

МИНИСТЕРСТВО ЗА ЗЕМЈОДЕЛСТВО, ШУМАРСТВО И ВОДОСТОПАНСТВО

Врз основа на член 69 алинеја 5 од Законот за здравјето на растенијата („Службен весник на Република Македонија“ бр. 29/05, 81/08, 20/09, 57/10 и 17/11), министерот за земјоделство, шумарство и водостопанство, донесе

НАРЕДБА ЗА СПРОВЕДУВАЊЕ НА ПОСЕБЕН НАДЗОР ЗА УТВРДУВАЊЕ НА ПРИСУСТВОТО НА БАКТЕРИЈАТА *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) *YABUUCHI ET AL.* И ПОСТАПКИТЕ ЗА ЛАБОРАТОРИСКО ИСПИТУВАЊЕ *

* Со оваа наредба се врши усогласување со одредбите на Директивата на Советот бр. 98/57/ЕЕЗ од 20 јули 1998 за контрола на *Ralstonia solanacearum* (Smith) *Yabuuchi et al.* CELEX број 31998L0057, изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр. 2006/63/ЕЗ од 14 јули 2006 година, CELEX број 32006L0063.

Член 1

Со оваа наредба се определува спроведување на посебен надзор за утврдување на присуството на бактеријата *Ralstonia solanacearum* (Smith) *Yabuuchi et al.* предизвикувач на кафеаво гниење на кртолите и бактериско венење на компирот и доматиите, одредување на распространетоста и во случај на појава мерките кои треба да се превземат за да се спречи ширењето и контролата, со цел ерадикација на кафеаво гниење на кртолите и бактериско венење на компирот и доматиите, како и на постапките за лабораториско испитување.

Член 2

Мерките кои се преземат заради уништување на бактеријата *Ralstonia solanacearum* (Smith) *Yabuuchi et al.* претходно познат како *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith која го предизвикува кафеавото гниење на кртолите и бактериското венење на компирот и доматиите (во натамошниот текст штетен организам), како и други растенија кои може да бидат домаќини

на штетниот организам (во натамошниот текст растителен материјал), дадени во Прилог 1 точка 1 кој е составен дел од оваа наредба, се со цел да се:

(а) лоцира и одреди нејзината раширеност и дистрибуција;

(б) спречи нејзиното појавување и ширење и

(в) ако се пронајде, да се спречи нејзното ширење и да се контролира заради целосна елиминација.

Член 3

(1) Посебниот надзор фитосанитарниот инспектор го врши за да утврди присуство на штетениот организам во кртолите и кога е потребно на растенијата од компир (*Solanum tuberosum* L.) кои потекнуваат од местото на производство, кај наведениот растителен материјал како и кај растенија кои не припаѓаат во наведениот растителен материјал, вклучувајќи диви растенија домаќини од фамилијата Solanaceae, како и на површинската вода која се користи за наводнување или прскање за наведениот растителен материјал, почвата, тврдиот и течниот отпад исфрлен од преработувачките капацитети или погоните за пакување за да се потврди отсуството на штетниот организам.

(2) При вршењето на посебниот надзор треба да зема примероци-мостри од кртоли од семенски, меркантилен компир и на наведениот растителен материјал. Препорачливо е да се земаат примероци-мостри посебно од секоја партија во складиштата и да се испитаат со лабораториско тестирање по методот утврден во Прилог 2 кој е составен дел од оваа наредба. Каде е соодветно, фитосанитарниот инспектор може да врши посебен надзор со визуелен преглед со сечење на кртолитена и наведениот растителен материјал;

(а) за наведениот растителен материјал согласно Прилог 1 точка 2 од оваа наредба и

(б) за растенијата домаќини кои не припаѓаат во наведениот растителен материјал и на водата вклучувајќи го течниот отпад, согласно одобрените методи и доколку е потребно, треба да се земаат примероци-мостри за лабораториско тестирање;

(в) каде што е соодветно за друг материјал, согласно утврдените методи.

(3) Посебниот надзор, во случај на растенија од компир и за наведениот растителен материјал се спроведува со примена на соодветни методи за земање на примероци-мостри кои подлежат на соодветно лабораториско тестирање или може да се користат и методи препорачани од страна на Европската и медитеранската организација за заштита на растенијата.

(4) Бројот, потеклото, стратификацијата и времето на собирање на примероците- мострите се одредува врз основа на сигурни научни принципи, биологијата на штетниот организам и земајќи

го во предвид начинот на производство на компир, производство на наведениот растителен материјал и доколку е погодно, на други растенија домаќини на штетниот организам за потврдување на отството на штетниот организмот.

Член 4

При вршење на посебен надзор фитосанитарниот инспектор треба да утврди дека нема сомнителната појава или потврдена присутност на штетен организам кај растенијата од компир, кртоли и за наведениот растителен материјал, кога се берат, складираат или пласираат на пазар, од сопственици регистрирани согласно Правилникот за формата, содржината и начинот на водење на Регистарот на производители, преработувачи, увозници и дистрибутери на растенија, растителни производи и други објекти и предмети (?).

(?) Правилникот за формата, содржината и начинот на водење на Регистарот на производители, преработувачи, увозници и дистрибутери на растенија, растителни производи и други објекти и предмети е усогласен со одребите на Директивата на Советот бр.2000/29/ЕЗ од 8 мај 2000 за заштитните мерки против воведување во Заедницата на организми штетни за растенијата или растителните производи и против нивното ширење во Заедницата, сеlex број 32000L0029; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр. 2001/33/ЕЗ на 8 Мај 2001 година, сеlex број 32001L0033; изменета и дополнета со Директивата бр. 2002/28/ЕЗ од 19 март 2002 година, сеlex број 32002L0028; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2002/36/ЕЗ на 29 април 2002 година, сеlex број 32002L0036; изменета и дополнета со Директивата на Советот бр. 2002/89/ЕЗ од 28 ноември 2002 година, сеlex број 32002L0089; изменета и дополнета со Директивата бр. 2003/22/ЕЗ од 24 март 2003 година, сеlex број 32003L0022; изменета и дополнета со Регулативата на Советот (ЕЗ) бр.806/2003 од 14 април 2003 година, сеlex број 32003R0806; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2003/47/ЕЗ на 4 јуни 2003 година, сеlex број 32003L0047; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2003/116/ЕЗ од 4 декември 2003 година, сеlex број 32003L0116; изменета и дополнета со Директивата бр.2004/31/ЕЗ од 17 март 2004 година, сеlex број 32004L0031; изменета и дополнета со Директивата бр.2004/70/ЕЗ од 28 април 2004 година, сеlex број 32004L0070; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2004/102/ЕЗ на 5 октомври 2004 година, сеlex број 32004L0102; изменета и дополнета со Директивата на Советот бр. 2005/15/ЕЗ од 28 февруари 2005 година, сеlex број 32005L0015; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2005/16/ЕЗ на 2 март 2005 година, сеlex број 32005L0016; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2005/77/ЕЗ од 11 ноември 2005 година, сеlex број 32005L0077; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2006/14/ЕЗ од 6 февруари 2006 година, сеlex број 32006L0014; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2006/35/ЕЗ од 24 март 2006 година, сеlex број 32006L0035; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр. 2007/41/ЕЗ од 28 јуни 2007 година, сеlex број 32007L0041; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр. 2008/64/ЕЗ од

27 јуни 2008 година, сеlex број 32008 L0064; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата 2008/109/ЕЗ од 28 ноември 2008 година, сеlex број 32008L0109; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр. 2009/7/ЕЗ на 10 февруари 2009 година, сеlex број 32009L0007; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр. 2009/118/ЕЗ на 9 септември 2009 година, сеlex број 32009L0118; изменета и дополнета со Директивата на Советот бр.2009/143/ЕЗ од 26 ноември 2009 година, сеlex број 32009L0143; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2010/1/ЕУ од 8 јануари 2010 година, сеlex број 32010L0001; Директивата на Комисијата бр.1992/90/ЕЗ од 3 ноември 1992 година за утврдување на обврските кои се однесуваат на производителите или увозниците на растенија, растителни производи и други објекти и за утврдување на деталите за нивна регистрација, сеlex број 31992L0090; Директивата на Комисијата бр.1993/50/ЕЗ од 24 јуни 1993 година за определување на одредени растенија кои не се во Анекс V дел А од Директивата на Советот бр.77/93/ЕЗ, чии производители или складишта, дистрибутивни центри во производните зони на вакви растенија, треба да бидат внесени во службен регистар, сеlex број 31993L0050.

Член 5

(1) Во случај на сомневање за појава на штетниот организам, фитосанитарниот инспектор по пријавен случај за сомневање, треба да изврши посебен надзор. При лабораториски тестирања се користи методот утврден во Прилог 2 од оваа наредба и согласно условите од Прилог 3 точка 1 кој е составен дел од оваа наредба, за да се потврди или да се побие сомневањето за појавата на штетниот организам. Во случај, да се потврди сомневањето на штетниот организам, треба да се превземат мерките од Прилог 3 точка 2 од оваа наредба.

(2) Заради потврдување или побивање на сомневањето за појава на штетен организам од став (1) од овој член, каде:

1. биле забележани сомнителни дијагностички и визуелни симптоми од болеста, односно биле забележани видливи знаци на болеста; или

2. имунофлуоросцентниот тест од Прилог 2 од оваа наредба или други соодветни тестови биле позитивни од брзиот тест за анализа, наведен во Прилог 2 Дел 1 точка 1 и Дел 2 од оваа наредба или од скининг тестот од Прилог 2 Дел 1 точка 2 и Дел 3 од оваа наредба, фитосанитарниот инспектор треба да:

- го забрани пуштањето во промет или преместување на сите растенија и кртоли од сите посеви, партии или пратки на растенија и кртоли од кои се земено примероците, освен оние кои се под нивна контрола и ако е утврдено дека нема опасност од ширење на штетниот организам;

- преземе мерки за откривање на можниот извор заради утврдување и следење на потеклото на сомневањето за појавата на штетниот организам;

- преземе мерки за откривање на можниот извор од контаминација на наведениот растителен материјал или површинската вода заради утврдување и следење на потеклото на сомневањето за појавата на штетниот организам;

- воведе соодветни дополнителни заштитни мерки врз основа на проценка на ризик, за да се спречи секакво ширење на штетниот организам. Таквите мерки може да вклучат контрола на местото на производство на наведениот растителен материјал или површинска вода, семенски и меркантилен компир и негово пуштањето во промет, како и преместување на сите други кртоли или растенија внатре или надвор од просторите, кои се поврзани со сомневањето за појавата и

- воведе карантин на местото на производство со посебен фитосанитарен надзор.

Член 6

Ако со посебениот надзор или лабораториски тестирања користени по методот утврден во Прилог 2 од оваа наредба, се потврди присутноста на штетниот организам во примероците-мострите на наведениот растителен материјал, кртоли од компир или делови од растенија, фитосанитарниот инспектор имајќи ја во предвид биологијата на штетниот организам, посебно производството, маркетингот, промет и преработувачките капацитети, треба:

(а) за наведениот растителен материјал:

1. да спроведе посебен надзор за да го определи степенот и примарните извори на контаминација согласно одредбите од Прилог 4 кој е составен дел од оваа наредба, дополнителни тестирања согласно член 5 став (1) од оваа наредба, на целата клонски сродна резерва од семенски компир и

2. да ги прогласи за контаминирани наведениот растителен материјал, кртолите, пратката и/или партијата, машините, опремата, превозните средства, садовите, складиштето или сите делови од нив, како и други предмети, вклучувајќи ја амбалажата и материјалот за пакување, од кои се земени примероците, местото(ата) на производство и полето(ињата) од каде бил земен наведениот растителен материјал или кртолите и

3. да одреди, земајќи ги предвид одредбите од Прилог 5 точка 1 и точка 2 кој е составен дел од оваа наредба, степенот на можната контаминација преку контакт пред или по бербата или преку производството, системите за наводнување или прскање со означената контаминација и можното ширење на штетниот организам;

4. да демаркира зона врз основа на објавената контаминација до :

- степенот на можната контаминација и

- можното ширење на штетениот организмот согласно Прилог 5 точка 2 и точка 3 од оваа наредба.

(б) во однос на посевите со растенија домаќини кои не припаѓаат во оние наведени во точка (а) од овој член каде производството на наведениот растителен материјал се идентификува како ризичен, да:

- спроведе посебен надзор согласно точка (а) од овој член и

- ги прогласат за контаминирани растенијата домаќини на штетниот организам од кои што е земена мострата и

- ја определат можната контаминација и да демаркира зона согласно точка (а) од овој член во однос на производството на наведениот растителен материјал;

(в) во однос на површинската вода (вклучувајќи го течниот отпад исфрлен од преработувачките капацитети или погоните за пакување кои располагаат со наведениот растителен материјал) и придружните диви растенија домаќини од фамилијата Solanaceae, каде производството на наведениот растителен материјал се идентификува како ризичен поради наводнувањето, прскањето или течењето на површинската вода, да

- спроведе официјално испитување во погодено време на примероци-мостри од површинската вода и од дивите растенија домаќини од фамилијата Solanaceae, доколку се присутни, со цел да се одреди степенот на контаминација и

- ја прогласат за контаминирана површинската вода од која се земени примероците-мострите, до определен степен и врз основа на испитувањата и

- определи можна контаминација и да ја демаркира зоната врз основа на објавената контаминација и можното ширење на штетниот организам земајќи ги предвид одредбите од Прилог 5 точките 1 и 2 од оваа наредба.

Член 7

(1) Таму каде што наведениот растителен материјал бил прогласен за контаминиран согласно член 6 точка (а) од оваа наредба да не се садат и под контрола на фитосанитарниот инспектор да биде подложен на една од одредбите од Прилог 6 точка 1 кој е составен дел од оваа наредба, со цел дека не постои ризик за ширење на штетниот организам и отпадот од истите да биде отстранет согласно Прилог 7 кој е составен дел од оваа наредба.

(2) Таму каде што наведениот наведениот растителен материјал кој е прогласен за можно контаминиран согласно член 6 точка (а) и точка (в) од оваа наредба, вклучувајќи го растителниот материјал од кој е идентификуван ризикот, произведен на местата на производство кои се прогласени за можно контаминирани согласно член 6 точка (а) од оваа наредба, да не се садат и под контрола на фитосанитарниот инспекторат, да биде ставен под соодветна употреба согласно Прилог 6 точка 2 од оваа наредба, со цел дека не постои ризик за ширење на штетниот организам.

(3) Под надзор на фитосанитарниот инспекторат секоја машина, превозно средство, опрема, садови, складишта и делови од нив или други предмети, амбалажа и материјалот за пакување, кои се прогласени за контаминирани согласно член 6 точка (а) од оваа наредба или одредени за можно контаминирани согласно член 6 точка (а) и точка (в) од оваа наредба треба да бидат уништени или исчистени и дезинфицирани со употреба на соодветни методи, согласно Прилог 6 точка 3 од оваа наредба. По извршената дезинфекцијата, ваквите предмети нема да се сметаат како контаминирани.

(4) Како резултат од тестирањето понатамошното назначување на контаминацијата, определувањето на степенот од можното заразување и демаркирање на зоната, согласно член 6 од оваа наредба.

(5) Без оглед на ставовите 1, 2 и 3 од овој член фитосанитарниот инспекторат во зоната која е демаркирана согласно член 6 точка (а) и точка (в) од оваа наредба, утврдува серии од мерки, согласно Прилог 4 точка 4.1 и точка 4.2 од оваа наредба.

Член 8

Семенскиот компир треба да се тестира за да се утврди дали ги исполнува посебните фитосанитарни барања и дали потекнува непосредно од материјал, кој е добиен во рамките на официјално одобрена програма, со официјални контролирани тестови по методот од Прилог 2 од оваа наредба, дека е слободен од штетниот организам. Ова тестирање се спроведува во случаи кога:

(а) било потврдено присуство на штетниот организам во семенски компир кои самите го произведуваат:

- со тестирање во раната фаза на размножување, вклучувајќи ја почетна клонска селекција и систематско тестирање на основното клонирано семе од компир; или

- каде било утврдено дека не постои клонска поврзаност, со помош на тестирање на основното клонирано семе од компир или тестирањата во раната фаза на размножување вклучувајќи ја почетна клонска селекција и

(б) во случаи кога треба да се утврди отсуството на штетниот организам на секое растение од почетна клонска селекција или на репрезентативните примероците-мострите од основниот семенски компир или компирот од претходните размножувања.

Член 9

Без оглед на одредбите од оваа наредба согласно Правилникот за научни и технички капацитети за експериментални, научноистражувачки, селекциони или развојни работи (?), по одобрување од страна на Фитосанитарната управа може да се изврши увоз за внесување или движење на штетни организми, растенија, растителни производи и други објекти и предмети наменети за експериментални, научноистражувачки, селекциони или развојни работи, во кои случаи не се применуваат одредбите од членовите 6 и 7 од оваа наредба, под услов да не се наруши контролата врз штетниот организам и да не се предизвика ризик од ширење на штетниот организам.

(?) Правилникот за научни и технички капацитети за експериментални, научноистражувачки, селекциони или развојни работи е усогласен со одредбите на Директивата на Комисијата бр. 2008/61/ЕС на 17 Јуни 2008 за утврдување на условите под кои одредени штетни организми, растенија, растителни производи и други објекти наведени во анексите од I до V Директивата на Советот 2000/29/ЕС може да се внесат во или движат во рамките на Заедницата или одредени заштитени зони од него, за експерименти или научни цели и за работа на сортната селекција, celex број 32008L0061.

Член 10

(1) Доколку условите тоа го налагаат може да се применат и други дополнителни или построги мерки заради уништување на штетниот организам или да се спречи неговото ширење.

(2) Дополнителните мерки наведени од став (1) од овој член можат да вклучат упатство дека може да се сади само семенскиот компир, кој е официјално потврден или официјално прегледан и ги исполнува бараните фитосанитарни стандарди за здравствената состојба на растението и истото се однесува и за наведениот растителен материјал.

Член 11

Со денот на влегувањето во сила на оваа наредба престанува да важи Наредбата за систематски контроли и мерки за спречување на ширењето и за сузбивање на бактериското венење и кафеавото гниење на компирот предизвикано од бактеријата *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. („Службен весник на Република Македонија“ бр. 32/07).

Член 12

Оваа наредба влегува во сила осмиот ден од денот на објавувањето во „Службен весник на Република Македонија“.

Бр. 17- 522/4
за земјоделство,

Министер

септември 2011 година
и водостопанство,

шумарство

Скопје
Димовски, с.р.

Љупчо

ПРИЛОГ 1

Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al. ПРЕДИЗВИКУВАЧ НА КАФЕАВОТО ГНИЕЊЕ НА КРТОЛИТЕ И БАКТЕРИСКО ВЕНЕЊЕ НА КОМПИРОТ И ДОМАТИТЕ И НЕГОВИ РАСТЕНИЈА
ДОМАЌИНИ

1. *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. предизвикувач на кафеавото гниење на кртолите и бактериско венење на компирот и доматиите, е еден од значајните организми кои се штетни за компирите и доматиите. Со официјална инспекција или посебен надзор се вршат испитувања кои се потребни за локализирање на патогенот, но земајќи го предвид фактот дека под определени климатски услови оваа болест може да остане латентна и незабележана како при растењето на надземните делови од компирот така и кај кртолите и земање на примероци-мостри, бидејќи патогенот може да се прошири преку површинската вода или дивите растенија од фамилијата Solanaceae, особено со наводнување на посеви од компир и домати со контаминирана вода може да претставува ризик за инфекција и негово ширење во овие насади.

Штетниот организам може да опстане преку зима кај самоникнати растенија (волонтери) од компири и домати и тие може да претставуваат главен извор за пренесување на инфекцијата од една година во друга, односно од една вегетациона сезона во друга. Штетниот организам се пренесува и шири и преку контаминирање на компири кои дошле во контакт со заразени и заболени компири за време на садењето, бербата, опремата за ракување, превозните средства или садовите за складирање кои биле контаминирани со штетниот организам од претходно заразени и заболени компири.

Листата на растенија домаќини на *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. наведени во членот 2 од оваа наредба.

Растенија (вклучувајќи кртоли), освен вистинско семе на *Solanum tuberosum* L., - компири

Растенија, освен плодови и семе од *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw. - домати

2. При вршење на посебен надзор фитосанитарниот инспектор треба да изврши испитувања согласно член 3 став (2) точка (а) од оваа наредба кои се базираат на биологијата на штетниот организам и соодветни производни системи, каде:

(а) во случај на компир:

- во соодветно време, визуелна инспекција на посевот, и/или земање примероци-мостри од семето и други компири во вегетационата сезона или во складиштата. Овие примероци-мостри треба да бидат предмет на официјална инспекција и посебен надзор со визуелна инспекција со сечење на кртолите; и

- во случај на семе од компири и доколку е возможно за други компири, официјални лабораториско тестирање со употреба на методот согласно Прилог 2 од оваа наредба.

(б) во случај на домати:

- визуелна инспекција, во соодветно време на посевот од растенијата наменети за пресадување за професионална употреба.

