

## KOMISIJOS DIREKTYVA 2006/63/EB

2006 m. liepos 14 d.

iš dalies keičianti Tarybos direktyvos 98/57/EB dėl *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* kontrolės II-VII priedus

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1998 m. liepos 20 d. Tarybos direktyvą 98/57/EC dėl *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* kontrolės <sup>(1)</sup>, ypač į jos 11 straipsnį,

kadangi:

- (1) Vienas iš svarbių bulvėms ir pomidorams kenksmingų organizmų yra *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, bulvių rudojo puvinio bei bulvių ir pomidorų bakterinio vytulio patogeninis organizmas (toliau - organizmas).
- (2) Šis organizmas vis dar pasitaiko kai kuriose Bendrijos vietose.
- (3) Direktyva 98/57/EB išsamiai nustatė, kokių priemonių valstybėse narėse reikia imtis prieš šį organizmą, kad būtų nustatyta jo buvimo vieta ir paplitimas; kad būtų apsisaugota nuo jo buvimo bei paplitimo ir, jeigu jis randamas, būtų apsisaugota nuo jo plitimo ir vykdoma jo kontrolė, siekiant jį sunaikinti.
- (4) Kadangi nuo tada buvo gauta svarbios mokslinės informacijos apie šio organizmo biologines ypatybes, nustatymo ir identifikavimo tvarką, be to, įgijus patirties, reikia persvarstyti keletą techninių nuostatų, susijusių su kontrolės priemonėmis.
- (5) Dėl šios pažangos būtina persvarstyti ir atnaujinti tam tikruose Direktyvos 98/57/EB prieduose nurodytas priemones.
- (6) Dėl nustatymo ir identifikavimo tvarkos pažymėtina, kad nustatymui ir identifikavimui yra taikomi neseniai sukurti metodai, tokie kaip fluorescencinė hibridizacija *in situ* (FISH) ir polimerazės grandininė reakcija (PGR), taip pat

patobulinti įvairūs techniniai elementai, ir yra pradėta taikyti organizmo aptikimo ir identifikavimo kituose augaluose šeimininkuose, išskyrus bulves, ir vandenyje bei dirvožemyje metodai.

- (7) Kai dėl kontrolės priemonių techninių elementų, tai pažymėtina, kad nuostatos buvo atnaujintos: dėl tiriamųjų bandinių išsaugojimo būdo, siekiant užtikrinti organizmo atsekamumą; dėl elementų, kurių reikia galimos taršos mastui nustatyti; dėl pranešimo duomenų apie bet kokį patvirtintą organizmo buvimą ir atitinkamą užterštą zoną; dėl priemonių, kurias reikia įgyvendinti produkcijos vietoje, laikomose užkrėstomis ir apibrėžtose zonose. Be to, buvo įtraukta keletas nuostatų dėl pomidorų, tam, kad daugiau dėmesio būtų skiriama šiam augalui kaip organizmo šeimininkui.
- (8) Šioje direktyvoje nustatytos priemonės atitinka Augalų sveikatos nuolatinio komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

1 straipsnis

Direktyvos 98/57/EB II-VII priedai pakeičiami šios direktyvos priedais.

2 straipsnis

1. Valstybės narės priima ir skelbia įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie, įsigalioję ne vėliau kaip iki 2007 kovo 31 d., įgyvendina šią direktyvą. Jos nedelsiant pateikia Komisijai tų teisės aktų tekstus ir tų teisės aktų nuostatų ir šios direktyvos koreliacijos lentelę.

Valstybės narės šias nuostatas taiko nuo 2007 m. balandžio 1 d.

Valstybės narės, priimdamos šias nuostatas, daro jose nuorodą į šią direktyvą arba tokia nuoroda daroma jas oficialiai skelbiant. Nuorodos darymo tvarką nustato valstybės narės.

<sup>(1)</sup> OL L 235, 1998 8 21, p. 1.

2. Valstybės narės nedelsdamos pateikia Komisijai šios direktyvos reglamentuojamoje srityje priimtų nacionalinės teisės aktų pagrindinių nuostatų tekstus.

*3 straipsnis*

Ši direktyva įsigalioja trečią dieną po jos paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

*4 straipsnis*

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 2006 m. liepos 14 d.

*Komisijos vardu*  
Markos KYPRIANOU  
*Komisijos narys*

## PRIEDAS

## „II PRIEDAS

## RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL. DIAGNOZAVIMO, APTIKIMO IR IDENTIFIKAVIMO PLANAS

## TYRIMŲ PLANO TAIKYMO SRITIS

Pateiktame plane apibūdinamos įvairios procedūros, atliekamos:

- i) diagnozuojant bulvių stiebagumbių rudąjį puvinį ir bulvių, pomidorų bei kitų augalų šeimininkų bakterinį vytulį;
- ii) aptinkant *Ralstonia solanacearum* bulvių stiebagumbių, bulvių, pomidorų ir kitų augalų šeimininkų bandiniuose, vandenyje ir dirvožemyje;
- iii) identifikuojant *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

## TURINYS

	Puslapis
	40
I SKIRSNIS.	40
1.	40
2.	43
3.	46
II SKIRSNIS.	48
1.	48
2.	48
3.	49
4.	49
III SKIRSNIS.	49
1.1.	51
1.2.	51
2.	51
2.1.	52
2.2.	53
IV SKIRSNIS.	55
2.	55
2.1.	55
2.2.	56
V SKIRSNIS.	58
2.	58
2.1.	58
2.2.	58



## BENDRIEJI PRINCIPAI

Įvairios optimizuotos metodikos, patvirtinti reagentai ir duomenys apie pasirošimą testui bei kontrolines medžiagas pateikiami priedėliuose. Laboratorių, dalyvavusių optimizuojant ir tvirtinant darbo taisykles, sąrašas pateikiamas 1 priedėlyje.

Kadangi metodikose numatytas karantino sąlygomis esančio organizmo aptikimas ir gyvybingos *R. solanacearum* kultūros bus naudojama kaip kontrolinė medžiaga, procedūras reikės atlikti karantino sąlygomis, naudojantis atitinkamais atliekų pašalinimo įrenginiais ir sąlygomis, kurias licencijavo oficialios augalų karantino institucijos.

Testavimo parametrai privalo užtikrinti nuolatinį ir atkartojamą *R. solanacearum* nustatymo lygmenį esant nustatytoms pasirinktų metodų nustatymo jautrumo slenkstinėms riboms.

Privaloma tiksliai paruošti teigiamas kontrolines medžiagas.

Atliekant testą, atsižvelgus į reikalaujamas metodo jautrumo slenkstines ribas taip pat padaroma prielaida, kad reikia pasirinkti teisingus nustatymus, atlikti įrangos kalibravimą ir techninę priežiūrą, rūpestingai tvarkyti ir saugoti reagentus ir imtis visų priemonių, kad būtų išvengta kryžminės taršos tarp bandinių, t. y. teigiamus kontrolinius bandinius atskiriant nuo tiriamųjų bandinių. Siekiant išvengti administracinių ir kitokių klaidų, ypač susijusių su ženkliniu etiketėmis ir dokumentų tvarkymu, privaloma taikyti kokybės kontrolės standartus.

Įtarus organizmo buvimą, kaip nurodyta Direktyvos 98/57/EB 4 straipsnio 2 dalyje, daroma prielaida, kad atliekant bandinio diagnostinį arba atrankos testą gaunamas teigiamas rezultatas, kaip nurodyta vaizduojamose diagramose. Jei pirmojo atrankos testo (IF arba PGR/FISH) rezultatas teigiamas, jį privaloma patikrinti atliekant antrąjį atrankos testą, pagrįstą kitokiu biologiniu principu.

Jei pirmojo atrankos testo rezultatas teigiamas, tai įtariamas užkrėtimas *R. solanacearum* ir privaloma atlikti antrąjį atrankos testą. Jei antrojo atrankos testo rezultatas teigiamas, tai įtariamas (įtariamas buvimas) patvirtinamas ir būtina toliau atlikti plane nurodytą bandymą. Jei antrojo atrankos testo rezultatas neigiamas, tada bandinys nėra laikomas užkrėstu *R. solanacearum*.

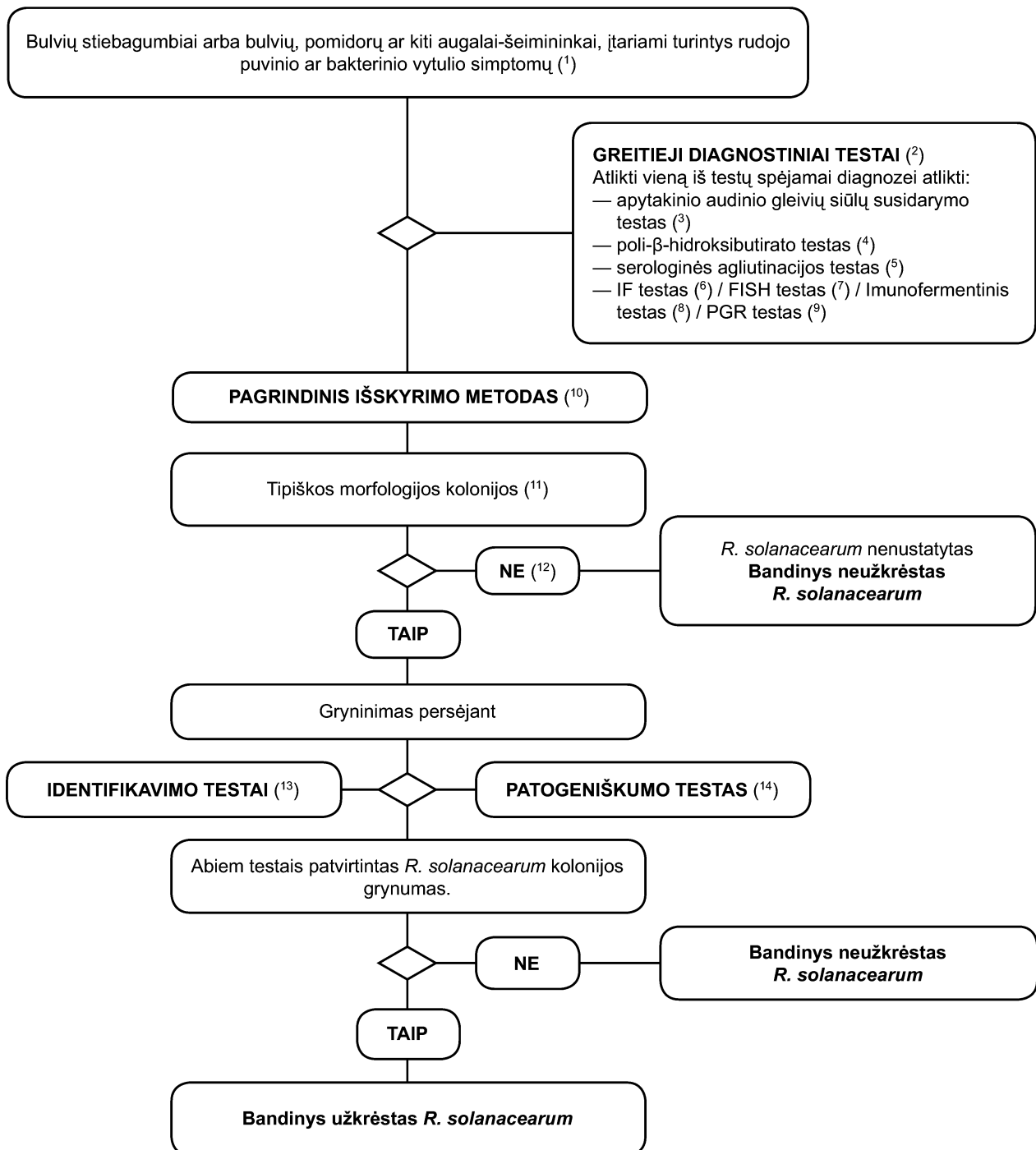
Jei yra patvirtintas buvimas, kaip nurodyta Direktyvos 98/57/EB 5 straipsnio 1 dalyje, daroma prielaida, kad buvo išskirta ir identifiukuota grynoji patogeninė *R. solanacearum* kultūra.

## I SKIRSNIS

## TYRIMŲ PLANO TAIKYMAS

- 1. Nustatymo, kuriuo siekiama diagnozuoti *R. solanacearum* sukeltą bulvių, pomidorų ir kitų augalų šeimininkų, turinčių rudojo puvinio ir bakterinio vytulio simptomų, rudąjį puvinį ir bakterinį vytulį, planas.**

Šis tyrimas yra taikomas tiriant bulvių stiebagumbius ir bulvinių šeimos augalus, turinčius arba įtariamus turint tipinių žiedinio puvinio simptomų. Jį sudaro greitos atrankos testas ir patogeno išskyrimas iš užkrėsto vaskuliarinio audinio, pasėjimas į (selektyvią) kultūrinę terpę ir, gavus teigiamą rezultatą, *Ralstonia solanacearum* kultūros identifikavimas.



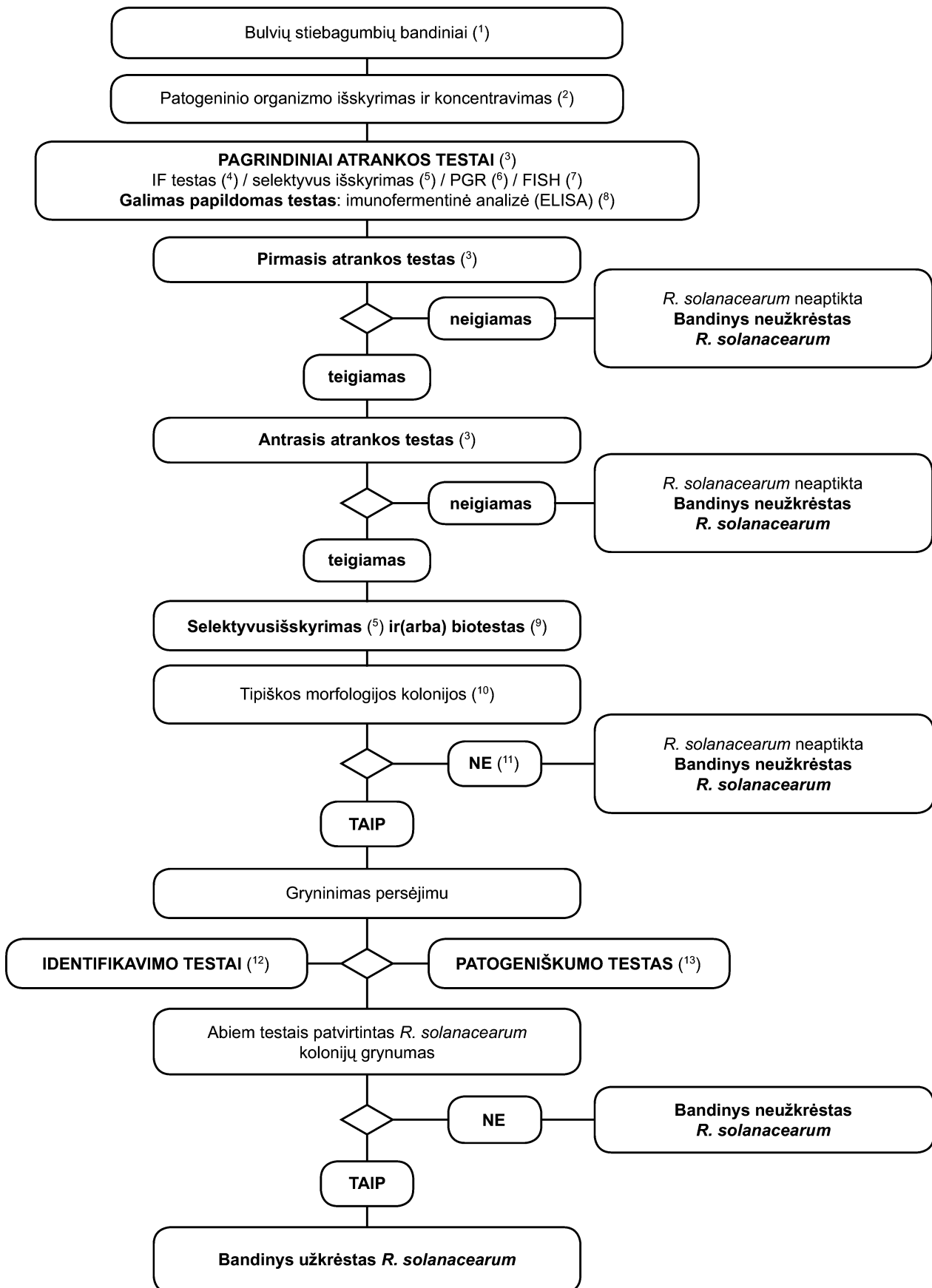
- (<sup>1</sup>) Simptomai aprašyti II skirsnio 1 dalyje
- (<sup>2</sup>) Greitieji diagnostiniai testai palengvina spėjimą diagnozę, tačiau nėra privalomi. Neigiamas rezultatas ne visada garantuoja nebuvimą.
- (<sup>3</sup>) Stiebo apytakinio audinio gleivių siūlų susidarymo testas aprašytas VI skirsnio A dalies 1 punkte.
- (<sup>4</sup>) Polibetahidroksibutirato granulių nustatymo bakterinėse ląstelėse testas aprašytas VI skirsnio A dalies 2 punkte.
- (<sup>5</sup>) Bakterinių gleivių arba simptominio audinio serologinės agliutinacijos testai aprašyti VI skirsnio A dalies 3 punkte.
- (<sup>6</sup>) Bakterinių gleivių vandeninės suspensijos arba simptominio audinio ekstraktų IF testas aprašytas VI skirsnio A dalies 5 punkte.
- (<sup>7</sup>) Bakterinių gleivių vandeninės suspensijos arba simptominio audinio ekstraktų FISH testas aprašytas VI skirsnio A dalies 7 punkte.
- (<sup>8</sup>) Bakterinių gleivių vandeninės suspensijos arba simptominio audinio ekstraktų imunofermentinės analizės testas (ELISA) aprašytas VI skirsnio A dalies 8 punkte.
- (<sup>9</sup>) Bakterinių gleivių vandeninės suspensijos arba simptominio audinio ekstraktų PGR aprašyta VI skirsnio A dalies 6 punkte.
- (<sup>10</sup>) Paprastai patogeninis organizmas išskiriamas iš simptomatinės augalinės medžiagos praskiedžiamuoju pasėjimu į terpę (II skirsnio 3 dalis).
- (<sup>11</sup>) Tipiška kolonijų morfologija aprašyta II skirsnio 3 dalies d punkte.
- (<sup>12</sup>) Paskesniuose užkrėtimo etapuose organizmo auginimas gali būti slopinamas dėl saprofitinių bakterijų konkurencijos arba peraugimo. Jei ligos simptomai tipiški, o išskyrimo testo rezultatai neigiami, tai išskyrimo testą reikia pakartoti, pirmiausia atliekant selektyvaus pasėjimo į terpę testą.
- (<sup>13</sup>) Galimų *R. solanacearum* izoliatų grynas kolonijas galima patikimai identifikuoti VI skirsnio B dalyje aprašytais testais. Kiekvienu nauju atveju rekomenduojama atlikti štamo apibūdinimą.
- (<sup>14</sup>) Patogeniškumo testas aprašytas VI skirsnio C dalyje.

**2. *Ralstonia solanacearum* aptikimo ir identifikavimo besimptominių bulvių stiebagumbių bandiniuose planas***Principas:*

Tyrimo procedūra skirta bulvių stiebagumbių latentinėms infekcijoms nustatyti. Išskiriant patogeninį organizmą, ypač tipišku kolonijų atveju, o vėliau patvirtinant jo kolonijų grynumą, kaip *R. solanacearum* atveju, privaloma papildomai atlikti du atrankos testus<sup>3</sup>, paremtus skirtingais biologijos principais, ir gauti teigiamą rezultatą. Tik vieno atrankos testo teigiamo rezultato nepakanka bandiniui įtarti.

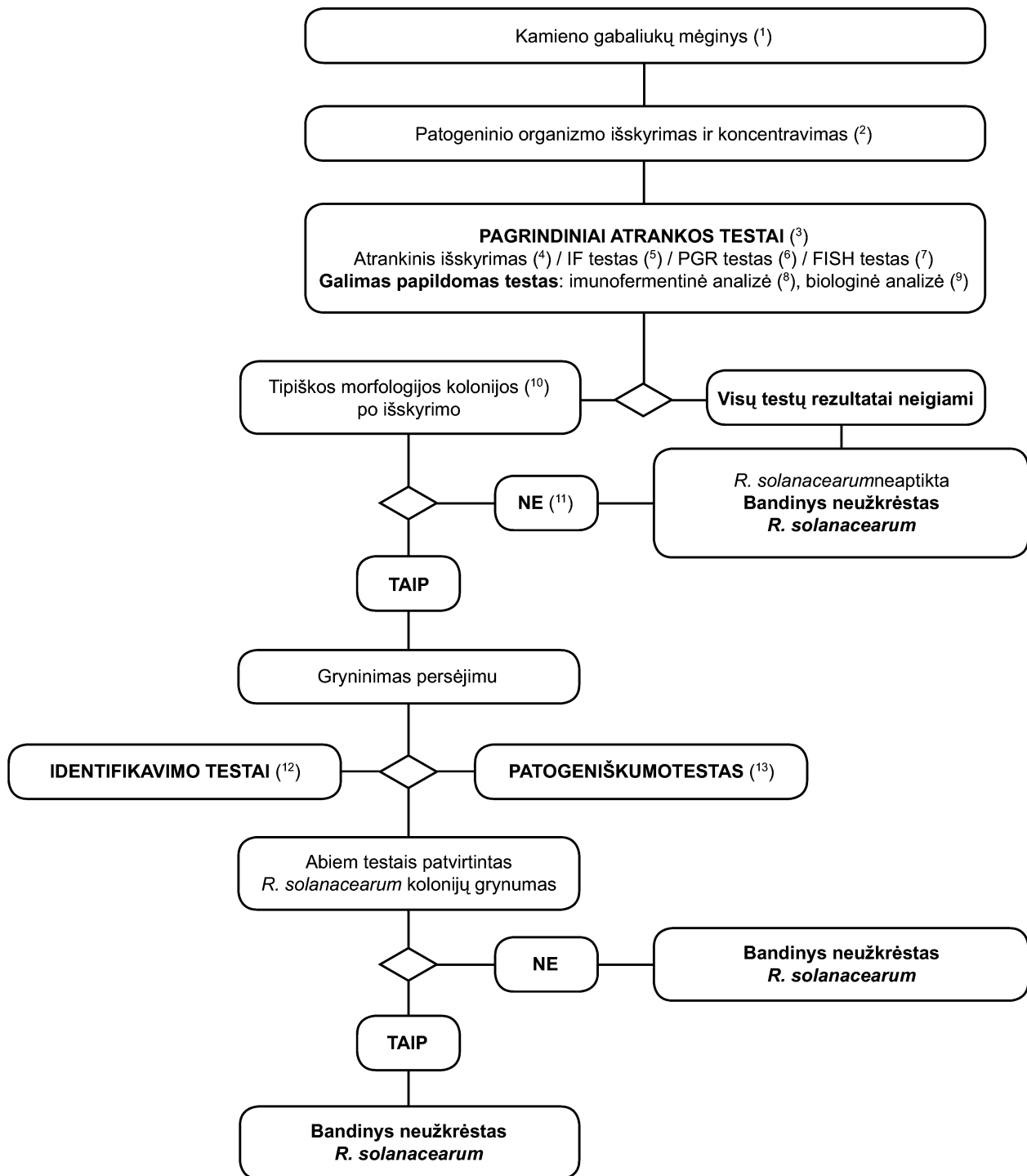
Atrankos testų ir išskyrimo testų nustatymo jautrumo slenkstinė riba turėtų siekti  $10^3$ - $10^4$  ląstelių/ml pakartotinai suspenduotose nuosėdose, naudojamose kaip teigiama kontrolė atliekant kiekvieną testų seriją.





- (<sup>1</sup>) Standartinį bandinį sudaro 200 stiebagumbių, tačiau galima naudoti mažesnius bandinius, jeigu negalima gauti 200 stiebagumbių.
- (<sup>2</sup>) Patogeno išskyrimo ir koncentravimo metodai aprašyti III skirsnio 1 punkto 1 papunktyje.
- (<sup>3</sup>) Jei mažiausiai dviejų testų, besiskiriančių pagal biologinius atlikimo principus, rezultatai teigiami, būtina atlikti išskyrimą ir patvirtinimą. Atliekamas bent vienas atrankos testas. Jei šio testo rezultatas neigimas, bandinys laikomas neigiamu. Jei šio testo rezultatas teigiamas, reikalaujama atlikti du ar daugiau atrankos testų, besiskiriančių pagal biologinius principus, pirmajam teigiamam rezultatui patvirtinti. Paskesnių testų nereikalaujama atlikti.
- (<sup>4</sup>) IF testas aprašytas VI skirsnio A dalies 5 punkte.
- (<sup>5</sup>) Selektivaus išskyrimo testas aprašytas VI skirsnio A dalies 4 punkte.
- (<sup>6</sup>) PGR testai aprašyti VI skirsnio A dalies 6 punkte.
- (<sup>7</sup>) FISH testas aprašytas VI skirsnio A dalies 7 punkte.
- (<sup>8</sup>) Imunofermentinės analizės (ELISA) testas aprašytas VI skirsnio A dalies 8 punkte.
- (<sup>9</sup>) Biotestas aprašytas VI skirsnio A dalies 9 punkte.
- (<sup>10</sup>) Tipiška kolonijų morfologija aprašyta II skirsnio 3 dalies d punkte.
- (<sup>11</sup>) Auginimo terpėje arba biotesto rezultatai gali nepavykti dėl saprofitinių bakterijų konkurencijos arba vykdomo slopinimo. Jei atrankos testų rezultatai teigiami, tačiau išskyrimo testų rezultatai neigiami, reikia pakartoti išskyrimo iš tų pačių nuosėdų testus arba, naudojant papildomą vaskuliarinį audinį, paimtą šalia to paties bandinio stiebagumbių viršūnės gabaliukų išpjovimo vietos, jei būtina iširti papildomus bandinius.
- (<sup>12</sup>) Siekiant patikimai identifikuoti galimas grynas *R. solanacearum* kolonijas, reikia atlikti VI skirsnio B dalyje aprašytus testus.
- (<sup>13</sup>) Patogeniškumo testas aprašytas VI skirsnio C dalyje.

