

- 2) Милосав Кљакић,
- 3) Милојка Сетенчић.

2. Ово рјешење ступа на снагу наредног дана од дана објављивања у "Службеном гласнику Републике Српске".

Број: 04/1-012-2-2090/17
17. августа 2017. године
Бања Лука

Предсједница
Владе,
Жељка Цвијановић, с.р.

На основу члана 43. став 6. Закона о Влади Републике Српске ("Службени гласник Републике Српске", број 118/08) и члана 53. став 1. тачка а) Закона о државним службеницима ("Службени гласник Републике Српске", бр. 118/08 и 117/11), Влада Републике Српске, на 138. сједници, одржаној 17.8.2017. године, доноси

Р Ј Е Ш Е Њ Е

О РАЗРЈЕШЕЊУ ВРШИОЦА ДУЖНОСТИ ПОМОЋНИКА МИНИСТРА ЗА РЕСОР ЗА БУЏЕТ И ЈАВНЕ ФИНАНСИЈЕ У МИНИСТАРСТВУ ФИНАНСИЈА РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ

1. Светлана Радовановић, дипломирани економиста, разрјешава се вршиоца дужности помоћника министра за Ресор за буџет и јавне финансије у Министарству финансија због истека времена на које је постављена.

2. Ово рјешење ступа на снагу наредног дана од дана објављивања у "Службеном гласнику Републике Српске".

Број: 04/1-012-2-2066/17
17. августа 2017. године
Бањалука

Предсједница
Владе,
Жељка Цвијановић, с.р.

На основу члана 15. став 1. тачка з) и члана 43. став 6. Закона о Влади Републике Српске ("Службени гласник Републике Српске", број 118/08) и чл. 25. и 42. Закона о државним службеницима ("Службени гласник Републике Српске", бр. 118/08 и 117/11), Влада Републике Српске, на 138. сједници, одржаној 17.8.2017. године, доноси

Р Ј Е Ш Е Њ Е

О ПОСТАВЉЕЊУ ВРШИОЦА ДУЖНОСТИ ПОМОЋНИКА МИНИСТРА ЗА РЕСОР ЗА БУЏЕТ И ЈАВНЕ ФИНАНСИЈЕ У МИНИСТАРСТВУ ФИНАНСИЈА РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ

1. Светлана Радовановић, дипломирани економиста, поставља се за вршиоца дужности помоћника министра за Ресор за буџет и јавне финансије у Министарству финансија Републике Српске на период до 90 дана.

2. Ово рјешење ступа на снагу наредног дана од дана објављивања у "Службеном гласнику Републике Српске".

Број: 04/1-012-2-2065/17
17. августа 2017. године
Бањалука

Предсједница
Владе,
Жељка Цвијановић, с.р.

1482

На основу члана 36, а у вези са чланом 43. Закона о заштити здравља биља у Републици Српској ("Службени гласник Републике Српске", број 25/09), и члана 82. став 2. Закона о републичкој управи ("Службени гласник Републике Српске", бр. 118/08, 11/09, 74/10, 86/10, 24/12, 121/12, 15/16 и 57/16), министар пољопривреде, шумарства и водопривреде доноси

П РА В И Л Н И К

О ОТКРИВАЊУ, СПРЕЧАВАЊУ ШИРЕЊА И СУЗБИЈАЊА ШТЕТНОГ ОРГАНИЗМА *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., ПРОУЗРОКОВАЧА СМЕЂЕ ТРУЛЕЖИ КРТОЛА КРОМПИРА И БАКТЕРИЈСКОГ УВЕНУЋА КРОМПИРА И ПАРАДАЈЗА

Члан 1.

Овим правилником прописују се мјере откривања, спречавања ширења и сузбијања штетног организма *Ralstonia*

solanacearum (Smith) Yabuuchi et al., проузроковача смеђе трулежи кртола кромпира и бактеријског увенућа кромпира и парадајза, начин одређивања граница зараженог и угроженог подручја и подручја без штетног организма, услови за окончање наложених мјера, као и начин обавјештавања о предузетим мјерама и престанак мјера.

Члан 2.

(1) Ради откривања појаве штетног организма *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., проузроковача смеђе трулежи кртола кромпира и бактеријског увенућа кромпира и парадајза (у даљем тексту: штетни организам) спроводе се прегледи биљака и кртола кромпира (*Solanum tuberosum* L.) и прегледи биљака парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.), осим сјемена и плодова парадајза (у даљем тексту: главне биљке домаћини), као и прегледи прописаних објеката.

(2) Ради откривања других могућих извора заразе који могу угрозити производњу главних биљака домаћина, врши се процјена опасности од ширења штетног организма. Ако се анализом ризика утврди опасност од ширења штетног организма у производним подручјима главних биљака домаћина спроводе се мјере откривања штетног организма, и то прегледом:

1) на другим биљкама домаћинима, укључујући самоикле биљке из фамилије Solanaceae,

2) површинских вода које се користе за наводњавање или прскање главних биљака домаћина,

3) течног отпада који настаје у индустријској преради или у погонима за паковање главних биљака домаћина и користи се за наводњавање или прскање главних биљака домаћина,

4) супстрата који се користи за раст биљака, земљишта и чврстих отпадака који настају у индустријској преради или у погонима за паковање главних биљака домаћина.

Члан 3.

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

(2) При визуелном прегледу кртола кромпира из лотова у складиштима и дистрибутивним центрима, врши се преглед кртола сјеменског кромпира и кромпира који није намијењен садњи (у даљем тексту: меркантилни кромпир), као и визуелни преглед кртола које су сјечене, а чији узорци се достављају лабораторији ради лабораторијског испитивања. Сјеменски кромпир мора да потиче од материјала који испуњава услове здравствене исправности и за који је лабораторијским испитивањем утврђено да није заражен штетним организмом.

(3) При визуелном прегледу парадајза у одговарајућем периоду током вегетације врши се преглед расада на присуство штетног организма који је намијењен тржишној производњи.

(4) Када се прегледи врше на другим биљкама домаћинима, у површинским водама, укључујући течни отпад и у осталом материјалу, посебно супстратима, земљишту и чврстим отпаcima индустријских постројења за прераду и паковање, узимају се узорци и достављају лабораторији ради лабораторијског испитивања.

(5) Лабораторијско испитивање из ст. 1, 2. и 4. овог члана спроводи се на начин описан у Прилогу - Шема тестирања за дијагностику, детекцију и идентификацију проузроковача смеђе трулежи кртола кромпира и бактеријског увенућа кромпира и парадајза, који чини саставни дио овог правилника.

Члан 4.

(1) Сумња на појаву штетног организма постоји ако су визуелним прегледом уочени типични симптоми болести

или је резултат једног од брзих тестова провјере (screening test) позитиван.

(2) Да би се потврдила или отклонила сумња на појаву штетног организма, спроводе се даља лабораторијска испитивања на начин описан у Прилогу.

(3) При лабораторијском испитивању, на одговарајући начин, чувају се узорковане кртоле и када је то могуће узорковане биљке, преостали екстракт и додатно припремљен материјал за брзе тестове провјере (screening test), нпр. скалица за имунофлуоресценцију и пратећа документација.

(4) Сачувани узорак кртоле обезбјеђује тестирање сортности, када је то потребно.

(5) Ако је лабораторијским испитивањем потврђено присуство штетног организма, на одговарајући начин, чувају се материјал из става 3. овог члана, узорак вјештачки заражених тест биљака парадајза и патлиџана, као и изолована култура штетног организма најмање мјесец дана од дана потврђене заразе.

Члан 5.

(1) У случају сумње на појаву штетног организма, пред мјера из чл. 2. и 3. овог правилника, спроводе се следеће мјере:

1) забрана премјештања биљака парадајза, као и биљака и кртола кромпира из свих усјева, лотова или пошиљака из којих су узети узорци,

2) предузимање потребних радњи ради откривања извора заразе штетним организмом,

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

(2) Мјере из става 1. тачка 3) овог члана примјењују се нарочито у случају производње главних биљака домаћина и премјештања свих осталих кртола или биљака повезаних са сумњивом појавом, унутар и ван објеката, ограничавање употребе потенцијално контаминираних машина и опреме.

Члан 6.

У случају сумње на заразу штетним организмом, када постоји опасност од преношења заразе са главних биљака домаћина или површинским водама у другу државу, Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде о томе обавјештава надлежне органе.

Члан 7.

Када се на основу резултата лабораторијских испитивања, спроведених на начин описан у Прилогу, потврди присуство штетног организма, границе зараженог и угроженог подручја или подручја без штетног организма одређују се тако што се:

1) утврђује обим једног или више примарних извора заразе,

2) означавају као заражене главне биљке домаћина, пошиљке или лотови из којих је узет узорак, машине, опрема, превозна средства, складишта или њихови дијелови и сви други објекти и предмети, укључујући материјал за паковање, који су били у контакту са главним биљкама домаћинима који су означени као заражени, мјеста производње, поља, заштићене просторе намијењене производњи биља, било да је узорак узет у току вегетације или након вађења или бербе главних биљака домаћина,

3) одређује обим могуће заразе на основу података о свим контактима у производном процесу са извором заразе (прије и после вађења или скупљања биљака),

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

Члан 8.

(1) Обим примарних извора заразе главних биљака домаћина из члана 7. тачка 1) овог правилника утврђује се у зависности од:

1) мјеста производње, на којем се:

1. производи или је био произведен кромпир, који је клонски сродан са кромпиром на којем је потврђена зараза штетним организмом,

2. производи или је био произведен парадајз, који потиче из истог извора као и парадајз на коме је потврђена зараза штетним организмом,

3. производе или су били произведени кромпир или парадајз, који су под надзором фитосанитарног инспектора због сумње на заразу штетним организмом,

4. производи или је био произведен кромпир који је клонски сродан с кромпиром произведеним на мјесту производње гдје је потврђена зараза штетним организмом,

5. производе кромпир или парадајз, а који се налазе у близини заражених мјеста производње, укључујући и она мјеста производње на којима се користе иста опрема за производњу и објекти,

6. користе површинске воде за наводњавање или прскање из истог извора за који се сумња на заразу или је потврђена да је заражен штетним организмом,

7. користе површинске воде за наводњавање или прскање из истог извора који се користи и на мјестима производње на којима је потврђена зараза или постоји сумња на заразу штетним организмом,

8. производе главне биљке домаћина, а које су поплављене или су биле поплављене површинским водама у којима је потврђена зараза или постоји сумња на заразу штетним организмом;

2) површинских вода које се користе за наводњавање, прскање или су поплавиле поља или мјеста производње на којима је потврђена зараза штетним организмом.

(2) При утврђивању обима примарних извора заразе главних биљака домаћина спроводи се лабораторијско испитивање свих партија сјеменског кромпира који је клонски сродан са зараженим кромпиром, на начин описан у Прилогу.

Члан 9.

Обим могуће заразе из члана 7. тачка 3) овог правилника одређује на основу података о:

1) главним биљкама домаћинима гајеним на мјесту производње које је означено као заражено,

2) другим мјестима производње која су у било каквој вези са производњом главних биљака домаћина које су означене као заражене, као и заједнички коришћене опреме и објеката,

3) главним биљкама домаћинима произведеним на мјестима производње из тачке 2) овог члана или су се налазиле на тим мјестима производње истовремено са главним биљкама домаћинима које су означене као заражене или су се налазиле на мјестима производње која су означена као заражена,

4) простору и објектима на којима се налазе или долажу главне биљке домаћина које потичу са мјеста производње из т. 1, 2. и 3. овог члана,

5) машинама, превозним средствима, складиштима или њиховим дијеловима и другим прописаним објектима или предметима, укључујући и материјал за паковање, који су могли да дођу у контакт са главним биљкама домаћинима које су означене као заражене,

6) главним биљкама домаћинима које су биле ускладиштене или у додиру са неким од прописаних објеката или предметима из тачке 5) овог члана прије њиховог чишћења и дезинфекције,

7) биљкама парадајза које потичу из истих извора као и парадајз који је означен као заражен, односно кртола или биљака кромпира које су клонски повезане са кртолама, односно биљкама кромпира које су означене као заражене и који се, и ако су резултати лабораторијских испитивања негативни, сматрају могуће зараженим због клонске сродности са кромпиром означеним као зараженим. Када

је потребно, може да се спроведе и тест сортности да би се провјерио идентитет заражених и клонски сродних кртола или биљака кромпира,

8) мјестима производње главних биљака домаћина наведених у тачки 7) овог члана,

9) мјестима производње главних биљака домаћина на којима се за наводњавање или прскање употребљава вода која је означена као заражена,

10) главним биљкама домаћинима произведеним на пољима која су била поплавлена површинском водом за коју је утврђено да је заражена штетним организмом.

Члан 10.

Обим могућег ширења штетног организма из члана 7. тачка 4) овог правилника одређује се на основу података о:

1) близини других мјеста производње главних биљака домаћина,

2) заједничкој производњи и заједничкој употреби залиха сјеменског кромпира,

3) мјесту производње на којем се употребљава површинска вода за наводњавање или прскање главних биљака домаћина, на којима постоји или је постојала могућност површинског дотицања воде са мјеста производње која су означена као заражена или могућност поплављивања водом са мјеста производње која су означена као заражена.

Члан 11.

Када се на основу резултата лабораторијских испитивања, спроведених на начин описан у Прилогу, потврди присуство штетног организма у усјеву других биљака домаћина у подручјима гдје је угрожена производња главних биљака домаћина одређују се границе зараженог и угроженог подручја и подручја без штетног организма, тако што се:

1) утврђује обим примарних извора заразе главних биљака домаћина, у складу са чланом 8. овог правилника,

2) означавају као заражене биљке домаћини из којих је узет узорак,

3) одређује обим могуће заразе и разграничава заражено и угрожено подручје у складу са чл. 9. и 10. овог правилника.

Члан 12.

(1) Када се на основу резултата лабораторијских испитивања, спроведених на начин описан у Прилогу, потврди присуство штетног организма у површинској води (укључујући и течни отпад који настаје у индустријској преради главних биљака домаћина или у погонима за њихово паковање) или у самониклим биљкама из фамилије Solanaceae које у њој расту, а производња главних биљака домаћина је угрожена због коришћења те воде за наводњавање, прскање или због поплављивања, одређују се границе зараженог, угроженог и подручја без штетног организма, тако што се:

1) означава као заражена површинска вода из које је узет узорак и

2) одређује обим могуће заразе и разграничава посебно регулисано подручје на основу означене заразе и могуће ширење штетног организма.

(2) Обим могућег ширења штетног организма у површинској води из става 1. тачка 2) овог члана одређује се на основу података о:

1) близини мјеста производње главних биљака домаћина која су угрожена плавлњем или се границе са површинском водом која је означена као заражена,

2) сваком засебном подручју наводњавања које је у вези с површинском водом која је означена као заражена и

3) воденим токовима повезаним са површинском водом која је означена као заражена, узимајући у обзир смјер и брзину тока воде означене као заражене и присутност самониклих биљака домаћина из фамилије Solanaceae.

Члан 13.

(1) Главне биљке домаћини које су означене као заражене не користе се за садњу.

(2) Када су главне биљке домаћини из става 1. овог члана означене као заражене, спроводе се следеће мјере:

1) уништавање, односно спаљивање или

2) одлагање на службено одобрено мјесто за одлагање отпада, за које је утврђено да не постоји опасност од ширења штетног организма или

3) употребљавање тих биљака као хране за животиње након одговарајуће топлотне обраде, која не оставља никакву могућност преживљавања штетног организма или

4) коришћење тих биљака за индустријску прераду, под условом да се директно допреме до мјеста прераде које има опрему за одлагање отпада, чиме је отклоњена опасност од ширења штетног организма и ако је обезбијеђено чишћење и дезинфекција превозних средстава која напуштају мјесто прераде или

5) друге мјере, под условом да нема опасности од ширења штетног организма.

Члан 14.

(1) Главне биљке домаћини које се сматрају могуће зараженим штетним организмом, главне биљке домаћини гајене на мјестима производње која се сматрају могуће зараженима, као и кртоле или биљке кромпира које су клонски повезане са онима које су означене као заражене без обзира на резултате лабораторијских испитивања не смију се користити за садњу.

(2) Кртоле кромпира из става 1. овог члана могу се:

1) употребити као меркантилни кромпир намијењен за исхрану, који се мора паковати на мјестима са одговарајућом опремом за одлагање отпада, и који је спреман за непосредну доставу и употребу без накнадног препакивања, а са сјеменским кромпиром дозвољено је да се рукује на тим истим мјестима само ако се ради одвојено или након чишћења и дезинфекције,

2) употребити као меркантилни кромпир намијењен индустријској преради, под условом да се директно допреме до мјеста прераде које има опрему за одлагање отпада, чиме је отклоњена опасност од ширења штетног организма, и ако је обезбијеђено чишћење и дезинфекција превозних средстава која напуштају мјесто прераде и

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

(3) Остали дијелови главних биљака домаћина, укључујући и остатке стабљика и лишћа, могу се уништити или употребити или одложити на други одобрени начин, под условом да нема опасности од ширења штетног организма.

Члан 15.