3. При вршење на посебен надзор фитосанитарниот инспектор треба да извести од официјалното испитување согласно член 3 став (3) од оваа наредба кое содржи:

(а) во случај на испитување на компири:

- проценка на вкупната површина, во хектари, засадена со семе и други компири;

- стратификација по категорија односно семенската категорија од семе и меркантилен компири, и каде што е соодветно по региони;

- број и време на земање на примероци/(мостри) за тестирање;

- број на визуелни инспекции во полето и

- број (и големина на примерокот/(мострата) од визуелната инспекција на кртолите.

(б) во случај на испитување на псеви од домати наменети за пресадување за професионална употреба:

- вкупниот број од проценети растенија и

- број на визуелни инспекции.

(в) во случај на испитување на растенијата домаќини кои не се домати и компири, вклучувајќи ги дивите растенија домаќини од фамилијата Solanaceae:

- видовите;

- бројот и времето на земените примероци-мостри;
- областа/реката од која се земаат примероците-мострите и
- методот на анализи;

(г) во случај на испитување на водата и течениот отпад испуштен од преработувачките капацитети или погоните за пакување:

- бројот и времето на земените примероци-мостри;
- областа/реката/локацијата на објектите од кои се земени примероците –мострите и
- методот на анализи.

ПРИЛОГ 2

ТЕСТ ШЕМА ЗА ДИЈАГНОЗА, ОТКРИВАЊЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЈА НА БАКТЕРИЈАТА НА КАФЕАВО ГНИЕЊЕ НА КРТОЛИТЕ И БАКТЕРИСКО ВЕНЕЕЊЕ НА КОМПИРОТ И ДОМАТИТЕ *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

ОПСЕГ НА ТЕСТ ШЕМАТА

Следната шема ги опишува различните постапки вклучени во:

- (1) дијагнозата на кафеавото гниење кај кртолите и бактериско венење кај компирот, домотот и некои други растенија-домаќини;
- (2) откривање и детекција на *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. во примероци на кртоли, компир, домот и други растенија-домаќини, водата и почвата;
- (3) идентификација на *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (sin. *Pseudomonas solanacearum*), (во натамошниот текст како *R. solanacearum*).

ОПШТИ ПРИНЦИПИ

Во додатоките обезбедени се оптималните протоколи за различни методи, потврдени реагенси и детали за подготовка на материјалите за тестирање и контрола. Лаборатории вклучени во оптимизирањето и потврдувањето на протоколите се наведени во Додаток 1.

Бидејќи протоколите вклучуваат откривање на карантински организам и ја вклучуваат употребата на живи култури на *R. solanacearum* како контролен материјал, потребно е да се спроведат постапките под соодветни карантински услови со соодветни средства за отпадните материјали и според условите со соодветни одобренија, издадени од Фитосанитарната управа.

Параметрите за тестирање мора да обезбедат веродостојна и репродуктивна детекција на нивоата на *R. solanacearum* на поставените прагови од избраните методи. Најважно е да се изврши соодветна подготовка на позитивните контроли.

Тестирањето според бараните прагови, исто така укажува на точни поставки, одржување и калибрирање на опремата, внимателно ракување и чување на реагенсите и сите мерки за спречување контаминација помеѓу примероците, т.е. одделување на позитивните контроли од примероците за тестирање. Мора да се применуваат стандардите за контрола, со цел да се избегнат административни и други грешки, особено во врска со означувањето и документацијата.

Сомневањето за појавата како што е наведено во член 5 став (2), доколку укажува на позитивен резултат во дијагностицирањето или тестовите за анализа кои се извршени на примерокот, наведено е во графиконите. Ако првиот тест за анализа е позитивен (IF тест, PCR /FISH, селективна изолација), треба да се потврди со втор тест за анализаврз врз основа на различни биолошки принципи.

Ако првиот тест за анализа (IF или PCR /FISH) е позитивен, тогаш постои сомнеж за контаминација со *R. solanacearum* и затоа мора да се направи второ тестирање. Ако второто тестирање е позитивно, тогаш се потврдува сомнежот (сомневањето за појавата) и мора да се продолжи тестирањето според шемата. Ако вториот тест за анализа е негативен, тогаш примерокот се смета дека не е заразен со *R. solanacearum*.

Потврдено присуство, како што е наведено во член 6 став (1), од наредбата, укажува на изолација и идентификација на чиста култура на *R. solanacearum*, со потврда на патогеноста.

ДЕЛ 1

1. ДИЈАГРАМСКИ ПРИКАЗ

1.1. Шема на откривање за дијагноза на кафеаво гниење на кртолите и бактериско венење на компирот и домотите *Ralstonia solanacearum* кај кртоли и компир, домат или други растенија-домаќини со симптоми на кафеаво гниење на кртолите и бактериско венење на компирот и домотите

Постапката за тестирање е наменета за кртолите и растенија со симптоми типични за или кои упатуваат на сомневање на кафеаво гниење на кртолите и бактериско венење на компирот и доматите. Постапката вклучува брз тест за анализа, изолација на патогенот од заразеното спроводното ткиво на медиум за дијагностицирање и во случај на позитивен резултат, идентификација на култура на *Ralstonia solanacearum*.

(1) За опис на овие симптоми видете Дел 1.1.

(2) Брзите дијагностички тестови ја олеснуваат веројатноста на поставувањето на дијагнозата, но не се од суштинско значење. Негативниот резултат не гарантира секогаш отсуство на патогенот.

(3) Тест за ексудација на стеблото (стриминг тест) на бактериски исцедок од спроводното ткиво на стеблото е опишан во Дел 6. А.1.

(4) Тестот за поли- β -хидроксибутират гранули во бактериски клетки е опишан во Дел 6. А.2.

(5) Серолошките тестови за аглутинација на бактериски исцедок или екстракти од симптоматично ткиво се опишани во Дел 6. А.3.

(6) IF тестот за бактериски исцедок суспендиран во вода или екстракти од симптоматично ткиво е опишан во Дел 6. А.5.

(7) FISH тестот за бактериски исцедок суспендиран во вода или екстракти од симптоматично ткиво е опишан во Дел 6. А.7.

(8) ELISA тестот за бактериски исцедок суспендиран во вода или екстракти од симптоматично ткиво е опишан во Дел 6. А.8.

(9) PCR тестот за бактериски исцедок суспендиран во вода или екстракти од симптоматично ткиво е опишан во Дел 6. А.6.

(10) Патогенот најчесто лесно се изолира од симптоматичниот растителен материјал со растворена размаска во Дел 2.3.

(11) Типичната морфологија на колоната е опишана во Дел 2. 3.(г.)

(12) Одгледувањето култури може да не биде успешно во случаи на напреден стадиум на инфекцијата што се должи на натпреварување или пребрзо растење на сапрофитските бактерии. Ако симптомите на болеста се типични, но тестот на изолација е негативен, тогаш изолацијата мора да се повтори, првенствено користејќи тест на селективна размаска.

(13) Веродостојна идентификација на чисти култури на веројатност на изолатите на *R. solanacearum* се постигнува со користење на тестовите опишани во Дел 6. Б. Субспецифичната карактеризација е изборна, но се препорачува во за секој нов случај.

(14) Тестот за патогеност е опишан во Дел 6. В.

2. Шема за откривање и идентификација на *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. во примероци од кртоли на компири без симптоми

Принцип

Постапката за тестирање е наменета за откривање на латентни инфекции во кртоли на компирот. Мора да се потврди позитивен резултат од најмалку два теста, врз основа на различни биолошки принципи, преку изолација на патогенот, проследено со изолација на типичн колонии, потврда за чиста култура на *Ralstonia solanacearum*. Позитивниот резултат од само еден тест за анализа не е доволен да се смета за сомнителен тој примерок.

Тестовите за анализа и тестовите со изолација мора да овозможуваат праг на откривање од 10^3 до 10^4 клетки/мл на гранулат(талог), вклучувајќи како и позитивни контроли во секоја серија тестови.

(1) Стандардната големина на примерокот е 200 кртоли, иако постапката може да се искористи и со помали примероци/мостри, ако нема 200 кртоли.

(2) Методите за екстракција (ексудација на стеблото) и концентрација на патогенот наведени во Дел 3.1.1.

(3) Ако најмалку два теста направени врз основа на различни биолошки принципи се позитивни, треба да се изврши изолација и потврдување. Треба да се направи најмалку еден тест за анализа. Кога овој тест е негативен, примерокот се смета за негативен. Во случај овој тест да биде позитивен, потребно е да се направи втор или повеќе тестови врз основа на различни биолошки принципи со цел да се потврди позитивниот резултат. Ако вториот или другите тестови се негативни, примерокот се смета за негативен. Понатамошни тестови не се потребни.

(4) IF тестот е опишан во Дел 6. А.5.

(5) Тестот на селективна изолација е опишан во Дел 6. А.4.

(6) PCR тестовите се опишани во Дел 6. А.6.

(7) FISH тестот е опишан во Дел 6. А.7.

(8) ELISA тестовите се опишани во Дел 6. А.8.

(9) Биоанализата е опишана во Дел 6. А.9.

(10) Типичната морфологија на колоната е опишана во Дел 2. 3.(г.)

(11) Одгледувањето култури или биоанализата може да не биде успешна поради конкуренцијата или попречувањето од сапрофитските бактерии. Ако со тестовите за анализа се постигнат позитивни резултати, но тестовите за изолација се негативни, треба да се повторат тестовите од истите пелети т.е. подлоги или со земање дополнително од спроводно ткиво во близина на окцето од пресечените кртоли од истиот примерок и ако е потребно да се тестираат дополнителни примероци.

(12) Веродостојна идентификација на чисти култури на веројатност на изолати на

R. solanacearum се постигнува со користење на тестовите наведени во Дел 6. Б.

(13) Тестот за патогеност е опишан во Дел 6. В.

3. Шема за откривање и идентификација на *Ralstonia solanacearum* (Smith)

Yabuuchi et al. во примероци од компир, домати или други растенија-домаќини без симптоми

- (1) Видете Дел 3.2.1. за препорачаната големина на примерокот.
- (2) Методите за екстракција (ексудација на стеблото) и концентрирање на патоген се опишани во Дел 3.2.1.
- (3) Ако најмалку два теста направени врз основа на различни биолошки принципи се позитивни, треба да се изврши изолација и потврдување. Треба да се направи најмалку еден тест за анализа. Кога овој тест е негативен, примерокот се смета за негативен. Во случај овој тест да биде позитивен, потребно е да се направи втор или повеќе тестови врз основа на различни биолошки принципи со цел да се потврди позитивниот резултат. Ако вториот или другите тестови се негативни, примерокот се смета за негативен. Понатамошни тестови не се потребни.
- (4) Тестот на селективна изолација е опишан во Дел 6. А.4.
- (5) IF тестот е опишан во Дел 6. А.5.
- (6) PCR тестовите се опишани во Дел 6. А.6.
- (7) FISH тестот е опишан во Дел 6. А.7.
- (8) ELISA тестовите се опишани во Дел 6. А.8.
- (9) Биоанализата е опишан во Дел 6. А.9.
- (10) Типичната морфологија на колоната е опишана во Дел 2.3.г.
- (11) Одгледувањето култури или биоанализата може да бидат неуспешни поради конкурентност или инхибирање на сапрофитски бактерии. Ако со тестовите за анализа се добијат позитивни резултати, а тестовите на изолација се негативни, тогаш тестовите за изолација се повторуваат.
- (12) Веродостојна идентификација на чисти култури на веројатност на изолати на *R. solanacearum* се постигнува со користење на тестовите опишани во Дел 6. Б.
- (13) Тестот за патогеност е опишан во Дел 6. В.

ДЕЛ 2

ДЕТАЛНИ МЕТОДИ ЗА ДЕТЕКЦИЈА НА RALSTONIA SOLANACEARUM ВО КРТОЛИ ОД КОМПИР, РАСТЕНИЈА ОД КОМПИР, ДОМАТ И ДРУГИ РАСТЕНИЈА ДОМАЌИНИ СО СИМПТОМИ НА КАФЕАВО ГНИЕЊЕ ИЛИ БАКТЕРИСКО ВЕНЕЊЕ

1.1. Симптоми кај компирот

Растенија од компир. Раниот стадиум на инфекцијата во поле се препознава по венење на листовите кон врвот на растението на високи температури во текот на денот и опоравување преку ноќта. Во раните стадиуми на венењето, листовите остануваат зелени, но подоцна жолтеат и се развива кафеава некроза. Епинасти исто така се појавуваат. Венењето на еден изданок или на цело растение за кратко време станува неповратно и доведува до колапс и смрт на растението. Спроводното ткиво на попречно пресечените стебла од овенатите растенија вообичаено се појавува кафеав и млечен бактериск исцедок (ексудат) кој истекува од пресечената површина или се појавува при притискање. Кога пресеченото стебло се става вертикално во вода, од спроводните снопови протекуваат слузести нишки односно конци.

Кртоли од компир. Кртолите мора да се исечат попречно блиску до окцето или по должината преку окцето на кртолата. Раниот стадиум на заразата се препознава по стаклестото жолто до светлокафеаво обојување на васкуларниот прстен од каде спонтано истекува блед кремав бактериски исцедок (ексудат) по неколку минути. Понатаму, васкуларното обезбојување станува уште поистакнато кафеаво и некрозата може да се прошири во паренхимското ткивото. Во понапредните стадиуми, заразата се шири нанадвор од окцето и 'ркулците од каде што може да се исцеди бактериски слуз предизвикувајќи спојување на честички земја. Црвеникаво-кафеави, донекаде вдлабнати лезии може да се појават на лушпата, што се должи на внатрешниот колапс на спроводното ткиво. Секундарниот развој од габи и бактерии предизвикувачи на меко гниење е вообичаено за напредните стадиуми на болеста.

1.2. Симптоми кај домотот

Растенија од домот. Првиот видлив симптом е млитавиот изглед на најмладите листови. При поволни услови во средината за патогенот (температура на почвата приближно 25°C и заситена влажност) се појавуваат епинастии и венење на едната страна или на целото растение, проследено за неколку денови што доведува до целосен колапс на растението. Ако условите не се поволни (температура на почвата под 21°C), се јавува помалку венење, но може да се развијат голем број на адвентивни корени на стеблото. Може да се набљудуваат како во вода натопени дамки од основата на стеблото, што укажува на некроза на васкуларниот систем. Кога стеблото е пресечено напречно, од обезбоените кафеави васкуларни ткива се цеди бел или жолтеникав бактериски исцедок.

1.3. Симптоми кај други домаќини

Растенија на *Solanum dulcamara* и *Solanum nigrum*. Во природни услови, симптомите на венење ретко се забележуваат кај овие плевелни растенија- домаќини, доколку температурата на почвата е повисока од 25°C или нивото на инокулација е екстремно високо (на пример, за *S. nigrum* што расте со заболени растенија на компир или домот). Во случај да се појави венење, симптомите се исти како кај домотот. Растенија на *Solanum dulcamara* кои не венеат, растат со стеблото и корените во вода може да покажуваат светлокафеаво обезбојување на васкуларните ткива на попречен т.е дијагонален пресек на основата на стеблото или на подводните делови на стеблото. Може да има бактериски исцедок (ексудат) од пресечените спроводни ткива или може да се формираат слузести нишки односно конци ако пресеченото стебло се стави вертикално во вода, дури и во отсуство на симптоми на венење.

2. Брзи тестови за анализа (скрининг тестови)

Брзите дијагностички тестови ја олеснуваат веројатноста на поставувањето на дијагноза, но не се од суштинско значење. Искористете еден или повеќе од следниве потврдени тестови:

2.1. Тест на ексудација на стеблото (стриминг тест) (видете Дел 6. А.1.)

2.2. Откривање на поли- β -хидроксибутират (PHB) гранули.

Карактеристичните PHB гранули во клетките на *R. solanacearum* се врши фиксирање со топлина и бојење на размаската на бактериски исцедок од инфицираното ткиво, со бои на Нил сино А или Судан црно (видете Дел 6. А.2.) и се визуализира на микроскопско стакленце.

2.3. Серолошки тестови за аглутинација (видете Дел 6. А.3.)

2.4. Останати тестови

Натамошните соодветни брзи тестови за анализа вклучуваат IF тест (видете Дел

6. А.5.), FISH тест (видете Дел 6. А.7.), ELISA тест (видете Дел 6. А.8.) и PCR

тестови (видете Дел 6. А.6).

3. Постапки за изолирање

(а) Отстранете исцедок или делови од обезбоеното ткиво од васкуларниот прстен на кртолите или од васкуларните садови на стеблото на компирот, домотот или други растенија-домаќини кои венеат. Суспендирајте ги во мала количина стерилна дестилирана вода или 50mM фосфатен пуфер (Додаток 4) и оставете ги од 5 до 10 минути.

(б) Подгответе серија децимални раствори на суспензијата.

(в) Префрлете 50-100 µl на суспензијата и растворите во општ хранлив медиум (NA, YPGA или SPA; видете Додаток 2) и/или во Келманов тетразолиум медиум (Додаток 2) и/или потврден селективен медиум (на пример, SMSA; видете Додаток 2). Се развлекува или размачкува на плочката со соодветна техника. Доколку е корисно, подгответе посебни плочки со растворена клеточна суспензија на *R. solanacearum* биовар 2 за позитивна контрола.

(г) Плочките се инкубираат за два до шест дена на температура од 28°C.

- На општиот хранлив медиум/(хранлива подлога), вирулентните изолати на *R. solanacearum* развиваат бисерно кремаво-бели, плоснати, неправилни и флуидни колонии, често со карактеристично венче во центарот. Авирулентните форми на *R. solanacearum* формираат мали, кружни, нефлуидни маслени колонии кои се целосно кремаво-бели.

- На Келмановиот тетразолиум и SMSA медиум/подлога, бојата на венчињата е крваво црвена. Авирулентните форми на *R. solanacearum* формираат мали, кружни, нефлуидни маслени колонии кои се целосно темноцрвени.

4. Тестови за идентификација за *R. solanacearum*

Тестовите кои го потврдуваат идентитетот на пресумптивните- веројатните изолати на *R. solanacearum* се дадено во Дел 6. Б.

ДЕЛ III

1. Детални методи за откривање и идентификување на *Ralstonia solanacearum* во примероци на кртоли без симптоми

1.1. Подготовка на примерокот Забелешка:

- Стандардната големина на примерокот е 200 кртоли по тест. Поинтензивното земање примероци бара повеќе тестови на примероци со оваа големина. Поголемиот број кртоли во примерокот доведува до инхибирање (запирање) или тешко толкување на резултатите. Меѓутоа, постапката може лесно да се примени за примероци со помалку од 200 кртоли, каде на располагање се помалку кртоли.

- Потврдувањето на сите методи за откривање наведени подолу се заснова врз тестирање на примероци од 200 кртоли.

- Екстрактот добиен од компир наведени подолу може да биде искористен и за откривање на бактерии на прстенесто гниење кај компирот, *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*.

Изборно предтретман во однапред подготвен примерок:

(а) Инкубација на примероци на температура од 25 до 30°C, до две недели пред тестирањето, за да се охрабри размножувањето на евентуална популација на *R. solanacearum*.

(б) Кртолите се мијат. Користете соодветни средства за дезинфекција (соединенија на хлор кога треба да се користи PCR тест со цел да се отстрани патогената ДНК) и детергенти помеѓу секој примерок. Кртолите се сушат на воздух. Оваа постапка на миење е особено корисна (но не е задолжителна) за примероци со многу почва и ако треба да се изврши PCR тест или постапка на директна изолација.

1.1.1. Со чист и дезинфициран скалпел или нож се отстранува кората од окцето на секоја кртола, така што ќе се гледа спроводното ткиво. Внимателно се сече мал дел од спроводното ткиво во подножјето на окцето и внимавајќи да се зафати што помалку соседно неспроводно ткиво.

Забелешка:

Сите (изгниени) кртоли со сомнителни симптоми на кафеаво гниење се ставаат настрана и се тестираат посебно.

Ако за време на отстранувањето на делот на сржта (кортекс) од окцето се забележат симптоми на кафеаво гниење, кртолата треба визуелно да се испита откако ќе се пресече во близина на окцето. Секоја пресечена кртола со сомнителни симптоми треба да се чува на собна температура во период од два дена за да се овозможи суберизација и се чува во фрижидер (на температура од 4 до 10°C) во соодветни услови на карантин. Сите кртоли, вклучувајќи ги и оние со сомнителни симптоми, треба да се чуваат според Прилог 3.

1.1.2. Соберете ја сржта (кортекс) од окцата во неискористени садови за една употреба кои може да се затворат и/или да се запечатат (во случај садовите да се користат повторно, тие треба темелно да се исчистат и да се дезинфицираат со употреба на соединенија од хлор). По можност, веднаш да се обработи. Ако ова не е можно, треба да се чуваат во сад без додавање на заштита или пуфер, да бидат ставени во фрижидер не подолго од 72 часа или не подолго од 24 часа на собна температура.