3. *Ralstonia solanacearum* aptikimo ir identifikavimo bulvių, pomidorų ar kitų augalų šeimininkų besimptominiuose bandiniuose planas



- (<sup>1</sup>) Žr. III skirsnio 2 dalies 1 punktą dėl rekomenduotinių bandinio dydžių.
- (<sup>2</sup>) Patogeninio išskyrimo ir koncentravimo metodai aprašyti III skirsnio 2 dalies 1 punkte .
- (<sup>3</sup>) Jei mažiausiai dviejų testų, besiskiriančių pagal biologinius atlikimo principus, rezultatai teigiami, būtina atlikti išskyrimą ir patvirtinimą. Atliekamas bent vienas atrankos testas. Jei šio testo rezultatas neigimas, bandinys laikomas neigiamu. Jei šio testo rezultatas teigiamas, reikalaujama atlikti du ar daugiau atrankos testų, besiskiriančių pagal biologinius principus, pirmajam teigiamam rezultatui patvirtinti. Paskesnių testų nereikalaujama atlikti.
- (<sup>4</sup>) Selektyvus išskyrimas aprašytas VI skirsnio A dalies 4 punkte.
- (<sup>5</sup>) IF testas aprašytas VI skirsnio A dalies 5 punkte.
- (<sup>6</sup>) PGR testas aprašytas VI skirsnio A dalies 6 punkte.
- (<sup>7</sup>) FISH testas aprašytas VI skirsnio A dalies 7 punkte.
- (<sup>8</sup>) Imunofermentinė analizė (ELISA) aprašyta VI skirsnio A dalies 8 punkte .
- (<sup>9</sup>) Biotestas aprašytas VI skirsnio A dalies 9 punkte.
- (<sup>10</sup>) Tipiška kolonijų morfologija aprašyta II skirsnio 3 dalies d punkte.
- (<sup>11</sup>) Auginimo terpėje arba biotesto rezultatai gali nepavykti dėl saprofitinių bakterijų konkurencijos arba vykdomo slopinimo. Jei atrankos testų rezultatai teigiami, bet išskyrimo testai neigiami, išskyrimo testus reikia pakartoti.
- (<sup>12</sup>) Siekiant patikimai identifikuoti galimas grynas *R. solanacearum* kolonijas, reikia atlikti VI skirsnio B dalyje aprašytus testus.
- (<sup>13</sup>) Patogeniškumo testas aprašytas VI skirsnio C dalyje.

## II SKIRSNIS

**RALSTONIA SOLANACEARUM NUSTATYMO BULVIŲ STIEBAGUMBIUOSE IR BULVIŲ, POMIDORŲ IR KITUOSE AUGALUOSE ŠEIMININKUOSE, TURINČIUOSE RUDOJO PUVINIO ARBA BAKTERINIO VYTULIO POŽYMIŲ, IŠSAMŲ METODAI****1. Simptomai** (žr. svetainę <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)**1.1. Bulvių simptomai**

*Bulvės augalas.* Pirmoji užkrėtimo stadija – viršutinių augalo lapų vytimas esant aukštai dienos temperatūrai ir atsigavimas naktį. Ankstyvojo užkrėtimo metu vystantys lapai išlieka žali, tačiau vėliau pageltonuoja ir vystosi rudoji nekrozė. Gali pasitaikyti ir epinastijų. Tačiau labai greitai lapai negrįžtamai nuvysta ir augalas žūva. Skersai nupjautų nuvytusių augalų stiebų apytakinis audinys gali paruduoti, ir iš nupjauto paviršiaus išsiskiria arba gali būti lengvai išspaudžiamas į pieną panašios išskyros. Nupjautą stiebą vertikaliai panardinus į vandenį, iš apytakinių pluoštų nusidriekia gleivių siūlai.

*Bulvės stiebagumbis.* Bulvės stiebagumbis turi būti perpjaunamas skersai arti stolonų prisisegimo vietos. Ankstyvajai užkrėtimo stadijai būdingas apytakinio žiedo išblukimas, spalva keičiasi nuo blizgančios geltonos iki šviesiai rudos spalvos. Iš apytakinio žiedo po kelių minučių spontaniškai išsiveržia šviesiai kreminės spalvos išskyros. Vėliau apytakinis išblukimas paruduoja, ir nekrozė gali išsiplėsti iki parenchimos. Progresuojančios ligos stadijose užkrečiančios bakterijos išsiveržia iš stolonų prisisegimo vietų ir akučių, dėl to žievėje gali susidaryti truputį pažeistos duobelės, iš kurių gali sunktis bakterijos, prie kurių prilimpa dirvos dalelės. Dėl vidinių vaskuliarinių audinių suirimo odelėje gali atsirasti raudonai rudų pažeidimų, iš kurių išsiskiria šiek tiek išskyrų. Paskesnės ligos stadijoms būdingas grybų ir bakterijų sukeliama šlapiojo puvinio susidarymas.

**1.2. Pomidorų simptomai**

*Pomidoro augalas.* Pirmasis pastebimas požymis – tai labai silpni jauniausi augalo lapeliai. Palankiomis patogenui aplinkos sąlygomis (dirvos temperatūra apie 25 °C, dirva prisotinta drėgmės) po keleto dienų vyksta epinastija ir vienos augalo pusės arba viso augalo vytimas, ir galiausiai augalas žūva. Mažiau palankiomis sąlygomis (dirvos temperatūra mažesnė nei 21 °C) ant stiebo gali išsivystyti daug papildomų šaknų. Tuomet ant stiebo atsiranda pastebima gliuti juosta, kuri įrodo apytakinės sistemos nekrozę. Perpjovus stiebą, iš išblukusių rudų apytakinių stiebo audinių išsiskiria balti arba gelsvi bakterinio skysčio lašeliai.

**1.3. Kitų augalų šeimininkų simptomai**

*Solanum dulcamara ir S. nigrum augalai.* Natūraliomis sąlygomis vytimo simptomai retai stebimi šiuose piktžoliniuose augaluose šeimininkuose, nebent dirvos temperatūra viršija 25 °C arba inokuliavimo laipsnis yra pernelyg didelis (pvz., *S. nigrum* auga šalia sergančių bulvių ar pomidorų augalų). Vytulio atveju simptomai panašūs į pomidorų simptomus. Nevystančiuose *S. dulcamara* augaluose, kurių stiebai ir šaknys auga vandenyje, galima pastebėti neryškų išblukimą stiebo pagrindo arba povandeninių augalo dalių vaskuliariniuose audiniuose, atlikus skersinį pjūvį. Bakterijos gali sunktis iš prapjautų vaskuliarinių audinių arba sudaryti gleivėtus siūlus, jei prapjautas stiebas įkišamas į vandenį vertikaliai, netgi nesant vytulio simptomų.

**2. Greitieji atrankos testai**

Greitieji atrankos testai palengvina spėjamos diagnozės nustatymą, bet jie nėra būtini. Taikykite vieną ar kelis iš šių testų:

**2.1. Stiebo gleivių siūlų susidarymo testas**

(žr. VI skirsnio A dalies 1 punktą.)

**2.2. Poli-β-hidroksibutirato (PHB) granulių aptikimas**

Būdingos PHB granulės stebimos *R. solanacearum* ląstelėse, kai iš užkrėsto audinio gautų bakterinių išskyrų karščiu fiksuoti tepinėliai stebimi mikroskopu, prieš stebėjamą tepinėlį nudažius *Nile Blue A* arba *Sudan Black* dažu (žr. VI skirsnio A dalies 2 punktą).

### 2.3. Serologinės agliutinacijos testai

(žr. VI skirsnio A dalies 3 punktą)

### 2.4. Kiti testai

Kiti atitinkami greitieji atrankos testai yra šie: IF testas (žr. VI skirsnio A dalies 5 punktą), FISH (žr. VI skirsnio A dalies 7 punktą), imunofermentinė analizė (ELISA) (žr. VI skirsnio A dalies 8 punktą) ir PGR (žr. VI skirsnio A dalies 6 punktą).

## 3. Išskyrimo tvarka

- a) Pašalinti iš bulvių stiebagumbio apytakinio žiedo arba bulvių, pomidorų ar kitų vystančių augalų šeimininkų stiebo apytakinio audinio išskyras arba pašviesėjusį audinį. Suspenduoti nedideliame sterilus distiliuoto vandens kiekyje arba 50 mM fosfatinio buferinio tirpalo (4 priedėlis) ir palikti 5–10 minučių ant stalo.
- b) Paruošti keletą suspensijos dešimtainių tirpalų.
- c) Lašinti standartinį 50-100 µl suspensijos ir tirpalų kiekį į pagrindinę mitybinę terpę (NA, YPGA ir SPA, 2 priedėlis) ir (arba) ant Kelmano tetrazolio terpės (2 priedėlis) ir (arba) į selektyvią SMSA terpę (2 priedėlis). Paskleisti arba ruožuoti taikant tinkamą pasėjimo į terpę metodą. Jei reikia, paruošti atskiras lėkšteles kaip teigiamą kontrolę naudojant *Ralstonia solanacearum* 2 biotipo ląstelių atskiestą suspensiją.
- d) Lėkšteles inkubuoti 2–6 dienas 28 °C temperatūroje.
  - Pagrindinėje mitybinėje terpėje virulentiški *R. solanacearum* izoliatai sudaro gelsvai baltas, plokščias, netaisyklingas ir takias kolonijas, dažnai su būdingais menturiais centre. Nevirulentinės *R. solanacearum* formos sudaro mažas, apskritas, netakias, riebias kolonijas, kurios yra ryškiai baltos spalvos.
  - Kelmano tetrazolio arba SMSA terpėje menturiai yra ryškiai raudonos spalvos. Nevirulentinės *Ralstonia solanacearum* formos sudaro mažas, apskritas, netakias, riebias tamsiai raudonas kolonijas.

## 4. *R. solanacearum* identifikavimo testai

Spėjamų *R. solanacearum* izoliatų tapatybės patvirtinimo testai aprašyti VI skirsnio B dalyje.

## III SKIRSNIS

### 1. *Ralstonia solanacearum* aptikimo ir identifikavimo besimptominių bulvių stiebagumbių bandiniuose išsamūs metodai

#### 1.1. Bandinio paruošimas

##### Pastaba.

- Standartinis vienam testui skirtas bandinio dydis - 200 stiebagumbių. Intensyvesnės imties atveju reikia atlikti daugiau šio dydžio bandinio testų. Dėl didesnio stiebagumbių skaičiaus viename bandinyje neįmanoma arba sunku aiškinti rezultatus. Tačiau turint vos keletą stiebagumbių, šią procedūrą galima taikyti mažiau nei 200 stiebagumbių bandiniams.
- Visų toliau aprašytų aptikimo metodų patvirtinimas pagrįstas 200 stiebagumbių bandinių tyrimu.
- Toliau aprašytą bulvių ekstraktą taip pat galima naudoti aptinkant bulvių žiedinio puvinio sukėlėją - bakteriją *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Prieš bandinio paruošimą galima atlikti išankstinį apdorojimą:

- a) 2 savaites prieš tyrimą bandinius inkubuoti 25–30 °C temperatūroje, kad būtų paskatintas *R. solanacearum* kolonijų dauginimasis.
- b) Nuplauti stiebagumbius. Naudoti atitinkamus dezinfektantus (chloro junginius, kai PGR naudojama visiškai pašalinti patogeno DNR) ir detergentus, skirtus kiekvienam bandiniui. Stiebagumbiai išdžiovinami oru. Ši plovimo tvarka ypač naudinga (bet kurio naudoti nereikalaujama), kai naudojami bandiniai, turintys dirvožemio perteklių ir kai būtina atlikti PGR testą arba taikyti kitą tiesioginį DNR išskyrimo metodą.

- 1.1.1. Kiekvieno stiebagumbio viršūnės oda pašalinama švari ir dezinfekuotu skalpeliu arba daržovėms pjaustyti skirtu peiliu taip, kad vaskuliarinis audinys taptų matomas. Kruopščiai išpjaunama stiebagumbio viršūnės vaskuliarinio audinio šerdis, kad nevaskuliarinio audinio būtų kuo mažiau (žr. Komisijos svetainę <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

*Pastaba.* Atskirti bet kurį pūvantį stiebagumbį: stiebagumbius su įtariamais rudojo puvinio simptomais iširti atskirai.

Jei šalinant stiebagumbio viršūnę yra stebimi įtariamai rudojo puvinio simptomai, tai reikia apžiūrėti šio stiebagumbio dalį prie viršūnės. Bet kurį perpjautą stiebagumbį reikia mažiausiai dvi dienas laikyti kambario temperatūroje, kad šis sukamštėtų, ir paskiau stiebagumbį atitinkamomis karantino sąlygomis laikyti atšaldytą (4–10 °C temperatūroje). Visus stiebagumbius, įskaitant ir stiebagumbius su įtariamais simptomais, reikėtų laikyti, atsižvelgiant į III priedą.

- 1.1.2. Stiebagumbių viršūnių gabaliukai surenkami į nepanaudotas vienkartinės talpyklas, kurias galima uždaryti ir (arba) užplombuoti. Jau panaudotas talpyklas reikėtų kruopščiai išvalyti ir dezinfekuoti chloro junginiais. Pirmiausia stiebagumbių viršūnių gabaliukus reikėtų apdoroti nedelsiant. Jei tai padaryti neįmanoma, jie, nepridedant buferio, šaltai ne ilgiau kaip 72 valandas arba kambario temperatūroje ne ilgiau kaip 24 valandas yra saugomi talpykloje.

Stiebagumbio viršūnės gabaliukai apdorojami pagal vieną iš šių procedūrų:

- a) gabaliukai pamerkami į pakankamą (apie 40 ml) išskyrimo buferinio tirpalo tūrį (4 priedėlis) ir 4 valandas žemesnėje nei 24 °C temperatūroje kratomi rotorine kratykle (50–100 rpm), arba 16–24 valandas šaldytuve,

arba

- b) gabaliukai homogenizuojami pakankame (apie 40 ml) išskyrimo buferinio tirpalo tūryje (4 priedėlis) arba naudojant maišyklę (pvz., *Waring* arba *Ultra Thurax*), arba užplombuotame vienkartiniam mirkymo maišelyje (pvz., *Stomacher* ar *Bioreba* tvirto polietileno maišelyje, 150 mm x 250 mm; sterilizuotame apšvita) juos sutraiskant guma apkaltu mediniu plaktuku arba atitinkamu malimo prietaisu (pvz., *Homex*).

*Pastaba.* Bandinių kryžminės taršos rizika yra ypač didelė, kai bandiniai homogenizuojami naudojant maišyklę. Stengiantis išvengti aerozolio susidarymo arba nuotėkio išskyrimo metu yra imamasi atsargumo priemonių. Užtikrinama, kad kiekvienam bandiniui būtų naudojami atskiri kėtikai tik sterilizuoti maišyklės peiliai ir indai. Jei atliekamas PGR testas, stengiamasi išvengti dauginamosios medžiagos pernešimo per talpyklas ar malimo aparatą. Atliekant PGR testą malimą rekomenduojama atlikti vienkartinuose maišeliuose ir vienkartinuose vamzdeliuose.

- 1.1.3. Viršnuosėdinis skystis nupilamas. Jei jis pernelyg drumstas, skaidrinamas lėtai centrifuguojant (10 minučių ne didesniu kaip 180 g greičiu 4–10 °C temperatūroje) arba filtravimu vakuume (40–100 μm), perplaunant filtrą papildomu (10 ml) išskyrimo buferiniu tirpalu.

- 1.1.4. Bakterijos frakcija koncentruojama 15 minučių centrifuguojant 7 000 g greičiu (arba 10 minučių – 10 000 g greičiu) 4–10 °C temperatūroje, ir viršnuosėdinis skystis nupilamas nepažeidžiant nuosėdų.

- 1.1.5. Nuosėdos pakartotinai suspenduojamos 1,5 ml nuosėdoms skirtame buferiniame tirpale (4 priedėlis). Naudojama 500 μl *C. m. subsp. sepedonicus*, 500 μl *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ir 500 μl etaloninės kultūros tyrimui. Įpilama sterilus glicerino, kad etaloninės alikvotinės dalies ir tiriamosios alikvotinės dalies 500 μl galutinė koncentracija siektų 10–25 % (tūris/tūris), sumaišoma ir saugoma temperatūroje nuo -16 iki -24 °C (savaites) arba nuo -68 iki -86 °C (mėnesius). Tyrimo metu tiriamosios alikvotinės dalys saugomos 4–10 °C temperatūroje.

Kartotinis sušaldymas ir atitirpinimas nerekomenduotini.

Jei ekstraktą reikia vežti, jis šaldomoje dėžėje pristatomas per 24 valandas.

- 1.1.6. Siekiant išvengti užkrėtimo, visus *R. solanacearum* teigiamus kontrolinius bandinius ir tiriamuosius bandinius būtina laikyti atskirai. Šitai daroma paruošiant IF plokšteles ir atliekant visus testus.

## 1.2. Tyrimas

Žr. vaizduojamąją diagramą ir testų bei optimizuotų metodikų aprašymą, pateikiamą atitinkamuose prieduose:

*Selektyvus išskyrimas* (žr. VI skirsnio A dalies 4 punktą)

*IF testas* (žr. VI skirsnio A dalies 5 punktą)

*PGR* (žr. VI skirsnio A dalies 6 punktą)

*FISH* (žr. VI skirsnio A dalies 7 punktą)

*Imunofermentinė analizė(ELISA)* (žr. VI skirsnio A dalies 8 punktą)

*Biotestas* (žr. VI skirsnio A dalies 9 punktą)

2. **R. solanacearum aptikimo ir identifikavimo besimptominių bulvių, pomidorų ir kitų augalų šeiminių bandiniuose išsamūs metodai**

## 2.1. Bandinio paruošimas

*Pastaba.* Siekiant aptikti latentines *R. solanacearum* populiacijas, rekomenduojama tirti sudėtinius bandinius. Ši tvarka gali būti sėkmingai taikoma tiriant 200 stiebų dalių sudėtinius bandinius. Atliekant apžiūras, rekomenduojama naudoti statistiškai patikimą tiriamąjį augalo populiacijos bandinį.

## 2.1.1. Nuo kiekvieno stiebo antžeminės dalies švari dezinfekuotu peiliu arba genėjimui skirtu sekatoriumi atpjaunamas 1–2 cm segmentas:

*Jauni pomidorų daigai:* švari dezinfekuotu peiliu nuo kiekvieno stiebo pagrindo dalies, esančios šiek tiek aukščiau dirvos paviršiaus, atpjaunamas 1 cm segmentas.

*Lauke arba šiltnamyje auginami pomidorų augalai:* švari dezinfekuotu peiliu nuo pagrindinio kiekvieno augalo stiebo atpjaunama žemiausiai esanti šakelė. Nuo kiekvienoje pusėje esančios šakelės žemiausios dalies atpjaunamas 1 cm segmentas.

*Kiti augalai šeiminių:* švari dezinfekuotu peiliu arba sekatoriumi nuo kiekvieno stiebo pagrindo dalies, esančios šiek tiek aukščiau dirvos paviršiaus, atpjaunamas 1 cm segmentas. *S. dulcamara* ar kitų vandenyje auginamų augalų šeiminių atveju nuo povandeninių stiebo dalių ar stolonų, turinčių vandenyje esančias šaknis, atpjaunami 1–2 cm segmentai.

Kai imtis atliekama konkrečioje vietoje, rekomenduojama tirti statistiškai reprezentatyvių 10 augalų imtį, paimtą kiekvienoje galimų piktžolinių augalų šeiminių bandinių paėmimo vietoje. Patogeninio organizmo aptikimą patikimiausiai galima atlikti pavasario pabaigoje, vasarą ir rudenį, nors gamtoje vykstančius užkrėtumus išstisus metus galima nustatyti tarp daugiamečių *Solanum dulcamara* augalų, augančių vandentakiuose. Žinomiems augalams šeiminių priklauso savaime įsisėjantys augalai (dirvožemio tvarkytojai) *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* ir kiti bulvinių šeimos augalai. Kiti šeiminių yra *Pelargonium* spp. ir *Portulaca oleracea*. Prie kai kurių augalų šeiminių, augančių Europoje ir tam tikromis aplinkos sąlygomis savo šaknyse ir (arba) rizosferoje galinčių turėti 2 biovariantų 3 rasės *R. solanacearum* populiacijų, galima priskirti šiuos augalus: *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans.*, *Tussilago farfara* ir *Urtica dioica*.

*Pastaba.* Vidinių simptomų (vaskuliarinio audinio dažymasis arba bakterijų išskyros) vizualinį įvertinimą reikia atlikti šio tyrimo etape. Bet kurie simptomų turintys stiebo segmentai atskiriami vieni nuo kitų ir išanalizuojami (žr. II skirsnį).

## 2.1.2. Stiebo segmentai trumpai dezinfekuojami 70 % etilo alkoholiu ir nedelsiant išdžiovinami sugeriamuoju popieriumi. Po to stiebo segmentai apdorojami taikant vieną iš šių procedūrų:

- segmentai pamerkami į pakankamo tūrio (apytiksliai 40 ml) išskyrimo buferinį tirpalą (4 priedėlis) ir 4 valandas maišomi besisukančia kratykle (50–100 rpm greičiu) mažesnėje nei 24 °C temperatūroje arba 16–24 valandas šaldomi, arba
- apdorojami nedelsiant, guma apkaltu plaktuku arba atitinkamu malimo aparatu (pvz., *Homex*) segmentus sumalant tvirtame mirkymo maišelyje (pvz., *Stomacher* arba *Bioreba*), įpylus atitinkamą išskyrimo buferinio tirpalo kiekį (4 priedėlis). Jei šito padaryti neįmanoma, tai stiebo segmentai saugomi šalta ne ilgiau kaip 72 valandas arba kambario temperatūroje ne ilgiau kaip 24 valandas.

## 2.1.3. 15 minučių leidus susidaryti nuosėdoms, viršnuosėdinis skystis nupilamas.

## 2.1.4. Paprastai paskiau nereikalaujama skaidrinti ekstrakto arba koncentruoti bakterinės frakcijos, tačiau tai galima atlikti filtruojant ir (arba) centrifuguojant, kaip aprašyta III.1.1.3–1.1.5 skirsniuose.



2.1.5. Neskiestas arba koncentruotas bandinio ekstraktas padalijamas į dvi lygias dalis. Viena dalis tiriama ir saugoma 4–10 °C temperatūroje, o kita saugoma 10–25 % (tūris/tūris) steriliame glicerine temperatūroje nuo – 16 iki – 24 °C (savaites) arba nuo – 68 iki – 86 °C (mėnesį) tuo atveju, jeigu bus reikalingi tolesni bandymai.

