

МИНИСТЕРСТВО ЗА ЗЕМЈОДЕЛСТВО, ШУМАРСТВО И ВОДОСТОПАНСТВО

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

НАРЕДБА ЗА СПРОВЕДУВАЊЕ НА ПОСЕБЕН НАДЗОР ЗА УТВРДУВАЊЕ НА ПРИСУСТВОТО НА БАКТЕРИЈАТА *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (SMITH) DAVIS ET AL. SSP. *SEPEDONICUS* (SPIECKERMANN ET KOTTHOFF) DAVIS ET AL. И ПОСТАПКИТЕ ЗА ЛАБОРАТОРИСКО ИСПИТУВАЊЕ *

* Со оваа наредба се врши усогласување со одредбите на Директивата на Советот бр. 93/85/ЕЕЗ од 4 октомври 1993 за контрола на прстенесто гниење на кртолите и венење на компирот од *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. CELEX број 31993L0085, изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр. 2006/56/ЕЗ од 12 јуни 2006 година, CELEX број 32006L0056.

Член 1

Со оваа наредба се определува спроведување на посебен надзор за утврдување на присуството на бактеријата *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. предизвикувач на прстенесто гниење на кртолите и венење на компирот, одредување на распространетоста и во случај на појава мерките кои треба да се превземат за да се спречи ширењето и контролата, со цел ерадикација на прстенесто гниење на кртолите и венење на компирот, како и на постапките за лабораториско испитување.

Член 2

Мерките кои се преземат заради уништување на бактеријата *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. која го предизвикува прстенестото гниење на кртолите и венењето на компирот (во натамошниот текст штетен организам), се со цел да се:

(а) лоцира и одреди нејзината раширеност и дистрибуција;

(б) спречи нејзиното појавување и ширење и

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

Член 3

(1) Посебниот надзор фитосанитарниот инспектор го врши за да утврди присуство на штетениот организам во кртолите и кога е потребно на растенијата од компир (*Solanum tuberosum* L.) кои потекнуваат од местото на производство, за да се потврди отсуството на штетниот организам.

(2) При вршењето на посебниот надзор фитосанитарниот инспектор треба да зема примероци-мостри од кртоли од семенски и меркантилен компир. Препорачливо е да се земаат примероци-мостри посебно од секоја партија во складиштата и да се испитаат со лабораториско тестирање по методот утврден во Прилог 1 кој е составен дел од оваа наредба. Каде е соодветно, фитосанитарниот инспектор може да врши посебен надзор со визуелен преглед со сечење на кртолите.

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

(4) Бројот, потеклото, стратификацијата и времето на собирање на примероците-мострите се одредува врз основа на сигурни научни принципи, биологијата на штетниот организам и земајки го во предвид начинот на производство на компир, за потврдување на отството на штетниот организмот.

Член 4

При вршење на посебен надзор фитосанитарниот инспектор треба да утврди дека нема сомнителната појава или потврдена присутност на штетен организам кај растенијата од компир

и кртоли кога се берат, складираат или пласираат на пазар, од сопственици регистрирани согласно Правилникот за формата, содржината и начинот на водење на Регистарот на производители, преработувачи, увозници и дистрибутери на растенија, растителни производи и други објекти и предмети (?).

(?)Правилникот за формата, содржината и начинот на водење на Регистарот на производители, преработувачи, увозници и дистрибутери на растенија, растителни производи и други објекти и предмети е усогласен со одребите на Директивата на Советот бр.2000/29/ЕЗ од 8 мај 2000 за заштитните мерки против воведување во Заедницата на организми штетни за растенијата или растителните производи и против нивното ширење во Заедницата, сеlex број 32000L0029; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2001/33/ЕЗ на 8 Мај 2001 година, сеlex број 32001L0033; изменета и дополнета со Директивата бр.2002/28/ЕЗ од 19 март 2002 година, сеlex број 32002L0028; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2002/36/ЕЗ на 29 април 2002 година, сеlex број 32002L0036; изменета и дополнета со Директивата на Советот бр.2002/89/ЕЗ од 28 ноември 2002 година, сеlex број 32002L0089; изменета и дополнета со Директивата бр.2003/22/ЕЗ од 24 март 2003 година, сеlex број 32003L0022; изменета и дополнета со Регулативата на Советот (ЕЗ) бр.806/2003 од 14 април 2003 година, сеlex број 32003R0806; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2003/47/ЕЗ на 4 јуни 2003 година, сеlex број 32003L0047; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2003/116/ЕЗ од 4 декември 2003 година, сеlex број 32003L0116; изменета и дополнета со Директивата бр.2004/31/ЕЗ од 17 март 2004 година, сеlex број 32004L0031; изменета и дополнета со Директивата бр.2004/70/ЕЗ од 28 април 2004 година, сеlex број 32004L0070; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2004/102/ЕЗ на 5 октомври 2004 година, сеlex број 32004L0102; изменета и дополнета со Директивата на Советот бр. 2005/15/ЕЗ од 28 февруари 2005 година, сеlex број 32005L0015;изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2005/16/ЕЗ на 2 март 2005 година, сеlex број 32005L0016; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2005/77/ЕЗ од 11 ноември 2005 година, сеlex број 32005L0077; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2006/14/ЕЗ од 6 февруари 2006 година, сеlex број 32006L0014; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2006/35/ЕЗ од 24 март 2006 година, сеlex број 32006L0035; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр. 2007/41/ЕЗ од 28 јуни 2007 година, сеlex број 32007L0041; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр. 2008/64/ЕЗ од 27 јуни 2008 година, сеlex број 32008 L0064; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата 2008/109/ЕЗ од 28 ноември 2008 година, сеlex број 32008L0109; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр. 2009/7/ЕЗ на 10 февруари 2009 година, сеlex број 32009L0007; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2009/118/ЕЗ на 9 септември 2009 година, сеlex број 32009L0118; изменета и дополнета со Директивата на Советот бр.2009/143/ЕЗ од 26 ноември 2009 година, сеlex број 32009L0143; изменета и дополнета со Директивата на Комисијата бр.2010/1/ЕУ од 8 јануари 2010 година, сеlex број 32010L0001; Директивата на Комисијата бр.1992/90/ЕЗ од 3 ноември 1992 година за

утврдување на обврските кои се однесуваат на производителите или увозниците на растенија, растителни производи и други објекти и за утврдување на деталите за нивна регистрација, сеlex број 31992L0090; Директивата на Комисијата бр.1993/50/ЕЗ од 24 јуни 1993 година за определување на одредени растенија кои не се во Анекс V дел А од Директивата на Советот бр.77/93/ЕЗ, чии производители или складишта, дистрибутивни центри во производните зони на вакви растенија, треба да бидат внесени во службен регистар, сеlex број 31993L0050.

Член 5

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

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

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

2. имунофлуоросцентниот тест од Прилог 1 од оваа наредба или други соодветни тестови биле позитивни, фитосанитарниот инспектор треба да:

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

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

- воведе соодветни дополнителни заштитни мерки врз основа на проценка на ризик, за да се спречи секако ширење на штетниот организам. Таквите мерки може да вклучат контрола на местото на производство, пуштањето во промет, преместување на сите други кртоли или растенија внатре или надвор од просторите, кои се поврзани со сомневањето за појавата и

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

Член 6

Ако со посебениот надзор или лабораториски тестирања користени по методот од Прилог 1 од оваа наредба, се потврди присутноста на штетениот организам во примероците-мострите на кртолите од компир, растенијата или деловите од растенијата, фитосанитарниот инспектор имајќи ја во предвид биологијата на штетениот организам, производството, маркетингот и преработувачките капацитети, треба да:

(а) ги прогласи за контаминирани кртолите или растенијата, пратката и/или партијата, машините, опремата, превозните средства, садовите, складиштето или сите делови од нив, како и други предмети, вклучувајќи ја амбалажата и материјалот за пакување, од кои се земени примероците, местото(ата) на производство и полето(ињата) од каде биле собрани кртолите или растенијата;

(б) го одреди, степенот на можната контаминација преку контакт пред или по бербата или преку поврзување на производството со означената контаминација, имајќи ги предвид одредбите од Прилог 3 точка 1 кој е составен дел од оваа наредба;

(в) да демаркира зона врз основа на објавената контаминација до :

- степенот на можната контаминација и

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

Член 7

(1) Таму каде што кртолите или растенијата биле прогласени за контаминирани, фитосанитарниот инспектор треба да изврши тестирање на залихите на компир, кои се клонски сродни со оние опфатени со контаминацијата. Тестирањето на кртолите или растенијата се врши колку што е потребно за одредување на можниот главен извор на инфекција и степен на можна контаминација, со цел да се одреди степенот од ризик.

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

Член 8

(1) Кртолите и растенијата, кои се прогласени како контаминирани согласно член 6 точка (а) од оваа наредба не треба да се садат и под надзор на фитосанитарниот инспекторат треба:

- да бидат уништени, или

- на друг начин отстранети, согласно мерките за посебен надзор, утврдени од во Прилог 4 точка 1 кој е составен дел од оваа наредба, ако е утврдено дека не постои никаков ризик од ширење на штетниот организам и отпадот од истите да биде отстранет согласно Прилог 5 кој е составен дел од оваа наредба.

(2) Кртолите и растенијата кои се прогласени како контаминирани согласно член 6 точка (б) од оваа наредба под надзор на фитосанитарниот инспекторат:

- (а) не треба да се садат, без оглед на резултатот од тестирањето наведено во член 7 од оваа наредба залихи од клонско сродни, под контрола на фитосанитарниот инспектор да бидат соодветно користени или отстранети, согласно Прилог 4 точка 2 од оваа наредба на начин ако е утврдено дека не претставуваат никаков ризик од ширењето на штетниот организам;

- (б) секоја машина, превозно средство, опрема, садови, складишта и делови од нив или други предмети, амбалажа и материјалот за пакување, кои се прогласени за контаминирани или одредени за можно контаминирани согласно член 6 точка (а) и (б) од оваа наредба треба да бидат уништени или исчистени и дезинфицирани со употреба на соодветни методи, согласно Прилог 4 точка 3 од оваа наредба. По извршената дезинфекцијата, ваквите предмети нема да се сметаат како контаминирани;

- (в) за зоната, која е демаркирана согласно член 6 точка (в) од оваа наредба се утврдува серии од мерки, согласно Прилог 4 точка 4 од оваа наредба.

Член 9

Семенскиот компир треба да се тестира за да се утврди дали ги исполнува посебните фитосанитарни барања и дали потекнува непосредно од материјал, кој е добиен во рамките на официјално одобрена програма, со официјални контролирани тестови по методот утврден во Прилог 1 од оваа наредба, дека е слободен од штетниот организам. Ова тестирање се спроведува во:

- случаи кога контаминацијата влијае врз производството на семенски компир, на растенија за почетна клонска селекција; или

- во случаи кога треба да се утврди отсуството на штетниот организам на секое растение за почетна клонска селекција или на репрезентативните примероци-мостри од основниот семенски компир или компирот од претходните размножувања.

Член 10

Без оглед на одредбите од оваа наредба согласно Правилникот за научни и технички капацитети за експериментални, научноистражувачки, селекциони или развојни работи (?), по одобрување од страна на Фитосанитарната управа може да се изврши увоз за внесување или движење на штетни организми, растенија, растителни производи и други објекти и предмети наменети за експериментални, научноистражувачки, селекциони или развојни работи, во кои случаи не се применуваат одредбите од членовите 7 и 8 од оваа наредба, под услов да не се наруши контролата врз штетниот организам и да не се предизвика ризик од ширење на штетниот организам.

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

Член 11

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

(2) Дополнителните мерки од став (1) од овој член можат да вклучат упатство дека може да се сади само семенскиот компир, кој е официјално потврден или официјално прегледан и ги исполнува бараните фитосанитарни стандарди за здравствената состојба на растението. Оваа може да се примени и во случај кога на земјоделците им е дозволено да го употребуваат на нивните сопствени имоти семенскиот компир, кој е добиен од сопствено производство.

Член 12

Со денот на влегувањето во сила на оваа наредба престанува да важи Наредбата за систематски контроли и мерки за спречување на ширењето на прстенесто гниење на клубените и венење на компирот предизвикано од *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. („Службен весник на Република Македонија“ бр. 32/07).

Член 13

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

Бр. 17-298/ 7

септември 2011 година

Министер за земјоделство,

шумарство и водостопанство,

ТЕСТ ШЕМА ЗА ДИЈАГНОЗА, ОТКРИВАЊЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЈА НА
БАКТЕРИЈАТА НА ПРСТЕНЕСТО ГНИЕЊЕ НА КРТОЛИТЕ И ВЕНЕЕЊЕ НА
КОМПИРОТ *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. *subsp. sepedonicus*
(Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.

ОПСЕГ НА ТЕСТ ШЕМАТА

Следната шема ги опишува различните постапки вклучени во:

- (1) дијагнозата на прстенестот гниење на кртолите и венење на растенијата кај компирот,
- (2) откривање и детекција на *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. *subsp. sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. во примероци од кртоли на компири и растенија,
- (3) идентификација на *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. *subsp. sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. (во натамошниот текст како *C. m. subsp. sepedonicus*).

ОПШТИ ПРИНЦИПИ

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

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

Параметрите за тестирање мора да обезбедат веродостојна и репродуктивна детекција на нивоата на *C. m. subsp. sepedonicus* на поставените прагови од избраните методи.

Најважно е да се изврши соодветна подготовка на позитивните контроли.

