

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 нивое 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 калибрирање опреме, пажљиво руковање и чување реагенаса, као и предузимање мјера за спречавање контаминације између узорак, нпр. раздвајање позитивних контрола од узорак за тестирање. Да би се избјегле административне или друге грешке, морају се примјењивати стандарди контроле квалитета, посебно при означавању узорак и вођењу документације.

Сумња на присуство патогена у узорку подразумева позитиван резултат теста провјере узорка 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 примијенити 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).

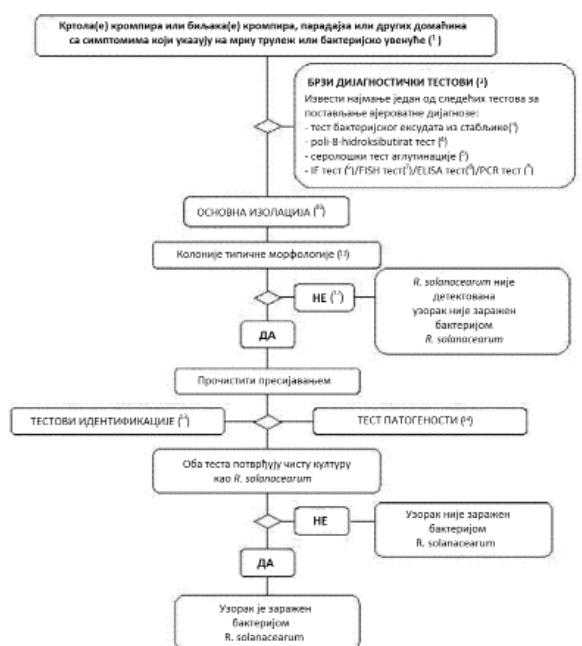
Потврђено присуство патогена подразумева изолацију и идентификацију чисте културе *R. solanacearum* и потврду патогености.

Поглавље III

1. Приказ дијаграма тока

1.1. Шема утврђивања присуства проузроковача смеђе трулежи кртола и бактеријског увенућа (*Ralstonia solanacearum*) у кртолама 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 екседату из спроводног ткива стабљике описан је у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.1. овог прилога.
- (4) Тест за откривање гранула poli-β-хидроксибутрата у бактеријским хелијама описан је у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.2. овог прилога.
- (5) Серолошки тестови аглутинације на бактеријском екседату или екстракту из ткива са симптомима описани су у Поглављу VIII тачка 1. подтачка 1.3. овог прилога.
- (6) IF тест на суспензији бактеријског екседата 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 екседата 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 екседата 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 екседата 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 разријеђања 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)

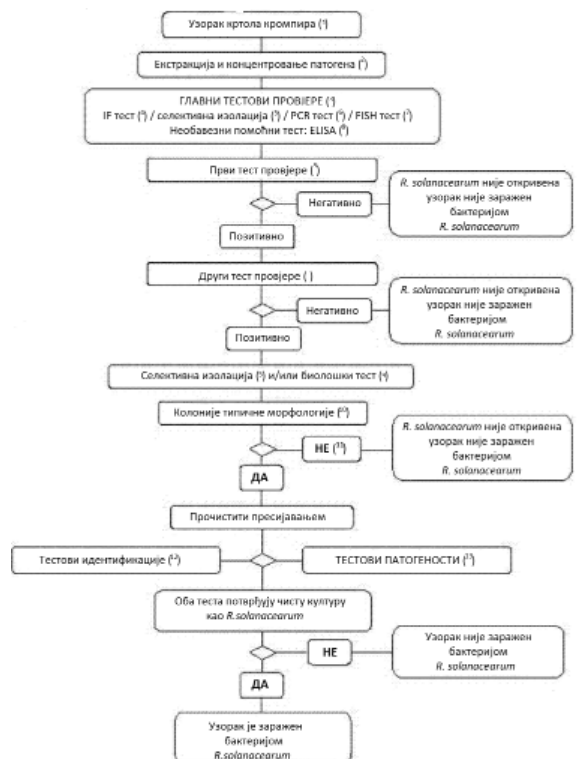
Начело

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

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

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

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



Шема 2.

