

METODE TESTIRANJA ZA DETEKCIJU I IDENTIFIKACIJU *Synchytrium endobioticum* (Schilbersky)

1. Testiranje pomoću spora

Za detekciju i identifikaciju upotrebljavaju se ljetnje sporangije i trajne spore, koji se dobijaju iz zemlje nakon prosijavanja ili direktno iz biljnog materijala.

2. Metode detekcije

Za ekstrakciju spora iz zemlje primjenjuje se jedna od sljedećih metoda:

- metoda prosijavanja zemlje, kako je opisana u Pratt (1976.)¹;
- metoda prosijavanja zemlje, kako je opisana u van Leeuwen et al. (2005.)²;
- tehnika zonalne centrifuge za obradu velike količine uzoraka, kako je opisana u Wander et al. (2007.)³.

3. Metode identifikacije

Nakon ekstrakcije spore se identifikuju jednom od sljedećih metoda:

- morfološka identifikacija pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 100x do 400x; b) konvencionalni PCR sa upotrebom prajmera prema Lévesque et al. (2001.)⁴ i van den Boogert et al. (2005.)⁵;
- Real-time PCR sa upotrebom prajmera i proba prema Gent-Pelzer et al. (2010.)⁶;
- Real-time PCR sa upotrebom prajmera i proba prema Smith et al. (2014.)⁷.

4. Održivost (viability) trajnih spora

Održivost trajnih spora može se odrediti mikroskopskim pregledom ili biotestom. Održivost sporangija može se odrediti mikroskopskim pregledom sporangije stavljene u laktopenol ili u vodu (Przetakiewicz 2015.)⁸. Sporangije sa granuliranim sadržajem ili blago zaokruženom protoplazmom mogu se smatrati vijabilnima. One koje su trajno plazmolizirane ili bez vidljivog sadržaja smatraju se mrtvim. Kao alternativa ili u slučaju sumnje može se sprovesti biotest, u skladu sa Prilogom 4 tačka 3.

5. Utvrđivanje patotipova

Za utvrđivanje patotipova potrebni su svježi tumori

Inokulum za testiranje proizvodi se jednom od sljedećih metoda:

- metoda SASA-e (Science and Advice for Scottish Agriculture) koja se sastoji od sljedeća dva koraka:
 - proizvodnja inokuluma
Staro (smeđe) tumorsko tkivo usitnjava se i suši na vazduhu na sobnoj temperaturi dok ne postane tvrdo. Tvrdo tkivo se melje, ručno ili mehanički. Mljeveni materijal prosijava se suvom metodom, prikuplja se frakcija između 25 i 75 µm, a zatim se ekstrahuje hloroformom Prattovom metodom (1976.)¹;
 - proizvodnja svježih tumora
Približno 10 mg ekstrahovanih trajnih spora pospe se po površini 10 ml sterilne destilovane vode u maloj plastičnoj petri kutiji i inkubira na tamnom mjestu na 20 °C do klijanja. Krtole krompira sa malim klicama dužine oko 1–2 mm stavljaju se u prozirne plastične kutije obložene vlažnim upijajućim papirom sa označenim klicama okrenutim nagore. Oko klica se otopljenim vazelinom špricom oblikuje prsten. Prsten mora biti neprekidan i dovoljno visok da drži suspenziju spora bez propuštanja. 10 ml proklijalih spora razrijedi se sterilnom vodom da se dobije 20 ml i sipa u prstene pomoću pipete ili špric boce dok klica ne bude potpuno potopljena u suspenziju spora. Plastične kutije prekrivaju se poklopcem i inkubiraju četiri dana na temperaturi od 10 °C, nakon čega se kutije otvaraju, uklanja se inokulum i prsteni od vazelina, a kutije se premještaju u staklenik sa sistemom za orošavanje na temperaturi od 15 do 18 °C (16 sati osvjetljenja);
- metoda Spiekermann i Kothoff (1924.)⁹;
- metoda Potoček et al. (1991.)¹⁰;
- metoda Glynne-Lemmerzähl (Glynne 1925.¹¹; Lemmerzähl 1930.¹²; Noble i Glynne 1970.¹³).

