DIREKTIVA KOMISIJE 2006/63/ES

z dne 14. julija 2006

o spremembi prilog II do VII k Direktivi Sveta 98/57/ES o obvladovanju bakterije *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE –

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 98/57/ES z dne 20. julija 1998 ([1]) o obvladovanju bakterije *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* in še zlasti člena 11 Direktive,

ob upoštevanju naslednjega:

(1) Eden od pomembnih organizmov, ki škodi krompirju in paradižniku, je *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, povzročitelj rjave gnilobe krompirja ter bakterijskega venenja krompirja in paradižnika (v nadaljevanju: „organizem“).

(2) Organizem se še vedno pojavlja v nekaterih predelih Skupnosti.

(3) Direktiva Sveta 98/57/ES določa podrobne ukrepe, ki jih morajo uveljaviti države članice proti organizmu, da bi ga odkrile in ugotovile njegovo razširjenost, preprečile njegovo pojavitev in razširjanje, in če ga najdejo, preprečile njegovo razširjanje in ga nadzirale z namenom izkoreninjenja.

(4) Od takrat je bil dosežen precejšen napredek pri razumevanju biologije, pri postopkih detekcije in identifikacije organizma; poleg tega praktične izkušnje, pridobljene z nadziranjem organizma, pozivajo k ponovnemu pregledu nekaterih tehničnih določb v zvezi z nadzornimi ukrepi.

(5) Kot rezultat tega napredka se zdi nujno pregledati in posodobiti ukrepe v nekaterih prilogah k Direktivi 98/57/ES.

(6) V zvezi s postopki odkrivanja in identifikacije je vključena sodobna metoda odkrivanja, fluorescentna in situ hibridizacija (FISH); vključene so tudi izboljšave metode verižne reakcije s polimerazo (PCR), izboljšave različnih tehničnih elementov trenutnega postopka detekcije in identifikacije ter metode za detekcijo in identifikacijo organizma v drugih gostiteljskih rastlinah razen krompirja, v vodi in zemlji.

(7) V zvezi s tehničnimi elementi kontrolnih ukrepov so izboljšane določbe za: način shranjevanja testiranih vzorcev, da bi zagotovili ugotavljanje prisotnosti organizma; elemente, potrebne za ugotavljanje obsega verjetne kontaminacije; podrobnosti o obveščanju glede potrjene prisotnosti organizma in glede relevantnega kontaminiranega območja; ukrepe, ki se izvajajo na mestih pridelave, ki so označena kot kontaminirana in ki ležijo znotraj razmejenih območij; poleg tega so vključene tudi nekatere določbe za paradižnik, da bi bolje upoštevali relevantnost te rastline kot gostiteljice organizma.

(8) Ukrepi, določeni v tej Direktivi, so v skladu z mnenjem Stalnega odbora za zdravstveno varstvo rastlin –

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Priloge II do VII k Direktivi 98/57/ES se nadomestijo z ustreznimi besedili iz prilog k tej direktivi.

Člen 2

1. Države članice sprejmejo in objavijo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 31. marca 2007. Komisiji takoj sporočijo besedilo navedenih določb in primerjalno tabelo med navedenimi določbami ter Direktivo.

Te predpise začnejo uporabljati s 1. aprilom 2007.

Države članice se v sprejetih predpisih sklicujejo na to direktivo ali pa sklic nanjo navedejo ob njihovi uradni objavi. Način sklicevanja določijo države članice.

([1]) UL L 235, 21.8.1998, str. 1.

2. Države članice Komisiji takoj predložijo besedila temeljnih predpisov nacionalne zakonodaje, sprejetih na področju, ki ga ureja ta direktiva.

Člen 3

Ta direktiva začne veljati tretji dan po objavi v *Uradnem listu Evropske unije*.

Člen 4

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 14. julija 2006

Za Komisijo
Markos KYPRIANOU
Član Komisije

PRILOGA

„PRILOGA II

PRESKUSNA SHEMA ZA DIAGNOSTICIRANJE, DETEKCIJO IN IDENTIFIKACIJO BAKTERIJE *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI *ET AL.*

PODROČJE UPORABE PRESKUSNE SHEME

Ta shema opisuje različne postopke, povezane z:

(i) diagnozo rjave gnilobe pri gomoljih krompirja ali bakterijskega venenja pri rastlinah krompirja, paradižnika in nekaterih drugih gostiteljskih rastlinah;

(ii) detekcijo bakterije *Ralstonia solanacearum* v vzorcih gomoljev krompirja, v sadikah krompirja, paradižnika in drugih gostiteljskih rastlin, vode in zeblje;

(iii) identifikacijo bakterije *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

VSEBINA

		Stran
	Splošna načela	40
ODDELEK I:	Uporaba testne sheme	40
	1. Shema detekcije za diagnozo rjave gnilobe in bakterijskega venenja (*R. solanacearum*) pri gomoljih krompirja ter na rastlinah krompirja, paradižnika in drugih gostiteljskih rastlinah s simptomi rjave gnilobe ali bakterijskega venenja	40
	2. Shema za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v vzorcih asimptomatskih gomoljev krompirja	43
	3. Shema za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v vzorcih asimptomatskih rastlin krompirja, paradižnika in drugih gostiteljskih rastlin	46
ODDELEK II:	Podrobne metode za detekcijo bakterije *R. solanacearum* v gomoljih krompirja ter na rastlinah krompirja, paradižnika in drugih gostiteljskih rastlinah s simptomi rjave gnilobe ali bakterijskega venenja	48
	1. Simptomi	48
	2. Hitri presejalni testi	48
	3. Postopek izolacije	49
	4. Identifikacijski testi za *R. solanacearum*	49
ODDELEK III:	1. Podrobne metode za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v vzorcih asimptomatskih gomoljev krompirja	49
	1.1 Priprava vzorcev	49
	1.2 Testiranje	51
	2. Podrobne metode za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v vzorcih asimptomatskih rastlin krompirja, paradižnika in drugih rastlin gostiteljic.	51
	2.1 Priprava vzorcev	51
	2.2 Testiranje	52
ODDELEK IV:	1. Shema za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v vodi	53
	2. Metode za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v vodi	55
	2.1 Priprava vzorcev	55
	2.2 Testiranje	55
ODDELEK V:	1. Shema za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v zemlji	56
	2. Metode za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v zemlji	58
	2.1 Priprava vzorcev	58
	2.2 Testiranje	58

Stran

ODDELEK VI: Optimizirani protokoli za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* 58

A. Diagnostični in detekcijski testi 58

1. Test eksudacije na steblu 58
2. Detekcija zrnc poli-β-hidroksibutirata 58
3. Seroaglutinacijski testi 59
4. Selektivna izolacija 60
   - 4.1 Razmaz na selektivno gojišče 60
   - 4.2 Obogatitveni postopek 60
5. Imunofluorescentni test (Test IF) 61
6. Verižna reakcija s polimerozo (Test PCR) 64
   - 6.1 Metode prečiščevanja DNK 65
     - (a) Pastrikova metoda (2000) 65
     - (b) Druge metode 65
   - 6.2 PCR 66
   - 6.3. Analiza produkta PCR 66
7. Fluorescentna in situ hibridizacija (Test FISH) 67
8. Encimskoimunski testi (Testi ELISA) 69
   - (a) Posredni ELISA 69
   - (b) DASI (indirektni dvojni sendvič) ELISA 70
9. Biološki test 71

B. Identifikacijski testi 72

1. Hranilni in encimski identifikacijski testi 72
2. IF test 72
3. Test ELISA 73
4. Test PCR 73
5. Test FISH 73
6. Profiliranje maščobnih kislin (FAP) 73
7. Metode opredelitve seva 73
   - 7.1 Določanje biovarja 73
   - 7.2 Iskanje prstnih odtisov genoma 74
   - 7.3 Metode PCR 74

C. Potrditveni test 74

Dodatek 1 Laboratoriji, ki optimirajo in potrjujejo protokole 76

Dodatek 2 Gojišča za izolacijo in gojenje bakterije *R. solanacearum* 77

Dodatek 3 (A) Komercialno dostopni standardizirani kontrolni material 79

(B) Priprava kontrole 80

Dodatek 4 Pufri za testne postopke 82

Dodatek 5 Ugotavljanje stopnje kontaminacije pri testih IF in FISH 85

Dodatek 6 Potrjeni PCR protokoli in reagenti 86

Dodatek 7 Potrjeni reagenti za test FISH 91

Dodatek 8 Pogoji kulture za paradižnik in jajčevec 93

Bibliografija 94

SPLOŠNA NAČELA

Optimizirani protokoli za različne metode, potrjeni reagenti in podrobnosti za pripravo testnih in kontrolnih materialov so opisani v Prilogah. Seznam laboratorijev, ki so sodelovali pri optimizaciji in potrjevanju protokolov, je v Dodatku 1.

Ker protokoli vključujejo detekcijo karantenskega organizma in bodo vključevali uporabo živih kultur *R. solanacearum* kot kontrolnih materialov, bo treba postopke izvajati v ustreznih karantenskih pogojih z zadostnimi sredstvi za odstranjevanje odpadkov in pod pogoji ustreznih licenc, ki jih izdajo uradne oblasti za karanteno rastlin.

Parametri testiranja morajo zagotavljati dosledno in ponovljivo detekcijo stopenj *R. solanacearum* na določenih pragovih za izbrane metode.

Obvezna je natančna priprava pozitivne kontrole.

Testiranje po zahtevanih pragovih pomeni tudi pravilne nastavitve, vzdrževanje in umerjanje opreme, pozorno ravnanje z reagenti in njihovo ohranjanje ter vse ukrepe za preprečevanje kontaminacije med vzorci, npr. ločitev pozitivnih kontrol od testnih vzorcev. Treba je uporabiti standarde zagotavljanja kakovosti, da ne bi prišlo do upravnih in drugih napak, še posebej pri označevanju in dokumentiranju.

Domnevni pojav, kot je navedeno v členu 4(2) Direktive 98/57/ES, implicira pozitivni rezultat v diagnostičnih ali presejalnih testih, opravljenih na vzorcu, kot je prikazano v diagramih poteka spodaj. Pozitivni prvi presejalni test (IF test, PCR/FISH, selektivna izolacija) mora biti potrjen z drugim presejalnim testom, ki temelji na drugačnem biološkem načelu.

Če je prvi presejalni test pozitiven, se domneva kontaminacija z *R. solanacearum* in je treba opraviti drugi presejalni test. Če je drugi presejalni test pozitiven, je domneva potrjena (domnevni pojav) in nadaljevati je treba s testiranjem po shemi. Če je drugi presejalni test negativen, se vzorec šteje za nekontaminiranega z *R. solanacearum*.

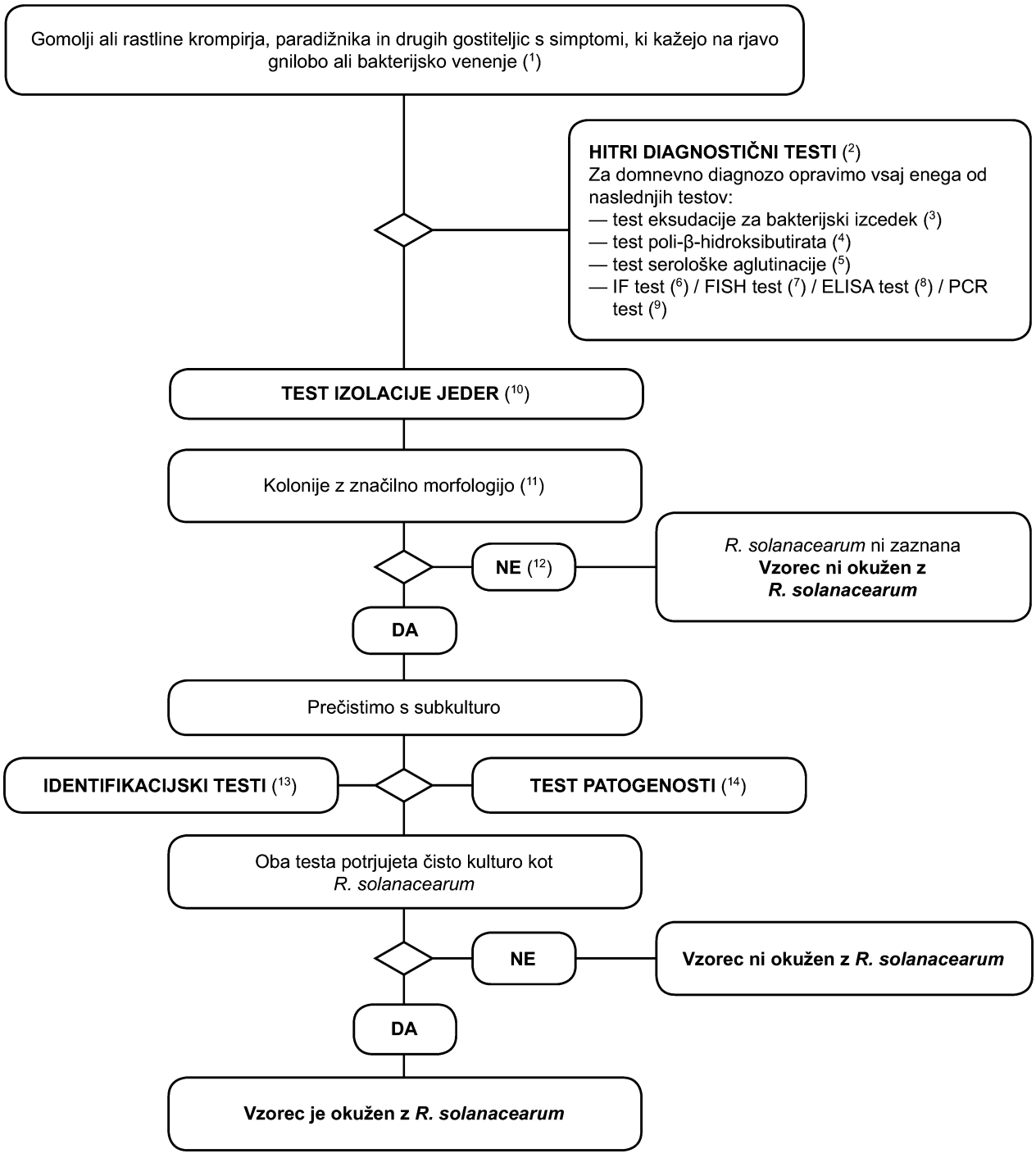
Potrjena navzočnost, kot je navedeno v členu 5(1) Direktive 98/57/ES, implicira izolacijo in identifikacijo čiste kulture *R. solanacearum* s potrditvijo patogenosti.

ODDELEK I

UPORABA TESTNE SHEME

1. **Shema detekcije za diagnozo rjave gnilobe in bakterijskega venenja (*R. solanacearum*) pri gomoljih krompirja ter na rastlinah krompirja, paradižnika in drugih gostiteljskih rastlinah s simptomi rjave gnilobe ali bakterijskega venenja.**

   Testni postopek je namenjen za krompirjeve gomolje in rastline s simptomi, ki so značilni za ali nakazujejo sum na rjavo gnilobo ali žilno venenje. Vključuje hitri presejalni test, izolacijo patogena iz okuženega žilnega tkiva na (selektivnem) gojišču, in v primeru pozitivnega rezultata, identifikacijo kulture kot bakterije *R. solanacearum*.


Gomolji ali rastline krompirja, paradižnika in drugih gostiteljic s simptomi, ki kažejo na rjavo gnilobo ali bakterijsko venenje (1)
HITRI DIAGNOSTIČNI TESTI (2)
Za domnevno diagnozo opravimo vsaj enega od naslednjih testov:
— test eksudacije za bakterijski izcedek (3)
— test poli-β-hidroksibutirata (4)
— test serološke aglutinacije (5)
— IF test (6) / FISH test (7) / ELISA test (8) / PCR test (9)
TEST IZOLACIJE JEDER (10)
Kolonije z značilno morfologijo (11)
NE (12)
R. solanacearum ni zaznana
Vzorec ni okužen z R. solanacearum
DA
Prečistimo s subkulturo
IDENTIFIKACIJSKI TESTI (13)
TEST PATOGENOSTI (14)
Oba testa potrjujeta čisto kulturo kot R. solanacearum
NE
Vzorec ni okužen z R. solanacearum
DA
Vzorec je okužen z R. solanacearum

([1]) Za opis simptomov glej oddelek II.1.

([2]) Hitri diagnostični testi pospešijo domnevno diagnozo, vendar niso bistveni. Negativni rezultat še ne pomeni, da patogen ni navzoč.

([3]) Test eksudacije za bakterijski izcedek iz žilnega stebelnega tkiva je opisan v oddelku VI.A.1.

([4]) Test za zrnca poli-β-hidroksibutirata v bakterijskih celicah je opisan v oddelku VI.A.2.

([5]) Testi serološke aglutinacije na bakterijskem izcedku ali izvlečki iz simptomatskega tkiva so opisani v oddelku VI.A.3.

([6]) IF test na bakterijskem izcedku, suspendiranem v vodi, ali na izvlečku simptomatskega tkiva je opisan v oddelku VI.A.5.

([7]) Test FISH na bakterijskem izcedku, suspendiranem v vodi, ali na izvlečku simptomatskega tkiva je opisan v oddelku VI.A.7.

([8]) Test ELISA na bakterijskem izcedku, suspendiranem v vodi, ali na izvlečku simptomatskega tkiva je opisan v oddelku VI.A.8.

([9]) Test PCR na bakterijskem izcedku, suspendiranem v vodi, ali na izvlečku simptomatskega tkiva je opisan v oddelku VI.A.6.

([10]) Patogen je običajno preprosto izolirati od simptomatskega rastlinskega materiala z redčitvenim razmazom (oddelek II.3.).

([11]) Značilna morfologija kolonije je opisana v oddelku II.3.d.

([12]) Gojenje na naprednih stopnjah infekcije lahko spodleti zaradi tekmovanja s saprofitskimi bakterijami, ki lahko prerastejo patogen. Če so simptomi bolezni značilni, vendar je izolacijski test negativen, je treba izolacijo ponoviti, po možnosti s testom selektivnega razmaza.

([13]) Zanesljiva identifikacija čiste kulture domnevnega izolata bakterije *R. solanacearum* se doseže s testi, opisanimi v oddelku VI.B. Dodatna možnost je podspecifična opredelitev, vendar je za vsak nov primer priporočljiva.

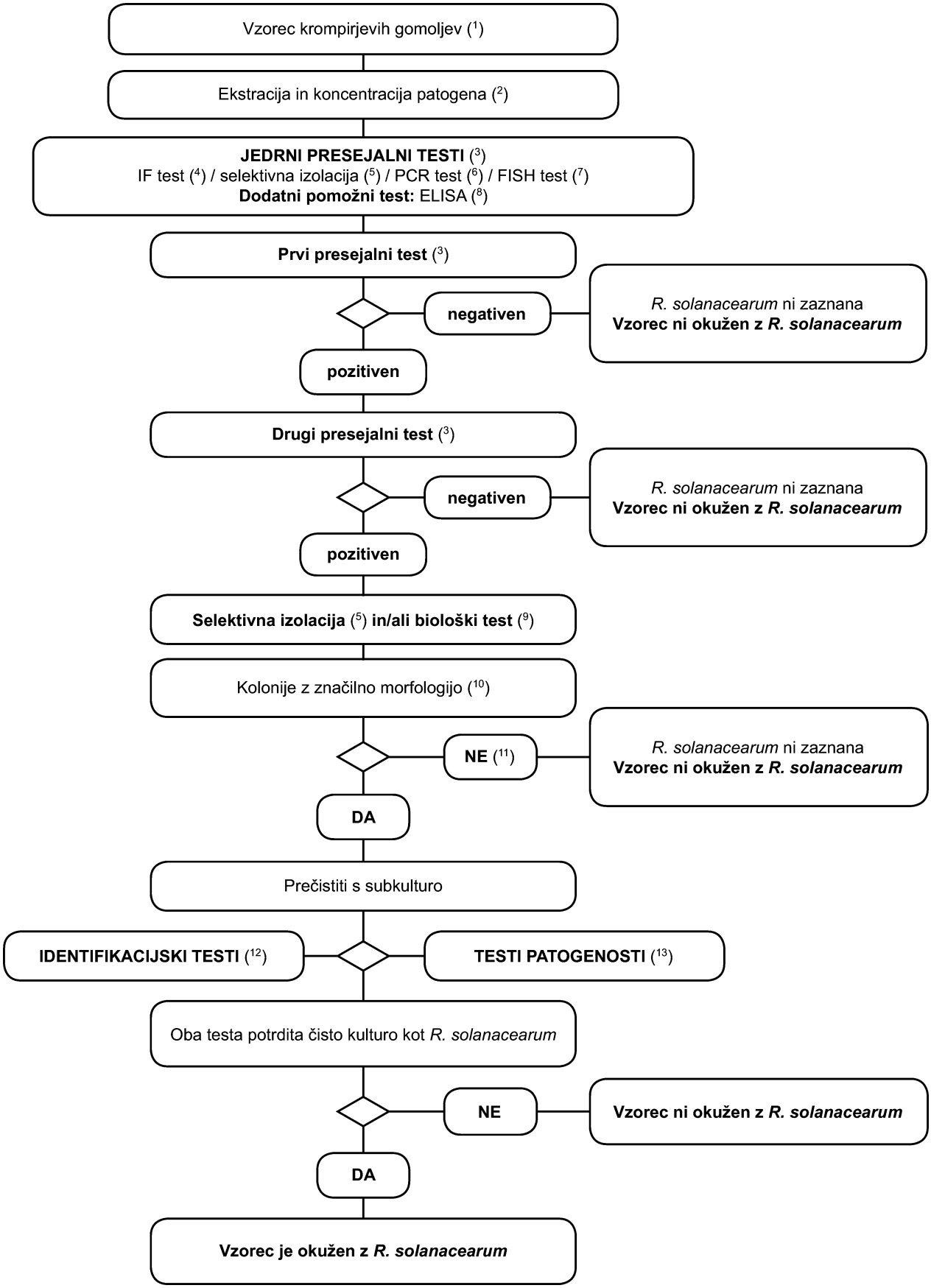
([14]) Test patogenosti je opisan v oddelku VI.C.

2. **Shema za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v vzorcih asimptomatskih gomoljev krompirja**

Načelo:

Postopek testiranja je namenjen detekciji latentnih okužb gomoljev krompirja. Pozitivni rezultat vsaj dveh presejalnih testov[3], ki sta osnovana na različnih bioloških načelih, mora biti dopolnjen z izolacijo patogena, ki mu v primeru izolacije značilnih kolonij sledi potrditev čiste kulture kot *R. solanacearum*. Pozitiven rezultat samo enega od presejalnih testov ne zadošča za sum okuženosti vzorca.

Presejalni testi in izolacijski testi morajo dovoljevati detekcijo 10^3 do 10^4 celic/ml resuspendirane pelete, vključene kot pozitivne kontrole v vsaki seriji testov.