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

Сомневањето за појавата како што е наведено во член 5 став (2), доколку укажува на позитивен резултат во дијагностицирањето или тестовите за анализа кои се извршени на примерокот, наведено е во графиконите.

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

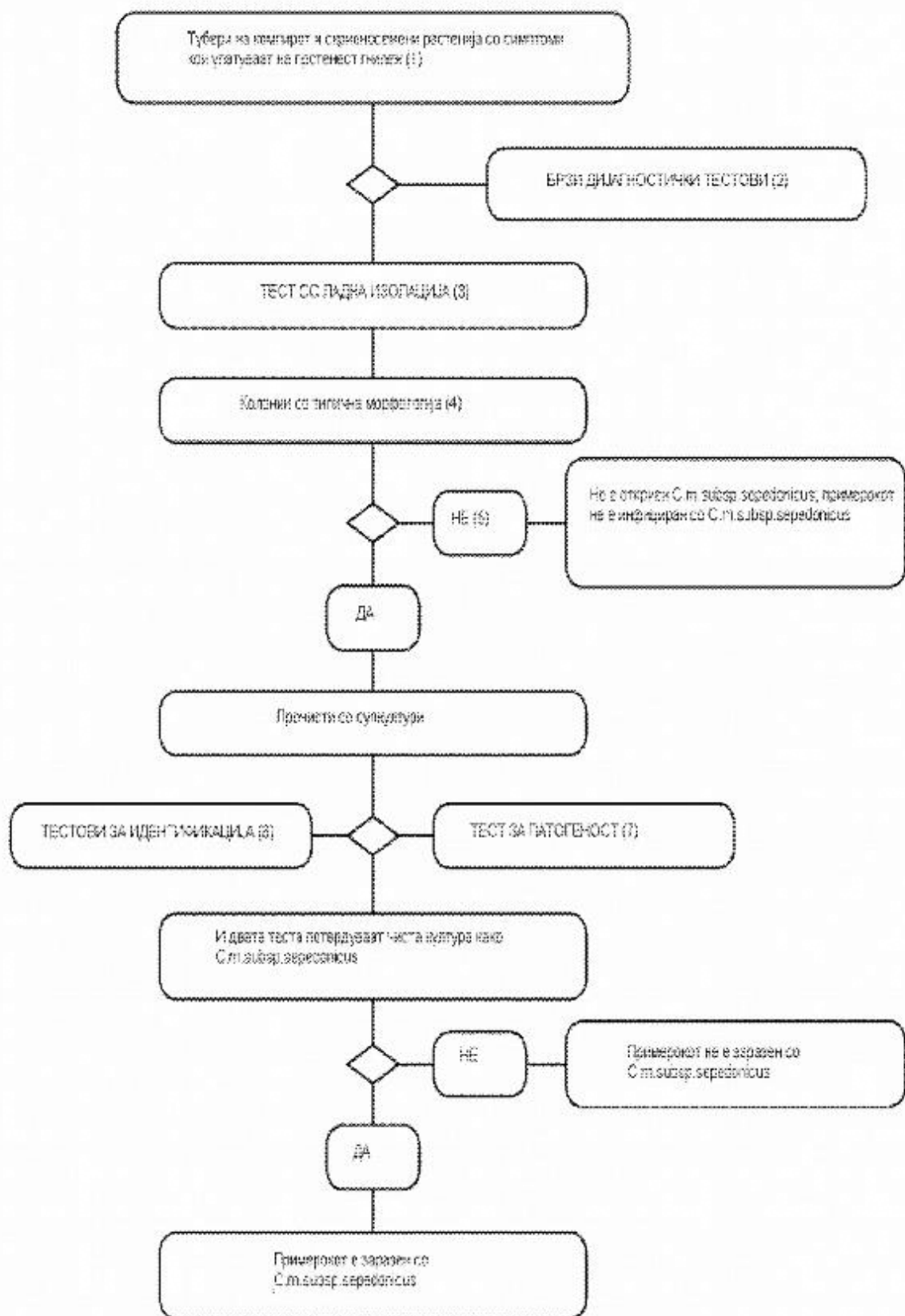
Затоа, позитивен IF тест како што е наведено во член 5 став (2) од наредбата, се дефинира како позитивно IF читање потврдено со вториот тест (PCR /FISH).

Потврдено присуство, како што е наведено во член 6 од наредбата, укажува на изолација и идентификација на чиста култура на *C. m. subsp. sepedonicus*, со потврда на патогеноста.

1. ДИЈАГРАМСКИ ПРИКАЗ

1.1. Шема на откривање за дијагноза на прстенесто гниење на кртолите и венење на растенијата кај компирот со симптоми на прстенесто гниење и венење кај компирот

Постапката за тестирање е наменета за кртолите и растенија од компир со симптоми типични за или кои упатуваат на прстенесто гниење и венење на растенијата кај компир. Постапката вклучува брз тест за анализа, изолација на патогенот од заразеното спроводното ткиво на медиум за дијагностицирање и во случај на позитивен резултат, идентификација на култура на *C. m. subsp. sepedonicus*.



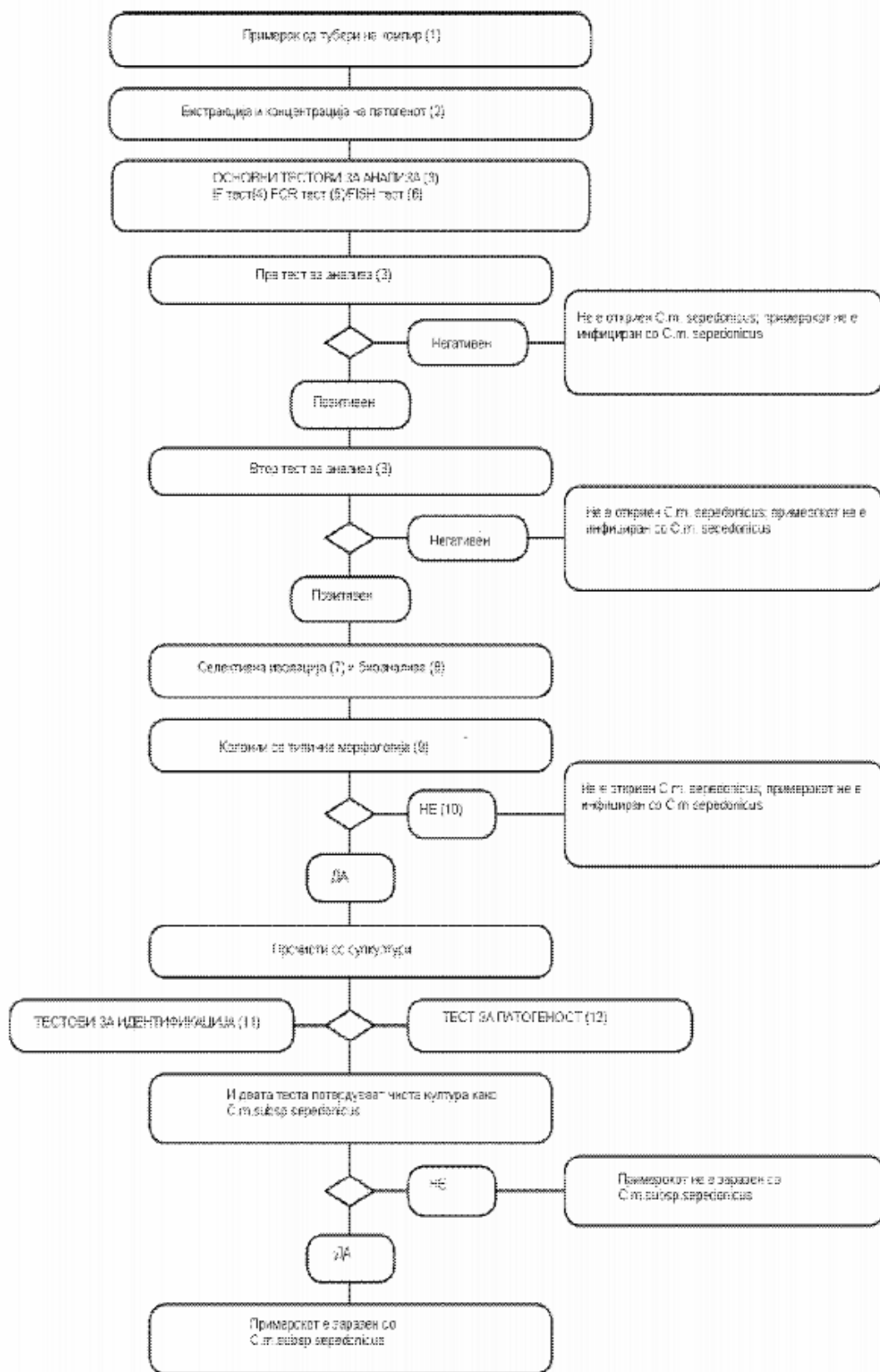
-
- (1) Описот на симптомите е прикажан во Дел 2.
 - (2) Соодветните тестови се следните:
 - IF - тест (Дел 4),
 - PCR - тест (Дел 6),
 - FISH - тест (Дел 5).
 - (3) Иако изолацијата на патогенот од растителниот материјал со типични симптоми со обложување со раствор е директно, обработката може да не успее во понапредните фази од инфекцијата. Сапрофитските бактерии кои растат на заразеното ткиво може да го надрастат или да го инхибираат патогенот на изолираниот медиум. Затоа, се препорачува да се користат и неселективни и селективни медиуми, особено MTNA (Дел 8) или тестот со биоанализа (Дел 7).
 - (4) Во Дел 8 е содржан описот на типична морфологија на колонија.
 - (5) Ако тестот со изолација е негативен, но симптомите на болеста се типични, тогаш изолацијата мора да се повтори.
 - (6) Веродостојна идентификација на чиста култура на *C. m. subsp. sepedonicus* се постигнува со користење на тестовите наведени во Дел 9.
 - (7) Тестот за патогеност е опишан во Дел 10.

1.2. Шема за откривање и идентификација на *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. *subsp. sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. во примероци од кртоли на компири без симптоми

Принцип

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

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



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

(2) Во Дел 3.1 се наведени методите за екстракција и концентрација на патогенот.

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

(4) Тест со имунофлуоресценција (IF).

Секогаш користете поликлонално антитело за IF тестирањето, дополнителните моноклонални антитела може попрецизно да се определат (види Дел 4).

(5) PCR тест.

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

(6) FISH тест.

Користете соодветно потврдени реагенси и протоколи (види Дел 5).

(7) Селективна изолација.

Со MTNA медиум или NCP-88 медиум и 1/100 раствор од ресуспендираниот гранулат (талог), овој во голем број случаи е соодветен метод за директна изолација на *C. m. subsp. sepedonicus*. Типични колонии може да се постигнат 3 до 10 дена по засејувањето. Потоа патогенот може да се прочисти и да се идентификува. За целосна експлоатација на неговиот потенцијал, за тестот е потребна внимателна подготовка на сржта (кортексот) од окцата, со цел да се избегнат секундарни бактерии од кртолите кај компирот, кои ќе бидат конкуренти на *C. m. subsp. sepedonicus* на медиумот/ хранливата подлога и би можеле да го надрастат патогенот. Ако тестот со подлогата не успее да овозможи изолација од растенијата што се користат за биоанализа (види Дел 8).

(8) Тестот со биоанализа се користи за изолација на *C. m. subsp. sepedonicus* од екстрактите на компирот, преку селективно збогатување кај модрите патлици (*Solanum melongena*). Тестот бара оптимални услови за инкубација, како што е утврдено во овој метод. Бактериите што го инхибираат *C. m. subsp. sepedonicus* на MTNA или NCP-88 медиумот, најверојатно нема да го попречуваат овој тест (види Дел 7).

