

EK I
BÖLÜM I

**Bu Yönetmeliğin 5 (1) maddesinde yer alan
Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi *et al.*'ın konukçusu olan bitkilerin listesi**

<i>Solanum tuberosum</i> L.'un tohum hariç bitkileri, yumrular dâhil	Patates
<i>Lycopersicon lycopersicum</i> (L.) Karsten ex Farw.'un tohum ve meyve hariç bitkileri	Domates

BÖLÜM II
Sürveysler

1. Bu Yönetmeliğin 5 (3) maddesinin (a) bendinde yer alan sürveysler planlanırken organizmanın biyolojisi ve üretim sistemleri temel alınır. Bu sürveyslerin esasları aşağıda belirtilmiştir:
 - (i) Patates için,
 - vejetasyon dönemi boyunca, uygun zamanlarda, yeşil aksamda gözle muayene ve/veya vejetasyon dönemi içinde tarlada veya depoda hem tohumluk hem de diğer patateslerde örnekleme yapılır. Bu örnekleri oluşturan yumruların kesilerek gözle muayeneleri yapılır, ve
 - tohumluk patateslerin ve eğer koşullar uygunsa diğer patateslerin, *EK II*' de yer alan metotlar kullanılarak laboratuvar testleri yapılır,
 - (ii) Domates için,
 - fidelikler gibi, özellikle ticari kullanım amacıyla yeniden dikilmek üzere domates bitkilerinin yetiştirildiği alanlarda, uygun zamanlarda bitkilerin gözle muayeneleri yapılır.
2. Bu Yönetmeliğin 6 (1) maddesinde yer alan sürveyslerin Bakanlığa bildiriminde şu bilgiler yer almalıdır:
 - (i) Patates sürveyinde,
 - tohumluk patatesler ve diğer patateslerin tahmini olarak toplam üretim alanı,
 - tohumluğun kademesi, kullanım amacı ve yetiştirme alanı,
 - laboratuvar analizi için alınan örneklerin sayısı ve örnek alma zamanı,
 - tarlada yapılan gözle muayenelerin sayısı,
 - yumrulardaki gözle muayenelerin sayısı ve örneğin büyüklüğü;
 - (ii) Fidelikler gibi, özellikle ticari kullanım amacıyla yeniden dikilmek üzere domates bitkilerinin yetiştirildiği alanlarda yürütülen sürveyslerde,
 - bitkilerin tahmini olarak toplam sayısı,
 - gözle muayenelerin sayısı;
 - (iii) Yabani *Solanaceae*'ler de dâhil olmak üzere, patates ve domates haricindeki diğer konukçu bitkilerde yürütülen sürveyslerde,
 - türler
 - örnek alma zamanı ve sayısı,
 - örnekleme yapılan alan /akarsu,
 - analiz metodu;
 - (iv) Endüstriyel işleme veya paketlenme binalarından boşaltılan sıvı atıklar ve yüzey suyu için yürütülen sürveyslerde,
 - örnek alma zamanı ve sayısı,
 - örnekleme yapılan alan/akarsu/ binaların yeri,
 - analiz metodu.

EK II**RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL.'İN
TEŞHİS, TESPİT VE TANISI İÇİN TEST ŞEMASI****Test Şemasının Kapsamı**

- (i) Patates yumrularında kahverengi çürüklük ve patates, domates ve diğer bazı konukçu bitkilerde bakteriyel solgunluk hastalığının teşhisi;
- (ii) Patates yumruları, patates, domates ve diğer konukçu bitkiler ile su ve toprak örneklerinde *Ralstonia solanacearum*'un tespiti;
- (iii) *Ralstonia solanacearum*'un tanısı.

İÇİNDEKİLER**Genel ilkeler****BÖLÜM I:** Test şemasının uygulanması

1. Kahverengi çürüklük veya bakteriyel solgunluk belirtilerini taşıyan patates yumruları, patates, domates veya diğer konukçu bitkilerde kahverengi çürüklük ve bakteriyel solgunluğun (*R. solanacearum*) teşhisi için tespit şeması
2. Belirti göstermeyen patates yumru örneklerinde *R. solanacearum*'un tespit ve tanısı için şema
3. Belirti göstermeyen patates, domates veya diğer konukçu bitki örneklerinde *R. solanacearum*'un tespiti ve tanısı için şema

BÖLÜM II: Kahverengi çürüklük veya bakteriyel solgunluk belirtilerini taşıyan patates yumruları, patates, domates veya diğer konukçu bitkilerde *R. solanacearum*'un tespiti için ayrıntılı metotlar

1. Belirtiler
2. Hızlı tarama testleri
3. İzolasyon prosedürü
4. *R. solanacearum*'un tanısı için testler

BÖLÜM III: 1. Belirti göstermeyen patates yumru örneklerinde *R. solanacearum*'un tespit ve tanısı için ayrıntılı metotlar

- 1.1. Örnek hazırlama
- 1.2. Testleme
2. Belirti göstermeyen patates, domates veya diğer konukçu bitki örneklerinde *R. solanacearum*'un tespit ve tanısı için ayrıntılı metotlar
- 2.1. Örnek hazırlama
- 2.2. Testleme

BÖLÜM IV: 1. Yüzey suyundan ve patatesin işlenmesinde kullanılan veya patates işleme tesislerinden boşaltılan atık sulardan *R. solanacearum*'un tespiti ve tanısı için şema

2. Yüzey suyundan ve patatesin işlenmesinde kullanılan veya patates işleme tesislerinden boşaltılan atık sulardan *R. solanacearum*'un tespiti ve tanısı için metotlar

- 2.1. Örnek hazırlama
 - 2.2. Testleme
- BÖLÜM V:**
1. Toprakta *R. solanacearum*'un tespiti için şema
 2. Toprakta *R. solanacearum*'un tespiti için yöntemler
 - 2.1. Örnek hazırlama
 - 2.2. Testleme
- BÖLÜM VI:**
1. *R. solanacearum*'un tespiti için standart protokoller
 - A. Tanı testleri
 1. İletim demetlerinden bakteriyel akıntı testi
 2. Poly- β -hidroksibütirat granüllerinin tespiti
 3. Agglütinasyon testi
 4. Seçici izolasyon
 - 4.1. Seçici ortama ekim
 - 4.2. Zenginleştirme işlemi
 5. Immunofluorescence testi (IF testi)
 6. Polimeraz zincir reaksiyon testi (PCR testi)
 - 6.1. DNA saflaştırma yöntemleri
 - (a) Pstrik yöntemi (2000)
 - (b) Diğer yöntemler
 - 6.2. PCR
 - 6.3. PCR ürününün analizi
 7. Floresan in-situ hibridizasyon testi (FISH testi)
 8. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) testi
 - (a) İndirek ELISA
 - (b) DASİ (Double-Antibody Sandwich Indirect) ELISA
 9. Bioassay testi
 - B. Tanı testleri
 1. Biyokimyasal testler
 2. IF testi
 3. ELISA testi
 4. PCR testi
 5. FISH testi
 6. Yağ asidi profili (FAP)
 7. Strain karakterizasyon yöntemleri
 - 7.1. Biovar tespiti
 - 7.2. Genomik parmak izi

7.3. PCR metotları

C Doğrulama testleri

- İlave 1* Protokollerin optimizasyonuna katılan laboratuvarlar
- İlave 2* *R.solanacearum*'un izolasyonu ve kültürü için besi ortamları
- İlave 3* (A) Ticari olarak satılan standardize edilmiş kontrol materyali
(B) Kontrollerin hazırlanması
- İlave 4* Tampon çözeltiler
- İlave 5* IF ve FISH testlerindeki bulaşma seviyelerinin tespiti
- İlave 6* Onaylanmış PCR protokol ve kimyasalları
- İlave 7* FISH testi için onaylı kimyasallar
- İlave 8* Domates ve patlıcan için yetiştirme koşulları
- Kaynaklar

GENEL İLKELER

Optimize edilmiş metotlar, onaylanmış kimyasallar, testlerin yapılması için gereken ayrıntılar ve kontrol materyalleri eklerde verilmiştir. Protokollerin optimizasyonu ve onaylanmasında çalışan laboratuvarların listesi *İlave 1*'de yer almaktadır.

R.solanacearum karantinaya tabi bir organizma olduğundan ve kontrol materyali olarak bu bakterinin canlı kültürleri kullanılacağından, bu bakteriyle yapılacak çalışmaların uygun atık boşaltım sistemine sahip ve karantina koşullarının yerine getirildiği yerlerde yapılması gerekmektedir.

Pozitif kontrollerle çalışılması gerekmektedir.

Çalışmalarda kullanılan ekipmanın kalibrasyonu, kimyasalların dikkatli bir şekilde işlenmesi ve muhafazası, örnekler arasında bulaşmanın engellenmesi gereklidir.

Bu Yönetmeliğin 8 (1) maddesinde sözü edilen şüpheli durumda, teşhis veya hızlı tarama testleri kullanılarak bir pozitif sonuç elde edilmesi zorunludur. İlk yapılan ve pozitif olan tarama testinin (IF, PCR/FISH, seçici besi yerine ekim) sonucu, farklı biyolojik temele dayanan ikinci bir tarama testi ile teyit edilmelidir.

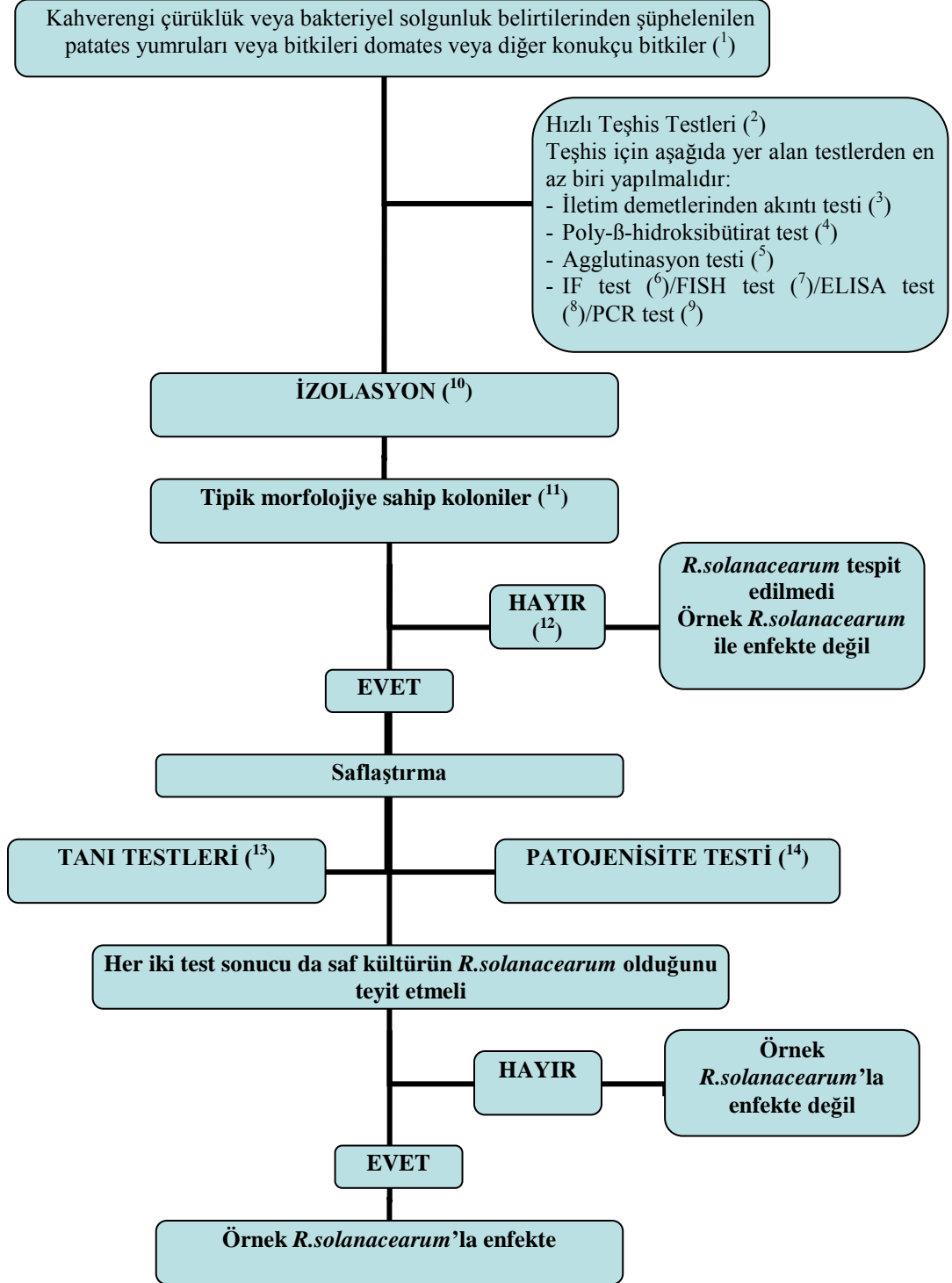
Eğer ilk yapılan tarama testi pozitifse, *R.solanacearum*'la bulaşmadan şüpheleniliyorsa, ikinci tarama testi yapılmalıdır. Eğer ikinci tarama testi de pozitifse bu şüphe doğrulanmış olacaktır ve diğer testlerde tamamlanmalıdır. Eğer ikinci tarama testi negatifse, örneğin *R.solanacearum*'la bulaşık olmadığına karar verilir.

Bu Yönetmeliğin 10 (1) maddesinde sözü edilen organizmanın varlığının doğrulanması için mutlaka izolasyon ve patojenisite testi ile birlikte *R.solanacearum*'un saf kültürünün tanısı gerekmektedir.

BÖLÜM I

TEST ŞEMASININ UYGULANMASI

1. Kahverengi çürüklük veya bakteriyel solgunluk belirtilerini taşıyan patates yumruları, patates, domates veya diğer konukçu bitkilerde kahverengi çürüklük ve bakteriyel solgunluğun (*R. solanacearum*) teşhisi için tespit şeması.



Şemada verilen referanslar:

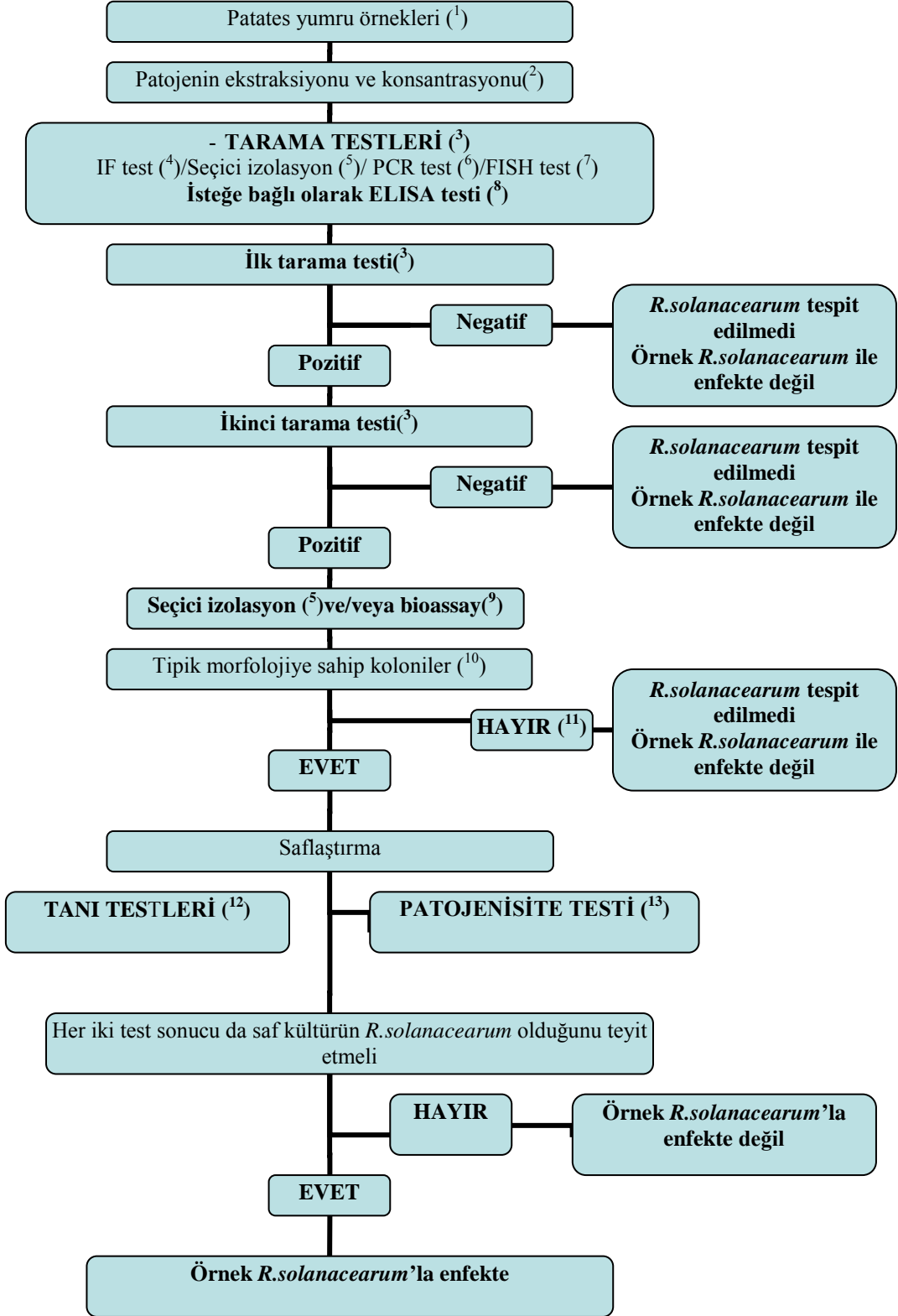
- (1) Bölüm II.1.de tarif edilen belirtiler
- (2) Hızlı tarama testleri olarak kullanılacak testler. Bu testlerin sonucunun negatif çıkması, örneğin organizmadan ari olduğu anlamına gelmez.
- (3) Bölüm IV.A.1.'de tarif edilen iletim demetlerinden bakteriyel akıntı testi,
- (4) Bölüm IV.A.2.'de tarif edilen bakteriyel hücrelerdeki poli-β-hidroksibütirat granülleri için test,
- (5) Bölüm IV.A.3.'de tarif edilen belirti gösteren doku ekstraktları veya su içinde süspanse edilmiş bakteriyel akıntıdan yapılan agglütinasyon testi
- (6) Bölüm IV.A.5.'de tarif edilen belirti gösteren doku ekstraktları veya su içinde süspanse edilmiş bakteriyel akıntıdan yapılan IF testi
- (7) Bölüm IV.A.7.'de tarif edilen belirti gösteren doku ekstraktları veya su içinde süspanse edilmiş bakteriyel akıntıdan yapılan FISH testi
- (8) Bölüm IV.A.8.'de tarif edilen belirti gösteren doku ekstraktları veya su içinde süspanse edilmiş bakteriyel akıntıdan yapılan ELISA testi
- (9) Bölüm IV.A.6.'da tarif edilen belirti gösteren doku ekstraktları veya su içinde süspanse edilmiş bakteriyel akıntıdan yapılan PCR testi
- (10) Seyreltme serilerinden yapılan ekimle belirti gösteren bitkilerden organizma kolaylıkla izole edilir (Bölüm II.3).
- (11) Tipik koloni morfolojisi Bölüm II.3.d'de tarif edilmiştir.
- (12) Saprofit bakterilerin hızla gelişmesi ve rekabetten dolayı, enfeksiyonun ileri devrelerinde bitki materyalinden yapılan izolasyonda başarısız olunabilir. Eğer hastalık belirtileri tipik ancak izolasyon sonucu negatifse, izolasyon tercihen seçici besi ortamı testi kullanılarak tekrarlanmalıdır.
- (13) *R.solanacearum*'un saf kültürlerinin, Bölüm VI.B'de verilen testler kullanılarak güvenilir bir şekilde tanısı yapılmalıdır. Alt tür karakterizasyonu isteğe bağlıdır. Ancak her yeni bulaşmada yapılması tavsiye edilir.
- (14) Patojenisite testi Bölüm VI.C'de tarif edilmiştir.

2. Belirti göstermeyen patates yumru örneklerinde *R. solanacearum*'un tespit ve tanısı için şema

Prensip:

Bu test prosedürü ile patates yumrularındaki latent enfeksiyonların tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Farklı biyolojik temele dayanan en az iki tarama testinin pozitif sonucu, patojenin izolasyonu ile tamamlanmalıdır. Bunu takiben elde edilen saf kültürün *R.solanacearum* olarak tanısı yapılmalıdır. Sadece bir tarama testinin sonucunun pozitif çıkması örneğin şüpheli olduğunu düşünmemiz için yeterli değildir.

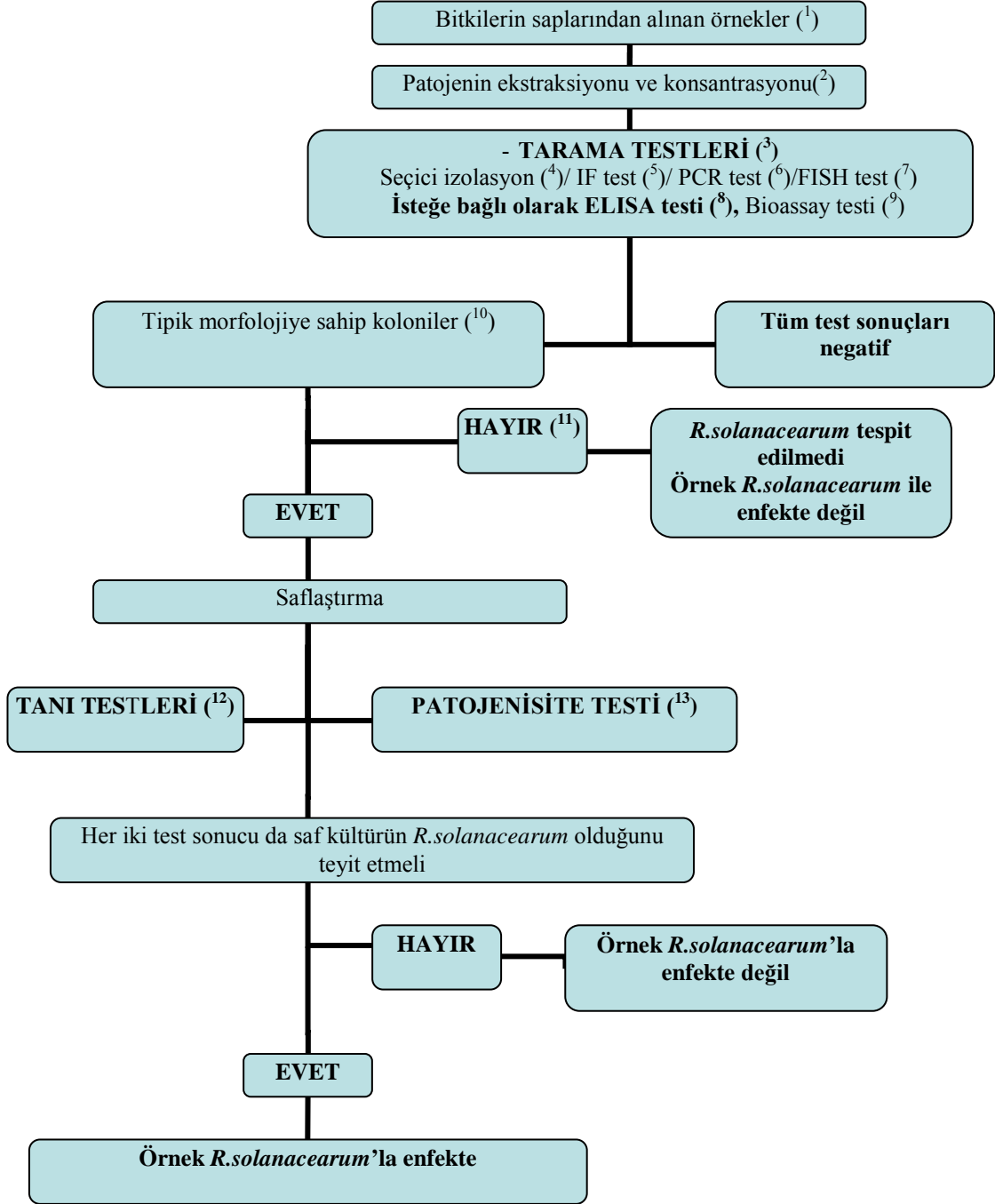
Tarama ve izolasyon testleri, yeniden süspanse edilmiş peletin mililitresindeki 10^3 - 10^4 bakteri hücrelerini tespit edebilmelidir. Testlerin her birinde aynı konsantrasyondaki pozitif kontrollerde kullanılmalıdır.