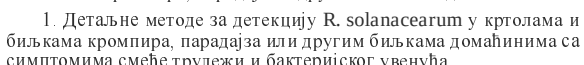
- (1) Стандардна величина узорка је 200 кртола, ако на располагању нема 200 кртола, поступак се може спровести и на мањим узорцима.
- (2) Методе екстракције и концентровања патогена описане су у Поглављу V тачка 1. овог прилога.
- (3) Ако су резултати најмање два теста који се заснивају на различитим биолошким начелима позитивни, потребно је извршити изолацију и потврдити присуство патогена. Извршити бар један тест провере. 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 провере 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.
- (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 конкуренције или инхибиције сапрофитних бактерија. Ако се у тестовима провере добију јасно позитивни резултати, а резултати изолације су негативни, поновити тестове изолације из истог ресуспендованог талога или поновити узимање

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

(12) Поуздана идентификација чистих култура *R. solanacearum* postiže se izvoђењем 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



1.1.1. Симптоми на кромпиру

Кртола кромпира. Кртоле кромпира треба прerezати попречно или уздужно у близини пупка кртола. Почетна фаза инфекције препознаје се по промени боје спроводног прстена од стакластожуте до свијетлосмеђе из којег се спонтано, након неколико минута, појављује бјелиди кремasti 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 пучаног дијела и из окада и на њу се лијепе 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.

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

Билке *Solanum dulcamara* и *S. nigrum*. Код ових биљака до-
маћина се у природним условима ријетко уочавају симптоми уве-
нућа, 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). Ако дође до увенућа,
симптоми су исти как и код парадајза. Биљке *Solanum dulcamara*
расту са стабљикама и коријењем у води и на њима није видљиво
увенуће, али је на попречном пресејку основе стабљике или дије-
ловима стабљике који су под водом видљива свијетлосмеђа обој-
еност спроводног ткива. Уколико пресејену стабљику усправно
ставимо у воду, из спроводног ткива на мјесту пресеја може цури-
ти бактеријски ексудат, чак и ако нема симптома увенућа.

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

1.2.2. Детекція гранула poli- β -hidroksibutirata (PHB):

Карактеристичне грануле РНВ-а у ћелијама *R. solanacearum* постају видљиве при бојењу термички фиксираним размазом бактеријског ексадата из зараженог ткива на микроскопској плочници нилским плавом бојом А и суданском црном бојом Б (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.2. овог прилога).

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

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

(3) Ako su rezultati najmaње dva testa koji se zasnivaju na različitim biološkim načelima pozitivni, potrebno je izvršiti izolaciju i potvrdu prisustva patogena. Izvršiti bar jedan test provjere. Kada je rezultat testa negativan, smatra se da je uzorak negativan. U slučaju da je rezultat tog testa pozitivan, potrebno je izvršiti drugi test ili više testova provjere, koji se zasnivaju na različitim biološkim načelima da bi se potvrdio pozitivan rezultat.

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

(6) PCR тестови opisani su u Poglavљу VIII tačka 1. podtačka 1.6. ovog priloga.

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

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

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

5.1. Поступак izolacije

У мањој количини стерилне дестиловане воде или 50 ml фосфатног пуфера направити суспензију бактеријског ексадата или дијелова ткива направљене 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 разријеђења суспензије. Пренијети 50 µl до 100 µl суспензије и разријеђења на општу храњиву 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 разријеђење размазати по подлози, примјењујући одговарајућу технику наношења разријеђења на подлогу. Уколико је потребно, наношењем разријеђења суспензије колонија на одвојеним подлогама припремити позитивну контролу *R. solanacearum* биовар 2.

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

На општој храњивој подлози вирулентни изолати бактерије *R. solanacearum* стварају пљоснате, неправилне и тачне 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 довешће 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 прстенасте 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 недеље прије извођења тестова, да би се изазвало умножавање популација бактерија *R. solanacearum*.

Опрати кртоле. Употријебити одговарајућа дезинфекциона средства (при коришћењу PCR теста у потријебити једињења хлора ради уклањања евентуално присутне ДНК патогена) и детергенте 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 поврће 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 околиног, 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 оваким 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 обрадити. Ако то није могуће, чувати их у посуду 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 прстенасте трулежи.

Извађене конусе из пупчаног дијела кртоле обрадити 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 мјешалници (нпр. Waring или Ultra Thux) било дробљењем у затвореној кеси за мацерацију за једнократну употребу (нпр. кесе Stomacher или Bioreba од чврстог политена 150 mm × 250 mm, стерилизоване зрачењем), користећи гумени чекић или одговарајући апарат за мацерирање (нпр. 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 ножице и посуде. Током процедуре PCR-а, спријечити пренос ДНК на контејнере или апаратуру за мацерирање. За PCR тест препоручује се мацерирање узорака у кесикама 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 додагнo испира екстракцијом 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, после чега се пажљиво, без мијешања са талогом одлива супернатант.