Окцата на сржта (кортексот) се обработуваат со една од следниве постапки: или,

(а) Сржта (кортексот) се покриваат со доволна количина (околу 40 ml) на пуфер за екстракција (Додаток 4) и се врши миксација со ротирачки мешач (50-100 врт/мин) во период од 4 часа на температура под 24°C, или за 16 до 24 часа во фрижидер,

или

(б) Сржта (кортекс) од окцето се хомогенизираат со доволна количина (околу 40 ml) на пуфер за екстракција (Додаток 4), или во блендер/ миксер (на пример, Waring или Ultra Thurax) или со кршење во затворена ќесе за смекнување за една употреба (на пример, Stomacher или Bioreba цврст политен, 150 mm x 250 mm; стерилизирани со радијација), користејќи гумен чекан или соодветна апаратура за ситнење (на пример, Nomex).

Забелешка:

Ризикот од напречна контаминација на примероците е голем кога тие се хомогенизираат со миксер. Преземете мерки на претпазливост за да избегнете создавање аеросоли или истурање за време на процесот на екстракција. Осигурете ја употребата на свежо стерилизирани ножеви на миксерот и садовите за секој примерок. Ако се користи PCR тест, избегнете пренесување на ДНК на садовите или апаратурата за ситнење. Се препорачува кршење во ќесиња за една употреба и користење епрувети за една употреба кога се користи PCR тест.

1.1.3. Површинскиот флуид се декантира. Ако е премногу заматен, се разбиструва или со бавно центрифугирање (не повеќе од 180 g, 10 минути на температура помеѓу 4 до 10°C), или со вакумска филтрација (40 до 100 µm), миејќи го филтерот со дополнителен (околу 10 ml) пуфер за екстракција.

1.1.4. Концентрирајте го бактерискиот дел со центрифугирање на 7.000 g, 15 минути (или 10.000 g за 10 минути) на температура од 4 до 10°C и отстранете го чистиот флуид без да го попречите гранулатот и да не се помеша талогот.

1.1.5. Ресуспендирајте го гранулатот во пуфер за гранулат од 1.5 ml (Додаток 4). Се користат 500 µl за тестирање за *R. solanacearum*, 500 µl за *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* и 500 µl за референтни цели. Се додава стерилен глицерол на конечната концентрација од 10 до 25% (v/v) на 500 µl од референтниот коефициент и со остатокот од количеството за тестирање, вортекс и силно се промешува и се чува на температура од -16 до -24°C (со недели) или на температура од -68 до -86°C (со месеци). Зачувајте ги аликвотните броеви на тестот на температура од 4 до 10°C за време на тестирањето.

Не се препорачува повторно замрзнување и одмрзнување.

Доколку екстрактот треба да се транспортира, истиот треба да се изврши во разладена комора во период од 24 до 48 часа.

1.1.6. Важно е сите позитивни контроли на *R. solanacearum* и примероците да се третираат одделно, со цел да се избегне контаминација. Ова се однесува на IF слајдовите и на сите тестови.

1.2. Тестирање

Видете го дијаграмот и описот на тестовите и оптимизираните протоколи во соодветните додатоци:

Селективна изолација (видете Дел 6. А.4.) IF тест (видете Дел 6. А.5).

PCR тест (видете Дел 6. А.6.) FISH тест (видете Дел 6. А.7.) ELISA тест (видете Дел 6. А.8.)

Биоанализа тест (видете Дел 6. А.9.)

2. Детални методи за откривање и идентификување на *R. solanacearum* во примероци на компир, домати и други растенија-домаќини без симптоми

2.1. Подготовка на примерокот

Забелешка:

За откривање на латентни популации на *R. solanacearum*, се препорачува тестирање на композитни (сложени) примероци. Постапката може да се користи за композитни (сложени) примероци до 200 делови од стебла. Онаму каде што се вршат истражувања, тие треба да се прават врз основа на статистички соодветен примерок од растителната популација која се испитува.

2.1.1. Ставете ги сегментите (деловите) од стеблото со големина од 1 до 2 cm во стерилен сад, според следните постапки за собирање примероци:

Садниците на домати од расад: Со чист дезинфициран нож, отстранете 1 cm сегмент (дел) од основата на секое стебло, веднаш над нивото на почвата.

Растенија од домати одгледани во поле или во стакленици: Со чист дезинфициран нож, се отстранува најдолниот изданок од секое растение, засекувајќи веднаш над спојот со главното стебло. Се отстранува 1 cm од најдолниот дел на секој страничен изданок.

Други домаќини: Со чист дезинфициран нож или ножици за режење, отстранете 1 cm сегмент (дел) од основата на секое стебло, веднаш над нивото на почвата. Во случајот на *Solanum dulcamara* или други растенија-домаќини кои растат во вода, отстранете делови од 1-2 cm од подводното стебло или столони со корени во вода.

Кога се зема примерок од одредена локација, се препорачува да се тестира статистички репрезентативен примерок од најмалку 10 растенија на земање на примероци од местото од секој потенцијален плевел-домаќин. Откривањето на патогенот ќе биде веродостојно за време на доцна пролет, лето и есен, иако природните инфекции може да се откријат во текот на целата година кај многугодишните растенија како *Solanum dulcamara* која расте во водени текови

(водотеци). Познати како домаќини се вбројуваат самоникнати растенија од компир, *Solanum dulcamara*, *Solanum nigrum*, *Datura stramonium* и други видови на фамилијата *Solanaceae*. Останати домаќини се *Pelargonium* spp. и *Portulaca oleracea*. Некои видови европски плевел кои може да бидат потенцијални домаќини како засолниште на популации на *R. solanacearum* биовар 2/раса 3 во корењата и/или ризосфери под посебни услови на околината се: *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp, *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans*, *Tussilago farfara* и *Urtica dioica*.

Забелешка:

Визуелно испитување за внатрешни симптоми (васкуларно обојување или бактериски исцедок/(ексудат)) може да се направи во оваа фаза. Евентуалните сегменти на стеблото со симптоми се ставаат настрана и се тестираат одделно (видете Дел 2).

2.1.2. Дезинфицирајте ги деловите од стеблото со 70% етанол и веднаш исушете ги со впивачка хартија. Обработете ги деловите од стеблото со една од следниве процедури:

или

(а) Покријте ги деловите со доволно количество (приближно 40 ml) пуфер за екстракција (Додаток 4) и извршете мешање со ротирачки мешач (50 до 100 врт/мин) во период од 4 часа, на температура под 24°C или 16 до 24 часа чување во фрижидер,

(б) Обработете веднаш со кршење на деловите во цврсто ќесе за гмечење, (мацерирање) (на пр. *Stomacher* или *Biogeba*) со соодветно количество пуфер за екстракција (Додаток 4), со користење на гумен чекан или соодветна апаратура за ситнење (на пр. *Homex*). Ако ова не е можно, деловите од стеблото треба да се чуваат замрзнати не подолго од 72 часа или не подолго од 24 часа на собна температура.

2.1.3. Претурете го чистиот флуид откако ќе отстои за 15 минути.

2.1.4. Вообичаено, не е потребно понатамошно прочистување на екстрактот или концентрацијата на бактерискиот дел, но тоа може да се постигне со филтрација и/или центрифугирање, како што е опишано во Дел 3. од 1.1.3. до 1.1.5.

2.1.5. Поделете го концентрираниот екстракт за примерок на два еднакви дела. Едната половина чувајте ја на температура од 4 до 10°C за време на тестирањето, а другата половина чувајте ја со 10 до 25% (v/v) стерилен глицерол на температура од -16 до -24°C (со недели) или на -68 до -86°C (со месеци), ако е потребно понатамошно тестирање.

2.2. Тестирање

Видете го дијаграмот и описот на тестовите и оптимизираните протоколи во соодветните додатоци:

Селективна изолација (видете Дел 6. А.4.) IF тест (видете Дел 6. А.5).

PCR тест (видете Дел 6..А.6) FISH тест (видете Дел 6. А.7) ELISA тест (видете Дел 6..А.8.)

Биоанализа /Биотест (видете Дел 6. А.9.)

ДЕЛ 4

1. Шема за откривање и идентификување на *R. solanacearum* во вода

- (1) Видете Дел 4. 2.1. за препорачани процедури за земање примероци.
- (2) Методите за концентрирање на патоген се опишани Дел 4.2.1. Концентрацијата ги зголемува популациите и на патогенот и на конкурентните сапрофитски бактерии и се препорачува само доколку не резултира до запирање на тестот на изолација.
- (3) Тестот на селективна изолација е опишан во Дел 6. А.4.
- (4) Биоанализата е опишан во делот 6. А.9.
- (5) PCR методи за збогатување се опишани во Дел 6. А.4.2 и Дел 6. А.6.
- (6) ELISA методи за збогатување се опишани во Дел 6. А.4.2 и Дел 6. А.8.
- (7) Во Дел 2. 3.(г) е содржан опис на типична морфологија на колонија.
- (8) Одгледувањето култури може да не биде успешно поради конкуренцијата или попречувањето од сапрофитските бактерии. Доколку постои сомнение дека сапрофитски популации влијаат врз веродостојноста на изолацијата, тогаш тестот на изолација се повторува по растворање на примерокот во стерилна вода.
- (9) Веродостојна идентификација на чиста веројатност на култура на *R. solanacearum* се постигнува со користење на тестовите наведени во Дел 6. Б.
- (10) Тестот за патогеност е опишан во Дел 6. В.

2. Методи за откривање и идентификување на *R. solanacearum* во вода

Принцип

Потврдената шема за откривање, опишана во овој дел, се применува за детекција на патогенот во примероци на површинска вода, а исто така, може да се примени за тестирање на примероци на вода од преработки на компир на или отпадни води. Сепак, важно е да се забележи дека очекуваната осетливост на откривањето ќе варира во зависност од супстратот. Осетливоста на тестот на изолација е под влијание на популациите на конкурентните сапрофитски бактерии кои вообичаено ги има повеќе во водата добиена од преработката на компирот и отпадните води отколку кај површинската вода. Додека шемата која е долунаведена се очекува да открие

најмалку 10⁷ клетки на литар во површинската вода, осетливоста на откривањето во води од преработка на компир или отпадни води најверојатно ќе биде значително пониска. За таа цел, се препорачува да се тестираат отпадните води по третмани за прочистување (на пример, седиментирање или филтрирање) и за тоа време се намалуваат популациите на сапрофитските бактерии. Ограничувањата на шемата на осетливост на тестот треба да се има предвид кога се проценува веродостојноста на евентуалните негативни резултати. Додека оваа шема за откривање успешно се користени при посебниот надзор за да утврди присуство или отсуство на патоген во површинска вода, нејзините ограничувања треба да се реализираат кога се слични примероците од преработка на компир или отпадни води.

2.1. Подготовка на примерокот

Забелешка:

- Детектирање на *R. solanacearum* во површинска вода е најверодостојно за време на доцна пролет, лето и есен, кога температурата на водата е повисока од 15°C.

- Повторно земања на примероци во различни периоди од гореспоменатиот период на одредени примероци укажува на зголемена веродостојноста на детекција со намалувањето на последиците на климатските варијации.

- Да се земат предвид ефектите на обилните дождови и географијата на водените текови за да се избегне ефектот на растворање што може да го замагли присуството на патогенот.

- Се земаат примероци од водата во близина на растенијата-домаќини доколку се присутни домаќините.

2.1.1. На избраните места за земање примероци, соберете примероци од водата со полнење на стерилни епрувети или шишиња, со земање ако е можно, на длабочина, под 30 cm и околу 2 m од брегот на водената површина. За индустриските и отпадните води, земете примероци од местото на испуштање на тие води. Се препорачува големината на примероците да биде до 500 ml по место. Доколку се претпочитаат помали примероци, се советува да се земат примероци на најмалку три наврати од место за земање на примероците, а секој примерок се состои од две повторувачки потпримероци од најмалку 30 ml. При интензивен посебен надзор, изберете најмалку три места за земање примероци на секои 3 km од текот на водата и бидете сигурни дека сте зеле примероци од притоците кои се влеваат во водниот тек.

2.1.2. Примероците се транспортираат во ладни и темни услови (4 до 10°C) и се тестираат во рок од 24 часа.

2.1.3. Доколку е потребно, бактерискиот дел може да се концентрира со користење на следниве методи:

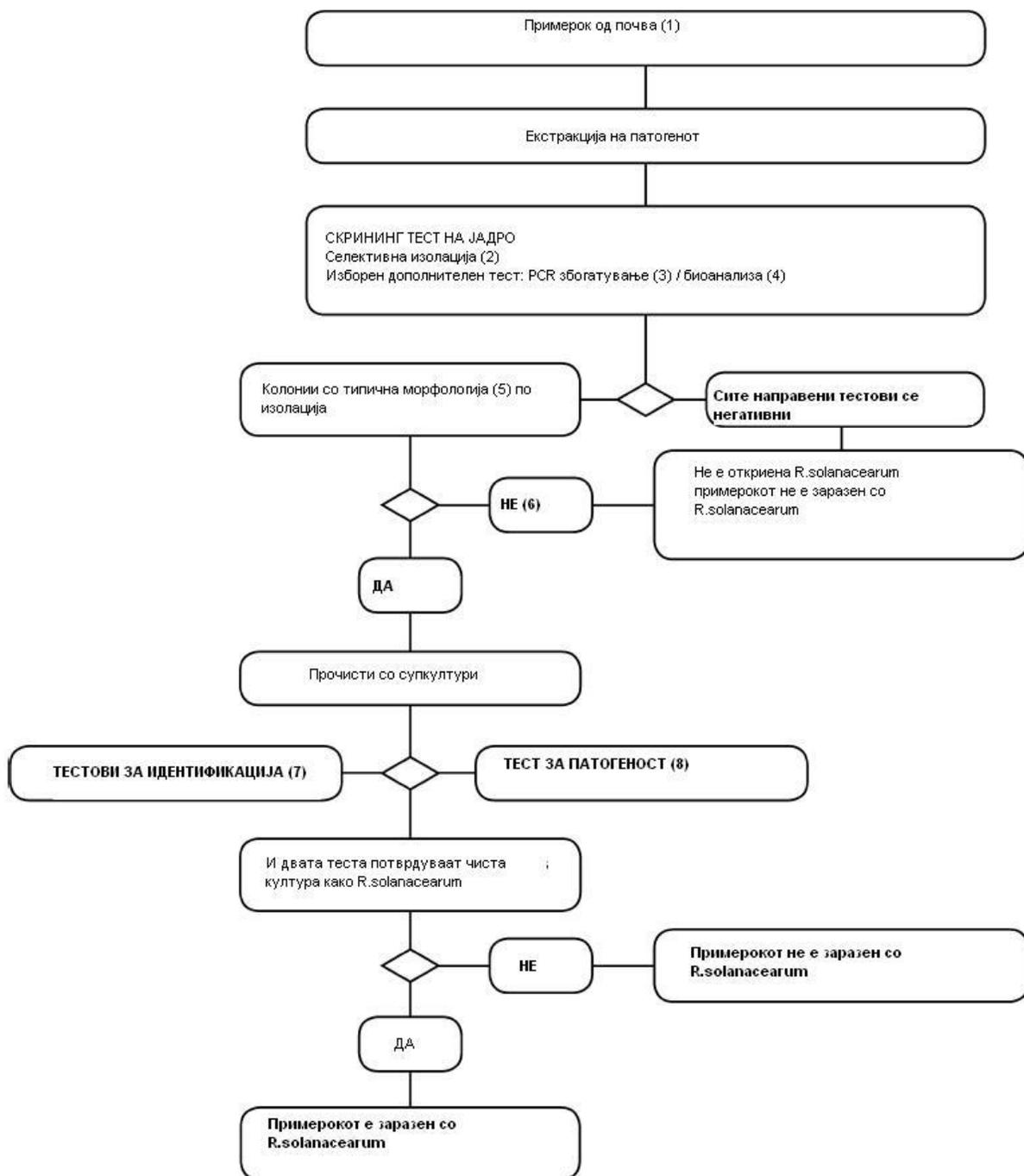
(а) центрифугирајте од 30 до 50 ml на потпримероци од 10 000 g, за 10 минути (или 7 000 g за 15 минути), се препорачува температура од 4 до 10°C, се отстранува делот кој плива (супернатант) и гранулатот се ресуспендира во 1 ml пуфер за екстракција (Додаток 4).

(б) мембранско филтрирање (минимална големина на порите 0,45 µm) по што следува миеење на филтерот во 5 до 10 ml пуфер на гранулатот и задржување на измениот дел. Овој метод е соодветен за поголеми количества вода што содржи мал број сапрофити. Концентрирањето најчесто не се препорачува за примероци на вода од обработен компир или отпадни води, токму поради зголемените популации на конкурентните сапрофитски бактерии кои го попречуваат детектирањето на *Ralstonia solanacearum*.

2.2. Тестирање. Видете го дијаграмот и описот на тестовите во соодветните додатоци.

ДЕЛ 5

1. Шема за откривање и идентификување на *R. solanacearum* во почвата



(1) Видете Дел 5.2.1. за препорачаните постапки за земање примероци.

(2) Тестот на селективна изолатија е опишан во Дел 6. А.4.

(3) PCR методи за збогатување се опишани во Дел 6. А.4.2 и Дел 6. А.6.

(4) Биоанализата е опишана во Дел 6. А.9.

(5) Во Дел 2.3.(г) е содржан опис на типична морфологија на колонија.

(6) Одгледувањето на култури може да не биде успешно поради конкуренцијата или попречувањето од сапрофитските бактерии. Доколку постои сомнение дека сапрофитски популации влијаат врз веродостојноста на изолацијата, тогаш тестот на изолација се повторува по растворање на примерокот.

(7) Веродостојна идентификација на чиста веројатна култура на *R. solanacearum* се постигнува со користење на тестовите наведени во Дел 6. Б.

(8) Тестот за патогеност е опишан во Дел 6. В.

2. Методи за откривање и идентификување на *R. solanacearum* во почва

Принципи

Потврдената шема за откривање, опишана во овој дел, се применува за откривање патогени во примероци на почвата, а исто така, може да се примени за тестирање цврсти примероци од преработка на компир или отпадни води. Сепак, треба да се забележи дека овие методи не се доволно осетливи за да гарантираат откривање на ниски и/или неправилно распространети популации на *Ralstonia solanacearum* кои може да се јават во природно заразени примероци на овие супстрати.

Ограничувањата на осетливоста на оваа шема на тестирање треба да се земат предвид кога се проценува веродостојноста на добиените негативни резултати, а исто така, и кога се користат во истражувања за одредување на присуството или отсуството на патогени во почвата или отпадот. Најверодостојниот тест за присуство на патоген во почвата е да се засади осетлив домаќин и да се мониторира при инфекцијата, но дури и со овој метод нема да може да открие ниското ниво на контаминација.

2.1. Подготовка на примерокот

2.1.1. Земањето примероци на почва од поле треба да се следат стандардните принципи кои се користат за земање примероци на нематоди. Соберете 0,5 до 1 kg почва по примерок од 60 места од 0,3 ha од длабочина од 10 до 20 cm (или во мрежа 7 x 7 метри). Ако постои сомнение за присуство на патоген, зголемете го бројот на места на 120 за површина од 0,3 ha. Чувајте ги примероците на температура од 12 до 15°C пред тестирањето. Земете примероци од обработките од компирот и отпадните води преку собирање на вкупно 1 kg од местата кои претставуваат вкупно количество отпад што треба да се тестира. Измешајте го добро секој примерок пред тестирањето.

2.1.2. Потпримероците од 10 до 25 g почва или отпад се дисперзираат со ротирачки мешач (250 врт/мин) во 60 до 150 ml пуфер за екстракција (Додаток 4) до два часа. Доколку е потребно, додавањето 0,02% стерилен Tween-20 и 10 до 20 g стерилен чакал може да помогне при дисперзирањето.

2.1.3. Задржете ја суспензијата на 4°C за време на тестирањето.

2.2. Тестирање

Видете го дијаграмот и описот на тестовите во соодветните додатоци.

ДЕЛ 6

ОПТИМИЗИРАНИ ПРОТОКОЛИ ЗА ОТКРИВАЊЕ И ИДЕНТИФИКУВАЊЕ НА *R. SOLANACEARUM*

А. ТЕСТОВИ ЗА ДИЈАГНОСТИЦИРАЊЕ И ОТКРИВАЊЕ

1. Тест за ексудација на стеблото (стриминг тест)

Присуството на *R. solanacearum* во стеблата на компир, домати или други растенија-домаќини што венеат, може да се наведе со следниов едноставен тест на веројатност: исечете го стеблото веднаш над нивото на почвата. Суспендирајте ја пресечената површина во епрувета со чиста вода. Набљудувајте за карактеристично спонтано протекување на нишки/конци на бактериски слуз од пресечените васкуларните садови после неколку минути.

2. Детекција на поли- β -хидроксибутират гранули /(талог)

1. Подгответе размаска на бактериски исцедок од инфицираното ткиво или од 48- часовна култура на YPGA или SPA медиум (Додаток 2) на микроскопска плочка.
2. Подгответе размази за позитивна контрола на биовар 2 сојот на *R. solanacearum* и доколку се смета за корисно, размаска за негативна контрола на познат РНВ негативен вид.
3. Дозволете да се исуши на воздух и префлрете ја долната површина на секоја плочка над пламен за да се фиксираат размаските.
4. Препаратот се бои или со Нилско сино или Судан црно и се набљудува под микроскоп на следниов начин:

Тест со Нилско сино:

(а) Потопете ја секоја плочка со 1% воден раствор на Нилско сино 1 и инкубирајте

10 минути на температура од 55°C.