Vzorec krompirjevih gomoljev (1)
Ekstracija in koncentracija patogena (2)
JEDRNI PRESEJALNI TESTI (3)
IF test (4) / selektivna izolacija (5) / PCR test (6) / FISH test (7)
Dodatni pomožni test: ELISA (8)
Prvi presejalni test (3)
negativen
R. solanacearum ni zaznana
Vzorec ni okužen z R. solanacearum
pozitiven
Drugi presejalni test (3)
negativen
R. solanacearum ni zaznana
Vzorec ni okužen z R. solanacearum
pozitiven
Selektivna izolacija (5) in/ali biološki test (9)
Kolonije z značilno morfologijo (10)
NE (11)
R. solanacearum ni zaznana
Vzorec ni okužen z R. solanacearum
DA
Prečistiti s subkulturo
IDENTIFIKACIJSKI TESTI (12)
TESTI PATOGENOSTI (13)
Oba testa potrdita čisto kulturo kot R. solanacearum
NE
Vzorec ni okužen z R. solanacearum
DA
Vzorec je okužen z R. solanacearum

([1]) Velikost standardnega vzorca je 200 gomoljev, čeprav postopek lahko uporabimo z manjšimi vzorci, če 200 gomoljev ni na voljo.

([2]) Metode ekstrakcije in koncentracije patogena so opisane v oddelku III.1.1.

([3]) Če sta pozitivna vsaj dva testa, ki temeljita na različnih bioloških načelih, je treba opraviti izolacijo in potrditev. Opravite vsaj en presejalni test. Če je ta test negativen, velja, da je vzorec negativen. Če je ta test pozitiven, je treba opraviti drugi presejalni test oziroma več testov, ki temeljijo na drugačnih bioloških načelih, da se preveri prvi pozitivni rezultat. Če so drugi test oziroma ostali testi negativni, velja, da je vzorec negativen. Nadaljnji testi niso potrebni.

([4]) IF test je opisan v oddelku VI.A.5.

([5]) Test selektivne izolacije je opisan v oddelku VI.A.4.

([6]) Testi PCR so opisani v oddelku VI.A.6.

([7]) Test FISH je opisan v oddelku VI.A.7.

([8]) Testi ELISA so opisani v oddelku VI.A.8.

([9]) Biološki test je opisan v oddelku VI.A.9.

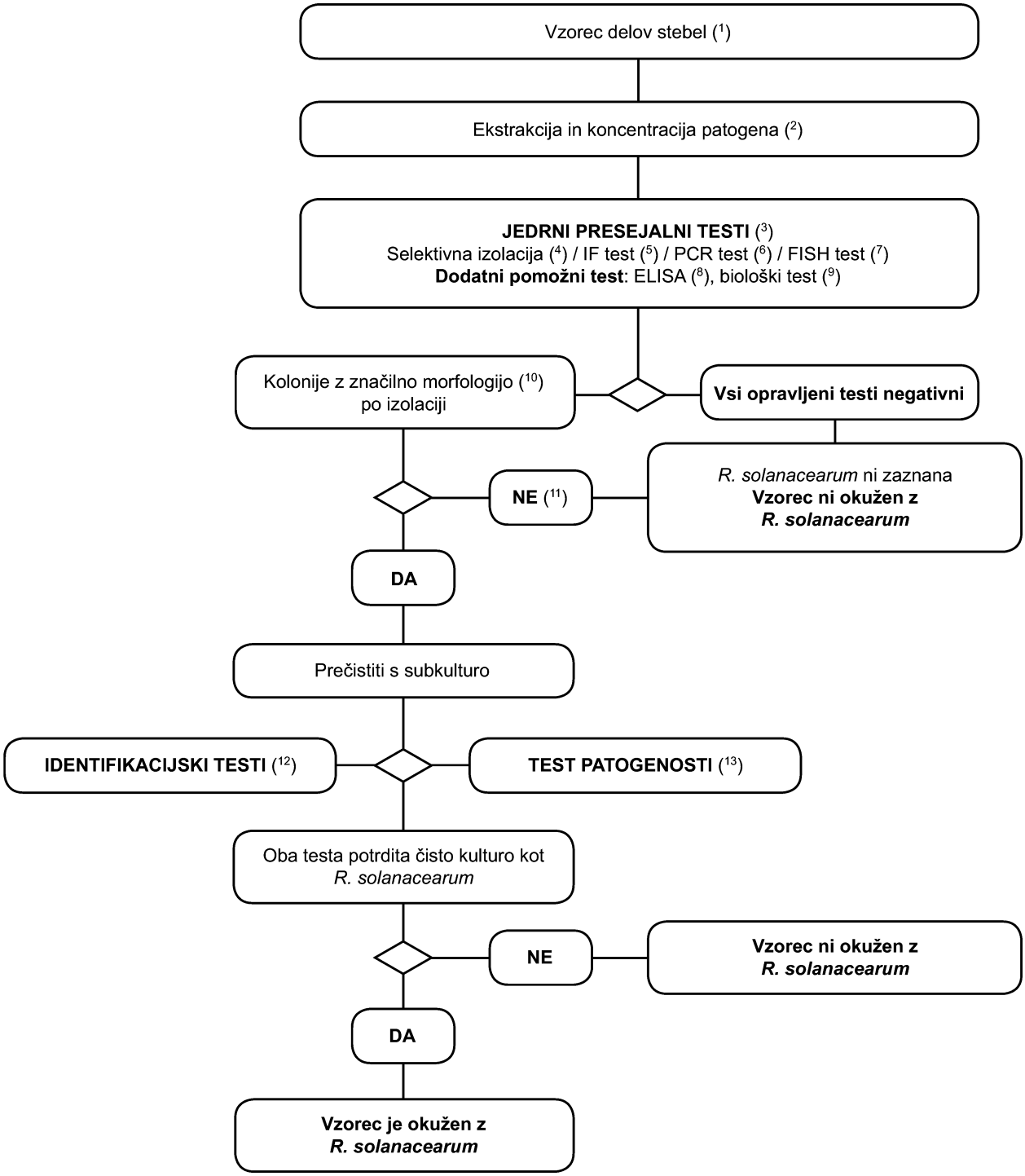
([10]) Značilna morfologija kolonije je opisana v oddelku II.3.d.

([11]) Gojenje ali biološki test lahko spodleti zaradi tekmovanja ali inhibicijskega delovanja saprofitskih bakterij. Če presejalni testi vrnejo jasne pozitivne rezultate, vendar so izolacijski testi negativni, ponovite izolacijske teste iz iste pelete ali tako, da vzamete dodatno žilno tkivo blizu stolona odrezanega gomolja istega vzorca, in po potrebi testirajte dodatne vzorce.

([12]) Zanesljivo identifikacijo čistih kultur domnevnega izolata bakterije *R. solanacearum* dosežemo s testi, opisanimi v oddelku VI.B.

([13]) Test patogenosti je opisan v oddelku VI.C.

3. **Shema za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v vzorcih asimptomatskih rastlin krompirja, paradižnika in drugih gostiteljskih rastlin**



([1]) Glej oddelek III.2.1 za priporočene velikosti vzorcev.

([2]) Metode ekstrakcije in koncentracije patogena so opisane v oddelku III.2.1.

([3]) Če sta pozitivna vsaj dva testa, ki temeljita na različnih bioloških načelih, je treba opraviti izolacijo in potrditev. Opravite vsaj en presejalni test. Če je ta test negativen, velja, da je vzorec negativen. Če je ta test pozitiven, je treba opraviti drugi presejalni test oziroma več testov, ki temeljijo na drugačnih bioloških načelih, da se preveri prvi pozitivni rezultat. Če so drugi test oziroma ostali testi negativni, velja, da je vzorec negativen. Nadaljnji testi niso potrebni.

([4]) Test selektivne izolacije je opisan v oddelku VI.A.4.

([5]) IF test je opisan v oddelku VI.A.5.

([6]) Testi PCR so opisani v oddelku VI.A.6.

([7]) Test FISH je opisan v oddelku VI.A.7.

([8]) Testi ELISA so opisani v oddelku VI.A.8.

([9]) Biološki test je opisan v oddelku VI.A.9.

([10]) Značilna morfologija kolonije je opisana v oddelku II.3.d.

([11]) Gojenje ali biološki test lahko spodleti zaradi tekmovanja ali inhibicijskega delovanja saprofitskih bakterij. Če pri presejalnih testih dobite pozitivne rezultate, vendar so izolacijski testi negativni, ponovite izolacijske teste.

([12]) Zanesljivo identifikacijo čistih kultur domnevne *R. solanacearum* dosežemo s testi, opisanimi v oddelku VI.B.

([13]) Test patogenosti je opisan v oddelku VI.C.

ODDELEK II

PODROBNE METODE ZA DETEKCIJO BAKTERIJE *R. SOLANACEARUM* V GOMOLJIH KROMPIRJA TER NA RASTLINAH KROMPIRJA, PARADIŽNIKA IN DRUGIH GOSTITELJSKIH RASTLINAH S SIMPTOMI RJAVE GNILOBE ALI BAKTERIJSKEGA VENENJA

1. **Simptomi** (glej spletno mesto http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)

1.1 Simptomi na krompirju

Rastlina krompirja. Zgodnja stopnja okužbe se kaže kot venenje listov proti vrhu rastline pri visokih dnevnih temperaturah, ponoči pa si rastlina opomore. V zgodnjih stopnjah venenja listi ostanejo zeleni, kasneje pa začnejo rumeneti in razvije se rjava nekroza. Pojavi se tudi epinastija. Venenje enega poganjka ali cele rastline hitro postane nepovratno in se konča s sesedanjem in z odmrtjem rastline. Žilno tkivo prečno prerezanih stebel uvelih rastlin je običajno rjavo, na površini prereza pa je mogoče opaziti ali z lahkoto iztisniti mlečni bakterijski izcedek. Če prerezano steblo postavimo navpično v vodo, iz žilnih snopov pritečejo sluzaste niti.

Gomolj krompirja. Gomolje krompirja je treba prečno prerezati blizu območja stolona ali po dolžini čez stolon. Zgodnja stopnja okužbe se kaže kot steklasto rumeno do svetlo rjavo razbarvanje žilnega obroča, iz katerega se po nekaj minutah spontano pocedi bled, kremast bakterijski izcedek. Pozneje postane razbarvanost žilnega tkiva bolj izrazito rjava, nekroza pa lahko zajame parenhimatično tkivo. V napredovalih stopnjah okužba izbruhne navzven od stolona in očes, iz katerih lahko mezi bakterijski izcedek, na katerega se začnejo lepiti grudice zemlje. Lahko se pojavijo rdečkasto-rjave, nekoliko udrte razpoke na povrhnjici zaradi notranjega odmrtja žilnih tkiv. V napredovalih stopnjah bolezni je značilen sekundarni razvoj glivičnih in bakterijskih mehkih gnilob.

1.2 Simptomi na paradižniku

Rastlina paradižnika. Prvi vidni simptom je uvel videz najmlajših listov. V ugodnih okoljskih pogojih za patogen (temperatura tal okrog 25 °C, nasičenost z vlago) sledita v nekaj dneh epinastija in venenje ene strani ali cele rastline, kar pripelje do njenega popolnega odmrtja. V manj ugodnih pogojih (temperatura tal pod 21 °C) je venenja manj, vendar lahko iz stebla požene večje število adventivnih korenin. Mogoče je opaziti z vodo zasičene proge vzdolž stebla, ki so dokaz nekroze žilnega sistema. Če steblo prečno prerežemo, iz razbarvanega rjavega žilnega tkiva stebla pritečejo kaplje belega ali rumenkastega bakterijskega izcedka.

1.3 Simptomi na drugih gostiteljih

Rastline Solanum dulcumara in S. nigrum. V naravnih pogojih na teh plevelnih gostiteljih simptome venenja redko opazimo, razen če temperatura tal presega 25 °C ali če je raven inokuluma izredno visoka (npr. če *S. nigrum* raste zraven bolnih rastlin krompirja ali paradižnika). Ko pride do venenja, so simptomi enaki kot pri paradižniku. Rastline *S. dulcamara*, ki ne venejo in ki rastejo s steblom in koreninami v vodi, lahko v notranjosti razvijejo rahlo rjavo obarvanost žilnih tkiv na prečnem delu dna stebla ali na potopljenem delu stebla. Iz prerezanih žilnih tkiv lahko priteče bakterijski izcedek, oziroma če postavimo prerezano steblo navpično v vodo, nastanejo sluzaste niti, tudi če ni simptomov venenja.

2. **Hitri presejalni testi**

Hitri presejalni testi pospešijo domnevno diagnozo, vendar niso bistveni. Uporabite enega ali več od spodnjih potrjenih testov:

2.1 Test eksudacije na steblu

(glej oddelek VI.A.1)

2.2 Detekcija zrnc poli-β-hidroksibutirata (PHB)

Značilna zrnca PHB v celicah *R. solanacearum* postanejo vidna po obarvanju toplotno fiksiranih madežev bakterijskega izcedka iz okuženega tkiva na stekelcu mikroskopa z nilsko modrim A ali sudan črnim (glej oddelek VI.A.2).

2.3 Seroaglutinacijski testi

(glej oddelek VI.A.3)

2.4 Drugi testi

Drugi ustrezni hitri presejalni testi so IF-test (oddelek VI.A.5), test FISH (oddelek VI.A.7), testi ELISA (oddelek VI.A.8) in testi PCR (oddelek VI.A.6).

3. **Postopek izolacije**

(a) Odvzamemo izcedek ali dele razbarvanega tkiva z žilnega obroča v gomolju krompirja ali z žilnih trakov v steblu rastlin krompirja, paradižnika ali drugih venečih gostiteljskih rastlin. Suspendiramo v majhni količini sterilne destilirane vode ali 50 mM fosfatnega pufra (Dodatek 4) in pustimo 5–10 minut.

(b) Pripravimo niz desetkratnih razredčin suspenzije.

(c) 50-100 µl suspenzije in razredčin prenesemo na splošno hranilno gojišče (NA, YPGA ali SPA, Dodatek 2) in/ali tetrazolno gojišče po Kelmanu (npr. SMSA, glej Dodatek 2). Razmažemo ali načrtamo z ustrezno tehniko razmaza razredčine. Če se zdi uporabno, pripravimo posamezne plošče z razredčeno celično suspenzijo bakterije *R. solanacearum* biovar 2/biotip 3 za pozitivno kontrolo.

(d) Plošče 2–6 dni inkubiramo pri 28 °C.

— Na splošnem hranilnem gojišču virulentni izolati bakterije *R. solanacearum* tvorijo biserno kremno bele, ploske, nepravilne in tekoče kolonije, ki imajo v sredini pogosto značilne spirale. Nevirulentne oblike bakterije *R. solanacearum* tvorijo majhne, okrogle, netekoče, maslaste kolonije, ki so povsem smetanaste barve.

— Na tetrazolnem gojišču po Kelmanu in SMSA gojiščih so spirale krvavo rdeče. Nevirulentne oblike bakterije *R. solanacearum* tvorijo majhne, okrogle, netekoče, maslaste kolonije, ki so povsem temno rdeče.

4. **Identifikacijski testi za *R. solanacearum***

Testi za potrjevanje identitete domnevnih izolatov bakterije *R. solanacearum* so prikazani v oddelku VI.B.

ODDELEK III

1. **Podrobne metode za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v vzorcih asimptomatskih krompirjevih gomoljev**

1.1 Priprava vzorcev

Opomba:

— Standardna velikost vzorca je 200 gomoljev na test. Intenzivnejše vzorčenje zahteva več testov na vzorcih te velikosti. Večje število gomoljev v vzorcu bo privedlo do inhibicije in otežilo razlago rezultatov. Postopek pa lahko prikladno uporabite za vzorce z manj kot 200 gomolji, če je na voljo manj gomoljev.

— Potrjevanje vseh metod detekcije, ki so opisane spodaj, temelji na testiranju vzorcev z 200 gomolji.

— Krompirjev izvleček, ki je opisan spodaj, lahko uporabite tudi za detekcijo bakterije krompirjeve obročkaste gnilobe, *Clavibacter michiganensis* podv. *sepedonicus*.

Dovoljena je tudi vnaprejšnja obdelava še pred pripravo vzorca.

(a) Vzorec inkubiramo pri 25–30 °C do dva tedna pred testiranjem, da spodbudimo množenje majhnih populacij bakterije *R. solanacearum*.

(b) Gomolje operemo. Med vsakim vzorcem uporabimo ustrezna razkužila (klorove spojine, kadar izvajamo test PCR, da odstranimo patogeno DNK) in detergente. Gomolje posušimo na zraku. Postopek pranja je še posebej koristen (vendar ni obvezen) za vzorce z odvečno zemljo in če bomo izvajali test PCR ali neposredno izolacijo.

1.1.1 S čistim in sterilnim skalpelom ali nožem za zelenjavo odstranimo povrhnjico gomolja na območju stolona, tako da najprej postanejo vidna žilna tkiva. Previdno izrežemo majhno stožčasto jedro žilnega tkiva na območju stolona. Nežilnega tkiva naj bo čim manj. (glej spletno mesto http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Opomba: Če so v vzorcu (gnijoči) sumljivi gomolji s simptomi rjave gnilobe, jih umaknemo in jih testiramo posebej.

Če med odstranjevanjem jedra stolona opazimo simptome rjave gnilobe, je treba ta gomolj vizualno pregledati in ga odrezati blizu stolona. Vse odrezane gomolje s sumljivimi simptomi je treba vsaj 2 dni hraniti na sobni temperaturi, da omogočimo suberizacijo, in jih hraniti na hladnem (na 4-10 °C) v primernih karantenskih pogojih. Vse gomolje, vključno tiste s sumljivimi simptomi, je treba hraniti v skladu s Prilogo III.

1.1.2 Jedra stolona zberemo v neuporabljene posode, ki jih je mogoče zapreti in/ali hermetično zapreti (če so posode večkrat uporabljene, jih je najprej treba temeljito očistiti in razkužiti s klorovimi spojinami). Zaželeno je, da se stoloni obdelajo takoj. Če to ni možno, jih shranimo v posodo brez dodatka pufra, v hladilniku za največ 72 ur oziroma pri sobni temperaturi ne dlje kot 24 ur.

Jedra stolonov obdelamo po enem od naslednjih postopkov, in sicer bodisi tako, da:

(a) dodamo zadostno količino (pribl. 40 ml) ekstrakcijskega pufra (Dodatek 4) in stresamo na rotacijskem stresalniku (50-100 vrt/min) 4 ure pod temperaturo 24 °C ali 16–24 ur pri temperaturi hladilnika;

bodisi

(b) homogeniziramo jedra z zadostno količino (pribl. 40 ml) ekstrakcijskega pufra (Dodatek 4), ali v mešalniku (npr. Waring ali Ultra Thurax), ali pa jih zdrobimo v dobro zaprti maceracijski vrečki za enkratno uporabo (npr. Stomacher ali Bioreba iz močnega politena, 150 mm × 250 mm, sterilizirano z obsevanjem) z gumijastim kladivom oziroma ustreznim drobilnim aparatom (npr. Homex).

Opomba: Če vzorce homogeniziramo z mešalnikom, obstaja veliko tveganje navzkrižne kontaminacije. Z ustreznimi ukrepi se izogibamo nastajanju aerosolov in politju med postopkom ekstrakcije. Poskrbimo, da bodo za vsak vzorec uporabljena sveže sterilizirana rezila mešalnika in posode. Če uporabljamo test PCR, se izogibamo prenosu DNK na posode oziroma drobilni aparat. Če uporabljamo PCR, je priporočljivo vzorce zmečkati v vrečkah za enkratno uporabo in uporabljati cevke za enkratno uporabo.

1.1.3 Odtočimo supernatant. Če je preveč moten, ga razčistimo s počasnim centrifugiranjem (pri največ 180 g 10 minut pri temperaturi 4-10 °C) ali z vakumsko filtracijo (40-100 μm), in operemo filter z dodatnim (10 ml) ekstrakcijskim pufrom.

1.1.4 Koncentriramo bakterijsko frakcijo s centrifugiranjem pri 7 000 g 15 minut (ali pri 10 000 g 10 minut) pri temperaturi 4-10 °C in zavržemo supernatant, ne da bi premešali peleto.

1.1.5 Peleto resuspendiramo v 1,5 ml peletnega pufra (Dodatek 4). Uporabimo 500 μl za testiranje bakterije *R. solanacearum*, 500 μl za *Clavibacter michiganensis* podv. *sepedonicus* in 500 μl za referenco. Dodamo končni koncentrat 10–25 % (v/v) sterilnega glicerola 500 μl referenčnega alikvota in preostanku testnega alikvota, močno premešamo. Shranimo pri – 16 do – 24 °C (tedni) ali pri – 68 do – 86 °C (meseci). Med testiranjem testne alikvote shranimo na 4-10 °C.

Večkratno zamrzovanje in taljenje ni priporočljivo.

Če je potreben transport ekstrakta, poskrbimo za dostavo v hladilni skrinji v 24 do 48 urah.

1.1.6 Obvezno je treba vse pozitivne kontrole in vzorce *R. solanacearum* obravnavati ločeno, da ne bi prišlo do kontaminacije. To velja za IF stekelca in za vse teste.

1.2 Testiranje

Glej Diagram poteka in opis testov ter optimizirane protokole v ustreznih dodatkih.

Selektivna izolacija (glej oddelek VI.A.4)

IF test (glej oddelek VI.A.5)

Test PCR (glej oddelek VI.A.6)

Test FISH (glej oddelek VI.A.7)

Test ELISA (glej oddelek VI.A.8)

Biološki test (glej oddelek VI.A.9)

2. **Podrobne metode za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v vzorcih asimptomatskih rastlin krompirja, paradižnika in drugih gostiteljskih rastlin**

2.1 Priprava vzorcev

Opomba: Za detekcijo latentnih populacij bakterije *R. solanacearum* priporočamo testiranje kompozitnih vzorcev. Postopek lahko prikladno uporabimo za kompozitne vzorce do 200 delov stebel. Če opravljamo preiskave, morajo temeljiti na statistično reprezentativnem vzorcu populacije rastline, ki jo preučujemo.

2.1.1 Zberemo 1-2 centimetrske dele stebel v zaprti sterilni posodi, skladno s spodnjimi postopki vzorčenja:

Nasad sadik paradižnika: S čistim, razkuženim nožem odstranimo kos dolžine 1 cm z dna vsakega stebla, tik nad zemljo.

Rastline paradižnika na njivi ali v rastlinjaku: S čistim, razkuženim nožem odstranimo poganjek na najnižjem delu z vsake rastline, tako da ga odrežemo tik nad stikom z glavnim steblom. Z vsakega poganjka ob strani odstranimo najnižji kos dolžine 1 cm.

Druge gostiteljice: S čistim, razkuženim nožem ali škarjami za obrezovanje odstranimo kos dolžine 1 cm z dna vsakega stebla, tik nad zemljo. V primeru *S. dulcamara* in drugih gostiteljskih rastlin, ki rastejo v vodi, odstranimo 1–2 cm dolge dele s stebla pod vodo ali s stolonov s koreninami v vodi.

