

## **A. METODY DIAGNÓZY, DETEKCE A IDENTIFIKACE PŮVODCE KROUŽKOVITOSTI**

Předložené postupové diagramy popisují různé postupy, které jsou součástí:

- i) diagnózy kroužkovitosti v hlízách bramboru a rostlinách bramboru,
- ii) detekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ve vzorcích hlíz bramboru a rostlin bramboru,
- iii) identifikace *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

### **OBECNÉ ZÁSADY**

Optimalizované protokoly pro různé metody, validovaná činidla a podrobnosti pro přípravu testovaných a kontrolních materiálů jsou uvedeny v dodatcích. Seznam laboratoří, které se podílely na optimalizaci a validaci protokolů, je v dodatku č.1.

Protože protokoly obsahují zjištění karanténního organismu a zahrnují použití životaschopných kultur *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* jako kontrolních materiálů, je nutné pracovat za vhodných karanténních podmínek s odpovídajícím zařízením na odstraňování odpadů a za podmínek příslušných povolení vydaných rostlinolékařskou správou.

Testovací parametry musí zajistit stálé a reprodukovatelné zjištění úrovně *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* jako stanovené prahy vybraných metod.

Zcela nezbytná je příprava pozitivních kontrol.

Testování podle požadovaných prahů také zahrnuje správné nastavení, údržbu a kalibraci zařízení, pečlivé zacházení s činidly a jejich uchovávání a všechna opatření pro zamezení kontaminace mezi vzorky, např. oddělení pozitivních kontrol od testovaných vzorků. Musí být uplatněno standardní řízení kvality, aby se zabránilo administrativním a jiným chybám, zvláště při označování a v dokumentaci.

Podezření z výskytu, jak je uvedeno v § 4 odst.1, naznačuje pozitivní výsledek z diagnostických nebo screeningových testů provedených na vzorku, jak je znázorněno v níže uvedených postupových diagramech.

Pokud je první screeningový test (IF nebo PCR/FISH) pozitivní, existuje podezření na infekci původcem kroužkovitosti a musí být proveden druhý screeningový test. Pokud je i druhý screeningový test pozitivní, pak je podezření z výskytu potvrzeno a musí se pokračovat v testování podle daného schématu. Pokud je druhý screeningový test negativní, pak vzorek není považován za infikovaný původcem kroužkovitosti.

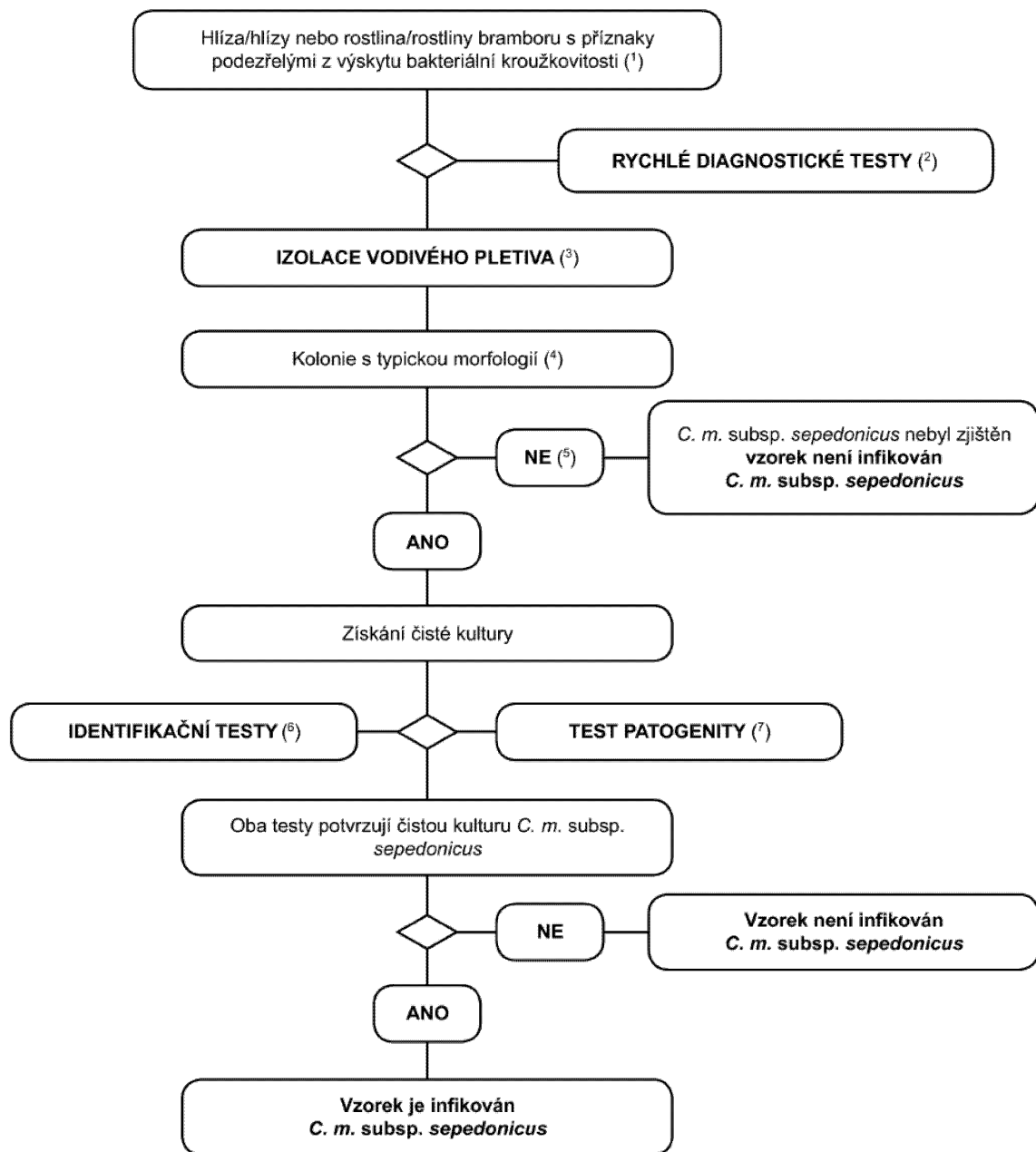
Z toho důvodu je pozitivní IF test podle § 4 odst. 1 definován jako pozitivní výsledek IF testu potvrzený druhým screeningovým testem (PCR/FISH).

Potvrzená přítomnost vyžaduje izolaci a identifikaci čisté kultury *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* s potvrzením patogenity.

## **1. Použití postupových diagramů**

### **1.1. Postupový diagram pro diagnózu bakteriální kroužkovitosti v hlízách bramboru a v rostlinách bramboru vykazujících příznaky bakteriální kroužkovitosti**

Postup testování je určen pro hlízy a rostliny bramboru s podezřením z výskytu nebo typickými příznaky kroužkovitosti. Zahrnuje rychlý screeningový test, izolaci patogenu z infikovaného vodivého pletiva na diagnostickém médiu a v případě pozitivního výsledku identifikaci kultury *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.



(1) Popis příznaků je v oddíle 2.

(2) Vhodné testy jsou: - IF test (oddíl 4),  
- PCR test (oddíl 6),  
- FISH test (oddíl 5).

(3) Ačkoli izolace patogena z rostlinného materiálu s typickými příznaky roztíráním suspenzí na média není komplikovaná, kultivace v pokročilých stádiích infekce se nemusí podařit. Saprophytické bakterie, které rostou na infikovaném pletivu, mohou přerůst nebo potlačovat patogena na izolačním médiu. Proto se doporučuje používat neselektivní i selektivní média, nejlépe MTNA (oddíl 8) nebo biotest (oddíl 7).

(4) Popis typické morfologie kolonie je v oddíle 8.

(5) Pokud je izolační zkouška negativní, ale příznaky choroby jsou typické, musí být izolace provedena znovu.

(6) Spolehlivé identifikace čisté kultury *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* se dosáhne za použití testů uvedených v oddílu 9.

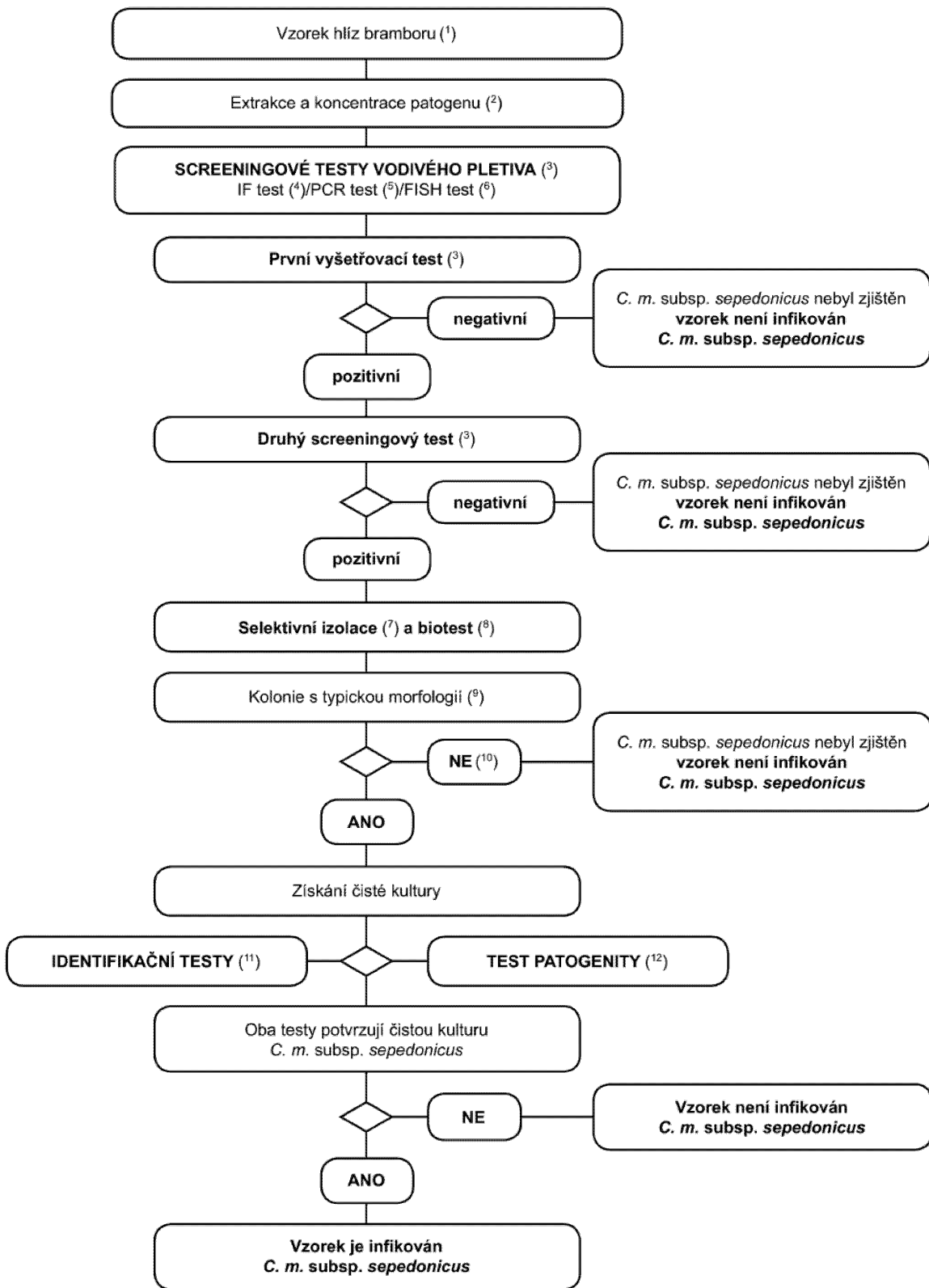
(7) Zkouška patogenity je popsána v oddíle 10.

## 1.2. Postupový diagram pro diagnózu bakteriální kroužkovitosti ve vzorcích bezpříznakových hlíz bramboru

Postup testování je určen ke zjištění latentních infekcí v hlízách bramboru. Pozitivní výsledek z nejméně dvou screeningových testů, z nichž každý je založen na jiném biologickém principu, musí být doplněn izolací patogena, a následně, v případě izolace typických kolonií, potvrzením, že čistá kultura je *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Pozitivní výsledek pouze jednoho screeningového testu není dostačující k tomu, aby byl vzorek považován za podezřelý.

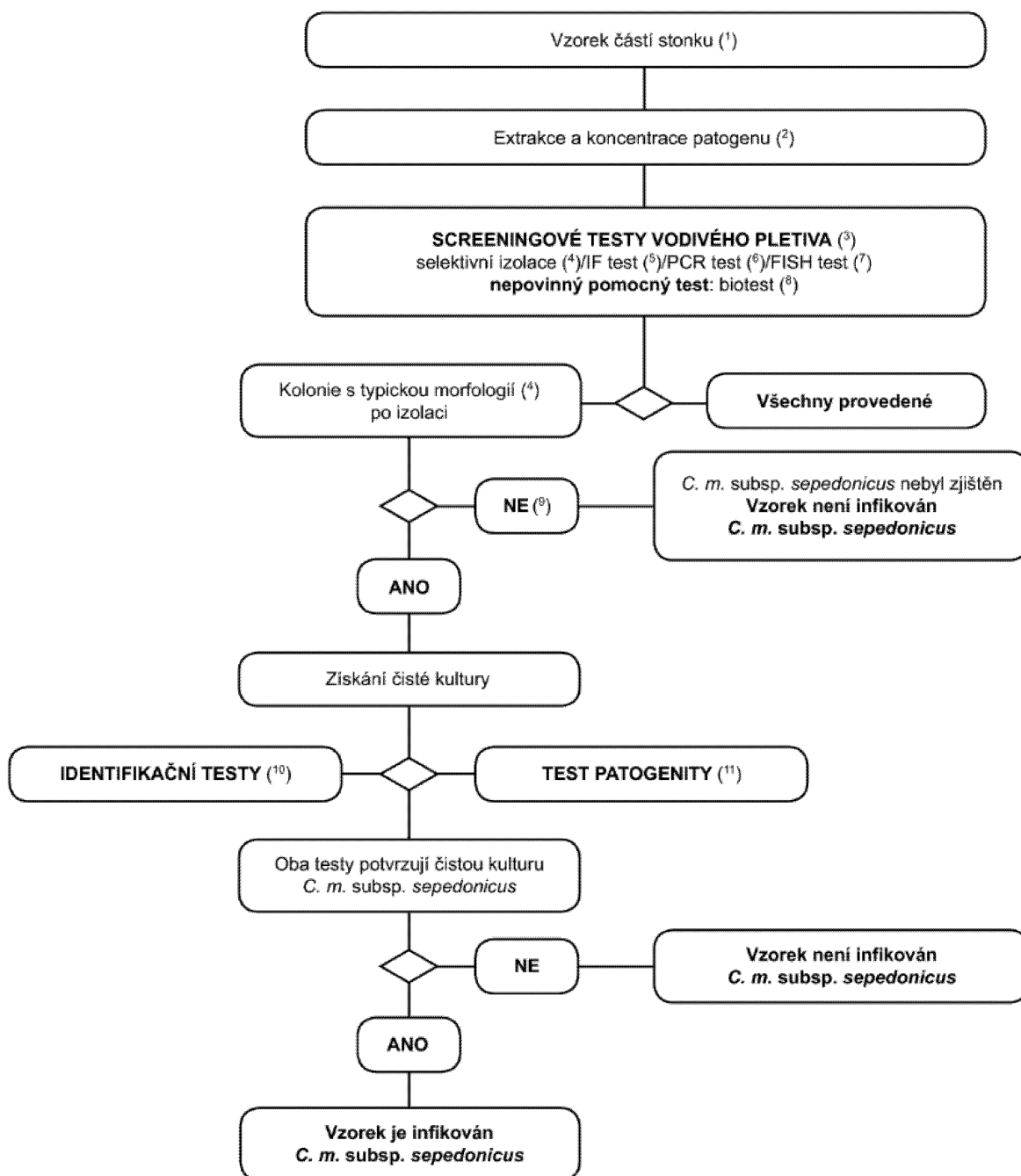
Screeningové a izolační testy musí umožnit detekční práh  $10^3$  až  $10^4$  buněk/ml resuspendované pelety zahrnutý jako pozitivní kontroly v každé sérii testů.





- (1) Standardní velikost vzorku je 200 hlíz, ačkoli postup lze použít i na menší počet, jestliže 200 hlíz není k dispozici.
- (2) Metody extrakce a koncentrace patogena jsou popsány v oddílu 3.1.
- (3) Pokud jsou alespoň dva testy založené na různých biologických principech pozitivní, musí být provedena izolace a potvrzení. Proveďte se nejméně jeden screeningový test. Pokud je tento test negativní, je vzorek považován za negativní. V případě, že je tento test pozitivní, je pro ověření prvního pozitivního výsledku nezbytný ještě jeden nebo více screeningových testů založených na různých biologických principech. Pokud je druhý nebo další test negativní, je vzorek považován za negativní. Další testy nejsou nutné.
- (4) Test imunofluorescence (IF).  
Pro vyšetření IF se vždy použije polyklonální protilátka, další monoklonální protilátky umožní větší přesnost (viz oddíl 4).
- (5) PCR test.  
Použijí se vhodná validovaná PCR činidla a protokoly (viz oddíl 6).
- (6) FISH test.  
Použijí se validovaná činidla a protokoly (viz oddíl 5).
- (7) Selektivní izolace.  
Toto může být v mnoha případech vhodná metoda pro přímou izolaci *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* za použití MTNA média nebo NCP-88 média a ředění resuspendované pelety 1/100. Typické kolonie lze získat během 3-10 dní po rozetření na médium. Kulturu patogena lze následně vyčistit a identifikovat. Pro úplné využití potenciálu test vyžaduje opatrnou přípravu pletiva z pupkové části, aby se omezily sekundární bakterie, které jsou konkurencí *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na médiu a které mohou patogena přerůst. Pokud se kultivační metoda takto nepodaří, musí být izolace provedena z rostlin použitých pro biotest (viz oddíl 8).
- (8) Biotest se používá k izolaci *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* z pelet bramborových extraktů pomocí selektivního obohacení v rostlinách lilku vejcoplodého (*Solanum melongena*). Test vyžaduje optimální inkubační podmínky stanovené pro tuto metodu. Bakteriální inhibitory *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na MTNA nebo NCP-88 médiu pravděpodobně tento test narušovat nebudou (viz oddíl 7).
- (9) Typická morfologie kolonie je popsána v oddílu 8.
- (10) Kultivace nebo biotesty mohou selhat z důvodů konkurence nebo inhibice saprofytickými bakteriemi. Pokud jsou výsledky screeningových testů pozitivní, ale izolační testy negativní, opakují se izolační testy ze stejné pelety nebo dodatečným odebráním vodivého pletiva z blízkosti pupkového konce hlíz stejného vzorku a v případě potřeby se provede test dalších vzorků.
- (11) Spolehlivá identifikace čistých kultur podezřelých na *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* se dosáhne použitím testů popsáných v oddílu 9.
- (12) Test patogenity je popsán v oddílu 10.

### 1.3. Postupový diagram pro diagnózu bakteriální kroužkovitosti ve vzorcích bezpříznakových rostlin bramboru



(1) Doporučené velikosti vzorků – viz oddíl 3.2.

(2) Metody extrakce a koncentrace patogenu jsou popsány v oddílu 3.2.

(3) Pokud jsou alespoň dva testy založené na různých biologických principech pozitivní, musí být provedena izolace a potvrzení. Provede se nejméně jeden screeningový test. Pokud je tento test negativní, je vzorek považován za negativní. V případě, že je tento test pozitivní, je pro ověření prvního pozitivního výsledku nezbytné provedení druhého nebo více screeningových testů založených na různých biologických principech. Pokud je druhý nebo další test negativní, je vzorek považován za negativní. Další testy nejsou nutné.

- (4) Selektivní izolační test a typická morfologie kolonie jsou popsány v oddílu 8.
- (5) IF test je popsán v oddílu 4.
- (6) PCR test je popsán v oddílu 6.
- (7) FISH test je popsán v oddílu 5.
- (8) Biotest je popsán v oddílu 7.
- (9) Kultivace nebo biotest mohou selhat z důvodů konkurence nebo inhibice saprofytickými bakteriemi. Pokud jsou výsledky screeningových testů pozitivní, ale izolační testy jsou negativní, opakují se izolační testy a v případě potřeby se provede test dalších vzorků.
- (10) Spolehlivé identifikace čistých kultur, u kterých je podezření, že se jedná o *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, se dosáhne pomocí testů popsaných v oddílu 9.
- (11) Test patogenity je popsán v oddílu 10.

## 2. Vizuální vyšetření na přítomnost příznaků kroužkovitosti

### 2.1. Rostliny bramboru

V evropských klimatických podmínkách se příznaky na poli zjistí jen zřídka a často pak až na konci sezóny. Kromě toho jsou příznaky skryté nebo se zamění s příznaky jiných chorob, stárí nebo mechanických poškození. Proto mohou být příznaky při kontrole na poli snadno přehlédnuty. Příznaky vadnutí jsou velmi odlišné od příznaků hnědé hniloby; vadnutí je obvykle pomalé a zpočátku omezené na okraje listů. Mladé infikované listy často i přes infekci nadále rostou, i když růst v infikovaných místech je omezený. Tím vznikají neobvykle tvarované listy. Listy postižené ucpáním vodivých pletiv na spodní části stonku často mají chlorotické, žluté až oranžové mezižební partie. Infikované děložní lístky, listy a dokonce stonky mohou eventuálně odumřít. Často jsou listy a hlízy pouze menší. Příležitostně jsou rostliny zakrnělé. Barevné snímky řady příznaků jsou na internetové stránce <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

### 2.2. Hlízy bramboru

Nejranějšími příznaky jsou slabá sklovitost nebo průsvitnost pletiva bez měknutí v okolí cévního systému, zejména blízko pupku. Prstenec svazků cévních na pupkovém konci hlízy může mít nepatrně tmavší zbarvení než obvykle. Prvním dobře identifikovaným příznakem je žlutavé zbarvení prstence cévních svazků a stav, kdy při jemném zmáčknutí hlízy vystupují z cév sloupky sýrovité hmoty. Tento exsudát obsahuje miliony bakterií. Vodivá pletiva mohou zhnědnout a příznaky na hlízách jsou v tomto stádiu podobné příznakům hnědé hniloby způsobené *Ralstonia solanacearum*. Zpočátku mohou být tyto příznaky omezeny na jednu část prstence, nemusí se vyskytovat jen blízko pupkové části a mohou se postupně šířit na celý prstenec. S postupem infekce dochází k destrukci vodivých pletiv: vnější korová část se může oddělit od vnitřní korové části. V pokročilých stádiích infekce se objevují na povrchu hlízy praskliny, často s červenohnědými okraji. V poslední době se v Evropě objevilo několik případů, kdy střední kůra hnije s prstencem svazků cévních, čímž dochází k druhotnému poškození se vznikem vnitřních dutin a nekrózy. Druhotná houbová nebo bakteriální infekce může příznaky maskovat a může být obtížné, ne-li nemožné, rozlišit pokročilé příznaky kroužkovitosti od jiných hnilob bramboru. Možné jsou i atypické příznaky. Barevné snímky řady příznaků jsou na internetové stránce <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

### 3. Příprava vzorků

#### 3.1. Hlízy bramboru

Poznámka:

- Standardní velikost vzorku je 200 hlíz na 1 test. Intenzivnější vzorkování vyžaduje více testů na vzorcích této velikosti. Větší množství hlíz ve vzorku vede k zpomalení nebo složitějšímu výkladu výsledků. Postup však lze vhodně použít i pro vzorky s méně než 200 hlízami, pokud je k dispozici menší množství hlíz.
- Validace všech níže uvedených zjišťovacích metod je založená na testování vzorků o velikosti 200 hlíz.
- Níže popsaný bramborový extrakt lze použít také pro zjištění původce hnědé hniloby, *Ralstonia solanacearum*.

Nepovinné ošetření před přípravou vzorku:

Hlízy se omyjí. Použijí se vhodné dezinfekční prostředky (s obsahem chlóru, jestliže má být proveden PCR test, pro odstranění možné patogenní DNA) a mycí prostředky mezi každým vzorkem. Hlízy se nechají oschnout na vzduchu. Tento postup mytí je obzvláště užitečný v případě, že je ve vzorku příliš zeminy a jestliže se má provádět PCR test nebo přímá izolace.

- 3.1.1. Pomocí čistého a dezinfikovaného skalpelu nebo nožem či škrabkou na brambory se odstraní slupka na pupkovém konci každé hlízy. Opatrně se vyříznou konické výkrojky vodivého pletiva z pupkových konců brambor. Na minimum se omezí nadbytečná část pletiva nezahrnující cévní svazky. Po odebrání musí být výkrojky z pupkových konců zpracovány do 24 hodin nebo konzervovány při -20 °C po dobu nejdéle dvou týdnů.

Všechny hlízy s podezřelými příznaky bakteriální kroužkovitosti se dají stranou a testují se odděleně.

Pokud jsou při vyříznutí výkrojku z pupkového konce zjištěny příznaky kroužkovitosti, provede se vizuální vyšetření této hlízy po naříznutí hlízy na pupkovém konci. Všechny naříznuté hlízy s podezřelými příznaky se nechají korkovatět po dobu 2 dnů při pokojové teplotě a uchovávají se v karanténě při teplotě 4 – 10 °C až do ukončení všech testů. Všechny hlízy ve vzorku se uchovávají podle přílohy č.2.

- 3.1.2. Výkrojky z pupkové části se shromáždí v nepoužitých nádobách na jedno použití, které jsou uzavíratelné a/nebo utěsnitelné (v případě, že jsou nádoby znovu používány, musí být důkladně vyčištěny a dezinfikovány prostředky s obsahem chlóru). Nejlépe je zpracovat výkrojky z pupkového konce okamžitě, pokud to není možné, uchovávají se v nádobě bez přidání pufu, v chladu po dobu maximálně 72 hodin nebo při pokojové teplotě maximálně 24 hodin. Schnutí a suberizace výkrojků a růst saprofytů v průběhu skladování může bránit zjištění přítomnosti bakterie způsobující kroužkovitost.

- 3.1.3. Výkrojky z pupkového konce se zpracují jedním z následujících postupů:

a) výkrojky se zalijí dostatečným množstvím (přibližně 40 ml) extrakčního pufu (dodatek 3) a třepají se v rotační třepačce (50-100 ot/min) po dobu 4 hodin při teplotě nižší než 24 °C nebo po dobu 16-24 hodin chlazené;

nebo

- b) výkrojky se homogenizují s dostatečným množstvím (přibližně 40 ml) extrakčního pufru (dodatek 3), buď v mixéru nebo rozdrčením v utěsněném jednorázovém maceračním sáčku za použití gumového tloučku nebo vhodného mlecího zařízení.

*Poznámka:*

Při homogenizaci vzorků za použití mixéru existuje vysoké nebezpečí křížové kontaminace vzorků. Je nutno učinit bezpečnostní opatření pro zamezení vzniku aerosolu nebo rozlití během extrakce. Pro každý vzorek musí být použita čerstvě sterilizovaná ostří (nože) a nádoby. Pokud má být použit PCR test, je nutno zamezit přenosu DNA na nádoby nebo mlecí zařízení, doporučuje se drcení v sáčcích na jedno použití a použití zkumavky na jedno použití.

- 3.1.4. Dekantuje se supernatant. Pokud je nadměrně zakalený, pročistí se buď pomalým odstředěním (při maximálně 180 g po dobu 10 minut při teplotě 4-10°C) nebo vakuovou filtrací (40-100µm), filtr se omyje přidávkem (10 ml) extrakčního pufru (dodatek 3).

- 3.1.5. Bakteriální frakce se zahustí odstředováním při 7000 g po dobu 15 minut (nebo 10 000 g po dobu 10 minut) při teplotě 4-10°C a odstraní se supernatant, aniž by se rozvířila peleta.

- 3.1.6. Resuspenduje se peleta v 1,5 ml peletového pufru (dodatek 3). Použije se 500 µl pro test na *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, 500 µl pro *Ralstonia solanacearum* a 500 µl pro referenční účely. Přidá se sterilní glycerol na konečnou koncentraci 10-25 % (v/v) k 500 µl referenční poměrné části a ke zbývajícím částem vzorku, promíchá se vířením a uloží při teplotě -16 až -24°C (týdny) nebo při teplotě -68 až -86°C (měsíce). Extrakty se během testování uchovávají při teplotě 4-10°C.

Opakované zmrazení a rozmrazení se nedoporučuje.

Pokud je nutný transport extraktu, zajistí se přeprava v chladícím boxu do 24 až 48 hodin.

- 3.1.7. Je nezbytně nutné, aby se se všemi pozitivními kontrolami a vzorky *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* zacházelo odděleně, aby se předešlo kontaminaci. To platí i pro sklíčka na IF testy a všechny testy.

## 3.2. Rostliny bramboru

*Poznámka:*

Pro zjištění latentních populací *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* se doporučuje kontrola kombinovaných vzorků. Postup je vhodný pro kombinované vzorky až 200 částí stonků. (Pokud se provádí podrobné průzkumy, měly by být založeny na statisticky reprezentativním vzorku rostlinné populace, která je předmětem vyšetřování.)

- 3.2.1 Pomocí čistého dezinfikovaného nože nebo zahradnických nůžek se odstraní část o velikosti 1-2 cm ze spodní strany každého stonku přímo nad povrchem země.

Části stonků se krátce dezinfikují etanolem 70 %, okamžitě osuší savým papírem a shromažďují v uzavřené sterilní nádobě.

- 3.2.2. Části stonků se zpracují jedním z následujících postupů:

- a) části se zalijí dostatečným množstvím (přibližně 40 ml) extrakčního pufru (dodatek 3) a třepají v rotační třepačce (50-100 ot/min) po dobu 4 hodin při teplotě nižší než 24 °C nebo po dobu 16-24 hodin chlazené,  
nebo
  - b) části se okamžitě rozdrtí v pevném maceračním sáčku s přiměřeným množstvím extrakčního pufru (dodatek 3) za použití gumového tloučku nebo vhodného mlecího zařízení. Pokud to není možné, skladují se části stonků v chladu maximálně 72 hodin nebo maximálně 24 hodin při pokojové teplotě.
- 3.2.3. Po usazení, které má trvat 15 minut, se dekantuje supernatant.
  - 3.2.4 Další purifikace extraktu nebo koncentrace bakteriální frakce obvykle není nutná, ale lze ji dosáhnout filtrací a/nebo odstředěním podle popisu v oddílu 3.1.3.-3.1.6.
  - 3.2.5 Čistý nebo koncentrovaný vzorkový extrakt se rozdělí na 2 stejné části, Jedna polovina se udržuje během testování při teplotě 4-10 °C a druhá polovina se skladuje s 10-25 % (v/v) sterilního glycerolu při teplotě -16 až -24 °C (týdny) nebo při teplotě -68 až -86 °C (měsíce), pokud je nutné další testování.