¹ Pratt MA. 1976. A wet-sieving and flotation technique for the detection of resting sporangia of. *Annals of Applied Biology* 82: str. 21.–29.

² Van Leeuwen GCM, Wander JGN, Lamers J, Meffert JP, van den Boogert PHJF, Baayen RP. 2005. Direct examination of soil for sporangia of *Synchytrium endobioticum* using chloroform, calcium chloride and zinc sulphate as extraction reagents. *EPPO Bulletin* 35: str. 25.–31.

³ Wander JGN, van den Berg W, van den Boogert PHJF, Lamers JG, van Leeuwen GCM, Hendrickx G, Bonants P. 2007. A novel technique using the Hendrickx centrifuge for extracting winter sporangia of *Synchytrium endobioticum* from soil. *European Journal of Plant Pathology* 119: str. 165.–174.

⁴ Lévesque CA, de Jong SN, Ward LJ & de Boer SH (2001.). Molecular phylogeny and detection of *Synchytrium endobioticum*, the causal agent of potato wart. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: str. 200.–201.

⁵ Van den Boogert PHJF, van Gent-Pelzer MPE, Bonants PJM, de Boer SH, Wander JGN, Lévesque CA, van Leeuwen GCM, Baayen RP. 2005. Development of PCR-based detection methods for the quarantine phytopathogen *Synchytrium endobioticum*, causal agent of potato wart disease. *European Journal of Plant Pathology* 113: str. 47.–57.

⁶ Van Gent-Pelzer MPE, Krijger M, Bonants PJM. 2010. Improved real-time PCR assay for the detection of the quarantine potato pathogen, *Synchytrium endobioticum*, in zonal centrifuge extracts from soil and in plants. *European Journal of Plant Pathology* 126: str. 129.–133.

⁷ Smith DS, Rocheleau H, Chapados JT, Abbott C, Ribero S, Redhead SA, Lévesque CA, De Boer SH. 2014. Phylogeny of the genus *Synchytrium* and the development of TaqMan PCR assay for sensitive detection of *Synchytrium endobioticum* in soil). *Phytopathology* 104: str. 422.–432.

⁸ Przetakiewicz, J. 2015. Vijabilnost zimskih sporangija štetnog organizma *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. From Poland. *American Journal of Potato Research* 92: str. 704.–708

⁹ Spiekermann A, Kothoff P. 1924. Testing potatoes for wart resistance. *Deutsche Landwirtschaftliche Presse* 51: str. 114.–115.

¹⁰ Potoček J, Kraljičková K, Klabzubová S, Krejcar Z, Hnízdil M, Novák F, Perlová V. 1991. Identification of new *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. pathotypes in Czech Republic. *Ochrana Rostlin* 27: str. 191.–205.

¹¹ Glynne MD. 1925. Infection experiments with wart disease of potatoes. *Synchytrium endobioticum*. *Annals of Applied Biology* 12: str. 34.–60

¹² Lemmerzähl J. 1930. A new simplified method for inoculation of potato cultivars to test for wart resistance. *Züchter* 2: str. 288.–297

¹³ Noble M, Glynne MD. 1970. Wart disease of potatoes. *FAO Plant Protection Bulletin* 18: str. 125.–135.

Za određivanje svih patotipova za koje je poznato da su relevantni (1(D1), 2(G1), 6(O1), 18(T1) i 38(Nevşehir)) primjenjuje se diferencijalni test na zarazu sa raznim sortama određenog bilja kako je navedeno u tabeli. Test na zarazu sprovodi se u skladu sa protokolom iz tačke (d) (metoda Glynne-Lemmerzahl).