(б) Исушете го растворот за боене. Кратко измијте го под слаб млаз со водоводна вода. Отстранете го вишокот вода со впивачка хартија.

(в) Потопете ја плочката со 8% воден раствор на оцетна киселина и инкубирајте една минута на собна температура.

(г) Кратко измијте го под слаб млаз водоводна вода. Отстранете го вишокот вода со впивачка хартија.

(д) Повторно навлажнете со капка вода и покријте со плочка.

(е) Испитајте ја обоената размаска со епифлуоресцентен микроскоп на 450 nm маслено потопување, при зголемување од 600 до 1000, користејќи објектив потопен во масло или во вода.

(e) Набљудувајте за јако портокалово обоени флуоресцентни гранули на РНВ. Исто така, набљудувајте под природно светло за да се осигурите дека гранулитите се интрацелуларни и дека морфологијата на клетката е типична за *R. solanacearum*.

Тест со Судан црно:

(a) Потопете ја секоја плочка со 0,3% раствор на Судан црно В во 70% етанол и инкубирајте 10 минути на собна температура.

(б) Исушете го растворот за обојување и кратко измијте со водоводна вода, отстранувајќи го вишокот вода со вливлива хартија.

(в) Потопете ги накратко плочките во ксилол и исушете со тапкање со вливлива хартија. Внимание: ксилолот е штетен, па затоа преземете мерки на претпазливост и работете во ламинар (дигесториум).

(г) Потопете ги плочките со 0,5% (w/v) воден раствор на шафранин и оставете ги 10 секунди на собна температура.

Внимание: шафранинот е штетен, па затоа преземете мерки на претпазливост и работете во ламинар (дигесториум).

(д) Измијте ги на слаб млаз со водоводна вода, исушете со вливлива хартија и покријте со друга плочка.

(f) Испитајте ги обоените размаски со светлосен микроскоп користејќи природно светло со потопување во масло (имерзија), со зголемување од 1000, и објективот да е потопен во масло.

(e) Набљудувајте за сино-црно обојување на РНВ гранули во клетки на *R. solanacearum* со розово обоени клеточни ѕидови.

3. Серолошки тестови за аглутинација

Аглутинацијата на клетките на *R. solanacearum* во бакерискиот исцедок или екстракт од симптоматично ткиво најдобро се забележува со користење на потврдени антитела (види Додаток 3) обележани со соодветни обоени маркери како, на пример, црвените клетки на *Staphylococcus aureus* или честички на обоен латекс. Доколку користите достапен комплет на пазарот (видете Додаток 5), следете ги упатствата на производителот. Во спротивно, следете ја нареднава процедура:

(а) Измешајте капки суспензија на обележено антитело и бактериски исцедок (приближно 5 μ l за секој) на сидовите на плочките за тестирање со повеќе вдлабнатини.

(б) Подгответе позитивни и негативни контроли користејќи суспензија на *R. solanacearum* биовар 2 и хетерологен (различен) сој.

(в) Набљудувајте за аглутинација во позитивните примероци по нежно мешање 15 секунди.

4. Селективна изолација

4.1. Селективно посејување на плочка

Забелешка: Пред да го користите овој метод за првпат, изведете прелиминарни тестови за да се осигури повторливо детектирање на 10^3 до 10^4 клетки на *R. solanacearum* кои формираат колонија во милилитар, додадени во екстракти на примероците кои претходно биле негативни на тестовите.

Употребете соодветно потврден селективен медиум како SMSA (како што е модифициран од Elphinstone et al., 1996 г.; (видете Додаток 2).

Потребно е внимателно да се направи разлика помеѓу *R. solanacearum* од други бактерии кои се способни да развијат колонии на медиумот/подлогата. Понатаму, колониите на *R. solanacearum* може да покажат атипична морфологија ако плочките се пренатрупани или ако се присутни и антагонистички бактерии. Кога постои сомнение за конкуренција или анатонизам, примерокот треба повторно да се тестира користејќи различен тест.

Најголема чувствителност на детектирање со овој метод може да се очекува кога се користат свежо подготвени екстракти на примерокот. Меѓутоа, овој метод се применува кај екстракти кои се чувале во глицерол на температура од -68 до -86°C .

Како позитивни контроли, подгответе децимални раствори од 10^6 cfu/ml од вирулентен биовар 2 сој на *R. solanacearum* (на пример, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). За да се избегне евентуална можност од контаминација, подгответе позитивни контроли целосно одделно од примероците кои треба да се тестираат.

За секоја ново подготвена серија на селективен медиум/подлога, треба да е погодна за растењето на патогенот пред да се користи за тестирање на рутински примероци.

Тестирајте го контролниот материјал на идентичен начин како примерокот (примероците).

4.1.1. Изведете соодветна техника на разредена размаска со цел да се осигури дека се сведени на минимум евентуалните ефекти на популациите кои формираат колонии во позадината. Нанесете 50-100 μl на плочка од екстрактот на примерокот и од секое разредување.

4.1.2. Инкубирајте ги плочките на 28°C . Прочитајте ги плочките по 48 часа и потоа, секој ден во период од шест дена. Типичните колонии на *R. solanacearum* на SMSA медиум се млечно бели, плоскати, неправилни и флуидни и по тридневна инкубација добиваат розова до крв црвена боја во центарот со внатрешно набраздување или создавање венче.

Забелешка:

Понекогаш на овој медиум се формираат атипични колонии на *R. solanacearum*. Тие може да бидат мали, заоблени, целосно црвени и нефлуидни или само делумно флуидни, па затоа тешко се разликуваат од сапрофитските колонии кои формираат бактерии.

4.1.3. Прочистете ги веројатните колонии на *R. solanacearum* по нанесувањето или разредената размаска на општ хранлив медиум/(хранлива подлога) за да се добијат изолирани колонии (видете Додаток 2).

4.1.4. Чувајте ги културите краткорочно во стерилна вода (pH 6 до 8, без хлор) на собна температура на темно место или долгорочно, на соодветен смрзнувачко издржлив медиум на –68 до –86°C или со лиофилизација.

4.1.5. Идентификувајте ги веројатните култури (видете Дел 6. Б.) и изведете тест за патогеност (видете Дел 6. В)

Толкување на резултатите од тестот на селективно засејување.

Тестот на селективно засејување на плочка е негативен ако не се забележани бактериски колонии по шест дена или ако не се најдени веројатни колонии типични за *R. solanacearum*, под услов да нема сомневање за инхибирање што се должи на конкурентноста или антагонизмот на други бактерии и да бидат најдени типични колонии на *R. solanacearum* на позитивните контроли.

Тестот на селективно засејување на плочка е позитивен ако се изолирани претпоставени колонии на *R. solanacearum*.

4.2. Постапка за збогатување

Употребете соодветно потврден збогатен медиум, како што е модифицираната хранлива средина на (Wilbrink broth) (видете Додаток 2).

Оваа постапка може да се искористи за селективно зголемување на популациите на *R. solanacearum* во екстрактите на примерокот и да се зголеми осетливоста на откривање. Исто така, постапката ефикасно ги разредува инхибиторите на PCR реакцијата (1:100). Треба да се забележи дека збогатувањето на *R. solanacearum* може да биде не успешно поради конкурентноста или антагонизмот на сапрофитски организми кои често истовремено се развиваат. Поради тоа, изолирањето на *R. solanacearum* од збогатени хранливи култури може да биде тешко. Понатаму, поради тоа што популациите на серолошки поврзаните сапрофити може да се зголемат, употребата на специфични моноклонални антители отколку поликлонални тела се препорачува онаму каде што се користи ELISA тестот.

4.2.1. За збогатување-PCR, пренесете 100 µl од екстрактот на примерокот во 10 ml збогатена хранлива подлога (Додаток 2) претходно поделена на алокворни делови во епрувети или

лабораториски колби без ДНК. За збогатување-ELISA, може да се употребат поголеми делови на екстрактот на примерокот во хранлив медиум/подлога (на пример, 100 μ l во 1,0 ml збогатена хранлива подлога).

4.2.2. Инкубирајте 72 часа на температура од 27 до 30°C во агитирана или статичка култура со капачиња кои не се затвораат целосно за да се дозволи проветрување.

4.2.3. Добро да се измеша пред да се употреби во ELISA или PCR тестови.

4.2.4. Третирајте ја збогатената хранлива подлога на ист начин како и примероците во горенаведените тестови.

Забелешка: Ако се очекува инхибиција на збогатувањето на *R. solanacearum*, поради високите популации на одредени конкурентни сапрофитски бактерии, збогатувањето на екстрактите на примерокот пред центрифугирање или други чекори за концентрирање може да даде подобри резултати.

5. IF тест

Принцип

Употребата на IF тестот како основен тест за анализа (скрининг тест) се препорачува поради неговата способност за постигнување на бараните гранични вредности.

При употреба на IF тестот како основен тест за анализа, ако резултатот е позитивен мора да се направи PCR или FISH тест, како втор тест за анализа. Кога се користи IF тестот како втор тест

за анализа и резултатот е позитивен, потребно е понатамошно тестирање според шемата на постапки, со цел да се комплетира анализата.

Забелешка:

Користете потврден извор на антитела на *R. solanacearum*. Се препорачува да се утврди титер за секоја нова серија антитела. Титерот се дефинира како највисокото ниво на разредување на кое се јавува оптимална реакција кога се тестира суспензија што содржи 10⁵ до 10⁶ клетки во милилитар на хомологен вид на *R. solanacearum* и кога се користи соединение на флуоресцентен изотиоцијанат конјугат (FITC), според препораките на производителот. Сите потврдени поликлонални антисеруми имаат IF титар од најмалку 1:2000. За време на тестирањето, антителата треба да се користат во работен раствор/раствори (WD) блиску до, или на нивото на титерот.

Тестот треба да се изведе на свежо подготвени екстракти од примерокот. Доколку е потребно, тестот може успешно да се изврши кај екстракти кои се чувале во глицерол на температура од -68 до -86°C. Глицеролот може да се отстрани од примерокот со додавање 1 ml гранулатен пуфер (Додаток 4), повторно да се центрифугира 15 минути на 7000 g и да се ресуспендира во подеднаква количина на гранулатен пуфер. Ова често не е неопходно, особено ако примероците се фиксирани на плочките со пламен.

Подгответе одделни плочки за позитивни контроли со хомологени видови или други референтни видови на *R. solanacearum*, суспендирани во екстрактот на компир, како што е наведено во (Додаток 3. Б.) и по избор, во пуфер.

Природно инфицираното ткиво (кое се одржува со лиофилизација или замрзнување на -16 до -24°C) треба да се користи секаде каде што е можно како слична контрола на истата плочка.

Како негативна контрола може да се користат аликвотните делови на екстракт на примерок што претходно дал негативен резултат на тестирање за *R. solanacearum*.

Стандардизираните позитивни и негативни контролни материјали достапни за употреба со овој тест се наведени во Додаток 3.

Употребете микроскопски плочки со повеќе вдлабнатини, по можност со 10 прозорчиња со минимален дијаметар од 6 mm.

Тестирајте го контролниот материјал на идентичен начин како примерокот (примероците).

5.1. Подгответе ги плочките за тестирање користејќи една од следниве постапки: (а) За гранулатите (талог) со релативно мал седимент на скроб:

Со пипета ставете измерено стандардно количество (15 μ l е доволно за прозорец од 6 mm – за поголеми прозорци користете поголеми количества) од 1/100 раствор на ресуспендираната гранулат од компирот и ставете го на првиот прозорец. Понатаму, со пипета додавајте слично количество неразредена пелета (1/1) и ставете го врз другите прозорци во редот. Вториот ред може да се искористи како дупликат или како втор примерок, како што е прикажано на слика 1.

(б) За останатите гранулати (талози):

Подгответе децимални раствори (1/10 и 1/100) од ресуспендираниот гранулат во пуфер за гранулати. Со пипета земете стандардно количество (15 μ l е соодветно за прозорец со дијаметар од 6 mm – за поголеми прозорци користете поголеми количества) од ресуспендираниот гранулат и секој раствор во редот прозорци. Вториот ред може да се користи како дупликат или како втор примерок, како што е прикажано на слика 2.

5.2. Исушете ги капките на собна температура или со загревање на температура од 40 до 45°C. Фиксирајте ги бактериските клетки на плочката или со загревање (15 минути на температура 60°C), запалување на пламен со 95% етанол или според упатствата од добавувачите на антигено.

Ако е неопходно, фиксираните плочки потоа може да се чуваат замрзнати во сува кутија во колку што е можно пократок период (максимално до 3 месеци) пред да се продолжи со понатамошно тестирање.

5.3. IF постапка

(а) Според подготовката на плочки за тестирање наведено во 5.1(а):

Подгответе сет двократни раствори антитела во IF пуфер. Првата комора треба да содржи ? од титерот (T/2), а другите ? од титерот (T/4), ? од титерот (T/2), титерот (T) и двојно од титерот (2T).

(б) Според подготовката на плочката за тестирање, наведено во 5.1(б):

Подгответе го работниот раствор (WD) на антителата во IF пуфер. Работниот раствор влијае на специфичноста.

Следната постапка треба да се изврши ако нема специфични упатства од добавувачите на антитела:

5.3.2. Извршете инкубација на плочките на влажна хартија, покриени, во период од 30 минути на собна температура (18 до 25°C).

5.3.3. Протресете ги капките од секоја плочка и внимателно измијте со IF пуфер. Измијте со потопување за 5 минути во IF пуфер – (Tween) (Додаток 4) и потоа за време од 5 минути во IF пуфер. Избегнувајте предизвикување аеросоли или пренос на капките, кое може да резултира со напречна контаминација. Внимателно отстранете ја влажноста со нежно бришење.

5.3.4. Распоредете ги плочките на влажна хартија. Покријте ги тест прозорците со раствор од FITC конјугат кој се користи за определување на титерот. Количеството конјугат што се применува на секој прозорец мора да биде идентично како количеството антитела што се користи.

5.3.5. Инкубирајте ги покриените плочки на влажна вливлива хартија 30 минути на собна температура (18 до 25°C).

5.3.6. Истресете ги капките конјугат од плочката. Измијте како што е наведено во (5.3.3).

Внимателно отстранете го вишокот влага.

5.3.7. Со пипета додадете 5 до 10 μl од 0,1M глицерол со фосфатен пуфер (Додаток 4) или комерцијално средство против избледнување во секој прозорец и покријте со микроскопско стакленце.

5.4. Читање на IF тест

5.4.1. Разгледајте ги плочките на епифлуоресцентен микроскоп со филтри соодветни за екситација на FITC, со потопување во масло или вода, со зголемување од 500 до 1000. Скенирајте ги прозорците по два дијаметри под прав агол и околу периметарот. За примероците кои не покажуваат или покажуваат мал број клетки, набљудувајте најмалку 40 микроскопски полиња.

Проверете ја прво позитивната контролна плочка. Клетките мора да бидат светли флуоресцентни и целосно прекриени со титерот од антитела или работниот раствор. IF тестот (Дел б. А.5) мора да се повтори ако прекриеноста не е доволна.

5.4.2. Набљудувајте за светлите флуоресцентни клетки со карактеристична морфологија на *R. solanacearum* во тест прозорците на тест плочките. Интензитетот на флуоресцентноста мора да биде еднаков од сојот на позитивната контролна на истиот раствор на антитела. Клетките со нецелосно прекривање или со слаба флуоресценција мора да се отфрлат.

Ако има сомнеж за контаминација, тестот мора да се повтори. Ваков може да биде случајот кога сите плочки во групата покажуваат позитивни клетки поради контаминацијата на пуферот или ако се забележат позитивни клетки (надвор од прозорците на плочката) на прекривката на плочката.

5.4.3. Постојат неколку проблеми што се карактеристични за тестот со имунофлуоресценција. Основните популации флуоресцентни клетки со атипична морфологија и сапрофитски бактерии со големина и морфологија слична на *R. solanacearum*, најверојатно ќе се појават во сржта (кортексот) на компирот и на сегментите од стеблото.

5.4.4. Треба да се земат предвид само клетки со типична големина и морфологија на титерот или работниот раствор на антитела, како што е во

5.4.5. Толкување на читањето на IF тестот:

(а) Ако се забележат светли флуоресцентни клетки со карактеристична морфологија, пресметајте го просечниот број типични клетки по микроскопско поле и пресметајте го бројот на типични клетки по ml ресуспендиран гранулат (Додаток 5).

IF читањето е позитивно за примероците со намалку 5×10^2 типични клетки на ml ресуспендиран гранулат. Примерокот се смета за потенцијално контаминиран и потребно е понатамошно тестирање.

(б) IF читањето е негативно за примероците со помалку од 5×10^2 клетки на ml ресуспендиран гранулат и примерокот се смета за негативен. Не е потребно понатамошно тестирање.

6. PCR тест

Принципи

Кога се користи PCR тест како прв тест за анализа и истиот е позитивен, мора да се направи изолациски или IF тест, како втор задолжителен тест за анализа. Кога се користи PCR тестот како втор тест за анализа и резултатот е позитивен, потребно е понатамошно тестирање според шемата на постапки, со цел да се комплетира дијагнозата.

Целосно искористување на овој метод како основен тест за анализа се препорачува само кога постои специјализирана експертиза.

Забелешка: Прелиминарното тестирање со овој метод треба да овозможи репродуктивно откривање на најмалку 10^3 до 10^4 клетки од *R. solanacearum* на ml додадени на екстракт од примерок кој претходно бил тестиран и покажал негативен резултат. Експериментите за оптимизација може да бидат потребни за да се постигнат максимални нивоа на чувствителност и специфичност во сите лаборатории.

Користете соодветно потврдени PCR реагенси и протоколи (види Додаток 6).

Пожелно е да изберете метод со внатрешна контрола.

Користете соодветни мерки на претпазливост за да избегнете контаминација на примерокот со целна ДНК. PCR тестот треба да го вршат искусни техничари во специјални лаборатории за молекуларна биологија, со цел да се минимизира можноста за контаминација со целната ДНК.

Негативните контроли (за ДНК екстракција и PCR постапките) треба секогаш да се третираат како конечни примероци во постапката, за да се види дали се појавило пренесување на ДНК.

Следните негативни контроли треба да бидат вклучени во PCR тестот:

- екстракт на примерок што претходно бил тестиран и се покажал како негативен за *R. solanacearum*.
- пуфер контроли кои се користат за екстракција на бактеријата и ДНК од примерокот,
- PCR – реактивен микс.

Треба да се вклучат следните позитивни контроли:

- аликоти на суспендиран гранулат на кој е додаден *R. solanacearum* (препарација, види Додаток 3. Б.),
- суспензија од 10⁶ клетки на ml од *R. solanacearum* во вода од вирулентен изолат (на пр. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; види Додаток 3 Б).
- ако е можно, исто така, користете ја ДНК извадена од позитивните контролни примероци во PCR тестот.

Со цел да избегнете можна контаминација, подгответе ги позитивните контроли во одделна средина од онаа во којашто ќе се тестираат примероците.

Екстрактите од примероци треба да бидат исчистени од земја. Затоа, во одредени случаи, се препорачува да се подготват екстрактите од измени компири, во случај кога се користат PCR протоколи.

Стандардизирани позитивни и негативни контролни материјали, коишто може да се користат со овој тест, се наведени во Додаток 3).

6.1. Методи за прочистување на ДНК

Користете позитивни и негативни контролни примероци, како што е прикажано погоре (види Додаток 3).

Подгответе го контролниот материјал на идентичен начин како и примерокот (примероците).

Достапни се разновидни методи за прочистување на ДНК од сложените супстрати на примероците, така што се отстрануваат инхибиторите на PCR и другите ензиматски реакции и

концентрирање на целната ДНК во екстрактот на примерокот. Следниот метод е направен за да се употребува со потврден PCR метод, прикажан во Додатокот 6.

(а) Метод според Пастрик(Pastrik) (2000)

1) Со пипета земете 220 μ l пуфер за лизирање (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) во 1.5 ml Епендорфова епрувета.

2) Додадете 100 μ l екстракт од примерок и ставете го на грејач или водена када, на температура од 95°C за време од 10 минути.

3) Оставете ја епруветата на мраз 5 минути.

4) Додадете 80 μ l раствор од лизозим (50 mg лизозим на ml во 50 mM Tris HCl, pH 10) и инкубирајте на температура од 37°C, 30 минути.

5) Додадете 220 μ l од Easy DNA® раствор А (инвитроген), добро промешајте и инкубирајте на температура од 65°C за време од 30 минути.

6) Додадете 100 μ l од Easy DNA® раствор Б (инвитроген), силно измешајте се додека преципитатот слободно не протече во епруветата и примерокот е еднакво вискозен.

7) Додадете 500 μ l хлороформ и мешајте се додека не се намали вискозноста и додека смесата не стане хомогена.

8) Центрифугирајте на 15000 g за 20 минути на температура од 4°C за да ги одделите фазите и да се формира интерфазата.

9) Пренесете ја горната фаза во нова Епендорфова епрувета.

10) Додадете 1 ml од 100% етанол (-20°C), кратко мешајте и инкубирајте на мраз 10 минути.