Ko nabiramo vzorce na določeni lokaciji, je priporočljivo testirati statistično reprezentativen vzorec vsaj 10 rastlin na mesto vzorčenja za vsako potencialno plevelno gostiteljico. Detekcija patogenov je najzanesljivejša pozno spomladi, poleti in jeseni, čeprav je pri zimzeleni rastlini *Solanum dulcamara*, ki raste v vodnih tokovih, naravne infekcije mogoče odkriti v kateremkoli letnem času. Znane gostiteljice vključujejo krompirjeve samosevce (se ohranijo v tleh), *Solanum dulcamara, S. nigrum, Datura stramonium* in druge člane družine Solanaceae. Med gostiteljicami so tudi vrste *Pelargonium* in *Portulaca oleracea*. Nekatere evropske vrste plevela, ki potencialno lahko gostijo populacije *R. solanacearum* biovar 2/biotip 3 v koreninah in/ali rizosferah v določenih okoljskih pogojih, so med drugim: *Atriplex hastata, Bidens pilosa, Cerastium glomeratum, Chenopodium album, Eupatorium cannabinum, Galinsoga parviflora, Ranunculus scleratus*, vrste rodu *Rorippa*, vrste rodu *Rumex, Silene alba, S. nutans., Tussilago farfarra* in *Urtica dioica*.

Opomba: Na tej stopnji lahko opravimo vizualni pregled za interne simptome (obarvanje žil ali bakterijski izcedek). Dele stebel s simptomi damo na stran in jih testiramo ločeno (glej oddelek II).

2.1.2 Dele stebel na hitro razkužimo z etanolom 70 % in takoj posušimo z vpojnim papirjem. Nato dele stebel obdelamo po enem od naslednjih postopkov, in sicer bodisi tako, da

(a) dele prekrijemo z zadostno količino (pribl. 40 ml) ekstrakcijskega pufra (Dodatek 4) in stresamo na rotacijskem stresalniku (50-100 vrt/min) 4 ure pod temperaturo 24 °C ali 16–24 ur pri temperaturi hladilnika, bodisi tako, da

(b) takoj obdelamo, dele stolčemo v močni maceracijski vrečki (npr. Stomacher ali Bioreba) z ustrezno količino ekstrakcijskega pufra (Dodatek 4) in gumijastim kladivom oziroma ustreznim drobilnim aparatom (npr. Homex). Če to ni mogoče, dele stebel shranimo v hladilniku za največ 72 ur oziroma pri sobni temperaturi ne dlje od 24 ur.

2.1.3 Po 15 minutah usedanja odtočimo supernatant.

2.1.4 Nadaljnje prečiščenje ekstrakta ali koncentrata bakterijske frakcije običajno ni potrebno, lahko pa ga dosežemo s filtriranjem in/ali centrifugacijo, kot je opisano v oddelku III.1.1.3 do 1.1.5.

2.1.5 Razdelimo ekstrakt čistega oziroma koncentriranega vzorca na dva enaka dela. Polovico hranimo pri 4-10 °C med testiranjem, drugo polovico pa shranimo z 10-25 % (v/v) sterilnim glicerolom pri – 16 do – 24 °C (tedni) oziroma – 68 do – 86 °C (meseci), če bi bilo potrebno nadaljnje testiranje.

2.2 Testiranje

Glej Diagram poteka in opis testov ter optimizirane protokole v ustreznih dodatkih.

Selektivna izolacija (glej oddelek VI.A.4)

IF test (glej oddelek VI.A.5)

Test PCR (glej oddelek VI.A.6)

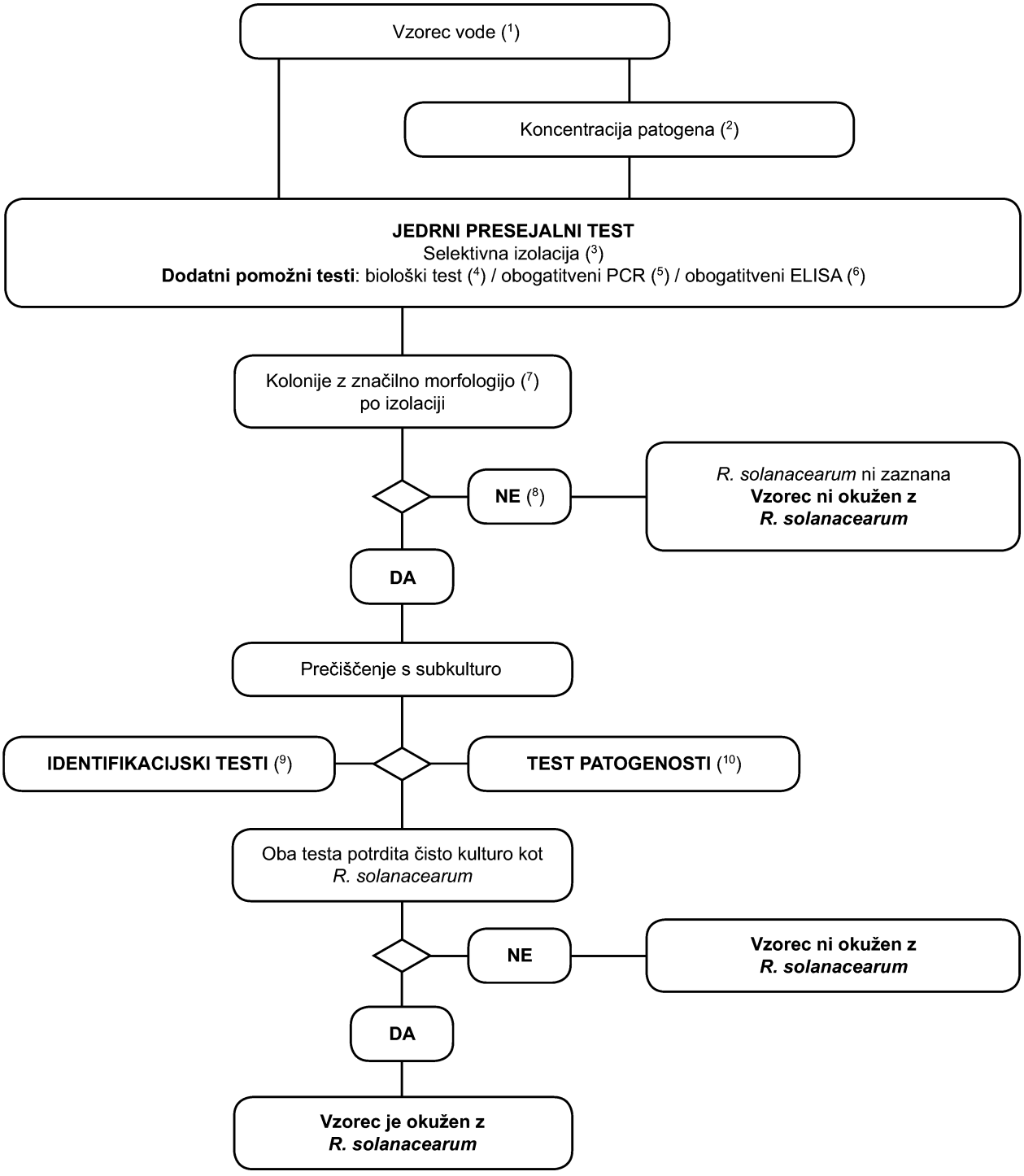
Test FISH (glej oddelek VI.A.7)

Test ELISA (glej oddelek VI.A.8)

Biološki test (glej oddelek VI.A.9)

ODDELEK IV

1. **Shema za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v vodi**



([1]) Glej oddelek IV.2.1 za priporočene postopke vzorčenja.

([2]) Metode koncentriranja patogenov so opisane v oddelku IV.2.1. Koncentracija poveča populacijo tako patogenih kot tekmujočih saprofitskih bakterij, zato je priporočljiva le, če ne povzroči inhibicije izolacijskega testa.

([3]) Test selektivne izolacije je opisan v oddelku VI.A.4.

([4]) Biološki test je opisan v oddelku VI.A.9.

([5]) Obogatitvene metode PCR so opisane v oddelku VI.A.4.2 in oddelku VI.A.6.

([6]) Obogatitvene metode ELISA so opisane v oddelku VI.A.4.2 in oddelku VI.A.8.

([7]) Značilna morfologija kolonije je opisana v oddelku II.3.d.

([8]) Gojenje lahko spodleti zaradi tekmovanja ali inhibicijskega delovanja saprofitskih bakterij. Če sumite, da velike populacije saprofitskih bakterij vplivajo na zanesljivost izolacije, ponovite izolacijske teste po razredčenju vzorca v sterilni vodi.

([9]) Zanesljivo identifikacijo čistih kultur domnevne *R. solanacearum* dosežemo s testi, opisanimi v oddelku VI.B.

([10]) Test patogenosti je opisan v oddelku VI.C.

2. **Metode za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v vodi**

Načelo

Potrjena shema detekcije, ki je opisana v tem oddelku, velja za detekcijo patogenov v vzorcih površinske vode, uporabimo pa jo lahko tudi za testiranje vzorcev iztokov pri predelavi krompirja in odplak. Pomembno se je zavedati, da se pričakovana občutljivost detekcije spreminja z medijem. Na občutljivost izolacijskega testa vplivajo populacije tekmujočih saprofitskih bakterij, ki so ponavadi v iztokih pri predelavi krompirja in odplakah veliko večje kot v površinski vodi. Spodnja shema predvideva detekcijo le 10^3 celic na liter v površinski vodi, občutljivost detekcije v iztokih pri predelavi krompirja in odplakah pa bo verjetno veliko nižja. Zato je priporočljivo testirati iztoke po vsaki vrsti čiščenja (npr. sedimentaciji ali filtriranju), med katerim se zmanjšajo populacije saprofitskih bakterij. Ko ocenjujemo zanesljivost morebitnih dobljenih negativnih rezultatov, je treba upoštevati omejitve pri občutljivosti testne sheme. Ta shema se sicer uspešno uporablja pri pregledovanju in ugotavljanju prisotnosti oziroma odsotnosti patogena v površinski vodi, toda zavedati se je treba njenih omejitev, če jo uporabljamo pri podobnem pregledovanju iztokov ob predelavi krompirja oziroma odplak.

2.1 Priprava vzorcev

Opomba:

— Detekcija bakterij *R. solanacearum* je najzanesljivejša pozno spomladi, poleti in jeseni, ko temperatura vode preseže 15 °C.

— Zanesljivost detekcije povečamo z večkratnim zbiranjem vzorcev ob različnih časih v zgoraj omenjenem obdobju na določenih točkah za vzorčenje. Tako zmanjšamo učinke podnebne variacije.

— Upoštevamo učinke močnega deževja in geografijo vodnega toka, da ne bi prišlo do velikih razredčenj, ki bi prikrila prisotnost patogena.

— Vzorce površinske vode jemljemo v bližini gostiteljskih rastlin, če so gostitelji na voljo.

2.1.1 Na izbranih točkah za vzorčenje zberemo vodne vzorce, tako da napolnimo sterilne cevke ali stekleničke za enkratno uporabo, če je mogoče, na globini več kot 30 cm in v oddaljenosti največ 2 m od brega. Za iztoke predelave in odplak zberemo vzorce na mestu odtoka odpadne vode. Priporočljiva je velikost vzorca do 500 ml na mesto vzorčenja. Če imamo rajši manjše vzorce, je priporočljivo, da vzamemo vzorce ob vsaj treh različnih časih na vsako mesto vzorčenja, pri čemer naj vsak vzorec vsebuje dva replicirana pod-vzorca z vsaj 30 ml. Za intenzivno pregledovanje izberemo vsaj 3 točke vzorčenja na 3 km vodotoka in obvezno vzamemo vzorce tudi iz pritokov tega vodotoka.

2.1.2 Vzorce prevažamo v hladnem, temnem okolju (4-10 °C) in testiramo v roku 24 ur.

2.1.3 Po potrebi se bakterijska frakcija lahko koncentrira po eni od naslednjih metod:

(a) Centrifugiramo 30-50 ml podvzorcev pri 10 000 g 10 minut (ali 7 000 g 15 minut), najraje pri 4-10 °C, zavržemo supernatant in resuspendiramo peleto v 1 ml peletnega pufra (Dodatek 4).

(b) Filtracija membrane (najmanjša velikost por 0,45 μm), ki ji sledi pranje filtra v 5-10 ml peletnega pufra in ohranitev izpirka. Ta metoda je primerna za večje količine vode z manjšim številom saprofitov.

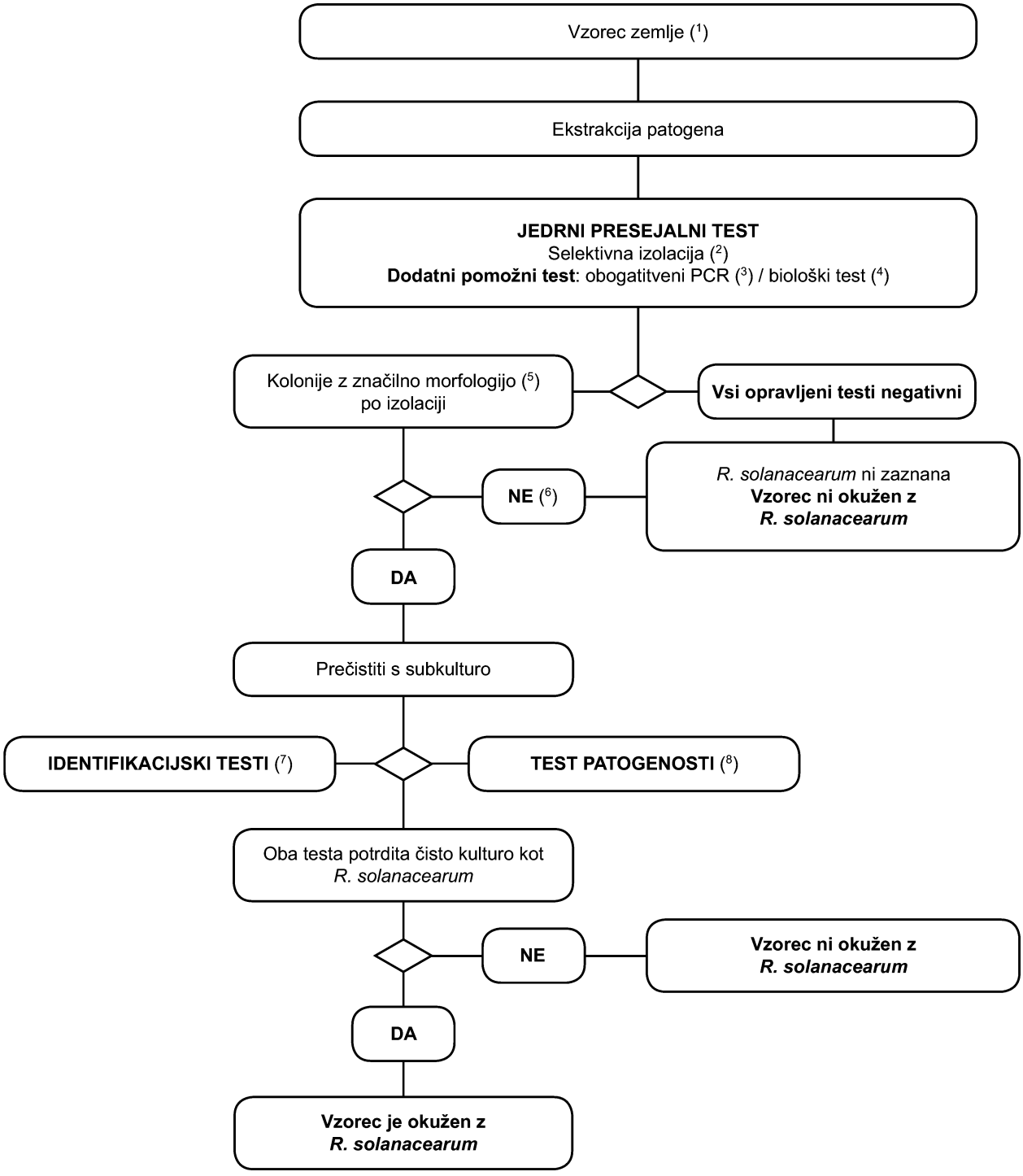
Koncentriranje običajno ni priporočljivo za vzorce odpadnih voda od predelave krompirja ali kanalizacije, ker večje populacije konkurenčnih saprofitskih bakterij inhibirajo detekcijo bakterije *R. solanacearum*.

2.2 Testiranje

Glej Diagram poteka in opis testov v ustreznih dodatkih.

ODDELEK V

1. **Shema za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v zemlji**



([1]) Glej oddelek V.2.1 za priporočene postopke vzorčenja.

([2]) Test selektivne izolacije je opisan v oddelku VI.A.4.

([3]) Obogatitvene metode PCR so opisane v oddelku VI.A.4.2 in oddelku VI.A.6.

([4]) Biološki test je opisan v oddelku VI.A.9.

([5]) Značilna morfologija kolonije je opisana v oddelku II.3.d.

([6]) Gojenje lahko spodleti zaradi tekmovanja ali inhibicijskega delovanja saprofitskih bakterij. Če sumite, da velike populacije saprofitskih bakterij vplivajo na zanesljivost izolacije, ponovite izolacijske teste po nadaljnjem razredčenju vzorca.

([7]) Zanesljivo identifikacijo čistih kultur domnevne *R. solanacearum* dosežemo s testi, opisanimi v oddelku VI.B.

([8]) Test patogenosti je opisan v oddelku VI.C.

2. **Metode za detekcijo in identifikacijo bakterije *R. solanacearum* v zemlji**

Načela

Potrjena shema detekcije, opisana v tem oddelku, velja za detekcijo patogenov v vzorcih zemlje, lahko pa se uporablja tudi za testiranje vzorcev trdnih odpadkov predelave krompirja oziroma komunalne gošče. Zavedati pa se je treba, da te metode niso zadosti občutljive, da bi zagotovile detekcijo majhnih in/ali neenakomerno razpršenih populacij bakterije *R. solanacearum*, do katerih lahko pride v naravno okuženih vzorcih teh medijev.

Omejitve občutljivosti te testne sheme je treba upoštevati, če ocenjujemo zanesljivost morebitnih dobljenih negativnih rezultatov, pa tudi ko jo uporabljamo pri pregledovanju za ugotavljanje prisotnosti ali odsotnosti patogena v zemlji in goščah. Najzanesljivejši test za prisotnost patogena v poljskih tleh je, da posadimo dovzetno gostiteljico in spremljamo morebitno okužbo, toda celo s to metodo nizke ravni kontaminacije uidejo detekciji.

2.1 Priprava vzorcev

2.1.1 Vzorčenje poljske zemlje mora slediti standardnim načelom za vzorčenje na ogorčice. Zberemo 0,5-1 kg zemlje na vzorec s 60 mest na 0,3 ha na globini 10-20 cm (ali na mreži 7 × 7 metrov). Če sumimo prisotnost patogena, povečamo število mest zbiranja na 120 na 0,3 ha. Pred testiranjem hranimo vzorce na 12-15 °C. Zberemo goščo od predelave krompirja in odplak, tako da zberemo skupno 1 kg z mest, ki predstavljajo skupni volumen gošče, ki jo bomo testirali. Vsak vzorec pred testiranjem dobro premešamo.

2.1.2 Dispergiramo podvzorce 10-25 g zemlje oziroma gošče z rotacijskim stresanjem (250 vrtlj./m) v 60-150 ml ekstrakcijskega pufra (Dodatek 4) do 2 uri. Po potrebi pri disperziji lahko pomaga, če dodamo 0,02 % sterilnega Tween-20 in 10-20 g sterilnega peska.

2.1.3 Suspenzijo med testiranjem hranimo pri 4 °C.

2.2 Testiranje

Glej Diagram poteka in opis testov v ustreznih dodatkih.

ODDELEK VI

OPTIMIZIRANI PROTOKOLI ZA DETEKCIJO IN IDENTIFIKACIJO BAKTERIJE *R. SOLANACEARUM*

A. *DIAGNOSTIČNI IN DETEKCIJSKI TESTI*

1. **Test eksudacije na steblu**

Prisotnost bakterije *R. solanacearum* v uvelih steblih krompirja, paradižnika in drugih rastlin gostiteljic je mogoče oceniti na podlagi naslednjega preprostega testa domneve: steblo prerežemo tik nad površino tal. Prerezano površino postavimo v epruveto s čisto vodo. Po nekaj minutah lahko opazimo, da iz prerezanih žilnih snopov spontano pritečejo sluzaste niti bakterijskega izcedka.

2. **Detekcija zrnc poli-β-hidroksibutirata**

1. Pripravimo razmaz bakterijskega izcedka iz okuženega tkiva na objektnem stekelcu ali razmaz 48-urne kulture na YPGA ali SPA (Dodatek 2).

2. Pripravimo razmaze seva biovar 2 bakterije *R. solanacearum* za pozitivno kontrolo in, če se zdi uporabno, razmaz znanega PHB negativnega seva za negativno kontrolo.

3. Razmaze pustimo, da se posušijo. Spodnjo površino stekelca hitro povlečemo prek plamena, da se razmaz fiksira.

4. Preparat obarvamo ali z nilsko modrim ali s sudan črnim, in opazujemo pod mikroskopom, kot je opisano spodaj:

Test z nilsko modrim:

(a) Fiksiran razmaz zalijemo z 1-odstotno vodno raztopino nilsko modrega A. Inkubiramo 10 minut pri 55 °C.

(b) Odcedimo raztopino barvila. Na hitro speremo pod majhnim curkom vodovodne vode. Odstranimo odvečno vodo z vpojnim papirjem.

(c) Razmaz zalijemo z 8-odstotno vodno raztopino ocetne kisline. Inkubiramo 1 minuto pri sobni temperaturi.

(d) Na hitro speremo pod majhnim curkom vodovodne vode. Odstranimo odvečno vodo z vpojnim papirjem.

(e) Ponovno navlažimo s kapljo vode. Pokrijemo s krovnim stekelcem.

(f) Obarvani razmaz opazujemo pod epifluorescenčnim mikroskopom pri 450 nm v imerzijskem olju pri povečavi 600–1 000. Uporabljamo imerzijski objektiv za olje ali za vodo.

(g) Iščemo svetlo oranžna fluorescenčna zrnca PHB. Opazujemo tudi pri dnevni svetlobi, da se prepričamo, da so zrnca znotraj celic in da je morfologija celic značilna za bakterijo *R. solanacearum*.

Test s sudan črnim:

(a) Fiksiran razmaz zalijemo z 0,3-odstotno raztopino sudan črnega B v 70-odstotnem etanolu. Inkubiramo 10 minut pri sobni temperaturi.

(b) Odcedimo raztopino barvila. Na hitro speremo pod tekočo vodo. Odstranimo odvečno vodo z vpojnim papirjem.

(c) Razmaz na kratko potopimo v ksilol. Popivnamo z vpojnim papirjem. *Pozor: Ksilol je zdravju škodljiv. Upoštevajte varnostne ukrepe in delajte v digestoriju.*

(d) Razmaz zalijemo z 0,5-odstotno (w/v) vodno raztopino safranina in pustimo 10 sekund pri sobni temperaturi. *Pozor: Safranin je zdravju škodljiv. Upoštevajte varnostne ukrepe in delajte v digestoriju.*

(e) Speremo pod majhnim curkom vodovodne vode. Popivnamo z vpojnim papirjem. Pokrijemo s krovnim stekelcem.

(f) Obarvani razmaz opazujemo pod svetlobnim mikroskopom s presevno svetlobo v imerzijskem olju pri povečavi 1 000. Uporabljamo imerzijski objektiv za olje.