(1) Ради спречавања ширења штетног организма отпадом који је настао као резултат спровођења мјера из чл. 13. и 14. овог правилника и отпада који настаје током руковања, одстрањивања и прераде заражених партија, спроводе се следеће мјере:

1) отпаци кромпира и парадајза (укључујући одбачени кромпир, кору и парадајз) и сви други чврсти отпаци који су у вези са кромпиром и парадајзом (укључујући земљу, камење и друге остатке) морају да се:

1. одлажу на службено одобреном мјесту, на којем не постоји опасност од неконтролисаног ширења штетног организма у околину (нпр. испирањем кроз поре земље до пољопривредног земљишта или дотицајем са водом која би могла да се употребити за наводњавање пољопривредног земљишта). Отпаци се превозе директно до одређеног мјеста, у затвореном превозном средству, тако да не постоји опасност од губитка отпада,

2. спаљују,

3. одстране примјеном других мјера за које је утврђено да не постоји опасност од ширења штетног организма;

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

(2) Течни дио отпада из става 1. тачка 2) овог члана третира се на сљедећи начин:

1) прије одстрањивања загријава се на температури од најмање 60 °C у трајању најмање 30 минута или

2) одстрањује се на начин који онемогућава да отпадци дођу на било који начин у додир са пољопривредним земљиштем или водом која се може употребити за наводњавање пољопривредног земљишта.

Члан 16.

(1) Машине, превозна средства, складишта и њихови дијелови, други објекти и предмети, укључујући и материјал за паковање, који су означени као заражени или се сматрају могуће зараженим, морају да се очисте и дезинфикују примјеном одговарајућих поступака за чишћење и дезинфекцију којима се отклања опасност од ширења штетног организма.

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

Члан 17.

(1) На пољу намијењеном за производњу главних биљака домаћина, које је означено као заражено за вријеме од најмање четири вегетационе године послјиге године у којој је утврђена зараза, налаже се спровођење сљедећих мјера:

1) уклањање самониклих биљака кромпира и парадајза, као и других самониклих биљака домаћина штетног организма, укључујући корове из породице Solanaceae, и

2) забрана садње кртола или биљака кромпира, као и сјетве сјемена кромпира у ботаничком смислу, садње биљака парадајза и сјетве сјемена парадајза, садње или сјетве других биљака домаћина, садње или сјетве биљних врста из рода Brassica за које је утврђено да омогућавају преживљавање штетног организма и садње или сјетве биљака за које је утврђено да омогућавају ширење штетног организма.

(2) У првој сезони производње кромпира или парадајза која сlijеди послјиге периода из става 1. овог члана, под условом да на пољу најмање двије последње вегетационе године током спровођења прегледа нису пронађене самоникле биљке кромпира и парадајза, као и друге биљке домаћини, укључујући корове из породице Solanaceae, у случају производње кромпира, допушта се производња искључиво меркантилног кромпира и спроводи лабораторијско испитивање кртола приликом вађења.

(3) У сезони производње кромпира или парадајза која сlijеди послјиге сезоне из става 2. овог члана дозволиће се, уз одговарајући плодоред, који мора бити најмање двогодишњи за производњу сјеменског кромпира, производња сјеменског или меркантилног кромпира, као и биљака парадајза, уз спровођење прегледа.

(4) У току пет вегетационих година послјиге године у којој је зараза утврђена, спроводе се сљедеће мјере:

1) уклањање самониклих биљака кромпира и парадајза, као и других биљака домаћина штетног организма, укључујући корове из фамилије Solanaceae, и

2) у прве три године, одржавање поља на угару или као трајни пашњак са интензивном испашом или честом ниском косидбом или се сију житарице или се користи за производњу сјеменских трава. У сљедеће двије узастопне године допуштена је производња биљака које нису домаћи-

ни штетног организма и за које је познато да не омогућавају преживљавање или ширење штетног организма.

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

Члан 18.

(1) На осталим пољима унутар мјеста производње које је означено као заражено у вегетационој години која сlijеди послјиге године у којој је утврђена зараза, под условом да је утврђено да је отклоњена опасност од самониклих биљака кромпира и парадајза, као и других биљака домаћина штетног организма, укључујући корове из фамилије Solanaceae, не дозвољава се садња кртола и биљака кромпира, сјетва сјемена кромпира у ботаничком смислу, као и сјетва и садња других биљака домаћина штетног организма.

(2) Ако је прије садње утврђено да је отклоњена опасност од самониклих биљака домаћина штетног организма, може се дозволити садња сертификованог сјеменског кромпира намијењеног искључиво производњи меркантилног кромпира, односно садња биљака парадајза произведених из сјемена које испуњава услове здравствене исправности. Током вегетације мора се спроводити надзор, као и лабораторијско испитивање извађених биљака и кртола на присуство штетног организма на начин описан у Прилогу.

(3) У другој и трећој вегетационој години која сlijеди послјиге године у којој је зараза утврђена, послјиге спровођења мјера из ст. 1. и 2. овог члана, дозвољава се садња искључиво сертификованог сјеменског кромпира за сјеменску или меркантилну производњу, односно садња само оних биљака парадајза које су произведене из сјемена које испуњава услове здравствене исправности, или из биљака добијених вегетативним размножавањем биљака парадајза произведених из таквог сјемена и произведених под стручним надзором на мјестима производње која нису означена као заражена, за производњу расада или плодова.

(4) Поред мјера из ст. 1, 2. и 3. овог члана, на осталим пољима унутар мјеста производње које је означено као заражено најмање три вегетационе године спроводи се уклањање самониклих биљака главног домаћина и других биљака домаћина штетног организма и преглед усјева током производње, у одговарајућим временским периодима, свих поља на којима се гаји кромпир, као и лабораторијско испитивање извађених биљака и кртола са сваког поља.

Члан 19.

(1) На мјестима производње која су означена као заражена послјиге утврђивања заразе штетним организмом произвођач мора очистити и дезинфиковати све машине, опрему и складишне просторе који су коришћени за производњу кромпира или парадајза, како у првој години када је дозвољена производња кромпира и парадајза тако и у свакој наредној производној години.

(2) Када је то потребно ради спречавања ширења штетног организма на мјестима производње која су означена као заражена није дозвољено наводњавање и прскање.

Члан 20.

(1) У заштићеном простору који је означен као заражен, а намијењен је за производњу биља, није дозвољена садња кртола или биљака кромпира и сјетва сјемена кромпира у ботаничком смислу, као ни сјетва и садња других биљака домаћина штетног организма, укључујући и биљке и сјеме парадајза, све док се у том заштићеном простору не спроведу мјере уништавања штетног организма и не уклоне све биљке домаћини и њихови дијелови, при чему се, као минимална мјера, обавезно спроводи потпуна замена супстрата за гајење, као и чишћење и дезинфекција тог заштићеног простора и целокупне опреме.

(2) Послије спровођења мјера из става 1. овог члана може се одобрити производња кромпира и парадајза, и то:

1) производња кромпира из сертифициваног сјеменског кромпира произведеног под стручним надзором или мини-кртола или микро-биљака добијених из културе биљног ткива које потичу из тестираног извора и

2) производња парадајза из сјемена које испуњава услове здравствене исправности или из биљака добијених вегетативним размножавањем биљака парадајза произведених из таквог сјемена под стручним надзором.

(3) Када је то потребно ради спречавања ширења штетног организма на мјестима производње која су означена као заражена, није дозвољено наводњавање и прскање.

Члан 21.

(1) Ради праћења здравственог стања главних биљака домаћина, биљних производа и прописаних објеката у посебно регулисаном подручју и обезбјеђивања услова за престанак наложених мјера у току најмање три вегетационе године које слиједи последице оне у којој је зараза утврђена:

1) врши се надзор мјеста на којима се производе, складиште, налазе или дорађују кртоле кромпира или биљке парадајза, укључујући и парцеле (површине) са којих потичу и на којима су се користили исти уређаји,

2) врши се садња унутар зараженог и угроженог подручја искључиво сертифициваног сјеменског кромпира и обавезно испитивање последице вађења сјеменског кромпира који је произведен на могуће зараженим мјестима производње и

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

4) врши се садња само оних биљака парадајза произведених из сјемена које испуњава услове здравствене исправности или из биљака добијених вегетативним размножавањем биљака парадајза произведених из таквог сјемена и гајених под стручним надзором, у свим усјевима парадајза унутар зараженог и угроженог подручја,

5) обављају се прегледи из чл. 2. и 3. овог правилника.

(2) Ради праћења површинских вода које су биле означене као заражене у зараженом и угроженом подручју и обезбјеђивања услова за престанак наложених мјера у току најмање три вегетационе године које слиједи последице заразе у којој је зараза утврђена:

1) обављају се прегледи у одговарајућем временском периоду и узимају узорци површинске воде, а када је то потребно, узорци биљака домаћина штетног организма из фамилије Solanaceae из те воде, ради лабораторијског испитивања,

2) врши се надзор при спровођењу наводњавања и прскања главних биљака домаћина.

(3) Ако је на основу резултата лабораторијског испитивања узорака утврђено да вода која је била означена као заражена више није заражена, може се дозволити њена употреба за наводњавање и прскање.

Члан 22.

Подаци и информације о потврђеној зарази, као и подаци и информације о престанку мјера Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде доставља надлежним органима.

Члан 23.

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

Број: 12.03.3-330-3269/17
25. августа 2017. године
Бања Лука

Министар,
Др **Стево Мирјанић**, с.р.

ПРИЛОГ

Шема тестирања за дијагностику, детекцију и идентификацију проузроковача смеђе трулежи кртола кромпира и бактеријског увенућа кромпира и парадајза

Поглавље I - Област примјене шеме тестирања

Приказана шема тестирања описује различите поступке укључене у:

1) дијагнозу проузроковача смеђе трулежи кромпира и бактеријског увенућа кромпира, парадајза и других биљака домаћина,

2) детекцију *Ralstonia solanacearum* у узорцима кртола кромпира, биљака кромпира, парадајза и других биљака домаћина, у води и у земљишту,

3) идентификацију *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

Поглавље II - Општа начела

У поглављима од IX до XVI овог прилога налазе се стандардни протоколи за поједине методе, потврђени и одобрени реагенси и појединости у вези са припремом материјала за тестирање и референтног материјала. У Поглављу IX овог прилога налази се списак лабораторија укључених у процес оптимизације и валидације протокола.

С обзиром на то да протоколи укључују методе детекције карантинског организма, што подразумева и употребу живих референтних култура *R. solanacearum*, процедура се мора изводити у прописаним карантинским условима са одговарајућим објектима за одлагање, чување и уништавање отпада у складу са условима које прописује институција одговорна за карантинске прописе.

Параметри тестирања морају обезбиједити уједначене и поновљиве нове детекције *R. solanacearum* према прописаним праговима осјетљивости појединих метода.

Обавезна је прецизна припрема позитивних контрола.

Тестирање у складу са захтијеваним прагом осјетљивости подразумева правилно постављање, одржавање и калибрање опреме, пажљиво руковање и чување реагенаса, као и предузимање мјера за спречавање контаминације између узорака, нпр. раздвајање позитивних контрола од узорака за тестирање. Да би се избјегле административне или друге грешке, морају се примјењивати стандарди контроле квалитета, посебно при означавању узорака и вођењу документације.

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

Позитиван резултат добијен у првом извршеном тесту провјере (IF тест, PCR/FISH, селективна изолација) мора се потврдити и другим тестом провјере који се базира на другом биолошком начелу.

Ако је резултат првог теста провјере (IF или PCR/FISH) позитиван, тада се сумња на присуство *R. solanacearum* и потребно је примјенити и други тест провјере. Ако је резултат и другог теста позитиван, тада је сумња потврђена и тестирање се наставља према описаној шеми. Ако је резултат другог теста негативан, тада се сматра да *R. solanacearum* није присутна у узорку. Позитиван резултат IF теста се дефинише као позитивно читавање IF теста потврђено и другим тестом провјере (PCR/FISH).

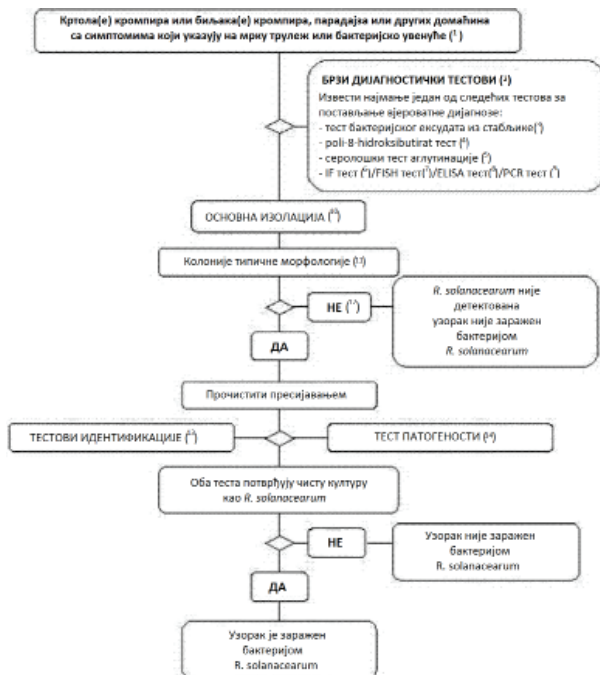
Потврђено присуство патогена подразумева изолацију и идентификацију чисте културе *R. solanacearum* и потврду патогености.

Поглавље III

1. Приказ дијаграма тока

1.1. Шема утврђивања присуства проузроковача смеђе трулежи кртола и биљкама кромпира, парадајза или другим биљкама домаћинима са симптомима смеђе трулежи или бактеријског увенућа (Шема 1)

Поступак тестирања примјењује се за кртоле и биљке кромпира, парадајза или друге биљке домаћине са типичним симптомима или симптомима који упућују на присуство проузроковача смеђе трулежи. Поступак укључује тест провјере, изолацију патогена из зараженог спроводног ткива на храњиву подлогу и у случају позитивног резултата идентификацију чисте културе *R. solanacearum*.



Шема 1.

(1) Опис симптома наведен је у Поглављу IV овог прилога.

(2) Брзи дијагностички тестови олакшавају постављање дијагнозе, али нису неопходни. Негативан резултат не гарантује увијек одсуство патогена.

(3) Тестирање присуства патогена у бактеријском ексудату из спроводног ткива стабљике описан је у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.1. овог прилога.

(4) Тест за откривање гранула поли-β-хидроксибутирата у бактеријским ћелијама описан је у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.2. овог прилога.

(5) Серолошки тестови аглутинације на бактеријском ексудату или екстракту из ткива са симптомима описани су у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.3. овог прилога.

(6) IF тест на суспензији бактеријског ексудата у води или на екстракту из ткива са симптомима описан је у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.5. овог прилога.

(7) FISH тест на суспензији бактеријског ексудата у води или на екстракту из ткива са симптомима описан је у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.7. овог прилога.

(8) ELISA тест на суспензији бактеријског ексудата у води или на екстракту из ткива са симптомима описан је у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.8. овог прилога.

(9) PCR тест на суспензији бактеријског ексудата у води или на екстракту из ткива са симптомима описан је у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.6. овог прилога.

(10) Патоген се обично може лако изоловати из биљног материјала са симптомима методом разрјеђења и изолације на хранљиву подлогу (Поглавље IV тачка 1. подтачка 1.3. овог прилога).

(11) Опис типичне морфологије колоније наведен је у Поглављу IV тачка 1. подтачка 1.3. овог прилога.

(12) Гајење бактеријске културе може бити неуспјешно у подмаклом стадијуму инфекције због конкуренције или претјераног размножавања сапрофитних бактерија. Ако су симптоми болести типични, а тест изолације негативан, тест изолације се мора поновити, најбоље на селективној хранљивој подлози.

(13) Поуздана идентификација чистих култура изолата бактерије *R. solanacearum* постиже се извођењем тестова описаних у Поглављу VIII тачка 2. овог прилога.

(14) Тест патогености описан је у Поглављу VIII тачка 3. овог прилога.

1.2. Шема за утврђивање присуства и идентификацију *R. solanacearum* у узорцима кртола кромпира без видљивих симптома (Шема 2)

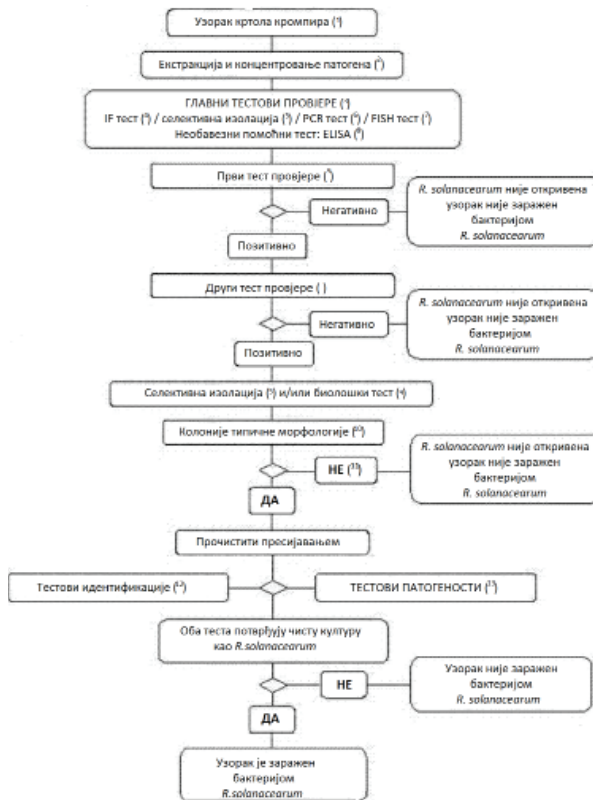
Начело

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

Позитиван резултат најмање два теста проверје, који се базирају на различитим биолошким начелима, допуњава се изолацијом патогена, послје чега, у случају изолације типичних колонија, слиједи потврда чисте културе *R. solanacearum*.

