

(vidi mrežnu stranicu <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Preporučljivo je da se titar odredi za svaku novu seriju antitijela. Titar se definira kao najveće razrjeđenje kod kojeg dolazi do optimalne reakcije pri testiranju suspenzije koja sadrži 105 do 106 stanica/ml homolognog soja bakterije *R. solanacearum* uz korištenje odgovarajućih konjugata sekundarnih antitijela prema preporukama proizvođača. Tijekom testiranja, treba koristiti antitijela u radnim razrjeđenjima koja su blizu ili jednaka titru formulacije dostupne na tržištu.

Odredite titar antitijela na suspenziji od 105 do 106 stanica po ml homolognog soja bakterije *R. solanacearum*.

Za negativnu kontrolu koristite ekstrakt uzorka koji je u ranijem testiranju na *R.*

solanacearum bio negativan i suspenziju bakterije, s kojom ne dolazi do unakrsne reakcije, u fosfatnom puferu s dodatkom soli (PBS).

Za pozitivnu kontrolu koristite alikvote ekstrakta uzorka koji je u ranijem testiranju bio negativan, pomiješane s 103 do 104 stanica/ml bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (npr. soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vidi Dodatak 2A i B). Za usporedbu rezultata na svakoj mikrotitarskoj ploči koristite standardnu suspenziju od 105 do 106 stanica/ml bakterije *R. solanacearum* u PBS-u. Pobrinite se da pozitivne kontrole na mikrotitarskoj ploči budu dobro odvojene od uzoraka koji se testiraju.

U Dodatku 3A. navedeni su standardizirani pozitivni i negativni kontrolni materijali koji se mogu upotrebljavati u ovom testu.

Kontrolni materijal testirajte jednako kao i uzorke.

Validirana su dva protokola za ELISA test.

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

1) Upotrijebite alikvote od 100 do 200 μ l ekstrakta uzorka. (Zagrijavanjem četiri minute na 100 °C u vodenoj kupelji ili bloku za zagrijavanje u nekim se slučajevima mogu smanjiti nespecifični rezultati).

2) Dodajte jednaki volumen pufera za oblaganje dvostruke jačine (Dodatak 4) i promiješajte na vrtložnoj miješalici.

- 3) Nanesite alikvote od 100 µl u svaku od najmanje dvije jažice na mikrotitarskoj ploči (npr. Nunc-Polysorp ili ekvivalentna) i inkubirajte jedan sat na 37 °C ili preko noći na 4 °C.
- 4) Uklonite ekstrakte iz jažica. Isperite jažice tri puta otopinom PBS-Tween (Dodatak 4), a zadnju otopinu za ispiranje ostavite u jažicama najmanje pet minuta.
- 5) Pripremite odgovarajuće razrjeđenje antitijela za *R. solanacearum* u blokirajućem puferu (Dodatak 4). Za validirana antitijela koja su dostupna na tržištu koristite preporučena razrjeđenja (obično dvostruka koncentracija titra).
- 6) Dodajte 100 µl u svaku jažicu i inkubirajte jedan sat na 37 °C.
- 7) Uklonite otopinu antitijela iz jažica i operite jažice kao prije (korak 4).
- 8) Pripremite odgovarajuće razrjeđenje sekundarnih antitijela- konjugata alkalne fosfataze u blokirajućem puferu. Dodajte 100 µl u svaku jažicu i inkubirajte jedan sat na 37 °C.
- 9) Uklonite konjugat antitijela iz jažica i operite jažice kao prije (korak 4).
- 10) U svaku jažicu dodajte 100 µl otopine supstrata alkalne fosfataze (Dodatak 4), inkubirajte u tami na sobnoj temperaturi i očitavajte apsorbanciju pri 405 nm u pravilnim razmacima tijekom 90 minuta.

