

**НАРЕДБА № 19 ОТ 2 ЮЛИ 2001 Г. ЗА БОРБА С
ПРЪСТЕНОВИДНОТО ГНИЕНЕ ПО КАРТОФИТЕ,
ПРИЧИНЯВАНО ОТ БАКТЕРИЯТА CLAVIBACTER
MICHIGANENSIS (SMITH) DAVIS ET AL. SSP.SEPEDONICUS
(SPIECKERMANN ET KOTTHOFF) DAVIS ET AL.**

*Издадена от Министерството на земеделието и горите
Обн. ДВ. бр.62 от 13 Юли 2001г., изм. ДВ. бр.8 от 22 Януари
2002г., изм. ДВ. бр.74 от 8 Септември 2006г., изм. ДВ. бр.27 от 30
Март 2007г.*

**Раздел I.
Обща разпоредба**

Чл. 1. (1) С тази наредба се уреждат мерките за борба с пръстеновидното гниене по картофите с причинител бактерията *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. ssp.sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., наричана по-нататък "вредител".

(2) Мерките за борба с вредителя включват:

1. предотвратяване на неговата поява;
2. при откриване определяне района на разпространението му;
3. предотвратяване на по-нататъшното му разпространение;
4. неговото пълно унищожаване.

**Раздел II.
Мерки за откриване на вредителя**

Чл. 2. (1) (Изм. - ДВ, бр. 8 от 2002 г.) Националната служба за растителна защита (НСРЗ) извършва оценка на риска от разпространение на вредителя, организира и провежда системни проверки и изследвания за откриването му по картофите по време на вегетация и върху клубените, произведени на територията на страната или от внос.

(2) Обхватът на проверките по ал. 1 се определя според установената степен на риск от разпространение на вредителя.

(3) (Нова - ДВ, бр. 74 от 2006 г., в сила от 01.01.2007 г.) Националната служба за растителна защита ежегодно предоставя на другите страни - членки на Европейската общност, и на Европейската комисия резултатите от проверките и изследванията по ал. 1.

Чл. 3. (1) (Изм. - ДВ, бр. 8 от 2002 г., изм. - ДВ, бр. 27 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) Проверките, броят и методите за вземане на проби и извършването на изследвания се провеждат съгласно процедурите, описани в приложение № 1.

(2) (Изм. - ДВ, бр. 8 от 2002 г.) При всяко съмнение за наличие на вредителя по

картофени растения и клубени по време на вегетация, по клубени на склад или предлагани на пазара фитосанитарните инспектори вземат проби за лабораторни изследвания и уведомяват НСРЗ.

(3) (Изм. - ДВ, бр. 8 от 2002 г.) Пробите се изследват в лабораториите на НСРЗ, а Централната лаборатория по карантин на растенията (ЦЛКР) в НСРЗ дава окончателно заключение въз основа на резултатите от изследванията.

(4) (Изм. - ДВ, бр. 8 от 2002 г.) При всяко доказано присъствие на вредителя в пробите ЦЛКР уведомява НСРЗ.

(5) (Изм. - ДВ, бр. 27 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) При откриване на вредителя в пробите се изпълняват процедурите, посочени в приложение № 2.

Раздел III.

Мерки за борба срещу вредителя и неговото разпространение

Чл. 4. Когато бъдат установени визуални диагностични симптоми за наличие на заболяването, причинявано от вредителя, или наличие на положителна реакция при тестови изпитвания за бързо откриване, до получаване на окончателното заключение фитосанитарните инспектори:

1. (доп. - ДВ, бр. 74 от 2006 г.) забраняват движението на всички партиди или пратки, от които са взети проби, освен под техен контрол и ако няма риск от разпространение на вредителя;

2. предприемат необходимите мерки за достигане до източника на предполагаемото заразяване;

3. вземат подходящи превантивни мерки за предотвратяване разпространението на вредителя.

Чл. 5. (1) (Предишен текст на чл. 5 - ДВ, бр. 74 от 2006 г.) Когато проведените по реда на чл. 3 изследвания потвърдят наличието на вредителя във взетите проби, фитосанитарните инспектори прилагат следните мерки:

1. (изм. - ДВ, бр. 74 от 2006 г.) обявяват за заразени клубените и/или растенията, пратката и/или партидата, мястото/местата, полето/ата и сградите за производство, от които е взета пробата, земеделската техника, машините, превозните средства, съдовете, складовите помещения или части от тях и всички други предмети, включително опаковките, които са били в контакт с растенията, от които е взета пробата;

2. (изм. - ДВ, бр. 27 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) определят вероятната степен на разпространение на заразата и обявяват за вероятно заразени по смисъла на т. 1 от приложение № 3 клубени, растения, парцели, складове и предприятия според контактите им по време на вегетацията, прибирането, складирането или преработката с обявените за заразени растения;

3. (изм. - ДВ, бр. 74 от 2006 г., изм. - ДВ, бр. 27 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) определят буферната зона, която включва обявените за заразени обекти по т. 1, зоната с вероятно заразяване по т. 2 и зоната на възможно разпространение на

вредителя по смисъла на т. 2 от приложение № 3.

(2) (Нова - ДВ, бр. 74 от 2006 г.) Националната служба за растителна защита незабавно уведомява страните - членки на Европейската общност, и Европейската комисия за всяка установена зараза и им представя подробна информация относно буферната зона.

(3) (Нова - ДВ, бр. 74 от 2006 г.) Когато НСРЗ получи информация от страна - членка на Европейската общност, за открита зараза в пратка, получена от България, обявява зараза, определя степента на вероятна зараза и буферната зона в съответствие с ал. 1.

Чл. 6. (1) (Предишен текст на чл. 6, изм. - ДВ, бр. 74 от 2006 г.) Когато клубени или растения са обявени за заразени по реда на чл. 5, ал. 1, т. 1, НСРЗ разпорежда изследване на запасите от картофи, които са клоново свързани със заразените. Изследването се извършва върху толкова клубени и растения, колкото е необходимо за определяне на вероятния първичен източник на зараза и на степента на вероятна зараза, за предпочитане по ред в зависимост от степента на опасност.

(2) (Нова - ДВ, бр. 74 от 2006 г.) В резултат от изследването може да се извърши допълнително обявяване на зараза, определяне степента на вероятна зараза и очертаване на буферната зона.

Чл. 7. (1) (Доп. - ДВ, бр. 74 от 2006 г., изм. - ДВ, бр. 27 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) Забранено е засаждането на клубени и използването на растения, обявени за заразени по чл. 5, ал. 1, т. 1. Те се унищожават или към тях се прилагат мерките, посочени в т. 1 на приложение № 4 и в приложение № 5, с цел премахване на риска от разпространение на вредителя.

(2) (Доп. - ДВ, бр. 74 от 2006 г., изм. - ДВ, бр. 27 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) Забранено е засаждането на клубени и използването на растения, обявени за вероятно заразени по чл. 5, ал. 1, т. 2. Те се унищожават или към тях се прилагат мерките, посочени в приложение № 4, т. 2, с цел премахване на риска от разпространение на вредителя.

(3) (Изм. - ДВ, бр. 27 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) Земеделската техника, машините за манипулации, транспортните средства, съдовете, складовите помещения или части от тях и всички други предмети, включително опаковките, на обявените за заразени или за вероятно заразени растения се унищожават или обеззаразяват по посочените методи в т. 3 на приложение № 4. След обеззаразяването предметите се считат за безопасни.

(4) (Доп. - ДВ, бр. 74 от 2006 г., изм. - ДВ, бр. 27 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) В зоната по чл. 5, ал. 1, т. 3 освен мерките по ал. 1, 2 и 3 фитосанитарните инспектори прилагат и други необходими мерки, предвидени в т. 4 на приложение № 4.

Чл. 8. Забранено е притежаването, съхранението и извършването на манипулации с вредителя.

Чл. 9. (Изм. - ДВ, бр. 8 от 2002 г., доп. - ДВ, бр. 74 от 2006 г.) Изключения от забраните по чл. 7, ал. 1 и 2 и чл. 8 за извършване на научни изследвания и селекция се

разрешават по реда на Наредба № 1 от 2002 г. за условията, при които вредители, растения, растителни и други продукти се използват за научноизследователски цели и селекция, въвеждаща Директива на Съвета 95/44 от 26 юли 1995 г., определяща условията, при които някои вредители, растения, растителни и други продукти, изброени в Приложения I до V на Директива 2000/29/ЕЕС, които могат да се въведат или движат в общността или някои защитени зони от нея, за опитни или научни цели и за работа по сортова селекция в националното законодателство.

Чл. 10. (1) (Изм. - ДВ, бр. 74 от 2006 г., изм. - ДВ, бр. 27 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.) За посев се използват картофи, които отговарят на изискванията на Наредба № 1 от 1998 г. за фитосанитарен контрол и произлизат директно от сертифициран посевен материал, в който не са открити следи от вредителя след изследвания, проведени съгласно процедурите, описани в приложение № 1.

(2) (Доп. - ДВ, бр. 74 от 2006 г.) Изследванията по ал. 1 се извършват чрез анализ на предходните поколения, базовите семена и на растенията от първоначалната клонова селекция.

Чл. 11. (Изм. - ДВ, бр. 8 от 2002 г., изм. - ДВ, бр. 74 от 2006 г.) (1) Генералният директор на НСРЗ със заповед разпорежда прилагането на допълнителни, както и на по-строги мерки за борба срещу вредителя или за предотвратяване на неговото разпространение, които не противоречат на изискванията на Наредба № 1 за фитосанитарен контрол, въвеждаща Директива на Съвета 2000/29/ЕС от 8 май 2000 г. за защитни мерки срещу въвеждането в общността на вредители по растенията или растителни продукти и срещу тяхното разпространение в общността.

(2) Мерките по ал. 1 се прилагат и при производители, на които е разрешено засаждането на семена картофи от собствено производство.

(3) За мерките по ал. 1 НСРЗ предоставя подробна информация на другите страни - членки на Европейската общност, и на Европейската комисия.

Допълнителни разпоредби

§ 1. (Нов - ДВ, бр. 74 от 2006 г.) Тази наредба въвежда Директива на Съвета 93/85/ЕЕС от 4 октомври 1993 г. за контрол на пръстеновидно гниене по картофите.

§ 2. (Нов - ДВ, бр. 74 от 2006 г.) По смисъла на тази наредба:

1. "Партида" е определено по маса (брой) количество растения, растителни или други продукти, което се характеризира със своята еднородност и произход и представлява част от една пратка.

2. "Пратка" е количество растения, растителни или други продукти, описани в един документ, необходим за извършването на митническите или други формалности, а също и от един фитосанитарен сертификат или друг алтернативен документ или маркировка. Пратката може да е съставена от една или повече партии.

Заклучителни разпоредби

§ 3. (Предишен § 1 - ДВ, бр. 74 от 2006 г.) Тази наредба се издава на основание § 3 от Закона за защита на растенията.

§ 4. (Предишен § 2 - ДВ, бр. 74 от 2006 г., отм. - ДВ, бр. 27 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.)

§ 5. (Предишен § 3 - ДВ, бр. 74 от 2006 г.) Изпълнението на наредбата се възлага на генералния директор на Националната служба за растителна защита (НСРЗ).

Заклучителни разпоредби

КЪМ НАРЕДБА ЗА ИЗМЕНЕНИЕ И ДОПЪЛНЕНИЕ НА
НАРЕДБА № 19 ОТ 2001 Г. ЗА БОРБА С ПРЪСТЕНОВИДНОТО
ГНИЕНЕ ПО КАРТОФИТЕ, ПРИЧИНЯВАНО ОТ БАКТЕРИЯТА
CLAVIBACTER MICHIGANENSIS (SMITH) DAVIS ET AL. SSP.
SEREDONICUS (SPIECKERMANN ET KOTTHOFF) DAVIS ET AL.

(ОБН., ДВ, БР. 74 ОТ 2006 Г.)

§ 14. Разпоредбите по § 1 и § 2, т. 2 влизат в сила от 1 януари 2007 г.

Заклучителни разпоредби

КЪМ НАРЕДБА ЗА ИЗМЕНЕНИЕ И ДОПЪЛНЕНИЕ НА
НАРЕДБА № 19 ОТ 2001 Г. ЗА БОРБА С ПРЪСТЕНОВИДНОТО
ГНИЕНЕ ПО КАРТОФИТЕ, ПРИЧИНЯВАНО ОТ БАКТЕРИЯТА
CLAVIBACTER MICHIGANENSIS (SMITH) DAVIS ET AL. SSP.
SEREDONICUS (SPIECKERMANN ET OTTHOFF) DAVIS ET AL.

(ОБН. - ДВ, БР. 27 ОТ 2007 Г., В СИЛА ОТ 01.04.2007 Г.)

§ 10. Навсякъде в текста на наредбата приложение № 1, приложение № 2 и приложение № 3 стават съответно приложение № 2, приложение № 3 и приложение № 4

§ 12. Наредбата влиза в сила от 1 април 2007 г.

Приложение № 1 към чл. 3, ал. 1

(Ново - ДВ, бр. 27 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.)

Схема за изпитване за диагностициране, установяване и идентифициране на бактерията на пръстеновидното гниене *Clavibacter michiganensis* (Smith) davis et al. ssp. *sepedonicus* (spieckermann et kotthoff) davis et al.

Обхват на схемата за изпитване

Представената схема описва различните процедури, включени във:

- а) Диагностиката на пръстеновидното гниене в картофени клубени и растения;
- б) Установяване на *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* в проби от картофени клубени и растения;
- в) Идентифициране на *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*).

Общи принципи

В допълненията са дадени оптимизирани протоколи за различните методи, валидирани реагенти и подробна информация за подготвяне на материалите за изпитване и контрол. Списъкът на лабораториите, които са участвали в оптимизирането и валидирането на протоколите, е даден в допълнение 1.

Тъй като протоколите включват откриване на карантинен организъм и ще включват използване на живи култури от *C. m.* subsp. *sepedonicus* като контролни материали, ще бъде необходимо да се изпълняват процедурите при подходящи карантинни условия с адекватни съоръжения за унищожаване на отпадъците и при условията на съответстващи разрешителни, издадени от официалните власти за растителна карантина.

Тестовите параметри трябва да осигурят последователно и възпроизводимо установяване на степени на *C. m.* subsp. *sepedonicus* при определените прагове на избраните методи.

Прецизната подготовка на положителни контроли е задължителна.

Изпитването в съответствие със задължителните прагове включва също правилни настройки, поддържане и калибриране на оборудването, внимателно боравене и съхраняване на реагентите и осигуряване на всички мерки за предотвратяване на заразяване между пробите, например отделяне на положителните контроли от пробите за изпитване. За избягване на административни и други грешки, особено по отношение на етикетирането и документацията, трябва да се прилагат стандартите за управление на качеството.

Съмнението за наличие, описано в член 4, параграф 2 на Директива 93/85/ЕИО, включва положителен резултат на диагностичните или скринингови тестове, извършени на една проба, както е описано в диаграмите.

Ако първият скринингов тест (имунофлуоресцентен IF или PCR/FISH) е положителен, се поражда съмнение за заразяване с *Cms* и трябва да се направи втори скринингов тест. Ако вторият скринингов тест е положителен, съмнението се потвърждава (съмнение за наличие) и тестването трябва да продължи по схемата. Ако

вторият скринингов тест е отрицателен, се счита, че пробата не е заразена с *Sms*.