## 4. IF test

### PRINCIP

Doporučuje se použít IF test jako hlavní screeningový test, protože byla prokázána jeho schopnost dosáhnout požadovaných prahů.

Použije-li se jako hlavní screeningový test a jeho výsledek je pozitivní, musí být jako druhý screeningový test proveden test PCR nebo FISH. Jestliže se test IF použije jako druhý screeningový test a jeho výsledek je pozitivní, je pro dokončení analýzy nutné další testování podle postupového diagramu.

#### *Poznámka:*

Pokud je IF test používán jako hlavní vyšetřovací test, používá se vždy polyklonální protilátka. V případě pozitivního výsledku IF testu s polyklonální protilátkou může být další vyšetření vzorku s monoklonální protilátkou přesnější, ale méně citlivé.

Používají se protilátky proti známému kmenu původce kroužkovitosti - ATCC33113 (NCPPB 2137) nebo NCPPB 2140. Doporučuje se určovat titr pro každou novou řadu protilátek. Titr je stanoven jako nejvyšší ředění, při kterém dochází k optimální reakci při testování suspenze obsahující 105 až 106 buněk na 1 ml homologického kmene původce kroužkovitosti a při použití vhodného konjugátu fluorescenčního isothiokyanatanu (FITC) podle doporučení výrobce. Nepracované polyklonální nebo monoklonální protilátky by měly mít IF titr alespoň 1:2000. Během testu by se měly protilátky používat v pracovním ředění (WD) v blízkosti titru nebo na titru. Používají se validované protilátky (viz internetovou stránku <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Test se provádí na čerstvě připravených vzorkových extraktech. V případě potřeby může být úspěšně proveden na extraktech skladovaných při - 68 až - 86 °C v glycerolu. Glycerol lze ze vzorku odstranit přidáním 1 ml peletového pufru (dodatek 4), opětovným odstředěním po dobu 15 minut při 7 000 g a resuspenzí ve stejném množství peletového pufru. To často není nutné, zejména pokud jsou sklíčka se vzorky fixována plamenem (viz 4.2).

Připraví se oddělená pozitivní kontrolní sklíčka s homologickým kmenem nebo s jiným srovnávacím kmenem původce kroužkovitosti, suspendovaným ve výluhu z brambor podle dodatku 2 a nepovinně v pufru.

Pletivo infikované přirozenou cestou (uchovávané lyofilizací nebo zmrazením při teplotě -16 až -24 °C) by se mělo podle možnosti použít jako paralelní kontrola na stejném podložním sklíčku.

Jako negativní kontroly se použijí alikvotní části vzorkových extraktů, které byly předtím testovány s negativním výsledkem.

Použijí se mikroskopická sklíčka s více okénky, nejlépe s 10 okénky o průměru nejméně 6 mm.

Test kontrolního materiálu se provede stejným způsobem jako test vzorků.

#### 4.1. Sklíčka na test se připraví jedním z následujících postupů:

##### a) Pro pelety s relativně nízkým množstvím škrobového sedimentu:

Napipetuje se měřené standardní množství (pro okénka o průměru 6 mm je vhodné 15  $\mu$ l – pro větší okénka objem vyšší) roztoku resuspendované bramborové pelety 1/100 do prvního okénka. Následně se napipetuje stejné množství nezředěné pelety (1/1) do zbývajících okének v řadě. Druhou řadu lze použít jako duplikát nebo pro druhý vzorek podle obrázku 1.

##### b) Pro jiné pelety:

Připraví se desetinná ředění (1/10 a 1/100) resuspendované pelety v peletovém pufru. Napipetuje se měřené standardní množství (pro okénka o průměru 6 mm je vhodné 15  $\mu$ l – pro větší okénka objem vyšší) resuspendované pelety 1/100 a každého roztoku do řady okének. Druhou řadu lze použít jako duplikát nebo pro druhý vzorek podle obrázku 2.

#### 4.2. Vysuší se kapky při pokojové teplotě nebo zahřátím na teplotu 40 až 45 °C. Bakteriální buňky se fixují na sklíčko buď zahřátím (15 minut při teplotě 60 °C), nad plamenem nebo pomocí 95 % etanolu nebo podle zvláštních pokynů dodavatelů protilátek.

V případě potřeby lze potom fixovaná sklíčka před dalším použitím skladovat zmrazená v suchém boxu po co možná nejkratší dobu (maximálně 3 měsíce).

#### 4.3. Postup IF testu:

##### a) Podle přípravy sklíčka na test v oddílu 4.1 písm. a):

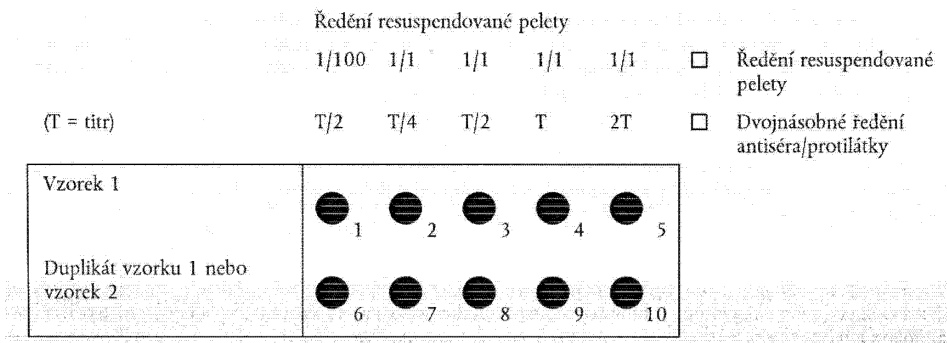
Připraví se sada dvojnásobných roztoků protilátky v IF pufru. V první jamce by měl být titr  $\frac{1}{2}$  (T/2), v ostatních titr  $\frac{1}{4}$  (T/4), titr  $\frac{1}{2}$  (T/2), titr (T) a dvojnásobný titr (2T).

##### b) Podle přípravy sklíčka na test v oddílu 4.1 písm. b):

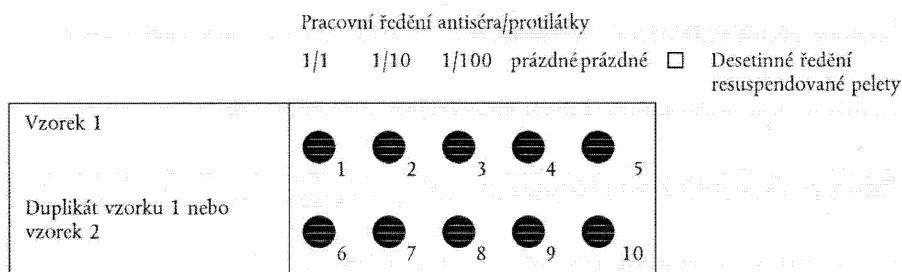
Připraví se pracovní ředění (WD) protilátky v IF pufru. Pracovní ředění ovlivňuje přesnost.



Obrázek 1: Příprava sklíčka na test podle oddílu 4.1. písm. a) a oddílu 4.3. písm. a)



Obrázek 2: Příprava sklíčka na test podle oddílu 4.1. písm. b) a oddílu 4.3 b)



4.3.1. Podložní sklíčka se uspořádají na navlhčený papír. Každé testovací okénko se pokryje kompletně ředěním protilátek. Množství protilátky na každém okénku musí být nejméně stejné jako množství použitého extraktu.

Pokud nejsou k dispozici konkrétní pokyny od dodavatele protilátek, postupuje se následovně:

4.3.2. Podložní sklíčka se inkubují na vlhkém papíře přikrytá po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18-25 °C).

4.3.3. Setřesou se kapky ze všech podložních sklíček a tato se pečlivě opláchnou pufrem IF. Umyjí se ponořením po dobu 5 minut v pufru IF Tween (dodatek 3) a následně v pufru IF. Je třeba zabránit vzniku aerosolu nebo přenosu kapiček, které by mohly způsobit vzájemnou kontaminaci, a pečlivě odstranit přebytečnou vlhkost jemným osušením.

4.3.4. Sklíčka se umístí na vlhký papír. Testovací okénka se pokryjí ředěním konjugátu FITC, kterým se stanovuje titer. Množství konjugátu naneseného do okének musí být stejné jako množství použité protilátky.

4.3.5. Zakrytá sklíčka se inkubují na vlhkém papíru po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18-25 °C).

4.3.6. Kapky konjugátu se setřesou ze sklíček a tato se opláchnou a umyjí jako předtím (4.3.3.).

Opatrně se odstraní přebytečná vlhkost.

4.3.7. Napipetuje se 5-10  $\mu$ l 0,1M fosfátového pufru s glycerolem (dodatek 3) nebo komerční krycí tekutiny do každého okénka a přiloží krycí sklíčko.

#### 4.4. Vyhodnocení IF testu

4.4.1. Testovací sklíčka se prohlížejí epifluorescenčním mikroskopem s filtry vhodnými pro excitaci FITC pod olejovou nebo vodní imersí při zvětšení 500x až 1000x. Zkoumají se okénka ve dvou navzájem kolmých průměrech a kolem obvodu. U vzorků s žádnými nebo malým počtem buněk se zkoumá nejméně 40 polí mikroskopu.

Nejdřív se zkontroluje pozitivní kontrolní vzorek. Buňky musí být jasně fluoreskující a zcela obarvené v určeném titru protilátky nebo pracovním ředění. Pokud je barevnost odchylná, musí být test IF opakován (oddíl 4).

4.4.2. Pozorují se jasně fluoreskující buňky s charakteristickou morfologií *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* v testovacích okénkách sklíčka (viz internetová stránka <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Intenzita fluorescence musí být při porovnání s pozitivním kontrolním kmenem ve stejném ředění protilátky stejná nebo lepší. Buňky s neúplným zbarvením nebo slabou fluorescencí nelze brát v úvahu.

Při podezření z jakékoli kontaminace musí být test zopakován. To se může stát, když všechna sklíčka ve skupině vykazují pozitivní buňky díky kontaminaci pufru nebo při zjištění pozitivních buněk (mimo okénka sklíček) na povrchu sklíček.

4.4.3. Existuje několik problémů podstatných pro přesnost imunofluorescenčního testu. V peletách z pupkové části bramboru a částí stonku se mohou vyskytnout doprovodné populace fluoreskujících buněk s atypickou morfologií a křížově reagující saprofytické bakterie s velikostí a morfologií podobnou *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

4.4.4. Berou se v úvahu pouze fluoreskující buňky s typickou velikostí a morfologií v titru nebo pracovním ředění protilátek podle oddílu 4.3.

4.4.5. Interpretace výsledku IF testu:

a) Při zjištění jasně fluoreskujících buněk s typickou morfologií se odhadne průměrný počet typických buněk v 1 mikroskopickém poli a vypočítá počet typických buněk na 1 ml resuspendované pelety (dodatek 4).

Výsledek IF je pozitivní u vzorků, kde je počet typických buněk na 1 ml resuspendované pelety nejméně  $5 \times 10^3$ . Vzorek je považován za potenciálně infikovaný a je povinné další testování.

b) Výsledek IF testu je negativní pro vzorky, které obsahují méně než  $5 \times 10^3$  buněk na 1 ml resuspendované pelety a vzorek se považuje za negativní. Další testování není nutné.

## 5. Test FISH

### PRINCIP

Když se jako první screeningový test použije FISH test a je pozitivní, musí být jako druhý povinný screeningový test proveden IF test. Když se FISH test provede jako druhý screeningový test a je pozitivní, je k dokončení diagnózy nutné další testování podle postupového diagramu.

#### Poznámka:

Používají se validované oligosondy specifické pro *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (dodatek 7). Úvodní testování touto metodou by mělo umožnit reprodukovatelné zjištění alespoň  $10^3$ - $10^4$  buněk *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na ml přidané do extraktů ze vzorku, které byly předtím testovány s negativním výsledkem.

Následující postup by měl být pokud možno proveden s čerstvě připravenými extrakty, ale je možné jej úspěšně provést s extraktem, který byl uchován v glycerolu při teplotě -16 až -24 nebo -68 až -86 °C.

Jako negativní kontrola se použije alikvotní část extraktu ze vzorku, který byl předtím testován na *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* s negativním výsledkem.

Jako pozitivní kontrola se připraví suspenze obsahující  $10^5$  až  $10^6$  buněk *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na ml (např. kmen NCPPB 4053 nebo PD 406) v 0,01 M fosfátového pufru (PB) z 3-5 denní kultury (příprava viz dodatek 2). Připraví se samostatná sklíčka s pozitivními kontrolními vzorky homologického kmene nebo jiného referenčního kmene *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* suspendovaného v bramborovém extraktu podle dodatku 2.

Použití eubakteriálních oligosond značených FITC poskytuje kontrolu procesu hybridizace, protože zbarví všechny eubakterie přítomné ve vzorku.

Test kontrolního materiálu se provádí stejným způsobem jako u vzorků.

### 5.1. Fixace bramborového extraktu

5.1.1. Připraví se fixační roztok (viz dodatek 7)

5.1.2. Napipetuje se 100  $\mu$ l každého vzorkového extraktu do Eppendorfovy mikrozkuhavky a odstředíte po dobu 8 minut na 7 000 g.

5.1.3. Odstraní se supernatant a rozpustí se peleta v 500  $\mu$ l fixačního roztoku připraveného max. 24 hodin předem. Protřepe se a inkubuje se přes noc při teplotě 4 °C.

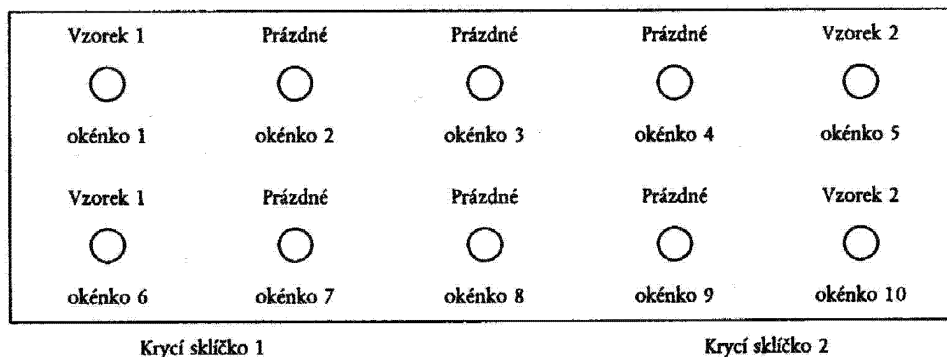
Alternativním fixačním činidlem je 96 % etanol. Pro jeho použití se rozpustí peleta z kroku 5.1.2. v 50  $\mu$ l 0,01 M PB a 50  $\mu$ l 96 % etanolu. Promíchá se protřepáním a inkubuje se při teplotě 4 °C po dobu 30-60 minut.

5.1.4. Odstředíte se po dobu 8 minut na 7 000 g, odstraní se supernatant a resuspenduje se peleta v 75  $\mu$ l 0,01 M PB (viz dodatek 3).

5.1.5. Kápne se 16  $\mu$ l fixované suspenze na čisté 10 okénkové sklíčko, jak ukazuje obrázek 3, přičemž se použijí 2 různé vzorky na jedno sklíčko, a to neředěný a zředěný 1:100 s použitím 10  $\mu$ l (v 0,01 M PB). Zbývající roztok vzorku (49 $\mu$ l) může být uložen při teplotě -20 °C po přidání 1 objemového množství 96 % etanolu. V případě, že je

třeba FISH metodu opakovat, odstraní se etanol odstředěním, přidá se stejné množství 0,01 M PB a zamíchá se protřepáním.

Obrázek 3. Rozmístění na sklíčku FISH



5.1.6. Sklíčka se nechají uschnout na vzduchu (nebo sušičkou sklíček při teplotě 37 °C) a fixují se nad plamenem.

V této fázi je možnost postup přerušit a pokračovat v hybridizaci další den. Sklíčka by měla být skladována chráněna před prachem a v suchu při pokojové teplotě.

## 5.2. Předhybridizace a hybridizace

5.2.1. Připraví se roztok lyozymu obsahující 10 mg lyozymu (Sigma L-6876) v 10 ml pufru (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Tento roztok lze skladovat, ale měl by se pouze jednou zmrazit a nechat roztát. Každý vzorek se dobře pokryje přibližně 50 µl roztoku lyozymu a inkubuje po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Potom se ponoří sklíčka do demineralizované vody, pouze jednou, a osuší filtračním papírem.

Alternativně se přidá místo lyozymu 50 µl proteinázy K 40-400 µg.ml<sup>-1</sup> v pufru (20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) do každé jamky a inkubuje se při teplotě 37 °C po dobu 30 minut.

5.2.2. Buňky se suší ve stupňovaných sériích 50 %, 80 % a 96 % etanolu pokaždé po dobu 1 minuty. Sklíčka se nechají uschnout na vzduchu v držáku sklíček.

5.2.3. Připraví se vlhká inkubační komora zakrytím dna vzduchotěsné krabice tkaninou nebo filtračním papírem namočeným v 1x hybmixu (dodatek 7). Krabice se přeinkubuje v hybridizační peci při teplotě 55 °C po dobu alespoň 10 minut.

5.2.4. Připraví se hybridizační roztok (dodatek 7) s 45 µl na 1 sklíčko a předinkubuje se po dobu 5 minut při teplotě 55 °C.

5.2.5. Sklíčka se umístí na horkou plotnu při teplotě 45 °C a do každého ze 4 okének na sklíčku / sklíčcích se přidá 10 µl hybridizačního roztoku.

5.2.6. Každé sklíčko se přikryje 2 krycími sklíčky (24 x 24 mm) tak, aby pod ně nevnikl vzduch. Sklíčka se umístí do předehřáté vlhké komory a hybridizuje se 14 – 18 h v peci při teplotě 55 °C v temnu.

- 5.2.7. Připraví se 3 kádinky obsahující 1 l sterilní vody (Ultra pure water = UPW), 1 l 1x hybmixu (334 ml 3x hybmix a 666 ml UPW) a 1 l 1/2 x hybmixu (167 ml 3x hybmix a 833 ml UPW). Každá z nich se přeinkubuje ve vodní lázni při teplotě 55 °C.
- 5.2.8. Sejmou se krycí sklička a podložní sklička se umístí do držáku sklíček.
- 5.2.9. Spláchne se nadbytek vzorku inkubací po dobu 15 minut v kádince s 1x hybmixem při teplotě 55 °C.
- 5.2.10. Držák sklíček se přemístí do promývacího roztoku 1/2 hybmix a nechá se inkubovat dalších 15 minut.
- 5.2.11. Sklička se ponoří krátce do UPW a položí na filtrační papír. Odstraní se nadbytečná vlhkost lehkým zakrytím povrchu filtračním papírem. Napipetuje se 5-10 µl krycího roztoku (např. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA nebo podobný) do každé jamky a celé skličko se zakryje velkým krycím skličkem (24 x 60 mm).

### 5.3. Hodnocení FISH testu

- 5.3.1. Sklička se prohlížejí ihned s mikroskopem vhodným pro epifluorescenční mikroskopii se zvětšením 630x nebo 1 000x pod olejovou imerzí. S filtrem vhodným pro fluorescein isothiokyanat (FITC) jsou eubakteriální buňky (včetně většiny gramnegativních buněk) ve vzorku zbarveny fluorescenčně zeleně. Použitím filtru pro tetramethylrhodamin-5-isothiokyanat se buňky *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* obarvené Cy3 jeví fluorescenčně červeně. Porovnává se buněčná morfologie s morfologií pozitivních kontrolních vzorků. Buňky musí být jasně fluoreskující a zcela zbarveny. Test FISH (oddíl 9.4) musí být zopakován, pokud je zbarvení odchýlné. Prohlíží se okénka napříč dvěma průměry v pravých úhlech a kolem obvodu. U vzorků, kde nejsou pozorovány žádné nebo málo buněk, se pozoruje nejméně 40 polí mikroskopu.
- 5.3.2. Hledají se jasně fluoreskující buňky s morfologií charakteristickou pro *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* v okénkách testovacích sklíček (viz internetová stránka <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Intenzita fluorescence musí odpovídat nebo být lepší než u pozitivního kontrolního kmene. Buňky, které nejsou zcela zbarveny nebo vykazují slabou fluorescenci, se neberou v úvahu.
- 5.3.3. Při podezření z jakékoli kontaminace musí být test zopakován. Při podezření z jakékoli kontaminace musí být test zopakován. To se může stát, když všechna sklička ve skupině vykazují pozitivní buňky díky kontaminaci pufrou nebo při zjištění pozitivních buněk (mimo okénka sklíček) na povrchu sklíček.
- 5.3.4. Existuje několik problémů podstatných pro přesnost FISH testu. V peletách z pupkové části bramboru a částí stonku se mohou vyskytnout doprovodné populace fluoreskujících buněk s atypickou morfologií a křížově reagující saprofytické bakterie s velikostí a morfologií podobnou *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, ačkoli mnohem méně často než u IF testu.

5.3.5. V úvahu se berou pouze fluoreskující buňky s typickou velikostí a morfologií, viz 5.3.2.

5.3.6. Interpretace výsledku testu FISH:

- a) Výsledky FISH testu jsou platné, pokud jsou při použití FITC filtru jasně zeleně fluoreskující buňky s velikostí a morfologií typickou pro *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* a při použití rhodaminového filtru jasně červeně fluoreskující buňky pozorovány ve všech pozitivních kontrolách a nejsou pozorovány v žádných negativních kontrolách. Pokud jsou přítomné jasně fluoreskující buňky s typickou morfologií, odhadne se průměrný počet typických buněk v 1 mikroskopickém poli a vypočítá počet typických buněk v 1 ml resuspendované pelety (dodatek 4). Vzorky, které obsahují alespoň  $5 \times 10^3$  typických buněk na 1 ml resuspendované pelety, se považují za pravděpodobně infikované *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Nutné je další testování. Vzorky, které obsahují méně než  $5 \times 10^3$  typických buněk na 1 ml resuspendované pelety, se považují za negativní.
- b) Výsledek FISH testu je negativní, pokud při použití rhodaminového filtru nejsou pozorovány jasně červeně fluoreskující buňky s velikostí a morfologií typickou pro *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, jestliže jsou tyto typické jasně červeně fluoreskující buňky při použití rhodaminového filtru pozorovány v pozitivních kontrolách.

## 6. PCR test

### PRINCIP

Použije-li se PCR test jako hlavní screeningový test a je pozitivní, musí být jako druhý povinný screeningový test proveden IF test. Pokud se PCR test používá jako druhý screeningový test a je pozitivní, je pro dokončení diagnózy nutné další testování podle postupového diagramu.

Využití této metody v celém rozsahu jako hlavního screeningového testu se doporučuje jen tehdy, je-li požadována specializovaná expertíza.

#### Poznámka:

Předběžné testování touto metodou by mělo umožnit reprodukovatelné zjištění  $10^3$  až  $10^4$  buněk *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na 1 ml přidaných do vzorku extraktů, které byly předtím testovány s negativním výsledkem. Pro dosažení maximální citlivosti a přesnosti ve všech laboratořích mohou být vyžadovány optimalizační pokusy.

Používají se validovaná PCR činidla a protokoly. Přednostně se používá metoda s interní kontrolou.

Je třeba použít vhodná bezpečnostní opatření, aby se zabránilo kontaminaci vzorku cílovou DNA. PCR test by měli provádět zkušení laboranti v laboratořích specializovaných na molekulární biologii, aby se minimalizovala možnost kontaminace cílovou DNA.

S negativními kontrolami (u průběhu extrakce DNA a PCR) by se mělo vždy zacházet jako s konečnými vzorky, aby bylo jasné, jestli došlo k přenosu DNA.

PCR test by měl zahrnovat následující negativní kontroly:

- extraktu ze vzorku, který byl předtím testován na *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* s negativním výsledkem,
- kontroly pufru používaného pro extrakci bakterie a DNA ze vzorku,
- reakční směs PCR.

Měly by být zahrnuty následující pozitivní kontroly:

- alikvotní části resuspendovaných pelet, k nimž byl přidán *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (příprava viz dodatek 2),
- suspenze  $10^6$  buněk na 1 ml *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ve vodě z virulentního izolátu (např. NCPPB 2140 nebo NCPPB 4053),
- pokud možno použít při provádění PCR testu také DNA extrahovanou z pozitivních kontrolních vzorků.

Aby se zabránilo možné kontaminaci, připraví se pozitivní kontroly v odděleném prostředí od vzorků, které budou testovány.

Extrakty ze vzorků by měly být pokud možno bez zeminy. V případě použití PCR testu je potřeba připravit extrakty z umytých brambor.

## 6.1 Metody purifikace DNA

Použijí se výše popsané pozitivní a negativní kontrolní vzorky.

Připraví se kontrolní materiál stejným způsobem jako vzorky.

K purifikaci cílové DNA z komplexních substrátů vzorků jsou k dispozici různé metody odstraňující inhibitory PCR a jiných enzymatických reakcí a koncentrující cílovou DNA v extraktu vzorku.

Následující metoda byla optimalizována pro použití s validovanou metodou PCR, uvedenou v dodatku 6.

### 6.1.a) Metoda podle Pastrika (2000)

1. Napipetuje se 220  $\mu$ l lýzového pufru (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml.
2. Přidá se 100  $\mu$ l extraktu ze vzorku a umístí se do termobloku nebo vodní lázně o teplotě 95  $^{\circ}$ C na dobu 10 minut.
3. Mikrozkušavka se vloží na 5 minut do ledu.
4. Přidá se 80  $\mu$ l zásobního roztoku lyozymu (50 mg lyozymu na 1 ml v 10 mM Tris HCl, pH 8,0) a inkubuje se při teplotě 37  $^{\circ}$ C po dobu 30 minut.
5. Přidá se 220  $\mu$ l Easy DNA<sup>®</sup> roztok A (Invitrogen), dobře se promíchá třepáním a inkubuje se při teplotě 65  $^{\circ}$ C po dobu 30 minut.
6. Přidá se 100  $\mu$ l Easy DNA<sup>®</sup> roztok B (Invitrogen) a silně se promíchá třepáním, až usazenina sama poteče do mikrozkušavky a vzorek začne být stejnoměrně viskózní.
7. Přidá se 500  $\mu$ l chloroformu a míchá se třepáním, až se viskozita sníží a směs se stane homogenní.
8. Odstředí se na 15 000 g po dobu 20 minut při 4  $^{\circ}$ C pro oddělení fází a vytvoření mezifáze.
9. Přenese se horní fáze do čisté mikrozkušavky.
10. Přidá se 1 ml 100 % etanolu (-20  $^{\circ}$ C), krátce se promíchá třepáním a inkubuje se na ledu po dobu 10 minut.
11. Odstředí se na 15 000 g po dobu 20 minut při 4  $^{\circ}$ C a odstraní se z pelety etanol.
12. Přidá se 500  $\mu$ l 80 % etanolu (-20  $^{\circ}$ C) a promíchá převrácením mikrozkušavky.
13. Odstředí se na 15 000 g po dobu 10 minut při 4 $^{\circ}$ C, peleta se zachová a odstraní etanol.
14. Peleta se nechá uschnout na vzduchu nebo v DNA speed vac.

15. Peleta se resuspenduje v 100  $\mu$ l sterilní vody (UPW) a nechá stát nejméně 20 minut při pokojové teplotě.
16. Skladuje se při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do upotřebení při PCR.
17. Jakákoliv bílá usazenina se odstraní odstředěním a pro PCR se použije 5  $\mu$ l supernatantu obsahujícího DNA.

### 6.1.b) Jiné metody

Jiné metody extrakce DNA by se mohly použít, pokud by se prokázalo, že jsou při purifikaci DNA z kontrolních vzorků obsahujících  $10^3$  až  $10^4$  patogenních buněk na 1 ml stejně efektivní.

## 6.2 PCR

- 6.2.1. Připraví se testované vzorky a kontroly pro PCR podle validovaného protokolu (dodatek 6). Připraví se jeden desetinný roztok vzorku DNA (1:10 ve sterilní vodě).
- 6.2.2. Připraví se příslušná reakční směs pro PCR v prostředí, kde nehrozí kontaminace, podle zveřejněného protokolu (dodatek 6). Validovaný protokol PCR je multiplexová reakce, která zahrnuje také interní kontrolu PCR.
- 6.2.3. Do sterilních PCR mikrozkušavek se přidá 5  $\mu$ l extraktu DNA na 25  $\mu$ l PCR reakce.
- 6.2.4. Zahrne se negativní kontrolní vzorek obsahující pouze reakční směs PCR a přidá se stejná sterilní voda UPW, která byla použita do směsi PCR namísto vzorku.
- 6.2.5. PCR mikrozkušavky se umístí do stejného termocykleru, který byl použit při počátečním testování a provede se vhodně optimalizovaný program PCR (dodatek 6)

## 6.3. Analýza produktu PCR

- 6.3.1. Rozdělí se amplikony PCR elektroforézou v agarózovém gelu. Nanese se nejméně 12  $\mu$ l amplifikované reakční směsi DNA z každého vzorku smíchané s 3  $\mu$ l nanášecího pufu (dodatek 6) do 2,0 % (w/v) agarózového gelu v Trisacetát-EDTA (TAE) pufu (dodatek 6) při 5-8 V na cm. Použije se vhodný marker DNA, např. 100 bp ladder.
- 6.3.2. Detekují se proužky DNA barvením v ethidium bromidu (0,5 mg na l) po dobu 30-45 minut, za použití vhodných bezpečnostních opatření pro zacházení s tímto mutagenem.
- 6.3.3. V obarveném a UV (krátké vlnové délky, např. 302 nm) prosvíceném gelu se hledají amplifikované produkty PCR o očekávané velikosti a výsledek se zdokumentuje.
- 6.3.4. U všech nových nálezů se zkontroluje pravost amplikonu PCR provedením restriční enzymové analýzy ve zbývajícím vzorku amplifikované DNA inkubací při optimální teplotě a době s vhodným restričním enzymem a pufrem (viz dodatek 6). Rozdělí se naštěpené fragmenty elektroforézou v agarózovém gelu a pozoruje se



charakteristický vzor restričního fragmentu pod UV prosvícením po obarvení ethidiumbromidem a porovnává se s neštěpenou a štěpenou pozitivní kontrolou.

Interpretace výsledku PCR testu:

PCR test je negativní, pokud amplikon typický pro *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* očekávané velikosti nebyl zjištěn v daném vzorku, ale byl zjištěn ve všech pozitivních kontrolních vzorcích (v případě vícenásobné PCR s rostlinnými interními kontrolními primery: druhý produkt PCR očekávané velikosti musí být amplifikován s daným vzorkem).

PCR test je pozitivní, pokud byl zjištěn amplikon typický pro *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* očekávané velikosti a vzoru (pokud se požaduje), za předpokladu, že nebyl amplifikován žádným z negativních kontrolních vzorků. Spolehlivého potvrzení pozitivního výsledku lze dosáhnout také opakováním testu s druhou sadou PCR primerů (oddíl 9.3).