(b) DASI ELISA

- 1) Pripremite odgovarajuće razrjeđenje poliklonskih imunoglobulina za bakteriju *R. solanacearum* u puferu za oblaganje pH 9,6 (Dodatak 4). Nanesite 200 µl u svaku jažicu. Inkubirajte četiri do pet sati na 37 °C ili 16 sati na 4 °C.
- 2) Jažice isperite tri puta otopinom PBS-Tween (Dodatak 4). U najmanje dvije jažice nanesite 190 µl ekstrakta uzorka. Na svakoj ploči dodajte pozitivnu i negativnu kontrolu, i to svaku u po dvije jažice. Inkubirajte 16 sati na 4 °C.
- 3) Jažice isperite tri puta otopinom PBS-Tween (Dodatak 4).
- 4) Pripremite odgovarajuće razrjeđenje monoklonskih antitijela specifičnih za bakteriju *R. solanacearum* u PBS-u (Dodatak 4) koji sadrži i 0,5 % govedeg serumskog albumina (BSA) te nanesite 190 µl u svaku jažicu. Inkubirajte dva sata na 37 °C.
- 5) Jažice isperite tri puta otopinom PBS-Tween (Dodatak 4).
- 6) Pripremite odgovarajuće razrjeđenje antimišjih imunoglobulina konjugiranih s alkalnom fosfatazom u PBS-u. Nanesite 190 µl u svaku jažicu. Inkubirajte dva sata na 37 °C.
- 7) Jažice isperite tri puta otopinom PBS-Tween (Dodatak 4).
- 8) Pripremite otopinu supstrata alkalne fosfataze koja sadrži 1 mg p-nitrofenil fosfata po ml pufera supstrata (Dodatak 4). Nanesite 200 µl u svaku jažicu. Inkubirajte u tami na sobnoj temperaturi i očitavajte apsorbanciju pri 405 nm u pravilnim razmacima tijekom 90 minuta.

Tumačenje rezultata ELISA testova

ELISA test je negativan ako je prosječna optička gustoća (OD) u jažicama s duplikatom uzorka $< 2x$ OD u jažici s negativnom kontrolom ekstrakta uzorka, pod uvjetom da su sve vrijednosti OD pozitivnih kontrola iznad 1,0 (nakon 90 minuta inkubacije sa supstratom) i da su veće od dvostruke vrijednosti OD dobivene za negativne ekstrakte uzorka.

ELISA test je pozitivan ako je prosječna optička gustoća (OD) u jažicama s duplikatom uzorka $> 2x$ OD u jažici s negativnom kontrolom ekstrakta uzorka, pod uvjetom da su vrijednosti OD za sve jažice s negativnom kontrolom $< 2x$ OD u jažicama s pozitivnom kontrolom.

Ako se u ELISA testu očitaju negativni rezultati u jažicama s pozitivnom kontrolom, to ukazuje da test nije pravilno proveden ili da je došlo do inhibicije. Ako se u ELISA testu očitaju pozitivni rezultati u jažicama s negativnom kontrolom, to ukazuje da je došlo do unakrsne kontaminacije ili do nespecifičnog vezanja antitijela.

9. Biotest

Napomena:

Preliminarno testiranje ovom metodom treba omogućiti ponovljivu detekciju 10³ do 10⁴ jedinica koje stvaraju kolonije (CFU) bakterije *R. solanacearum* po ml, a koje su dodane

ekstraktima uzoraka koji su u ranijem testiranju bili negativni. [za pripremu vidi Dodatak 3] Najveća osjetljivost detekcije može se očekivati ako se koriste svježe pripremljeni ekstrakti uzoraka te optimalni uvjeti rasta. Međutim, ova se metoda može uspješno primijeniti i s ekstraktima koji su bili pohranjeni s glicerolom na temperaturi od – 68 do – 86 °C.

Sljedeći se protokol temelji na Janse (1988):

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

9.2. 100 µl ekstrakta uzorka rasporedite na testne biljke.

9.2.1. Inokulacija injekcijom

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

9.2.2. Inokulacija zarezivanjem

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

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

Čvrsto zatvorite rez sterilnim vazelinom iz injekcije.

9.3. Koristeći istu metodu, inokulirajte pet biljaka suspenzijom u vodi od 105 do 106 stanica/ml pripremljenom iz 48-satne kulture virulentnog soja biovara 2, bakterije *R. solanacearum* za pozitivnu kontrolu, a puferom za talog za negativnu kontrolu (Dodatak 4). Kako ne bi došlo do unakrsne kontaminacije, odvojite biljke za pozitivnu i negativnu kontrolu od ostalih biljaka.

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

Pratite javljaju li se simptomi venuća, epinastije, kloroze i/ili zaostajanja u rastu.

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

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

9.7. Identificirajte sve pročišćene kulture vjerojatne bakterije *R. solanacearum* (Odjeljak VI.B).

Tumačenje rezultata biotesta

Rezultati biotesta su valjani ako biljke pozitivne kontrole pokazuju tipične simptome, ako se iz tih biljaka može ponovo izdvojiti bakterija, i ako se na negativnim kontrolama ne pronađu nikakvi simptomi.