## 2.2. Tyrimas

Žr. vaizduojamąją diagramą ir testų bei optimizuotų metodikų aprašymą, pateikiamą atitinkamuose prieduose:

*Selektyvus išskyrimas* (žr. VI skirsnio A dalies 4 punktą)

*IF testas* (žr. VI skirsnio A dalies 5 punktą)

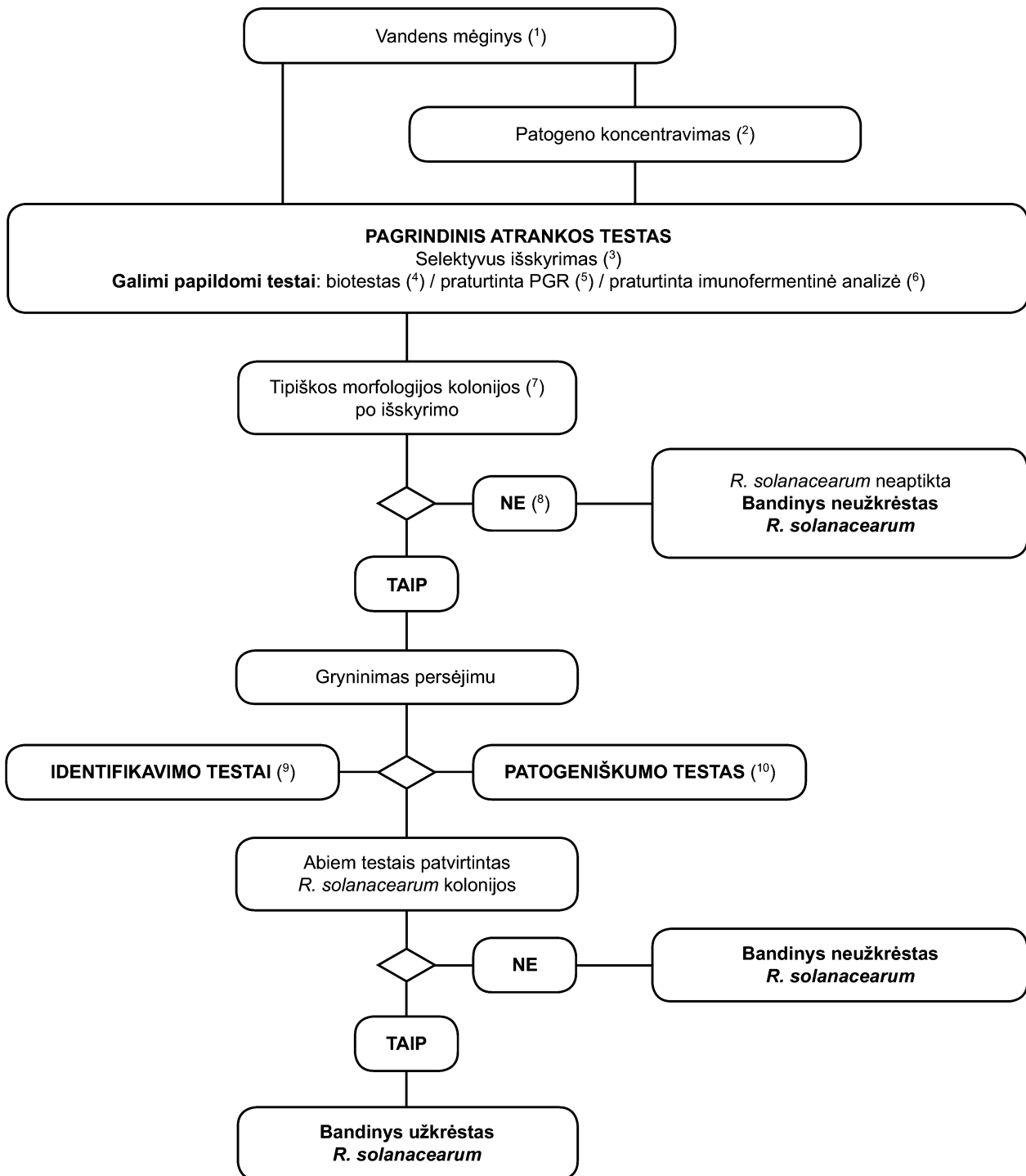
*PGR* (žr. VI skirsnio A dalies 6 punktą)

*FISH* (žr. VI skirsnio A dalies 7 punktą)

*Imunofermentinė analizė (ELISA)* (žr. VI skirsnio A dalies 8 punktą)

*Biotestas* (žr. VI skirsnio A dalies 9 punktą)

## IV SKIRSNIS

1. *R. solanacearum* aptikimo ir identifikavimo vandenyje planas

- (<sup>1</sup>) Žr. IV skirsnio 2 punkto 1 papunktį dėl rekomenduojamos bandinių ėmimo tvarkos.
- (<sup>2</sup>) Patogeninio organizmo koncentravimo metodai aprašyti IV skirsnio 2 punkto 1 papunktyje. Koncentravimas, kurio metu padidinamos tiek patogeninio organizmo ir konkuruojančių saprofitinių bakterijų populiacijos, rekomenduojamas, jei dėl to nepablogėja išskyrimo testo rezultatai.
- (<sup>3</sup>) Selektyvus išskyrimas aprašytas VI skirsnio A dalies 4 punkte.
- (<sup>4</sup>) Biotestas aprašytas VI skirsnio A dalies 9 punkte.
- (<sup>5</sup>) Praturtintos PGR metodai VI skirsnio A dalies 4 punkto 2 papunktyje ir VI skirsnio A dalies 6 punkte.
- (<sup>6</sup>) Praturtintos imunofermentinės analizės metodai VI skirsnio A dalies 4 punkto 2 papunktyje ir VI skirsnio A dalies 8 punkte.
- (<sup>7</sup>) Tipiška kolonijos morfologija aprašyta II skirsnio 3 dalies d punkte.
- (<sup>8</sup>) Auginimas gali nevykti dėl saprofitinių bakterijų keliamos konkurencijos ar slopinimo. Jei įtariama, kad didelis saprofitinių bakterijų skaičius gali sumažinti išskyrimo patikimumą, praskiedus bandinį steriliu vandeniu pakartojami išskyrimo testai.
- (<sup>9</sup>) Patikimas spėjimų grynų *R. solanacearum* kultūrų identifikavimas atliekamas taikant VI skirsnio B dalyje aprašytus metodus.
- (<sup>10</sup>) Patogeniškumo testas aprašytas VI skirsnio C dalyje.

## 2. *R. solanacearum* aptikimo ir identifikavimo vandenyje metodai

### Principas

Pagal šiame skirsnyje aprašytą aptikimo planą ligos sukėlėjas aptinkamas paviršiniame vandenyje ir taip pat bulvių perdirbimo atliekose arba nuotekų vandenyse. Tačiau reikia pabrėžti, kad aptikimo skirtingame substrate jautrumas kinta. Išskyrimo testo nustatymo jautrumui didelės įtakos turi konkuruojančios saprofitinės bakterijos, kurių skaičius bulvių perdirbimo atliekose ir nuotekų vandenyse yra gerokai didesnis nei paviršiniame vandenyje. Kadangi pagal paskesnę planą 1 litre paviršinio vandens tikimasi aptikti ne mažiau kaip  $10^3$  ląstelių, tai atrodo, kad organizmo aptikimo bulvių perdirbimo atliekose ar nuotekų vandenyse jautrumas bus gerokai mažesnis. Atsižvelgiant į tai, nuotekų vandens siūloma tirti baigus visas gryninimo operacijas (pvz., nusodinimą arba filtravimą), kurių metu sumažinamas saprofitinių bakterijų kolonijų skaičius. Aptikimo pagal šį tyrimo planą jautrumo apribojimus reikia apsvarstyti atlikus gautų neigiamų rezultatų patikimumo įvertinimą. Kadangi pagal šį tyrimo planą atlikti patogeninio organizmo buvimo ar nebuvimo paviršiniame vandenyje tyrimai buvo sėkmingi, reikia atsižvelgti į šio plano trūkumus, kai atliekamas patogeninio organizmo buvimo bulvių perdirbimo atliekose ir nuotekų vandenyse tyrimas.

### 2.1. Bandinio paruošimas

#### Pastaba.

- *R. solanacearum* aptikimą paviršiniame vandenyje geriausia atlikti pavasario pabaigoje, vasarą ir rudenį, kai vandens temperatūra viršija 15 °C.
- Dėl pakartotinio bandinių ėmimo skirtingu laiku pirmiau nurodytu laikotarpiu nustatytose imties vietose padidės aptikimo patikimumas, kartu sumažinant klimato kaitos sukeltą poveikį.
- Siekiant išvengti praskiedimų, užmaskuojančių patogeną, reikia atsižvelgti į liūčių laikotarpį ir vandentakio geografinę padėtį.
- Paimti paviršinio vandens, esančio netoli augalų šeimininkų, jei šie šeimininkai tebeegzistuoja, bandinius, jei šis vanduo yra netoliese augalų šeimininkų.

2.1.1. Pasirinktose imties vietose paimti vandens bandinius, pripildant vienkartinius mėgintuvėlius ar butelius vandens, paimto iš 30 cm gylio ir nedaugiau kaip 2 m nuo kranto. Jei bus tiriama perdirbimo atliekos arba nuotekų vandens, bandinius paimti nuotekų išmetimo vietoje. Rekomenduojama imties vietoje paimti iki 500 ml tūrio bandinius. Jei paimami mažesnio tūrio bandiniai, rekomenduojama paimti bandinius imties vietoje mažiausiai tris kartus, kiekvieno bandinio atlikti du poėmių pakartojimus, kurių kiekvieno tūris yra mažiausiai 30 ml. Atliekant intensyvesnį tyrimą, pasirinkti mažiausiai tris imties vietas 3 km ilgio vandentakyje ir užtikrinti, kad bandiniai taip pat bus paimami iš intakų, įtekančių į vandentakį.

2.1.2. Bandiniai vežami vėsiai (4–10 °C) tamsoje ir ištiriami per 24 valandas.

2.1.3. Jei reikia, bakterijų frakcija gali būti koncentruojama šiais metodais:

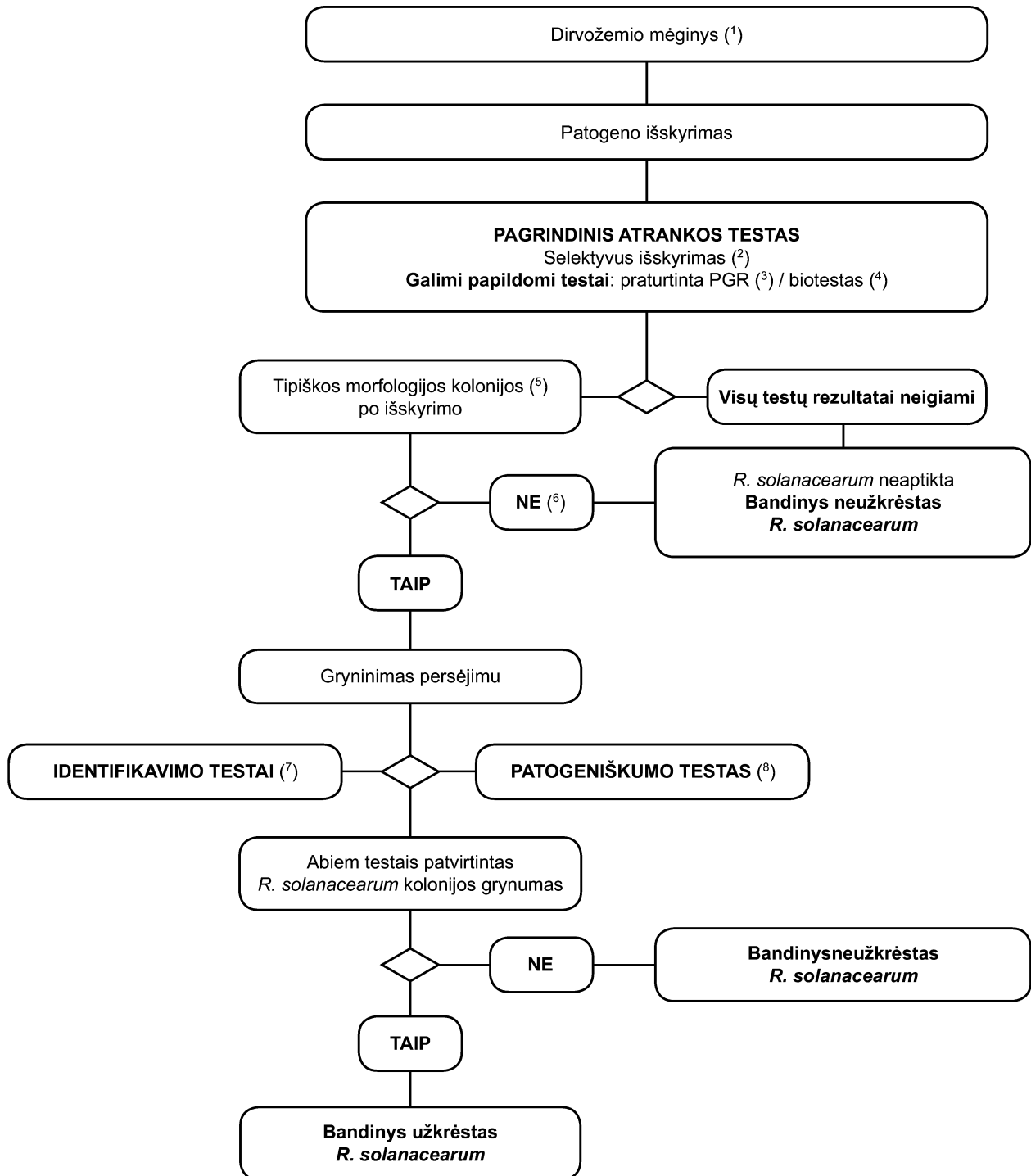
- a) 30–50 ml tūrio bandiniai centrifuguojami 10 000 g greičiu 10 minučių (arba 7 000 g greičiu 15 minučių) 4–10 °C temperatūroje, viršnuosėdinį skystį nupilant ir nuosėdas pakartotinai suspenduojant 1 ml nuosėdų buferiniame tirpale (4 priedėlis).
- b) Atliekamas filtravimas per membraną (mažiausiam skylių dydžiui esant 0,45 μm), paskiau atliekamas filtro perplovimas 5–10 ml nuosėdų buferiniu tirpalu ir nuoplovų išsaugojimas. Šis metodas tinkamas atlikti naudojant vandenį, kuriame yra nedaug saprofitinių bakterijų.

Tiriant bulvių perdirbimo arba nuotekų vandenų bandinius koncentravimas paprastai nerekomenduojamas, nes dėl padidėjusių saprofitinių bakterijų skaičiaus yra slopinamas *Ralstonia solanacearum* nustatymas.

### 2.2. Testavimas

Žr. vaizduojamąją diagramą ir testų aprašymą atitinkamuose priedėliuose.

## V SKIRSNIS

1. *R. solanacearum* aptikimo ir identifikavimo dirvožemyje planas

- (<sup>1</sup>) Žr. V skirsnio 2 punkto 1 papunktį dėl rekomenduojamos ėmimo tvarkos.
- (<sup>2</sup>) Selektyvus išskyrimas aprašytas VI skirsnio A dalies 4 punkte.
- (<sup>3</sup>) Praturtintos PGR metodai aprašyti VI skirsnio A dalies 4 punkto 2 papunktyje ir VI skirsnio A dalies 6 punkte.
- (<sup>4</sup>) Biotestas aprašytas VI skirsnio A dalies 9 punkte.
- (<sup>5</sup>) Tipiška kolonijų morfologija aprašyta II skirsnio 3 dalies d punkte.
- (<sup>6</sup>) Auginimas gali nevykti dėl saprofitinių bakterijų keliamos konkurencijos ar slopinimo. Jei įtariama, kad didelis saprofitinių bakterijų skaičius gali sumažinti išskyrimo patikimumą, praskiedus bandinį steriliu vandeniu yra pakartojami išskyrimo testai.
- (<sup>7</sup>) Patikimas spėjimų grynų *R. solanacearum* kultūrų identifikavimas atliekamas taikant VI skirsnio B dalyje aprašytus metodus.
- (<sup>8</sup>) Patogeniškumo testas aprašytas VI skirsnio C dalyje.

## 2. ***R. solanacearum* aptikimo ir identifikavimo dirvožemyje metodai**

### *Principai*

Pagal šiame skirsnyje aprašytą patvirtintą aptikimo planą dirvožemio bandiniuose yra aptinkamas ligos sukėlėjas ir taip pat tiriami bulvių perdirbimo atliekų ir nuotekų dumblo bandiniai. Tačiau reikia pažymėti, kad taikant šiuos metodus nustatymo jautrumas nėra pakankamas, kad būtų galima garantuoti nedidelio skaičiaus ir (arba) nevienodai išplitusių *Ralstonia solanacearum* populiacijų, randamų šiuose natūraliai užkrėstuose substratuose, aptikimą.

Aptikimo jautrumo apribojimus, susijusius su šiuo tyrimo planu, reikėtų apsvarstyti, kai yra vertinamas bet kokių gautų neigiamų rezultatų patikimumas ir taip pat kai yra atliekami patikrinimai, siekiant nustatyti patogeno buvimą arba nebuvimą dirvožemyje ir dumble. Patikimiausias patogeninio organizmo buvimo lauko dirvožemyje tyrimas yra jautraus užkrėtimui augalo šeimininko pasodinimas ir jo užkrėtimo stebėseną, tačiau ir šio metodo nustatymo jautrumas nėra pakankamas nedideliame užkrėtimo laipsniui nustatyti.

### 2.1. Bandinio paruošimas

2.1.1. Imant lauko dirvožemio bandinius, reikia laikytis nematodų imčiai taikomų standartinių principų. Kiekvienam bandiniui reikia surinkti 0,5–1 kg dirvožemio 60 imties vietų 0,3 ha ploto lauke 10–20 cm gylyje (arba iš 7 × 7 m žemės ploto). Įtarus patogeninio organizmo buvimą, bandinių imties vietų skaičių 0,3 ha plote reikia padidinti iki 120. Iki tyrimo bandiniai laikomi 12–15 °C temperatūroje. Bulvių perdirbimo atliekų ir nuotekų dumblo bandinių bendras svoris siekia 1 kg ir jie imami tiek imties vietų, kad būtų atitinkamas viso reikiamo ištirti dumblo tūris. Prieš tiriant kiekvienas bandinys sumaišomas.

2.1.2. 10–25 g dirvožemio arba dumblo poėmių dispergavimas 2 valandas atliekamas rotorine kratykle 250 rpm greičiu 60–150 ml išskyrimo buferiniame tirpale (4 priedėlis). Jei dispergavimą reikia pagreitinti, galima pripilti 0,02 % sterilaus Tween- 20 ir įberti 10–20 g sterilaus žvirždo.

2.1.3. Tyrimo metu suspensiją laikyti 4 °C temperatūroje.

### 2.2. Tyrimas

Žr. vaizduojamąją diagramą ir testų aprašymą atitinkamuose priedėliuose.

## VI SKIRSNIS

### **R. SOLANACEARUM APTIKIMO IR IDENTIFIKAVIMO OPTIMIZUOTOS METODIKOS**

#### A. *DIAGNOSTINIAI IR APTIKIMO TESTAI*

##### 1. **Stiebo gleivių siūlų susidarymo testas**

*Ralstonia solanacearum* bakterijos buvimą vystančiuose bulvių pomidorų ir kitų augalų šeimininkų stiebuose galima įvertinti atlikus šį paprastą spėjimą bandymą: nupjauti stiebą truputį virš dirvos paviršiaus. Įmerkti nupjautą stiebą į menzurą su vandeniu. Po kelių minučių stebėti būdingą spontaninį bakterijų gleivių siūlų tekėjimą iš apytakinių pluoštų.

##### 2. **Poli-β-hidroksibutirato granulių aptikimas**

1. Ant mikroskopo objektyvio stiklelio paruošti išskyry arba suspenduoto audinio tepinėlį, arba 48 valandas YPGA ar SPA terpėje augintos kultūros tepinėlį (2 priedėlis).
2. Paruošti 2 štamo *R. solanacearum* teigiamų kontrolinių bandinių tepinėlius ir, jei manoma, kad tai naudinga, paruošti heterologiško biovarianto neigiamo kontrolinio bandinio kontrolės tepinėlį.
3. Leisti išdžiūti ore ir keletą kartų greitai perleisti apatinį stiklelio paviršių per liepsną, kol tepinėlis užsifikuos.
4. Preparatą dažyti arba *Nile Blue* arba *Sudan Black* dažu ir stebėti mikroskopu, kaip aprašyta toliau:

*Nile Blue* dažo testas:

- a) Fiksuotą tepinėlį pamerkti į 1 % vandeninį *Nile Blue* A tirpalą. 10 minučių laikyti 55 °C temperatūroje.
- b) Nupilti dažantį tirpalą. Nuplauti, trumpai palaikant po silpna vandens srovele ir filtriniu popieriumi pašalinti vandens perteklių.
- c) Užpilti tepinėlį 8 % acto rūgštimi ir 1 minutę laikyti kambario temperatūroje.
- d) Nuplauti silpna vandens srovele ir nusausinti tepinėlį sugeriamuoju popieriumi.
- e) Pakartotinai sudrėkinti lašu vandens ir uždengti dengiamuoju stikleliu.
- f) Nudažytą tepinėlį stebėti epifluorescenciniu mikroskopu, šviesos bangos ilgiui siekiant 450 nm po aliejine imersija, padidinus 600–1 000 kartų ir naudojant imersinį aliejaus ar vandens objektyvą.
- g) Stebėti ryškiai oranžinį polibetahidroksibutirato granulių švytėjimą. Taip pat stebėti įprastinėje šviesoje, kad būtų išitikinta, jog nuosėdos yra ląstelės viduje ir ląstelių morfologija yra būdinga *R. solanacearum*.

*Sudan Black* dažo testas:

- a) Kiekvieną fiksuotą tepinėlį pamerkti į 0,3 % *Sudan Black* B tirpalą 70 % etanolyje ir 10 minučių palaikyti kambario temperatūroje.
- b) Nupilti dažantį tirpalą, trumpai palaikyti po vandeniu iš čiaupo ir filtriniu popieriumi pašalinti vandens perteklių.
- c) Tepinėlį trumpam panardinti į ksilolą ir nusausinti filtravimo popieriumi. *Atsargiai! Ksilolas yra kenksmingas sveikatai. Imtis visų atsargumo priemonių ir dirbti traukos spintoje.*
- d) Užpilti tepinėlį 0,5 % (g/ml) vandeniniu safranino tirpalu ir 10 minučių palikti kambario temperatūroje. *Atsargiai! Safraninas yra kenksmingas sveikatai. Imtis visų atsargumo priemonių ir dirbti traukos spintoje.*
- e) Nuplauti silpna vandens srovele. Nusausinti tepinėlį filtravimo popieriumi ir uždengti dengiamuoju stikleliu.
- f) Šviesos mikroskopu stebėti nudažytą tepinėlį, naudojant išsklaidytą šviesą, imersinį aliejų ir 1 000 kartų didinantį imersinį aliejaus objektyvą.
- g) Stebėti polibetahidroksibutirato granulių *Ralstonia solanacearum* bakterijos ląstelėje dažymąsi mėlynai juoda spalva. Ląstelės sienelė nusidažo rausva spalva.

### 3. Serologinės agliutinacijos testai

*R. solanacearum* ląstelių bakterinėse išskyrose arba simptominių audinių ekstraktuose serologinė agliutinacija geriausiai stebima naudojant patvirtintus antikūnus (žr. 3 priedėlį), žymėtus atitinkamomis spalvinėmis žymėmis, tokio-  
mis kaip raudonos *Staphylococcus aureus* ląstelės arba dažyto latekso dalelės. Jei naudojamosi nusipirktu rinkiniu (žr. 3 priedėlį), vadovaujamosi gamintojo instrukcijomis. Kitais atvejais operacija atliekama šia tvarka:

- a) Žymėtų antikūnų suspensijos ir bakterinių išskyrų lašai (kiekvieno apytiksliai po 5 µl) sumaišomi mikrotitravimo plokštelių duobutėse.
- b) Naudojant *R. solanacearum* 2 biovareto ir heterologinio štamo suspensijas, paruošiami teigiami ir neigiami kontroliniai bandiniai.
- c) Agliutinacija teigiamuose bandiniuose stebima po 15 sekundžių trukmės švelnaus maišymo.



#### 4. Selektyvus pasėjimas

##### 4.1. Selektyvus pasėjimas

*Pastaba.* Prieš pradėdant taikyti šį metodą pirmą kartą, atliekami išankstiniai testai, užtikrinant atkartojamą  $10^3$ - $10^4$  *R. solanacearum* kolonijas sudarančių vienetų, pridėtų prie bandinių, kurie pirmiau buvo įvertinti kaip neigiami, nustatymą viename mililitre.

Naudojamasi atitinkama patvirtinta selektyvią terpe, tokia kaip SMSA (kaip modifikuota Elphinstone *et al.*, 1996; žr. 2 priedėlį).

Reikia rūpestingai atlikti *R. solanacearum* atskyrimą nuo kitų bakterijų, nes terpėje gali augti ir kitų rūšių bakterijos. Be to gali išaugti netipiškos morfologijos *R. solanacearum* kolonijos dėl peraugimo ar bakterijų antagonizmo. Įtarus konkurencijos ar antagonizmo atvejus, bandinys pakartotinai tiriamas kitu metodu.

Didžiausio nustatymo jautrumo galima tikėtis, kai naudojamas šviežiai paruoštas bandinio ekstraktas ir laikomasi optimalių augimo sąlygų. Tačiau šį metodą galima sėkmingai taikyti, tiriant ekstraktus, laikytus glicerine temperatūroje nuo – 68 iki – 86 °C.

Kaip teigiamą kontrolinį bandinį paruošti *R. solanacearum* virulentiško biovarianto 2 štamo (pvz., NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857)  $10^6$  kolonijų sudarančių vienetų viename mililitre suspensijos praskiedimus santykiu 1:10. Siekiant išvengti taršos, paruošiami teigiami kontroliniai bandiniai atskirai nuo tiriamųjų bandinių.

Kiekvienos selektyvios terpės partija patikrinama pagal patogeno sugebėjimą augti joje prieš pradėdant įprastinių bandinių tyrimą.

Kontrolinė medžiaga tiriama taip pat, kaip ir bandinys.

4.1.1. Atlikti atitinkamą pasėjimo praskiedžiant operaciją, siekiant užtikrinti bet kokių pašalinių saprofitinių bakterijų populiacijų praskiedimą. Į kiekvieną lėkštelę pasėti po 50–100  $\mu$ l kiekvieno praskiedimo bandinio.

4.1.2. Lėkštelės inkubuojamos 28 °C temperatūroje. Plokštelės analizuojamos po 48 valandų ir po to kasdieną 6 dienas. Tipiškos *R. solanacearum* kolonijos SMSA terpėje būna pieno baltumo, lygios, netaisyklingos formos bei tokios ir po 3 inkubacijos dienų kolonijų centre atsiranda nuo rausvos iki kraujo spalvos centrinis vidinis ruožuotumas arba menturiai. (žr. svetainę [http://forum.europa.eu.int/MembersPublic/irc/sanco/sanco\\_europhyt/libraryHome/main](http://forum.europa.eu.int/MembersPublic/irc/sanco/sanco_europhyt/libraryHome/main)).

*Pastaba.* Kartais šioje terpėje išauga netipiškos *R. solanacearum* kolonijos. Jos gali būti mažos, apvalios, visiškai raudonos ir netaisos arba iš dalies tokios, todėl jas būna sunku atskirti nuo saprofitinių kolonijas sudarančių bakterijų.

4.1.3. *R. solanacearum* spėjamos kolonijos išgryninamos po pasėjimo į pagrindinę mitybinę terpę brėžimo arba praskiedimo būdu atskiroms kolonijoms gauti (žr. 2 priedėlį).

4.1.4. Kolonijos trumpai laikomos tamsoje steriliame kambario temperatūros vandenyje (pH 6–8, neturinčiame chloro) arba ilgą laiką – kriogeninėje apsauginėje terpėje esant temperatūrai nuo – 68 iki – 86 °C arba liofilizuojamos.

4.1.5. Spėjamos kultūros identifikuojamos (žr. VI skirsnio B dalį) ir atliekamas patogeniškumo testas (žr. VI skirsnio C dalį).

