

***Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.' ile Mücadele Hakkında Tebliğ**



Yetki Kanunu: 6968

Yayımlandığı R.Gazete: 29.09.2002-24891

Tebliğ No: 2002/62

Amaç

Madde 1- Bu Tebliğ, patatestе kahverengi çürüklük ve patates ve domates bitkilerinde bakteriyel solgunluk hastalığını oluşturan *Ralstonia solanacearum*' un yerinin ve yayılışının tespit edilmesi, meydana çıkışı ve yayılmasının engellenmesi, eğer tespit edilmişse mücadelesinin yapılması ve eradike edilmesi amacıyla hazırlanmıştır.

Kapsam

Madde 2- Bu Tebliğ, *Ralstonia solanacearum*' un tespit edilmesi, mücadelesi, yayılmasının engellenmesi ve eradike edilmesi hususlarını kapsar.

Hukuki dayanak

Madde 3- Bu Tebliğ; 15/5/1957 tarihli ve 6968 sayılı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Kanunu ve

6/8/1964 tarihli Zirai Karantina Tüzüğü' ne dayanılarak ve AB mevzuatına uyum çerçevesinde hazırlanmıştır.

Srvey

Madde 4- (Ek-I) Bölüm I' de listelenen bitkilerin yetiştirildiğı ekiliş alanları, depolar, zararlı organizmanın yayılmasında risk oluşturan *Solanaceae* familyasından yabancı otlar, bu konukçuların sulanmasında ve ilaçlanmasında kullanılan yüzey suyu, endüstriyel işleme ve paketleme binalarından boşaltılan sıvı atıklar üzerinde *Ralstonia solanacearum*' a yönelik olarak yıllık sistematik srveyler yapılır. Bu sürveylerin büyüklüğü yapılacak olan risk değerlendirmesine göre tespit edilir. Ayrıca yetiştirme ortamı, toprak ve endüstriyel işleme ve paketleme binalarındaki katı atıklar üzerinde de bu organizmaya yönelik olarak srveyler yapılabilir.

Srveylerin yapılması

Madde 5- Bu srveyler aşağıdaki şekilde yapılır :

a) Patates ve domates için (Ek-I) Bölüm-II'nin 1inci maddesinde yer alan esaslara göre yapılır.

b) Patates ve domates dışındaki diğer konukçu bitkiler ve sıvı atıklar için uygun yerlerden örnekler alınır ve uygun metotlar kullanılarak analizleri yapılır.

c) Diğer materyaller için de uygun metotlara göre srveyler yapılır.

Srveyleri yapacak resmi kuruluşlar

Madde 6- Sürveylerde alınacak örnek miktarı, kaynağı ve örnek alma zamanı Bakanlık Ziraat Mücadele Araştırma Enstitüleri ve diğer ilgili Bakanlık Araştırma Enstitüleri tarafından belirlenir. Sürveyler İl Tarım Müdürlüğü Bitki Koruma şube Müdürlükleri elemanları tarafından yapılır.

Srvey sonuçlarının bildirimi

Madde 7- Srvey sonuçları (Ek-I) Bölüm II'nin 2 nci maddesinde yer alan bilgileri içerecek şekilde her yıl 20 mayıs tarihinde Bakanlığa bildirilir.

Bakanlığa bildirim

Madde 8- Bu zararlı organizmanın tespit edilmesi yada şüpheli bir durum olduğu takdirde Bakanlığa bildirilir.

Tespit

Madde 9- şüpheli durumun doğrulanması sürecinde bu durumun oluştuğu bölgedeki patatesler ve domateslerin (Ek –II)'de yer alan test prosedüründeki ilgili metotlar kullanılarak laboratuvar analizleri yapılır. Uygulanan metot tamamlanıncaya veya doğrulama testleri sonuçlanıncaya kadar (Ek- III)'n 1 inci maddesinde yer alan koşullara uygun hareket edilir. şüpheli durum doğrulandığında (Ek-III)'n 2 nci maddesindeki koşullar uygulanır.