(g) Zrnca PHB v celicah bakterije *R. solanacearum* se obarvajo modro-črno. Celične stene se obarvajo rožnato.

3. **Seroaglutinacijski testi**

Aglutinacijo celic *R. solanacearum* v bakterijskem izcedku ali izvlečku simptomatskega tkiva najlažje opazujemo s potrjenimi protitelesi (glej Dodatek 3), označenimi z ustreznimi barvnimi oznakami, kot so npr. rdeče celice *Staphylococcus aureus* ali obarvani delci lateksa. Če uporabljamo komercialni pribor (glej Dodatek 3), sledimo navodilom proizvajalca. Sicer sledimo naslednjemu postopku:

(a) Zmešamo kapljice suspenzije označenega protitelesa in bakterijskega izcedka (vsak približno 5 µl) na okencih objektnih stekelc z več vdolbinicami.

(b) Pripravimo pozitivno in negativno kontrolo s suspenzijo *R. solanacearum* biovar 2 in heterolognega seva.

(c) Po rahlem mešanju, ki traja 15 sekund, opazujemo aglutinacijo v pozitivnih vzorcih.

4. **Selektivna izolacija**

4.1 Razmaz na selektivno gojišče

Opomba: Preden prvič uporabimo to metodo, opravimo predhodne teste za zagotovitev ponovljive detekcije 10^3 do 10^4 enot, ki tvorijo kolonije bakterije *R. solanacearum* na ml, dodane ekstraktom iz vzorcev, ki so bili prej v testih negativni.

Uporabimo primerno potrjeno selektivno gojišče, npr. SMSA (prilagojeno po Elphinstone in sod. 1996, glej Dodatek 2).

Potrebno je pozorno razlikovati med *R. solanacearum* in drugimi bakterijami, ki so sposobne na tem gojišču razviti kolonije. Kolonije *R. solanacearum* lahko izkazujejo tudi atipično morfologijo, če so plošče prenaseljene ali če so prisotne antagonistične bakterije. Kjer sumimo na učinke tekmovanja ali antagonizma, moramo vzorec ponovno testirati z drugačnim testom.

Največjo občutljivost detekcije s to metodo lahko pričakujemo, če uporabljamo sveže pripravljene ekstrakte vzorcev. Metoda pa je uporabna tudi za ekstrakte, ki so bili shranjeni pod glicerolom pri – 68 do – 86 °C.

Za pozitivno kontrolo pripravimo desetkratne razredčine iz suspenzije 10^6 enot, ki tvorijo kolonije, na ml virulentnega biovarja 2 seva *R. solanacearum* (npr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Da ne bi prišlo do kontaminacije, pripravimo pozitivne kontrole povsem ločeno od vzorcev, ki jih nameravamo testirati.

Za vsako novo pripravljeno serijo selektivnega gojišča je treba preveriti, ali je ustrezno za rast patogena, preden ga uporabimo za testiranje rutinskih vzorcev.

Kontrolni material testiramo povsem enako kot vzorce.

4.1.1 Izvedemo ustrezno tehniko redčitvenega razmaza z namenom, da zagotovimo razredčenje morebitnih populacij saprofitskih bakterij, ki tvorijo kolonije, v ozadju. Razmažemo 50-100 µl na ploščo ekstrakta vzorca in vsako razredčino.

4.1.2 Plošče inkubiramo pri 28 °C. Plošče odčitamo po 48 urah in do 6 dni zatem vsak dan. Tipične kolonije *R. solanacearum* na gojišču SMSA so mlečno bele, ploske, nepravilnih oblik in tekoče, in po treh dneh inkubacije razvijejo rožnato do krvavo rdečo obarvanost v sredini, z notranjimi progami ali spiralami (glej spletno mesto http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Opomba: Na tem gojišču se včasih razvijejo atipične kolonije bakterije *R. solanacearum*. Te so lahko majhne, okrogle, povsem rdeče barve in netekoče ali samo delno tekoče, zato jih je težko razlikovati od saprofitskih bakterij, ki tvorijo kolonije.

4.1.3 Prečistimo domnevne kolonije *R. solanacearum*, potem ko smo jih načrtali ali redčitveno razmazali na splošno hranilno gojišče. Tako dobimo izolirane kolonije (glej Dodatek 2).

4.1.4 Kratkoročno shranimo kulture v sterilni vodi (pH 6-8, brez klora) pri sobni temperaturi v temi, dolgoročno pa v primernem kriogenskem zaščitnem sredstvu pri temperaturi – 68 do – 86 °C ali liofilizirane.

4.1.5 Identificiramo domnevne kulture (glej oddelek VI. B) in opravimo test patogenosti (glej oddelek VI. C).

Interpretacija testa z razmazom na selektivno gojišče

Test z razmazom na selektivno gojišče je negativen, če po šestih dneh ne opazimo nobenih bakterijskih kolonij ali nobenih domnevnih kolonij, značilnih za bakterije *R. solanacearum*, pod pogojem, da inhibicija s strani kolonij drugih bakterij ni verjetna in da smo pri pozitivni kontroli našli značilne kolonije bakterije *R. solanacearum*.

Test z razmazom na selektivno gojišče je pozitiven, če izoliramo kolonije, značilne za bakterije *R. solanacearum*.

4.2 Obogatitveni postopek

Uporabimo potrjeno sredstvo za obogatitev, npr. modificiran bujon Wilbrink (Dodatek 2).

S tem postopkom lahko selektivno povečamo populacijo R. solanacearum *v ekstraktih vzorcev in povečamo občutljivost detekcije. Postopek tudi učinkovito razredči inhibitorje reakcije PCR (1:100). Treba pa se je zavedati, da lahko obogatitev* R. solanacearum spodleti zaradi tekmovanja in antagonizma saprofitskih organizmov, ki se pogosto hkrati obogatijo. Zato je lahko izolacija R. solanacearum iz *obogatenih kultur bujonov težavna. Ker je populacije serološko povezanih saprofitov mogoče povečati, se priporoča tudi uporaba specifičnih monoklonskih protiteles namesto poliklonskih protiteles, če uporabljamo test ELISA.*

4.2.1 Za obogatitveni PCR prenesemo 100 µl ekstrakta vzorca v 10 ml obogatitvenega bujona (Dodatek 2), ki smo ga prej alikvotirali v epruvete ali stekleničke brez DNK. Za obogatitveni test ELISA lahko uporabimo večji delež ekstrakta vzorca v bujonu (npr. 100 µl v 1,0 ml obogatitvenega bujona).

4.2.2 Inkubiramo 72 ur pri 27 do 30 °C v stresalni ali statični kulturi, pri čemer so pokrovi rahlo zaprti, da omogočimo zračenje.

4.2.3 Pred uporabo v testu ELISA ali PCR dobro premešamo.

4.2.4 Z obogatenim bujonom ravnamo enako kot z vzorci v zgornjih testih.

Opomba: Če pričakujemo inhibicijo obogatitve *R. solanacearum* zaradi velikih populacij nekaterih tekmujočih saprofitskih bakterij, bomo boljše rezultate morda dobili, če ekstrakte vzorcev obogatimo pred centrifugiranjem oziroma pred drugimi postopki koncentriranja.

5. **IF test**

Načelo

Uporaba IF testa kot glavnega presejalnega testa je priporočljiva, ker je dokazano obstojen pri doseganju zahtevanih pragov.

Če IF test uporabljamo kot glavni presejalni test in je odčitek IF pozitiven, je treba kot drugi presejalni test opraviti izolacijski test, test PCR ali FISH. Če IF test uporabljamo kot drugi presejalni test in je odčitek IF pozitiven, je za zaključek analize potrebno nadaljnje testiranje glede na diagram poteka.

Opomba: Uporabimo potrjen vir protiteles za *R. solanacearum* (glej spletno mesto http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Priporočljivo je, da se titer določi za vsako novo serijo protiteles. Titer je definiran kot najvišja razredčina, pri kateri pride do optimalne reakcije, če testiramo suspenzijo, ki vsebuje 10^5 do 10^6 celic na ml homolognega seva bakterije *R. solanacearum*, z ustrezno razredčino flourescein izotiocianatovega (FITC) konjugata v skladu z navodili proizvajalca. Potrjeni poliklonalni antiserumi so imeli vsi titer IF vsaj 1:2 000. Med testiranjem je treba protitelesa uporabiti z delovno razredčino (razredčinami), ki je blizu ali enaka titru.

Test je treba opraviti na sveže pripravljenih ekstraktih vzorcev. Po potrebi ga je mogoče uspešno opraviti na ekstraktih, shranjenih pri – 68 do – 86 °C pod glicerolom. Glicerol odstranimo iz vzorca z dodatkom 1 ml peletnega pufra (Dodatek 4), ponovnim 15-minutnim centrifugiranjem pri 7 000 g in resuspendiranjem v enakem volumnu peletnega pufra. To pogosto ni potrebno, še posebej če so vzorci na stekelcih fiksirani s plamenom.

Pripravimo ločena stekelca za pozitivno kontrolo s homolognim sevom ali katerimkoli drugim referenčnim sevom bakterije *R. solanacearum*, suspendiranim v ekstraktu krompirja, kot je navedeno v Dodatku 3 B, lahko pa tudi v pufru.

Naravno okuženo tkivo (ohranjeno z liofilizacijo ali zamrzovanjem pri – 16 do – 24 °C) je treba uporabiti, kjer je mogoče, kot podobno kontrolo na istem stekelcu.

Kot negativne kontrole lahko uporabimo alikvote ekstrakta vzorca, ki so bili prej testirani kot negativni za *R. solanacearum*.

Standardizirani pozitivni in negativni kontrolni materiali, ki so na voljo za uporabo s tem testom, so navedeni v Dodatku 3.

Uporabimo objektna stekelca z več vdolbinicami, po možnosti z 10 okenci po vsaj 6 mm v premeru.

Kontrolni material testiramo povsem enako kot vzorce.

5.1 Testna stekelca pripravimo po enem od naslednjih postopkov:

(i) Za pelete z relativno malo škroba:

V prvo okence odpipetiramo standardno količino (za okence s premerom 6 mm ustreza 15 µl –za večja okenca količino povečamo) razredčine 1/100 resuspendirane krompirjeve pelete. Nato odpipetiramo podobno količino nerazredčene pelete (1/1) na preostala okenca v vrstici. Drugo vrstico lahko uporabimo kot ponovitev ali za drugi vzorec, kot je prikazano na sliki 1.

(ii) Za druge pelete:

Pripravimo desetkratne razredčine (1/10, 1/100) resuspendirane pelete v peletnem pufru. V eno vrstico okenc odpipetiramo standardno količino (za okence s premerom 6 mm ustreza 15 µl –za večja okenca količino povečamo) resuspendirane pelete in vsake posamezne razredčine. Drugo vrstico lahko uporabimo kot ponovitev ali za drugi vzorec, kot je prikazano na sliki 2.

5.2 Počakamo, da se kapljice posušijo pri sobni temperaturi, ali jih segrejemo do temperature 40-45 °C. Celice bakterij fiksiramo na stekelce bodisi s segrevanjem (15 minut pri 60 °C), plamenom, 95-odstotnim etanolom, ali po specifičnih navodilih dobaviteljev protiteles.

Fiksirana stekelca lahko po potrebi shranimo zamrznjena v sušilni škatli, čim manj časa je potrebno (največ 3 mesece), preden jih spet testiramo.

5.3 Postopek IF

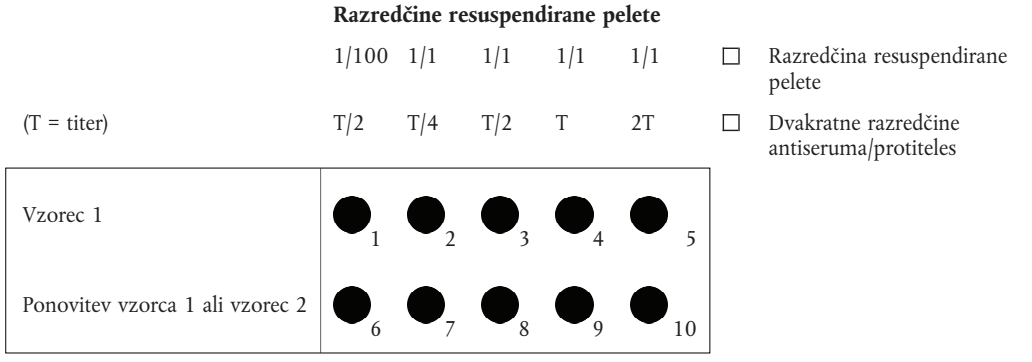
(i) V skladu s pripravo testnih objektnih stekelc v 5.1(i):

Pripravimo niz dvakratnih razredčin. Prva vdolbinica mora imeti 1/2 titra (T/2), druge pa 1/4 titra (T/4), 1/2 titra (T/2), titer (T) in dvakratni titer (2T).

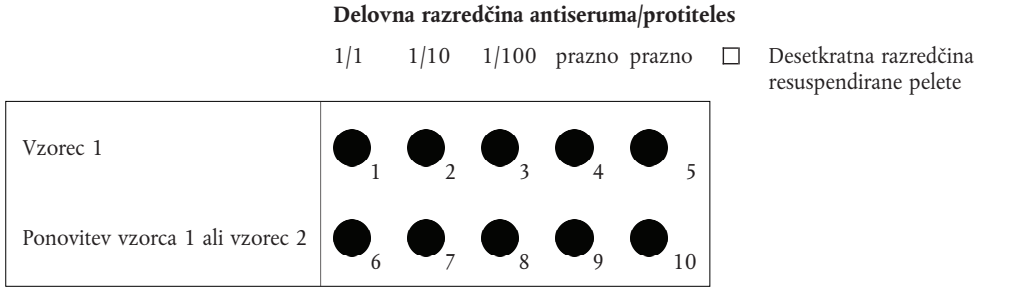
(ii) V skladu s pripravo testnih objektnih stekelc v 5.1(ii):

Pripravimo delovno razredčino (DR) protitelesa v pufru IF. Delovna razredčina vpliva na specifičnost.

Slika 1. V skladu s pripravo testnih objektnih stekelc v 5.1(i) in 5.3(i)



Slika 2. V skladu s pripravo testnih objektnih stekelc v 5.1(ii) in 5.3(ii)



5.3.1 Objektna stekelca razporedimo po vlažnem vpojnem papirju. Testna okenca prekrijemo z razredčino oziroma razredčinami protiteles. Količina protiteles, nanesenih na okenca, mora biti vsaj enaka količini nanesenega ekstrakta.

Temu postopku sledimo, če ni specifičnih navodil dobaviteljev protiteles.

5.3.2 Inkubiramo pokrito na vlažnem papirju 30 minut pri sobni temperaturi (18-25 °C).

5.3.3 S stekelc otresemo kapljice in stekelca previdno speremo s pufrom IF. Za pet minut potopimo v pufru IF-Tween (Dodatek 4) in nato še v pufru IF. Izogibamo se rabi pršil ali prenosu kapljic, kar bi lahko privedlo do navzkrižne kontaminacije. Previdno popivnamo odvečno vlago.

5.3.4 Objektna stekelca razporedimo po vlažnem papirju. Testna okenca prekrijemo z razredčino konjugata FITC, uporabljenega za določitev titra. Količina konjugata, nanesenega na okenca, mora biti enaka količini nanesenih protiteles.

5.3.5 Stekelca inkubiramo pokrita na vlažnem papirju 30 minut pri sobni temperaturi (18-25 °C).

5.3.6 S stekelca otresemo kapljice konjugata. Splaknemo in operemo kot prej (5.3.3).

Previdno odstranimo odvečno vlago.

5.3.7 Na vsako okence odpipetiramo 5–10 µl 0,1 M glicerola s fosfatnim pufrom (Dodatek 4) ali podobnim prekrivnim pufrom proti bledenju in pokrijemo s krovnim stekelcem.

5.4 Branje IF-testa:

5.4.1 Stekelca pregledamo pod epifluorescenčnim mikroskopom s filtri, primernimi za vzbujanje FITC, v imerzijskem olju ali vodi pri povečavi 500–1 000. Okenca pregledamo vzdolž dveh pravokotnih premerov in po obodu. Pri vzorcih, ki ne kažejo nobenih celic ali le malo celic, opazujemo vsaj 40 mikroskopskih polj.

Najprej pregledamo stekelce pozitivne kontrole. Celice morajo biti svetlo fluorescenčne in povsem obarvane pri določenem titru protiteles oziroma delovne razredčine. Če pri obarvanju pride do odstopanj, je treba IF test (oddelek VI.A.5.) ponoviti.

5.4.2 V testnih okencih testnih stekelc iščemo svetle fluorescenčne celice z značilno morfologijo bakterije *R. solanacearum* (glej spletno mesto http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Intenziteta fluorescence mora biti enaka kot pri sevu pozitivne kontrole pri enaki razredčini protiteles. Celice z nepopolnim obarvanjem ali šibko fluorescenco se ne upoštevajo.

Če sumimo kontaminacijo, moramo test ponoviti. Do tega lahko pride, če vsa stekelca v seriji kažejo pozitivne celice zaradi kontaminacije pufra ali če najdemo pozitivne celice (zunaj okenc stekelc) na zgornji plasti stekelca.

5.4.3 S specifičnostjo testa imunofluorescence je povezanih več problemov. V krompirjevih peletah stebelnih delov in stolonov se bodo verjetno pojavile populacije fluorescentnih celic ozadja z atipično morfologijo in navzkrižno reagirajoče saprofitske bakterije, ki so po velikosti in morfologiji podobne bakteriji *R. solanacearum*.

5.4.4 Upoštevamo samo fluorescentne celice tipične velikosti in morfologije pri titru oziroma delovni razredčini protiteles, kot je opisano v 5.3.

5.4.5 Interpretacija rezultata IF testa:

(i) Če najdemo svetle fluorescentne celice z značilno morfologijo, določimo povprečno število značilnih celic na mikroskopsko polje in izračunamo število značilnih celic na ml resuspendirane pelete (Dodatek 5).

Rezultat testa IF je pozitiven pri vzorcih, ki imajo vsaj 5×10^3 značilnih celic na ml resuspendirane pelete. Vzorec velja za potencialno kontaminiranega in potrebni so nadaljnji testi.

(ii) Rezultat IF testa je negativen pri vzorcih z manj kot 5×10^3 celic na ml resuspendirane pelete, in vzorec velja za negativnega. Nadaljnji testi niso potrebni.

6. **Testi PCR**

Načela

Če test PCR uporabljamo kot glavni presejalni test in je odčitek pozitiven, je treba kot drugi obvezni presejalni test opraviti izolacijski test ali IF test. Če test PCR uporabljamo kot drugi presejalni test in je odčitek pozitiven, je za zaključek diagnoze potrebno nadaljnje testiranje glede na diagram poteka.

Popolno izkoriščanje te metode kot osnovnega presejalnega testa se priporoča samo, če smo pridobili strokovno usposobljenost.

Opomba: Predhodno testiranje s to metodo mora omogočati ponovljivo detekcijo 10^3 do 10^4 celic bakterije *R. solanacearum* na ml, dodanih ekstraktom vzorcev, ki so bili prej testirani kot negativni. Če želimo doseči največjo stopnjo občutljivosti in specifičnosti v vseh laboratorijih, bodo morda potrebni eksperimenti za optimizacijo.

Uporabimo potrjene reagente za PCR in protokole (glej Dodatek 6). Po možnosti izberemo metodo z notranjo kontrolo.

Z ustreznimi previdnostnimi ukrepi se izogibamo kontaminaciji vzorca s ciljno DNK. Test PCR smejo izvajati le izkušeni strokovnjaki v temu namenjenih laboratorijih za molekularno biologijo, da bi zmanjšali možnost kontaminacije s ciljno DNK.

Negativne kontrole (za ekstrakcijo DNK in postopke PCR) je treba vedno obravnavati kot končne vzorce v postopku, ki pokaže, ali je prišlo do prenosa DNK.

V test PCR vključimo naslednje negativne kontrole:

— ekstrakt vzorca, ki je bil predhodno testiran negativno za *R. solanacearum*,

— pufrske kontrole za ekstrakcijo bakterije in DNK iz vzorca,

— reakcijsko zmes PCR.

Vključimo naslednje pozitivne kontrole:

— alikvote resuspendiranih pelet, ki jim je bila dodana bakterija *R. solanacearum* (*za pripravo glej* Dodatek 3B),

— suspenzijo 10^6 celic na ml bakterije *R. solanacearum* v vodi iz virulentnega izolata (npr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; glej Dodatek 3B),

— če je mogoče, pri PCR testu uporabimo tudi DNK, ekstrahirano iz pozitivnih kontrolnih vzorcev.

Da ne bi prišlo do kontaminacije, pripravimo pozitivno kontrolo v okolju, ločenem od vzorcev, ki jih nameravamo testirati.

Ekstrakti vzorcev morajo biti čim bolj očiščeni zemlje. Zato bi bilo v nekaterih primerih morda priporočljivo, da pripravimo ekstrakte iz opranih krompirjev, če nameravamo uporabiti protokole PCR.

Standardizirani pozitivni in negativni kontrolni materiali, ki so na voljo za uporabo s tem testom, so navedeni v Dodatku 3.

6.1 Metode prečiščevanja DNK

Uporabimo vzorce pozitivne in negativne kontrole, kot je opisano zgoraj (glej Dodatek 3).

Kontrolni material testiramo povsem enako kot vzorce.

Za prečiščevanje ciljne DNK iz kompleksnih vzorčnih medijev je na voljo vrsta metod, s katerimi odstranimo inhibitorje za PCR in druge encimske reakcije in koncentriramo ciljno DNK v ekstraktu vzorca. Naslednja metoda je bila optimirana za uporabo z potrjenimi metodami PCR, prikazanimi v Dodatku 6.

(a) Pastrikova metoda (2000)

1) Odpipetiramo 220 µl lizirnega pufra (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) v 1,5 ml Eppendorfovo epruveto.

2) Dodamo 100 µl ekstrakta vzorca in za 10 min postavimo v grelno enoto ali vodno kopel pri 95 °C.

3) Epruveto za 5 min damo na led.

4) Dodamo 80 µl osnovne raztopine lizocima (50 mg lizocima na ml v 10 mM Tris HCl, pH 8,0) in 30 min inkubiramo pri 37 °C.

5) Dodamo 220 µl Easy DNA® raztopine A (Invitrogen), dobro premešamo z vrtinčenjem in inkubiramo 30 min pri 65 °C.

6) Dodamo 100 µl Easy DNA® raztopine B (Invitrogen) in močno vrtinčimo, da oborina v epruveti prosto teče ter da vzorec postane enakomerno viskozen.

7) Dodamo 500 µl kloroforma in vrtinčimo, dokler se viskoznost ne zmanjša in mešanica postane homogena.

8) Centrifugiramo pri 15 000 g 20 min pri 4 °C, da ločimo faze in dosežemo interfazo.

9) Zgornjo fazo prenesemo v svežo Eppendorfovo epruveto.

10) Dodamo 1 ml 100 % etanola (– 20 °C), na kratko vrtičimo in za 10 min. inkubiramo na ledu.