*Poznámka:*

Lze mít podezření na inhibici PCR, pokud byl očekávaný amplikon získán z pozitivního kontrolního vzorku obsahujícího *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ve vodě, ale z pozitivní kontroly s *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* v bramborovém extraktu byly negativní. Ve vícenásobných protokolech PCR s interními kontrolami PCR i inhibici reakce došlo, pokud nebyl získán žádný z obou amplikonů.

Lze mít podezření na kontaminaci, pokud byl očekávaný amplikon získán z jedné nebo více negativních zkoušek.

## 7. Test na lilku vejcoplodém

*Poznámka:*

Předběžné testování touto metodou by mělo umožnit reprodukovatelné zjištění  $10^3$  až  $10^4$  jednotek *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* tvořících kolonie na 1 ml přidaný k extraktům ze vzorku, které byly testovány s negativním (příprava viz. dodatek 2)

Nejvyšší citlivost zjištění lze očekávat při použití čerstvě připraveného extraktu ze vzorku a optimálních růstových podmínkách. Metodu však lze úspěšně použít i na extrakty, které byly uchovávány v glycerolu při teplotě  $-68$  až  $-86$  °C.

Některé odrůdy lilku vejcoplodého poskytují vynikající selektivní obohacující médium pro růst *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* dokonce v případě nepřítomnosti příznaků a poskytují také vynikající základní konfirmační test.

Pro omezení nebezpečí falešně negativních výsledků by měly být vytvořeny optimální růstové podmínky.

Podrobnosti o pěstování jsou uvedeny v Dodatku 8.

7.1. Peleta podle 3.1.5. se rozdělí mezi rostliny lilku jednou z níže uvedených metod (7.2, 7.3, 7.4). Používají se pouze rostliny ve fázi 2-3 listů do úplného rozvinutí třetího pravého listu. Aby se zajistilo úplné využití resuspendované pelety i efektivní inokulaci, bude pro níže uvedené postupy potřeba 15-25 lilků na vzorek.

### 7.2. Inokulace zářezem I

7.2.1. Každý květináč se horizontálně podepře (pro květináče o průměru 10 cm je vhodný blok pěnového polystyrénu s vyhloubenou částí o rozměrech 5 cm hloubky, 10 cm

šířky a 15 cm délky). Pro každý testovaný vzorek se mezi stoněk a blok umístí proužek sterilní hliníkové fólie. Rostlinu je možno fixovat na místě gumovým páskem kolem bloku.

- 7.2.2. Pomocí skalpelu se provede mezi děložními lístky a prvním pravým listem podélný nebo mírně úhlopříčný řez dlouhý 0,5 až 1,0 cm a hluboký přibližně jako tři čtvrtiny průměru stonku.
- 7.2.3. Zářez se přidrží otevřený pomocí špičky čepele skalpelu a nanese se do něj inokulum štětečkem na oční linky nebo jemným malířským štětečkem namočeným do pelety. Zbytek pelety se rozdělí mezi všechny testovací rostliny lilku.
- 7.2.4. Řez se překryje sterilní vazelínou aplikovanou injekční stříkačkou o objemu 2 ml.

### 7.3 Inokulace zářezem II

- 7.3.1. Na stoněk rostliny držené dvěma prsty se napipetuje mezi děložní lístky a první pravý list kapka (přibližně 5 až 10  $\mu$ l) suspendované pelety.
- 7.3.2. Pomocí sterilního skalpelu se udělá sešikmený zářez (v úhlu přibližně 5°), dlouhý 1,0 cm a hluboký přibližně jako 2/3 tloušťky stonku, přičemž s řezem se začne v místě kapky suspendované pelety.
- 7.3.3. Řez se zakryje sterilní vazelínou z injekční stříkačky.

### 7.4 Inokulace injekční stříkačkou

- 7.4.1 Pro snížení vnitřního napětí buněk (turgoru) se rostliny lilku den před inokulací nezalévají.
  - 7.4.2 Stonky lilku vejcoplodého se inokulují těsně nad děložními lístky pomocí injekční stříkačky s podkožní jehlou (ne méně než 23 G). Peleta se rozdělí mezi testovací rostliny lilku vejcoplodého.
- 7.5. Jako pozitivní kontrola se inokuluje 5 rostlin stejnou inokulační metodou (7.2, 7.3 nebo 7.4) vodní suspenzí  $10^5$  až  $10^6$  buněk na 1 ml známé kultury původce kroužkovitosti a kde je to možné i pletivem z přirozeně infikovaných hlíz bramboru.
  - 7.6. Jako negativní kontrola se inokuluje 5 rostlin sterilním 0,05 M PBS stejnou inokulační metodou (7.2, 7.3 nebo 7.4).
  - 7.7. Po inokulaci se rostliny nechají inkubovat v karanténě ve vhodných podmínkách (dodatek 8) po dobu až 4 týdnů při teplotě 18-24°C. Rostliny se inkubují za dostatečného osvětlení a vysoké vlhkosti (70-80%) a zalévají se tak, aby nedošlo k nasávání vody nebo vadnutí kvůli nedostatku vody. Buňky *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* odumírají při teplotách nad 30°C a optimální teplota je 21°C. Aby se zamezilo kontaminaci, inkubují se rostliny pro pozitivní a negativní kontroly ve skleníku nebo růstové komoře na jasně oddělených policích, anebo při nedostatku místa se zajistí přísné oddělení mezi zacházení s nimi. Pokud musí být rostliny pro různé vzorky inkubovány blízko sebe, oddělí se vhodnými přepážkami. Při hnojení, zalévání, kontrole a jiné manipulaci se věnuje maximální pozornost tomu, aby nedošlo ke kontaminaci. Je

nezbytné, aby skleníky i růstové komory byly chráněny před veškerým hmyzem, protože by mohl přenášet bakterie z jednoho vzorku na druhý.

- 7.8. Pravidelně po osmi dnech se spočítají rostliny vykazující příznaky. Původce kroužkovitosti působí u lilku vejcoplodého vadnutí listů, které může začít jako okrajová nebo mezižilková ochablost (ztráta turgoru). Zvadlé pletivo může zprvu být tmavozelené nebo strakaté, ale před znekrotizováním zesvětlí. Povadlá místa mezi žilnatinou mívají často masně vodnatý vzhled. Nekrotická pletiva mívají často jasně žlutý okraj. Rostliny vždy neodumírají; čím déle trvá období do objevení se příznaků, tím je větší naděje na přežití. Rostliny mohou infekci odrůst. Mladé rostliny lilku vejcoplodého jsou mnohem citlivější vůči nízkým koncentracím původce kroužkovitosti než starší rostliny, proto je nezbytné používat rostliny ve fázi tří listů a nebo krátce před ní. Vadnutí mohou také způsobovat populace jiných bakterií nebo hub přítomných v peletě z pletiv hlízy. Patří k nim *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* a *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata*, jakož i velké koncentrace saprofytických bakterií. Tyto případy vadnutí lze odlišit od případů způsobených původcem kroužkovitosti, jelikož rychle vadnou celé listy nebo celé rostliny. Může se také připravit Gramovo barvení: tento test rozliší *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* od *Erwinia* spp
- 7.9. Jakmile se na lilku vejcoplodém objeví příznaky, měla by být provedena izolace za použití částí pletiva zvadlých listů nebo stonků rostlin. Povrch listů a stonků lilku vejcoplodého se vydezinfikuje otřením 70 % etanolem. Proveďte se test IF nebo PCR na šťávě z lilku a izoluje se na vhodném (selektivním) médiu (viz oddíl 8). Může se také připravit Gramovo barvení (dodatek 9). Čisté kultury podezřelé z přítomnosti *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* se identifikují a potvrdí se patogenita (viz oddíl 9 a 10).
- 7.10. Za určitých okolností, zejména pokud nejsou růstové podmínky optimální, se může stát, že *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* zůstává v rostlinách lilku vejcoplodého jako latentní infekce dokonce i po uplynutí inkubační doby až 4 týdnů. Pokud nejsou po 4 týdnech pozorovány žádné příznaky, provede se test IF/PCR na složeném vzorku částí stonků o délce 1 cm z každé testované rostliny odebraných nad místem inokulace. Pokud je test pozitivní, měla by být provedena izolace na vhodných (selektivních) médiích postupem podle oddílu 8. Čisté kultury podezřelé z přítomnosti *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* se identifikují a potvrdí se patogenita (viz oddíl 9 a 10).

## 8. Izolace *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Diagnóza může být potvrzena pouze tehdy, je-li původce kroužkovitosti izolován a takto identifikován. Ačkoliv je původce kroužkovitosti náročným organismem, je možno ho izolovat z pletiv projevujících příznaky napadení.

Mohou jej však přerůst rychle rostoucí saprofytické bakterie, a proto se nedoporučuje provádět izolaci přímo z pelety pletiva hlízy (3.1.5) nebo stonku (3.2). Přímá izolace *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* je možná za použití selektivního média a vhodného ředění resuspendované pelety z pupkové části hlízy nebo ze stonků rostliny.

Izolace se provádí ze všech hlíz bramboru nebo částí stonku a z rostlin lilku vejcoplodého, které nevykazují příznaky napadení, ale u nichž byl pozitivní výsledek v testu IF/PCR složených vzorků (viz oddíl 7.9). Pokud je třeba provést maceraci stonků lilku, měla by být provedena podle oddílu 3.1.2.

Jako pozitivní kontroly se připraví desetinná ředění suspenze  $10^6$  cfu na ml *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (např. NCPPB 4053 nebo PD 406). Aby se vyloučilo nebezpečí kontaminace, připraví se pozitivní kontroly odděleně od vzorků, které mají být testovány.

Pro každou nově připravenou dávku selektivního média by se měla před použitím k testování obvyklých vzorků přezkoušet jeho vhodnost pro růst patogenu.

Kontrolní materiál se testuje stejným způsobem jako vzorky.

## 8.1. Roztěr na selektivní médium

8.1.1. Ze 100  $\mu$ l alikvotní části ze vzorku resuspendované bramborové pelety nebo šťávy z lilku vejcoplodého se připraví desetinasobné ředění v peletovém pufru (dodatek 3).

8.1.2. Izolace z neředěné bramborové pelety se obvykle nepodaří kvůli náročným růstovým podmínkám *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* a konkurenci saprofytů. Vzhledem k tomu, že bakterie je obvykle v infikovaných pletivech přítomná ve vysokých koncentracích, lze saprofyty obvykle vypláchnout ředěním, zatímco patogen zůstává. Proto se doporučuje rozetřít 100  $\mu$ l z každého vzorku, v ředění 1/100 až 1/10 000 na MTNA médium nebo NCP-88 médium (dodatek 5), za použití pomůcek určených k roztěrům (hokejek) a techniky roztěrů.

8.1.3. Desky se inkubují v temnu při teplotě 21-23°C.

8.1.4. Počáteční kontrola misek zahrnuje porovnání s kontrolními miskami a počítání všech kolonií podobných *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* se provádějí po třech dnech, s dalším počítáním po 5, 7 a 10 dnech.

## 8.2. Čištění podezřelých kolonií

### *Poznámka:*

Subkultury kolonií podobných *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* pro inokulaci lilku vejcoplodého a/nebo následnou identifikaci by se měly pěstovat na YGM médiu; inokulace a identifikace by se měly provést dříve, než jsou média příliš přerostlá, tj. nejlépe po 3-5 dnech.

8.2.1. Kolonie podobné *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* se rozetřou na jedno z následujících médií (složení uvedena v dodatku 5):

- živný dextrózový agar (pouze pro subkultury),
- kvasničný pepton glukosový agar,
- agar z kvasničného extraktu s minerálními solemi.

Inkubace probíhá při teplotě 21-24 °C po dobu maximálně 10 dní.

Původce kroužkovitosti roste pomalu a obvykle vytváří kolonie velikosti špendlíkové hlavičky, vyklenuté, smetanově zbarvené.

8.2.2. Opětovně se provede rozřez pro zaručení čistoty. U subkultur se rychlost růstu zlepšuje. Typické kolonie jsou smetanově bílé nebo barvy slonoviny, někdy žluté, okrouhlé, hladké, vyvýšené, konvexně vyklenuté, slizovitě tekuté, s rovnými okraji a obvykle mají v průměru 1 – 3 mm.

Jednoduché Gramovo barvení (dodatek 9) může pomoci vybrat kolonie pro další testování.

8.2.3 Podezřelé kultury se identifikují (viz oddíl 9) a provede se zkouška patogenity (viz oddíl 10).

## 9. Identifikace

Čisté kultury pravděpodobné izolované kultury *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* se identifikují za použití nejméně dvou následujících testů založených na různých biologických principech.

V případě potřeby se zahrne pro každý provedený test známý referenční kmen.

### 9.1. Nutriční a enzymatické identifikační testy

Zjišťují se následující fenotypické vlastnosti. Veškerá média by se měla inkubovat při 21 °C a po šesti dnech by měla být vyhodnocena. Pokud nedošlo k žádnému růstu, inkubuje se po dobu nejvýše 20 dní.

Všechny testy musí zahrnovat kontrolu se známým kmenem *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Nutriční a fyziologické testy se musí provádět za použití inokula ze subkultur živného agaru. Morfologická srovnání se musí provádět z kultur z živného dextrózového agaru.

Test	Očekávaný výsledek
Oxidačně-fermentační (O/F)	inertní nebo slabě oxidační
Aktivita oxidázy	-
Aktivita katalázy	+
Redukce nitrátů	-
Aktivita ureázy	-
Tvorba H <sub>2</sub> S	-
Tvorba indolu	-
Využívání citrátu	-
Hydrolyza škrobu	- nebo slabá
Růst při 37 °C	-
Růst v 7% NaCl	-
Hydrolyza želatiny	-
Hydrolyza eskulinu	+
Tvorba kyseliny z:	
- glycerolu	-
- laktózy	- nebo slabá
- rhamnózy	-
- salicinu	-
Gramovo barvení (dodatek 9)	

## 9.2. IF test

- a) Připraví se suspenze přibližně  $10^6$  buněk/ml v pufru na IF (dodatek 3).
- b) Připraví se série dvojnásobného ředění vhodného antiséra.
- c) Provede se IF postup (oddíl 4).
- d) Pozitivního výsledku IF testu je dosaženo, jestliže IF titr kultury odpovídá titru pozitivní kontroly.

## 9.3. PCR test

- a) Připraví se suspenze přibližně  $10^6$  buněk na ml ve sterilní vodě (UPW)
- b) Zahřívá se 100  $\mu$ l suspenze buněk v uzavřených mikrozkušavkách v ohřívacím bloku nebo vřící vodní lázni při teplotě 100 °C po dobu 4 minut. V případě potřeby se může lýza buněk podpořit přidáním čerstvě připraveného NaOH do konečné koncentrace 0,05 M. Vzorokly lze potom uložit při teplotě -16 až -24 °C až do použití.
- c) Pro amplifikaci *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* specifických ampliconů se použijí vhodné postupy PCR (např. Pastrík, 2000; viz dodatek 4; Li a de Boer, 1995; Mills a kol., 1997; Pastrík a Rainey, 1999; Schaad a kol., 1999).
- d) Identifikace *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* je pozitivní, pokud jsou amplicony PCR stejné velikosti a mají stejnou mnohotvárnost délky fragmentu jako pozitivní kontrolní kmen.

## 9.4. FISH test

- a) Připraví se suspenze přibližně  $10^6$  buněk na ml v UPW.
- b) Provede se postup FISH (oddíl 5)
- c) Test FISH je pozitivní, jsou-li dosaženy stejné reakce kultury a pozitivní kontroly.

## 9.5. Analýza mastných kyselin (FAP)

- a) Kultura se pěstuje na tryptikázo-sójovém agaru (Oxoid) po dobu 72 hodin při teplotě 21 °C (+/- 1°C).
- b) Použije se vhodný postup FAP (Janse, 1991; Stead, 1992).
- c) Test FAP je pozitivní, pokud je profil podezřelé kultury identický s profilem pozitivní kontroly. Přítomnost charakteristických mastných kyselin 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 a 17:0 Anteiso jasně svědčí o přítomnosti *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Jiné rody jako *Curtobacterium*, *Arthrobacter* a *Micrococcus* také obsahují některé z těchto kyselin, ale 15:1 Anteiso A je pro tyto bakterie neobvyklá kyselina, která se však vyskytuje ve všech *Clavibacter* spp. v rozmezí 1-5 %. U *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* se hodnota obvykle pohybuje kolem 5 %.

## 9.6. BOX-PCR

- a) Připraví se suspenze přibližně  $10^6$  buněk na ml v UPW.
- b) Provede se test postupem podle Smith a kol., 2001.

## 10. Test patogenity

Pro konečné potvrzení původce kroužkovitosti a pro stanovení virulence kultur identifikovaných jako *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* musí být provedena zkouška patogenity.

- 10.1. Připraví se inokulum přibližně  $10^6$  buněk na ml z 3-denních kultur testované izolované látky a vhodného pozitivního kmene *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.
- 10.2. Naočkuje se 5-10 stonků mladých semenáčků lilku vejcoplodého ve fázi 3 pravých listů.
- 10.3. Inkubuje se při teplotě 18-24 °C při dostatečném světle a vysoké relativní vlhkosti s přiměřeným zaléváním, aby nedošlo k přemokření nebo vyschnutí. U čistých kultur by mělo během 2 týdnů nastat typické vadnutí, avšak rostliny, které po uplynutí této doby nevykazují žádné příznaky infekce, by se měly inkubovat až 3 týdny při teplotách příznivých pro růst lilku vejcoplodého, ale nepřesahujících 25 °C. Jestliže se po 3 týdnech příznaky infekce nevyskytují, nemůže být kultura považována za patogenní formu *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.
- 10.4. Izolace se provádí z rostlin s příznaky infekce odstraněním části stonku 2 cm nad místem inokulace. Pletiva se rozdrťí a suspendují v malém množství sterilní destilované vody nebo 50 mM fosfátového pufru. Izoluje se ze suspenze rozetřením nebo nanesením na MTNA a YPGA, inkubuje se po dobu 3-5 dní při teplotě 21-23°C a sleduje se vznik kolonií typických pro *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

### Dodatek 1

#### Laboratoře podílející se na optimalizaci a validaci protokolů

Laboratoř <sup>(1)</sup>	Místo	Země
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Vídeň a Linec	Rakousko
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgie
Plantedirektoratet	Lyngby	Dánsko
Central Science Laboratory	York	Anglie
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Skotsko
Laboratoire National de la Protection Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Francie
Laboratoire National de la Protection Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francie
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Německo
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Německo
State Laboratory	Dublin	Irsko
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nizozemsko
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Norsko
Direcção-General de Protecção das Culturas	Lisabon	Portugalsko
Nacionalni inštitut za biologijo	Ljubljana	Slovinsko
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Španělsko

(<sup>1</sup>) Kontaktní osoby: viz internetová stránka <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

### Příprava pozitivních a negativních kontrol pro vyšetření výkrojků testy PCR/IF a FISH

Vypěstuje se 72 hodinová kultura virulentního kmene *C. m. subsp. sepedonicus* (NCPPB 4053 nebo PD 406) na základním médiu MTNA a suspenduje se v 10 mMfosfátového pufru pro získání hustoty přibližně 1 až 2 x 10<sup>8</sup> buněk schopných tvorby kolonií/ml. Toho se obvykle dosáhne prostřednictvím slabě zakalené suspenze odpovídající optické hustotě 0,20 – 600 nm.

Výkrojky pletiva se odeberou z pupkových konců 200 hlíz odebraných z produkce odrůdy s bílou slupkou, u které je jisté, že je prosta *C. m. subsp. sepedonicus*.

Pupkové výkrojky se zpracují obvyklým způsobem a resuspenduje se peleta v 10 ml.

Připraví se 10 sterilních mikrozkušavek o objemu 1,5 ml s 900 µl resuspendované pelety.

Přenesou se 100 µl suspenze *C. m. subsp. sepedonicus* do první mikrozkušavky. Nechá se protřepat.

V následujících pěti mikrozkušavkách se provedou desetinná ředění.

Šest kontaminovaných mikrozkušavek se použije jako pozitivní kontrola. Čtyři nekontaminované mikrozkušavky se použijí jako negativní kontroly. Mikrozkušavky se opatří štítkem.

Připraví se alikvotní části z 100 µl ve sterilních mikrozkušavkách o objemu 1,5 ml, čímž se získá 9 kopií každého kontrolního vzorku. Skladování probíhá při teplotě – 16 až – 24 °C až do doby použití.

Přítomnost a množství *C. m. subsp. sepedonicus* v kontrolních vzorcích by měla být nejprve potvrzena prostřednictvím imunofluorescence.

Pro PCR test se provede extrakce DNA z pozitivních a negativních kontrolních vzorků pro každou sérii zkušebních vzorků.

Pro IF a FISH testy se provedou kvantitativní rozbory pozitivních a negativních kontrolních vzorků pro každou sérii zkušebních vzorků.

Při kvantitativních rozbořech IF, FISH a PCR musí být *C. m. subsp. sepedonicus* zjištěn v nejméně v 10<sup>6</sup> a 10<sup>4</sup> buněk/ml pozitivních kontrol a nesmí být zjištěn v žádné z negativních kontrol.

### Pufry pro testovací postupy

OBEZNĚ: Neotevřené sterilizované pufry lze skladovat po dobu až jednoho roku.

#### 1. Pufry pro extrakci

##### 1.1. Extrakční pufr (50 mM fosfátový pufr, pH 7,0)

Tento pufr se používá k extrakci bakterie z rostlinných tkání homogenizací nebo protřepáním.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (bezvodý)	4,26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g
Destilovaná voda	1,00 l

Složky se rozpustí, zkontroluje se pH a provede se sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

Užitečné mohou být následující složky:

	Účel	Množství (na litr)
Lubrolové vločky	Protisrážlivý prostředek (*)	0,5 g
DC silikonový odpěňovač	Odpěňovací činidlo (*)	1,0 ml
Tetrasodiumpyrofosfát	Antioxidační činidlo	1,0 g
Polyvinylpyrrolidon-40 000 (PVP – 40)	Vázání inhibitorů PCR	50 g
(*) pro použití při extrakci homogenizací		



## 1.2. *Peletový pufr (10 mM fosfátový pufr, pH 7,2)*

Tento pufr se používá pro resuspenzi a ředění extraktů z výkrojků z pupkových částí bramborových hlíz poté, co byly odstředováním koncentrovány do pelety.

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
Destilovaná voda	1,00 l

Složky se rozpustí, zkontroluje se pH a provede se sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

## 2. **Pufry pro IF test**

### 2.1. *Pufry pro IF (10 mM fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku (PBS), pH 7,2)*

Tento pufr se používá k ředění protilátek.

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
Destilovaná voda	1,00 l

Složky se rozpustí, zkontroluje se pH a provede se sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min

### 2.2. *IF-pufr-Tween*

Tento pufr se používá k mytí sklíček.

Přidá se 0,1 % Tween 20 k pufru pro IF.

### 2.3. *Fosfátový pufr v glycerolu, pH 7,6*

Tento pufr se používá jako krycí roztok na okénka sklíček na IF testy k zvýšení fluorescence.

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
Glycerol	50 ml
Destilovaná voda	100 ml

Krycí roztoky jsou komerčně dostupné, např. Vectashield<sup>®</sup> (Vector Laboratories) nebo Citifluor<sup>®</sup> (Leica).

## Dodatek 4

### Stanovení koncentrace IF a FISH pozitivních buněk

1. Vypočítá se průměrný počet typických fluoreskujících buněk v jednom pozorovacím poli (c).
2. Vypočítá se počet typických fluoreskujících buněk v okénku mikroskopického sklíčka (C).

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

kde S = plocha jednoho pole na sklíčku s více jamkami a

s = plocha pole objektivu.

$$s = \pi^2/4G^2K^2,$$

kde i = koeficient pole (v rozmezí od 8 – 24 podle typu okuláru),

K = tubusový koeficient (1 nebo 1,25),

G = zvětšení objektivu (100 x, 40 x atd.).

3. Vypočítá se počet charakteristických fluoreskujících buněk na 1 ml resuspendované pelety (N).

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

kde y = objem resuspendované pelety v každém okénku a

F = zředovací faktor resuspendované pelety

#### Dodatek 5

### Média pro izolaci a kultivaci *C. m. subsp. sepedonicus*

#### 1. Obecná růstová média

Živný agar (Nutrient agar = NA)

Živný agar (Difco)	23 g
Destilovaná voda	1,00 l

Složky se rozpustí a provede se sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

Živný dextrózový agar (Nutrient dextrose agar = NDA)

Difco bakto živný agar obsahující 1 % D(+) glukózy (monohydrátu). Provede se sterilizace v autoklávu při 121 C po dobu 20 min.

Kvasnično-pepton-glukózový agar (Yeast peptone glucose agar = YPGA)

Kvasnicový extrakt (Difco)	5,0 g
Baktopepton (Difco)	5,0 g
D(+) glukóza (monohydrát)	10,0 g
Baktoagar (Difco)	15,0 g
Destilovaná voda	1,00 l

Složky se rozpustí a provede se sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

Médium s kvasnicovým extraktem a minerálními solemi (Yeast extract mineral salts medium = YGM)

Kvasnicový extrakt (Difco)	2,0 g
D(+) glukóza (monohydrát)	2,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,005 g
Baktoagar (Difco)	18,0 g
Destilovaná voda	1,00 l

Složky se rozpustí a provede se sterilizace 0,5 l média v autoklávu při 115 °C po dobu 20 min.

#### b) Validovaná selektivní růstová média

Médium MTNA

Pokud není uvedeno jinak, pocházejí všechny složky médií z BDH.

Kvasnicový extrakt (Difco)	2,0 g
Manit	2,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g

MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,005 g
Agar (Oxoid č. 1)	16,0 g
Destilovaná voda	1,00 l

Složky se rozpustí, pH se upraví na 7,2. Po autoklávování (při 121 °C po dobu 15 min.) a ochlazení na 50 °C se přidají antibiotika: trimethoprim 0,06 g, nalidixic acid 0,002 g, amphotericin B 0,01 g.

V zásobě se nechají roztoky antibiotik: trimethoprim (Sigma) a nalidixic acid (Sigma) (obě 5 mg/ml) v 96 % metanolu, amphotericin B (Sigma) (1 mg/ml) v dimethyl sulfoxidu. Zásobní roztoky jsou sterilizované filtrací.

*Poznámka:*

Trvanlivost základního média je 3 měsíce. Po přidání antibiotik je trvanlivost 1 měsíc při skladování v chladu do 8 +/- 2 °C.

Médium NCP-88

Živný agar (Difco)	23,0 g
Kvasnicový extrakt (Difco)	2,0 g
D-manit	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,25 g
Destilovaná voda	1,00 l

Složky se rozpustí, upraví se pH na 7,2. Po autoklávování a ochlazení na 50 °C se přidají následující antibiotika: polymyxin B sulphate (Sigma) 0,003g, nalidixic acid (Sigma) 0,008 g, cycloheximide (Sigma) 0,2 g.

Antibiotika se rozpustí pro přípravu zásobních roztoků následovně: nalidixic acid v 0,01 M NaOH, cykloheximid v 50% etanolu, polymyxin B sulphate v destilované vodě. Zásobní roztoky se sterilizují filtrací.

*Poznámka:*

Trvanlivost základního média je 3 měsíce. Po přidání antibiotik je trvanlivost 1 měsíc při skladování v chladu do 8 +/- 2 °C.

*Dodatek 6*

**Validované protokoly a činidla pro PCR**

*Poznámka:*

Úvodní testování by mělo umožnit reprodukovatelné zjištění nejméně 10<sup>3</sup> až 10<sup>4</sup> buněk *C. m. subsp. sepedonicus* na 1 ml vzorkového extraktu. Úvodní testování by také nemělo vykazovat žádné falešné pozitivní výsledky se skupinou vybraných kmenů bakterií.

**1. Vícenásobný PCR protokol s interní PCR kontrolou (Pastrik, 2000)**

**1.1. Oligonukleotidní primery**

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

Předpokládaná velikost amplikonu z DNA *C. m. subsp. sepedonicus* šablony = 502 bp (sada PSA- primerů).

Předpokládaná velikost amplikonu z interní PCR kontroly 18S rRNA = 377 bp (sada NS- primerů).

## 1.2. Reakční směs PCR

Činidlo	Množství na reakci	Konečná koncentrace
Sterilní voda (UPW)	15,725 µl	
10x PCR pufr (1) (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (frakce V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Směs d-nTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer NS-7-F (10 µM) <sup>(2)</sup>	0,1 µl	0,04 µM
Primer NS-8-R (10 µM) <sup>(2)</sup>	0,1 µl	0,04 µM
Taq polymeráza (5 U/µl) <sup>(1)</sup>	0,2 µl	1,0 U
Vzorkové množství	5,0 µl	
Celkový objem		25,0 µl

- (<sup>1</sup>) Metody byly validovány za použití Taq polymerázy Perkin Elmer (AmpliTaq nebo Gold) a Gibco BRL.
- (<sup>2</sup>) Koncentrace primerů NS-7 F a NS-8-R byla optimalizována pro extrakci pupkové části bramboru za použití homogenizační metody a purifikace DNA podle Pastrika (2000) (viz oddíl 6.1 písm. a) a 6.2). Při použití extrakce třepáním nebo jinými metodami izolace DNA je nutná nová optimalizace koncentrací činidla.

## 1.3. Reakční podmínky pro PCR

Postupuje se podle následujícího programu:

1 cyklus:	i)	3 minuty při teplotě 95 °C (denaturace DNA matrice)
10 cyklů	ii)	1 minuta při teplotě 95 °C (denaturace DNA matrice)
	iii)	1 minuta při teplotě 64 °C (připojení primerů)
25 cyklů	iv)	1 minuta při teplotě 72 °C (prodlužování kopie)
	v)	30 sekund při teplotě 95 °C (denaturace DNA matrice)
	vi)	30 sekund při teplotě 62 °C (připojení primerů)
1 cyklus	vii)	1 minuta při teplotě 72 °C (prodlužování kopie)
	viii)	5 minut při teplotě 72 °C (závěrečná prodlužování)
	ix)	Udržuje se při teplotě 4 °C

### Poznámka:

Tento program je optimalizován pro použití s tepelným cyklem MJ Research PTC 200. Při použití jiných modelů může být nutná modifikace kroků cyklů ii), iii) iv), v), vi) a vii).

## 1.4. Analýzy ampliconu restriktivním enzymem

Produkty PCR amplifikované z DNA *C. m.* subsp. *sepedonicus* produkují charakteristickou mnohotvárnost délky fragmentu s enzymem *Bgl* II po inkubaci při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Fragменты získané z fragmentu specifického pro *C. m.* subsp. *sepedonicus* mají rozměry 282 bp a 220 bp.