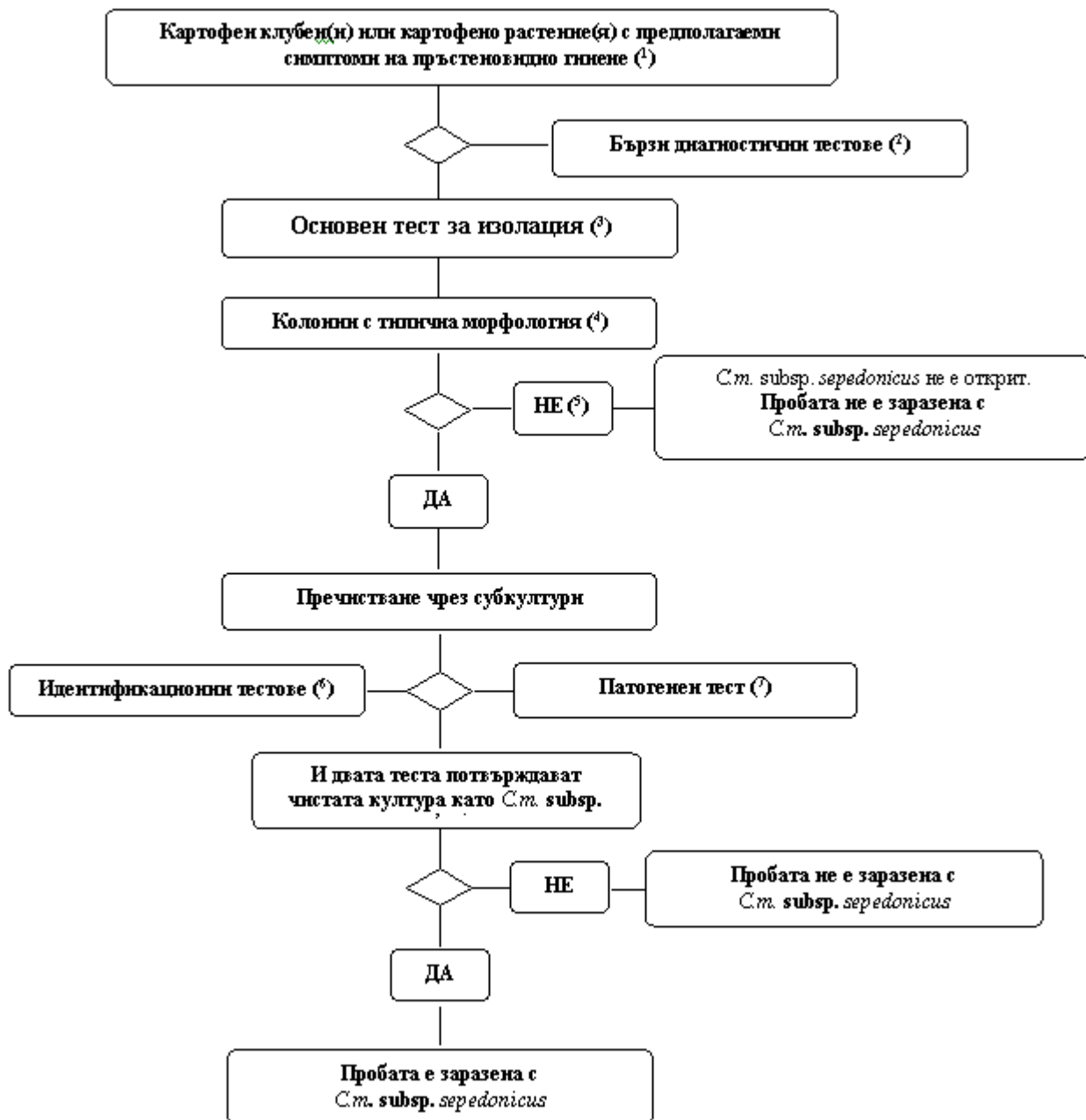
Следователно положителният имунофлуоресцентен тест, цитиран в член 4, параграф 2, се определя от положителен имунофлуоресцентен (IF) резултат, потвърден от втори скринингов тест (PCR/FISH).

Потвърдено наличие, цитирано в член 5, параграф 1 на Директива 93/85/ЕИО, включва изолирането и идентифицирането на чиста култура от *S. m. subsp. sepedonicus* с потвърждение за патогенност.

1. Представяне на диаграмата за последователност

1.1. Схема за диагностициране за наличие на пръстеновидно гниене при картофени клубени и растения със симптоми на пръстеновидно гниене

Процедурата на изпитване е предназначена за картофени клубени и растения с типични или предполагаеми симптоми на пръстеновидно гниене. Тя включва бърз скринингов тест, изолиране на патогена от инфектираната проводяща тъкан върху диагностична среда и в случай на положителен резултат, идентифициране на културата като *S. m. subsp. sepedonicus*.



(1) Описанието на симптомите е дадено в раздел 2.

(2) Подходящи тестове са:

- имунофлуоресцентен тест (раздел 4)
- PCR тест (раздел 6)
- FISH тест (раздел 5).

(3) Въпреки че директното изолиране на патогена от растителна тъкан с типични симптоми чрез разстилане е лесно осъществимо, то отглеждането на културата може да пропадне от по-напредналите стадии на инфекцията. Сапрофитните бактерии, които се развиват на болната тъкан, могат да изпреварят в растежа си или да подтиснат патогена върху средата за изолация. Следователно е препоръчително да се използват както основни, така и селективни хранителни среди, за предпочитане MTNA (раздел 8) или

биологичен тест (раздел 7).

(4) Описание на типичната морфология на колонията е дадено в раздел 8.

(5) Ако тестът за изолация е отрицателен, но симптомите на болестта са типични, тогава изолирането трябва да се повтори.

(6) Сигурната идентификация на чиста култура от *C. m. subsp. sepedonicus* се получава чрез използване на тестовете, изброени в раздел 9.

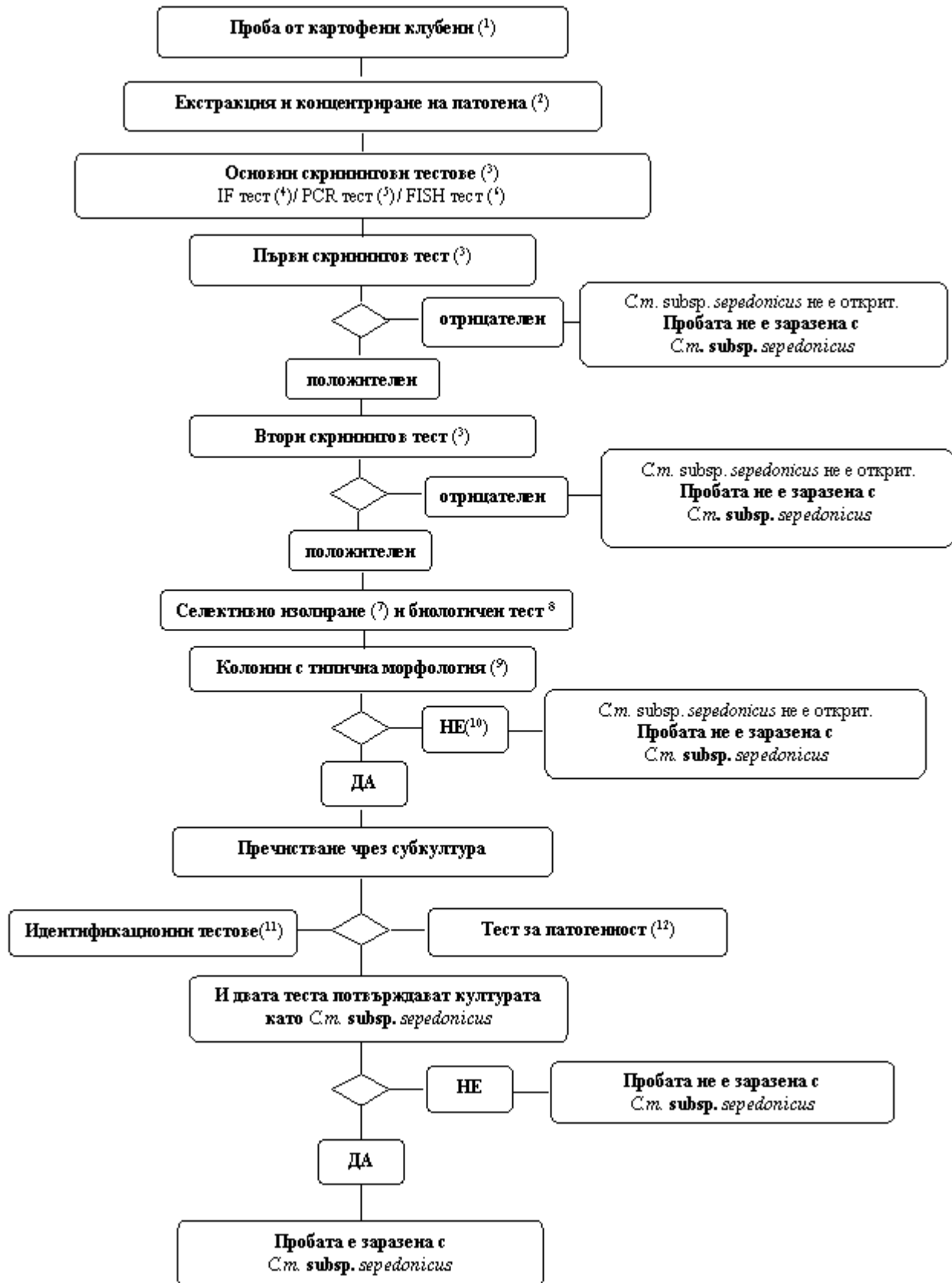
(7) Патогенният тест е описан в раздел 10.

1.2. Схема за установяване и идентифициране на *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* в проби от картофени клубени без симптоми

Принцип

Процедурата на изпитване е предназначена за откриване на латентни инфекции в картофени клубени. Положителен резултат от поне два скринингови теста, на базата на различни биологични принципи, трябва да се допълни от изолирането на патогена; последвано, при изолирането на типични колонии, от потвърждаването на чиста култура като *C. m. subsp. sepedonicus*. Положителен резултат само от един от скрининговите тестове не е достатъчен, за да се счете пробата за съмнителна.

Скрининговите тестове и изолационните тестове трябва да позволяват откриване на 10³ до 10⁴ клетки/ml от повторно суспендирана утайка, включени като положителни контроли във всяка серия тестове.



(1) Стандартният размер на пробата е 200 клубена, въпреки че процедурата може да

бъде използвана при по-малки проби, ако няма на разположение 200 клубена.

(2) Методите на екстракция и концентрация на патогена са описани в раздел 3.1.

(3) Ако най-малко два теста, на базата на различни биологични принципи, са положителни, трябва да се направи изолация и потвърждаване. Извършва се поне един скринингов тест. Когато той е отрицателен, се счита, че пробата е отрицателна. Когато той е положителен, трябва да се направи втори или няколко скринингови теста, на базата на различни биологични принципи, за да се провери първият положителен резултат. Ако вторият или другите тестове са отрицателни, се счита, че пробата е отрицателна. Не са необходими допълнителни тестове.

(4) Имунофлуоресцентен тест (IF).

Винаги използвайте поликлонално антитяло за IF скрининг, допълнителни моноклонални антитела могат да осигурят повече специфичност (виж раздел 4).

(5) PCR тест. Използвайте подходящи валидирани реагенти и протоколи (виж раздел 6).

(6) FISH тест. Използвайте валидирани реагенти и протоколи (виж раздел 5).

(7) Селективно изолиране.

С MTNA среда или NCP-88 и разреждане 1/100 от разтворената утайка това в много случаи е подходящ метод за директно изолиране на *C. m. subsp. sepedonicus*. Типични колонии се наблюдават от 3 до 10 дни след посевка. След това патогенът може да бъде пречистен и идентифициран. За пълно използване на възможностите, които дава този тест, е необходимо внимателна подготовка на конусчетата, за да се избегнат зарази от сапрофитни бактерии, които се явяват конкуренти на *C. m. subsp. sepedonicus* върху средата и могат да се развият по-бързо от патогена. Ако тестовете с блюдата се провалят, трябва да се направи изолиране от растения, използвани за биологичния тест (виж раздел 8).

(8) Биологичният тест се използва за изолиране на *C. m. subsp. sepedonicus* от утайки от растителен екстракт, чрез селективно обогатяване в патладжан (*Solanum melongena*). Тестът изисква оптимални условия на инкубация, както е определено в този метод. Бактерии, инхибиращи *C. m. subsp. sepedonicus* на MTNA или NCP-88 среда, най-вероятно няма да повлияят в този тест (виж раздел 7).

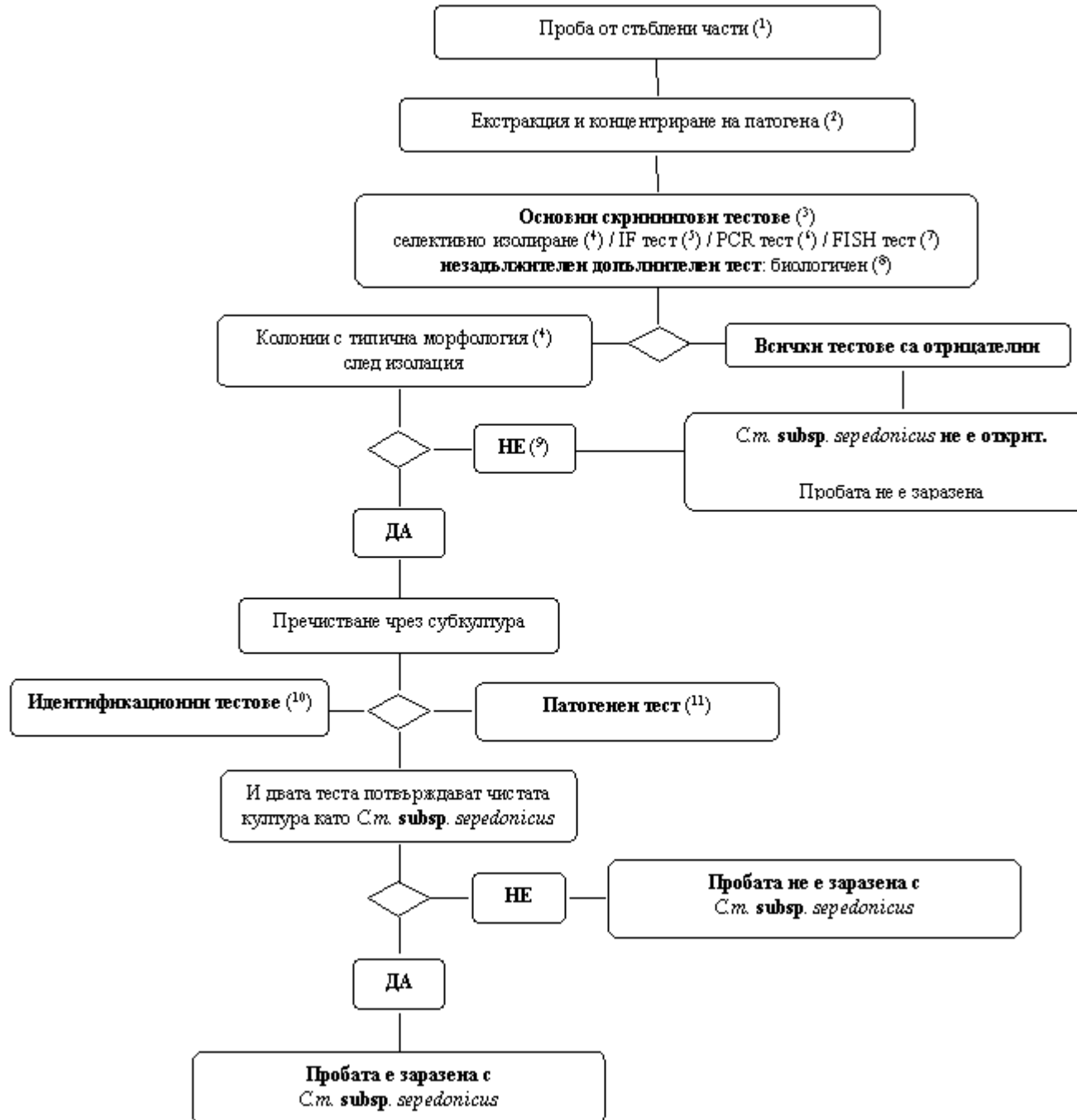
(9) Типичната морфология на колонията е описана в раздел 8.