Ресуспендовати талог у 1,5 ml пелет пуфера (пуфера за растварање талогоа). 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 посљедњи, референтни дио од 500 µl додати стерилни глицерол у коначној концентрацији од 10% до 25% (v/v), промијешати и чувати на температури од -16 °C до -24 °C (недјељама) или на -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 погоднo примјенити на збирне узорке са највише 200 дијелова стабљике (узимање узорка током спровођења надзора мора се базираити 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.
Расада 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 биљке домаћини које расту у води, одсјеците дио величине од 1 cm до 2 cm са подводног дијела стабљике или столона 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 прољећа и током лjeta и јесени, иако се природне инфекције могу открити током цијеле године код вишегодишње биљке *Solanum dulcamara*, која расте у водотоковима. Познати домаћини су самоникле биљке кромпир (кртоле остале у земљишту), *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* и други врсте породице *Solanaceae*. Остале биљке 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 измачерирати 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 сложења, 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.

Подијелити 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 глицерила 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).

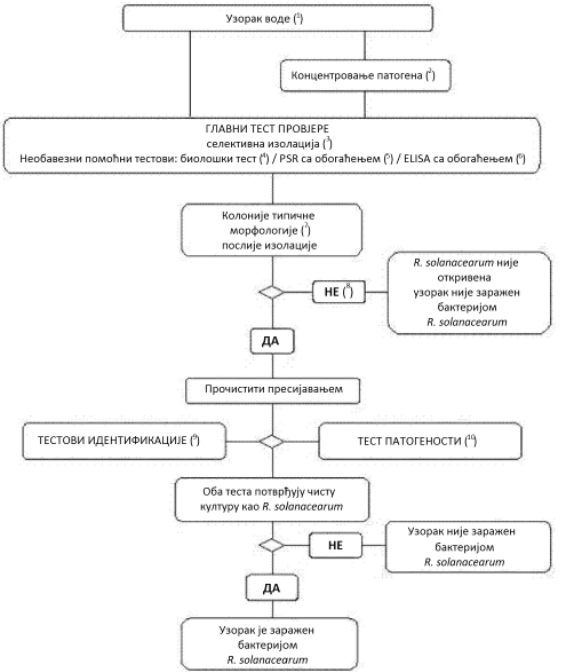
FISH тест (Поглавље VIII тачка 1. подтачка 1.7. овог прилога).

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 конкурентских сапрофитних бактерија, чија је бројност најчешће много већа у случају индустријских (отпадних) вода, него у случају површинских (текућих) вода. Иако се поштовањем и реализовањем поменуте 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 прољећа, лjeta 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 разрјеђења који могу умањити могућност детекције патогена;

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

На одабраним мјестима узорковати воду захаћивањем 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 концентрати коришћењем једне од следећих метода:

8. центрифугирати 30 ml до 50 ml подузорка 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;

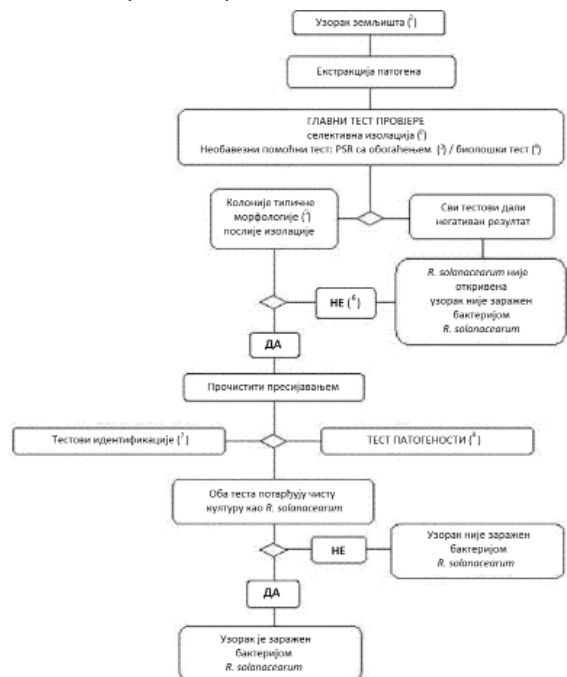
9. извршити мембранску филтрацију (минимална величина поре 0,45 µm), а потом и испирање филтера са 5 ml до 10 ml пуфера и сакупљање онога што се испере; овај метод је погодан за веће запремине воде које садрже мању концентрацију сапрофита.

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 разрјеђивања 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 сустрата.

Треба узети у обзир ограничења у осјетљивости овог поступка тестирања при оцјењивању 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 промјешати прије тестирања.

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

Суспензију 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 увелик 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. После неколико минута, из пресјечених спроводних судова пратити појаву карактеристичног бактеријског ексудата.

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

На микроскопској плочици припремити размазе бактеријског ексудата из зараженог ткива или из 48-часовне културе са хранљиве 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.

Поново 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 светлоранцаста 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* са ћелијским зидовима обојеним ружичасто.