Selektivna osjetljivost sorti krompira za određivanje patotipova *S. endobioticum*

sorta	Patotipovi <i>S. endobioticum</i>				
	1(D1)	2(G1)	6(O1)	18(T1)	38(Nevşehir)
Tomensa/Evora/Deodara	S	S	S	S	S
Irga/Producent		S	S	S	S
Talent	R	R*	R*	S	S
Saphir	R	S	R	R	S
Ikar/Gawin/Karolin/Belita	R	R	R	R	R

„S”: osjetljivo

„R”: otporno

*: upućuje na slabu osjetljivost sorte na *S. endobioticum* („prisustvo nenekrotičnih nakupina sorsa bez formiranja tumora”)

IZVJEŠTAJ O REZULTATIMA NADZORA KOJI SE SPROVODI RADI OTKRIVANJA PRISUSTVA *Synchytrium endobioticum* (Schilbersky)

[illegible]

PROTOKOL ZA OCJENU OTPORNOSTI SORTE

Protokol za ocjenu otpornosti sorte uključuje sljedeće korake:

1. Testira se najmanje 40 krtola ili krompirovih okaca po sorti određenog bilja. Dije se u dvije grupe (ponavljanja).
2. Testiranje traje dvije godine, izuzetno, ako se pokaže da je sorta vrlo osjetljiva na patotip *S. endobioticum*, trajanje testiranja može se smanjiti na jednu godinu.
3. Prije početka sezone testiranja testira se čistoća inokuluma primjenom metoda datih u Prilogu 1.
4. Testiranje uvijek obuhvata pozitivnu kontrolu u obliku sorte određenog bilja koja je vrlo osjetljiva na patotip *S. endobioticum* koji se testira.
5. Primjenjuje se jedna od sljedećih metoda testiranja:
 - a) metoda Glynne-Lemmerzähl (Glynne 1925., Lemmerzähl 1930., Noble & Glynne 1970.);
 - b) Spieckermannova metoda (Spieckermann & Kothoff 1924.); ili
 - c) metoda SASA (Science and Advice for Scottish Agriculture) koja se sastoji od sljedećih koraka:
 - priprema krtola:
Krtole se vade iz hladnjače oko deset dana prije predviđene inokulacije, nježno se peru, suše i čuvaju na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi, da se podstakne klijanje.
Vrlo osjetljiva sorta („Morene” ili sorta uporedive osjetljivosti) uključuje se u svaku inokulaciju da bi služila kao pozitivna kontrola,
 - klijanje trajnih spora:
Uslovi za podsticanje klijanja trajnih spora podešavaju se 21 dan prije inokulacije. Približno 10 mg ekstrahovanih spora posipa se po površini 10 ml sterilne destilovane vode u malim plastičnim petri kutijama i inkubira na tamnom mjestu na 20 °C do klijanja. Sadržaj svake petri kutije razrjeđuje se sa dodatnih 10 ml sterilne destilovane vode za inokulaciju
 - inokulacija i inkubacija klica:
Kada klice dostignu 1 mm dužine, oko njih se oblikuje prsten otopljenim vazelinom
m. Prsten od vazelina mora biti neprekinut kako bi držao suspenziju spore bez propuštanja i dovoljno visok da suspenzija prekrije klicu. Na svakoj krtoli se oblikuje prsten oko jedne klice ili grupe klica. Krtole se stavljaju u plastične kutije obložene vlažnim upijajućim papirom sa označenim klicama okrenutima prema gore. Prsteni od vazelina pune se suspenzijom spora pipetom ili špric bocom dok klica ne bude potpuno potopljena. Plastične kutije prekrivaju se poklopcem i inkubiraju četiri dana na temperaturi od 10 °C na tamnom mjestu, nakon čega se prsteni uklanjaju, a otvorene kutije se stavljaju u staklenik na temperaturu od 15 °C do 18 °C s periodičnim orošavanjem (tri puta dnevno po 30 minuta). Ako nije došlo do zaraze, zato što je klica istrunula ili se nije razvila, krtola se može ponovno testirati pomoću druge klice
 - ocjena: Klice se 28 dana nakon inokulacije ispituju na zarazu stereomikroskopom sa povećanjem 10–15x i svjetlosnim mikroskopom. Najmanje 80 % krtola pozitivne kontrole mora dobiti ocjenu 4 ili 5, kako je navedeno u tabeli. Ocjena za najmanje jednu krtolu mora biti 5.
6. Svim krlama dodjeljuje se ocjena za otpornost od 1 do 5, kako je navedeno u tabeli.
7. Svaka testirana sorta raspoređuje se u grupu prema otpornosti („vrlo otporna”, „otporna”, „blago osjetljiva” ili „vrlo osjetljiva”), u skladu s rasponom ocjena u odgovarajućoj populaciji testiranih pojedinačnih krtola ili krompirovih okaca:
 - a) sorta se smatra „vrlo otpornom” ako sve krtole u svim ponavljanjima imaju ocjenu 1;
 - b) sorta se smatra „otpornom” ako sve krtole u svim ponavljanjima imaju ocjenu između 1 i 3;
 - c) sorta se smatra „blago osjetljivom” ako jedna ili više krtola imaju ocjenu 4 (ako samo jedna krtola ima ocjenu 4, test se može ponoviti kako bi se isključila nečistoća u partiji sorte);
 - d) sorta se smatra „vrlo osjetljivom” ako najmanje jedna krtola u jednom ponavljanju ima ocjenu 5