Позитиван резултат само једног од тестова проверје није довољан да би се узорак сматрао вјероватно зараженим.

Тестови проверје и изолација морају омогућити ниво осјетљивости детекције 103 ћелије/ml до 104 ћелије/ml ресуспендованог талога, укљученог као позитивна контрола у свакој серији тестова.



Шема 2.

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

(2) Методе екстракције и концентровања патогена описане су у Поглављу V тачка 1. овог прилога.

(3) Ако су резултати најмање два теста који се заснивају на различитим биолошким начелима позитивни, потребно је извршити изолацију и потврдити присуство патогена. Извршити бар један тест проверје. Када је резултат теста негативан, сматра се да је узорак негативан. У случају да је резултат тог теста позитиван, потребно је извршити други тест или више тестова проверје који се заснивају на различитим биолошким начелима да би се потврдио позитиван резултат. Ако су резултати осталих тестова негативни, сматра се да је тај узорак негативан. Даље тестирање није потребно. Тест имунофлуоресценције (IF) описан је у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.5. овог прилога.

(4) Селективна изолација је описана у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.4. овог прилога.

(5) PCR тест је описан у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.6. овог прилога.

(6) FISH тест је описан у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.7. овог прилога.

(7) ELISA тестови су описани у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.8. овог прилога.

(8) Биолошки тест је описан у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.9. овог прилога.

(9) Типична морфологија колоније описана је у Поглављу IV тачка 1. подтачка 1.3. овог прилога.

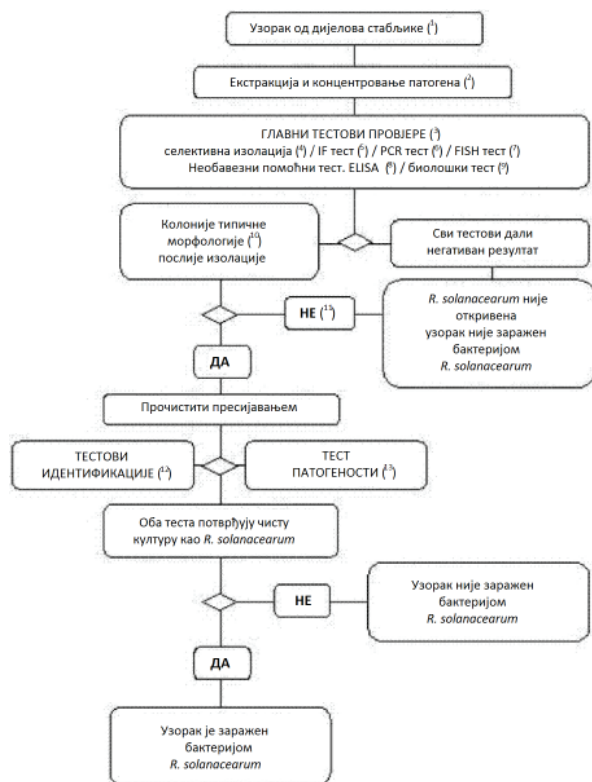
(10) Гајење бактеријске културе или биолошки тест могу бити неуспјешни због конкуренције или инхибиције сапрофитним бактеријама. Ако се у тестовима проверје добију јасно позитивни резултати, а резултати изолације су негативни, поновити тестове изолације из истог ресуспендованог талога или поновити узимање

спроводног ткива на мјесту везивања столона код кртола из истог узорка и, ако је потребно, тестирати додатне узорке.

(12) Поуздана идентификација чистих култура *R. solanacearum* постиже се извођењем тестова описаних у Поглављу VIII тачка 2. овог прилога.

(13) Тест патогености описан је у Поглављу VIII тачка 3. овог прилога.

1.3. Шема за утврђивање присуства и идентификацију *R. solanacearum* у узорцима биљака кромпира, парадајза или других биљака домаћина без симптома (Шема 3)



Шема 3.

(1) За препоручене величине узорка видјети Поглавље V тачка 2. подтачка 2.1. овог прилога.

(2) Екстракција патогена и методе концентровања описане су у Поглављу V тачка 2. подтачка 2.1. овог прилога.

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

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

(4) Селективна изолација описана је Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.4. овог прилога.

(5) IF тест описан је у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.5. овог прилога.

(6) PCR тестови описани су у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.6. овог прилога.

(7) FISH тест описан је у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.7. овог прилога.

(8) ELISA тест описан је у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.8. овог прилога.

(9) Биолошки тест описан је у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.9. овог прилога.

(10) Типична морфологија колоније описана је у Поглављу IV тачка 1. подтачка 1.3. овог прилога.

(11) Гајење бактеријске културе или биолошки тест могу бити неуспјешни због компетиције или инхибиције сапрофитним бактеријама. Ако се у тестовима провјере добију јасно позитивни резултати, а резултати изолације су негативни, поновити тестове изолације из истог ресуспендованог талога или поновити узимање

спроводног ткива на мјесту везивања столона код кртола из истог узорка и, ако је потребно, тестирати додатне узорке.

(12) Поуздана идентификација чистих култура *R. solanacearum* постиже се извођењем тестова описаних у Поглављу VIII тачка 2. овог прилога.

(13) Тест патогености описан је у Поглављу VIII тачка 3. овог прилога.

Поглавље IV - Детекција бактерије *R. solanacearum* у кртолама и биљкама кромпира, парадајза и другим биљкама домаћинима

1. Детаљне методе за детекцију *R. solanacearum* у кртолама и биљкама кромпира, парадајза или другим биљкама домаћинима са симптомима смеђе трулежи и бактеријског увенућа

1.1. Симптоми

1.1.1. Симптоми на кромпиру

Биљка кромпира. Почетна фаза инфекције у пољу препознаје се по увенућу лишћа при врху биљке на високим температурама током дана, али које се опорављају током ноћи. У раним фазама увенућа лишће остаје зелено, али касније почиње да жути и развија се смеђа некроза. Такође, долази и до појаве епинастије. Убрзо долази до неповратног увенућа изданка или цијеле биљке што резултира пропадањем и одумирањем биљке. Попречни пресјек спроводног ткива увенуле стабљике обично је смеђе боје, а из пресјеченог мјеста се лако може искиједити млијечни бактеријски ексудат. Кад се пресјечено мјесто стабљике стави усправно у воду, из спроводних судова истиче бактеријски ексудат.

Кртола кромпира. Кртоле кромпира треба пререзати попречно или уздужно у близини пупка кртола. Почетна фаза инфекције препознаје се по промјени боје спроводног прстена од стакластожуге до свијетлосмеђе из којег се спонтано, након неколико минута, појављује блиједи кремасти бактеријски ексудат. Касније, спроводно ткиво постаје изразито смеђе и некроза се може проширити на паренхимско ткиво. У узнапредовалим фазама инфекције бактеријски ексудат може цурити и из пупчаног дијела и из окача и на њу се лијепа честице земље. На pokožици кртоле могу се појавити црвенкастосмеђа улегнућа због пропадања спроводног ткива изнутра. У узнапредовалим фазама болести уобичајен је и секундарни развој меке трулежи коју проузрокују гљиве и бактерије.

1.1.2. Симптоми на парадајзу

Биљка парадајза. Први видљиви симптом је увелост најмлађих листова. У условима који су повољни за патогена (температура земљишта око 25 °C; zasiћеност влагом) у року од неколико дана долази до епинастије и увенућа само једне стране или цијеле биљке што доводи до потпуног пропадања биљке. У мање повољним условима (температура земљишта мања од 21 °C) увенуће се рјеђе појављује, али се на стабљичи може развити велики број адвентивног коријења. Могуће је уочити пруге које изгледају као натопљене водом и протежу се дуж стабљике, од њене базе, а доказ су некротирања спроводног ткива. Ако се стабљика пресијече унакрсно, из спроводног ткива чија је боја промијењена у смеђу, цури бијели или жућкасти бактеријски ексудат.

1.1.3. Симптоми на другим биљкама домаћинима

Биљке *Solanum dulcamara* и *S. nigrum*. Код ових биљака домаћина се у природним условима ријетко уочавају симптоми увенућа, осим ако температура земљишта прелази 25 °C или ако је ниво инокулума изузетно висок (нпр. *S. nigrum* који расте близу обојеле биљке кромпира или парадајза). Биљке *Solanum dulcamara* расту са стабљикама и коријењем у води и на њима није видљиво увенуће, али је на попречном пресијеку основе стабљике или дијеловима стабљике који су под водом видљива свијетлосмеђа обојеност спроводног ткива. Уколико пресјечену стабљичу усправно ставимо у воду, из спроводног ткива на мјесту пресјека може цурити бактеријски ексудат, чак и ако нема симптома увенућа.

1.2. Брзи тестови провјере

Брзи тестови провјере олакшавају, али нису пресудни у постављању почетне дијагнозе. Примјенијени један или више следећих одобрених тестова:

1.2.1. Тест бактеријског ексудата из стабљике (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.1. овог прилога).

1.2.2. Детекција гранула поли-β-хидроксибутирата (PHB):

Карактеристичне грануле PHB-а у хелијама *R. solanacearum* постају видљиве при бојењу термички фиксираним размазом бактеријског ексудата из зараженог ткива на микроскопској плочици нилском плавом бојом А и суданском црном бојом Б (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.2. овог прилога).

1.2.3. Серолошки тестови аглутинације (Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.3. овог прилога).

Остали тестови. У остале одговарајуће брзе тестове провјере спадају IF тест, FISH тест, ELISA тест и PCR тест.

1.3. Поступак izolacije

У мањој количини стерилне дестиловане воде или 50 ml фосфатног пуфера направити суспензију бактеријског ексадата или дијелова ткива промијене боје из спроводног прстена кртола кромпира или из спроводних судова стабљика кромпира, парадајза или других биљака домаћина са симптомима увенућа и оставити 5 до 10 минута.

Припремити низ децималних разрјеђења суспензије. Припремити 50 µl до 100 µl суспензије и разрјеђења на општу хранљиву подлогу (NA, YPGA или SPA; и/или на Келманову тетразолиум-подлогу и/или на одобрену селективну подлогу (нпр. SMSA; видјети Поглавље X овог прилога). Суспензију и/или разрјеђење размазати по подлози, примјењујући одговарајућу технику наношења разрјеђења на подлогу. Уколико је потребно, наношењем разрјеђења суспензије колонија на одвојеним подлогама припремити позитивну контролу *R. solanacearum* биовар 2.

Инкубирати подлоге од два до шест дана на 28 °C.

На општој хранљивој подлози вирулентни изолати бактерије *R. solanacearum* стварају плоснате, неправилне и течне колоније бисерне кремастобијеле боје, често са карактеристичним спиралама у средини. Невирулентни облици бактерије *R. solanacearum* стварају мале, округле, нефлуидне колоније, путерасте конзистенције и кремастобијеле боје.

На Келмановој тетразолиум-подлози и на SMSA подлози спирале су крвавоцрвене боје. Невирулентни облици бактерије *R. solanacearum* стварају мале, округле, нефлуидне колоније, путерасте конзистенције које су цијеле и тамноцрвене боје.

1.4. Тестови за идентификацију бактерија *R. solanacearum*

Тестови за потврду идентитета изолата за које се сматра да су изолати *R. solanacearum* наведени су у Поглављу VIII тачка 2. овог прилога.

Поглавље V - Методе за детекцију и идентификацију бактерије *R. solanacearum* у узорцима кртола кромпира без симптома

1. Детаљне методе за детекцију и идентификацију бактерије *R. solanacearum* у узорцима кртола кромпира без симптома

1.1. Припрема узорка

Стандардна величина узорка је 200 кртола по тесту.

Интензивније узорковање захтијева извођење већег броја тестова на узорцима те величине. Већи број кртола у узорку доведиће до инхибиције или ће отежати тумачење резултата. Међутим, поступак се може примјенити и за узорке са мање од 200 кртола, када је на располагању мање кртола.

Валидација свих метода за утврђивање присуства патогена, које су описане у даљем тексту, базира се на тестирању узорака од 200 кртола.

Екстракт кромпира који је описан у даљем тексту може се користити и за утврђивање присуства проузроковача претенасте трулежи кромпира, бактерије *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Процедура која претходи припреми узорка (опциона):

Инкубирати узорак на од 25 °C до 30 °C у периоду до двије недјеље прије извођења тестова, да би се изазвало умножавање популација бактерија *R. solanacearum*.

Опрати кртоле. Употријебити одговарајућа дезинфекциона средства (при коришћењу PCR теста употребити једињења хлора ради уклањања евентуално присутне ДНК патогена) и детерџенте између сваког узорка. Осушити кртоле на ваздуху. Поступак прања је посебно користан (али не обавезан) за случајеве обраде узорака са већом количином земље, при извођењу PCR теста или процедуре директне изолације.

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

Све кртоле са потенцијално сумњивим симптомима смеће трулежи одвојити посебно и тестирати.

Ако се приликом вађења конуса из пупчаног дијела уоче потенцијални симптоми смеће трулежи, кртоле треба визуелно прегледати. Сваку пресјечену кртолу са оваквим симптомима треба оставити два дана на собној температури, а потом чувати у карантинским условима (на 4 °C до 10 °C) до спровођења тестирања. Све кртоле у узорку (укључујући и оне са сумњивим симптомима) треба чувати у складу с одговарајућим одредбама Правилника.

Извађене конусе из пупчаног дијела кртоле који садрже дијелове спроводног ткива ставити у стерилне посуде које се могу запечатити и/или херметички затворити (ако су посуде већ употребљаване, морају се темељно очистити и дезинфиковати употребом средстава на бази једињења хлора). Узорке је пожељно

одмах обработити. Ако то није могуће, чувати их у посуди без додатка пуфера, најдуже 72 сата у фрижидеру или најдуже 24 сата на собној температури. Током чувања долази до сушења и суберијације сржног дијела конуса, као и до раста и развоја сапрофита, што може ометати утврђивање присуства бактерије проузроковача претенасте трулежи.

Извађене конусе из пупчаног дијела кртоле обработити коришћењем једног од следећих поступака:

- извађене конусе прекрити довољном количином (око 40 ml) екстракционог пуфера и ултрацентрифугирати на 50 обртаја/мин. до 100 обртаја/мин., четири сата на температури испод 24 °C или 16 до 24 сата уз хлађење или

- извађене конусе хомогенизовати са довољном количином (око 40 ml) екстракционог пуфера било у мјешалици (нпр. *Waring* или *Ultra Thurax*) било дробљењем у затвореној кеси за мацерирацију за једнократну употребу (нпр. кесе *Stomacher* или *Bioreba* од чврстог политена 150 mm · 250 mm, стерилизоване зрачењем), користећи гумени чекић или одговарајући апарат за мацерирање (нпр. *Homex*).

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

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

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

Ресуспендовати талог у 1,5 ml пелет пуфера (пуфера за растварање талого). Од ове количине користити 500 µl за тестирање на присуство *R. solanacearum*, 500 µl за тестирање на присуство *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* и 500 µl као референтни материјал за чување. У последњи, референтни дио од 500 µl додати стерилни глицерол у коначној концентрацији од 10% до 25% (v/v), промијешати и чувати на температури од -16 °C до -24 °C (недјељама) или на -68 °C до -86 °C (мјесецима). Дијелове одвојене за утврђивање присуства бактерија током тестирања чувати на температури од 4 °C до 10 °C. Не препоручује се вишеструко замрзавање и одмрзавање. У случају потребе за транспортом узорка, доставити га у преносивом фрижидеру у року од 24 сата до 48 сати.

Важно је да се све позитивне контроле *R. solanacearum* и узорци држе одвојено да би се избјегла контаминација. Ово се односи и на IF плочице и друге тестове.

1.2. Тестирање

Видјети дијаграм и опис тестова и оптимизоване протоколе у одговарајућим додацима:

Селективна изолација (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.4. овог прилога).

IF тест (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.5. овог прилога).

PCR тестови (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.6. овог прилога).

FISH тест (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.7. овог прилога).

ELISA тестови (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.8. овог прилога).

Биолошки тест (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.9. овог прилога).

2. Методе за детекцију и идентификацију бактерије *R. solanacearum* у узорцима биљака кромпира, парадајза или других биљака домаћина без симптома

2.1. Припрема узорка

За откривање латентних популација *R. solanacearum* препоручује се тестирање збирних узорка. Поступак се може погодно примјенити на збирне узорке са највише 200 дијелова стабљике (узимање узорка током спровођења надзора мора се базирати на статистички репрезентативном узорку испитиване биљне популације).

Чистим дезинфикованим ножем или маказама за резање одрезати 1 cm до 2 cm доњег дијела сваке стабљике, одмах изнад површине земљишта. Дијелове стабљике дезинфиковати кратким потапањем у 70% етанол и одмах осушити упијајућим папиром.

Ставити дијелове стабљике у затворену стерилну посуду.

Расад парадајза из расадника: чистим дезинфикованим ножем одсјећи дио величине 1 cm од доњег дијела стабљике, непосредно изнад површине земље.

Билке парадајза из поља или стакленика чистим, дезинфикованим ножем одсјећи најнижи бочни изданак на свакој биљци, и то непосредно изнад споја са стабљиком. Са сваког бочног изданка одсјећи доњи део величине 1 cm.

Са осталих биљака домаћина чистим, дезинфикованим ножем или баштенским маказама одсјећи део величине 1 cm са доњег дијела стабљике, непосредно изнад нивоа земље. Ако се узоркује *S. dulcamara* или друге билке домаћина које расту у води, одсјеците дио величине од 1 cm до 2 cm са подводног дијела стабљике или стилона са воденим коријењем.