1.3. Серолошки тест аглутинације

Аглутинација ћелија *R. solanacearum* у бактеријском ексудату или екстрактима ткива са симптомима, најбоље се уочава коришћењем потврђених и одобрених антитијела 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, примијенити следећи поступак:

- помијешати капљице суспензије обиљеженог антитијела и бактеријског екседата (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 после 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 додате екстрактима узорака који су у претходним тестирањима доказали 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 оцјенија компетиције 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. NCRPB 4156 = PD 2762 = CFBR 3857). Позитивне контроле припремити потпуно одвојено од узорака који се тестирају да би се избјегла могућност контаминирања узорака.

Прије у 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.

Примијенити одговарајућу технику наношења 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 после 48 сати, а после 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 после 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 делимично 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 после 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 употребити 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, услед 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 антитијела уместо поликлоналних антитијела.

За обогаћивање за PCR тест пренесите 100 μ l екстракта узорка у 10 ml течне подлоге за обогаћивање који је претходно подијељен у аликовте 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 промијешати 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 обогаћивањем 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 антигијела *R. solanacearum*.

Препоручује се одређивање титра за сваку нову серију антигијела. Титар се дефинише као највеће разрјеђење у коме долази до оптималне реакције при тестирању суспензије која садржи 10⁵ до 10⁶ ћелија по ml одговарајућег соја *R. solanacearum* уз коришћење флуоресценци-изотиоцијанат (FITC) коњулата у складу са препорукама произвођача. Сви потврђени и одобрени поликлонални антисеруми имали су IF титар најмање 1 : 2.000. Током тестирања користити радна разрјеђења антигијела, која су близу или једнака титру.

Тестирање треба извршити на свјеже припремљеним екстрактима узорака, а по потреби, тестирање се може успешно 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.

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

1.5.1. Припремљени IF плочице за тестирање једним од следећих поступака

1.5.1.1. За талоге с релативно малом количином наталоженог скроба

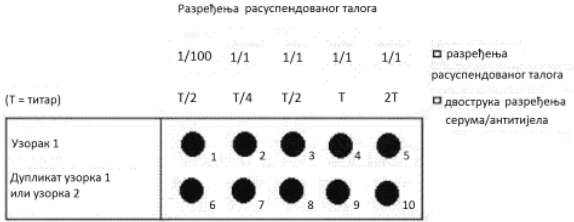
У први бунарчић пипетом одмјерити стандардну запремину разрјеђења од 1/100 ресуспендованог талога кромпира (15 µl је довољно за бунарчиће пречника 6 mm – повећати запремину за веће бунарчиће). Потом у остале бунарчиће у истом реду пипетом одмјерити сличну запремину неразрјеђене суспензије (1/1) талога. 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 µl 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 антигијела.

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 антигијела 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 антигијела у IF пуферу. Радно разрјеђење учите 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 антигијела. Запремина антигијела мора бити једнака запремини нанесеног екстракта.

Уколико не постоје посебна упутства произвођача антигијела, 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 коњулата нанесеног на бунарчић мора бити једнака запремини нанесеног антигијела.

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

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

На сваки бунарчић пипетом нанјетити од 5 µl до 10 µl 0,1M глицерола с фосфатним пуфером или комерцијално доступну средство против избљеђивања и ставити покровно стакло.

1.5.4. Очитавање IF теста

Прегледати припремљене плочице под епифлуоресцентним микроскопом с одговарајућим филтерима за ексцитацију FITC-а, под уљном или воденом имерзијом и увећањем од 500 до 1.000 пута. Прегледати сваки бунарчић уздуж и попрјекло, 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 антигијела 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 антигијела. Запаметити 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 хелије или ако су позитивне хелије пронађене (изван бунарчића) на површини плочице].

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

Приликом читавања у обзир се узимају само флуоресцентне хелије типичне величине и морфологије у титру или радном разређењу антицијела.

Тумачење читавања IF теста

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

Очитавање IF теста је позитивно за узорке који имају најмање $5 \cdot 10^3$ типичних хелија 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 $5 \cdot 10^3$ хелија 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

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

За постижање највећег степена осјетљивости и специфичности у свим лабораторијама потребно је извођење огледа за стандардизацију (оптимизацију) методе. Користити потврђене и одобрене реагенси 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 хелија по ml вирулентног изолата *R. solanacearum* у води (нпр. NCPPB 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 кромптира 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 екстракт узорка.

Метода која сlijеди 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[®] А (Invitrogen), добро измјешати на вортексу и инкубирати 30 минута на 65 $^{\circ}$ C.

Додати 100 μ l раствора EasyDNA[®] Б (Invitrogen) и снажно измјешати на вортексу до постижања униформног вискозитета узорка.