Biotest je negativan ako testne biljke nisu zaražene bakterijom *R. solanacearum*, pod uvjetom

da je bakterija *R. solanacearum* detektirana u pozitivnim kontrolama.
Biotest je pozitivan ako su testne biljke zaražene bakterijom *R. solanacearum*.

B. TESTOVI ZA IDENTIFIKACIJU

Identificirajte čiste kulture vjerojatnih izolata bakterije *R. solanacearum* pomoću najmanje dva od sljedećih testova koja se temelje na različitim biološkim načelima.

Prema potrebi, u svaki test uključite poznate referentne sojeve (vidi Dodatak 3).

1. Nutritivni i enzimatski testovi za identifikaciju

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

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

2. IF test

2.1. Pripremite suspenziju od oko 10⁶ stanica/ml u puferu za IF (Dodatak 4).

2.2. Pripremite niz dvostrukih razrjeđenja odgovarajućeg seruma (vidi mrežnu stranicu <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

2.3. Provedite IF test (Odjeljak VI.A.5).

2.4. IF test je pozitivan ako je IF titar kulture jednak onom pozitivne kontrole.

3. ELISA test

Napomena:

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

3.1. Pripremite suspenziju od oko 10⁸ stanica/ml u 1x PBS (Dodatak 4).

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

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

4. PCR testovi

4.1. Pripremite suspenziju od oko 10⁶ stanica/ml u sterilnoj vodi namijenjenoj uporabi u molekularnoj biologiji.

4.2. Zagrijte 100 µl stanične suspenzije u zatvorenim epruветama u bloku za zagrijavanje ili vreloj vodenoj kupelji četiri minute na 100 °C. Uzorci se mogu potom, do uporabe, pohraniti na – 16 do – 24 °C.

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

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

5. FISH test

5.1. Pripremite suspenziju od oko 106 stanica/ml u ultra čistoj vodi.

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

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

6. Profiliranje masnih kiselina (FAP)

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

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

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

7. Metode karakterizacije soja

Kod svakog novog slučaja izolacije *R. solanacearum* preporučuje se obaviti karakterizaciju soja jednom od sljedećih metoda.

Prema potrebi, u svaki korišteni test uključite poznate referentne sojeve (vidi Dodatak 3).

7.1. Određivanje biovara

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

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

Biovar 2 se dijeli na podfenotipove pomoću dodatnih testova.

	Biovar 2A	Biovar 2A	Biovar 2T
	(proširen	(u Čileu i	(u tropskim

	u cijelom Kolumbiji) područjima) svijetu)		
Iskorištavanje trehaloze	–	+	+
Iskorištavanje mezo-inozitola	+	–	+
Iskorištavanje D-riboze	–	–	+
Pektolitička aktivnost ⁽¹⁾	slaba	slaba	visoka
⁽¹⁾ Vidi Lelliot i Stead (1987)			

7.2. Genomski otisak prsta

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

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

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

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

7.3. PCR metode

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

C. TEST POTVRDE

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

1) Pripremite inokulum od oko 10⁶ stanica/ml iz 24 do 48 sati stare kulture izolata koji namjeravate testirati te odgovarajući pozitivni kontrolni soj bakterije *R. solanacearum* (npr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vidi Dodatak 3).

2) Inokulirajte 5 do 10 sadnica osjetljivih rajčica ili patlidžana u fazi trećeg pravog lista (vidi Odjeljak VI.A.9).

3) Inkubirajte do dva tjedna na 25 do 28 °C i uz visoku relativnu vlažnost te ih primjereno zalijevajte pazeći da ne dođe do zasićenja vodom ili venuća zbog nedostatka vode. Kod čistih bi se kultura trebalo pojaviti tipično venuće u roku od 14 dana. Ako nakon ovog razdoblja simptomi nisu prisutni, ne može se potvrditi da je kultura patogeni oblik bakterije *R. solanacearum*.

4) Pratite javljaju li se simptomi venuća i/ili epinastije, kloroze i zaostajanja u rastu.

5) Iz biljaka sa simptomima izdvojite dio stabljike oko 2 cm iznad mjesta inokulacije.