şüpheli durumda yapılması gereken işlemler

Madde 10- Bu Tebliğin 9 uncu maddesinde bahsedilen şüpheli durumun doğrulanması sürecinde şüpheli durumun görüldüğü yerde;

a) Organizma tarafından meydana getirilen belirtilerin görülmesi durumunda (Ek-II) Bölüm I, madde 1 ve Bölüm II'de yer alan hızlı tarama testleri kullanılarak ya da,

b) (Ek-II), Bölüm I, madde 2 ve Bölüm III' te yer alan tespit ve tanıya yönelik metotlar kullanılarak pozitif sonuç elde edilmelidir. Örneğin alındığı yerdeki ürünlere ait tüm bitki ve yumruların, parsellerdeki bitkilerin veya partilerin nakli yasaklanır. şüpheli bulgunun kaynağı araştırılır ve yayılmasını önlemek amacıyla ilave önlemler alınabilir.

Bulaşmanın kaynağı ve sınırları

Madde 11- Bu Tebliğe uygun olarak alınan bir örnekte organizmanın varlığı (Ek-II)' de yer alan test prosedüründeki ilgili metotlar kullanılarak doğrulandığında, (Ek- IV)' te yer alan esaslara göre bulaşmanın ana kaynağını ve derecesini belirlemek için bir çalışma başlatılır.

a) Patates ve domates için, örneğin alındığı ve bulaşık olarak tespit edilen bitkisel materyal, parti ve/veya parsel, ayrıca makine, taşıt, depo, bitkisel materyalle temas eden paketleme

materyali ve yine örneğin hasat edildiği ve alındığı tarlalar ve örtü altı üretim yerleri de bulaşık olarak kabul edilir.

b) Patates ve domatestede hasat öncesi veya sonrası temas, üretim, sulama veya ilaçlama yada klonal bir akrabalık yoluyla gerçekleşen olası bir bulaşmanın derecesi (Ek-V)'in 1 inci maddesinde yer alan esaslara uygun olarak tespit edilir.

c) (Ek-V) madde 2 (i)' de yer alan esaslara uygun olarak bu maddenin (a) bendinde yer alan bulaşmanın ve/veya bu maddenin (b) bendinde yer alan olası bulaşmanın ve organizmanın olası yayılışının bulunduğu bölgenin sınırları çizilir. Patates ve domates üretiminin yapıldığı ve risk altında bulunan yerlerde yetişen diğer konukçu bitkiler için de bu maddenin (a), (b) ve (c) bentlerine uygun hareket edilir.

d) Sulama, ilaçlama veya taşkınlar yoluyla risk altında bulunan patates ve domates üretim alanlarındaki yabani *Solanaceae'* lerdeki ve endüstriyel işleme, paketleme binalarından boşaltılan sıvı atıklar da dahil olmak üzere yüzey suyundaki bulaşmanın derecesini tespit etmek için uygun zamanlarda örnekler alınarak sürvey yapılır.

e) Bu maddenin (d) bendine göre alınan yüzey suyu örneklerinde organizmanın tespit edilmesi durumunda yüzey suyu bulaşık olarak kabul edilir.

f) Bu maddenin (e) bendine göre bulaşık olarak kabul edilen yüzey suyunun olası bulaşma bölge sınırları (Ek-V) madde 2 (ii)' ye göre belirlenir.

g) Bu maddenin (a) ve (e) bendine göre belirlenen herhangi bir bulaşma ve bu maddenin (c) ve uygulanabildiği yerlerde (f) bendine göre sınırları belirlenen bölgeye ait ayrıntılar (Ek-V)' in 3 üncü maddesinde yer alan esaslara göre Bakanlığa acilen bildirilir. (Ek-V)' in 4 üncü maddesinde yer alan ilave bildirimler de Bakanlığa aynı zamanda yapılır.

Eradikasyon

Madde 12- Bu Tebliğin 11 inci maddesinin (a) bendine göre bulaşık olarak bulunan bitkisel materyal İl Tarım Müdürlüğü Bitki Koruma Şubesi elemanlarınca (Ek-VI)'nın 1 inci maddesinde yer alan yöntemlerden birine tabi tutulur.