При узорковању на одређеној локацији, препоручује се тестирање статистички репрезентативног узорка од најмање десет биљака по мјесту узорковања за сваку врсту самониклог биља која је потенцијални домаћин. Детекција патогена најпоузданија је крајем пролећа и током лета и јесени, иако се природне инфекције могу открити током цијеле године код вишегодишње билке *Solanum dulcamara*, која расте у водотоковима. Познати домаћини су самоникле билке кромпира (кртоле остале у земљишту), *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* и други врсте породице *Solanaceae*. Остале билке домаћини су *Pelargonium* spp. и *Portulaca oleracea*. Европске врсте самониклог биља које у специфичним условима средине могу бити потенцијални домаћини популација *R. solanacearum* биовар 2 / раса 3 у коријењу и/или ризосфери су *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*.

У овој се фази може обавити визуелни преглед биљака (обојеност спроводног система или појава бактеријског ексудата). Одвојити све дијелове стабљика са симптомима и тестирати их посебно.

Кратко дезинфикујте дијелове стабљика 70% етанолом и одмах осушите упијајућим папиром. Дијелове стабљика затим обрадите једним од следећих поступака:

- дијелове стабљике прекрити довољном количином (приближно 40 ml) екстракционог пуфера и ултрацентрифугирати на 50 обртаја/мин. до 100 обртаја/мин. четири сата на температури испод 24 °C или 16 до 24 сата уз хлађење,

или

- дијелове стабљике измацерирати у чврстој кеси за мацерацију (нпр. *Stomacher* или *Bioreba*) са одговарајућом количином екстракционог пуфера, користећи гумени чекић или одговарајућу опрему за мацерирање (нпр. *Homex*). Ако то није могуће, дијелове стабљике чувати у фрижидеру најдуже 72 сата или на собној температури најдуже 24 сата.

Послије 15 минута таложења, одлити супернатант.

Даље избистравање екстракта или концентровање фракције бактерија обично није потребно, али се може постићи филтрирањем и/или центрифугирањем како је описано у тачки 1. овог поглавља.

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

2.2. Тестирање

Видјети дијаграм и опис тестова и оптимизоване протоколе у одговарајућим додацима:

Селективна изолација (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.4. овог прилога).

IF тест (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.5. овог прилога).

PCR тест (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.6. овог прилога).

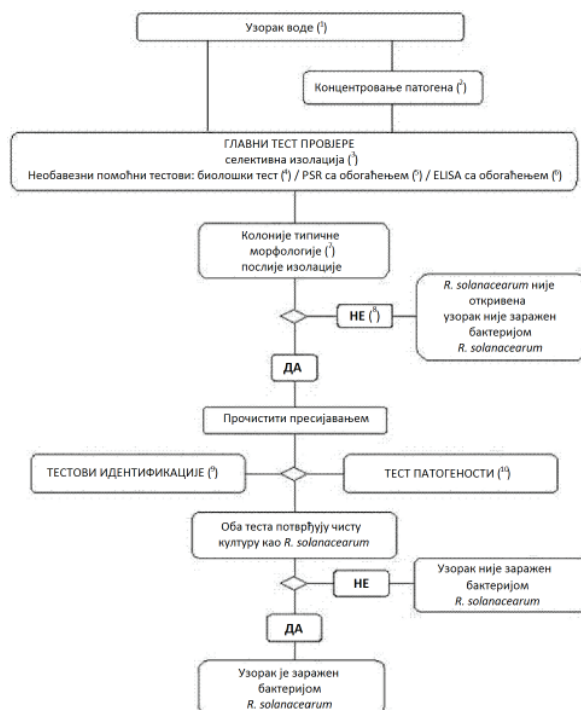
FISH тест (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.7. овог прилога).

ELISA тест (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.8. овог прилога).

Биолошки тест (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.9. овог прилога).

Поглавље VI - Детекција и идентификација у води

1. Шема за детекцију и идентификацију бактерије *R. solanacearum* у води



Шема 4.

(1) За препоручене поступке узорковања видјети тачку 2. подтачка 2.1. овог поглавља.

(2) Методе концентрисања патогена описане су у тачки 2. подтачка 2.1. овог поглавља. Овај поступак се препоручује само ако неће довести до инхибиције изолације, јер се концентрисањем повећавају популације и патогена и конкурентних сапрофитних бактерија.

(3) Селективна изолација описана је у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.4. овог прилога.

(4) Биолошко тестирање је описано у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.9. овог прилога.

(5) Методе обогаћивања за PCR тест описане су у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.4. и Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.6. овог прилога

(6) Методе обогаћивања за ELISA тест описане су у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.4. и Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.8. овог прилога.

(7) Типична морфологија колоније описана је у Поглављу IV тачка 1. подтачка 1.3. овог прилога.

(8) Гајење бактеријске културе може бити неуспјешно због конкуренције или инхибиције сапрофитним бактеријама. Ако се сумња да ће велике популације сапрофитних бактерија утицати на поузданост изолације, поновити изолацију после разријеђивања узорка у стерилној води.

(9) Поуздана идентификација чистих култура *R. solanacearum* постиже се извођењем тестова описаних у Поглављу VIII тачка 2. овог прилога.

(10) Тест патогености описан је Поглављу VIII тачка 3. овог прилога.

Идентификациона шема описана у овом поглављу може се примјенити за детекцију патогена у узорцима површинске (текуће воде), као и у узорцима индустријских (отпадних) вода. Ипак, важно је нагласити да ће очекивана осјетљивост детекције варирати у зависности од супстрата. На осјетљивост теста изолације утичу популације конкурентних сапрофитних бактерија, чија је бројност најчешће много већа у случају индустријских (отпадних) вода, него у случају површинских (текућих) вода. Иако се поштовањем и реализовањем поменути идентификационе шеме очекује детекција популације бактерије концентрације 10^3 h/литру површинске (текуће) воде, очекује се да је осјетљивост детекције много нижа код индустријске (отпадне) воде. Из овог разлога се препоручује да се популација ове бактерије утврђује у узорку отпадне воде тек после процеса прочишћавања (нпр. седиментација или филтрација), током којег се редукује број бактерија сапрофитне популације. Ово ограничавање осјетљивости метода треба узети у обзир када се процјењује поузданост било ког добијеног негативног резултата анализе. Иако се ова шема веома успјешно при-

мјењује код утврђивања присуства ове бактерије у текућим водама, њена ограничења треба узети у обзир приликом сличних надзора индустријских (отпадних) вода.

2. Методе за детекцију и идентификацију *R. solanacearum* у води

2.1. Припрема узорака

4. детекција *R. solanacearum* у текућим водама је најпоузданија током касног пролећа, лета и јесени, када је температура воде изнад 15 °C;

5. поновљено узимање узорака на одабраним мјестима неколико пута током наведеног периода ће повећати поузданост детекције умањивањем климатских варијација;

6. узети у обзир утицај јаких падавина и географске параметре водотокова у циљу избјегавања ефекта разријеђења који могу умањити могућност детекције патогена;

7. узорке узимати у текућим водама у близини биљака домаћина, уколико постоје.

На одабраним мјестима узорковати воду захватањем одређене количине воде у рециклабилне стерилне епрувете или боце, и то са дубине испод 30 cm и у оквиру 2 m од обале; индустријску и отпадну воду узорковати на мјесту испуштања; препоручује се величина узорка од 500 ml по мјесту узорковања. Уколико је потребно да узорци буду мањи, препоручује се да буду узети са три различите тачке по одабраном мјесту узорковања и да се сваки састоји од два подузорка од најмање 30 ml. У условима интензивног надзора, изабрати најмање три мјеста узорковања на свака 3 km водотока; у узорковање укључити и мјеста уливања других водотокова.

Узорак транспортовати у тамним и хладним контејнерима (4 °C до 10 °C) и тестирати у периоду од 24 сата од узорковања.

Уколико је потребно, бактеријска фракција се може концентровати коришћењем једне од следећих метода:

8. центрифугирати 30 ml до 50 ml подузорака на 10.000 g у трајању од 10 минута (или 7.000 g у трајању од 15 минута), најпожељније на температури од 4 °C до 10 °C; одлити супернатант и ресуспендовати пелет у 1 ml пуфера;

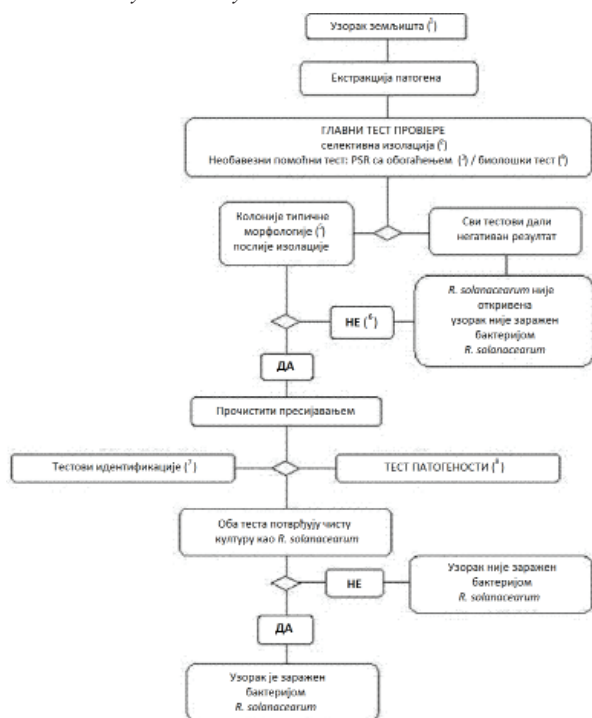
9. извршити мембранску филтрацију (минимална величина поре 0.45 µm), а потом и испирање филтера са 5 ml до 10 ml пуфера и сакупљање онога што се испере; овај метод је погодан за веће запремине воде које садрже мању концентрацију сапрофита.

Концентрисање раствора се не препоручује за узорке индустријске (отпадне) воде, јер би повећана популација сапрофитних бактерија инхибирала развој *R. solanacearum*.

2.2. Тестирање у лабораторији се изводи према одговарајућој идентификационој шеми у складу са овим прилогом.

Поглавље VII - Детекција и идентификација у земљишту

1. Шема за детекцију и идентификацију бактерије *R. solanacearum* у земљишту



Шема 5.

(1) За препоручене поступке узорковања видјети у Поглављу VI тачка 2. подтачка 2.1. овог прилога.

(2) Селективна изолација описана је у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.4. овог прилога.

(3) Методе обогаћивања за PCR тест описане су у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.4. и 1.6. овог прилога.

(4) Биолошки тест је описан у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.9. овог прилога.

(5) Типична морфологија колоније описана је у Поглављу IV тачка 1. подтачка 1.3. овог прилога.

(6) Гајење бактерије може бити неуспјешно због конкуренције или инхибиције сапрофитних бактерија. Ако се сумња да ће велике популације сапрофитних бактерија утицати на поузданост изолације, поновити изолацију после додатног разријеђивања узорка.

(7) Поуздана идентификација чистих култура *R. solanacearum* постиже се примјеном тестова описаних у Поглављу VIII тачка 2. овог прилога.

(8) Тест патогености описан је у Поглављу VIII тачка 3. овог прилога.

2. Методе за детекцију и идентификацију бактерије *R. solanacearum* у земљишту

Начела

Валидан поступак описан у овом дијелу се може примјенити за детекцију патогена у узорцима земљишта, као и за испитивање узорака чврстог индустријског отпада насталог при преради кромпира или узорака канализацијског муља. Међутим, важно је напоменути да ове методе нису довољно осјетљиве да би гарантовале детекцију мањих и/или неравномерно распоређених популација бактерије *R. solanacearum*, које могу бити природно присутне у узорцима тих супстрата.

Треба узети у обзир ограничења у осјетљивости овог поступка тестирања при одређивању поузданости добијених негативних резултата, као и при примјени поступка у истраживањима чији је циљ утврдити присуство или одсуство патогена у земљишту или муљу. Најпоузданији начин утврђивања присуства патогена у земљишту на пољу је сјетва/садња осјетљивих биљака домаћина и праћење појаве инфекције, али се ни коришћењем ове методе неће открити ниски нивои контаминације.

2.1. Припрема узорка

Узорковање земљишта у пољу треба обављати у складу с основним начелима која се примјењују код узорковања за испитивање нематода. Са 60 мјеста на сваких 0,3 ha узети 0,5 до 1 kg земљишта по узорку, с дубине од 10 cm до 20 cm (или на мрежи од 7 m · 7 m). Ако се сумња на присуство патогена, повећати број мјеста узорковања на 120 (на сваких 0,3 ha). Прије тестирања узорке чувати на температури од 12 °C до 15 °C. Узорковање чврстог индустријског отпада насталог при преради кромпира или узорковање канализацијског муља извршити узимањем укупно 1 kg на мјестима која представљају укупну количину муља коју треба тестирати. Сваки узорак добро промијешати прије тестирања.

Подузорке од 10 g до 25 g земљишта или муља измијешати у 60 ml до 150 ml екстракционог пуфера на ротационој мјешалици (250 обртаја/мин.), у трајању од максимално 2 сата. Мијешању, по потреби, може помоћи додавање 0,02% стерилног Tween – 20 и 10 g до 20 g стерилног пијеска.

Успензију одржавати на температури од 4 °C током тестирања.

Тестирање се изводи према одговарајућој идентификационој шеми у складу са овим прилогом.

Поглавље VIII - Оптимизовани протоколи за детекцију и идентификацију *R. solanacearum*

1. Дијагностички тестови и тестови за идентификацију

1.1. Тестирање бактеријског ексудата из стабљике

Присуство *R. solanacearum* у стабљикама увелих биљака кромпира, парадајза или других биљака домаћина може се утврдити следећим једноставним тестом: сасјети стабљику непосредно изнад површине земљишта и тај крај ставити у епрувету са чистом водом. Послије неколико минута, из пресечених спроводних судова пратити појаву карактеристичног бактеријског ексудата.

1.2. Детекција гранула поли-п-хидроксибутирата (PHB)

На микроскопској плочици припремити размаз бактеријског ексудата из зараженог ткива или из 48-часовне културе са храњиве подлоге YPGA или SPA (Поглавље X овог прилога).

За позитивну контролу припремити размазе биовара 2, бактерије *R. solanacearum*, а за негативну контролу размаз бактеријске врсте за коју је познато да је негативна на PHB, уколико се овај поступак сматра потребним.

Размазе оставити да се осуше на ваздуху и потом их фиксирати на пламену.

Обојити препарат или нилском плавом или суданском црном бојом и посматрати под микроскопом следеће.

1.2.1. Тест са нилском плавом бојом:

Прелити сваку плочицу с 1% воденим раствором нилскоплаве боје А и инкубирати 10 минута на 55 °С.

Оциједити раствор боје. Испрати кратко под благим млазом воде из славине. Вишак воде уклонити упијајућим папиром.

Прелити размаз 8% воденим раствором сирћетне киселине и инкубирати један минут на собној температури.

Испрати кратко под благим млазом воде из славине. Вишак воде уклонити упијајућим папиром.

Поновно навлажити капљицом воде и покрити покровним стаклом.

Прегледати обојени размаз епифлуоресцентним микроскопом на 450 nm, имерзијским објективом повећања од 600 до 1.000 пута (уљна или водена имерзија).

Прегледати да ли је присутна светлонанцаста флуоресценција гранула РНВ-а. Такође, прегледати плочицу и под нормалним светлом да би се потврдило присуство гранула РНВ у ћелијама и да је ћелијска морфологија типична за *R. solanacearum*.

1.2.2. Тест са бојом суданскоцрно

Прелити сваку плочицу 0,3% воденим раствором боје суданскоцрно Б у 70% етанолу и инкубирати 10 минута на собној температури.

Оциједити раствор боје, кратко испрати под млазом воде из славине и вишак воде уклонити упијајућим папиром.

Плочице накратко умочити у ксилол и осушити их на упијајућем папиру. Ксилол је опасан за здравље, предузети потребне сигурносне мјере и радити у дигестору.

Прелити плочице 0,5% (w/v) воденим раствором шафранина и оставити 10 секунди на собној температури. Шафранин је опасан за здравље, предузети потребне сигурносне мјере и радити у дигестору.

Испрати под благим млазом воде из славине, осушити на упијајућем папиру и покрити покровним стаклом.

Прегледати обојене размазе под микроскопом који користи пролазно свјетло, уљним имерзијским објективом повећања од 1.000 пута.

Прегледати да ли се уочавају плаво-црно обојене грануле РНВ-а у ћелијама *R. solanacearum* с ћелијским зидовима обојеним ружичасто.

1.3. Серолошки тест аглутинације

Аглутинација ћелија *R. solanacearum* у бактеријском ексадату или екстрактима ткива са симптомима, најбоље се уочава коришћењем потврђених и одобрених антителија обиљежених одговарајућим обојеним ознакама као што су црвене ћелије *Staphylococcus aureus* или обојене честице латекса. Ако се користи комплет који је доступан на тржишту, слиједити упутства произвођача. У супротном, примјенити следећи поступак:

- помијешати капљице суспензије обиљеженог антителија и бактеријског ексадата (око 5 μ l сваког) на предметним плочицама са више бунарчића,

- припремити позитивне и негативне контроле користећи суспензије *R. solanacearum* биовар 2 и хетерологног соја,

- уочити да ли долази до аглутинације у позитивним узорцима послје 15 секунди лаганог мијешања.