Tabela ocjena za populacije testiranih sorti

Standardna ocjena	Grupa prema otpornosti	Opis otpornosti	Opis
1	R1	vrlo otporna	Rana odbrambena nekroza; nema vidljivog stvaranja sorusa
2	R1	Otporna	Kasna odbrambena nekroza; stvaranje sorusa djelimično je vidljivo, sorusi nezreli ili nekrotični prije sazrijevanja
3	R2	Slabo otporna	Vrlo kasna odbrambena nekroza; razvili su se zasebni zreli sorusi ili nakupine sorusa, ali su potpuno okruženi nekrozom; dopušteno je do pet nenekrotičnih ljetnih sorusa, jasna nekroza u drugim djelovima iste krtole. Nisu se stvorili tumori ni trajne spore. Za donošenje odluke ocjeni 3 ili 4 može biti potrebna priprema tankih isječaka zaraženog tkiva: ako nema trajnih spora, ocjena je 3
4	S1	Blago osjetljiva	Raspršena zaraza; sorusi ili nakupine sorusa nisu nekrotični, malo ih je; kasna nekroza može biti prisutna na drugim mjestima zaraze na klici; klica može biti blago deformisana (zadebljana). Prisutni su zimske sporangije. Za donošenje odluke o ocjeni 3 ili 4 može biti potrebna priprema tankih isječaka zaraženog tkiva: ako su prisutne trajne spore, ocjena je 4
5	S2	Vrlo osjetljiva	Gusta polja zaraze, brojni nenekrotični sorusi i nakupine sorusa, nakupine sa gustim nenekrotičnim mjestima zaraze, preovlađujuća formacija tumora

UKIDANJE FITOSANITARNIH MJERA ISKORJENJIVANJA

1. Uslovi za ukidanje mjera

1.1. Nakon najmanje 50 godina od posljednje detekcije *Synchytrium endobioticum* (Schilbersky), ako kontinuirana evidencija proizvodnje na zaraženom području pokazuje da su se sve vrijeme sprovodile mjere iz člana 5 st. 3 i 4 ovog pravilnika i da se zaraženo područje nije koristilo kao trajni travnjak.