Kullanıma sunma

Madde 13- Bu Tebliğin 11 inci maddesinin (b) bendinde belirtildiği şekilde muhtemelen bulaşık durumda bulunan patates ve domates bitkileri ile risk altında bulunan arazilerdeki bitkiler, organizma için yayılma riski yaratmamak kaydıyla (Ek-VI)'nın 2 nci maddesinde yer alan şekilde kullanıma sunulabilir veya satışı yapılabilir.

Teknik temizleme

Madde 14- Bu Tebliğin 11 inci maddesinin (a) ve (b) bentlerinde sözü edilen, organizma ile bulaşık olduğu belirlenen veya risk altında bulunan yerlerdeki makine, taşıt, tekne, depo ve paketleme materyali dahil diğer materyal (Ek-VI)'nın 3 üncü maddesine göre uygun bir metot kullanılarak imha ya da dezenfekte edilir.

Bulaşık üretim alanlarında yapılacak işlemler

Madde 15- Bu Tebliğin 11 inci maddesinin (c) bendine göre tarif edilen sınırlar belirlendikten sonra bu alanlarda (Ek- VI)'nın 4.1 ve 4.2 nci maddelerinde belirtilen önlemler alınır. Organizmayla mücadele etmek amacıyla bu Tebliğin 12, 13 ve 14 üncü maddelerinde belirtilen hususlarla ilgili yapılan işlemler Bakanlığa bildirilir.

Patates tohumluğu

Madde 16- Tohumluk patatesler (Ek- II)'de yer alan test prosedürü uygulanarak organizmadan âri bulunmuş olmalı, sertifikasyon sonucu elde edilmiş direkt patates hatlarından üretilmiş olmalıdır.

Çoğaltım materyali

Madde 17- Tohumluk patates üretim yerlerinde organizmanın var olduğuna ilişkin bulguların olması durumunda; anaç tohumluk patates klonları dahil başlangıç çoğaltım materyali sistematik şekilde test edilir, klonal bir akrabalığın olmadığı durumlarda tüm anaç patates klonları test edilir.

Bulundurma ve nakil yasağı

Madde 18- *Ralstonia solanacearum* kültürlerinin bir yerden bir yere nakli, bulundurulması ve dağıtımı yasaktır.

Çeşit seleksiyonu, deneme veya bilimsel amaçlı getirilen materyal

Madde 19- Çeşit seleksiyonu çalışmalarında ve deneme veya bilimsel amaçlı getirilen materyal için bu Tebliğin hükümleri Bakanlık tarafından değiştirilebilir.

Bakanlığın yetkisi

Madde 20- Organizmanın yayılmasını engellemek ve mücadele etmek için gerektiğinde Bakanlık tarafından ilave daha sert önlemler alınabilir.

Yürürlük

Madde 21- Bu Tebliğ yayım tarihinde yürürlüğe girer.

Yürütme

Madde 22- Bu Tebliğ hükümlerini Tarım ve Köyşleri Bakanı yürütür.

EK I

Bölüm I

Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al. 'ın konukçusu olan bitkiler

- *Solanum tuberosum* L.'un tohum hariç bitkileri , yumrular dahil Patates

-*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw. tohum ve meyve hariç bitkileri Domates

Bölüm II

Sürveyler

1. Bu Tebliğin 4 üncü maddesinde yer alan sürveylerde organizmanın biyolojisi ve üretim sistemleri temel alınır ve 5 inci maddenin (a) bendinde yer alan sürveylerin yapılmasına ilişkin esaslar aşağıda belirtilmiştir :

(i) Patatesler için,

-Uygun zamanlarda, yetiştirme mevsimi boyunca görsel kontrol ve/veya yetiştirme mevsiminde veya depoda hem tohumluk hem de diğer patateslerde örnekleme yapılır. Bu örnekleri oluşturan yumrular kesilerek görsel kontrolü yapılır, ve

-Tohumluk patateslerde ve diğer patatesler için uygun yerlerde, Ek II' deki test prosedüründe yer alan metotlar kullanılarak laboratuvar testleri yapılır,

(ii) Domatesler için,

-Ticari kullanım amacıyla tekrar dikilecek olan bitkilerin en azından yetiştirme mevsiminde uygun zamanlarda görsel kontrolü yapılır.