Şemada yer alan referanslar:

- (1) Standart örnek büyüklüğü 200 yumrudur. Eğer 200 yumru temin edilemiyorsa daha az örnekle de test yapılabilir.
- (2) Patojenin ekstraksiyon ve konsantrasyon metotları Bölüm III.1.1.'de verilmiştir.
- (3) Eğer farklı biyolojik prensibe dayanan en az iki test sonucu pozitif ise, izolasyon ve bunun sonucunda elde edilen bakterinin *R.solanacearum* olduğu teyit edilmek zorundadır. En az bir tarama testi gerçekleştirilmelidir. Bu test negatif sonuç vermişse, örneğin negatif olduğu düşünülür. Eğer bu testin sonucu pozitifse, farklı biyolojik temele dayanan mutlaka ikinci bir tarama testi veya daha fazla sayıda tarama testleri yapılmalı ve bu şekilde birinci testten alınan pozitif sonuç doğrulanmalıdır. Eğer ikinci test sonucu ve diğer testlerin sonucu negatifse, örneğin negatif olduğu düşünülür. Daha ileri testleri yapmak gereksizdir.
- (4) IF testi Bölüm VI.A.5'de tarif edilmiştir.
- (5) Seçici izolasyon testi Bölüm VI.A.4'de tarif edilmiştir.
- (6) PCR testi Bölüm VI.A.6'da tarif edilmiştir.
- (7) FISH testi Bölüm VI.A.7'de tarif edilmiştir.
- (8) ELISA testi Bölüm VI.A.8'de tarif edilmiştir.
- (9) Bioassay testi Bölüm VI.A.9'da tarif edilmiştir.
- (10) Tipik koloni morfolojisi Bölüm II.3.d.'de tarif edilmiştir.
- (11) Kültüre alma ve bioassay testlerinin sonuçları, saprofit bakterilerin engellemesi ve rekabetten dolayı başarısız olabilir. Eğer tarama testlerinin sonucunda kesin bir pozitif sonuç elde edilmişse, fakat izolasyon sonucu negatifse, aynı pelet veya aynı örneğin kesilen yumrularının göbek (heel-end-yumrunun stolana bağlandığı nokta) bölümüne yakın iletim demetlerinden alınan parçalardan izolasyon tekrar edilmelidir. Eğer gerekliyse ilave örneklerde test edilebilir.
- (12) *R.solanacearum*'un saf kültürlerinin, Bölüm VI.B'de verilen testler kullanılarak güvenilir bir şekilde tanısı yapılmalıdır.
- (13) Patojenisite testi Bölüm VI.C'de tarif edilmiştir.

3. Belirti göstermeyen patates, domates veya diğer konukçu bitki örneklerinde *R.solanacearum*'un tespiti ve tanısı için şema



Şemada yer alan referanslar:

- (1) Tavsiye edilen örnek büyüklüğü için Bölüm III.2.1.' e bakınız.
- (2) Patojenin ekstraksiyon ve konsantrasyon metotları Bölüm III.2.1.'de verilmiştir.
- (3) Eğer farklı biyolojik prensibe dayanan en az iki test sonucu pozitif ise, izolasyon ve bunun sonucunda elde edilen bakterinin *R.solanacearum* olduğu teyit edilmek zorundadır. En az bir tarama testi gerçekleştirilmelidir. Bu test negatif sonuç vermişse, örneğin negatif olduğu düşünülür. Eğer bu testin sonucu pozitifse, farklı biyolojik temele dayanan mutlaka ikinci bir tarama testi veya daha fazla sayıda tarama testleri yapılmalı ve bu şekilde birinci testten alınan pozitif sonuç doğrulanmalıdır. Eğer ikinci test sonucu ve diğer testlerin sonucu negatifse, örneğin negatif olduğu düşünülür. Daha ileri testleri yapmak gereksizdir.
- (4) Seçici izolasyon testi Bölüm VI.A.4'de tarif edilmiştir.
- (5) IF testi Bölüm VI.A.5'de tarif edilmiştir
- (6) PCR testi Bölüm VI.A.6'da tarif edilmiştir.
- (7) FISH testi Bölüm VI.A.7'de tarif edilmiştir.
- (8) ELISA testi Bölüm VI.A.8'de tarif edilmiştir.
- (9) Bioassay testi Bölüm VI.A.9'da tarif edilmiştir.
- (10) Tipik koloni morfolojisi Bölüm II.3.d.'de tarif edilmiştir.
- (11) Kültüre alma ve bioassay testlerinin sonuçları, saprofit bakterilerin engellemesi ve rekabetten dolayı başarısız olabilir. Eğer tarama testlerinin sonucunda kesin bir pozitif sonuç elde edilmişse, fakat izolasyon sonucu negatifse, izolasyon tekrar edilmelidir.
- (12) *R.solanacearum*'un saf kültürlerinin, Bölüm VI.B'de verilen testler kullanılarak güvenilir bir şekilde tanısı yapılmalıdır.
- (13) Patojenite testi Bölüm VI.C'de tarif edilmiştir.

BÖLÜM II

KAHVERENGİ ÇÜRÜKLÜK VEYA BAKTERİYEL SOLGUNLUK BELİRTİLERİNİ TAŞIYAN PATATES YUMRULARI, PATATES, DOMATES VEYA DİĞER KONUKÇU BİTKİLERDE *R. SOLANACEARUM*'UN TESPİTİ İÇİN AYRINTILI METOTLAR

1. Belirtiler

1.1 Patatesteki belirtiler

Patates bitkisi: Enfeksiyonun erken döneminde, gün içerisindeki yüksek sıcaklıklarda bitkinin tepe yapraklarında bir solgunluk oluşur. Ancak bu solgunluk geceleri düzelir. Solgunluğun ilk dönemlerinde yapraklar yeşil kalır, daha sonra yapraklarda sararma ve kahverengi nekrozlar görülür. Epinasti oluşur. Solgunluk hızla geri dönüşümsüz bir hal alır ve bitkinin ölümüne yol açar. Bu tip bitkiler enine kesildiğinde iletim dokusunun kahverengi renkte olduğu görülür ve kesilen yüzeyden kendiliğinden veya sıkılınca sütümsü bir akıntı (ooze) çıkar. Kesilen sap su içerisine dikey olarak yerleştirildiğinde, bakteri iplikçiklerinin iletim demetlerinden suyun içine aktığı görülür.

Patates yumrusu: Patates yumruları göbek (heel-end-yumrunun stolana bağlandığı nokta) bölümüne yakın kısımlarından enine ya da stolon ucundan uzunlamasına kesilmelidir. Enfeksiyonun erken devresinde iletim demeti halkasında saman sarısı açık kahverengi renk değişikliği vardır. Yumru kesildikten birkaç dakika sonra kendiliğinden iletim demetlerinden açık krem rengi sütümsü bir bakteriyel akıntı (ooze) çıkar. Daha sonra iletim demetlerindeki renk değişikliği koyu kahverengiye döner ve nekroz, parankimatik dokuya doğru yayılır. İleri devrelerde enfeksiyon yumrunun göbek kısmı ve gözlerinden dışarıya doğru yayılır. Göbek kısmı ve gözlerden çıkan bu bakteriyel akıntıya toprak parçaları yapışır. Yumrunun içindeki iletim dokusunun çökmesinden dolayı, kabukta kırmızımsı kahverengi, hafifçe çökük lezyonlar oluşabilir. Hastalığın daha sonraki dönemlerinde ikincil olarak gelişen bakteriyel ve fungal yumuşak çürüklükler yaygındır.

1.2 Domatesteki belirtiler

Domates bitkisi: İlk belirtiler en genç yapraklarda sarkık ve cansız oluşum şeklinde görülür. Patojen için uygun çevresel koşullar oluştuğunda (doymuş nemle birlikte 25 °C civarında toprak sıcaklığı), epinasti ve tek taraflı veya bitkinin tamamında oluşabilen solgunluk görülür. Bunu izleyen birkaç gün içerisinde bitkiler tamamen çöker. Daha az uygun olan koşullarda (toprak sıcaklığı 21 °C nin altında), solgunluk daha az görülür ancak bunun yanında sapın üzerinde çok fazla sayıda yan kök gelişebilir. İletim demetlerinde oluşan nekroz nedeniyle, sapın dip kısımlarında sulu görünüşlü çizgiler oluşması olasıdır. Sap çapraz kesildiğinde, iletim demetlerinin kahverengiye döndüğü görülür. Ayrıca beyaz veya sarımsı bakteriyel akıntı damlaları çıkar.

1.3 Diğer konukçulardaki belirtiler

Solanum dulcamara ve *S.nigrum* bitkileri: Doğal koşullarda, toprak sıcaklığı 25 °C'yi aşmadıkça ya da toprakta çok yüksek bir inokulum seviyesi olmadıkça (örneğin hastalıklı patates veya domates bitkilerine bitişik olan yetişen *S.nigrum*'da görüldüğü gibi) yabancı otlarda çok seyrek olarak solgunluk belirtileri görülür. Solgunluk oluşursa, belirtiler domateste tarif edildiği şekildedir. Suyun içinde yetişen solgunluk göstermeyen *S.dulcamara* bitkilerinin, su altındaki parçaları veya dibe yakın yerden sapları enlemesine kesildiğinde, iletim demeti dokularında açık kahverengi renk değişikliği oluştuğu görülebilir. Solgunluk belirtileri görülme bile, eğer kesilen sap dik olarak su içine yerleştirilirse, iletim demetlerinden suya doğru bakteriyel iplikçiklerin aktığı görülebilir.

2. Hızlı tarama testleri

Hızlı tarama testleri yönteme bağlı tanıyı kolaylaştırır. Aşağıdaki testlerden bir veya daha fazlası kullanılır:

2.1. İletim demetlerinden bakteriyel akıntı testi

Bölüm VI.A.1.'e bakınız.

2.2. Poli-β-hidroksibütirat granüllerinin tespiti:

Ralstonia solanacearum hücrelerindeki tipik PHB granülleri, enfekteli dokulardan alınan bakteriyel akıntının bir lam üzerine sürülmesi ve bunun ısı ile lama sabitlendikten sonra, Nile blue A veya Sudan Black ile boyanması sonucu görülebilmektedir (Bölüm VI.A.2'ye bakınız).

2.3. Agglütinasyon testi

Bölüm VI.A.3'e bakınız.

2.4. Diğer testler

Diğer hızlı tarama testleri IF testi (Bölüm VI.A.5.'e bakınız)), FISH testi (Bölüm VI.A.7'ye bakınız), ELISA testi (Bölüm VI.A.8'e bakınız) ve PCR testini (Bölüm VI.A.6.'ya bakınız) içermektedir.

3. İzolasyon prosedürü

(a) Patates yumrularındaki iletim demeti halkasından veya patates, domates veya solgunluk gösteren diğer konukçu bitkilerin saplarındaki iletim demetlerinden renk değiştirmiş doku parçaları veya bakteriyel akıntı alınır. Az bir miktar steril destile su veya 50 mM fosfat tamponu (*İlave 4*) içinde süspanse edilir. 5-10 dakika bekletilir.

(b) S spansiyondan onluk seyreltme serisi hazırlanır.

(c) Süspansiyon ve seyreltme serilerinin 50-100 µl'si genel besi ortamlarına (NA, YPGA veya SPA; *İlave 2*'ye bakınız) ve/veya Kelman'ın tetrazolium ortamına (*İlave 2*) ve/veya onaylanmış SMSA seçici ortamına ( rneęin SMSA; *İlave 2*'ye bakınız) ekilir. Uygun seyreltme serisi ekim tekniğiyle yayarak veya çizerek ekim yapılır. Eğer faydalı olacağı düşünülüyorsa, pozitif kontrol olarak *Ralstonia solanacearum*'un virulent Biovar 2/race 3 straininin sulandırılmış hücre süspansiyonu hazırlanır ve bu her ortam üzerine ayrı ayrı ekilir.

(d) Petriler 28  C' de 2-6 gün süreyle inkube edilir.

- Genel besi ortamları üzerinde *Ralstonia solanacearum*'un virulent izolatları, inci beyazı, düz, düzensiz ve akışkan koloniler şeklinde gelişir. *R.solanacearum*'un virülent olmayan (avirulent) formları ise, küçük, yuvarlak, akışkan olmayan, yağlımsı krem-beyaz renkli koloniler oluşturur.

- Kelman'ın tetrazolium ağarı ve SMSA besi ortamı üzerinde akışkan kan kırmızı merkezli koloniler oluşturur. *R. solanacearum*'un virülent olmayan formları küçük, yuvarlak, akışkan olmayan, yağlımsı koyu kırmızı renkli koloniler oluşturur.

4. *R.solanacearum* için tanı testleri

Bu testler Bölüm VI.B.'de verilmiştir.

BÖLÜM III

1. Belirti göstermeyen patates yumru örneklerinde *R. solanacearum*'un tespit ve tanısı için ayrıntılı metotlar

1.3. Örneğin hazırlanması

Not:

- Standart örnek büyüklüğü her test için 200 yumrudur. Daha yoğun örneklemede aynı sayıda yumruya sahip daha fazla sayıda örnekleme testler yapılır. Örnek büyüklüğünün 200 yumrudan daha fazla olması engellemeye yol açar veya sonuçların yorumlanmasını güçleştirir. Bununla beraber bu prosedür fazla sayıda yumrunun temin edilemediği yerlerde 200 yumrudan daha az miktarda da uygulanabilir.
- Aşağıda yer alan tespit metotları 200 yumruluk örnek büyüklüğü üzerinden yapılarak onaylanmıştır.
- Bu yöntemle elde edilen patates ekstraktı aynı zamanda *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*' un tespitinde de kullanılabilir.

Eğer faydalı olduğu düşünülüyorsa, isteğe bağlı olarak, test öncesi yapılabilecek işlemler:

- (a) Teste başlamadan önce örneklerin iki hafta kadar 25-30 °C' de inkube edilmesiyle, *R.solanacearum* popülasyonunun çoğalması teşvik edilir.
- (b) Yumruları yıkamak. Uygun deterjan ve dezenfektanlarla (PCR testi yapılacaksa patojenin DNA'sını yok etmek için klorinli bileşikler kullanılmalıdır) her bir örnek yıkanır. Yumrular kuruması için bırakılır. Yıkama, eğer örnekler yoğun olarak toprakla bulaşmışsa ve eğer PCR testi veya direk izolasyon yapılacaksa özellikle faydalıdır (fakat yine de yapılması isteğe bağlıdır).

- 1.1.1 Temiz ve steril bir bisturi veya sebze bıçağıyla yumrunun göbek (heel-end/yumrunun stolana bağlandığı nokta) kısmındaki kabuk kaldırılır, bu şekilde iletim demetleri görülebilir hale gelir. Dikkatlice göbekteki iletim demetlerinin bulunduğu dokudan koni şeklinde küçük bir parça çıkarılır (3-5 mm çapında). İletim demetlerine ait olmayan dokunun miktarı minimum tutulur. Örnekteki her bir yumru için işlem aynı şekilde tekrarlanır.

Not: Kahverengi çürüklük belirtisi gösteren yumrular (çürüyenlerde dâhil) ayrılır ve ayrıca test edilir.

Eğer şüpheli kahverengi çürüklük belirtisi gösteren göbek parçası çıkartıldıysa, bu yumruda mutlaka gözle muayene yapılmalı ve yumru göbeğe yakın yerden kesilmelidir. Şüpheli belirtiler gösteren herhangi bir kesik yumru mantarlaşmayı sağlamak amacıyla oda sıcaklığında en az iki gün süreyle tutulmalıdır. Daha sonra karantina koşulları altında buzdolabında (+ 4-10 °C'de) saklanmalıdır. Şüpheli belirtileri gösteren yumrular da dâhil olmak üzere tüm yumrular *EK III* de belirtildiği şekilde saklanmalıdır.

- 1.1.2. Tek kullanımlık kapaklı ve/veya mühürlü kapalı bir kap (kapların tekrar kullanılması durumunda tam olarak temizlendikten sonra klorinli bileşikler kullanılarak dezenfekte edilmelidir) içine göbek parçaları toplanır. Tercihen göbek parçaları hemen işleme alınır. Eğer bu mümkün değilse, oda sıcaklığında 24 saatten, + 4 °C' de ise 72 saatten fazla olmamak kaydıyla tampon çözelti ilave etmeksizin muhafaza edilebilir.

Aşağıdaki yöntemlerden biriyle göbek parçaları işlenir: ya,

- (a) Göbek parçalarının üstünü kapatacak kadar yeterli miktarda ekstraksiyon tampon çözeltisi (yaklaşık 40 ml) eklenir (*ilave 4*) ve 24 °C' den düşük sıcaklıklarda 4 saat süreyle, +4 °C' de ise 16-24 saat süreyle bir çalkalayıcıda (50-100 rpm) çalkalanır,

veya

- (b) Göbek parçaları yeterli miktarda (yaklaşık 40 ml) ekstraksiyon tampon çözeltisi (*İlave 4*) ilave edilerek, ya bir parçalayıcı (blender) yardımıyla (örneğin Waring Blender veya Ultra Thurrax) ya da mühürlü tek kullanımlık yumuşatma torbası (örneğin Stomacher veya Bioreba strong guage polythene, 150 mm x 250 mm; radyasyonla steril edilmiş) içinde kauçuk bir çekiç veya uygun bir ezme aparatı (örneğin Homex) kullanılarak homojenize edilir.

Not: Bir parçalayıcı kullanılarak örnekler homojenize edildiği zaman, örneklerde çapraz bulaşma riski yüksektir. Ekstraksiyon işlemi sırasında püskürme veya dökülmeden kaçınmak için önlemler alınmalıdır. Her bir örnek için yeni steril edilmiş parçalayıcı bıçakları ve gövdeleri kullanılmalıdır. Eğer PCR testi kullanılacaksa, kullanılan kaplar veya parçalama aparatlarının üzerinde DNA'nın taşınmasından kaçınılmalıdır. DNA bulaşmalarından kaçınmak için, tek kullanımlık torbalarda ezme işleminin yapılması ve tek kullanımlık tüplerin kullanımı PCR işleminin yapılacağı yerlerde tavsiye edilmektedir.

- 1.1.3. Üst sıvı boşaltılır. Eğer üst sıvı çok yoğun bir şekilde bulanıksa, ya yavaş hızda (+4-10 °C arasında bir sıcaklıkta 10 dakika süreyle 180 g den daha fazla olmayan rpm'de) santrifüj edilir ya da ekstraksiyon tampon çözeltisi ilave edilerek (yaklaşık 10 ml) filtreden (40-100 µm) vakum filtrasyon yöntemiyle yıkanarak berraklaştırılmalıdır.
- 1.1.4. 4-10 °C arasında bir sıcaklıkta 15 dakika süreyle 7 000 g de (veya 10 dakika süreyle 10.000 g de) santrifüj edilerek bakteriler çöktürülür ve dipteki pelet bozulmadan üst sıvı boşaltılır.
- 1.1.5. 1.5 ml pelet tamponuyla (*İlave 4*) tekrar süspansiyon edilir. Bu süspansiyonun 500 µl'si *R.solanacearum* için, 500 µl'si *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* için ve 500 µl'si ise referans olarak kullanılır. 500 µl'lik referans seriyeye ve test serilerinin kalanlarına son konsantrasyonları % 10 ila 25 (v/v) olacak şekilde steril gliserol ilave edilir, vortekslenir ve - 16 ila - 24 °C' de (haftalar) veya - 68 ila - 86 °C' de (aylarca) saklanır. Testleme işlemi devam ederken bu seriler +4 ila 10 °C' de muhafaza edilmelidir.

Tekrar tekrar dondurma ve çözündürme işlemi tavsiye edilmemektedir.

Eğer doku ekstraktının bir yerden diğer yere nakledilmesi gerekiyorsa, 24 ila 48 saat içerisinde soğuk zinciri kırılmadan nakledildiğinden emin olunmalıdır.

- 1.1.6. Bulaşmayı engellemek için tüm *R.solanacearum* pozitif kontrolleri ve örneklerin ayrı ayrı muamele edilmesi zorunludur. Bu; IF lamlarında ve tüm testlerde uygulanır.

1.2. Testleme

İlgili eklerde yer alan testlere ve optimize edilmiş protokollerin tanımlarına ve akış şemasına bakınız:

Seçici izolasyon (Bölüm VI.A.4.'e bakınız)

IF testi (Bölüm VI.A.5'e bakınız)

PCR testi (Bölüm VI.A.6'ya bakınız)

FISH testi (Bölüm VI.A.7'ye bakınız)

ELISA testi (Bölüm VI.A.8'e bakınız)

Bioassay (Bölüm VI.A.9'a bakınız)

2. Belirti göstermeyen patates, domates veya diğer konukçu bitki örneklerinde *R.solanacearum*'un tespit ve tanısı için ayrıntılı metotlar

2.1. Örnek hazırlığı

Not: *R.solanacearum* populasyonlarının latent enfeksiyonlarını tespit etmek için örneklerin birleştirilerek test edilmesi tavsiye edilmektedir. Burada yer alan metotla 200 sap parçasına kadar olan birleşik örneklerde rahatlıkla uygulanabilmektedir. Sürveylerin yürütüldüğü alanlarda inceleme altındaki bitki populasyonundan alınacak örnekler populasyonu istatistikî olarak temsil edecek sayıda olmalıdır.

2.1.1. Aşağıda yer alan örnekleme prosedürüne göre, 1-2 cm uzunluğundaki sap parçaları kapaklı steril bir kap içinde toplanır:

Domates fideliklerinde: Temiz dezenfekte edilmiş bir bıçak ile, her bir sapın hemen toprak üzerinde yer alan dip kısmından 1 cm'lik bir parça alınır.

Tarla veya serada yetiştirilen domates bitkileri: Temiz dezenfekte edilmiş bir bıçak ile, en altta bulunan yan sürgünün ana gövdeye bağlandığı en yakın noktadan 1 cm'lik bir parça alınır. Her bir yanda yer alan en alttaki sürgünler için bu işlem tekrarlanır.

Diğer konukçular: Temiz dezenfekte edilmiş bir bıçak veya makas ile, her bir sapın hemen toprak üzerinde yer alan dip kısmından 1 cm'lik bir parça alınır. Su içinde yetişen *S.dulcamara* ve diğer konukçu bitkiler söz konusu olduğunda, sucul köklü stolonlar veya su altındaki saplardan 1-2 cm'lik parçalar alınır.

Özel bir bölgede örnekleme yapıldığı zaman, potansiyel konukçu olan her bir yabancı ot için, her bir örnekleme noktasında yer alan en az 10 bitkinin test edilmesi tavsiye edilmektedir. Her ne kadar su kenarlarında daimi olarak yetişen *S.dulcamara* üzerinde tüm yıl boyunca doğal enfeksiyonlar tespit edilebilse de, ilkbahar sonları, yaz veya sonbahar mevsiminde patojenin tespiti yapılacak olursa en güvenilir sonuçlar alınmış olacaktır. Bilinen konukçuları kendi gelen patates bitkileri, *Solanum dulcamara*, *S.nigrum*, *Datura stramonium* ve Solanaceae familyasının diğer üyeleridir. Ayrıca *Pelargonium* spp. ve *Portulaca oleracea*'da konukçuları arasındadır. Özel bazı çevre koşullarında bazı Avrupa yabancı otlarının köklerinde ve/veya rizosferinde *R.solanacearum* biovar 2/Race 3'ün populasyonları kolonize olabilmektedir. Bunlar *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S.nutans*, *Tussilago farfara* and *Urtica dioica*'dır.

Not: İletim demetlerinde renk değişikliği ve bakteriyel akıntı gibi belirtiler için yapılan gözle muayeneler bu devrede yapılmalıdır. Belirti gösteren sap parçaları ayrılmalı ve bunlar ayrı olarak test edilmelidir (Bölüm II'ye bakınız).

2.1.2. Sap parçaları % 70'lik etil alkolle dezenfekte edilir ve hemen kurutma kağıdı arasında kurutulur. Sonra sapsar aşağıda yer alan prosedürlerden biriyle işleme tabi tutulur: ya,

(a) Sap parçalarının üstünü örtecek kadar ekstraksiyon tampon çözeltisi (yaklaşık 40 ml) eklenir (*İlave 4*) ve 24 °C' den düşük sıcaklıklarda 4 saat süreyle, +4 °C' de ise 16-24 saat süreyle bir çalkalayıcıda (50-100 rpm) çalkalanır,

veya

(b) Sap parçaları yeterli miktarda ekstraksiyon tampon çözeltisi (*İlave 4*) ilave edilerek, sağlam bir yumuşatma torbası (örneğin Stomacher veya Bioreba) içinde kauçuk bir çekici veya uygun bir ezme aparatı (örneğin Homex) kullanılarak hemen homojenize edilir. Eğer bu mümkün değilse, oda sıcaklığında 24 saatten, + 4 °C' de ise 72 saatten fazla olmamak kaydıyla muhafaza edilebilir.