Додати 500 μ l хлороформа, измјешати 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 хелија 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 разређење екстракта ДНК из узорка 1 : 10 у ултрачистој води.

У неконтаминираном 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 протокулу 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 коришћен 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 (TAE), (Поглавље XIV овог прилога) нанијети најмање 12 μ l ампликона ДНК из сваког узорка, помјешане с 3 μ l боје и пропустити уз напон од 5 до 8 В по cm. Употријебити 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 УВ 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-

стрикционних ензима на узорку преостале умножене ДНК, и то инкубацијом при оптималној температури и у оптималном времену с одговарајућим ензимом и пуфером. Настале фрагменте развојити електрофорезом у агарозном гелу како је претходно наведено и послеје бојења етидиум бромидом на УВ трансилуминатору посматрати карактеристичну матрицу (образец) рестрикционих фрагмената и упоредити је с позитивном контролом прије и послеје 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 постављање 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 одobreне 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 додатих 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°C до -24°C или од -68°C до -86°C .

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

За позитивну контролу припремити суспензије које садрже 10^3 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 хомологом 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 обиљежене 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 cap., (1998):

Припремити раствор за фиксирање (Поглавље XV овог прилога).

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

Уклонити супернатант и раствори 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°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 употребити $10\text{ }\mu\text{l}$ за припремање разријеђена $1 : 100$ (у $0,01\text{ M}$ ПБ). Преостали фиксирани раствор узорка ($49\text{ }\mu\text{l}$) чувати на -20°C Послеје 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°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 хубмик (Поглавље XV овог прилога). Кутију претходно инкубирати у апарату за хибридизацију нуклеинских киселина на 45°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 Шеми 7) сваке плочице, а два средња бунарчића (3 и 8) оставити празне.

Прва и задња четири бунарчића покрити покровним стакалцем ($24\text{ mm} \times 24\text{ mm}$), 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°C , у тами.

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

Скинути покривна стакалца, а предметне плочице ставити на држач.

Вишак пробе уклонити инкубирањем у трајању од 15 минута на 45°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 влаге уклонити филтерпапиром. У сваки бунарчић пипетом нанијети $5\text{ }\mu\text{l}$ до $10\text{ }\mu\text{l}$ заштитног раствора против избуљивања (нпр. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA или еквивалентна) па цијелу предметну плочицу покрити великим покровним стаклом ($24\text{ mm} \times 60\text{ mm}$).

1.7.3. Очитавање FISH теста

Плочице прегледати под епифлуоресцентним микроскопом, коришћењем уљане имерзије, с увећањем 630 или 1.000 puta. Са филтером прикладним за флуоресцеин-изотиоцијанат (FITC), еубактеријске ћелије (укључујући већину грам-негативних ћелија) се у узорку виде као флуоресцентно зелене. Употребом филтера за тетраметилродамин-5-изотиоцијанат, ћелије *R. solanacearum*, обојене са CuS_2 , 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 попречику 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

Очитати 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 пулпних 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 филтра уочава присуство насоб 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 са 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 примјењити само као необавезни додатни тест поред IF, PCR или FISH тестова. Ако се примјењује DAS ELISA, обавезно је претходно обогаћивање екстракта и употреба моноклоналних антитијела.

Обогаћивање 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 антитијела за *R. solanacearum*.

Препоручљиво је да се титар одреди за сваку нову серију антитијела. Титар се дефинише као највеће разријеђење 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 антитијела према препорукама произвођача. Током тестирања, треба користити антитијела у радним разријеђењима која су близу или једнака титру формулације доступне на тржишту.

Одредити титар антитијела 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 = CFBR 3857). За упоређивање резултата на свакој микротитарској плочи користити стандардну суспензију од 10^3 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 тачка 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 µl до 200 µl екстракта узорка (у неким случајевима се загријавањем четири минута на 100 °C у

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

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

Нанијети аликоте од 100 µl у најмање два бунарчића на микротитарске плоче (нпр. Nunc-Polusort или еквивалентна) и инкубирати један сат на 37 °C или преко ноћи на 4 °C.

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

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

Додати 100 µl у сваки бунарчић и инкубирати један сат на 37 °C.

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

Припремити одговарајуће разријеђење секундарних антитијела – конјугата алканне фосфатазе у пуферу за блокирање. Додати 100 µl у сваки бунарчић и инкубирати један сат на 37 °C.

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

У сваки бунарчић додати 100 µl раствора супстрата алканне 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 разријеђење поликлоналних имуноглобулина за бактерију *R. solanacearum* у пуферу за облагање pH 9,6 (Поглавље XII овог прилога). Нанијети 200 µl у сваки бунарчић. Инкубирати четири до пет сати на 37 °C или 16 сати на 4 °C.