(10) Култивирането или биологичният тест могат да се провалят поради конкуренция или подтискане от сапрофитни бактерии. Ако се получат положителни резултати при скрининговите тестове, но тестовете за изолация са отрицателни, повторете тестовете за изолация от същата утайка или чрез вземане на допълнителна проводяща тъкан в близост до конусчетата от разрязани клубени от същата проба и ако е необходимо, тествайте допълнителни проби.

(11) Сигурната идентификация на предполагаеми чисти култури от *C. m. subsp. sepedonicus* се получава, като се използват тестовете, описани в раздел 9.

(12) Патогенният тест е описан в раздел 10.

1.3. Схема за установяване и идентифициране на *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* в проби от картофени растения без симптоми



(1) Виж раздел 3.2 за препоръчителните размери на пробата.

(2) Методите за екстракция и концентриране на патогена са описани в раздел 3.2.

(3) Ако най-малко два теста, на базата на различни биологични принципи, са положителни, трябва да се направи изолация и потвърждаване. Извършва се поне един скринингов тест. Когато той е отрицателен, се счита, че пробата е отрицателна. Когато той е положителен, трябва да се направи втори или няколко скринингови теста, на базата на различни биологични принципи, за да се провери първият положителен резултат. Ако вторият или другите тестове са отрицателни, се счита, че пробата е

отрицателна. Не са необходими допълнителни тестове.

(4) Тестът за селективно изолиране и типична морфология на колонията са описани в раздел 8.

(5) IF тест е описан в раздел 4.

(6) PCR тест е описан в раздел 6.

(7) FISH тест е описан в раздел 5.

(8) Биологичният тест е описан в раздел 7.

(9) Култивирането или биологичният тест могат да се провалят поради конкуренция или потискане от сапрофитни бактерии. Ако се получат положителни резултати при скрининговите тестове, но тестовете за изолация са отрицателни, повторете тестовете за изолация и ако е необходимо, тествайте допълнителни проби.

(10) Сигурната идентификация на предполагаеми чисти култури от *S. m. subsp. sepedonicus* се получава, като се използват тестовете, описани в раздел 9.

(11) Патогенният тест е описан в раздел 10.

2. Визуален преглед за симптоми на пръстеновидно гниене

2.1. Картофени растения

При европейските климатични условия симптомите рядко се откриват на полето и често само в края на сезона. Още повече симптомите са често маскирани или повлияни/объркани с/от други болести, остаряване или други механични повреди. Следователно може лесно да се пропуснат симптомите при инспекции на полето. Симптомите на увяхването са много различни от тези при кафявото гниене; то обикновено е бавно и първоначално е ограничено до периферията на листата. Младите заразени листа често продължават да нарастват макар и по-бавно в заразените зони. Това създава листа със странни форми. Листата, засегнати от блокирането на проводящите тъкани по-надолу по стъблото, често развиват хлоротични, жълти до оранжеви зони между жилките. Заразените млади листа, основните листа и дори стъбла могат впоследствие да загинат. Често листата и клубените са просто с намален размер. Рядко растенията са недоразвити. Цветни снимки на обхвата от симптоми могат да бъдат намерени на страницата в интернет <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

2.2. Картофени клубени

Най-ранните симптоми са лека стъкловидност или полупрозрачност на тъканта, без омекване около проводящата система, особено близо до столоната. Проводящият пръстен на столоните може да е малко по-тъмен на цвят от обикновено. Първият лесно определен симптом е този, при който проводящият пръстен има жълтеникаво оцветяване и когато клубенът се притисне леко с пръсти, струйки от подобна на сирене материя излизат от проводящите съдове. Този ексудат съдържа милиони бактерии. Покафеняването на проводящата тъкан може да се развие бързо и симптомите по клубените на този етап наподобяват тези на кафявото гниене, причинявано от *Ralstonia solanacearum*. Първоначално тези симптоми може да са ограничени в една част от пръстена, не задължително близо до столоните, и могат постепенно да се разпрострат по целия пръстен. С напредването на инфекцията става разрушаване на проводящата тъкан; външната кора може да се отдели от вътрешната. При напредналите стадии на инфекция се появяват пукнатини по повърхността на клубена, често червеникаво-кафяви по краищата. Напоследък в Европа се появиха няколко случая, при които централната кора гние, в същото време като проводящия пръстен, причиняващо

вторична инвазия с образуване на кухини и некроза. Вторичната гъбна или бактериална зараза може да маскира симптомите и да бъде трудно и дори невъзможно да се различат симптомите на напреднало пръстеновидно гниене от другите видове гниенета по клубените. Възможни са атипични симптоми. Цветни снимки на обхвата от симптоми може да се намери на страницата в интернет <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

3. Приготвяне на пробата

3.1. Картофени клубени

Забележки:

- Стандартният размер на пробата е 200 клубена за тест. По-интензивното пробовземане изисква повече тестове на проби с този размер. По-големият брой клубени в пробата ще доведе до потискане или трудно интерпретиране на резултатите. Въпреки това процедурата може за удобство да бъде приложена за проби с по-малко от 200 клубена, когато са налични по-малко клубени.

- Валидирането на всички методи за откриване, описани по-долу, е базирано на тестването на проби от по 200 клубена.

- Картофеният извлек (мацерат), описан по-долу, може също да бъде използван за откриване на бактерията на кафявото гниене по картофите - *Ralstonia solanacearum*.

Незадължителна предварителна обработка преди приготвянето на пробата:

Измийте клубените. Използвайте подходящ дезинфектант (хлорна съставка, когато ще се използва PCR тест с оглед да се премахне ДНК на евентуален патоген) и детергенти между всяка проба. Изсушете на въздух клубените. Тази процедура за измиване е особено полезна (но не е задължителна) за проби с много почва и ако ще се прави PCR тест или директно изолиране.

3.1.1. Премахнете с чист и дезинфектиран скалпел или нож за зеленчуци кожата при столоните от всеки клубен така, че проводящата тъкан да стане видима. Внимателно изрежете малко сърцевина (под формата на конус) от проводящата тъкан при столоните и поддържайте количеството непроводяща тъкан в минимално количество (виж интернет сайта: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Забележка.

Отделете настрана всички клубени с предполагаеми симптоми на пръстеновидно гниене и ги тествайте отделно.

Ако по време на вземане на конуси се наблюдават симптоми на пръстеновидно гниене, клубенът трябва да се прегледа визуално след разрез близо до столона. Всеки клубен с предполагаеми симптоми трябва да бъде суберизиран при стайна температура за два дни и съхранен под карантина (при темп. от 4 до 10°C), докато не завършат всички изпитвания. Всички клубени в пробата (включително тези с предполагаеми симптоми) трябва да се съхраняват съгласно Приложение II.

3.1.2. Събирайте конусите в неупотребявани контейнери за еднократна употреба, които могат да бъдат затворени и/или запечатани (в случай че контейнерите се използват повторно, те трябва да бъдат щателно почистени и дезинфектирани, като се използват хлорни съединения). Препоръчително е конусите да се обработят незабавно. Ако това не е възможно, ги съхранете в контейнер, без да добавяте буфер, в хладилник за не по-дълго от 72 h или не по-дълго от 24 h при стайна температура. Изсушаването и суберизацията на конусите и развитието на сапрофити по време на съхранението може да възпрепятства откриването на бактерията на пръстеновидното гниене.

3.1.3. Обработете конусите по една от следните процедури: или

(а) покрийте конусите с достатъчен по обем (приблизително 40 ml) екстракционен буфер (Допълнение 3) и разклатете на ротационна клатачка (50 до 100 rpm) за четири часа при под 24°C или от 16 до 24 h охладени,

или

(б) хомогенизирайте конусите с достатъчен обем (приблизително 40 ml) екстракционен буфер (Допълнение 3) или в блендер (напр. Waring или Ultra Thugax), или чрез стриване в запечатана торбичка за мацерация за еднократна употреба (напр. Stomacher или Bioreba - здрав полиетилен, 150 mm x 250 mm; стерилизиран с облъчване), използвайки гумено чукче или подходящ апарат за стриване (напр. Nomex).

Забележка.

Рискът от кръстосано заразяване на пробите е висок, когато хомогенизирането им се извършва с блендер. Вземете предпазни мерки, за да избегнете аерозолно заразяване или разпиляване по време на процеса на екстракция. Уверете се, че остриета на блендера и съдовете за всяка проба се използват стерилизирани. Когато се предвижда PCR тест, избягвайте остатъците от ДНК по контейнерите или апарата за стриване. Стриването на пробите в торбички за еднократна употреба и използването на еднократни епруветки се препоръчва там, където ще се използва PCR.

3.1.4. Прелейте супернатантата. Ако течността е твърде мътна, я избистрете с центрофугиране на ниска скорост (при не повече от 180 g за 10 min при температура между 4 и 10°C) или чрез вакуумна филтрация (40 до 100 µm), измивайки филтъра с допълнителен (10 ml) екстракционен буфер (Допълнение 3).

3.1.5. Концентрирайте бактериалната фракция чрез центрофугиране при 7000 g за 15 min (или 10 000 g за 10 min) при температура между 4 и 10°C и изхвърлете супернатантата, без да разклащате утайката.

3.1.6. Ресуспендирайте (разтворете отново) утайката в 1,5 ml буфер за разтваряне на утайката (Допълнение 3). Пробата се разделя на 3 равни части (аликвоти). Използвайте 500 µl за тестване за *S. m. subsp. sepedonicus*, 500 µl за *Ralstonia solanacearum* и 500 µl за референтни цели (съхранява се за бъдещи тестове).

Добавете стерилен глицерол до крайна концентрация от 10 до 25% (v/v) към 500-те µl от референтната част, разбийте и съхранете при -16 до -24°C (за седмици) или 68 to - 86°C (за месеци). Съхранявайте пробите при 4 до 10°C по време на тестването. Не е желателно повторно замразяване и размразяване. Ако се налага транспортиране на екстракта, осигурете доставянето му в хладилна кутия в рамките на 24 до 48 h.

3.1.7. Задължително е всички положителни контроли и проби от *S. m. subsp. sepedonicus* да се третират отделно, за да се избегне заразяване. Това се отнася за стъклата за имунофлуоресценция и за всички тестове.

3.2. Картофени растения

Забележка.

За откриване на латентни популации от *S. m. subsp. sepedonicus* е препоръчително да се тестват сложни (смесени) проби. Процедурата може да бъде подходящо приложена за смесени проби от/до 200 части от стъбла. (Там, където се извършват наблюдения, те трябва да се основават на статистически представителна проба от растителната популация под проучване.)

3.2.1. С чист дезинфекциран нож или лозарски ножици премахнете участък от 1 - 2 cm от основата на всяко стъбло над нивото на почвата.

Дезинфекцирайте стъблените части за кратко в етанол 70% и незабавно ги

подсушете на филтърна хартия. Съхранявайте ги в затворен стерилен контейнер съгласно следните процедури за обработване на пробата:

3.2.2. Обработете частите по една от следните процедури: или

(а) покрийте частите с достатъчен обем (приблизително 40 ml) екстракционен буфер (Допълнение 3) и разклатете на ротационна клатачка (50 до 100 rpm) за 4 h при температура, по-ниска от 24°C, или за 16 до 24 h в хладилник, или

(б) обработете незабавно; като ги стриете в здрава торбичка за мацерация (напр. Stomacher или Bioreba) с подходящ обем екстракционен буфер (Допълнение 3), използвайки гумено чукче или подходящ апарат за счукване (напр. Nomex); ако това не е възможно, съхранявайте частите от стъблата охладени не по-дълго от 72 h или не по-дълго от 24 h при стайна температура.

3.2.3. Прелейте супернатантата след утаяване от 15 min.

3.2.4. По-нататъшно избистряне на екстракта или концентрата на бактериалната фракция обикновено не се изискват, но могат да бъдат постигнати чрез филтрация и/или центрофугиране, както е описано в раздел 3.1.4 до 3.1.6.

3.2.5. Разделете чистия или концентриран екстракт от пробата на 2 равни части. Поддържайте едната половина при 4 до 10°C по време на тестването и съхранявайте другата половина с 10 до 25% (v/v) стерилен глицерол при -16 до -24°C (седмици) или при -68 до -86°C (месеци) в случай, че се налага по-нататъшно тестване.

4. Имунофлуоресцентен тест

Принцип

Използването на имунофлуоресцентен тест като основен скринингов тест се препоръчва поради доказаната му яснота да постига изискваните нива.

Когато се използва имунофлуоресцентен тест като основен скринингов тест и резултатите от имунофлуоресценцията са положителни, то PCR или FISH тест трябва да бъдат извършени като втори скринингов тест. Когато имунофлуоресцентен тест се използва като втори скринингов тест и резултатите от имунофлуоресценцията са положителни, за да се завършат анализите, се изисква по-нататъшно тестване съгласно диаграмата.

Важно:

Винаги използвайте поликлонални антитела, когато се използва имунофлуоресцентен тест като основен скринингов тест. В случай на положителни резултати от имунофлуоресценцията с поликлонални антитела по-нататъшен скрининг на пробата с моноклонални антитела може да предостави повече специфичност, но тестът е по-слабо чувствителен.

Използвайте антителата за референтен щам на *C. m. subsp. sepedonicus*. Препоръчително е титърът да се определя за всяка нова серия антитела. Титърът се определя като най-високото разреждане, чиято оптимална реакция настъпва, когато при тестване на суспензия, съдържаща 105 до 106 клетки на ml от хомоложен щам на *C. m. subsp. sepedonicus*, и използвайки флуоресцентен изотиоцианатен (FITC) конюгат, се осъществи свързване съгласно препоръките на производителя.

Суровите поликлонални или моноклонални антитела трябва да имат титър от поне 1:2000. По време на тестването антителата трябва да бъдат използвани при работни дози (WD), близки до/или равни на титъра.

Използвайте валидирани антитела (виж интернет страницата <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Тестът трябва да се провежда на пряно приготвени екстракти от пробата. Ако е необходимо, може да бъде успешно проведен и тест на екстракти, съхранявани при -68 до -86°C в глицерол. Глицеролът може да бъде премахнат от пробата чрез добавяне на 1 ml буфер за разтваряне на утайката (Допълнение 4), повторно центрофугиране за 15 min при 7000 g и ресуспензиране в еднакъв обем от буфер за разтваряне на утайката. Това често не е необходимо, особено ако пробите на стъклата са добре фиксирани към тях след опламеняването (виж 2.2).

Изгответе стъкла с положителни контроли от хомоложен щам или друг референтен щам на *S. m. subsp. sepedonicus*, суспендирани в картофен извлек, както е описано в Допълнение 2, и по избор в буфер.

Естествено заразената тъкан (поддържана чрез лиофилизация или замразяване при -16 до -24°C) трябва да бъде използвана, където е възможно като подобна контрола на същото стъкло.

Като отрицателни контроли използвайте разреждания от извлек на пробата, които са показали отрицателни резултати при тестването преди това.

Използвайте предметни стъкла с много гнезда, препоръчително е с 10 прозорчета от поне 6 mm в диаметър.

Тествайте контролния материал по еднакъв начин, както пробата(ите).

4.1. Пригответе стъклата за тестване по една от следните процедури:

а) За утайки с относително малко количество от скорбяла:

Пипетирайте един стандартен обем (15 µl е подходящ за прозорче с диаметър 6 mm, увеличете обема за по-големи прозорчета) от разтвор 1/100 от ресуспендираната картофена утайка върху първото прозорче. След това пипетирайте подобен обем от неразтворената утайка (1/1) върху останалите прозорчета на редицата. Вторият ред може да се използва за дубликат или за втора проба, така както е представено на фиг. 1.

б) За други утайки:

Пригответе децимални разтвори (1/10 и 1/100) от ресуспендираната утайка в буфер за утайки. Пипетирайте един измерен стандартен обем (15 µl е подходящ за прозорче с диаметър 6 mm, увеличете обема за по-големи прозорчета) от ресуспендираната утайка и всяко разреждане на един ред от прозорчета. Вторият ред може да се използва за дубликат или за втора проба, така както е представено на фиг. 2.

4.2. Изсушете капките на стайна температура или чрез затопляне при температура от 40 до 45°C. Фиксирайте бактериалните клетки на стъклото чрез загряване (15 min при 60°C), опламеняване или с 95% етанол, или съгласно специфичните инструкции на доставчиците на антителата.