##### *Selektyvaus pasėjimo rezultatų aiškinimas*

Selektyvaus pasėjimo testo rezultatai laikomi neigiamais, jei po 6 dienų auginimo bakterijų kultūros nestebimos arba tipiškos *R. solanacearum* kolonijų nėra, laikantis nuostatos, kad slopinimas nevyko dėl kitų bakterijų konkurencijos ar antagonizmo ir kad tipiškos *R. solanacearum* kolonijos aptinkamos tik teigiamuose bandiniuose.

Selektyvaus pasėjimo testas teigiamas, jei išskiriamos spėjamos *R. solanacearum* kolonijos.

##### 4.2. Terpės praturtinimo procedūra

*Naudoti tokią patvirtintą terpę, kaip modifikuotas Wilbrink buljonas (žr. 2 priedėlį).*

Ši procedūra gali būti taikoma *R. solanacearum* populiacijų bandinyje atrankai pagerinti ir aptikimo jautrumui padidinti. Šios procedūros metu PGR reakcijos inhibitoriai tinkamai praskiedžiami (1:100). Tačiau reikėtų pažymėti, kad *R. solanacearum* praturtinimas gali nepasisekti dėl saprofitinių bakterijų, praturtinamų tuo pačiu metu, konkurencijos ar antagonizmo. Dėl šios priežasties *R. solanacearum* išskyrimas iš praturtintų buljono terpėje auginamų kultūrų gali būti problemiškas. Be to, kadangi serologiškai giminingų saprofitų populiacijos gali padidėti, rekomenduojama imunofermentinei analizei atlikti vietoj specifinių monokloninių antikūnų naudoti polikloninius antikūnus.

- 4.2.1. Praturtinant PGR, 100 µl bandinio ekstrakto įpilama į 10 ml praturtinamojo sultinio (2 priedėlis), prieš tai išpilstyto alikvotinėmis dalimis į mėgintuvėlius ar kolbutes, į kurias nepripilta DNR. Praturtinant imunofermentinę analizę, į praturtinamąjį sultinį galima įpilti didesnio tūrio tiriamųjų bandinių (pvz., 100 µl į 1,0 ml praturtinamojo sultinio).
- 4.2.2. Kultūros 72 valandas inkubuojamos 27-30 °C ant kratyklės arba nekratant kolbose, neužkimštose aklinau tam, kad šios vėdintųsi.
- 4.2.3. Prieš atliekant imunofermentinę analizę ar PGR gerai sumaišyti.
- 4.2.4. Atliekant abu testus, praturtinamasis sultinys paveikiamas lygiai taip pat, kaip ir tiriamasis bandinys.

*Pastaba.* Jei *R. solanacearum* praturtinimas slopinamas dėl didelio konkuruojančių saprofitinių bakterijų populiacijų skaičiaus, bandinių ekstraktų praturtinimą geriau atlikti prieš centrifugavimo ar koncentravimo kitu būdu operaciją.

## 5. Imunofluorescencinės analizės (IF) Testas

### Principas

Imunofluorescencinės analizės testas kaip pagrindinis atrankos testas rekomenduojamas taikyti dėl to, kad jį atliekant yra pasiekiamos reikalaujamos slenkstinės vertės.

Kai IF testas atliekamas kaip pagrindinis atrankos testas ir IF rezultatai teigiami, PGR ir FISH testą reikia atlikti kaip antrąjį atrankos testą. Kai IF testas atliekamas kaip antrasis atrankos testas ir IF rezultatai teigiami, reikia atlikti paskesnę testavimą pagal vaizduojamą diagramą tam, kad analizė būtų baigta.

*Pastaba.* Naudojami patvirtinti antikūnai, specifiški *R. solanacearum* (žr. svetainę <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Rekomenduojama nustatyti kiekvieno naujos antikūnų partijos titrą. Titrus apibrėžiamas kaip didžiausias praskiedimas, kuriam esant vyksta reakcija, tiriant homologinio *R. solanacearum* štamo  $10^5$ - $10^6$  ląstelių/ml ląstelių suspensiją ir naudojant atitinkamą gamintojo rekomenduojamą fluoresceino izotiocianato (FITC) konjugatą. Neišgrynintų polikloninių arba monokloninių antikūnų titras turėtų būti ne mažesnis kaip 1:2 000. Tyrimo metu antikūnus reikėtų praskiesti iki darbinio praskiedimo (DP), artimo ar lygaus jų titrui.

Reikėtų tirti tik šviežiai pagamintus ekstraktus. Jei būtina, galima tirti glicerine temperatūroje nuo – 68 iki – 86 °C laikomus ekstraktus. Gliceriną iš bandinio galima pašalinti, įpylus 1 ml nuosėdų buferinio tirpalo (4 priedėlis), pakartotinai 15 minučių centrifuguoti 7 000 g greičiu ir pakartotinai suspenduoti, pripylus nuosėdų buferinio tirpalo lygų tūrį. Dažnai šitai atlikti nebūtina, ypač jei bandiniai fiksuojami ant plokštelės liepsna.

Paruošti atskiras teigiamas kontrolines plokšteles, į kurių duobutes bus pripilta homologinio arba bet kurio nors etaloninio *C. m. subsp. sepedonicus* štamo, suspenduoto bulvių ekstrakto, kaip nurodyta 3 priedėlio B dalyje, ir pirmiausia buferiniame tirpale.

Jei įmanoma, į tos pačios plokštelės duobutes turėtų būti pripilama natūraliai užkrėsto audinio preparato (palaikomo liofilizacijos arba šaldymo nuo – 16 iki – 24 °C temperatūroje būdu) kaip panašaus kontrolinio bandinio.

Anksčiau nustatytų kaip neigiamų bandinių ekstraktų alikvotinės dalys galėtų būti naudojamos kaip neigiamos kontrolės.

Prieinamos standartizuotos teigiamos ir neigiamos kontrolinės medžiagos išvardytos 3 priedėlyje.

Naudoti daug duobučių turinčias mikroskopines plokšteles, mažiausiai 6 mm storio ir geriausia turinčias 10 langelių.

Kontrolinis bandinys tiriamas taip pat, kaip ir tiriamasis bandinys.

### 5.1. Tyrimui skirtos plokštelės paruošiamos taikant vieną iš šių procedūrų:

- i) Nuosėdos, turinčios palyginti nedaug krakmolo:

Standartinis tūris (15 µl tinka dirbti, kai naudojamos 6 mm storio plokštelės, o jei langeliai didesni, tūris padidinamas) 1:100 praskiestų pakartotinai suspenduotų bulvių nuosėdų lašinamas į pirmąjį langelį. Paskiau nepraskiestų (1/1) pakartotinai suspenduotų nuosėdų panašus tūris lašinamas į vienos tos pačios eilės langelius. Antroje eilutėje pakartojamas pirmasis bandinys arba lašinamas antrasis bandinys, kaip parodyta 1 pav.

ii) Esant kitoms nuosėdoms:

Pakartotinai suspenduotos nuosėdos praskiedžiamos santykiu 1:10 ir 1:100 nuosėdų buferiniame tirpale. Standartinis pakartotinai suspenduotų nuosėdų tūris (15  $\mu$ l tinka dirbti, kai naudojamos 6 mm storio plokštelės, o jei langeliai didesni, tūris padidinamas) lašinamas į langelį ir vienoje langelių eilutėje atliekamas praskiedimas. Antroje eilutėje pakartojamas pirmasis bandinys arba lašinamas antrasis bandinys, kaip parodyta 2 pav.

5.2. Lašeliai išdžiovinami kambario temperatūroje arba kaitinami 40-45 °C temperatūroje. Bakterinės ląstelės fiksuojamas prie plokštelės arba kaitinant (15 minučių 60 °C temperatūroje), arba liepsna, 95 % etilo alkoholiu arba bet kuria kita antikūnų tiekėjų nurodyta tvarka.

Jei būtina, fiksuotos plokštelės paskiau iki tyrimo gali būti kiek galima trumpiau (ilgiausiai 3 mėnesius) saugomos šalta sausoje dėžėje.

### 5.3. IF tvarka



i) Plokštelė, paruošta kaip nurodyta 5.1 skirsnio i punkte:

Paruošiamas antikūnų, dukart praskiestų IF buferiniu tirpalu, rinkinys. Į pirmąją duobutę įpilama 1/2 titro (T/2), į kitas - 1/4 titro (T/4), 1/2 titro, (T/2), 1 titras (T) ir dukart titro antikūnų (2T).


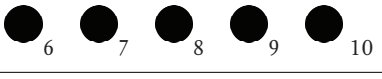
ii) Plokštelė, paruošta kaip nurodyta 5.1 skirsnio ii punkte:

Atliekamas antikūnų darbinis praskiedimas (DP) IF buferiniame tirpale. Praskiedimas turi įtakos antikūnų specifiškumui.

1 pav. Tiriamosios plokštelės paruošimas pagal 5.1 skirsnio i punktą ir 5.3 skirsnio i punktą

		<b>Pakartotinai suspenduotų nuosėdų praskiedimai</b>					
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/> Pakartotinai suspenduotų nuosėdų praskiedimas
(T = titras)		T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/> Antiserumų/antikūnų praskiedimas dukart
1 bandinys							
1 bandinio arba 2 bandinio pakartojimas							

2 pav. Tiriamosios plokštelės paruošimas pagal 5.1 skirsnio ii punktą ir 5.3 skirsnio ii punktą

		<b>Antiserumo/antikūnų darbinis praskiedimas</b>					
		1/1	1/10	1/100	tuščia	tuščia	<input type="checkbox"/> Pakartotinai suspenduotų nuosėdų praskiedimas dešimt kartų
1 bandinys							
1 bandinio 2 bandinio pakartojimai							

- 5.3.1. Plokštelės išdėliojamos ant sudrėkinto sugeriamojo popieriaus. Kiekvienas testuojamasis langelis sklidinai pripildomas praskiestų antikūnų tirpalo. Į kiekvieną langelį įpilamo antikūnų tirpalo tūris turi atitikti bent tiriamojo ekstrakto tūrį.

Antikūnų tiekėjams nepateikus vartojimo instrukcijų, laikomasi šios tvarkos:

- 5.3.2. Plokštelės 30 minučių laikomos uždengtos ant drėgno popieriaus kambario temperatūroje (18–25 °C).
- 5.3.3. Kiekvienoje duobutėje lašeliai sukrotami ir kruopščiai sudrėkinami, įpilant IF buferinio tirpalo. Perplaunama įpilant IF buferinio tirpalo, turinčio Tween (4 priedėlis), ir palaikoma 5 minutes, o po to įpilama IF buferinio tirpalo ir laikoma dar 5 minutes. Vengti aerozolio susidarymo arba lašelių pernešimo, dėl kurio gali įvykti kryžminė tarša. Perteklinis vanduo atsargiai pašalinamas nusausinant.
- 5.3.4. Plokštelės išdėliojamos ant drėgno popieriaus ir į duobutes įpilama praskiesto FITC bei antikūnų konjugato titrui nustatyti. Į duobutes įpilamo konjugato tūris turi atitikti įpilamų antikūnų tirpalo tūrį.
- 5.3.5. Plokštelės 30 minučių laikomos uždengtos ant drėgno popieriaus kambario temperatūroje (18–25 °C).
- 5.3.6. Konjugato lašeliai pašalinami iš plokštelės juos nukratant. Plokštelė sudrėkinama ir plaunama, kaip pirmiau aprašyta (5.3.3).

Atsargiai pašalinamas perteklinis vanduo.

- 5.3.7. Į kiekvieną tiriamąjį langelį pipete įlašinama po 5–10 µl 0,1 M glicerino fosfatinio buferinio tirpalo arba komercinio priešblukinančiu aktyvumu pasižyminčio ryškintojo tirpalo (4 priedėlis) ir plokštelė uždengiama dengiamuoju stikleliu.

#### 5.4. IF testo rezultatai:

- 5.4.1. Tiriamąsias plokšteles stebėti epifluorescenciniu mikroskopu naudojant filtrus, tinkamus FITC sužadimui, aliejaus ar vandens imersinius tirpalus bei 500–1 000 kartų padidinus. Langeliai stebimi per dvigubą skersmenį dešiniuose kampuose ir aplink perimetrą. Bandinių, neturinčių arba turinčių nedaug ląstelių, stebima mažiausiai 40 laukelių.

Pirmiausia stebima teigiama kontrolinė plokštelė. Ląstelės turi šviesiai fluorescuoti ir būti visiškai nusidažiusios esant nustatytam antikūnų titrui ar darbiniam praskiedimui. Jei dažymasis nepavyko, IF testą (žr. VI skirsnio A dalies 5 punktą) reikia pakartoti.

- 5.4.2. Tiriamųjų plokštelių tiriamuosiuose langeliuose stebimos šviesiai fluorescuojančios tipiškos morfologijos *R. solanacearum* ląstelės (žr. žiniatinklio svetainę: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Fluorescencijos intensyvumas privalo būti lygiavertis arba net didesnis už teigiamo kontrolinio štamo fluorescencijos intensyvumą esant tam pačiam antikūnų praskiedimui ir ne visai nusidažiusias ląsteles ar silpnai fluorescuojančias ląsteles nekreipiama dėmesio.

Įtarus bet kokią užkrėtimą, testą privaloma pakartoti. Šitai gali atsitikti tokiu atveju, kai visose vienos partijos plokštelėse matomos teigiamos ląstelės dėl buferinio tirpalo taršos arba dėl to, kad ant plokštelės dangtelio stebimos teigiamos ląstelės (už plokštelės lango ribų).

- 5.4.3. Yra keletas būdingų IF testo specifiškumo problemų. Gali pasitaikyti foninių fluorescuojančių netipiškos morfologijos ląstelių populiacijų panašių į *R. solanacearum* savo dydžiu bei morfologija panašių kryžmiškai reaguojančių saprofitinių bakterijų, pasitaikančių bulvių stiebagumbių viršūnių gabaliukų segmentų nuosėdose.
- 5.4.4. Tirti tik tipiško dydžio ir morfologijos fluorescuojančias ląsteles esant antikūnų titrui arba darbiniam praskiedimui, kaip nurodyta 5.3 skirsnyje.

## 5.4.5. IF rezultatų aiškinimas:

- i) Jei stebimos šviesiai fluorescuojančios tipiškos morfologijos ląstelės, apskaičiuojamas tipišių ląstelių viename mikroskopiniame laukelyje vidurkis ir tipišių ląstelių skaičius pakartotinai suspenduotų nuosėdų viename mililitre (5 priedėlis).

Bandiniai, kurių 1 ml yra mažiausiai  $5 \times 10^3$  tipišių ląstelių, laikomi užkrėstais. Reikalaujama juos tirti toliau.

- ii) IF testo rezultatai laikomi neigiamais, kai viename bandinių mililitre yra mažiau nei  $5 \times 10^3$  ląstelių, ir toks bandinys laikomas neigiamu. Toliau tirti nereikalaujama.

## 6. PGR testai

*Principas*

Kai PGR testas atliekamas kaip pagrindinis atrankos testas ir gaunami teigiami rezultatai, išskyrimo arba IF testą būtina atlikti kaip antrąjį privalomąjį atrankos testą. Kai PGR testas atliekamas kaip antrasis atrankos testas ir gaunami teigiami rezultatai, tai paskesnę testavimą reikia atlikti pagal vaizduojamąją diagramą tam, kad būtų baigtas diagnozavimas.

Šio metodo kaip pagrindinio atrankos testo visas galimybes rekomenduojama panaudoti tik turint patirties tam tikroje srityje.

*Pastaba.* Išankstinio testavimo taikant šį metodą nustatymo geba 1 mililitre turėtų siekti  $10^3$  -  $10^4$  *R. solanacearum* ląstelių bandinio ekstraktų, kurie anksčiau buvo įvertinti kaip neigiami. Kad visose laboratorijose būtų pasiektas didžiausias metodo nustatymo jautrumas ir specifiskumas, gali būti reikalaujama atlikti optimizavimo eksperimentus.

Naudoti patvirtintus PGR reagentus ir metodikas (žr. 6 priedėlį). Pirmiausia pasirinkti metodą, kurį taikant naudojamas vidinis kontrolinis bandinys.

Siekiant išvengti bandinio užteršimo tiriamąja DNR, imtis atitinkamų atsargumo priemonių. Kad būtų sumažinta taršos tiriamąja DNR galimybė, PGR testą turėtų atlikti prityręs molekulinės biologijos srityje dirbančių laboratorijų techninis personalas.

Neigiami kontroliniai bandiniai (DNR išskyrimo ir PGR atlikimo metu) visada turėtų būti laikomi galutiniais bandiniais, kuriais įrodoma, ar įvyko tarša DNR.

Atliekant PGR testą reikėtų taikyti šiuos neigiamus kontrolinius bandinius:

- bandinio ekstraktą, kuris per ankstesnį tyrimą buvo rastas neužkrėstas *R. solanacearum*,
- buferinius kontrolinius tirpalus, naudojamus išskirti iš bandinio bakterijai ir DNR,
- PGR reakcinį mišinį.

Reikėtų naudoti šiuos teigiamus kontrolinius bandinius:

- pakartotinai suspenduotų nuosėdų, prie kurių pridėta *R. solanacearum* C. m. subsp. *sepedonicus*, alikvotines dalis (apie paruošimą žr. 3B priedėlyje),
- virulentiško *C. m. subsp. sepedonicus* izoliato (pvz., NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; žr. 3B priedėlyje)  $10^6$ /ml ląstelių vandeninę suspensiją,
- jei įmanoma, atliekant PGR testą reikėtų naudoti teigiamų kontrolinių bandinių DNR.

**Siekiant išvengti galimos taršos, tiriamieji teigiami kontroliniai bandiniai paruošiami atskirai nuo tiriamųjų bandinių.**

Reikėtų stengtis, kad bandinių ekstraktuose nebūtų dirvožemio. Todėl tam tikrais atvejais rekomenduotina išskyrimą atlikti naudojant plautas bulves, jei dirbama pagal PGR metodikas.

Išigyjamos standartizuotos teigiamos ir neigiamos kontrolinės medžiagos, naudojamos šiam testui atlikti, išvardytos 3 priedėlyje.

## 6.1. DNR gryninimo metodai

Naudoti teigiamus ir neigiamus kontrolinius bandinius, kaip aprašyta pirmiau 3 priedėlyje.

Kontrolinę medžiagą paruošti taip pat, kaip ir bandinį.

Tiriamoji DNR iš sudėtingų bandinių substratų išskiriama įvairiais metodais, taigi PGR ir kitų fermentinių reakcijų inhibitoriai pašalinami ir tiriamoji DNR sukonzentruojama bandinio ekstrakto. Paskesnis metodas buvo optimizuotas tam, kad būtų atliekama patvirtinta PGR, aprašyta 6 priedėlyje.

## a) Pastro (2000) metodas:

- 1) 220 µl lizės buferinio tirpalo (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) įlašinama į 1,5 ml tūrio Eppendorfo mėgintuvėlį.
- 2) Įpilti 100 µl bandinio ekstrakto ir mėgintuvėlį 10 minučių laikyti termostate arba vandens vonelėje 95 °C temperatūroje.
- 3) Mėgintuvėlį 5 minutes palaikyti lede.
- 4) Įpilti 80 µl lizocimo pradinio tirpalo (50 mg lizocimo/ml 10 mM Tris HCl, pH 8,0 buferiniame tirpale) ir 30 minučių inkubuoti 37 °C temperatūroje.
- 5) Įpilti 220 µl *Easy DNA*<sup>®</sup> tirpalo A (*Invitrogen*), gerai sumaišyti kratant ir 30 minučių inkubuoti 65 °C temperatūroje.
- 6) Įpilti 100 µl *Easy DNA*<sup>®</sup> tirpalo B (*Invitrogen*), intensyviai kratyti prieš nuosėdų susidarymą mėgintuvėlyje ir bandiniui tampant visiškai klampiam.
- 7) Įpilti 500 µl chloroformo ir kratyti tol, kol sumažėja klampumas ir mišinys tampa homogeniškas.
- 8) 20 minučių centrifuguoti 15 000 g greičiu 4 °C temperatūroje, kad būtų atskirtos fazės ir susidarytų interfazė.
- 9) Perpilti viršutinę fazę į naujai paruoštą Eppendorfo mėgintuvėlį.
- 10) Įpilti 1 ml 100 % etilo alkoholio (– 20 °C), trumpai pakratyti ir 10 minučių inkubuoti lede.
- 11) 20 minučių centrifuguoti 15 000 g greičiu 4 °C temperatūroje ir pašalinti etilo alkoholį iš nuosėdų.
- 12) Įpilti 500 µl 80 % etilo alkoholio (– 20 °C) ir sumaišyti pavartant mėgintuvėlį.
- 13) 10 minučių centrifuguoti 15 000 g greičiu 4 °C temperatūroje ir išsaugoti nuosėdas bei pašalinti etilo alkoholį.
- 14) Leisti nuosėdoms išdžiūti ore arba greitajame DNR siurblyje.
- 15) Pakartotinai suspenduoti nuosėdas 100 µl steriliame ypač gryname vandenyje ir mažiausiai 20 minučių palikti kambario temperatūroje.
- 16) Laikyti – 20 °C temperatūroje tol, kol bus atliekama PGR.
- 17) Centrifuguojant išsodinti bet kurį baltos spalvos precipitatą ir 5 µl supernatanto, turinčio DNR, panaudoti PGR atlikti.

## b) Kiti metodai

Kiti DNR išskyrimo metodai (pvz., *Qiagen DNeasy Plant Kit*) galėtų būti taikomi, jei įrodoma, kad jie tokie pat veiksmingi, išskiriant DNR iš kontrolinių bandinių, kurių 1 ml yra  $10^3$ - $10^4$  patogeno ląstelių.

- 6.2. PGR
- 6.2.1. Tiriamosios ir kontrolinės PGR matricos paruošiamos pagal patvirtintą metodiką (VI.A.6 skirsnis). Bandinio DNR ekstraktas praskiedžiamas ypač grynu vandeniu santykiu 1:10.
- 6.2.2. Pagal paskelbtą metodiką paruošiamas atitinkamas PGR mišinys taršai atsparioje aplinkoje (6 priedėlis). Patvirtinta PGR yra daugybinė reakcija, kurią atliekant taip pat naudojamas vidinis PGR kontrolinis bandinys.
- 6.2.3. 2–5 µl DNR ekstrakto įpilama į 25 µl PGR reakcinio mišinio, esančio steriliuose PGR skirtuose mėgintuvėliuose (žr. 6 priedėlis).
- 6.2.4. Naudojamas neigiamas kontrolinis bandinys, sudarytas tik iš PGR reakcinio mišinio, ir vietoj bandinio į jį įpilama ypač gryno vandens.
- 6.2.5. Mėgintuvėliai įdedami į tą patį PGR reaktorių, kuris buvo naudojamas išankstinio tyrimo metu, ir atliekama atitinkamai optimizuota PGR reakcija (6 priedėlis).

### 6.3. PGR produkto analizė

- 6.3.1. Padaugintos matricinės DNR bandiniai analizuojami elektroforezės agarozės gelyje metodu. Kiekvieno bandinio į gelį įnešama mažiausiai po 12 µl padaugintos DNR reakcinio mišinio, sumaišyto su 3 µl įnešimo buferinio tirpalo (6 priedėlis). Naudojami 2,0 % (svoris/tūris) agarozės geliai, pagaminti taikant TRIS-acetato-EDTA (TAE) buferinį tirpalą (6 priedėlis) ir elektroforezė atliekama esant 5–8 V/cm. Naudojama atitinkamo ilgio DNR žymė, pvz., 100bp ilgio fragmentas.
- 6.3.2. DNR juostelės išryškinaamos dažant etidiumo bromido dažu (0,5 mg/l) 30–60 minučių, imantis atsargumo priemonių, dirbant su šiuo mutagenu.
- 6.3.3. Gelis apžiūrimas, apšviečiant jį trumpųjų UV bangų peršvietėju (pvz., bangos ilgiui siekiant  $\lambda = 302$  nm), stebimi numatomo ilgio padaugintos DNR fragmentai (6 priedėlis) ir nufotografuojami.
- 6.3.4. Gavus naujų duomenų arba esant naujiems atvejams, nustatomas padaugintos DNR autentiškumas atliekant likusios padaugintos DNR bandinio analizę restriktaze, jį inkubuojant kambario temperatūroje atitinkamo fermento ir buferinio tirpalo mišinyje (žr. 6 priedėlį). Suskaldyti fragmentai analizuojami agarozės gelio elektroforezės metodu ir stebimas būdingas restrikcijos fragmentas, gelį apšviečiant UV peršvietėju, nudažius etidiumo bromidu ir palyginant su nesuskaldytu ir suskaldytu teigiamu kontroliniu bandiniu.

#### PGR testo rezultato aiškinimas:

PGR testas neigiamas, jei specifinės padaugintos *R. solanacearum* DNR fragmentas tiriamajame bandinyje nenustatomas, bet jis nustatomas visuose teigiamuose kontroliniuose bandiniuose (kai daugybinė PGR atliekama naudojant augalo atžvilgiu specifinius vidinius kontrolinius pradmenis, antrąjį numatomą PGR produktą reikia padauginti kartu su tiriamuoju bandiniu).

PGR testas yra teigiamas, jei aptinkama specifinė padaugintos *R. solanacearum* numatomo dydžio DNR ir jos fragmentas, suskaldytas restriktaze (kai reikalaujama), laikantis nuostatos ir laikomasi nuostatos, kad jis negaunamas iš bet kurio neigiamo kontrolinio bandinio. Patikimas teigiamo rezultato patvirtinimas gali būti gaunamas pakartojant testą ir naudojant antrąjį DNR pradmenų rinkinį (6 priedėlis).

*Pastaba.* PGR inhibiciją galima įtarti, jei padaugintos matricinės DNR gaunama iš teigiamo kontrolinio bandinio, turinčio *R. solanacearum* vandenį, tačiau neigiami rezultatai gaunami naudojant teigiamą kontrolinį bandinį, turintį *R. solanacearum* bulvių ekstrakto. Daugybinę PGR atliekant naudojant vidinius PGR kontrolinius bandinius, reakcijos inhibicija stebima negavus abiejų padaugintų matricinių DNR.