Бунарчиће испрати три пута раствором PBS-Tween.

У најмање два бунарчића нанијети 190 µl екстракта узорка.

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

Инкубирати 16 сати на 4 °C.

Бунарчиће испрати три пута раствором PBS-Tween.

Припремити одговарајуће разријеђење моноклоналних антитијела специфичних за бактерију *R. solanacearum* у PBS-у, који садржи и 0,5% говеђе серумског албумина (BCA), и нанијети 190 µl у сваки бунарчић. Инкубирати два сата на 37 °C.

Бунарчиће испрати три пута раствором PBS-Tween.

Припремити одговарајуће разријеђење антимишијих имуноглобулина конјугираних са алканалном фосфатазом у PBS-у. Нанијети 190 µl у сваки бунарчић. Инкубирати два сата на 37 °C.

Бунарчиће испрати три пута раствором PBS-Tween.

Припремити раствор супстрата алканне фосфатазе која садржи 1 mg p-нитрофенил фосфата по ml пуфера супстрата. Нанијети 200 µl 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 антитијела.

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).

Највећи објектљивост 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 екстракта 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 парадјазу у фази трећег правог листа (нпр. Мопеумакер 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 правог листа. Симптоми на плавом патлиџану су слабији и спорије се развијају, па се препоручује коришћење младих биљака парадјазу.

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 зарезивањем

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 везелином из шприца.

Позитивна контрола: користећи исту методу инокулисати 5 биљака суспензијом од 10⁵ до 10⁶ ћелија по ml воде познате културе *R. solanacearum*, вирусног 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 спријечило 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, побринути се да су биљке јасно одвојене између појединих поступака у току извођења процедуре. Ако се биљке за различите узорке морају гајити близу једна другог, раздвојите их поодним платном. Пазити да не дође до унакрсне контаминације приликом прихраћивања, 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, применим метод засејавања разријеђања 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 Lelluomm 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 разријеђања раствора погодног антисептика.

Примијенити 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.

Припремити 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 епруветкама у термоблоку или у врелом воденом купатилу четири минута на 100 °C. До употребе узорци се могу чувати на -16 °C до -4 °C.

Употријежити 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.

Примијенити 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.

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

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

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	-	-	+	+	-
Дулцитол	-	-	+	+	-

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-инози- тола	+	-	+
Коришћење Д-рибозе	-	-	+
Пектолитичка активност ⁽¹⁾	слаба	слаба	висока

¹ Видјет и 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 (Patrik 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 16С 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. НЦПБ 4156 = ПД 2762 = ЦФБП 3857; Поглавље XI овог прилога).

Инокулисати стабљике 5 до 10 младих сјајанаца 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 недеље 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.

Појава 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 дестиловане воде или 50 mm фосфатном пуферу (Поглавље XII овог прилога). Изолати 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. Послије 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
Département 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 Technologie 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 - Хранљиве подлоге за изолацију и гајење бактерије R. solanacearum

1. Опште хранљиве подлоге

1.1. Хранљиви агар (NA)

Хранљиви агар (Difco) 23 g

Дестилована вода 1 l

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

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

Екстракт квасца (Difco) 5 g

Bacto pepton (Difco) 5 g

Д(+) глукоза (монохидрат) 10 g

Agar Bacto (Difco) 15 g

Дестилована 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

Bacto pepton (Difco) 5 g

K₂XPO₄ 0,5 g

MgCO₄ 7X₂O 0,25 g

Agar Bacto (Difco) 15 g

Дестилована 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 pepton (Difco) 10 g

Декстроза 5 g

Agar Bacto (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

Цасамино киселине (Difco) 1 g

Vasto pepton (Difco) 10 g

Глицерол 5 ml

Agar Bacto (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 следећих 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 Agar Bacto (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 Agar Bacto. 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 Agar Bacto 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 g

MgSO₄ 0,25 g

NaNO₃ 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 следећих бактеријских изолата као стандардног референтног материјала било за позитивне контроле (Табела 1) или током оптимизације тестова у циљу изједначавања унакрсних реакција (Табела 2). Сви су сојеви доступни на тржишту и могу се набавити код:

1) National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), 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) phyto bacteriologie, Angers, Francuska.