2. Bu Tebliğin 7 inci maddesinde yer alan sürveylerin bildirimi şunları içerir :

(i) Patatesler için yapılacak sürveylerde,

- Tohumluk ve diğer patateslerde hektar olarak tahmini toplam üretim alanı,
- Tohumluğun kademesi, kullanım amacı ve yetiştirme alanı ,
- Testlemek için alınan örneklerin örnek alma zamanı ve miktarı,
- Tarlada görsel olarak kontrol edilenlerin sayısı,
- Yumrulardaki görsel kontrollerin sayısı ve örneğin büyüklüğü ;

- (ii) Tohumluk amaçlı olan domatesler için yetiştirme mevsiminde yapılacak sürveylerde,
 - Bitkilerin tahmini toplam sayısı,
 - Görsel kontrollerin sayısı;
- (iii) Konukçusu olan yabancı *Solanaceae*'ler dahil, patates ve domates haricindeki diğer konukçu bitkiler üzerinde yapılan sürveylerde,
 - Türler,
 - Örnek alma zamanı ve sayısı,
 - Örnekleme yapılan alan /akarsu
 - Analiz metodu;
- (iv) Endüstriyel işleme veya paketleme binalarından boşaltılan su ve sıvı atıklarda yapılan sürveylerde,
 - Örnek alma zamanı ve sayısı,
 - Örnekleme yapılan alan/akarsu/ binaların yeri,
 - Analiz metodu.

EK- II

Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al. 'un teşhis, tespit ve tanısı için kullanılan test prosedürü

Test Prosedürünün Kapsamı

- (i) Patates yumrularında kahverengi çürüklük ve patates ve domates bitkilerinde bakteriyel solgunluğun teşhisi
 - (ii) Patates yumru örneklerinde *Ralstonia solanacearum*'un tespiti;
- İlave olarak test materyallerinin (besi ortamları, tampon çözeltiler, solüsyonlar, ayırıcılar gibi) hazırlanması için gerekli ayrıntılar verilmiştir.

Test Prosedürünün İçeriği

BÖLÜM I : Test prosedürünün uygulanması

1. Patates yumrularında kahverengi çürüklük ve patates ve domates bitkilerinde bakteriyel solgunluğun teşhisi
2. Patates yumru örneklerinde *Ralstonia solanacearum*'un tespit ve tanısı

BÖLÜM II : Patates yumrularında kahverengi çürüklük ve patates ve domates bitkilerinde bakteriyel solgunluğun teşhisi

1. Belirtiler
2. Hızlı tarama test(leri)
3. İzolasyon prosedürü
4. Doğrulama test(leri)

BÖLÜM III : Patates yumru örneklerinde *Ralstonia solanacearum*'un tespit ve tanısı