1.4. Изолација *R. solanacearum*

1.4.1. Изолација на селективној подлози

Напомена

Прије примјене ове методе, обавити претходне тестове да би се осигурала поновљива детекција 10^3 до 10^4 јединица које стварају колоније (CFU) бактерије *R. solanacearum* по ml, а које су дате екстрактима узорака који су у претходним тестирањима доказани као негативни.

Користити потврђену и одобрену селективну хранљиву подлогу као што је SMSA (прилагођену према Elphinstone и сар., 1996; – Поглавље X овог прилога).

Приликом прегледа засејане хранљиве подлоге, обратити пажњу на разликовање *R. solanacearum* од других бактерија чије колоније могу расти на тој хранљивој подлози, јер колоније *R. solanacearum* могу бити нетипичне морфологије ако је интензиван пораст разних бактерија на подлози или ако су присутне антагонистичке бактерије. Уколико се посумња да је дошло до негатив-

ног утицаја конкуренције или антагонизма, узорак треба поново тестирати другим тестом.

Највећа осјетљивост детекције овом методом може се очекивати ако се користе свјеже припремљени екстракти узорака. Међутим, ова се метода може примјењивати и на екстрактима чуваним с глицеролом на температури од -68 °С до -86 °С.

Позитивна контрола: припремити децимална разријеђења суспензије 106 cfu по ml вирулентног соја биовара 2 *R. solanacearum* (нпр. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Позитивне контроле припремити потпуно одвојено од узорака који се тестирају да би се избјегла могућност контаминарања узорака.

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

Примјенити одговарајућу технику доношења разријеђења да би се осигурала довољна разријеђеност популација сапрофитних бактерија. Нанијети од 50 μ l до 100 μ l екстракта узорка по подлози и по сваком разријеђењу.

Инкубирати подлоге на 28 °С и очитати их послје 48 сати, а послје тога сваки дан у периоду од шест дана. Типичне колоније *R. solanacearum* на хранљивој подлози SMSA А су млијечнобијеле боје, плоснате, неправилног облика и воденасте, а послје три дана инкубације средина им постаје ружичаста до крвавоцрвена с унутрашњим пругама или спиралама.

Напомена

На овој хранљивој подлози понекад расту и нетипичне колоније *R. solanacearum*, које могу бити мале, округле, потпуно црвене боје и неводенасте или само дјелимично воденасте, због чега их је тешко разликовати од колонија сапрофитних бактерија.

Колоније за које се сматра да су колоније *R. solanacearum* треба пренијети на уобичајену хранљиву подлогу и пречистити да би се добиле појединачне издвојене колоније.

Културе се кратко вријеме могу чувати у стерилној води (pH 6 до 8, без хлора) на собној температури у тамни или дуже вријеме на температури од -68 °С до -86 °С или лиофилизоване.

Изолате идентификовати (Поглавље VIII тачка 2. овог прилога) и провјерити патогеност (Поглавље VIII тачка 3. овог прилога).

Тумачење резултата селективне изолације

Селективна изолација је негативна ако се послје шест дана не уочавају никакве бактеријске колоније или ако се не пронађу сумњиве колоније типичне за *R. solanacearum*, под условом да се не сумња на инхибицију због конкуренције или антагонизма других бактерија и да су типичне колоније *R. solanacearum* пронађене у позитивним контролама

Селективна изолација је позитивна ако се издвоје сумњиве колоније *R. solanacearum*.

1.4.2. Поступак обогаћивања

За обогаћивање употриједити потврђену и одобрену подлогу што је модификована *Wilbrink* течна подлога (Поглавље X овог прилога).

Овај поступак се може примјенити за селективно повећање популације *R. solanacearum* у екстрактима узорака, усљед чега се повећава и осјетљивост детекције. На овај начин се такође значајно разријеђују инхибитори PCR реакције (1 : 100). Међутим, треба напоменути да обогаћивање *R. solanacearum* може бити неуспјешно због конкуренције или антагонизма сапрофитних организама који се често истовремено обогаћују. Због тога може бити тешко издвојити *R. solanacearum* из култура обогаћених у течной подлози. Поред тога, у случају употребе ELISA теста, с обзиром на то да се популације серолошки сродних сапрофита могу повећати, препоручује се употреба специфичних моноклоналних антителија умјесто поликлоналних антителија.

За обогаћивање за PCR тест пренесите 100 μ l екстракта узорка у 10 ml течне подлоге за обогаћивање који је претходно подијељен у аликоте у епрувете или бочице без ДНК. За обогаћивање за ELISA тест могу се користити већи дијелови екстракта узорка у текућој подлози (нпр. 100 μ l у 1,0 ml текуће подлоге за обогаћивање).

Инкубирати 72 сата на температури од 27 °С до 30 °С са протресањем или без протресања, с чепом који није до краја затегнут да би се омогућило провјетравање.

Добро помијешати прије коришћења у ELISA или PCR тестовима.

С обогаћеном текућом подлогом поступати исто као и с узорцима у претходно описаним тестовима.

Напомена

Уколико се очекује да ће обогаћивање *R. solanacearum* бити онемогућено због великих популација одређених конкурентних

сапрофитних бактерија, бољи резултати се могу добити обогаћавањем екстракта узорака прије центрифугирања или других поступака концентрисања.

1.5. IF тест

Начело

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

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

Напомена

Користити потврђена и одобрена антибијела *R. solanacearum*.

Препоручује се одређивање титра за сваку нову серију антибијела. Титар се дефинише као највеће разрјеђење у коме долази до оптималне реакције при тестирању суспензије која садржи 10^5 до 10^6 ћелија по ml одговарајућег соја *R. solanacearum* уз коришћење флуоресцеин-изотиоцијанат (FITC) коњугата у складу с препорукама произвођача. Сви потврђени и одобрени поликлонални антисеруми имали су IF титар најмање 1 : 2.000. Током тестирања користити радна разрјеђења антибијела, која су близу или једнака титру.

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

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

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

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

У Поглављу XI овог прилога наведени су стандардизовани позитивни и негативни контролни материјали који се могу употребљавати у овом тесту.

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

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

1.5.1. Припремити IF плочице за тестирање једним од следећих поступака

1.5.1.1. За талог с релативно малом количином наталоженог скроба

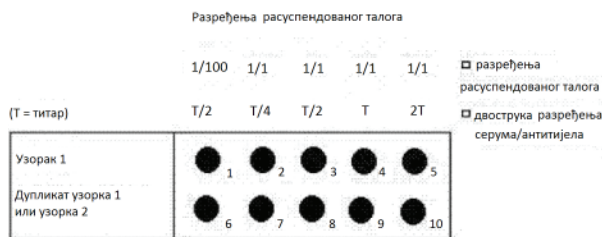
У први бунарчић пипетом одмјерити стандардну запремину разрјеђења од 1/100 ресуспендованог талога кромпира (15 μ l је довољно за бунарчиће пречника 6 mm – повећати запремину за веће бунарчиће). Потом у остале бунарчиће у истом реду пипетом одмјерити сличну запремину неразрјеђене суспензије (1/1) талога. Други ред се може користити као дупликат првог или за други узорак како је приказано у Шеми 6.

1.5.1.2. За остале суспензије талога

Припремити децимална разрјеђења (1/10 и 1/100) ресуспендованог талога у пуферу за талог. У један ред бунарчића пипетом одмјерити стандардну запремину ресуспендованог талога и сваког разрјеђења (15 μ l је довољно за бунарчиће пречника 6 mm – повећати запремину за веће). Други ред се може користити као дупликат првог или за други узорак као што је приказано у Шеми 7.

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

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



1.5.3. IF поступак

1.5.3.1. У складу са поступком за припрему плочица за тестирање како је описано у 1.5.1.1

Припремити двоструки низ разрјеђења антибијела у IF пуферу. Први бунарчић мора имати 1/2 титра (T/2), а остали 1/4 титра (T/4), 1/2 титра (T/2), титар (T) и двоструки титар (2T).

1.5.3.2. У складу с поступком за припрему плочица за тестирање како је описано у 1.5.1.2.

Припремити радно разрјеђење антибијела у IF пуферу. Радно разрјеђење утиче на специфичност.



Шема 7. Припрема плочица у складу са 1.5.1.2. и 1.5.3.2.

Поредати плочице на навлажени упијајући папир. Сваки бунарчић потпуно испунити разрјеђењем антибијела. Запремина антибијела мора бити једнака запремини нанесеног екстракта.

Уколико не постоје посебна упутства произвођача антибијела, слиједити следећу процедуру:

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

Капљице са сваке плочице отрести и плочице пажљиво испрати IF пуфером. Потопити плочице у IF пуфер-Tween па у IF пуфер, у трајању од по 5 минута. Спријечити стварање аеросола или пренос капљица јер би могло доћи до унакрсне контаминације узорака. Плочице пажљиво осушити упијајућим папиром.

Поредати плочице на навлажени упијајући папир. Бунарчиће попити разрјеђеним FITC коњугатом који се користи за одређивање титра. Запремина коњугата нанесеног на бунарчић мора бити једнака запремини нанесеног антибијела.

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

Отрести капљице коњугата са плочица. Испрати и опрати плочице како је претходно описано. Плочице пажљиво осушити.

На сваки бунарчић пипетом нанијети од 5 μ l до 10 μ l 0,1M глицерола с фосфатним пуфером или комерцијално доступно средство против избљеђивања и ставити покривно стакло.

1.5.4. Читавање IF теста

Прегледати припремљене плочице под епифлуоресцентним микроскопом с одговарајућим филтерима за ексцитацију FITC-а, под улном или воденом имерзијом и увећањем од 500 до 1.000 пута. Прегледати сваки бунарчић уздуж и попрјико, под правим углом и дуж спољне ивице. За узорке у којима је видљив мали број ћелија или их уопште нема прегледати најмање 40 микроскопских видних поља.

Прво треба прегледати плочицу с позитивном контролом. Ћелије морају бити изразито флуоресцентне и потпуно обојене на утврђеном титру антибијела или радног разрјеђења. У случају да код обојености дође до одступања, IF тест се мора поновити (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.5. овог прилога).

Утврдити да ли јасно флуоресцентне ћелије које се уочавају у бунарчићима имају морфологију карактеристичну за *R. solanacearum*.

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

Уколико се посумња на контаминацију, тест се мора поновити [нпр. ако због контаминације пуфера све плочице у серији показују

позитивне ћелије или ако су позитивне ћелије пронађене (изван бунарчића) на површини плочице].

Постоји неколико проблема у вези са специфичношћу теста имунофлуоресценције. У концентрованом екстракту издвојених конуса пупчаних делова кртеле или делова стабљике увијек се очекује и присуство популација флуоресцентних ћелија са нетипичном морфологијом или унакрсна реакција са сапрофитним бактеријама сличне величине и грађе као *R. solanacearum*.

Приликом читавања у обзир се узимају само флуоресцентне ћелије типичне величине и морфологије у титру или радном разрјеђу антитијела.

Тумачење читавања IF теста

Уколико се утврди присуство јасно флуоресцентних ћелија карактеристичне морфологије, одредити просјечан број типичних ћелија по микроскопском видном пољу и израчунати број типичних ћелија по ml ресуспендованог талога (Поглавље XIII овог прилога).

Очитавање IF теста је позитивно за узорке који имају најмање $5 \cdot 10^3$ типичних ћелија по ml ресуспендованог талога. Овакав узорак се сматра потенцијално контаминираним и потребно је извршити даље тестирање.

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

1.6. PCR тест

Начела

Када се употребом PCR теста као првог теста провјере добије позитиван резултат, IF тест или изолација на подлогу се користе као други обавезни тест провјере. Ако се коришћењем PCR теста као другог теста провјере добије позитиван резултат, за постављање коначне дијагнозе треба обавити даље тестирање према дијаграму тока.

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

Напомена

Прелиминарна тестирања примјеном ове методе треба да омогуће поновљиву детекцију најмање 10^3 до 10^4 ћелија *R. solanacearum* по ml, које су додате екстракту узорка претходно доказаног као негативног.

За постизање највећег степена осјетљивости и специфичности у свим лабораторијама потребно је извођење огледа за стандардизацију (оптимизацију) методе. Користити потврђене и одобрене реагенсе и протоколе за PCR (Поглавље XIV овог прилога). Пожељно је одабрати метод са интерном контролом. Предузети одговарајуће мјере опреза да би се избјегла контаминација узорка циљном ДНК. PCR тест треба да обављају искусни стручњаци, у специјализованим лабораторијама за молекуларну биологију.

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

У PCR тест укључити следеће негативне контроле:

- екстракт узорка у коме претходно током тестирања није доказано присуство *R. solanacearum*,
- пуфер коришћен за екстракцију бактерије и ДНК из узорка,
- PCR реакциони микс.

У PCR тест укључити следеће позитивне контроле:

10. аликвоте ресуспендованих талога у које је додата бактерија *R. solanacearum* (за припрему видјети Поглавље XI тачка 2. овог прилога),

11. суспензију од 106 ћелија по ml вирулентног изолата *R. solanacearum* у води (нпр. NCPPВ 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; видјети

12. ако је могуће, у PCR тесту користити и ДНК екстраховану из позитивних контролних узорка.

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

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

У поглављу XI овог прилога наведени су стандардизовани позитивни и негативни контролни материјали који се могу користити у овим тестовима.

1.6.1. Методе пречишћавања ДНК

Позитивну и негативну контролу користити како је претходно описано (видјети у Поглављу XI овог прилога). Контролни материјал припремити на исти начин као и узорке.

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

Метода која слиједи је стандардизована за коришћење са потврђеном и одобреном PCR методом у Поглављу XIV овог прилога.

1.6.1.1. Метода према Pastriku (2000)

Пипетом одмјерити 220 μ l лизис пуфера (100 mm NaCl, 10 mm Tris-HCl [pH 8], 1 mM EDTA [pH 8]) у Eppendorf тубу од 1,5 ml.

Додати 100 μ l екстракта узорка и ставити у термоблок или водено купатило на 95 $^{\circ}$ C 10 минута.

Ставити тубу на лед у трајању од пет минута.

Додати 80 μ l основног шток раствора *Lysozyme* (50 mg лизозима по ml у 10 mm Tris HCl, pH 8) и инкубирати 30 минута на 37 $^{\circ}$ C.

Додати 220 μ l раствора *Easy DNA® A (Invitrogen)*, добро измијешати на вортексу и инкубирати 30 минута на 65 $^{\circ}$ C.

Додати 100 μ l раствора *EasyDNA® B (Invitrogen)* и снажно измијешати на вортексу до постизања униформног вискозитета узорка.

Додати 500 μ l хлороформа, измијешати на вортексу док се вискозитет не умањи и смјеса постане хомогена.

Центрифугирати на 15.000 g 20 минута на 4 $^{\circ}$ C да се подијеле фазе и створи међуфаза.

Пренети горњу фазу у нову Eppendorf тубу.

Додати 1 ml 100% етанола (-20 $^{\circ}$ C), кратко промијешати на вортексу и инкубирати на леду 10 минута.

Центрифугирати на 15.000 g 20 минута на 4 $^{\circ}$ C и уклонити етанол од талога.

Додати 500 μ l 80% етанола (-20 $^{\circ}$ C) и промијешати окретањем тубе.

Центрифугирати на 15.000 g 10 минута на 4 $^{\circ}$ C сачувати талог, а уклонити етанол.

Оставити талог да се суши на ваздуху или у вакуумској центрифуги (*DNA speed vac*).

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

Чувати на -20 $^{\circ}$ C до извођења PCR-а.

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

1.6.1.2. Друге методе

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

1.6.2. PCR

Припремити узорке за тестирање и контролне узорке за PCR према одобреним протоколима (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.6. овог прилога). Припремити разрјеђење екстракта ДНК из узорка 1 : 10 у ултрачистој води.

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

Према протоколу за PCR, додати 5 μ l екстракта ДНК на 25 μ l реакционог микса у стерилне епрувете за PCR.

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

Ставити епрувете у уређај за PCR (*thermal cycler*) и покренути стандардизовани PCR програм.

1.6.3. Анализа PCR продуката

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

Обојити електрофоретске траке ДНК у гелу потапањем гела у етидиум бромид (0,5 mg/l) у трајању од 30 до 60 минута. Предузети одговарајуће мјере опреза при раду са овим мутагеном.

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

Приликом сваког новог налаза/случаја провјерити аутентичност умноженог PCR продукта извођењем анализе уз помоћ ре-

стрикционих ензима на узорку преостале умножене ДНК, и то инкубацијом при оптималној температури и у оптималном времену с одговарајућим ензимом и пуфером. Настале фрагменте раздвојити електрофорезом у агарозном гелу како је претходно наведено и последије бојења етидиум бромидом на УВ трансилуминатору посматрати карактеристичну матрицу (образец) рестрикционих фрагмената и упоредити је с позитивном контролом прије и последије раздвајања.

Тумачење резултата PCR теста

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

PCR тест је позитиван ако је видљив PCR продукт који је специфичан за *R. solanacearum* и који је очекиване дужине и рестрикционог обрасца, под условом да није умножен ни у једном узорку која представља негативну контролу. Поуздана потврда позитивног резултата представља и успјешно понављање теста с другим паром PCR прајмера (Поглавље XIV овог прилога).

Напомена

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

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

1.7. FISH тест

Начело

Када се FISH тест као први тест провјере и ако се њиме добије позитиван резултат, мора се спровести IF тест или изолација као други обавезни тест провјере. Ако се FISH тест користи као други тест провјере и ако се њиме добије позитиван резултат, за постављање коначне дијагнозе треба обавити даље тестирање према дијаграму тока.