Ако е необходимо, фиксираните стъкла могат да бъдат съхранявани замразени в суха кутия за кратко време (максимум до 3 месеца) преди по-нататъшно тестване.

4.3. Имунофлуоресцентна процедура:

а) Съгласно изготвянето на препарати за тестване в 4.1а):

Изгответе серия от удвоени разтвори на антиялото в имунофлуоресцентен буфер. Първото гнездо трябва да има 1/2 от титъра (T/2), останалите 1/4 от титъра (T/4), 1/2 от титъра (T/2), титъра (T) и двойно на титъра (2T).

б) Съгласно изготвянето на препарати за тестване 4.1б):

Изгответе работен разтвор (WD) на антиялото в имунофлуоресцентен буфер. Работният разтвор влияе на специфичността.

Фиг. 1. Изготвяне на препарат за тестване съгласно 4.1а) и 4.3а)

Разтвори от ресуспендирана утайка

	1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/> Разтвори от ресуспендирана утайка
(Т = титър)	Т/2	Т/4	Т/2	Т	2Т	<input type="checkbox"/> Удвоени разтвори от антисерум/антитяло
Проба 1	o 1	o 2	o 3	o 4	o 5	
Дубликат на проба 1 или проба 2	o 6	o 7	o 8	o 9	o 10	

Фиг. 2. Изготвяне на препарат за тестване съгласно 4.1б) и 4.3б)

Работни разреждания на антисерум/антитяло

	1/1	1/10	1/100	празно	празно	<input type="checkbox"/> Децимални разреждания на ресуспендирана утайка
Проба 1	o 1	o 2	o 3	o 4	o 5	
Дубликат на проба 1 или проба 2	o 6	o 7	o 8	o 9	o 10	

4.3.1. Подредете стъклата върху влажна хартия. Покрийте всяко тестово прозорче напълно с разтвор на антитялото. Обемът на антитялото, нанесен върху всяко прозорче, трябва да е поне обемът на прилагания извлек.

Следната процедура трябва да бъде извършвана при отсъствие на специфични инструкции от доставчиците на антитела.

4.3.2. Инкубирайте стъклата върху влажна хартия под похлупак за 30 min на стайна температура (18 до 25°C).

4.3.3. Изтръскайте капчиците от всяко стъкло и изплакнете внимателно с имунофлуоресцентен буфер (IF). Измийте чрез потапяне за 5 min в имунофлуоресцентен буфер Tween (Допълнение 3) и след това за 5 min в имунофлуоресцентен буфер. Избягвайте разпръскване или преминаване на капчици от едно в друго прозорче, които могат да причинят кръстосано заразяване. Внимателно премахнете излишната влага чрез нежно подсушаване.

4.3.4. Подредете стъклата на влажна хартия. Покрийте тестовите прозорчета с разтвор на FITC конюгат, използван, за да се определи титърът. Обемът на конюгата, нанесен върху прозорчетата, трябва да е идентичен с обема на нанесаното антитяло.

4.3.5. Инкубирайте стъклата на влажна хартия под похлупак за 30 min на стайна температура (18 до 25°C).

4.3.6. Изтръскайте капчиците конюгат от стъклата. Изплакнете и измийте, както

преди (4.3.3). Внимателно отстранете излишната влага.

4.3.7. Пипетирайте 5 до 10 μ l от 0,1 М фосфатен буфер с глицерол (Допълнение 3) или търговски увеличител против избледняване върху всяко прозорче и поставете покривното стъкло.

4.4. Тълкуване на имунофлуоресцентния тест:

4.4.1. Прегледайте тестовите стъкла на епифлуоресцентен микроскоп с филтри, подходящи за възбуждането на багрилото FITC, под водна или маслена имерсия и при увеличение от 500 до 1000. Сканирайте прозорчетата напречно на двата диаметра при десните ъгли и по периметъра. За проби, показващи липса или малък брой клетки, наблюдавайте поне 40 микроскопски полета.

Проверете първо стъклото с положителната контрола. Клетките трябва да са ярко флуоресцентни и напълно обагрени при определения титър на антиялото или работния разтвор. Имунофлуоресцентният тест (раздел 4) трябва да бъде повторен, ако оцветяването е аномално.

4.4.2. Наблюдавайте за ярко флуоресциращи клетки с характерна за *S. m. subsp. sepedonicus* морфология в тестовите прозорчета на стъклата (виж интернет страницата <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Интензитетът на флуоресценцията трябва да бъде еквивалентен или по-добър от щам на положителната контрола при същия разтвор на антиялото. Клетки с непълно оцветяване или със слаба флуоресценция трябва да бъдат игнорирани. Ако се предполага някакво заразяване, тестът трябва да бъде повторен. Това може да бъде случай, при който всички стъкла от една серия показват положителни клетки поради замърсяване на буфера или ако положителните клетки се откриват (извън прозорчето на препарата) по покривния слой на предметното стъкло.

4.4.3. Има няколко проблема, присъщи на специфичността на имунофлуоресцентния тест. Възможно е съпътстващи популации от флуоресциращи клетки с атипична морфология и кръстосани реакции със сапрофитни бактерии, чийто размер и морфология са подобни на *S. m. sepedonicus*, да се намерят в утайките от конуси и части от стъбла.

4.4.4. Отчитайте само флуоресциращи клетки с характерен размер и морфология при титъра или работния разтвор на антителата като в 4.3.

4.4.5. Тълкуване на резултатите от имунофлуоресценцията:

а) Ако се открият ярко флуоресциращи клетки с характерна морфология, пресметнете средния брой типични клетки на микроскопско поле и изчислете броя на типични клетки на ml от ресуспендираната утайка (Допълнение 4).

Резултатите от имунофлуоресценцията са положителни за проби с поне 5×10^3 типични клетки на ml от ресуспендираната утайка. Пробата се счита за потенциално заразена и се изисква по-нататъшно тестване.

б) Резултатите от имунофлуоресценцията са отрицателни за проби с по-малко от 5×10^3 клетки на ml от ресуспендираната утайка и пробата се счита за отрицателна. Не се изисква по-нататъшно тестване.

5. Тест FISH

Принцип

Когато се използва тест FISH като първи скринингов тест и даде положителен резултат, то трябва да се извърши имунофлуоресцентният тест като втори задължителен скринингов тест. Когато се използва тест FISH като втори скринингов тест и даде

положителен резултат, се изисква по-нататъшно тестване съгласно диаграмата, за да се завърши диагностиката.

Забележка.

Използвайте валидирани специфични олиго-сонди от *C. m. subsp. sepedonicus* (Допълнение 7). Предварително тестване с този метод би трябвало да позволи възпроизводимо откриване на поне 103 до 104 клетки от *C. m. subsp. sepedonicus* на ml екстракт/извлек от пробата, която преди това е била отрицателна.

Следната процедура трябва с предимство да бъде изпълнявана на прясно приготвен екстракт от пробата, но може също да бъде изпълнена и на екстракт от проба, който е бил съхраняван в глицерол при -16 до -24°C или -68 to -86°C.

Като отрицателни контроли използвайте част от предварително разделения на равни части екстракт от пробата, които преди това са дали отрицателни резултати за *C. m. subsp. sepedonicus*.

Като положителни контроли пригответе суспензии, съдържащи 105 до 106 клетки на ml от *C. m. subsp. sepedonicus* (напр. щам NCPPB 4053 или PD 406) в 0,01 M фосфатен буфер (PB) от три- до пет- дневна култура (за приготвяне виж Допълнение 2). Изгответе отделни стъкла с положителни контроли от хомоложен щам или от някой друг референтен щам на *C. m. subsp. sepedonicus*, суспендиран в картофен извлек/екстракт, както е описано в Допълнение 2.

Използването на етикетирана с FITC еубактериална олигопроба предлага контрола за хибридизационния процес, тъй като ще оцвети всички еубактерии, които са налични в пробата. Тествайте контролния материал по същия начин като пробата(ите).

5.1. Фиксиране на картофения екстракт

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

5.1.1. Изгответе фиксационен разтвор (виж Допълнение 7).

5.1.2. Пипетирайте 100 µl от всеки екстракт от проба в Епендорф епруветка и центрофугирайте 8 min при 7000 g.

5.1.3. Отстранете супернатантата и разтворете утайката в 500 µl от фиксационния разтвор, приготвен преди по-малко от 24 h. Разбъркайте и инкубирайте една нощ при 4°C.

Алтернативен фиксатор е 96% етанол. За да го използвате, разтворете утайката от стъпка 5.1.2 в 50 µl 0,01 M PB и 50 µl 96% етанол. Разбъркайте сместа и инкубирайте при 4°C 30 до 60 min.

5.1.4. Центрофугирайте 8 min при 7000 g, отстранете супернатанта и ресуспендирайте утайката в 75 µl 0,01 M PB (виж Допълнение 3).

5.1.5. Капнете 16 µl от фиксираната суспензия на чисто предметно стъкло за многократно тестване, както е показано на фиг. 3. Нанесете 2 различни проби на стъкло, неразредени и използвайте 10 µl за да направите разтвор 1:100 (в 0,01 M PB). Оставащият разтвор от пробата (49 µl) може да бъде съхранен при - 20°C след прибавяне на 1 обем от 96% етанол. В случай, че тестът FISH изисква повторение, отстранете етанола чрез центрофугиране и добавете равен обем 0,01 M PB (смесете чрез разбъркване).

Фиг. 3. Постановка за FISH стъкло

Проба 1	Празно	Празно	Празно	Проба 2
---------	--------	--------	--------	---------

□	□	□	□	□
Прозорче 1	Прозорче 2	Прозорче 3	Прозорче 4	Прозорче 5
Проба 1	Празно	Празно	Празно	Проба 2
□	□	□	□	□
Прозорче 6	Прозорче 7	Прозорче 8	Прозорче 9	Прозорче 10
Покривно стъкло 1			Покривно стъкло 2	

5.1.6. Изсушете на въздух стъклата (или в сушилня за препарати при 37°C) и ги фиксирайте чрез опламеняване.

На този етап процедурата може да бъде прекъсната и хибридизацията продължена на следващия ден. Стъклата трябва да бъдат съхранявани далеч от прах и сухи при стайна температура.

5.2. Прехибридизация и хибридизация

5.2.1. Пригответе лизозимен разтвор, съдържащ 10 mg лизозим (Sigma L - 6876) в 10 ml буфер (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Този разтвор може да се съхранява, но трябва да бъде замразяван и размразяван само веднъж. Покрийте всяка проба добре с приблизително 50 µl лизозимен разтвор и инкубирайте 10 min на стайна температура. След това потопете препаратите в деминерализирана вода само веднъж и изсушете с филтърна хартия.

Алтернативно вместо лизозим прибавете 50 µl от 40 до 400 µg ml⁻¹ протеиназа К в буфер (20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4) във всяко кладенче и инкубирайте при 37°C за 30 min.

5.2.2. Дехидратирайте клетките в степенувани серии етанол от 50%, 80% и 96% за по една минута всяка. Изсушете на въздух стъклата в поставка за препарати.

5.2.3. Пригответе влажна инкубационна камера чрез покриване на дъното на херметична кутия с тъкан или филтърна хартия, напоена в 1 x хибмикс (Допълнение 7). Предварително инкубирайте кутията в хибридизационна пещ при 55°C за поне 10 min.

5.2.4. Пригответе хибридизационен разтвор (Допълнение 7), позволяващ 45 µl на предметно стъкло и предварително инкубирайте за 5 min при 55°C.

5.2.5. Поставете стъклата на котлон при 45°C и сложете 10 µl от хибридизационния разтвор във всяко от четирите кладенчета на стъклата.

5.2.6. Поставете 2 покривни стъкла (24 x 24 mm) на всеки препарат, без да допускате въздух. Поставете препаратите в предварително затоплена влажна камера и хибридизирайте за една нощ в пещ при 55°C (на тъмно).

5.2.7. Пригответе три стъкленици, съдържащи 1 l ултрачиста вода, 1 l от 1x хибмикс (334 ml 3x хибмикс и 666 ml ултрачиста вода) и 1 l от 1/2x хибмикс (167 ml 3x хибмикс и 833 ml ултрачиста вода). Предварително инкубирайте всяка на водна баня при 55°C.

5.2.8. Отстранете покривните стъкла от препаратите и ги поставете в кутия за препарати.

5.2.9. Отмийте излишната проба чрез инкубация за 15 min в стъкленица с 1x хибмикс при 55°C.

5.2.10. Преместете кутията за препарати в 1/2 хибмикс разтвор за измиване и инкубирайте за още 15 min.

5.2.11. Потопете стъклата за кратко в ултрачиста вода и ги поставете върху филтърна хартия. Отстранете излишната влага чрез внимателно покриване на повърхността с филтърна хартия. Пипетирайте 5 до 10 µl от разтвора на увеличителя

против избледняване (напр. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA или еквивалентен) върху всяко прозорче и поставете голямо покривно стъкло (24 x 60 mm) върху целия препарат.

5.3. Тълкуване на FISH теста

5.3.1. Наблюдавайте препаратите веднага с микроскоп, пригоден за епифлуоресцентна микроскопия при 630 до 1000x увеличение под имерсионно масло. С филтър, подходящ за флуоресцеин изотиоцианат (FITC), еубактериалните клетки (включително повечето грам-отрицателни клетки) в пробата се оцветяват във флуоресцентно зелено. Използвайки филтър за тетраметилродамин-5-изотиоцианат, Су3-оцветените клетки на *C. m. subsp. sepedonicus* се наблюдават като флуоресцентно червени. Сравнете морфологията на клетките с тази на положителните контроли. Клетките трябва да са ярко флуоресциращи и напълно оцветени. Тестът FISH (раздел 9.4) трябва да бъде повторен, ако оцветяването е аномално. Сканирайте прозорчетата напречно през двата диаметра при десните ъгли и по периметъра. За проби без или с малък брой клетки наблюдавайте поне 40 микроскопски полета.

5.3.2. Наблюдавайте за ярко флуоресциращи клетки с характерна за *C. m. subsp. sepedonicus* морфология в прозорчетата на тестовите стъкла (виж интернет страницата <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Интензивността на флуоресценцията трябва да бъде еквивалентна или по-добра от тази на щам на положителната контрола. Клетки с непълно оцветяване или слаба флуоресценция не трябва да бъдат отчитани.

5.3.3. Ако се предполага някакво заразяване, тестът трябва да бъде повторен. Това може да бъде случай, при който всички стъкла от една серия показват положителни клетки поради замърсяване на буфера или ако се намират положителни клетки (извън прозорчетата на препарата) по покривния слой на предметното стъкло.

5.3.4. Има няколко проблема, присъщи на специфичността на FISH теста. Възможно е съпътстващи популации от флуоресциращи клетки с атипична морфология и кръстосани реакции със сапрофитни бактерии, чиито размер и морфология са подобни на *C. m. sepedonicus*, да се намерят в утайките от конуси и стъблени части макар и по-рядко, отколкото при имунофлуоресцентния тест.

5.3.5. Отчитайте само флуоресциращи клетки с типичен размер и морфология, вижте 5.3.2.

5.3.6. Тълкуване на резултатите от FISH теста:

а) Валидни резултати от FISH теста се получават, ако се наблюдават ярко зелени флуоресциращи клетки с размер и морфология, типични за *C. m. subsp. sepedonicus*, използвайки FITC филтър и ярко оцветени в червено флуоресциращи клетки, използвайки родаминов филтър във всички положителни контроли и в нито една от отрицателните контроли. Ако се открият ярко флуоресциращи клетки с типична морфология, пресметнете средния брой типични клетки на микроскопско поле и изчислете броя на типични клетки на ml от ресуспендирана утайка (Допълнение 4). Проби с поне 5×10^3 типични клетки на ml от ресуспендирана утайка се считат за потенциално заразени. Изисква се по-нататъшно тестване.

Пробите с по-малко от 5×10^3 типични клетки на ml от ресуспендирана утайка се считат за отрицателни.