Taršą galima įtarti, jei numatoma padauginta DNR gaunama iš daugiau nei vieno neigiamo kontrolinio bandinio.

## 7. Fluorescencinės hibridizacijos in situ (FISH) testas

### Principas

Kai FISH testas taikomas kaip pirmasis atrankos testas ir nustatoma, kad jis teigiamas, IF testą reikia atlikti kaip antrąjį privalomąjį atrankos testą. Kai FISH testas taikomas kaip antrasis privalomasis testas ir nustatoma, kad jis teigiamas, tai reikalaujama paskesnę testavimą pagal vaizduojamąją diagramą atlikti tam, kad būtų baigtas diagnozavimas.

**Pastaba.** Naudoti patvirtintus oligonukleotidų, specifiskų *R. solanacearum* bandinius (7 priedėlis). Taikant šį metodą, išankstinio testavimo nustatymo geba turėtų siekti  $10^3$ - $10^4$  *R. solanacearum* ląstelių viename mililitre bandinio ekstraktų, kurie anksčiau buvo įvertinti kaip neigiami.

Ši tvarka pirmiausia turėtų būti taikoma šviežiai paruoštam bandinio ekstraktui, tačiau ją taip pat galima taikyti bandinio ekstraktui, kuris buvo laikomas glicerine nuo – 16 iki – 24 °C arba nuo – 68 iki – 86 °C temperatūroje.

Bandinio ekstrakto, nustatyto kaip neturinčio *R. solanacearum* ląstelių, alikvotines dalis naudoti kaip neigiamus kontrolinius bandinius.

3–5 dienų amžiaus kultūrų suspensijas, turinčias *R. solanacearum* (pvz., NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857 štamo) 0,01 M fosfatiniame buferiniame tirpale  $10^5$ - $10^6$  ląstelių/ml, reikėtų naudoti kaip teigiamus kontrolinius bandinius (apie paruošimą žr. 3 priedėlyje). Paruošti atskiras teigiamas kontrolines plokšteles, skirtas homologiui arba bet kuriam etaloniniam *R. solanacearum* štamui, suspenduotam bulvių ekstrakto, kaip nurodyta 3B priedėlyje.

Fluoresceino izotiocianato (FITC) žyme pažymėti oligonukleotidiniai bandiniai, specifiški eubakterijoms, labai naudingi kontroliuojant hibridizavimo procesą, kadangi jais nudažomos visos bandinyje esančios bakterijos.

Įsigijamos standartizuotos teigiamos ir neigiamos kontrolinės medžiagos, naudojamos šiam testui atlikti, išvardytos 3 priedėlio A dalyje.











Kontrolinis bandinys tiriamas tokiu pat būdu, kaip ir tiriamasis bandinys.

### 7.1. Bulvių ekstrakto fiksavimas

Paskesnė metodika pagal Wullings *et al.* (1998):

- 7.1.1. Paruošti fiksavimo tirpalą (žr. 7 priedėlį).
- 7.1.2. Į Eppendorf mėgintuvėlį įlašinama po 100 µl kiekvieno bandinio ekstrakto ir mėgintuvėlis 7 minutes centrifuguojamas 7 000 g greičiu.
- 7.1.3. Nupilamas viršnuosėdinis skystis ir nuosėdos ištirpinamos 200 µl fiksažo, paruošto prieš trumpiau kaip 24 valandas. Mėgintuvėlis sumaišomas ir 1 valandą inkubuojamas šaldytuve.
- 7.1.4. 7 minutes centrifuguojama 7 000 g, nupilamas viršnuosėdinis skystis ir nuosėdos pakartotinai suspenduojamos 75 µl 0,01 M fosfatiniame buferiniame tirpale (žr. 7 priedėlį).
- 7.1.5. Į švarios daug duobučių turinčios plokštelės duobutes įlašinama po 16 µl fiksuotų suspensijų taip, kaip parodyta 3 pav. Kiekviena plokštelė skiriama 2 bandiniams iširti, įlašinant juos nepraskiestus po 10 µl, ir paskiau padaryti 1:100 praskiedimą (0,01 M fosfatiniu buferiniu tirpalu). Likusį bandinio tirpalą (49 µl) galima saugoti 20 °C temperatūroje, pripylus 1 tūrį 96 % etilo alkoholio. Jei reikia pakartoti FISH testą, etilo alkoholis pašalinamas, centrifuguojant ir pripilant tokį pat tūrį 0,01 M fosfatinio buferinio tirpalo (sumaišoma, pavartant aukštyn ir žemyn).

7.1 pav. FISH testui skirtos plokštelės išklotinė

1 bandinys	tuščia	tuščia	tuščia	2 bandinys
				
1 duobutė	2 duobutė	3 duobutė	4 duobutė	5 duobutė
1 bandinys	tuščia	tuščia	tuščia	2 bandinys
				
6 duobutė	7 duobutė	8 duobutė	9 duobutė	10 duobutė
1 dengiančioji juostelė			2 dengiančioji juostelė	



7.1.6. Plokštelės džioviamos ore (arba plokštelių džiovintuve 37 °C temperatūroje) ir fiksuojamos liepsna.

Šiame etape darbą galima nutraukti ir hibridizavimą atlikti kitą dieną. Plokštelės turi būti nedulkėtos ir jas reikia laikyti sausas kambario temperatūroje.

## 7.2. Hibridizavimas

7.2.1. Vanduo pašalinamas iš ląstelių, kas minutę įpilant laipsniškai didėjančios koncentracijos - 50 %, 80 % ir 96 % - etilo alkoholio. Plokštelės džioviamos, įdėjus jas į plokštelėms skirtą laikiklį.

7.2.2. Parengiama drėgna inkubavimo kamera, oro nepraleidžiančios dėžės dugną uždengus sugeriamuoju arba filtriniu popieriumi, išmirkytu 1× hybmix (7 priedėlis). Dėžė mažiausiai 10 minučių paliekama hibridizavimui skirtoje krosnelėje 45 °C temperatūroje.

7.2.3. Paruošti hibridizacijos tirpalą (7 priedėlis), į vienos plokštelės 8 duobutes (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 ir 10 duobutes žr. 7.1 pav.) įpilti 10 µl ir 2 centrinės duobutes (3 ir 8) palikti laisvas.

7.2.4. Kiekviena plokštelė uždengiama dviem apsauginėmis juostelėmis (24 x 24 mm), kad neprasisiskverbtų oras. Plokštelės sudedamos į pašildytą drėgną kamerą ir 5 valandas krosnelėje 45 °C temperatūroje tamsioje atliekamas hibridizavimas.

7.2.5. Į tris laboratorines kolbas įpilama po 1 l Milli Q (molekulinės biologijos darbams skirto) vandens, po 1 l 1x hybmix tirpalo (334 ml 3x hybmix ir 666 ml Milli Q vandens) ir 1 l 1/8x hybmix (42 ml 3x hybmix ir 958 ml Milli Q vandens). Kiekviena kolba pašildoma vandens vonioje 45 °C temperatūroje.

7.2.6. Plokštelės atidengiamos ir įdedamos į plokštelių laikiklį.

7.2.7. Bandinio perteklius pašalinamas 15 minučių inkubuojant plokštelę laboratorinėje kolboje, į ją įpylus 1x hybmix, 45 °C temperatūroje.

7.2.8. Plokštelių laikiklis pamerkiamas į 1/8 hybmix plovimo tirpalą ir inkubuojamas dar 15 minučių.

7.2.9. Plokštelės trumpam pamerkiamos į Milli Q vandenį ir padedamos ant filtrinio popieriaus. Perteklinis vanduo pašalinamas, paviršių padengiant filtriniu popieriumi. Į kiekvieną langelį pipete įlašinama po 5–10 µl priešblukinančiu aktyvumu pasižyminčio ryškintojo tirpalo (pvz., Vectashield, Vecta Laboratories, CA, JAV arba jam lygiavertis) ir visa plokštelė uždengiama viena (24 × 60 mm) dengiančiąja juostele.

## 7.3. FISH testo rezultatai

7.3.1. Plokšteles, pamerktas į imersinį aliejų, nedelsiant stebėti mikroskopu, tinkančiu epifluorescencinei mikroskopijai, ir padidinus 630 ir 1 000 kartų. Bandinyje esančias eubakterines ląsteles (įskaitant Gram(-) ląsteles) stebinti per filtrą, tinkantį fluoresceino izotiocianatui (FITC), jos atrodo fluorescuojančios žaliai. Cy3 dažų dažytas *R. solanacearum* ląsteles stebinti per filtrą, skirtą tetrametilrodamino-5-izotiocianatui, jos fluorescuoja raudonai. Palyginti tiriamųjų ir teigiamų kontrolinių ląstelių morfologiją. Ląstelės turi fluorescuoti šviesia spalva ir būti visiškai nusidažiusios. FISH testą (VI.A.7 skirsnis) reikia pakartoti, jei dažymasis nepavyko. Langeliai stebimi per dvigubą skersmenį dešiniuose kampuose ir aplink perimetrą. bandinių, neturinčių arba turinčių nedaug ląstelių, stebima mažiausiai 40 laukelių.

7.3.2. Stebėti būdingos morfologijos šviesiai fluorescuojančias *R. solanacearum* ląsteles tiriamųjų plokštelių tiriamuosiuose langeliuose (žr. svetainę <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Fluorescencijos intensyvumas privalo būti lygiavertis arba net didesnis už teigiamo kontrolinio štamo fluorescencijos intensyvumą. Į ne visai nusidažiusias ląsteles ar silpnai fluorescuojančias ląsteles nekreipiama dėmesio.

7.3.3. Įtarus bet kokią taršą, testą privaloma pakartoti. Šitai gali atsitikti tokiu atveju, kai dėl buferinio tirpalo taršos visose vienos partijos plokštelėse matomos teigiamos ląstelės, arba dėl to, kad stebimos teigiamos ląstelės (už plokštelės lango ribų) ant plokštelės dangtelio.

- 7.3.4. Yra keletas būdingų FISH testo specifiskumo problemų. Gali pasitaikyti foninių fluorescuojančių netipiškos morfologijos ląstelių populiacijų ir į *R. solanacearum* savo dydžiu bei morfologija panašių kryžmiškai reaguojančių saprofitinių bakterijų, nors tokie atvejai gerokai retesni nei IF testo atveju tiriant bulvių stiebagumbių viršūnės gabaliukų segmentų nuosėdas.
- 7.3.5. Tirti tik tipiško dydžio ir morfologijos fluorescuojančias ląsteles.
- 7.3.6. FISH testo rezultatų aiškinimas:
- Teigiami FISH testo rezultatai gaunami tada, kai per FITC filtrą stebimos tipiško dydžio bei morfologijos šviesiai žaliai fluorescuojančios *R. solanacearum* ir per rodamino filtrą stebint visas teigiamas kontrolines ląsteles, šios fluorescuoja šviesiai raudona spalva, o tarp neigiamų kontrolinių ląstelių jokios fluorescencijos nėra. Jei randama šviesiai fluorescuojančių būdingos morfologijos ląstelių, apskaičiuojamas tipiškų ląstelių viename mikroskopiniame laukelyje vidurkis ir tipiškų ląstelių skaičius pakartotinai suspenduotų nuosėdų viename mililitre (4 priedėlis). Bandiniai, kurių 1 ml yra mažiausiai  $5 \times 10^3$  tipiškų ląstelių, laikomi užkrėstais. Reikalaujama juos tirti toliau. Bandiniai, kurių pakartotinai suspenduotų nuosėdų 1 ml yra mažiau kaip  $5 \times 10^3$  tipiškų ląstelių, laikomi neigiamais.
  - FISH testas yra neigiamas tada, kai stebint per rodamino filtrą tipiško dydžio ir morfologijos šviesiai raudonai fluorescuojančios *R. solanacearum* nėra stebimos, laikantis nuostatos, kad šviesiai raudonai fluorescuojančios ląstelės teigiamuose kontroliniuose bandiniuose stebimos, šiuos stebint per rodamino filtrą.

## 8. IMUNOFERMENTINĖS ANALIZĖS (ELISA) testai

### Principas

Imunofermeninė analizė gali būti taikoma tik kaip papildomas testas atliekant IF, PGR ir FISH testus dėl palyginti mažo nustatymo jautrumo šio testo metu. Kai atliekama dviejų antikūnų sluoksnių netiesioginė imunofermeninė analizė (DASI ELISA), praturtinimo operacija ir monokloninių antikūnų naudojimas yra privalomi (žr. svetainę <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Mėginių praturtinimas prieš imunofermeninę analizę gali atnešti naudos, kad nustatymo jautrumas šio testo metu padidėtų, tačiau dėl kitų praturtinamų konkuruojančių bakterijų jis gali ir sumažėti.

**Pastaba.** Naudoti tik patvirtintus antikūnus, specifiskus *R. solanacearum* (žr. svetainę <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Rekomenduojama nustatyti kiekvienos naujos antikūnų partijos titrą. Titrą apibrėžiamas kaip didžiausias praskiedimas, kuriam esant vyksta optimali reakcija, kai tiriama *R. solanacearum* homologinio štamo  $10^3$ - $10^6$  ląstelių viename mililitre suspensija, naudojant atitinkamus antrinių antikūnų konjugatus, remiantis gamintojo rekomendacijomis. Tyrimo metu antikūnų titras turi būti darbinis ir artimas arba lygus komercinio preparato titrui. Nustatyti antikūnų, titrą *R. solanacearum* homologinio štamo suspensijoje, kurios 1 ml yra  $10^5$ - $10^6$  ląstelių.

Bandinio ekstraktą, kuris, kaip anksčiau įrodyta, buvo neigiamas *R. solanacearum* atžvilgiu, ir kryžmiškai nereaguojančių bakterijų fosfatiniame buferiniame tirpale suspensiją naudoti kaip neigiamus kontrolinius bandinius.

Bandinio ekstrakto alikvotines dalis, kurias sumaišius su  $10^3$ - $10^4$  *R. solanacearum* 2 biovariantų (pvz., štamo NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, žr. 2A ir B priedus) suspensija ir nustatius, kad jos buvo neigiamos *R. solanacearum* atžvilgiu, naudoti kaip neigiamą kontrolinį bandinį. Atliekant kiekvienos plokštelės rezultatų palyginimą naudojama standartinė *R. solanacearum*  $10^5$ - $10^6$  ląstelių fosfatiniame buferiniame tirpale suspensija. Užtikrinti, kad atliekant testą plokštelės duobutėse įpilti teigiami kontroliniai bandiniai būtų tinkamai atskirti nuo tiriamųjų bandinių.

Standartizuotos teigiamos ir neigiamos kontrolinės medžiagos, skirtos šiam testui atlikti, išvardytos 3 priedėlio A dalyje.

Testui skirtą kontrolinę medžiagą tirti taip pat, kaip ir bandinį (bandinius).

Patvirtintos dvi imunofermeninės analizės metodikos.

### a) Netiesioginė imunofermeninė analizė (Robinson Smith *et al.*, 1995)

- Naudoti 100–200  $\mu$ l bandinio ekstrakto alikvotines dalis (4 minutes kaitinant 100 °C temperatūroje vandens vonelėje arba termostate, kai kuriais atvejais galima sumažinti nespecifinių rezultatų skaičių).
- Įpilti tokio pat tūrio dvigubos joninės jėgos plokštelės padengimo buferinio tirpalo (4 priedėlis) ir sukratyti.
- 100  $\mu$ l alikvotinių dalių įpilti mažiausiai į dvi mikrotitravimo plokštelės (pvz., *Nunc-Polysorp* ar lygiavertės markės) duobutes ir 1 valandą inkubuoti 37 °C temperatūroje arba per naktį 4 °C temperatūroje.

- 4) Ekstraktus išpilti iš duobučių, šias tris kartus perplauti fosfatinio buferinio tirpalo ir *Tween* mišiniu (4 priedėlis), paskutinę plovimo tirpalo porciją mažiausiai 5 minutes paliekant duobutėse.
  - 5) Paruošti atitinkamo praskiedimo antikūnų, specifinių *R. solanacearum*, blokavimo buferiniame tirpale bandinį (4 priedėlis). Naudojant patvirtintų antikūnų komercinį preparatą, atlikti rekomenduojamus praskiedimus (paprastai dvigubai didesnius už darbinį titrą).
  - 6) Įpilti 100 µl antikūnų bandinio į kiekvieną duobutę ir 1 valandą inkubuoti 37 °C temperatūroje.
  - 7) Išpilti antikūnų tirpalą iš duobučių ir plokštelę perplauti, kaip nurodyta 4 punkte.
  - 8) Paruošti atitinkamo praskiedimo antrinių antikūnų ir šarminės fosfatazės konjugato blokavimo buferiniame tirpale bandinį. Įpilti jo po 100 µl ir 1 valandą inkubuoti 37 °C temperatūroje.
  - 9) Išpilti antikūnų konjugatą tirpalą iš duobučių ir plokštelę perplauti, kaip nurodyta 4 punkte.
  - 10) Į kiekvieną duobutę įpilti po 100 µl šarminės fosfatazės substrato tirpalo (4 priedėlis). Inkubuoti tamsoje kambario temperatūroje ir atlikti plokštelėje esančių bandinių spektrofotometrinių matavimų, išmatuojant absorbciją, bangos ilgiui siekiant 405 nm, reguliariais intervalais 90 minučių laikotarpiu.
- b) DVIEJŲ ANTIKŪNŲ SLUOKSNIŲ NETIESIOGINĖ IMUNOFERMENTINĖ ANALIZĖ (DASI ELISA)
- 1) Paruošti atitinkamo praskiedimo polikloninių antikūnų, specifinių *R. solanacearum*, plokštelės padengimo buferiniame tirpale pH 9,6 (4 priedėlis) bandinį, po 200 µl įpilti į kiekvieną duobutę ir 4–5 valandas inkubuoti 37 °C temperatūroje arba 16 valandų 4 °C temperatūroje.
  - 2) Duobutes tris kartus perplauti fosfatinio buferinio tirpalo ir *Tween* mišiniu (4 priedėlis).  
Į mažiausiai dvi duobutes įpilti po 190 µl bandinio ekstrakto. Į kiekvienos plokštelės dvi duobutes įpilti teigiamų ir neigiamų kontrolinių tirpalų ir 16 valandų inkubuoti 4 °C temperatūroje.
  - 3) Duobutes tris kartus perplauti fosfatinio buferinio tirpalo ir *Tween* mišiniu (4 priedėlis).
  - 4) Paruošti atitinkamo praskiedimo monokloninių antikūnų, specifinių *R. solanacearum*, fosfatiname buferiniame tirpale, taip pat turinčiame 0,5 % galvijų serumo albumino (4 priedėlis), bandinį, į kiekvieną duobutę įpilti po 190 µl ir 2 valandas inkubuoti 37 °C temperatūroje.
  - 5) Duobutes tris kartus perplauti fosfatinio buferinio tirpalo ir *Tween* mišiniu (4 priedėlis).
  - 6) Paruošti atitinkamo praskiedimo antikūnų, specifinių pelių imunoglobulinams, ir šarminės fosfatazės konjugato fosfatiname buferiniame tirpale bandinį, į kiekvieną duobutę įpilti po 190 µl ir 2 valandas inkubuoti 37 °C temperatūroje.
  - 7) Duobutes tris kartus perplauti fosfatinio buferinio tirpalo ir *Tween* mišiniu (4 priedėlis).
  - 8) Paruošti šarminės fosfatazės substrato tirpalą, kurio 1 ml yra 1 mg p-nitrofenilfosfato (4 priedėlis). Į kiekvieną duobutę pripilti po 200 µl. Plokštelė inkubuojama tamsoje, kambario temperatūroje, ir po to matuojama absorbcija, bangos ilgiui siekiant 40 nm reguliariais intervalais 90 minučių laikotarpiu.

#### *Imunofermentinės analizės rezultatų aiškinimas*

Imunofermentinė analizė laikoma neigiama, jei bandinių, esančių dviejose duobutėse (bandinys ir jo pakartojimas), vidutinis optinis tankis (OT) dukart mažesnis už neigiamo bandinio ekstrakto, esančio 1 duobutėje, optinį tankį, laikantis nuostatos, kad visų teigiamų kontrolinių bandinių optinis tankis didesnis nei 1,0 (pasibaigus 90 minučių trukusiai inkubacijai su substratu) ir dukart didesnis už neigiamų bandinių ekstraktų optinį tankį.

Imunofermentinė analizė laikoma teigiama, jei bandinių, esančių dviejose duobutėse (bandinys ir jo pakartojimas), vidutinis optinis tankis (OT) dukart didesnis už neigiamo bandinio ekstrakto, esančio 1 duobutėje, optinį tankį, laikantis nuostatos, kad visų neigiamų kontrolinių bandinių optinis tankis dukart mažesnis už visų teigiamų kontrolinių bandinių optinį tankį.

Teigiamo kontrolinio bandinio optinio tankio rodmenims esant neigiamiems, įrodoma, kad testas nebuvo tinkamai atliktas arba jo metu įvyko slopinimas. Neigiamų kontrolinių bandinių teigiami optinio tankio rezultatai rodo, kad įvyko kryžminė tarša arba prisijungė nespecifiniai antikūnai.

## 9. Biotestas

*Pastaba.* Šiuo metodu atliekant išankstinių tyrimų bandinių ekstraktuose, kurie buvo anksčiau neigiami, 1 ml galima nustatyti  $10^3$ - $10^4$  *R. solanacearum* kolonijas sudarančių vienetų (apie paruošimą žr. 3 priedėlyje).

Didžiausio nustatymo jautrumo galima tikėtis, kai naudojamas šviežiai paruoštas bandinio ekstraktas ir laikomasi optimalių augimo sąlygų. Tačiau šį metodą galima sėkmingai taikyti tiriant ekstraktus, laikytus glicerine nuo – 68 iki – 86 °C temperatūroje.

Taikoma Janse metodika (1988):

- 9.1. Auginti 10 tiriamųjų pažeidžiamojo tipo pomidorų augalų (pvz., veislę „Moneymaker“ arba lygiavertę jautrią užkrėtimui veislę, kaip nustatyta tyrimų laboratorijoje), kiekvienam bandomajam augalui esant trečiojo lapelio stadijoje. Dėl auginimo žr. 8 priedėlį. Panašiai auginti baklažanų (pvz., veislę „Black Beauty“ arba lygiavertę užkrėtimui jautrią veislę). Naudoti tik augalus, esančius 2–3 lapelio stadijoje, sudarant sąlygas visiškai pasiekti trečiojo tikrojo lapelio stadiją. Nustatyta, kad simptomai pasireiškia ne taip ūmiai ir lėčiau pasireiškia baklažanuose. Kai įmanoma, rekomenduojama auginti pomidorų daigus.

- 9.2. 100 µl bandinio ekstrakto paskirstoma po lygiai visiems tiriamiesiems augalams.

### 9.2.1. Inokuliacija švirkštu

Augalų stiebai virš sėklaskilčių inokuliuojami naudojant švirkštą su hipodermine adata (ne mažiau kaip 23G). Inokuliuojant visus augalus, bandinys padalijamas po lygiai.

### 9.2.2. Inokuliacija įpjovos vietoje

Laikant augalą dviem pirštais, suspenduotų nuosėdų lašas (apytiksliai 5–10 µl) užlašinamas ant stiebo tarp sėklaskilčių ir pirmojo lapelio.

Steriliu skalpeliu padaromas įstrižinis 1 cm ilgio ir 2/3 stiebo storio gylio pjūvis nuo tos vietos, kur buvo užlašintas suspenduotų nuosėdų lašas.

Naudojant švirkštą, pjūvis užsandarinamas vazelinu.

- 9.3. Taikant tą patį inokuliacijos metodą, 5 daigai inokuliuojami *R. solanacearum* virulentiško biovarianto 2 štamo kultūros  $10^5$ - $10^6$  ląstelių/ml vandenine suspensija 48 val. kaip teigiamu kontroliniu bandiniu ir nuosėdų buferiniu tirpalu (4 priedėlis) kaip neigiamu kontroliniu bandiniu. Siekiant išvengti kryžminės taršos, teigiami ir neigiami kontroliniai augalai atskiriami nuo kitų augalų.

- 9.4. Augalai testams karantino sąlygomis 4 savaites laikomi 25–30 °C temperatūroje ir esant didelei santykinei drėgmei, tinkamai drėkinant, kad būtų išvengta vytimo, skurdimo dėl vandens trūkumo. Siekiant išvengti taršos, teigiami kontroliniai ir neigiami kontroliniai augalai auginami aiškiai atskirtuose šiltnamyje arba auginimui skirtose patalpose, o jei trūksta erdvės, juos paveikiant yra užtikrinama atskirtis. Jei skirtingais bandiniais inokuliuojamus augalus reikia auginti kartu, jie atskiriami skydeliais. Tręšimo, laistymo, tikrinimo ir kitų operacijų metu labai rūpinamasi išvengti kryžminės taršos. Būtina užtikrinti, kad į šiltnamius ir auginimui skirtas patalpas nepatektų jokie vabzdžiai kenkėjai, nes jie gali pernešti bakteriją nuo vieno bandinio prie kito.

Stebėti vytimo, epinastijos, chlorozės ir (arba) žemaūgiškumo simptomus.

- 9.5. Atskirti užkrėstus augalus (II.3 skirsnis) ir identifikuoti spėjamas *R. solanacearum* kultūras (VI. B skirsnis).
- 9.6. Jei simptomų nepastebima, po trijų savaičių atliekamas IF/PGR testas naudojant sudėtinį bandinį, gautą iš kiekvieno tiriamojo augalo aukščiau inokuliacijos vietos paėmus 1 cm dydžio stiebo segmentą. Jei testo rezultatai teigiami, atliekamas selektyvaus pasėjimo į auginimo terpę testas (4.1 skirsnis).
- 9.7. Identifikuoti bet kurias išgrynintas spėjamas *R. solanacearum* kultūras (VI. B skirsnis).