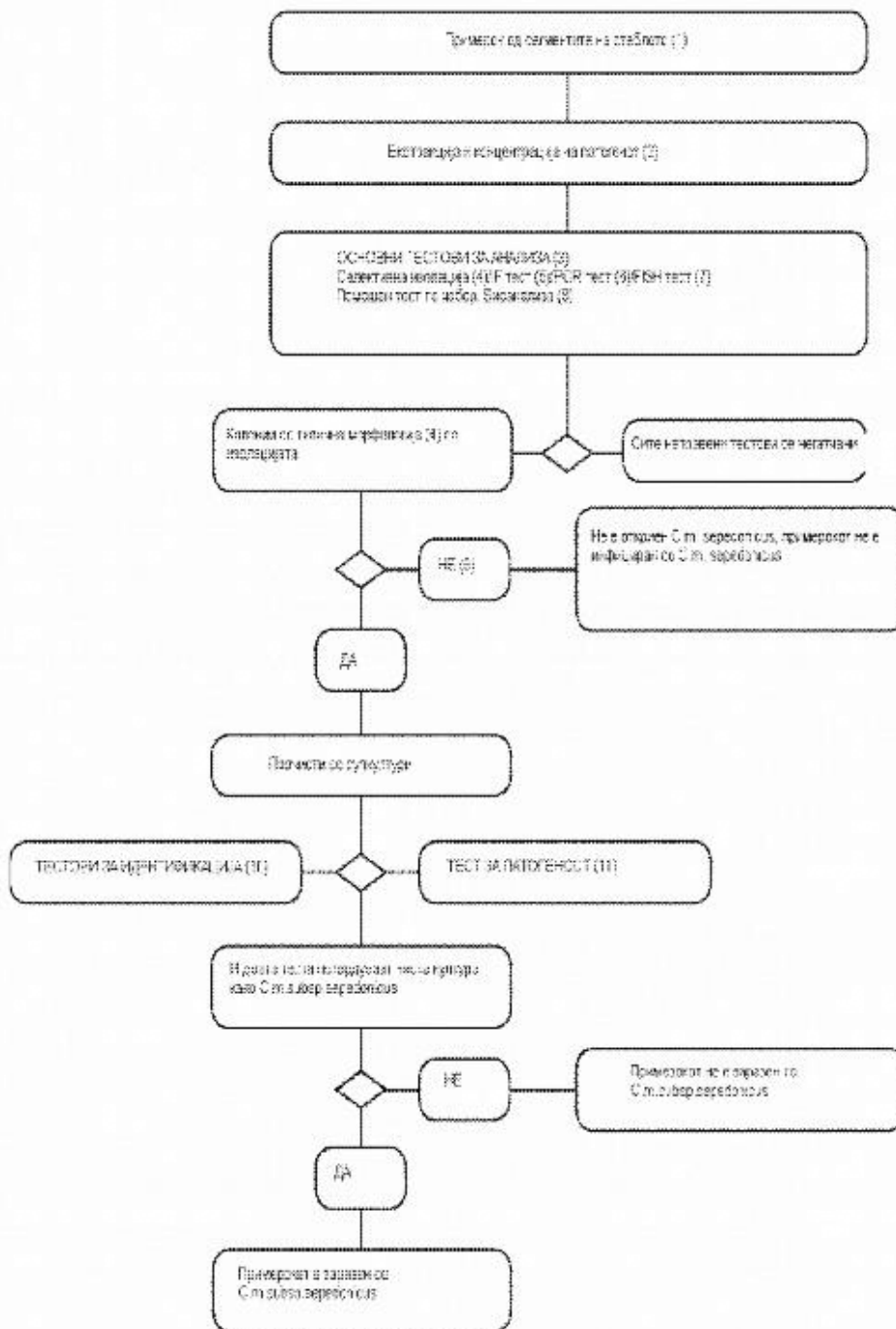
(9) Во Дел 8 е содржан опис на типична морфологија на колонија.

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

(11) Веродостојна идентификација на чиста култура на *C. m. subsp. sepedonicus* се постигнува со користење на тестовите наведени во Дел 9.

(12) Тестот за патогеност е опишан во Дел 10.

1.3. Шема за откривање и идентификација на *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. *subsp. sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. во примероци од растенија од компир без симптоми



-
- (1) Види Дел 3.2 за препорачаната големина на примерокот.
 - (2) Во Дел 3.2 се наведени методите за екстракција и концентрација на патогенот.
 - (3) Ако најмалку два теста направени врз основа на различни биолошки принципи се позитивни, треба да се изврши изолација и потврдување. Треба да се направи најмалку еден тест за анализа. Кога овој тест е негативен, примерокот се смета за негативен. Во случај овој тест да биде позитивен, потребно е да се направи втор или да се направат повеќе тестови врз основа на различни биолошки принципи, со цел да се потврди позитивниот резултат. Ако вториот или другите тестови се негативни, примерокот се смета за негативен. Не се неопходни понатамошни тестови.
 - (4) Тестот со селективна изолација и типичната морфологија на колонија се прикажани во Дел 8.
 - (5) IF тестот е опишан во Дел 4.
 - (6) Дел 6 ги опишува PCR тестовите.
 - (7) FISH тестот е опишан во Дел 5.
 - (8) Биоанализата е опишана во Дел 7.
 - (9) Одгледувањето култури или биоанализата може да не биде успешна поради конкуренцијата или попречувањето од сапрофитските бактерии. Ако со тестовите за анализа се постигнат позитивни резултати, но тестовите за изолација се негативни, треба да се повторат тестовите и ако биде неопходно да се тестираат дополнителни примероци.
 - (10) Веродостојна идентификација на чиста култура на *C. m. subsp. sepedonicus* се постигнува со користење на тестовите наведени во Дел 9.
 - (11) Тестот за патогеност е опишан во Дел 10.

2. ВИЗУЕЛЕН ПРЕГЛЕД ЗА СИМПТОМИ НА ПРСТЕНЕСТО ГНИЕЊЕ НА КРТОЛИТЕ И ВЕНЕЕЊЕ НА РАСТЕНИЈАТА КАЈ КОПИРОТ

2.1. Растенија од компир

Според европските климатски услови, на полињата ретко се забележуваат симптоми и често само на крајот на сезоната. Понатаму, симптомите често се маскирани или се мешаат со другите болести, стареење или механички оштетувања. Затоа, лесно е да не се забележат симптомите при контролата на терен. Симптомите на овенување се сосема различни од оние на кафеавото гниење, венењето вообичаено е бавно и првично ограничени на краевите од листовите. Младите инфицирани листови често продолжуваат да растат, но помалку во инфицираните зони. Ова создава листови со чудна форма. Листовите поради блокирање на спроводното ткиво во долниот дел на стеблото, често развиваат хлортични, жолти или портокалови области меѓу лисните жили. Инфицираните леторасты, листовите па дури и стеблата со тек на времето на крајот може да изумрат. Често листовите и кртолите се намалени во големина. Повремено растенијата се цуцести и закржлавени.

2.2. Кртоли од компири

Најраните симптоми се слаба просирност на ткивото, без омекнување околу спроводниот систем, особено во непосредна близина на окцето на кртолата. Спроводните прстени од окцето може да биде незначително потемнети од вообичаената боја. Првиот симптом што може да се идентификува е кога спроводниот прстен има жолтеникава обоеност и кога кртолата нежно ќе се притисне, од жилите излегува бела сиренкаста материја од бактериск исцедок (ексудат). Оваа материја содржи милиони бактерии. Во оваа фаза може да се развие кафеава боја на спроводното ткиво и симптомите на кртолата во оваа фаза се слични со оние кај кафеавото гниење што го предизвикува *Ralstonia solanacearum* sin. *Pseudomonas solanacearum*.

Во почетокот, овие симптоми може да бидат ограничени на само еден дел од спроводниот прстен, тие не мора да биде во близина на окцето и може постепено да се шират на целиот прстен. Како што напредува инфекцијата, доаѓа до пропаѓање на спроводното ткиво, надворешната кора може да се оддели од внатрешната. Кај напредните фази од инфекцијата се појавуваат пукнатини на површината на кртолата, кои често се црвеникаво-кафеави на краевите. Појавени се неколку случаи каде што централно сржта гние во исто време како и спроводниот прстен, што резултира со секундарна инвазија со внатрешно гниење, создавање на шуплини и некроза. Секундарниот напад од габите или бактериите може да ги маскира симптомите и може да биде тешко, дури и невозможно да се направи разлика помеѓу симптомите од прстенесто гниење на кртолите од другите гниења кој се јавува на кртолите. Можни се атипични симптоми.

3. ПОДГОТОВКА НА ПРИМЕРОКОТ

3.1. Кртоли на компири

Забелешка:

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

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

- Екстрактот од компир што е наведен подолу може, исто така, да се користи за откривање на бактеријата на кафеаво гниење кај компирот, *Ralstonia solanacearum*.

Постапка пред подготвување на примерокот:

Измијте ги кртолите. Користете соодветни средства за дезинфекција (соединенија на хлор кога се користи PCR тестот, со цел да се отстранат можните патогени ДНК) и детергенти на секој примерок. Исушете ги кртолите со вентилирање или сушење. Оваа постапка за миене особено е корисна (но не е задолжителна) за примероците со многу почва и ако треба да се изврши PCR тестот или постапката за изолација.

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

Забелешка:

Одделете ги сите кртоли со сомнителни симптоми на прстенесто гниење и извршете го тестот одделно.

Ако за време на отстранувањето на делот на сржта (кортекс) од окцето се забележуваат симптоми на прстенесто гниење, кртолата треба визуелно да се испита откако ќе се пресече во близина на окцето. Секој пресечена кртола со сомнителни симптоми треба да се суберизира на собна температура во период од два дена во карантин (на температура од 4 до 10°C) сè додека не се завршат сите тестирања. Сите кртоли во примерокот (вклучувајќи ги и оние со сомнителни симптоми) треба да се чуваат според Прилог 2.

3.1.2. Соберете ја сржта (кортекс) од окцата во неискористени садови за една употреба кои може да се затворат и/или да се запечатат (во случај садовите да се користат повторно, тие треба темелно да се исчистат и да се дезинфицираат со употреба на соединенија од хлор). По можност, веднаш да се обработи. Ако ова не е можно, треба да се чуваат во сад без додавање на заштита, да бидат ставени во фрижидер не подолго од 72 часа или не подолго од 24 часа на собна температура. Сушењето и суберизацијата на сржта (кортексот), како и растот на сапрофитите за време на чувањето може да го спречи откривањето на бактеријата на прстенесто гниење.

3.1.3. Обработете ја сржта (кортекс) од окцето со една од следните постапки: или

(а) покријте ја сржта (кортекс) од окцето со доволно количество (приближно 40мл) пуфер за екстракција (Додаток 3) и извршете миксација со ротирачки мешач (50 до 100 ввм) во период од 4 часа на температура под 24°C за 16 до 24 часа во фрижидер,

или

(б) хомогенизирајте ја сржта (кортекс) од окцето со доволно количество (приближно 40мл) пуфер за екстракција (Додаток 3), или со блендер/миксер (на пр. Waring or Ultra Thurax) или со кршење во затворено кесе за смекнување за една употреба (на пр. Stomacher or Bioreba, цврст политен, 150 мм × 250 мм;

стерилизирана со радијација) со употреба на гумен чекан или соодветна апаратура за ситнење (на пр. Nometex).

Забелешка:

Ризикот за напречна контаминација на примероците е висока кога примероците се хомогенизираат со миксер. Треба да избегнувате генерирање на аеросоли или истурање за време на процесот на екстракција. Осигурете ја употребата на свежо стерилизирани ножеви на миксерот и садовите за секој примерок. Ако се користи PCR тестот, избегнувајте пренесување на ДНК на садовите или апаратурата за ситнење. Се препорачува кршење во ќесиња за една употреба и користење епрувети за една употреба кога се користи PCR .

3.1.4. Претурете го чистиот флуид. Ако е премногу матен, разбистрете го со центрифугирање на ниска брзина (не повеќе од 180g за 10 минути, на температура помеѓу 4 до 10°C) или со вакумска филтрација (40 до 100 µm), миене на филтерот со дополнителен (10 мл) пуфер за екстракција (Додаток 3).

3.1.5. Концентрирајте го бактерискиот дел со центрифугирање на 7000 g за 15 минути (или 10.000g за 10 минути) на температура помеѓу 4 до 10°C и отстранете го чистиот флуид без да го попречите гранулатот и да не се помеша талогот.

3.1.6. Ресуспендирајте го гранулатот во пуфер за гранулат од 1,5мл (Додаток 3). Користете 500 µl за да направите тест за *C. m. subsp. sepedonicus*, 500 µl за *Ralstonia solanacearum* и 500 µl за референтни цели. Додадете стерилен глицерол на конечната концентрација од 10 до 25% (v/v) на 500 µl од референтниот коефициент и со остатокот од количеството за тестирање, вортекс и чувајте на температура од -16 до -24°C (недели) или на - 68 до - 86°C (месеци). Зачувајте ги аликвотните броеви на тестот на температура од 4 до 10° C за време на тестирањето.

Не се препорачува повторено замрзнување и кондензација.

Ако е потребен транспорт на екстрактот, истиот треба да се изврши во разладена комора во период од 24 до 48 часа.

3.1.7. Важно е сите позитивни контроли на *C. m. subsp. sepedonicus* и примероците да се третираат одделно, со цел да се избегне контаминација. Ова се однесува на IF слајдовите и на сите тестови.

3.2. Растенија од компир

Забелешка:

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

3.2.1. Со чист дезинфициран нож или ножици за режење, отстранете 1 до 2 см сегмент од основата на секое стебло, веднаш над нивото на почвата.

Дезинфицирајте ги деловите од стеблото со 70% етанол и веднаш исушете ги со хартија.

Ставете ги сегментите од стеблото во стерилен сад, според следните постапки за примероци:

3.2.2. Обработете ги деловите од стеблото со една од следните постапки: или,

(а) покријте ги деловите со доволно количество (приближно 40 мл) пуфер за екстракција (Додаток 3) и извршете миксација со ротирачки мешач (50 до 100 вртења/минута) во период од 4 часа, на температура под 24°C за 16 до 24 часа чување во фрижидер,

или

(б) веднаш извршете обработка. Со кршење на деловите во цврсто кесе за смекнување (на пр. Stomacher or Bioreba) со соодветно количество пуфер за екстракција (Додаток 3), со користење на гумен чекан или соодветна апаратура за ситнење (на пр. Homex). Ако ова не е можно, деловите од стеблото треба да се чуваат замрзнати не подолго од 72 часа или не подолго од 24 часа на собна температура.

3.2.3. Претурете го чистиот флуид откако ќе отстои 15 минути.

3.2.4. Вообичаено, не е потребно понатамошно прочистување на екстрактот или концентрацијата на бактерискиот дел, но тоа може да се постигне со филтрација и/или центрифугирање, како што е опишано во деловите од 3.1.4 до 3.1.6.

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

4. IF TEST

Принцип

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

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

потребно е понатамошно тестирање според шемата на постапки, со цел да се комплетира анализата.