б) FISH тестът е отрицателен, ако не се наблюдават ярко оцветени в червено флуоресциращи клетки с размер и морфология, типични за *C. m. subsp. sepedonicus*, използвайки родаминов филтър, при условие че типични ярко оцветени в червено

флуоресциращи клетки се наблюдават във всички стъкла с положителни контроли, като се използва родаминов филтър.

6. PCR тест

Принципи

Когато се използва PCR тест като основен скринингов тест и той даде положителни резултати, трябва да се извърши имунофлуоресцентен тест като втори задължителен скринингов тест. Когато се използва PCR тест като втори скринингов тест и той даде положителни резултати, се изисква по-нататъшно тестване според диаграмата, за да се завърши диагностиката.

Пълното използване на този метод като основен скринингов тест се препоръчва само когато са натрупани необходимите експертни знания и умения.

Забележка.

Предварително тестване с този метод би трябвало да позволи продуктивно откриване на 103 до 104 клетки от *S. m. subsp. sepedonicus* на ml, прибавен към екстрактите от пробата, които преди това са дали отрицателни резултати. Може да се наложат опити за оптимизиране, за да се постигнат максималните нива на чувствителност и специфичност във всички лаборатории. Използвайте валидирани реактиви и протоколи за PCR. Препоръчително е да изберете метод с вътрешен контрол.

Използвайте подходящи предпазни мерки, за да избегнете замърсяване на пробата с целева ДНК. PCR тестът трябва да се извършва от опитни лаборанти в специализирани лаборатории по молекулярна биология с оглед да се минимизира възможността от заразяване с целева ДНК.

Отрицателните контроли (за ДНК екстракция и PCR процедури) трябва винаги да бъдат третирани като крайни проби в процедурата, за да стане ясно дали е станало някакво пренасяне на ДНК.

В PCR теста трябва да бъдат включени следните отрицателни контроли:

- екстракт от пробата, която преди това е показала отрицателни резултати за *S. m. subsp. sepedonicus*,
- буферни контроли, използвани за екстракция на бактерията и ДНК от пробата,
- реакционна смес за PCR.

Трябва да бъдат включени следните положителни контроли:

- равни части от ресуспендирани утайки, към които е бил прибавен *S. m. subsp. sepedonicus* (за подготовка виж Допълнение 2),
- суспензия от 106 клетки на ml от *S. m. subsp. sepedonicus* във вода от вирулентен изолат (напр. NCPPV 2140 от NCPPV 4053),
- ако е възможно, използвайте също ДНК, извлечена от проби на положителни контроли при PCR тест.

За да избегнете потенциално заразяване, пригответе положителни контроли в отделна среда от пробите, които ще се тестват.

Екстрактите от проби трябва да са колкото е възможно по-чисти от почвени примеси. Следователно в определения случай може да е препоръчително да се приготвят извлеци от измити картофи, ако трябва да се използват протоколите от PCR.

6.1. Методи за пречистване на ДНК

Използвайте положителни и отрицателни контролни проби, както е описано по-горе.

Подгответе контролния материал по същия начин както пробата(ите).

Съществуват много разнообразни методи за пречистване на целева ДНК от сложните субстрати на пробата, премахвайки по този начин инхибиторите на PCR и други ензимни реакции и концентриращи целевата ДНК в екстракта от пробата.

Следните методи са оптимизирани за използване с валидирания PCR метод, показан в Допълнение 6.

6.1(a). Метод на Pastrik (2000)

1. Пипетирайте 220 μ l лизисен буфер (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) в 1,5 ml Епендорф епруветка.

2. Добавете 100 μ l екстракт от пробата и поставете в термостат или на водна баня при 95°C за 10 min.

3. Сложете епруветката върху лед за пет минути.

4. Добавете 80 μ l разтвор на лизозим за съхраняване (50 mg lysozyme на ml в 10 mM Tris HCl, pH 8,0) и инкубирайте при 37°C за 30 min.

5. Добавете 220 μ l Easy DNAT разтвор А (Invitrogen), разбъркайте добре и инкубирайте при 65°C за 30 min.

6. Добавете 100 μ l Easy DNAT разтвор В (Invitrogen), разбъркайте енергично, докато преципитатът тече свободно в епруветката и пробата стане полутечна.

7. Добавете 500 μ l хлороформ и разбъркайте, докато намалее вискозитетът и сместа стане хомогенна.

8. Центрофугирайте на 15 000 g за 20 min при 4°C, за да се отделят фазите и да се образува интерфаза.

9. Прехвърлете горната фаза в нова Епендорф епруветка.

10. Добавете 1 ml 100% етанол (-20°C), разбъркайте за кратко и инкубирайте върху лед за 10 min.

11. Центрофугирайте на 15 000 g за 20 min при 4°C и отстранете етанола от утайката.

12. Добавете 500 μ l 80% етанол (-20°C) и разбъркайте чрез обръщане на епруветката.

13. Центрофугирайте на 15 000 g за 10 min при 4°C, запазете утайката и отстранете етанола.

14. Оставете утайката да изсъхне на въздух или в скоростна вакуум камера за ДНК.

15. Ресуспендирайте утайката в 100 μ l стерилна ултрачиста вода и оставете на стайна температура поне 20 min.

16. Съхранете при -20°C, колкото е необходимо до извършване на PCR.

17. Утаете всички бели преципитати чрез центрофугиране и използване на 5 μ l от супернатантата, съдържаща ДНК за PCR.

6.1(б). Други методи

Други методи за екстракция на ДНК (напр. Qiagen DNeasy Plant Kit) могат да бъдат прилагани, при условие че за тях е доказано, че са също толкова ефективни в пречистването на ДНК от контролни проби, съдържащи 10³ до 10⁴ патогенни клетки на ml.

6.2. PCR

6.2.1. Пригответе тестови и контролни матрици за PCR според валидираните протоколи (Допълнение 6). Пригответе едно десетично разреждане на ДНК екстракт от пробата (1:10 в ултрачиста вода).

6.2.2. Пригответе подходящата реакционна смес (микс) за PCR в среда,

свободна от зараза според публикувания протокол (Допълнение 6). Валидираният PCR протокол е многостепенна реакция, която също включва вътрешна контрола на PCR.

6.2.3. Добавете 5 µl ДНК екстракт на 25 µl PCR реакция в стерилни PCR епруветки.

6.2.4. Включете отрицателна контролна проба, съдържаща само PCR микс, и добавете същия източник на стерилна ултрачиста вода, така както е използван в сместа за PCR на място на пробата.

6.2.5. Поставете епруветките в същия термоцикълор, който е бил използван при предварителното тестване, и включете оптимизирана PCR програма (Допълнение 6).

6.3. Анализ на продукта от PCR

6.3.1. Разкрийте PCR амплификата (продукт от PCR) чрез електрофореза в агарозен гел. Накапете най-малко 12 µl амплифицирана ДНК реакционна смес от всяка проба, смесена с 3 µl натоварващ буфер (Допълнение 6) в 2,0% (w/v) агарозен гел, поставен в трис-ацетат-EDTA (ТАЕ) буфер (Допълнение 6). Стартирайте електрофорезата при напрежение 5 до 8 V на см. Използвайте подходящ ДНК маркер, например 100 бд.

6.3.2. Визуализирайте ДНК ивиците чрез оцветяване в етидиев-бромид (0,5 mg / l) за 30 до 45 min, като вземете подходящи предпазни мерки за работа с този мутаген.

6.3.3. Наблюдавайте оцветения гел под UV къси вълни (e.g. $\lambda = 302$ nm) за наличието на амплифицирани PCR продукти от очаквания размер (Допълнение 6) и документирайте.

6.3.4. За всички нови открития/случаи проверявайте автентичността на PCR амплификата чрез извършване на рестрикционен ензимен анализ на проба от оставащата амплифицирана ДНК чрез инкубиране при оптимална температура и време с подходящ ензим и буфер (виж Допълнение 6). Разкрийте разрязаните фрагменти чрез електрофореза в агарозен гел както преди и наблюдавайте за характерните рестрикционни фрагменти под UV светлина след оцветяване с етидиев-бромид и сравнете с положителни контроли преди и след рестрикция.

Тълкуване на резултата от PCR теста:

PCR тестът е отрицателен, ако специфичният за *S. m. subsp. sepedonicus* PCR амплификат с очаквания размер не се намира в съответната проба, но се намира във всички положителни контролни проби (в случай на многостепенна PCR със специфични за растението вътрешни контролни праймери: втори PCR-продукт с очаквания размер трябва да бъде намножен от съответната проба).

PCR тестът е положителен, ако специфичният за *S. m. subsp. sepedonicus* PCR амплификат с очаквания размер и рестрикционен модел се открива, при условие че не се амплифицира от никоя отрицателна контролна проба. Достоверно потвърждение на положителен резултат може също да се получи чрез повтаряне на теста с втора серия от PCR праймери (раздел 9.3).

Забележка.

Може да се предполага инхибиране на PCR, ако очакваното намножаване е получено от проба с положителна контрола, съдържаща *S. m. subsp. sepedonicus* във вода, но отрицателни резултати са били получени от положителни контроли с *S. m. subsp. sepedonicus* в картофен извлек. В многостепенни PCR протоколи с вътрешни PCR контроли има индикации за инхибиране тогава, когато не е получен нито един от двата амплификата.

Може да се предполага заразяване, ако очакваният амплификат се получава от

една или повече отрицателни контроли.

7. Биологичен тест

Забележка.

Предварително тестване с този метод трябва да позволи възпроизводимо откриване от 103 до 104 клетки от *S. m. subsp. sepedonicus* на ml прибавен към екстракт от проба, която преди това е дала отрицателен резултат (за приготвянето виж Допълнение 2).

Най-висока чувствителност на установяване може да се очаква, когато се използва пряко приготвен екстракт и оптимални условия за растеж. Въпреки това методът може успешно да се приложи и за екстракти, които са били съхранявани с глицерин при -68 до -86°C.

Някои сортове патладжан осигуряват отлична селективна обогатяваща среда за растеж на *S. m. subsp. sepedonicus* дори при отсъствие на симптоми, а също така са и отличен гостоприемник при тестове за потвърждаване.

Условията за растеж трябва да са оптимални, за да се намали рискът от фалшиви отрицателни резултати от теста.

За подробности за отглеждането виж допълнение 8.

7.1. Разпределете цялата оставаща част за тестване от ресуспендираната утайка от раздел 3.1.6 или 3.2.5 между патладжаните по един от методите, дадени по-долу (7.3 или 7.4). Използвайте само растения в стадий втори-трети до напълно развит трети същински лист. За да се гарантира пълно оползотворяване на ресуспендираната утайка, както и ефективна инокулация /инжектиране, за подчертаните по-долу процедури са необходими 15 до 25 растения от патладжан за проба.

7.2. Не поливайте патладжаните един или два дни преди инокулацията, за да намалите тургурното налягане.

7.3. Инокулация чрез срязване

7.3.1. Придържайки растението между два пръста, пипетирайте една капка (приблизително 5 до 10 µl) от суспендираната утайка върху стъблото между котиледоните (семеделни листа) и първия лист.

7.3.2. Използвайки стерилен скалпел, направете диагонален разрез около 1,0 cm и дълбок приблизително до 2/3 от дебелината на стъблото, започвайки разреза от капката (утайка от концентрирания екстракт).

7.3.3. Запечатайте разреза със стерилен вазелин от спринцовка.

7.4. Инокулация със спринцовка

Инокулирайте стъблото на патладжана точно над котиледоните чрез използване на спринцовка с игла за подкожна инжекция (не по-малка от 23 G). Разпределете пробата между патладжаните.

7.5. Като положителни контроли инокулирайте 5 растения с водна суспензия от 105 до 106 клетки на ml от позната култура на *S. m. subsp. sepedonicus* и където е възможно - с естествено заразена тъкан от клубени (виж раздел 4) по същия инокулационен метод (7.3 или 7.4).

7.6. Като отрицателни контроли инокулирайте 5 растения със стерилен буфер за разтваряне на утайката, като използвате същия инокулационен метод (7.3 или 7.4).

7.7. Инкубирайте растенията в карантинни съоръжения до четири седмици при 18 до 24°C. Инкубирайте растенията при достатъчно светлина и висока влажност (70 до 80%), за да предотвратите полягане или спаружване поради недостиг на вода. Клетките

на *S. m. sepedonicus* загиват при температура 30°C, а оптималната температура е 21°C. За да избегнете заразяване, инкубирайте растенията от положителната и отрицателната контрола на ясно разделени маси в оранжерия или вегетационна камера или в случай че мястото е ограничено, осигурете строго разделяне между третиранията. Ако растенията от различни проби трябва да бъдат инкубирани близо едно до друго, отделете ги с подходящи прегради. Когато наторявате, поливате, инспектирате или извършвате някакви други манипулации, внимавайте изключително много, за да избегнете кръстосано заразяване. Важно е да се пазят оранжерии и растежните камери свободни от насекомни вредители, тъй като те могат да пренесат бактерията от проба на проба.

7.8. Преглеждайте редовно за симптоми, започвайки след една седмица. Преброявайте растенията, показващи симптоми.

S. m. subsp. sepedonicus причинява увяхване на листата при патладжаните, което може да започне като омекване на тъканите по периферията на листата или между нерватурата. Засегнатата тъкан може първоначално да бъде тъмнозелена или на петна, но впоследствие избледнява, преди да некротизира. При увяхване между жилките повърхността често изглежда мазна и много водна. Мъртвата тъкан е често яркочълта по края. Растенията не загиват непременно. Колкото по-дълъг е периодът, преди да се развият симптомите, толкова по-голям е шансът за оцеляване. Растенията могат да превъзмогнат инфекцията. Младите патладжани са много по-чувствителни към ниски популации на *S. sepedonicum*, отколкото по-старите растения и оттам следва необходимостта да се използват растения в третата фаза на разлистване или точно преди нея. Увяхването може също да се предизвика и от популации на други бактерии или гъби, намиращи се в концентрирания екстракт (мацерат) от картофените клубени. В тях са включени *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora subsp. carotovora* and *E. carotovora subsp. atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua var. foveata*, както и големи популации на сапрофитни бактерии. В частност *Erwinia chrysanthemi* може да предизвика симптоми по листата и увяхване, които са много сходни с тези на *S. m. sepedonicus*. Единствената разлика е почерняването на стъблата в случай на инфекции с *Erwinia chrysanthemi*. Другите увяхвания могат да бъдат разграничени от увяхването, причинено от *S. sepedonicum*, тъй като при него цели листа или цели растения бързо увяхват. Също така може да се направи тест - оцветяване по Грам: като по този начин ще се разграничи *S. m. subsp. sepedonicus* от *Erwinia spp.*

7.9. Веднага щом започнат да се наблюдават симптоми при патладжаните, трябва да се направи нова изолация, като се използват участъци от тъкан на увяхнали листа или тъкани от стъбла на растения (виж 3.1.3 за мацерация). Повърхността на листата и стъблата на патладжаните се дезинфекцира със 70% етанол. Направете имунофлуоресцентен тест или PCR на патладжанен извлек и изолирайте на подходяща (селективна) среда (виж раздел 8). Може също да се приготви и Грам оцветяване (Допълнение 9). Идентифицирайте пречистени култури от предполагаем *S. m. subsp. sepedonicus* и потвърдете патогенността (виж раздел 9 и 10).

7.10. При определени обстоятелства, особено там където условията на растеж не са оптимални, е възможно *S. sepedonicum* да присъства като латентна инфекция в патладжаните дори след инкубационен период от 4 седмици. Ако не се наблюдават симптоми след 4 седмици, извършете IF/PCR на смесена проба на 1 cm части от стъбла от всяко тестово растение, взети от участъка над инокулацията. Ако тестът е положителен, трябва да се извърши наново изолация върху подходяща (селективна) среда, следвайки процедурата от раздел 8. Идентифицирайте пречистени култури от

предполагаме *S. m. subsp. sepedonicus* и потвърдете патогенността (виж раздел 9 и 10).