11) Центрифугирајте на 15.000 g за 20 минути на температура од 4°C и отстранете го етанолот од пелетата.

12) Додадете 500 μ l од 80% етанол (-20°C) и мешајте со превртување на епруветата.

13) Центрифугирајте на 15000 g за 10 минути на температура од 4°C, отстранете го етанолот и задржете ја плочката.

14) Дозволете плочката да се исуши или користете ДНК комора.

15) Ресуспендирајте ја плочката во 100 μ l стерилна UPW и оставете ја на собна температура најмалку 20 минути.

16) Чувајте на температура од -20°C се додека не е потребна за PCR.

17) Со центрифугирање, отстранете ги белите преципитати и користете 5 μ l од супернатантот кој содржи ДНК за PCR.

(6) Други методи

Други методи за екстракција на ДНК, (на пр. Qiagen DNeasy Plant Kit) може да се применат под услов ако се докаже дека се еднакво ефикасни во прочистувањето на ДНК од контролните примероци што содржат 10^3 до 10^4 патогенски клетки на ml.

6.2. PCR

6.2.1. Подгответе ги тест и контролните шаблони за PCR според потврден протокол (Дел VI.A.6). Подгответе еден децимален раствор на ДНК екстракт на примерок (1:10 во UPW).

6.2.2. Подгответе соодветен PCR реактивен микс во неконтаминирана средина, според објавените протоколи (Додаток 6). Каде што е можно, се препорачува да се користи повеќеслоен PCR протокол со внатрешна PCR контрола.

6.2.3. Додадете 2-5 μ l ДНК екстракт на 25 μ l PCR реакција во стерилни PCR

епрувети според PCR протоколи (види Додаток 6).

6.2.4. Вклучете го негативниот контролен примерок што содржи само PCR реактивен микс и додадете го истиот извор на UPW, како што е направено во PCR миксот на местото од примерокот.

6.2.5. Ставете ги епруветите во истиот термоциклатор кој се користеше во прелиминарното тестирање и спроведете ја соодветно оптимизираната PCR програма (Додаток 6).

6.3. Анализа на PCR производот

6.3.1. Разложете ги PCR ампликоните/ производите со електрофореза со агарозен гел. Излејте најмалку 12 μ l амплифицирана ДНК реактивна мешавина од секој примерок измешан со 3 μ l пуфер за полнење (Додаток 6) во 2,0% (w/v) агарозни гелови во трис-ацетат-EDTA (TAE) пуфер (Додаток 6) на 5 до 8 V на см. Користете соодветен ДНК маркер, на пр. 100 bp скала.

6.3.2. Откријте ги ДНК врските со обложување со етидиум бромид (0,5 mg на l) за време од 30 до 60 минути, имајќи предвид соодветни мерки за претпазливост при ракувањето со овој мутаген.

6.3.3. Набљудувајте го обложениот гел на UV трансилуминација на кратки бранови ($\lambda = 302 \text{ nm}$) за засилени PCR производи со очекувана големина (Додаток

б) и документирајте.

6.3.4. За сите нови наоди/случаи треба да ја потврдите автентичноста на PCR ампликонот, преку изведување рестриктивна ензимска анализа на примерок од останатата амплифицирана ДНК, со инкубација на оптимална температура и време, со соодветен ензим и пуфер (види Додаток б). Растворете ги обработените фрагменти со електрофореза со агарозен гел како претходно и набљудувајте ја карактеристичната рестриктивна шема на фрагментот под UV трансилуминација, по обложување со етидиум бромид и споредете со дијагностицираните и недијагностицираните позитивни контроли.

Толкување на резултатите од PCR тестот:

PCR ќе биде негативен ако *R. solanacearum*-специфичниот PCR производ со очекувана големина не се забележи на примерокот, но се забележува за сите позитивни контролни примероци (во случај на повеќеслојна PCR анализа со внатрешни контролни параметри карактеристични за растенија: вториот PCR производ со очекувана големина мора да се засили со примерокот што се анализира).

PCR тестот ќе биде позитивен ако се забележи *R. solanacearum*-специфичниот PCR производ со очекувана големина и рестриктивна шема (кога е потребно), под услов да не се засили со која било од негативните контролни примероци. Исто така, може да се добие веродостојна потврда со повторување на тестот со вториот комплет PCR параметри (Додаток б).

Забелешка: Може да се посомневате на инхибиција на PCR ако очекуваниот производ се добие од позитивен контролен примерок со *R. solanacearum* во вода, но се добиваат негативни резултати од позитивните контроли со *R. solanacearum* кај екстрактот од компир. Кај повеќеслојните PCR протоколи со внатрешни PCR контроли, инхибицијата на реакцијата е индицирана кога не се добива ниту еден од производите.

Може да има сомневање за контаминација ако очекуваниот производ се добие од еден или од повеќе негативни контроли.

7. FISH тест

Принцип

Кога се користи FISH тест како прв тест за анализа и ако истиот е позитивен, мора да се направи IF тест, како втор задолжителен тест за анализа. Кога се користи FISH тестот како втор тест за анализа и резултатот е позитивен, потребно е понатамошно тестирање според шемата на постапки, со цел да се комплетира дијагнозата.

Забелешка: Користете верификувани специфични олиго-проби за *R. solanacearum* (види Додаток 7). Прелиминарното тестирање со овој метод треба да овозможи репродуктивно откривање на најмалку 10^3 до 10^4 клетки од *R. solanacearum* на ml додадени на екстракт од примерок кој претходно бил тестиран и покажал негативен резултат.

Следната постапка пожелно е да се врши на свежо подготвен екстракт од примерок, но, исто така, може успешно да се изврши и на екстракт од примерок што се чува во глицерол на температура од -16 до -24°C или -68 до -86°C .

Како негативни контроли, користете ги аликотите на екстрактот од примерокот што претходно покажал негативен резултат за *R. solanacearum*.

Како позитивни контроли, подгответе суспензии кои ќе содржат 10^5 до 10^6 клетки на ml од *R. solanacearum* biovar 2 (на пр. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, види Додаток 3), во 0,01M фосфатен пуфер (PB) од три до пет дневна култура).

Подгответе одделни позитивни контролни плочки од хомогената низа или која било друга референтна низа на *R. solanacearum*, ставена во екстракт од компир, како што е наведено во (Додаток 3. Б).

Користењето на FITC означена еубактериска олиго-проба нуди контрола за процесот на хибридизација, бидејќи ќе ги прекрие сите еубактерии што се присутни на примерокот.

Стандардизирани позитивни и негативни контролни материјали, коишто може да се користат со овој тест, се наведени во (Додаток 3.А).

Тестирајте го контролниот материјал на идентичен начин како и примерокот

(примероците).

7.1. Фиксирање на екстрактот од компир

Следниот протокол се базира на Wullings et al., (1998),

7.1.1. Подгответе раствор за фиксирање (види Додаток 7).

7.1.2. Со пипера земете 100 μl од секој екстракт на примерок во Епендорфова епрувета и центрифугирајте 7 минути на 7000 грама.

7.1.3. Отстранете го чистиот флуид (супернатантот) и растворете го гранулатот во 200 μl фиксатор, претходно подготвен за помалку од 24 часа. Мешајте и инкубирајте еден час во ладилникот.

7.1.4. Центрифугирајте 7 минути на 7000 грама, отстранете го чистиот флуид и ресуспендирајте го гранулатот во 75 μl 0,01M PB (види Додаток 7).

7.1.5. Нанесете 16 μl од фиксираниите суспензии на чиста плочка за повеќекратно тестирање, како што е прикажано на сликата 7.1. Нанесете два различни нерастворени примероци по плочка и користете 10 μl за да направите 1:100 раствор (во 0,01 M PB). Останатиот раствор од примерокот (49 μl) може да се чува на температура од -20°C по додавање на количество од 96% етанол. Во случај да треба да се повтори FISH анализата, отстранете го етанолот со центрифугирање и додадете еднакво количество 0,01 PB (измешајте во вортекс - вртетка мешалица).

7.2.3. Нанесете 10 µl од растворот за хибридизација (Додаток 7) на осум прозорци (прозорци 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 и 10; види слика 7.1.) на секоја плочка и оставете ги празни двата централни прозорци (3 и 8).

7.2.4. Користете плочки (24 × 24 mm) за првите и последните четири прозорци без да се пропушта воздух. Ставете ги плочките во претходно загреана влажна комора и хибридизирајте пет часа во печка на температура од 45°C на темно.

7.2.5. Подгответе три лабораториски чаши со 1 l Milli Q вода (за молекуларна анализа), 1l од 1x (hybmix) (334 ml 3x (hybmix) и 666 ml Milli Q вода) и 1l од 1/8x (hybmix) (42 ml 3x (hybmix) и 958 ml Milli Q вода). Претходно инкубирајте ја секоја од нив во водена када на температура од 45°C.

7.2.6. Отстранете ги плочките од слајдовите и ставете ги на држач за плочки.

7.2.7. Измијте го вишокот на сондата со инкубација од 15 минути во лабораториска чаша со 1x (hybmix), на температура од 45°C.

7.2.8. Пренесете го држачот на плочки во раствор за миење од 1/8 (hybmix) и извршете инкубација дополнителни 15 минути.

7.2.9. Кратко потопете ги плочките во Milli Q вода и ставете ги на филтер хартија. Отстранете го вишокот влажност со покривање на површината со филтер хартија. Со пипета земете 5 до 10 µl раствор од засилувач против бледеење (на пр. Vectashield, Vecta Laboratories, или еднакви) на секој прозор и користете голема плочка (24 × 60 mm) на целата површина.

7.3. Читање на FISH тестот

7.3.1. Набљудувајте ги плочките под микроскоп опремен за епифлуоресценција на 630 или 1000 x зголемување потопени во масло. Со филтер соодветен за флуоресцентни изотиоцијантни (FITC) еубактериски клетки (вклучително повеќето грам негативни клетки) во примерокот се прекриени со флуоресцентно зелено. Со филтер за тетраметилродамин-5-изотиоцијанат, клетки обложени со СуЗ на *R. solanacearum* имаат флуоресцентна црвена боја. Споредете ја морфологијата на клетката со таа на позитивните контроли.

Клетките мора да бидат светли флуоресцентни и целосно прекриени. FISH тестот (дел VI.A.7) мора да се повтори ако прекриеноста не е доволна. Скенирајте ги прозорците по два дијаметри под прав агол и околу периметарот. За примероците кои не покажуваат или покажуваат мал број клетки, набљудувајте најмалку 40 микроскопски полиња.

7.3.2. Набљудувајте за светлите флуоресцентни клетки со карактеристична морфологија на *R. solanacearum* во тест прозорците на тест плочките. Интензитетот на флуоресцентноста мора да биде еднаков или подобар од позитивната контрола. Клетките со нецелосно прекривање или со слаба флуоресценција мора да се отфрлат.

7.3.3. Ако има сомневање за контаминација, тестот мора да се повтори. Ваков може да биде случајот кога сите плочки во групата покажуваат позитивни клетки поради контаминацијата на пуферот или ако се забележат позитивни клетки (надвор од прозорците на плочката) на прекривката на плочката.

7.3.4. Постојат неколку проблеми што се карактеристични за FISH тестот. Основните популации флуоресцентни клетки со атипична морфологија и сапрофитски бактерии со вкрстено дејство, со големина и морфологија слична на

R. solanacearum, најверојатно ќе се појават од сржта (кортексот) од окцата во компирот и на сегментите од стеблото, иако многу поретко во споредба со IF тестот.

7.3.5. Разгледајте ги само флуоресцентните клетки со типична големина и морфологија.

7.3.6. Толкување на резултатите од FISH тестот:

(а) Валидни резултати од FISH тестот се постигнуваат ако се разгледуваат светли зелени флуоресцентни клетки со големина и морфологија типична за *R. solanacearum*, со употреба на FITC филтер, и ако се разгледуваат светли црвени флуоресцентни клетки со употреба на родамински филтер кај сите позитивни контроли и не кај негативните контроли. Ако се забележат светли флуоресцентни клетки со карактеристична морфологија, пресметајте го просечниот број типични клетки по микроскопско поле и пресметајте го бројот на типични клетки по ml ресуспендиран гранулат (Додаток 4). Примероците со најмалку 5×10^3 типични клетки на ml ресуспендиран гранулат се сметаат за потенцијално контаминирани. Потребно е понатамошно тестирање. Примероците со помалку од 5×10^3 типични клетки на ml ресуспендиран гранулат се сметаат за негативни.

(б) FISH тестот е негативен ако не се забележат светли црвени флуоресцентни клетки со големина и морфологија типична за *R. solanacearum*, користејќи родамински филтер, под услов тие типични светли флуоресцентни клетки да се набљудуваат во позитивните контролни кога се користи родаминскиот филтер.

8. ELISA тестови

Принцип

ELISA тестови може да се користат како оптимални тестови покрај IF, PCR или FISH поради нивната релативно мала чувствителност. Кога се користи DAS ELISA задолжително е збогатување и употреба на моноклонски антитела. Збогатувањето на примерокот пред користење на ELISA може да биде корисно со цел да се зголеми чувствителноста на овој тест, но може и да не биде успешно како резултат на конкуренцијата од другите организми во примерокот.

Забелешка: Користете проверен извор на антитела на *R. solanacearum*. Се препорачува да се одредува титерот за секоја група на антитела. Титерот се дефинира како највисок раствор на кој се јавува оптимална реакција кога се врши тестирање на суспензија што содржи 10^5 до 10^6 клетки на ml од хомогената низа на *R. solanacearum* и кога се користат соодветни секундарни соединенија на антитела според препораките на производителот. За време на тестирањето,

антителата треба да се користат на работните раствори (WD) во близина на, или во титерот на комерцијалната формулација.

Одредете го титерот на антителата на суспензија од 10^5 до 10^6 клетки на ml од хомогената низа на *R. solanacearum*.

Вклучете екстракт на примерок кој претходно бил тестиран и покажал негативен резултат за *R. solanacearum* и суспензија од бактерија без вкрстено дејствување во фосфатен солен пуфер (PBS) како негативни контроли.

Како позитивна контрола, користете ги аликотите на екстрактот од примерокот што претходно покажал негативен резултат, заедно со 10^3 до 10^4 клетки на ml од

R. solanacearum biovar 2 (на пример, низа NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, види Додаток 2 А и Б). За споредба на резултатите на секоја плочка користете стандардна суспензија од 10^5 до 10^6 клетки на ml во PBS на *R. solanacearum*. Проверете дали позитивните контроли се добро одделени на микротитерната плочка од примерокот (примероците) што се тестираат.

Стандардизирани позитивни и негативни контролни материјали, коишто може да се користат со овој тест, се наведени во Додаток 3 А.

Тестирајте го контролниот материјал на идентичен начин како и примерокот (примероците).

Два ELISA протоколи се валидни.

(а) Индиректен ELISA (Robinson Smith et al., 1995)

1) Користете 100 до 200 μ l аликоти на екстрактот од примерокот. (загревањето на 100°C четири минути во водено купатило или грејач може да ги намали неспецифичните резултати во некои случаи.)

2) Додадете еднакво количество обложен пуфер со двојна сила (Додаток 4) и промешајте.

3) Нанесете 100 μ l аликоти на секоја од најмалку две комори на микротитерната плоча (на пр. Nunc-Polysorp или слично) и инкубирајте еден час на температура од 37°C или преку ноќ на температура од 4°C .

4) Извадете ги екстрактите од коморите. Трипати измијте ги коморите со PBS- Tween (Додаток 4), и последниот раствор за миеење оставете го во коморите најмалку пет минути.

5) Подгответе соодветен раствор на антитела против *R. solanacearum* во блокирачки пуфер (Додаток 4). За потврдени комерцијални антитела, користете ги препорачаните раствори (вообичаено двапати поконцентрирани од титерот).

6) Додадете 100 μ l на секоја комора и инкубирајте еден час на температура од 37°C.

7) Извадете го растворот од антитела од коморите и измијте ги коморите на ист начин како во точка (4).

8) Подгответе соодветен раствор од секундарни соединенија на антитела од алкална фосфатаза во блокирачкиот пуфер. Додадете 100 μ l на секоја комора и инкубирајте еден час на температура од 37°C.

9) Извадете го соединетото антитело од коморите и измијте ги коморите на ист начин како во точка (4).

10) Додадете 100 μ l алкален фосфатазен супстратен раствор (Додаток 4) на секоја комора. Инкубирајте во темно на собна температура и читајте ја апсорпцијата на 405 nm на редовни интервали од 90 минути.

(6) DASi ELISA

1) Подгответе го соодветниот раствор од анти-*R. solanacearum* поликлонални имуноглобулини во обложен пуфер pH 9.6 (Додаток 4). Додадете 200 μ l на секоја комора. Инкубирајте на температура од 37°C четири или пет часа или на температура од 4°C шеснаесет часа.

2) Коморите измијте ги трипати со PBS-Tween (Додаток 4).

Додадете 190 μ l од екстрактот од примерокот на најмалку две комори. Исто така, додадете позитивни и негативни контроли во две комори на секоја плочка. Инкубирајте 16 часа на температура од 4°C.

3) Коморите измијте ги трипати со PBS-Tween (Додаток 4).

4) Подгответе соодветен раствор на моноклонски антитела специфични за *R. solanacearum* во PBS (Додаток 4), којшто ќе содржи 0,5% говедски серум албумин (BSA) и додадете 190 μ l на секоја комора. Инкубирајте на температура од 37°C два часа.

5) Коморите измијте ги трипати со PBS-Tween (Додаток 4).

6) Подгответе соодветен раствор од анти-имуноглобулини од глувци со алкална фосфатаза во PBS. Додадете 190 μ l на секоја комора. Инкубирајте на температура од 37°C два часа.

7) Коморите измијте ги трипати со PBS-Tween (Додаток 4).

8) Подгответе алкален фосфатазен супстратен раствор кој содржи 1 mg p-нитрофенил фосфат на ml супстратен пуфер (Додаток 4). Додадете 200 μ l на секоја комора. Инкубирајте во темно на собна температура и читајте ја апсорпцијата на 40 nm на редовни интервали од 90 минути.

Толкување на резултатите од ELISA тестот:

ELISA тестот е негативен ако читањето на просечната оптичка густина (OD) од двојни комори е < 2x OD од читањето на контролната комора со екстракт од негативен примерок, под услов OD за позитивните контроли да биде над 1,0 (по 90-минутна инкубација со супстратот), а да биде двапати поголем од OD добиен за екстракти од негативни примероци.

ELISA тестот е позитивен ако читањата на просечната оптичка густина од двојни комори е > 2x OD во екстрактот на негативен примерок под услов сите читања на OD во сите негативни контролни комори се < 2x читањата во позитивните контролни комори.

Негативните ELISA читања во позитивни контролни комори покажуваат дека тестот не бил точно извршен или бил прекинат. Позитивни ELISA читања во негативни контролни комори покажуваат дека се појавила вкрстена контаминација или неспецифично врзување на антитела.

9. ТЕСТ СО БИОАНАЛИЗА

Забелешка: Прелиминарното тестирање со овој метод треба да овозможи репродуктивно откривање на најмалку 10³ до 10⁴ клетки кои формираат колонии од *R. solanacearum* на ml додадени на екстракт од примерок кој претходно бил тестиран и покажал негативен резултат (подготовка, види Додаток 3).

Највисоко ниво на чувствителност при откривање може да се очекува кога се користи свежо подготвен екстракт од примерок и кога има оптимални услови за растење. Меѓутоа, методот може успешно да се користи за екстракти што се чувале во глицерол на температура од -68 до -86°C.

Следниот протокол се базира на Janse (1988):

9.1. Користете 10 растенија за тестирање од осетлива сорта на домати (на пр. Moneymaker или друга осетлива сорта, определена од лабораторијата за тестирање) во третата фаза на вистинит лист за секој примерок. За детали во врска со културите, (види Додаток 8). Како алтернативна можност, може да користите модри патлици (на пример, сортата Black Beauty или сорта со еквивалентна осетливост), користете само растенија во втора или трета фаза на листови до целосно развивање на третиот вистински лист. Се покажа дека Симптомите што се развиваат се помалку тешки и развојот е побавен кај модрите патлици. Онаму каде што е можно, се препорачува да се користат расад од домати.

9.2. Распределете 100 μ l од екстракт на примерок помеѓу растенијата за тестирање.

9.2.1. Инокулација со шприц

Инокулирајте ги стеблата на растенијата веднаш над котиледоните, со користење на шприц со хиподермичка игла (не помалку од 23G). Распределете го примерокот помеѓу растенијата за тестирање.

9.2.2. Надолжна инокулација

Со држење на растението меѓу двата прста, пипетирајте една капка (приближно 5 до 10 μ l) од суспендираната плочка врз стеблото меѓу котиледоните и првиот лист.

Со употреба на стерилен скалпер направете дијагонален пресек, околу 1.0 cm долг и приближно длабок $2/3$ од дебелината на стеблото, почнувајќи со нанесување на капки од ресуспендираниот талог од плочката.

Затворете го пресекот со стерилен вазелин од шприц.