Забелешка:

Секогаш користете поликлонални антитела кога IF тестот се користи како основен тест за анализа. Во случај на позитивен резултат со поликлоналното антитело, понатамошното испитување на примерокот со моноклонално антитело може да овозможи прецизност, но помала чувствителност.

Користете антитела со референтна низа на *C. m. subsp. sepedonicus*. Се препорачува титерот да се определи за секоја нова група антитела. Титерот се дефинира како највисок раствор на кој се јавува оптимална реакција кога се врши тестирање на суспензија што содржи од 10^5 до 10^6 клетки на мл од хомогениот вид на *C. m. subsp. sepedonicus* и кога се користи соодветен флуоресцентен изотиоцинатен конјугат (FITC), според препораките на производителот. Суровите поликлонални или моноклонални антитела треба да имаат IF титер од најмалку 1:2000. За време на тестирањето, антителата треба да се користат на работните раствори (WD) во близина на или во ниво на титерот. Користете соодветните антитела.

Тестот треба да се изведе на свежо подготвени екстракти. Ако е неопходно, може успешно да се изврши на екстракти што се чуваат на температура од -68 до -86°C со глицерол. Глицеролот може да се отстрани од примерокот со додавање на 1 мл гранулатен пуфер (Додаток 4), рецентрифугирање за 15 минути на 7000 грама и ресуспензија на еднакво количество гранулатен пуфер. Ова често не е неопходно, особено ако примероците се фиксирани на плочки со пламен. (види 2.2).

Подгответе одделни позитивни контролни слајдови од хомологени видови или која било друга референтни видови на *C. m. subsp. sepedonicus*, ставена во екстракт од компир, како што е наведено во (Додаток 2) и по избор, во пуфер.

Природно заразеното ткиво (кое се одржува со лиофилизација или замрзнување на температура од -16 до -24°C) треба, каде што е можно, да се користи како слична контрола на истиот слајд.

Како негативни контроли, користете ги аликутите на екстрактот од примерокот што претходно покажал негативен резултат.

Користете повеќекратни микроскопски плочки, по можност со 10 прозорчиња со дијаметар од најмалку 6 мм.

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

4.1. Подгответе ги плочките за тестирање користејќи една од следните постапки:

(а) За гранулатите (талог) со релативно мал седимент на скроб:

Со пипета земете стандардно количество (15 μ л е соодветно за прозорец со дијаметар од 6 мм – за поголеми прозорци користете поголеми количества) од 1/100 раствор на ресуспендираниот гранулат од компирот и ставете го на првиот прозорец. Потоа, земете слично количество нерастворен гранулат (1/1) и ставете го врз другите прозорци во редот. Вториот ред може да се користи како дупликат или како втор примерок, како што е прикажано на слика 1.

(б) За другите гранулати (талози) :

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

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

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

4.3. IF постапка

(а) Според подготовката на плочката за тестирање, наведено во 4.1(а):

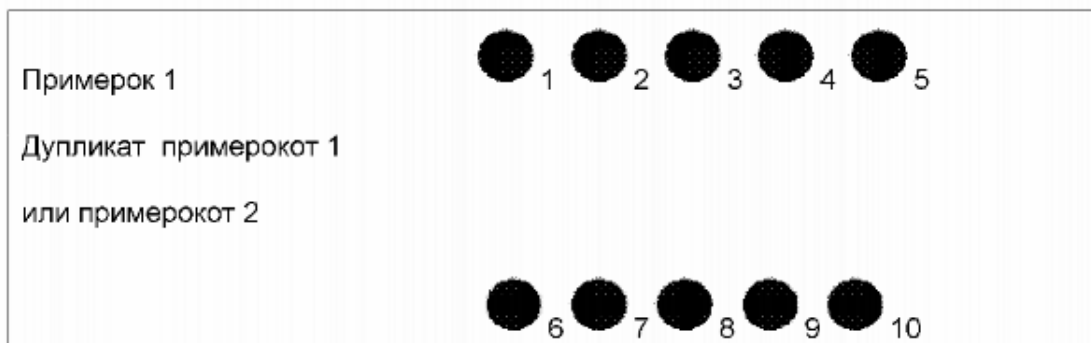
Подгответе сет двократни раствори антитела во IF пуфер. Првата комора треба да содржи $\frac{1}{2}$ од титерот (T/2), а другите $\frac{1}{4}$ од титерот (T/4), $\frac{1}{2}$ од титерот (T/2), титерот (T) и двојно од титерот (2T).

(б) Според подготовката на плочката за тестирање, наведено во 4.1(б):

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

Слика 1. Подготовка на плочката за тестирање, според 4.1(а) и 4.3(а)

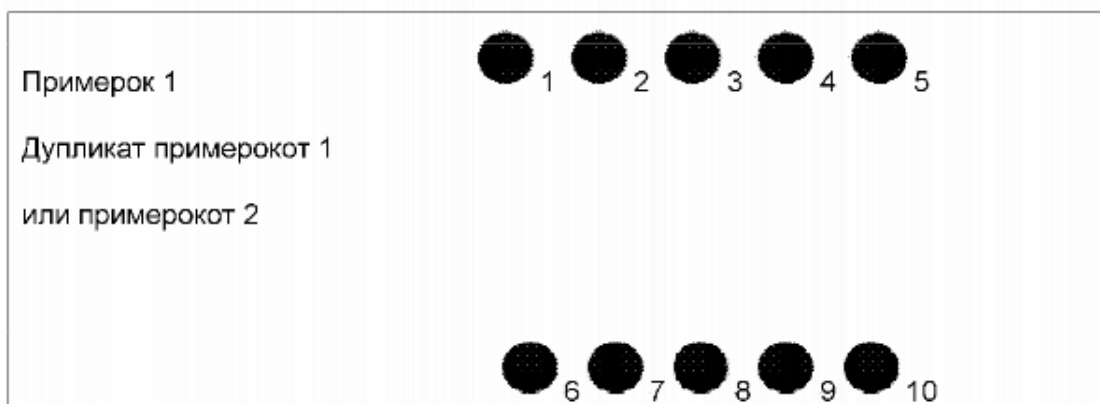
Раствори на ресуспендиран гранулат						
1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	1	Раствори на ресуспендиран гранулат
(Т=титер)	T/2	T/4	T/2	T	2T	Двократни раствори на антисерум/антитела



Слика 2. Подготовка на плочката за тестирање, според 4.1(б) и 4.3(б)

Работен раствор од антисерум/антитело

1/1 1/10 1/100 Празно Празно Г децимален раствор на ресуспендиран гранулат



4.3.1. Распоредете ги плочките на влажна хартија. Целосно покријте го секој тест прозорец со растворот од антитела. Количеството антитела што се применува на секој прозорец мора да биде најмалку колку количеството екстракт што се користи.

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

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

4.3.3. Протресете ги капките од секоја плочка и внимателно измијте со IF пуфер. Измијте со потопување за 5 минути во IF пуфер – (Tween) (Додаток 3) и потоа за време од 5 минути во IF пуфер. Избегнувајте предизвикување аеросоли или пренос на капките, кое може да резултира со напречна контаминација. Внимателно отстранете ја влажноста со нежно бришење.

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

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

4.3.6. Истресете ги капките од конјугатот од секоја од плочката. Измијте како што е наведено во (4.3.3).

Внимателно отстранете го вишокот влажност.

4.3.7. Со пипета земете 5 до 10 μ л од 0,1M глицерол збогатен со фосфат (Додаток 3) или комерцијално средство против избледнување на секој прозорец и покријте со микроскопско стакленце.

4.4. Читање на IF тестот:

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

Проверете ја прво позитивната контролна плочка. Клетките мора да бидат светли флуоресцентни и целосно прекриени со титерот од антитела или работниот раствор. IF тестот (Дел 4) мора да се повтори ако прекриеноста не е доволна.

4.4.2. Набљудувајте за светлите флуоресцентни клетки со карактеристична морфологија на *C. m. subsp. sepedonicus* во тест прозорците на тест плочките. Интензитетот на флуоресцентноста мора да е еднаков или подобар од сојот на

позитивната контролна на истиот раствор на антитела. Клетките со нецелосно прекривање или со слаба флуоресценција мора да се отфрлат.

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

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

4.4.4. Треба да се земат предвид само клетки со типична големина и морфологија на титерот или работниот раствор на антитела, како што е во 4.3.

4.4.5. Толкување на читањето на IF тестот:

(а) Ако се забележат светли флуоресцентни клетки со карактеристична морфологија, пресметајте го просечниот број типични клетки по микроскопско поле и пресметајте го бројот на типични клетки по мл ресуспендиран гранулат (Додаток 4).

IF читањето е позитивно за примероците со намалку 5×10^3 типични клетки на мл ресуспендиран гранулат. Примерокот се смета за потенцијално контаминиран и потребно е понатамошно тестирање.

(б) IF читањето е негативно за примероците со помалку од 5×10^3 клетки на мл ресуспендиран гранулат и примерокот се смета за негативен. Не е потребно понатамошно тестирање.

5. FISH тест

Принцип

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

Забелешка:

Користете верификувани специфични олиго-проби за *C. m. subsp. sepedonicus* (Додаток 7). Прелиминарното тестирање со овој метод треба да овозможи репродуктивно откривање на најмалку 10^3 до 10^4 клетки од *C. m. subsp. sepedonicus* на мл, додадени на екстракт од примерок кој претходно бил тестиран и покажал негативен резултат.

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

Како негативни контроли, користете ги аликотите на екстрактот од примерокот што претходно покажал негативен резултат за *C. m. subsp. sepedonicus*.

Како позитивни контроли, подгответе суспензии кои ќе содржат 10^5 до 10^6 клетки на мл од *C. m. subsp. sepedonicus* (на пр. NCPPB 4053, или PD 406) во 0,01M фосфатен пуфер (PB) од три до пет дневна култура (подготовка види Додаток 2). Подгответе одделни позитивни контролни плочки од хомогениот сој или кој било друг референтен сој на *C. m. subsp. sepedonicus*, ставена во екстракт од компир, како што е наведено во (Додаток 2).

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

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

5.1. Фиксирање на екстрактот од компир

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

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

5.1.2. Со пипера земете 100 μl од секој екстракт на примерок во Епендорфова епрувета и центрифугирајте 8 минути на 7000 грама.

5.1.3. Отстранете го чистиот флуид (супернатантот) и растворете го гранулатот во 500 μl фиксатор, претходно подготвен за помалку од 24 часа. Измешајте во вортекс – ротирачка мешалица и инкубирајте или еден час или преку ноќ на температура од 4°C .

Алтернативен фиксатор е 96% етанол. За да го користите истиот, растворете го гранулатот од чекорот 5.1.2 во 50 μl 0,01M PB и 50 μl 96 % етанол. Измешајте и инкубирајте на температура од 4°C за време од 30 до 60 минути.

5.1.4. Центрифугирајте 8 минути на 7000 грама, отстранете го чистиот флуид и ресуспендирајте го гранулатот во 75 μl 0,01M PB (види Додаток 3).

5.1.5. Нанесете 16 μl од фиксираниите суспензии на чиста плочка за повеќекратно тестирање, како што е прикажано на сликата 3. Нанесете два различни нерастворени примероци по плочка и користете 10 μl за да направите 1:100 раствор (во 0,01M PB). Останатиот раствор од примерокот (49 μl) може да се чува на температура од -20°C по додавање на 1 количество 96% етанол. Во случај да треба да се повтори FISH анализата, отстранете го етанолот со центрифугирање и додадете еднакво количество 0,01M PB (измешајте во вортекс- вртчка мешалица).

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

Како негативни контроли, користете ги аликотите на екстрактот од примерокот што претходно покажал негативен резултат за *C. m. subsp. sepedonicus*.

Како позитивни контроли, подгответе суспензии кои ќе содржат 10^5 до 10^6 клетки на мл од *C. m. subsp. sepedonicus* (на пр. NCPPB 4053, или PD 406) во 0,01M фосфатен пуфер (PB) од три до пет дневна култура (подготовка види Додаток 2). Подгответе одделни позитивни контролни плочки од хомогениот сој или кој било друг референтен сој на *C. m. subsp. sepedonicus*, ставена во екстракт од компир, како што е наведено во (Додаток 2).

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

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

5.1. Фиксирање на екстрактот од компир

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

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

5.1.2. Со пипера земете 100 μl од секој екстракт на примерок во Епендорфова епрувета и центрифугирајте 8 минути на 7000 грама.

5.1.3. Отстранете го чистиот флуид (супернатантот) и растворете го гранулатот во 500 μl фиксатор, претходно подготвен за помалку од 24 часа. Измешајте во вортекс – ротирачка мешалица и инкубирајте или еден час или преку ноќ на температура од 4°C .

Алтернативен фиксатор е 96% етанол. За да го користите истиот, растворете го гранулатот од чекорот 5.1.2 во 50 μl 0,01M PB и 50 μl 96 % етанол. Измешајте и инкубирајте на температура од 4°C за време од 30 до 60 минути.

5.1.4. Центрифугирајте 8 минути на 7000 грама, отстранете го чистиот флуид и ресуспендирајте го гранулатот во 75 μl 0,01M PB (види Додаток 3).

5.1.5. Нанесете 16 μl од фиксираниите суспензии на чиста плочка за повеќекратно тестирање, како што е прикажано на сликата 3. Нанесете два различни нерастворени примероци по плочка и користете 10 μl за да направите 1:100 раствор (во 0,01M PB). Останатиот раствор од примерокот (49 μl) може да се чува на температура од -20°C по додавање на 1 количество 96% етанол. Во случај да треба да се повтори FISH анализата, отстранете го етанолот со центрифугирање и додадете еднакво количество 0,01M PB (измешајте во вортекс- вртчка мешалица).