- 2.1.3. 15 dakika bekledikten sonra üst sıvı boşaltılır.
- 2.1.4. Doku ekstraktının berraklaştırılması ya da bakterilerin çökeltilmesine genellikle ihtiyaç duyulmamaktadır ancak eğer gerekliyse Bölüm III.1.1.3.-1.1.5.'de açıklandığı şekilde filtrasyon veya santrifüj işlemleri yapılabilir.
- 2.1.5. Doku ekstraktı eşit iki miktarda bölünür. Yarıları testleme işlemi devam ederken +4 ila 10 °C' de muhafaza edilir, diğer yarısına ise, son konsantrasyonu % 10 ila 25 (v/v) olacak şekilde steril gliserol ilave edilir, vortekslenir ve ihtiyaç duyulabilecek diğer testlerde kullanılmak üzere - 16 ila - 24 °C' de (haftalar) veya - 68 ila - 86 °C' de (aylarca) saklanır.

2.2. Testleme

İlgili eklerde yer alan testlere ve optimize edilmiş protokollerin tanımlarına ve akış şemasına bakınız:

Seçici izolasyon (Bölüm VI.A.4.'e bakınız)

IF testi (Bölüm VI.A.5'e bakınız)

PCR testi (Bölüm VI.A.6'ya bakınız)

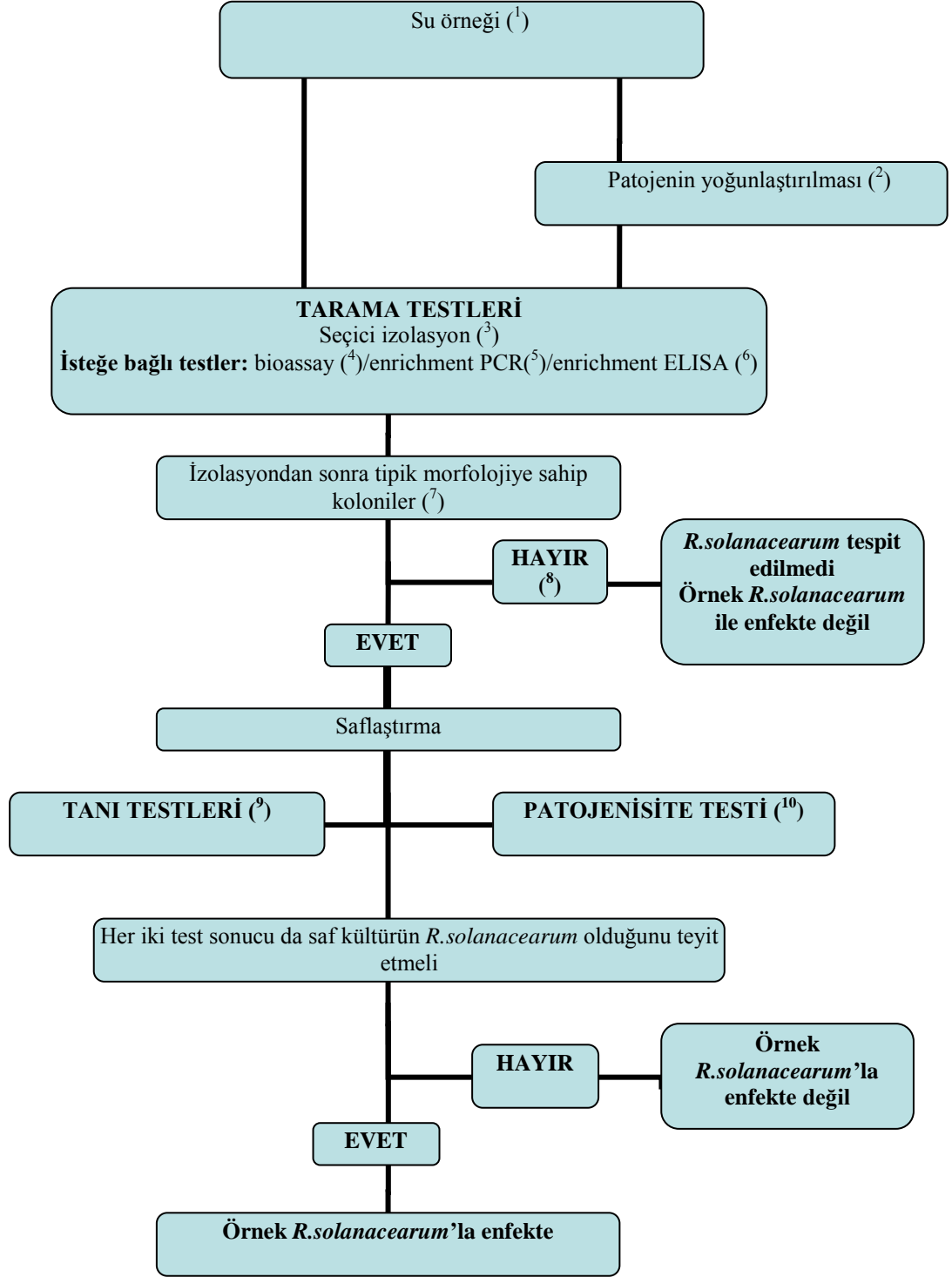
FISH testi (Bölüm VI.A.7'ye bakınız)

ELISA testi (Bölüm VI.A.8'e bakınız)

Bioassay (Bölüm VI.A.9'a bakınız)

BÖLÜM IV

1. Yüzey suyundan ve patatesin işlenmesinde kullanılan veya patates işleme tesislerinden boşaltılan atık sulardan *R. solanacearum*'un tespiti ve tanısı için şema



Şemada yer alan referanslar:

- (1) Tavsiye edilen örnekleme prosedürü için Bölüm IV.2.1.'e bakınız.
- (2) Patojenin yoğunlaştırma metotları Bölüm IV.2.1.'de verilmiştir. Yoğunlaştırma işlemi hem patojen hem de onunla rekabet eden bakterilerin popülasyonlarını artırdığından, izolasyon sonucunu etkilemeyeceği durumlarda ancak tavsiye edilebilir.
- (3) Seçici izolasyon testi Bölüm VI.A.4'de tarif edilmiştir.
- (4) Bioassay testi Bölüm VI.A.9'da tarif edilmiştir.
- (5) Zenginleştirme PCR testi Bölüm VI.A.4.2. ve Bölüm VI.A.6'da tarif edilmiştir.
- (6) Zenginleştirme ELISA testi Bölüm VI.A.4.2. ve Bölüm VI.A.8.'de tarif edilmiştir.
- (7) Tipik koloni morfolojisi Bölüm II.3.d.'de tarif edilmiştir.
- (8) Kültüre alma, saprofit bakterilerin engellemesi ve rekabetten dolayı başarısız olabilir. Eğer saprofitlerin çok yüksek miktarda olmasından dolayı izolasyonun başarısız olduğu düşünülüyorsa, steril su ile örnek seyreltikten sonra izolasyon tekrarlanmalıdır.
- (9) *R.solanacearum*'un saf kültürlerinin, Bölüm VI.B'de verilen testler kullanılarak güvenilir bir şekilde tanısı yapılmalıdır.
- (10) Patojenisite testi Bölüm VI.C'de tarif edilmiştir.

2. Yüzey suyu ve patatesin işlenmesinde kullanılan su veya patates işleme tesislerinden boşaltılan atık sularda *R. solanacearum*'un tespiti ve tanısı için metotlar

Prensip

Burada açıklanan metot ile yüzey suyunda bulunan patojen tespit edilebilir, aynı zamanda bu metot patatesin işlenmesinde kullanılan su veya patates işleme tesislerinden boşaltılan atık sularda patojenin tespiti için kullanılabilir. Bununla beraber patatesin işlenmesinde kullanılan su veya patates işleme tesislerinden boşaltılan atık sularda, yüzey suyuyla kıyaslandığında, patojenle rekabet eden saprofit bakterilerin sayısı daha fazladır. Saprofit bakteri popülasyonunun yüksek olması da izolasyonun hassasiyetini etkileyebilecektir. Hâlbuki aşağıda yer alan metot ile yüzey suyunun her bir litresinde bulunan 10^3 bakteri hücrenin tespit edilmesi hedeflenmektedir. Patatesin işlenmesinde kullanılan su veya patates işleme tesislerinden boşaltılan atık suların yapılacak tespitin hassasiyeti ise, bundan önemli ölçüde düşük olacaktır. Saprofit bakterilerin popülasyonunu azaltabilmek için, bu atık suların önce herhangi bir saflaştırma işlemine (örneğin çöktürme veya filtrasyon) tabi tutulması ve daha sonra test edilmesi tavsiye edilmektedir. Bu nedenle elde edilen negatif bir sonucun güvenilirliği değerlendirilirken, bu test metodunun hassasiyetini sınırlayan faktörler göz önünde bulundurulmalıdır.

2.1. Örneğin hazırlanması

Not:

- Yüzey suyundan *R. solanacearum*'u tespit etmek için su sıcaklığının $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'yi aştığı ilkbahar sonları, yaz ve sonbahar ayları en uygun zamandır ve en güvenilir sonuçlar bu dönemde yapılan analizler sonucunda alınmaktadır.
- Örnek almak için belirli noktalar tespit edilmelidir. Bu noktalardan yukarıda bahsedilen dönemler içinde farklı zamanlarda örnekler alınmalıdır. Bu şekilde iklimsel değişikliklerin etkisi minimuma indirilecek ve bu şekilde tespitin güvenilirliği de artmış olacaktır.
- Yoğun yağış alan dönemlerde su miktarı artacağından patojenin yoğunluğu düşebilecektir. O nedenle bu dönemlerde yapılacak örnekleme de olumsuz sonuç alınabilir. Değerlendirmeler yapılırken bu göz önünde bulundurulmalıdır.
- Eğer su kaynaklarının yakınlarında *R. solanacearum*'un konukçusu olan bitkiler varsa bunlara yakın olan noktalardan örnekler alınmalıdır.

2.1.1. Seçilen örnekleme noktalarında, kıyıda 2 m uzaklıkta ve suyun yaklaşık 30 cm altından tek kullanımlık steril tüpler veya şişeler kullanılarak örnekler alınmalıdır. Patates işlenmesinde kullanılan su ve işleme tesislerinden boşaltılan atık sulardan alınan örnekler ise, boşaltım noktasından alınmalıdır. Her bir örnekleme noktasından 500 ml'ye kadar örnek alınması tavsiye edilmektedir. Eğer daha küçük örneklerin alınması tercih edilirse, her bir örnekleme noktasının en az üç farklı yerinden alınmalıdır. Bu durumda her örnek en az 30 ml'lik iki tekerrürlü alt örnekten oluşmalıdır. Yoğun bir survey çalışması için, her 3 km'de bir en az üç örnekleme yapılması tavsiye edilmektedir.

2.1.2. Alınan örnekler soğuk ($+4-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) ve karanlık koşullarda 24 saat içerisinde laboratuara gönderilmelidir.

2.1.3. Eğer bakterinin çökeltmesine ihtiyaç duyuluyorsa aşağıdaki metotlardan biri kullanılmalıdır:

- (a) $+4-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 10 dakika süreyle 10 000 g'de 30-50 ml'lik alt örnekler santrifüj edilir. Üst sıvı boşaltılır ve pelet 1 ml pelet tampon çözeltisi (*İlave 4*) ile sulandırılır.

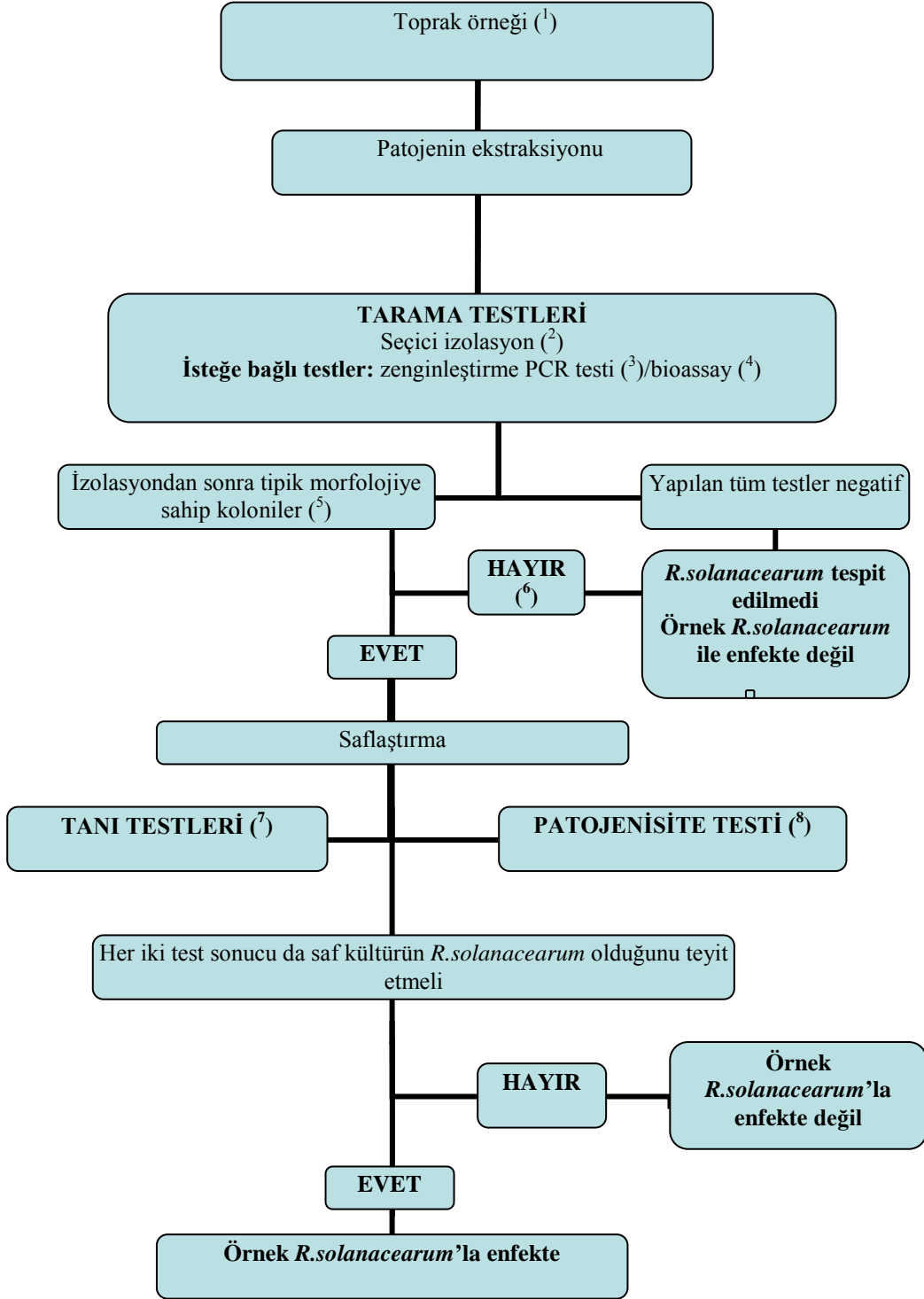
- (b) Delik çapı minimum 0,4µm olan membran filtreden girilir. Daha sonra bu membran filtrede kalanlar 5-10 ml pelet tampon çözeltisi kullanılarak yıkanır. Bu metot saprofit bakterilerin miktarının düşük olduğu daha büyük hacimli su örnekleri için kullanılır.

Yoğunlaştırma, patates işleminde kullanılan su ve işleme tesislerinden boşaltılan atık sulardan alınan örneklerde tavsiye edilmemektedir. Çünkü bu işlemlerle saprofitlerin popülasyonu da artmakta ve *R.solanacearum*'un tespiti engellenmektedir.

2.2 Testleme

İlgili eklerde yer alan testlere ve akış şemasına bakınız.

BÖLÜM V

1. Toprakтан *R. solanacearum*'un tespit ve tanısı için şema

Şemada yer alan referanslar:

- (1) Tavsiye edilen örnekleme prosedürü için Bölüm V.2.1.'e bakınız.
- (2) Seçici izolasyon testi Bölüm VI. A.4'de tarif edilmiştir.
- (3) Zenginleştirme PCR testi Bölüm VI. A.4.2. ve Bölüm VI. A.6'da tarif edilmiştir.
- (4) Bioassay testi Bölüm VI. A.9'da tarif edilmiştir.
- (5) Tipik koloni morfolojisi Bölüm II.3.d.'de tarif edilmiştir.
- (6) Kültüre alma, saprofit bakterilerin engellemesi ve rekabetten dolayı başarısız olabilir. Eğer saprofitlerin çok yüksek miktarda olmasından dolayı izolasyonun başarısız olduğu düşünülüyorsa, steril su ile örnek seyreltikten sonra izolasyon tekrarlanmalıdır.
- (7) *R.solanacearum*'un saf kültürlerinin, Bölüm VI. B'de verilen testler kullanılarak güvenilir bir şekilde tanısı yapılmalıdır.
- (8) Patojenisite testi Bölüm VI. C'de tarif edilmiştir.

2. Toprakta *R. solanacearum*'un tespit ve tanısı için metotlar

Prensip

Burada açıklanan metot ile toprak örneklerinde bulunan patojen tespit edilebilir, aynı zamanda bu metot patatesin işleme tesislerinden boşaltılan katı atıklardan da patojenin tespiti için kullanılabilir. Bununla beraber doğal olarak bulaşık materyal üzerinde *R. solanacearum* populasyonu az miktarda ve/veya düzensiz olarak dağılabilmektedir. Bu nedenle de tespitin hassasiyeti yeterli düzeyde olmamaktadır.

Bu test metodunun hassasiyetini sınırlayan faktörler, toprak ve katı atıklarda patojenin varlığını belirlemeye yönelik sürveylerde ve herhangi bir negatif sonuç alınması durumunda göz önünde bulundurulmalıdır. Toprakta patojenin var olup olmadığını tespit etmek için en güvenilir test, hassas bir konukçunun dikilmesi ve bunun üzerinde gözlemlerin yapılmasıdır. Bu metot ile düşük seviyelerdeki bulaşma bile tespit edilebilmektedir.

2.1. Örneğin hazırlanması

2.1.1. Toprakta yapılacak örnekleme için, her 3 da'lık alandaki farklı 60 noktadan toprağın 10–20 cm derinliğinden örnek alınır. Her bir toprak örneği 0,5-1 kg olmalıdır. Eğer patojenin var olduğundan şüpheleniliyorsa, örnekleme noktalarının sayısı artırılır ve 3 da için 120 noktadan örnek alınır. Örnekler 12–15 °C'de muhafaza edilmelidir. Patates işleme tesislerindeki katı atıklardan alınacak örnekler ise test edilecek toplam hacmi temsil edecek sayıdaki alandan toplam 1 kg olarak alınmalıdır. Testlemeden önce her bir örnek iyice karıştırılmalıdır.

2.1.2. Toprak veya katı atıkların 10–25 gr'lık alt örneklerini 6–150 ml ekstraksiyon tampon çözeltisi (*İlave 4*) içinde iki saate kadar çalkalanır (250 rpm). Eğer ihtiyaç duyulursa, % 0,02 steril Tween 20 ve 10–20 gr steril gravel ilave ederek toprak parçacıklarının birbirine yapışması engellenir.

2.1.3. Testleme sırasında süspansiyonları +4 °C'de muhafaza edilmelidir.

2.2. Testleme

İlgili eklerde yer alan testlere ve akış şemasına bakınız.

BÖLÜM VI

***R. SOLANACEARUM*'UN TESPİT VE TANISI İÇİN OPTİMİZE EDİLMİŞ STANDART PROTOKOLLER**

A. TEŞHİS VE TESPİT TESTLERİ

1. İletim demetlerinden bakteriyel akıntı testi

Solgunluk belirtisi gösteren patates, domates veya diğer konukçu bitkilerin saplarından *R.solanacearum* basit bir test metoduyla tespit edilebilir: Toprak seviyesinin hemen üzerinden sap kesilir. Temiz su dolu bir tüp içerisine kesik yüzey daldırılır. Birkaç dakika sonra iletim demetlerinden suya doğru akan bakteriyel akıntı görülebilecektir.

2. Poli-β-hidroksibütirat granüllerinin tespiti

1. Enfekteli dokudan çıkan bakteriyel akıntı direk olarak veya YPGA veya SPA (*İlave 2*) besi yerleri üzerinde 48 saat süreyle geliştirilmiş bir kültürden lam üzerine sürülür ve yayılır.
2. *R.solanacearum* Biovar 2 kullanılarak pozitif kontrol hazırlanır ve eğer faydalı olacağı düşünülüyorsa, PHB negatif olduğu bilinen bir türle negatif kontrol hazırlanır.
3. Kuruması için bırakılır. Sabitlemek için lamın alt yüzü birkaç kez hızlıca alevden geçirilir.
4. PHB granülleri Nile Blue veya Sudan Black ile aşağıda verilen metot ile boyanır ve mikroskopta gözlenir.

Nile Blue testi:

- (a) Nile Blue A'nın % 1' lik suda hazırlanmış solusyonuyla lam boyanır ve 55 °C de 10 dakika süreyle inkube edilir.
- (b) Boyama solusyonu boşaltılır. Akan su altında yavaşça kısa süre yıkanır. Bir kâğıt havluyla fazla su alınır.
- (c) % 8' lik suyla hazırlanmış asetik asitle lam boyanır. Oda sıcaklığında bir dakika süreyle inkube edilir.
- (d) Akan su altında yavaşça yıkanır. Bir kâğıt havluyla fazla su alınır.
- (e) Bir damla suyla tekrar nemlendirilir. Bir lamel kapatılır.
- (f) 600-1000' lik büyütmede immersion yağ altında 450 nm epifluorescence mikroskopta yağ veya su-immersion objektif kullanılarak lam incelenir.
- (g) PHB granülleri parlak portakal renkli fluorescence gösterir. *R. solanacearum*'un tipik hücre morfolojisi ve granüllerin hücreler içinde olup olmadığı da normal ışık mikroskobuyla ayrıca kontrol edilir.

Sudan Black testi:

- (a) % 70' lik etil alkolde hazırlanmış % 0.3' lük Sudan Black B solusyonu ile lam boyanır ve oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkube edilir.
- (b) Boyama solusyonu boşaltılır. Musluk suyuyla kısa süreyle yıkanır. Fazla su kâğıt havluyla alınır.
- (c) Lam kısa süreyle xylol içerisine daldırılır. Kâğıt havluyla kurulanır.
Dikkat! Xylol zararlı bir üründür. Çeker ocakta çalışınız.

- (d) Suyla hazırlanmış % 0.5 (w/v)' lik safraninle boyanır ve oda sıcaklığında 10 saniye süreyle inkube edilir.
Dikkat! Safranin zararlı bir üründür. Çeker ocakta çalışınız.
- (e) Akan musluk suyunda yavaşça yıkanır. Kâğıt havluyla kurulanır. Bir lamel kapatılır.
- (f) 1000' lik büyütmeyle immersion yağ kullanılarak ışık mikroskopuyla boyanan lam incelenir.
- (g) Hücre duvarları pembe boyanmış olan *R.solanacearum* hücreleri içinde PHB granülleri mavi-siyah boyanmış olarak görülecektir.

3. Agglütinasyon testi

Bakteriyel akıntı veya belirti gösteren doku özlerindeki *R.solanacearum* hücrelerinin agglütinasyonu, kırmızı *Staphylococcus aureus* hücreleri veya renkli latex partikülleri gibi işaretleyicilerle etiketlenmiş onaylı antibadiler (*İlave 3'e* bakınız) kullanılarak en iyi şekilde gözlenmektedir. Eğer ticari bir kit (*İlave 3'e* bakınız) kullanılacaksa, üretici firma tarafından verilen talimatlara uyulur. Aksi takdirde aşağıda yer alan metod uygulanır:

- (a) Pencereci lam üzerinde bakteriyel akıntı (yaklaşık her bir pencereye 5 µl) ve etiketlenmiş antibadi damlaları karıştırılır.
- (b) *R.solanacearum* biovar 2 süspansiyonu ve heterolog bir strain kullanılarak pozitif ve negatif kontroller hazırlanır.
- (c) 15 saniye süreyle hafifçe karıştırıldıktan sonra pozitif örneklerde oluşan agglütinasyon gözlenir.

4. Seçici izolasyon

4.1. Seçici ortama ekim

Not: Bu metot ilk kez uygulanacaksa, önceden metodun tespit sınırları ile ilgili bir ön deneme yapılır. Daha önceden test edilerek negatif olduğu belirlenmiş doku ekstraktlarının içine *R.solanacearum*'un 10^3 - 10^4 cfu/ml'si ilave edilir ve tespit sınırları belirlenmiş olur.