#### Biotesto rezultatų aiškinimas

Biotesto patikimi rezultatai gaunami, kai teigiamuose kontroliniuose augaluose pasireiškia tipiški simptomai, iš šių augalų galima išskirti bakteriją ir neigiamuose kontroliniuose augaluose simptomų pastebėta nebuvo.

Biotestas neigiamas, jei tiriamieji augalai neužkrečiami *R. solanacearum*, laikantis nuostatos, kad *R. solanacearum* aptinkama teigiamuose kontroliniuose augaluose.

Biotestas teigiamas, jei tiriamieji augalai užkrečiami *R. solanacearum*.

#### B. IDENTIFIKAVIMO TESTAI

Spėjamų *R. solanacearum* izoliatų grynos kolonijos identifikuojamos taikant bent šiuos du testus, pagrįstus skirtingais biologiniais principais.

Atliekant kiekvieną testą, naudojami atitinkami etaloniniai štamai (žr. 3 priedėlį).

#### 1. Mitybiniai ir fermentiniai identifikavimo testai

Fenotipinės savybės, kurios paprastai stebimos arba nėra stebimos *R. solanacearum* atveju, nustatomos Lelliott ir Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001) metodais.

Testas	Numatomas rezultatas
Fluorescuojančio pigmento sintezė	–
Polibetahidroksibutirato intarpai	+
Oksidavimo/Fermentacijos (O/F) testas	O+/F–
Katalazės aktyvumas	+
Kovac'o oksidazės testas	+
Nitrato redukavimas	+
Citrato sunaudojimas	+
Augimas 40 °C temperatūroje	–
Augimas esant 1 % NaCl	+
Augimas esant 2 % NaCl	–
Arginino dihidrolazės aktyvumas	–
Želatinos skystėjimas	–
Krakmolo hidrolizė	–
Eskulino hidrolizė	–
Levano sintezė	–

#### 2. Imunofluorescencinė analizė (IF)

- 2.1. Paruošti apytiksliai  $10^6$  ląstelių/1 ml IF buferinio tirpalo suspensiją (4 priedėlis).
- 2.2. Atitinkamą antiserumą dukart praskiesti (žr. svetainę <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).
- 2.3. Taikyti IF procedūrą (VI.A.5 skirsnis).
- 2.4. Imunofluorescencinės analizės rezultatas laikomas teigiamu, jei jos metu nustatytas kultūros titras yra lygiavertis kontrolinio bandinio titrui.

### 3. Imunofermentinė analizė (ELISA)

*Pastaba.* Atliekant du identifikavimo testus, taikyti tik šį metodą.

- 3.1. Paruošti apytiksliai  $10^8$  ląstelių vieną kartą koncentruotame fosfatiniame buferiniame tirpale suspensiją (4 priedėlis).
- 3.2. Atitinkamai atlikti imunofermentinę analizę, naudojant monokloninį antikūną, specifiską *R. solanacearum*.
- 3.3. Imunofermentinės analizės rezultatas laikomas teigiamu, jei iš kultūros gauto bandinio optinis tankis yra lygus ne mažiau kaip pusei teigiamo kontrolinio bandinio optinio tankio.

### 4. PGR

- 4.1. Paruošti apytiksliai  $10^6$  ląstelių/1 ml molekulinės biologijos tyrimams skirto vandens suspensiją.
- 4.2. 100 µl ląstelių suspensijos 4 minutes pakaitinti uždaruose mėgintuvėliuose termostate arba vandens vonelėje 100 °C temperatūroje. Paskiau bandinius galima saugoti –16 – –24 °C temperatūroje tol, kol jų prireiks.
- 4.3. Atitinkamomis PGR procedūromis padauginami atitinkami *R. solanacearum* matricinės DNR fragmentai (pvz., Seal *et al.* (1993); Pastrok and Maiss (2000); Pastrok *et al.* (2002); Boudazin *et al.* (1999); Opina *et al.* (1997), Weller *et al.* (1999)).
- 4.4. *R. solanacearum* identifikuojama, jei padauginti matricinės DNR fragmentai yra to paties dydžio ir pasižymi tuo pačiu restrikcinio fragmento ilgio polimorfizmu, kaip ir teigiamas kontrolinis štamas.

### 5. FISH testas

- 5.1. Paruošti apytiksliai  $10^6$  ląstelių/1 ml ypač gryno vandens suspensiją.
- 5.2. Taikyti FISH procedūrą (VI.A.7 skirsnis) naudojant mažiausiai du oligonukleotidinius bandinius, specifiskus *R. solanacearum* (7 priedėlis).
- 5.3. FISH testo teigiamas rezultatas gaunamas, jei tiriant kultūrą ir teigiamą kontrolinį bandinį gaunamas tas pats rezultatas.

### 6. Riebiųjų rūgščių tipo nustatymas

- 6.1. 48 valandas auginti kultūrą triptikazės sojos agare (Oxoid) 28 °C temperatūroje.
- 6.2. Riebiųjų rūgščių tipą nustatyti taip, kaip nurodyta (Janse, 1991; Stead, 1992).
- 6.3. Riebiųjų rūgščių tipo nustatymo testo teigiamas rezultatas gaunamas, jei spėjamos kultūros riebiųjų rūgščių tipas atitinka teigiamo kontrolinio bandinio riebiųjų rūgščių tipą. Būdingų riebiųjų rūgščių - 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH ir 18:1 2OH buvimas ir 16:0 3OH nebuvimas visiškai patvirtina užkrėtimą *Ralstonia* sp.

### 7. Štamo apibūdinimo metodai

Kiekvienu nauju *R. solanacearum* išskyrimo atveju rekomenduojama štamą apibūdinti taikant toliau pateikiamus metodus.

Atliekant kiekvieną testą, prireikus naudojami etaloniniais štamais (žr. 3 priedėly).

#### 7.1. Biovarieteto nustatymas

*R. solanacearum* skirstoma į biovarietetus pagal sugebėjimą panaudoti ir (arba) oksiduoti tris disacharidus ir tris heksozės alkoholius (Hayward, 1964 ir Hayward *et al.*, 1990). Atliekant biovarieteto nustatymo testą, naudojama auginimo terpe, aprašyta 2 priedėlyje. Testas atliekamas sėkmingai, jei terpė inokuliuojama grynomis *R. solanacearum* izoliatų kultūromis dūrio metodu ir inkubuojama 28 °C temperatūroje. Jei terpė išpilstoma į sterilias 96 duobučių plokštes (1 duobutės tūriui siekiant 200 µl), tai per 72 valandas galima stebėti spalvos pokytį nuo alyvų žalumo iki geltonumo, įrodantį teigiamą testo rezultatą.

	Biovarietetas				
	1	2	3	4	5
Sugebėjimas sunaudoti:					
Maltozę	–	+	+	–	+
Laktozę	–	+	+	–	+
D (+) Celiobiozę	–	+	+	–	+
Manitolį	–	–	+	+	+
Sorbitolį	–	–	+	+	–
Dulcitolį	–	–	+	+	–

Nustatant 2 biovarieteto subfenotipus, atliekami papildomi testai.

	Biovarietetas 2A (paplitęs visame pasaulyje)	Biovarietetas 2A (aptinkamas Čilėje ir Kolumbijoje)	Biovarietetas 2T (aptinkamas tropikuose)
Trehalozės sunaudojimas	–	+	+
Mezo-inozitolio sunaudojimas	+	–	+
D ribozės sunaudojimas	–	–	+
Pektino skaldymo aktyvumas <sup>(1)</sup>	mažas	mažas	didelis

<sup>(1)</sup> Žr. Lelliott and Stead (1987).

## 7.2. Genominis „pirštų antspaudų“ metodas

*R. solanacearum* štamų nustatymas molekulinės biologijos metodais apskritai atliekamas taikant šiuos tris metodus:

7.2.1. Restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo analizė (Cook *et al.*, 1989).

7.2.2. Pakartojamos sekos PGR naudojant pradmenis, specifiskus bakterinėms REP, BOX ir ERIC sekoms (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995).

7.2.3. Padauginto fragmento ilgio polimorfizmo analizė (Van der Wolf *et al.*, 1998).

## 7.3. PGR metodai

Specifiniai PGR pradmenys (Patrik *et al.*, 2002; žr. 6 priedėlių) gali būti naudojami nustatant *R. solanacearum* atskirus štamus, priklausančius 1 skyriui (3, 4 ir 5 biovarietetai) ir 2 skyriui (1, 2A ir 2T biovarietetai), kai anksčiau buvo nustatyta, atlikus restrikcijos fragmentų polimorfizmo analizę (Cook *et al.*, 1989) bei nustatant 16S rDNR nukleotidų seką (Taghavi *et al.*, 1996).

## C. patvirtinimo metodai

Patogeniškumo testą privaloma atlikti galiausiai diagnozuojant *R. solanacearum* ir įvertinant kultūrų, identifikuojamų kaip *R. solanacearum*, virulentiškumą.

- 1) Paruošti apytiksliai 10<sup>6</sup> ląstelių, po 24–48 valandų auginimo paimtų iš tiriamojo izoliato ir atitinkamo teigiamo kontrolinio *R. solanacearum* (pvz., NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; žr. 3 priedėlių), inokuliatą.
- 2) Inokuliuoti 5–10 pomidorų arba baklažanų daigų 3 lapelio stadijoje esančius stiebus (žr. VI skirsnio A dalies 9 punktą).

- 3) 2 savaites inkubuoti 25–28 °C temperatūroje esant pakankamai šviesos ir palyginti daug drėgmės, atitinkamai laistant, stengiantis išvengti permirkimo arba sausros sukeliama poveikio. Grynų kultūrų atveju tipiškas vytimas turėtų įvykti per 14 dienų. Jei pasibaigus šiam laikotarpiui ir augalus inkubuojant dar 3 savaitėms, simptomai nestebimi, *R. solanacearum* kultūros negalima laikyti patogenine.
  - 4) Stebėti vytimo ir (arba) epinastijos, chlorozės ir žemaūgiškumo simptomus.
  - 5) Išskirti iš simptominių augalų, 2 cm virš inokuliacijos vietos paimti stiebo segmentą. Paimta dalis susmulkinama ir suspenduojama nedideliame sterilaus vandens tūryje arba 50 mM fosfatiniame buferiniame tirpale (4 priedėlis). Iš suspensijos išskiriama praskiedimo arba persėjimo į tinkamą terpę, pirmiausia mitybinę, būdu (2 priedėlis), 48–72 valandoms inkubuojant 28 °C temperatūroje ir stebint *R. solanacearum* tipiškų kolonijų susiformavimą.
-



## 1 priedėlis

**Metodikos optimizuojančios ir patvirtinančios laboratorijos**

Laboratorija <sup>(1)</sup>	Buvimo vieta	Šalis
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viena ir Lincas	Austrija
Departement Gewasbescherming	Merelbekas	Belgija
Plantedirektoratet	Lingbis	Danija
Central Science Laboratory	Jorkas	Anglija
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgas	Škotija
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Anžeras	Prancūzija
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Prancūzija
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnovas	Vokietija
Pflanzenschutzamt Hannover	Hanoveris	Vokietija
State Laboratory	Dublinas	Airija
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bolonija	Italija
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Italija
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloordas	Nyderlandų Karalystė
Plantenziektenkundige Dienst	Vageningenas	Nyderlandų Karalystė
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabona	Portugalija
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanka	Ispanija
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valensija	Ispanija
Swedish University of Agricultural Sciences	Upsala	Švedija

<sup>(1)</sup> Mokslininkai ryšiams palaikyti: žr. svetainę <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

## 2 priedėlis

**R. solanacearum išskyrimo ir auginimo terpė****a) Pagrindinė auginimo terpė***Mitybinis agaras (MA)*

Mitybinis agaras (Difco)	23,0 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

Ingredientus ištirpinti ir 15 minučių sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje.

*Mielių peptono gliukozės agaras (MPGA)*

Mielių ekstraktas (Difco)	5,0 g
„Bacto“ peptonas (Difco)	5,0 g
D(+) gliukozė (monohidratas)	10,0 g
„Bacto“ agaras (Difco)	15,0 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

Ingredientus ištirpinti ir 15 minučių sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje.

*Sacharozės peptono agaras (SPA)*

Sacharozė	20,0 g
„Bacto“ peptonas (Difco)	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25 g
„Bacto“ agaras (Difco)	15,0 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

pH 7,2–7,4

Ingredientus ištirpinti ir 15 minučių sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje.

*Kelmano tetrazolio terpė*

Kazamino rūgštys (Difco)	1,0 g
„Bacto“ peptonas (Difco)	10,0 g
Dekstrozė	5,0 g
„Bacto“ agaras (Difco)	15,0 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

Ingredientus ištirpinti ir 15 minučių sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje.

Atvėsinti iki 50 °C ir pripilti steriliai perfiltruoto 2,3,5-trifeniltetrazolio chlorido (Sigma) tirpalo, kad galutinė koncentracija siektų 50 mg/l.

**b) Patvirtinta selektyvi auginimo terpė***SMSA terpė (Englebrecht, 1994, modifikuota Elphinstone et al., 1996)**Pagrindinė terpė*

Kazamino rūgštys (Difco)	1,0 g
„Bacto“ peptonas (Difco)	10,0 g
Glicerolis	5,0 ml
„Bacto“ agaras (Difco); žr. 2 pastabą.	15,0 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

Ingredientus ištirpinti ir 15 minučių sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje.

Atvėsinti iki 50 °C ir įpilti šių ingredientų tirpalų, prieš tai juos steriliai perfiltravus, kad būtų gautos nurodytos galutinės koncentracijos:

Kristalvioleto (Sigma)	5 mg/l
Polimiksino B sulfato	(Sigma P-1004) 600 000 U/l (apytiksliai 100 mg)
Bacitracino (Sigma B-0125)	1 250 U/l (apytiksliai 25 mg)
Chloramfenikolo (Sigma C-3175)	5 mg/l
Penicilino G (Sigma P-3032)	825 U/l (apytiksliai 0,5 mg)
2,3,5-trifeniltetrazolio chlorido (Sigma)	50 mg/l

#### PASTABA.

1. Jei naudojami reagentai, kurie skiriasi nuo pirmiau išvardytųjų, jie gali turėti įtakos *R. solanacearum* augimui.
2. Oksoid-agarą #1 galima naudoti vietoj „Bacto“ agaro (Difco). Šiuo atveju *R. solanacearum* augs lėčiau, nors konkuruojančių saprofitų augimą taip pat galima sumažinti. Tipiškų *R. solanacearum* kolonijų susidarymas užtruks 1–2 dienas ir raudona kolonijų spalva gali būti šviesesnė nei Bacto-agaro terpėje augančių kolonijų.
3. Padidinus bacitracino koncentraciją iki 2 500 V/l, konkuruojančių bakterijų populiacijų skaičius gali sumažėti, nepadarant įtakos *R. solanacearum* augimui.

Terpę ir antibiotikų koncentruotus tirpalus saugoti 4 °C temperatūroje tamsoje ir sunaudoti per vieną mėnesį.

Prieš naudojimą lėkštelių paviršiuje neturi būti vandens lašelių.

Vengti perteklinio plokštelių perdžiovinimo.

Kokybės kontrolę reikėtų atlikti paruošus kiekvienos naujos partijos terpę ir, pasėjus į ją *R. solanacearum* etaloninio štamo ląstelių suspensijos (žr. 3 priedėlį), pasibaigus 2–5 dienų trukmės inkubacijai 28 °C temperatūroje, stebėti tipiškų kolonijų susidarymą.

#### c) Patvirtinta praturtinančioji terpė

SMSA buljonas (Elphinstone et al., 1996)

Ruošti taip pat, kaip ir SMSA selektyvią agaro terpę, tik neįdedant „Bacto“ agaro ir 2,3,5-tetrazolio chlorido.

Modifikuotas Wilbrink buljonas (Caruso et al., 2002)

Sacharozė	10 g
Proteazės peptonas	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g
NaNO <sub>3</sub>	0,25 g
Distiliuotas vanduo	1 l

15 minučių sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje ir atvėsinti iki 50 °C.

Antibiotikų koncentruotų tirpalų įpilama tiek, kiek pilama, ruošiant SMSA buljono terpę.

## 3 priedėlis

## A. Parduodama standartizuota kontrolinė medžiaga

## a) Bakterijų izoliatai

Toliau pateikiamus bakterijos izoliatas rekomenduojama naudoti kaip standartinę etaloninę medžiagą, taikomą kaip teigiamą kontrolinę medžiagą (1 lentelė) arba, siekiant išvengti kryžminių reakcijų, optimizuojant testus (2 lentelė). Visus štamus galima įsigyti:

1. Iš Nacionalinės augalų patogeninių bakterijų kolekcijos (NCPBP), esančios centrinėje mokslinėje laboratorijoje Jorke (Jungtinė Karalystė).
2. Iš Augalų apsaugos tarnybos kultūrų kolekcijos, esančios Vageninge (Nyderlandų Karalystė).
3. I Nacionalinės fitopatogeninių bakterijų kolekcijos, esančios Prancūzijos nacionaliniame žemės ūkio moksliniame institute (INRA) Anžere (Prancūzija).

1 lentelė. Etaloninių standartinių (SMT) *R. solanacearum* izoliatų rinkinys

NCPBP kodas	SMT #	Kiti kodai	Kilmės šalis	Biovarietetas
NCPBP 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egiptas	2
NCPBP 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turkija	2
NCPBP 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Anglija	2
NCPBP 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Kipras	2
NCPBP 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Švedija	2
NCPBP 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgija	2
NCPBP 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Nyderlandai	2
NCPBP 4157	66	LNPV 15.59	Prancūzija	2
NCPBP 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Portugalija	2
NCPBP 4160	69	IVIA-1632-2	Ispanija	2
NCPBP 4161	76	B3B	Vokietija	2
NCPBP 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	JAV	1
NCPBP 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Kosta Rika	1
NCPBP 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Kolumbija	2
NCPBP 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPBP 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brazilija	2T
NCPBP 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPBP 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Australija	3
NCPBP 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Šri Lanka	4
NCPBP 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipinai	4
NCPBP 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Kinija	5

(\*) Kaip standartinį etaloninį štamą naudoti *R. solanacearum* 2 biovarietetą (3 rasės).

Pastaba. Pirmiau pateiktų štamų autentiškumas garantuojamas, jei šie įsigijami tik iš autentiškos kultūrų kolekcijos.

2 lentelė. Serologiškai ar genetiškai giminingų bakterijų, naudojamų testų optimizavimui, standartinis etaloninis rinkinys

NCPPB kodas	SMT #	Kitas kodas	Identifikavimas
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> (1)
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> (1)
NCPPB 4164	—	CFBP 2227	<i>Burkholderia cepacia</i> (2)
NCPPB 4165	—	CFBP 2459	<i>Ralstonia pickettii</i> (2)
NCPPB 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	<i>Ralstonia pickettii</i> (1)
NCPPB 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	<i>Ralstonia</i> sp. (1)
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	<i>Burkholderia andropogonis</i> (1)
NCPPB 353	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia caryophylli</i> (1)
NCPPB 945	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia cepacia</i> (1)
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia glumae</i> (1)
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia plantarii</i> (1)
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	<i>Banana Blood Disease Bacterium</i> (1) (2) (3)
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	<i>Enterobacter</i> sp. (1)
NCPPB 4169	62	IPO 1695	<i>Enterobacter</i> sp. (1)
NCPPB 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (1) (2)
NCPPB 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	<i>Curtobacterium</i> sp. (1) (2)
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	<i>Pseudomonas</i> sp. (1)
NCPPB 4173	—	PD 2318	<i>Aureobacterium</i> sp. (2)
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	<i>Flavobacterium</i> sp. (1) (2)

(1) Atliekant serologinius testus (imunofluorescencinę arba imunofermentinę analizę) ir štamai gali kryžmiškai reaguoti su polikloniniais antikūnais.

(2) Štamai, kurių galima panaudoti padauginant kai kuriose laboratorijose PGR produktą, kurio dydis panašus į prognozuojamo produkto dydį, naudojant pradmenis OLI-1 ir Y-2 (žr. 6 priedėlį).

(3) Atrodo, kad štamai gali kryžmiškai reaguoti atliekant daugelį testų, tačiau žinoma, kad kryžminė reakcija įvyksta tiriant bananus Indonezijoje.

#### b) Paroduodama standartizuota kontrolinė medžiaga

Iš Nacionalinės augalų patogeninių bakterijų kultūrų kolekcijos (NCPPB) galima įsigyti šią standartizuotą kontrolinę medžiagą.

Atliekant visus testus kaip neigiamą kontrolę naudoti šalčiu išdžiovinto bulvių ekstrakto, gauto iš 200 sveikų bulvių stiebagumbių, nuosėdas.

Atliekant serologinius testus ir PGR kaip teigiamą kontrolę naudoti šalčiu išdžiovinto bulvių ekstrakto, gauto iš 200 sveikų bulvių stiebagumbių, turinčio  $10^3$ - $10^4$  ir  $10^4$ - $10^6$  *R. solanacearum* 2 biovareteto (štamai NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) ląstelių, nuosėdas. Kadangi džiovinimas šalčiu daro įtaką ląstelių gyvybingumui, šie ekstraktai nėra tinkama standartinė kontrolinė medžiaga atliekant išskyrimą biotestu.

Atliekant serologinius testus kaip teigiama kontrolė naudojamos *R. solanacearum* 2 biovareteto (štamai 156 = PD 2762 = CFBP 3857)  $10^6$  ląstelių/ml koncentracijos suspensijos, fiksuotos formalinu.

#### B. Pagrindinių atrankos testų PGR/IF ir FISH teigiamų ir neigiamų kontrolinių bandinių paruošimas

*R. solanacearum* 3 rasės/2 biovareteto virulentiškas štamai (pvz., NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) 48 valandas auginamas SMSA terpėje ir suspenduojamas 10 mM fosfatiniame buferiniame tirpale, kad ląstelių tankis siektų apie  $2 \times 10^8$  ksv/ml. Paprastai gaunama šiek tiek drumsta suspensija, kurios optinis tankis, matuojant 600 nm bangų ilgio spektre, siekia 0,15.

Kūgio formos gabaliukai išpjaunami iš 200 stiebagumbių, kurie, kaip žinoma, neužkrėsti *R. solanacearum*.

Kūgio formos gabaliukai susmulkinami kaip įprasta ir gautos nuosėdos pakartotinai suspenduojamos 10 ml.

Į kiekvieną iš dešimties 1,5 ml tūrio miniatiūrinių mėgintuvėlių įpilama po 900 µl pakartotinai suspenduotų nuosėdų.

100 µl *R. solanacearum* suspensijos įpilama į pirmąjį miniatiūrinį mėgintuvėlį. Suplakama.

Naudoti dešimtinius užkrato praskiedimus, santykiu 1:10, atliekant praskiedimus penkiuose paskesniuose miniatiūriniuose mėgintuvėliuose.

Šeši miniatiūriniai mėgintuvėliai su užkratu bus naudojami kaip teigiami kontroliniai bandiniai. Keturi miniatiūriniai mėgintuvėliai be užkrato bus neigiami kontroliniai bandiniai. Šie mėgintuvėliai atitinkamai paženklinami.

Į sterilius 1,5 ml tūrio miniatiūrinius mėgintuvėlius įpilama po 100 µl alikvotinių dalių ir gaunama po 9 kiekvieno kontrolinio bandinio pakartojimus, iki panaudojimo saugomus – 16– 24 °C temperatūroje.

Atliekant IF testą, *R. solanacearum* buvimas ir kiekis pirmiausia nustatomi kontroliniuose bandiniuose.

Atliekant kiekvienos serijos tiriamųjų bandinių PGR testą, DNR išskiriama tiek iš teigiamų, tiek iš neigiamų kontrolinių bandinių.

Atliekant kiekvienos serijos tiriamųjų bandinių IF ir FISH testą, tiriami ir teigiami, ir neigiami kontroliniai bandiniai.

Atliekant IF, FISH ir PGR testus, *R. solanacearum* būtina aptikti mažiausiai  $10^6$  ląstelių ir esant  $10^4$  ląstelių/ml tankiui tik teigiamuose kontroliniuose bandiniuose, o ne neigiamuose kontroliniuose bandiniuose.

## 4 priedėlis

**Buferiniai tirpalai tyrimui**

**BENDRA PASTABA:** Neatidarius talpyklų, buferinius tirpalus galima saugoti iki vienerių metų.

**1. Buferiniai tirpalai išskyrimui**

## 1.1. Išskyrimo buferinis tirpalas (50 mM fosfatinis buferinis tirpalas, pH 7,0)

Šis buferinis tirpalas naudojamas bakterijai išskirti iš augalinės kilmės audinių homogenizacijos arba kratymo būdu.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (bevandenis)	4,26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

Ištirpinti ingredientus, patikrinti pH ir 15 minučių sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje.

Galima panaudoti šiuos papildomus junginius:

	<i>Naudojimo tikslas</i>	<i>Kiekis 1 litre</i>
Lubrolio dribsnius	Deflokuliantas (*)	0,5 g
DC (tiesioginio stingimo) silicio priešputis	Priešputis (*)	1,0 ml
Tetranatrio pirofosfatas	Antioksidantas	1,0 g
Polivinilpirolidonas-40000 (PVP-40)	PGR inhibitorių surišėjas	50 g

(\*) Naudoti išskiriant homogenizacijos metodu.

## 1.2. Buferinis tirpalas nuosėdoms suspenduoti (10 mM fosfatinis buferinis tirpalas, pH 7,2)

Šis buferinis tirpalas naudojamas bulvių stiebagumbių viršūnių kūgio formos gabaliukų ekstraktų pakartotiniam suspendavimui ir praskiedimui baigus nuosėdų koncentravimą centrifuguojant.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,4 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

Ištirpinti ingredientus, patikrinti pH ir 15 minučių sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje.