Слика 3. Приказ на FISH плочка

Примерок 1	Празно	Празно	Празно	Примерок 2
				
Прозорец 1	Прозорец 2	Прозорец 3	Прозорец 4	Прозорец 5
Примерок 1	Празно	Празно	Празно	Примерок 2
				
Прозорец 6	Прозорец 7	Прозорец 8	Прозорец 9	Прозорец 10

Плочка 1

Плочка 2

5.1.6. Со вентилирање исушете ги плочките (или со сушач на плочки на температура од 37°C) и фиксирајте ги со запалување.

Во оваа фаза, постапката може да се прекине и да се продолжи со хибридизација наредниот ден. Плочките треба да се чуваат на собна температура, на суво место каде што нема прав.

5.2. Предхибридизација и хибридизација

5.2.1. Подгответе раствор од лизозим со 10мг лизозим (Sigma L- 6876) во 10мл пуфер (100 mM Tris- HCl, 50 mM EDTA , pH8.0). Овој раствор може да се чува, но може да се замрзнува и да се одмрзнува само еднаш. Добро покријте го секој примерок со приближно 50 μ л раствор од лизозим и инкубирајте 10 минути на собна температура. Потоа, потопете ги плочките во деминерализирана вода само еднаш, а потоа исушете со филтер хартија.

Како алтернатива, наместо лизозин, додадете 50 μ л од 40 до 400 μ г мл – 1 протеиназа K во пуферот (20 mM Tris- HCl , 2 mM CaCl₂, , pH 7,4) во секоја комора, на температура од 37°C за време од 30 минути.

5.2.2. Дехидрирајте ги клетките во серија етанол од 50%, 80% и 96%, по минута во секоја од нив. Исушете ги плочките на држач за плочки, со вентилирање.

5.2.3. Подгответе влажна комора за инкубација со покривање на дното на вакумска кутија користејќи марамче или филтер хартија натопена во 1x хибмикс (hybmix) (Додаток 7). Претходно инкубирајте ја кутијата во печка за хибридизација на температура од 55°C за време од 10 минути.

5.2.4. Подгответе го растворот за хибридизација (Додаток 7) дозволувајќи 45 μ л по плочка и прединкубирајте 5 минути на температура од 55°C.

5.2.5. Ставете ги плочките на жешка плоча на температура од 45°C и нанесете 10 μ л од растворот за хибридизација на секоја од четирите комори на плочката (плочките).

5.2.6. Користете две плочки (24 × 24мм) за секој слајд, без да се пропушта воздух. Ставете ги плочките во претходно загреана влажна комора и хибридизирајте преку ноќ во печка на температура од 55°C на темно.

5.2.7. Подгответе три лабораториски чаши со 1л ултра чиста вода (UPW), 1 л 1x (hybmix) (334 мл 3x (hybmix) и 666 мл UPW) и 1л од 1/2x (hybmix) (167 мл 3x (hybmix) и 833 мл UPW). Претходно инкубирајте ја секоја од нив во водена када на температура од 55°C.

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

5.2.9. Измијте го вишокот на сондата со инкубација од 15 минути во лабораториска чаша со 1x (hybmix) , на температура од 55°C.

5.2.10. Пренесете го држачот на плочки во раствор за миење од 1/2 (hybmix) и извршете инкубација дополнителни 15 минути.

5.2.11. Кратко потопете ги плочките во UPW и ставете ги на филтер хартија. Отстранете го вишокот влажност со покривање на површината со филтер хартија. Со пипета земете 5 до 10 μ л раствор против избледнување (на пр. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA или еднакви) на секој прозорец и користете голема плочка (24 × 60 мм) на целата површина.

5.3. Читање на FISH тестот

5.3.1. Набљудувајте ги плочките под микроскоп опремен за епифлуоресценција на 630 или 1000x потопени во масло. Со филтер соодветен за флуореосцентни изотиоциантни (FITC) еубактериски клетки (вклучително повеќето грам негативни клетки) во примерокот се прекриени со флуоресцентно зелено. Со филтер за тетраметилпродамин-5-изотиоцианат, Су3- обоени клетки од *C. m. subsp. sepedonicus* имаат флуоресцентна црвена боја. Споредете ја морфологијата на клетката со таа на позитивните контроли. Клетките мора да бидат светли флуоресцентни и целосно прекриени. FISH тестот (Дел 9.4) мора да се повтори ако прекриеноста не е доволна. Скенирајте ги прозорците по два дијаметра под прав агол и околу периметарот. За примероците кои не покажуваат или покажуваат мал број клетки, набљудувајте најмалку 40 микроскопски полиња.

5.3.2. Набљудувајте светли флуоресцентни клетки со карактеристична морфологија на *C. m. subsp. sepedonicus* во тест прозорците на тест плочките. Интензитетот на флуоресцентноста мора да биде еднаков или подобар од сојот на позитивната контрола. Клетките со нецелосно прекривање или со слаба флуоресценција мора да се отфрлат.

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

5.3.4. Постојат неколку проблеми што се карактеристични за FISH тестот. Основните популации флуоресцентни клетки со атипична морфологија и сапрофитски бактерии со големина и морфологија слична на *C. m. subsp. sepedonicus* најверојатно ќе се појават од сржта (кортексот) од окцата во компирот и на сегментите од стеблото, иако многу поретко во споредба со IF тестот.

5.3.5. Разгледајте ги само флуоресцентните клетки со типична големина и морфологија, види 5.3.2.

5.3.6. Толкување на резултатите од FISH тестот:

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

(б) FISH тестот е негативен ако не се забележат светли црвени флуоресцентни клетки со големина и морфологија типична за *C. m. subsp. sepedonicus*, користејќи родамински филтер, под услов тие типични светли флуоресцентни клетки да се набљудуваат во изработените позитивни контроли кога се користи родаминскиот филтер.

6. PCR тест

Принципи

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

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

Забелешка:

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

Користете соодветно потврдени PCR реагенси и протоколи. Пожелно е да изберете метод со внатрешна контрола.

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

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

Следните негативни контроли треба да бидат вклучени во PCR тестот:

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

Треба да се вклучат следните позитивни контроли:

- аликоти на суспендиран гранулат на кој е додаден *C. m. subsp. sepedonicus* (подготовка, види Додаток 2),
- суспензија од 10^6 клетки на мл од *C. m. subsp. sepedonicus* во вода од вирулентен изолат (на пр. NCPPB 2140 или NCPPB 4053),
- ако е можно, исто така, користете ја ДНК извадена од позитивните контролни примероци во PCR тестот.

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

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

6.1. Методи за прочистување на ДНК

Користете позитивни и негативни контролни примероци како што е прикажано погоре.

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

Достапни се разновидни методи за прочистување на ДНК од сложените супстрати на примероците, така што се отстрануваат инхибиторите на PCR и другите ензиматски реакции и концентрирање на целната ДНК во екстрактот на примерокот.

Следниот метод е да се употребува со потврден PCR метод, прикажан во Додаток 6.

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

1. Со пипета земете 220 μ л пуфер за лизирање (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0) во 1.5 мл Епендорфова епрувета.
2. Додадете 100 μ л екстракт од примерок и ставете го на грејач или водена када, на температура од 95°C за време од 10 минути.
3. Ставете ја епруветата во мраз 5 минути.
4. Додадете 80 μ л раствор од лизозим (50 мкг лизозим на мл во 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) и инкубирајте на температура од 37°C 30 минути.
5. Додадете 220 μ л од Easy ДНА® раствор А (инвитроген), добро промешајте и инкубирајте на температура од 65°C за време од 30 минути.
6. Додадете 100 μ л од Easy ДНА® раствор Б (инвитроген), силно измешајте сè додека преципитатот слободно не протече во епруветата и примерокот е еднакво вискозен.
7. Додадете 500 μ л хлороформ и мешајте сè додека не се намали вискозноста и додека смешата не стане хомогена.
8. Центрифугирајте на 15000g 20 минути на температура од 4°C за да ги одделите фазите и да се формира интерфазата.
9. Пренесете ја горната фаза во нова епендорфова епрувета.
10. Додадете 1мл од 100% етанол (-20°C), кратко мешајте и инкубирајте на мраз 10 минути.
11. Центрифугирајте на 15000g за 20 минути на температура од 4°C и остранете го етанолот од плочката.

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

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

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

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

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

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

6.1.(б) Други методи

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

6.2. PCR

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

6.2.2. Подгответе соодветен PCR реактивен микс во неконтаминирана средина, според објавениот протокол (Додаток 6). Потврдениот PCR протокол е многустрана реакција која, исто така, вклучува внатрешна PCR контрола.

6.2.3. Додадете 5 μ л ДНК екстракт на 25 μ л PCR реакција во стерилни PCR епрувети.

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

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

6.3. Анализа на PCR производот

6.3.1. Разложете ги PCR ампликоните/ производите со електрофореза со агарозен гел. Излејте најмалку 12 μ л амплифицирана ДНК реактивна мешавина од секој примерок измешан со 3 μ л пуфер за полнење (Додаток 6) во 2.0% (w/v) агарозни гелови во трис-ацетат-EDTA (TAE) пуфер (Додаток 6) на 5 до 8 V на см. Користете соодветен ДНК маркер, на пр. 100 bp скала.

6.3.2. Откријте ги ДНК врските со обложување со етидиум бромид (0.5 мг на л) за време од 30 до 45 минути, имајќи предвид соодветни мерки за претпазливост при ракувањето со овој мутаген.

6.3.3. Набљудувајте го обложениот гел на УВ трансилуминација на кратки бранови (на пр. $\lambda = 302$ nm) за засилени PCR производи со очекувана големина (Додаток 6) и документирајте.

6.3.4. За сите нови наоди/случаи треба да ја потврдите автентичноста на PCR ампликонот, преку изведување рестриktivна ензимска анализа на примерок од останатата амплифицирана ДНК, со инкубација на оптимална температура и време, со соодветен ензим и пуфер (види Додаток 6). Растворете ги обработените фрагменти со електрофореза со агарозен гел како претходно и набљудувајте ја карактеристичната рестриktivна шема на фрагментот под УВ трансилуминација, по обложување со етидиум бромид и споредете со дијагностицираните и недијагностицираните позитивни контроли.

Толкување на резултатите од PCR тестот:

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

PCR тестот ќе биде позитивен, ако се забележи *C. m. subsp. sepedonicus* специфичниот PCR производ со очекувана големина и рестриktivна шема (кога е потребно), под услов да не се засили со која било од негативните контролни примероци. Исто така, може да се добие веродостојна потврда со повторување на тестот со вториот комплет PCR параметри (Дел 9.3).

Забелешка:

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

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

7. ТЕСТ СО БИОАНАЛИЗА

Забелешка:

Прелиминарното тестирање со овој метод треба да овозможи репродуктивно откривање на најмалку 10^3 до 10^4 клетки кои формираат колонии од *C. m. subsp. sepedonicus* на мл додадени на екстракт од примерок кој претходно бил тестиран и покажал негативен резултат (подготовка, види Додаток 2).

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

Некои видови модри патлици овозможуваат одлична средина за селективно збогатување за раст на *C. m. subsp. sepedonicus*, дури во отсуство на симптоми и обезбедуваат одличен тест за потврдување на домаќинот.

Условите за растење треба да бидат оптимални за да се намали ризикот за погрешни негативни резултати од тестирањето.

За детали во врска со културите, види Додаток 8.

7.1. Распределете го целиот останат производ од тестот на ресуспендирана плочка, како што е претставено во делот 3.1.6 или 3.2.5 помеѓу модрите патлици, користејќи еден од методите дадени подолу (7.3 или 7.4) Користете само растенија во втора или трета фаза на листови сè до целосно ширење на третиот вистински лист. Со цел да се обезбеди целосно искористување на ресуспендираната плочка, како и ефективна инокулација, за постапките што се опишани подолу потребни се 15 до 25 модри патлици по примерок.

7.2. Не ги наводнувајте модрите патлици еден или два дена пред инокулацијата, со цел да се намали тургорниот притисок.

7.3. Надолжна инокулација

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

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

7.3.3. Затворете го пресекот со стерилен вазелин од шприц.

7.4. Инокулација со шприц

Инокулирајте ги стеблата на модриот патлиџан веднаш над котиледоните, со користење на шприц со хиподермичка игла (не помалку од 23 Г). Распределете го примерокот помеѓу модрите патлиџани.

7.5. Како позитивна контрола, инокулирајте 5 растенија со водена суспензија од 10^5 до 10^6 клетки на мл од позната култура на *C. m. subsp. sepedonicus*, каде што е возможно, од природно инфицирано ткиво од кртола (види Дел 4) со истиот метод на инокулација (7.3 или 7.4).

7.6. Како негативна контрола, инокулирајте 5 растенија со стерилен пуфер од талог со истиот метод на инокулација (7.3 или 7.4).

7.7. Инкубирајте ги растенијата во карантински услови за време до 4 недели, на температура од 18 до 24°C. Инкубирајте ги растенијата со доволно светлина и висок степен на влажност (70 до 80%) и наводнувајте за да спречите напукнување и венење поради недостаток на вода. Клетките на *C. m. subsp. sepedonicus* умираат на температура на 30°C, а оптимална температура е 21°C. За да избегнете контаминација, инкубирајте ги растенијата од позитивната и негативната контрола на одделни маси/полици во оранжерија или комора за растење, во случај ако нема доволно простор, обезбедете строга поделеност помеѓу третманите. Ако растенијата од различни примероци мора да се инкубираат заедно, одделете ги со соодветни прегради. При фертилизација, наводнување, испитување и друг вид манипулации, внимавајте да избегнувате напречна контаминација. Важно е оранжеријата и коморите за растење да бидат слободни од сите штетни организми, бидејќи тие може да ја пренесуваат бактеријата од еден примерок на друг.