## 2. Příprava nanášecího pufru

### 2.1. Bromfenolová modř (10 % zásobní roztok)

Bromfenolová modř	5 g
Destilovaná voda	50 ml

### Nanášecí pufr

Glycerol (86 %)	3,5 ml
Bromfenolová modř	300 µl
Destilovaná voda	6,2 ml

### 3. Pufir 10x TRIS-acetát-EDTA (TAE), pH 8,0

TRIS	48,4 g
Ledová kyselina octová	11,42 ml
EDTA (sodná sůl)	3,72 g
Destilovaná voda	1,00 l

Před použitím se zředí na 1x.

Také komerčně dostupné (např. Invitrogen nebo rovnocenné).

#### Dodatek 7

### Validovaná činidla pro FISH test

#### 1. Oligosondy

Sonda specifická pro <i>Cms</i> CMS-CY3-01:	5' - ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'
Nespecifická eubakteriální sonda EUB-338-FITC:	5' - gct gcc tcc cgt agg agt-3'

#### 2. Fixační roztok

*[UPOZORNĚNÍ: FIXAČNÍ ROZTOK OBSAHUJE PARAFORMALDEHYD, KTERÝ JE TOXICKÝ! POUŽÍVAT RUKAVICE A NEVDECHOVAT. DOPORUČUJE SE PRACOVAT V DIGESTOŘI.]*

- Zahřeje se 9 ml molekulárně čisté vody (např. Ultra pure water = (UPW)) na teplotu přibližně 60 °C a přidá se 0,4 g paraformaldehydu. Paraformaldehyd se rozpustí po přidání 5 kapek 1N NaOH a zamíchání magnetickým míchadlem.
- Upraví se pH na 7,0 přidáním 1ml fosfátového pufru 0,1 M (PB; pH 7,0) a 5 kapek HCl 1N. Indikačním proužkem se zkontroluje pH a v případě potřeby se upraví pomocí HCl nebo NaOH.

*[UPOZORNĚNÍ: V ROZTOCÍCH S PARAFORMALDEHYDEM NEPOUŽÍVAT MĚŘIČ pH!]*

- Roztok se přefiltruje přes membránový filtr 0,22 µm a skladuje se chráněný před prachem při teplotě 4 °C do dalšího použití.
- Poznámka:*  
Alternativní fixační roztok: 96 % etanol.

#### 3. 3x Hybmix

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (sterilizovaný přes filtr a autoklávovaný)	15 mM

Zředí se až 1x, podle potřeby.

#### 4. Hybridizační roztok

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

Připraví se množství hybridizačního roztoku podle výpočtů v tabulce. Pro každé skličko (obsahující dvojmo 2 různé vzorky) je třeba 90 µl hybridizačního roztoku.

Tabulka: Doporučená množství pro přípravu hybridizační směsi

	2 sklíčka	8 sklíček
Sterilní ultra čistá voda	50,1	200,4
3x hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
sonda EUB 338 (100 ng/μl)	4,5	18,0
sonda CMSCY301 (100 ng/μl)	4,5	18,0
<b>Celkový objem (μl)</b>	<b>90,0</b>	<b>360,0</b>

*Poznámka.:*

Všechny roztoky obsahující světlocitlivé oligosondy se uchovávají v temnu při teplotě – 20 °C. Během použití je nutné je ochraňovat před přímým slunečním zářením nebo elektrickým světlem.

## 5. 0,1M fosfátový pufr, 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
Destilovaná voda	1,00l

Složky se rozpustí, zkontroluje se pH a sterilizuje se autoklárováním při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

### Dodatek 8

#### Pěstování lilku vejcoplodého

Semena lilku vejcoplodého (*Solanum melongena*) se vysejí do pasterizovaného výsevního substrátu. Semenačky s plně rozvinutými děložními lístky (10 až 14 dní) se přepichují do pasterizovaného pěstebního substrátu.

Lilek by se měl pěstovat ve skleníku za následujících podmínek:

Délka dne:	14 hodin nebo přirozená délka dne, pokud je delší;
Teplota:	den: 21 až 24 °C,
	noc: 15 °C.

Vhodné odrůdy lilku vejcoplodého „Black Beauty“, „Long Tom“, „Rima“, „Balsas“.

Dodavatel: viz internetová stránka <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

### Dodatek 9

#### Gramovo barvení v Huckerově modifikaci (Doetsch, 1981) <sup>(1)</sup>

*Roztok krystalové violeti*

Rozpustí se 2 g krystalové violeti v 20 ml 95 % etanolu.  
Rozpustí se 0,8 g šťavelanu amonného v 80 ml destilované vody.

Oba roztoky se smíchají.

*Lugolův jódový roztok*

Jód	1 g
Jodid draselný	2 g
Destilovaná voda	300 ml

Pevné látky se společně rozetrou pomocí tloučku v misce. Nasypou se do vody a míchají se v uzavřené nádobě do rozpuštění.

### *Safraninový roztok kontrastního barviva*

Zásobní roztok:

Safranin O	2,5 g
95 % etanol	100 ml

Zamíchá se a uloží se.

Ředění: 1:10 pro přípravu pracovního roztoku.

### *Postup barvení*

1. Připraví se roztěry, vysuší se na vzduchu a fixují se zahřátím.
2. Sklíčko se zalije roztokem krystalové violeti a nechá se působit 1 minutu.
3. Krátce se omyje pod tekoucí vodou.
4. Zalije se Lugolovým jódovým roztokem a nechá se působit po dobu jedné minuty.
5. Opláchne se pod tekoucí vodou a vysuší se savým papírem.
6. Odbarvuje se pomocí po kapkách přidávaného 95 % etanolu tak dlouho, pokud se vyplavuje barvivo, nebo ponořením za jemného pohybování do etanolu na dobu 30 sekund.
7. Opláchne se pod tekoucí vodou a vysuší se savým papírem.
8. Zalije se safraninovým roztokem a nechá se působit 10 s.
9. Opláchne se pod tekoucí vodou a vysuší se savým papírem.

Grampozitivní bakterie se zbarví fialově modře, gramnegativní bakterie se zbarví růžovočerveně.

---

(<sup>1</sup>) Mohou se také použít komerčně dostupné roztoky nebo barvicí soupravy.

## LITERATURA

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Commission of the European Communities, Luxembourg. Publ EUR 11 288 EN, 21 pp.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213–218.
3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147–152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. V: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21–23.
5. Hugh, R. a Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24–26.
6. Janse, J. D., 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fattyacid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335–345.
7. Janse, J. D. a J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull., č. 17, 1987, pp. 1–10.
8. Jansing, H. a K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Diseases and Protection, 105, 590–601.
9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.
10. Klement Z.; Rudolph, K a D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114–118.
12. Lelliott, R. A., E. Billing a A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470–489.
13. Lelliott, R. A. a P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Koth.) Skapt. et Burk.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 (2), 101–106.
14. Li, X. a S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Phytopathology, 85, 837–842.
15. Mills, D., Russell, B., W. a J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology, 87, 8, 853–861.
16. Pastrok, K. -H. a R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147; 687–693.
17. Pastrok, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 106, 155–165.
18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 pp.
19. Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. a Knorr, D. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83; 1095–1100.
20. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. – 3. ed.; St. Paul, Minnesota.; 373 pp.
21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
22. Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1 *Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. European Journal of Plant Pathology, 107 (7), 739–748.
23. Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of Pseudomonas working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481–527.
24. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281–295.
25. Wullings, B. A.; van Beuningen, A. R.; Janse, J. D. a A. D. L. Akkermans, 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent *in situ* hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4546–4554.



## B. METODY DIAGNÓZY, DETEKCE A IDENTIFIKACE PŮVODCE HNĚDÉ HNILOBY

Předložené postupové diagramy popisují různé postupy, které jsou součástí:

- i) diagnózy hnědé hniloby v hlízách bramboru a bakteriálního vadnutí bramboru, rajčete a některých dalších hostitelských rostlin,
- ii) detekce *Ralstonia solanacearum* ve vzorcích hlíz bramboru, rostlin bramboru, rostlin rajčete a jiných hostitelských rostlin, a ve vzorcích vody a půdy,
- iii) identifikace *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*)

### OBECNÉ ZÁSADY

Optimalizované protokoly pro různé metody, schválená činidla a podrobnosti pro přípravu testovaných a kontrolních materiálů jsou uvedeny v dodatcích. Seznam laboratoří, které se podílely na optimalizaci a validaci protokolů, je v dodatku 1.

Protože protokoly obsahují zjištění karanténního organismu a zahrnují použití životaschopných kultur *R. solanacearum* jako kontrolních materiálů, je nutné pracovat za vhodných karanténních podmínek s odpovídajícím zařízením na odstraňování odpadů a za podmínek stanovených příslušným povolením rostlinolékařské správy.

Testovací parametry musí zajišťovat stále a reprodukovatelné zjištění úrovní *R. solanacearum* jako stanovené prahy vybraných metod.

Zcela nezbytná je přesná příprava pozitivních kontrol.

Testování podle požadovaných prahů také zahrnuje správné nastavení, údržbu a kalibraci zařízení, pečlivé zacházení s činidly a jejich uchovávání a všechna opatření pro zamezení kontaminace mezi vzorky, např. oddělení pozitivních kontrol od testovaných vzorků. Musí být uplatněno standardní řízení kvality, aby se zabránilo administrativním a jiným chybám, zvláště při označování a v dokumentaci.

Podezření z výskytu, jak je uvedeno v § 4 odst. 1, naznačuje pozitivní výsledek z diagnostických nebo screeningových testů provedených na vzorku, jak je znázorněno v níže uvedených postupových diagramech. První pozitivní screeningový test (test IF, PCR/FISH, selektivní izolace) musí být potvrzen druhým screeningovým testem založeným na jiném biologickém principu.

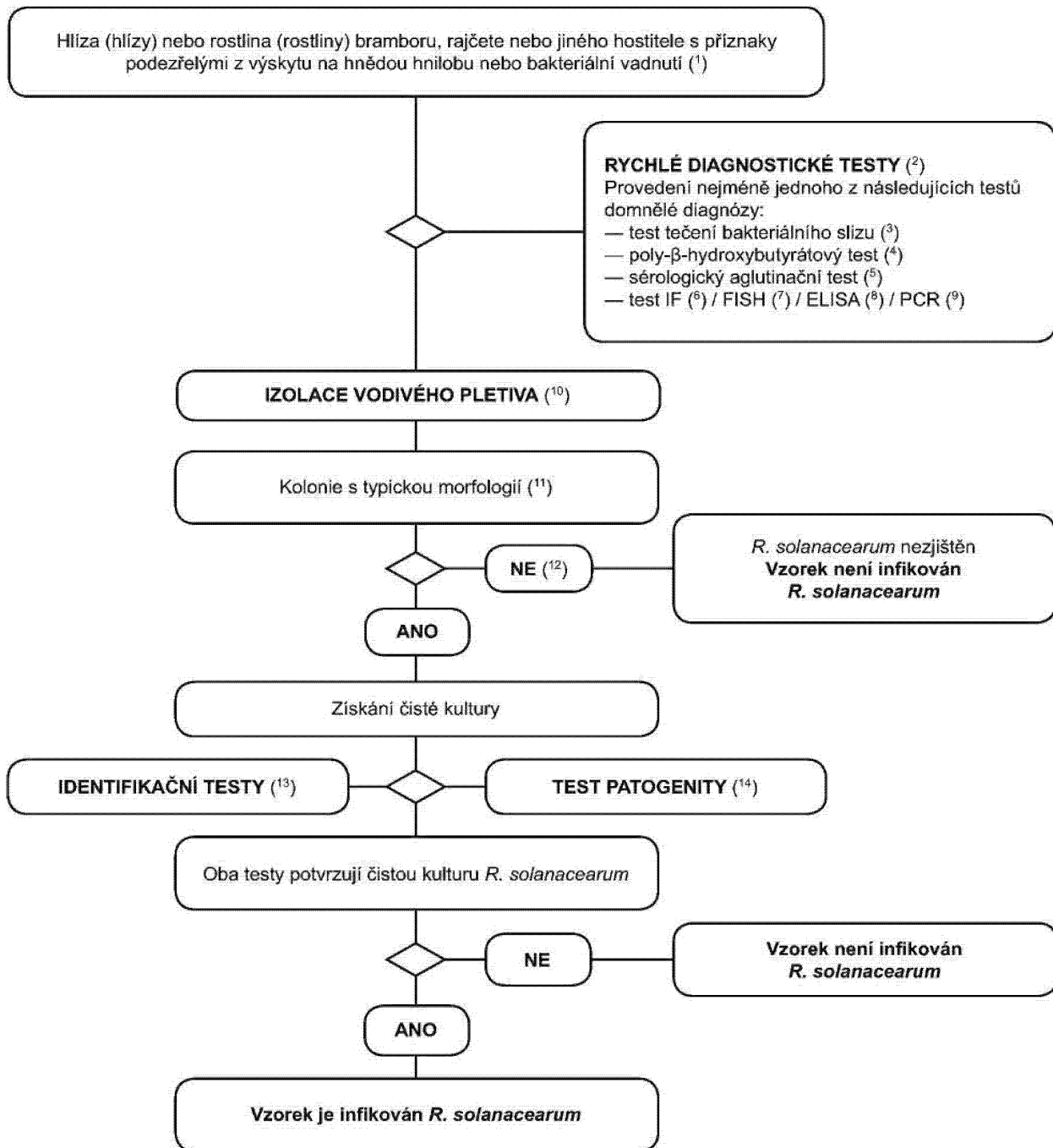
Pokud je první screeningový test pozitivní, existuje podezření na infekci *R. solanacearum* a musí být proveden druhý screeningový test. Pokud je i druhý screeningový test pozitivní, pak je podezření potvrzeno a musí se pokračovat v testování podle daného schématu. Jestliže je druhý screeningový test negativní, pak vzorek není považován za infikovaný *R. solanacearum*.

Potvrzená přítomnost podle §. 5 odst. 1 vyžaduje izolaci a identifikaci čisté kultury *R. solanacearum* s potvrzením patogenity.

# 1. Použití postupových diagramů

## 1.1. Postupový diagram pro diagnózu hnědé hniloby a bakteriálního vadnutí (*Ralstonia solanacearum*) hlíz bramboru a rostlin bramboru, rajčete a jiných hostitelských rostlin vykazujících příznaky hnědé hniloby nebo bakteriálního vadnutí

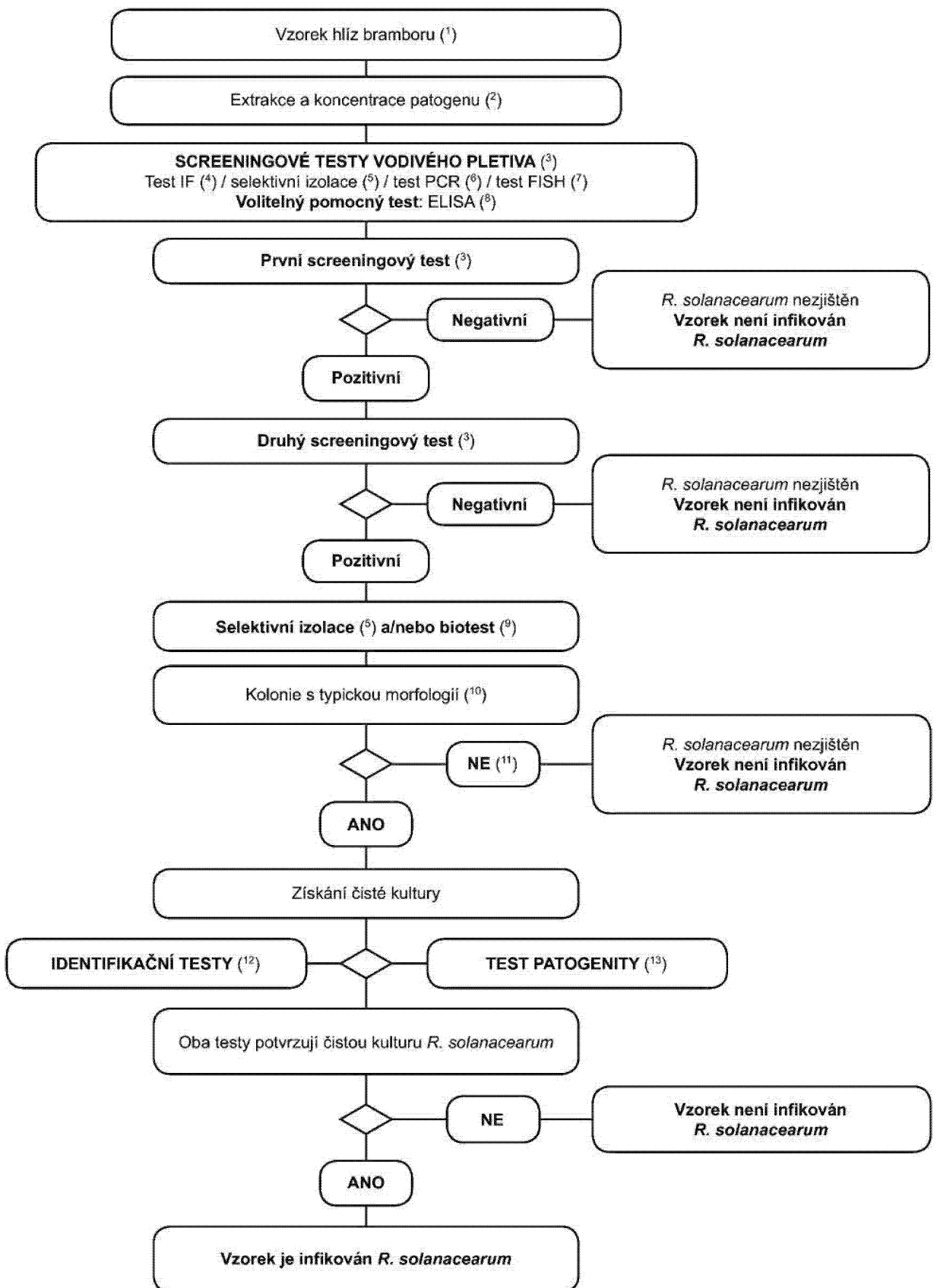
Postup testování je určen pro hlízy a rostliny bramboru s podezřením z výskytu nebo typickými příznaky hnědé hniloby nebo bakteriálního vadnutí. Zahrnuje rychlý screeningový test, izolaci patogena z infikovaného vodivého pletiva na selektivní živné půdě a v případě pozitivního výsledku identifikaci kultury *Ralstonia solanacearum*.



- 1) Popis příznaků se nachází v oddíle 2.1.
- 2) Rychlé diagnostické testy usnadňují předběžnou diagnózu, ale nejsou dokonalé. Negativní výsledek naznačuje vždy nepřítomnost patogenu.
- 3) Test na výtok slizu ze svazků cévních stonku je popsán v oddíle 6.1.1.
- 4) Test na přítomnost granulí poly- $\beta$ -hydroxybutyrátu je popsán v oddíle 6.1.2.
- 5) Sérologické aglutinační testy bakteriálního slizu nebo extraktů z pletiva vykazujícího příznaky jsou popsány v oddíle 6.1.3.
- 6) Test IF bakteriálního slizu suspendovaného ve vodě nebo extraktech pletiva vykazujícího příznaky je popsán v oddíle 6.1.5.
- 7) Test FISH bakteriálního slizu suspendovaného ve vodě nebo extraktech pletiva vykazujícího příznaky je popsán v oddíle 6.1.7.
- 8) Test ELISA bakteriálního slizu suspendovaného ve vodě nebo extraktech pletiva vykazujícího příznaky je popsán v oddíle 6.1.8.
- 9) Test PCR bakteriálního slizu suspendovaného ve vodě nebo extraktech pletiva vykazujícího příznaky je popsán v oddíle 6.1.6.
- 10) Patogen je obvykle snadno izolovatelný z rostlinného materiálu vykazujícího příznaky metodou zředěvacích roztěrů (postupným ředěním) (viz. v oddíle 2.3.).
- 11) Typická morfologie kolonie je popsána v oddíle 2.3.d.
- 12) Kultivace může selhat při pokročilých fázích infekce z důvodů konkurence nebo bujného růstu saprofytických bakterií. Jestliže jsou příznaky infekce typické, ale izolační test je negativní, musí se izolace opakovat, nejlépe kultivací na selektivních živných půdách.
- 13) Spolehlivá identifikace čistých kultur *R. solanacearum* se provede pomocí testů popsanych v bodu 6.2. Dílčí specifická charakteristika je nepovinná, ale doporučuje se pro každý nový případ.
- 14) Test patogenity je popsán v bodu 6.3.

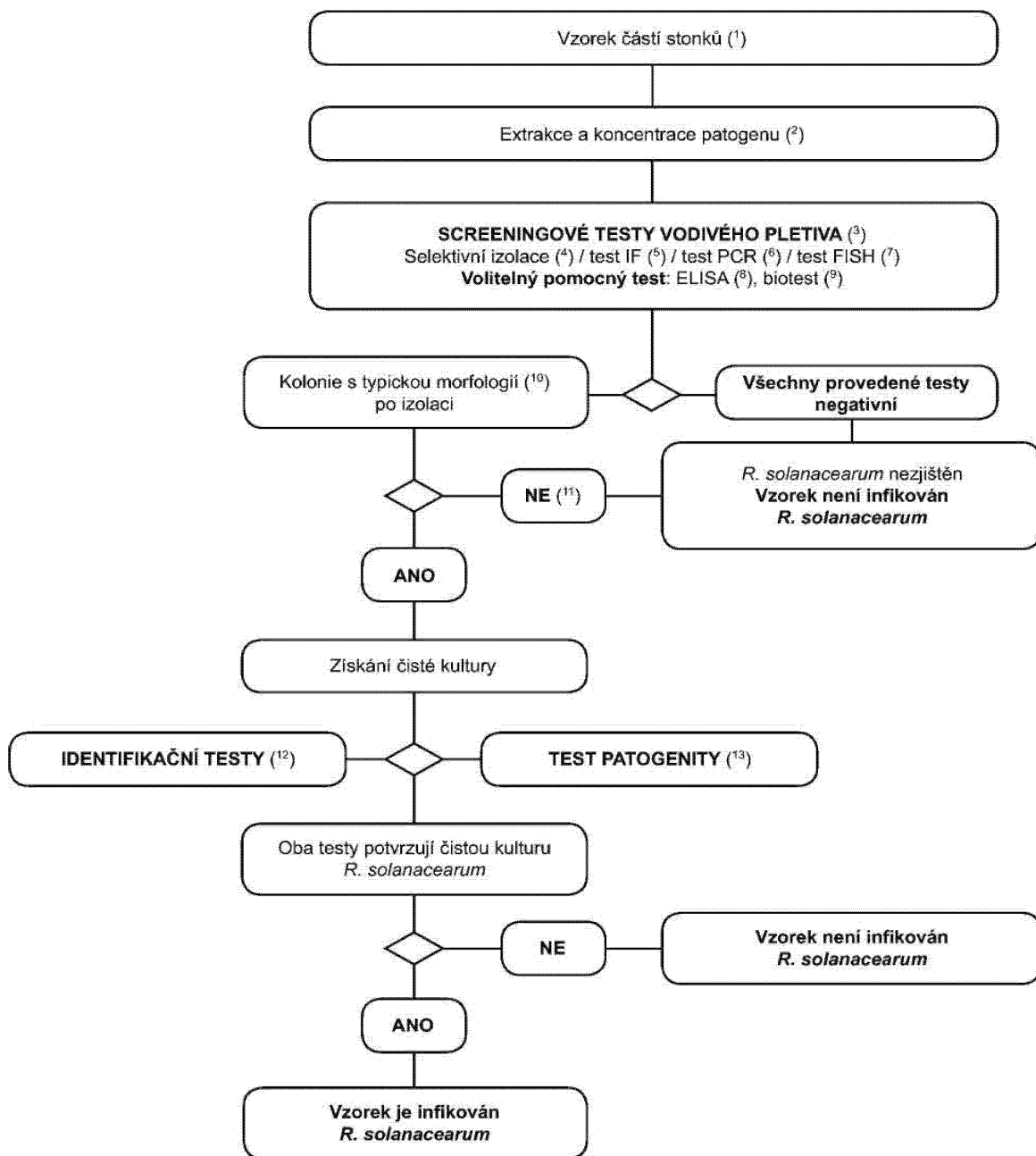
## 1.2. Postupový diagram pro detekci a identifikaci *Ralstonia solanacearum* ve vzorcích hlíz bramboru nevykazujících příznaky

Testování je určeno ke zjištění latentních infekcí v hlízách bramboru. Pozitivní výsledek alespoň ze dvou screeningových testů (viz poznámka v diagramu 3), z nichž každý je založen na jiném biologickém principu, musí být doplněn izolací patogenu a dále, v případě izolace typických kolonií, potvrzením, že čistá kultura je *R. solanacearum*. Pozitivní výsledek pouze z jednoho screeningového testu není dostačující k tomu, aby byl vzorek považován za podezřelý. Screeningové testy a izolační testy musí umožnit detekční práh  $10^3$  až  $10^4$  buněk/ml resuspendované pelety zahrnutý jako pozitivní kontroly v každé sérii testů.



- 
- 1) Standardní velikost vzorku je 200 hlíz, ačkoli postup lze použít i na menší počet, jestliže 200 hlíz není k dispozici.
  - 2) Metody extrakce a koncentrace patogenu jsou popsány v oddíle 3.1.1.
  - 3) Pokud jsou alespoň dva testy založené na různých biologických principech pozitivní, musí být provedena izolace a potvrzení. Proveďte se nejméně jeden screeningový test. Je-li test negativní, je vzorek považován za negativní. V případě, že je test pozitivní, je pro validaci prvního pozitivního výsledku nezbytný ještě jeden nebo více screeningových testů založených na různých biologických principech. Je-li druhý nebo další test negativní, je vzorek považován za negativní. Další testy nejsou nutné.
  - 4) Test IF je popsán v oddíle 6.1.5.
  - 5) Test selektivní izolace je popsán v oddíle 6.1.4.
  - 6) Testy PCR jsou popsány v oddíle 6.1.6.
  - 7) Test FISH je popsán v oddíle 6.1.7.
  - 8) Testy ELISA jsou popsány v oddíle 6.1.8.
  - 9) Biotest je popsán v oddíle 6.1.9.
  - 10) Typická morfologie kolonie je popsána v oddíle 2.3.d.
  - 11) Kultivace nebo biotest mohou selhat z důvodů konkurence nebo inhibice saprofytickými bakteriemi. Jsou-li ve screeningových testech získány pozitivní výsledky, ale izolační testy jsou negativní, je třeba opakovat izolační testy ze stejné pelety nebo dodatečným odebráním vodivého pletiva z blízkosti pupkového konce hlíz stejného vzorku, případně provést test s dalšími vzorky.
  - 12) Spolehlivé identifikace čistých kultur podezřelých na *R. solanacearum* se dosáhne pomocí testů popsáných v oddíle 6.2.
  - 13) Test patogenity je popsán v oddíle 6.3.

Postupový diagram pro detekci a identifikaci *Ralstonia solanacearum* ve vzorcích rostlin bramboru nevykazujících příznaky, rostlin rajčete nevykazujících příznaky nebo rostlin jiných hostitelských rostlin nevykazujících příznaky



- 1) Viz. oddíl 3.2.1. , kde jsou uvedeny doporučené velikosti vzorků.
- 2) Metody extrakce a koncentrace patogenu jsou popsány v oddíle 3.2.1.
- 3) Pokud jsou alespoň dva testy založené na různých biologických principech pozitivní, musí být provedena izolace a potvrzení. Provede se alespoň jeden screeningový test. Je-li test negativní, je vzorek považován za negativní. V případě, že je test pozitivní, vyžaduje se pro validaci prvního pozitivního výsledku provedení druhého nebo více screeningových testů založených na různých biologických principech. Jsou-li druhý nebo další testy negativní, považuje se vzorek za negativní. Další testy nejsou nutné.
- 4) Selektivní izolační test je popsán v oddíle 6.1.4.
- 5) Test IF je popsán v oddíle 6.1.5.
- 6) Testy PCR jsou popsány v oddíle 6.1.6.

- 7) Test FISH je popsán v oddíle 6.1.7.
- 8) Testy ELISA jsou popsány v oddíle 6.1.8.
- 9) Biotest je popsán v oddíle 6.1.9.
- 10) Typická morfologie kolonie je popsána v oddíle 2.3.d.
- 11) Kultivace nebo biotest mohou selhat z důvodů konkurence nebo inhibice saprofytickými bakteriemi. Jsou-li ve screeningových testech získány pozitivní výsledky, ale izolační testy jsou negativní, opakují se izolační testy.
- 12) Spolehlivé identifikace čistých kultur, u kterých je podezření, že se jedná o *R. solanacearum*, se dosáhne pomocí testů popsáných v oddíle 6.2.
- 13) Test patogenity je popsán v oddíle 6.3.

## 2. Diagnóza původce hnědé hniloby

### 2.1. Příznaky

#### 2.1.1. Příznaky u bramboru

*Rostlina bramboru.* Raná fáze infekce v polních podmínkách se rozpozná vadnutím listů směrem k vrcholu rostliny při vysokých teplotách během dne, přičemž v noci dochází k zotavení. V raných fázích vadnutí zůstávají listy zelené, ale později žloutnou a objevují se hnědé nekrózy. Dochází také k ohýbání listů dolů. Vadnutí jednoho výhonku nebo celé rostliny se rychle stává nevratným a končí kolapsem a uhytnutím rostliny. Z cévních svazků napříč uříznutých stonků zvadlých rostlin obvykle vytéká hnědý a mléčný bakteriální sliz nebo je možné sliz vymáčknout. Při ponoření uříznutého stonku svisle do vody se z cévních svazků táhnou vlákna slizu.

*Hlíza bramboru.* Hlízy bramboru je třeba překrojit napříč u pupkového konce a podélně přes pupkový konec. V rané fázi se infekce pozná podle láhově žlutého až světle hnědého zbarvení cévního prstence, ze kterého po několika minutách začne prýštit bledý krémový bakteriální sliz. Později se cévní zbarvení stává výrazněji hnědým a odumření se může rozšířit do parenchymatického pletiva. V pokročilejších fázích se infekce rozšíří vně od pupkového konce hlízy a z oček může vytékat bakteriální sliz, na který se přilepují částice půdy. Na slupce se mohou objevit červenohnědá, lehce propadlá místa jako důsledek vnitřního kolapsu cévního pletiva. V pokročilejších fázích infekce je obvyklý sekundární rozvoj měkkých hnilob bakteriálního a houbového původu.

#### 2.1.2. Příznaky u rajčete

*Rostlina rajčete.* Prvním viditelným příznakem je povadlý vzhled nejmladších listů. Za příznivých podmínek pro patogena (teplota půdy kolem 25°C, při nasycené vzdušné vlhkosti) se během několika málo dní rozvine kroucení listů směrem dolů a vadnutí na jedné straně rostliny nebo celé rostliny, které končí jejím úplným odumřením. Za méně příznivých podmínek pro patogena (teplota půdy méně než 21°C) rostlina tolik nevadne, ale na stonku se může tvořit větší počet postranních výhonů. Je možné pozorovat vodou nasáklé pruhy od spodu stonku, které jsou dokladem odumírání cévního systému. Při příčném řezu stonkem vylučují hnědě zbarvená vodivá pletiva bílý nebo nažloutlý bakteriální sliz.