Табела 1. SMT попис референтних изолата бактерије R. solanacearum

Ознака NCPBP	Број SMT	Остале ознаке	Држава поријекла	Биовар
NCPBP 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Египат	2
NCPBP 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Турска	2
NCPBP 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Енглеска	2
NCPBP 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Кипар	2
NCPBP 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Шведска	2
NCPBP 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Белгија	2
NCPBP 4156*	71 *	PD 2762, CFBP 3857	Холандија	2
NCPBP 4157	66	LNPV 15.59	Француска	2
NCPBP 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS55	Португал	2
NCPBP 4160	69	IVIA –1632-2	Шпанија	2
NCPBP 4161	76	B3B	Њемачка	2
NCPBP 325	41	CFBP 2047, KEL 60-1, R842	САД	1
NCPBP 3967	42	CFBP 4610, R285, GONg7	Костарика	1
NCPBP 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Колумбија	2
NCPBP 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Перу	2Т
NCPBP 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Бразил	2Т
NCPBP 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Перу	3
NCPBP 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Аустралија	3
NCPBP 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CMlb2861	Шри Ланка	4
NCPBP 4005	49	CFBP 4616, R470	Филипини	4
NCPBP 4011	50	CFBP 4617, R288, HEMP52	Кина	5

* Употребљавати као стандардни референтни сој бактерије R. solanacearum биовар 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	Bacillus polymyxa (1)
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	Pseudomonas marginalis pv. marginalis (1)
NCPPB 4164	–	CFBP 2227	Burkholderia cepacia (2)
NCPPB 4165	–	CFBP 2459	Ralstonia pickettii (2)
NCPPB 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	Ralstonia pickettii (1)
NCPPB 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	Ralstonia sp. (1)
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	Burkholderia andropogonis (1)
NCPPB 353	54	CFBP 3572	Burkholderia caryophylli (1)
NCPPB 945	55	CFBP 3569	Burkholderia cepacia (1)
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	Burkholderia glumae (1)
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	Burkholderia plantarii (1)
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	Banana Blood Disease Bacterium (1) (2) (3)
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	Enterobacter sp. (1)
NCPPB 4169	62	IPO 1695	Enterobacter sp. (1)
NCPPB 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	Ochrobactrum anthropi (1) (2)
NCPPB 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	Curtobacterium sp. (1) (2)
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	Pseudomonas sp. (1)
NCPPB 4173	–	PD 2318	Aureobacterium sp. (2)
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	Flavobacterium sp. (1) (2)

¹ Сој који у серолошким т ест овима (IF и/или ELISA) мож е унакрсно реаговат и са поликлоналним серумима.

² Сој од кога се у неким лаборат оријама мож е умножит и PCR продукт дуж ине сличне дуж ини која се очекује при упот реби специфичних прајмера OLI -1 и Y-2 (Поглавље XIV овог прилога).

³ У већини т ест ова би могао дат и унакрсну реакцију, али је познат о да се јавља само на банаана у Индонезији.

Дољенаведени стандардни контролни материјал може се доби-ти 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 10³ до 10⁴ и 10⁴ до 10⁶ хелија R. solanacearum биовар 2 (сој NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) као позитивна контрола за серолошке и PCR тестове. С обзиром да лиофилиза-ција утиче на виталност хелија, оне нису прикладне као стандард-на контрола за изолацију или биолошке тестове.

Формалином фиксиране суспензије бактерије R. solanacearum биовар 2 (сој NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) са 10⁶ хелија/ml као позитивна контрола за серолошке тестове.

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

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

= CFBP 3857) сајне 48 сати на SMSA основној подлози у 10 mm фосфатном пуферу концентрације приближно 2 · 10⁸ cfu/ml. То је обично слабо мутна суспензија оптичке густине 0,15 на 600 nm.

Издајити конус пупчаног дијела из 200 кртола бијеле сор-те кромпира за које је познато да нису заражене бактеријом R. solanacearum.

Обрадити конусе уобичајеном методом и ресуспендовати та-лог у 10 ml.

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

У прву микроепрувету додати 100 µl суспензије R. solanacearum и измијешати на вортексу. У сљедећих пет микроепрувета припре-мити децимална разрјеђења бактеријске суспензије.

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

У микроепруветама од 1,5 ml припремити аликвоте од 100 µl тако да се добије девет копија сваког контролног узорка. До упо-требе 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 нега-тивним контролним узорцима за сваку серију узорака за тестирање.

За IF и FISH тестове извршити тестирање позитивних и нега-тивних контролних узорака за сваку серију узорака за тестирање. Код IF, FISH и PCR тестова потребно је утврдити присуство R. solanacearum у концентрацији од најмање 10³ и 10⁴ хелија/ 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 го-дину дана.

1. Пуфери за екстракцију 1.1. Екстракциони пуфер (50 mm фо-сфатни пуфер, pH 7)

Овај пуфер се користи за екстракцију бактерије из биљног тки-ва 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.

Сљедећи 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 инхиби-тора	50 g

* За употребу код методе екстракције хомогенизацијом.