7.8. По една недела редовно испитувајте за појава на симптомите. Избројте го бројот на растенија што покажуваат симптоми. *C. m. subsp. sepedonicus* предизвикувајќи паѓање на листовите кај модриот патлиџан, кое може да започне со омекнување на краевите или нерватура на растението. Заразеното ткиво на почетокот може да изгледа темнозелено или со дамки, но станува побледо пред да стане некротично. Венењето меѓу лисните жили често изгледаат како да се мрсни и наводенети. Некротичното ткиво често има светложолта маргина. Растенијата не мора да умрат, колку е подолг периодот пред да се развијат симптомите, толку е поголема шансата за преживување. Растенијата можат да ја надрастат инфекцијата. Младите модри патлиџани се поподложни на мали популации од *C. m. subsp. sepedonicus* во споредба со постарите, па оттаму, неопходно е да се користат растенија во или веднаш пред фаза 3 на листовите.

Венењето, исто така, може да го предизвикаат популации од други бактерии или габи присутни во талогот од ткивото од кртолата. Тука се вклучени *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora subsp. carotovora* и *E. carotovora subsp. atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua var. foveata*, како и големи популации на сапрофитни бактерии. Особено *Erwinia chrysanthemi* може да предизвика симптоми, а листовите и овенувањето слично како и симптомите на *C. m. subsp. sepedonicus*. Единствената разлика е зацрнувањето на стеблата во случај на инфекциите со *Erwinia chrysanthemi*. Другите видови венење може да се разликуваат од оние предизвикани од *C. m. subsp. sepedonicus*,

бидејќи целите лисја или растенија венеат многу брзо. Исто така, може да се подготви и Грам бојење. Овој тест ќе направи разлика помеѓу *C. m. subsp. sepedonicus* и *Erwinia chrysanthemi*.

7.9. Откако ќе се забележат симптомите кај модриите патлици, треба да се изведе реизолација, со користење на ткиво од овенат лист или ткиво од стеблото на растенијата (види 3.1.3 за мацерација на ткиво). Извршете површинска дезинфекција на листовите и стеблата на модриот патлици, со третман со 70% етанол. Направете IF или PCR тест на сокот од модриите патлици и извршете изолација на соодветен (селективен) медиум (види Дел 8). Може, исто така, да се подготви Грам бојење (Додаток 9). Идентификувајте прочистени култури на *C. m. subsp. sepedonicus* и потврдете ја патогеноста (види Дел 9 и 10).

7.10. Во одредени околности, особено кога нема оптимални услови за растење, можно е *C. m. subsp. sepedonicus* да постои како латентна инфекција во модриите патлици, дури и по периодот на инкубација до 4 недели. Ако не се забележат симптоми по 4 недели, направете IF/ PCR на композитен примерок од 1 см делови од стебло на секое растение за тестирање земено над местото на инокулација. Ако тестот е позитивен, треба да се направи реизолација на соодветен (селективен) медиум, следејќи ја постапката наведена во Дел 8. Идентификувајте прочистени култури од *C. m. subsp. sepedonicus* и потврдете ја патогеноста (види Дел 9 и 10).

Толкување на резултатите од тестот со биоанализа.

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

Биоанализата е негативна ако тест растенијата не се заразени со *C. m. subsp. sepedonicus* и под услов да биде откриен *C. m. subsp. sepedonicus* во позитивните контроли.

Тестот со биоанализа е позитивен ако тест растенијата се инфицирани со *C. m. subsp. sepedonicus*.

8. ИЗОЛАЦИЈА НА *C. m. subsp. sepedonicus*

Забелешка:

Дијагнозата е комплетна ако се изолира *C. m. subsp. sepedonicus*, ако потоа се идентификува (види Дел 9) и се потврди со тест за патогеност (Дел 10). Иако *C. m. subsp. sepedonicus* е сложен организам, може да се изолира од симптоматското ткиво.

Меѓутоа, може да биде надраснат од брзо растечките сапрофитски бактерии и затоа се тешки изолациите директно од екстратот на ткивото од кртолата или стеблото (Делови 3.1.6 или 3.2.5). Со селективен медиум и соодветен раствор

на ресуспендиран мацерат од сржта (кортексот) од окцата или стеблата на компирите може да биде возможна изолација на *C. m. subsp. sepedonicus*.

Изолирањето ќе се направи од сите симптоматски кртоли или сегменти на стеблото на компирот и модрите патлици каде што не се забележани симптоми, но IF/PCR тестот од композитниот примерок беше позитивен (види Дел 7.10). Мацерацијата на стеблата на модрите патлици, кога е неопходно, треба да се прави како што е опишано во Дел 3.1.3.

Како позитивни контроли, подгответе децимални раствори од суспензија од 10^6 cfu на мл *C. m. subsp. sepedonicus* (на пр. NCPPB 4053 или PD 406). Со цел да избегнете можна контаминација, подгответе ги позитивните контроли во одделна средина од онаа каде што ќе се тестираат примероците.

За секоја новоподготвена група селективен медиум, неговата соодветност за раст на патоген треба да се тестира пред да се користи за тестирање на рутински примероци.

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

8.1. Селективно посејување на плочка

8.1.1. Направете 10-кратни раствори во мацератен пуфер од 100 μ л аликот/количество од ресуспендиран примерок на компир или сок од модар патлицан (Додаток 3).

8.1.2. Изолирањето од нерастворениот концентрат од компирот вообичаено не успева поради тешкиот раст на *C. m. subsp. sepedonicus* и од влијанието од сапрофитите. Бидејќи бактеријата е вообичаено присутна во големи популации кај заразените ткива, сапрофитите може вообичаено да се растворат, а да остане патогенот. Затоа, се препорачува да се нанесе 100 μ л од секој примерок, 1/100 до 1/10000 раствори на MTNA медиум или NCP -88 медиум (Додаток 5) (ако се користат Петри садови со дијаметар од 90мм, треба да се усогласи волуменот за алтернативни големини на садот), со инструменти за нанесување (стапче) и техниката за нанесување на плоча.

Забелешка:

Алтернативна стратегија, исто така, е да се нанесе прво 100 μ л аликот/количество од екстракт на компир врз првата плочка, со нанесувач и потоа да се отстрани нанесувачот на втора плочка, отстранувајќи ги остатоците останати на нанесувачот, на крајот повторете го ова со трета плочка, со што ќе овозможите ефект на растворување преку нанесувачот.

8.1.3. Инкубирајте ги плочките на темно, на температура од 21 до 23°C.

8.1.4. Првичните испитувања на плочките, вклучувајќи упатување кон контролните плочки, се бројат какви било *C. m. subsp. sepedonicus* колонии, се создадени по 3 дена, со понатамошни анализи по 5, 7 и евентуално по 10 дена.

8.2. Прочистување на сомнителните колонии

Забелешка:

Субкултурирањето на колониите слични на *C. m. subsp. sepedonicus* слични колонии треба да се изврши на YGM медиуми за инокулација на модар патлиџан и/или последователна идентификација, ова треба да се направи пред плочките да прераснат, т.е. пожелно е по три до пет дена.

8.2.1. Нанесете ги колониите слични на *C. m. subsp. sepedonicus* на еден од следните медиуми: (дадени во Додатокот 5):

хранлив декстрозен агар (само за субкултури),

квасен пептонски гликозен агар,

квасен екстракт со минерални соли.

Инкубирајте на температура од 21 до 24°C во период од десет дена.

C. m. subsp. sepedonicus бавно расте, вообичаено генерира точковидни, кремасти, куполообразни колонии, во период од 10 дена.

8.2.2. Нанесете одново за да добиете чистота.

Стапките на раст се подобруваат со субкултурата. Типичните колонии се кремasto-бели или со боја на слонова коска, често жолтеникави, кружни, мазни, подигнати, со конвексни куполи, мукоидно течни, со целосни marginи и најчесто со дијаметар од 1 до 3 мм.

Едноставно Грам боење (Додаток 9) може да помогне при селектирање на колониите за понатамошно тестирање.

8.2.3. Идентификувајте ги претпоставените култури (види Дел 9) и направете тест за патогеност (види Дел 10).

9. ИДЕНТИФИКАЦИЈА

Идентификувајте чисти култури на изолати на *C. m. subsp. sepedonicus*, со користење на најмалку два од следните тестови, врз основа на различни биолошки принципи.

Вклучете ги познатите референтни соеви каде што е соодветно за секој извршен тест.

9.1. Хранливи и ензимски идентификациски тестови

Определете ги следните фенотипски карактеристики кои се универзално присутни или отсутни кај *C. m. subsp. sepedonicus*, според методите на Lelliott and Stead (1987), Klement et al. (1990), Schaad (2001), Anonymous (1987).

Сите медиуми треба да се инкубираат на температура од 21°C и да се испитаат по шест дена. Ако нема раст, инкубирајте до период од 20 дена.

Сите тестови мора да вклучуваат позната контрола на *C. m. subsp. sepedonicus*. Хранливите и физиолошките тестови мора да се направат со користење на култури од хранлив агар. Морфолошките споредби мора да се направат од култури на хранлив агар со додаток на декстроза.

Тестови	Очекуван резултат
Тест со оксидација /ферментација (О/Ф) оксидација	Инертен или со неделна
Активност на оксидазата	—
Раст на температура од 37°C	—
Активност на уреазата	—
Хидролиза на ескулин	+
Хидролиза на скроб	— или слаба
Толеранција од 7% NaCl	—
Индол производство	—
Активност на каталаза	+
Генерирање H ₂ S	—
Користење цитрат	—
Ликвификација на желатин	—
Кисел глицерол	—
Киселина од лактоза	— или слаба
Киселина од рамноза	—
Киселина од салицин	—
Грам боење (Додаток 9)	+

9.2. IF-тест

- (а) Подгответе суспензија од приближно 10^6 клетки на мл во IF пуфер (Додаток 3).
- (б) Подгответе серија двократен раствор од соодветниот антисерум.
- (в) Спроведете ја постапката за IF тестот (Дел 4).
- (г) Позитивен IF тест се постигнува ако IF титерот на културата е еднаков со оној на позитивната контрола.

9.3. PCR тест

- (а) Подгответе суспензија од приближно 10^6 клетки на мл во ултра чиста вода (UPW).
- (б) Загрејте 100 μ л од клеточната суспензија во затворени епрувети во термостат или жешка када на температура од 100°C четири минути. Ако е потребно, додадете свежо подготвен NaOH на конечната концентрација од 0,05M, кое ќе помогне за клеточното разградување. Тогаш, примероците може да се чуваат на температура од -16 до -24°C сè додека не бидат потребни.
- (в) Применете ги соодветни постапки за PCR за да се засилат специфичните ампликони/продукти на *C. m. subsp. sepedonicus*. (на пр. Pastrok, 2000; see Appendix 4; Li and de Boer, 1995; Mills et al., 1997; Pastrok and Rainey, 1999; Schaad et al., 1999.)
- (г) Позитивна идентификација на *C. m. subsp. sepedonicus* се добива ако PCR ампликоните/продуктите се со иста големина и имаат полиморфизми со иста рестриктивна должина на фрагмент како и кај низата од позитивната контрола.

9.4. FISH тест

- (а) Подгответе суспензија од приближно 10^6 клетки на мл во ултра чиста вода (UPW.).
- (б) Спроведете ја постапката за FISH тестот (Дел 5).
- (в) Позитивен FISH тест се добива ако се постигнат истите реакции од културата и позитивната контрола.

9.5. Профилирање на масните киселини (ПМК) - (FAP)

- (а) Растете ја културата на трипитказен соја- агар (Oxoid) за време од 72 часа на температура од 21°C (+/- 1°).

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

(в) (FAP) – тестот е позитивен ако профилот на претпоставената култура е идентичен со оној на позитивната контрола. Присуството на карактеристични масни киселини е 15:1 масни киселини и естери (Антеисо А), 15:0 Исо, 15:0 Антеисо, 16:0 Исо, 16:0 и 17:0 Антеисо (15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 i 17:0 Anteiso) укажува на *C. m. subsp. sepedonicus*. Другите родови, како што се *Curtobacterium*, *Arthrobacter* and *Micrococcus*, исто така, имаат дел од овие киселини, но 15:1 Антеисо А е ретка киселина кај овие бактерии, но се појавува кај сите *Clavibacter spp.*, помеѓу 1 до 5%. Кај *C. m. subsp. sepedonicus*, вредноста најчесто е 5%.

9.6. BOX-PCR

(а) Подгответе суспензија од приближно 10^6 клетки на мл во ултра чиста вода (UPW).

(б) Применете го тестот според постапката (Smith et al., 2001)

10. ТЕСТ ЗА ПОТВРДУВАЊЕ

Тестот за патогеноста мора да се изведе како конечна потврда за дијагнозата на *C. m. subsp. sepedonicus* и за процена на вируленцијата на културите идентификувани како *C. m. subsp. sepedonicus* :

10.1. Подгответе инокулум од приближно 10^6 клетки по мл од три дневни култури од изолат што треба да се тестира и соодветна низа од позитивна контрола од *C. m. subsp. sepedonicus*.