Smrvite i suspendirajte u manjem volumenu sterilne destilirane vode ili 50 mM fosfatnog pufera (Dodatak 4). Izolaciju iz suspenzije izvedite razmazom razrjeđenja na prikladnu hranjivu podlogu, po mogućnosti selektivnu (Dodatak 2), inkubirajte 48 do 72 sata na 28 °C te pratite rast kolonija tipičnih za *R. solanacearum*.

Dodatak 1.

Laboratoriji uključeni u optimizaciju i validaciju protokola

Laboratorij ⁽¹⁾	Mjesto	Država
----------------------------	--------	--------

Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Beč i Linz	Austrija
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgija
Plantedirektoratet	Lyngby	Danska
Central Science Laboratory	York	Engleska
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Škotska
Laboratoire national de la protection des végétaux, unité de bactériologie	Angers	Francuska
Laboratoire national de la protection des végétaux, Station de quarantaine de la pomme de terre	Le Rheu	Francuska
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Njemačka
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Njemačka
State Laboratory	Dublin	Irska
Dipartimento di Scienze e Technologie Agroambientali	Bologna	Italija
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Italija
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Nizozemska
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nizozemska
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabon	Portugal
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Španjolska
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Španjolska
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Švedska
(1) Znanstvenici za vezu: vidi mrežnu stranicu http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main		

Dodatak 2.

Podloge za izolaciju i uzgoj bakterije *R. solanacearum*

(a) Uobičajene hranjive podloge

Hranjivi agar (NA)

Hranjivi agar (Difco) 23,0 g

Destilirana voda 1,0 L

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

Agar s kvascem, peptonom i glukozom (YPGA)

Ekstrakt kvasca (Difco) 5,0 g

Bacto pepton (Difco) 5,0 g

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

Bacto agar (Difco) 15,0 g
Destilirana voda 1,0 L

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

Agar sa saharozom i peptonom (SPA)

Saharoza 20,0 g
Bacto pepton (Difco) 5,0 g
K₂HPO₄ 0,5 g
MgSO₄·7H₂O 0,25 g
Bacto agar (Difco) 15,0 g
Destilirana voda 1,0 L
pH 7,2 – 7,4

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

Kelmanova tetrazolium-podloga
Casamino kiseline (Difco) 1,0 g
Bacto pepton (Difco) 10,0 g
Dekstroza 5,0 g
Bacto agar (Difco) 15,0 g
Destilirana voda 1,0 L

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

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

(b) Validirane selektivne hranjive podloge

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

Osnovna podloga

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

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

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

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

Napomena:

1. Reagensi drugačiji od gore navedenih mogu utjecati na rast bakterije *R. solanacearum*.
2. Umjesto Bacto agara (Difco) može se koristiti Oxoid agar br. 1. U tom će slučaju *R. solanacearum* sporije rasti, ali se može smanjiti i rast konkurentnih saprofita. Za formiranje tipičnih kolonija bakterije *R. solanacearum* možda će trebati 1 do 2 dana više, a crveno obojenje može biti svjetlije i difuznije nego na Bacto agaru.
3. Povećanjem koncentracije bacitracina na 2500 U/L mogu se smanjiti populacije

konkurentnih bakterija, a da se ne utječe na rast bakterije *R. solanacearum*.

Pohranite hranjivu podlogu i osnovnu otopinu antibiotika na 4 °C na tamno mjesto i upotrijebite u roku od jednog mjeseca.

Prije uporabe, s podloga moramo ukloniti površinsku kondenzaciju.

Podloge ne smijete pretjerano osušiti.

Nakon pripremanja svake nove serije hranjive podloge, treba obaviti kontrolu kakvoće tako što se nasadi suspenzija referentne kulture *R. solanacearum* (vidi Dodatak 3) i prati hoće li doći do stvaranja tipičnih kolonija nakon dva do pet dana inkubacije na 28 °C.

(c) Validirani mediji za obogaćivanje

SMSA tekući medij (Elphinstone i sur., 1996)

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

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

Saharoza 10 g

Proteozna pepton 5 g

K₂HPO₄ 0,5 g

MgSO₄ 0,25 g

NaNO₃ 0,25 g

Destilirana voda 1 L

Sterilizirajte u autoklavu na 121 °C 15 minuta te ohladite na 50 °C.

Dodajte osnovne otopine antibiotika kao za SMSA tekući medij.

Dodatak 3.