9.3. Инокулирајте со истата техника пет садници со водна суспензија од 10⁵ до 10⁶ клетки на ml подготвени од 48-часовна култура на вирулентна биовар 2 низа на *R. solanacearum* како позитивна контрола и со пуфер за гранулат (Додаток 4) како негативна контрола. Одделете ги растенијата од позитивна и негативна контрола од другите растенија за да се одбегне вкрстена контаминација.

9.4. Растенијата за тестирање одгледувајте ги во карантински простории во време од четири недели на температура од 25 до 30°C и висока влажност со соодветно наводнување за да се спречи презаситување со вода или овенување заради недоволно количество на вода. За да избегнете контаминација, инкубирајте ги растенијата од позитивната и негативната контрола на одделни маси/полици во оранжерија или комора за растење, во случај ако нема доволно простор, обезбедете строга поделеност помеѓу третманите. Ако растенијата за различни примероци мора да се инкубираат заедно, одделете ги со соодветни прегради. При фертилизација, наводнување, испитување и друг вид манипулации, внимавајте да избегнувате напречна контаминација. Важно е оранжеријата и коморите за растење да бидат слободни од сите штетни организми, бидејќи тие може да ја пренесуваат бактеријата од еден примерок на друг.

Набљудувајте ги симптоми на венење, епинастии, хлороза и/или запирање на развој.

9.5. Изолирајте од заразени растенија (Дел 2.3) и идентификувајте исчистени култури од *R. solanacearum* (Дел 6.Б).

9.6. Ако не се забележат симптоми по 3 недели, направете IF/PCR/изолација на композитен примерок од 1 cm од стеблото дел на секое растение за тестирање земено над местото на инокулација. Ако тестот е позитивен, извршете обложување со раствор (Дел 4.1.)

9.7. Идентификувајте исчистени култури од *R. solanacearum* (Дел 6.Б).

Толкување на резултатите од тестот со биоанализа.

Валидни резултати од биоанализа се добиваат кога растенијата од позитивната контрола покажуваат типични симптоми, бактериите може да се реизолираат од тие растенија и нема симптоми на негативните контроли.

Тестот со биоанализа е негативен ако растенијата што се тестираат се заразени со *R. solanacearum*, и ако се забележи *R. solanacearum* во позитивни контроли.

Тестот со биоанализа е позитивен ако тест растенијата се инфицирани со *R. solanacearum*.

Б. ТЕСТОВИ ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЈА

Идентификувајте чисти култури на претпоставени изолати на *R. solanacearum* со користење на најмалку два од следните тестови, врз основа на различни биолошки принципи

Вклучете ги познатите референтни соеви онаму каде што е соодветно за секој извршен тест (вид Додаток 3).

Забелешка: Ако изведувате само 2 тестови за идентификација, не користете друг серолошки тест покрај овој метод.

3.1. Подгответе суспензија од приближно 10⁸ клетки на ml во 1X PBS (Додаток 4).

3.2. Изведете соодветна ELISA постапка со специфично моноклонско антитело на *R. solanacearum*.

3.3. Се остварува позитивен ELISA тест ако ELISA читањето што се добива од културата е барем половина од она што се добива за позитивната контрола.

4. PCR тестови

4.1. Подгответе суспензија од приближно 10⁶ клетки на ml во молекуларна стерилизирана вода.

4.2. Загрејте 100 μ l од клеточната суспензија во затворени епрувети во термостат или водена када на температура од 100°C во време од четири минути. Тогаш, примероците може да се чуваат на температура од -16 до -24°C се додека не бидат потребни.

4.3. Применете соодветни PCR постапки за засилување на производи специфични за *R. solanacearum* (на пр. Seal et al. (1993); Pastrik and Maiss (2000); Pastrik et al. (2002); Boudazin et al. (1999); Opina et al. (1997), Weller et al. (1999).

4.4. Позитивна идентификација на *R. solanacearum* се добива ако PCR производи се со иста големина и имаат полиморфизми со иста

рестриктивна должина на фрагмент како и кај сојот од позитивната контрола.

5. FISH тест

5.1. Подгответе суспензија од приближно 10⁶ клетки на мл во ултра чиста вода (UPW).

5.2. Применете ја FISH процедурата (Дел VI.A.7), со најмалку 2 олиго-проби специфични за *R. solanacearum* (Додаток 7).

5.3. Позитивен FISH тест се добива ако се постигнат истите реакции од културата и позитивната контрола.

6. Профилирање на масните киселини (ПМК)

6.1. Одгледувајте ја културата на трипитказен соин агар (Oxoid) за време од 48 часа на температура од 28°C.

6.2. Користете ја соодветната постапка за FAP (Janse, 1991; Stead, 1992).

6.3. Позитивен FAP тест се постигнува ако профилот на претпоставената култура е идентичен со оној на позитивната контрола. Присуството на карактеристични масни киселини е следново 14:0 3ОН, 16:0 2ОН, 16:1 2ОН и 18:1 2ОН, а отсуството на 16:0 3ОН е индикативно за *Ralstonia* sp.

7. Методи за карактеризирање на соевите

Карактеризирање на соевите со користење на еден од следниве методи се препорачува за секој нов случај на изолирање на *R. solanacearum*.

Вклучете ги познатите референтни соеви онаму каде што е соодветно за секој извршен тест (вид Додаток 3).

7.1. Определување на биовариетети

R. solanacearum е поделен на биовариетети (понатаму како биовари) врз основа на можноста да користи и/или да оксидира три дисакариди и три хексозни алкохоли (Hayward, 1964 and Hayward *et al.*, 1990. Медиумите за растење на биовар за тестови се опишани во Додаток 2. Тестот може успешно да се изврши ако медиумите се инокулираат со чисти култури на изолати на *R. solanacearum* и нивна инкубација на температура од 28°C. Ако медиумите се распределат во стерилни плочки на клеточни култури со 96 комори (200 µl на комора) може да се забележи промена на боја од маслинесто зелена на жолта во период од 72 часа, што укажува на позитивен резултат.

Биовар					
	1	2	3	4	5
Употреба на:					
Малтоза	-	+	+	-	+
Лактоза	-	+	+	-	+
D(+)-Целобиоза	-	+	+	-	+
Манитол	-	-	+	+	+
Сорбитол	-	-	+	+	-
Дулцитол	-	-	+	+	-

Со дополнителни тестови се разграничуваат биовар 2 под-фенотипа

	Биовар 2А (распределба низ целиот свет)	Биовар 2А (распространет во Чиле и Колумбија)	Биовар 2Т (распространет во тропски области)
Користење на трехазол	-	+	+
Користење на мезо-инозитол	+	-	+
Користење на D рибоза	-	-	+
Пектолитска активност (1)	ниска	ниска	ниска

(1) Види Lelliott and Stead (1987)

7.2. Анализа на геном

Може да се направи молекуларна диференцијација на соевите во *R. solanacearum* со користење на неколку техники, и тоа:

7.2.1. Анализа на полиморфизми со ограничена должина (RFLP) (Cook et al., 1989).

7.2.2. PCR со низа што се повторува со користење на REP, BOX и ERIC параметри (Louws et al., 1995; Smith et al., 1995).

7.2.3. Анализа на полиморфизми по должина на зголемени фрагменти (AFLP) (Van der Wolf et al., 1998).

7.3. PCR методи

Може да се користат специфични PCR параметри (Patrik et al, 2002; види Додаток

6) за разграничување на соеви од оддел 1 (биовар 3, 4 и 5) и оддел 2 (биовари 1, 2А и 2Т) на *R. solanacearum*, првично определени со RFLP анализа ((Cook et al., 1989) и 16S рДНК секвенцирање (Taghavi et al., 1996).

В. ТЕСТ ЗА ПОТВРДУВАЊЕ

Тестот за патогеноста мора да се изведе како конечна потврда за дијагнозата на

R. solanacearum и за процена на вируленцијата на културите идентификувани како

R. solanacearum.

1) Подгответе инокулум од приближно 10⁶ клетки по ml од 24 до 48-часовни култури од изолат што треба да се тестира и соодветна низа од позитивна контрола од *R. solanacearum* (на пр. NCPPV 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; види Додаток 3).

2) Инокулирајте 5 до 10 осетливи садници од домати или модри патлици во фаза на три вистински листови (види Дел VI.A.9).

3) Инкубирајте во период од две недели на температура од 25 до 28°C и висока влажност со соодветно наводнување, со цел да се избегне исушување или стрес од дехидрирање. Со чисти култури на типично венење би требало да се случи во рок од 14 дена. Ако и по овој период не се присутни симптомите, културата не може да се потврди како патогена форма од *R. solanacearum*.

4) Внимателно набљудувајте за симптоми на венење и/или епинастии, хлороза и/или запирање на развој.

5) Изолирајте од симптоматските растенија, со отстранување на дел од стеблото,

2 cm над точката на инокулација. Пулверизирајте и суспендирајте мало количество стерилна дестилирана вода или 50 mM фосфатен пуфер (Додаток 4). Изолирајте од суспензијата со раствор несубајќи на соодветен медиум, по можност на селективен медиум (Додаток 2), инкубирајте 48 до 72 часа на температура од 28°C и набљудувајте го формирањето на колонии типични за *R. solanacearum*.

В. ТЕСТ ЗА ПОТВРДУВАЊЕ

В. ТЕСТ ЗА ПОТВРДУВАЊЕ

Додаток 1

Лаборатории вклучени во оптимизацијата и потврдувањето на протоколите

(¹)За контакт со научните центри: посетете ја интернет страница
<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

Додаток 2

Медиуми за изолација и култура на *R. solanacearum*

(a) општ медиуми за растење

Агар за потхранување (NA)

Агар за потхранување (Difco) 23,0 g

Дестилирана вода 1,0 l

Растворете ги состојките и стерилизирајте со автоклав на температура од 121°C за време од 15 минути.

Квасен пептонски гликозен агар (YPGA)

Квасен екстракт (Difco) 5,0 g

Бакто-пептон (Difco)	5,0 g
D(+) гликоза (монохидрат)	10,0 g
Бакто-агар (Difco)	15,0 g
Дестилирана вода	1,0 l

Растворете ги состојките и стерилизирајте со автоклав на температура од 121°C за време од 15 минути.

Сукрозен пептонски агар (SPA)

Сукроза	20,0 g
Бакто-пептон (Difco)	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Бакто-агар (Difco)	15,0 g
Дестилирана вода	1,0 l

pH 7,2 – 7,4

Растворете ги состојките и стерилизирајте со автоклав на температура од 121°C за време од 15 минути.

Келманов Тетразолиумски медиум

Касамино киселини (Difco)	1,0 g
Бакто-пептон (Difco)	10,0 g
Декстроза	5,0 g
Бакто-агар (Difco)	15,0 g
Дестилирана вода	1,0 l

Растворете ги состојките и стерилизирајте со автоклав на температура од 121°C за време од 15 минути.

Разладувајте до температура од 50°C и додадете раствор на 2,3,5-трифенил тетразолиум хлорид (Sigma) стерилизиран со филтер за постигнување концентрација од 50 mg на литар.

(б) Потврдени селективни медиуми за раст

SMSA медиум (Енгелбрехт, 1994, изменето со Елфинстон и сораб., 1996)

Базален медиум

Касамино киселини (Difco)	1,0 g
Бакто-пептон (Difco)	10,0 g
Глицерол	5,0 ml
Бакто-агар (Difco); види белешка бр. 2	15,0 g
Дестилирана вода	1,0 l

Растворете ги состојките и стерилизирајте со автоклав на температура од 121°C за време од 15 минути.

Разладете до 50°C и додадете водени готови раствори стерилизирани со филтер од следните состојки, за да се постигнат назначените конечни концентрации:

Кристално виолетово (Sigma)	5 mg на литар
Полимиксин- Б-сулфат (Sigma P-1004)	600000 U (приближно 100 mg) на литар
Бацитрацин (Sigma B-0125)	1250 U (приближно 25 mg) на литар
Хлорамфеникол (Sigma C-3175)	5 mg на литар
Пеницилин-G (Sigma P-3032)	825 U (приближно 0,5 mg) на литар
2,3,5-трифенил тетразолиум хлорид (Sigma)	50 mg на литар

Забелешка:

1. Користењето реагенси надвор од она што е наведено погоре може да предизвика раст на *R. solanacearum*.

2. Оксидниот агар #1 може да се користи наместо бакто-агарот (Difco). Во овој случај растот на *R. Solanacearum* ќе биде побавен, иако растот на конкурентните сапрофити може, исто така, да биде намален. За типичните колонии на *R. Solanacearum* потребни се 1 до 2 дена подолго за да се формираат, а црвеното обојување може да биде посветло и подифузно во споредба со бакто-агарот.

3. Зголемувањето на концентрацијата на бацитрацин на 2500 U на литар може да ги намали популациите на конкурентните бактерии без да влијае врз растот на *Ralstonia solanacearum*.

Чувајте повеќе медиуми и готови раствори на температура од 4°C и искористете ги во рок од еден месец.

Плочките пред употреба треба да се исчистат од површинската кондензација.

Избегнувајте прекумерно сушење на плочките.

Контролата на квалитетот треба да се изврши по подготовка на секоја нова група медиум, со нанесување на суспензија од референтна култура од *R. Solanacearum* (види Додаток 3) и набљудување на формирањето на типичните колонии по инкубација на температура од 28°C во период од два до пет дена.

(в) Потврдени медиуми за збогатување

SMSA мешавина (Elphinstone *et al.*, 1996)

Подгответе како за SMSA селективен агар медиум, но испуштете бакто-агар и 2, 3, 5-тетразолиум хлорид.

Модифицирана Вилбринк(*Wilbrink*) мешавина (Caruso *et al.*, 2002)

Сукроза	10
	g
Протеозен	5 g
пептон	
K ₂ HPO ₄	0,5
	g
MgSO ₄	0,25
	g
NaNO ₃	0,25
	g
Дестилирана	1 l
вода	

Стерилизирајте со автоклав на температура од 121°C за време од 15 минути и разладете до 50°C.

Додадете антибиотски готови раствори, како и за SMSA мешавината.

Додаток 3

А. Комерцијално достапен стандардизиран контролен материјал

(а) Бактериски изолати

Следните бактериски изолати се препорачуваат за употреба како стандарден референтен материјал, како позитивни контроли (табела 1) или за време на оптимизација на тестовите за да се избегнат напречните реакции (табела 2). Сите соеви се комерцијално достапни од:

Табела 1 SMT референтен панел изолати на *R. solanacearum*

NCPPB шифра	SMT #	Други шифри	Земја потекло	на Био вар
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Египет	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Турција	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Англија	2
NCPPB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Кипар	2
NCPPB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Шведска	2
NCPPB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Белгија	2
NCPPB 4156 (*)	710	PD 2762, CFBP 3857	Холандија	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15.59	Франција	2

NCPFB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Португалија	2
NCPFB 4160	69	IVIA-1632-2	Шпанија	2
NCPFB 4161	76	B3B	Германија	2
NCPFB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	САД	1
NCPFB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONg7	Костарика	1
NCPFB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Колумбија	2
NCPFB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Перу	2Т
NCPFB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Бразил	2Т
NCPFB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Перу	3
NCPFB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Австралија	3
NCPFB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CMib2861	Шри Ланка	4
NCPFB 4005	49	CFBP 4616, R470	Филипини	4
NCPFB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Кина	5

(*) Користете како стандардна референтен сој на *R. solanacearum* biovar 2 (раса 3)

Забелешка: Автентичноста на горенаведените низи може да се гарантира само ако се добијат од автентична колекција култури.

Табела 2 SMT референтен панел серолошки или генетски поврзани бактерии за употреба во оптимизацијата на тестовите за детекција

NCPPB шифра	SMT #	Други шифри	Идентификација
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⁾ Сој со потенцијал за напречно реагирање при серолошките тестови (IF и/или ELISA) поликлонални антисеруми.

⁽²⁾ Сој од која може да се засили PCR производот во некои лаборатории со слична големина во однос на онаа очекувана со користење на прајмерите OLI-1 и Y-2 (види Додаток 6).

⁽³⁾ Веројатност дека напречно ќе реагира кај повеќето тестови, но познато е дека се појавува само кај бананите во Индонезија.

(б) Комерцијално достапен стандардизиран контролен материјал

Следниот стандарден контролен материјал е достапен од колекцијата за NCPPB културата.

Пелета исушени со замрзнување на екстракт од компир која содржи 200 здрави кртоли од компир како негативна контрола за сите тестови.

Пелета од екстракт од компир исушена со замрзнување, која содржи 200 здрави тубери од компир со 10^3 до 10^4 и 10^4 до 10^6 клетки *R. solanacearum* biovar 2 (низа NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) како позитивни контроли за серолошки и PCR тестови. Бидејќи има влијанија врз видливоста на клетката за време на сушењето со замрзнување, тие не се соодветни како стандардни контроли за изолација и тестови со биоанализа.

Суспензиите фиксирани со формалин за *R. solanacearum* biovar 2 (низа NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) на 10^6 клетки на ml како позитивни контроли за серолошки тестови.

Б. Подготовка на позитивни и негативни контроли за скрининг тестови на кортексот(сржта) PCR/IF и FISH

Одгледувајте 48-часовна култура од вирулентни соеви на *R. solanacearum* gase3/biovar2 (на пр, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) на SMSA базален медиум и суспендирајте во 10 mM фосфатен пуфер за да постигнете клеточна густина од приближно 2×10^8 cfu на ml. Ова вообичаено се постигнува со слабо матна суспензија еднаква на оптичка густина од 0,15 на 600 nm.

Отстранете ги сржта (кортексот) на окцата од 200 кртоли земени од сорти со бела кора, за кои е познато дека не се заразени од *R. solanacearum*.

Обработете ги окцата со вообичаени методи и ресуспендирајте го талогот во 10 ml.

Подгответе 10 стерилни 1,5 ml микроепрувети со 900µl од ресуспендираниот талог.

Пренесете 100 µl од суспензијата *R. solanacearum* во првата микроепруветка. Измешајте со вртчка мешалица.

Дефинирајте ги децималните нивоа на контаминација со понатамошно растворање во наредните пет микроепрувети.

Шесте контаминирани микроепрувети ќе се искористат како позитивна контрола. Четирите неконтаминирани микроепрувети ќе се искористат како негативни контроли. Соодветно означете ги микроепруветите.

Подгответе аликоти од 100 µl во стерилни микроепрувети од 1,5 ml, така што ќе добиете девет дупликации од секој контролен примерок. Чувајте на температура од -16 до -24°C сè до употребата.

Присуството и количината на *R. solanacearum* во контролните примероци треба најпво да се потврди со IF.

Додаток 4

Пуфери за постапките за тестирање

ОПШТО: Неотворени стерилизирани пуфери може да се чуваат до една година.

1. Пуфери за постапката за екстракција

1.1. Пуфер за екстракција (50 mM фосфатен пуфер, pH 7,0)

Овој пуфер се користи за екстракција на бактеријата од ткивата на растенијата со помош на хомогенизација или протресување.

Na ₂ HPO ₄ (анхидрозен)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Дестилирана вода	1.00 l

Растворете ги состојките, проверете ја pH вредноста и стерилизирајте со автоклав на температура од 121°C за време од 15 минути.

Може да бидат корисни и дополнителни компоненти како што се следните:

Цел	Количина (на литар)	
Снегулки од Луброл	Дефлокулација [*]	0,5 g
DC силиконска антипена	Агенс против пенење [*]	1,0 ml
Тетрасодиум пирофосфат	Антиоксидант	1,0 g
Поливинилпиролидон – 4000 (PVP-40)	Врзување на PCR инхибиторите	50 g

1.2. Пуфер за плочката (10 mM фосфатен пуфер, pH 7,2)

Овој пуфер се користи за ресуспензија и растворање на јадрата од подножјето на туберот на компирот, по концентрација на пелета со помош на центрифугирање.

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,4 g
Дестилирана вода	1,0 l

Растворете ги состојките, проверете ја pH вредноста и стерилизирајте со автоклав на температура од 121°C за време од 15 минути.

2. Пуфери за IF тест

2.1. IF- пуфер (10 mM фосфатен солен пуфер (PBS), pH 7.2)

Овој пуфер се користи за растворање на антитела.

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

Растворете ги состојките, проверете ја pH вредноста и стерилизирајте со автоклав на температура од 121°C за време од 15 минути.

2.2. IF-пуфер -Tween

Овој пуфер се користи за миеење на плочките.

Додадете 0,1% Tween 20 на IF пуферот.

2.3. Глицерол третиран со фосфатен пуфер, pH 7,6

Овој пуфер се користи како флуид за зголемување на прозорците на IF плочките за да се зголеми флуоресценцијата.

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

Растворите на засилувач против блеење се комерцијално достапни, на пр. Vectashield® (Vector Laboratories) или Citifluor® (Leica).

3. Пуфери за индиректен ELISA тест

3.1. Двојно засилен пуфер за обојување, pH 9,6.

Na_2CO_3	6,36 g
NaHCO_3	11,72 g
Дестилирана вода	1,00 l

Растворете ги состојките, проверете ја pH вредноста и стерилизирајте со автоклав на температура од 121°C за време од 15 минути.

Калиум сулфит (0.2%) може да се додаде како антиоксидант, ако е потребно да се спречи наталожување на оксидирани ароматски соединенија.