11) Centrifugiramo pri 15 000 g 20 min pri 4° C in iz pelete odstranimo etanol.

12) Dodamo 500 µl 80 % etanola (– 20 °C) in premešamo, tako da obrnemo epruveto.

13) Centrifugiramo pri 15 000 g 10 min pri 4 °C, shranimo peleto in odstranimo etanol.

14) Peleto pustimo, da se posuši na zraku ali v vakuumski centrifugi.

15) Peleto resuspendiramo v 100 µl sterilne ultra čiste vode in vsaj 20 minut pustimo pri sobni temperaturi.

16) Hranimo pri – 20 °C, dokler je potrebno za PCR.

17) Morebitno belo oborino odvrtimo s centrifugiranjem in uporabimo 5 µl supernatanta, ki vsebuje DNK za PCR.

(b) Druge metode

Druge metode za ekstrakcijo DNK, npr. Qiagen DNeasy Plant Kit, lahko uporabimo, če so dokazano enako učinkovite za prečiščevanje DNK iz kontrolnih vzorcev, ki vsebujejo 10^3 do 10^4 patogenih celic na ml.

6.2 PCR

6.2.1 Po potrjenih protokolih pripravimo testne in kontrolne matrice za PCR (oddelek VI.A.6). Pripravimo eno desetkratno razredčino vzorčnega ekstrakta DNK (1:10 v ultra čisti vodi).

6.2.2 Ustrezno reakcijsko zmes PCR pripravimo v nekontaminiranem okolju po objavljenih protokolih (Dodatek 6). Kjer je to mogoče, je priporočljivo uporabiti multipli protokol PCR, ki vključuje tudi notranjo kontrolo PCR.

6.2.3 Dodamo 2-5 µl ekstrakta DNK na 25 µl reakcijske zmesi PCR v sterilne epruvete za PCR po protokolih za PCR (glej Dodatek 6).

6.2.4 Vključimo tudi vzorec za negativno kontrolo, ki vsebuje samo reakcijsko zmes PCR, in dodamo isti vir ultra čiste vode, kot smo ga uporabili za zmes PCR pri vzorcu.

6.2.5 Epruvete damo v isti ciklični termostat, ki smo ga uporabili pri predhodnem testiranju, in zaženemo ustrezno optimirani program PCR (Dodatek 6).

6.3 Analiza produkta PCR

6.3.1 Pomnožke PCR odkrijemo z elektroforezo v agaroznem gelu. Vsaj 12 µl pomnožene reakcijske zmesi DNK iz vsakega vzorca, zmešane s 3 µl nanašalnega pufra (Dodatek 6), vlijemo v 2,0 % (w/v) agarozne gele v tris-acetatnem-EDTA (TAE) pufru (Dodatek 6), 5-8 V na cm. Uporabimo ustrezni označevalec DNK, npr. lestvico 100 bp.

6.3.2 Proge DNK razkrijemo tako, da jih 30-60 min barvamo z etidijevim bromidom (0,5 mg na L), pri tem pa upoštevamo ustrezne varnostne ukrepe za ravnanje s to mutageno snovjo.

6.3.3 Obarvani gel opazujemo pod kratkovalovno UV presvetlitvijo (λ = 302 nm) in iščemo pomnožene produkte PCR pričakovane velikosti (Dodatek 6) ter dokumentiramo.

6.3.4 Za vsa nova odkritja/primere preverimo avtentičnost pomnožka PCR, tako da opravimo restrikcijsko encimsko analizo na vzorcu preostale pomnožene DNK: inkubiramo pri optimalni temperaturi in času z ustreznim encimom in pufrom (glej Dodatek 6). Tako kot prej, raztopljene fragmente PCR odkrijemo z elektroforezo v agaroznem gelu in po obarvanju z etidijevim bromidom opazujemo značilni restrikcijski vzorec fragmentov pod UV presvetlitvijo ter primerjamo z raztopljeno in neraztopljeno pozitivno kontrolo.

Interpretacija rezultata testa PCR:

Test PCR je negativen, če za dotični vzorec ne odkrijemo za bakterijo *R. solanacearum* značilnega pomnožka PCR pričakovane velikosti, vendar ga odkrijemo za vse vzorce pozitivne kontrole (pri multiplem PCR z za rastlino specifičnimi PCR primerji notranje kontrole: z dotičnim vzorcem je treba pomnožiti drugi produkt PCR pričakovane velikosti).

Test PCR je pozitiven, če odkrijemo za bakterijo *R. solanacearum* značilen pomnožek PCR pričakovane velikosti in restrikcijskega vzorca (če je potrebno), pod pogojem, da ni bil pomnožen iz nobenega od vzorcev negativne kontrole. Zanesljivo potrditev pozitivnega rezultata dobimo tudi, če ponovimo test z drugo množico PCR primerjev (Dodatek 6).

Opomba: Inhibicijo PCR lahko sumimo, če pričakovani pomnožek dobimo iz vzorca pozitivne kontrole, ki vsebuje bakterijo *R. solanacearum* v vodi, medtem ko iz pozitivnih kontrol z bakterijo *R. solanacearum* v ekstraktu krompirja dobimo negativne rezultate. Pri multiplih protokolih PCR z notranjo kontrolo PCR je indicirana inhibicija reakcije, če ne dobimo nobenega od obeh pomnožkov.

Kontaminacijo lahko sumimo, če pričakovani pomnožek dobimo iz ene ali več negativnih kontrol.

7. **Test FISH**

Načelo

Če test FISH uporabljamo kot glavni presejalni test in je odčitek pozitiven, je treba kot drugi obvezni presejalni test opraviti izolacijski test ali IF test. Če test FISH uporabljamo kot drugi presejalni test in je odčitek pozitiven, je za zaključek diagnoze potrebno nadaljnje testiranje glede na diagram poteka.

Opomba: Uporabimo potrjene, za bakterijo *R. solanacearum* specifične oligo-sonde (glej Dodatek 7). Predhodno testiranje s to metodo mora omogočati ponovljivo detekcijo vsaj 10^3 do 10^4 celic bakterije *R. solanacearum* na ml dodano ekstraktom vzorcev, ki so bili prej testirani kot negativni.

Spodnji postopek je najbolje opraviti na sveže pripravljenem ekstraktu vzorca, uspešno pa ga lahko opravimo tudi na ekstraktu vzorca, ki je bil shranjen pod glicerolom pri – 16 do – 24 °C ali – 68 do – 86 °C.

Kot negativne kontrole uporabimo alikvote ekstrakta vzorca, ki so bili prej testirani kot negativni za *R. solanacearum*.

Kot pozitivne kontrole pripravimo suspenzije, ki vsebujejo 10^5 do 10^6 celic na ml bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (npr. sev NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, glej Dodatek 3) v 0,01 M fosfatnega pufra (PB) iz 3-5 dnevne kulture). Pripravimo ločena stekelca za pozitivno kontrolo s homolognim sevom ali katerimkoli drugim referenčnim sevom bakterije *R. solanacearum*, suspendiranim v ekstraktu krompirja, kot je navedeno v Dodatku 3B.

Uporaba eubakterijske oligo-sonde FITC omogoča kontrolo procesa hibridizacije, saj bodo obarvane vse eubakterije, ki so navzoče v vzorcu.

Standardizirani pozitivni in negativni kontrolni materiali, ki so na voljo za uporabo s tem testom, so navedeni v Dodatku 3, točka A.

Kontrolni material testiramo povsem enako kot vzorce.

7.1 Fiksiranje ekstrakta krompirja

Spodnji protokol temelji na Wullings in sod. (1998):

7.1.1 Pripravimo fiksirno raztopino (glej Dodatek 7).

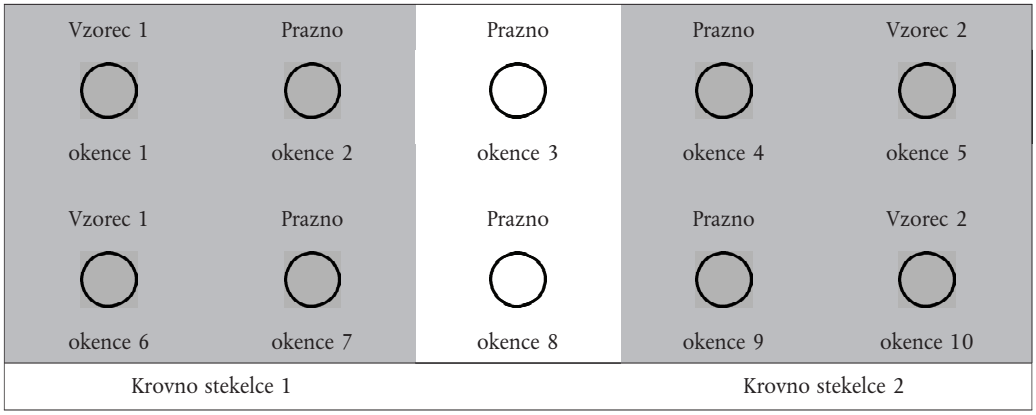
7.1.2 Odpipetiramo 100 µl vsakega ekstrakta vzorca v Eppendorfovo epruveto in centrifugiramo 7 min pri 7 000 g.

7.1.3 Odstranimo supernatant in raztopimo peleto v 200 µl preparata za fiksiranje, pripravljenega manj kot 24 ur pred tem. Vrtinčimo in inkubiramo 1 uro v hladilniku.

7.1.4 Centrifugiramo 7 min pri 7 000 g, odstranimo supernatant in resuspendiramo peleto v 75 µl 0,01 M PB (glej Dodatek 7).

7.1.5 V okenca čistega večprekatnega stekelca nanesemo 16 µl fiksiranih suspenzij, kot je prikazano na sliki 7.1. Nanesemo 2 različna vzorca na stekelce, nerazredčena in uporabimo 10 µl za izdelavo razredčine 1:100 (v 0,01 M PB). Preostalo raztopino vzorca (49 µl) lahko shranimo pri – 20 °C, potem ko smo dodali 1 količino 96 % etanola. Če je treba test FISH ponoviti, etanol odstranimo s centrifugiranjem in dodamo enako količino 0,01 PB (premešamo z vrtinčenjem).

Slika 7.1 Razporeditev stekelca za FISH



7.1.6 Stekelca posušimo na zraku (ali v sušilniku za stekelca pri 37 °C) in jih fiksiramo s plamenom.

Na tej točki je postopek mogoče prekiniti in nadaljevati s hibridizacijo naslednji dan. Stekelca je treba shraniti v suhem okolju brez prahu pri sobni temperaturi.

7.2 Hibridizacija

7.2.1 Celice dehidriramo v stopenjski seriji etanola 50 %, 80 % in 96 %, v vsakem po eno minuto. Stekelca pustimo, da se posušijo v držalu.

7.2.2 Pripravimo vlažno inkubacijsko komoro, tako da pokrijemo dno hermetične škatle z vpojnim ali filtrirnim papirjem, namočenim v 1x hybmix (Dodatek 7). Škatlo vsaj 10 minut predinkubiramo v hibridizacijski pečici pri 45 °C.

7.2.3 Nanesemo 10 µl hibridizacijske raztopine (Dodatek 7) na 8 okenc (okenca 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 in 10; glej sliko 7.1) vsakega stekelca, tako da sredinski okenci (3 in 8) ostaneta prazni.

7.2.4 Prva 4 in zadnja 4 okenca pokrijemo s krovnimi stekelci (24 × 24 mm), ne da bi ujeli zrak. Stekelca postavimo v vnaprej ogreto vlažno komoro in hibridiziramo 5 ur v pečici pri 45 °C v temi.

7.2.5 Pripravimo 3 čaše, ki vsebujejo 1 l Milli Q (molekulske stopnje) vode, 1 l 1x hybmixa (334 ml 3x hybmixa in 666 ml Milli Q vode) in 1 l 1/8x hybmixa (42 ml 3x hybmixa in 958 ml Milli Q vode). Vsako predinkubiramo v vodni kopeli pri 45 °C.

7.2.6 S stekelc odstranimo krovna stekelca in stekelca damo v držalo.

7.2.7 Speremo odvečno sondo, tako da 15 minut inkubiramo v čaši z 1 × hybmix pri 45 °C.

7.2.8 Držalo prestavimo v pralno raztopino 1/8 hybmix in inkubiramo nadaljnjih 15 minut.

7.2.9 Stekelca na hitro potopimo v vodo Milli Q in jih damo na filtrirni papir. Odvečno vlago odstranimo, tako da površino narahlo prekrijemo s filtrirnim papirjem. Na vsako okence odpipetiramo 5-10 µl raztopine prekrivnega pufra proti bledenju (npr. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA ali ekvivalentni) in pokrijemo celo stekelce z velikim krovnim stekelcem (24 × 60 mm).

7.3 Branje testa FISH:

7.3.1 Stekelca takoj opazujemo z mikroskopom, opremljenim za epifluorescenčno mikroskopiranje, pri 630 ali 1 000-kratni povečavi v imerzijskem olju. S filtrom, primernim za fluorescein izotiocianat (FITC), so evbakterijske celice (kar vključuje večino gram negativnih celic) v vzorcu obarvane fluorescentno zeleno. S filtrom za tetrametilrodamin 5-izotiocianat so celice bakterije *R. solanacearum*, obarvane s Cy3, videti fluorescentno rdeče. Primerjamo morfolocijo celic z morfologijo pozitivnih kontrol. Celice morajo biti svetlo fluorescentne in povsem obarvane. Če pri obarvanju pride do odstopanj, je treba test FISH ponoviti (oddelek VI.A.7.). Okenca pregledamo vzdolž dveh pravokotnih premerov in po obodu. Pri vzorcih, ki ne kažejo nobenih celic ali le malo celic, opazujemo vsaj 40 mikroskopskih polj.

7.3.2 V testnih okencih testnih stekelc iščemo svetle fluorescenčne celice z značilno morfologijo bakterije *R. solanacearum* (glej spletno mesto http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Intenziteta fluorescence mora biti enaka ali večja kot pri sevu pozitivne kontrole. Celice z nepopolnim obarvanjem ali šibko fluorescenco se ne upoštevajo.

7.3.3 Če sumimo kontaminacijo, moramo test ponoviti. Do tega lahko pride, če vsa stekelca v seriji kažejo pozitivne celice zaradi kontaminacije pufra ali če najdemo pozitivne celice (zunaj okenc stekelc) na zgornji plasti stekelca.

7.3.4 S specifičnostjo testa FISH je povezanih več problemov. V krompirjevih peletah stebelnih delov in stolonov se lahko – čeprav veliko redkeje kot pri testu IF – pojavijo populacije fluorescentnih celic ozadja z atipično morfologijo in navzkrižno reagirajoče saprofitske bakterije, ki so po velikosti in morfologiji podobne bakteriji *R. solanacearum*.

7.3.5 Upoštevamo samo fluorescenčne celice značilne velikosti in morfologije.

7.3.6 Interpretacija rezultata testa FISH:

(i) Veljavne rezultate testa FISH dobimo, če opazimo celice, ki so po velikosti in morfologiji značilne za bakterijo *R. solanacearum*, in so s filtrom FITC videti fluorescentno svetlo zelene, s filtrom rodaminom pa fluorescentno svetlo rdeče. Opaziti jih moramo v vseh pozitivnih kontrolah in v nobeni od negativnih kontrol. Če najdemo svetle fluorescentne celice z značilno morfologijo, določimo povprečno število značilnih celic na mikroskopsko polje in izračunamo število značilnih celic na ml resuspendirane pelete (Dodatek 4). Vzorci z najmanj 5×10^3 značilnih celic na ml resuspendirane pelete veljajo za potencialno kontaminirane. Potrebni so nadaljnji testi. Vzorci z manj kot 5×10^3 značilnih celic na ml resuspendirane pelete veljajo za negativne.

(ii) Test FISH je negativen, če s filtrom rodaminom ne opazimo fluorescentnih živo rdečih celic z značilno velikostjo in morfologijo bakterije *R. solanacearum*, pod pogojem, da značilne živo rdeče fluoresecentne celice opazimo v preparatih pozitivne kontrole pri uporabi filtra rodamina.

8. **Testi ELISA**

Načelo

Test ELISA lahko uporabimo le kot dodatni test poleg testov IF, PCR ali FISH, saj ima ta test dokaj nizko občutljivost. Če uporabimo DAS ELISA, je obvezna obogatitev in uporaba monoklonalnih protiteles (glej spletno mesto http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Obogatitev vzorca pred uporabo testa ELISA je lahko koristna, saj poveča občutljivost testa, vendar lahko spodleti zaradi tekmovanja z drugimi organizmi v vzorcu.

Opomba: Uporabimo potrjen vir protiteles za *R. solanacearum* (glej spletno mesto http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Priporočljivo je, da se titer določi za vsako novo serijo protiteles. Titer je definiran kot najvišja razredčina, pri kateri pride do optimalne reakcije, če testiramo suspenzijo, ki vsebuje 10^5 do 10^6 celic na ml homolognega seva bakterije *R. solanacearum*, z ustreznimi konjugati sekundarnih protiteles v skladu z navodili proizvajalca. Med testiranjem protitelesa uporabljamo pri delovni razredčini blizu titra ali v vrednosti titra komercialne formulacije.

Titer protiteles določimo na suspenziji 10^5 do 10^6 celic na ml homolognega seva bakterije *R. solanacearum*.

Kot negativno kontrolo vključimo ekstrakt vzorca, ki je bil že testiran kot negativen za *R. solanacearum*, in suspenzijo ne-navzkrižno reagirajoče bakterije v fosfatnem pufru s soljo (PBS).

Kot pozitivno kontrolo uporabimo alikvote ekstrakta vzorca, ki so bili že testirani kot negativni, pomešane z 10^3 do 10^4 celicami na ml bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (npr. sev NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, glej Dodatek 2 A in B). Za primerjavo rezultatov na obeh ploščah uporabimo standardno suspenzijo 10^5 do 10^6 celic na ml v PBS bakterije *R. solanacearum*. Poskrbimo, da so pozitivne kontrole na mikrotitrski ploščici zagotovo ločene od testiranih vzorcev.

Standardizirani pozitivni in negativni kontrolni materiali, ki so na voljo za uporabo s tem testom, so navedeni v Dodatku 3, točka A.

Kontrolni material testiramo povsem enako kot vzorce.

Potrjena sta dva protokola za test ELISA:

(a) Posredni ELISA (Robinson Smith in sod., 1995)

1) Uporabimo 100-200 µl alikvota ekstrakta vzorca. (Segrevanje 4 minute pri 100 °C v vodni kopeli ali grelni enoti lahko v nekaterih primerih zmanjša število nespecifičnih rezultatov).

2) Dodamo enako količino karbonatnega premaznega pufra z dvojno koncentracijo (Dodatek 4) in močno premešamo.

3) V vsako od vsaj dveh vdolbinic na mikrotitrski ploščici odmerimo 100 µl alikvote (npr. Nunc-Polysorp ali ekvivalentni). Inkubiramo eno uro pri 37 °C ali čez noč pri 4 °C.

4) Otresemo ekstrakte iz vdolbinic. Vdolbinice trikrat speremo z raztopino PBS-Tween (Dodatek 4), pri čemer zadnjo izpiralno raztopino pustimo v vdolbinicah vsaj pet minut.

5) Pripravimo ustrezno razredčino protiteles za bakterijo *R. solanacearum* v blokirnem pufru (Dodatek 4). Za veljavna komercialna protitelesa uporabimo priporočene razredčine (običajno dvakrat bolj koncentrirane kot titer).

6) V vdolbinice nanesemo po 100 µl razredčine in inkubiramo eno uro pri 37 °C.

7) Otresemo raztopino iz vdolbinic. Vdolbinice speremo kakor prej (4).

8) Pripravimo ustrezno razredčino konjugata alkalne fosfataze sekundarnih protiteles v blokirnem pufru. V vdolbinice nanesemo po 100 µl razredčine in inkubiramo eno uro pri 37 °C.

9) Otresemo konjugat protiteles iz vdolbinic. Vdolbinice speremo kakor prej (4).

10) V vsako vdolbinico dodamo 100 µl raztopine substrata alkalne fosfataze (Dodatek 4). Inkubiramo v temnem prostoru pri sobni temperaturi in odčitavamo absorbanco pri 405 nm v rednih presledkih v 90 minutah.

(b) DASI ELISA

1) Pripravimo ustrezno razredčino poliklonalnih imunoglobulinov z delovanjem proti bakteriji *R. solanacearum* v premaznem pufru pH 9,6 (Dodatek 4). V vsako vdolbinico nanesemo 200 µl. Inkubiramo 4-5 ur pri 37 °C ali 16 ur pri 4 °C.

2) Vdolbinice trikrat izperemo z raztopino PBS-Tween (Dodatek 4).

Vsaj v 2 vdolbinici nanesemo 190 µl ekstrakta vzorca. Na vsaki ploščici dodamo tudi pozitivno in negativno kontrolo, vsako v po dve vdolbinici. Inkubiramo 16 ur pri 4 °C.

3) Vdolbinice trikrat izperemo z raztopino PBS-Tween (Dodatek 4).

4) Pripravimo ustrezno razredčino za bakterijo *R. solanacearum* specifičnih monoklonalnih protiteles v PBS (Dodatek 4), ki vsebuje tudi 0,5 % bovinega seruma albumina (BSA), in dodamo 190 µl v vsako vdolbinico. Inkubiramo 2 uri pri 37 °C.

5) Vdolbinice trikrat izperemo z raztopino PBS-Tween (Dodatek 4).

6) Pripravimo ustrezno razredčino antimišjih imunoglobulinov, konjugiranih z alkalno fosfatazo v PBS. V vsako vdolbinico nanesemo 190 µl. Inkubiramo 2 uri pri 37 °C.

7) Vdolbinice trikrat izperemo z raztopino PBS-Tween (Dodatek 4).

8) Pripravimo raztopino substrata alkalne fosfataze, ki vsebuje 1 mg p-nitrofenil fosfata na ml pufra substrata (Dodatek 4). V vsako vdolbinico nanesemo 200 µl. Inkubiramo v temnem prostoru pri sobni temperaturi in odčitavamo absorbanco pri 405 nm v rednih presledkih v 90 minutah.

Interpretacija rezultatov testa ELISA:

Test ELISA je negativen, če je povprečni odčitek optične gostote (OD) iz ponovitev vzorčnih vdolbinic < 2x vrednost OD v vdolbinici ekstrakta vzorca negativne kontrole, pod pogojem, da so OD pozitivnih kontrol vsi nad 1,0 (po 90 minutah inkubacije s substratom) in so več kot dvakrat večji od OD, ki je bil ugotovljen za negativne ekstrakte vzorca.

Test ELISA je pozitiven, če so povprečni odčitki OD iz ponovitev vzorčnih vdolbinic > 2x vrednosti OD v vdolbinici ekstrakta vzorca negativne kontrole, pod pogojem, da so odčitki OD v vseh vdolbinicah negativne kontrole < 2x vrednosti odčitkov v vdolbinicah pozitivne kontrole.

Negativni odčitki ELISA v vdolbinicah pozitivne kontrole kažejo, da test ni bil opravljen pravilno ali da je bil inhibiran. Pozitivni odčitki ELISA v vdolbinicah negativne kontrole kažejo, da je prišlo do navzkrižne kontaminacije ali nespecifične vezave protiteles.