**2. Buferiniai tirpalai IF testui**

## 2.1. IF-buferinis tirpalas (10 mM fosfatinis buferinis druskos tirpalas (PBS), pH 7,2)

Šis buferinis tirpalas naudojamas antikūnų praskiedimams

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

Ištirpinti ingredientus, patikrinti pH ir 15 minučių sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje.

## 2.2. IF-buferinis tirpalas, turintis Tween

Šis buferinis tirpalas naudojamas plokštelėms plauti.

Įpilti 0,1 % Tween - 20 į IF buferinį tirpalą.

## 2.3. Fosfatinis buferinis glicerino tirpalas, pH 7,6

Šis buferinis tirpalas naudojamas kaip dengiamųjų stiklelių sukibimo su IF plokštelėmis skystis fluorescencijai sustiprinti.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	3,2 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,15 g
Glicerinas	50 ml
Distiliuotas vanduo	100 ml

Priešblukinančiu aktyvumu pasižyminčius sukibimą skatinančius tirpalus galima įsigyti prekyboje, pvz., komercinį tirpalą *Vectashield*<sup>®</sup> (Vector Laboratories) arba *Citifluor*<sup>®</sup> (Leica).

3. **Buferiniai tirpalai netiesioginei imun fermentinei analizei**

## 3.1. Dvigubos joninės jėgos plokštelės padengimo buferinis tirpalas, pH 9,6.

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6,36 g
NaHCO <sub>3</sub>	11,72 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

Ištirpinti ingredientus, nustatyti pH ir 15 minučių sterilizuoti autoklave 121 °C temperatūroje.

Kaip antioksidanto galima įpilti natrio sulfito (0,2 %), jei reikalaujama apsaugoti nuo oksiduotų aromatinių junginių susidarymo.

## 3.2. 10X fosfatinis buferinis tirpalas (PBS), pH 7,4

NaCl	80,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	29,0 g
KCl	2,0 g
Distiliuotas vanduo	1,0 l

## 3.3. PBS-Tween

10X PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Distiliuotas vanduo	895 ml

## 3.4. Antikūnų blokavimo buferinis tirpalas (privaloma paruošti šviežią)

10X PBS	10,0 ml
Polivinilpirolidonas-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Pieno milteliai	0,5 g
Distiliuotas vanduo	įpilti iki 100 ml



## 3.5. Šarminės fosfatazės substrato tirpalas, pH 9,8

Dietanolaminas	97 ml
Distiliuotas vanduo	800 ml

Sumaišyti ir, įpilant koncentruotos HCl, nustatyti pH 9,8.

Įpilti distiliuoto vandens iki 1 litro.

Ištirpinti 0,2 g  $MgCl_2$ .

Dvi 5 mg masės fosfatazės tabletes (Sigma) ištirpinti 15 ml tirpale.

4. **Buferiniai tirpalai dviejų antikūnų sluoksnių netiesioginei imunofermentinei analizei (DASI ELISA)**

## 4.1. Plokštelės padengimo buferinis tirpalas, pH 9,6.

$Na_2CO_3$	1,59 g
$NaHCO_3$	2,93 g
Distiliuotas vanduo	1 000 ml

Ištirpinti ingredientus ir nustatyti pH 9,6

## 4.2. 10X fosfatinis buferinis tirpalas(PBS) pH 7,2–7,4

NaCl	80,0 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$	4,0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	27,0 g
Distiliuotas vanduo	1 000 ml

## 4.3. PBS-Tween

10X PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Distiliuotas vanduo	950 ml

## 4.4. Substrato buferinis tirpalas, pH 9,8

Dietanolaminas	100 ml
Distiliuotas vanduo	900 ml

Sumaišyti ir, įpilant koncentruotos HCl, nustatyti pH 9,8.

---

## 5 priedėlis

**Užkrėtimo laipsnio nustatymas IF ir FISH testais**

1. Nustatyti tipišku fluorescuojančių ląstelių skaičiaus viename matymo laukelyje vidurkį (c).
2. Nustatyti tipišku fluorescuojančių ląstelių viename mikroskopu stebimos plokštelės matymo lauke langelių skaičių (C).

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

čia  $S$  = daug langelių turinčios plokštelės paviršiaus plotas

ir  $s$  = objektyvo laukelio paviršiaus plotas.

$$s = \pi^2/4G^2K^2, \quad \text{čia} \quad i = \text{lauko koeficientas (kinta nuo 8 iki 24 priklausomai nuo okuliario tipo),}$$
$$K = \text{vamzdelio koeficientas (1 arba 1,25),}$$
$$G = \text{objektyvo padidinimas (100 kartų, 40 kartų ir pan.).}$$

3. Nustatyti tipišku fluorescuojančių ląstelių pakartotinai suspenduotų nuosėdų viename mililitre skaičių (N)

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

čia  $y$  = pakartotinai suspenduotų nuosėdų tūris kiekviename langelyje

ir  $F$  = pakartotinai suspenduotų nuosėdų praskiedimo faktorius.

---

## 6 priedėlis

## Patvirtinta PGR darbo tvarka ir reagentai

*Pastaba.* Atliekant išankstinį testą turėtų būti pakartojamai aptinkama mažiausiai  $10^3$ - $10^4$  *R. solanacearum* ląstelių viename bandinio ekstrakto mililitre.

Atliekant išankstinį tyrimą auginant pasirinktą bakterijų štamų rinkinį taip pat neturėtų būti gaunama netikrųjų teigiamų rezultatų (3 priedėlis).

1. PGR darbo tvarka pagal Seal *et al.* (1993)

## 1.1. Oligonukleotidiniai pradmenys

Priekinis pradmuo OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'

Atvirkštinis pradmuo Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Numatomos padauginti *R. solanacearum* matricinės DNR dydis = 288 bp

## 1.2. PGR reakcinis mišinys

Reagentas	Reakcinis kiekis	Galutinė koncentracija
Sterilus YGV	17,65 µl	
10X PGR buferinis tirpalas (1) (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
dNTP mišinys (20mM)	0,25 µl	0,2 mM
Pradmuo OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1µM
Pradmuo Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1µM
Taq polimerazė (5 U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Bandinio tūris	2,0 µl	
Bendras tūris	25 µl	

(1) Metodas buvo patvirtintas naudojant Taq polimerazę, gautą iš Perkin Elmer (AmpliTaq) ir Gibco BRL.

## 1.3. PGR reakcijos sąlygos

Atlikti pagal šią programą:

- 1 ciklas: i) 2 minutės 96 °C temperatūroje (matricinės DNR denatūracija).  
 35 ciklai: ii) 20 sekundžių 94 °C temperatūroje (matricinės DNR denatūracija).  
 iii) 20 sekundžių 68 °C temperatūroje (pradmenų surišimas su matricine DNR).  
 iv) 30 sekundžių 72 °C temperatūroje (matricinės DNR kopijos ilginimas).  
 1 ciklas: v) 10 minučių 72 °C temperatūroje (galutinis ilginimas).  
 vi) laikyti 4 °C temperatūroje.

*Pastaba.* Ši programa optimizuota naudojant Perkin Elmer 9600 šiluminį reaktorių. Naudojant kitų modelių reaktorių, ii, iii ir iv ciklus galima pakeisti.

## 1.4. Padaugintos matricinės DNR restrikcinė analizė.

Padauginus *R. solanacearum* DNR, gauti PGR produktai buvo veikiami restriktaze Ava II inkubuoiant 37 °C temperatūroje ir buvo stebimas skirtingo ilgio restrikcinio fragmento polimorfizmas.

## 2. PGR metodika pagal Pastrik ir Maiss (2000)

### 2.1. Oligonukleotidiniai pradmenys

Priešakinis pradmuo Ps-1 5'-agt cga acg gca gcg ggg g-3'

Atvirkštinis pradmuo Ps-2 5'-ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca-3'

*R. solanacearum* matricinės DNR numatomos padauginti kopijos dydis = 553 bp.

### 2.2. PGR reakcinis mišinys

Reagentas	Reakcinis kiekis	Galutinė koncentracija
Sterilus YGV	16,025 µl	
10X PGR buferinis tirpalas (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
GSA (V frakcija) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP mišinys (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Pradmuo Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Pradmuo Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq polimerazė (5 V/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Bandinio tūris	5,0 µl	
Bendras tūris	25,0 µl	

(1) Metodai patvirtinti naudojant Taq polimerazę, gautą iš Perkin Elmer (AmpliTaq) ir Gibco BRL.

Pastaba. Iš pradžių optimizuota naudojant MJ Research PTC 200 šiluminį reaktorių ir Gibco Taq polimerazę.

Galima naudoti tos pačios koncentracijos Perkin Elmer AmpliTaq ir buferinį tirpalą.

### 2.3. PGR reakcijos sąlygos

Atlikti šią programą:

- 1 ciklas: i) 5 minutės 95 °C temperatūroje (matricinės DNR denatūracija).  
 35 ciklai: ii) 30 sekundžių 95 °C temperatūroje (matricinės DNR denatūracija).  
 iii) 30 sekundžių 68 °C temperatūroje (pradmenų surišimas su matricine DNR).  
 iv) 45 sekundės 72 °C temperatūroje (kopijos ilginimas).  
 1 ciklas: v) 5 minutės 72 °C temperatūroje (galutinis ilginimas).  
 vi) laikyti 4 °C temperatūroje.

Pastaba. Ši programa buvo optimizuota naudojant MJ Research PTC 200 šiluminį reaktorių. Naudojant kitų modelių reaktorius, ii, iii ir iv ciklus galima pakeisti.

### 2.4. Padaugintos matricinės DNR restrikinė analizė.

Padauginus *R. solanacearum* DNR gauti PGR produktai buvo veikiami restriktaze Taq I, 30 minučių inkubuojant 65 °C temperatūroje, ir buvo stebimas skirtingo ilgio restrikinio fragmento polimorfizmas. *R. solanacearum* padaugintos matricinės DNR fragmentą suskaldžius restriktazėmis, buvo gauti 457 bp ir 96 bp fragmentai.

## 3. Daugkartinės PGR naudojant vidinį PGR kontrolinį bandinį metodika (Pastrik, 2002)

### 3.1. Oligonukleotidiniai pradmenys

Priešakinis pradmuo RS-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Atvirkštinis pradmuo RS-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Priešakinis pradmuo NS-5-F 5'-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3'

Atvirkštinis pradmuo NS-6-R 5'-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3'

*R. solanacearum* matricinės DNR numatomos padauginti kopijos dydis = 718 bp (RS-pradmenų rinkinys)

E Vidinio kontrolinio bandinio - 18S rRNA - numatomas padaugintos matricinės DNR kopijos dydis = 310 bp (NS-pradmenų rinkinys).

## 3.2. PGR reakcinis mišinys

Reagentas	Reakcinis kiekis	Galutinė koncentracija
Sterilus YGV	12,625 µl	
10X PGR buferinis tirpalas <sup>(1)</sup> (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
GSA (V frakcija) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP mišinys (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Pradmuo RS-1-F (10µM)	2,0 µl	0,8 µM
Pradmuo RS-1-R (10µM)	2,0 µl	0,8 µM
Pradmuo NS-5-F (10µM) <sup>(2)</sup>	0,15 µl	0,06 µM
Pradmuo NS-6-R (10µM) <sup>(2)</sup>	0,15 µl	0,06 µM
Taq polimerazė (5V/µl) <sup>(1)</sup>	0,2 µl	1,0 U
Mėginio tūris	5,0 µl	
Bendras tūris	25,0 µl	

<sup>(1)</sup> Metodai patvirtinti naudojant Taq polimerazę, gautą iš Perkin Elmer (AmpliAq) ir Gibco BRL.

<sup>(2)</sup> Pradmenų NS-5-F ir NS-6-R koncentracijos buvo optimizuotos bulvių stiebagumbių viršūnių gabaliukų ekstraktą gavus homogenizavimo ir DNR išgryninus Pastriko metodu (Pastrik (2000)) (žr. VI akieanio A dalies 6.1 punkto a papunktį). Reagentų koncentracijas reikia pakartotinai optimizuoti, jei DNR išskiriama kratymo ar kitu metodu.

## 3.3. PGR reakcijos sąlygos

Atlikti šią programą:

- 1 ciklas: i) 5 minutės 95 °C temperatūroje (matricinės DNR denatūracija).
- 35 ciklai: ii) 30 sekundžių 95 °C temperatūroje (matricinės DNR denatūracija).  
 iii) 30 sekundžių 58 °C temperatūroje (pradmenų sujungimas su matricine DNR).  
 iv) 45 sekundės 72 °C temperatūroje (kopijos ilginimas).
- 1 ciklas: v) 5 minutės 72 °C temperatūroje (galutinis ilginimas).  
 vi) laikyti 4 °C temperatūroje.

*Pastaba.* Ši programa buvo optimizuota naudojant MJ Research PTC 200 šiluminį reaktorių. Naudojant kitų modelių reaktorius, ii, iii ir iv ciklus galima pakeisti.

## 3.4. Padaugintos DNR kopijos restrikinė analizė

Padauginus *R. solanacearum* DNR gauti PGR produktai buvo veikiami restriktaze *Bsm* I arba jos izomeru (*Mva* 1269 I) I, 30 minučių inkubuojant 65 °C temperatūroje, ir buvo stebimas skirtingo ilgio restrikinio fragmento polimorfizmas.

4. *R. solanacearum* biovarietetų atveju atliekamos PGR metodika (Pastrik et al, 2001)

## 4.1. Oligonukleotidiniai pradmenys

Priešakinis pradmuo Rs-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'

Atvirkštinis pradmuo Rs-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'

Atvirkštinis pradmuo Rs-3-R 5'-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3'

Numatomas padauginti *R. solanacearum* matricinės DNR dydis:

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

naudojant Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp

## 4.2. PGR reakcinis mišinys

## a) 1/2 biovarieteto atveju atliekama PGR

Reagentas	Reakcinis kiekis	Galutinė koncentracija
Sterilus YPV	12,925 µl	
10X PGR buferinis tirpalas <sup>(1)</sup>	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
GSA (V frakcija) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-NTP mišinys (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Pradmuo Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Pradmuo Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq polimerazė (5V/µl) <sup>(1)</sup>	0,2 µl	1 U
Mėginio tūris	5,0 µl	
Bendras tūris	25,0 µl	

<sup>(1)</sup> Metodai buvo patvirtinti naudojant Taq polimerazę, gautą iš Perkin Elmer (AmpliTaq) ir Gibco BRL.

## b) 3/4/5 biovarieteto atveju atliekama PGR

Reagentas	Reakcinis kiekis	Galutinė koncentracija
Sterilus YPV	14,925 µl	
10X PGR buferinis tirpalas <sup>(1)</sup>	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
GSA (V frakcija) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP mišinys (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Pradmuo Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Pradmuo Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq polimerazė (5V/µl) <sup>(1)</sup>	0,2 µl	1 U
Mėginio tūris	5,0 µl	
Bendras tūris	25,0 µl	

<sup>(1)</sup> Metodai patvirtinti naudojant Taq polimerazę, gautą iš Perkin Elmer (AmpliTaq) ir Gibco BRL.

## 4.3. PGR reakcijos sąlygos

Atlikti šią programą 1/2 ir 3/4/5 biovarietetų atveju:

- 1 ciklas: i) 5 minutės 95 °C temperatūroje (matricinės DNR denatūracija).  
 35 ciklas: ii) 30 sekundžių 95 °C temperatūroje (matricinės DNR denatūracija)  
 iii) 30 sekundžių 58 °C temperatūroje (pradmenų sujungimas su matricine DNR)  
 iv) 45 sekundės 72 °C temperatūroje (kopijos ilginimas)  
 1 ciklas: v) 5 minutės 72 °C temperatūroje (galutinis ilginimas)  
 vi) laikyti 4 °C temperatūroje

*Pastaba.* Ši programa buvo optimizuota naudojant MJ Research PTC 200 šiluminį reaktorių. Naudojant kitų modelių reaktorių, ii, iii ir iv ciklus galima pakeisti.

## 4.4. Padaugintos DNR kopijos restriktinė analizė

*R. solanacearum* padaugintos DNR gauti PGR produktai, gauti naudojant pradmenis Rs-1-F ir Rs-1-R, buvo veikiami restriktaze Bsm I arba jos izomeru (pvz., Mva 1269 I) 30 minučių inkubuojant 65 °C temperatūroje ir buvo stebimas skirtingo ilgio restriktinio fragmento polimorfizmas.

**5. Užpildo buferinio tirpalo paruošimas****5.1. Bromfenolio mėlynasis (10 %-koncentruotas tirpalas)**

Bromfenolio mėlynasis	5 g
Distiliuotas vanduo (perdistiliuotas)	50 ml

**5.2. Užpildo buferinis tirpalas**

Glicerinas (86 %)	3,5 ml
Bromfenolio mėlynasis (5,1)	300 µl
Distiliuotas vanduo (perdistiliuotas)	6,2 ml

**6. 10X Tris acetatinis buferinis tirpalas EDTA (TAE) buferinis tirpalas, pH 8,0**

Tris buferinis tirpalas	48,40 g
Ledinė acto rūgštis	11,42 ml
EDTA (di-natrio druska)	3,72 g
Distiliuotas vanduo	1,00 l

Vienąkart praskiesti prieš naudojimą.

Taip pat galima įsigyti (*Invitrogen* ar panašioje bendrovėje).

---

## 7 priedėlis

## Patvirtinti reagentai FISH testui

## 1. Oligonukleotidiniai bandiniai

*R. solanacearum*-specifinis bandinys OLI-1-CY3: 5'-ggc agg tag caa gct acc ccc-3'

Nespecifinis *Eubacteriaceae* bandinys EUB-338-FITC: 5'-gct gcc tcc cgt agg agt-3'

## 2. Fiksavimo tirpalas

(DĖMESIO! FIKSAVIMO TIRPALE YRA NUODINGO PARAFORMALDEHIDO. DIRBDAMI MŪVĖKITE PIRŠTINES IR NEĮKVĖPKITE. REKOMENDUOJAMA DIRBTI TRAUKOS SPINTOJE)

- i) 9 ml molekulinės biologijos darbams skirto vandens (pvz., ypač gryno vandens (YGV)) pakaitinti 60 °C temperatūroje ir pridėti 0,4 g paraformaldehido. Paraformaldehidas ištirpsta įdėjus 5 lašus 1N NaOH ir maišant magnetine maišykle.
- ii) Įdėjus 1 ml 0,1 M fosfatinio buferinio tirpalo (FB; pH 7,0) ir 5 lašus 1N HCl, nustatomas pH 7,0. Patikrinti pH indikatorinėmis juostelėmis ir nustatyti pH, pridendant HCl arba NaOH. (DĖMESIO! NENAUDOTI PH MATAVIMO PRIETAISO, JEI NAUDOJAMI PARAFORMALDEHIDO TURINČIUOSE TIRPALUOSE)
- iii) Kol bus vėliau naudojamas, tirpalą filtruoti 0,22 µm membraniniu filtru ir saugoti nuo dulkių 4 °C temperatūroje.

## 3. 3X Hybmix tirpalas

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (filtruotas steriliu filtru ir sterilizuotas autoklave)	15 mM

Kaip reikalaujama, praskiesti 1 kartą.

## 4. Hibridizavimo darbinis mišinys

1 kartą koncentruotas Hybmix

Natrio dodecilsulfatas (SDS)	0,01 %
Formamidas	30 %
Bandinys EUB 338	5 ng/µl
Bandiniai OLI-1 arba OLI-2	5 ng/µl

Pagal 1 lentelėje pateikiamus apskaičiavimus paruošti hibridizavimo mišinio kiekius. Kiekvienos plokštelės (į kurios duobutes įpilama po 2 skirtingus bandinius su pakartojimais) reikia 90 µl hibridizavimo mišinio. (DĖMESIO! FORMAMIDAS LABAI NUODINGAS, TODĖL MŪVĖKITE PIRŠTINES IR IMKITĖS ATITINKAMŲ SAUGUMO PRIEMONIŲ!)

1 Lentelė Siūlomi kiekiai hibridizavimo mišiniui paruošti

Plokštelių skaičius	1	4	6	8	10
Sterilus YGV	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3x hybmix tirpalas	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamidas	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Mėginys EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Mėginys OLI-1 arba OLI-2 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Bendras tūris (µl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

Pastaba. Visus tirpalus, turinčius šviesai jautrių oligonukleotidinių bandinių, saugoti tamsoje – 20 °C temperatūroje. Naudojimo metu saugoti nuo tiesioginės saulės šviesos ar elektros šviesos.



**5. 0,1 M fosfatinis buferinis tirpalas, pH 7,0**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,52 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,44 g
Distiliuotas vanduo	1,00 l

Ingredientai ištirpinami, patikrinamas pH, ir tirpalas 15 minučių sterilizuojamas autoklave 121 °C temperatūroje.

---

## 8 priedėlis

**Baklažano ir pomidoro kultūra**

Pomidoro (*Lycopersicon esculentum*) arba baklažano (*Solanum melongena*) sėklos pasodinamos pasterizuotame sėklų komposte. Daigai su visiškai išsiskleidusiomis sėklaskiltėmis (10–14 dienų) persodinami į vazonėlį su pasterizuotu kompostu.

Pomidorai arba baklažanai turi būti auginami šiltnamyje esant tokioms aplinkos sąlygoms:

dienos ilgumas:	14 valandų arba natūralus dienos ilgumas, jeigu diena ilgesnė;
temperatūra:	dienąnuo: 21 iki 24 °C, naktįnuo: 14 iki 18 °C.
Jautri užkrėtimui pomidorų veislė:	„Moneymaker“
Jautri užkrėtimui baklažanų veislė:	„Black Beauty“
Tiekėjas:	žr. svetainę <a href="http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main">http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main</a>

## NUORODOS

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Official Journal of the European Communities L235, 1-39.
3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology* 105; 373-380.
4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J.L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3634-3638.
5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1:113-121.
6. Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26; 663-678.
7. Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) *Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27; 265-277.
9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 69; 269-280.
10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. *J. Phytopathology* 146; 379-384.
11. Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18, 343-351.
12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14; 335-345.
13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44; 693-695.
14. Klement Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.
16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne *et al.*, (eds). *Klewer Academic Publishers*. pp. 117-121.
17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295.
18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85; 528-536.
19. Opina, N., F. Taverne, G. Holloway, J.-F. Wang, T.-H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5; 19-33.
20. Pstrik, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathology* 148; 619-626.
21. Pstrik, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. *European Journal of Plant Pathology* 108, 831-842.
22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67-79.

23. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota: 373 pp.
  24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139: 1587-1594.
  25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61; 4262-4268.
  26. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281-295.
  27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 46; 10-15.
  28. Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigallet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.
  29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative fluorescent 5' nuclease TaqMan assay. Applied and Environmental Microbiology 66; 2853-2858.
  30. Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse and A.D.L. Akkermans. 1998. Detection of *R. solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4546-4554.
-

## III PRIEDAS

1. Kiekvienu įtariamu atveju, kai buvo gautas išvardytos augalinės kilmės medžiagos atrankos testo teigiamas rezultatas, ir visais kitais atvejais, taikant II priede išdėstytus metodus ir baigus šį tyrimą, laukiant patvirtinimo arba paneigimo, reikia atskirti ir tinkamai užkonservuoti:

- visus atrinktus stiebagumbius ir, jei įmanoma, visus atrinktus augalus,
- bet kurį likusį ekstraktą ir atrankos testui paruoštą papildomą medžiagą, pvz., imunofluorescencines skaidres,  
ir
- visus atitinkamus dokumentus,

Atskyrus stiebagumbius, tam tikrais atvejais bus galima ištirti įvairias veisles.