Напомена

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

Поступак треба извршити на свеже припремљеним екстрактима узорака, али се успјешно може примјенити и на екстракт узорка који је био чуван са глицеролом на температури од $-16\text{ }^\circ\text{C}$ до $-24\text{ }^\circ\text{C}$ или од $-68\text{ }^\circ\text{C}$ до $-86\text{ }^\circ\text{C}$.

За негативну контролу употријебити дијелове екстракта узорака који су у ранијем тестирању на *R. solanacearum* доказани као негативни.

За позитивну контролу припремити суспензије које садрже 10^5 до 10^6 ћелија/ml $0,01\text{ M}$ фосфатног пуфера (ПБ) бактерије *R. solanacearum* биовар 2 (нпр. сој NCPPB4156 = PD 2762 = CFBP3857; видјети Додатак 3) из културе старе од три до пет дана. Припремити одвојене плочице за позитивну контролу са хомологим или неким другим референтним изолатом бактерије *R. solanacearum*, раствореним у екстракту кромпира, као што је наведено у Поглављу XI тачка 2. овог прилога.

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

У Поглављу XI тачка 1. овог прилога наведени су стандардизирани позитивни и негативни контролни материјали који се могу употребљавати у овом тесту.

Контролни материјал тестирати примјеном исте процедуре као и узорке.

1.7.1. Фиксирање екстракта кромпира

Сљедећи протокол се заснива на процедури *Wullingsi* сар., (1998):

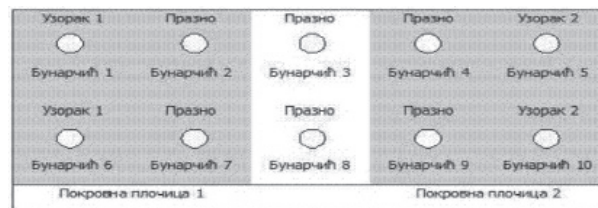
Припремити раствор за фиксирање (Поглавље XV овог прилога).

Пипетом одмерити $100\text{ }\mu\text{l}$ екстракта сваког узорка у *Eppendorf* епрувету на центрифугирати 7 минута на 7.000 g .

Уклонити супернатант и растворити талог у $200\text{ }\mu\text{l}$ фиксатива припремљеног највише 24 сата раније, промијешати и инкубирати један сат у фрижидеру. Алтернативни фиксатив је 96% етанол. При томе је потребно растворити талог из корака 5.1.2 у $50\text{ }\mu\text{l}$ $0,01\text{ M}$ ПБ и $50\text{ }\mu\text{l}$ 96% етанола, промијешати и инкубирати на $4\text{ }^\circ\text{C}$, 30 до 60 минута.

Центрифугирати 7 минута на 7.000 g , уклонити супернатант и ресуспендовати талог у $75\text{ }\mu\text{l}$ $0,01\text{ M}$ ПБ.

У бунарчиће чистих плочица нанијети $16\text{ }\mu\text{l}$ фиксираних суспензија како је приказано у Шеми 8. На сваку плочицу нанијети два различита, неразријеђена узорка и употријебити $10\text{ }\mu\text{l}$ за припремање разријеђења $1 : 100$ (у $0,01\text{ M}$ ПБ). Преостали фиксирани раствор узорка ($49\text{ }\mu\text{l}$) чувати на $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Послије додавања једнаке запремине 96% етанола. Ако FISH тест треба поновити, центрифугирањем уклонити етанол и додати једнаку запремину $0,01\text{ M}$ ПБ (уз мешање).



Шема 8. Приказ плочице за FISH тест

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

1.7.2. Хибридизација

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

Припремити влажну комору за инкубацију тако што се дно херметички затворене кутије прекрива упијајућим или филтерпапиром потопљеним у 1 h *hubmix* (Поглавље XV овог прилога). Кутију претходно инкубирати у апарату за хибридизацију нуклеинских киселина на $45\text{ }^\circ\text{C}$ најмање 10 минута.

Нанесите по $10\text{ }\mu\text{l}$ хибридизованог раствора у осам бунарчића (бунарчићи 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 и 10; видети Шему 7) сваке плочице, а два средња бунарчића (3 и 8) оставити празне.

Прва и задња четири бунарчића покрити покровним стакалцем ($24\text{ mm} \cdot 24\text{ mm}$), пазећи притоме да у бунарчићима не остане ваздух. Ставити плочицу у претходно загријану влажну комору и хибридизовати пет сати у апарату за хибридизацију на $45\text{ }^\circ\text{C}$, у тами.

Припремити три посуде са 1 l ултрачисте воде, 1 l $1 \cdot \text{hubmix}$ (334 ml $3 \cdot \text{hubmix}$ и 666 ml ултрачисте воде) и 1 l $1/8 \cdot \text{hubmix}$ (42 ml $3 \cdot \text{hubmix}$ и 958 ml ултрачисте воде). Сваку посуду претходно инкубирати у воденом купатилу на $45\text{ }^\circ\text{C}$.

Скинути покровна стакалца, а предметне плочице ставити на држач.

Вишак пробе уклонити инкубирањем у трајању од 15 минута на $45\text{ }^\circ\text{C}$ у посуди с $1 \cdot \text{hubmix}$.

Пренијети држач плочица у раствор за прање ($1/8 \cdot \text{hubmix}$) и инкубирати још 15 минута.

Плочице накратко уронити у ултрачисту воду и ставити на филтерпапир. Вишак воде уклонити филтерпапиром. У сваки бунарчић пипетом нанијети $5\text{ }\mu\text{l}$ до $10\text{ }\mu\text{l}$ заштитног раствора против изблеђивања (нпр. *Vectashield*, *Vecta Laboratories*, СА, УСА или еквивалентна) па цијелу предметну плочицу покрити великим покровним стаклом ($24\text{ mm} \cdot 60\text{ mm}$).

1.7.3. Очитивање FISH теста

Плочице прегледати под епифлуоресцентним микроскопом, коришћењем уљање имерзије, с увећањем 630 или $1.000\times$. Са филтером прикладним за флуоресцеин-изотиоцијанат (FITC), еубактеријске ћелије (укључујући већину грам-негативних ћелија) се у узорку виде као флуоресцентно зелене. Употребом филтера за тетраметилпродамин-5-изотиоцијанат, ћелије *R. solanacearum*, обојене са Cu_3 , виде се као флуоресцентно црвене. Упоредити морфологију ћелија узорка с морфологијом ћелија позитивних контрола. Ћелије морају бити јасно флуоресцентне и у потпуности обојене. Ако дође до одступања у обојености, FISH тест (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.7. овог прилога) мора се поновити. Прегледати сваки бунарчић уздуж и попречно под нормалним углом и дуж спољне ивице. За узорке у којима је видљив мали број ћелија или их уопште нема прегледати најмање 40 микроскопских видних поља.

Уочити да ли су видљиве јасно флуоресцентне ћелије у бунарчићима морфологије карактеристичне за *R. solanacearum*.

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

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

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

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

Тумачење резултата FISH теста

Резултати FISH теста сматрају се важећим ако се у свим позитивним и ни у једној негативној контроли примјеном FISH филтера уочава присуство јасно зелених флуоресцентних ћелија чија је величина и морфологија типична за *R. solanacearum* и ако се примјеном филтера за родамин уочавају јасне црвене флуоресцентне ћелије. Ако се уоче јасне ћелије карактеристичне морфологије, одредити просјечни број типичних флуоресцентних ћелија по микроскопском видном пољу и израчунати број типичних ћелија по милилитру ресуспендованог талога. Потенцијално позитивним се сматрају узорци са најмање $5 \cdot 10^3$ типичних ћелија по ml ресуспендованог талога и потребна су им даља тестирања. Негативним се сматрају узорци с мање од $5 \cdot 10^3$ типичних ћелија по ml ресуспендованог талога.

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

1.8. ELISA тестови

Начело

Због релативно ниске осјетљивости, ELISA се може примјенити само као необавезни додатни тест поред IF, PCR или FISH тестова. Ако се примјењује DAS ELISA, обавезно је претходно обогативање екстракта и употреба моноклоналних антителијела.

Обогативање узорака прије примјене ELISA теста може бити корисно јер се на тај начин повећава осјетљивост теста, али може бити и неуспјешно због конкуренције осталих организама у узорку.

Напомена

Користити потврђени и одобрени извор антителијела за *R. solanacearum*.

Препоручљиво је да се титар одреди за сваку нову серију антителијела. Титар се дефинише као највеће разрјеђење код којег долази до оптималне реакције при тестирању суспензије која садржи 10^5 до 10^6 ћелија/ml хомологног соја бактерије *R. solanacearum* уз коришћење одговарајућих конјугата секундарних антителијела према препорукама произвођача. Током тестирања, треба користити антителијела у радним разрјеђењима која су близу или једнака титру формулације доступне на тржишту.

Одредити титар антителијела на суспензији од 10^5 до 10^6 ћелија по ml хомологног соја бактерије *R. solanacearum*.

За негативну контролу користити екстракт узорка који је у ранијем тестирању на *R. solanacearum* био негативан и суспензију бактерије, с којом не долази до унакрсне реакције, у фосфатном пуферу с додатком соли (PBS).

За позитивну контролу користити аликоте екстракта узорка који је у ранијем тестирању био негативан, помијешане са 10^3 до 10^4 ћелија/ml бактерије *R. solanacearum* биовар 2 (нпр. сој NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). За упоређивање резултата на свакој микротитарској плочи користити стандардну суспензију од 10^5 до 10^6 ћелија/ml бактерије *R. solanacearum* у PBS-у. Побрините се да позитивне контроле на микротитарској плочи буду добро одвојене од узорака који се тестирају.

У Поглављу XI табела 1. овог прилога наведени су стандардизовани позитивни и негативни контролни материјали који се могу употребљавати у овом тесту.

Контролни материјал тестирати на исти начин као и узорке.

Извршена је валидација два протокола за ELISA тест.

1.8.1. Индиректна ELISA (Robinson Smith и сар., 1995)

Употријебити аликоте од 100 μ l до 200 μ l екстракта узорка (у неким случајевима се загријавањем четири минута на 100 $^{\circ}$ C у

воденом купатилу или блоку за загријавање могу смањити неспецифични резултати).

Додати једнаку запремину пуфера за облагање двоструке јачине и промијешати на вортексу.

Нанијети аликоте од 100 μ l у најмање два бунарчића на микротитарске плоче (нпр. *Nunc-Polysort* или еквивалентна) и инкубирати један сат на 37 $^{\circ}$ C или преко ноћи на 4 $^{\circ}$ C.

Уклонити екстракт из бунарчића. Испрати бунарчиће три пута раствором PBS-*Tween*, а последњи раствор за испирање оставити у бунарчићима најмање пет минута.

Припремити одговарајуће разрјеђење антителијела за *R. solanacearum* у пуферу за блокирање. За потврђена и одобрена антителијела која су доступна на тржишту користити препоручена разрјеђења (обично двострука концентрација титра).

Додати 100 μ l у сваки бунарчић и инкубирати један сат на 37 $^{\circ}$ C.

Уклонити раствор антителијела из бунарчића и испрати бунарчиће, три пута раствором PBS-*Tween*, а последњи раствор за испирање оставити у бунарчићима најмање пет минута.

Припремити одговарајуће разрјеђење секундарних антителијела – конјугата алкалне фосфатазе у пуферу за блокирање. Додати 100 μ l у сваки бунарчић и инкубирати један сат на 37 $^{\circ}$ C.

Уклонити конјугат антителијела из бунарчића и опрати бунарчиће, као што је претходно описано.

У сваки бунарчић додати 100 μ l раствора супстрата алкалне фосфатазе, инкубирати у тами на собној температури и очитати апсорпцију при 405 nm у интервалу од 90 минута.

1.8.2. DASI ELISA

Припремити одговарајуће разрјеђење поликлоналних имуноглобулина за бактерију *R. solanacearum* у пуферу за облагање рН 9,6 (Поглавље XII овог прилога). Нанијети 200 μ l у сваки бунарчић. Инкубирати четири до пет сати на 37 $^{\circ}$ C или 16 сати на 4 $^{\circ}$ C.

Бунарчиће испрати три пута раствором PBS-*Tween*.

У најмање два бунарчића нанијети 190 μ l екстракта узорка.

На свакој плочи додати позитивну и негативну контролу, и то сваку у по два бунарчића.

Инкубирати 16 сати на 4 $^{\circ}$ C.

Бунарчиће испрати три пута раствором PBS-*Tween*.

Припремити одговарајуће разрјеђење моноклоналних антителијела специфичних за бактерију *R. solanacearum* у PBS-у, који садржи и 0,5% говеђег серумског албумина (BCA), и нанијети 190 μ l у сваки бунарчић. Инкубирати два сата на 37 $^{\circ}$ C.

Бунарчиће испрати три пута раствором PBS-*Tween*.

Припремити одговарајуће разрјеђење антимишијих имуноглобулина конјугираних са алкалном фосфатазом у PBS-у. Нанијети 190 μ l у сваки бунарчић. Инкубирати два сата на 37 $^{\circ}$ C.

Бунарчиће испрати три пута раствором PBS-*Tween*.

Припремити раствор супстрата алкалне фосфатазе која садржи 1 mg п-нитрофенил фосфата по ml пуфера супстрата. Нанијети 200 μ l у сваки бунарчић. Инкубирати у тами на собној температури и очитати апсорпцију при 405 nm у периоду од 90 минута.

Тумачење резултата ELISA тестова

ELISA тест је негативан ако је просјечна оптичка густина (OD) у бунарчићима с дупликатом узорка < 2x OD у бунарчићу с негативном контролом екстракта узорка, под условом да су све вриједности OD позитивних контрола изнад 1 (након 90 минута инкубације са супстратом) и да су веће од двоструке вриједности OD добијених за негативне екстракте узорка.

ELISA тест је позитиван ако је просјечна оптичка густина (OD) у бунарчићима с дупликатом узорка > 2x OD у бунарчићу с негативном контролом екстракта узорка, под условом да су вриједности OD за све бунарчиће с негативном контролом < 2x OD у бунарчићима с позитивном контролом.

Ако се у ELISA тесту очитају негативни резултати у бунарчићима са позитивном контролом, то указује да тест није правилно изведен или да је дошло до инхибиције. Ако се у ELISA тесту очитају позитивни резултати у бунарчићима с негативном контролом, то указује да је дошло до унакрсне контаминације или до неспецифичног везања антителијела.

1.9. Биолошки тест

Напомена

Прелиминарно тестирање овом методом треба да омогући поновљиво откривање присуства 10^3 до 10^4 CFU бактерије *R. solanacearum* по ml, додатих екстрактима узорака који су у ранијем тестирању били негативни (Поглавље XI овог прилога).

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

Сљедећи протокол се заснива на *Janse* (1988)

За сваки узорак користити 10 биљака осјетљиве сорте парадајза у фази трећег правога листа (нпр. *Moneumaker* или друге сорте за коју је утврђено у лабораторијским условима да је једнаке осјетљивости). Детаљи о гајењу биљака се налазе у Поглављу XVI овог прилога. За ову сврху може се употријебити и плави патлиџан (нпр. сорта *Black Beauty* или сорте једнаке осјетљивости), али само биљке у фази 2-3 листа до потпуног развоја трећег правога листа. Симптоми на плавом патлиџану су слабији и спорије се развијају, па се препоручује коришћење младих биљака парадајза.

Распоредити 100 µl екстракта узорка на биљке за тестирање.

Инокулација инјекцијом

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

Инокулација резивањем

Држећи биљку међу прстима, пипетом нанијети капљицу (око 5 µl до 10 µl) ресуспендованог талога на стабљику, и то између котиледона и првог листа. Стерилним скалпелом направити дијагонални рез, дуг око 1 cm и дубок око 2/3 дебљине стабљике, почевши од нанесене капљице ресуспендованог талога. Чврсто затворити рез стерилним вазелином из шприца.

Позитивна контрола: користећи исту методу инокулисати 5 биљака суспензијом од 10⁵ до 10⁶ ћелија по ml воде познате културе *R. solanacearum*, вирулентног соја биовара 2.

Негативна контрола: инокулисати 5 биљака, користећи стерилни пелет пуфер (пуфер за растварање талога). Биљке за позитивне и негативне контроле одвојити од осталих биљака.

Биљке гајити у карантинским просторијама до четири седмице на 25 °C до 30 °C, уз довољну количину свјетла и високу влажност и адекватно заливати да би се спречило накупљање воде или увенуће због недостатка воде. У циљу спречавања унакрсне контаминације, биљке позитивне и негативне контроле гајити на јасно одвојеним столовима у стакленику или полицама у комори за раст или, у случају да је простор ограничен, побринут се да су биљке јасно одвојене између појединих поступака у току извођења процедуре. Ако се биљке за различите узорке морају гајити близу једна другој, раздвојите их погодним платном. Пазити да не дође до унакрсне контаминације приликом прихрањивања, заливања, прегледања и сваког другог поступка с биљкама. Од кључне важности је да у стакленицима и коморама за гајење не буде никаквих инсеката јер они могу пренијети бактерију с узорка на узорак. Пратити појаву симптома увенућа, епинастије, хлорозе и/или заостајање у порасту.

Из заражених биљака изоловати (Поглавље IV тачка 1. подтачка 1.3. овог прилога) и идентификовати пречишћене културе *R. solanacearum* (Поглавље VIII тачка 2. овог прилога).