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

Овај пуфер се користи за ресуспендовање и разрјеђивање ек-стракта конуса извађених из пупчаних дијелова кртола кромпира, послје концентровања 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 121C 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 антитијела.

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.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3,2 g
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,15 g
Glicerol 50 ml
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_2CO_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_2PO_4	2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	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
Поливинилпириридон-44000 (PVP - 44)	2 g
10% Tween 20	0,5 ml
Млијело 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 концентрованом HCl. Допунити дестилованом водом до 1 литра.
Додајте 0,2 g MgCl_2
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_2CO_3 1,59 g	Na_2CO_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
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 g	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 27 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 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 концентрованом HCl.
Поглавље XIII - Одрђивање нивоа контаминације у IF и FISH тестовима
1. Избројати просечан број типичних флуоресцентних ћелија по видном пољу (ц)
 $c = \pi \cdot 2/4 \cdot 2K^2$
гдје је
и = коефицијент поља (варира од 8 до 24 зависно од типа окулара)
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
Ф = фактор разређења ресуспендованог талога.

- Поглавље XIV - Потврђени и одобрени протоколи и реагенси за PCR

- Напомена
ПРЕЛИМИНАРНА ТЕСТИРАЊА ТРЕБА ДА ОМОГУЋЕ ПОНОВЉИВУ ДЕТЕКЦИЈУ ОД НАЈМАЊЕ 10^3 ДО 10^4 ЋЕЛИЈА *R. solanacearum* ПО ml ЕКСТРАКТА УЗОРКА.

- Током ПРЕЛИМИНАРНИХ ТЕСТИРАЊА НЕ СМІЈЕ 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	Конечна концентрација
Стерилна ултрачиста вода	17,65 μ l	
10 · PCR пуфер ¹ (15 mM MgCl_2)	2,5 μ l	1 · (1,5 mM MgCl_2)
Смјеса d-NTP (20 mM)	0,25 μ l	0,2 mM
Прајмер OLI-1 (20 μ M)	1,25 μ l	1 μ M
Прајмер Y-2 (20 μ M)	1,25 μ l	1 μ M
Taq полимераза (5 U/ μ l) ¹	0,1 μ l	0,5 U
Запремина узорка	2 μ l	
Укупна запремина	25 μ l	

¹ Валидација мет оде извршена је уз коришћење Taq полимеразе Perkin Elmer (AmpliTaқ 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 послје инкубације на 37 °C.

2. Протокол за PCR према Pastrik i 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 acg tgc 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 mm)	0,5 µl	0,2 µM
Прајмер Пс-2 (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Тақ полимераза (5 U/µl)¹	0,1 µl	0,5 U
Запремина узорка	5 µl	
Укупна запремина	25 µl	

¹ Валидација мет оде извршена је уз коришћење polimeraze Perkin Elmer (AmpliTaқ ili Gold) i Gibco BRL.

Напомена

Оптимални услови коришћења овог програма дефинисани су за коришћење на PCR MJ Research PTC 200 thermal cycleru са Gibco Тақ 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 Тақ I послје 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 18C 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)
BSA (фракција В) (10%)	0,25 µl	0,1%
Смјеса d-NTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Прајмер RS-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µl
Прајмер RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µl
Прајмер NS-5-F (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µl
Прајмер NS-6-R (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µl
Тақ полимераза (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Запремина узорка	5 µl	
Укупна запремина	25 µl	

¹ Мет ода је потврђена Тақ полимеразом Perkin Elmer (AmpliTaқ ili Gold) i Gibco BRL.

² Концент рације прајмера NS-5-F и NS-6-R су опт имизоване за екст ракцију конуса пулчаних дијелова крт ола кромпира мет одом хомогенизације и прецишвањем ДНК према Pastriku (2000). Ако се екст ракција обавља т ресењем или ако се примјењују друге мет оде издвајања ДНК, пот ребно је поново опт имизоват и концент рације реагенаса.

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 1269 I) послје 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)
BSA (frakcija V) (10%)	0,25 µl	0,1%
Смјеша d-NTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Prājmer 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	Коначна концентрација
Стерилна ултрачиста вода	14,925 µl	
10 · PCR pufer 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⁾ Мет оде су пот врђене Taq polimerazom Perkin Elmer (AmpliTaq ili Gold) i Gibco BRL.Л.

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) др-жати на 4 °C

Напомена

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

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) послеи 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 pufer (TAE), pH 8,0 Tris pufer 48 g

Глацијална сирћегна 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 saa 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 послеи 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 подесите 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 дупликату) 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
Формамид	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 (јл)	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 патлићана и парадајаза

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

Прије инокулације, парадајз и плави патлићан 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 парадајаза: Moneymaker

Осјетљива сорта плавог патлићана: Black Beauty