2. Jeigu organizmo buvimas patvirtinamas, mažiausiai vieną mėnesį nuo pranešimo 5 straipsnio 2 dalyje nurodyta tvarka reikia atskirti ir tinkamai užkonservuoti:

- visą 1 dalyje minėtą medžiagą,  
ir
  - užkrėstos pomidorų ar baklažanų medžiagos bandinį, kuris buvo inokuliuotas stiebagumbio arba augalo ekstraktu,  
ir
  - išskirtą organizmo kultūrą.
-

## IV PRIEDAS

Atliekant 5 straipsnio 1 dalies a punkto i papunktyje nurodytą tyrimą, reikia tirti:

- i) produkcijos gamybos vietas,
- ar auginamos arba augintos bulvės kloniniais ryšiais yra susijusios su bulvėmis, kuriose organizmas buvo aptiktas,
  - ar auginami arba auginti pomidorai yra kilę iš to paties šaltinio, kaip ir organizmu užkrėsti pomidorai,
  - ar auginamos arba augintos bulvės ar pomidorai buvo oficialiai kontroliuojami, įtarus organizmo buvimą,
  - ar auginamos arba augintos bulvės, kurios kloniniais ryšiais susijusios su bulvėmis, augintomis produkcijos vietose, kurios, kaip patvirtinta, užkrėstos organizmu,
  - ar bulvės arba pomidorai yra auginami šalia užkrėstų produkcijos vietų, įskaitant tokias produkcijos vietas, kuriose tiesiogiai arba tarpininkaujant tiekėjui yra naudojamos ta pačia įranga ir tomis pačiomis patalpomis,
  - ar drėkinimui ir laistymui skirtas paviršinis vanduo gaunamas iš šaltinio, kuris, kaip patvirtinta arba įtariama, yra užkrėstas organizmu,
  - ar drėkinimui ir laistymui skirtas paviršinis vanduo gaunamas iš šaltinio, kuris naudojamas ir užkrėstų ar įtariamų užkrėtimu produkcijos vietų drėkinimui arba laistymui,
  - ar produkcijos vieta užtvindyta arba buvo užtvindyta paviršiniu vandeniu, kuris, kaip patvirtinta ar įtariama, užterštas organizmu;
- ir
- ii) ar drėkinimui ir laistymui naudojamas paviršinis vanduo, ar kuriuo buvo užtvindytas (-ti) laukas (-ai) arba produkcijos vieta (-os), kurie (-ios), kaip patvirtinta, užkrėsti (-os) organizmu.
-

## V PRIEDAS

1. Nustatant galimo užkrėtimo mastą pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto iii papunktį ir 5 straipsnio 1 dalies c punkto iii papunktį, reikia tirti:
  - nurodytą augalinės kilmės medžiagą, auginamą produkcijos vietoje, pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto ii papunktį laikomą užkrėsta,
  - gamybos vietą (-as), kurioje yra gamybos grandis, susijusi su nurodyta augaline medžiaga, kuri pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto ii papunktį laikoma užkrėsta, įskaitant tas, kur tiesiogiai arba tiekėjui tarpininkaujant per tą patį tiekėją yra dalijamasi gamybos įranga ir priemonėmis,
  - nurodytą augalinės kilmės medžiagą, gautą pirmesnėje įtraukoje nurodytoje produkcijos vietoje arba esančią tokioje auginimo vietoje tuo laikotarpiu, kai nurodyta augalinė medžiaga, pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto ii papunktį laikoma užkrėsta, buvo pirmojoje įtraukoje nurodytose auginimo vietose,
  - patalpas, kuriose laikoma nurodyta augalinė medžiaga iš pirmesnėje įtraukose minėtų auginimo vietų,
  - bet kokią techniką, transporto priemonę, laivą, saugyklą arba jo dalis ir kitus objektus, įskaitant pakuotę, kurie galėjo turėti sąlytį su nurodyta augaline medžiaga, kuri laikoma užkrėsta pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto ii papunktį,
  - bet kokią sandėliuojamą augalinę medžiagą arba turėjusią sąlytį su bet kuria saugykla ar objektu minimu pirmesnėje įtraukoje iki jų išvalymo ir dezinfekavimo,
  - taip pat, atlikus tyrimą ir testavimą pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto i papunktį, ir ištyrus bulvių stiebagumbius arba bulvių augalus, susijusius seseriniais ar motininiais kloniniais ryšiais, ir ištyrus pomidorų augalus, kilusius iš to paties šaltinio, iš kurio kilusi nurodyta augalinė medžiaga pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto ii papunktį laikoma užkrėsta ir kurie, kaip buvo nustatyta, neužkrėsti organizmu, tačiau užkrėtimo galimybė dėl kloninės kilmės yra didelė. Galima tirti veislių užkrėstų ir klonavimu susijusių stiebagumbių ar augalų identitetui nustatyti,
  - produkcijos gamybos vietą (-as), kurioje (-se) yra pirmesnėje įtraukoje nurodyta augalinė medžiaga,
  - produkcijos gamybos vietą (-as), kurioje (-se) nurodytos augalinės medžiagos drėkinimui ar laistymui naudojamas vanduo, pagal 5 straipsnio 1 dalies c punkto ii papunktį laikomas užkrėstu,
  - nurodytą augalinę medžiagą, išaugintą laukuose, užtvindytuose paviršiniu vandeniu, kuris, kaip patvirtinta, yra užkrėstas.
2. Nustatant galimą išplitimą pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto iv papunktį ir 5 straipsnio 1 dalies c punkto iii papunktį, reikia tirti:
  - i) pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto iv papunktį nustatytais atvejais:
    - ar yra arti kitų produkcijos gamybos vietų, kuriose auginama nurodyta augalinė medžiaga,
    - sėklinių bulvių atsargų bendrąją produkciją ir vartojimą,
    - nurodytos augalinės medžiagos produkcijos gamybos vietas, kuriose augalinių medžiagų drėkinimui ar laistymui naudojamas paviršinis vanduo, ir kai kyla arba kilo pavojus dėl paviršinio vandens nutekėjimo arba produkcijos gamybos vietos, kuri pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto ii papunktį laikoma užkrėsta.

- ii) tais atvejais, kai paviršinis vanduo pagal 5 straipsnio 1 dalies c punkto ii papunktį laikomas užkrėstu:
- produkcijos vietą (-as), kurioje (-iose) yra nurodyta augalinė medžiaga yra šalia arba jai (joms) gresia užtvindymo paviršiniu vandeniu, laikomu užkrėstu, pavojus,
  - bet kokį atskirą drėkinimo baseiną, susisiekiantį su laikomu užkrėstu paviršiniu vandeniu,
  - vandens telkinius, susisiekiančius su laikomu užkrėstu paviršiniu vandeniu, atsižvelgiant į:
    - vandens, laikomo užkrėstu, srauto kryptį ir greitį,
    - laukinių bulvinių šeimos augalų šeiminių buvimą.
3. Pranešimui, minimam 5 straipsnio 2 dalies pirmojoje pastraipoje, priskiriama:
- nustačius organizmo buvimą I priede išdėstytais metodais testavimo laboratorijoje būdu, nedelsiant nurodoma bent:
    - bulvių atveju:
      - a) bulvių siuntos veislės pavadinimas,
      - b) bulvių tipas (skirtos parduoti, sėklinės ir pan.) ir prireikus, sėklinių bulvių kategorija,
    - pomidorų augalų atveju – siuntos veislės pavadinimas ir prireikus, kategorija;
  - nepažeisdama pranešimo apie įtariamą buvimą, nurodytą 4 straipsnio 3 dalyje, reikalavimų, valstybė narė, kurioje organizmo buvimas buvo patvirtintas, kilus išvardytų augalinės kilmės medžiagų, importuojamų į kitą valstybę (-es) narę (-es) arba eksportuojamų į kitą valstybę (-es) narę (-es), užkrėtimo pavojui, nedelsiant pateikia suinteresuotai (-oms) valstybei (-ėms) narei (-ėms) šią informaciją, būtiną atitikti 5 straipsnio 3 dalį:
    - a) bulvių arba pomidorų siuntos veislės pavadinimas,
    - b) krovinio siuntėjo ir krovinio gavėjo pavadinimas ir adresas,
    - c) bulvių arba pomidorų siuntos pristatymo diena,
    - d) pristatytos bulvių ar pomidorų siuntos dydis,
    - e) augalo paso kopija arba tam tikrais atvejais bent augalo paso numeris arba tam tikrais atvejais – augintojo arba prekiautojo registravimo numeris ir pranešimo apie pristatymą kopija.

Paruošus šią informaciją, nedelsiant pranešama Komisijai.

4. Papildomo pranešimo, nurodyto 5 straipsnio 2 dalies antrojoje pastraipoje, duomenys pateikiami tokia tvarka:

Baigus visus tyrimus, kiekvienu atveju pateikiama:

- a) užkrėtimo patvirtinimo diena,
- b) tyrimo, atlikto užkrėtimo šaltiniui ir galimam plitimui nustatyti, įskaitant bandinių ėmimo lygį, trumpas aprašymas,
- c) informacija apie identifikuotą arba tariamą užkrėtimo šaltinį (-ius),
- d) duomenys apie nustatyto užkrėtimo mastą, įskaitant produkcijos gamybos vietų skaičių, o bulvėms – siuntų skaičių, nurodant veislę, ir sėklinių bulvių atveju – kategoriją,



- e) duomenys apie teritorijos ribų nustatymą, įskaitant produkcijos gamybos vietų, laikomų neužkrėstomis, skaičių toje teritorijoje,
  - f) duomenys apie vandens tyrimą, nurodant vandens telkinio pavadinimą bei vietą ir draudimo laistymui ar drėkinimui mastą,
  - g) bet kurios pomidorų krovinio ar, siuntos laikomos užkrėsta, pažymėjimai, nurodyti Direktyvos 2000/29/EB 13 straipsnio 1 dalies ii punkte, ir paso numeris pagal Direktyvos 2000/29/EB V priedo A dalies I.2.2 skirsnį,
  - h) Komisijai pareikalavus, bet kokia kita informacija apie patvirtintą protrūkį.
-

## VI PRIEDAS

1. 6 straipsnio 1 dalyje nurodytos nuostatos yra šios:

- gyvūnų pašaro panaudojimas po terminio apdorojimo, laikantis nuostatos, kad nėra organizmo išlikimo pavojaus,  
  
ar
- sunaikinimas oficialiai tam tikslui patvirtintoje vietoje, kurioje nėra nustatytas pavojus, kad organizmas pateks į aplinką, pvz., nutekės į dirbamą žemės plotą arba vandens šaltinį, kuris gali būti panaudotas dirbamos žemės drėkinimui,  
  
ar
- sudeginimas,  
  
ar
- panaudojimas pramoniniam perdirbimui tiesiai ir skubiai pristatant į perdirbimo cechą, kuriame yra oficialiai patvirtinti atliekų sunaikinimo įrenginiai, nustačius, kad nėra organizmo išplitimo pavojaus ir kur yra taikoma sandėliavimo zonų bei išvykstančių transporto priemonių valymo ir dezinfekavimo sistema,  
  
arba
- kitos priemonės, jeigu užtikrinama, kad nėra organizmo išplitimo pavojaus; apie tokias priemones turi būti pranešta Komisijai ir kitoms valstybėms narėms.

Visos likusios atliekos, susijusios su pirmiau nurodytais atliekų šalinimo procesais, arba atsiradusios jų metu, yra pašalinamos oficialiai patvirtintais būdais pagal šios direktyvos VII priedo nuostatas.

2. 6 straipsnio 2 dalyje nurodyta augalinė medžiaga tinkamai panaudojama arba sunaikinama, suinteresuotų valstybių narių atsakingosioms oficialioms įstaigoms atitinkamai bendradarbiaujant, kad užtikrinti, jog tokią kontrolę ir patvirtinimą visada vykdo valstybės narės, kurioje bulvės supakuojamos arba perdirbamos, naudojant pirmoje ir antroje įtraukose minimus atliekų tvarkymo įrenginius:

- i) bulvių stiebagumbių atveju,
  - naudojama kaip maistinės bulvės, skirtos žmonėms suvartoti, supakuotos tiesioginiam pristatymui ir vartojamos neperpakuojant vietoje, kurioje naudojami atitinkami atliekų tvarkymo įrenginiai. Sėklinės bulvės gali būti tvarkomos toje pačioje vietoje, jei šitai atliekama atskirai, užbaigus valymą ir dezinfekavimą,  
  
ar
  - naudojama kaip maistinės bulvės, skirtos pramoniniam perdirbimui, ir tiesioginiam ir neatidėliotinam pristatymui į perdirbimo įmonę, kurioje yra tinkami atliekų tvarkymo įrenginiai arba taikoma bent išvykstančių transporto priemonių valymo ir dezinfekavimo sistema,  
  
arba
  - kitaip tinkamai panaudojama ar sunaikinama, nustačius, kad nėra organizmo išplitimo pavojaus ir patvirtinus minėtosioms atsakingosioms oficialioms įstaigoms.
- ii) kitų augalų dalių, įskaitant stiebo ir lapijos liekanas, atveju,
  - yra sunaikinamos,  
  
ar
  - kitaip panaudojamos ar pašalinamos, laikantis nuostatos, kad nebėra organizmo plitimo pavojaus nebėra ir kad gautas minėtų oficialių įstaigų patvirtinimas.

3. Tinkamais objektų, minimų 6 straipsnio 3 dalyje, valymo ir dezinfekavimo metodais laikomi tie, kurie nekelia organizmo išplitimo pavojaus ir taikomi prižiūrint atsakingoms oficialioms valstybių narių įstaigoms.
4. Priemonės, kurias valstybės narės įgyvendina pažymėtoje teritorijoje, nustatytoje pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto iv papunktį ir c punkto iii papunktį ir nurodytoje 6 straipsnio 4 dalyje, sudaro:
  - 4.1. produkcijos gamybos vietose, kurios laikomos užkrėstomis, remiantis 5 straipsnio 1 dalies a) punkto ii) papunkčiu:
    - a) lauke arba saugomame pasėlyje, kurie laikomi užkrėstais pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto ii papunktį, taikoma viena šių priemonių:
      - i) trumpiausiai per ketverius auginimo metus po nustatyto užkrėtimo,
        - imamasi priemonių, stengiantis išnaikinti savaime augančius bulvių ir pomidorų augalus ir kitus organizmo augalus šeiminius, įskaitant ir bulvinių šeimos piktžoles,
        - ir
        - nesodinami:
          - bulvių stiebagumbiai, augalai arba tikrosios sėklos,
          - pomidorų augalai arba sėklos,
          - atsižvelgiama į organizmo biologines ypatybes,
          - kiti augalai šeiminius,
          - *Brassica* rūšies augalai, kurių atveju kyla rimtas organizmo išlikimo pavojus,
          - pasėliai, kurių atveju kyla rimtas organizmo plitimo pavojus;
        - pirmąjį bulvių ar pomidorų auginimo sezoną, einantį po ankstesnėje įtraukoje apibūdinto laikotarpio, ir laikantis sąlygos, kad patikrinimo metu lauke nebuvo rasta savaime sudygstančių bulvių ar pomidorų augalų ar kitų natūraliai augančių organizmo augalų šeiminių, įskaitant ir bulvinių šeimos piktžoles, bent dvejus pastaruosius metus iki sodinimo, leidžiama auginti tik maistines bulves,
        - bulvių atveju leidžiama auginti tik prekinės bulves,
        - bulvių ir pomidorų atveju, surinkti bulvių stiebagumbiai arba prirėkus, pomidorų augalai tiriami II priede nurodyta tvarka,
        - bulvių ar pomidorų auginimo sezoną, einantį po ankstesnėje įtraukoje minimo sezono ir pasibaigus atitinkamam sėjomainos ciklui, kuris tęsiasi mažiausiai dvejus metus, jei ketinama auginti sėklinės bulves, atliekamas oficialus tyrimas, kaip apibūdinta 2 straipsnio 1 dalyje;
      - arba
      - ii) per penkerius metus nuo tų metų, kai buvo nustatytas užkrėtimas,
        - imamasi priemonių pašalinti savaime išsėjančius pomidorų ar bulvių augalus, o taip pat ir kitus natūraliai randamus organizmo augalus šeiminius, įskaitant bulvinių šeimos piktžolinius augalus
        - pasirenkamas laukas ir pirmuosius trejus metus, atsižvelgiant į pavojų, paliekamas pūdymui arba užsėjamas pasėliais arba skiriamas daugiametei ganyklai, kuri dažnai visiškai nupjaunama arba intensyviai ganoma arba skirta žolės sėklų produkcijai, o paskesnius dvejus metus užsėjamas augalais, kurie nėra organizmo šeiminius ir kurių atveju neįkyla organizmo išlikimo ar plitimo pavojus,

- pirmąjį bulvių ar pomidorų auginimo sezoną, einantį po ankstesnėje įtraukoje apibūdinto laikotarpio, ir laikantis sąlygos, kad oficialaus patikrinimo metu lauke nebuvo rasta savaime sudygstančių pomidorų, bulvių augalų bei bulvinių šeimos augalų ar kitų natūraliai augančių organizmo augalų šeiminių bent dvejus pastaruosius metus iki sodinimo,
  - bulvių atveju leidžiama auginti sėklines ir prekinės bulves,
  - surinkti bulvių stiebagumbiai arba, prireikus, pomidorų augalai tiriami II priede nurodyta tvarka;
- b) kituose užkrėstos produkcijos gamybos vietose laukuose laikantis sąlygos, kad atsakingosios oficialios įstaigos patvirtina natūraliai sudygstančių bulvių ar pomidorų augalų arba kitų natūraliai aptinkamų organizmo augalų šeiminių, įskaitant bulvinių šeimos piktžolinių augalų keliamos rizikos pašalinimą:
- kitais metais po užkrėtimo nustatymo:
    - jokie stiebagumbiai, augalai, tikrosios sėklos ar kiti natūraliai aptikti organizmo augalai šeiminiškai negali būti sodinami,arba
    - bulvių stiebagumbių atveju sertifikuotos sėklinės bulvės gali būti sodinamos tiktai maistui,
    - pomidorų augalų atveju iš sėklos, atitinkančios Direktyvos 2000/29/EB reikalavimus, išauginti pomidorų augalai, gali būti sodinami tik vaisių derliui gauti,
  - antraisiais auginimo metais po tų metų, kuriais buvo nustatytas užkrėtimas,
    - bulvių atveju, sėklai ar maistui leidžiama sodinti tik sertifikuotas sėklines bulves arba oficialiai patikrintas ruduoju puviniumi neužkrėstas sėklines bulves, vykdant oficialią auginimo vietų, išskyrus nurodytas 4.1 pastraipoje kontrolę,
    - pomidorų atveju, augalų daigams arba vaisių derliui gauti galima sodinti tik pomidorų augalus, išaugintus iš sėklos, atitinkančios Direktyvos 2000/29/EB reikalavimus, arba dauginant vegetatyviniu būdu iš pomidorų augalų, kurie išaugo iš tokios sėklos ir kurie buvo auginami vykdant oficialią auginimo vietų, išskyrus nurodytas 4.1 pastraipoje, kontrolę,
  - anksčiausiai trečiaisiais metais po užkrėtimo nustatymo,
    - bulvių atveju, sėklai arba maistui sodinamos tik sertifikuotos sėklinės bulvės arba sėklinės bulvės, užaugintos iš sertifikuotų sėklinių bulvių, atliekant oficialią kontrolę,
    - pomidorų atveju augalų daigams arba vaisių derliui gauti sodinami tik iš sėklos, atitinkančios Direktyvos 2000/29/EB reikalavimus, išauginti pomidorų augalai arba iš pastarųjų atliekant oficialią kontrolę išauginti pomidorų augalai,
  - kiekvienais auginimo metais, nurodytais pirmesnėse įtraukose, yra imamas priemonių siekiant pašalinti savaime sudygstančius bulvinių šeimos augalus ar kitus natūraliai augančius organizmo augalus šeiminius ir atitinkamu metu yra atliekamas auginamų pasėlių oficialus patikrinimas ir bulvių derliaus iš kiekvieno lauko oficialus patikrinimas pagal II priede pateiktą tvarką.
- c) nedelsiant po užkrėtimo nustatymo pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto ii papunktį ir kiekvienais paskesniais auginimo metais:
- visi mechanizmai ir sandėliavimo įranga auginimo vietoje ir susijusi su bulvių ar pomidorų produkcija, yra tinkamai valoma ir prireikus, dezinfekuojama atitinkamais metodais, kaip nurodyta 3 dalyje
  - drėkinimo ir laistymo programų oficiali kontrolė ir jų įgyvendinimo draudimas pradedamas taikyti prireikus, kad būtų apsaugoma nuo organizmo paplitimo,

- d) saugomo pasėlio gamybos dalyje, kuri laikoma užkrėsta pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto ii papunktį, kuriuose auginimo terpę galima visiškai pakeisti,
- jokie stiebagumbiai, augalai, tikrosios sėklos ar kiti organizmo augalai šeiminiškai, įskaitant pomidorų augalus ir sėklas, nesodinami, kol produkcijos gamybos vietoje nebus imtasi oficialiai prižiūrimų priemonių, skirtų išnaikinti bakteriją ir pašalinti visą bulvių ar kitą bulvinių šeimos medžiagą, tarp jų bent jau visiškai pakeisti auginamąją terpę, išvalyti ir dezinfekuoti gamybos vietą bei visą įrangą ir paskui iš atsakingųjų oficialių įstaigų gauti leidimą bulvių ar pomidorų produkcijai,
- ir
- bulvės auginamos iš sertifikuotų sėklinių bulvių arba iš minigumbų ar mikroaugalų, gautų pradinio dauginimo būdu,
  - pomidorai yra auginami iš sėklos, atitinkančios Direktyvos 2000/29/EB reikalavimus, arba, dauginant vegetatyviniu būdu iš pomidorų augalų, išaugintų iš tokios sėklos ir auginami atliekant oficialią kontrolę,
  - drėkinimo ir laistymo programų oficiali kontrolė ir jų įgyvendinimo draudimas pradedamas taikyti prireikus, kad būtų apsisaugoma nuo organizmo paplitimo.

#### 4.2. Pažymėtoje teritorijoje, nepažeisdamos priemonių, apibūdintų 4.1 dalyje, valstybės narės:

- a) nedelsdamos po nustatyto užkrėtimo užtikrina, kad visos bulvių arba pomidorų gamybai naudojamos saugojimo patalpos ir mašinos, kuriomis dirbama su bulvių ir pomidorų produkcija, turi būti atitinkamais metodais deramai valomos ir dezinfekuojamos, kaip nurodyta 3 pastraipoje,
- b) nedelsdamos ir mažiausiai tris auginimo sezonus po nustatyto užkrėtimo:
- ba) tais atvejais kai pažymėta teritorija buvo nustatyta pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto iv papunktį,
- užtikrina, kad jų atsakingosios oficialios įstaigos prižiūrėtų vietas ir patalpas, kur auginami, laikomi ir apdorojami bulvių stiebagumbiai ir pomidorai, taip pat patalpas, kur bulvių ir pomidorų apdorojimo mašinomis dirbama pagal sutartį,
  - reikalauja, kad toje teritorijoje būtų sodinamos tik sertifikuotos sėklos arba bulvių sodinimui skirtos sėklos, išaugintos, vykdančios oficialią kontrolę toje zonoje ir tiriamos po sėklai skirtų bulvių derliaus nuėmimo produkcijos gamybos vietose, kurios identifikuotos kaip galimai užkrėstos pagal 5 straipsnio 1 dalies a punkto iii papunktį,
  - reikalauja, kad būtų atskirai laikomos sėklinių bulvių atsargos nuo maistinių bulvių visuose toje teritorijoje esančiuose sandėliuose, arba tų sandėlių valymas ir dezinfekavimas, kur būtina, taikomas sėklinėms ir maistinėms bulvėms,
  - reikalauja sodinti tik tuos pomidorų augalus, kurie buvo išauginti iš Direktyvos 2000/29/EB reikalavimus atitinkančios sėklos arba dauginant vegetatyviniu būdu iš pomidorų augalų, išaugintų iš tokios sėklos atliekant oficialią visų tos zonos pomidorų augalų kontrolę,
  - atlieka oficialų tyrimą, kaip nurodyta 2 straipsnio 1 dalyje,
- bb) tais atvejais, kai pagal 5 straipsnio 1 dalies c punkto ii papunktį nustatoma, kad paviršinis vanduo užkrėstas arba per jį gali plisti organizmas, kaip numatyta V priedo 2 punkte,
- atitinkamu metu kasmet atlieka tyrimą, įskaitant paviršinio vandens ir tam tikrais atvejais bulvinių šeimos augalų šeiminių atitinkamuose vandens šaltiniuose bandinių ėmimą ir taikant II priede išdėstytus atitinkamus išvardytos augalinės medžiagos tyrimo metodus, skirtus ir kitiems atvejams,

- pradeda taikyti drėkinimo ir laistymo programų kontrolę, įskaitant draudimą išvardytos augalinės medžiagos ir tam tikrais atvejais augalų šeimininkų drėkinimui ir laistymui naudoti užkrėstą vandenį, siekiant išvengti organizmo plitimo. Šis draudimas gali būti atšaukiamas, remiantis kasmetinio tyrimo duomenimis ir panaikinant užkrėtimo statusą, jei oficialios įstaigos įsitikina, kad vanduo nebėra užkrėstas. Draudimą naudoti vandenį augalų šeimininkų drėkinimui ir laistymui, galima panaikinti, jei atliekama oficiali kontrolė, taikant oficialiai patvirtintus metodus, kuriais organizmas pašalinamas ir jo plitimas sustabdomas,
  - tais atvejais, kai vandens nuotėkiai užkrečiami, pradeda atlikti kietųjų arba skystųjų atliekų, turinčių išvardytos augalinės medžiagos ir ištekančių iš gamybinių perdirbimo ar pakavimo patalpų, oficialią kontrolę;
- c) tam tikrais atvejais parengia visų sėklinių bulvių atsargų reguliaraus pakeitimo programą per tam tikrą laikotarpį.
-

## VII PRIEDAS

Kad būtų išvengta nustatyto organizmo plitimo pavojaus, taikant VI priedo 1 dalyje nurodytus oficialiai patvirtintus atliekų šalinimo būdus yra laikomasi šių sąlygų:

- i) bulvių ir pomidorų atliekos (tarp jų ir netinkami pomidorai ir netinkamos bulvės bei lupenos) ir kitos kietosios su bulvėmis ir pomidorais susijusios atliekos (tarp jų ir dirvožemis, akmenys bei nuolaužos) yra pašalinamos:
- oficialiai tam tikslui patvirtintoje atliekų šalinimo vietoje, kurioje nėra nustatyto pavojaus, kad patogenai pateks į aplinką, pvz., nutekės į dirbamą žemės plotą ar kontaktuos su vandens telkiniu, kuris gali būti naudojamas dirbamos žemės laistymui. Atliekos yra saugiai pristatomos tiesiai į sąvartyną, užtikrinant, kad jokia jų dalis nebus pamesta,
  - arba
  - jas sudeginant,
  - arba
  - kitomis priemonėmis, jeigu užtikrinama, kad nėra bakterijos išplitimo pavojaus. Apie tokias priemones turi būti pranešta Komisijai ir kitoms šalims narėms.
- ii) skystos perdirbimo atliekos: prieš pašalinant skystas atliekas, savo sudėtyje turinčias kietų dalelių, šios dalelės pašalinamos filtruojant arba nusodinamos. Šios dalelės pašalinamos kaip nurodyta i pastraipoje.

Tuomet skystos atliekos pašalinamos vienu iš būdų:

- prieš pašalinant mažiausiai 30 minučių yra kaitinamos mažiausiai 60 °C temperatūroje, užtikrinant tokią temperatūrą visame jų tūryje,
- arba
- yra kitaip pašalinamos, oficialiai tam pritarus ir oficialiai patikrinus, kad nėra pavojaus atliekoms patekti į dirbamą žemę arba į vandens šaltinį, kuris gali būti naudojamas dirbamai žemei drėkinti. Apie atliekų pašalinimo būdą yra pranešama kitoms šalims narėms ir Komisijai.

Šiame priede pateikti pašalinimo būdai taip pat taikomi ir užkrėstų bulvių siuntų tvarkymo, pašalinimo ir perdirbimo atliekoms.”

---