Ако се после три недеље не појаве симптоми, обавити IF/PCR/изолацију на узорку дијелова стабљика дужине 1 cm са сваке биљке за тестирање. Ако тест буде позитиван, примјенити метод засејавања разрјеђења на хранљиву подлогу.

Идентификовати све пречишћене културе *R. solanacearum*.

Тумачење резултата биолошког теста

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

Биолошки тест је негативан ако тестиране биљке нису заражене *R. solanacearum*, а под условом да је утврђено присуство *R. solanacearum* у позитивним контролама.

Биолошки тест је позитиван ако су тестиране биљке заражене *R. solanacearum*.

2. Идентификациони тестови

Идентификација чисте културе добијених изолата *R. solanacearum* врши се коришћењем најмање два од наведених тестова који се заснивају на различитим биолошким принципима. Према потреби, укључити познате референтне изолате за сваки тест (Поглавље XI овог прилога).

2.1. Одгајивачки и ензимски тестови за идентификацију

Фенотипска својства универзално присутна или одсутна код бактерије *R. solanacearum* утврдити према методама *Oelluom* и *Stead* (1987), *Klement* и сар. (1990), *Schaad* и сар. (2001).

Тестови	Очекивани резултати
Стварање флуоресцентног пигмента	-
Грануле поли-(3-хидроксибутирата	+
Оксидацијски/ферментацијски (O/F) тест	0+/F-
Активност каталазе	+
Тест оксидазе по Ковацу	+
Редукција нитрата	+
Коришћење цитрата	+
Раст на 40 °C	-
Раст у 1% NaCl	+
Раст у 2% NaCl	-
Активност аргинин-дихидролазе	-
Разлагање желатина	-
Хидролиза скроба	-
Хидролиза ескулина	-
Стварање левана	-

2.2. IF тест

Припремити суспензију од приближно 10⁶ ћелија по ml у IF пуферу.

Припремити двострука разрјеђења раствора погодног антисептика.

Примјенити IF поступак (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.5. овог прилога).

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

2.3. ELISA тест

Напомена

При примјени само два теста идентификације, не примјењивати други серолошки тест уз овај.

Припремите суспензију од око 10⁸ ћелија по ml у 1 · PBS.

Спровести одговарајући поступак ELISA са моноклоналним антицијелима специфичним за бактерију *R. solanacearum*.

ELISA тест је позитиван ако је ELISA вриједност читања културе једнака најмање половини вриједности позитивне контроле.

2.4. PCR тест

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

Загријати 100 µl суспензије ћелија бактерије у затвореним епруветама у термоблоку или у врелом воденом купатилу четири минута на 100 °C. До употребе узорци се могу чувати на -16 °C до -4 °C.

Употријебити одговарајуће PCR процедуре за умножавање специфичних фрагмената *R. solanacearum* [нпр. *Sea* и сар. (1993), *Pastrik & Maiss* (2000), *Pastrik* и сар. (2002), *Boudazin* и сар. (1999), *Opina* и сар. (1997), *Weller* и сар. (1999)].

Идентификација *R. solanacearum* је позитивна ако су PCR продукти исте величине и имају исти полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената као и позитивни контролни изолат.

2.5. FISH тест

Припремити суспензију од приближно 10⁶ ћелија по ml ултрачисте воде.

Примјенити FISH поступак (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.7. овог прилога) са најмање двије олиго-пробе специфичне за *R. solanacearum* (Поглавље XV овог прилога).

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

2.6. Профилирање масних киселина (FAP)

Културу гајити на триптиказа-соја-агару (*Oxoid*) 48 сати на 28 °C.

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

FAP тест је позитиван ако је профил тестиране културе идентичан профилу позитивне контроле. Присуство карактеристичних масних киселина: 14:0 3OX, 16:0 2OX, 16:1 2OX и 18:1 2OX, и одсуство 16:0 3OX у великој мјери указују на *Ralstonia* sp.

2.7. Методе карактеризације соја

Код сваког новог случаја изолације *R. solanacearum*, препоручује се обављање карактеризација соја, примјеном једне од сљедећих метода.

Према потреби, у сваки коришћени тест укључити познате референтне сојева.

2.7.1. Одређивање биовара

R. solanacearum се дијели на биоваре на основу способности коришћења и/или оксидације три дисахарида и три хексозна алкохола (Hayward, 1964. и Hayward и сар., 1990). Хранљиве подлоге за одређивање биовара описане су у Поглављу X овог прилога. Тест се може успјешно обавити инокулисањем подлоге чистим културама изолата *R. solanacearum* и инкубирањем на 28 °C. Ако се подлога распореди у 96 стерилних бунарчића на одговарајућој плочи (200 µl по бунарчићу), у року од 72 сата може се уочити промјена боје од маслинастозелене до жуте, што означава позитиван резултат теста.

	Биовар				
	1	2	3	4	5
Коришћење:					
Малтоза	-	+	+	-	+
Лактоза	-	+	+	-	+
Д (+) целобиоза	-	+	+	-	+
Манитол	-	-	+	+	+
Сорбитол	-	-	+	+	-
Дулицитол	-	-	+	+	-

Биовар 2 се дијели на подфенотипове помоћу додатних тестова.

	Биовар 2А (проширен у целом свету)	Биовар 2А (нађен у Чилеу и Колумбији)	Биовар 2Т (нађен у тропским подручјима)
Коришћење трехалозе	-	+	+
Коришћење мезо-инозитола	+	-	+
Коришћење Д-рибозе	-	-	+
Пектолитичка активност ⁽¹⁾	слаба	слаба	висока

¹ Видјети Lelliot и Stead (1987).

2.7.2. Геномски отисак прста

Молекуларна диференцијација сојева у комплексу *R. solanacearum* може се постићи примјеном неколико метода, укључујући следеће:

Анализа полиморфизма дужине рестрикционих фрагмената (RFLP), (Cook и сар., 1989).

PCR понављајућих низова, коришћењем прајмера REP, BOX и ERIC (Louws и сар., 1995, Smith и сар., 1995).

Анализа полиморфизма дужине умножених фрагмената (AFLP), (Van der Wolf и сар., 1998).

2.7.3. PCR методе

Специфични PCR прајмери (Pastrik и сар., 2002; видети Поглавље XIV овог прилога) могу се употребити за диференцијацију сојева који припадају групи 1 (биовари 3, 4 и 5) и групи 2 (биовари 1, 2А и 2Т) бактерије *R. solanacearum*, како је првобитно било утврђено методом RFLP (Cook и сар., 1989) и секвенционирањем 16S рДНК (Taghavi и сар., 1996).

3. Тест потврде

Тест провјере патогености се користи за коначно потврђивање присуства *R. solanacearum* и за процјену вирулентности култура идентификованих као *R. solanacearum*.

Припремити инокулум од приближно 10⁶ ћелија по ml из култура изолата који се тестира, старости 24 до 48 сати и одговарајућег изолата позитивне контроле *R. solanacearum* (нпр. НЦППБ 4156 = ПД 2762 = ЦФБП 3857; Поглавље XI овог прилога).

Инокулисати стабљике 5 до 10 младих сијанаца осјетљивих сорти парадајза или плавог патлиџана у фази 3 прва листа (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.9. овог прилога).

Инокулисане сејанце инкубирати до две недјеље на 25 °C до 28 °C уз високу релативну влажност и адекватно заливати да би се избјегло накупљање воде или стрес од суше.

Код инокулације чистим културама, типично увенуће се појављује у року од 14 дана. Ако послје овог периода симптоми нису присутни, добијена култура се не може потврдити као патогени изолат *R. solanacearum*.

Појаву симптома увенућа и/или епинастије, хлорозе и заостајања у порасту.

Изолацију из биљака са симптомима извршити одстрањивањем дијела стабљике дужине 2 cm изнад мјеста инокулације који се затим уситни и раствори у малој количини стерилне дестилване воде или 50 mm фосфатном пуферу (Поглавље XII овог прилога). Изолација патогена се потом врши размазом добијеног мацерата на одговарајућу селективну подлогу (Поглавље X овог прилога), која се инкубира 48 до 72 сата на 28 °C. Послје чега се прати раст колонија типичних за бактерију *R. solanacearum*.

Поглавље IX - Лабораторије укључене у оптимизацију и валидацију протокола

Лабораторија	Мјесто	Држава
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Беч и Линц	Аустрија
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Белгија
Plantedirektoratet	Lyngby	Данска
Central Science Laboratory	York	Енглеска
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Шкотска
Laboratoire national de la protection des vegetaux, unite de	Angers	Француска
Laboratoire national de la protection des vegetaux, Station de quarantaine de la pomme de terre	Le Rheu	Француска
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Њемачка
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Њемачка
State Laboratory	Dublin	Ирска
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	Италија
Regione Veneto Unit – Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Италија
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Холандија
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Холандија
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabon	Португал
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Шпанија
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Instituto	Шпанија
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Шведска

Поглавље X - Храњиве подлоге за изолацију и гајење бактерије *R. solanacearum*

1. Опште хранљиве подлоге

1.1. Хранљиви агар (NA)

Хранљиви агар (Difco) 23 g

Дестилвана вода 1 l

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

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

Екстракт квасца (Difco) 5 g

Vacto pepton (Difco) 5 g

Д(+) глукоза (монохидрат) 10 g

Agar Vacto (Difco) 15 g

Дестилвана вода 1 l

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

1.3. Агар са сахарозом и пептоном (СПА)

Сахароза 20 g

Vacto pepton (Difco) 5 g

K₂XPO₄ 0,5 g

MgCO₄ 7X₂O 0,25 g

Agar Vacto (Difco) 15 g

Дестилвана вода 1 l

pH 7,2-7,4

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

1.4. Келманова тетразолиум-подлога

Касамино киселине (Difco) 1 g

Vasto repton (Difco) 10 g

Декстроза 5 g

Agar Vasto (Difco) 15 g

Дестилована вода 1 l

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

Охладити на 50 °C и додати раствор 2,3,5-трифенил-тетразолиум-хлорида (Сигма), стерилисаног филтрирањем, како би се добила коначна концентрација од 50 mg/l.

2. Потврђене и одобрене селективне хранљиве подлоге

SMSA подлога (Englebrecht, 1994, измјене према Elphinstone и сар., 1996)

Основна подлога

Касамино киселине (Difco) 1 g

Vasto repton (Difco) 10 g

Глисерол 5 ml

Agar Vasto (Difco), (види напомену 2) 15 g

Дестилована вода 1 l

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

Охладите на 50 °C и додајте основни водени раствор сљедећих састојака, стерилисан филтрирањем, да бисте добили предвиђене коначне концентрације:

Кристал виолет (Сигма) 5 mg на l

Полимиксин-Б-сулфат (Сигма П-1004) 600 000 У (око 100 mg) на l

Бацитрацин (Сигма Б-0125) 1 250 У (око 25 mg) на l

Хлорамфеникол (Сигма Ц-3175) 5 mg на l

Пеницилин-Г (Сигма П-3032) 825 У (око 0,5 mg) на l

2,3,5-трифенил-тетразолиум-хлорид (Сигма) 50 mg на l

Напомена

Други реагенси у односу на горенаведене могу утицати на раст бактерије *R. solanacearum*.

Умјесто Агара Vasto (Difco) може се користити Agar Oxoid бр. 1. Раст *R. solanacearum* је у том случају спорији, али се може умањити и раст конкурентних сапрофита. За формирање типичних колонија бактерије *R. solanacearum* можда ће требати 1 до 2 дана више, а црвено обојење може бити свјетлије и дифузније, него на Агари Vasto. Повећањем концентрације бацитрацина на 2500 У/l умањује се пораст популације конкурентних бактерија, без утицаја на раст бактерије *R. solanacearum*.

Храњиву подлогу и основни раствор антибиотика чувати на 4 °C на тамном мјесту и употребити у року од мјесец дана.

Прије употребе, са подлога се уклања површинска кондензација.

Подлоге се не смију претјерано осушити.

Након припремања сваке нове серије хранљиве подлоге, треба обавити контролу квалитета подлоге засијавањем суспензије референтне културе *R. solanacearum* (Поглавље XI овог прилога) и праћењем стварања типичних колонија после два до пет дана инкубације на 28 °C.

3. Потврђене и одобрене хранљиве подлоге за обогаћивање

SMSA течна подлога (Elphinstone и сар., 1996)

Припремити као за селективну подлогу SMSA, али изоставити Агар Vasto и 2,3,5-трифенил-тетразол-хлорид.

Модификована Wilbrink течна подлога (Caruso и сар., 2002)

Сахароза 10 g

Протеоза пептон 5 g

K₂HPO₄ 0,5 gMgSO₄ 0,25 gNaNO₃ 0,25 g

Дестилована вода 1 l

Стерилизовати у аутоклаву на 121 °C 15 минута и охладити на 50 °C.

Додати основни раствор антибиотика као за SMSA течну подлогу.

Поглавље XI - Стандардизовани контролни материјали

1. Стандардизовани контролни материјали доступни на тржишту

Бактеријски изолати

Препоручује се коришћење сљедећих бактеријских изолата као стандардног референтног материјала било за позитивне контроле (Табела 1) или током оптимизације тестова у циљу избегавања унакрсних реакција (Табела 2). Сви су сојеви доступни на тржишту и могу се набавити код:

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

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

Collection francaise de bacteries phytopathogenes (CFBP), INRA – Station de

3) phytobacteriologie, Angers, Francuska.

Табела 1. SMT попис референтних изолата бактерије *R. solanacearum*

Ознака NCPPB	Број. SMT	Остале ознаке	Држава поријекла	Био-вар
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Египат	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Турска	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Енглеска	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*	71 *	PD 2762, CFBP 3857	Холандија	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15.59	Француска	2
NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS55	Португал	2
NCPPB 4160	69	IVIA -1632-2	Шпанија	2
NCPPB 4161	76	B3B	Њемачка	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	САД	1
NCPPB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Костарика	1
NCPPB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Колумбија	2
NCPPB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Перу	2Т
NCPPB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Бразил	2Т
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Перу	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Аустралија	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Шри Ланка	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	Филипини	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmpS2	Кина	5

* Употребљавати као стандардни референтни сој бактерије *R. solanacearum* био-вар 2 (раса 3).

Напомена

Аутентичност горенаведених сојева може се гарантовати само ако су набављени из аутентичне збирке култура.

Табела 2. SMT попис референтних серолошки или генетски сродних бактерија за употребу при оптимизацији тестова детекције

Ознака NCPPB	Број SMT	Остале ознаке	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 који у серолошким тестовима (IF и/или ELISA) може унакрсно реаговати са поликлоналним серумима.

² Сој од кога се у неким лабораторијама може умножити PCR продукт дужине сличне дужини која се очекује при употреби специфичних прајмера OLI-1 и Y-2 (Поглавље XIV овог прилога).

³ У већини тестова би могао дати унакрсну реакцију, али је познато да се јавља само на бананама у Индонезији.

Дољенаведени стандардни контролни материјал може се добити из збирке култура NCPPB.

Лиофилизоване грануле екстракта кромпира из 200 здравих кртола кромпира као негативна контрола за све тестове.

Лиофилизоване грануле екстракта кромпира из 200 здравих кртола кромпира са 10^3 до 10^4 и 10^4 до 10^6 ћелија *R. solanacearum* биовар 2 (сој NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) као позитивна контрола за серолошке и PCR тестове. С обзиром да лиофилизација утиче на виталност ћелија, оне нису прикладне као стандардна контрола за изолацију или биолошке тестове.

Формалином фиксиране суспензије бактерије *R. solanacearum* биовар 2 (сој NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) са 10^6 ћелија/ml као позитивна контрола за серолошке тестове.

2. Припрема позитивних и негативних контрола за основне тестове провјере (PCR/IF и FISH)

Направити суспензију културе вирулентног соја *R. solanacearum* раса 3 / биовар 2 (нпр. сој NCPPB 4156 = PD 2762

= CFBP 3857) гајене 48 сати на SMSA основној подлози у 10 mm фосфатном пуферу концентрације приближно $2 \cdot 10^8$ cfu/ml. То је обично слабо мутна суспензија оптичке густине 0,15 на 600 nm.

Извадити конус пупчаног дијела из 200 кртола бијеле сорте кромпира за које је познато да нису заражене бактеријом *R. solanacearum*.

Обрадити конусе уобичајеном методом и ресуспендовати талог у 10 ml.

Припремити 10 стерилних микроепрувета од 1,5 ml са 900 μ l ресуспендованог талога.

У прву микроепрувету додати 100 μ l суспензије *R. solanacearum* и измијешати на вортексу. У следећих пет микроепрувета припремити децимална разрјеђења бактеријске суспензије.

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

У микроепруветама од 1,5 ml припремити аликоте од 100 μ l тако да се добије девет копија сваког контролног узорка. До употребе чувати на -16 °C до -24 °C.

Присуство и количину присутне *R. solanacearum* у контролним узорцима прво потврдити IF тестом.

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

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

Поглавље XII - Пуфери за тест процедуре

Стерилисани пуфери који нису отворани могу се чувати до годину дана.

1. Пуфери за екстракцију 1.1. Екстракциони пуфер (50 mm фосфатни пуфер, pH 7)

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

Na₂HPO₄ (анхидровани) 4,26 g

KH₂PO₄ 2,72 g

Дестилована вода 1 l

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

Следећи састојци могу бити корисни:

	Напомена	Количина по литру
Pahuljice Lubrol	Дефлокулант (*)	0,5 g
DC силикон против пјењења	Средство против пјењења (*)	1 ml
Tetranatrijev pirofosfat	Антиоскиданс	1 g
Polivinilpirolidon -40000 (PVP-40)	Везање PCR инхибитора	50 g

* За употребу код методе екстракције хомогенизацијом.