1.2. Nakon najmanje 20 godina od posljednje detekcije *Synchytrium endobioticum* (Schilbersky), ako kontinuirana evidencija proizvodnje pokazuje da su se sve vrijeme sprovodile mjere iz člana 5 st. 3 i 4 ovog pravilnika i da se zaraženo područje nije koristilo kao trajni travnjak; i:

- nijesu otkriveni znakovi zaraze sa dva biotesta iz tačke 3 ovog Priloga sa osjetljivim sortama krompira, ili
- nijesu otkriveni znakovi zaraze jednim biotestom iz tačke 3 ovog Priloga sa osjetljivim sortama krompira i tokom direktnog pregleda zemlje iz zaraženog područja mikroskopom nakon ekstrakcije spora jednom od metoda iz Priloga 1 tačka 2 ovog pravilnika, nijesu pronađene vitalne trajne spore.

Postupak za uzimanje zemlje za testiranje uključuje sljedeće korake:

- zaraženo područje dijeli se na djelove od 0,33 ha,
- iz svakog dijela uzima se 60 poduzoraka na dubini od 20 cm, koji se ravnomjerno raspoređuju po cijelom području ili objedinjuju zavisno od poznatih žarišta,
- poduzorci se temeljno miješaju kako bi se dobila 3 uzorka po hektaru.

2. Djelimično ukidanje mjera

Nakon najmanje deset godina od posljednje detekcije *Synchytrium endobioticum* (Schilbersky) na zaraženom području može se razmotriti djelimično ukidanje mjera iz člana 5 za to područje ako kontinuirana evidencija proizvodnje na zaraženom području pokazuje da su se sve vrijeme sprovodile mjere iz st. 3 i 4 člana 5 i da se zaraženo područje nije koristilo kao trajni travnjak i ako:

- a) nisu otkriveni znakovi zaraze sa dva biotesta iz tačke 3 ovog Priloga sa osjetljivim sortama krompira, ili
- b) nisu otkriveni znakovi zaraze jednim biotestom iz tačke 3 ovog Priloga sa osjetljivim sortama krompira i tokom direktnog pregleda zemlje iz zaraženog područja mikroskopom nakon ekstrakcije spora jednom od metoda iz Priloga 1 tačka 2 ovog pravilnika, pronađeno je manje od pet vitalnih trajnih spora po gramu zemlje.

Postupak za uzimanje zemlje za testiranje uključuje sledeće korake:

- zaraženo područje dijeli se na djelove od 0,33 ha,
- iz svakog dijela uzima se 60 poduzoraka na dubini od 20 cm, koji se ravnomjerno raspoređuju po cijelom području ili objedinjuju zavisno od poznatih žarišta,
- poduzorci se temeljno miješaju kako bi se dobila tri uzorka po hektaru.

Ako ti uslovi nisu ispunjeni, djelimično ukidanje mjera može se ponovo razmotriti nakon najmanje dvije godine. Pri određivanju dužine perioda čekanja uzima se u obzir nivo zaraze i/ili broj otkrivenih vitalnih spora.

3. Biotestovi za ukidanje mjera

Nekoliko krtola se inkubira u posudama sa najmanje 5 l zemlje u uslovima temperature, vlage i svjetlosti koji pogoduju rastu krompira. Upotrebljava se sorta koja je vrlo osjetljiva na sve patotipove (kao što su Deodara, Evora, Morene, Tomensa, Maritiema, Arran Chief).

Biljke krompira koje rastu režu se kad dostignu visinu od otprilike 60 cm. Nakon otprilike 100 dana provjerava se jesu li se na formiranim krtolama pojavili tumori.

Testiranje mora da obuhvati negativne kontrole zemlje koja nije zaražena *Synchytrium endobioticum* (Schilbersky) i pozitivne kontrole zaražene zemlje. Test se smatra validnim ako se na krtolama pozitivne kontrole formiraju tumori i ako se na krtolama negativne kontrole ne formiraju. Vodi se evidencija o temperaturi i vlažnosti u stakleniku. Mikroskopski se ispituje da li tumori nastali na testiranim uzorcima sadrže ljetnje sporangije i/ili trajne spore.

Testiranje se sprovodi u uslovima u kojima je spriječeno dalje širenje *Synchytrium endobioticum* (Schilbersky).