3.2. 10X фосфатен солен пуфер (PBS), pH 7,4

NaCl	80,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	29,0 g
KCl	2,0 g
Дестилирана вода	1,0 l

3.3. PBS-Tween 10X PBS	100 ml
10% Tween 20	5 ml
Дестилирана вода	895 ml

3.4. Блокаторски (антитела) пуфер (мора свежо да се подготвува).

10X PBS	10,0 ml
Поливинилпиролон – 4000 (PVP-44)	2,0 g
10% Tween 20	0,5 ml
Млечен прашок	0,5 g
Дестилирана вода	До 100 ml

3.5. Субстрат од алкална фосфатаза, pH 9,8

Диетаноламин	97 ml
Дестилирана вода	800 ml

Мешајте и приспособете на pH 9,8, со концентрирана HCl.

До 1 l со дестилирана вода.

Додадете 0,2 g MgCl₂

Растворете 2 супстрати фосфатаза од 5 mg таблети (Sigma) на 15 ml раствор.

4. Пуфери за DASI ELISA тест

4.1. Пуфер за обложување, pH 9,6

Na₂CO₃ 1,59 g

NaHCO₃ 2,93 g

Дестилирана вода 1000 ml

Растворете ги состојките и проверете за pH 9,6

4.2. 10X фосфатен солен пуфер (PBS) pH 7,2 до 7,4

NaCl 80,0 g

NaH₂PO₄·2 H₂O 4,0 g

Na₂HPO₄·12H₂O 27,0 g

Дестилирана вода 1000 ml

4.3. PBS-Tween 10X PBS 50 ml

10% Tween 20 5 ml

Дестилирана вода 950 ml

4.4. Субстратен пуфер, pH 9,8

Диетаноламин 100 ml

Дестилирана вода 900 ml

Мешајте и приспособете на pH 9,8, со концентрирана HCl.

Додаток 5

Определување на нивото на контаминација кај IF и FISH тестовите

1. Пресметајте го средниот број на типични флуоресцентни клетки по поле на набљудување (с)
2. Пресметајте го бројот на типични флуоресцентни клетки на секој прозорец од микроскопските слајдови (С)

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

Каде што: S = површината на прозорецот на слајд со повеќе места, и
 s = површината на полето на објективот.

$s = \pi i^2 / 4G^2K^2$ каде што i = коефициент на полето (варира од 8 до 24, во зависност од типот на окуларот)

K = коефициент на епруветата (1 или 1,25)

G = зголемување на објективот (100x, 40x итн.).

3. Пресметајте го бројот на типични флуоресцентни клетки на мл суспендирана плочка (N)

$$N = C \times 1\,000/y \times F$$

Каде што: y = волуменот на ресуспендираната плочка на секој прозорец, и

F = факторот на растворање на ресуспендираната плочка.

Додаток 6

Потврдени PCR протоколи и реагенси

Забелешка: Прелиминарното тестирање со овој метод треба да овозможи откривање на 10^3 до 10^4 клетки од *R. solanacearum* на ml екстракт од примерок.

Прелиминарното тестирање, исто така, не покажува лажни позитивни резултати со панел селектирани бактериски низи (види Додаток 3).

1. PCR протокол на Seal et al. (1993)

- 1.1. Олигонуклеотидни прајмери

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

Заден прајмер Y-2

5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Очекувана големина на ампликонот/продуктот на шаблонот на *R. Solanacearum*
ДНК = 288 bp

1.2. PCR реактивен микс

Реагенс	Количина реакција	по	Конечна концентрација
Стерилна UPW	17,65 pl		
10x PCR пуфер (1) (15 mM MgCl ₂)	2,5 pl		1x (1,5 mM MgCl ₂)
dNTP mix (20 mM)	0,25 pl		0,2 mM
Прајмер OLI-1 (20 pM)	1,25 pl		1pM
Прајмер Y-2 (20 pM)	1,25 pl		1pM
Так полимераза (5U/pl) (1)	0,1 pl		0,5 U
Волумен на примерокот	2,0 pl		
Вкупно волумен	25 pl		

1.3. Услови на PCR реакција

Спроведете ја следната програма:

- 1 циклус од: (1.) 2 минути на температура од 96°C (денатурација на шаблон ДНК)
- 35 циклуси од: (2.) 20 секунди на температура од 94°C (денатурација на шаблон ДНК)
- (3.) 20 секунди на температура од 68°C (хибридизација на прајмерите)
- (4.) 30 минути на температура од 72°C (продолжување на копија)
- 1 циклус од: (5.) 10 минути на температура од 72°C (завршно продолжување)
- (6.) држете на температура од 4°C.

Забелешка: Оваа програма е оптимизирана за употреба со Perkin Elmer 9600 термоциклатор. Може да биде потребна модификација на времетраењето на циклусите (2.), (3.) и (4.) за примена со другите модели.

1.4. Анализа на ампликон/продуктот со рестриктивен ензим.

PCR производите, засилени од ДНК на *R. solanacearum*, генерираат карактеристичен полиморфизам со ограничена должина на фрагментот со ензим Ava II, по инкубација на температура од 37°C.

2. PCR протокол на Pastrik and Maiss (2000)

2.1. Олигонуклеотидни прајмери

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

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

Очекувана големина на ампликонот на шаблонот на *R. Solanacearum* ДНК =

553 bp

2.2. PCR реактивен микс

Реагенс	Количина по реакција	Конечна концентрација
Стерилна UPW	16,025 ul	
10X PCR пуфер ⁽¹⁾	2,5 ul	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (дел V) (10 %)	0,25 ul	0,1 %
d-нTP mix (20 mM)	0,125 ul	0,1 mM
Прамер PS-1 (10 uM)	0,5 ul	0,2 uM
Прамер PS-2 (10 uM)	0,5 ul	0,2 uM
Так полимераза (5U /ul) ⁽¹⁾	0,1 ul	0,5 U
Волумен на примерокот	5,0 ul	
Вкупно волумен	25,0 ul	

⁽¹⁾ Методи каде што е потврдено користење Таq полимераза од страна на Perkin Elme (AmpliТaq) и Gibco BRL.

Забелешка: Првично оптимизирано за MJ Research PTC 200 термоциклаторот со Gibco Таq полимераза.

Perkin Elmer AmpliТaq и пуферот, исто така, може да се користат со истите концентрации.

2.3. Услови на PCR реакција

Спроведете ја следната програма:

1 циклус од: (1.) 5 минути на температура од 95°C (денатурација на шаблон ДНК)

35 циклуси од: (2.) 30 секунди на температура од 95°C (денатурација на шаблон ДНК)

- (3.) 30 секунди на температура од 68°C (хибридизација на прајмерите)
- (4.) 45 минути на температура од 72°C (продолжување на копија)
- 1 циклус од: (5.) 5 минути на температура од 72°C (завршно продолжување)
- (6.) држете на температура од 4°C.

Забелешка: Оваа програма е оптимизирана за употреба со MJ Research PTC 200 термоциклатор. Може да биде потребна модификација на времетраењето на циклусите (2.), (3.) и (4.) за примена со другите модели.

2.4. Анализа на ампликон/продуктот со рестриктивен ензим.

PCR производите, засилени од ДНК на *R. solanacearum*, генерираат карактеристичен полиморфизам со ограничена должина на фрагментот со ензим Taq I, по инкубација на температура од 65°C, за 30 минути. Рестриktivните фрагменти добиени од *R. solanacearum*-специфичните фрагменти имаат големина од 457 bp и 96 bp.

3. Мултипликација на PCR протокол со внатрешна PCR контрола (Patrik *et al.*, 2002)

3.1. Олигонуклеотидни прајмери

Преден прајмер RS-1-F	5'- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3'
Заден прајмер RS-1-R	5'- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3'
Преден прајмер NS-5-F	5'- AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G -3'
Заден прајмер NS-6-R	5'- GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC -3'

Очекувана големина на ампликонот/продуктот на шаблонот на *R. Solanacearum* ДНК = 718 bp (RS-прајмерски сет)

Очекувана големина на ампликонот/продуктот од 18S rRNA внатрешна PCR контрола = 310 bp (NS-прајмерски збир).

3.2. PCR реактивен микс

Реагенс	Количина по реакција	Конечна концентрација
Стерилна UPW	12,625 pl	
10x PCR пуфер ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 pl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (дел V) (10 %)	0,25 pl	0,1 %
d-nTP mix (20 mM)	0,125 pl	0,1 mM
Прајмер RS-1-F (10 pM)	2,0 pl	0,8 pM
Прајмер RS-1-R (10 pM)	2,0 pl	0,8 pM
Прајмер NS-5-F (10 uM) ⁽²⁾	0,15 pl	0,06 pM
Прајмер NS-6-R (10 uM) ⁽²⁾	0,15 pl	0,06 pM
Так полимераза (5 U/ul) ⁽¹⁾	0,2 pl	1,0U
Волумен на примерокот	5,0 pl	
Вкупно волумен	25,0 pl	

⁽¹⁾ Методи каде што е потврдено користење Таq полимераза од страна на Perkin Elme (AmpliТaq) и Gibco BRL.

⁽²⁾ Концентрацијата на прајмерите NS-5-F и NS-6-R се оптимизирани за јадрата на подножјата кај компирите, со користење на методот за хомогенизација и прочистување на ДНК, според (Patrik *et al.*, (види дел VI.A.6.1.a.). Реоптимизација на концентрациите на реагенсот ќе биде потребна ако се користи екстракција со протресување или други методи за изолација на ДНК.

3.3. Услови на PCR реакција

Спроведете ја следната програма:

- | | | |
|----------------|------|--|
| 1 циклус од: | (1.) | 5 минути на температура од 95°C
(денатурација на шаблон ДНК) |
| 35 циклуси од: | (2.) | 30 секунди на температура од 95°C
(денатурација на шаблон ДНК) |
| | (3.) | 30 секунди на температура од 58°C
(хибридизација на прајмерите) |
| | (4.) | 45 секунди на температура од 72°C
(продолжување на копија) |
| 1 циклус од: | (5.) | 5 минути на температура од 72°C (завршно
продолжување) |
| | (6.) | држете на температура од 4°C. |

Забелешка: Оваа програма е оптимизирана за употреба со MJ Research PTC 200 термоциклатор. Може да биде потребна модификација на времетраењето на циклусите (2.), (3.) и (4.) за примена со другите модели.

3.4. Анализа на ампликон со рестриктивен ензим.

PCR производите, засилени од ДНК на *R. solanacearum*, генерираат карактеристичен полиморфизам со ограничена должина на фрагментот со ензим Bsm I или изошизомер (на пр. Mva 1269 I) по инкубација на температура од 65°C за време од 30 минути.

4. *R. solanacearum* biovarietet-специфичен PCR протокол (Patrik et al., 2001)

4.1. Олигонуклеотидни прајмери

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

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

Заден прајмер RS-3-R 5'- TTC ACG GCA AGA TCG CTC -3'

Очекувана големина на ампликонот/продуктот на шаблонот на *R. solanacearum* ДНК:

со Rs-1-F/Rs-1-R = 718 bp

со Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp

3.3. Услови на PCR реакција

Спроведете ја следната програма:

- | | | |
|----------------|------|--|
| 1 циклус од: | (1.) | 5 минути на температура од 95°C
(денатурација на шаблон ДНК) |
| 35 циклуси од: | (2.) | 30 секунди на температура од 95°C
(денатурација на шаблон ДНК) |
| | (3.) | 30 секунди на температура од 58°C
(хибридизација на прајмерите) |
| | (4.) | 45 секунди на температура од 72°C
(продолжување на копија) |
| 1 циклус од: | (5.) | 5 минути на температура од 72°C (завршно
продолжување) |
| | (6.) | држете на температура од 4°C. |

Забелешка: Оваа програма е оптимизирана за употреба со MJ Research PTC 200 термоциклатор. Може да биде потребна модификација на времетраењето на циклусите (2.), (3.) и (4.) за примена со другите модели.

3.4. Анализа на ампликон со рестриктивен ензим.

PCR производите, засилени од ДНК на *R. solanacearum*, генерираат карактеристичен полиморфизам со ограничена должина на фрагментот со ензим Bsm I или изошизомер (на пр. Mva 1269 I) по инкубација на температура од 65°C за време од 30 минути.

4. *R. solanacearum* biovarietet-специфичен PCR протокол (Patrik et al., 2001)

4.1. Олигонуклеотидни прајмери

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

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

Заден прајмер RS-3-R 5'- TTC ACG GCA AGA TCG CTC -3'

Очекувана големина на ампликонот/продуктот на шаблонот на *R. solanacearum* ДНК:

со Rs-1-F/Rs-1-R = 718 bp

со Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp

4.2. PCR реактивен микс

(а) Биовариетет 1/2-специфичен PCR

Реагенс	Количина реакција	по	Конечна концентрација
Стерилна UPW	12,925 ul		
10X PCR пуфер ⁽¹⁾	2,5 ul		1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (дел V) (10 %)	0,25 ul		0,1 %
d-NTP mix (20mM)	0,125 ul		0,1 mM
Прајмер Rs-1-F (10 uM)	2 ul		0,8 uM
Прајмер Rs-1-R (10 uM)	2 ul		0,8 uM
Так полимераза (5U /ul) ⁽¹⁾	0,2 ul		1 U
Волумен на примерокот	5,0 ul		
Вкупно волумен	25,0 ul		

⁽¹⁾ Методи каде што е потврдено користење Таq полимераза од страна на Perkin Elmer (AmpliTa_q) и Gibco BRL.

(б) Биовариетет 3/4/5-специфичен PCR

Реагенс	Количина реакција	по	Конечна концентрација
Стерилна UPW	14,925 ul		
10X PCR пуфер ⁽¹⁾	2,5 ul		1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (дел V) (10 %)	0,25 ul		0,1 %
dNTP mix (20 mM)	0,125 ul		0,1 mM
Прајмер Rs-1-F (10 uM)	1 ul		0,4 uM
Прајмер Rs-3-R (10 uM)	1 ul		0,4 uM
Так полимераза (5 U/ul) ⁽¹⁾	0,2 ul		1 U
Волумен на примерокот	5,0 ul		
Вкупно волумен	25,0 ul		

⁽¹⁾ Методи каде што е потврдено користење Таq полимераза од страна на Perkin Elmer (AmpliTa_q) и Gibco BRL.

4.3. Услови на PCR реакција

Извршете ја следната програма за биовариетет 1/2- и биовариетет 3/4/5-специфичните реакции:

- 1 циклус од: (1.) 5 минути на температура од 95°C (денатурација на шаблон ДНК)
- 35 циклуси од: (2.) 30 секунди на температура од 95°C (денатурација на шаблон ДНК)
- (3.) 30 секунди на температура од 58°C (хибридизација на прајмерите)
- (4.) 45 минути на температура од 72°C (продолжување на копија)
- 1 циклус од: (5.) 5 минути на температура од 72°C (завршно продолжување)
- (6.) држете на температура од 4°C.

Забелешка: Оваа програма е оптимизирана за употреба со MJ Research PTC 200 термоциклатор. Може да биде потребна модификација на времетраењето на циклусите (2.), (3.) и (4.) за примена со другите модели.

4.4. Анализа на ампликон/продуктот со рестриктивен ензим.

PCR производите, засилени од ДНК на *R. solanacearum*, со користење на прајмерите Rs-1-F и Rs-1-R генерираат карактеристичен полиморфизам со ограничена должина на фрагментот со ензим Bsm I или изошизомер (на пр. Mva 1269 I) по инкубација на температура од 65°C за време од 30 минути. PCR производите од ДНК на *R. solanacearum*, користејќи ги прајмерите Rs-1-F и Rs-3-R немаат места на рестрикција.

5. Подготовка на пуфер за електрофореза

5.1. Бромфенол сино (10%-готов раствор)

Бромфенол сино	5 g
Дестилирана вода (bidest)	50 ml

5.2. Пуфер за електрофореза

Глицерол (86%)	3,5 ml
Бромфенол сино (5,1)	300 µl

Дестилирана вода (bidest) 6,2 ml
6. **10X** Трис ацетат EDTA (TAE) пуфер, pH 8.0
Трис пуфер 48,40 g
Глацијална оцетна киселина 11,42 ml
EDTA (дисодиумова сол) 3,72 g
Дестилирана вода 1,00 l

Растворете до 1x пред употреба.

Исто така, комерцијално е достапен (на пр. Инвитроген или еднаков на него).

Додаток 7

Потврдени реагенси за FISH тестот

1. Олиго-проби

Специфична проба за *R. solanacearum*-specific OLI-1-CY3: 5'-ggc agg tag caa gct acc ccc-3'

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

2. Раствор за фиксирање

(ПРЕДУПРЕДУВАЊЕ! ФИКСАТОРОТ СОДРЖИ ПАРАФОРМАЛДЕХИД КОЈ Е ТОКСИЧЕН (ОТРОВЕН). НОСЕТЕ РАКАВИЦИ, НЕМОЈТЕ ДА ГО ВДИШУВАТЕ. ПРЕПОРАЧЛИВА Е РАБОТА ВО ИЗОЛИРАНА КОМОРА.

(1) Загрејте 9 мл вода за молекуларна анализа (на пр. ултра чиста вода (UPW) на приближно 60°C и додадете 0.4г параформалдехид. Параформалдехидот се раствора по додавање неколку капки 1N NaOH и промешување со магнетен мешач.

(2) Усогласете ја рН вредноста на 7,0 со додавање на 1мл од 0,1M фосфатен пуфер (PB; рН 7,0) и пет капки од 1 N HCl. Проверете ја рН вредноста со индикаторски ленти и усогласете ако е неопходно со HCl или NaOH .

ПРЕДУПРЕДУВАЊЕ! НЕ КОРИСТЕТЕ рН МЕТАР ЗА РАСТВОРИТЕ СО ПАРАФОРМАЛДЕХИД.

(3) Филтрирајте го растворот преку мембрански филтер од 0,22 µm и заштитете го растворот од прашина, се чува на температура од 4°C додека не се употреби.

3. 3 x Hybmix

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (филтрирајте стерилизирано и загреано во автоклав)	15 mM
Разредите до 1x ако е потребно	

4. Раствор за хибридизација 1x Hybmix

Натриум додецил сулфат (SDS)	0,01%
Формаид	30%,
сонда EUB 338	5 ng/µl
сонда OLI-1 или OLI-2	5 ng/µl

Подгответе количини од растворот за хибридизација според пресметките во табелата. За секој слајд (кој содржи два различни примерока во дупликат) потребен е 90 μ л раствор за хибридизација.

ВАЖНО: ФОРМАМИДОТ Е МНОГУ ОТРОВЕН, ТАКА ШТО ТРЕБА ДА НОСИТЕ РАКАВИЦИ И ДА ГИ ПРЕЗЕМЕТЕ НЕОПХОДНИТЕ МЕРКИ НА ПРЕТПАЗЛИВОСТ!

Табела 1 Предложени количества за изготвување на хибридизирачката смеша

Број на стакленца:	1	4	6	8	10
Стерилна ултра чиста вода	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3x Hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Формаид	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Сонда EUB 338 (100 ng/l)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Сонда OLI-1 или OLI-2 (100 ng/l)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Вкупен волумен (μ л)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

Забелешка: Сите раствори што содржат олиго-сонди што се чувствителни на светлина треба да се чуваат на темно, на -20°C .

Заштитете ги од директна сончева светлина или електрична светлина за време на употребата.

5. 0,1M фосфатен пуфер, pH 7,0

Na_2HPO_4 8,52 g

KH_2PO_4 5,44 g

Дестилирана вода 1,00 L

Растворете ги состојките, проверете ја pH вредноста и стерилизирајте со обработка во автоклав на 121°C за време од 15 минути.

Додаток 8

Култури од модар патлиџан и домати

Засадете семе од домати (*Lycopersicon esculentum*) или модар патлиџан (*Solanum melongena*) во пастеризиран семенски компост. Пресадете го расадот со целосно развиените котиледони (10 до 14 дена) во пастеризиран компост за садење.

Модрите патлиџани или домати треба да се одгледуваат во оранжерија со следниве услови на животната средина пред инокулацијата:

Должина на денот 14 часа или природна должина на денот доколку е подолга;

Температура Ден: од 21 до 24°C,
 Нок: од 14 до 18°C.

Осетлива сорта домати „MoneyMaker“

Осетлива сорта модри патлиџани „Black Beauty“

ПРИЛОГ 3

1. Во случај на сомнителна појава за која е идентификуван позитивен резултат на тестот за наведените растителни материјали и за сите останати случаи, се применува методот од Прилог 2 од оваа наредба, се чека потврда или негирање од добиените резултати, при што треба да се задржат и соодветно да се конзервираат:

- сите кртоли што се земени примероци-мостри, кога тоа е возможно, сите растенија земени како примероци;

- останатите екстракти и дополнително изготвениот материјал за тестот, на пример стаклата за имунофлуоресценција и

- сите документи, сè додека не се завршат наведените методи.

Задржувањето на кртолите ќе овозможи разновидно тестирање кое се врши по потреба.

2. Во случајот на позитивна потврда на штетниот организам, треба соодветно да се задржи и да се конзервира:

- материјалот од точка (1) од овој Прилог;

- примерок од заразениот материјал од модриот патлиџан или од домотот, инокулиран со кртола или растителен екстракт, во зависност од случајот и

- изолираната култура на штетниот организам, сè додека не помине најмалку еден месец по постапката.