SMSA gibi onaylanmış bir seçici ortam kullanılır (Elphinstone *et al.* tarafından modifiye edilen, 1996, *İlave 2'ye* bakınız).

Ortamda gelişebilen diğer bakteriler nedeniyle *R.solanacearum*'u ayırt ederken dikkatli olunmalıdır. Eğer ortamda çok yoğun bir gelişme ve antagonist bakteriler var ise, *R.solanacearum* kolonileri tipik olmayan bir morfoloji sergileyebilirler. Besi yeri üzerinde diğer bakteriler tarafından *R.solanacearum*' un engellenebileceğinden şüphelenildiğinde, örnek farklı bir test kullanılarak yeniden testlenmelidir.

Taze olarak hazırlanan örnek doku ekstraktları kullanıldığında bu metot ile en yüksek hassasiyet sağlanmaktadır. Bununla beraber bu metot gliserol ile -68 ila -86 °C'de depolanmış doku ekstraktları için de uygulanabilir.

R.solanacearum'un virulent bir biovar 2 straininin (örneğin NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) 10^6 cfu/ml konsantrasyonluk bir süspansiyonundan seyreltme serisi hazırlanır. Herhangi bir bulaşma olasılığını ortadan kaldırmak için, pozitif kontroller test edilecek örneklerden tamamen ayrı bir şekilde hazırlanır.

Yeni hazırlanan her SMSA ortamı patojenin gelişip gelişmediğini kontrol etmek için kullanmadan önce test edilmelidir.

- 4.1.1. Saprofit bakterileri azaltmak için seyreltme serileri hazırlanır. Örnek doku ekstraktı ve her bir seyreltme serisinin 50-100 µl'si besi ortamına yayılır.
- 4.1.2. 28 °C de petrilere inkube edilir. 48 saat ve daha sonra 6 güne kadar günlük olarak petrilere bakılır. *R.solanacearum*'un tipik kolonileri SMSA ortamı üzerinde sütümsü-beyaz, düz, düzensiz ve akışkandır. Üç günlük inkubasyondan sonra bu kolonilerin merkezi pembeden kan kırmızı renge kadar döner.
- Not: *R.solanacearum*'un atipik kolonileri bazan bu ortam üzerinde oluşur. Bunlar küçük, yuvarlak, akışkan olmayan veya kısmen akışkan olan kırmızı renkli koloniler oluşturur. Bundan dolayı bunları saprofit bakterilerin kolonilerinden ayırmak güçtür.
- 4.1.3. Genel bir besi ortamı üzerine çizgi ekim veya seyreltme serisi ekim tekniği kullanılarak ekim yapılır ve bu şekilde şüpheli koloniler saflaştırılmış olur (*İlave 2*).
- 4.1.4. Kültürler oda sıcaklığında kısa süreli olarak steril su içinde (pH 6-8, klorsuz su) muhafaza edilmelidir. Uzun dönem saklama için ise soğuk zararına karşı koruyan uygun bir ortam içinde -68 ila -86 °C'ler arasında muhafaza edilmelidir. Liyofilize kültür olarak da saklanabilir.
- 4.1.5. Saf kültürlerin tanısı Bölüm VI.B'de yer alan testlere göre yapılmalıdır. Patojenisite testini Bölüm VI.C'de tarif edildiği gibi yapınız.

Seçici ortama ekim testinin sonuçlarının yorumlanması

Pozitif kontrolde *R.solanacearum*'un karakteristik kolonilerinin bulunması ve diğer bakteriler tarafından oluşturulan bir engellemeden şüphe edilmemesi durumunda; eğer bakteri kolonileri altı gün sonra görülüyorsa veya karakteristik *R.solanacearum* kolonileri izole edilmemişse seçici besi ortamına ekim testi negatiftir.

R.solanacearum' un karakteristik kolonileri izole edilmişse, seçici besi ortamına ekim testi pozitiftir.

4.2. Zenginleştirme işlemi

Modifiye edilmiş Wilbrink broth gibi bir zenginleştirme ortamı kullanılır (İlave 2'ye bakınız).

Bu işlem, örnek doku ekstraktı içindeki R.solanacearum popülasyonunu ve tespiti hassasiyetini artırmak için kullanılabilir. Bu işlemle PCR reaksiyonunun engelleyicileri seyreltilmekte ve etkisiz hale gelmektedir (1:100). Ancak bu zenginleştirme işlemi sırasında saprofit organizmalarda hedef organizma gibi popülasyonunu artırabileceğinden, bunların oluşturacağı rekabet ve engelleme nedeniyle, R.solanacearum'un zenginleştirme işlemi başarısızlıkla sonuçlanabilecektir. Bu sebeple, zenginleştirilmiş broth kültürlerinden R.solanacearum'un izolasyonu çok güç olabilir. Buna ilaveten serolojik olarak R.solanacearum ile akraba saprofitlerin de popülasyonu artabileceğinden, ELISA testinin kullanıldığı yerlerde poliklonal antibadilerden ziyade monoklonal olanların kullanılması tavsiye edilmektedir.

- 4.2.1. Zenginleştirilmiş-PCR için, DNA'dan arı tüpler veya erlenler içine 10 ml zenginleştirme brothu (*İlave 2*) koyulur ve daha sonra bunlara doku ekstraktı örneklerinin 100 µl'si ilave edilir. Zenginleştirilmiş-ELISA için, daha fazla miktarda doku ekstraktı örneği broth içine ilave edilir (örneğin; 1,0 ml broth içine 100 µl doku ekstraktı örneği).
- 4.2.2. Çalkalayarak 72 saat süreyle 27-30 °C'de inkube edilir ve havalanmayı sağlamak için tüplerin kapakları hafifçe gevşetilir.
- 4.2.3. ELISA veya PCR testinde kullanmadan önce iyice karıştırılır.

Not: Eğer herhangi bir şekilde saprofit bakterilerden kaynaklanan bir engelleme veya rekabet sonucunda bu işlemin başarısız olacağı düşünülüyorsa, örnek doku ekstraktları santrifüj veya diğer yoğunlaştırma işlemlerinden birine tabi tutulmadan, zenginleştirmenin yapılmasından daha iyi sonuçlar alınabilecektir.

5. Immunofluorescence test (IF testi)

Prensip

İstenilen eşik değerlere ulaşmadaki doğruluğu ispatlandığından, birinci tarama testi olarak IF testin kullanımı tavsiye edilmektedir.

IF testi birinci tarama testi olarak kullanılıp pozitif sonuç alındığında, izolasyon, PCR veya FISH ikinci tarama testi olarak yapılmalıdır. İkinci tarama testi olarak IF kullanıldığı ve IF testi sonucu pozitif sonuç alındığında analizi tamamlamak için akış şemasındaki diğer testleri yapmaya gerek vardır.

Not: *R.solanacearum* için onaylanmış antibadiler kullanılmalıdır (web sayfasına bakınız <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Her yeni antibadi açıldığında titrenin yeniden tespit edilmesi tavsiye edilmektedir. Titre, uygun fluorescein isothiocyanate (FITC) konjugat kullanımı ve *R.solanacearum*'un homolog bir strainin 10^5 - 10^6 hücre/ml'sini içeren bir süspansiyonun testlenmesiyle optimum reaksiyonun meydana geldiği en yüksek seyreltme olarak tanımlanmaktadır. Onaylı poliklonal antiserumların tamamı en az 1:2000 IF titresine sahiptir. Testleme sırasında antibadiler tam titrede veya çalışma seyreltmelerine yakın değerlerde kullanılmalıdır.

Test taze olarak hazırlanmış doku ekstraktı örnekleri ile gerçekleştirilmelidir. Eğer gerekirse, gliserol altında -68 ila -86 °C'de depolanmış doku ekstraktlarıyla da başarılı olarak yapılabilir. Gliserol, 1 ml pelet tampon çözeltinin (*İlave 4*) ilave edilip 7000 g'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmesi ve daha sonra tekrar 1 ml pelet tampon çözelti ilavesiyle örnekten uzaklaştırılabilir. Bu işlem eğer lamalar alevden geçirilerek sabitleniyorsa gerekli değildir.

İlave 3 B'de belirtildiği gibi patates doku ekstraktı içinde ve isteğe bağlı olarak tampon çözelti içinde süspanse edilmiş *R.solanacearum*'un homolog straini veya diğer bir referans straini kullanılarak pozitif kontrol lamaları ayrı olarak hazırlanmalıdır.

Doğal olarak enfekte olmuş doku ekstraktı (liyofilizasyon veya -16 ila -24 °C'de dondurulmuş) eğer mümkünse aynı lam üzerinde benzer kontrol olarak kullanılmalıdır.

Negatif kontrol olarak, daha önceden *R.solanacearum* yönünden negatif olduğu belirlenmiş doku ekstraktı örnekleri kullanılabilir.

Bu test ile birlikte kullanılacak standardize edilmiş pozitif ve negatif kontrol materyalleri *İlave 3*'de listelenmiştir.

En az 6 mm çapında tercihen 10 pencereci çok kuyulu mikroskop lamaları kullanılır.

5.1. Aşağıda yer alan test yöntemlerinden biri kullanılarak test lamaları hazırlanır:

(a) Nispeten daha az nişasta içeren peletler:

İlk pencereye 1/100'lük yeniden süspanse edilmiş patates peletinin uygun bir miktarı (6 mm çapındaki pencereler için 15 µl uygundur ancak daha geniş pencereler için bu miktar artırılabilir) pipetle konur. Daha sonra aynı sıra üzerindeki diğer pencerelere aynı miktarda seyreltilmemiş pelet (1/1) pipetle koyulur. İkinci sıra Şekil 1'de verildiği gibi ya aynı örnek için kullanılır ya da ikinci bir örnek bu sıraya yerleştirilir.

(b) Diğer peletler için:

Pelet tampon çözelti ile yeniden süspanse edilmiş peletin 1/10, 1/100 seyreltme serileri hazırlanır. Her bir seyreltme ve yeniden süspanse edilmiş peletin uygun bir miktarı (6 mm çapındaki pencereler için 15 µl uygundur ancak daha geniş pencereler için bu miktar artırılabilir) pencerelerin bir sırası üzerine pipetle koyulur. İkinci sıra Şekil 2’de verildiği gibi ya aynı örnek için kullanılır ya da ikinci bir örnek bu sıraya yerleştirilir.

- 5.2. Oda sıcaklığında veya 40–45 °C’de damlacıklar kurutulur. Bakteri hücreleri ısıtılarak (60 °C’de 15 dakika süreyle), alevden geçirilerek, % 95’lik etil alkolle ya da antibadilerin temin edildiği yerlerden verilen özel talimatlara göre lam üzerine sabitlenir.

Eğer gerekliyse, sabitlenen lamlar nemli olmayan kutular içerisinde dondurularak saklanabilir (maksimum 3 aya kadar).











- 5.3. IF prosedürü

- (a) 5.1 (a)’da hazırlanan test lamına göre:











Seyreltme serilerinin bir serisi hazırlanır. Birinci kuyuya titrenin ½’si (T/2), diğerlerine titrenin ¼’ü (T/4), titrenin ½’si (T/2), titre (T) ve titrenin iki katı yerleştirilir.

- (c) 5.1 (b)’de hazırlanan test lamına göre:

IF tamponu içinde antibadinin çalışma seyreltmesi hazırlanır. Çalışma seyreltmesi özgünlüğü etkiler.

		Yeniden süspanse edilmiş pelet seyreltmeleri				
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1
(T=titre)		T/2	T/4	T/2	T	2T
Örnek 1						
		1	2	3	4	5
Aynı örnek veya Örnek 2						
		6	7	8	9	10

Şekil 1. 5.1 (a) ve 5.3 (a)’ya göre test lamlarının hazırlanması

		Antiserum/antibadinin çalışma seyreltmesi				
		1/1	1/10	1/100	boş	boş
Örnek 1						
		1	2	3	4	5
Aynı örnek veya Örnek 2						
		6	7	8	9	10

Şekil 2. 5.1 (b) ve 5.3 (b)’ye göre test lamlarının hazırlanması

5.3.1. Nemli kâğıt havlu üzerine lamlar dizilir. Antibadi seyreltmeleri her bir test penceresini tamamen kapatacak şekilde mikropipet yardımıyla koyulur. Her bir pencereye koyulacak antibadinin miktarı, pencereye daha önceden koyulmuş olan doku ekstraktının miktarı kadar olmalıdır.

Daha sonra aşağıda yer alan prosedür uygulanır (Eğer antibadinin temin edildiği üretici firmanın özel bir talimatı yoksa):

5.3.2. Nemli kağıt üzerinde, üzeri kapalı olarak oda sıcaklığında (18-25 °C) 30 dakika süreyle lamlar inkube edilir.

5.3.3. İnkubasyon süresinin sonunda her bir lam üzerindeki damlalar silkelendir ve lamlar dikkatlice IF tampona daldırılır. IF tampon-Tween içinde 5 dakika süreyle yıkanır daha sonra IF tampon ile 5 dakika daha yıkanır (*İlave 4*). Lamlar üzerindeki fazla su kâğıt havluyla dikkatlice alınır.

5.3.4. Nemli kâğıt havlu üzerine lamlar dizilir. Titresi tespit edilmiş FITC konjugat seyreltmesi her bir test penceresini tamamen kapatacak şekilde mikropipet yardımıyla koyulur. Pencereye uygulanan konjugatın miktarı 5.3.1’de verilen antibadinin miktarıyla eşit olmalıdır.

5.3.5. Nemli kağıt üzerinde, üzeri kapalı olarak oda sıcaklığında (18-25 °C) 30 dakika süreyle lamlar inkube edilir.

5.3.6. İnkubasyon süresinin sonunda her bir lam üzerindeki damlalar silkelendir ve lamlar dikkatlice IF tampona daldırılır. IF tampon-Tween içinde 5 dakika süreyle yıkanır daha sonra IF tampon ile 5 dakika daha yıkanır (*İlave 4*). Lamlar üzerindeki fazla su kâğıt havluyla dikkatlice alınır.

5.3.7. Her bir pencereye 5-10 µl 0.1 M phosphate buffer gliserol (*İlave 4*) mikropipetle koyulur ve bir lamel kapatılır.

5.4. IF testinin okunması:

5.4.1. FITC’nin harekete geçmesi için gereken uygun filtreli epifluorescence bir mikroskopla lamlar incelenir. Bu inceleme için lamlar üzerine immersion yağı koyulur ve 500-1000 büyütmede inceleme yapılır. Lam üzerindeki her bir pencerenin çapı, dikey ve yatay yönde olmak üzere taranır. Az sayıda ya da hiç bakteri hücresi gözlenmeyen örnekler için en az 40 mikroskop alanında inceleme yapılır.

İlk olarak, pozitif kontrol olarak boyanan lam incelenir. Hücreler, boyamada kullanılan antibadi titresi veya çalışma seyreltmesinde parlak fluoresan ve tamamen boyanmış olmalıdır. Not: Eğer boyama iyi değilse test tekrarlanmalıdır (Bölüm VI.A.5).

5.4.2. Test pencerelerinde *R. solanacearum*’un karakteristik morfolojiye sahip, parlak fluoresan hücreleri kontrol edilir. Fluoresanın şiddeti, aynı antibadi seyreltmesinde pozitif kontrolün verdiği fluoresan şiddetine eşit olmalıdır. Tam olarak boyanmamış veya zayıf fluoresan veren hücreler çok sayıda olmadıkça önemsenmemelidir.

Eğer herhangi bir bulaşmadan şüpheleniliyorsa test mutlaka tekrarlanmalıdır. Aynı grupta boyanan tüm lamlarda pozitif hücreler görülüyorsa, bu tampon çözeltideki bulaşmadan kaynaklanabilir. Eğer lam üzerindeki pencerelerin dışında hücreler görülüyorsa, kullanılan immersion yağda bir bulaşmadan şüphelenilebilir.

5.4.3. *R.solanacearum* hücrelerine benzemeyen ancak fluoresan veren hücrelerin zeminde oluşturduğu yoğunluk ve yine patates göbek ve sap parçalarından elde edilen doku ekstraktlarında bulunabilen ve *R.solanacearum*’a benzer morfolojide ve ölçüde olan saprofit bakterilerin oluşturduğu çapraz reaksiyonlar IF testine özgü problemlerdir.

5.4.4. Bu testte sadece *R.solanacearum*'un tipik ölçü ve morfolojisine sahip floresan veren hücreler dikkate alınır.

5.4.5. IF testi sonucunun yorumlanması:

(i) Eğer karakteristik morfolojiye sahip parlak floresan veren hücreler varsa, her bir mikroskop alanındaki hücrelerin ortalama sayısı tespit edilir ve tekrar süspanse edilen peletin her bir mililitresindeki hücrelerin sayısı hesaplanır (*İlave 5*).

Tekrar süspanse edilen peletin her bir mililitresinde en az 5×10^3 hücre olan örneklerde, IF testi pozitifdir. Bu örnekler potansiyel olarak bulaşık kabul edilir ve bulaşıklığın teyit edilmesi ve kesin kararın verilebilmesi için ilave testler yapılmasına gerek vardır.

(ii) Tekrar süspanse edilen peletin her bir mililitresinde 5×10^3 'den az hücre bulunan örneklerde, IF testi negatiftir. Bu durumda örnek negatif olarak kabul edilir ve ilave testlerin yapılmasına gerek yoktur.

6. PCR testi

Prensip

PCR, ilk tarama testi olarak kullanıldığı ve pozitif sonuç alındığında, izolasyon veya IF testi mutlaka ikinci zorunlu test olarak yapılmalıdır. PCR ikinci tarama testi olarak kullanıldığı ve pozitif bulunduğu zaman ise, tam olarak teşhisi tamamlayabilmek için akış şemasında yer alan daha ileri testlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Not: Önceden test edilerek temiz bulunmuş patates doku ekstraktlarının içine, mililitresinde 10^3 - 10^4 olacak şekilde *R.solanacearum* ilave edilmiş ve bu doku ekstraktları kullanılarak PCR metodunun ilk testlemesi yapılmıştır. Bu nedenle tüm laboratuarlarda hassasiyet ve özgünlüğün maksimum seviyelerine ulaşmak için optimizasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır.

İlave 6'da yer alan PCR kimyasalları ve protokolleri kullanılmalıdır. Dâhili kontrolün kullanıldığı bir metot tercihen seçilmelidir.

Hedef DNA ile örneğin bulaşmasını engellemek için gerekli tedbirler alınmalıdır. Hedef DNA'yla bulaşma olasılığını minimuma indirmek için, sadece moleküler biyoloji çalışmaları için kullanılan bir laboratuarda, deneyimli elemanlarca PCR testi gerçekleştirilmelidir.

Negatif kontrol (DNA ekstraksiyonu ve tüm PCR işlemleri için), daima en son örnek olarak işleme alınmalıdır.

PCR testi yapılırken aşağıda yer alan negatif kontroller kullanılmalıdır:

- Daha önceden *R.solanacearum* yönünden test edilerek temiz bulunmuş bir doku ekstraktı örneği
- Örnekten bakteriyi ve DNA'yı çıkartmak için kullanılan tampon çözeltiler
- PCR reaksiyon karışımı

PCR testi yapılırken aşağıda yer alan pozitif kontroller kullanılmalıdır:

- *R.solanacearum* ilave edilmiş ve yeniden süspanse edilmiş peletlerin seyreltmeleri (Bunların hazırlık işlemleri *İlave 3 B*'de yer almaktadır)
- *R.solanacearum*'un virulent bir izolatı (örneğin NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; *İlave 3 B*'ye bakınız) kullanılarak mililitresinde 10^6 bakteri hücresi olacak şekilde su ile hazırlanmış bir süspanسیون
- Eğer mümkünse, PCR testindeki pozitif kontrol örneklerinden çıkartılan DNA.

Bulaşma olasılığını ortadan kaldırmak için pozitif kontroller test edilen örneklerden ayrı bir ortamda hazırlanmalıdır.

Doku ekstraktı örnekleri mümkün olduğu kadar topraktan arı olmalıdır. Bundan dolayı, bazı durumlarda, eğer PCR protokolü kullanılacaksa, yıkanmış patateslerden doku ekstraktlarının hazırlanması tavsiye edilebilir.

PCR testinde kullanılacak standart hale getirilmiş pozitif ve negatif kontroller *İlave 3'*de yer almaktadır.

6.1. DNA saflaştırma metotları

*İlave 3'*de yer alan ve yukarıda bahsedildiği gibi pozitif ve negatif kontrol örnekleri kullanılır.

Kompleks örnek substratları içindeki PCR engelleyicileri ve diğer enzimatik reaksiyonları ortadan kaldırarak, doku ekstrakt örneği içindeki hedef DNA'yı saflaştırabilecek bazı metotlar vardır. Aşağıda verilen metot *İlave 6'*da yer alan PCR metoduyla beraber kullanılmak için optimize edilmiştir.

(a) Pastrok metodu (2000)

- 1) 220 µl lysis buffer (100mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0]) 1.5 ml'lik eppendorf tüp içine koyulur.
- 2) 100 µl doku ekstraktı örneği ilave edilir ve ısı bloğu veya 95 °C'ye ısıtılmış su banyosunda 10 dakika tutulur.
- 3) 5 dakika buz üzerinde tutulur.
- 4) 80 µl lizozim stok solusyonu (mililitresinde 50 mg lizozim olacak şekilde bir solusyon 10 mM Tris HCl içinde hazırlanır, pH 8.0) ilave edilir ve 30 dakika süreyle 37 °C'de inkube edilir.
- 5) 220 µl Easy DNA solusyon A (Invitrogen) ilave edilir ve vorteks kullanılarak iyice karıştırılır ve 30 dakika süreyle 65 °C'de inkube edilir.
- 6) 100 µl Easy DNA solusyon B (Invitrogen) ilave edilir ve tüp içerisindeki çökeltiler serbest kalıp, örnek eşit bir şekilde jel veya koyu tutkal görünümü alana kadar, kuvvetli bir şekilde karıştırılır (vorteksle).
- 7) 500 µl kloroform ilave edilir ve jel görünümü azalana ve karışım homojen bir hale gelinceye kadar vorteks kullanılarak karıştırılır.
- 8) Fazları ayırmak ve interfazı oluşturmak için +4 °C'de 20 dakika süreyle 15 000 g'de santrifüj edilir.
- 9) Her bir tüpte bulunan üst faz ayrı temiz bir tüpe aktarılır.
- 10) % 100'lük etil alkolün (-20 °C) 1 ml'si ilave edilir ve kısa süreyle vorteksle karıştırılır, 10 dakika süreyle buz üzerinde tutulur.
- 11) +4 °C'de 20 dakika süreyle 15 000 g'de santrifüj edilir ve peletten etil alkol uzaklaştırılır.
- 12) 500 µl % 80'lik etil alkol (-20 °C) ilave edilir ve tüp bir aşağı bir yukarı çevrilerek karıştırılır.
- 13) +4 °C'de 10 dakika süreyle 15 000 g'de santrifüj edilir, pelete dokunmadan etil alkol uzaklaştırılır.
- 14) Havada veya DNA speed vakum kullanılarak pelet kurutulur.

- 15) 100 µl steril ultra saf su (UPW) kullanılarak pelet süspansiyonu edilir ve oda sıcaklığında en az 20 dakika süreyle bırakılır.
- 16) PCR işleminde kullanılana kadar -20 °C'de depolanır.
- 17) Herhangi bir beyaz çökelti oluşması durumunda santrifüj yapılır ve PCR için DNA'nın 5 µl'si kullanılır.

(b) Diğer metotlar

Mililitrede 10^3 – 10^4 bakteri hücresi içeren kontrol örneklerden DNA'yı saflaştırabildiği belirlenmiş diğer DNA ekstraksiyon metotları kullanılabilir, Qiagen DNeasy Plant Kit gibi.