10.2. Инокулирајте 5 до 10 стебла од модар патлиџан од млади израсатоци во фаза 3 на листот (Дел 7.3 или 7.4).

10.3. Инкубирајте на температура од 18 до 24°C, со доволно светлина и висока влажност, со соодветно наводнување со цел да се избегне исушување или стрес од дехидрирање (Дел 7.7). Со чисти култури, типичното венеење би требало да се случи во рок од две недели, но растенијата кои не покажуваат симптоми (види Дел 7.8) за ова време треба да се инкубираат до три недели, на температура која е соодветна за растот на модриот патлиџан, но не над 25°C (Додаток 8). Ако и по трите недели нема симптоми, културата не може да се потврди како патогена форма на *C. m. subsp. sepedonicus* .

10.4. Изолирајте од симптоматските растенија, со отстранување на дел од стеблото, 2 см над точката на инокулација. Пулверизирајте и суспендирајте мало количество стерилна дестилирана вода или 50 mM фосфатен пуфер (Додаток 3). Изолирајте од суспензијата со помош на раствор нанесувајќи на MTNA and YPGA (Додаток 5), инкубирајте три до пет дена, на температура од 21 до 23°C и набљудувајте го формирањето на колонии типични за *C. m. subsp. sepedonicus* .

Додаток 1

Лаборатории вклучени во оптимизацијата и потврдувањето на протоколите

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

Додаток 2

Подготовка на позитивни и негативни контроли за основни- скрининг тестови PCR/IF и FISH

Одгледувајте 72-часовна култура од вирулентни соеви на *C. m. subsp. sepedonicus* (NCPPB 4053 или PD 406) на MTNA базален медиум и суспендирајте во 10 mM фосфатен пуфер за да постигнете клеточна густина од приближно $1 \text{ со } 210^8 \text{ cfu мл}$. Ова вообичаено се постигнува со слабо матна суспензија еднаква на оптичка густина од 0,20 на 600 nm.

Отстранете ја сржта (кортексот) на окцата од 200 кртоли земени од сорти со бела кора, за кои е познато дека не се заразени од *C. m. subsp. sepedonicus*.

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

Подгответе 10 стерилни од 1,5мл микропрувети со 900μл од ресуспендираниот талог.

Пренесете 100 μл од суспензијата *C. m. subsp. sepedonicus* во првата микропруветка. Измешајте со вртчка мешалица.

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

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

Подгответе аликоти од 100 μл во стерилни микропрувети од 1,5 мл, така што ќе добиете девет дупликати од секој контролен примерок. Чувајте на температура од -16 то -24°C сè до употребата.

Присуството и количината на *C. m. subsp. sepedonicus* во контролните примероци треба најпрво да се потврди со IF тестови.

За PCR тестот, направете екстракција на ДНК од позитивните и негативните контролни примероци, со секоја серија примероци за тестирање.

За IF и FISH тестот, направете биоанализа на позитивните и негативните контролни примероци, со секоја серија примероци за тестирање.

За IF, FISH и PCR анализата, *C. m. subsp. sepedonicus* мора да се открие најмалку во 10^5 и 10^4 клетки/мл од позитивните контроли и не се забележува во негативните контроли.

Додаток 3

Пуфери за постапките за тестирање

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

1. Пуфери за постапката за екстракција

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

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

Na₂HPO₄ (анхидрозен) 4,26 г

KH₂PO₄ 2,72 г

Дестилирана вода 1.00 л

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

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

	Цел	Количина (на литар)
Снегулки од Луброл	Дефлокулација Ш*К	0,5 г
DC силиконска антипена	Агенс против пенење Ш*К	1,0 мл
натриумтетра пирофосфат	Антиоксидант	1,0 г
Поливинилпиролидон – 4000 (ПВП-40)	Врзување на PCR инхибиторите	50 г
*За користење со хомогенизирачкиот метод за екстракција.		

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

Овој пуфер се користи за ресуспензија и растворање на сржта (кортекс) на окцето од кртолата на компирот, по концентрација на талогот со помош на центрифугирање.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 г
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 г
Дестилирана вода	1,00 Л

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

2. Пуфери за IF тест

2.1. IF - пуфер (10 mM фосфатен солен пуфер (PBS), pH 7,2)

Овој пуфер се користи за растворање на антитела.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 г
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 г
NaCl	8,0 г
Дестилирана вода	1.0 Л

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

2.2. IF -пуфер -Тњеен

Овој пуфер се користи за миење на плочките.

Додадете 0,1% Тњеен 20 на IF пуферот.

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

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

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,2 г
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15 г
Глицерол	50 мл
Дестилирана вода	100 мл

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

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 г
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 г
Дестилирана вода	1,00 Л

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

2. Пуфери за IF тест

2.1. IF - пуфер (10 mM фосфатен солен пуфер (PBS), pH 7,2)

Овој пуфер се користи за растворање на антитела.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 г
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 г
NaCl	8,0 г
Дестилирана вода	1.0 Л

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

2.2. IF -пуфер -Тњеен

Овој пуфер се користи за миење на плочките.

Додадете 0,1% Тњеен 20 на IF пуферот.

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

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

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,2 г
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15 г
Глицерол	50 мл
Дестилирана вода	100 мл

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

Додаток 4

Определување на нивото на контаминација кај IF и FISH тестовите

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

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

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

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

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

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

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

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

Каде што: y = волуменот на ресуспендираната плочка на секој прозорец, и
 F = факторот на растворање на ресуспендираната плочка.

Додаток 5

Медиуми за изолација и култура на *C. m. subsp. sepedonicus*

(а) општ медиуми за растење

Агар за потхранување (NA)

Агар за потхранување (Difco) 23,0 г

Дестилирана вода 1,0 Л

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

Хранлив дестрозен агар (NDA)

Difco bacto хранлив агар со 1%D(+) гликоза (монохидратен). Стерилизирајте со автоклав на температура од 115°C за време од 20 минути.

Квасен пептонски гликозен агар (YPGA)

Квасен екстракт (Difco)	5,0 г
Бакто-пептон (Difco)	5,0 г
Д(+) гликоза (монохидрат)	10.0г
Бакто-агар (Difco)	15,0 г
Дестилирана вода	1,0 Л

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

Медиум со квасен екстракт со минерални соли (YGM)

Бакто-квасен екстракт (Difco)	2,0 г
Д(+) гликоза (монохидрат)	2,5 г
K ₂ HPO ₄	0,25 г
KH ₂ PO ₄	0,25 г
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 г
MnSO ₄ .H ₂ O	0,015 г
NaCl	0,05 г
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005 г
Бакто-агар (Difco)	18 г
Дестилирана вода	1,0 Л

Растворете ги состојките и стерилизирајте количества од 0,5л медиум со автоклав на температура од 115°C за време од 20 минути.

(б) Потврдени селективни медиуми за раст

MTNA медиум

Освен ако не е поинаку наведено, сите медиумски компоненти се од BDH.

Квасен екстракт (Difco)	2,0 г
Манитол	2,5 г
K ₂ HPO ₄	0,25 г
KH ₂ PO ₄	0,25 г
NaCl	0,05 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 г
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,015 г
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 г
Агар (оксид бр. 1)	16,0 г
Дестилирана вода	1,0 л

Растворете ги состојките, усогласете ја pH вредноста на 7,2. По автоклавот (на температура од 121°C за време од 15 минути) и разладување до 50°C, додајте антибиотици: Триметоприм 0,06г, налидиксична киселина 0,002 г, амфотерицин Б 0,01 г.

Групирајте ги растворите антибиотици: Риметоприм (Sigma) и налидиксична киселина (Sigma) (и двете на 5мг/мл), во 96% метанол, амфотерицин Б (Sigma) (1мг/мл) во диметил сулфоксид. Групираните раствори се стерилизираат со филтер.

Забелешка:

Трајноста на базичниот медиум е три месеци. Откако ќе се додадат антибиотиците, трајноста е еден месец кога се чува во фрижидер.

NCP -88 медиум

Агар за потхранување (Difco)	23 г
Квасен екстракт (Difco)	2 г
Д-манитол	5 г

K ₂ HPO ₄	2 г
KH ₂ PO ₄	0,5 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 г
Дестилирана вода	1,0 Л

Растворете ги состојките, усогласете ја pH вредноста на 7,2. По загревање во автоклавот и разладување до 50°C, додајте ги следните антибиотици: Полимиксин Б сулфат (Sigma) 0,003г, налидиксична киселина (Sigma) 0,008 г, Циклохексимид (Sigma) 0,2г.

Растворете ги антибиотиците во групите раствори, како што следува: Налидиксична киселина во 0,01 М NaOH, циклохексамид во 50% етанол, полимиксин Б сулфат во дестилирана вода. Групираните раствори се стерилизираат со филтер.

Забелешка:

Трајноста на базичниот медиум е три месеци. Откако ќе се додадат антибиотиците, трајноста е еден месец кога се чува во фрижидер.

Додаток 6

Потврден PCR протокол и реагенси

Забелешка:

Прелиминарното тестирање со овој метод треба да овозможи откривање на најмалку 10³ до 10⁴ клетки од *C. m. subsp. Sepedonicus* на мл додадени на екстракт од примерок.

Прелиминарното тестирање, исто така, не покажува лажни позитивни резултати со панел селектирани бактериски соеви.

1. Многустран PCR протокол со внатрешна PCR контрола (Patrik, 2000)

1.1. Олигонуклеотидни прајмери

Преден прајмер PSA-1 5'- ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3'

Обратен прајмер PSA-R 5'- tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3'

Преден прајмер NS-7-F 5'- gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3'

Обратен прајмер NS-8-R 5'- tcc gca ggt tca cct acg ga -3'

Очекувана големина на ампликонот/продуктот од шаблонот на *C. m. subsp. sepedonicus* ДНК =502 бп (PSA-збир прајмери).

Очекувана големина на ампликонот/продуктот од 18S рРНА внатрешна PCR контрола =377 бп (NS -прајмерски збир).

1.2. PCR реактивен микс

Реагенс	Количина реакција	по Конечна концентрација
Стерилна UPW	15,725 µl	
10xPCRбуфер(1)(15mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (дел В) (10%)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP mix (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer NS-7-F (10 µM) ⁽²⁾	0,1 µl	0,04 µM
Primer NS-8-R (10 µM) ⁽²⁾	0,1 µl	0,04 µM
Так полимераза (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0U
Волумен на примерокот	5,0 µl	
Вкупно волумен	25,0 µl	

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

(2) Концентрација прајмери NS-7-F и NS-8-Rкаде што е направена оптимизација за екстракција на сржта (кортексот) од окцата на компирот, со користење на метод за хомогенизација и прочистување на ДНК, според Pastrok (2000) (види Дел 6.1.а) и 6.2). Реоптимизација на концентрациите на реагенсот е потребна ако се користи екстракцијата со протресување или друг метод за ДНК изолација.

1.3. Услови на PCR реакција

Спроведете ја следната програма:

- 1 циклус од: (1.) 3 минути на температура од 95°C (денатурација на шаблон ДНК)
- 10 циклуси од: (2.) 1 минута на температура од 95°C (денатурација на шаблон ДНК)

	(3.) 1 минута на температура од 64°C (хибридизација на прајмерите)
	(4.) 1 минута на температура од 72°C (продолжување на копија)
25 циклуси од:	(5.) 30 секунди на температура од 95°C (денатурација на шаблон ДНК)
	(6.) 30 секунди на температура од 62°C (хибридизација на прајмерите)
	(7.) 1 минута на температура од 72°C (продолжување на копија)
1 циклус од:	(8.) 5 минути на температура од 72°C (завршно продолжување)
	(9.) држете на температура од 4°C.

Забелешка:

Оваа програма е оптимизирана за употреба со MJ Research PTC 200 термоциклатор. Може да биде потребна модификација на времетраењето на циклусите (2.), (3.) (4.), (5.), (6.) и (7.) за примена со другите модели.

1.4. *Анализа на ампликон/продуктот со рестриктивен ензим.*

PCR производите засилени од ДНК на *C. m. subsp. sepedonicus* генерираат карактеристичен полиморфизам со ограничена должина на фрагментот со ензим Bgl II по инкубација на температура од 37°C, за време од 30 минути. Рестриktivните фрагменти добиени од специфичните фрагменти на *C. m. subsp. sepedonicus* се со големина од 282 bp и 220 bp .

2. Подготовка на пуфер за електрофореза

2.1. *Бромфенол сино (10%-готов раствор)*

Бромфенол сино	5 г
Дестилирана вода (бидест)	50 мл

2.2. Пуфер за електрофореза

Глицерол (86 %)	3,5 мл
Бромфенол сино (5.1)	300 μ л

Дестилирана вода (бидест) 6,2 мл

3. 10x Tris Acetate EDTA (TAE) пуфер, pH 8,0

Tris пуфер 48,4 г

Глацијална оцетна киселина 11,42 мл

EDTA (дисодиумова сол) 3,72 г

Дестилирана вода 1,00 Л

Растворете до 1x пред употреба.

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

Додаток 7

Потврдени реагенси за FISH тестот

1. Олигопроби

Специфична проба Cms -CMS-CY3-01: 5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'

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

2. Раствор за фиксирање

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

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

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

ПРЕДУПРЕДУВАЊЕ! НЕ КОРИСТЕТЕ pH МЕТАР ЗА РАСТВОРИТЕ СО ПАРАФОРМАЛДЕХИД.