9. **Biološki test**

Opomba: Predhodno testiranje s to metodo mora omogočati ponovljivo detekcijo 10^3 do 10^4 enot bakterije *R. solanacearum*, ki tvorijo kolonije, na ml dodano ekstraktom vzorcev, ki so bili prej testirani kot negativni (priprava glej Dodatek 3).

Največjo občutljivost detekcije lahko pričakujemo, če uporabljamo sveže pripravljen ekstrakt vzorca in imamo optimalne pogoje za rast. Metodo pa lahko uspešno uporabimo tudi za ekstrakte, ki so bili shranjeni pod glicerolom pri – 68 do – 86 °C.

Spodnji protokol temelji na Janse (1988):

9.1 Za vsak vzorec uporabimo 10 testnih rastlin - dovzetnih kultivarjev paradižnika (npr. Moneymaker ali kultivar z ekvivalentno dovzetnostjo, kot določi testni laboratorij) v fazi tretjega pravega lista. Za podrobnosti o kulturah glej Dodatek 8. Uporabimo lahko tudi jajčevce (npr. kultivar Black Beauty ali kultivarje z ekvivalentno dovzetnostjo), uporabimo samo rastline v fazi listov 2–3, vse do popolnega razprostrtja tretjega pravega lista. Simptomi pri jajčevcu so se pokazali kot blažji in se razvijejo počasneje. Kjer je mogoče, je zato priporočljiva uporaba paradižnikovih sadik.

9.2 Med testne rastline porazdelimo 100 µl ekstrakta vzorca.

9.2.1 Inokulacija z brizgalko

Inokuliramo v steblo tik nad kličnima listoma z brizgalko, na kateri je nameščena igla (ne manj kot 23G). Vzorec porazdelimo med testne rastline.

9.2.2 Inokulacija v zarezo

Rastlino držimo med dvema prstoma in odpipetiramo kapljico (približno 5-10 µl) suspendirane pelete na steblo med kličnima listoma in prvim listom.

S sterilnim skalpelom naredimo diagonalno zarezo, dolgo približno 1,0 cm in globoko približno 2/3 debeline stebla. Zarežemo ob kapljici pelete.

Zarezo zalepimo s sterilnim vazelinom iz brizge.

9.3 Inokuliramo z isto tehniko, 5 sadik z vodno suspenzijo 10^5 do 10^6 celic na ml, pripravljeno iz 48 urne kulture virulentnega biovarja 2 seva bakterije *R. solanacearum* kot pozitivno kontrolo, in s peletnim pufrom (Dodatek 4) kot negativno kontrolo. Rastline pozitivne in negativne kontrole ločimo od drugih rastlin, da ne bi prišlo do navzkrižne kontaminacije.

9.4 Testne rastline gojimo v karanteni do 4 tedne pri 25-30 °C in v visoki relativni vlažnosti in primerno zalivamo, da ne bi prišlo do zasičenja z vodo oziroma do venenja zaradi pomanjkanja vode. Da ne bi prišlo do kontaminacije, inkubiramo rastline pozitivne in negativne kontrole na jasno ločenih klopeh v rastlinjaku oziroma rastni komori, in če je prostor omejen, zagotovimo strogo ločitev med obravnavanimi primeri. Če morajo biti rastline iz različnih vzorcev inkubirane blizu skupaj, jih ločimo z ustreznimi zasloni. Ko gnojimo, zalivamo, pregledujemo in delamo karkoli drugega, moramo zelo paziti, da ne bi prišlo do navzkrižne kontaminacije. Rastlinjaki in rastne komore morajo biti obvezno brez vseh insektnih zajedalcev, ker ti lahko prenašajo bakterijo z vzorca na vzorec.

Opazujemo, če se pojavijo simptomi venenja, epinastije, kloroze in krnenja.

9.5 Izoliramo od inficiranih rastlin (oddelek II.3) in identificiramo prečiščene kulture domnevne bakterije *R. solanacearum* (oddelek VI. B).

9.6 Če po 3 tednih ne opazimo simptomov, opravimo test IF/PCR/izolacije na kompozitnem vzorcu delov stebel dolžine 1 cm vsake testne rastline, odvzetih nad mestom inokulacije. Če je test pozitiven, naredimo razmaz razredčine (oddelek 4.1).

9.7 Identificiramo morebitne prečiščene kulture domnevne bakterije *R. solanacearum* (oddelek VI. B).

Interpretacija rezultatov biološkega testa

Veljavne rezultate biološkega testa dobimo, če rastline pozitivne kontrole izkazujejo značilne simptome, če bakterije iz teh rastlin lahko ponovno izoliramo in na negativnih kontrolah ne odkrijemo simptomov.

Biološki test je negativen, če testne rastline niso okužene z bakterijo *R. solanacearum* in pod pogojem, da bakterijo *R. solanacearum* opazimo v pozitivnih kontrolah.

Biološki test je pozitiven, če so testne rastline okužene z bakterijo *R. solanacearum*.

B. *IDENTIFIKACIJSKI TESTI*

Čiste kulture domnevnih izolatov bakterije *R. solanacearum* identificiramo z vsaj dvema od naslednjih testov, ki temeljijo na različnih bioloških načelih.

Za vsak opravljeni test vključimo znane referenčne seve, kjer je to primerno (glej Dodatek 3).

1. **Hranilni in encimski identifikacijski testi**

Določimo naslednje lastnosti fenotipov, ki so pri *R. solanacearum* vselej prisotne ali odsotne, v skladu z metodami Lelliott in Stead (1987), Klement in sod. (1990), Schaad (2001)

Test	Pričakovani rezultat
Fluorescentni pigment	–
Vključki PHB	+
Oksidacijski/fermentacijski (O/F) test	O+/F–
Katalaza	+
Oksidaza po Kovacsu	+
Redukcija nitrata	+
Izraba citrata	+
Rast pri 40 °C	–
Rast v 1 % NaCl	+
Rast v 2 % NaCl	–
Arginin dihidrolaza	–
Utekočinjenje želatine	–
Hidroliza škroba	–
Hidroliza ezulina	–
Produkcija levana	–

2. **IF test**

2.1 Pripravimo suspenzijo približno 10^6 celic na ml v IF pufru (Dodatek 4).

2.2 Pripravimo niz dvakratnih razredčin ustreznega antiseruma (glej spletno mesto http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

2.3 Izvedemo postopek IF (oddelek VI.A.5).

2.4 Test IF je pozitiven, če je IF-titer kulture enakovreden titru pozitivne kontrole.

3. **Test ELISA**

Opomba: Če delamo le 2 identifikacijska testa, poleg te metode ne smemo uporabiti še enega serološkega testa.

3.1 Pripravimo suspenzijo približno 10^8 celic na ml v 1X PBS (Dodatek 4).

3.2 Izvedemo ustrezni postopek ELISA z monoklonalnim protitelesom, specifičnim za *R. solanacearum*.

3.3 Test ELISA je pozitiven, če odčitek ELISA iz kulture doseže vsaj polovico vrednosti odčitka pozitivne kontrole.

4. **Testi PCR**

4.1 Pripravimo suspenzijo približno 10^6 celic na ml v sterilni vodi molekulske stopnje.

4.2 Štiri minute segrevamo 100 µl suspenzije celic v zaprtih epruvetah v grelni enoti ali vreli vodni kopeli pri 100 °C. Vzorce nato lahko shranimo pri – 16 do – 24 °C, dokler jih ne potrebujemo.

4.3 Izvedemo ustrezne postopke PCR, da pomnožimo za bakterijo *R. solanacearum* specifične pomnožke (npr. Seal in sod. (1993); Pastrik in Maiss (2000); Pastrik in sod. (2002); Boudazin in sod. (1999); Opina in sod. (1997), Weller in sod. (1999).

4.4 Pozitivno identifikacijo *R. solanacearum* dosežemo, če so pomnožki PCR enake velikosti in imajo enak polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov kot sev pozitivne kontrole.

5. **Test FISH**

5.1 Pripravimo suspenzijo približno 10^6 celic na ml v ultra čisti vodi.

5.2 Opravimo postopek FISH (oddelek VI.A.7) z vsaj dvema oligo-sondama, specifičnima za *R. solanacearum* (Dodatek 7).

5.3 Pozitiven test FISH dosežemo, če dobimo iste reakcije iz kulture in pozitivne kontrole.

6. **Profiliranje maščobnih kislin (FAP)**

6.1 Kulturo 48 ur pri 28 °C gojimo na triptikaznem sojinem agarju (Oxoid).

6.2 Izvedemo ustrezen postopek FAP (Janse, 1991; Stead, 1992).

6.3 Test FAP je pozitiven, če je profil domnevne kulture identičen profilu pozitivne kontrole. Prisotnost značilnih maščobnih kislin 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH in 18:1 2OH in odsotnost 16:0 3OH je močan indikator vrste *R.*

7. **Metode opredelitve seva**

Za vsak nov primer izolacije *R. solanacearum* se priporoča opredelitev seva po eni od naslednjih metod.

Za vsak opravljeni test vključimo znane referenčne seve, kjer je to primerno (glej Dodatek 3).

7.1 Določanje biovarja

R. solanacearum se deli na biovarje na podlagi zmožnosti izrabe in/ali oksidacije treh disaharidov in treh heksoznih alkoholov (Hayward, 1964 in Hayward in sod., 1990). Rastna gojišča za test biovarja so opisana v Dodatku 2. Test lahko uspešno izvedemo tako, da inokuliramo gojišče s čistimi kulturami izolatov *R. solanacearum* in inkubiramo pri 28 °C. Če gojišče razdelimo v sterilne plošče celične kulture s 96 vdolbinicami (200 µl na vdolbinico), je mogoče v 72 urah opaziti spremembo barve z olivno zelene na rumeno, kar kaže na pozitivni rezultat testa.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Izraba:					
maltoze	–	+	+	–	+
laktoze	–	+	+	–	+
D (+) celobioze	–	+	+	–	+
manitola	–	–	+	+	+
sorbitola	–	–	+	+	–
dulcitola	–	–	+	+	–

Dodatni testi delijo biovar 2 na podfenotipe.

	Biovar 2A (razširjenost po vsem svetu)	Biovar 2A (v Čilu in Kolumbiji)	Biovar 2T (v tropskih območjih)
izraba trehaloze	–	+	+
izraba *mezo*-inozitola	+	–	+
izraba D-riboze	–	–	+
pektolitična aktivnost ([1])	nizka	nizka	visoka

([1]) Glej Lelliott in Stead (1987).

7.2 Iskanje prstnih odtisov genoma

Molekularno razlikovanje sevov v kompleksu bakterije *R. solanacearum* je mogoče opraviti z več tehnikami, med drugim:

7.2.1 Analiza polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) (Cook in sod., 1989)

7.2.2 Ponavljajoče zaporedje PCR z uporabo primerjev REP, BOX in ERIC (Louws in sod., 1995; Smith in sod., 1995)

7.2.3 Analiza polimorfizma dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP) (Van der Wolf in sod., 1998)

7.3 Metode PCR

Za razločevanje sevov, ki pripadajo delitvi 1 (biovarji 3, 4 ad 5) in delitvi 2 (biovarji 1, 2A in 2T) bakterije *R. solanacearum*, lahko uporabimo specifične PCR primerje (Pastrik in sod, 2002; glej Dodatek 6), kot je bilo prvotno določeno z analizo RFLP (Cook in sod., 1989) in določanjem zaporedja 16S rDNA (Taghavi in sod., 1996).

C. *POTRDITVENI TEST*

Test patogenosti je treba opraviti kot zadnjo potrditev diagnoze za *R. solanacearum* in za ocenitev virulentnosti kultur, identificiranih kot *R. solanacearum*.

1) Pripravimo inokulum s približno 10^6 celic na ml iz 24–48-urne kulture izolata, ki ga nameravamo testirati, in ustrezni pozitivni kontrolni sev bakterije *R. solanacearum* (npr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; glej Dodatek 3).

2) Inokuliramo 5–10 dovzetnih rastlin paradižnika ali jajčevca, najbolje v fazi tretjega pravega lista (oddelek VI.A.9).

3) Inkubiramo največ dva tedna pri 25–28 °C in visoki relativni vlažnosti ter ustrezno zalivamo, da ne prihaja do zasičenosti z vodo ali pomanjkanja vode. Pri čistih kulturah bi se moralo značilno venenje pojaviti v 14 dneh. Če po tem obdobju niso prisotni simptomi, kulture ni mogoče potrditi kot patogene oblike bakterije *R. solanacearum*.

4) Opazujemo, če se pojavijo simptomi venenja in/ali epinastije, kloroze in krnenja.

5) Izoliramo od simptomatičnih rastlin, tako da odstranimo del stebla približno 2 cm nad točko inokulacije. Zmeljemo in suspendiramo v majhni količini sterilne destilirane vode ali 50 mM fosfatnega pufra (Dodatek 4). Izoliramo iz suspenzije z razmazom ali načrtanjem razredčine na ustrezno gojišče, po možnosti na selektivno gojišče (Dodatek 2), inkubiramo 48-72 ur pri 28 °C in opazujemo tvorbo kolonij, značilnih za bakterijo *R. solanacearum*.

Dodatek 1

Laboratoriji, ki optimizirajo in potrjujejo protokole

Laboratorij [1]	Lokacija	Država
Agentur für Gesundheit und Ernahrungssicherheit	Dunaj in Linz	Avstrija
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgija
Plantedirektoratet	Lyngby	Danska
Central Science Laboratory	York	Anglija
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburg	Škotska
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Francija
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francija
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Nemčija
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Nemčija
State Laboratory	Dublin	Irska
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	Italija
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Italija
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Nizozemska
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nizozemska
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lizbona	Portugalska
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Španija
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Španija
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Švedska

[1] Kontakti znanstvenikov: glej spletno mesto http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main.

Dodatek 2

Gojišča za izolacijo in gojenje bakterije *R. solanacearum*

(a) **Splošna rastna gojišča**

Hranilni agar (NA)

Hranilni agar (Difco)	23,0 g
Destilirana voda	1,0 L

Raztopimo sestavine in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Agar s kvasom, peptonom in glukozo (YPGA)

Kvasni ekstrakt (Difco)	5,0 g
Pepton Bacto (Difco)	5,0 g
D(+)-glukoza (monohidrat)	10,0 g
Agar Bacto (Difco)	15,0 g
Destilirana voda	1,0 L

Raztopimo sestavine in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Agar s saharozo in peptonom (SPA)

Saharoza	20,0 g
Pepton Bacto (Difco)	5,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
Agar Bacto (Difco)	15,0 g
Destilirana voda	1,0 L
pH 7,2–7,4	

Raztopimo sestavine in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Tetrazolno gojišče po Kelmanu

Kazaminske kisline (Difco)	1,0 g
Pepton Bacto (Difco)	10,0 g
Dekstroza	5,0 g
Agar Bacto (Difco)	15,0 g
Destilirana voda	1,0 L

Raztopimo sestavine in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Ohladimo do 50 °C. Dodamo s filtriranjem sterilizirano raztopino 2,3,5-trifenil tetrazolijevega klorida (Sigma), tako da dobimo končno koncentracijo 50 mg na liter.

(b) **Potrjena selektivna rastna gojišča**

Gojišče SMSA (Englebrecht, 1994, spremenjeno v Elphinstone in sod., 1996)

Osnovno gojišče	
Kazaminske kisline (Difco)	1,0 g
Pepton Bacto (Difco)	10,0 g
Glicerol	5,0 ml
Agar Bacto (Difco); glej *opombo 2*.	15,0 g
Destilirana voda	1,0 L

Raztopimo sestavine in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Ohladimo na 50 °C in dodamo s filtriranjem sterilizirane osnovne raztopine naslednjih sestavin, da dobimo določene končne koncentracije:

Kristalvijolično (Sigma)	5 mg na L
Polimiksin B sulfat	(Sigma P-1004) 600 000 U (približno 100 mg) na L
Bacitracin (Sigma B-0125)	1 250 U (približno 25 mg) na L
Kloramfenikol (Sigma C-3175)	5 mg na L
Penicillin-G (Sigma P-3032)	825 U (približno 0,5 mg) na L
2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid (Sigma)	50 mg na L

OPOMBA:

1. Uporaba reagentov, ki niso navedeni zgoraj, lahko vpliva na rast bakterije *R. solanacearum*.
2. Namesto agarja Bacto (Difco) lahko uporabimo agar Oxoid št. 1. V tem primeru bo rast bakterije *R. solanacearum* počasnejša, čeprav se lahko upočasni tudi rast tekmujočih saprofitskih bakterij. Značilne kolonije bakterije *R. solanacearum* se tvorijo 1-2 dni dlje in rdeča obarvanost je svetlejša in bolj razpršena kot pri agarju Bacto.
3. Če povečamo koncentracijo bacitracina na 2 500 U na liter, se lahko zmanjšajo populacije tekmujočih bakterij, ne da bi to vplivalo na rast bakterije *R. solanacearum*.

Gojišča in osnovne raztopine antibiotikov hranimo pri 4 °C v temi in porabimo v enem mesecu.

Pred uporabo moramo s plošč odstraniti površinski kondenz.

Plošč ne smemo pretirano sušiti.

Nadzor kakovosti je treba opraviti, potem ko smo pripravili vsako novo serijo gojišča, tako da razmažemo suspenzijo referenčne kulture *R. solanacearum* (glej Dodatek 3) in opazujemo tvorbo značilnih kolonij po 2-5 dneh inkubacije pri 28 °C.

(c) **Potrjena obogatitvena gojišča**

Bujon SMSA (Elphinstone in sod., 1996)

Pripravimo kot za selektivno gojišče SMSA z agarjem, vendar ne dodamo agarja Bacto in 2,3,5-tetrazolijevega klorida.

Modificiran bujon Wilbrink (Caruso in sod., 2002)

Saharoza	10 g
Proteoza pepton	5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4$	0,25 g
$NaNO_3$	0,25 g
Destilirana voda	1 L

Steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut in ohladimo na 50 °C.

Dodamo osnovne raztopine antibiotikov, kot pri bujonu SMSA.

Dodatek 3

A. **Komercialno dostopni standardizirani kontrolni material**

(a) *Bakterijski izolati*

Naslednji izolati so priporočljivi za uporabo kot standardni referenčni material, ali kot pozitivna kontrola (Tabela 1) ali med optimizacijo testov za preprečevanje navzkrižnih reakcij (Tabela 2). Vsi sevi so na voljo pri:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), Central Science Laboratory, York, Združeno kraljestvo

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

3. Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), INRA Station Phytobactériologie, Angers, Francija.

Tabela 1 Referenčna tabela SMT izolatov bakterije *R. solanacearum*

Koda NCPPB	št. SMT #	Druge kode	Država porekla	Biovar
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egipt	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turčija	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Anglija	2
NCPPB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Ciper	2
NCPPB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Švedska	2
NCPPB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgija	2
NCPPB 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Nizozemska	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15.59	Francija	2
NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80, NCPBB 4066	Portugalska	2
NCPPB 4160	69	IVIA-1632-2	Španija	2
NCPPB 4161	76	B3B	Nemčija	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	ZDA	1
NCPPB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONg7	Kostarika	1
NCPPB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Kolumbija	2
NCPPB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPPB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brazilija	2T
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Avstralija	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CMIb2861	Šri Lanka	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipini	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Kitajska	5

(*) Uporabiti kot standardni referenčni sev bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (rasa 3).

Opomba: Pristnost zgoraj navedenih sevov je mogoče zagotoviti le, če smo jih dobili iz avtentične zbirke kultur.

Tabela 2 Referenčna tabela SMT serološko ali genetsko sorodnih bakterij za uporabo pri optimizaciji detekcijskih testov

Koda NCPPB	št. SMT #	Druga koda	Identifikacija
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	*Bakterija BBD* (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 1 844,06	*Flavobacterium* sp. (1) (2)

(1) Potencialen navzkrižno reagirajoči sev v seroloških testih (IF in/ali ELISA) s poliklonalnimi antiserumi.
(2) Sev, iz katerega je mogoče v nekaterih laboratorijih pomnožiti produkt PCR podobne velikosti na velikost, ki se pričakuje ob uporabi določenih primerjev OLI-1 in Y-2 (glej Dodatek 6).
(3) Verjetna navzkrižna reakcija pri večini testov, vendar je znano, da se pojavlja le na bananah v Indoneziji.

(b) *Komercialno dostopni standardizirani kontrolni material*

Spodaj navedeni standardni kontrolni material je na voljo iz zbirke kultur NCPPB.

Liofilizirane pelete ekstrakta krompirja iz 200 zdravih gomoljev krompirja kot negativna kontrola za vse teste.

Liofilizirane pelete ekstrakta krompirja iz 200 zdravih gomoljev krompirja, ki vsebujejo 10^3 do 10^4 in 10^4 do 10^6 celic bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (sev NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) kot pozitivna kontrola za serološke teste in teste PCR. Ker liofilizacija vpliva na sposobnost celic za življenje, te niso primerne kot standardna kontrola za izolacijske in biološke teste.

V formalinu fiksirane suspenzije bakterije *R. solanacearum* biovar 2 (sev NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3 857) s 10^6 celic na ml kot pozitivna kontrola za serološke teste.

B. **Priprava pozitivne in negativne kontrole za jedrne presejalne teste PCR/IF in FISH**

Ustvarimo 48-urno kulturo virulentnega seva bakterije *R. solanacearum* rasa 3/biovar 2 (npr. sev NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) na osnovnem gojišču SMSA in suspendiramo v 10 mM fosfatnega pufra, da dobimo gostoto celic približno 2×10^8 enot, ki tvorijo kolonije, na ml. To običajno dosežemo pri rahlo motni suspenziji, ekvivalentni optični gostoti 0,15 pri 600 nm.

Odstranimo jedra stolonov 200 gomoljev, ki smo jih izbrali iz vrste z belo kožo, za katero je znano, da je ni napadla bakterija *R. solanacearum*.

Jedra stolonov obdelamo kot ponavadi in resuspendiramo peleto v 10 ml.

Pripravimo 10 sterilnih 1,5 ml mikroepruvet z 900 µl resuspendirane pelete.

100 µl suspenzije *R. solanacearum* prenesemo v prvo mikroepruveto. Vrtinčimo.

Ugotovimo desetkratne stopnje kontaminacije, tako da še naprej razredčimo v naslednjih petih mikroepruvetah.

Šest kontaminiranih mikroepruvet bomo uporabili za pozitivno kontrolo. Štiri nekontaminirane mikroepruvete bomo uporabili za negativno kontrolo. Ustrezno označimo mikroepruvete.

Pripravimo alikvote po 100 µl v sterilnih 1,5 ml mikroepruvetah, da dobimo 9 kopij vsakega kontrolnega vzorca. Do uporabe hranimo pri – 16 do – 24 °C.

Prisotnost in število *R. solanacearum* v kontrolnih vzorcih moramo najprej potrditi s testom IF.

Za test PCR opravimo ekstrakcijo DNK iz vzorcev pozitivne in negativne kontrole pri vsaki seriji testnih vzorcev.

Za testa IF in FISH opravimo teste na vzorcih pozitivne in negativne kontrole pri vsaki seriji testnih vzorcev.