6.2. PCR

- 6.2.1. Geçerli olan protokole göre PCR için kontrol ve test örneklerini hazırlayın (Bölüm VI.A.6). Örnek DNA ekstraktının 10^{-1} (Ultra saf su içinde 1:10) seyreltmesini hazırlayın.
- 6.2.2. Bulaşma riski olmayan bir ortamda, yayınlanmış protokollere göre (*İlave 6*) PCR reaksiyon karışımı hazırlanır. Uygun olan ortamlarda, dâhili PCR kontrolün kullanıldığı multiplex PCR'ın kullanımını tavsiye edilir.
- 6.2.3. PCR protokollerine göre, steril PCR tüpleri içine, her bir 25 µl'lik PCR reaksiyon karışımı için 2-5 µl kadar DNA ekstraktı ilave edilir (*İlave 6*).
- 6.2.4. Sadece PCR reaksiyon karışımının ve PCR reaksiyon karışımı içine örneğin yerine ultra saf suyun (UPW) katıldığı negatif kontrollerde hazırlanır.
- 6.2.5. Hazırlanan tüpler aynı thermal cycler içine yerleştirilir ve optimize edilmiş bir PCR programı kullanılarak çalıştırılır (*İlave 6*).
- 6.3. PCR ürününün analizi
- 6.3.1. Agaroz jel elektroforez yöntemi ile PCR ürünü analiz edilir. Her bir santimetresine 5-8 V akım uygulanan Tris-acetate-EDTA (TAE) tampon çözelti (*İlave 6*) içinde bulunan % 2'lik (w/v) agaroz jele, her bir örnekten en az 12 µl alınıp 3 µl yükleme tampon çözeltisi ile karıştırılarak yüklenir. Uygun bir DNA işaretleyici (marker) kullanılır, örneğin 100 bp.
- 6.3.2. Mutajen olan ethidium bromide çalışırken gerekli güvenlik tedbirleri alınır ve jel 30–60 dakika süreyle ethidium bromide (litrede 0.5 mg) içinde boyanarak DNA bantları elde edilir.
- 6.3.3. Bantları görebilmek için kısa dalga boyu UV transilluminasyon ($\lambda = 302$ nm) kullanılır ve jel bu transilluminator üzerine konularak bantlar gözlenir ve resmi çekilir (*İlave 6*).
- 6.3.4. Herhangi yeni bir bulguda, PCR ürününün güvenilirliğini doğrulamak için, geriye kalan DNA uygun enzim ve tampon çözelti (*İlave 6*'ya bakınız) kullanılarak optimum sıcaklık ve sürede inkube edilir ve bu şekilde kesim enzimleri analizi (restriction enzyme analysis) gerçekleştirilmiş olur. Daha sonra bunlar agaroz jel elektroforez yöntemiyle ayrıştırılır ve ethidium bromide ile boyandıktan sonra UV transilluminator kullanılarak kesilen parçacıklara pozitif kontrollerle karşılaştırılarak bakılır.

PCR test sonuçlarının yorumlanması:

Tüm pozitif kontrollerde (eğer multiplex PCR yapılmışsa bitkiye özel dâhili kontrol primerleri: beklenen bant dizilişinin olduğu yerde ikinci bir bant oluşmalıdır) *R.solanacearum* için beklenen bant dizilişi tespit edilip, eğer çalışılan örnekte tespit edilmediyse PCR testi negatiftir.

Tüm negatif kontrollerde herhangi bir bant dizilişi gözlenmeyip, eğer çalışılan örnekte *R.solanacearum* için beklenen bant dizilişi ve gerek duyulduğu hallerde kesim modeli

(restriction pattern) tespit edildiyse, PCR testi pozitifdir. Pozitif sonucun teyit edilmesi amacıyla ikinci bir PCR primer seti kullanılarak test tekrarlanabilir (*İlave 6*).

Not: Eğer su ile hazırlanmış olan *R.solanacearum*'un bulunduğu pozitif kontrolde bant dizilişi gözlenip, patates doku ekstraktı içinde hazırlanmış olan pozitif kontrolde gözlenmediyse, PCR testini engelleyen bazı engelleyicilerden (inhibitor) şüphelenilebilir. Dâhili PCR kontrollerinin kullanıldığı multiplex PCR'da ise, eğer beklenen her iki bantta oluşmadıysa, bu PCR reaksiyonunun engellendiğini göstermektedir.

Negatif kontrollerin bir veya daha fazlasında bant oluşumu gözlemlenirse, bulaşma olasılığından şüphelenilir.

7. FISH testi

Prensip

FISH testi ilk tarama testi olarak kullanılıp pozitif sonuç alındığında, izolasyon veya IF testi ikinci zorunlu tarama testi olarak mutlaka yapılmalıdır. FISH testi ikinci tarama testi olarak kullanılıp pozitif sonuç alındığında ise, teşhisin tamamlanması için akış şemasına göre daha ileri testlerin yapılmasına gerek vardır.

Not: Bu testte *R.solanacearum*'a özel oligo-problar kullanılır (*İlave 7*). Önceden analiz edilerek *R.solanacearum* yönünden temiz bulunmuş patates doku ekstraktının içine ilave edilen *R.solanacearum*'un, mililitrede 10^3-10^4 hücresi bu testin ön denemelerinde tespit edilebilmiştir.

Aşağıdaki yöntem tercihen taze olarak hazırlanmış doku ekstrakt örnekleri ile gerçekleştirilir, ancak -20 veya -86'da depolanmış örneklerde de başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Önceden test edilmiş ve *R.solanacearum* yönünden temiz bulunmuş doku ekstrakt örnekleri, negatif kontrol olarak kullanılır.

0.01 M fosfat tampon çözelti kullanılarak mililitresinde 10^5-10^6 *R.solanacearum* biovar 2 (örneğin strain NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; *İlave 3 B*'ye bakınız) hücresi olacak şekilde hazırlanmış süspansiyonlar, pozitif kontrol olarak kullanılır. *İlave 3 B*'de verilen diğer *R.solanacearum* strainleride patates doku ekstraktının içine katılarak, pozitif kontroller hazırlanabilir. Kullanılan *R.solanacearum* strainleri 3-5 gün süreyle inkube edilmiş kültürler olmalıdır.

Örneğin içinde bulunan tüm ökaryotlar boyanacağından, hibridizasyon işlemi için FITC ile etiketlenmiş öbakteriyel oligo-probe kullanılmaktadır.

İlave 3 A'da verilen standardize edilmiş pozitif ve negatif kontrol materyali de kullanılabilir.

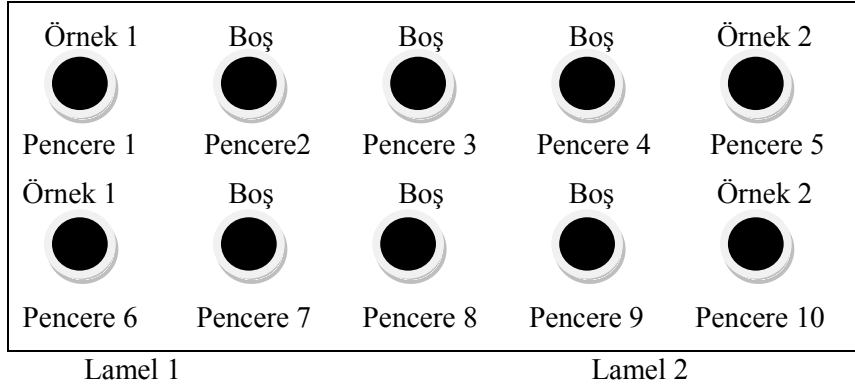
7.1. Patates doku ekstraktının sabitlemesi

Aşağıda yer alan protokol Wullings *et al.* (1998)'den alınmıştır:

- 7.1.1. Sabitleyici solusyon hazırlanır (*İlave 7*'ye bakınız).
- 7.1.2. 100 µl örnek eppendorf tüp içerisine pipetle koyulur ve 7 000 g 'de 7 dakika santrifüj edilir.
- 7.1.3. Üst sıvı atılır ve pelete yeni hazırlanmış sabitleyicinin 200 µl'si ilave edilir. Vorteksle karıştırılır ve bir saat süreyle buzdolabında inkube edilir.
- 7.1.4. Yedi dakika 7 000 g'de santrifüj edilir, üst sıvı atılır ve pelet 75 µl'e 0.01 M PB ile tekrar süspanse edilir (*İlave 7*'ye bakınız).

7.1.5. Temiz bir pencereci lam üzerine, Şekil 7.1.'de gösterildiği gibi süspansiyonların 16 µl'si damlatılır. Seyreltilmemiş iki farklı örnek uygulanan her bir lam ve 1:1000'lik seyreltme (0.01 M PB içinde) yapmak için 10 µl kullanılır. Kalan örnek solusyonuna (49 µl) eşit miktarda % 96'lık etil alkol ilave edilir ve daha sonra - 20 °C'de depolanır. FISH işleminin tekrarlanması durumunda, etil alkol santrifüj edilerek örnekten uzaklaştırılır ve aynı miktarda 0.01 M PB ilave edilir (Vorteksle karıştırılır).

Şekil 7.1. FISH lamının planı



7.1.6. Lamalar üzerindeki damlalar kurumaya bırakılır (veya 37 °C'ye ayarlanmış bir inkubatörde) ve alevden geçirilerek sabitlenir.

Eğer istenirse işlem bu aşamada iken bırakılabilir ve hibridizasyon işlemine ertesi gün devam edilebilir. Lamalar nemsiz, toz olmayan bir ortamda oda sıcaklığında tutulmalıdır.

7.2. Hibridizasyon

7.2.1. % 50, % 80 ve % 90'lık etil alkolde sırasıyla birer dakika tutularak hücrelerdeki su uzaklaştırılır. Daha sonra lamalar kurumaya bırakılır.

7.2.2. Dip kısmına 1x hybmix (İlave 7) ile ıslatılmış kâğıt havlu veya filtre kâğıdı yerleştirilmiş ve hava geçirmeyecek şekilde sıkıca kapatılmış bir inkubasyon kutusu hazırlanır. Bu kutu en az 10 dakika süreyle 45 °C'de ısıtılmış hibridizasyon fırınında ön inkubasyona bırakılır.

7.2.3. Her bir lam üzerindeki 3 ve 8 nolu pencereler boş bırakılarak, geriye kalan 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 ve 10 nolu pencerelere 10 µl hibridizasyon solusyonu (İlave 7) koyulur.

7.2.4. Hava kabarcığı kalmayacak şekilde ilk dört ve son dört pencere 24 x 24 mm'lik lamelle kapatılır. Lamalar önceden ısıtılmış olan inkubasyon çemberine yerleştirilir ve karanlıkta 45 °C'de hibridizasyon fırınında 5 saat süreyle inkubasyona bırakılır.

7.2.5. Bir litre sıvı alabilen üç ayrı beher hazırlanır. Bunların birinde 1 litre Milli Q (molecular grade) su, diğerinde 1 litre 1x hybmix (334 ml 3x hybmix ve 666 ml Milli Q su) ve sonuncusunda 1 litre 1/8x hybmix (42 ml 3x hybmix ve 958 ml Milli Q su) koyulur. Bunlar 45 °C'de ısıtılmış su banyosunda ön inkubasyona bırakılır.

7.2.6. Lamaların üzerinden lameller kaldırılır ve lam taşıyıcıya yerleştirilir.

7.2.7. Proben fazlasının uzaklaştırılması için 45 °C'de içinde 1x hybmix bulunan erlene 15 dakika süreyle tutulur.

7.2.8. Buradan alınan lamalar, içinde 1/8 hybmix yıkama solusyonu bulunan erlene aktarılır ve 15 dakika daha inkube edilir.

- 7.2.9. Daha sonra lamlar Milli Q su içine daldırılır ve filtre kâğıdı üzerine yerleştirilir. Fazla suyu uzaklaştırmak için filtre kâğıdıyla lamlar yavaşça kurulanır. 5-10 µl anti-fading mountant solusyon (örneğin Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA veya buna eşdeğer bir diğer kimyasal) her bir pencere üzerine koyulur ve tüm lam 24 x 60 mm'lik bir lamel ile kapatılır.
- 7.3. FISH testinin okunması
- 7.3.1. İmmersion yağ kullanılarak 630 veya 1000 x büyütmede epifluorescence bir mikroskop ile hemen lamlar incelenir. Fluorescein isothiocyanate (FITC) için uygun bir filtre kullanıldığında, örneğin içindeki ökaryotik hücreler (çoğu gram negatif hücrelerde dâhil) yeşil fluoresan boyanır. Tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate için uygun filtre kullanıldığında, *R.solanacearum*'un Cy3 ile boyanmış hücreleri kırmızı fluoresan verir. Pozitif kontrolle hücrelerin morfolojisi karşılaştırılır. Hücreler parlak fluoresan ve tamamen boyanmış olmalıdır. Eğer boyama iyi değilse FISH testi (Bölüm VI.A.7) tekrarlanmalıdır. Lam üzerindeki her bir pencerenin çapı dikey ve yatay yönde olmak üzere taranır. Az sayıda ya da hiç bakteri hücresi gözlenmeyen örnekler için en az 40 mikroskop alanında inceleme yapılır.
- 7.3.2. Test pencerelerinde *R. solanacearum*'un karakteristik morfolojiye sahip, parlak fluoresan hücreleri kontrol edilir. Fluoresanın şiddeti, pozitif kontrolün verdiği fluoresan şiddetine eşit ya da ondan daha iyi olmalıdır. Tam olarak boyanmamış veya zayıf fluoresan veren hücreler dikkate alınmamalıdır.
- 7.3.3. Eğer herhangi bir bulaşmadan şüpheleniliyorsa test mutlaka tekrarlanmalıdır. Tampon çözeltilerdeki bulaşmadan dolayı, aynı grupta boyanan tüm lamalarda pozitif hücreler görülebilir ya da eğer lam üzerindeki pencerelerin dışında hücreler görülüyorsa kullanılan immersion yağda bir bulaşmadan şüphelenilebilir.
- 7.3.4. *R.solanacearum* hücrelerine benzemeyen ancak fluoresan veren hücrelerin zeminde oluşturduğu yoğunluk ve IF testindeki kadar olmasa da, yine patates göbek ve sap parçalarından elde edilen doku ekstraktlarında bulunabilen ve *R.solanacearum*'a benzer morfolojide ve ölçüde olan saprofit bakterilerin oluşturduğu çapraz reaksiyonlar FISH testine özgü problemlerdir.
- 7.3.5. Bu testte sadece *R.solanacearum*'un tipik ölçü ve morfolojisine sahip fluoresan veren hücreler dikkate alınır.
- 7.3.6. FISH testi sonucunun yorumlanması:
- Geçerli bir FISH test sonucu için tüm pozitif kontrollerde, *R. solanacearum*'un tipik morfolojiye ve büyüklüğe sahip hücrelerinin görülmesi gerekmektedir. Bunlar, FITC filtresi kullanıldığında parlak yeşil fluoresan ve eğer rhodamine filtre kullanılıyorsa parlak kırmızı hücreler şeklinde görülecektir. Bu arada negatif kontrollerde de herhangi bir boyama gözlenmemelidir. Eğer karakteristik morfolojiye sahip parlak fluoresan veren hücreler varsa, her bir mikroskop alanındaki hücrelerin ortalama sayısı tespit edilir ve tekrar süspanse edilen peletin her bir mililitresindeki hücrelerin sayısı hesaplanır (İlave 5). Tekrar süspanse edilen peletin her bir mililitresinde en az 5×10^3 hücre olan örnekler potansiyel olarak bulaşık kabul edilir ve bulaşıklığın teyit edilmesi ve kesin kararın verilebilmesi için ilave testler yapılmasına gerek vardır. Tekrar süspanse edilen peletin her bir mililitresinde 5×10^3 'den az hücre bulunan örnekler ise negatif olarak kabul edilir.
 - Rhodamine filtre kullanılarak pozitif kontrollerde parlak kırmızı fluoresan veren *R.solanacearum*'un tipik morfolojisi ve büyüklüğüne sahip hücreler gözlemlendiğinde, eğer aynı hücreler çalışılan örneklerde yoksa FISH testi negatiftir.

8. ELISA testi

Prensip

ELISA testinin diğer testlere oranla hassasiyeti düşük olduğundan, IF, PCR veya FISH'e ilaveten tercihe bağlı olarak sadece kullanılabilir. ELISA'ya başlamadan önce örneklerin zenginleştirilmesi bu testin hassasiyetinin artırılması için faydalıdır, fakat bu sırada örneğin içindeki diğer organizmalarla rekabetten dolayı bu işlemde başarısız olunabilir.

Not: *R.solanacearum* için geçerliliği onaylanmış antitadiler kullanılır (web sayfasına bakınız <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Her yeni antitadi açıldığında, titrenin yeniden tespit edilmesi tavsiye edilmektedir. Titre, *R.solanacearum*'un homolog bir straininin 10^5 - 10^6 hücre/ml'sini içeren bir süspansiyonun testlendiği ve üretici firmanın tavsiyesine göre uygun bir ikinci konjugat kullanıldığında, optimum reaksiyonun meydana geldiği en yüksek seyreltme olarak tanımlanmaktadır. Testleme sırasında, antitadiler ticari formülasyonunda önerilen titre veya çalışma seyreltmelerine yakın değerlerde kullanılmalıdır.

R.solanacearum'un homolog bir straininin 10^5 - 10^6 hücre/ml'sini içeren bir süspansiyon kullanılarak antitadilerin titresi belirlenir.

Daha önceden *R.solanacearum* yönünden negatif olduğu belirlenmiş bir doku ekstraktı örneği ve çapraz reaksiyon vermeyen bir bakterinin PBS tampon çözelti kullanılarak hazırlanmış bir süspansiyonu negatif kontrol olarak kullanılır.

Önceden test edilerek temiz bulunmuş patates doku ekstraktlarının içine, mililitresinde 10^3 - 10^4 hücre olacak şekilde *R.solanacearum* biovar 2 (örneğin strain NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, *İlave 2 A* ve *B*'ye bakınız) ilave edilir ve bunlar pozitif kontrol olarak kullanılır. PBS kullanılarak *R.solanacearum*'un homolog bir straini ile mililitresinde 10^5 - 10^6 hücre olacak şekilde hazırlanan standart süspansiyon ise, her bir plate'de sonuçların karşılaştırılması amacıyla kullanılır. Bulaşma riskini ortadan kaldırmak için, pozitif kontrollerle çalışılan örneklerin plate üzerinde karışmasının engellenmesi gerekmektedir.

Bu test ile birlikte kullanılacak standardize edilmiş pozitif ve negatif kontrol materyalleri *İlave 3 A*'da listelenmiştir.

İki ELISA protokolünün kullanımı onaylanmıştır.

(a) İndirek ELISA (Robinson Smith *et al.*, 1995)

- 1) Doku ekstraktı örneğinin 100–200 μ l'si kullanılır (bazı durumlarda spesifik olmayan sonuçları azaltabilmek için, ısı bloğu veya su banyosunda 4 dakika süreyle 100 °C de örnekler ısıtılır).
- 2) Double strength coating buffer (*İlave 4*) eşit miktarda ilave edilir ve vorteksle karıştırılır.
- 3) Mikrotitre plate'in (örneğin Nunc-Polysorp veya buna eşdeğer olan) kuyularına, her bir seyreltmeden 100' er μ l pipetle koyulur. Her bir seyreltme için en az iki kuyuya bu uygulama yapılır ve 37 °C de bir saat veya +4°C de bir gece süreyle inkube edilir.
- 4) Kuyulardan doku ekstraktı örnekleri tek bir ani hareketle boşaltılır. PBS-Tween (*İlave 4*)'le 3 kez kuyular yıkanır, kuyularda PBS-Tween son yıkamada en az 5 dakika süreyle bırakılır.

- 5) Blocking buffer (*İlave 4*) kullanılarak anti-*R.solanacearum* antibadilerinin uygun seyreltmeleri hazırlanır. Kullanımı onaylanmış ticari antibadiler için, tavsiye edilen seyreltmeler kullanılır
- 6) Her bir kuyuya 100 µl ilave edilir ve 37 ° C'de bir saat süreyle inkube edilir.
- 7) Kuyulardan tek bir hareketle antiserum boşaltılır. (4)'de olduğu gibi kuyular yıkanır.
- 8) Blocking buffer (*İlave 4*) kullanılarak alkaline phosphatase konjugatın uygun seyreltmeleri hazırlanır. Kullanımı onaylanmış ticari antibadiler için, tavsiye edilen seyreltmeler kullanılır
- 9) Kuyulardan tek bir hareketle antiserum boşaltılır. (4)'de olduğu gibi kuyular yıkanır.
- 10) Alkaline phosphatase substrate solusyonu (*İlave 4*) hazırlanır. Kuyulara 100 µl ilave edilir. Oda sıcaklığında karanlıkta inkube edilir ve 90 dakika süresince düzenli aralıklarla 405 nm'de absorbans değerleri okunur.

(b) DASI ELISA

- 1) pH'sı 9.6 olan coating buffer kullanılarak, anti-*R.solanacearum* poliklonal immunoglobulinlerin uygun seyreltmesi hazırlanır (*İlave 4*). Her bir kuyuya 200 µl kullanılır. 37 °C de 4-5 saat veya 4°C de 16 saat süreyle inkube edilir.
- 2) PBS-Tween (*İlave 4*)'le 3 kez kuyular yıkanır.
En az iki kuyu olacak şekilde her bir doku ekstraktı örneğinden 190'ar µl uygulanır. Ayrıca her bir plate'e iki kuyuya pozitif ve negatif kontroller ilave edilir. +4°C de 16 saat süreyle inkube edilir.
- 3) PBS-Tween (*İlave 4*)'le 3 kez kuyular yıkanır.
- 4) % 0.5 bovine serum albumin (BSA) içeren PBS (*İlave 4*) kullanılarak, *R.solanacearum*'a spesifik monoklonal antibadilerin uygun seyreltmeleri hazırlanır ve 190'ar µl her bir kuyuya uygulanır. 37 °C'de iki saat süreyle inkube edilir.
- 5) PBS-Tween (*İlave 4*)'le 3 kez kuyular yıkanır.
- 6) PBS (*İlave 4*) kullanılarak alkaline phosphatase'la konjuge edilmiş anti-mouse immunoglobulinlerin uygun seyreltmeleri hazırlanır. 190ar µl her bir kuyuya uygulanır ve 37 °C'de iki saat süreyle inkube edilir.
- 7) PBS-Tween (*İlave 4*)'le 3 kez kuyular yıkanır.
- 8) Substrat buffer'ın her bir mililitresinde 1 mg p-nitrophenyl phosphate bulunan alkaline phosphatase substrate solusyonu (*İlave 4*) hazırlanır. Kuyulara 200 µl ilave edilir. Oda sıcaklığında karanlıkta inkube edilir ve 90 dakika süresince düzenli aralıklarla 405 nm'de absorbans değerleri okunur.

ELISA test sonuçlarının yorumlanması:

Pozitif kontrollerin hepsinden, negatif doku ekstraktı örneklerinin OD değerinin iki katından daha fazla ve 1.0'in üzerinde (substratla 90 dakikalık inkubasyondan sonra) OD değeri elde edilmek koşuluyla, eğer örneğin koyulduğu her iki kuyudan okunan ortalama optik yoğunluk (OD) değeri, kontrol olarak yer alan negatif doku ekstraktı örneğinden elde edilen değerden < 2x OD ise, ELISA testi negatiftir.

Tüm negatif kontrol kuyularından elde edilen OD değerleri, pozitif kontrolünkünden < 2x olduğunda, eğer örneğin koyulduğu her iki kuyudan okunan ortalama optik yoğunluk

(OD) değeri, negatif doku ekstraktı örneklerinden elde edilen değerden $> 2x$ OD ise ELISA testi pozitifdir.

Pozitif kontrollerdeki negatif ELISA okumaları, testin doğru olarak gerçekleştirilmediğini ya da sonucun bir şekilde engellendiğini gösterir. Negatif kontrol kuyularındaki pozitif ELISA okumaları ise, çapraz bulaşmayı veya spesifik olmayan antibadi bağlanışını gösterir.

9. Bioassay testi

Not: Önceden analiz edilerek *R.solanacearum* yönünden temiz bulunmuş patates doku ekstraktının içine ilave edilen *R.solanacearum*'un, mililitrede 10^3-10^4 hücresi bu testin ön denemelerinde tespit edilmelidir (Hazırlanması için *İlave 3'*e bakınız).

Taze olarak hazırlanmış doku ekstraktı örneği kullanıldığı ve optimum gelişme koşulları sağlandığında, en yüksek tespit hassasiyeti beklenebilir. Bununla beraber $-68 - -86$ °C'de gliserol altında depolanan doku ekstraktı örnekleri ile de bu test başarıyla gerçekleştirilebilir.

Aşağıda yer alan protokol kullanılır (Janse- 1988):

- 9.1. Her bir örnek için 3 gerçek yaprak dönemindeki hassas bir domates çeşidinden (örneğin Moneymaker veya buna eş derecede hassasiyet gösterdiği laboratuvar testleri ile tespit edilmiş bir çeşit) 10 bitki kullanılır. Ayrıntılar için *İlave 8'*e bakınız. Alternatif olarak patlıcan bitkileri (örneğin Black beauty veya buna eşdeğer hassasiyet gösteren diğer bir çeşit) kullanılır, bu bitkilerden 2-3 adet gerçek yaprakları tam açılana kadarki dönem de olanlar kullanılır. Belirtiler patlıcan bitkisinde daha az şiddette oluşur ve daha yavaş gelişir. Bu nedenle mümkün olduğu yerlerde domates fidelerinin kullanılması tavsiye edilmektedir.
- 9.2. Test bitkilerine 100 µl örnek doku ekstraktı verilir.
 - 9.2.1. Enjektör ile inokulasyon

İnce uçlu bir enjektör (23G'den daha ince değil) ile kotiledonların hemen üzerinden bitki sapı inokule edilir. Test bitkileri arasında örnek dağıtılır.
 - 9.2.2. Düz uzunlamasına bir kesik atılarak yapılan inokulasyon (Slit inokulasyon)

Bitki iki parmak arasında tutulurken, kotiledonlar ve ilk yapraklar arasındaki sap üzerine süspanse edilen peletin bir damlası (yaklaşık 5-10 µl) pipetle koyulur.