Тълкуване на резултатите от биологичния тест

* Валидни резултати от биологичния тест се получават, когато растенията от положителните контроли показват типични симптоми, бактериите могат да бъдат повторно изолирани от тези растения и не са открити симптоми по отрицателните контроли.

* Биологичният тест е отрицателен, ако тестовите растения не са заразени с *S. m. subsp. sepedonicus* и при условие че *S. m. subsp. sepedonicus* се открива в положителните контроли.

* Биологичният тест е положителен, ако тестовите растения са заразени с *S. m. subsp. sepedonicus*.

8. Изолиране на *S. m. subsp. sepedonicus*

Забележка.

Диагностицирането може да се потвърди, само ако *S. m. subsp. sepedonicus* бъде изолирана, в последствие идентифицирана (виж раздел 9) и потвърдена с патогенен тест (виж раздел 10). Независимо че *S. m. subsp. sepedonicus* е труден за изолиране вредител, той може да се изолира от тъкани с характерни симптоми.

Тъй като *S. m. subsp. sepedonicus* расте по-бавно, то той лесно може да бъде потиснат от други бързорастящи сапрофитни бактерии и това прави директното му изолиране от клубенова проба или утайка от стъблена тъкан (мацерат) (раздел 3.1.6 или 3.2.5.) затруднено. Но използването на селективна хранителна среда и подходящо разреждане на повторно разреждана утайка (мацерат) от конусите или от стъблата на картофите прави директното изолиране на *S. m. subsp. sepedonicus* възможно да се осъществи. Изолирането трябва да се прави от всички картофени клубени или части от стъбла със симптоми и от растенията на патладжана, при които не се наблюдават симптоми, но IF/PCR тестът от смесената проба е бил положителен (виж раздел 7.10). Когато е необходимо, мацерацията на стъблата на патладжаните може да бъде извършена, както е описано в раздел 3.1.3.

Като положителни контроли пригответе децимални разреждания на суспензия от 106 клетки на ml от *S. m. subsp. sepedonicus* (напр. NCPPV 4053 или PD 406). За да се избегне каквато и да е вероятност от заразяване, пригответе положителните контроли напълно отделно от пробите, които ще се тестват.

За всяка новопригответена серия от селективната среда, трябва да се извърши тестване за нейната пригодност за растеж на патогена преди използването и за рутинните проби.

Тествайте контролния материал по идентичен начин като пробата(-ите).

8.1. Селективна посявка

8.1.1. Вземете 100 µl от пробата, получена след повторно разтваряне на картофената утайка (мацерат) или сок от патладжан и направете 10-кратни (децимални) разреждания в буфер за утайка (Допълнение 3).

8.1.2. Изолирането от неразредена картофена утайка обикновено се проваля поради трудния растеж на *Sms* и конкуренцията му със сапрофитите. Тъй като бактерията обикновено присъства в големи популации по заразените тъкани, плътността на сапрофитите може да бъде разреждана, докато патогенът остане. Поради това се препоръчва да се разпредели по 100 µl от всяка проба, от 1/100 до 1/10 000 разреждания, върху MTNA среда или NCP-88 среда (Допълнение 5) (ако се използват петриеви блюда

с диаметър 90 mm, излейте необходимия обем среда, съответстващ на размера на блюдата), използвайки шпатула и подходяща лабораторна техника за разстилане.

Забележка.

Друга алтернативна стратегия е да се направи посявка с начално количество от 100 µl картофен извлек върху едно петриево блюдо с помощта на шпатула за разстилане и след това да се премине към второто петри, разстилайки останалия по инструмента за разстилане извлек, и най-накрая да се приложи върху трето петри, като по този начин произвеждате ефект на разреждане върху петриевите блюда чрез инструмента за разстилане.

8.1.3. Инкубирайте петриевите блюда на тъмно при 21 до 23°C.

8.1.4. Първоначални прегледи на петриевите блюда, включително и на референтните контролни блюда, и преброяване на колонии, подобни на *S. m. subsp. sepedonicus*, се правят след 3 дни с последващи преброявания след 5, 7 и накрая 10 дни.

8.2. Пречистване на предполагаеми колонии

Забележка.

Култивирането на субкултури, подобни на *S. m. subsp. sepedonicus*, трябва да бъде извършвано върху YGM среда; инокулацията на патладжан и/или последваща идентификация трябва да бъде извършена, преди колонии да се разраснат твърде много, т.е. за предпочитане след три до пет дни.

8.2.1. Прави се натривка от колонии на *S. m. subsp. sepedonicus* върху една от следните хранителни среди (формулите са дадени в Допълнение 5):

Хранително-декстрозен агар (за употреба само при субкултура),

дрожден - пептонено-глюкозен агар,

дрожден екстракт с минерални соли.

Инкубирайте при 21 до 24°C до 10 дни.

S. m. subsp. sepedonicus расте бавно, обикновено дава точковидни кремави куполообразни колонии за 10 дни. За снимки на типични колонии на *S. m. subsp. sepedonicus* (виж интернет страницата <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

8.2.2. Натрийте отново, за да установите чистота.

Темповете на растеж се подобряват в субкултурата. Типичните колонии са кремавобели или с цвят на слонова кост; рядко жълти, заоблени, гладки, издигнати, с изпъкнал купол, мукоидно-течни, с ясни краища и диаметър обикновено от 1 до 3 mm.

Бърз тест за оцветяване по Грам (Допълнение 9) може да помогне да се подберат колонии за по-нататъшно тестване.

8.2.3. Идентифицирайте предполагаемите култури (виж раздел 9) и направете тест за патогенност (раздел 10).

9. Идентификация

Идентифицирайте чисти култури от предполагаеми изолати на *S. m. subsp. sepedonicus*, като използвате поне два от следните тестове, базирани на различни биологични принципи.

Включете познати референтни щамове, където е необходимо, за всеки потвърждаващ тест.

9.1. Хранителни и ензимни тестове за идентификация

Определете следните фенотипни характеристики, които са универсално застъпени или отсъстващи при *S. m. subsp. sepedonicus*, съгласно методите на Lelliott

and Stead (1987), Klement et al. (1990), Schaad (2001), (Anonymous) (1987).

Всички хранителни среди трябва да бъдат инкубирани при 21°C и прегледани след шест дни. Ако не е настъпил растеж, инкубирайте 20 дни.

Всички тестове трябва да включват позната контрола на *C. m. subsp. sepedonicus*. Хранителните и физиологичните тестове трябва да се правят, като се използва инокулат от субкултури, отгледани на хранителен агар. Морфологичните сравнения трябва да се правят на култури, отгледани на хранителен декстрозен агар.

Тестове	Очакван резултат
Окислително-ферментационен тест	(O/F) инертна или слабо оксидативна
Оксидазен тест	-
Растеж при 37°C	-
Уреаза	-
Хидролиза на ескулина	+
Хидролиза на скорбялата	- или слаба
Толеранс на 7% разтвор на NaCl	-
Произвеждане на индол	-
Каталазна активност	+
Произвеждане на H ₂ S	-
Използване на цитрат	-
Втечняване на желатин	-
Получаване на киселина от глицерин	-
Получаване на киселина от лактоза	- или слаба
Получаване на киселина от рамноза	-
Получаване на киселина от салицин	-
Грам оцветяване (допълнение 9)	+

9.2. Имунофлуоресцентен тест

(а) Пригответе суспензия от приблизително 10⁶ клетки на ml, разтворени в буфер за IF (Допълнение 3).

(б) Пригответе серия от двукратни разреждания на подходящ антисерум.

(в) Приложете процедурата за имунофлуоресценция (раздел 4).

(г) Положителен IF тест се постига, ако имунофлуоресцентният титър на културата е еквивалентен на този от положителната контрола.

9.3. PCR

(а) Пригответе суспензия от приблизително 10⁶ клетки на ml в ултрачиста вода.

(б) Загрейте 100 µl от клетъчната суспензия в затворени епруветки в термостат или на водна баня при 100°C за 4 min. Ако е необходимо, добавете прясно приготвена

NaOH с крайната концентрация от 0,05M, което ще спомогне за разкъсване на клетъчните стени. След това пробите могат да бъдат съхранявани при -16 до -24°C , колкото е необходимо.

(в) Приложете подходящи процедури, за да увеличите специфичните амплификати от *C. m. subsp. sepedonicus* (е. г. Pastrik, 2000; вижте Допълнение 4; Li and de Boer, 1995; Mills et al., 1997; Pastrik and Rainey, 1999; Schaad et al., 1999).

(г) Положителна идентификация на *C. m. subsp. sepedonicus* се постига, ако PCR амплификатите са същият размер и имат същата дължина на фрагмента като този на положителната контрола.

9.4. Тест FISH

(а) Пригответе суспензия от приблизително 106 клетки на ml в ултрачиста вода.

(б) Приложете FISH процедурата (раздел 5).

(в) Положителен FISH тест се постига, ако се получат едни и същи реакции от културата и от положителната контрола.

9.5. Профилиране на мастните киселини (FAP)

(а) Отгледайте културата на Trypticase soy agar (Oxoid) за 72 h при 21°C (+/- 1°).

(б) Приложете подходяща FAP процедура (Janse, 1991; Stead, 1992).

(в) Положителен FAP тест се получава, когато профилът на предполагаемата контрола е идентичен с този на положителната контрола. Наличието на характерните мастни киселини 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 and 17:0 Anteiso е много показателно за *C. m. sepedonicus*. Други родове като *Curtobacterium*, *Arthrobacter* и *Micrococcus* също имат такива киселини, но 15:1 Anteiso A е рядка киселина в тези бактерии и се среща във всички видове *Clavibacter* spp. между 1 и 5%.

При *C. m. sepedonicus* стойността обикновено е около 5%.

9.6. BOX-PCR

(а) Пригответе суспензия от приблизително 106 клетки на ml в ултрачиста вода.

(б) Приложете теста съгласно процедурата (Smith et al., 2001).

10. Тест за потвърждаване

Тестът за патогенност трябва да се извърши като крайно потвърждаване на диагностиката на *C. m. subsp. sepedonicus* и за оценка на вирулентността на културите, идентифицирани като *C. m. subsp. sepedonicus*:

10.1. Пригответе инокулум от приблизително 106 клетки на ml от изолати на 3 дневни култури, които да бъдат тествани и подходящи щамове от положителни контроли на *C. m. subsp. sepedonicus*.

10.2. Инокулирайте 5 до 10 млади растения от патладжан в стадий 3 лист (раздел 7.3 или 7.4).

10.3. Инкубирайте при 18 до 24°C с достатъчно светлина и висока относителна влажност, за да избегнете напукване или стрес от засушаване (раздел 7.7). С чисти култури типичното увяхване ще се получи за две седмици, но растенията, които не показват симптоми (вижте раздел 7.8) след този период, трябва да бъдат инкубирани до три седмици при температури, които водят до растеж на патладжанените растения, но не надхвърлящи 25°C (Допълнение 8). Ако няма симптоми, след 3 седмици културата не може да бъде потвърдена като патогенна форма на *C. m. subsp. sepedonicus*.

10.4. Изолирайте от растение със симптоми участък от стъблото - 2 cm над точката на инокулация. Стрийте и суспендирайте в малък обем стерилна дестилирана вода или 50 mM фосфатен буфер (Допълнение 3). Направете изолация от суспензията

след разреждане на разтвора и посевка върху MTNA и YPGA (Допълнение 5), инкубирайте три до пет дни при 21 до 23°C и наблюдавайте за образуването на типични за *C. m. subsp.sepedonicus* колонии.

Допълнение 1

Лаборатории, включени в оптимизирането и валидиране на протоколи

Лаборатория (1)	Място	Държава
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Виена и Линц	Австрия
Departement Gewasbescherming	Мерелбек	Белгия
Plantedirektoratet	Лингби	Дания
Central Science Laboratory	Йорк	Англия
Scottish Agricultural Science Agency	Единбург	Шотландия
Laboratoire National de la Protection des Vegetaux, Unite de Bacteriologie	Анжер	Франция
Laboratoire National de la Protection des Vegetaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Франция
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Германия
Pflanzenschutzamt Hannover	ХанOVER	Германия
State Laboratory	Дъблин	Ирландия
Plantenziektenkundige Dienst	Вагенинген	Холандия
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Аас	Норвегия
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Лисабон	Португалия
Nacionalni inštitut za biologijo	Любляна	Словения
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Саламанка	Испания

(1) Учени за контакт: вижте интернет страницата <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

Допълнение 2

Изготвяне на положителни и отрицателни контроли за скринингови тестове PCR/IF и FISH на растителна тъкан от клубени

Изгответе 72-часова култура от вирулентен щам на *C. m. subsp. sepedonicus* (NCPPB 4053 или PD 406) върху MTNA среда и суспендирайте в 10 mM фосфатен буфер, за да получите клетъчна плътност от приблизително 1 до 2 x 10⁸ cfu на ml. Това обикновено се постига чрез получаване на слабо мътна суспензия, еквивалентна на оптична плътност от 0,20 при 600 nm.

Отстранете конусчетата от 200 клубена, взети от сорт с бяла кора, за които се знае, че са свободни от *C. m. subsp. sepedonicus*.

Обработете конусчетата както обикновено и ресуспендирайте утайката в 10 ml.

Пригответе 10 стерилни 1,5 ml микропруветки с 900 µl от ресуспендирана утайка.

Прехвърлете 100 ml от суспензията от *C. m. subsp. sepedonicus* в първата микропруветка. Разбъркайте.

Установете десетични нива на заразяване чрез по-нататъшно разреждане в следващите 5 микропруветки.

Шестте заразени микропруветки ще бъдат използвани като положителни контроли. Четирите незаразени микропруветки ще бъдат използвани като отрицателни контроли. Надпишете микропруветките.

Пригответе равни части от 100 µl в стерилни микропруветки от 1,5 ml, като по този начин получите девет повторения на всяка контролна проба. Съхранявайте при -16 до -24°C до употребата.

Присъствието и количественото определяне на *C. m. subsp. sepedonicus* в контролните проби трябва първо да се потвърди чрез имунофлуоресценция.

За PCR теста извършете ДНК екстракция от положителни и отрицателни контролни проби с всяка серия от тестови проби.

За имунофлуоресценцията и FISH тестовете извършете опити върху положителни и отрицателни контролни проби с всяка серия от тестови проби.

За имунофлуоресценцията, FISH и PCR тестове - *C. m. subsp. sepedonicus* трябва да бъде открит в поне 10⁶ и 10⁴ кл/ml от положителните контроли и в нито една от отрицателните контроли.

Допълнение 3

Буфери за тест процедури

Общо: Неотворените стерилизирани буфери могат да бъдат съхранявани до една година.

1. Буфери за екстракционна процедура

1.1. Екстракционен буфер (50 mM фосфатен буфер, pH 7,0)

Този буфер се използва за екстракция на бактерията от растителни тъкани чрез хомогенизиране или разклащане.

Na₂HPO₄ (anhydrous) - 4,26 g

KH₂PO₄ - 2,72 g

Дестилирана вода - 1,00 L

Разтворете съставките, проверете pH и стерилизирайте в автоклав при 121°C за 15 min.

Допълнителни компоненти могат да бъдат полезни, както следва:

	Цел	Количество (за L)
Lubrol flakes	Deflocculant (*)	0,5 g
DC silicone antifoam	Anti-foam agent (*)	1,0 ml
Tetrasodium pyrophosphate	Anti-oxidant	1,0 g
Polyvinylpyrrolidone - 40000 (PVP-40)	Спойка за инхибитори за PCR	50 g

(*) За употреба при хомогенизиращия метод за екстракция.

1.2. Буфер за утайката (10 mM фосфатен буфер, pH 7,2)

Този буфер се използва за ресуспендиране и разреждане на екстракта от конусчета на картофени клубени след концентриране на утайката чрез центрофугиране.

Na₂HPO₄.12H₂O - 2,7 g

NaH₂PO₄.2H₂O - 0,4 g

Дестилирана вода - 1,00 L

Разтворете съставките, проверете pH и стерилизирайте в автоклав при 121°C за 15 min.

2. Буфери за имунофлуоресцентен тест

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

Този буфер се използва за разреждане на антитела.