Za teste IF, FISH in PCR moramo detektirati vsaj 10^6 in 10^4 celic/ml bakterije *R. solanacearum* pri pozitivni kontroli in nobenih pri negativni kontroli.

Dodatek 4

Pufri za testne postopke

SPLOŠNO: Neodprte sterilizirane pufre lahko shranjujemo do enega leta.

1. **Pufri za postopek ekstrakcije**

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

Ta pufer uporabljamo za ekstrakcijo bakterije iz rastlinskih tkiv s homogenizacijo ali tresenjem.

Na_2HPO_4 (brez vode)	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Destilirana voda	1,00 L

Raztopimo sestavine, preverimo pH in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Koristne so lahko tudi naslednje dodatne sestavine:

	Namen	Količina (na liter)
Kosmiči Lubrol	deflokulant (*)	0,5 g
Protipenilno sredstvo DC silikon	protipenilno sredstvo (*)	1,0 ml
Tetranatrijev pirofosfat	antioksidant	1,0 g
Polivinilpirolidon-40000 (PVP-40)	vezava inhibitorjev PCR	50 g

(*) Za uporabo pri homogenizacijski ekstrakcijski metodi.

1.2 Peletni pufer (10 mM fosfatni pufer, pH 7,2)

Ta pufer se uporablja za resuspenzijo in redčenje ekstraktov jeder stolonov gomoljev krompirja, čemur sledi koncentriranje v peleto s centrifugiranjem.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
Destilirana voda	1,0 L

Raztopimo sestavine, preverimo pH in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

2. **Pufri za test IF**

2.1 IF-pufer (10 mM fosfatni pufer s soljo (PBS), pH 7,2)

Ta pufer se uporablja za redčenje protiteles.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
NaCL	8,0 g
Destilirana voda	1,0 L

Raztopimo sestavine, preverimo pH in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

2.2 IF-pufer Tween

Ta pufer se uporablja za pranje stekelc.

IF-pufru dodamo 0,1 % Tween 20.

2.3 Fosfatni pufer z glicerolom, pH 7,6

Ta pufer se uporablja kot prekrivna tekočina na okencih stekelc IF za ojačanje fluorescence.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,15 g
Glicerol	50 ml
Destilirana voda	100 ml

Raztopine prekrivnega pufra proti bledenju je mogoče kupiti, npr. Vectashield® (Vector Laboratories) ali Citifluor® (Leica).

3. **Pufri za posredni test ELISA**

3.1 Premazni pufer z dvojno koncentracijo, pH 9,6.

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

Raztopimo sestavine, preverimo pH in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Kot antioksidant lahko dodamo natrijev sulfit (0,2 %), da preprečimo nalaganje oksidiranih aromatskih spojin.

3.2 10X fosfatni pufer s soljo (PBS), pH 7,4

NaCL	80,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	29,0 g
KCl	2,0 g
Destilirana voda	1,0 L

3.3 PBS-Tween

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

3.4 Blokirni pufer (protitelesa) (moramo pripraviti sveže)

10X PBS	10,0 ml
Polivinilpirolidon-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Mleko v prahu	0,5 g
Destilirana voda	dopolnimo do 100 ml

3.5 Raztopina substrata alkalne fosfataze, pH 9,8

Dietanolamin	97 ml
Destilirana voda	800 ml

Premešamo in s koncentrirano HCl uravnamo pH na 9,8.

Dopolnimo z destilirano vodo do enega litra.

Dodamo 0,2 g $MgCl_2$

Raztopimo dve 5-miligramski tableti fosfataznega substrata (Sigma) na 15 ml raztopine.

4. **Pufri za test DASI ELISA**

4.1 Premazni pufer, pH 9,6.

Na_2CO_3	1,59 g
$NaHCO_3$	2,93 g
Destilirana voda	1 000 ml

Sestavine raztopimo in preverimo, da je pH 9,6.

4.2 10X fosfatni pufer s soljo (PBS), pH 7,2–7,4

NaCl	80,0 g
$NaH_2PO_4.2\ H_2O$	4,0 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	27,0 g
Destilirana voda	1 000 ml

4.3 PBS-Tween

10X PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilirana voda	950 ml

4.4 Pufer substrata, pH 9,8.

Dietanolamin	100 ml
Destilirana voda	900 ml

Premešamo in s koncentrirano HCl uravnamo pH na 9,8.

Dodatek 5

Ugotavljanje stopnje kontaminacije pri testih IF in FISH

1. Preštejemo povprečno število značilnih fluorescentnih celic na vidno polje (c).

2. Izračunamo število značilnih fluorescenčnih celic na okence mikroskopskega stekelca (C).

   $C = c \times S/s$

   pri čemer S = površina okenca pri stekelcu z več okenci
   in s = površina polja objektiva

   $s = \pi i^2/4G^2K^2$ pri čemer i = koeficient polja (odvisen od vrste okularja in znaša od 8 do 24)
   K = koeficient tubusa (1 ali 1,25)
   G = povečava (100×, 40× itd.) objektiva.

3. Izračunamo število značilnih fluorescentnih celic na ml resuspendirane pelete (N).

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

   pri čemer y = količina resuspendirane pelete na okencu
   in F = faktor razredčitve pelete.

Dodatek 6

Potrjeni PCR protokoli in reagenti

Opomba: Predhodno testiranje mora omogočati ponovljivo detekcijo 10^3 do 10^4 celic bakterije *R. solanacearum* na ml ekstrakta vzorca.

Predhodno testiranje tudi ne sme pokazati lažnih pozitivnih rezultatov pri naboru izbranih bakterijskih sevov (glej Dodatek 3).

1. **Protokol PCR po Seal in sod. (1993)**

1.1 Začetna zaporedja oligonukleotidov

Začetni oligonukleotid OLI-1 5′-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3′

Začetni oligonukleotid Y-2 5′-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3′

Pričakovana velikost pomnožkov iz matrice DNK *R. solanacearum* = 288 bp

1.2 Reakcijska zmes PCR

Reagent	Količina na reakcijo	Končna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	17,65 µl	
10x PCR pufer (1) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
dNTP zmes (20mM)	0,25 µl	0,2 mM
Začetni oligonukleotid OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Začetni oligonukleotid Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Taq polimeraza (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Volumen vzorca	2,0 µl	
Skupni volumen:	25 µl	

(1) Metoda je bila potrjena z uporabo *Taq* polimeraze v Perkin Elmer (AmpliTaq) in Gibco BRL.

1.3 Pogoji reakcije PCR

Zaženite naslednji program:

1 cikel:	(i)	2 minuti pri 96 °C (denaturacija matrice DNK)
35 ciklov:	(ii)	20 sekund pri 94 °C (denaturacija matrice DNK)
	(iii)	20 sekund pri 68 °C (prileganje začetnih oligonukleotidov)
	(iv)	30 sekund pri 72 °C (podaljševanje kopije)
1 cikel:	(v)	10 minut pri 72 °C: (končno podaljševanje)
	(vi)	pustimo pri 4 °C

Opomba: Ta program je bil optimiran za uporabo s cikličnim termostatom Perkin Elmer 9600. Pri drugih cikličnih termostatih je lahko potrebna prilagoditev trajanja ciklov (ii), (iii) in (iv).

1.4 Restrikcijska encimska analiza pomnožka

Produkti PCR, pomnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum*, proizvedejo značilen polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov z encimom *Ava* II po inkubaciji pri 37 °C.

2. **Protokol PCR po Pastrik in Maiss (2000)**

2.1 Začetna zaporedja oligonukleotidov

Začetni oligonukleotid Ps-1 5′- agt cga acg gca gcg ggg g -3′

Začetni oligonukleotid Ps-2 5′- ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca -3′

Pričakovana velikost pomnožkov iz matrice DNK *R. solanacearum* = 553 bp.

2.2 Reakcijska zmes PCR

Reagent	Količina na reakcijo	Končna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	16,025 µl	
10x PCR pufer (1)	2,5 µl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP zmes (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Začetni oligonukleotid Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Začetni oligonukleotid Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq polimeraza (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Volumen vzorca	5,0 µl	
Skupni volumen:	25,0 µl	

(1) Metode so bile potrjene z uporabo *Taq* polimeraze v Perkin Elmer (AmpliTaq) in Gibco BRL.
Opomba: Prvotno optimirano za ciklični termostat MJ Research PTC 200 z Gibco *Taq* polimerazo. Pri istih koncentracijah smemo uporabiti tudi AmpliTaq in pufer za Perkin Elmer.

2.3 Pogoji reakcije PCR

Zaženite naslednji program:

1 cikel:	(i)	5 minuti pri 95 °C (denaturacija matrice DNK)
35 ciklov:	(ii)	30 sekund pri 95 °C (denaturacija matrice DNK)
	(iii)	30 sekund pri 68 °C (prileganje začetnih oligonukleotidov)
	(iv)	45 sekund pri 72 °C (podaljševanje kopije)
1 cikel:	(v)	5 minut pri 72 °C: (končno podaljševanje)
	(vi)	pustimo pri 4 °C.

Opomba: Ta program je optimiran za uporabo s cikličnim termostatom MJ Research PTC 200. Pri drugih cikličnih termostatih je lahko potrebna prilagoditev trajanja ciklov (ii), (iii) in (iv).

2.4 Restrikcijska encimska analiza pomnožka

Prdukti PCR, pomnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum*, proizvedejo značilen polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov z encimom *Taq* I po 30-minutni inkubaciji pri 65 °C. Restrikcijski fragmenti, pridobljeni iz fragmenta, specifičnega za *R. solanacearum*, so veliki 457 bp in 96 bp.

3. **Multipli protokoli PCR z notranjo kontrolo PCR (Pastrik in sod., 2002)**

3.1 Začetna zaporedja oligonukleotidov

Začetni oligonukleotid RS-1-F 5′- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3′

Začetni oligonukleotid RS-1-R 5′- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3′

Začetni oligonukleotid NS-5-F 5′- AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G -3′

Začetni oligonukleotid NS-6-R 5′- GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC -3′

Pričakovana velikost pomnožkov iz matrice DNK *R. solanacearum* = 718 bp (niz začetnih oligonukleotidov RS)

Pričakovana velikost pomnožkov iz 18S rRNA notranje kontrole PCR = 310 bp (niz začetnih oligonukleotidov NS).

3.2 Reakcijska zmes PCR

Reagent	Količina na reakcijo	Končna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	12,625 µl	
10x PCR pufer (1) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP zmes (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Začetni oligonukleotid RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Začetni oligonukleotid RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Začetni oligonukleotid NS-5-F (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µM
Začetni oligonukleotid NS-6-R (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µM
Taq polimeraza (5U/µl) (1)	0,2 µl	1,0 U
Volumen vzorca	5,0 µl	
Skupni volumen:	25,0 µl	

(1) Metode so bile potrjene z uporabo *Taq* polimeraze v Perkin Elmer (AmpliTaq) in Gibco BRL.

(2) Koncentracije začetnih oligonukleotidov NS-5-F in NS-6-R so bile optimirane za ekstrakcijo jeder stolonov krompirja s homogenizacijsko metodo in prečiščevanje DNK po Pastriku (2000) (glej oddelek VI.A.6.1.a). Ponovna optimizacija koncentracij reagentov bo potrebna, če uporabimo ekstrakcijo s stresanjem ali druge metode izoliranja DNK.

3.3 Pogoji reakcije PCR

Zaženite naslednji program:

1 cikel:	(i)	5 minuti pri 95 °C (denaturacija matrice DNK)
35 ciklov:	(ii)	30 sekund pri 95 °C (denaturacija matrice DNK)
	(iii)	30 sekund pri 58 °C (prileganje začetnih oligonukleotidov)
	(iv)	45 sekund pri 72 °C (podaljševanje kopije)
1 cikel:	(v)	5 minut pri 72 °C: (končno podaljševanje)
	(vi)	pustimo pri 4 °C.

Opomba: Ta program je optimiran za uporabo s cikličnim termostatom MJ Research PTC 200. Pri drugih cikličnih termostatih je lahko potrebna prilagoditev trajanja ciklov (ii), (iii) in (iv).

3.4 Restrikcijska encimska analiza pomnožka

Produkti PCR, pomnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum*, proizvedejo značilen polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov z encimom *Bsm* I ali izoshizomerom (npr. Mva 1269-I) po 30-minutni inkubaciji pri 65 °C.

4. **Protokol PCR, specifičen za biovar *R. solanacearum* (Pastrik in sod, 2001)**

4.1 Začetna zaporedja oligonukleotidov

Začetni oligonukleotid Rs-1-F 5′- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3′

Začetni oligonukleotid Rs-1-R 5′- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3′

Začetni oligonukleotid Rs-3-R 5′- TTC ACG GCA AGA TCG CTC -3′

Pričakovana velikost pomnožkov iz matrice DNK *R. solanacearum*:

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

z Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp.

4.2 Reakcijska zmes PCR

(a) Specifični PCR za biovar 1/2

Reagent	Količina na reakcijo	Končna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	12,925 µl	
10X PCR pufer (1)	2,5 µl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-NTP zmes (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Začetni oligonukleotid Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Začetni oligonukleotid Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq polimeraza (5U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Volumen vzorca	5,0 µl	
Skupni volumen:	25,0 µl	

(1) Metode so bile potrjene z uporabo *Taq* polimeraze v Perkin Elmer (AmpliTaq) in Gibco BRL.

(b) Specifični PCR za biovar 3/4/5

Reagent	Količina na reakcijo	Končna koncentracija
Sterilna ultra čista voda	14,925 µl	
10X PCR pufer (1)	2,5 µl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frakcija V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP zmes (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Začetni oligonukleotid Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Začetni oligonukleotid Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq polimeraza (5U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Volumen vzorca	5,0 µl	
Skupni volumen:	25,0 µl	

(1) Metode so bile potrjene z uporabo *Taq* polimeraze v Perkin Elmer (AmpliTaq) in Gibco BRL.

4.3 Pogoji reakcije PCR

Zaženemo naslednji program za specifične reakcije tako za biovar 1/2 kot biovar 3/4/5:

1 cikel:	(i)	5 minuti pri 95 °C (denaturacija matrice DNK)
35 ciklov:	(ii)	30 sekund pri 95 °C (denaturacija matrice DNK)
	(iii)	30 sekund pri 58 °C (prileganje začetnih oligonukleotidov)
	(iv)	45 sekund pri 72 °C (podaljševanje kopije)
1 cikel:	(v)	5 minut pri 72 °C: (končno podaljševanje)
	(vi)	pustimo pri 4 °C.

Opomba: Ta program je bil optimiran za uporabo s cikličnim termostatom MJ Research PTC 200. Pri drugih cikličnih termostatih je lahko potrebna prilagoditev trajanja ciklov (ii), (iii) in (iv).

4.4 Restrikcijska encimska analiza pomnožka

Produkti PCR, pomnoženi iz DNK bakterije *R. solanacearum*, s primerji Rs-1-F in Rs-1-R, proizvedejo značilen polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov z encimom *Bsm* I ali izoshizomerom (npr. Mva 1269-I) po 30-minutni inkubaciji pri 65 °C. Produkti PCR, pomnoženi iz DNK *R. solanacearum* s primerji Rs-1-F in Rs-3-R nimajo mest restrikcije.

5. **Priprava nanašalnega pufra**

5.1 Bromfenol modro (10 % **osnovna raztopina**)

Bromfenol modro	5 g
Destilirana voda (bidest)	50 ml

5.2 Nanašalni pufer

Glicerol (86 %)	3,5 ml
Bromfenol modro (5.1)	300 µl
Destilirana voda (bidest)	6,2 ml

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

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

Pred uporabo razredčimo do 1X.

Tudi komercialni izdelek (npr. Invitrogen in ekvivalentni).

Dodatek 7

Potrjeni reagenti za test FISH

1. **Oligo-sonde**

Za *R. solanacearum* specifična sonda OLI-1-CY3 5′- ggc agg tag caa gct acc ccc-3′

Nespecifična eubakterijska sonda EUB-338-FITC 5′- gct gcc tcc cgt agg agt -3′

2. **Fiksirna raztopina**

[POZOR! FIKSIRNA RAZTOPINA VSEBUJE PARAFORMALDEHID, KI JE TOKSIČEN. NOSITE ROKAVICE IN NE VDIHAVAJTE. PRIPOROČLJIVO JE DELATI V DIGESTORIJU.]

(i) Segrejemo 9 ml vode molekulske stopnje (npr. ultra čiste vode (UPW)) na približno 60 °C in dodamo 0,4 g paraformaldehida. Paraformaldehid se raztopi, ko dodamo 5 kapljic 1N NaOH in pomešamo z magnetnim mešalcem.

(ii) Uravnamo pH na 7,0, tako da dodamo 1 ml 0,1 M fosfatnega pufra (PB; pH 7,0) in 5 kapljic 1N HCl. pH preverimo z lakmusovim papirjem in po potrebi uravnamo s HCl ali NaOH. [*POZOR! MERILNIKA PH NE UPORABLJAJTE V RAZTOPINAH S PARAFORMALDEHIDOM.*]

(iii) Raztopino filtriramo skozi 0,22 μm membranski filter in skrbimo, da se ne zapraši ter hranimo pri 4 °C do naslednje uporabe.

3. **3X Hybmix**

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (filtrsko steriliziran in avtoklaviran)	15 mM

Po potrebi razredčite do 1X.

4. **Hibridizacijska raztopina**

1X Hybmix	
Natrijev dodecil sulfat (SDS)	0.01 %
Formamid	30 %,
sonda EUB 338	5 ng/μl
sonda OLI-1 ali OLI-2	5 ng/μl

Pripravimo količine hibridizacijske raztopine v skladu z izračuni v Tabeli 1. Za vsako stekelce (ki vsebuje 2 različna vzorca v ponovitvi) je potrebno 90 μl hibridizacijske raztopine. *POMEMBNO: FORMAMID JE ZELO TOKSIČEN, ZATO NOSITE ROKAVICE IN UPOŠTEVAJTE USTREZNE VARNOSTNE UKREPE!*

Tabela 1 Predlagane količine za pripravo hibridizacijske zmesi.

Število stekelc:	1	4	6	8	10
Sterilna ultra čista voda	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3x hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamid	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Sonda EUB 338 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Sonda OLI-1 ali OLI-2 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Skupni volumen (μl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

Opomba: Vse raztopine, ki vsebujejo na svetlobo občutljive oligo-sonde, hranite v temi pri – 20 °C. Med uporabo jih zaščitite pred neposredno sončno ali električno svetlobo.

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

Na_2HPO_4	8,52 g
KH_2PO_4	5,44 g
Destilirana voda	1,00 L

Raztopimo sestavine, preverimo pH in steriliziramo v avtoklavu pri 121 °C 15 minut.

Dodatek 8

Kulture jajčevca in paradižnika

Semena paradižnika (*Lycopersicon esculentum*) ali jajčevca (*Solanum melongena*) posadimo v pasteriziran kompost za semena. Ko imajo sadike povsem razprta klična lista (10 do 14 dni), jih presadimo v pasteriziran kompost za lončnice.

Jajčevce in paradižnike moramo pred inokulacijo vzgajati v rastlinjaku z naslednjimi okoljskimi pogoji:

Dolžina dneva	14 ur ali naravna dolžina dneva, če je daljša;
Temperatura	dnevna 21 do 24 °C, nočna 14 do 18 °C.
Dovzetna vrsta paradižnika	‚Moneymaker'
Dovzetna vrsta jajčevca	‚Black Beauty'
Dobavitelji	glej spletno mesto http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

BIBLIOGRAFIJA

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 172: 762-770.

2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al*. Official Journal of the European Communities L235, 1-39.

3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. European Journal of Plant Pathology 105; 373-380.

4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J.L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. Applied and Environmental Microbiology, 68, 3634-3638.

5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. Molecular Plant-Microbe Interactions 1:113-121.

6. Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO Bulletin 26; 663-678.

7. Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) Bacterial Wilt Newsletter 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.

8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27; 265-277.

9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 69; 269-280.

10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. J. Phytopathology 146; 379-384.

11. Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 18, 343-351.

12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacaerum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335-345.

13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44; 693-695.

14. Klement Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.

15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.

16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne *et al*., (eds). Klewer Academic Publishers. pp. 117-121.

17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic Xanthomonas and Pseudomonas pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology, 60, 2286-2295.

18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Phytopathology 85; 528-536.

19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F Wang, T.-H Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 5; 19-33.

20. Pastrik, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. J. Phytopathology 148; 619-626.

21. Pastrik, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. European Journal of Plant Pathology 108, 831-842.

22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. Food and Agricultural Immunology 7, 67-79.

23. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota: 373 pp.

24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum, Pseudomonas syzygii, Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139: 1587-1594.

25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61; 4262-4268.

26. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281-295.

27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysiss of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum, Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 46; 10-15.

28. Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigalet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.

29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative flourogenic 5' nuclease TaqMan assay. Applied and Environmental Microbiology 66; 2853-2858.

30. Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse and A.D.L. Akkermans. 1998. Detection of R. *solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4546-4554.

PRILOGA III

1. Za vsak primer domnevnega pojava, pri katerem je bil s presejalnim testom dobljen pozitiven rezultat v skladu s primerno metodo iz Priloge II za navedeni rastlinski material ali s katero koli drugo uradno odobreno metodo v vseh drugih primerih in se še čaka na potrditev ali ovržbo domnevnega pojava z navedeno metodo, je treba, do dokončanja navedene metode, obdržati in ustrezno konzervirati:

   — vse vzorčene gomolje, in kjer je to mogoče, vse vzorčene rastline,

   — ves preostali ekstrakt in dodatno pripravljeni material za presejalne teste, npr. objektna stekelca imunofluorescenčnega testa,

   in

   — vso pripadajočo dokumentacijo.

   Zadržanje gomoljev bo omogočilo testiranje sorte, kjer je to potrebno.

2. V primeru potrjene okužbe z organizmom je treba, vsaj še en mesec po postopku obveščanja iz člena 5(2), obdržati in ustrezno konzervirati:

   — material iz odstavka 1,

   in

   — vzorec okuženega materiala paradižnika oziroma jajčevca, inokuliranega z ekstraktom gomoljev ali rastlin, kadar je to ustrezno,

   in

   — izolirano kulturo organizma,

PRILOGA IV

Elementi preiskave iz člena 5(1)(a)(i), kadar je to primerno, vključujejo:

(i) mesta pridelave,

— kjer se prideluje ali se je prideloval krompir, ki je klonsko soroden s krompirjem, za katerega je bilo ugotovljeno, da je okužen z organizmom,

— kjer se prideluje ali se je prideloval paradižnik, ki je iz istega vira kot paradižnik, za katerega je bilo ugotovljeno, da je okužen z organizmom,

— kjer se prideluje ali se je prideloval krompir ali paradižnik, ki je zaradi domnevnega pojava organizma pod uradnim nadzorom,

— kjer se prideluje ali se je prideloval krompir, klonsko soroden s krompirjem, ki je bil pridelan na mestih pridelave, za katera je bilo ugotovljeno, da so okužena z organizmom,

— kjer se prideluje krompir ali paradižnik in ki se nahajajo v bližini okuženih mest pridelave, vključno s tistimi, ki uporabljajo isto opremo in objekte, bodisi neposredno bodisi prek skupnega izvajalca,

— kjer se za namakanje ali škropljenje uporablja površinska voda iz katerega koli vira, potrjeno ali domnevno okuženega z organizmom,

— kjer se za namakanje ali škropljenje uporablja površinska voda iz vira, ki ga uporabljajo tudi mesta pridelave, potrjeno ali domnevno okužena z organizmom,

— ki so ali so bila poplavljena s površinsko vodo, potrjeno ali domnevno okuženo z organizmom;

in

(ii) površinsko vodo, ki se uporablja za namakanje ali škropljenje ali je poplavila polja ali mesta pridelave in je potrjeno okužena z organizmom.