1.2. Пелет пуфер (пуфер за растварање талога – 10 mm фосфатни пуфер, pH 7,2)

Овај пуфер се користи за ресуспендовање и разрјеђивање екстракта конуса извађених из пупчаних дијелова кртола кромпира, послје концентравања талога центрифугирањем.

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

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

2. Пуфери за IF тест

2.1. IF пуфер [10 mm фосфатни пуфер с додатком соли (PBS), pH 7,2]

Овај пуфер се користи за разрјеђивање антигјела.

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8 g
Дестилована вода	1 l

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

2.2. IF пуфер – Tween

Овај пуфер се користи за испирање IF плочица.

IF пуферу додати 0,1% Tween 20.

2.3. Фосфатни пуфер с глицеролом pH 7,6

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

Na₂HPO₄ · 12H₂O 3,2 g

NaH₂PO₄ · 2H₂O 0,15 g

Glycerol 50 ml

Дестилована вода 100 ml

Комерцијални раствори нпр. VectashieldR (Vector Laboratories) или CitifluorR (Leica). 3. Пуфери за индиректни ELISA тест.

3.1. Пуфер за облагање двоструке јачине, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
Дестилована вода	1 l

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

Као антиоксиданс може се додати натријум сулфит (0,2%).

3.2. 10X фосфатни пуфер са додатком соли (PBS), pH 7,4

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

3.3. PBS-Tween

10X PBS	100 ml
10% Tween 20	5 ml
Дестилована вода	895 ml

3.4. Пуфер за блокирање антитијела (мора бити свеже припремљен)

10X PBS	10 ml
Поливинилпиролон-44000 (PVP - 44)	2 g
10% Tween 20	0,5 ml
Млијеко у праху	0,5 g
Дестилована вода	Допуните до 100 ml

3.5. Раствор супстрата алкалне фосфатазе, pH 9,8

Диетаноламин 97 ml

Дестилована вода 800 ml

Помијешати и подесити pH на 9,8 концентрованој HCl. Допунити дестилованом водом до 1 литра.

Додајте 0,2 g MgCl₂

Растворите две таблете супстрата фосфатазе од 5 mg (Сигма) на 15 ml раствора.

4. Пуфери за DASI ELISA тест

4.1. Пуфер за облагање, pH 9,6

Na ₂ CO ₃ 1,59 g	Na ₂ CO ₃ 1,59 g
NaHCO ₃ 2,93 g	NaHCO ₃ 2,93 g
Дестилована вода	1000 ml

Растворити састојке и подесити pH на 9,6.

4.2. 10X фосфатни пуфер са додатком соли (PBS), pH 7,2 до 7,4

NaCl 80 g	NaCl 80 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O 4 g	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O 4 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O 27 g	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O 27 g
Дестилована вода	1.000 ml

4.3. PBS-Tween

10X PBS	50 ml
10% Tween	205 ml
Дестилована вода	950 ml

4.4. Пуфер супстрата, pH 9,8

Диетаноламин 100 ml

Дестилована вода 900 ml

Помијешати и подесити pH на 9,8 концентрованој HCl.

Поглавље XIII - Одређивање нивоа контаминације у IF и FISH тестовима

1. Избројати просечан број типичних флуоресцентних ћелија по видном пољу (ц)

$c = \pi 2/4 \Gamma 2 K^2$

гдје је

и = коефицијент поља (варира од 8 до 24 зависно од типа окулар)

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

Г = повећање објектива (100x, 40x, итд.).

2. Израчунати број типичних флуоресцентних ћелија по бунарчићу микроскопске

плочице (C)

$C = c \cdot C/c$

гдје је

C = површина бунарчића IF плочице са више бунарчића и

c = површина поља објектива.

3. Израчунати број типичних флуоресцентних ћелија по ml ресуспендованог талога

(N)

$N = C \cdot 1.000/y \cdot F$ гдје је

y = запремина ресуспендованог талога у сваком бунарчићу и

F = фактор разријеђења ресуспендованог талога.

Поглавље XIV - Потврђени и одобрени протоколи и реагенси за PCR

Напомена

Прелиминарна тестирања треба да омогуће поновљиву детекцију од најмање 10³ до 10⁴ ћелија *R. solanacearum* по ml екстракта узорка.

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

(Поглавље XI овог прилога)

1. Протокол за мултиплекс PCR са унутрашњом PCR контролом (Seal и сар., 1993)

1.1. Олигонуклеотидни прајмери

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

Низводни прајмер Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Очекивана дужина умноженог производа из ДНК бактерије *R. solanacearum* = 288 bp (пар прајмера PSA).

1.2. PCR реакциони микс

Реагенс	Количина по реакцији	Коначна концентрација
Стерилна ултрачиста вода	17,65 µl	
10 · PCR пуфер ¹ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1 · (1,5 mM MgCl ₂)
Смјеса d-NTP (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Прајмер OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Прајмер Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Taq полимераза (5 U/µl)	0,1 µl	0,5 U
Запремина узорка	2 µl	
Укупна запремина	25 µl	

¹ Валидација методе извршена је уз коришћење Taq полимеразе Perkin Elmer (AmpliQa ili

Gold) i Gibco BRL.

1.3. Услови PCR реакције

Извести следећи програм:

1 циклус: 2 минута на 96 °C (денатурација ланца ДНК)

35 циклуса: 20 секунди на 94 °C (денатурација ланца ДНК)

20 секунди на 68 °C (везивање прајмера)

30 секунди на 72 °C (хибридизација)

1 циклус: 10 минута на 72 °C (коначно продужавање) држати на 4 °C

Напомена

Оптимални услови коришћења овог програма су дефинисани за коришћење на PCR *Perkin Elmer 9600 thermal cycler*. Модификација трајања корака циклуса 35 је вјероватно потребна у случају употребе других модела *thermal cycler*.

1.4. Анализа продукта умножавања рестрикционим ензимом

PCR производи умножени из ДНК *R. solanacearum* испољавају карактеристичне полиморфизме у дужини рестрикционих фрагмената са ензимом Ава II после инкубације на 37 °C.

2. Протокол за PCR према Pastrik и Maiss (2000)

2.1. Олигонуклеотидни прајмери

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

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

Очекивана дужина умноженог производа из ланца ДНК бактерије *R. solanacearum* = 553 bp.

2.2. PCR реакциони микс

Реагенс	Количина по реакцији	Коначна концентрација
Стерилна ултрачиста вода	16,025 µl	
10 · PCR пуфер ¹ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1 · (1,5 mM MgCl ₂)
БСА (фракција В) (10%)	0,25 µl	0,1%
Смјеса д-НТП (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Прајмер Пс-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Прајмер Пс-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Тақ полимераз (5 U/µl) ¹	0,1 µl	0,5 U
Запремина узорка	5 µl	
Укупна запремина	25 µl	

¹ Валидација методе извршена је уз коришћење *polimeraze Perkin Elmer (AmpliTaқ ili Gold) и Gibco BRL*.

Напомена

Оптимални услови коришћења овог програма дефинисани су за коришћење на PCR *MJ Research PTC 200 thermal cycler* са *Gibco Taq* полимеразом. При истим концентрацијама може се користити и *Perkin Elmer AmpliTaқ* и пуфер.

2.3. Услови PCR реакције

Извести следећи програм:

1 циклус: 5 минута на 95 °C (денатурација ланца ДНК)

30 секунди на 95 °C (денатурација ланца ДНК)

35 циклуса: 30 секунди на 68 °C (везивање прајмера) 45 секунди на 72 °C (продужавање копије)

1 циклус: 5 минута на 72 °C (коначно продужавање) држати на 4 °C

Напомена

Оптимални услови коришћења овог програма дефинисани су за коришћење на PCR *MJ Research PTC 200 thermal cycler*. Модификација трајања корака циклуса 35 је можда потребна у случају употребе других модела *thermal cycler*.

2.4. Анализа продукта умножавања рестрикционим ензимом

PCR производи умножени из ДНК *R. solanacearum* испољавају карактеристичне полиморфизме у дужини рестрикционих фрагмената са ензимом *Taq I* после инкубације на 65 °C 30 минута. Рестрикциони фрагменти добијени из специфичног фрагмента *R. solanacearum* су величине 457 bp и 96 bp.

3. Протокол за мултиплекс PCR са унутрашњом PCR контролом (Pastrik и сар., 2000)

3.1. Олигонуклеотидни прајмери

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

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

Узводни прајмер NS-5-F 5'-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3'

Низводни прајмер NS-6-R 5'-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3'

Очекивана дужина умноженог производа из ДНК *R. solanacearum* = 718 bp (пар прајмера PC).

Очекивана дужина умноженог производа из 18С рРНК унутрашње контроле = 310 bp (пар прајмера HC).

3.2. PCR реакциони микс

Реагенс	Количина по реакцији	Коначна концентрација
Стерилна ултрачиста вода	12,625 µl	
10 · PCR пуфер ¹ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1 · (1,5 mM MgCl ₂)
БСА (фракција В) (10%)	0,25 µl	0,1%
Смјеса д-НТП (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Прајмер RS-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Прајмер RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Прајмер NS-5-F (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µM
Прајмер NS-6-R (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µM
Тақ полимераз (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Запремина узорка	5 µl	
Укупна запремина	25 µl	

¹ Метода је потврђена *Taq* полимеразом *Perkin Elmer (AmpliTaқ ili Gold) и Gibco BRL*.

² Концентрације прајмера NS-5-F и NS-6-R су оптимизоване за екстракцију конуса пупчаних дијелова кртола кромпира методом хомогенизације и пречишћавањем ДНК према Pastriku (2000). Ако се екстракција обавља тресењем или ако се примјењују друге методе издвајања ДНК, потребно је поново оптимизовати концентрације реагенса.

3.3. Услови PCR реакције

Извести следећи програм:

1 циклус: 5 минута на 95 °C (денатурација ланца ДНК)

30 секунди на 95 °C (денатурација ланца ДНК)

35 циклуса: 30 секунди на 58 °C (везивање прајмера) 45 секунди на 72 °C (хибридизација)

1 циклус: 5 минута на 72 °C (коначно продужавање) држати на 4 °C

Напомена

Оптимални услови коришћења овог програма дефинисани су за коришћење на PCR *MJ Research PTC 200 thermal cycler*. Модификација трајања корака циклуса 35 је можда потребна у случају употребе других модела *thermal cycler*.

3.4. Анализа продукта умножавања рестрикционим ензимом

PCR производи умножени из ДНК *R. solanacearum* испољавају карактеристичне полиморфизме у дужини рестрикционих фрагмената са ензимом *Bsm I* или *изосхизомером* (нпр. *Mva I* 269 bp) после инкубације на 65 °C у трајању од 30 минута.

4. Протокол за специфичан PCR биовара (Pastrik и сар. 2001)

4.1. Олигонуклеотидни прајмери

Узводни прајмер Rs-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Низводни прајмер Rs-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Низводни прајмер Rs-3-R 5'-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3'

Очекивана дужина умноженог производа из ДНК *R. solanacearum*:

са Rs-1-F/Rs-1-R = 718 bp

са Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp

4.2. PCR реакциони микс

Специфични PCR за биовар 1/2

Реагенс	Количина по реакцији	Коначна концентрација
Стерилна ултрачиста вода	12,925 µl	
10 · PCR пуфер ¹ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1 · (1,5 mM MgCl ₂)
БСА (фракција В) (10%)	0,25 µl	0,1%
Смјеса д-НТП (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Прајмер Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM

Prajmer Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq polimeraza (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Запремина узорка	5 µl	
Укупна запремина	25 µl	

¹ Методе су потврђене *Taq polimerazom Perkin Elmer (AmpliTaq ili Gold)* i *Gibco BRL*.

Специфични PCR за биовар 3/4/5

Реагенс	Количина по реакцији	Конечна концентрација
Стерилна ултрачиста вода	14,925 µl	
10 · PCR пуфер ¹ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1 · (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (фракција V) (10%)	0,25 µl	0,1%
Смјеса d-NTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Prajmer Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Prajmer Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq polimeraza (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1,0 U
Запремина узорка	5,0 µl	
Укупна запремина	25,0 µl	

⁽¹⁾ Методе су потврђене *Taq polimerazom Perkin Elmer (AmpliTaq ili Gold)* i *Gibco BRL*.

4.3. Услови PCR реакције

Извести сљедећи програм за специфичне реакције за биовар 1/2 и биовар 3/4/5:

1 циклус: 5 минута на 95 °C (денатурација ланца ДНК)

30 секунди на 95 °C (денатурација ланца ДНК)

35 циклуса: 30 секунди на 58 °C (везивање прајмера)

45 секунди на 72 °C (хибридизација)

1 циклус: 5 минута на 72 °C (коначно продужавање) држати на 4 °C

Напомена

Оптимални услови коришћења овог програма су дефинисани за коришћење на *PCR MJ Research PTC 200 thermal cyclers*. Модификација трајања корака циклуса 35 је можда потребна у случају употребе других модела *thermal cyclers*.

4.4. Анализа продукта умножавања рестрикционим ензимом

PCR производи умножени из ДНК *R. solanacearum* са прајмерима Rs-1-F i Rs-1-R испољавају карактеристичне полиморфизме у дужини рестрикционих фрагмената са ензимом Bsm I или изосхизомером (нпр. Mva 1269 I) после инкубације на 65 °C у трајању од 30 минута. PCR производи умножени из ДНК бактерије *R. solanacearum* са прајмерима Rs-1-F i Rs-3-R немају мјеста рестрикције.

5. Припрема боје за електрофорезу

5.1. Бромфенол плаво (10% концентровани раствор)

Бромфенол плаво 5 g

Дестилована вода (бидестилована) 50 ml

5.2. Пуфер за бојење

Глицерол (86%) 3,5 ml Бромфенол плаво

(5.1) 300 µl Дестилована вода

(бидестилована) 6,2 ml

5.3. 10x Tris acetatni i EDTA пуфер (ТАЕ), pH 8,0 Tris пуфер 48 g

Глацијална сирћетна киселина 11,42 ml

EDTA (динатријумова со) 3,72 g

Дестилована вода 1 l

Разриједите једном прије употребе.

Доступан је и на тржишту (нпр. инвитроген или замјена).

Поглавље XV - Потврђени и одобрени реагенси за Fish тест

1. Олиго пробе

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

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

2. Раствор за фиксирање

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

2.1. Загријати 9 ml воде за употребу у процедурама молекуларне биологије (нпр. ултрачисте воде) на око 60 °C и додати 0,4 g параформалдехида. Параформалдехид се раствара после додавања 5 капи 1N NaOH и мијешања на магнетској мјешалици.

2.2. Подесити pH на 7 додајући 1 ml 0,1 M фосфатног пуфера (PB; pH 7,0) и 5 капи 1N HCl. Вриједност pH провјерити и помоћу индикатор трака и ако је потребно подесити pH помоћу HCl или NaOH.

У растворима с параформалдехидом не употребљавати pH-метар.

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

3. 3X Hybmix

NaCl 2,7 M

Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)

EDTA (стерилизована филтрирањем и у аутоклаву) 15 mM

Разриједите до једанпут према потреби.

4. Раствор за хибридизацију

1X Hybmix

Натријум додецил сулфат (SDS) 0,01%

Formamid 30%

Проба EUB 338 5 ng/µl

Проба OLI-1 ili OLI-2 5 ng/µl

Припремити количине раствора за хибридизацију према прорачунима у Табели 1. За сваку плочицу (са 2 различита узорка у дупликуату) треба 90 µl раствора за хибридизацију. Важно: формамид је веома токсичан и зато носити рукавице и предузети потребне мјере опреза!

Табела 1. Предложене количине за припремање смјесе за хибридизацију

Број стакалаца	1	4	6	8	10
Стерилна ултрачиста вода	23,1	92,4	138,6	184,8	231
3 · Hybmix	30	120	180	240	300
1% SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9
Формаид	27	108	162	216	270
Проба EUB 338 5 ng/µl	4,5	18	27	36	45
Проба OLI-1 ili OLI-2 5 ng/µl	4,5	18	27	36	45
Укупна запремина (µl)	90	360	540	720	900

Напомена

Све растворе који садрже олиго-пробе осјетљиве на свјетлост чувати у мраку на -20 °C.

Током употребе заштитите их од директне сунчеве свјетлости или електричног свјетла.

5. 0,1 M фосфатни пуфер, pH 7,0

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Дестилована вода	1 l

Растворите састојке, проверите pH и стерилишите у аутоклаву на 121 °C 15 минута.

Поглавље XVI - Услови гајења плавог патлициана и парадајза

Посијати сјеме парадајза (*Lycopersicon esculentum*) и плавог патлициана (*Solanum melongena*) у пастеризовани компост за сјеме. Пресајати сијанце са потпуно развијеним котиледонима (од десет до 14 дана) у пастеризован компост у саксијама.

Прије инокулације, парадајз и плави патлициан би требало да се гаје у стакленику под сљедећим условима:

Дужина дана: 14 сати или природна дужина дана, ако је дужа од 14 сати

Температура:

дневна: од 21 °C до 24 °C

ноћна: од 14 °C до 18 °C

Осјетљива сорта парадајза: *Moneymaker*

Осјетљива сорта плавог патлициана: *Black Beauty*