#### 2.1.3. Příznaky u jiných hostitelů

Rostliny *Solanum dulcamara* a *S. nigrum*. Za normálních podmínek jsou u těchto plevelných hostitelských rostlin zřídka pozorovány příznaky vadnutí, pokud

teploty půdy nepřevyšují 25°C nebo není extrémně vysoká koncentrace inokula (např. u rostliny *S. nigrum* rostoucí u nemocné rostliny bramboru nebo rajčete). Při vadnutí jsou příznaky stejné jako u rostliny rajčete. Nevadnoucí rostliny *S. dulcamara*, která má stonky a kořeny ve vodě, mohou vykazovat vnitřní světle hnědé zbarvení vodivých pletiv na příčném řezu spodní části stonku nebo částí stonku pod vodou. Z řezu cévních svazků mohou vytékat bakterie nebo mohou tvořit vlákna slizu, jestliže je řez stonku ponořen svisle do vody, a to i při absenci příznaků vadnutí.

## 2.2. Rychlé screeningové testy

Rychlé screeningové testy mohou napomoci předběžné diagnóze, ale nejsou dostačující. Použije se jeden nebo více následujících testů:

### 2.2.1. Test na výtok slizu ze stonku

(Viz. 6.1.1.)

### 2.2.2. Test na přítomnost granulí poly- $\beta$ -hydroxybutyrátu (PHB)

Charakteristické granule PHB v buňkách *R. solanacearum* jsou zviditelněny obarvením tepelně fixovaných skvrn bakteriálního slizu z infikovaného pletiva na mikroskopickém sklíčku nilskou modří A nebo súdánskou černí (viz. oddíl 6.1.2.).

### 2.2.3. Sérologické aglutinační testy

(Viz. oddíl 6.1.3.)

### 2.2.4. Jiné testy

Dalšími vhodnými rychlými screeningovými testy jsou test IF (viz. oddíl 6.1.5.), test FISH (viz. oddíl 6.1.7.), testy ELISA (viz. oddíl 6.1.8.) a testy PCR (viz. oddíl 6.1.6.).

## 2.3. Postup při izolaci

- a) Odebere se sliz nebo vrstva zbarveného pletiva z cévního prstence hlízy bramboru nebo z cévních vláken stonku rostliny bramboru, rajčete nebo jiné vadnoucí hostitelské rostliny. Suspenduje se v malém množství sterilní destilované vody nebo 50mM fosfátového pufru (dodatek 4) a nechá se 5-10 minut stát.
- b) Připraví se řada desetinasobných ředění suspenze.
- c) Přenese se 50-100  $\mu$ l suspenze a roztoku na universální živnou půdu (NA, YPGA nebo SPA; viz. dodatek 2) a/nebo Kelmanovo tetrazolové médium (dodatek 2) a/nebo validované selektivní médium (např. SMSA, viz. dodatek 2). Rozetře se metodou zředovacích roztěrů. Připraví se případně samostatné misky s rozředěnou buněčnou suspenzí *R. solanacearum* biovar 2 k pozitivní kontrole.
- d) Inkubuje se 2-6 dní při teplotě 28°C.
  - Na universální živné půdě vytvářejí virulentní izoláty *R. solanacearum* perlově krémově bílé, ploché, nepravidelné a fluidní kolonie, často s charakteristickými spirálkami ve středu. Avirulentní formy *R. solanacearum* tvoří malé kruhové nefluidní máslovité kolonie, které jsou zcela krémově bílé.



- U Kelmanova tetrazolového média a média SMSA jsou spirálky krvavě červeně zbarvené. Aviruletní formy *R. solanacearum* tvoří malé kruhové nefluidní máslovité kolonie, které jsou zcela temně červené.

## 2.4 Identifikační testy *Ralstonia solanacearum*

Testy potvrzující výskyt *R. solanacearum* v podezřelých izolátech jsou popsány v bodu 6.2.

## 3. Detekce a identifikace původce hnědé hniloby ve vzorcích hlíz bramboru

### 3.1. Podrobné metody pro detekci a identifikaci *Ralstonia solanacearum* ve vzorcích bezpříznakových hlíz bramboru

#### 3.1.1. Příprava vzorků

*Poznámka:*

- Standardní velikost vzorku je 200 hlíz na jeden test. Intenzivnější vzorkování vyžaduje více testů na vzorcích této velikosti. Větší množství hlíz ve vzorku vede k zpomalení nebo složitějšímu výkladu výsledků. Postup lze vhodně použít i pro vzorky s méně než 200 hlízami, pokud je k dipozici menší množství hlíz.
- Validace všech níže uvedených zjišťovacích metod je založená na testování vzorků o velikosti 200 hlíz.
- Extrakt bramboru popsáný níže může být rovněž použit pro zjištění původce bakteriální kroužkovitosti bramboru. *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*.

Nepovinné ošetření před přípravou vzorku

- a) Inkubace vzorků při teplotě 2-30°C po dobu až 2 týdnů před testováním na podporu množení všech populací *R. solanacearum*.
- b) Hlízy se omyjí. Použijí se vhodné desinfekční prostředky (s obsahem chlóru, jestliže má být proveden PCR test, pro odstranění patogenní DNA) a mycí prostředky mezi každým vzorkem. Hlízy se nechají oschnout na vzduchu. Tento postup mytí je vhodný zvláště v případě, když je ve vzorcích příliš zeminy nebo jestliže má být proveden test PCR nebo přímá izolace.

- 3.1.1.1. Pomocí čistého a dezinfikovaného skalpelu nebo nože na zeleninu se odstraní slupka na pupkovém konci každé hlízy, tak aby bylo viditelné vodivé pletivo. Opatrně se vyříznou malé výkrojky vodivých pletiv na pupkovém konci. Množství pletiva nezahrnující cévní svazky se omezí na minimum.

*Poznámka:*

Všechny (hniující) hlízy s podezřelými příznaky hnědé hniloby se dají stranou a testují se odděleně.

Pokud jsou při vyříznutí výkrojku zjištěny příznaky podezření na hnědou hnilobu, provede se vizuální vyšetření takové hlízy na řezu hlízy na pupkovém konci. Všechny naříznuté hlízy s podezřelými příznaky se uchovávají po dobu nejméně 2 dnů při pokojové teplotě, aby mohlo dojít ke zkorkovatění (suberizaci) a potom se uchovávají v chladu (4-10°C) za řádných karanténních podmínek. Všechny hlízy včetně hlíz s podezřelými příznaky by měly být uchovány podle přílohy III.

3.1.1.2. Výkrojky z pupkové části se uloží do nepoužitých nádob na jedno použití, které jsou uzavíratelné a/nebo utěsnitelné (v případě, že nádoby jsou znovu používány, musí být důkladně vyčištěny a dezinfikovány prostředky s obsahem chlóru). Nejlépe je zpracovat výkrojky z pupkového konce okamžitě. Není-li to možné, uchovávají se v nádobě bez přidání pufru; v chladu nejdéle 72 hodin nebo při pokojové teplotě (18 -25 °C) nejdéle 24 hodin.

Výkrojky z pupkových konců se zpracují jedním z následujících postupů:

- a) Zalijí se dostatečným množstvím (přibližně 40 ml) extrakčního pufru (dodatek 4) a třepou se v rotační třepačce (50-100 ot./min) 4 hodiny při teplotě nižší než 24 °C nebo 16-24 hodin chlazené,  
nebo
- b) homogenizují se dostatečným množstvím (přibližně 40 ml) extrakčního pufru (dodatek 4) buď v mixéru (např. Waring nebo Ultra Thurax) nebo drcením v utěsněném maceračním sáčku na jedno použití (např. silný polyethylenový sáček Stomacher nebo Bioreba, 150mm x 250mm, sterilovaný zářením) pomocí gumového tloučku nebo vhodného mlecího zařízení (např. Homex).

*Poznámka:*

Při homogenizaci vzorků pomocí mixéru existuje vysoké nebezpečí křížové kontaminace vzorků. Je nutné zamezit vzniku aerosolu nebo rozlití během extrakčního procesu. Pro každý vzorek se použijí čerstvě sterilované nože (ostří) a nádoby. Při testu PCR je nutno zabránit přenosu DNA na nádobách nebo v mlecím přístroji. U testu PCR se doporučuje použít drcení v sáčcích na jedno použití a použití zkumavek na jedno použití.

3.1.1.3. Supernatant se dekantuje. Je-li příliš zakalený, pročistí se buď pomalým odstředováním (nejvýš 180 g po dobu 10 minut při teplotě 4-10°C) nebo vakuovou filtrací (40-100µm), filtr se omyje přidávkem (10ml) extrakčního pufru.

3.1.1.4. Bakteriální frakce se zahustí odstředováním, 7 000g po dobu 15 minut (nebo 10 000g po dobu 10 minut) při teplotě 4-10°C a odstraní se supernatant, aniž by se rozvířila peleta.

3.1.1.5. Peleta se resuspenduje v 1,5 ml peletového pufru (dodatek 4). Použije se 500 µl pro *R. solanacearum*, 500 µl pro *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* a 500 µl pro referenční účely. Přidá se sterilní glycerol na konečnou koncentraci 10 - 25% (v/v) k 500 µl referenční poměrné části a ke zbývající části vzorku, promíchá se vířením a uloží se při teplotě -16 až -24°C (týdny) nebo -68 až -86°C (měsíce). Extrakty se uchovávají během testování při teplotě 4-10°C.

Opakované zmrazení a rozmrazení se nedoporučuje.

Je-li nutná přeprava extraktu, zajistí se přeprava v chladícím boxu s doručením do 24 až 48 hodin.

3.1.1.6. Je nezbytně nutné, aby všechny pozitivní kontroly a vzorky *R. solanacearum* byly uchovány a zpracovány odděleně, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci. To platí pro sklíčka IF a všechny testy.

3.1.2. Testování

Postupové diagramy a popisy testů a optimalizovaných protokolů jsou v příslušných dodatcích:

*Selektivní izolace* (viz. oddíl 6.1.4.)

*IF test* (viz. oddíl 6.1.5.)

*Testy PCR* (viz. oddíl 6.1.6.)

*Test FISH* (viz. oddíl 6.1.7.)

*Testy ELISA* (viz. oddíl 6.1.8.)

*Biotest* (viz. oddíl 6.1.9.)

### 3.2. Podrobné metody pro detekci a identifikaci *R. solanacearum* ve vzorcích bezpříznakových rostlin bramboru, rajčete nebo jiných hostitelských rostlin

#### 3.2.1. Příprava vzorků

*Poznámka:*

Pro účely detekce latentních populací *R. solanacearum* se doporučuje testovat smíšené vzorky. Postup lze vhodně použít na smíšené vzorky o počtu až 200 stonkových částí. Provádí-li se průzkum, měl by být založen na statisticky reprezentativním vzorku zkoumané rostlinné populace.

##### 3.2.1.1. Do uzavřené sterilní nádoby se uloží 1-2 cm dlouhé kousky stonků podle následujícího postupu vzorkování:

*Rajčatové sazenice z předpěstírny:* Čistým dezinfikovaným nožem se odebere kousek dlouhý 1 cm z paty každého stonku hned nad úroveň země.

*Rostliny z pole nebo skleníku:* Čistým dezinfikovaným nožem se odebere nejspodnější postranní výhonek z každé rostliny uříznutý hned nad spojením s hlavním stonkem. Odebere se nejspodnější, 1 cm dlouhý díl z každého výhonku.

*Jiné hostitelské rostliny:* Čistým dezinfikovaným nožem nebo zahradnickými nůžkami se odebere 1 cm dlouhý díl z paty každého stonku hned nad úroveň země. U lilku potměchuti (*S. dulcamara*) nebo jiných hostitelských rostlin rostoucích ve vodě se odeberou 1-2 cm díly ze stonku pod vodou nebo oddenků s vodními kořeny.

Při vzorkování určité oblasti se doporučuje testovat statisticky reprezentativní vzorek o počtu nejméně 10 rostlin na 1 vzorkovací místo pro každou potenciální plevelnou hostitelskou rostlinu. Detekce patogenu bude nejspolehlivější v období pozdního jara, léta a podzimu, ačkoli přirozenou infekci je možné zjistit po celý rok u víceleté *Solanum dulcamara* rostoucí ve vodních tocích. Mezi známé hostitelské rostliny patří plevelné rostliny bramboru, *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* a další zástupci čeledi *Solanaceae*. Dalšími hostitelskými rostlinami jsou rostliny rodu *Pelargonium* spp. a *Portulaca oleracea*. Některé evropské plevelné druhy, které mohou hostit populace *R. solanacearum* biovar 2/Race 3 v kořenech a/nebo oddencích za specifických podmínek, zahrnují *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans.*, *Tussilago farfara* a *Urtica dioica*.

*Poznámka:*

V této fázi je možné provést vizuální šetření vnitřních příznaků (zbarvení cév nebo bakteriální sliz). Jakýkoli díl stonku s příznaky se dá stranou a testuje se odděleně (viz. oddíl 2.).

3.2.1.2. Části stonku se krátce dezinfikují 70% etanolem a ihned vysuší savým papírem. Potom se zpracují části stonku jedním z následujících postupů:

- a) zalijí se části dostatečným množstvím (přibližně 40 ml) extrakčního pufru (dodatek 4) a třepou na rotační třepačce (50-100 ot./min) 4 hodiny při teplotě do 24°C nebo 16-24 hodin chlazené,  
nebo
- b) se ihned zpracují drcením v pevném maceračním sáčku (např. Stomacher nebo Bioreba) s přiměřeným množstvím extrakčního pufru (dodatek 4) pomocí gumového tloučku nebo vhodného mlecího zařízení (např. Homex). Není-li to možné, uloží se části stonků v chladu nejdéle na 72 hodin nebo při pokojové teplotě (18 – 25°C) na 24 hodin.

3.2.1.3. Po usazení, které má trvat 15 minut, se dekantuje supernatant.

3.2.1.4. Další pročišťování extraktu nebo zahušťování bakteriální frakce obvykle není třeba, ale lze je provést filtrací a/nebo odstředováním popsáním v oddíle 3.1.1.3. až 3.1.1.5.

3.2.1.5. Čistý nebo koncentrovaný vzorkový extrakt se rozdělí na dva stejné díly. Jeden díl se testuje při teplotě 4-10°C a druhý díl se skladuje v 10-25% (v/v) sterilním glycerolu při teplotě -16 až -24°C (týdny) nebo -68 až -86°C (měsíce) pro případné další testování.

### 3.2.2. Testování

Postupové diagramy a popisy testů a optimalizovaných protokolů jsou v příslušných dodatcích:

*Selektivní izolace* (viz. oddíl 6.1.4.)

*Test IF* (viz. oddíl 6.1.5.)

*Testy PCR* (viz. oddíl 6.1.6.)

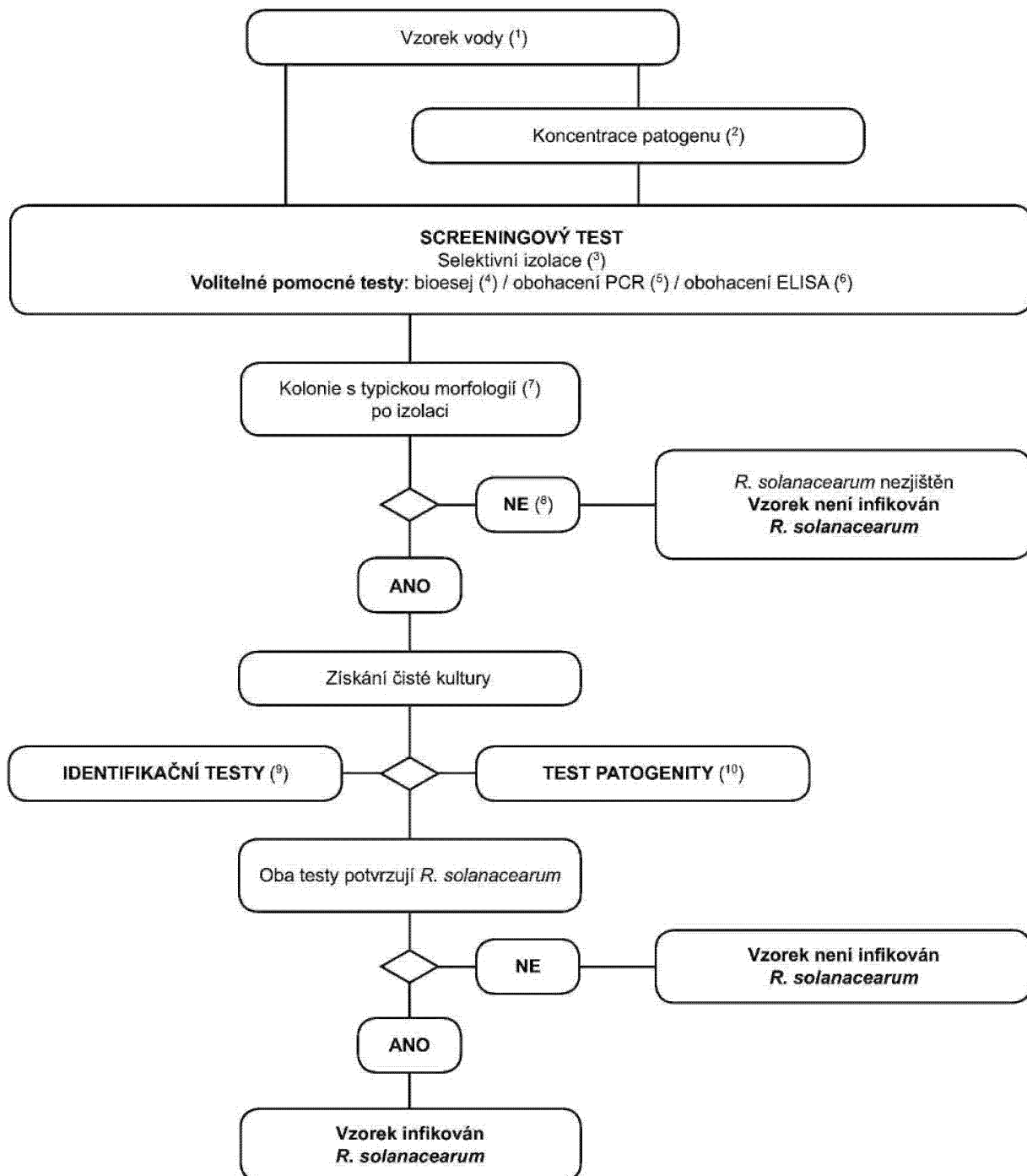
*Test FISH* (viz. oddíl 6.1.7.)

*Testy ELISA* (viz. oddíl 6.1.8.)

*Biotest* (viz. oddíl 6.1.9.)

## 4. Detekce a identifikace původce hnědé hniloby ve vodě

### 4.1 Postupový diagram pro detekci a identifikaci *R. solanacearum* ve vodě



(1) Viz. oddíl 4.2.1., kde jsou uvedeny doporučené postupy vzorkování.

(2) Metody koncentrace patogenu jsou popsány v oddíle 4.2.1. Koncentrace zvětšuje populaci jak patogenu, tak konkurenčních saprofytických bakterií a doporučuje se jen tehdy, jestliže nebrání izolačnímu testu.

(3) Selektivní izolační test je popsán v oddíle 6.1.4.

(4) Biotest je popsán v oddíle 6.1.9.

(5) Metody obohacovacího testu PCR jsou popsány v oddíle 6.1.4.2. a 6.1.6.

- (6) Metody obohacovacího testu ELISA jsou popsány v oddíle 6.1.4.2. a 6.1.8.
- (7) Typická morfologie kolonie je popsána v oddíle 2.3.d.
- (8) Kultivace může selhat z důvodu konkurence nebo inhibice saprofytickými bakteriemi. Je-li podezření, že velká saprofytická populace ovlivní spolehlivost izolace, opakují se izolační testy po zředění vzorku sterilní vodou.
- (9) Spolehlivá identifikace podezřelých čistých kultur *R. solanacearum* se dosáhne pomocí testů popsanych v oddíle 6.2.
- (10) Test patogenity je popsán v oddíle 6.3.

## 4.2. Metody detekce a identifikace *R. solanacearum* ve vodě

### *Princip*

Validované schéma detekce popsané v tomto oddíle je použitelné k detekci patogenu ve vzorcích povrchové vody a rovněž může být použito k testování vzorků odpadní vody ze zpracování brambor a odpadní vody. Očekávaná citlivost detekce se však liší v závislosti na substrátu. Citlivost testu selektivní izolace je ovlivňována populacemi konkurenčních saprofytických bakterií, kterých je obecně mnohem více v odpadní vodě ze zpracování brambor a odpadní vodě než v povrchové vodě. Zatímco níže uvedené schéma předpokládá detekci asi  $10^3$  buněk/litr povrchové vody, citlivost detekce v odpadní vodě ze zpracování brambor a odpadní vodě bude pravděpodobně podstatně nižší. Z tohoto důvodu se doporučuje testovat odpadní vodu po provedení nějakého čistícího postupu (např. sedimentace nebo filtrace), při nichž dojde ke snížení saprofytických bakteriálních populací. Omezení citlivosti testovacího schématu by mělo být bráno v úvahu při hodnocení spolehlivosti v případě získání negativních výsledků. Vzhledem k tomu, že se toto schéma používá úspěšně k mapování výskytu nebo nepřítomnosti patogenu v povrchové vodě, je třeba si uvědomit jeho omezení při použití k podobnému mapování v odpadní vodě ze zpracování brambor a v odpadní vodě.

### 4.2.1. Příprava vzorků

#### *Poznámka:*

- Zjištění *R. solanacearum* v povrchové vodě je nejspolehlivější v období pozdního jara, léta a podzimu, kdy teplota vody překračuje 15°C.
- Opakované vzorkování v různé době během výše uvedených období na určených vzorkovacích místech zvýší spolehlivost zjištění snížením vlivů výkyvů povětrnostních podmínek.
- Vlivem silných dešťů a geografie vodního toku může dojít ke značnému zředění a tím i zastření výskytu patogenu.
- Vzorky vody se odebírají v blízkosti hostitelských rostlin, pokud jsou přítomny.

4.2.1.1. Na vybraných vzorkovacích místech se odeberou vzorky vody do sterilních zkumavek nebo lahvíček na jedno použití, pokud možno 30 cm pod hladinou a 2 m od břehu. Při vzorkování odpadní vody ze zpracování brambor a odpadní vody se odeberou vzorky z místa výtoku odpadní vody. Doporučená velikost vzorku je 500 ml. Je-li upřednostňována menší velikost, doporučuje se odebrat vzorky nejméně 3krát pro každé vzorkovací místo, z nichž každý bude obsahovat 2 opakované dílčí vzorky o velikosti nejméně 30 ml. Při intenzivním mapování se vyberou nejméně 3 vzorkovací místa na každé 3 km vodního toku a vzorkují se rovněž přítoky.

4.2.1.2. Vzorky se přepravují v chladu a temnu (4-10°C) a testují do 24 hodin.

4.2.1.3. Je-li potřeba, může být provedena koncentrace bakteriální frakce pomocí následujících metod:

- a) Odstředí se 30-50 ml dílčí vzorky při 10 000 g po dobu 10 minut (nebo 7000 g po dobu 15 minut), pokud možno při teplotě 4-10°C, slije se kapalina nad usazeninou a resuspenduje se peleta v 1 ml pufru (dodatek 4).
- b) Proveďte se filtrace přes membránu (minimální velikost pórů 0,45 µm) s následným promytím filtru v 5-10 ml peletového pufru a zachycením filtrátu. Tato metoda je vhodná pro velké objemy vody, které obsahují malý počet saprofytů.

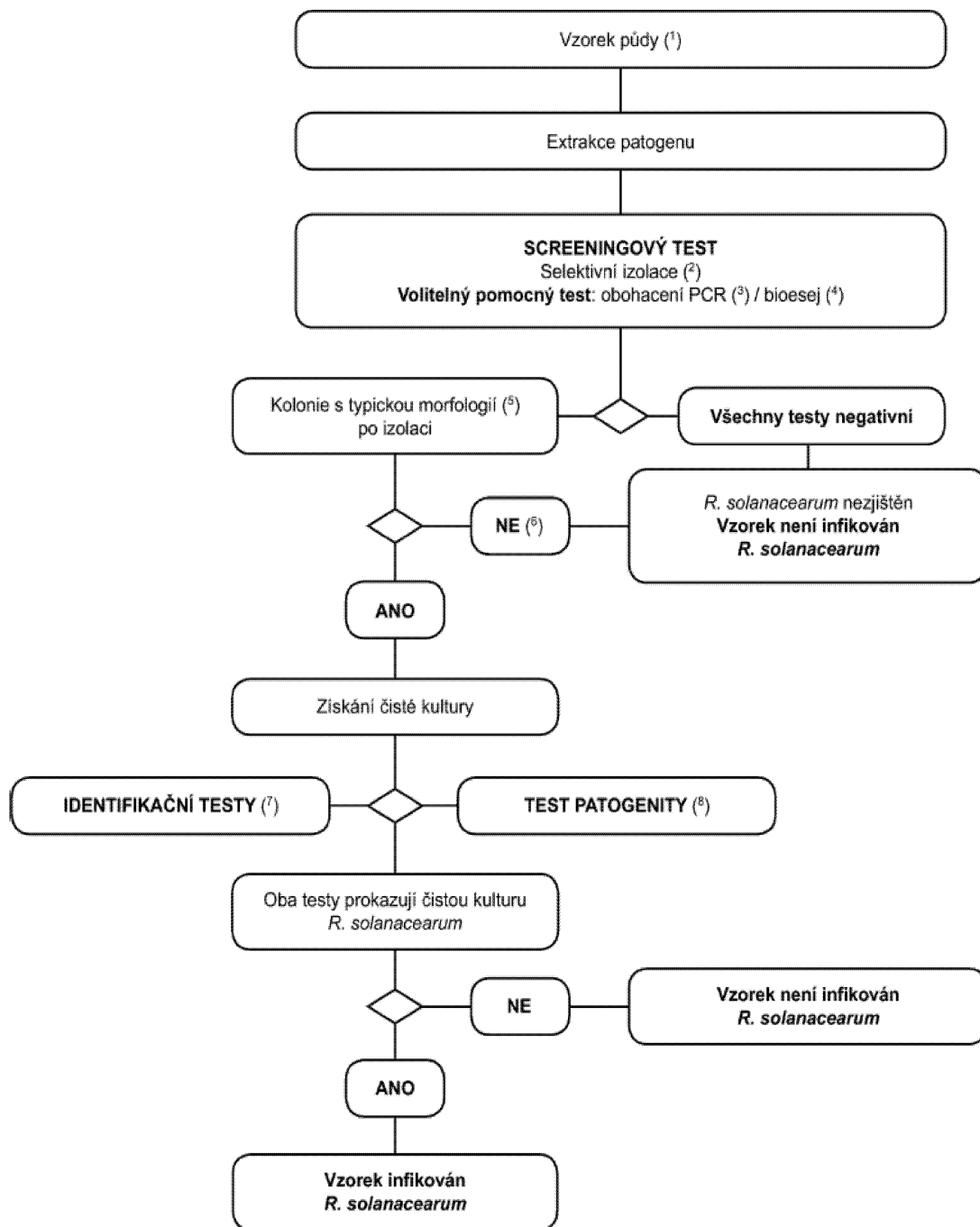
Koncentrace se obvykle nedoporučuje u vzorků vody ze zpracování brambor nebo u vzorků odpadní vody, protože zvýšená populace konkurenčních saprofytických bakterií inhibuje detekci *Ralstonia solanacearum*.

4.2.2. Testování

Viz. postupový diagram a popis testů v příslušných dodatcích.

## 5. Detekce a identifikace původce hnědé hniloby v půdě

### 5.1. Postupový diagram pro detekci a identifikaci *R. solanacearum* v půdě



(1) Viz. oddíl 5.2.1., kde jsou uvedeny doporučené postupy vzorkování

(2) Selektivní izolační test je popsán v oddíle 6.1.4.

(3) Obohacovací PCR testy jsou popsány v oddíle 6.1.4.2. a 6.1.6.

(4) Biotest je popsán v oddíle 6.1.9.

(5) Typická morfologie kolonie je popsána v oddíle 2.3.d.



- (6) Kultivace může selhat z důvodů konkurence nebo inhibice saprofytickými bakteriemi. Je-li podezření na vliv saprofytické populace na spolehlivost izolace, opakují se testy selektivní izolace po dalším zředění vzorku.
- (7) Spolehlivá identifikace podezřelých čistých kultur *R. solanacearum* se dosáhne pomocí testů popsanych v oddíle 6.2.
- (8) Test patogenity je popsán v oddíle 6.3.

## 5.2. Metody pro detekci a identifikaci *R. solanacearum* v půdě

### *Principy*

Platné detekční schéma popsané v tomto oddíle je použitelné pro detekci patogenu ve vzorcích půdy, ale může být rovněž použito k testování vzorků pevného odpadu při zpracování brambor nebo kalu z odpadní vody. Je však nutné poznamenat, že tyto metody nejsou dostatečně citlivé, aby zaručovaly detekci nízkých nebo nepravidelně rozptýlených populací *Ralstonia solanacearum*, které se mohou vyskytovat v přirozeně infikovaných vzorcích těchto substrátů.

Při hodnocení spolehlivosti všech získaných negativních výsledků a také při sestavování přehledů určujících přítomnost patogenu v půdě nebo kalu je třeba vzít v úvahu omezenou citlivost tohoto testovacího schématu. Nejspolehlivějším testem přítomnosti patogenu v polní půdě je vypěstování náchylné hostitelské rostliny a její sledování, zda není infikována, ale i při použití této metody unikne nízký stupeň zamoření pozornosti.

### 5.2.1. Příprava vzorků

- 5.2.1.1. Vzorkování polní půdy by se mělo řídit standardními principy používanými pro vzorkování hlístů. Na jeden vzorek se shromáždí 0,5 až 1 kg půdy ze 60 míst na ploše 0,3 ha z hloubky 10-20 cm. Je-li podezření na výskyt patogenu, zvýší se počet sběrných míst na 120 z plochy 0,3 ha. Před testováním se uchovávají vzorky při teplotě 12-15°C. Kal ze zpracování brambor a kanalizace se navzorkuje shromážděním celkem 1 kg z míst reprezentujících celkový objem testovaného kalu. Před testováním se každý vzorek dobře promíchá.
- 5.2.1.2. Dílčí vzorky 10-25 g půdy nebo kalu se rozptýlí rotační třepačkou (250 ot./min) v 60-150 ml extrakčního pufru (dodatek 4) po dobu 2 hodin. Je-li třeba, přidání 0,02% sterilního Tween-20 a 10-20 g sterilních kamínků může napomoci disperzi.
- 5.2.1.3. Během testování se udržuje suspenze v teplotě 4°C.