Steril bir bistüri kullanılarak, yaklaşık 1.0 cm uzunluğunda ve sapın yaklaşık 2/3'ü derinliğine kadar inen bir uçtan diğer uca bir çizik, pelet damlasından başlayarak atılır.

Kesilmiş olan yer bir enjektör kullanılarak steril vazelin ile kapatılır.
- 9.3. *R.solanacearum* biovar 2'nin virülent olduğu bilinen bir straini 48 saat süreyle geliştirilir ve bundan su ile 10^5-10^6 hücre/ml yoğunluğunda bir süspanسیون hazırlanır. Yukarıda anlatılan metot kullanılarak, 5 fide pozitif kontrol olarak bu süspanسیونla inokule edilir. Negatif kontrol olarakta yine 5 bitki aynı yöntemle pelet tampon çözeltisiyle (*İlave 4*) inokule edilir. Çapraz bulaşmadan kaçınmak için pozitif ve negatif kontrol bitkileri diğer bitkilerden ayrılmalıdır.
- 9.4. İnokule edilen bitkiler, karantina koşullarına uygun bir şekilde, $25-30$ °C ve yüksek orantılı nem koşullarında 4 haftaya kadar yetiştirilir. Bu sırada bitkiler su eksikliği nedeniyle oluşan solgunluk veya aşırı su yüklemesinden kaçınılacak şekilde uygun bir sulama programı takip edilerek sulanır. İnkube edilen pozitif ve negatif kontrollerde bulaşmadan kaçınmak için, bunlar serada veya yetiştirme odasında ayrı yerlerde tutulmalıdır. Eğer yer açısından bir sıkıntı varsa, bunlar birbirine değme durumu

olmayacak şekilde steril edilmiş bariyerlerle ayrılmalıdır. Aynı durum farklı örneklerle inokule edilmiş bitkilerin birbirine yakın bir şekilde bulunması gerektiği durumlarda da geçerlidir, bu bitkilerde birbirine değmeyecek şekilde uygun bariyerler kullanılarak ayrılmalıdır. Gübreleme, sulama ve rutin kontrol işlemleri sırasında, çapraz bulaşmaları engellemek için azami dikkat gösterilmelidir. Sera veya yetiştirme odalarının böceklerden arı olması çok önemlidir. Çünkü bu böcekler örnekten örneğe bakteriyi aktarabilir.

Solgunluk, epinasti, kloroz ve/veya cüceleşme gibi belirtiler yönünden bitkiler kontrol edilir.

- 9.5. Enfekteli bitkilerden izolasyon yapılır (Bölüm II.3) ve gelişen koloniler saflaştırılarak tanıya gidilir (Bölüm VI. B).
- 9.6. Üç hafta sonra herhangi bir belirti görülmezse, her bir test bitkisinin inokulasyon noktasının üzerinden yaklaşık 1.0 cm uzunluğunda sap parçaları alınır ve bunlardan IF/PCR/izolasyon gerçekleştirilir. Eğer test pozitif ise, seyreltme ekim tekniği uygulanır (Bölüm 4.1).
- 9.7. Gelişen koloniler saflaştırılarak tanıya gidilir (Bölüm VI. B).

Bioassay test sonuçlarının yorumlanması

Pozitif kontrol olarak kullanılan bitkiler tipik belirtiler oluşturup, bu bitkilerden bakteri tekrar izole edilebiliyorsa ve negatif kontrol olarak kullanılan bitkilerde hiçbir belirti oluşmamışsa, bioassay test sonuçları kabul edilebilir test sonuçları olarak kullanılır.

Test bitkileri *R.solanacearum* ile enfekteli değil ve pozitif kontrolde *R.solanacearum* tespit edilmişse, bioassay test sonuçları negatiftir.

Eğer test bitkileri *R.solanacearum* ile enfekteli ise bioassay testi pozitifdir.

B. TANI TESTLERİ

Aşağıda yer alan testlerden farklı biyolojik temele dayanan en az iki tanesi kullanılarak, *R.solanacearum* olduğu varsayılan saf kültürlerin tanısı yapılır. Bu testler yapılırken gerektiği hallerde *Ilave 3'* de yer alan bilinen referans strainlerde kullanılır.

1. Besinsel ve enzimatik tanı testleri

Aşağıda yer alan fenotipik özellikler, Lelliott ve Stead (1987), Klement *et al.* (1990) ve Schaad (2001)'de yer alan metotlara göre belirlenir.

Test	Beklenen sonuç
Fluorescent pigment	-
PHB içerikleri	+
Oxidation/Fermentation(O/F) testi	O+/F-
Catalase aktivitesi	+
Kovac's oxidase testi	+
Nitrat indirgemesi	+
Citrate kullanımı	+
40 °C de gelişme	-
% 1 NaCl de gelişme	+
% 2 NaCl de gelişme	-
Arginine dihydrolase aktivitesi	-
Gelatine liquefaction	-
Nişasta hidrolizi	-
Aesculine hidrolizi	-
Levan üretimi	-

2. IF testi

- 2.1. Mililitrede yaklaşık 10^6 hücre olacak şekilde bir süspansiyon hazırlanır.
- 2.2. Antiserumun seyreltmeleri hazırlanır (<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).
- 2.3. IF boyama yapılır (Bölüm VI.A.5).
- 2.4. Eğer kültürün IF titresini pozitif kontrolün titresine eşitse, IF testi pozitifdir.

3. ELISA testi

Not: Eğer sadece iki tanı testi kullanılacaksa bu metoda ilave olarak diğer bir serolojik test kullanılmamalıdır.

- 3.1. Mililitrede yaklaşık 10^8 hücre olacak şekilde, 1x PBS (İlave 4) kullanılarak bir süspansiyon hazırlanır.
- 3.2. *R.solanacearum*'a spesifik bir monoklonal antibadi kullanılarak ELISA testi yapılır.
- 3.3. Kültürün ELISA değeri pozitif kültürün en az yarı değeri kadarsa, ELISA testi pozitifdir.

4. PCR testi

- 4.1. Mililitrede yaklaşık 10^6 hücre olacak şekilde, moleküler çalışmalarda kullanılan steril su içinde bir süspansiyon hazırlanır.
- 4.2. 100 µl'lik bakteri süspansiyonu ısı bloğu veya 100 °C'de kaynayan su banyosu içinde 4 dakika süreyle ısıtılır. Örnekler kullanılana kadar - 20 °C'de tutulur.
- 4.3. *R.solanacearum*'a spesifik primerler kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilir [örneğin Seal *et al.* (1993); Pastrok ve Maiss (2000); Pastrok *et al.* (2002); Boudazin *et al.* (1999); Opina *et al.* (1997); Weller *et al.* (1999)]
- 4.4. Eğer oluşan PCR ürünü pozitif kontrol olarak kullanılan strainle aynı ölçüde ve aynı RFLP modeline sahipse, *R. solanacearum* için pozitif bir tanı yapılmıştır.

5. FISH testi

- 5.1. Mililitrede yaklaşık 10^6 hücre olacak şekilde ultra saf su (UPW) içinde bir süspansiyon hazırlanır.
- 5.2. *R.solanacearum*'a spesifik en az iki oligo-probe kullanılarak FISH testi (Bölüm VI.A.7) yapılır.
- 5.3. Kültür ve pozitif kontrolden aynı sonuçlar alındığında FISH testi pozitifdir.

6. Yağ asidi profili (Fatty acid profiling, FAP)

- 6.1. Kültürler, 28 °C'de 48 saat süreyle trypticase soy agar (Oxoid) üzerinde geliştirilir.
- 6.2. Uygun FAP prosedürü uygulanır (Janse, 1991; Stead, 1992).
- 6.3. Çalışılan örnek pozitif kültürün profiliyle aynıysa, FAP testi pozitifdir. 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH ve 18:1 2OH yağ asitlerinin bulunması ve 16:0 3OH'in olmaması *Ralstonia* sp. için belirleyici bir özelliktir.

7. Stain karakterizasyon metotları

R.solanacearum'un yeni bir örnekte tespit edildiği her durumda, aşağıdaki metotlardan biri kullanılarak strain karakterizasyonunun yapılması önerilir.

Bu testler yürütülürken bilinen referans strainlerde testlerde kullanılmalıdır (İlave 3'e bakınız).

7.1. Biovar tespiti

R.solanacearum, üç disakkarit ve 3 heksoz alkolünü kullanma ve/veya oksitleme kabiliyetine göre, biovarlara ayrılmıştır (Hayward, 1964 ve Hayward *et al.*, 1990). Biovar testi için kullanılan besi yeri *İlave 2*'de verilmiştir. Bu testte *R.solanacearum* saf kültürlerinin besi yerlerine iğne ile inokulasyonu yapılır ve 28 °C'de inkube edilir. Eğer ortam steril 96 kuyulu bir plate'e 200'er µl olarak paylaşılırsa, pozitif test sonucunu gösteren zeytin yeşilinden sarıya dönen renk 72 saat içerisinde gözlemlenebilir.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Kullanımı:					
Maltose	-	+	+	-	+
Lactose	-	+	+	-	+
Cellobiose	-	+	+	-	+
Mannitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-

Biovar 2 nin alt fenotiplerinin farklılaşmalarını gösteren ilave testler

	Biovar 2 (Dünya genelinde dağılım)	Biovar 2A (Şili ve Kolombiya'da bulundu)	Biovar 2T (Tropikal bölgelerde bulundu)
Trehalose kullanımı	-	+	+
<i>meso</i> -inositol kullanımı	+	-	+
D-ribose kullanımı	-	-	+
Pektolitik aktivite (1)	düşük	düşük	Yüksek

(1) Lelliott ve Stead (1987)'e bakınız.

7.2. Genomik parmak izi

R.solanacearum kompleksi içindeki strainlerin moleküler olarak ayrıştırılması bazı teknikler kullanılarak yapılabilir. Bunlar aşağıda verilmiştir:

7.2.1. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analizi (Cook *et al.*, 1989).

7.2.2. REP, BOX ve ERIC primerleri kullanılarak repetitive sequence PCR (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995).

7.2.3. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analizi (Van der Wolf *et al.*, 1998).

7.3. PCR metodu

RFLP analizi (Cook *et al.*, 1989) ve 16S rDNA dizileme (Taghavi *et al.*, 1996)'de tanımlandığı gibi, spesifik PCR primerleri (Patrik *et al.*, 2002; *İlave 6*'ya bakınız), *R.solanacearum*'un bölüm 1 (biovar 3, 4 ve 5) ve bölüm 2 (biovar 1, 2A ve 2T)'ye ait strainlerinin farklılaştırılmasında kullanılabilir.

C. DOĞRULAMA TESTİ

Patojenisite testi, *R.solanacearum* olarak tanısı yapılan kültürlerin virülensliğini değerlendirmek ve *R.solanacearum*'un teşhisinin doğrulanması amacıyla yapılmalıdır.

- 2) *R.solanacearum*'un pozitif kontrol straini (örneğin NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; *İlave 3*'e bakınız) ve test edilen izolatin 24-48 saatlik kültüründen ml' de 10^6 hücrelik bir inokulum hazırlanır
- 3) Hassas üç gerçek yapraklı dönemdeki 5-10 domates veya patlıcan bitkisi inokule edilir (Bölüm VI.A.9'a bakınız).
- 4) Kuraklık veya su fazlasından kaçınmak için uygun bir sulama programıyla beraber yüksek orantılı nem ve 25-28 °C'de 2 hafta kadar inkubasyona bırakılır. Saf kültürle çalışıldığında 14 gün içerisinde tipik solgunluk belirtileri oluşmalıdır. Eğer bu sürenin sonunda bu belirtiler oluşmamışsa, kültür *R.solanacearum*'un patojenik formu olarak doğrulanamaz.
- 5) Solgunluk ve/veya epinasti, kloroz, cüceleşme belirtileri gözlenir.
- 6) Belirti vermeyen bitkilerin inokulasyon noktalarının üzerinden yaklaşık 2 cm'lik bir sap parçası alınarak bundan izolasyon yapılır. Steril destile su veya 50 mM fosfat tampon çözeltisi (*İlave 4*) içinde süspanse edilir veya ezilir. Bu süspansiyondan tercihen seçici besi yerine olmak üzere (*İlave 2*) çizgi ekim veya yayarak ekim yapılır, 28 °C'de 72 saat inkube edilir ve *R.solanacearum*'un tipik kolonileri kontrol edilir.

*İlave 1***Protokollerin optimizasyonu ve geçerliliğinin tespit edildiği testlere katılan laboratuvarlar**

Laboratuvar ⁽¹⁾	Şehir	Ülke
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viyana ve Linz	Avusturya
Department Gewasbescherming	Merelbeke	Belçika
Plantedirektoratet	Lyngby	Danimarka
Central Science Laboratory	York	İngiltere
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburg	İskoçya
Laboratoire National de la Protection des Vegetaux, Unite de Bacteriologie	Angers	Fransa
Laboratoire National de la Protection des Vegetaux, Station de Quarantine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Fransa
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Almanya
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Almanya
State Laboratory	Dublin	İrlanda
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	İtalya
Regione Veneto Unita Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	İtalya
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Hollanda
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Hollanda
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lizbon	Portekiz
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	İspanya
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	İspanya
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	İsveç

⁽¹⁾ Araştırmacılarla bağlantıya geçmek için,
<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main> web sayfasına bakınız.

İlave 2

Ralstonia solanacearum*' un izolasyonu ve geliştirilmesi için besiyerleri*(a) Genel besiyerleri***Nutrient Agar (NA)*

Nutrient agar (Difco)	23.0 g
Destile su	1.0 litre

Karışımdaki maddeler eritilir. 15 dakika 121 °C de otoklavla sterilize edilir.

Yeast-Peptone-Glucose Agar (YPGA)

Yeast extract (Difco)	5.0 g
Bacto peptone(Difco)	5.0 g
D(+) Glucose (monohidrat)	10.0 g
Bacto agar (Difco)	15.0 g
Destile su	1.0 litre

Karışımdaki maddeler eritilir. 15 dakika 121 °C de otoklavla sterilize edilir.

Sucrose Peptone Agar (SPA)

Sucrose	20.0 g.
Bacto peptone(Difco)	5.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g
Bacto agar (Difco)	15.0 g
Destile su	1.0 litre
pH 7.2-7.4	

Karışımdaki maddeler eritilir. 15 dakika 121 °C de otoklavla sterilize edilir.

Kelman 'in Tetrazolium Agarı

Casamino acid (Difco)	1.0 g
Bacto peptone (Difco)	10.0 g
Dextrose	5.0 g
Bacto agar (Difco)	15.0 g
Destile su	1.0 litre

Karışımdaki maddeler eritilir. 15 dakika 121 °C de otoklavla sterilize edilir.

50 °C' ye soğutulur ve litrede 50 mg' lık bir son konsantrasyon sağlamak için 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (Sigma) nın filtre sterilize edilmiş sulu solusyonu ilave edilir.

(b) Geçerliliği onaylanmış seçici besiyerleri

SMSA besiyeri (Engelbrecht, 1994, 1996'da Elphinstone tarafından modifiye edilmiş)

Temel ortam	
Casamino asit (Difco)	1.0 g
Bacto-peptone (Difco)	10.0 g

Glycerol	5.0 ml
Bacto-Agar (Difco); Not 2'ye bakınız	15.0 g
Destile su	1.0 litre

Karışımdaki maddeler eritilir. 15 dakika 121 °C de otoklavla sterilize edilir.

50 °C ye soğutulur ve aşağıda stok solusyonları verilen maddeler filtre sterilizasyondan sonra ilave edilir:

Crystal violet (Sigma)	litrede 5 mg
Polymixin B sülfat (Sigma P-1004)	litrede 600.000 ünite (yaklaşık 100 mg)
Bacitracin (Sigma B-0125)	litrede 1250 ünite (yaklaşık 25 mg)
Chloramphenicol (Sigma C-3175)	litrede 5 mg
Penicillin – G (Sigma P-3032)	litrede 825 ünite (yaklaşık 0.5 mg)
2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (Sigma)	litrede 50 mg

Not:

1. Yukarıda verilenler dışındaki kimyasalların kullanımı *R.solanacearum*'un gelişmesini etkileyebilir.
2. *Bacto-agar (Difco)*'ın yerine *Oxoid Agar No:1* kullanılabilir. Bu durumda *R.solanacearum*'un gelişmesi daha yavaş olacaktır. *R.solanacearum*'un tipik kolonilerinin gelişimi 1-2 gün daha uzun sürebilir ve kırmızı renk daha açıktır.
3. *Bacitracin* konsantrasyonunun litrede 2500 üniteye çıkarılmasıyla, *R.solanacearum*'un gelişimi etkilenmeden saprofit bakterilerin popülasyonu azaltılabilir.

Hazırlanmış olan antibiyotik stok solusyonları ve besiyerleri karanlıkta +4 °C de depolanır ve bir ay içinde kullanılmalıdır.

Besiyerlerini kullanmadan önce petrilere oluşmuş su damlaları kurutulmalıdır.

Aşırı derecede kurumuş besiyerleri kullanılmamalıdır.

Hazırlanan yeni besiyerlerinde kalite kontrolünü yapmak için, *R.solanacearum*'un pozitif kontrolü bu besiyerlerine ekilir ve 2-5 gün süreyle 28 °C de inkubasyondan sonra tipik kolonilerin oluşup oluşmadığı gözlenir.

(c) Geçerliliği onaylanmış zenginleştirme ortamı

SMSA Broth (Elphinstone *et al.*, 1996)

Bacto-Agar ve 2, 3, 5 -tetrazolium chloride ilave etmeksizin SMSA seçici besi yeri hazırlanır.

Modifiye edilmiş Wilbrink broth (Caruso *et al.*, 2002)

Sucrose	10 g
Proteose peptone	5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄	0.25 g
NaNO ₃	0.25 g
Destile su	1 litre

15 dakika 121 °C de otoklavla sterilize edilir ve 50 °C ye soğutulur.

SMSA broth için antibiyotik stok solusyonlardan ilave edilir.

İlave 3

A. Ticari olarak satılan standart hale getirilmiş kontrol materyali(a) *Bakteriyel izolatlar*

Aşağıda verilen bakteriyel izolatların, çapraz bulaşmadan kaçınmak için, ya pozitif kontrol olarak (Tablo 1) ya da testlerin optimizasyonu sırasında (Tablo 2) standart referans materyal olarak kullanımı tavsiye edilir. Tüm strainler ticari olarak aşağıdaki merkezlerde mevcuttur:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Central Science Laboratory, York, İngiltere
2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Hollanda
3. Collection Française de Bacteries Phytopathogenes (CFBP), INRA Station Phytobacteriologie, Angers, Fransa

Tablo 1. *R.solanacearum*'un referans izolatları

NCPPB Kod	SMT	Diğer Kodlar	Orijin ülke	Biovar
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Mısır	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Türkiye	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	İngiltere	2
NCPPB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Kıbrıs	2
NCPPB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	İsveç	2
NCPPB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belçika	2
NCPPB 4156	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Hollanda	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15.59	Fransa	2
NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Portekiz	2
NCPPB 4160	69	IVIA-1632-2	İspanya	2
NCPPB 4161	76	B3B	Almanya	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	A.B.D	1
NCPPB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Kostarika	1
NCPPB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Kolombiya	2
NCPPB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPPB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brezilya	2T
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Avustralya	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Sri Lanka	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipinler	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Çin	5

(*) *R. solanacearum* biovar 2 (ırk 3)'nin standart referans straini olarak kullanılır.

Tablo 2. Tespit testlerinin optimizasyonunda kullanılan serolojik veya genetik olarak akraba bakterilerin SMT referans paneli

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

Poliklonal antiserumla serolojik testlerde (IF ve/veya ELISA) potansiyel olarak çapraz reaksiyon verebilecek strainler
⁽²⁾ PCR testinde, OLI-1 ve Y-2 spesifik primerleri kullanıldığında oluşan bantlarla aynı ölçüde bant oluşturabilecek strainler
⁽³⁾ Endonezya’da muz üzerinde sadece varlığı bildirilen ve çoğu testte çapraz reaksiyon verebilecek strain

(b) Ticari olarak mevcut standart kontrol materyal

Aşağıdaki standart kontrol materyal NCPPB kültür koleksiyonunda mevcuttur.

Tüm testlerde negatif kontrol olarak kullanılabilir 200 sağlıklı patates yumrusundan elde edilmiş patates doku ekstraktının dondurularak kurutulmuş peleti

Serolojik testlerde ve PCR’da pozitif kontrol olarak kullanılabilir *R.solanacearum* biovar 2 (strain NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857)’nin 10^3 – 10^4 ve 10^4 – 10^6 hücrelerini içeren 200 sağlıklı patates yumrusundan elde edilen patates doku ekstraktının dondurularak kurutulmuş peleti. Dondurularak kurutma sırasında hücrelerin canlılığı etkilenebildiğinden, izolasyon veya bioassay testlerinde standart kontrol olarak uygun değildir.

Serolojik testlerde pozitif kontrol olarak kullanılabilir *R.solanacearum* biovar 2 (strain NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857)’nin mililitrede 10^6 hücrelerini içeren formalinle sabitlenmiş süspansiyonları.

B. PCR/IF ve FISH tarama testlerinde kullanılacak pozitif ve negatif kontrollerin hazırlanması

R.solanacearum race 3/biovar 2 (strain NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857)’nin virulent bir straini SMSA ortamında 48 saat süreyle geliştirilir. Bu kültürden 10 mM

fosfat tampon çözelti kullanılarak mililitrede 2×10^8 olacak şekilde bir süspansiyon hazırlanır. Bu, 600 nm'de 0,15 optik yoğunluğa eşit hafif bulanıklıkta bir süspansiyondur.

R.solanacearum'dan arı olduğu bilinen beyaz kabuklu bir patates çeşidinin 200 yumrusunun göbek parçaları çıkarılır.

Göbek parçaları her zaman olduğu gibi işlenir ve pelet 10 ml ile tekrar süspansiyon edilir.

Tekrar süspansiyon edilen peletle, steril 1.5 ml'lik tüpler içinde 10 adet 900 µl'lik süspansiyonlar hazırlanır.

Birinci tüpe *R.solanacearum*'un süspansiyonundan 100 µl ilave edilir ve vortekslenir.

Bundan sonra gelen beş tüp kullanılarak 10'luk seyreltmeler hazırlanır.

Bu altı tüp pozitif kontrol olarak kullanılacaktır. Geriye kalan *R.solanacearum* bulaştırılmamış 4 tüp ise negatif kontrol olarak kullanılacaktır. Bu tüpler etiketlenir.

Her bir kontrol örneğinin 100 µl'lik 9 adet tekerrürü, steril 1.5 ml'lik tüpler içinde hazırlanır. – 20 °C'de kullanılabilecek kadar depolanır.

Kontrol örneklerinde *R.solanacearum*'un varlığı ve miktarı IF boyama yapılarak doğrulanır.

PCR testi için, pozitif ve negatif kontrol örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılır.

IF ve FISH testleri için, pozitif ve negatif kontrol örneklerinden tetleme yapılır.

IF, FISH ve PCR testleri için, *R.solanacearum*'un en az 10^6 ve 10^4 hücre/ml'si tespit edilmelidir. Negatif kontrollerde ise hiçbir hücre tespit edilmemelidir.

İlave 4

Testlerde kullanılacak tampon çözeltiler

Kural: Sterilize edilmiş ve kapakları açılmamış tampon çözeltiler bir yıl süresince saklanabilir.

1. Örnek hazırlanması için tampon çözeltiler

1.1 Ekstraksiyon tampon çözeltisi (50 mM fosfat tampon, pH 7.0)

Bu tampon; parçalama veya çalkalama yoluyla bitki dokularından bakterinin çıkartılmasında kullanılır.

Na ₂ HPO ₄ (susuz)	4.26 g
KH ₂ PO ₄	2.72 g
Destile su	1 litre

İçindekiler çözülür ve pH kontrol edilir. 15 dakika 121 °C' de otoklavda sterilize edilir.