PRILOGA V

1. Dejavniki, ki jih je treba upoštevati pri določanju obsega verjetne okužbe v skladu s členom 5(1)(a)(iii) in 5(1)(c)(iii):

— navedeni rastlinski material, pridelan na mestih pridelave, določenih za okužene v skladu s členom 5(1)(a)(ii),

— mesto(-a) pridelave, kakor koli povezano(-a) z navedenim rastlinskim materialom, določenim za okuženega v skladu s členom 5(1)(a)(ii), vključno s tistimi, ki uporabljajo isto pridelovalno opremo in objekte bodisi neposredno bodisi prek skupnega izvajalca,

— navedeni rastlinski material, ki je bil proizveden na mestih pridelave iz prejšnje alinee ali je bil na teh mestih prisoten v času, ko je bil na mestu pridelave iz prve alinee prisoten navedeni rastlinski material, določen za okuženega v skladu s členom 5(1)(a)(ii),

— posestva, kjer je bil navedeni rastlinski material z zgoraj navedenih mest pridelave,

— kateri koli stroj, vozilo, posodo, skladišče ali njihov del in katere koli druge predmete, vključno z embalažo, ki so morda prišli v stik z navedenim rastlinskim materialom, določenim za okuženega v skladu s členom 5(1)(a)(ii),

— kateri koli navedeni rastlinski material, uskladiščen ali v stiku s katerimi koli objekti ali predmeti, navedenimi v prejšnji alinei, pred čiščenjem in razkuževanjem teh objektov in predmetov,

— na podlagi preiskave in testiranja iz člena 5(1)(a)(i) pri krompirju gomolje ali rastline krompirja, sestrsko ali starševsko klonsko sorodne z navedenim rastlinskim materialom, ki je določen za okuženega v skladu s členom 5(1)(a)(ii), ter pri paradižniku rastline paradižnika iz istega vira kot tak navedeni rastlinski material, za katere se kljub morebitnemu negativnemu rezultatu testa na organizem zdi, da so verjetno okuženi zaradi klonske povezave. Lahko se opravi testiranje sort, da se preveri istovetnost okuženih in klonsko sorodnih gomoljev ali rastlin, in

— mesta pridelave navedenega rastlinskega materiala iz prejšnje alinee,

— mesta pridelave navedenega rastlinskega materiala, kjer se za namakanje ali škropljenje uporablja voda, ki je bila določena za okuženo v skladu s členom 5(1)(c)(ii),

— navedeni rastlinski material, proizveden na poljih, poplavljenih s površinsko vodo, za katero je bilo potrjeno, da je okužena.

2. Elementi ugotavljanja možne razširjenosti iz člena 5(1)(a)(iv) in 5(1)(c)(iii) vključujejo:

(i) v primerih iz člena 5(1)(a)(iv),

— bližino drugih mest pridelave, kjer se prideluje navedeni rastlinski material,

— skupno pridelavo in uporabo zalog semenskega krompirja,

— mesta pridelave, kjer se uporablja površinska voda za namakanje ali škropljenje navedenega rastlinskega materiala, kadar obstaja ali je obstajala nevarnost površinskega odtekanja vode z mest pridelave, ki so določena za okužena v skladu s členom 5(1)(a)(ii), ali njihovega poplavljanja;

(ii) kadar je bila površinska voda določena za okuženo v skladu s členom 5(1)(c)(ii):

— mesta pridelave, kjer se proizvaja navedeni rastlinski material, ki mejijo na ali jih ogroža poplavljanje s površinsko vodo, določeno za okuženo,

— kakršno koli zaključeno namakalno zajetje, povezano s površinsko vodo, ki je bila določena za okuženo,

— vode, povezane s površinsko vodo, ki je bila določena za okuženo, upoštevajoč:

— smer in hitrost pretoka vode, ki je bila določena za okuženo,

— prisotnost divjih gostiteljskih rastlin iz družine razhudnikovk.

3. Obvestilo iz prvega pododstavka člena 5(2) se zagotovi:

— takoj po potrditvi prisotnosti organizma z laboratorijskimi testi, in z uporabo metod, določenih v Prilogi II, vsaj:

— za krompir,

(a) ime sorte pošiljke;

(b) tip (jedilni, semenski itd.) in, kjer je primerno, kategorija semena,

— za rastline paradižnika, ime sorte partije in, kjer je primerno, kategorija.

— brez poseganja v zahteve za obveščanje o domnevnem pojavu iz člena 4(3), če obstaja tveganje okužbe navedenega rastlinskega materiala iz drugih držav članic ali v druge države članice, država članica, v kateri je bila pojavitev potrjena, nemudoma obvesti države članice, ki jih to zadeva, o informacijah, potrebnih za ravnanje v skladu s členom 5(3), in sicer:

(a) ime sorte krompirja ali paradižnika v partiji;

(b) ime in naslov pošiljatelja in prejemnika;

(c) datum dostave partije krompirja ali paradižnika;

(d) velikost dostavljene partije krompirja ali paradižnika;

(e) kopijo rastlinskega potnega lista ali vsaj številko rastlinskega potnega lista, kadar je to primerno, ali kadar je primerno, tudi registrsko številko pridelovalca ali trgovca ter kopijo dobavnice.

O prejemu takih informacij se takoj obvesti Komisijo.

4. Podrobnosti dodatnega obvestila iz drugega pododstavka člena 5(2) vključujejo:

ko so končane vse preiskave, za vsak primer:

(a) datum potrditve okuženosti;

(b) kratek opis izvedenih preiskav za identifikacijo vira in možnega širjenja okužbe, vključno z obsegom odvzema vzorcev;

(c) informacije o identificiranih oziroma domnevnih virih kontaminacije;

(d) podrobnosti o obsegu določene kontaminacije, vključno s številom mest pridelave, in za krompir število pošiljk z navedbo sorte in pri semenskem krompirju kategorije;

(e) podrobnosti o razmejitvi območja, vključno s številom mest pridelave, ki niso določena za okužena, vendar so vključena v območje;

(f) podrobnosti o določitvi vode, vključno z imenom in lokacijo vode ter obsegom določitve/prepovedi namakanja;

(g) za vse pošiljke ali partije rastlin paradižnika, določene kot okužene, potrdila, predpisana v členu 13(1)(ii) Direktive 2000/29/ES in številka potnega lista, v skladu z navedbo v Prilogi V, del A, oddelek I.2.2 k Direktivi 2000/29/ES;

(h) vse druge informacije v zvezi s potrjenim(-) izbruhom(-hi), ki jih lahko zahteva Komisija.

PRILOGA VI

1. Določbe iz člena 6(1) so:

— uporaba za živalsko krmo po toplotni obdelavi, tako da ni nobene nevarnosti, da bi organizem preživel,

ali

— odlaganje na uradno odobrenem mestu ločenega odstranjevanja odpadkov, kjer ni nevarnosti, da bi organizem prišel v okolje kmetijskih zemljišč, npr. s pronicanjem, ali v stik z vodnimi viri, ki se uporabljajo za namakanje kmetijskih zemljišč,

ali

— sežig,

ali

— industrijska predelava z neposredno in takojšnjo dostavo v predelovalni obrat z uradno odobrenimi napravami za odstranjevanje odpadkov, za katere je bilo ugotovljeno, da ni prepoznavne nevarnosti, da bi se organizem razširil, in s sistemom čiščenja ter razkuženja vsaj vozil, ki odhajajo,

ali

— drugi ukrepi, pod pogojem, da dokazano ne predstavljajo nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma; o takšnih ukrepih in njihovi utemeljitvi je treba takoj obvestiti Komisijo in druge države članice.

Preostali odpadki, povezani in nastali z zgoraj omenjenim, se odlagajo na načine, ki so uradno odobreni, v skladu s Prilogo VII k tej direktivi.

2. Ustrezna uporaba ali odstranitev navedenega rastlinskega materiala iz člena 6(2) pod nadzorom pristojnih uradnih organov zadevnih držav članic, pri čemer se pristojni uradni organi ustrezno obveščajo, da se zagotovi stalni nadzor in odobritev pristojnega uradnega organa države članice, v kateri naj bi se krompir pakiral ali predelal, odobri naprave za odstranjevanje odpadkov iz prve in druge alinee, je:

(i) za gomolje krompirja:

— uporaba kot jedilni krompir, namenjen za prehrano, pakiran na mestih z ustreznimi napravami za odstranjevanje odpadkov, pripravljen in namenjen za neposredno dostavo in uporabo brez prepakiranja, ali krompir za sajenje je dovoljeno obdelati le na istem mestu, če to poteka ločeno ali po čiščenju in razkuženju,

ali

— uporaba kot jedilni krompir, namenjen za industrijsko predelavo in za neposredno in takojšnjo dostavo v predelovalni obrat z ustreznimi napravami za odstranjevanje odpadkov ter sistemom za čiščenje in razkuževanje vsaj vozil, ki odhajajo,

ali

— drugačna uporaba ali odstranitev, pod pogojem da dokazano ne predstavlja nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma in da so to odobrili navedeni pristojni uradni organi.

(ii) za druge dele rastlin, vključno z ostanki stebel in listov:

— uničenje,

ali

— drugačna uporaba ali odstranitev, pod pogojem da dokazano ne predstavlja nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma in da so to odobrili navedeni pristojni uradni organi.

3. Ustrezni metodi razkuževanja predmetov iz člena 6(3) sta čiščenje in, kadar je to primerno, razkuževanje, tako da ni nobene prepoznavne nevarnosti za širjenje organizma, izvajata pa se pod nadzorom pristojnih uradnih organov držav članic.

4. Niz ukrepov, ki jih morajo izvesti države članice znotraj razmejenih območij, določenih v skladu s členom 5(1)(a)(iv) in (c)(iii), iz člena 6(4) vključujejo naslednje:

4.1 Kadar so mesta pridelave določena za okužena v skladu s členom 5(1)(a)(ii):

(a) se na polju ali enoti pridelave zaščitenega pridelka, določeni za okuženo v skladu s členom 5(1)(a)(ii), bodisi

(i) vsaj štiri rastna leta, ki sledijo določitvi kontaminacije,

— izvajajo ukrepi za odstranjevanje krompirjevih in paradižnikovih samosevcev in drugih gostiteljskih rastlin organizma, vključno s plevelom iz družine razhudnikovk,

in

— ne sadijo:

— gomolji, rastline ali prava semena krompirja,

— rastline in semena paradižnika,

— ob upoštevanju biologije organizma:

— druge gostiteljske rastline,

— rastline iz rodu *Brassica*, pri katerih je ugotovljena nevarnost, da omogočajo preživetje organizma,

— posevki, pri katerih je ugotovljena nevarnost širjenja organizma,

— v prvi sezoni pridelave krompirja ali paradižnika, ki sledi obdobju iz prejšnje alinee, in pod pogojem da na polju najmanj dve zaporedni rastni leti pred sajenjem med uradnimi pregledi niso bili najdeni samosevci krompirja in paradižnika ter drugih gostiteljskih rastlin, vključno s plevelom iz družine razhudnikovk:

— v primeru krompirja je dovoljena samo pridelava jedilnega krompirja,

— v primeru krompirja in paradižnika se v skladu s postopkom iz Priloge II testirajo pridelani gomolji krompirja oziroma rastline paradižnika,

— v sezoni pridelovanja krompirja ali paradižnika, ki sledi obdobju iz prejšnje alinee, in ob upoštevanju ustreznega kolobarja, ki v primeru semenskega krompirja obsega najmanj dve leti, se izvede uradna preiskava, kakor je opredeljeno v členu 2(1);

ali

(ii) pet rastnih let, ki sledijo določitvi okužbe,

— se izvajajo ukrepi za odstranjevanje krompirjevih in paradižnikovih samosevcev in drugih naravno zasajenih gostiteljskih rastlin organizma, vključno s plevelom iz družine razhudnikovk,

in

— se polje v prvih treh letih vzpostavi in vzdržuje kot ledina, kot žitno polje v skladu z ugotovljeno nevarnostjo, kot stalni pašnik s pogosto nizko košnjo ali intenzivno pašo, ali kot travnik za pridelavo semena, čemur v naslednjih dveh letih sledi sajenje rastlin, ki niso gostiteljske rastline organizma in za katere ni prepoznavne nevarnosti za preživetje ali širjenje organizma,

— v prvi sezoni pridelave krompirja ali paradižnika, ki sledi obdobju iz prejšnje alinee, in pod pogojem da na polju najmanj dve zaporedni rastni leti pred sajenjem med uradnimi pregledi niso bili najdeni samosevci krompirja in paradižnika ter drugih gostiteljskih rastlin, vključno s plevelom iz družine razhudnikovk:

— v primeru krompirja je dovoljena pridelava semenskega ali jedilnega krompirja,

— v skladu s postopkom iz Priloge II se testirajo pridelani gomolji krompirja ali rastline paradižnika, kakor je primerno;

(b) na vseh drugih poljih okuženega mesta pridelave, pod pogojem, se se pristojnim uradnim organom dokaže, da je odpravljena nevarnost samosevcev krompirja, paradižnika in drugih naravno rastočih gostiteljskih rastlin za organizem, vključno s plevelom iz družine razhudnikovk:

— v rastnem letu, ki sledi letu določene okužbe:

— se bodisi ne sadijo gomolji in rastline in pravo seme krompirja ali drugih gostiteljskih rastlin organizma,

ali

— v primeru krompirjevih gomoljev se lahko sadi certificirani semenski krompir le za pridelavo jedilnega krompirja,

— v primeru rastlin paradižnika se lahko rastline, zrasle iz semena, ki izpolnjuje zahteve iz Direktive 2000/29/ES, sadi le za pridelavo plodov,

— v drugem rastnem letu, ki sledi določitvi okužbe:

— v primeru krompirja se sadi le certificirani semenski krompir ali semenski krompir, uradno testiran za odsotnost rjave gnilobe in pridelan pod uradnim nadzorom na mestih pridelave, ki niso navedena pod 4.1, za semenski ali jedilni krompir,

— v primeru paradižnika se lahko rastline paradižnika, zrasle iz semena, ki izpolnjuje zahteve iz Direktive 2000/29/ES ali v primeru vegetativnega razmnoževanja iz rastlin paradižnika, ki so bile pridelane iz semena in gojene pod uradnim nadzorom na mestih pridelave, ki niso navedena pod 4.1, sadi za pridelavo rastlin ali sadeža,

— v vsaj tretjem rastnem letu, ki sledi določitvi kontaminacije:

— v primeru krompirja se sadi le certificirani semenski krompir ali semenski krompir, pridelan pod uradnim nadzorom iz certificiranega semenskega krompirja, za semenski ali jedilni krompir,

— v primeru paradižnika se lahko rastline paradižnika, zrasle iz semena, ki izpolnjuje zahteve iz Direktive 2000/29/ES, ali rastline paradižnika, ki so zrasle iz takih rastlin pod uradnim nadzorom, sadi samo za pridelavo rastlin ali plodov,

— v vsakem od rastnih let iz prejšnjih alinej se izvedejo ukrepi za uničenje krompirjevih samosevcev in ostalih morebitnih najdenih naravnih gostiteljskih rastlin organizma in uradna preiskava rastočega posevka ob ustreznem času ter uradno testiranje pobranega krompirja za vsako krompirjevo polje v skladu s postopkom iz Priloge II;

(c) takoj po določitvi kontaminacije v skladu s členom 5(1)(a)(ii) in po prvem rastnem letu:

— vsi stroji in skladiščni prostori na mestu pridelave, ki so vključeni v pridelavo krompirja ali paradižnika, se očistijo in, kadar je to primerno, razkužijo z uporabo ustreznih metod iz točke 3,

— se vpelje uradni nadzor namakalnih in škropilnih programov, vključno z njihovo prepovedjo, kadar je to primerno, da se prepreči širjenja organizma;

(d) na enoti pridelave zavarovanega pridelka, določeni za okuženo v skladu s členom 5(1)(a)(ii), kjer je rastni substrat mogoče v celoti zamenjati,

— se ne sadijo gomolji, rastline krompirja ali prava semena ali druge gostiteljske rastline organizma, vključno z rastlinami in semenom paradižnika, razen če so bili na navedeni enoti izvedeni uradno nadzorovani ukrepi za izkoreninjenje organizma in odstranitev vsega materiala gostiteljskih rastlin, vključno z vsaj celotno zamenjavo rastnega substrata ter očiščenjem in, kadar je to ustrezno, razkužitvijo navedene enote in vse opreme, ter so nato pristojni uradni organi odobrili pridelavo krompirja ali paradižnika,

in

— v primeru pridelave krompirja se krompir prideluje iz certificiranega semenskega krompirja, minigomoljev ali mikro-rastlin, pridobljenih iz testiranih virov,

— pri pridelavi paradižnika poteka pridelava iz semena, ki izpolnjuje zahteve iz Direktive 2000/29/ES ali v primeru vegetativnega razmnoževanja iz rastlin paradižnika, pridelanega iz takega semena in gojenega pod uradnim nadzorom,

— se vpelje uradni nadzor namakalnih in škropilnih programov, vključno z njihovo prepovedjo, kadar je to primerno, da se prepreči širjenje organizma.

4.2 Znotraj razmejenega območja, brez poseganja v ukrepe iz 4.1, države članice:

(a) takoj po določitvi kontaminacije zagotovijo, da se očisti in razkuži vse stroje in skladiščne prostore na teh posestih, vključenih v pridelavo krompirja ali paradižnika, kot je to primerno, in z ustreznimi metodami iz točke 3;

(b) takoj in nato še vsaj tri rastna leta po določitvi okužbe:

(ba) kadar je razmejeno območje določeno v skladu s členom 5(1)(a)(iv):

— zagotovijo, da njihovi pristojni uradni organi nadzorujejo posesti, ki pridelujejo, skladiščijo ali opravljajo delo z gomolji krompirja ali paradižnikom, vključno s posestvi, ki po pogodbi upravljajo s stroji za pridelavo krompirja ali paradižnika,

— zahtevajo sajenje le uradno certificiranega semenskega krompirja ali semenskega krompirja, ki je bil pridelan pod uradnim nadzorom, za celotno pridelavo krompirja znotraj tega območja ter testiranje po spravilu semenskega krompirja, pridelanega na mestih pridelave, ki so bila določena za verjetno okužena v skladu s členom 5(1)(a)(iii),

— zahtevajo ločeno obravnavo pridelanih zalog semenskega krompirja in jedilnega krompirja na vseh posestih znotraj območja, ali izvedbo sistema čiščenja, in kjer je to primerno, razkužitve med opravljanjem dela z zalogami semenskega in jedilnega krompirja,

— zahtevajo sajenje samo rastlin paradižnika, zraslih iz semena, ki izpolnjuje zahteve iz Direktive 2000/29/ES, ali v primeru vegetativnega razmnoževanja iz rastlin paradižnika, pridelanih iz takega semena in gojenih pod uradnim nadzorom, za celoten pridelek na tem območju,

— izvedejo uradno preiskavo, kot je opisano v členu 2(1);

(bb) kadar je bila v skladu s členom 5(1)(c)(ii) površinska voda določena za okuženo ali v skladu s točko 2 Priloge V vključena med elemente možnega širjenja organizma:

— opravijo letno preiskavo v ustreznih časovnih obdobjih, vključno z vzorčenjem površinske vode in, kjer je to primerno, ustreznih gostiteljskih rastlin iz družine razhudnikovk iz primernih vodnih virov, ter testiranjem v skladu s primerno metodo iz Priloge II za navedeni rastlinski material in za druge primere,

— vpeljejo uradni nadzor namakalnih in škropilnih programov, vključno s prepovedjo uporabe vode, ki je bila določena za okuženo, za namakanje in škropljenje navedenega rastlinskega materiala in, kadar je to primerno, drugih gostiteljskih rastlin organizma, da se prepreči širjenje organizma. Ta prepoved se lahko revidira na podlagi rezultatov navedene letne preiskave, in označbe se lahko ukinejo, če pristojni uradni organi potrdijo, da površinska voda ni več okužena. Uporaba vode, ki je prepovedana, se lahko pod uradnim nadzorom dovoli za namakanje in škropljenje gostiteljskih rastlin, pri čemer se uporabljajo uradno odobrene tehnike, ki uničijo organizem in preprečujejo njegovo širjenje,

— v primeru okuženih odpadnih voda vpeljejo uradni nadzor odstranjevanja trdnih odpadkov ali odpadnih voda iz obratov za industrijsko predelavo ali pakiranje, kjer se opravlja delo z navedenim rastlinskim materialom;

(c) izdelajo program, kadar je to primerno, za zamenjavo celotnih zalog semenskega krompirja v ustreznem časovnem obdobju.

PRILOGA VII

Uradno odobreni načini odstranjevanja odpadkov iz odstavka 1 Priloge VI so v skladu z naslednjimi določbami tako, da ni mogoče prepoznati nevarnosti širjenja organizma:

(i) krompirjevi in paradižnikovi odpadki (vključno z izločenim krompirjem in olupki ter paradižniki) in drugi trdni odpadki, povezani s krompirjem in paradižniki (vključno z zemljo, kamni in drugimi ostanki) se

— odlagajo na uradno odobrenem mestu ločenega odstranjevanja odpadkov, kjer ni nevarnosti, da bi patogen prišel v okolje kmetijskih zemljišč, npr. s pronicanjem, ali v stik z vodnimi viri, ki se uporabljajo za namakanje kmetijskih zemljišč. Odpadki se prepeljejo neposredno na odlagališče v zaprtem sistemu, tako da ni nevarnosti izgube odpadkov,

ali

— sežigajo,

ali

— zanje izvedejo drugi ukrepi pod pogojem, da ni nevarnosti širjenja organizma; take ukrepe je treba sporočiti Komisiji in ostalim državam članicam;

(ii) odpadne vode iz predelave: pred odstranitvijo se iz odpadnih vod, ki vsebujejo suspendirane trdne delce, ti delci odstranijo s filtracijo ali postopkom posedanja. Te delce se odstrani v skladu s pododstavkom (i).

Nato se odpadne vode bodisi:

— segreje na najmanj 60 °C celotne prostornine najmanj 30 minut pred odlaganjem,

ali

— odstrani na drug način, ki je predmet uradne odobritve, in pod uradnim nadzorom tako, da ni nevarnosti, da bi odpadki lahko prišli v stik s kmetijskim zemljiščem ali vodnimi viri, ki se uporabljajo za namakanje kmetijskega zemljišča. Podrobnosti o tem se sporoči ostalim državam članicam in Komisiji.

Možnosti, opisane v tej prilogi, veljajo tudi za odpadke, povezane z ravnanjem, odlaganjem in obdelavo okuženih partij.“