### 5.2.2. Testování

Postupový diagram a popis testů jsou v příslušném dodatku.

## 6. Optimalizované protokoly pro detekci a identifikaci *R. solanacearum*

### 6.1. Diagnostické a detekční testy

#### 6.1.1. Test na výtok slizu ze stonku

Přítomnost *R. solanacearum* ve stoncích vadnoucích rostlin bramboru, rajčete nebo jiných hostitelských rostlin může ukázat následující jednoduchý test pravděpodobného výskytu: uřízne se stoněk právě nad úrovní země. Řez stonku se ponoří do zkumavky s čistou vodou. Sleduje se, zda se po několika minutách

objeví charakteristická samovolně proudící vlákna bakteriálního slizu z přeříznutých cévních svazků.

#### 6.1.2. Test na přítomnost granulí poly- $\beta$ -hydroxybutyrátu

1. Připraví se roztěr bakteriálního slizu z infikovaného pletiva nebo ze 48 hodinové kultury na živné půdě YPGA nebo SPA (dodatek 2) na mikroskopické sklíčko.
2. Připraví se pozitivní kontrolní roztěr kmenu biovaru 2 *R. solanacearum* a případně negativní kontrolní roztěr o známém PHB negativním sp.
3. Roztěry se nechají uschnout a spodní povrch každého sklíčka se rychle protáhne nad plamenem, aby se roztěry fixovaly.
4. Preparáty se obarví buď nilskou modří nebo súdánskou černí a provede se mikroskopické pozorování podle níže uvedeného popisu:

##### *Test nilskou modří:*

- a) Obě sklíčka se zakápnou 1% vodným roztokem nilské modří a nechají se inkubovat 10 minut při teplotě 55°C.
- b) Odstraní se barvicí roztok. Krátce se opláchne jemně tekoucí vodou z kohoutku. Přebytečná voda se odsaje savým papírem.
- c) Roztěr se zakápně 8% vodním roztokem kyseliny octové a nechá se inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě.
- d) Krátce se opláchne jemně tekoucí vodou z kohoutku. Přebytečná voda se odsaje savým papírem.
- e) Znovu se navlhčí kapkou vody a přiloží se krycí sklíčko.
- f) Zkoumá se obarvený roztěr epifluorescenčním mikroskopem při 450 nm pod olejovou nebo vodní imersí se zvětšením 600x až 1000x s použitím objektivu pro olejovou nebo vodní imersi.
- g) Pozoruje se, zda se objeví na PHB granulích jasně oranžová fluorescence. Také se pozoruje v procházejícím normálním světle, zda jsou granule intracelulární a zda je morfologie buněk typická pro *R. solanacearum*.

##### *Test súdánskou černí:*

- a) Zakápnou se všechna sklíčka 0,3% roztokem súdánské černi B v 70% etanolu a inkubují se 10 minut při pokojové teplotě.
- b) Odstraní se barvicí roztok a krátce se opláchne jemně tekoucí vodou z kohoutku a odsaje se přebytečná voda savým papírem.
- c) Sklíčka se ponoří krátce do xylolu a vysají se savým papírem. Upozornění : Xylol je zdraví škodlivý, je třeba dodržet nezbytná bezpečnostní opatření a pracovat v digestoři.
- d) Sklíčka se zakápnou 0,5% (w/v) vodným roztokem safraninu a nechají 10 vteřin inkubovat při pokojové teplotě. Upozornění: safranin je zdraví škodlivý, je třeba dodržet nezbytná bezpečnostní opatření a pracovat v digestoři.
- e) Sklíčka se opláchnou jemně tekoucí vodou z kohoutku, odsaje se přebytečná voda savým papírem a přiloží se krycí sklíčko.
- f) Zkoumá se obarvený roztěr mikroskopem s procházejícím světlem pod olejovou imersí a při zvětšení 1 000x.

- g) Hledá se modročerné zbarvení PHB granulí v buňkách *R. solanacearum* s růžově zbarvenými stěnami buněk.

### 6.1.3. Sérologické aglutinační testy

Aglutinace buněk *R. solanacearum* v bakteriálním slizu nebo v extraktech z pletiv s příznaky je nejlépe pozorovatelná pomocí validovaných protilátek (viz. dodatek 3) označených příslušnými obarvenými značkovači, např. červenými buňkami *Staphylococcus aureus* nebo obarvenými latexovými částicemi. Při použití komerčně dostupného vybavení (viz. dodatek 3) se postupuje podle instrukcí výrobce. Jinak je postup následující:

- Smíchají se kapky suspenze označené protilátky a bakteriálního slizu (přibližně 5 µl každé látky) na okénku testovacího víceokénkového sklíčka.
- Připraví se pozitivní a negativní kontrolní vzorky použitím suspenzí biovaru 2 *R. solanacearum* a heterologního kmenu.
- Pozoruje se, zda se v pozitivních vzorcích po jemném míchání po dobu 15 sekund objeví aglutinace.

### 6.1.4. Selektivní izolace

#### 6.1.4.1. Očkování na živnou půdu

*Poznámka:*

Než se použije tato metoda poprvé, provede se předběžný test k zajištění reprodukovatelné detekce  $10^3$  až  $10^4$  jednotek tvořících kolonie *R. solanacearum* na 1 ml přidaných do extraktů ze vzorků, které byly předtím testovány s negativním výsledkem.

Použije se řádně validovaná selektivní živná půda, např. SMSA (ve znění Elphinstone et al., 1996; viz. dodatek 2).

Rozlišení *R. solanacearum* od jiných bakterií schopných na živné půdě růst vyžaduje velkou pozornost. Dále, kolonie *R. solanacearum* mohou mít atypickou morfologii, jestliže Petriho misky jsou přeplněny nebo jsou rovněž přítomny antagonistické bakterie. Je-li podezření na konkurenci nebo inhibici, měl by být vzorek otestován znovu pomocí jiného testu.

Při použití čerstvě připravených extraktů ze vzorků lez očekávat, že citlivost detekce touto metodou bude velmi vysoká. Metoda je však použitelná i pro extrakty, které byly uchovány v glycerolu při teplotě od -68 do -86°C.

Pozitivní kontroly se připraví jako desetinné ředění ze suspenze  $10^6$  cfu/ml virulentního kmene biovaru 2 *R. solanacearum* (např. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). K vyloučení možné kontaminace se připraví pozitivní kontrolní vzorky zcela odděleně od vzorků k testování.

U každé nově připravené šarže selektivní živné půdy by měla být před jejím použitím k rutinnímu testování vzorků nejdříve otestována její vhodnost pro kultivaci patogenu. Kontrolní materiál se testuje tímž způsobem jako vzorek (vzorky).

- Provede se ředění s cílem zajistit, aby všechny populace saprofytických bakterií byly vyloučeny. Nanese se 50-100 µl extraktu vzorku na 1 misku pro každé ředění.
- Misky se nechají inkubovat při teplotě 28°C. Po 48 hodinách se zkontroluje jejich stav a pak se provádí kontrola denně po 6 dní. Typické kolonie

*R. solanacearum* na živné půdě SMSA jsou mléčně bílé, ploché, nepravidelné a fluidní a po 3 dnech inkubace se rozvine růžově až krvavě červené zbarvení ve středu s vnitřními pruhy nebo spirálami.

*Poznámka:*

Někdy se na tomto médiu tvoří atypické kolonie *R. solanacearum*. Mohou být malé, kruhové, zcela červené a nefluidní nebo jen částečně fluidní, a proto obtížně rozeznatelné od saprofytických bakterií tvořících kolonie.

3. Předpokládané kolonie *R. solanacearum* se rozetřou nebo očkují metodou zředování na universální živnou půdu, aby se získaly izolované kolonie (viz. dodatek 2).
4. Kultury se uchovávají krátkodobě ve sterilní vodě (pH 6-8, bez chlóru) při pokojové teplotě v temnu nebo dlouhodobě ve vhodném ochranném médiu při teplotě -68 až -86°C nebo lyofilizované.
5. Proveďte se identifikace podezřelých kultur (viz. oddíl 6.2.) a test patogenity (viz oddíl 6.3).

*Interpretace výsledků testu očkováním na selektivní média.*

Test očkování na selektivní média je negativní, jestliže po 6 dnech nejsou zpozorovány žádné bakterie nebo nejsou nalezeny žádné podezřelé kolonie typické pro *R. solanacearum*, za předpokladu, že nedošlo k inhibici jinými bakteriemi a v kontrolních vzorcích jsou nalezeny typické kolonie *R. solanacearum*.

Test očkování na selektivní média je pozitivní, jestliže jsou izolovány podezřelé kolonie *R. solanacearum*.

#### 6.1.4.2. Obohacovací testy

*Použije se validované médium pro obohacení, např. modifikovaný bujón Wilbrink (viz dodatek 2).*

*Tento postup lze použít pro selektivní zvětšení populací *R. solanacearum* v extraktech ze vzorků a zvýšení citlivosti detekce. Tímto způsobem dojde i ke zředění potenciálních inhibitorů PCR testu (1:100). Obohacení *R. solanacearum* však může být neúspěšné z důvodů konkurence nebo antagonismu saprofytických organismů, které bývají často současně také obohaceny. Z tohoto důvodu může být izolace *R. solanacearum* z obohacené kultury obtížná. Kromě toho, protože může dojít k rozvoji populací sérologicky příbuzných saprofytů, se pro test ELISA doporučuje použít místo polyklonálních protilátek specifické monoklonální protilátky.*

1. U obohacovacího testu PCR se přenesou 100 ul extraktu ze vzorku do 10 ml obohacného bujónu (dodatek 2), který se předem připraví do sterilních zkumavek nebo baněk. U obohacovacího testu ELISA může být použit větší podíl extraktu ze vzorku do bujónu (např. 100 ul v 1,0 ml obohacné živné půdy).
2. Inkubuje se 72 hodin při teplotě 27 až 30 °C v třepané nebo statické kultuře s uvolněnými uzávěry, které umožní provzdušňování.
3. Před zahájením testů ELISA nebo PCR se obsah dobře promíchá.

4. S obohacným bujónem se zachází týmž způsobem jako se vzorky ve výše uvedených testech.

*Poznámka:*

Očekává-li se inhibice obohacení *R. solanacearum* z důvodu vysoké koncentrace konkurenčních saprofytických bakterií, lze docílit lepších výsledků obohacením extraktů ze vzorků před jakýmkoli odstředováním nebo jinými postupy zvyšování koncentrace.

#### 6.1.5. Test IF

*Postup*

Použití testu IF jako hlavního screeningového testu se doporučuje kvůli dokázané spolehlivosti v dosažení požadovaných prahů.

Použije-li se test IF jako hlavní a výsledek IF testu je pozitivní, musí být jako druhý screeningový test použit test izolace, PCR nebo FISH. Jestliže je test IF použit jako druhý screeningový test a je pozitivní, je nutné provést další testování podle postupového diagramu, aby byla analýza úplná.

*Poznámka:*

Použije se validovaný zdroj protilátek *R. solanacearum*. Doporučuje se určit titer pro každou novou šarži protilátek. Titr je definován jako nejvyšší ředění, při kterém dojde k optimální reakci při testování suspenze obsahující  $10^5$  až  $10^6$  buněk/ml homologického kmene *R. solanacearum* a použitím vhodného konjugátu fluorescenčního isothiokyanatanu (FITC) podle doporučení výrobce. Validovaná polyklonální antiséra mají všechna titer IF nejméně 1:2 000. Během testování by měly být použity protilátky v pracovních ředěních blízkých nebo stejných jako titer.

Test by měl být proveden na čerstvě připravených extraktech ze vzorků. Jestliže je to nutné, může být úspěšně proveden na vzorcích uchovaných při teplotě - 68 až - 86 °C v glycerolu. Glycerol může být ze vzorku odstraněn přidáním 1 ml pufru (dodatek 4), 15minutovým odstředováním při 7000 g a resuspenzí ve stejném množství peletového pufru. Často to není potřeba, zvláště pokud jsou vzorky fixovány na sklíčka plamenem.

Připraví se oddělená pozitivní kontrolní sklíčka s homologickým kmenem nebo jiným referenčním kmenem *R. solanacearum* suspendovaným v bramborovém extraktu, jak je uvedeno v dodatku 3 B, a nepovinně v pufru.

Pletivo infikované přirozenou cestou (uchovávané lyofilizací nebo zmrazením při teplotě - 16 až 24 °C) by se mělo podle možností použít jako paralelní kontrola na stejném podložním sklíčku.

Jako negativní kontroly se použijí alikvotní díly extraktů ze vzorků, které byly předtím testovány s negativním výsledkem.

Standardizované materiály k pozitivní a negativní kontrole, které lze použít pro tento test, jsou uvedeny v dodatku 3.

Použijí se mikroskopická sklíčka s více okénky, pokud možno s 10 okénky s průměrem nejméně 6 mm.

Test kontrolního materiálu se provede týmž způsobem jako test vzorků.

##### 6.1.5.1. Připraví se sklíčka k testování jedním z následujících postupů:

i) Pro pelety s relativně nízkým množstvím sedimentu škrobu:

Napipetuje se odměřené standardní množství (15  $\mu$ l je vhodné pro průměr okénka 6 mm - u většího okénka je množství větší v příslušném poměru) resuspendované bramborové pelety v ředění 1/100 do prvního okénka.

Následně se napipetuje stejné množství nezředěné pelety (1/1) do zbývajících okének v řadě. Druhá řada může být použita jako duplikát nebo pro druhý vzorek, jak ukazuje obr. 1.

ii) Pro jiné pelety:

Připraví se desetinná ředění (1/10, 1/100) resuspendované pelety v peletovém pufru. Napipetuje se odměřené standardní množství (15  $\mu$ l je vhodné pro průměr okénka 6 mm - u většího okénka je množství větší v příslušném poměru) resuspendované pelety pro každé ředění do řady okének. Druhá řada může být použita jako rezervní nebo pro druhý vzorek, jak ukazuje obr.2.

6.1.5.2. Vysuší se kapičky při okolní teplotě nebo zahřátím na teplotu 40 až 45 °C. Bakteriální buňky se fixují na sklíčko buď zahřátím (15 minut při teplotě 60 °C), plamenem, 95 % etanolem nebo podle konkrétních instrukcí od dodavatele protilátek.

Pokud je potřeba, fixovaná sklíčka je možné skladovat ve zmrazeném stavu v suchém boxu po nezbytně krátkou dobu (maximálně 3 měsíce) před dalším testováním.

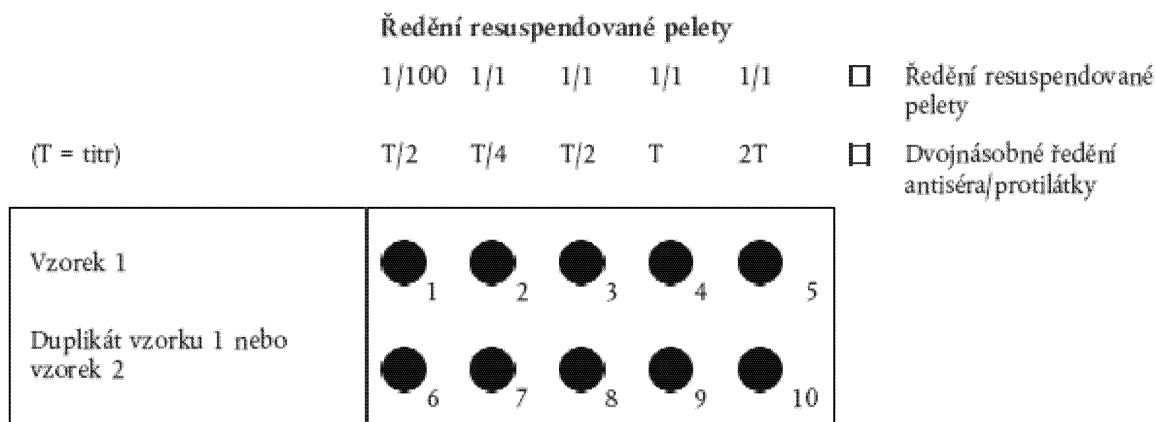
6.1.5.3. Postup IF

i) Podle přípravy sklíčka na test v odst. 5.1.i):

Připraví se sada dvojnásobných zředění. První jamka by měla mít 1/2 titru (T/2), ostatní 1/4 titru (T/4), 1/2 titru (T/2), titr (T) a dvojnásobek titru (2T).

ii) Podle přípravy sklíčka na test v odst. 5.1.ii):

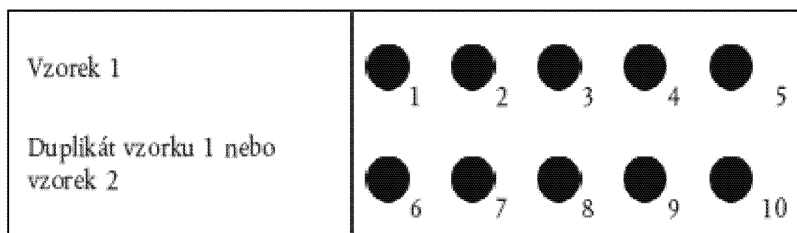
Připraví se pracovní ředění (PŘ) protilátek v pufru IF. Pracovní ředění ovlivňuje přesnost.



Obrázek 1. Příprava sklíčka na test podle odst. 6.1.5.1.i) a 6.1.5.3.i)

### Pracovní ředění antiséra/protilátky

1/1    1/10    1/100    prázdnýprázdný     Desetinné ředění  
resuspendované pelety



Obrázek 2. Příprava sklíčka na test podle odst. 6.1.5.1.ii) a 6.1.5.3.ii)

1. Podložní sklíčka se uspořádají na navlhčený savý papír. Každé testovací okénko se pokryje kompletně ředěním protilátek. Množství protilátky na každém okénku musí být nejméně stejné jako množství použitého extraktu.

Pokud nejsou k dispozici konkrétní pokyny od dodavatele protilátek, postupuje se následovně:

2. Podložní sklíčka se inkubují na vlhkém papíře přikrytá po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C).
3. Setřesou se kapky ze všech podložních sklíček a tato se pečlivě opláchnou pufrům IF. Umyjí se ponořením po dobu 5 minut v pufru IF Tween (dodatek 4) a následně v pufru IF. Je třeba zabránit vzniku aerosolu nebo přenosu kapiček, které by mohly způsobit vzájemnou kontaminaci. Pečlivě se odstraní přebytečná vlhkost jemným osušením.
4. Sklíčka se umístí na vlhký papír. Testovací okénka se pokryjí ředěním konjugátu FITC, kterým se stanovuje titr. Množství konjugátu naneseného do okének musí být stejné jako množství použité protilátky.
5. Sklíčka se inkubují zakrytá na vlhkém papíru po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C).
6. Setřesou se kapky konjugátu ze sklíčka. Sklíčko se opláchně a umyje jako předtím (3.).  
Opatrně se odstraní přebytečná vlhkost.
7. Napipetuje se 5-10 ul 0,1M fosfátového pufru s glycerolem (dodatek 4) nebo komerční krycí tekutiny do každého okénka a přiloží se krycí sklíčko.

#### 6.1.5.4. Vyhodnocení IF testu

1. Prohlížejí se testovací sklíčka epifluorescenčním mikroskopem s filtry vhodnými pro excitaci FITC pod olejovou nebo vodní imersí při zvětšení 500x až 1 000x. Zkoumají se okénka ve dvou navzájem kolmých průměrech

a kolem obvodu. U vzorků s žádnými nebo malým počtem buněk se zkoumá nejméně 40 polí mikroskopu.

Nejdřív se zkontroluje pozitivní kontrolní vzorek. Buňky musí být jasně fluoreskující a zcela obarvené v určeném titru protilátky nebo pracovním ředění. Pokud je barevnost odchylná, musí být test IF opakován (odst. 6.1.5).

2. Pozorují se jasně fluoreskující buňky s charakteristickou morfologií *R. solanacearum* v testovacích okénkách sklíčka. Intenzita fluorescence musí být při porovnání s pozitivním kontrolním kmenem ve stejném ředění protilátky stejná nebo lepší. Buňky s neúplným zbarvením nebo slabou fluorescencí nelze brát v úvahu.

Při podezření z jakékoli kontaminace musí být test zopakován. To se může stát, když všechna sklíčka ve skupině vykazují pozitivní buňky díky kontaminaci pufry nebo při zjištění pozitivních buněk (mimo okénka sklíček) na povrchu sklíček.

3. Existuje několik problémů podstatných pro přesnost imunofluorescenčního testu. V peletách z pupkové části bramboru a částí stonku se mohou vyskytnout doprovodné populace fluoreskujících buněk s atypickou morfologií a křížově reagující saprofytické bakterie s velikostí a morfologií podobnou *R. solanacearum*.
4. Berou se v úvahu pouze fluoreskující buňky s typickou velikostí a morfologií v titru nebo pracovním ředění protilátek podle oddílu 6.1.5.3.
5. Interpretace výsledků testu IF:

- i) Při zjištění jasně fluoreskujících buněk s typickou morfologií se odhadne průměrný počet typických buněk v 1 mikroskopovém poli a vypočítá počet typických buněk na 1 ml resuspendované pelety (dodatek 5).

Výsledek IF je pozitivní u vzorků, kde je počet typických buněk na 1 ml resuspendované pelety nejméně  $5 \times 10^3$ . Vzorek je považován za potenciálně infikovaný a je povinné další testování.

- ii) Výsledek IF testu je negativní pro vzorky, které obsahují méně než  $5 \times 10^3$  buněk na 1 ml resuspendované pelety a vzorek se považuje za negativní. Další testování není nutné.

#### 6.1.6. Testy PCR

##### *Principy*

Použije-li se test PCR jako hlavní screeningový test a výsledek je pozitivní, musí být povinně proveden druhý screeningový test, a sice izolace nebo IF. Jestliže je PCR použita jako druhý screeningový test a je pozitivní, je nutné provést další testování podle postupového diagramu, aby byla analýza úplná.

Využití této metody v celém rozsahu jako hlavního screeningového testu se doporučuje jen tehdy, je-li požadována specializovaná expertíza.

##### *Poznámka:*

Předběžné testování touto metodou by mělo umožnit reprodukovatelné zjištění  $10^3$  až  $10^4$  buněk *R. solanacearum* na 1 ml přidání do vzorků extraktů, které byly předtím testovány jako negativní. Dosažení maximální citlivosti a přesnosti ve všech laboratořích může vyžadovat optimalizační pokusy.



Použijí se schválená činidla a protokoly PCR (viz dodatek 6). Pokud možno, zvolí se metoda s interní kontrolou.

Je třeba použít vhodná bezpečnostní opatření k zabránění kontaminace vzorku cílovou DNA. Test PCR by měl být prováděn zkušenými laboranty v laboratořích specializovaných na molekulární biologii, aby se minimalizovala možnost kontaminace cílovou DNA.

S negativními kontrolami (v průběhu extrakce DNA a PCR) by se mělo vždy zacházet jako s konečnými vzorky, aby bylo jasné, jestli došlo k přenosu DNA.

PCR test by měl zahrnovat následující negativní kontroly:

- extraktu ze vzorku, který byl předtím testován na *R. solanacearum* s negativním výsledkem,
- kontroly pufru používaného pro extrakci bakterií a DNA ze vzorku,
- reakční směs PCR.

Měly by být zahrnuty následující pozitivní kontroly:

- alikvotní části resuspendovaných pelet, do kterých byla přidána *R. solanacearum* (přípravu viz dodatek 3 B);
- suspenze  $10^6$  buněk na 1 ml *R. solanacearum* ve vodě z virulentního izolátu (např. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; viz dodatek 3 B);
- pokud možno, při PCR použít také DNA extrahovanou z pozitivních kontrolních vzorků.

**Aby se zabránilo případné kontaminaci, připravují se pozitivní kontroly v prostředí odděleném od vzorků, které budou testovány.**

Extrakty ze vzorků by měly být pokud možno bez zeminy. V případě použití PCR testu je potřeba připravit extrakty z umytých brambor.

Standardizované materiály k pozitivní a negativní kontrole, které lze použít pro tento test, jsou uvedeny v dodatku 3.

#### 6.1.6.1. Metody purifikace DNA

Používají se výše popsané pozitivní a negativní kontrolní vzorky (viz. dodatek 3).

Test kontrolního materiálu se provede tímž způsobem jako test vzorků.

K purifikaci cílové DNA z komplexních substrátů vzorků jsou k dispozici různé metody odstraňující inhibitory PCR a jiných enzymových reakcí a koncentrující cílovou DNA ve vzorku. Následující metoda byla optimalizována pro použití se schválenými metodami PCR uvedenými v dodatku 6.

a) Metoda podle Patrika (2000)

1. Napipetuje se 220  $\mu$ l lyzátového pufru (100mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)) do 1,5 ml Eppendorfovy mikrozkuhavky.
2. Přidá se 100  $\mu$ l extraktu ze vzorku a mikrozkuhavka se umístí do termobloku nebo vodní lázně s teplotou 95 °C na 10 min.

3. Mikrozkuřavka se vloží na 5 min. do ledu.
4. Přidá se 80 µl zásobního roztoku lysozymu (50 mg lysozymu/na 1 ml 10 mM TrisHCl, pH 8,0) a inkubuje při teplotě 37 °C po dobu 30 minut.
5. Přidá se 220 µl roztoku Easy DNA® A (Invitrogen), dobře promíchá třepáním a inkubuje se při teplotě 65 °C po dobu 30 minut.
6. Přidá se 100 µl roztoku Easy DNA® B (Invitrogen), důkladně promíchá třepáním, pokud vzorek nezačne být stejnoměrně viskózní.
7. Přidá se 500 µl chloroformu a promíchá, až se viskozita sníží a směs se stane homogenní.
8. Pro oddělení fází a vytvoření mezifáze se směs odstřeďuje při 15 000 g po dobu 20 min. při teplotě 4 °C.
9. Horní fáze se převede do nové Eppendorfovy mikrozkuřavky.
10. Přidá se 1 ml 100 % etanolu (- 20 °C), krátce promíchá třepáním a inkubuje se na ledu po dobu 10 min.
11. Odstřeďuje se při 15 000 g po dobu 20 minut při teplotě 4 °C a odstraní se etanol z pelety.
12. Přidá se 500 µl 80 % etanolu (- 20 °C) a promíchá se překlápěním mikrozkuřavky.
13. Odstřeďuje se při 15 000 g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C, zachová se peleta a odstraní etanol.
14. Peleta se nechá uschnout na vzduchu nebo v DNA odparce.
15. Peleta se resuspenduje v 100 µl sterilní UPW a nechá se stát při pokojové teplotě nejméně 20 minut.
16. Skladuje se při teplotě - 20 °C až do použití při PCR.
17. Jakákoliv bílá sraženina se odstraní odstřeďením. 5 µl supernatantu obsahujícího DNA se použije pro test PCR.

b) Jiné metody

Jiné metody extrakce DNA, např. Qiagen DNeasy Plant Kit, by se mohly použít, pokud by se prokázalo, že jsou při purifikaci DNA z kontrolních vzorků obsahujících  $10^3$  až  $10^4$  patogenních buněk na 1 ml stejně efektivní.

#### 6.1.6.2. PCR

1. Připraví se testované vzorky a kontroly pro PCR podle schválených protokolů (6.1.6). Připraví se desetinásobné ředění vzorku extraktu DNA (1:10 ve sterilní vodě).
2. Připraví se příslušná reakční směs pro PCR v prostředí, ve kterém nehrozí kontaminace podle zveřejněných protokolů (dodatek 6). Pokud možno, doporučuje se použít multiplexní protokol PCR, který rovněž zahrnuje interní protokol PCR.
3. Do sterilních PCR mikrozkuřavek se přidá 5 µl extraktu DNA na 25 µl PCR reakce podle protokolů PCR (viz dodatek 6).

4. Přidají se negativní kontrolní vzorky obsahující pouze reakční směs PCR a přidá se též zdroj UPW jako byl ten, který byl použit ve směsi PCR místo vzorku.
5. PCR mikrozkušavky se umístí do téhož termocykleru, který byl použit při počátečním testování, a spustí se vhodně optimalizovaný program PCR (dodatek 6).

#### 6.1.6.3. Analýza produktu PCR

1. Amplikony se rozdělí elektroforézou v agarózovém gelu. Nanese se nejméně 12  $\mu$ l směsi amplifikované DNA z každého vzorku s 3  $\mu$ l nanášecího pufru (dodatek 6) do 2,0 % (w/v) agarózového gelu v Tris-acetát-EDTA (TAE) pufru (dodatek 6) při 5-8 V/cm. Použije se vhodný DNA marker, např. (ladder) 100 bp.
2. Detekují se proužky DNA obarvením v ethidiumbromidu (0,5 mg/l) po dobu 30-60 minut za použití vhodných bezpečnostních opatření pro zacházení s tímto mutagenem.
3. V obarveném a UV (krátké vlnové délky např. 302 nm) prosvíceném gelu se hledají amplifikované produkty PCR o očekávané velikosti a výsledek se zdokumentuje.
4. U všech nových nálezů/případů se zkontroluje pravost amplikonu PCR provedením restriční enzymové analýzy ve zbývajícím vzorku amplifikované DNA inkubací při optimální teplotě a čase shodným restričním enzymem a pufrem (viz dodatek 6). Naštěpené fragmenty se rozdělí elektroforézou v agarózovém gelu a pozoruje se charakteristický vzor restričních fragmentů pod UV světlem po obarvení ethidiumbromidem a porovnává se s neštěpenou a štěpenou pozitivní kontrolou.

#### *Interpretace výsledků testu PCR*

Test PCR je negativní, jestliže amplikon PCR specifický pro *R. solanacearum* očekávané velikosti není u zkoumaného vzorku zjištěn, ale je zjištěn u všech pozitivních kontrolních vzorků (v případě vícenásobné PCR s interními kontrolními primery specifickými pro rostlinu: druhý produkt PCR očekávané velikosti musí být amplifikován se zkoumaným vzorkem).

Test PCR je pozitivní, jestliže je zjištěn amplikon PCR specifický pro *R. solanacearum* očekávané velikosti a (případně) vzoru, za předpokladu, že není amplifikován u žádného vzorku negativní kontroly. Spolehlivé potvrzení pozitivního výsledku lze také získat opakováním testu s druhou sadou primerů PCR (dodatek 6).

#### *Poznámka:*

Lze mít podezření na inhibici PCR, jestliže je získán očekávaný amplikon ze vzorku pozitivní kontroly obsahujícího *R. solanacearum* ve vodě, zatímco ze vzorku pozitivní kontroly *R. solanacearum* v bramborovém extraktu byly získány negativní výsledky. V multiplexních protokolech PCR s interními kontrolami PCR nasvědčuje inhibici reakce, jestliže není získán žádný ze dvou amplikonů.

V případě, že očekávaný amplikon je získán z jednoho nebo více vzorků negativních kontrol, je podezření na kontaminaci.