Na₂HPO₄.12H₂O - 2,7 g

NaH₂PO₄.2H₂O - 0,4 g

NaCl - 8,0 g

Дестилирана вода - 1,0 L

Разтворете съставките, проверете pH и стерилизирайте в автоклав при 121°C за 15 min.

2.2. Буфер за имунофлуоресценция - Tween

Този буфер се използва за измиване на предметните стъкла.

Прибавете 0,1% Tween 20 към буфера за имунофлуоресценция.

2.3. Фосфатен буфер с глицерол, pH 7,6

Този буфер се използва като течен увеличител върху гнездата на предметните стъкла за усилване на флуоресценцията.

Na₂HPO₄.12H₂O - 3,2 g

NaH₂PO₄.2H₂O - 0,15 g

Глицерол - 50 ml

Дестилирана вода - 100 ml

Разтвори, използвани против избледняване, се предлагат като готови търговски продукти, напр. Vectashield(r) (Vector Laboratories) или Citifluor(r) (Leica).

Допълнение 4

Определяне нивото на зараза в имунофлуоресцентни и FISH тестове

1. Избройте средния брой типични флуоресцентни клетки на зрително поле (в)

2. Изчислете броя на типични флуоресцентни клетки на гнездо от микроскопски

препарат (в)

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

където S е повърхностната площ на гнездо от многогнездно предметно стъкло;

s - повърхностната площ на полето на обектива;

$s = \pi i^2 / 4G^2K^2$, където i е коефициентът на полето (варира от 8 до 24 в зависимост от типа окуляр);

K - коефициентът на епруветката (1 или 1,25);

G - увеличението на обектива (100x, 40x etc.).

3. Изчислете броя на типични флуоресцентни клетки на ml разтворена утайка (N).

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

където y е обемът на разтворената утайка върху всяко гнездо;

F - факторът на разреждане на разтворената утайка.

Допълнение 5

Среди за изолиране и отглеждане на *C. m. subsp. sepedonicus*

(а) Основна среда за растеж

Хранителен агар (NA)

Хранителен агар (Difco) - 23,0 g

Дестилирана вода - 1,0 L

Разтворете съставките и стерилизирайте в автоклав при 121°C за 15 min.

Хранителен декстрозен агар (NDA)

Хранителен агар на фирма Difco, съдържащ 1% D(+) глюкоза (монохидрат).

Стерилизирайте в автоклав при 115°C за 20 min.

Пептонено-глюкозен дрождиев агар (YPGA)

Екстракт от дрожди (Difco) - 5,0 g

Vacto-Peptone (Difco) - 5,0 g

D(+) Глюкоза (монохидрат) - 10,0 g

Vacto-Agar (Difco) - 15,0 g

Дестилирана вода - 1,0 L

Разтворете съставките и стерилизирайте в автоклав при 121°C за 15 min.

Среда с минерални соли и екстракт от дрожди (YGM)

Vacto-Yeast-Extract (Difco) - 2,0 g

D(+) Глюкоза (монохидрат) - 2,5 g

K₂HPO₄ - 0,25 g

KH₂PO₄ - 0,25 g

MgSO₄.7H₂O - 0,1 g

MnSO₄.H₂O - 0,015 g

NaCl - 0,05 g

FeSO₄.7H₂O - 0,005 g

Vacto-Agar (Difco) - 18 g

Дестилирана вода - 1,0 L

Разтворете съставките и стерилизирайте средата в обеми от 0,5 литър - в автоклав при 115°C за 20 min.

(б) Валидирани селективни хранителни среди

Среда MTNA

В случай че не е упоменато друго, всички компоненти са от BDH.

Екстракт от дрожди (Difco) - 2,0 g

Манитол - 2,5 g

K₂HPO₄ - 0,25 g

KH₂PO₄ - 0,25 g

NaCl - 0,05 g

MgSO₄.7H₂O - 0,1 g

MnSO₄.H₂O - 0,015 g

FeSO₄.7H₂O - 0,005 g

Агар (Oxoid no. 1) - 16,0 g

Дестилирана вода - 1,0 L

Разтворете съставките, коригирайте рН на 7,2. След загряването в автоклав (при 121°C за 15 min) и охлаждане до 50°C добавете антибиотици: trimethoprim 0,06 g, nalidixic acid 0,002 g, amphotericin B 0,01 g.

Разтваряне на антибиотиците до получаване на крайна работна концентрация: Trimethoprim (Sigma) и Nalidixic acid (Sigma) (и двете при 5 mg/ml), в 96% метанол, Amphotericin B (Sigma) (1 mg/ml) в диметилов серен оксид.

Работните разтвори на антибиотиците трябва да се съхраняват след стерилизиране през филтър.

Важно.

Годността на основната хранителна среда е три месеца. След като се добавят антибиотици, трайността е един месец, ако се съхранява в хладилник.

NCP-88 среда

Хранителен агар (Difco) - 23 g

Екстракт от дрожди (Difco) - 2 g

D-манитол - 5 g

K₂HPO₄ - 2 g

KH₂PO₄ - 0,5 g

MgSO₄.7H₂O - 0,25 g

Дестилирана вода - 1,0 L

Разтворете съставките, коригирайте рН на 7,2. След загряването в автоклав (при 121°C за 15 min) и охлаждане до 50°C добавете следните антибиотици: Polymyxin B sulphate (Sigma) 0,003 g, Nalidixic acid (Sigma) 0,008 g, Cycloheximide (Sigma) 0,2 g.

Разтваряне на антибиотиците до получаване на крайна работна концентрация, както следва: nalidixic acid в 0,01 M NaOH, cycloheximide в 50% етанол, polymyxin B sulphate в дестилирана вода. Работните разтвори на антибиотиците трябва да се съхраняват след стерилизиране през филтър.

Важно. Годността на основната хранителна среда е три месеца. След като се добавят антибиотици, трайността е един месец, ако се съхранява в хладилник.

Допълнение 6

Валидирани PCR протоколи и реактиви

Важно.

Предварителното тестване трябва да позволи възпроизводимо откриване на поне 103 до 104 клетки от *S. m. sepedonicus* на ml екстракт от проба.

Предварителното тестване трябва също да не показва положителни резултати с група от селектирани щамове.

1. Многострани протоколи с вътрешен PCR контрол (Patrik, 2000).

1.1. Олигонуклеотидни праймери

Начален праймер PSA-1 5'- ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3'
 Краен праймер PSA-R 5'- tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3'
 Начален праймер NS-7-F 5'- gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3'
 Краен праймер NS-8-R 5'- tcc gca ggt tca cct acg ga -3'

Очакваният размер на амплификата от модел на ДНК от *C. m. subsp. sepedonicus* = 502 бд (PSA-набор от праймери).

Очакваният размер на амплификата от 18S рРНК при вътрешен контрол PCR = 377 бд (NS-набор от праймери).

1.2. PCR реакционна смес

Реактив	Количество реактиви за микс	Крайна концентрация
Стерилна UPW	15,725 µl	
10x PCR буфер (1)		1 x
(15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	(1,5 mM MgCl ₂)
BSA (фракция V) (10%)	0,25 µl	0,1%
d-nTP mix (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Праймер PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Праймер PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Праймер NS-7-F (10 µM) (2)	0,1 µl	0,04 µM
Праймер NS-8-R (10 µM) (2)	0,1 µl	0,04 µM
Taq polymerase (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1,0 U
Обем на пробата	5,0 µl	
Общ обем	25,0 µl	

(1) Методите са били валидирани чрез използване на Taq полимераза от Perkin Elmer (AmpliTaq или Gold) и Gibco BRL.

(2) Концентрацията на праймерите NS-7-F и NS-8-R е била оптимизирана за екстракцията на конусчетата, като се използва методът на хомогенизиране и пречистване на ДНК според Patrik (2000) (вижте раздел 6.1.а и 6.2). Реоптимизиране на концентрациите от реактивите ще се изисква, ако са използвани екстракция чрез разклащане или други методи за изолиране.

1.3. Условия за протичане на PCR

Включете следната програма:

- 1 цикъл: а) 3 min при 95°C (денатурация на матрична ДНК)
- 10 цикъла: б) 1 min при 95°C (денатурация на матрична ДНК)
в) 1 min при 64°C (хибридизация на праймерите)
г) 1 min при 72°C (удължаване на копието)
- 25 цикъла: д) 30 s при 95°C (денатурация на матрична ДНК)
е) 30 s при 62°C (хибридизация на праймерите)
ж) 1 min при 72°C (удължаване на копието)
- 1 цикъл: з) 5 min при 72°C (крайно удължаване на копието)
и) задържане при 4°C.

Важно.

Тази програма е оптимизирана за използване с MJ Research PTC 200 термоцикълор. Може да се наложи модифициране на стъпките на циклите "б", "в", "г", "д", "е" и "ж" при използване на други модели.

1.4. Анализ на амплификата с рестриктазен ензим

PCR продуктите, получени от ДНК на *S. m. subsp. sepedonicus*, дават ясно разграничим полиморфизъм на дължината на рестрицираните фрагменти с ензима Bgl II след инкубиране при 37°C за 30 min. Рестриционните фрагменти, получени от специфичен за *S. m. subsp. sepedonicus* фрагмент, са с размер 282 бд и 220 бд.

2. Приготвяне на буфер за електрофореза

2.1. Bromphenol blue (10% готов разтвор)

Bromphenol blue	5 g
Дестилирана вода (бидестилирана)	50 ml

2.2. Натоваарващ буфер

Глицерол (86%)	3,5 ml
Bromphenol blue (5.1)	300 µl
Дестилирана вода (бидестилирана)	6,2 ml

3. 10x Трис ацетат EDTA (ТАЕ)

буфер, рН 8,0

Tris буфер	48,4 g
Ледена оцетна киселина	11,42 ml
EDTA (дикалиева сол)	3,72 g
Дестилирана вода	1,00 L

Разтворете до 1x преди употреба.

Налични и в търговската мрежа (напр. Invitrogen или подобни).

Допълнение 7

Валидирани реактиви за FISH тест

1. Олиго-сонди

Cms-специфична

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

Неспецифична

еубактериална проба

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

2. Фиксиращ разтвор

[ВНИМАНИЕ! ФИКСАТОРЪТ СЪДЪРЖА ПАРАФОРМАЛДЕХИД, КОЙТО Е ТОКСИЧЕН, НОСЕТЕ РЪКАВИЦИ И НЕ ВДИШВАЙТЕ. ПРЕПОРЪЧИТЕЛНО Е ДА СЕ РАБОТИ В ИЗОЛАЦИОННА КАМЕРА].

а) Загрейте 9 ml вода за молекулярен анализ (напр. ултрачиста вода до 60°C) и прибавете 0,4 g параформалдехид. Параформалдехидът се разтваря след прибавяне на пет капки 1N NaOH и разбъркване с магнитна бъркалка.

б) Нагласете рН до 7,0 чрез прибавяне на 1 ml 0,1 M фосфатен буфер (PB; рН 7,0) и пет капки 1 N HCl. Проверете рН с индикаторна лентичка и го коригирайте, ако е необходимо, с HCl или NaOH.

[ВНИМАНИЕ! НЕ ИЗПОЛЗВАЙТЕ РН МЕТЪР В РАЗТВОРИ С ПАРАФОРМАЛДЕХИД.]

в) Филтрирайте разтвора през 0,22 µm мембранен филтър и го пазете от прах при 4°C до следваща употреба.

г) Важно.

Алтернативни фиксиращи разтвори: 96% етанол.

3. 3x Hybmix

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (филтърно стерилизирана или на автоклав)	- 15 mM

Разредете до 1x, както се изисква.

4. Хибридизационен разтвор

1x Hybmix	
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	0,01%
проба EUB 338	5 ng/µl
проба CMSCY301	5 ng/µl

Пригответе количествата от разтвора за хибридизация според изчисленията в таблицата. За всяко предметно стъкло (съдържащо две различни проби в дубликат) са необходими 90 µl хибридизационен разтвор.

Таблица. Примерни количества за приготвяне на хибридизационна смес

	2 препарата	8 препарата
Стерилна УЧВ	50,1	200,4
3x хибмикс	30,0	120,0
1% SDS	0,9	3,6
Сонда EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Сонда CMSCY301 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Общ обем (µl)	90,0	360,0

Важно. Съхранявайте всички разтвори, съдържащи чувствителни на светлина олигосонди, на тъмно, при - 20°C. Пазете ги от пряка слънчева или електрическа светлина по време на използване.

5. 0,1 М фосфатен буфер, рН 7,0

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Дестилирана вода	1,00 L

Разтворете съставките, проверете рН и стерилизирайте в автоклав при 121°C за 15 min.

Допълнение 8
Култура от патладжан

Посейте семена от патладжан (*Solanum melongena*) в пастьоризиран компост за семена. След появата на напълно развити семедели (от 10 до 14 дни) и на първи същински лист растенията се пикират в пастьоризиран компост за засаждане.

Патладжанените растения трябва да се отглеждат в оранжерия със следните условия на средата:

Продължителност на деня:	14 h или естествена дневна продължителност, ако тя е по-голяма;
Температура:	дневна: 21 до 24°C, нощна: 15°C.

Чувствителни сортове патладжан: "Black Beauty",
"Long Tom",
"Rima",
"Balsas"

Доставчик: вижте интернет страницата
<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

Допълнение 9

Процедура Грам оцветяване (модификация на Hucker's) (Doetsch, 1981) (1)

Разтвор на Crystal violet

Разтворете 2 g Crystal violet в 20 ml 95% етанол.

Разтворете 0,8 g амониев оксалат в 80 ml дестилирана вода.

Смесете двата разтвора.

Lugol's iodine

Йод	1 g
Калиев йодид	2 g
Дестилирана вода	300 ml

Стрийте твърдите части заедно в хаванче с чукало. Добавете към водата и разбъркайте, за да разтворите съставките в затворен съд.

Разтвор от Safranin - за оцветяване

Разтвор с концентрация за съхранение:

Safranin O	2,5 g
95% етанол	100 ml

Разбъркайте и съхранете.

Разредете 1:10, за да получите работен разтвор.

Процедура по оцветяване:

1. Пригответе натривки, изсушете на въздух и ги фиксирайте чрез загаряване.
 2. Залейте предметното стъкло с разтвор на кристал виолет за 1 min.
 3. Изплакнете бързо на течаща вода.
 4. Залейте с луголов р-р за 1 min.
 5. Изплакнете на течаща вода и подсушете.
 6. Обезцветете с 95% етанол, като добавяте внимателно капка по капка, докато спре извличането на повече цвят или потопете с леко разклащане за 30 s.
 7. Изплакнете на течаща вода и поийте.
 8. Залейте с шафранинов разтвор до 10 s.
 9. Изплакнете на течаща вода и поийте.
- Грам-положителните бактерии се оцветяват във виолетово-синьо;
Грам-отрицателните бактерии се оцветяват в розово-червено.
(1) Могат да се използват и търговски разтвори и комплекти за оцветяване.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Commission of the European Communities, Luxembourg. Publ EUR 11288 EN, 21 pp.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. *Rev. Pl. Path.*, 49, 213 - 218.
3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. *EPPO Bull.* 14 (2), 147 - 152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: *Manual of methods for general bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, 21 - 23.
5. Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J. Bact.*, 66, 24 - 26.
6. Janse, J. D., 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14; 335 - 345.
7. Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. *EPPO Bull.*, No 17, 1987, pp. 1 - 10.
8. Jansing, H. and K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 105, 590 - 601.
9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature, Lond.*, 178, 703.
10. Klement Z.; Rudolph, K and D. C. Sands, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. *J. appl. Bact.*, 29, 114 - 118.
12. Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. appl. Bact.*, 29, 470 - 489.
13. Lelliott, R. A. and P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. *EPPO Bull.*, 6 (2), 101 - 106.
14. Li, X. and S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *Phytopathology*, 85, 837 - 842.
15. Mills, D., Russell, B., W. and J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. *Phytopathology*, 87, 8, 853 - 861.
16. Pstrik, K.-H. and R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *J. Phytopathology* 147; 687 - 693.
17. Pstrik, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 155 - 165.
18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the *Corynebacteria*. *Mem. Cornell agric. Exp. Sta.*, 366, 52 pp.
19. Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. and Knorr, D. (1999) Detection of

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. *Plant Disease* 83; 1095 - 1100.