Aşağıdaki maddelerin kullanımı tavsiye edilir:

	Amaç	Miktar (litre)
Lubrol flakes	topaklanma engelleyici (*)	0.5 g
DC Silicone antifoam	köpüklenmeyi engelleyici (*)	1.0 ml
Tetrasodiumpyrophosphate	antioksidant	1.0 g
Polyvinylpyrrolidone-40000 (PVP-40)	PCR engelleyicilerini bağlayan	50 g

(*) Ekstraksiyon metodu olarak parçalama yöntemi kullanıldığında önerilir.

1.2. Pelet tampon çözeltisi (10 mM fosfat tampon pH 7.2)

Bu tampon; patates göbek parçaları ve peletlerinin sulandırılması ve tekrar süspansiyon edilmesinde kullanılır.

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2.7 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0.4 g
Destile su	1 litre

İçindekiler çözülür ve pH kontrol edilir. 15 dakika 121 °C' de otoklavda sterilize edilir.

2. IF testi için tampon çözeltiler

2.1. IF tampon çözeltisi [10mM fosfat buffer saline (PBS) pH 7.2]

Bu tampon; antibadilerin sulandırılmasında kullanılır.

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2.7 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0.4 g
NaCl	8.0 g
Destile su	1 litre

İçindekiler çözülür ve pH kontrol edilir. 15 dakika 121 °C' de otoklavda sterilize edilir.

2.2. IF tampon çözeltisi - Tween

Bu tampon; lamların yıkanmasında kullanılır.

IF tampona % 0.1' lik Tween 20 ilave edilir.

2.3. Glycerol fosfat tampon çözeltisi, pH 7.6

Bu tampon; fluoresanı zenginleştirmek için IF lamının pencereleri üzerine konulan bir yayıcı sıvı olarak kullanılır.

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3.2 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0.15 g
Glycerol	50 ml
Destile su	100 ml

Ticari olarak mevcut olanlar: Vectashield (Vector Laboratories) veya Citifluor (Leica).

3. İndirek ELISA testi için tampon çözeltiler

3.1. Double strength coating buffer, pH 9.6.

Na ₂ CO ₃	6.36 g
NaHCO ₃	11.72 g
Destile su	1 litre

İçindekiler çözülür ve pH ölçülür. 15 dakika 121 °C de otoklavda sterilize edilir.

Eğer doku özü yüksek ölçüde aromatik bileşikler içeriyorsa, antioksidan olarak % 0.2' lik sodyum sülfid ilave edilebilir.

3.2. 10X Fosfat Buffer Saline (PBS), pH 7.4.

NaCl	80 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	29 g
KCl	2 g
Destile su	1 litre

3.3. PBS-Tween

10X PBS	100 ml
%10 Tween 20	5 ml
Destile su	895 ml

3.4. Blocking (antibody) buffer (taze olarak hazırlanmalıdır)

10X PBS	10 ml
Polyvinylpyrrolidone-44000 (PVP-44)	2.0 g
% 10 Tween 20	0.5 ml
Süt tozu	0.5 g
Destile su	100 ml'ye tamamlanır.

3.5. Alkaline phosphatase substrate solusyonu, pH 9.8.

Diethanolamine	97 ml
Destile su	800 ml

Karıştırılır ve derişik HCl ile pH 9.8' e ayarlanır.

Destile suyla 1 litreye tamamlanır.

0.2 g MgCl₂ ilave edilir.

Solusyonun her 15 ml si için 5 mg'lık iki phosphatase substrat tableti (Sigma) çözülür.

4. DASI ELISA testi için tampon çözeltiler

4.1. Coating buffer, pH 9.6.

Na ₂ CO ₃	1.59 g
---------------------------------	--------

NaHCO ₃	2.93 g
Destile su	1 litre

İçindekiler çözülür ve pH 9.6'ya ayarlanır.

4.2. 10X Fosfat Saline Buffer (PBS), pH 7.2-7.4.

NaCl	80 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	4 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	27 g
Destile su	1 litre

4.3. PBS-Tween

10X PBS	50 ml
%10 Tween 20	5 ml
Destile su	950 ml

4.4. Substrate buffer, pH 9.8.

Diethanolamine	100 ml
Destile su	900 ml

Karıştırılır ve derişik HCl ile pH 9.8' e ayarlanır.

*İlave 5***IF ve FISH testindeki bulaşma seviyesinin tespiti**

1. Her bir görüş alanındaki tipik fluoressan hücrelerin miktarı sayılır (c).
2. Her bir penceredeki tipik fluoressan hücrelerin miktarı hesaplanır (C).

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

S= Çok pencereli lamda tek bir pencerenin yüzey alanı

s= Objektif alanının yüzey alanı

$$s = \frac{\pi i^2}{4G^2K^2}$$

i = alan katsayısı (oküler tipine bağlıdır ve 8 den 24' e kadar değişir)

K = tüp katsayısı (1 veya 1.25),

G = Objektif büyütmesi (100x, 40x gibi).

3. Tekrar süspansedilen peletin mililitresindeki tipik fluoressan hücrelerin miktarını hesaplayın (N).

$$N = C \times 1000 / y \times F$$

y= Her bir penceredeki tekrar süspansedilen peletin hacmi

F= tekrar süspansedilen peletin seyreltme faktörü

İlave 6

Geçerliliği onaylanmış PCR protokolleri ve kimyasalları

Kullanılan protokol doku ekstraktı örneğinin her bir mililitresindeki $10^3 - 10^4$ *R. solanacearum* hücrelerini tespit edebilmelidir.

Ayrıca İlave 3’de yer alan bakteriyel strainler ile yanlış pozitif sonuç vermemelidir.

1. Seal et al.’ın PCR protokolü (1993)

1.1. Oligonükleotid primerler

Forward primer OLI-1 5’ - GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC – 3’

Reverse primer Y-2 5’ – CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT – 3’

R. solanacearum’un DNA’sı için beklenen bant büyüklüğü = 288 bp

1.2. PCR reaksiyon karışımı

Kimyasal	Her bir reaksiyon için kullanılacak miktar (1X)	Son konsantrasyon
Steril ultra saf su (UPW)	17,65 µl	
10X PCR buffer ⁽¹⁾ (15 mM Mg Cl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM Mg Cl ₂)
dNTP mix (20 mM)	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 polimeraz (5 U/ µl) ⁽¹⁾	0,1 µl	0,5 U
Örnek hacmi	2,0 µl	
Toplam hacim	25 µl	

⁽¹⁾ Bu metodun geçerliliği, Perkin Elmer (AmpliTaq) ve Gibco BRL marka Taq polimeraz kullanılarak onaylanmıştır.

1.3. PCR reaksiyon koşulları

Aşağıdaki program kullanılır:

- | | | |
|----------|-------|---|
| 1 döngü | (i) | 96 °C’de 2 dakika (DNA’nın parçalanması) |
| 35 döngü | (ii) | 94 °C’de 20 saniye (DNA’nın parçalanması) |
| | (iii) | 68 °C’de 20 saniye (primerlerin bağlanması) |
| | (iv) | 72 °C’de 30 saniye (kopyanın uzaması) |
| 1 döngü | (v) | 72 °C’de 10 dakika (son uzama) |
| | (vi) | 4 °C’de tutma (∞) |

Bu program, Perkin Elmer 9600 thermal cycler kullanılarak optimize edilmiştir. Thermal cycler cihazının diğer modellerinin kullanılması durumunda (ii), (iii) ve (iv) nolu döngülerin sürelerinde değişikliklere gidilebilir.

1.4. Çoğaltılan ürünün kesim enzimleriyle analizi

R.solanacearum’dan çoğaltılmış olan PCR ürünü 37 °C’de inkubasyondan sonra *Ava II* enzimiyle kesilerek farklı bir restriction fragment length polimorfizm üretir.

2. Pastrik ve Maiss'in PCR protokolü (2000)

2.1. Oligonükleotid primerler

Forward primer Ps-1 5' – AGT CGA ACG GCA GCG GGG G – 3'

Reverse primer Ps-2 5' – GGG GAT TTC ACA TCG GTC TTG CA – 3'

R. solanacearum'un DNA'sı için beklenen bant büyüklüğü = 553 bp

2.2. PCR reaksiyon karışımı

Kimyasal	Her bir reaksiyon için kullanılacak miktar (1X)	Son konsantrasyon
Steril ultra saf su (UPW)	16,025 µl	
10X PCR buffer ⁽¹⁾ (15 mM Mg Cl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM Mg Cl ₂)
BSA (fraction V) (% 10)	0,25 µl	% 0,1
dNTP mix (20 mM)	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 polimeraz (5 U/ µl) ⁽¹⁾	0,1 µl	0,5 U
Örnek hacmi	5,0 µl	
Toplam hacim	25 µl	
<p>⁽¹⁾ Bu metodun geçerliliği, Perkin Elmer (AmpliTaq) ve Gibco BRL marka Taq polimeraz kullanılarak onaylanmıştır.</p> <p>Gibco Taq Polimerazla, MJ Research PTC 200 thermocycler kullanılarak optimize edilmiştir.</p> <p>Perkin Elmer Amplitaq ve 10X PCR buffer'da aynı konsantrasyonda kullanılabilir.</p>		

2.3. PCR reaksiyon koşulları

Aşağıdaki program kullanılır:

- | | | |
|----------|-------|---|
| 1 döngü | (i) | 95 °C'de 5 dakika (DNA'nın parçalanması) |
| 35 döngü | (ii) | 95 °C'de 30 saniye (DNA'nın parçalanması) |
| | (iii) | 68 °C'de 30 saniye (primerlerin bağlanması) |
| | (iv) | 72 °C'de 45 saniye (kopyanın uzaması) |
| 1 döngü | (v) | 72 °C'de 5 dakika (son uzama) |
| | (vi) | 4 °C'de tutma (∞) |

Bu program, MJ Research PTC 200 thermocycler kullanılarak optimize edilmiştir. Thermal cyler cihazının diğer modellerinin kullanılması durumunda (ii), (iii) ve (iv) nolu döngülerin sürelerinde değişikliklere gidilebilir.

2.4. Çoğaltılan ürünün kesim enzimleriyle analizi

R. solanacearum'dan çoğaltılmış olan PCR ürünü, 65 °C'de 30 dakika inkube edilir, daha sonra *Taq* I enzimiyle kesilerek farklı bir RFLP üretir. *R. solanacearum*'a özel parçacıktan elde edilmiş bu kesim parçaları 457 bp ve 96 bp ölçüsündedir.

3. Dahili kontrol ile birlikte Multiplex PCR protokolü (Pastrik *et al.*, 2002)

3.1. Oligonükleotid primerler

Forward primer RS-1-F 5' – ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA – 3'

Reverse primer RS-1-R 5' – CCC AGT CAC GGC AGA GAC T – 3'

Forward primer NS-5-F 5' – AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G – 3'

Reverse primer NS-6-R 5' – GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC – 3'

R. solanacearum'un DNA'sı için beklenen bant büyüklüğü = 718 bp (RS primer seti ile)

18S rRNA dâhili PCR kontrolü için beklenen bant büyüklüğü = 310 bp (NS primer seti ile)

3.2. PCR reaksiyon karışımı

Kimyasal	Her bir reaksiyon için kullanılacak miktar (1X)	Son konsantrasyon
Steril ultra saf su (UPW)	12,625 µl	
10X PCR buffer ⁽¹⁾ (15 mM Mg Cl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM Mg Cl ₂)
BSA (fraction V) (% 10)	0,25 µl	% 0,1
dNTP mix (20 mM)	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-5-F (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Primer NS-6-R (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Taq polimeraz (5 U/ µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Örnek hacmi	5,0 µl	
Toplam hacim	25,0 µl	

⁽¹⁾ Bu metodun, Perkin Elmer (AmpliTaq) ve Gibco BRL marka Taq polimeraz kullanılarak geçerliliği onaylanmıştır.

⁽²⁾ NS-5-F ve NS-6-R primerlerinin konsantrasyonları, patates göbek parçalarının ekstraksiyonu için homojenizasyon metodunun kullanıldığı ve Pastrik (2000)'e göre DNA'nın saflaştırıldığı metod ile optimize edilmiştir (bakınız bölüm VI.A.6.1.a). Eğer ekstraksiyon çalkalama yoluyla yapılırsa veya diğer DNA ekstraksiyon metodları kullanılırsa, kimyasalların konsantrasyonlarında tekrar optimizasyona ihtiyaç duyulabilir.

3.3 PCR reaksiyon koşulları

Aşağıdaki program kullanılır:

- | | | |
|----------|-------|---|
| 1 döngü | (i) | 95 °C'de 5 dakika (DNA'nın parçalanması) |
| 35 döngü | (ii) | 95 °C'de 30 saniye (DNA'nın parçalanması) |
| | (iii) | 58 °C'de 30 saniye (primerlerin bağlanması) |
| | (iv) | 72 °C'de 45 saniye (kopyanın uzaması) |
| | (v) | 72 °C'de 5 dakika (son uzama) |
| 1 döngü | (vi) | 4 °C'de tutma (∞) |

Bu program, MJ Research PTC 200 thermocycler kullanılarak optimize edilmiştir. Thermal cycler cihazının diğer modellerinin kullanılması durumunda (ii), (iii) ve (iv) nolu döngülerin sürelerinde değişikliklere gidilebilir.

3.4. Çoğaltılan ürünün kesim enzimleriyle analizi

R.solanacearum'dan çoğaltılmış olan PCR ürünü, 65 °C'de 30 dakika inkube edilir, daha sonra *Bsm* I veya bir Isoschizomere (örneğin *Mva* 1269 I) enzimiyle kesilerek farklı bir RFLP üretir.

4. *R.solanacearum*'un biovarlarına özel PCR protokolü (Patrik *et al.*, 2001)

4.1. Oligonükleotid primerler

Forward primer RS-1-F 5' – ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA – 3'

Reverse primer RS-1-R 5' – CCC AGT CAC GGC AGA GAC T – 3'

Reverse primer RS-3-R 5' – TTC ACG GCA AGA TCG CTC – 3'

R. solanacearum'un DNA'sı için beklenen bant büyüklüğü:

RS-1-F/RS-1-R ile = 718 bp

RS-1-F/RS-3-R ile = 716 bp

4.2. PCR reaksiyon karışımı

(a) Biovar 1 ve 2'ye özel PCR

Kimyasal	Her bir reaksiyon için kullanılacak miktar (1X)	Son konsantrasyon
Steril ultra saf su (UPW)	12,925 µl	
10X PCR buffer ⁽¹⁾ (15 mM Mg Cl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM Mg Cl ₂)
BSA (fraction V) (% 10)	0,25 µl	% 0,1
dNTP mix (20 mM)	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 polimeraz (5 U/ µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Örnek hacmi	5,0 µl	
Toplam hacim	25,0 µl	
⁽¹⁾ Bu metodun, Perkin Elmer (AmpliTaq) ve Gibco BRL marka Taq polimeraz kullanılarak geçerliliği onaylanmıştır.		

(b) Biovar 3, 4 ve 5'e özel PCR

Kimyasal	Her bir reaksiyon için kullanılacak miktar (1X)	Son konsantrasyon
Steril ultra saf su (UPW)	14,925 µl	
10X PCR buffer ⁽¹⁾ (15 mM Mg Cl ₂)	2,5 µl	1X (1,5 mM Mg Cl ₂)
BSA (fraction V) (% 10)	0,25 µl	% 0,1
dNTP mix (20 mM)	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 polimeraz (5 U/ µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Örnek hacmi	5,0 µl	
Toplam hacim	25,0 µl	
⁽¹⁾ Bu metodun, Perkin Elmer (AmpliTaq) ve Gibco BRL marka Taq polimeraz kullanılarak geçerliliği onaylanmıştır.		

4.3 PCR reaksiyon koşulları

Aşağıdaki program tüm biovara özel PCR'da kullanılır:

1 döngü	(i)	95 °C'de 5 dakika (DNA'nın parçalanması)
35 döngü	(ii)	95 °C'de 30 saniye (DNA'nın parçalanması)
	(iii)	58 °C'de 30 saniye (primerlerin bağlanması)
	(iv)	72 °C'de 45 saniye (kopyanın uzaması)
1 döngü	(v)	72 °C'de 5 dakika (son uzama)
	(vi)	4 °C'de tutma (∞)

Bu program, MJ Research PTC 200 thermocycler kullanılarak optimize edilmiştir. Thermal cycler cihazının diğer modellerinin kullanılması durumunda (ii), (iii) ve (iv) nolu döngülerin sürelerinde değişikliklere gidilebilir.

4.4. Çoğaltılan ürünün kesim enzimleriyle analizi

RS-1-F ve RS-1-R primerleri kullanılarak, *R.solanacearum*'dan çoğaltılmış olan PCR ürünü, 65 °C'de 30 dakika inkube edilir, daha sonra *Bsm* I veya bir Isoschizomere (örneğin *Mva* 1269 I) enzimiyle kesilerek farklı bir RFLP üretir. RS-1-F ve RS-3-R primerleri kullanılarak, *R.solanacearum*'dan çoğaltılmış olan PCR ürününün kesim bölgesi yoktur.

5. Yükleme tampon çözeltisinin hazırlanması

5.1. Bromphenol blue (% 10 stok solusyon)

Bromphenol blue	5 g
Bidestile su	50 ml

5.2. Yükleme tampon çözeltisi

Glycerol (% 86)	3,5 ml
Bromphenol blue (5,1)	300 µl
Bidestile su	6,2 ml

6. 10X Tris Acetate EDTA (TAE) tampon çözelti, pH 8.0

Tris buffer	48,40 g
Glacial acetic acid	11,42 ml
EDTA (disodyum tuzu)	3,72 g
Destile su	1,00 L

Kullanmadan önce 1X olacak şekilde sulandırılır.

Bu tampon çözelti hazır olarakta satılmaktadır (örneğin İnvitrogen veya eşdeğeri)

İlave 7

FISH testi için geçerliliği onaylanmış kimyasallar**1. Oligo problemler**

R.solanacearum'a özel prob OLI-1-CY3: 5'-GGC AGG TAG CAA GCT ACC CCC – 3'
Spesifik olmayan öbakteriyel prob EUB-338-FITC: 5'-GCT GCC TCC CGT AGG
AGT– 3'

2. Sabitleyici solusyon

(DİKKAT! SABİTLEYİCİ; TOKSİK BİR MADDE OLAN PARAFORMALDEHİT İÇERİR. ELDİVEN GİYEREK ÇALIŞINIZ VE BU MADDEYİ SOLUMAYINIZ. ÇEKER OCAK İÇERİSİNDE ÇALIŞILMASI TAVSİYE EDİLİR.)

- (i) Moleküler çalışmalarda kullanılan suyun (örneğin ultra saf su, UPW) 9 ml'si 60 °C civarında ısıtılır ve 0,4 g paraformaldehit ilave edilir. Paraformaldehit, 1 N NaOH'in 5 damlası ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcıyla karıştırmaya devam edilirken çözülür.
- (ii) 0,1 M fosfat tampon çözelti (PB; pH 7.0)'nin 1 ml'si ve 5 damla 1 N NaOH ilave ederek pH 7.0'ye ayarlanır. pH, bir strip kullanılarak (turnusol kâğıdı benzeri) kontrol edilir ve eğer gerekliyse HCl veya NaOH ile ayarlama yapılır.

(DİKKAT! PARAFORMALDEHİT İÇEREN SOLUSYONLARLA ÇALIŞIRKEN pH METRE KULLANMAYINIZ.)

- (iii) 0,22 µm'lik membrane filtreden solusyon geçirilir ve kullanılana kadar +4 °C'de toz almayacak şekilde muhafaza edilir.

3. 3X Hybmix

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (filtre steril edilmiş ve otoklavlanmış)	15 mM

Kullanılacak miktar kadar 1X şeklinde seyreltilir.

4. Hibridizasyon solusyonu

1X Hybmix	
Sodyum dodecyl sülfat (SDS)	% 0,01
Formamide	% 30
Prob EUB 338	5 ng/ µl
Prob OLI-1 veya OLI-2	5 ng/ µl

Tablo 1'de yer alan hesaplamalara göre hibridizasyon solusyonunu hazırlanır. Her bir lam için (2 farklı örnek içeren) 90 µl hibridizasyon solusyonuna ihtiyaç vardır.

ÖNEMLİ: FORMAMİDE ÇOK TOKSİKTİR. BU NEDENLE ELDİVENLERİNİZİ GİYİNİZ VE ÇALIŞIRKEN GEREKLİ GÜVENLİK TEDBİRLERİNİ ALINIZ!

Tablo 1. Hibridizasyon karışımının hazırlanması için tavsiye edilen miktarlar

Lamların sayısı	1	4	6	8	10
Steril ultra saf su	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3x hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
% 1 SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamide	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Probe EUB 338 (100 ng/ μ l)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Prob OLI-1 veya OLI-2 (100 ng/ μ l)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Toplam hacim (μ l)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0
Işığa hassas olan oligo problemleri içeren tüm solusyonlar karanlıkta – 20 °C’de depolanır. Kullanım sırasında direk gün ışığı veya elektrik kaynaklı ışıktan uzak tutulur.					

5. 0,1 M Fosfat tampon çözelti, pH 7,0

Na₂HPO₄ 8,52 g

KH₂PO₄ 5,44 g

Destile su 1,00 L

Kimyasallar çözülür, pH kontrol edilir ve 15 dakika süreyle 121 °C’de otoklavda steril edilir.

*İlave 8***Patlıcan ve domates kültürü**

Domates (*Lycopersicon esculentum*) ve patlıcan (*Solanum melongena*) tohumları pastörize edilmiş tohum kompostuna ekilir. Kotiledon yaprakların tam olarak açıldığı dönemde (10-14 günlük) fideler pastörize edilmiş karışım içeren saksılara şaşırtılır.

İnokule edilmeden önce, patlıcan veya domates bitkileri aşağıda yer alan koşullarda serada yetiştirilir:

Gün uzunluğu	14 saat veya doğal gün ışığı varsa daha uzun
Sıcaklık	gündüz 21-24 °C, gece 14-18 °C,
Hassas domates çeşidi	“Moneymaker”
Hassas patlıcan çeşidi	“Black Beauty”
Temin edici sayfasına bakınız	http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main web

EK III

1. *R.solanacearum*'un konukçusu olan ve bu yönetmelikte belirtilen, domates ve patates bitkisel materyali ve diğer tüm materyal, *EK II*'de yer alan uygun tarama testlerinden biri ile analiz edilmeli ve eğer şüpheli bir durum tespit edilirse aşağıdaki işlemler yapılmalıdır:
Şüpheli durum doğrulanana veya reddedilene kadar aşağıda yer alan materyal uygun saklama koşulları olan bir yerde bekletilmelidir:
 - tüm yumru örnekleri ve eğer mümkünse toplanan tüm bitkiler,
 - kalan doku özü örnekleri ve tarama testleri için hazırlanmış olan materyal (örneğin Immunofluoresan test lamaları gibi) ve,
 - ilgili olan diğer tüm dökümanlar.Yumrulardan geriye kalanlar uygun durumlarda çeşit testleme denemelerine alınabilir.
2. Şüpheli durum doğrulanıp, *R.solanacearum*'la bulaşıklık kesin olarak belirlendiğinde ve bu Yönetmeliğin 10 (4) maddesinde belirtilen bildirim yapıldıktan sonra, en az bir ay süreyle aşağıda yer alan materyal uygun saklama koşulları olan bir yerde bekletilmelidir:
 - birinci paragrafta yer alan materyal,
 - eğer saklayabilecek koşullar mevcutsa, yumru veya bitki özleri ile inokule edilmiş patlıcan veya domates bitkilerinin bir örneği,
 - zararlı organizmanın izole edilmiş kültürü.