### 6.1.7. Test FISH

#### *Princip*

Když se jako první screeningový test použije FISH test a je pozitivní, musí být jako druhý povinný screeningový test provedena izolace nebo IF test. Když se FISH test provede jako druhý vyšetřovací test a je pozitivní, je k dokončení diagnózy nutné další testování podle postupového diagramu.

#### *Poznámka:*

*Používají se schválené oligosondy specifické pro *R. solanacearum* (dodatek 7). Úvodní testování touto metodou by mělo umožnit reprodukovatelné zjištění alespoň  $10^3$ - $10^4$  buněk *R. solanacearum* na ml přidané do extraktů ze vzorku, které byly předtím testovány s negativním výsledkem.*

Následující postup by měl být pokud možno proveden s čerstvě připravenými extrakty, ale je možné jej úspěšně provést s extraktem, který byl uchován v glycerolu při teplotě - 16 až - 24 °C nebo - 68 až - 86 °C.

Jako negativní kontrola se použije alikvotní část extraktu ze vzorku, který byl předtím testován na *R. solanacearum* s negativním výsledkem.

Jako pozitivní kontrola se připraví suspenze obsahující  $10^5$  až  $10^6$  buněk na 1 ml *R. solanacearum* biovar 2 (např. kmen NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, viz dodatek 3) v 0,01M fosfátovém pufru (PB) ze 3-5 denní kultury. Připraví se samostatná sklíčka s pozitivními kontrolními vzorky homologického kmenu nebo jiného referenčního kmene *R. solanacearum*, suspendovaného v bramborovém extraktu, jak je uvedeno v dodatku 3 B.

Použití eubakteriálních oligosond značených FITC poskytuje kontrolu procesu hybridizace, protože zbarví všechny eubakterie přítomné ve vzorku.

Standardizovaný pozitivní a negativní kontrolní materiál, který se používá v tomto testu, je uveden v dodatku 3 bodu A.

Test kontrolního materiálu se provede stejným způsobem jako u vzorku(ů).

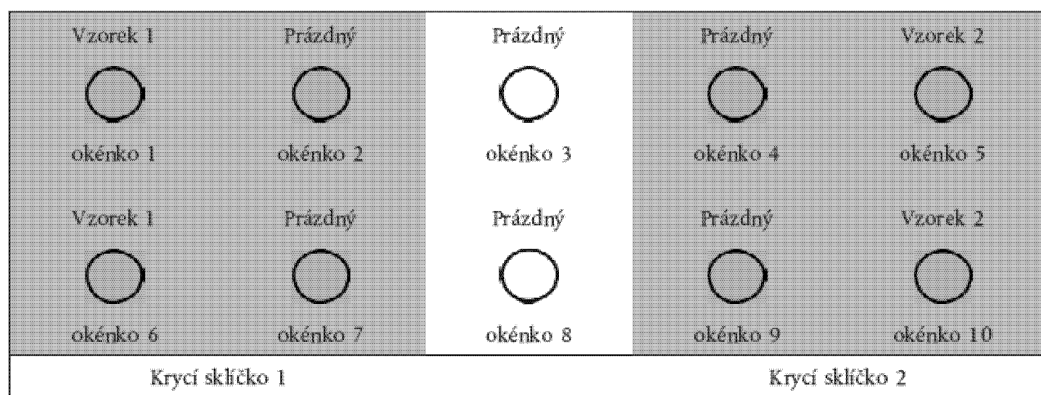
#### 6.1.7.1. Fixace bramborového extraktu

Následující protokol vychází z Wullingse *et al.* (1998).

1. Připraví se fixační roztok (viz dodatek 7).
2. Napipetuje se 100 µl každého vzorkového extraktu do Eppendorfovy mikrozkušavky a odstředuje se po dobu 7 minut na 7 000 g.
3. Odstraní se supernatant a rozpustí se peleta ve 200 µl fixačního roztoku připraveného max. 24 hodin předem. Protřepe se a inkubuje 1 hodinu v chladičím zařízení.
4. Odstředuje se 7 minut při 7 000 g, odstraní se supernatant a resuspenduje se peleta v 75 µl 0,01M PB (viz dodatek 7).
5. Kápně se 16 µl fixované suspenze na čisté 10 okénkové sklíčko, jak ukazuje obrázek 7.1, přičemž se použijí 2 různé vzorky na jedno sklíčko, a to neředěný a zředěný 1:100 s použitím 10 µl (v 0,01 M PB). Zbývající roztok vzorku (49 µl) může být uložen při teplotě - 20 °C po přidání 1 objemového

množství 96 % etanolu. V případě, že je třeba FISH metodu opakovat, odstraní se etanol odstředěním a přidá se stejné množství 0,01 PB (zamíchá se protřepáním).

Obrázek 7.1 Rozmístění na sklíčku FISH



6. Sklíčka se nechají uschnout na vzduchu (nebo v sušičce sklíček při teplotě 37 °C) a fixují se nad plamenem.

V této fázi je možné postup přerušit a pokračovat v hybridizaci další den. Sklíčka by měla být skladována chráněna před prachem a v suchu při pokojové teplotě.

#### 6.1.7.2. Hybridizace

- Dehydratují se buňky v postupné etanolové řadě 50 %, 80 % a 96 %, pokaždé po dobu 1 minuty. Osuší se vzduchem v držáku sklíček.
- Připraví se vlhká inkubační komora přikrytím dna vzduchotěsného boxu tkaninou nebo filtračním papírem nasáklým hybridizační směsí (1x hybmix, dodatek 7). Před inkubací se ohřeje box v hybridizační peci při teplotě 45 °C po dobu nejméně 10 minut.
- Použije se 10 µl hybridizačního roztoku (dodatek 7) na 8 okének (okénka 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 a 10; viz obr.7.1) na každém sklíčku, přičemž dvě středová okénka (3 a 8) se nechají prázdná.
- Přiloží se krycí sklíčka (24 x 24 mm) na první a poslední 4 okénka, a to tak, aby pod ně nevnikl vzduch. Sklíčka se umístí do předem zahřáté vlhké komory a nechá se proběhnout proces hybridizace po dobu 5 hodin v troubě při teplotě 45 °C v temnu.
- Připraví se 3 kádinky obsahující 1 l vody s molekulární kvalitou (Milli Q), 1 l 1x hybmix (334 ml 3x hybmix a 666 ml vody s molekulární kvalitou) a 1 l 1/8x hybmixu (42 ml 3x hybmix a 958 ml vody s molekulární kvalitou). Nechají se inkubovat ve vodní lázni o teplotě 45 °C.
- Sejmou se krycí sklíčka a podložní sklíčka se umístí do držáku sklíček.
- Spláchnou se nadbytek vzorku inkubací po dobu 15 minut v kádince s 1 x hybmixem při teplotě 45°C.

8. Držák sklíček se přemístí do promývacího roztoku 1/8 hybmix a nechá se inkubovat dalších 15 minut.
9. Sklíčka se krátce ponoří do UPW (např. Milli Q water) a položí na filtrační papír. Odstraní se nadbytečná vlhkost lehkým zakrytím povrchu filtračním papírem. Napipetuje se 5-10  $\mu$ l krycího roztoku (např. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA nebo podobný) do každého okénka a celé sklíčko se zakryje velkým krycím sklíčkem (24 x 60 mm).

#### 6.1.7.3. Hodnocení FISH testu

1. Sklíčka se ihned prohlízejí pod mikroskopem vhodným pro epifluorescenční mikroskopii se zvětšením 630 x nebo 1 000 x pod olejovou imerzí. S filtrem vhodným pro fluorescein isothiokyanat (FITC) jsou eubakteriální buňky (včetně většiny gramnegativních buněk) ve vzorku zbarveny fluorescenčně zeleně. Použitím filtru pro tetramethylrhodamin-5-isothiokyanat se buňky *R. solanacearum* obarvené Cy3 jeví fluorescenčně červeně. Porovnává se buněčná morfologie s morfologií pozitivních kontrolních vzorků. Buňky musí být jasně fluoreskující a zcela zbarveny. Test FISH (odst. 6.1.7) musí být zopakován, pokud je zbarvení odchýlné. Prohlízejí se okénka napříč dvěma průměry v pravých úhlech a kolem obvodu. U vzorků, kde nejsou pozorovány žádné nebo málo buněk, se pozoruje nejméně 40 polí mikroskopu.
2. Hledají se jasně fluoreskující buňky s morfologií charakteristickou pro *R. solanacearum* v okénkách testovacích sklíček. Intenzita fluorescence musí odpovídat nebo být lepší než u pozitivního kontrolního kmene. Buňky, které nejsou zcela zbarveny nebo vykazují slabou fluorescenci, se neberou v úvahu.
3. Při podezření na jakoukoli kontaminaci musí být test opakován. To může nastat v případě, kdy všechna sklíčka ve várce ukazují pozitivní buňky z důvodu kontaminace pufru nebo jestliže jsou pozitivní buňky zjištěny (vně okénka sklíčka) na krytu sklíčka.
4. Specifičnost testu FISH s sebou nese několik problémů. Je pravděpodobné, že u pletiv z bramborových hlíz a pelet ze stonkových partií bramboru dojde k výskytu populací fluorescenčních buněk na pozadí s atypickou morfologií a ke křížové reakci se saprofytickými bakteriemi velikostí a morfologií podobnými *R. solanacearum*, i když mnohem méně častěji než u testu IF.
5. V úvahu se berou pouze fluoreskující buňky s typickou velikostí a morfologií.
6. Interpretace výsledků testu FISH
  - i) Výsledky FISH testu jsou platné, pokud jsou při použití FITC filtru jasně zeleně fluoreskující buňky s velikostí a morfologií typickou pro *R. solanacearum* a při použití rhodaminového filtru jasně červeně fluoreskující buňky pozorovány ve všech pozitivních kontrolách a nejsou pozorovány v žádných negativních kontrolách. Pokud jsou přítomné jasně fluoreskující buňky s typickou morfologií, odhadne se průměrný počet typických buněk v 1 mikroskopovém poli a vypočítá počet typických buněk v 1 ml resuspendované pelety (dodatek 4).

Vzorky, které obsahují alespoň  $5 \times 10^3$  typických buněk na 1 ml resuspendované pelety, se považují za pravděpodobně infikované. Nutné je další testování. Vzorky, které obsahují méně než  $5 \times 10^3$  typických buněk na 1 ml resuspendované pelety, se považují za negativní.

- ii) Výsledek FISH testu je negativní, pokud při použití rhodaminového filtru nejsou pozorovány jasně červeně fluoreskující buňky s velikostí a morfologií typickou pro *R. solanacearum*, jestliže jsou tyto typické jasně červeně fluoreskující buňky při použití rhodaminového filtru pozorovány v pozitivních kontrolách.

#### 6.1.8. Testy ELISA

##### *Princip*

Testy ELISA lze použít pouze jako volitelný test kromě testů IF, PCR nebo FISH pro jeho relativně nízkou citlivost. Při použití DAS ELISA je obohacení a použití monoklonálních protilátek povinné. Obohacení vzorků před použitím testu ELISA může zvýšit citlivost testu, ale může se rovněž setkat s nezdarem kvůli konkurenci jiných organismů ve vzorku.

##### *Poznámka:*

Použije se validovaný zdroj protilátek *R. solanacearum*. Doporučuje se určení titru pro každou novou šarži protilátek. Titr je definován jako nejvyšší ředění, při kterém dojde k optimální reakci při testování suspence obsahující  $10^5$  až  $10^6$  buněk na 1 ml homologického kmene *R. solanacearum* a použití vhodných druhotných konjugátů protilátek podle doporučení výrobce. Při testování by měly být použity protilátky v pracovním ředění, které je blízké nebo stejné jako u titru komerční formulace.

Určí se titr protilátek pro suspenzi  $10^5$  až  $10^6$  buněk na 1 ml homologického kmene *R. solanacearum*.

Vzorek, který byl předtím otestován jako *R. solanacearum* negativní a suspenze bakterií bez vzájemného působení v solném roztoku fosfátového pufru (PBS) se použijí jako vzorky negativní kontroly.

Jako pozitivní kontrolní vzorky se použijí alikvótní podíly vzorkových extraktů, které byly předtím otestovány jako negativní, s příměsí  $10^3$  až  $10^4$  buněk na 1 ml biovaru 2 *R. solanacearum* (např. kmen NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, viz dodatek 2 A a B). Pro srovnání výsledků na každé destičce se použije standardní suspenze  $10^5$  až  $10^6$  buněk na 1 ml v PBS *R. solanacearum*. Pozitivní kontrolní vzorky musí být na mikrotitrové destičce dobře odděleny od vzorků k testování.

Standardizované pozitivní a negativní materiály, které se používají pro tento test, jsou uvedeny v dodatku 3 bodu A.

Test kontrolního materiálu se provede týmž způsobem jako test vzorku(ů).

Validované jsou dva protokoly ELISA.

##### a) Nepřímý test ELISA (Robinson Smith et al., 1995)

- 1) Použije se 100-200  $\mu$ l vzorkového extraktu. (Zahřátí na 100 °C na 4 minuty ve vodní lázni nebo topném boxu může v některých případech redukovat vznik nespecifických výsledků).
- 2) Přidá se stejné množství dvojnásobně silného uhličitanového krycího pufru (dodatek 4) a směs se promíchá.
- 3) Nakape se 100  $\mu$ l do každé jamky mikrotitrační destičky (např. Nunc-Polysorp nebo rovnocenné) a nechá se inkubovat 1 hodinu při teplotě 37 °C nebo 14 – 18 h při teplotě 4 °C.

- 4) Extrakty se vylíjí z jamek. Jamky se třikrát vymyjí pomocí PBS-Tween (dodatek 4) a poslední vymývací roztok se nechá v jamce nejméně 5 minut.
- 5) Připraví se vhodné ředění protilátek proti *R. solanacearum* v blokačním pufru (dodatek 4). U validovaných komerčních protilátek se použijí doporučená ředění (obvykle dvojnásobné koncentrace, než je titr).
- 6) Přidá se 100  $\mu$ l do každé jamky a nechá se inkubovat 1 hodinu při teplotě 37 °C.
- 7) Roztok protilátek se vylíje z jamek a jamky se vymyjí jako předtím (bod 4.).
- 8) Připraví se vhodné ředění konjugátu alkalické fosfatázy v blokačním pufru. Přidá se 100  $\mu$ l do každé jamky a nechá se inkubovat 1 hodinu při teplotě 37 °C.
- 9) Konjugát se vylíje z jamek a jamky se vymyjí jako předtím (bod 4).
- 10) Přidá se 100  $\mu$ l substrátového alkalického roztoku fosfatázy (dodatek 4) do každé jamky. Nechá se inkubovat v temnu při pokojové teplotě a odečítá se absorbance při 405 nm v pravidelných 90minutových intervalech.

#### b) DAS-ELISA

- 1) Připraví se vhodné ředění polyklonálního imunoglobulinu v uhličitanovém pufru pH 9.6 (dodatek 4). Přidá se 200  $\mu$ l do každé jamky. Nechá se inkubovat při teplotě 37 °C 4 až 5 hodin nebo 4 °C po dobu 16 hodin.
- 2) Jamky se třikrát dobře vypláchnou použitím PBS-Tween (dodatek 4). Přidá se 190  $\mu$ l extraktu ze vzorku do nejméně dvou jamek. Přidají se rovněž pozitivní a negativní kontrolní vzorky do dvou jamek na každé destičce. Nechá se inkubovat 16 hodin při teplotě 4 °C.
- 3) Jamky se třikrát dobře vypláchnou použitím PBS-Tween (dodatek 4).
- 4) Připraví se vhodné ředění specifických monoklonálních protilátek *R. solanacearum* v PBS (dodatek 4) s obsahem 0,5 % hovězího sérového albuminu (BSA), přidá se 190  $\mu$ l do každé jamky a nechá stát 2 hodiny při teplotě 37 °C.
- 5) Jamky se třikrát dobře vypláchnou použitím PBS-Tween (dodatek 4).
- 6) Připraví se ředění protimýšního imunoglobulinu konjugovaného alkalickou fosfatázou v PBS. Přidá se 190  $\mu$ l do každé jamky a nechá se inkubovat 2 hodiny při teplotě 37 °C.
- 7) Jamky se třikrát dobře vypláchnou použitím PBS-Tween (dodatek 4).
- 8) Připraví se roztok 1 mg p-NPP/ml alkalické fosfatázy v substrátovém pufru (dodatek 4). Přidá se 200  $\mu$ l do každé jamky a inkubuje se v temnu při pokojové teplotě. Absorbance při 405 nm se odečítá v pravidelných intervalech 90 minut.

#### Interpretace výsledků testu ELISA

Test ELISA je negativní, jestliže průměrná hodnota optické hustoty (OH) z jamek se stejnými vzorky je menší než dvojnásobek OH u negativního kontrolního vzorku, pokud všechny hodnoty OH pozitivních kontrolních vzorků jsou větší



než 1,0 (po 90 minutách inkubace se substrátem) a jsou větší než dvojnásobek OH získané z negativních vzorkových extraktů.

Test ELISA je pozitivní, jestliže průměrné hodnoty OH z jamek se stejným vzorkem jsou větší než dvojnásobek OH v negativním extraktu testovaného vzorku, pokud hodnoty OH ve všech negativních kontrolních vzorcích jsou menší než dvojnásobek hodnot v pozitivních kontrolních vzorcích.

Negativní hodnoty ELISA v pozitivních kontrolních vzorcích ukazují, že test nebyl proveden správně nebo že byl inhibován. Pozitivní hodnoty ELISA v negativních kontrolních vzorcích ukazují, že došlo k vzájemné kontaminaci nebo nespecifickému vázání protilátek.

### 6.1.9. Biotest

*Poznámka:*

Předběžné testování touto metodou by mělo umožnit reprodukovatelnou detekci  $10^3$  až  $10^4$  jednotek tvořících kolonie *R. solanacearum* na 1 ml přidány do extraktu ze vzorku, který byl předtím testován s negativním výsledkem (přípravu viz v dodatku 3).

Nejvyšší citlivost zjištění lze očekávat při použití čerstvě připraveného extraktu ze vzorku a v optimálních růstových podmínkách. Metodu lze však také úspěšně použít na extrakty, které byly uchovány v glycerolu v teplotě - 68 až - 86 °C.

Následující protokol vychází z Janseho (1988):

6.1.9.1. Použije se 10 testovacích rostlin citlivé odrůdy rajčete (např. kultivaru Moneymaker nebo kultivaru s rovnocennou citlivostí podle testovací laboratoře) ve fázi třech pravých listů u každého vzorku. Podrobnosti pěstování viz. v dodatku 8. Nebo se použije lilek (např. kultivar Black Beauty nebo kultivary s rovnocennou citlivostí), ale jen rostliny ve fázi 2. až 3. listů až do plného rozvinu třetího pravého listu. Příznaky u lilku jsou méně výrazné a vyvíjejí se pomaleji. Pokud možno, doporučujeme proto použít sazenice rajčat.

6.1.9.2. Rozdělí se 100  $\mu$ l extraktu ze vzorku mezi testovací rostliny.

#### 1. Inokulace injekční stříkačkou

Inokulují se stonky rostlin hned nad děložními listy pomocí stříkačky s podkožní jehlou (ne méně než 23G). Vzorek se rozdělí mezi testovací rostliny.

#### 2. Inokulace zářezem

Rostlina se přidrží mezi dvěma prsty a pipetou se kápne přibližně 5-10  $\mu$ l suspendované pelety na stonku mezi děložními listy a prvním listem.

Sterilním skalpelem se udělá příčný řez asi 1 cm dlouhý a hluboký přibližně 2/3 tloušťky stonku, přičemž řez se začne v místě kapky resuspendované pelety.

Řez se utěsí sterilní vazelínou z injekční stříkačky.

6.1.9.3. Stejnou technikou se nainokulují 5 sazenic vodní suspenzí  $10^5$  až  $10^6$  buněk na 1 ml, připravenou ze 48 hodinové kultury virulentního kmene biovaru 2 *R. solanacearum* jako pozitivní kontrolní vzorek, a peletovým pufrem (dodatek 4)

jako negativní kontrolní vzorek. Oddělí se pozitivní a negativní kontrolní rostliny od ostatních rostlin, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci.

- 6.1.9.4. Testovací rostliny se nechají růst v karanténním zařízení 4 týdny při teplotě 25 - 30 °C a vysoké relativní vlhkosti s přiměřeným zavlažováním, aby se zabránilo jak přemokření, tak vadnutí z důvodu nedostatku vody. Aby se zabránilo kontaminaci, musí být drženy pozitivní a negativní kontrolní rostliny ve zcela oddělených místech skleníku nebo vegetační komory nebo jinak přísně izolovány. Musejí-li být rostliny z různých vzorků po dobu inkubace drženy blízko sebe, oddělí se vhodnými zástěnami. Při hnojení, zalévání, prohlížení a všech ostatních činnostech se věnuje zvláštní pozornost tomu, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci. Nutné je udržovat skleník nebo vegetační prostor bez hmyzích škůdců, protože by mohli přenést bakterie mezi vzorky.

Hledají se příznaky vadnutí, epinastie, chloróz anebo krnění rostlin.

- 6.1.9.5. Z infikovaných rostlin se provede izolace (odst. 2.3) a identifikují se podezřelé čisté kultury (bod 6.2.).
- 6.1.9.6. Jestliže během 3 týdnů nejsou pozorovány žádné příznaky, provede se test IF/PCR/izolace na složeném vzorku ze segmentů stonků dlouhých 1 cm z každé testovací rostliny, odebraných nad místem inokulace. Je-li test pozitivní, provedou se zředovací roztěry (bod 4.1).
- 6.1.9.7. Identifikují se všechny čisté kultury s podezřením na *R. solanacearum* (bod 6.2.).

#### *Interpretace výsledků biotestu*

Platné výsledky biotestu jsou získány, jestliže pozitivní kontrolní testovací rostliny vykazují typické příznaky, bakterie mohou být z těchto rostlin znovu izolovány a negativní kontrolní rostliny nevykazují žádné příznaky.

Biotest je negativní, jestliže rostliny nejsou infikovány bakteriemi *R. solanacearum*, pokud byl organismus zjištěn u pozitivních kontrolních testovacích rostlin.

Biotest je pozitivní, jestliže testovací rostliny jsou infikovány bakteriemi *R. solanacearum*.

## 6.2. Identifikační testy

Identifikují se čisté kultury izolovaného podezřelého organismu *R. solanacearum* použitím nejméně dvou následujících testů založených na různých biologických principech.

Zahrnou se případně známé referenční kmeny pro každý provedený test (viz dodatek 3).

### 6.2.1. Výživové a enzymatické identifikační testy

Určují se následující fenotypové vlastnosti, které jsou vesměs přítomny nebo naopak chybí u *R. solanacearum*, metodami Lelliott a Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001).

Text	Očekávaný výsledek
Produkce fluorescenčního pigmentu	-
Inkluze PHB	+
Oxidačně fermentační test	O+/F-
Katalázová aktivita	+
Oxidázový test podle Kovace	+
Redukce dusičnanů	+
Využití citrátů	+
Růst při 40°C	-
Růst v 1% NaCl	+
Růst v 2% NaCl	-
Arginin-dihydrolázová aktivita	-
Ztekucení želatiny	-
Hydrolyza škrobu	-
Hydrolyza eskulinu	-
Produkce levanu	-

Média a metody viz. Lelliot & Stead (1987).

#### 6.2.2. Test IF

- 6.2.2.1. Připraví se suspenze přibližně  $10^6$  buněk na 1 ml v pufru IF (dodatek 4).
- 6.2.2.2. Připraví se řada dvojnásobných zředění vhodného antiséra.
- 6.2.2.3. Použije se IF metoda (6.1.5.).
- 6.2.2.4. Test IF je pozitivní, jestliže titer IF kultury odpovídá titru pozitivní kontroly.

#### 6.2.3. Test ELISA

*Poznámka:*

Při provádění pouze 2 identifikačních testů se nepoužívá kromě této metody jiný sérologický test.

- 6.2.3.1. Připraví se suspenze přibližně  $10^8$  buněk na 1 ml v 1X PBS (dodatek 4).
- 6.2.3.2. Provede se test ELISA se specifickou monoklonální protilátkou k *R. solanacearum*.
- 6.2.3.3. Test ELISA je pozitivní, jestliže hodnota jeho výsledku získaná z této kultury je nejméně poloviční v porovnání s hodnotou z pozitivní kontroly.

#### 6.2.4. Testy PCR

- 6.2.4.1. Připraví se suspenze přibližně  $10^6$  buněk na 1 ml sterilní vody (UPW = ultra pure water).
- 6.2.4.2. Ohřeje se 100  $\mu$ l buněčné suspence v uzavřených zkumavkách v ohřivacím bloku nebo vařící vodní lázni při 100 °C 4 minuty. Vzorky mohou být uchovány při teplotě - 16 až - 24 °C do dalšího použití.
- 6.2.4.3. Použijí se příslušné postupy PCR k amplifikaci amplikonů specifických pro *R. solanacearum* (např. Seal *et al.* (1993); Pastrik a Maiss (2000); Pastrik *et al.* (2002); Boudazin *et al.* (1999); Opina *et al.* (1997), Weller *et al.* (1999).

6.2.4.4. Identifikace organismu *R. solanacearum* je pozitivní, jestliže amplikony PCR mají stejnou velikost a mají stejnou mnohotvárnost délky fragmentů jako pozitivní kontrolní kmen.

#### 6.2.5. Test FISH

6.2.5.1. Připraví se suspenze přibližně  $10^6$  buněk na 1 ml v UPW.

6.2.5.2. Použije se metoda FISH (6.1.7) s nejméně 2 oligosondami specifickými pro *R. solanacearum* (dodatek 7).

6.2.5.3. Test FISH je pozitivní, jestliže se u kultury a pozitivní kontroly dosáhne stejných reakcí.

#### 6.2.6. Analýza mastných kyselin (FAP)

6.2.6.1. Pěstuje se kultura na tryptikázo-sójovém agaru (Oxoid) 48 hodin při teplotě 28 °C.

6.2.6.2. Použijte se metoda FAP (Janse, 1991; Stead, 1992).

6.2.6.3. Test FAP je pozitivní, jestliže je profil podezřelé kultury stejný jako profil pozitivní kontroly. Výskyt charakteristických mastných kyselin: 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH a 18:1 2OH a absence 16:0 3 OH poukazuje na *Ralstonia sp.*

#### 6.2.7. Metody charakteristiky kmenů

Pro každý nový případ izolace *R. solanacearum* se doporučuje charakteristika kmenu použitím jedné z následujících metod.

U každého provedeného testu se zahrnou případně známé referenční kmeny (viz. dodatek 3).

##### 6.2.7.1. Stanovení biovaru

*R. solanacearum* tvoří biovary lišící se schopností využití a/nebo oxidace tří disacharidů a tří hexosových alkoholů (Hayward, 1964 a Hayward *et al.*, 1990). Živná půda pro test biovaru je popsána v dodatku 2. Test lze úspěšně provést očkováním do živné půdy s čistou kulturou *R. solanacearum* a inkubací při teplotě 28 °C. Je-li živná půda rozdělena na sterilní destičky s 96 jamkami (200 µl na 1 jamku), zbarvení se mění během 72 hodin od olivově zelené po žlutou a znamená pozitivní výsledek testu.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Využití:					
Malťosa	-	+	+	-	+
Laktosa	-	+	+	-	+
D (+) Cellobiosa	-	+	+	-	+
Mannitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-

Dodatečné testy pro rozlišení dílčích fenotypů biovaru 2

	Biovar 2A (světově rozšířen)	Biovar 2A (Chile a Kolumbie)	Biovar 2T (tropické oblasti)
Využití trehalosy	-	+	+
Využití meso-inositolu	+	-	+
Využití D ribosy	-	-	+
Pektolytická aktivita (1)	nízká	nízká	vysoká

(1) Viz Lelliott a Stead (1987).

#### 6.2.7.2. Genomická variabilita

Molekulární identifikace kmenů komplexu *R. solanacearum* lze dosáhnout několikaletými technikami, mezi něž patří:

1. Analýza délkového polymorfismu restričních fragmentů RFLP (Cook *et al.*, 1989).
2. Repetitivní sekvenční PCR s využitím primerů REP, BOX a ERIC (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995).
3. Analýza délkového polymorfismu amplifikovaných fragmentů AFLP (Van der Wolf *et al.*, 1998).

#### 6.2.7.3. Metody PCR

Specifické primery PCR (Patrik *et al.*, 2002; viz dodatek 6) lze použít k diferenciaci kmenů patřících do skupiny 1 (biovary 3, 4 a 5) a skupiny 2 (biovary 1, 2A a 2T) *R. solanacearum*, jak bylo původně definováno analýzou RFLP (Cook *et al.*, 1989) a sekvenováním 16S rDNA (Taghavi *et al.*, 1996).

### 6.3. Konfirmační test (test patogenity)

Jako závěrečné potvrzení diagnózy *R. solanacearum* a k potvrzení virulence kultur identifikovaných jako *R. solanacearum* musí být proveden test patogenity.

- 1) Připraví se inokulum o hustotě přibližně  $10^6$  buněk na 1 ml ze 24 až 48 hodinových kultur k testování a příslušný kmen pozitivní kontroly *R. solanacearum* (např. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; viz dodatek 3).
- 2) Inokuluje se 5 až 10 náchylných sazenic rajčete nebo lilku ve fázi 3 pravých listů (viz odst. 6.1.9).
- 3) Sazenice se nechají inkubovat až 2 týdny při teplotě 25-28 °C a vysoké relativní vzdušné vlhkosti s přiměřeným zaléváním, bez vystavení zamokření nebo vyprahlosti půdy. U čistých kultur by typické vadnutí mělo nastat během 14 dnů. Neobjeví-li se po této době příznaky, kultura nemůže být považována jako patogenní forma *R. solanacearum*.
- 4) Hledají se příznaky vadnutí a/nebo epinastie, chlorózy nebo krnění.
- 5) Provede se izolace z rostlin vykazujících příznaky odebráním segmentu ze stonku asi 2 cm nad místem inokulace. Segment se rozmělní a suspenduje v malém množství sterilní destilované vody nebo 50 mM fosfátového pufru (dodatek 4). Izolace ze suspence se provede zředovacím roztěrem pokud možno na selektivní živné půdě (dodatek 2). Po inkubaci 48 až 72 hodin při teplotě 28 °C se vyhodnotí výskyt typických kolonií pro *R. solanacearum*.