A. Standardizirani kontrolni materijali dostupni na tržištu

(a) Bakterijski izolati

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

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

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

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

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

Oznaka NCPBB	Br. SMT	Ostale oznake	Država podrijetla	Biovar
NCPBB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egipat	2
NCPBB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turska	2
NCPBB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Engleska	2
NCPBB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Cipar	2
NCPBB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Švedska	2
NCPBB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgija	2
NCPBB 4156*	71 *	PD 2762, CFBP 3857	Nizozemska	2
NCPBB 4157	66	LNPV 15.59	Francuska	2

NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Portugal	2
NCPPB 4160	69	IVIA-1632-2	Španjolska	2
NCPPB 4161	76	B3B	Njemačka	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	SAD	1
NCPPB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Kostarika	1
NCPPB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Kolumbija	2
NCPPB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPPB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brazil	2T
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Australija	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CMib2861	Sri Lanka	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipini	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmp52	Kina	5
* Upotrebljavati kao standardni referentni soj bakterije <i>R. solanacearum</i> biovar 2 (rasa 3)				

Napomena:

Autentičnost gore navedenih sojeva može se jamčiti samo ako su oni dobiveni iz autentične zbirke kultura.

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

Oznaka NCPPB	Br. SMT	Ostale oznake	Identifikacija
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4164	–	CFBP 2227	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽²⁾
NCPPB 4165	–	CFBP 2459	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽²⁾
NCPPB 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	<i>Ralstonia</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	<i>Burkholderia andropogonis</i> ⁽¹⁾
NCPPB 353	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia caryophylli</i> ⁽¹⁾
NCPPB 945	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia glumae</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia plantarii</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	<i>Banana Blood Disease Bacterium</i> ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ⁽³⁾
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4169	62	IPO 1695	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾

NCPPB 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ⁽¹⁾ ⁽²⁾
NCPPB 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	<i>Curtobacterium</i> sp. ⁽¹⁾ ⁽²⁾
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	<i>Pseudomonas</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4173	–	PD 2318	<i>Aureobacterium</i> sp. ⁽²⁾
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	<i>Flavobacterium</i> sp. ⁽¹⁾ ⁽²⁾
⁽¹⁾ Soj koji u serološkim testovima (IF i/ili ELISA) može unakrsno reagirati s poliklonskim serumima.			
⁽²⁾ Soj od kojega se u nekim laboratorijima može umnožiti PCR produkt dužine slične dužini koja se očekuje pri uporabi specifičnih početnica OLI-1 i Y-2 (vidi Dodatak 6).			
⁽³⁾ U većini testova mogao bi unakrsno reagirati, ali je poznato da se javlja samo na bananama u Indoneziji.			

(b) Standardizirani kontrolni materijali dostupni na tržištu

Dolje navedeni standardni kontrolni materijal može se dobiti iz zbirke kultura NCPPB.

Liofilizirane granule ekstrakta krumpira iz 200 zdravih gomolja krumpira kao negativna kontrola za sve testove.

Liofilizirane granule ekstrakta krumpira iz 200 zdravih gomolja krumpira s 103 do 104 i 104 do 106 stanica *R. solanacearum* biovar 2 (soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) kao pozitivna kontrola za serološke i PCR testove. S obzirom da liofilizacija utječe na vijabilnost stanica, one nisu prikladne kao standardna kontrola za izolaciju ili biotestove.

Formalinom fiksirane suspenzije bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) s 106 stanica/ml kao pozitivna kontrola za serološke testove.

B. Pripremanje pozitivnih i negativnih kontrola za osnovne testove provjere (PCR/IF i FISH)
Uzgojite 48-satnu kulturu virulentnog soja *R. solanacearum* rasa 3/biovar 2 (npr. soj NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) na osnovnoj SMSA podlozi i suspendirajte u 10 mM fosfatnom puferu da dobijete gustoću stanica od oko 2×10^8 cfu/ml. Ovo je obično blago zamućena suspenzija optičke gustoće 0,15 na 600 nm.

Izrežite jezgre pupaka iz 200 gomolja krumpira sorte s bijelom korom za koje je poznato da nisu zaraženi bakterijom *R. solanacearum*.

Obradite jezgre pupaka uobičajenom metodom i resuspendirajte talog u 10 ml.

Napunite 10 sterilnih mikroepreveta od 1,5 ml s 900 µl resuspendiranog taloga.

U prvu mikroeprevetetu dodajte 100 µl suspenzije *R. solanacearum*. Promiješajte na vrtložnoj miješalici.

U sljedećih pet mikroepreveta pripremite decimalna razrjeđenja.