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

(4) Забелешка:

Алтернативен раствор за фиксирање: 96% етанол.

3. 3x Hybmix

NaCl 2,7 M

Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)

EDTA (филтрирајте стерилизирано и загреано во автоклав) 15 mM

Разредите до 1x ако е потребно.

4. Раствор за хибридизација

1x Hybmix

Натриум додецил сулфат (SDS) 0,01 %

Проба EUB 338 5 ng/μl

Проба CMSCY 301 5 ng/μl

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

Табела: Препорачани количини за подготовка на миксот за хибридизација

	2 слајда	8 слајда
Стерилна UPW	50,1	200,4
3x Hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
проба EUB 338 (100 ng /μl)	4,5	18,0
проба CMSCY 301 (100 ng /μl)	4,5	18,0
Вкупно волумен (μl)	90,0	360,0

Забелешка: Сите раствори што содржат олигопроби се чувствителни на светлина, чувајте ги на темно на температура од -20°C. Заштитете ги од директна сончева светлина или вештачка светлина додека се употребуваат.

5. 0,1M фосфатен пуфер, pH 7,0

Na₂HPO₄ 8,52 г

КН₂РO₄ 5,44 г

Дестилирана вода 1,00 Л

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

Додаток 8

Култура од модар патлиџан

Засадете семе од модар патлиџан (*Solanum melongena*) во пастеризиран компост за семе. Пресадете го расадот со целосно раширени котиледони (10 до 14 дена) во пастеризиран компост за садење.

Модрите патлиџани треба да се одгледуваат во оранжерија со следните средински услови :

Должина на денот: 14 часа или природна должина на денот ако тоа е повеќе;

Температура: Ден: 21 до 24°C,

Нок: 15°C.

Осетлива сорта модри патлиџани : 'Black Beauty', 'Long Tom', 'Rima', 'Balsas

Додаток 9

Постапка за Грам обојување (Hucker's модификација) (Doetsch, 1981)¹

Кристално виолетов раствор

Растворете 2г кристално виолетово во 20мл 95% етанол.

Растворете 0,8г амониум оксалат во 80мл дестилирана вода.

Измешајте ги двата раствора.

Луголов јод- раствор

Јод 1 г

Калиум јодид 2 г

¹ Исто така може да се користат комерцијално достапни раствори и комплети за обојување.

Дестилирана вода 300 мл

Иситнете ги цвртите честици во аван. Додадете ги во водата и мешајте за да се растворот, во затворен сад.

Контрастно обојување со шафранов раствор

Готов раствор:

Сафранин О 2,5 г

95% етанол 100 мл

Измешајте и оставете.

Растворете: 1:10 за добивање работен раствор.

Постапка за обојување

1. Подгответе брисови/премаски, исушете и фиксирајте со загревање.
2. Потопете го слајдот со кристален виолетов раствор една минута.
3. Кратко измијте со дестилирана вода.
4. Потопете со луголов јод една минута.
5. Измијте со дестилирана вода и исушете.
6. Извршете обезбојување со 95% етанол, додавајте во насока на капките, сè додека не се отсрани бојата или потопете со нежно триење триесет секунди.
7. Измијте со дестилирана вода и исушете.
8. Потопете со шафранов раствор 10 секунди.
9. Измијте со дестилирана вода исушете.

Грам позитивните бактерии се бојата виолетово-сино, грам негативните бактерии се бојата розово-црвено.

ПРИЛОГ 2

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

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

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

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

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

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

- материјалот од точка (1) од овој Прилог;

- примерок од заразениот материјал од модриот патлиџан инокулиран со кртола или растителен екстракт и

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

ПРИЛОГ 3

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

- кртолите или растенијата одгледувани на место на производство определено како контаминирано согласно член 6 точка (а) од оваа наредба;

- местото (та) на производство од одредена производна единица со кртоли или растенија, определени како контаминирани согласно член 6 точка (а) од оваа наредба, како и оние кои директно ја користат производната опрема и објект или имаат заеднички изведувач на работите;

- кртолите или растенијата произведени на местото(та) на производство наведени во претходната алинеа или се присутни на такви места на производство, за време кога кртолите или растенијата означени како контаминирани согласно член 6 точка (а) од оваа наредба биле присутни на местото на производство што е наведено во алинеа (1) од оваа точка;

- просториите, складиштата каде што се чува компирот од местата на производство, наведени во алинеите 1, 2 и 3 од оваа наредба;

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

- кртолите или растенијата складирани или доаѓаат во контакт со кои било објекти или предмети наведена во претходната алинеа, пред чистење и дезинфекција на ваквите објекти и предмети;

- како резултат на тестирањата согласно член 7 од оваа наредба, кртолите или растенијата со сестринска или родителска врска со кртолите или растенијата определени како контаминирани согласно член 6 точка (а) од оваа наредба и за кои, иако можеби на тестот покажале негативен резултат од штетниот организмот, појавата на контаминација е веројатна преку клоналната врска. Може да се преземат различни тестови за да се потврди идентитетот на контаминираните и клонално поврзаните кртоли или растенија и

- местото (та) на производство на кртолите или растенијата наведени во претходната алинеа.

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

- близината до другите места на производство на компири или други растенија кои може да бидат домаќини на штетниот организам и

- заедничко производство, складирање и користење на семени материјал.

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

(а) по потврдувањето на присуството на штетниот организам при лабораториски тест со користење на методот од Прилог 1 од оваа наредба и барем за :

- сортното име на партијата со компири и

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

(б) фитосанитарниот инспектор по утврдување и завршување на сите испитувања на присуството на штетниот организам, треба да обезбеди:

- дата на потврдување на контаминацијата;

- краток опис на извршените испитувања за идентификација на изворот на можно ширење на контаминацијата, вклучувајќи и бројот на земени примероци;

- информации за идентификувани или претпоставени извори на контаминација;

- детали за степенот на определената контаминација, вклучувајќи и бројот на местата на производство и бројот на пратките со назнака на сортата и ако се работи за семе, категоријата;

- податоци за демаркираната зона, вклучувајќи и бројот на местата на производство, кои не се определени како контаминирани, но се вклучени во зоната и

- сите други податоци поврзани со утврдената појава од штетниот организам.

4. Кога постои ризик од контаминација на компирот, Државниот инспекторат за земјоделство треба да ги извести другите држави кои се засегнати и да достави информации кои треба да се усогласат и исполнат:

- сортното име на партијата со компири,

- името и адресата на испраќачот и примачот,

- датата на доставената пратка,

- големината на доставената пратка компири и

- копија од пасошот за растенија или најмалку бројот на пасошот за растенија или фитосанитарниот сертификат или регистарскиот број на одгледувачот или дистрибутерот и копија од испратницата.

ПРИЛОГ 4

1. Официјални контролни мерки, од член 8 став (1) од оваа наредба, се:

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

или

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

или

- палење;

или

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

или

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

Останатиот отпад кој произлегува од точка 1 од овој Прилог се отстранува согласно Прилог 5 од оваа наредба.

2. Соодветната употреба или отстранување на кртолите или растенијата определени како можно контаминирани согласно членот 6 точка (б) и членот 8 став (2) од оваа наредба, фитосанитарниот инспектор треба да спроведе контрола во секое време и каде компирите треба да се пакуваат или да се обработуваат во капацитети каде има соодветно отстранување на отпадот, наведени во првата и втората алинеа од точка 1 на овој Прилог се:

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

или

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

или

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

3. Соодветните методи за чистење и дезинфекција на од член 8 точка (б) од оваа наредба се тие за кои што е утврдено дека нема ризик за ширење на штетниот организам и се користат под надзор на фитосанитарниот инспектор.

4. Серијата мерки што ги спроведува фитосанитарниот инспектор во рамките на определената зона, согласно член 6 точка (в) и член 8 точка (в) од оваа наредба, го вклучат следното:

4.1. на местата на производство определено како контаминирано согласно член 6 точка (а) од оваа наредба:

(а) во поле определено како контаминирано; или

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

- се преземат мерки за елиминација на самоникнати растенија од компир и други растенија кои може природно да бидат домаќини на штетниот организам

и

- нема да се садат меркантилен, растенија или семенски компир или други растенија кои природно може да се домаќини на штетниот организам или посеви за кои има ризик за ширење на штетниот организам;

- во првата сезона на посевот по периодот утврден во претходните алинеи од точка 4.1.1. и под услов полето да биде исчистено од други самоникнати растенија од компир и други растенија кои може да бидат домаќини на штетниот организам за време на официјални инспекции за најмалку две последователни години на одгледување пред садење, ќе се дозволи само производство на меркантилен компир, а собраните кртоли ќе се тестираат според методот од Прилог 1 од оваа наредба;

- за време на сезоната на собирање на компирите, по извршување на активностите од претходниот став и по соодветен ротациски циклус, која изнесува најмалку две години, ако се одгледуваат компири за семе, компирите може да се садат или за семе или меркантилен, се врши официјално испитување и посебен надзор, согласно член 3 став (1) од оваа наредба;

или

4.1.2 за време на четирите години на одгледување, после годината кога е утврдена контаминацијата;

- се преземат мерки за елиминација на случајно самоникнати растенија од компир и други растенија кои може природно да бидат домаќини на штетниот организам;

- полето треба да биде одржувано под угар за време на сезоната или да биде одржувано како пасиште со често косење и испасување на животните;

- во првата сезона на посевот по периодот утврден во претходните алинеи од точка 4.1.2. и под услов полето да биде исчистено од други самоникнати растенија од компир или други растенија кои може да бидат домаќини на штетниот организам за време на официјалните инспекции за најмалку две последователни години на одгледување пред садење, ќе се дозволи одгледување на семенски и меркантилен компир, а собраните кртоли се тестираат согласно Прилог 1 од оваа наредба;

(б) во сите други полиња од контаминираното место на производство кога фитосанитарниот инспектор утврдува дека условите се задоволени и е елиминиран ризикот од самоникнати растенија од компир и други растенија кои може да бидат домаќини на штетниот организам:

- во годината на одгледување после годината кога е утврдена контаминација, не се сади меркантилен, растенија или семенски компир, или други растенија кои може природно да бидат домаќини на штетниот организам; или

- може да се насадат одобрени сертифицирани семиња само за производство на меркантилен компир;

- во втората година на одгледување после годината кога е утврдена контаминација, се садат само одобрени сертифицирани семиња или компири за семе, кои се официјално тестирани дека се без присуство на прстенесто гниење и се одгледуваат под инспекциска контрола на местата на производство, различни од оние наведени во точка 4.1 без разлика дали се работи за производство на семе или меркантилен компир;

- најмалку по третата година на одгледување после годината кога е утврдена контаминација, се садат само одобрени сертифицирани семиња или компири за семе, кои се одгледуваат под инспекциска контрола, без разлика дали се работи за производство за семе или меркантилен компир;

- секоја година на одгледување, наведена во претходните алинеи, ќе се преземат мерки за елиминирање на самоникнати растенија од компир и други растенија кои може да бидат домаќини на штетните случајности, ако се присутни и секое тестирање на компирите од полето, а собраните кртоли се тестираат согласно Прилог 1 од оваа наредба;

(в) веднаш по определувањето на контаминацијата, согласно член 6 точка (а) од оваа наредба, и по првата година на одгледување, се врши чистење и дезинфекција на целокупната механизација и складиштата на местото на производство, како и опремата вклучена во производството на компир, со користење на соодветни методи, согласно точка 3 од овој Прилог;

(г) во единица производство во заштини простори што е определена како контаминирана потребна е целосната замена на медиумот-супстратот за одгледување;

- нема да се садат кртоли, растенија или оригинално семе, освен ако производната единица била предмет на официјален надзор на мерки за елиминирање на штетниот организмот и отстранување на целокупниот материјал на сите носители домаќини на растенија, вклучувајќи целосна промена на медиумот/супстратот за одгледување, чистење и дезинфекција на единицата за производство, како и целата опрема, по што ќе следува одобрување за производство од страна на фитосанитарниот инспектор и

- производството на компири се врши од одобрени сертифицирани семиња или од миникртоли или микрорастенија изведени од тестирани извори;

4.2. во рамките на демаркираната зона, без оглед на мерките наведени во точка 4.1 се врши следното:

(а) веднаш по определувањето на контаминацијата, ќе извршат чистење и дезинфекција на целокупната механизација и складиштата на местото на производство, како и опремата вклучена во производството на компир, со користење на соодветни методи, како што е наведено согласно точка 3 од овој Прилог;

б) веднаш и најмалку во текот на три сезони, по определување на контаминација:

- се обезбеди посебен надзор од фитосанитарниот инспектор над просториите каде се врши производството, чувањето или манипулацијата со кртолите, заедно со просториите каде што се ракува со механизацијата;

- се бара садење само со одобрено семе или семе добиено со официјална контрола за сите насади на компир во таа зона и тестирање после собирањето на сите компири, одгледани на местата на производство означени како можно контаминирани согласно член 6 точка (б) од оваа наредба;

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

- се спроведа посебен надзор, согласно член 3 став (1) од оваа наредба;

(в) се дефинираат програми каде што е возможно, за замена на целокупниот семенски материјал, на одредени временски интервали.

ПРИЛОГ 5

Официјално одобрените методи за отстранување на отпадот, од Прилог 4 точка 1 од оваа наредба, треба да се во согласност со следните одредби, така што ќе се согледува секој ризик за ширење на штетниот организам што може да се идентификува:

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

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

или

- палење;

или

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

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

Потоа, течниот отпад:

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

или

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

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