#### Dodatek 1

#### Laboratoře podílející se na optimalizaci a validaci protokolů

Laboratoř <sup>(1)</sup>	Místo	Země
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Vídeň a Línec	Rakousko
Departement Gewasbescherming	Merebeke	Belgie
Plantedirektoratet	Lyngby	Dánsko
Central Science Laboratory	York	Anglie
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Skotsko
Laboratoire National de la Protection Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Francie
Laboratoire National de la Protection Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francie
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Německo
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Německo
State Laboratory	Dublin	Irsko
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Boloň	Itálie
Regione Veneto Unita Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Itálie
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Nizozemsko
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nizozemsko
Direcção-General de Protecção das Culturas	Lisabon	Portugalsko
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Španělsko
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencie	Španělsko
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Švédsko

<sup>(1)</sup> Kontakty: viz internetová stránka <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

**Média pro izolaci a kultivaci organismu *R. solanacearum***

**a) Živné půdy pro izolaci a kultivaci**

*Živný agar (NA)*

Živný agar (Difco)	23,0 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpustí se složky a sterilují tlakem při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

*Kvasnično-pepton-glukózový agar (YPGA)*

Kvasnicový extrakt (Difco)	5,0 g
Bacto-Pepton (Difco)	5,0 g
D(+) Glukóza (monohydrát)	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpustí se složky a sterilují tlakem při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

*Sacharózepeptonový agar (SPA)*

Sacharóza	20,0 g
Bacto-Peptone (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-Agar (Difco)	15,0 g
Destilovaná voda	1,00 l
pH 7,2–7,4	

Rozpustí se složky a sterilují v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

*Kelmanovo tetrazoliové médium*

kasein hydrolyzát (Difco)	1,0 g
Bacto-Pepton (Difco)	10,0 g
Dextróza	5,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpustí se složky a sterilují v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Ochladí se na 50 °C a přidá se filtrem sterilizovaný roztok 2,3,5-trifenylnitroimidazoliumchloridu (Sigma), až do dosažení konečné koncentrace 50 mg na litr.

**b) Validované selektivní živné půdy**

*Živná půda SMSA (Englebrecht, 1994 ve znění Elphinstone et al., 1996)*

Základní živná půda

Casamino kyseliny (Difco)	1,0 g
Bacto-Pepton (Difco)	10,0 g
Glycerol	5,0 ml
Bacto-Agar (Difco) (viz pozn. 2)	15,0 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpustí se složky a sterilují v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Ochladí se na 50 °C a přidá filtrem sterilizovaný vodný roztok následujících složek, aby se získala stanovená konečná koncentrace:

Krystalová violet <sup>®</sup> (Sigma)	5 mg/l
Polymixin-B-sulfát (Sigma P1004)	600 000 U (přibližně 100 mg)/l
Bacitracin (Sigma B-0125)	1 250 U (přibližně 25 mg)/l

Chloramfenikol (Sigma C-3175)	5 mg/l
Penicilín-G (Sigma P-3032)	825 U (přibližně 0,5 mg)/l
2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid (Sigma)	50 mg/l

*Poznámky:*

1. Použití jiných než výše uvedených reagentů může ovlivnit růst *R. solanacearum*.
2. Místo Bacto-Agar (Difco) může být použit Oxoid Agar #1. V takovém případě bude růst *R. solanacearum* pomalejší, ale může to také omezit růst konkurenčních saprofytů. Typické kolonie *R. solanacearum* se mohou tvořit o 1–2 dny déle a červené zbarvení může být světlejší a rozptýlenější než při použití Bacto-Agaru.
3. Zvýšení koncentrace bacitracinu na 2 500 U/l může omezit populace konkurenčních bakterií bez ovlivnění růstu *Ralstonia solanacearum*.

Roztoky antibiotik se uchovávají a skladují při teplotě 4 °C v temnu a musí se spotřebovat do 1 měsíce.

Misky s médiem by měly být před použitím zbaveny povrchové kondenzace.

Nutno zabránit přílišnému vysušení média.

Každá nově připravená šarže živné půdy by měla být podrobena kontrole kvality živné půdy roztěrem suspence referenční kultury *R. solanacearum* na médium (viz dodatek 3) a pozorováním, zda se po 2 až 5 dnech při teplotě 28 °C objeví typické kolonie.

### c) Validované obohacené živné půdy

#### *Živná půda SMSA (Elphinstone et al., 1996)*

Provede se příprava jako pro selektivní agarovou živnou půdu SMSA, ale vynechá se Bacto-Agar a 2,3,5- trifenyltetrazolium chlorid.

#### *Upravená živná půda Wilbrink (Caruso et al., 2002)*

Sacharóza	10 g
Proteázový pepton	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
Destilovaná voda	1,00 l

Steriluje se tlakem při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a ochladí se na 50 °C.

Přidá se antibiotický zásobní roztok jako pro živnou půdu SMSA.



## A. Komerční standardizovaný kontrolní materiál

## a) Izolované bakteriální kultury

Následující izolované bakteriální kultury se doporučují jako standardní referenční materiál buď k pozitivní kontrole (tabulka 1) nebo během optimalizace testů, aby se zabránilo vzájemnému působení (tabulka 2). Všechny kmeny jsou komerčně dostupné a lze je získat z těchto sbírek:

1. Národní sbírka patogenních bakterií rostlin (NCPPB), Ústřední vědecká laboratoř York, UK.
2. Sběrka kultur sekce ochrany rostlin (PD), Wageningen, Nizozemsko.
3. Francouzská sbírka patogenních bakterií rostlin (CFBP), Ústav fyto bakteriologie INRA, Angers, Francie.

Tabulka 1: Referenční panel izolovaných bakteriálních kultur SMT *R. solanacearum*

Kód NCPPB	SMT #	Jiné kódy	Země původu	Biovar
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egypt	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turecko	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Anglie	2
NCPPB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Kypr	2
NCPPB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Švédsko	2
NCPPB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgie	2
NCPPB 4156 (*)	71(*)	PD 2762, CFBP 3857	Nizozemsko	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15.59	Francie	2
NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Portugalsko	2
NCPPB 4160	69	IVIA-1632-2	Španělsko	2
NCPPB 4161	76	B3B	Německo	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	USA	1
NCPPB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Kostarika	1
NCPPB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Kolumbie	2
NCPPB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPPB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brazílie	2T
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131	Austrálie	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CMib2861	Srí Lanka	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipíny	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Čína	5

(\*) Jako standardní referenční kmen se použije *R. solanacearum* biovar 2 (rod 3).

## Poznámka:

Spolehlivost výše uvedených kmenů může být zaručena pouze v případě, že pocházejí z původních sbírek kultur.

Tabulka 2: Referenční panel SMT sérologicky nebo geneticky příbuzných bakterií k optimalizaci detekčních testů

Kód NCPPB	SMT #	Jiné kódy	Identifikace
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis pv. marginalis</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 4164	-	CFBP 2227	<i>Burkholderia cepacia</i> <sup>(2)</sup>
NCPPB 4165	-	CFBP 2459	<i>Ralstonia pickettii</i> <sup>(2)</sup>
NCPPB 4166	58	CFBP 3567, CSL Pr1150	<i>Ralstonia pickettii</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 4167	60	CFBP 4618, PD 2778	<i>Ralstonia sp.</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	<i>Burkholderia andropogonis</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 353	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia caryophylli</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 945	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia cepacia</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia glumae</i> <sup>(1)</sup>

NCPPB 3590	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia plantarii</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	<i>Banana Blood Disease Bacterium</i> <sup>(1)(2)(3)</sup>
NCPPB 4168	61	CFBP 4619, IPO S339	<i>Enterobacter</i> sp. <sup>(1)</sup>
NCPPB 4169	62	IPO 1695	<i>Enterobacter</i> sp. <sup>(1)</sup>
NCPPB 4170	63	CFBP 4621, IPO S306	<i>Ochrobactrum anthropi</i> <sup>(1)(2)</sup>
NCPPB 4171	64	CFBP 4622, IPO 1693	<i>Curtobacterium</i> sp. <sup>(1)(2)</sup>
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	<i>Pseudomonas</i> sp. <sup>(1)</sup>
NCPPB 4173	-	PD 2318	<i>Aureobacterium</i> sp. <sup>(2)</sup>
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	<i>Flavobacterium</i> sp. <sup>(1)(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Potencionální křížově reagující kmen v sérologických testech (IF a/nebo ELISA) s polyklonálním antisérem.  
<sup>(2)</sup> Kmen, ze kterého lze v některých laboratořích amplifikovat produkt PCR na podobnou velikost, jako je očekávaná velikost při použití specifických primerů OLI-1 a Y-2 (viz dodatek 6).  
<sup>(3)</sup> Pravděpodobnost křížové reakce ve většině testů, ale výskyt znám pouze u banánů v Indonésii.

b) *Komerční standardizovaný kontrolní materiál*

Následující standardní kontrolní materiál je možné získat ze sbírky kultur NCPPB.

Mražené sušené pelety bramborového extraktu ze 200 zdravých hlíz bramboru k negativní kontrole všech testů.

Mražené sušené pelety bramborového extraktu ze 200 zdravých hlíz bramboru obsahující  $10^3$  až  $10^4$  a  $10^4$  až  $10^6$  buněk biovaru 2 *R. solanacearum* (kmen NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) jako pozitivní kontroly serologických a PCR testů. Protože životaschopnost buňky je ovlivněna lyofilizací, nejsou tyto vhodné jako standardy v testech izolace a testech patogenity.

Ve formaldehydu fixované suspence biovaru 2 *R. solanacearum* (kmen NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) s  $10^6$  buňkami na 1 ml k pozitivní kontrole sérologických testů.

B. **Příprava pozitivních a negativních kontrol pro screeningové testy vodivých pletiv PCR/IF a FISH**

Kultivuje se 48hodinová kultura virulentního kmene *R. solanacearum* rasy 3/biovaru 2 (např. kmen NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) na SMSA živné půdě a suspenduje se v 10 mM fosfátovém pufru, aby se získala buněčná hustota přibližně  $2 \times 10^8$  buněk tvořících kolonie na 1 ml. Obvykle se jí dosáhne jemně zakalenou suspenzí rovnající se optické hustotě 0,15 při 600 nm.

Odebere se dřev z pupkových konců 200 hlíz z produkce odrůdy s bílou slupkou, o které se ví, že je prosta *R. solanacearum*.

Zpracují se pupkové konce výše uvedeným postupem a resuspenduje se peleta v 10 ml.

Připraví se 10 sterilních mikrozkuvek o objemu 1,5 ml s 900  $\mu$ l resuspendované pelety.

Přenesou se 100  $\mu$ l suspenze *R. solanacearum* do první mikrozkuvky a protřepe se..

Provede se desetinásobné ředění v dalších pěti mikrozkuvkách.

Těchto šest kontaminovaných mikrozkuvek se použije jako kontrolní vzorky. Čtyři nekontaminované mikrozkuvky se použijí jako kontrolní negativní vzorky. Mikrozkuvky musí být řádně označeny.

Připraví se alikvotní části z 100  $\mu$ l ve sterilních zkuvkách o objemu 1,5 ml, čímž se získá 9 kopií každého kontrolního vzorku. Uskladní se při teplotě -16 až -24 °C až do doby použití.

Přítomnost a množství *R. solanacearum* v kontrolních vzorcích by měly být nejprve potvrzeny testem IF.

Pro PCR test se provede extrakce DNA z pozitivních a negativních kontrolních vzorků pro každou sérii zkušebních vzorků.

Pro IF a FISH testy se provede test patogenity pozitivních a negativních kontrolních vzorků pro každou sérii zkušebních vzorků.

Při kvantitativních rozborech IF, FISH a PCR musí být *R. solanacearum* zjištěna v nejméně v  $10^6$  a  $10^4$  buněk/ml pozitivních kontrol a nesmí být zjištěn v žádné z negativních kontrol.

**Pufry pro testovací postupy**

OBEZNĚ: Neotevřené sterilizované pufry lze skladovat po dobu až jednoho roku.

**1. Pufry pro extrakci**

## 1.1 Extrakční pufr (50 mM fosfátový pufr, pH 7,0)

Tento pufr se používá k extrakci bakterie z rostlinných tkání homogenizací nebo protřepáním.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (bezvodý)	4,26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpustí se složky, zkontroluje pH a sterilizuje v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

Užitečné mohou být následující složky:

	Účel	Množství (na liter)
Lubrolové vločky	Protisrážlivý prostředek (*)	0,5 g
DC silikonový odpěňovač	Odpěňovací činidlo (*)	1,0 ml
Tetrasodiumpyrofosfát	Antioxidační činidlo	1,0 g
Polyvinylpyrrolidon-40 000 (PVP – 40)	Vázání inhibitorů PCR	50 g
(*) pro použití při extrakci homogenizací		

## 1.2. Peletový pufr (10 mM fosfátový pufr, pH 7,2)

Tento pufr se používá pro resuspenzi a ředění extraktů z výkrojků z pupkových částí bramborových hlíz poté, co byly odstředováním koncentrovány do pelety.

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
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpustí se složky, zkontroluje pH a sterilizuje v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

**2. Pufry pro IF test**

*Pufr pro IF (10 mM fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku (PBS), pH 7,2)*

Tento pufr se používá k ředění protilátek.

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
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpustí se složky, zkontroluje pH a sterilizuje v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

*IF-pufr-Tween*

Tento pufr se používá k oplachování podložních sklíček.

Přidá se 0,1 % Tween 20 k pufru pro IF.

*Fosfátový pufr v glycerolu, pH 7,6*

Tento pufr se používá jako krycí roztok na okénka sklíček na IF testy k zvýšení fluorescence.

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

Glycerol	50 ml
Destilovaná voda	100 ml

Krycí roztoky jsou komerčně dostupné, např. Vectashield<sup>®</sup> (Vector Laboratories) nebo CitiFluor<sup>®</sup> (Leica).

### 3. Pufry pro účely nepřímého testu ELISA

- 3.1. Dvojnásobný uhličitanový potahovací pufr, pH 9,6.

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6,36 g
NaHCO <sub>3</sub>	11,72 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpustí se složky, zkontroluje pH a steriluje autoklárováním při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Pokud extrakt obsahuje vysoký podíl aromatických molekul, je možné jako antioxidant přidat siřičitan sodný (0,2 %).

- 3.2. Desetinásobný roztok chloridu sodného pufovaný fosfátem (10 x 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
Destilovaná voda	1,00 l

- 3.3. PBS-Tween

10 x PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilovaná voda	895 ml

- 3.4. Blokační pufr (musí být čerstvě připraven).

10 x PBS	10,0 ml
Polyvinylpyrrolidon-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Sušené mléko	0,5 g
Destilovaná voda	doplnit do 100 ml

- 3.5. Roztok pro substrát alkalické fosfatázy, pH 9,8

Diethanolamin	97 ml
Destilovaná voda	800 ml

Rozpustí se a koncentrovanou HCl se upraví pH na 9,8.

Doplní se do 1 l destilovanou vodou.

Přidá se 0,2 g MgCl<sub>2</sub>.

Rozpustí se dvě 5 mg tabletky fosfatázového substrátu (Sigma) v 15 ml roztoku.

### 4. Pufry pro účely testu DASI ELISA

- 4.1. Potahovací pufr, pH 9,6.

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 g
Destilovaná voda	1 000 ml

Rozpustí se složky a zkontroluje pH 9,6.

- 4.2. 10 x fosfátosolný pufr (PBS) pH 7,2– 7,4

NaCl	80,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	27 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O                    4 g  
Destilovaná voda                        1 000 ml

- 4.3. PBS-Tween  
10 x PBS                                    50 ml  
10 % Tween 20                            5 ml  
Destilovaná voda                        950 ml
- 4.4 Substrátový pufr, pH 9,8  
Diethanolamin                            100 ml  
Destilovaná voda                        900 ml

Smíchá se a nastaví se hodnota pH 9,8 koncentrovanou HCl.

#### Dodatek 5

##### Stanovení koncentrace IF a FISH pozitivních buněk

1. Vypočítá se průměrný počet typických fluoreskujících buněk v jednom pozorovacím poli (c).
2. Vypočítá se počet typických fluoreskujících buněk v okénku mikroskopického sklíčka (C).

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

kde S = plocha jednoho pole na sklíčku s více okénky a  
s = plocha pole objektivu.

$$s = \pi^2/4G^2K^2,$$

kde i = koeficient pole (v rozmezí 8 – 24 podle typu okuláru),  
K = tubusový koeficient (1 nebo 1,25),  
G = zvětšení objektivu (100 x, 40 x atd.).

3. Vypočítá se počet charakteristických fluoreskujících buněk na 1 ml resuspendované pelety (N).

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

kde y = objem resuspendované pelety v každém okénku a  
F = zředovací faktor resuspendované pelety

#### Dodatek 6

##### Validované protokoly a činidla pro PCR

*Poznámka:*

Úvodní testování by mělo umožnit reprodukovatelné zjištění nejméně 10<sup>3</sup> až 10<sup>4</sup> buněk *R. solanacearum* na 1 ml vzorkového extraktu. Úvodní testování by také nemělo vykazovat žádné falešné pozitivní výsledky se skupinou vybraných kmenů bakterií (viz *dodatek 3*).

##### 1. Protokol PCR Seal *et al.* (1993)

- 1.1. Oligonukleotidové primery

Přímý primer OLI-1:                    5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'

Reverzní primer Y-2:                    5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Očekávaná velikost ampliconu templatové DNA *R. solanacearum* = 288 bp

- 1.2. Reakční směs PCR

Reagencie	Množství v reakci	Konečná koncentrace
Sterilní UPW	17,65 µl	
10x pufr PCR (1) (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
Směs dNTP (20mM)	0,25 µl	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM

Primer Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Taq polymerasa (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Množství vzorku	2,0 µl	
Celkové množství	25 µl	

(1) Metoda byla validována použitím Taq polymerázy Perkin Elmer (AmpliQ) a Gibco BRL.

### 1.3. Reakční podmínky PCR

Provede se následující cyklický proces:

- 1 cyklus: i) 2 minuty při 96 °C (denaturace templátové DNA)  
35 cyklů: ii) 20 sekund při 94 °C (denaturace templátové DNA)  
iii) 20 sekund při 68 °C (hybridizace primerů s templátovou DNA)  
iv) 30 sekund při 72 °C (syntéza kopie)  
1 cyklus: v) 10 minut při 72 °C (závěrečná syntéza)  
vi) ponechá se při teplotě 4 °C.

*Poznámka:*

Tento program byl optimalizován pro použití termocyklieru Perkin Elmer 9600. Použití jiných přístrojů může vyžadovat úpravu jednotlivých kroků cyklu ii), iii) a iv).

### 1.4. Restrikční enzymová analýza amplikonu.

Produkty PCR vzniklé amplifikací z *R. solanacearum* DNA vytvářejí polymorfismus délky restrikčních fragmentů s enzymem *Ava* II po inkubaci při teplotě 37 °C.

## 2. Protokol PCR Pastrika a Maise (2000)

### 2.1. Oligonukleotidové primery

Přímý primer Ps-1: 5'-agt cga acg gca gcg ggg g -3'  
Reverzní primer Ps-2: 5'-ggg gat ttc aca tgc gtc ttg ca -3'  
Očekávaná velikost amplikonu templátové DNA *R. solanacearum* DNA = 553 bp.

### 2.2. Reakční směs PCR

Reagencie	Množství v reakci	Konečná koncentrace
Sterilní UPW	16,025 µl	
10x pufr PCR (1)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (frakce V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Směs dNTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq polymerasa (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Množství vzorku	5,0 µl	
Celkové množství	25,0 µl	

(1) Metoda byla validována použitím Taq polymerázy Perkin Elmer (AmpliQ) a Gibco BRL.

*Poznámka:*

Původně optimalizovaná pro termocyklier MJ Research PTC 200 s polymerasou Gibco Taq Polymerase. Perkin Elmer AmpliQ a pufr mohou být rovněž použity ve stejných koncentracích.

### 2.3 Reakční podmínky PCR

Provede se následující cyklický proces:

- 1 cyklus: i) 5 minut při 95 °C (denaturace templátové DNA)  
35 cyklů: ii) 30 sekund při 95 °C (denaturace templátové DNA)  
iii) 30 sekund při 68 °C (hybridizace primerů s templátovou DNA)  
iv) 45 sekund při 72 °C (syntéza kopie)  
1 cyklus: v) 5 minut při 72 °C (syntéza extenze)  
vi) ponechá se při teplotě 4 °C.

*Poznámka:*

Tento program byl optimalizován pro použití termocyklieru MJ Research PTC 200. Použití jiných přístrojů bude možná vyžadovat úpravu jednotlivých kroků cyklu ii), iii) a iv).

2.4. Restrikční enzymová analýza amplikonu

Produkty PCR vzniklé amplifikací z *R. solanacearum* DNA vytvářejí zřetelný polymorfismus délky restrikčních fragmentů s enzymem *Taq* I po inkubační době 30 minut při teplotě 65 °C. Restrikční fragmenty specifické pro *R. solanacearum* mají velikost 457 bp a 96 bp.

**3. Protokol pro multiplexní PCR s interní kontrolou (Pastrík *et al.*, 2002)**

3.1. Oligonukleotidové primery

Přímý primer RS-1-F: 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'  
Reverzní primer RS-1-R: 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'  
Přímý primer NS-5-F: 5'-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3'  
Reverzní primer NS-6-R: 5'-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3'

Očekávaná velikost amplikonu templátové DNA *R. solanacearum* = 718 bp (sada primerů RS).

Očekávaná velikost amplikonu interní kontroly PCR 18S rRNA = 310 bp (sada primerů NS).

3.2. Reakční směs PCR

Reagencie	Množství v reakci	Konečná koncentrace
Sterilní UPW	12,625 µl	
10x pufr PCR (1) (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (frakce V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Směs dNTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer NS-S-F (10 µM) <sup>(2)</sup>	0,15 µl	0,06 µM
Primer NS-6-R (10 µM) <sup>(2)</sup>	0,15 µl	0,06 µM
Taq polymeráza (5U/µl) <sup>(1)</sup>	0,2 µl	1,0 U
Množství vzorku	5,0 µl	
Celkové množství	25,0 µl	
<sup>(1)</sup> Metoda byla validována použitím Taq polymerázy Perkin Elmer (AmpliAq) a Gibco BRL. <sup>(2)</sup> Koncentrace primerů NS-5-F a NS-6-R byly optimalizovány pro výkrojky pletiva pupkových částí hlíz bramboru pomocí homogenizační metody a purifikace DNA podle Pastríka (2000) (viz 6.1.6.1.a)). Použití extrakční metody třepáním nebo jiných metod izolace DNA může vyžadovat nové provedení optimalizace koncentrací reagensů.		

3.3. Reakční podmínky PCR

Provede se následující cyklický proces:

1 cyklus: i) 5 minut při 95 °C (denaturace templátové DNA)  
35 cyklů: ii) 30 sekund při 95 °C (denaturace templátové DNA)  
iii) 30 sekund při 58 °C (hybridizace primerů s templátovou DNA)  
iv) 45 sekund při 72 °C (syntéza kopie)  
1 cyklus: v) 5 minut při 72 °C (konečná syntéza)  
vi) nechá se při teplotě 4 °C.

*Poznámka:*

Tento program byl optimalizován pro použití termocyklieru MJ Research PTC 200. Použití jiných přístrojů může vyžadovat úpravu jednotlivých kroků cyklu ii), iii) a iv).

3.4. Restrikční enzymová analýza amplikonu

Produkty PCR vzniklé amplifikací z DNA *R. solanacearum* vytvářejí zřetelný polymorfismus délky restrikčních fragmentů s enzymem *Bsm* I nebo *Isoschizomere* (např. *Mva* 1269 I) po inkubační době 30 minut při teplotě 65 °C.

#### 4. Protokol PCR specifický pro biovar *R. solanacearum* (Pastrik et al, 2001)

##### 4.1. Oligonukleotidové primery

Přímý primer Rs-1-F: 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'  
Reverzní primer Rs-1-R: 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'  
Reverzní primer Rs-3-R: 5'-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3'

Očekávaná velikost ampliconu templátové DNA *R. solanacearum*:

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

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

##### 4.2. Reakční směs PCR

###### a) Protokol PCR specifický pro biovar ½

Reagencie	Množství v reakci	Konečná koncentrace
Sterilní UPW	12,925 µl	
10x pufr PCR <sup>(1)</sup>	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (frakce V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Směs dNTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer Rs-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Taq polymeráza (5U/µl) <sup>(1)</sup>	0,2 µl	1,0 U
Množství vzorku	5,0 µl	
Celkové množství	25,0 µl	

<sup>(1)</sup> Metoda byla validována použitím Taq polymerázy Perkin Elmer (AmpliTaq) a Gibco BRL.

###### b) Protokol PCR specifický pro Biovar 3/4/5

Reagencie	Množství v reakci	Konečná koncentrace
Sterilní UPW	14,925 µl	
10x pufr PCR (1)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (frakce V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Směs dNTP (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	1,0 µl	0,4 µM
Primer Rs-3-R (10 µM)	1,0 µl	0,4 µM
Taq polymeráza (5U/µl) <sup>(1)</sup>	0,2 µl	1,0 U
Množství vzorku	5,0 µl	
Celkové množství	25,0 µl	

<sup>(1)</sup>Metoda byla validována použitím Taq polymerázy Perkin Elmer (AmpliTaq) a Gibco BRL.

##### 4.3. Reakční podmínky PCR

Provede se následující cyklický proces pro obě reakce specifické pro biovary 1/2- a biovary 3/4/5:

1 cyklus: i) 5 minut při 95 °C (denaturace templátové DNA)  
35 cyklů: ii) 30 sekund při 95 °C (denaturace templátové DNA)  
iii) 30 sekund při 58 °C (hybridizace primerů s templátovou DNA)  
iv) 45 sekund při 72 °C (syntéza kopie)  
1 cyklus: v) 5 minut při 72 °C (konečná syntéza)  
vi) ponechá se při teplotě 4 °C.

*Poznámka:*

Tento program byl optimalizován pro použití termocykleru MJ Research PTC 200. Použití jiných přístrojů může vyžadovat úpravu jednotlivých kroků cyklu ii), iii) a iv).



#### 4.4. Restrikční enzymová analýza amplikonu.

Produkty PCR vzniklé amplifikací DNA *R. solanacearum* pomocí primerů Rs-1-F a Rs-1-R vytvářejí zřetelný polymorfismus délky restrikčních fragmentů s enzymem *Bsm* I nebo Isoschizomere (např. Mva 1269 I) po inkubační době 30 minut při teplotě 65 °C. Produkty PCR vzniklé amplifikací z DNA *R. solanacearum* pomocí primerů Rs-1-F a Rs-3-R nemají žádná restrikční místa.

### 5. Příprava nanášecího pufru

#### 5.1. Bromfenolová modř (10 % zásobní roztok)

Bromfenolová modř	5 g
Destilovaná (redestilovaná) voda	50 ml

#### 5.2. Nanášecí pufr

Glycerol (86 %)	3,5 ml
Bromfenolová modř (5,1)	300 µl
Destilovaná (redestilovaná) voda (bidestilát)	6,2 ml

### 6. Pufr 10x TRIS-acetát-EDTA (TAE), pH 8,0

TRIS	48,4 g
Ledová kyselina octová	11,42 ml
EDTA (sodná sůl)	3,72 g
Destilovaná voda	1,00 l

Před použitím se zředí na 1X.

Také komerčně dostupné (např. Invitrogen nebo rovnocenné).

### Dodatek 7

### Validovaná činidla pro FISH test

#### 1. Oligosondy

Sonda specifická pro <i>R. solanacearum</i> OLI-1-CY3:	5'-ggc agg tag caa gct acc ccc-3'
Nespecifická eubakteriální sonda EUB-338-FITC:	5'-gct gcc tcc cgt agg agt-3'

#### 2. Fixační roztok

*[UPOZORNĚNÍ: FIXAČNÍ ROZTOK OBSAHUJE PARAFORMALDEHYD, KTERÝ JE TOXICKÝ. POUŽÍT RUKAVICE A NEVDECHNOUT. DOPORUČUJE SE PRACOVAT V DIGESTOŘI.]*

- Zahřeje se 9 ml molekulárně čisté vody (např. Ultra pure water = (UPW)) na teplotu přibližně 60 °C a přidá se 0,4 g paraformaldehydu. Paraformaldehyd se rozpustí po přidání 5 kapek 1N NaOH a zamíchání magnetickým míchadlem.
- Upraví se pH na 7,0 přidáním 1ml fosfátového pufru 0,1 M (PB; pH 7,0) a 5 kapek HCl 1N. Zkontroluje se pH indikačním proužkem a v případě potřeby se upraví pomocí HCl nebo NaOH. *[UPOZORNĚNÍ: V ROZTOCÍCH S PARAFORMALEDEHYDEM NEPOUŽÍVAT MĚŘIČ PH!]*
- Přefiltruje se roztok přes membránový filtr 0,22 µm a skladuje se chráněný před prachem při teplotě 4 °C do dalšího použití.

#### 3. 3x Hybmix

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)

EDTA (sterilizovaný přes filtr a autoklávovaný) 15 mM

Zředí se až 1x, podle potřeby.

#### 4. Hybridizační roztok

1x Hybmix  
Sodium dodecyl sulfát (SDS) 0,01 %  
Formamid 30 %  
Sonda EUB 338 5 ng/μl  
Sonda OLI-1 nebo OLI2 5 ng/μl

Připraví se množství hybridizačního roztoku podle výpočtů v tabulce 1. Pro každé sklíčko (obsahující dvojmo 2 různé vzorky) je třeba 90 μl hybridizačního roztoku. **UPOZORNĚNÍ: FORMAMID JE VELMI JEDOVATÝ, NUTNO POUŽÍVAT RUKAVICE A UČINIT POTŘEBNÁ BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ!**

Tabulka 1. Doporučená množství pro přípravu hybridizační směsi

Počet sklíček	1	4	6	8	10
Sterilní ultra čistá voda	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3 x Hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamid	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Sonda EUB 338 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Sonda OLI-1 nebo OLI2 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Celkové množství	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

*Poznámka:*

Všechny roztoky obsahující světlocitlivé oligosondy se uchovávají v temnu při teplotě – 20 °C. Během použití se chrání před přímým slunečním zářením nebo elektrickým světlem.

#### 5. 0,1M fosfátový pufr, 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  
Destilovaná voda 1,00 l

Rozpustí se složky, zkontroluje pH a sterilizuje autoklávováním při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

#### Dodatek 8

##### Pěstování lilku a rajčete

Vysejí se semena rajčete (*Lycopersicon esculentum*) nebo lilku (*Solanum melongena*) do pasterizovaného výsevniho substrátu. Sazeničky s plně rozvinutými děložními lístky (10 až 14 dní) se přesadí do pasterizovaného pěstebního substrátu.

Rostliny lilku a rajčete by se měly pěstovat ve skleníku za následujících podmínek:

Délka dne: 14 hodin nebo přirozená délka dne, pokud je delší;  
Teplota: den: 21 až 24 °C,  
noc: 14 až 18 °C.

Vhodná odrůda lilku vejcoplodého: „Black Beauty“

Vhodná odrůda rajčete: „Moneymaker“

Dodavatelé: viz internetová stránka <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

## LITERATURA

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 Phyto bacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.
16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne *et al.*, (eds) *Klewer Academic Publishers*. pp. 117-121.
17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars, and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295.
18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85; 528-536.
19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J-F Wang, T-H Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5; 19-33.
20. 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., Trigalet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.
29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative 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.