Ovih šest mikroepreveta s kontaminiranim ekstraktom koristite za pozitivnu kontrolu. Četiri mikroeprevete s nekontaminiranim ekstraktom koristite za negativnu kontrolu. U skladu s tim, označite mikroeprevete.

Pripremite alikvotne od 100 µl u mikroeprevetama od 1,5 ml tako da dobijete devet kopija svakog kontrolnog uzorka. Do uporabe ih pohranite na -16 do -24 °C.

Prisutnost i količinu *R. solanacearum* u kontrolnim uzorcima potvrdite najprije IF testom.

Za PCR test, obavite ekstrakciju DNK na pozitivnim i negativnim kontrolnim uzorcima za svaku seriju uzoraka za testiranje.

Za IF i FISH testove, obavite testove na pozitivnim i negativnim kontrolnim uzorcima za svaku seriju uzoraka za testiranje.

Kod IF, FISH i PCR testova, *R. solanacearum* se mora detektirati u najmanje 106 i 104 stanica/ml pozitivnih kontrola i niti u jednoj negativnoj kontroli.

Dodatak 4

Puferi za postupke testiranja

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

1. Puferi za postupak ekstrakcije

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

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

Na ₂ HPO ₄ (bezvodni)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Destilirana voda	1,00 L

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

Mogu biti korisni i sljedeći dodatni sastojci:

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

(*) Upotrebljavati za metodu ekstrakcije homogeniziranjem

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

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

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

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

2. Puferi za IF test

2.1. IF pufer (10 mM fosfatni pufer s dodatkom soli (PBS), pH 7,2)

Ovaj se pufer koristi za razrjeđivanje antitijela

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

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

2.2. IF pufer Tween

Ovaj se pufer koristi za pranje stakalaca.

IF puferu dodajte 0,1 % Tween 20.

2.3. Glicerol s fosfatnim puferom, pH 7,6

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

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

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

3. Puferi za neizravni ELISA test

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

Na_2CO_3	6,36 g
NaHCO_3	11,72 g
Destilirana voda	1,00 L

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

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

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

NaCl	80,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	29,0 g
KCl	2,0 g
Destilirana voda	1,0 L

3.3. PBS-Tween

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

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

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

i F = faktor razrjeđenja resuspendiranog taloga

Dodatak 6

Validirani protokoli i reagensi za PCR

Napomena:

Preliminarna testiranja trebaju omogućiti ponovljivu detekciju 103 do 104 stanica bakterije *R. solanacearum* po ml ekstrakta uzorka.

Preliminarna testiranja ne smiju dati lažno pozitivne rezultate kod određenih odabranih bakterijskih sojeva (vidi Dodatak 3).

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

1.1. Oligonukleotidne početnice

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

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

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

1.2. Reakcijska smjesa za PCR

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

1.3. Uvjeti za PCR reakciju

Provedite sljedeći program:

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

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

(iii) 20 sekundi na 68 °C (sparivanje početnica i kalupa)

(iv) 30 sekundi na 72 °C (produljivanje kopije)

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

(vi) držati na 4 °C

Napomena:

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

1.4. Analiza produkta umnožavanja restrikcijskim enzimima

PCR produkti umnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum* daju karakteristični obrazac polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata s enzimom Ava II nakon inkubacije na 37 °C.

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

2.1. Oligonukleotidne početnice

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

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

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

2.2. Reakcijska smjesa za PCR

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

Napomena:

Prvotno optimizirano za uređaj (thermo cycler) MJ Research PTC 200 s Gibco Taq polimerazom. Pri istim koncentracijama može se koristiti i Perkin Elmer AmpliTaq i pufer

2.3. Uvjeti za PCR reakciju

Provedite sljedeći program:

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

Napomena:

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

2.4. Analiza produkta umnožavanja restrikcijskim enzimima

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

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

3.1. Oligonukleotidne početnice

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

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

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

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

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

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

3.2. Reakcijska smjesa za PCR

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

⁽¹⁾ Metoda je bila validirana Taq polimerazom Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL

⁽²⁾ Koncentracije početnica NS-5-F i NS-6-R bile su optimizirane za ekstrakciju jezgri pupaka metodom homogenizacije i pročišćavanjem DNK prema Pastriku (2000) (vidi Odjeljak VI.A.6.1.a). Ako se ekstrakcija obavlja tresenjem ili ako se primjenjuju druge metode izdvajanja DNK, trebat će ponovo optimizirati koncentracije reagensa.