ПРИЛОГ 4

1. Елементите што треба да се земат предвид во определувањето на степенот на можна контаминација согласно член 6 точка (а) и член 7 став (1) од оваа наредба го вклучуваат следното:

(а) местото на производство каде:

- се одгледуваат или се одгледувале компири кои се клонално поврзани со компирите за кои е пронајдено дека се заразени со штетниот организам;

- се одгледуваат или се одгледувале домати кои потекнуваат од истиот извор како домотите за кои е пронајдено дека се заразени со штетниот организам;

- се одгледуваат или се одгледувале компири или домати кои биле ставени под официјална контрола поради сомневање за појава на штетниот организам;

- се одгледуваат или се одгледувале компири кои се клонално поврзани со компирите што биле одгледувани на места на производство за кои е пронајдено дека се заразени со штетниот организам;

- се одгледуваат компири или домати лоцирани во близина на заразените места на производство, вклучувајќи ги оние места на производство кои користат заедничка производна опрема и објект или имаат заеднички изведувач на работите;

- се употребува површинска вода за наводнување или прскање од кој било извор за кој е потврдено или за кој постои сомневање дека е контаминиран со штетниот организам;

- се употребува површинска вода за наводнување или прскање од извор што го користат други, каде на местата за производство за кои е потврдено или постои сомневање дека се заразени со штетниот организам и

- е или било поплавено со површински води за кои е потврдено или постои сомневање дека се контаминирани со штетниот организам.

(б) површинските води користени за наводнување или прскање или ги поплавиле полето (та) или местото(та) на производство, за кои е потврдено дека се заразени со штетниот организам.

ПРИЛОГ 5

1. Елементите што треба да се земат предвид во определувањето на степенот на можната контаминација согласно член б точка (а) и точка (в) од оваа наредба, го вклучуваат следното:

- наведените растителни материјали одгледувани на местото на производство определено како контаминирано согласно член б точка (а) од оваа наредба;

- местото (та) на производство од одредена производна единица со наведените растителни материјали, определени како контаминирани согласно членот б точка

(а) од оваа наредба, како и оние кои директно ја користат производната опрема и објект или имаат заеднички изведувач на работите;

- наведените растителни материјали произведени на местото(та) на производство што се наведени во претходната алинеја или се присутни на такви места на производство, за време кога наведените растителни материјали означени како контаминирани согласно член б точка (а) од оваа наредба биле присутни на местото на производство што е наведено во првата алинеја;

- просторите, складиштата каде што се чуваат наведените растителни материјали од местата на производство, наведени во претходните алинеи;

- сите машини, опрема, превозни средства, садови, алати, складови или делови од нив и какви било други предмети, вклучувајќи и материјали и амбалажа за пакување кои можеле да бидат во контакт со наведените растителни материјали определени како контаминирани согласно член 6 точка (а) од оваа наредба;

- наведените растителни материјали складирани или доаѓаат во контакт со кои било објекти или предмети наведени во претходната алинеја, пред чистење и дезинфекцијата на на ваквите објекти и предмети;

- како резултат на тестирањата согласно член 6 точка (а) од оваа наредба во случајот на компирот, оние кртоли или растенија со сестринска или родителска врска и во случајот на домот, оние растенија што потекнуваат од истиот извор како наведениот растителен материјал одреден како контаминиран согласно член 6 точка (а) од оваа наредба и за кои, иако можеби на тестот покажале негативен резултат од штетниот организам, појавата на контаминација е веројатна преку клоналната врска. Може да се извршат различни тестови на сортите за да се потврди идентитетот на контаминираниите и клонално поврзаните кртоли или растенија;

- местото(та) на производство на наведените растителни материјали наведени во претходната алинеа;

- местото(та) на производство на наведените растителни материјали што употребувале вода за наводнување или прскање која била определена како контаминирана согласно член 6 точка (в) од оваа наредба;

- наведените растителни материјали произведени на поле(иња) поплавени со површинска вода за која е потврдено дека е контаминирана.

2. Елементите што треба да се земат предвид за определувањето на степенот на раширеност согласно член 6 точка (а) и точка (в) од оваа наредба, треба да го вклучуваат следното:

(а) во случаите согласно членот 6 точка (а) од оваа наредба:

- близината до другите места на производство на кои се одгледува наведениот растителен материјал;

- заедничкото производство, складирање и користење на семенски материјал;

- местата на производство што употребувале површинска вода за наводнување или прскање на наведените растителни материјали, во случаите кога постои или постоел ризик за истекување

на површинските води од, или нивно поплавување на места на производство што биле определени како контаминирани согласно член 6 точка (а) од оваа наредба.

(б) во случај кога површинската вода била определена како контаминирана согласно член 6 точка (в) од оваа наредба:

- местото(та) на производство на кои се одгледувал наведениот растителен материјал кои се соседни или се под ризик да бидат поплавени од површинската вода определена како контаминирана;

- секој воден басен за наводнување што е поврзан со површинската вода определена како контаминирана;

- водните маси кои се поврзани со површинската вода определена како контаминирана, земајќи ги предвид:

- насоката на течењето и протокот на водата определена како контаминирана;

- присуството на диви растенија кои може да бидат носители на штетниот организам *R. solanacearum*.

3. Фитосанитарниот инспектор согласно членот 6 од оваа наредба, треба да извести:

(а) по потврдувањето на присуството на штетниот организам при лабораториски тест со користење на методот од Прилог 2 од оваа наредба и барем:

- за компири:

- сортното име на партијата со компири и

- типот (меркантилен, семенски, итн.) и каде што е можно семенската категорија на компирите.

- за растенијата на домати:

- сортното име на партијата и каде што е можно, категоријата.

(б) Кога постои ризик од контаминација на компирот и на наведениот растителен материјал, Државниот инспекторат за земјоделство треба да ги извести другите држави кои се засегнати и да достави информации кои треба да се усогласат и исполнат:

- сортното име на партијата со компири или домати;

- името и адресата на испраќачот и примачот;

- датата на доставената пратка компири или домати;
- големината на доставената пратка компири или домати и
- копија од пасошот за растенија или најмалку бројот на пасошот за растенија или фитосанитарниот сертификат или регистарскиот број на одгледувачот или дистрибутерот и копија од испратницата.

4. Фитосанитарниот инспектор по утврдување и завршување на сите испитувања на присуството на штетниот организам, треба да обезбеди:

- дата на потврдување на контаминацијата;
- краток опис на извршените испитувања за идентификација на изворот на можно ширење на контаминацијата, вклучувајќи и бројот на земени примероци;
- информации за идентификувани или претпоставени извори на контаминација;
- детали за степенот на определената контаминација, вклучувајќи и бројот на местата на производство и бројот на пратките со назнака на сортата и ако се работи за семе, категоријата;
- податоци за демаркираната зона, вклучувајќи и бројот на местата на производство, кои не се определени како контаминирани, но се вклучени во зоната;
- детали за определување на водата, вклучувајќи го називот и местоположбата на водената маса и степенот на заразата/забраната за наводнување;
- за секоја пратка или серија растенија на домати определени како контаминирана, сертификатите или бројот на пасошот и
- сите други податоци поврзани со утврдената појава од штетниот организам.

ПРИЛОГ 6

1. Официјални контролни мерки, од членот 7 став (1) од оваа наредба, се:

- користење на кртолите од компир како сточна храна по третманот со загревање (варење на кртолите), така што да се елиминира ризикот за преживување на штетниот организам;

или фрлање на официјално одобрени места за отпад каде што нема ризик за ширење на патогенот во животната средина, (на пример да се спречи продирањето во земјоделско

земјиште или контакти со водени извори кои би можеле да се користат за наводнување на земјоделско земјиште); или

- палење; или

- индустриска преработка со директно и навремено пренесување во фабрика за обработка, на официјално одобрени места за фрлање на отпадот, за која е утврдено дека нема ризик од ширење на штетниот организам и каде има систем за чистење и дезинфекција на возилата;

или

- други мерки, под услов да се утврди дека нема ризик за ширење на штетниот организам при таквите мерки.

Останатиот отпад кој произлегува од точка 1 од овој Прилог се отстранува согласно Прилог 7 од оваа наредба.

2. Соодветната употреба или отстранување на наведените растителни материјали согласно членот 7 став (2) од оваа наредба, фитосанитарниот инспектор треба да спроведе контрола во секое време и каде компирите треба да се пакуваат или да се обработуваат во капацитети каде има соодветно отстранување на отпадот, наведени во првата и втората алинеа од точка 1 на овој Прилог се:

(а) за кртоли на компир:

- употреба на меркантилните компири наменети за конзумација, пакувани за директен транспорт и нивно користење без препакување, на место со соодветни капацитети за отпад;

- компирите наменети за садење може да се ракува на истото место, ако тоа се врши одделно или по чистење и дезинфекција;

или

- употреба на меркантилните компири за индустриска преработка и директна достава до фабриката за обработка, која располага со соодветен капацитет за отпадот и со систем за чистење и дезинфекција на возилата што излегуваат од фабриката;

или

- друга употреба под услов да се утврди дека нема ризик од ширење на штетниот организам.

(б) за други делови од растението, вклучувајќи го стеблото и остатоците од лисјата односно лисната маса:

- уништување, или

- друга употреба или отстранување, под услов да се утврди дека нема ризик од ширење на штетниот организам.

3. Соодветните методи за чистење и дезинфекција на предметите согласно член 7 став (3) од оваа наредба се тие за кои што е утврдено дека нема ризик за ширење на штетниот организам и се користат под надзор на фитосанитарниот инспектор.

4. Серијата мерки што ги спроведува фитосанитарниот инспектор во рамките на определената зона, согласно член 6 точка (а) и точка (в) и член 7 став (4) од оваа наредба, го вклучуваат следното:

4.1. на местата на производство определено како контаминирано согласно член 6

точка (а) од оваа наредба:

(а) во поле или единица на производство во заштини простори определени како контаминирани ; или

4.1.1. за време од најмалку четири години на одгледување, после годината кога е утврдена контаминацијата:

- се преземаат мерки за елиминација на самоникнатите растенија од компир и домати, како и други растенија кои може природно да бидат домаќини на штетниот организмот, вклучувајќи ги и плевелите од фамилијата Solanaceae и

- нема да се садат:

- меркантилен, растенија или семенски компир;

- растенија и семе од домати или други растенија домаќини;

- растенија од фамилијата Brassicaceae, кои може да бидат домаќини и овозможуваат преживување на штетниот организмот;

- во првата сезона на посевот на компири или домати по периодот утврден во претходната алинеја од точка 4.1.1. и под услов полето да биде исчистено од други самоникнати растенија на компир или домати и други растенија кои може да бидат домаќини на штетниот организам, вклучувајќи и плевели од фамилијата Solanaceae за време на официјални инспекции за најмалку две последователни години на одгледување пред садење, ќе се дозволи само производство на меркантилен компир, а собраните кртоли од компирите или растенијата на домати, ќе се тестираат сопоред методот од Прилог 2 од оваа наредба;

- за време на сезоната за собирање на компирите или домати што следува по годината по извршување на активностите во претходната алинеја и по соодветен ротациски циклус, која изнесува најмалку две години ако се сади компири за семе, се врши официјално испитување и посебен надзор, согласно член 3 став (1) од оваа наредба;

или

(б) за време на пет години на одгледување, после годината кога е утврдена контаминацијата:

- се преземаат мерки за елиминација на самоникнатите растенија од компир и домати, како и други растенија кои може природно да бидат домаќини на штетниот организам, вклучувајќи ги и плевелите од фамилијата Solanaceae;

и

- полето треба да биде одржувано во текот на првите три години како угар или посеано со житарици или како пасиште со често ниско косење или испасување на животните или посеано со трева за производство на семе, по што следува одгледување последователно две години со растенија што не се носители на штетниот организам за кои не постои ризик дека ќе овозможат преживување или ширење на штетниот организам;

- за време на првата сезона на собирање на компирите или домати, по извршување на активностите утврдени во претходната алинеја и под услов ако е утврдено дека во полето немало самоникнати растенија на компир или домати и други растенија домаќини на штетниот организам, вклучувајќи ги и плевели од фамилијата Solanaceae за време на официјални инспекции и посебен надзор во рок од најмалку две последователни години пред садењето;

- во случајот на компири се дозволува производството на мреркантилен компир или компир за семе;

- собраните кртоли од компири или растенијата на домати, во зависност од случајот, се тестираат според методот од Прилог 2 од оваа наредба.

(б) во сите други полиња од контаминираното место на производство кога фитосанитарниот инспектор утврдува дека условите се задоволени и е елиминиран ризикот од самоникнати растенија од компир, домати и други растенија домаќини на штетниот организам што може да се најдат во природата, вклучувајќи ги плевелите од фамилијата Solanaceae:

- во година на одгледување после годината кога е утврдена контаминацијата; или

- не се садат кртоли, растенија или семе од компир или останати растенија кои може да бидат домаќини на штетниот организам;

или

- во случајот на кртоли на компир насадат одобрени сертифицирани семиња само за производство на меркантилен компи;
 - во случајот на растенија на домати, растенијата на домати се одгледани од семе кои може да се садат единствено за производство на плодови;
 - во втората година на одгледување после годината кога што е утврдена контаминацијата;
 - во случајот на компири се садат само одобрени сертифицирани семиња или компири за семе кои се официјално тествани дека се без присуство на кафеаво гниење или бактериско венење и се одгледувани под инспекциска контрола на местата на производство, различни од оние што се наведени во 4.1, без разлика дали се работи за производство на семе или меркантилен компир;
 - во случајот на домати, се садат растенија на домати што се одгледани од семе што ги исполнува барањата или во случај на вегетативно размножување, од растенија на домати што се произведени од вакво семе и се одгледувани под инспекциска контрола на места на производство, различни од оние што се наведени во 4.1, за производство на семе или плодови;
 - најмалку во третата година на одгледување после годината кога е утврдена контаминацијата;
 - во случај на компири, се садат одобрени сертифицирани семиња или компирите за семе што се одгледани под инспекциска контрола и посебен надзор без разлика дали се работи за производство за семе или меркантилен компир;
 - во случај на домати, се садат растенијата на домати што се одгледани од семе што ги задоволува барањата или садници на домати кои се одгледуваат под инспекциска контрола и посебен надзор без разлика дали се работи за производство на растенија или плодови;
 - во сите вегетативните години што се наведени во претходните алинеи се преземаат мерки за елиминирање на самоникнати растенија на компир и други растенија кои може природно да бидат домаќини на штетниот организам ако се присутни, се спроведува фитосанитарна инспекција и посебен надзор на одгледуваната култура во соодветни времиња и во секое поле во кое се одгледува компирот, со спроведување официјално тестирање на собраните компири согласно методот од Прилог 2 од оваа наредба.
- (в) веднаш по определувањето на контаминацијата согласно членот 6 точка (а) од оваа наредба и по првата година на одгледување:

- сите машини, механизација и складиштата на местото на производство и оние што се вклучени во производството на компири или домати се врши чистење и дезинфекција со користење на соодветни методи, како што е наведено во точка 3 од овој Прилог,

- се воведува инспекциска контрола врз програмите за наводнување и прскање, вклучувајќи ја нивната забрана, заради спречување на ширењето на штетниот организам;

(г) единица на производство во заштини простори што е определена како контаминирана согласно член 6 точка(а) од оваа наредба, потребна е целосната замена на медиумот-супстратот за одгледување;

- нема да се садат кртоли, растенија или оригинално семе од компир, или други растенија кои се носители на штетниот организам, вклучувајќи ги растенијата и семето од домати, освен ако производната единица била предмет на официјален надзор на мерки за елиминирање на штетниот организам и отстранување на сите носители домаќини на растителните материјали, вклучувајќи целосна промена на медиумот-супстратот за одгледување, чистење и дезинфекција на претходно наведената единица за производство, како и целата опрема, по што ќе следува одобрување за производство од страна на фитосанитарниот инспектор за производство на компири или домати и

- за производството на компири, ваквото производство се врши од одобрени сертифицирани семиња од компири или од миникртоли или микрорастенија добиени од тестирани извори;

- за производство на домати, ваквото производство се врши од семе што ги исполнува барањата, во случај на вегетативно размножување, од растенија на домати што се произведени од семе и се одгледувани под официјална контрола и посебен надзор;

- се воведува официјална контрола и посебен надзор врз програмите за наводнување и прскање на забрана, заради спречување на ширењето на штетниот организам.

4.2. Во рамките на демаркираната зона, без оглед на мерките наведени во точка 4.1, под надзор на фитосанитарниот инспектор се врши:

(а) веднаш по определувањето на контаминацијата, се врши чистење и дезинфекција на целокупната механизација и складиштата на местото на производство, како и на опремата вклучена во производството на компир и домати, со користење на соодветни методи, од точка 3 од овој Прилог;

б) веднаш и за најмалку три вегетациони години на одгледување после годината кога е утврдена контаминацијата:

(ба) во случаи кога зоната на распространување е утврдена согласно член 6

точка (а) од оваа наредба, треба да се:

- обезбеди посебен надзор над просториите каде што се врши производството, чувањето или манипулацијата со кртоли од компир или со домати, заедно со просториите каде што се ракува со механизацијата за производство на компири или домати;

- садење само на одобрени сертифицирани семиња или семе добиено со официјална контрола за сите посеви на компир во таа зона и тестирање после собирањето на сите компири, одгледани на местата на производство означени како можно контаминирани согласно член 5 точка (а) од оваа наредба;

- одделно ракување со собраните компири и оние наменети за преработка и конзумација во сите простории во рамки на зоната или се обезбедат систем за чистење и дезинфекција за оние наменети за семе и залихите од меркантилен компир;

- садење на растенија од домати одгледани од семе што ги задоволува барањата и во случај на вегетативно размножување, од растенија на домати произведени од семе и се одгледувани под официјална контрола на сите посеви на домати во рамките на таа зона;

- се спроведува посебен надзор со официјално испитување, согласно член 3 став

(1) од оваа наредба;

(бб) во случаите кога некоја површинска вода е определена како контаминирана согласно член 6 точка (в) од оваа наредба или е вклучена во елементите за можното ширење на штетниот организам од Прилог 5 точка 2 од оваа наредба;

- спроведуваат годишно испитување во соодветни периоди, вклучувајќи земање примероци-мостри од површинската вода и од растенијата домаќини на штетниот организам од фамилијата Solanaceae од водени извори и се тестираат според методите од Прилог 2 од оваа наредба, за наведените растителни материјали и за други случаи;

- се воведува официјална контрола и посебен надзор врз програмите за наводнување и прскање, вклучувајќи забрана на употребата на водата која е контаминирана за наводнување и прскање на наведениот растителен материјал заради спречување на ширењето на штетниот организам. Оваа забрана може да се укине врз основа на добиените резултати од претходно наведеното годишно испитување, по што ќе следува укинување на одредената забрана од страна на фитосанитарниот инспектор кој утврдил дека површинската вода повеќе не е контаминирана. Употребата на вода што е предмет на забрана може да се дозволи, под официјална контрола и посебен надзор за наводнување и прскање на наведените растенијата

ако се употребени одобрени техники за елиминирање на штетниот организам и за спречување на неговото ширење;

- во случаите на контаминација на испуштените течни отпадоци, се воведува официјална контрола за отстранување на цврстиот или течниот отпад од погоните на индустриските капацитети или погоните за пакување кои работат со наведениот растителен материјал.

(в) се воспоставуваат програма, за замена на целиот семенски материјал на компири во текот на определен временски период.

ПРИЛОГ 7

Официјално одобрените методи за отстранување на отпадот, од Прилог 6 точка 1 од оваа наредба, треба да се во согласност со следните одредби, така што ќе се согледува секој ризик за ширење на штетниот организам што може да се идентификува:

(а) отпадот од компирите и доматиите (вклучува исфрлени и неупотребливи компири и кората од компирите и доматиите), како и каков било друг цврст отпад што е поврзан со компирите (вклучувајќи почва, камења и други остатоци) се отстранува; или преку

- фрлање на официјално одобрени места за отпад каде што нема ризик за ширење на штетниот организам во животната средина, на пример, да се спречи продирањето во земјоделско земјиште или водени извори и текови. Отпадот се одвезува директно на место каде што има карантински услови, така што нема да има ризик од губење на отпадот; или

- палење; или

- други мерки, под услов да се утврди дека нема ризик за ширење на штетниот организам при таквите мерки.

(б) течен отпад: пред отстранувањето, течниот отпад што содржи цврсти честици ќе се подложи на филтрирање или процес на обработка за да се отстрани цврстот материјал. Ваквиот цврст материјал се отстранува како што е наведено во точка (а) од овој Прилог.

Потоа, течниот отпад:

- се загрева на минимум 60°C, целото количество за време од 30 минути пред фрлањето;

или

- се отстранува на друг начин под официјално одобрување и контрола, така што не постои ризик дека отпадот може да дојде во контакт со земјоделското земјиште или со водени извори што може да се користат за наводнување на земјоделско земјиште.

Можностите наведени во овој Прилог исто така, се однесуваат и на отпадот поврзан со ракување, отстранување и обработка на контаминираните пратки.