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

21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.

22. Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1 *Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *European Journal of Plant Pathology*, 107 (7), 739 - 748.

23. Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, 481 - 527.

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

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

Приложение № 2 към чл. 3, ал. 5

(Изм. - ДВ, бр. 8 от 2002 г., изм. - ДВ, бр. 74 от 2006 г., предишно приложение № 1 към чл. 3, ал. 5, изм. - ДВ, бр. 27 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.)

Процедури при установяване на диагностични симптоми за наличие на заболяването, причинено от вредителя, и наличие на положителна реакция

1. За всяка вероятна поява, когато е установен положителен резултат от скрининг теста/тестовите в съответствие с приложение № 1 по чл. 3, ал. 1 и се чака окончателно потвърждение или отхвърляне, се запазват при подходящо съхранение:

- а) всички клубени от пробата и когато е възможно, всички растения от пробата,
- б) всеки оставащ екстракт и допълнително изготвения материал за скрининг теста/тестовите, например препарати за имунофлуоресценция и
- в) цялата свързана документация, до приключването на анализите.

Запазването на клубените ще спомогне да се извърши сортоизпитване при необходимост.

2. Когато бъде потвърдено наличието на вредителя, се запазват минимум един месец след официалното уведомяване на НСРЗ при подходящо съхранение:

- а) материалът, посочен в т. 1, и
- б) пробата от заразения материал от патладжана, инокулиран с екстракт от клубена или растението, и
- в) изолираната култура на вредителя.

Приложение № 3 към чл. 5, т. 2

(Изм. и доп. - ДВ, бр. 74 от 2006 г., предишно приложение № 2 към чл. 5, изм. - ДВ, бр. 27 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.)

Определяне вероятната степен на заразяване

1. Елементите, които трябва да се вземат под внимание при определяне вероятната степен на заразяване в смисъла на чл. 5, ал. 1, т. 2, включват:

а) клубени или растения, отгледани на мястото на производство, обявено за заразено по чл. 5, т. 1;

б) мястото/местата и сградите за производство, собствени и/или наети, свързани с клубените или растенията, обявени за заразени по реда на чл. 5, ал. 1, т. 1, включително собствените и/или наетите производствени съоръжения и техника;

в) клубени или растения, произведени в мястото/местата на производство, посочени в буква "б", или такива, които едновременно със заразените са били/са на местата на производство или сградите, посочени в буква "а";

г) централните складове, съхраняващи или търгуващи с картофи, произведени на местата на производство по букви "а" и "б";

д) всякаква техника, транспортни средства, сухоземни или водни, складове или части от тях и всички други предмети, включително опаковъчния материал, които са имали вероятен контакт с клубените или растенията, обявени за заразени по чл. 5, т. 1;

е) всички клубени или растения, съхранявани във или били в контакт със съоръженията или с предметите, изброени в буква "д", преди изчистването или дезинфекцирането на тези съоръжения или предмети;

ж) като резултат от тестването по смисъла на чл. 6, тези клубени или растения със сестрински или родителски клонов произход като заразените по чл. 5, т. 1 и за които, въпреки че изследванията са отрицателни за вредителя, има възможност за вероятна зараза чрез клоново звено; може да се предприеме сортоизпитване за да се провери идентичността на заразените и клоново свързаните клубени или растения, и

з) мястото/местата на производство на клубените или растенията, посочени в буква "ж".

2. Елементите, които трябва да се вземат под внимание при определянето на възможното разпространение по чл. 5, т. 3, включват:

а) близостта на други места за производство, на които се отглеждат картофи или други растения - гостоприемници на вредителя;

б) общата продукция и използването на запаси от картофи за семе.

3. Уведомяването по чл. 5, ал. 2 включва:

Незабавно след потвърждаването на присъствието на вредителя чрез лабораторно изследване, използвайки методите, посочени в приложение № 1, най-малко:

а) името на сорта на партидата картофи,

б) видът (за семе, за консумация и т. н.) и където е приложимо, категорията на картофите.

Когато има риск от заразяване на картофи от или в друга държава членка/държави членки, държавата членка, в която е било потвърдено присъствието,

трябва незабавно да информира засегнатата държава членка/държави членки с необходимата информация в съответствие с чл. 5, ал. 3, като:

- а) името на сорта на партидата картофи;
- б) името и адреса на получателя и на изпращача;
- в) датата на доставяне на партидата картофи;
- г) размера на доставената партида картофи;
- д) копие на растителния паспорт или поне номера на растителния паспорт, когато е необходимо, или регистрационния номер на производителя или търговеца на едро и копие от бележката за доставка.

Когато се предостави такава информация, Европейската комисия трябва също да се информира незабавно.

След приключване на всички разследвания, за всеки отделен случай се посочват:

- а) датата, на която заразата е била потвърдена;
- б) кратко описание на проведеното разследване за идентифициране на източника и вероятното разпространение на заразата, включително предприетият брой на взетите проби;
- в) информация на идентифицирания или предполагаемия източник/източници на зараза;
- г) подробности за степента на определената зараза, включително броя на местата на производство и броя на партидите с индикация на сорта и ако са картофи за семе, категория;
- д) подробности за буферната зона, включително броя на местата на производство, които не са определени като заразени, но са включени в зоната;
- е) друга информация, свързана с потвърденото огнище/огнища, която Европейската комисия може да изисква.

Приложение № 4 към чл. 7, ал. 1

(Изм. - ДВ, бр. 8 от 2002 г., изм. и доп. - ДВ, бр. 74 от 2006 г., предишно приложение № 3 към чл. 7, изм. - ДВ, бр. 27 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.)

Карантинни мерки при заразени клубени, растения и в заразените зони

I. Официалните мерки, които се прилагат по чл. 7, ал. 1, са:

- а) използване като фураж на животните след термична обработка по такъв начин, че да не съществува риск от разпространение на вредителя, или
- б) ликвидиране в официално одобрено място за отпадъци, в което няма риск от възможност за освобождаване на вредителя в околната среда, т. е. чрез просмукване в селскостопанска земя, или
- в) инсинерация, или
- г) използване за промишлена преработка чрез директна и незабавна доставка до преработващо предприятие, разполагащо с подходящи технически съоръжения за унищожаване на отпадъци и със система за дезинфекция на местата, където се складира, на транспортните средства, които ги извозват, когато е установено от

фитосанитарните органи, че не съществува опасност от разпространение на вредителя, или

д) други мерки, когато не съществува риск от разпространението на вредителя; тези мерки се съобщават на Европейската комисия и на другите държави - членки на Европейската общност.

Всякакви останали остатъчни продукти, свързани със или произтичащи от погорните мерки трябва да се ликвидират чрез официалните одобрени методи в съответствие с приложение № 5.

II. Правилната употреба или ликвидирането на клубени или растения, определени като вероятно заразени съгласно чл. 5, ал. 1, буква "б" и назовани в чл. 7, ал. 2, под контрола на официално отговорните органи на заинтересованите страни членки, с правилната комуникация между официално отговорните органи да гарантира такъв контрол през цялото време и одобрение от официално отговорните органи на страната членка, където ще се опаковат или преработват картофите по отношение на съоръжения за съхранение на отпадъците, цитирани в първа и втора подточка, трябва да са:

а) използване като картофи за преработка и консумация, опаковани за директна доставка и употреба без повторно опаковане, на място с подходящи съоръжения за съхраняване на отпадъците; с картофите, предназначени за засаждане, може да се борави на същото място, ако това се прави отделно или след почистване и дезинфекция, или

б) използване като картофи за преработка и консумация, предназначени за промишлена преработка и предназначени за директна и незабавна доставка до преработвателния завод с подходящи съоръжения за съхранение на отпадъците и система за почистване и дезинфекция най-малкото на превозните средства, напускащи мястото, или

в) някаква друга употреба или ликвидиране, при условие че е установено, че не съществува риск от разпространение на организма и подлежат на одобрение от споменатите официално отговорни органи.

III. Подходящите методи за почистване и дезинфекциране на предметите, цитирани в чл. 7, ал. 3, трябва да бъдат тези, за които е било установено, че не съществува риск от разпространение на организма и ще бъдат използвани съгласно надзора на официално отговорни органи на страните членки.

IV. Серията от мерки, цитирани в чл. 7, ал. 4, които да бъдат изпълнявани от страните членки в рамките на зоната, установена съгласно чл. 5, ал. 1, т. 3, трябва да включват:

1. На местата за производство, обявени за заразени по чл. 5, ал. 1, т. 1:

A) На определена площ, обявена за заразена по чл. 5, ал. 1, т. 1, или

а) най-малко в продължение на трите следващи години след годината на обявяване на заразата:

- се вземат мерки за унищожаване на самосевките от картофи и други растения - гостоприемници на вредителя; и

- не се допуска засаждане на никакви клубени, растения или семена или други естествено намиращи се растения - гостоприемници на вредителя, или култури, за които съществува риск от разпространение на организма;

- след периода, определен в предходния абзац, през първата година се засаждат само сертифицирани семена за картофи за преработка или консумация под контрола на НСРЗ;

- в сезона на първата реколта от картофи, следваща периода, описан в предходната подточка, и при условие че за полето е било установено, че е свободно от самосевки и други естествено намиращи се растения - гостоприемници на организма по време на инспекциите за поне две последователни години на отглеждане, предхождащи засаждането, ще бъде разрешено само производство на картофи за консумация и преработка под контрола на НСРЗ, а прибраните клубени трябва да се тестват според процедурата, описана подробно в приложение № 1;

- в сезона на прибиране на реколтата от картофи, последващ този, цитиран в предходната подточка и следващ подходящ цикъл на сеитбообращение, който ще бъде поне две години, ако ще се отглеждат картофи за семе, могат да се засаждат картофи за производство на картофи за семе или консумация и преработка и ще се извършва официално наблюдение, както е описано в чл. 2, ал. 1; или

б) през следващите четири години след годината на обявяване на зараза:

- се вземат мерки за унищожаване на самосевките от картофи и на други растения - гостоприемници на вредителя; и

- полето се оставя и поддържа или като гола угар, или като пасище, с често ниско окосяване или интензивно затревено;

- в сезона на първата реколта, следваща периода, описан в предходната подточка, и при условие че за полето е било установено, че е свободно от самосевки от картофени растения и други естествено намиращи се растения - гостоприемници на организма по време на официалните инспекции за поне две последователни години на отглеждане, предхождащи засаждането, ще бъде разрешено производството на картофи за семе или картофи за преработка и консумация под контрола на НСРЗ и прибраните клубени трябва да се тестват съгласно процедурите, описани в приложение № 1.

Б) Във всички други полета на заразено място на производство и при условие че официално отговорните органи са били убедени, че рискът самосевки от картофени растения и други естествено намиращи се растения - гостоприемници на организма, е бил елиминиран:

- в годината на отглеждане, следваща тази на обозначеното заразяване, не трябва да се засаждат нито картофени клубени, нито картофени растения или същински семена, нито други естествено намиращи се растения - гостоприемници на организма, или

- могат да се засаждат сертифицирани картофи за семе, но само за производство на картофи за преработка и консумация,

- във втората година на отглеждане, следваща тази на обозначеното заразяване, трябва да се засаждат само сертифицирани картофи за семе или картофи за семе, официално тествани за отсъствие на пръстеновидно гниене и отглеждани под официален контрол на места за производство, различни от тези, назовани в т. IV, 1, за производство на картофи за семе, преработка и консумация,

- за поне третата година на отглеждане, следваща годината на обозначеното заразяване, трябва да бъдат засадени само сертифицирани картофи за семе или картофи за семе под официален контрол от сертифицирани картофи за семе, за производство на картофи за семе или картофи за преработка и консумация,

- във всяка от годините на отглеждане, назовани в предните подточки, трябва да

се вземат мерки, за да се елиминират самосевки от картофени растения и други естествено намиращи се растения-гостоприемници на организма, ако такива съществуват, и във всяко поле ще се извършва официално тестване на реколтата от картофи според процедурите, подробно описани в приложение № 1.

В) Непосредствено след обявяване на заразата по чл. 5, ал. 1, т. 1 и през всяка от следващите години, включително първата година, разрешена за отглеждане на картофи на полето/полетата, обявени за заразени, цялата техника и складовите съоръжения на мястото на производство и включените в производството на картофи се почистват и дезинфекцират по т. III.

Г) В производствени системи, където е възможна цялостна подмяна на хранителната среда:

- не се засаждат клубени, растения или семена, без производствената единица да бъде подложена на действия за унищожаване на вредителя и за отстраняване на всякакъв гостоприемен материал, включващи най-малко цялостна подмяна на хранителната среда, почистване и дезинфекция на производствената единица и на всички съоръжения и без официално разрешение за производство на картофи от фитосанитарните органи, и

- картофите се произвеждат от сертифицирано семе за картофи, от миниклубени или от микрорастения, получени от изследвани източници.

2. В заразената зона независимо от мерките, описани в т. 1, държавите членки трябва:

А) незабавно след обозначаването на заразяването да гарантират, че всички машини и съоръжения за съхранение на тези места и включени в производството на картофи ще бъдат подходящо почистени и дезинфекцирани, използвайки правилните методи, както е описано в т. III.

Б) незабавно и минимум за поне три сезона на отглеждане след обозначаване на заразата:

- да гарантират надзор от техните официално отговорни органи на местата за отглеждане, съхранение или обработка на картофени клубени заедно с местата, в които се работи с машини по договор,

- да изискват засаждането само на сертифицирани семена или семена, отглеждани под официален контрол за всички картофени култури в рамките на тази зона, и тестване след прибирането на реколтата от картофи за семе, отглеждани в местата на производство, обозначени като вероятно заразени съгласно чл. 5, ал. 1,

- да изискват разделно обработване на прибраните запаси от картофи за семе от тези за преработка и консумация на всички места в зоната, или система за почистване и дезинфекция, които да бъдат извършвани между обработките на запасите от картофи за семе и тези за преработка и консумация,

- да провеждат официални наблюдения, както е описано в чл. 2, ал. 1.

В) да въведат програма, където е уместно, за смяна на всички запаси от картофи за семе на подходящ период от време.

Приложение № 5 към чл. 7, ал. 1

(Ново - ДВ, бр. 27 от 2007 г., в сила от 01.04.2007 г.)

Официално одобрените методи за унищожаване на отпадъците, посочени в приложение № 4 т. 1, трябва да отговарят на следните разпоредби, така че да се избегне всякакъв риск от разпространение на организма:

1. отпадък от картофи (включително изхвърлените картофи и обелки) и всякакви други твърди отпадъци, свързани с картофите (включително почва, камъни и други остатъци) трябва да бъдат изхвърляни чрез:

а) унищожаване на официално одобрено за целта място за унищожаване на отпадъци, на което няма риск от преминаване на организма в околната среда, например чрез просмукване към земеделска земя; отпадъците трябва да бъдат директно отвеждани към мястото в специални условия така, че да няма риск от загуба или разпиляване, или

б) инсинерация, или

в) други мерки, при условие че е било установено, че няма риск от разпространение на организма; тези мерки трябва да бъдат съобщени на Комисията и на страните членки;

2. течни отпадъци: преди унищожаването им течните отпадъци, съдържащи утаени твърди частици, трябва да бъдат подложени на филтрация или разделителен процес, за да се отстранят тези твърди частици; тези твърди частици трябва да бъдат унищожени така, както е заложено в т. 1.

Течните отпадъци трябва следователно да бъдат:

а) загрети до минимум 60°C през целия обем по време на поне 30 min преди унищожаването, или

б) унищожени по друг начин, подлежащ на официално одобрение и под официален контрол, така че да няма риск, че отпадъците могат да влязат в контакт със земеделска земя; подробностите за това трябва да бъдат съобщени на другите страни членки и на Комисията.

Възможностите, описани в това приложение, също се прилагат за отпадъците, свързани с боравенето, преработката и унищожаването на замърсените пратки.