3.3. Uvjeti za reakciju PCR

Provedite sljedeći program:

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

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

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

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

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

(vi) držanje na 4 °C

Napomena:

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

3.4. Analiza produkta umnožavanja restrikcijskim enzimom

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

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

4.1. Oligonukleotidne početnice

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

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

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

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

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

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

4.2. Reakcijska smjesa za PCR

(a) Specifični PCR za biovar 1/2

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

⁽¹⁾ Metode su validirane Taq polimerazom Perkin Elmer (AmpliTaq) i Gibco BRL

(b) Specifični PCR za biovar 3/4/5

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

4.3. Uvjeti za reakciju PCR

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

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

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

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

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

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

(vi) držanje na 4 °C

Napomena:

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

4.4. Analiza produkta umnožavanja restrikcijskim enzimom

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

5. Priprema pufera za nanošenje

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

Bromfenol plavilo 5 g

Destilirana voda (bidestilirana) 50 ml

5.2. Pufer za nanošenje

Glicerol (86 %) 3,5 ml

Bromfenol plavo (5,1) 300 µl

Destilirana voda (bidestilirana) 6,2 ml

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

Tris pufer 48,40 g
Ledena octena kiselina 11,42 ml
EDTA (dinatrijeva sol) 3,72 g
Destilirana voda 1,00 L

Prije uporabe razrijedite do 1X.

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

Dodatak 7

Validirani reagensi za FISH test

1. Oligo-probe

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

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

2. Otopina za fiksiranje

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

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

(ii) Podesite pH na 7,0 dodajući 1 ml 0,1M fosfatnog pufera (PB; pH 7,0) i 5 kapi 1N HCl.

Indikatorskim papirom provjerite vrijednost pH i ako je potrebno podesite je pomoću HCl ili NaOH.

(UPOZORENJE! U OTOPINAMA S PARAFORMALDEHIDOM NE UPOTREBLJAVAJTE pH-METAR.)

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

3. 3X Hybmix

NaCl 2,7 M

Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)

EDTA (sterilizirana filtriranjem i u autoklavu) 15 mM

Po potrebi razrijedite do 1X.

4. Otopina za hibridizaciju

1X Hybmix

Natrijev dodecil sulfat (SDS) 0,01 %

Formamid 30 %

Proba EUB 338 5 ng/µl

Proba OLI-1 ili OLI-2 5 ng/µl

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

Tablica 1. Predložene količine za pripremanje smjese za hibridizaciju

Broj stakalaca	1	4	6	8	10
Sterilna ultra čista voda	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3 x hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0

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

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

Na₂HPO₄ 8,52 g

KH₂PO₄ 5,44 g

Destilirana voda 1,00 L

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

Dodatak 8

Uzgoj patlidžana i rajčice

Sjeme rajčice (*Lycopersicon esculentum*) i patlidžana (*Solanum melongena*) posijte u pasterizirani kompost za sjeme. Sadnice presadite u pasterizirani kompost za lončanice nakon što se supke u cijelosti razviju (10 do 14 dana).

Prije inokulacije, rajčice i patlidžane treba uzgajati u stakleniku pod sljedećim uvjetima:

Duljina dana 14 sati ili prirodna duljina dana ako je veća

Temperatura dnevna: 21 do 24 °C

noćna: 14 do 18 °C

Osjetljiva vrsta rajčice »Moneymaker«

Osjetljiva vrsta patlidžana »Black Beauty«

Dobavljači vidi mrežnu stranicu <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

POPIS LITERATURE

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. *Official Journal of the European Communities* L235, 1-39.
3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology* 105; 373-380.
4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J. L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3634-3638.
5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1:113-121.
6. Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26; 663-678.

7. Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) Bacterial Wilt Newsletter 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27; 265-277.
9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 69; 269-280.
10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. J. Phytopathology 146; 379-384.
11. Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 18, 343-351.
12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335-345.
13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44; 693-695.
14. Klement Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.
16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne i sur., (eds). Kluwer Academic Publishers. pp. 117-121.
17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology, 60, 2286-2295.
18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. Phytopathology 85; 528-536.
19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F Wang, T.-H Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 5; 19-33.
20. Pastrok, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. J. Phytopathology 148; 619-626.
21. Pastrok, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. European Journal of Plant Pathology 108, 831-842.
22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. Food and Agricultural Immunology 7, 67-79.
23. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota: 373 pp.

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