EK IV

Bu Yönetmeliğin 10 (1) (a) maddesinde yer alan bulaşık alanlar ve bu alanlardaki bulaşmanın ne ölçüde olduğunu belirlemek için araştırılması gerekenler aşağıda yer almaktadır:

(i) Üretim yerleri için kontrol edilmesi gerekenler:

- *R.solanacearum*'la enfekteli olduğu tespit edilmiş patateslerle klonal olarak akraba olan hasat edilmiş veya hala tarlada olup hasat edilmemiş olan patatesler,
- *R.solanacearum*'la enfekteli olduğu tespit edilmiş domateslerle aynı kaynaktan gelen (aynı tohum lotu, aynı fidelikte yetiştirilmiş domatesler gibi) hasat edilmiş veya hala yetiştirilmekte olan domatesler,
- *R.solanacearum* açısından şüpheli bir durum söz konusu olduğu için, resmi kontrol altına alınmış olan yerlerdeki hasat edilmiş veya hasat edilmemiş domates veya patatesler,
- *R.solanacearum*'la bulaşık olduğu tespit edilmiş üretim yerlerinde yetiştirilen patateslerle klonal olarak akraba olan, hasat edilmiş veya hala tarlada olup hasat edilmemiş olan patatesler,
- *R.solanacearum*'la bulaşık olduğu tespit edilmiş üretim yerlerine komşu olan yerlerde yetiştirilen patates veya domatesler, ayrıca bulaşık olduğu belirlenmiş olan üretim yerleriyle direk olarak veya herhangi bir anlaşma yaparak aynı ekipman ve olanakları paylaşmış veya kullanmış üretim yerleri,
- eğer bir yüzey suyunun (nehir, ırmak, sulama kanalı vb.) *R.solanacearum*'la bulaşık olduğu doğrulanmış veya henüz şüpheli durum devam ediyorsa, bu yüzey sularını sulama veya ilaçlama amaçlı olarak kullanan yerler,
- *R.solanacearum*'la bulaşık olduğu doğrulanmış veya henüz şüpheli durumun devam ettiği üretim yerleriyle ortak olarak aynı kaynaktan gelen yüzey suyunu sulama veya ilaçlama amaçlı olarak kullanan yerler,
- *R.solanacearum*'la bulaşık olduğu doğrulanmış veya henüz şüpheli durumun devam ettiği yüzey suyunun herhangi bir nedenle taşması sonucu su baskınına uğramış yerler,

ve

(ii) *R.solanacearum*'la bulaşık olduğu doğrulanmış üretim yerleri veya taşkına maruz kalmış tarlaların sulanması veya ilaçlamasında kullanılan yüzey suyunun araştırılması gerekmektedir.

EK V

1. Bu Yönetmeliğin 10 (1) (c) ve 10 (3) (c) maddelerine göre; olası bulaşıklığın büyüklüğünü belirlemek için araştırılması gerekenler aşağıda yer almaktadır:
 - bu Yönetmeliğin 10 (1) (b) maddesine göre bulaşık olduğu kabul edilmiş üretim yerlerinde yetiştirilmiş olan listelenmiş bitkisel materyal (*Solanum tuberosum*'un, yumrular dâhil, tohum hariç bitkileri; *Lycopersicon lycopersicum*'un tohum ve meyve hariç bitkileri),
 - bu Yönetmeliğin 10 (1) (b) maddesine göre *R.solanacearum*'la bulaşık olduğu kabul edilmiş listelenmiş bitkisel materyalle üretim bağlantısına sahip üretim yerleri, bu bağlantı; direk olarak veya herhangi bir anlaşma yapılarak aynı ekipman ve olanakları paylaşmış veya kullanmış olan üretim yerlerini de kapsamaktadır,
 - bir önceki paragrafta belirtilen yerlerde üretilen listelenmiş bitkisel materyal veya bu Yönetmeliğin 10 (1) (b) maddesine göre bulaşık olduğu kabul edilmiş üretim yerlerinde yetiştirilmiş, bu bölümün ilk paragrafında sözü edilen listelenmiş bitkisel materyal,
 - yukarıda yer alan paragraflarda belirtilen üretim yerlerinde yetiştirilmiş olan listelenmiş bitkisel materyalin işlendiği yerler (bina, depo vb),
 - bu Yönetmeliğin 10 (1) (b) maddesine göre bulaşık olduğu kabul edilmiş üretim yerlerinde yetiştirilmiş olan listelenmiş bitkisel materyalle temas etmiş veya etme riski bulunan makine, araç, depo veya diğer binalar ve paketlenme materyalini de içeren diğer materyal,
 - bir önceki paragrafta belirtilen binalar ve materyal temizlenmeden ve dezenfekte edilmeden önce, bu bu binalarda depolanmış veya bu gibi materyalle temas etmiş listelenmiş bitkisel materyalin tamamı,
 - bu Yönetmeliğin 10 (1) (b) maddesine göre bulaşık olduğu kabul edilmiş listelenmiş bitkisel materyalle, klonal akrabalık ilişkisi bulunan patates yumru ve bitkileri ve aynı kaynaktan gelen domates bitkilerinin test sonuçları negatif çıksa bile, klonal akrabalık nedeniyle bulaşıklık ihtimali olduğu düşünülür. Bu gibi materyal bulaşmayı teyit etmek ve klonal olarak akraba olduklarını belirlemek amacıyla çeşit testlemesine tabi tutulabilir,
 - bir önceki paragrafta belirtilen listelenmiş bitkisel materyalin üretim yerleri,
 - bu Yönetmeliğin 10 (3) (b) maddesine göre bulaşık suyun, ilaçlama veya sulama amaçlı kullanıldığı listelenmiş bitkisel materyalin üretim yerleri,
 - *R.solanacearum*'la bulaşık olduğu doğrulanmış yüzey sularının taşmasına, ya da bu suların oluşturduğu baskınlara maruz kalmış listelenen bitkisel materyalin üretildiği tarlalar,
2. Bu Yönetmeliğin 10 (1) (ç) ve 10 (3) (c) maddelerine göre olası yayılma tespit edilirken göz önünde bulundurulması gereken hususlar aşağıda yer almaktadır:
 - (i) bu Yönetmeliğin 10 (1) (ç) maddesine göre;
 - listelenmiş bitkisel materyalin yetiştirildiği diğer üretim yerlerinin yakınlığı,
 - tohumluk patates stoklarının yaygın üretimi ve kullanımı,
 - bu Yönetmeliğin 10 (1) (b) maddesine göre bulaşık olduğu kabul edilmiş üretim yerlerinde yaşanan su baskını sonucu bulaşmış olan sular veya riskli akarsularla sulanmış ya da ilaçlanmış listelenen bitkisel materyalin yetiştirildiği üretim yerleri,

- (ii) bu Yönetmeliğin 10 (3) (c) maddesine göre bulaşık olduğu belirlenen yüzey suları söz konusu ise;
- bulaşık olduğu belirlenen yüzey sularına yakın veya su baskını riski altında olan üretim alanları,
 - bulaşık olduğu belirlenen yüzey suları ile birleşen herhangi farklı bir sulama havzası,
 - bulaşık olduğu belirlenen yüzey sularıyla bağlantılı olan su kaynakları incelenirken dikkate alınması gereken hususlar aşağıda verilmiştir:
 - bulaşık olduğu belirlenen suyun akış yönü ve oranı,
 - *R.solanacearum*'un konukçusu olan yabancı Solanaceae bitkilerinin suda ve kenar bölgelerde bulunması.
3. Bakanlığa, bu Yönetmeliğin 10 (4) maddesinde yer alan bildirimler yapılırken verilmesi gereken ayrıntılar şunlardır:
- *EK II*'de yer alan metotlar kullanılarak yapılan laboratuvar testleri sonucu *R.solanacearum*'un varlığı tespit edilir edilmez acil olarak yapılması gerekenler:
 - patatesler için,
 - (a) lotun çeşit ismi,
 - (b) çeşidi (yemeklik mi, tohumluk mu vb.) ve eğer biliniyorsa tohumluk sınıfı
 - domatesler için ise, lotun çeşit ismi ve eğer biliniyorsa sınıfı.
4. Bakanlığa, bu Yönetmeliğin 10 (4) maddesinde yer alan ilave bildirimler yapılırken verilmesi gereken ayrıntılar şunlardır:
- Tüm araştırmalar sonuçlandıktan sonra,
- (a) bulaşmanın teyit edildiği tarih,
 - (b) bulaşmanın kaynağı ve yayılışını tespit ederken yürütülen çalışmalara ilişkin olarak kısa bir bilgi,
 - (c) bulaşmanın belirlenen ya da tahmin edilen kaynağı hakkında bilgi,
 - (d) bulaşmanın büyüklüğünü ortaya koyan detaylar (üretim yerlerinin sayısı, patatesler için lotların sayısı ve eğer tohumluk patates ise sınıfı),
 - (e) çalışmalar sonucunda bulaşık olarak belirlenmese de sınırlandırma bölgesi içinde kalan yerlere ilişkin bilgiler,
 - (f) bulaşık olduğu belirlenen su kaynağının yeri, ismi, sulama için yasaklanan su kaynaklarının uzunluğu.

EK VI

1. Bu Yönetmeliğin 11 (1) maddesinde sözü edilen bulaşık olduğu belirlenmiş olan bitkisel materyalin eradikasyonu için uygulanabilecek yöntemler aşağıda verilmiştir:

- *R.solanacearum*'un canlı kalmayacağı şekilde bitkisel materyali bir ısıtma işleminden geçirdikten sonra, hayvan yemi olarak kullanarak,

veya

- tarımsal alanlara sızıntı riski olmayan veya tarımsal alanların sulanmasında kullanılan su kaynaklarıyla temas etmeyecek resmi olarak onay verilmiş yerlere derin şekilde gömerek,

veya

- çöp fırınlarında yakarak,

veya

- *R.solanacearum*'un yayılması için risk teşkil etmeyecek, resmi olarak onaylanmış atık tesisleri bulunan ve nakliyyede kullanılan araçların dezenfeksiyonu ve temizlenmesi için de bir sistemi olan endüstriyel işleme tesislerine bitkisel materyalin direk ve acil olarak nakliye edip, burada işleyerek,

veya

- organizmanın yayılma riskinin olmayacağı diğer bir metot da kullanılabilir. Ancak yeni önerilen bu metot uygulanmadan önce, metodun uygulanabilirliği ve etkinliği ile ilgili Bakanlık'tan görüş alınmalıdır.

Yukarıda yer alan durumlar nedeniyle ortaya çıkabilecek ve bunlarla birlikte bulunabilen herhangi bir diğer atık ise, bu yönetmeliğin *EK VII*'sinde yer alan resmi olarak onaylanmış metotlardan biriyle imha edilmelidir.

2. Bu Yönetmeliğin 12 (1) maddesinde belirtilen listelenmiş bitkisel materyalin elden çıkarılması veya uygun bir şekilde kullanılması için Bakanlık'la iletişim kurulmalı ve bu işlemler yapılırken birinci ve ikinci paragraflarda belirtilen Bakanlıkça onaylanmış tesislerde paketlenerek satılacak veya çöp atık tesislerinde işlenecek patatesler kontrol edilmelidir.

(i) Patates yumruları için,

- sofralık patates olarak kullanılır ve uygun çöp atık sistemi olan tesislerde paketlenerek direk olarak dağıtıma verilir. Aynı yerde temizleme ve dezenfeksiyondan sonra veya ayrı bir alanda dikim amaçlı patateslerde işlenebilir,

veya

- atık arıtma sistemi olan patates işleme tesislerinde sanayi patatesi olarak kullanılır,

veya

- organizmanın yayılmasıyla ilgili belirgin bir riski olmayan ve resmi makamlarca kabul edilen farklı bir şekilde de kullanılabilir.

(ii) Gövde ve yaprak artıklarını içeren diğer bitki parçaları,

- imha,

veya

- organizmanın yayılması konusunda risk yaratmayacak diğer bir yöntem kullanılabilir.

3. Bu Yönetmeliğin 13 (1) maddesinde ifade edilen araç ve objeler Bakanlığın gözetiminde organizmanın yayılmasına olanak vermeyecek şekilde dezenfekte edilir veya temizlenir.
4. Bu Yönetmeliğin 14 (1) maddesinde ifade edilen ve 10 (1) (ç) ve 10 (3) (c) maddelerine göre sınırlandırılmış bölgede uygulanan önlemler dizisi şunları içermelidir:
 - 4.1. Bu Yönetmeliğin 10 (1) (b) maddesine göre bulaşık olduğu kabul edilmiş üretim yerlerinde uygulanacak önlemler:
 - (a) Bu Yönetmeliğin 10 (1) (b) maddesine göre bulaşık olduğu belirlenen tarla veya örtü altı üretim yerinde,
 - ya,
 - (i) bulaşmanın tespitinden sonraki en az 4 üretim yılı boyunca,
 - kendigelen patates ve domates bitkileri ile Solanaceae yabancı otları dâhil diğer konukçu bitkilerin tamamen yok edilmesi için önlemler alınır,
 - ve
 - aşağıdakiler ekilmez:
 - patates yumruları, bitkileri veya gerçek tohumları,
 - domates bitki ve tohumları,
 - organizmanın biyolojisi de dikkate alınarak,
 - diğer konukçu bitkiler,
 - organizmanın üzerinde yaşama riski bulunduğu Brassicaceae türü bitkiler,
 - organizmanın yayılmasında etkili olabilecek diğer bitkiler;
 - bir önceki bölümde belirtilmiş olan en az 4 yıllık süreyi takip eden ilk domates veya patates üretim sezonunda (tarlanın kendi gelen domates ve patates bitkilerinden ve Solanaceae' ler dahil diğer konukçu bitkilerden dikimden önceki en az iki yıl boyunca temiz olması durumunda),
 - bu alanlarda sadece yemeklik patates ekimine izin verilir,
 - hasat edilen patates yumruları veya domates bitkileri *EK II*'de yer alan uygun metotlar kullanılarak testlenir;
 - ve bir önceki paragrafta sözü edilen patates veya domates üretim sezonunu izleyen ve uygun bir münavebeyi takip eden üretim sezonunda eğer tohumluk patates yetiştirilecekse, en az iki yıl süreyle bu Yönetmeliğin 5 (1) ve (2) maddelerinde belirtilen sürveyler yürütülür;
 - ya da,
 - (ii) bulaşmanın belirlenmesini takip eden 5 üretim yılı boyunca,
 - kendigelen patates ve domates bitkileri ile Solanaceae yabancı otları dâhil diğer konukçu bitkilerin tamamen yok edilmesi için önlemler alınır,
 - ve
 - tarla, ilk 3 yıl boyunca ya nadasa bırakılır ya da tanımlanan riske göre hububat ekilir veya yem bitkileri ile kalıcı bir mera, otlak kurulur ya da tohumluk üretimi için çim ekilir, bunu takip eden iki yıl süresince de organizmanın konukçusu olmayan ve onun canlılığını sürdürmesi veya yayılmasında etkili olmayan bitkiler ekilir,

- bir önceki paragrafta belirtilen süreyi takip eden ilk patates veya domates üretim mevsiminde ve dikimden önceki birbirini takip eden en az iki yıl süreyle yapılan resmi kontroller sonucunda kendi gelen patates ve domates bitkileri ve solanaceae familyasından yabancı otları da içeren diğer konukçu bitkilerden tarlanın ari bulunması durumunda,
 - tohumluk veya yemeklik patates üretimi yapılabilir,
 - hasat edilen patates yumruları veya domates bitkileri *EK II*'de yer alan uygun metotlar kullanılarak testlenir;
- (b) bulaşık üretim alanlarındaki diğer tüm tarlalarda ve kendi gelen patates ve domates bitkileri ve solanaceae familyasından yabancı otları da içeren diğer konukçu bitkilerin risk oluşturduğunun resmi kurumlar tarafından belirlendiği durumlarda:
 - belirlenen bulaşmayı takip eden üretim yılında, ya
 - patates yumruları, bitkileri, gerçek tohumları ve organizmanın konukçusu olan diğer bitkiler yetiştirilmez,
 - ya da,
 - sadece sertifikalı tohumluk kullanılarak yemeklik patates üretilebilir,
 - domateste ise, sadece tüketim amaçlı domatesler yetiştirilebilir. Fide amaçlı üretim bu alanda yapılamaz;
 - belirlenen bulaşmayı takip eden ikinci üretim yılında,
 - patates için; 4.1.'de sözü edilen üretim alanları dışındaki tarlalarda, resmi kontrol altında yetiştirilmiş ve kahverengi çürüklük hastalığı yönünden test edilmiş tohumluk patatesler veya sertifikalı tohumluk patatesler, ya tohumluk ya da tüketim amaçlı olarak dikilebilir,
 - domates için; hem fide hem de tüketim amaçlı domates ekilebilir. Bitki sağlığı yönünden laboratuvar testleri yapılmış tohumlar kullanılmalıdır. Eğer vejetatif olarak çoğaltılacaksa, kullanılacak bitkiler 4.1.'de sözü edilen üretim alanları haricindeki yerlerde resmi kontrol altında yetiştirilmiş ve laboratuvar testleri yapılmış tohumlardan üretilmiş olmalıdır.
 - belirlenen bulaşmayı takip eden üçüncü üretim yılında,
 - sadece sertifikalı tohumluk patatesler kullanılarak ya tohumluk ya da yemeklik olarak patates yetiştirilebilir.
 - domates için; hem fide hem de tüketim amaçlı domates yetiştirilebilir. Bitki sağlığı yönünden laboratuvar testleri yapılmış tohumlar veya resmi kontrol altında yetiştirilmiş domates bitkileri kullanılarak bu üretim yapılmalıdır.
 - Yukarıda yer alan üretim sezonlarının her birinde, kendi gelen patates bitkileri ve organizmanın doğal olarak bulunduğu diğer konukçu bitkilerin yok edilmesi için gerekli tedbirler alınmalıdır. Eğer bu bitkiler mevcutsa, mutlaka uygun zamanlarda resmi kontroller tarlalarda yapılmalı ve her bir patates tarlasından hasat edilen yumrular *EK II*'de yer alan metotlara göre test edilmelidir.
- (c) Bu Yönetmeliğin 10 (1) (b) maddesine göre bulaşıklık tespit edildiğinde acil olarak ve bunu takip eden ilk yetiştirme sezonunda:

- patates veya domates üretiminde kullanılan tüm makine, alet ve depolama alanları temizliğe tabi tutulur ve mümkün olduğu takdirde *EK VI (3)*'e göre uygun bir dezenfektan ile muamele edilir,
 - organizmanın yayılmasını önlemek için sulama ve ilaçlama programları kontrol edilir, gerekli görülürse yasaklanır.
- (d) Örtü altı üretim yerlerinde, bu Yönetmeliğin 10 (1) (b) maddesine göre bulaşıklık tespit edildiğinde ve üretim ortamının tamamen değiştirilmesi mümkün olduğu durumlarda,
- organizmanın tamamen yok edildiği ve tüm konukçu bitkilerin uzaklaştırılarak üretim ortamının tamamen değiştirilip temizlendiği ve üretim yerindeki tüm alet ve ekipmanların dezenfekte edildiği resmi olarak onaylanmadıkça, tohumları dahil domates bitkileri ve patates bitkileriyle yumruları ve organizmanın konukçusu diğer bitkiler yetiştirilemez,
- ve
- patates üretimi için, sertifikalı tohumluk veya test edilmiş mini yumru veya mikro bitkiler kullanılmalıdır,
 - domates üretimi için, bitki sağlığı yönünden laboratuvar testleri yapılmış tohumlar kullanılmalıdır. Eğer vejetatif olarak çoğaltılacaksa, kullanılacak bitkiler resmi kontrol altında yetiştirilmiş ve laboratuvar testleri yapılmış tohumlardan üretilmiş olmalıdır,
 - organizmanın yayılmasını önlemek için sulama ve ilaçlama programları kontrol edilir, gerekli görülürse yasaklanır.

4.2. Sınırları çizilen bölge içinde, *EK VI 4.1* de detaylandırılan önlemlere bakılmaksızın, Üye Devletler:

- (a) bulaşıklık tespit edildiğinde acil olarak, patates veya domates üretiminde kullanılan tüm makine, alet ve depolama alanlarını temizliğe tabi tutar ve mümkün olduğu takdirde *EK VI (3)*' e göre uygun bir dezenfektan ile muamele eder,
- (b) bulaşıklık tespit edildiğinde acil olarak ve bunu izleyen en az 3 yıl boyunca:
- (ba) bu Yönetmeliğin 10 (1) (ç) maddesine göre belirlenen, sınırları çizilmiş bölgede,
- patates yumruları veya domateslerin işlenmesi, depolanması, yetiştirilmesinde kullanılan yerler ve buralarda kullanılan makinelerin sorumlu resmi kurumların denetimi altında bulundurulduğunu garanti eder,
 - sınırları çizilmiş bu bölge içinde sadece sertifikalı tohumluk veya resmi kontrol altında yetiştirilmiş tohumlukların dikimine müsaade eder ve bu Yönetmeliğin 10 (1) (c) maddesine göre bulaşma olasılığı olan üretim yerlerinde yetiştirilen tohumluk patates bitkilerini hasattan sonra test eder,
 - bu bölge içinde hasat edilen tüm tohumluk stoklarının yemeklik patateslerden ayrı bir yerde işleme tabi tutulmasını sağlar, ya da uygun olan yerlerde tohumluk ve yemeklik patateslerin işlenmesi sırasında birinden diğerine geçerken uygun bir dezenfeksiyon programı uygular,

- domates üretimi için; sınırlandırılmış bölgede bitki sağlığı yönünden laboratuvar testleri yapılmış tohumların kullanılmasını sağlar, ya da eğer vejetatif olarak çoğaltılacaksa, kullanılacak bitkiler resmi kontrol altında yetiştirilmiş ve laboratuvar testleri yapılmış tohumlardan üretilmiş olmalıdır,
 - bu Yönetmeliğin 5 (1) maddesinde belirlenen veya belirtilen sürveyleri yürütür;
- (bb) bu Yönetmeliğin 10 (1) (b) maddesine göre bulaşık olduğu bilinen, *EK V* (2)'ye göre organizmanın olası yayılmasında rol alabilecek yüzey suyu ile ilgili olarak;
- yüzey suyundan uygun zamanda örneklemeler yaparak yıllık sürveyleri yürütür. Bu sürveylerde ayrıca su kaynaklarının kenarlarında ya da içinde bulunan organizmanın konukçusu olan Solanaceae konukçu bitkilerinden de örnekleme yapar ve bu bitkileri *EK II*'de yer alan metotları kullanarak test eder,
 - organizmanın yayılmasını önlemek için sulama ve ilaçlama programları kontrol edilir, gerekli görülürse listelenmiş bitkisel materyalin ilaçlanması ve sulanması da dâhil olmak üzere kullanımı yasaklanır. Bu yasaklama, yıllık sürvey sonuçları gözden geçirilerek uzatılabilir ya da sonuçlar bulaşmanın ortadan kalktığını gösteriyorsa sonlandırılabilir. Kullanımı yasaklanan su, resmi olarak onaylanmış bazı teknikler (kimyasal uygulaması, ultraviyole uygulaması gibi) uygulanarak organizmadan arındırılabilirse, resmi makamların gözetimi altında yeniden sulama ve ilaçlama için kullanılabilir,
 - sıvı atıkların bulaşık olduğu yerlerde, domates ve patates bitkilerinin işleme tesislerinden boşaltılan sıvı ve katı atıklar üzerinde de resmi kontrolleri yürütür;
- (c) uygun bir zaman dilimi içinde tüm tohumluk patates stoklarını yenilemek için bir program başlatır.

EK VII

EK VI'nın birinci paragrafında yer alan resmi olarak onaylanmış atık imha metotları aşağıda yer alan koşulları karşılamalıdır:

(i) Patates ve domates atıkları (bulaşık bulunan patatesler ve kabukları ve domatesler) ve patates ve domatesle birlikte bulunabilen diğer katı atıklar (toprak, taş ve buna benzer diğer atıklar) aşağıda yer alan metotlardan ya,

- çevreye yayılma riski bulunmayan bir yere gömülerek imha edilmelidir (özellikle tarım alanlarına yakın olmayan ve bu alanlara sızıntı riski bulunmayan yerler). Atıkların gömüleceği yerin resmi olarak onaylanmış olması gerekmektedir. Atığın bu alana nakledilmesi sırasında, herhangi bir şekilde çevreye dökülmesi ve dağılması engellenmelidir,

veya

- yakarak,

veya

- organizmanın yayılmasına neden olmayacak diğer tedbirlerden biri uygulanarak imha edilmelidir. Ancak yeni önerilen bu metot uygulanmadan önce, metodun uygulanabilirliği ve etkinliği ile ilgili Bakanlık'tan görüş alınmalıdır.

(ii) sıvı atıklar imha edilmeden önce, içlerinde bulunabilecek katı atık parçalarından temizlenmelidir (filtre edilerek ya da çöktürme işlemiyle). Bu katı atıklar da yukarıda yer alan alt paragraf (i)'deki metotlardan biri kullanılarak imha edilmelidir.

Katı atık parçalarından temizlenmiş olan sıvı atıkların zararlı organizmadan arındırılması için aşağıda yer alan metotlardan biri uygulanır:

- en az yarım saat süreyle sıvı atığın her yerinde minimum 60 °C'lık bir sıcaklık olacak şekilde ısıtılarak, zararlı organizmadan arındırılması,
- sıvı atıklar, tarımsal amaçlı sulama için kullanılan su kaynakları veya tarımsal alanlarla temas etme riski doğurmayacak şekilde yeni bir metot kullanılarak imha edilebilir. Ancak bu metot uygulanmadan önce, metodun uygulanabilirliği ve etkinliği ile ilgili Bakanlık'tan görüş alınmalıdır.

Yukarıda yer alan tüm seçenekler, bulaşık lotların işlenmesi, atılması, gibi işlemler sonucunda ortaya çıkabilecek sıvı ve katı atıklara da uygulanabilir.