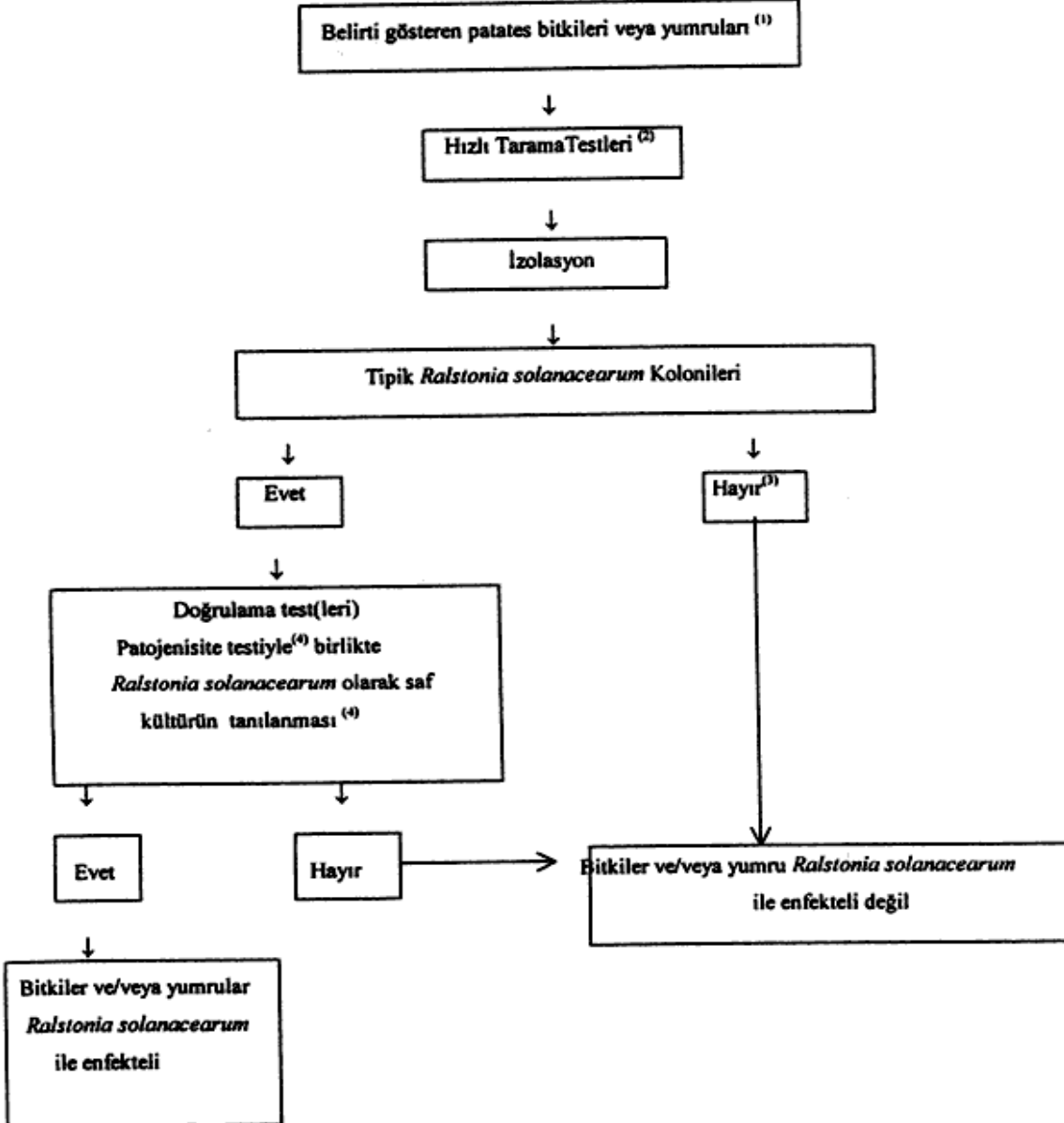
1. Test için örneklerin hazırlanması
2. Immunofluorescence (IF) test
3. Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay test (ELISA)
4. Polymerase Chain Reaction test (PCR)
5. Seçici ortama ekim testi
6. Bioassay testi
7. Zenginleştirme testleri
8. Patojenisite testi

- İlave 1 *Ralstonia solanacearum*'un izolasyonu ve kültüründe kullanılan besiyemeleri
- İlave 2 Örneğin hazırlanmasında kullanılan materyaller
- İlave 3 IF testinde kullanılan materyaller
- İlave 4 IF testi içindeki bulaşma seviyesinin tespiti
- İlave 5 ELISA testinde kullanılan materyaller
- İlave 6 PCR testinde kullanılan materyaller
- İlave 7 Seçici besiyemeye ekim ve zenginleştirme testlerinde kullanılan materyaller

Kaynaklar

BÖLÜM I
Test prosedürünün uygulanması

1. Patates yumrularında kahverengi çürüklük ve patates ve domates bitkilerinde bakteriyel solgunluğun teşhisi
Aşağıda yer alan prosedür, tipik ya da şüpheli kahverengi çürüklük belirtisi gösteren patates yumruları ve tipik ya da şüpheli bakteriyel solgunluk belirtisi gösteren patates ve domates bitkileri için uygulanır.



Şemada verilen referanslar :

⁽¹⁾ Bölüm II.1.de tarif edilen belirtiler

⁽²⁾ Hızlı tarama testleri olarak kullanılabilecek testler

Uygun testler :

İletim demetlerinden bakteriyel akıntı testi (Bölüm II.2),

Poly-β-hydroxybutyrate granülleri için test (Bölüm II.2),

IF testi (Bölüm III.2),

ELISA testi (Bölüm III.3),

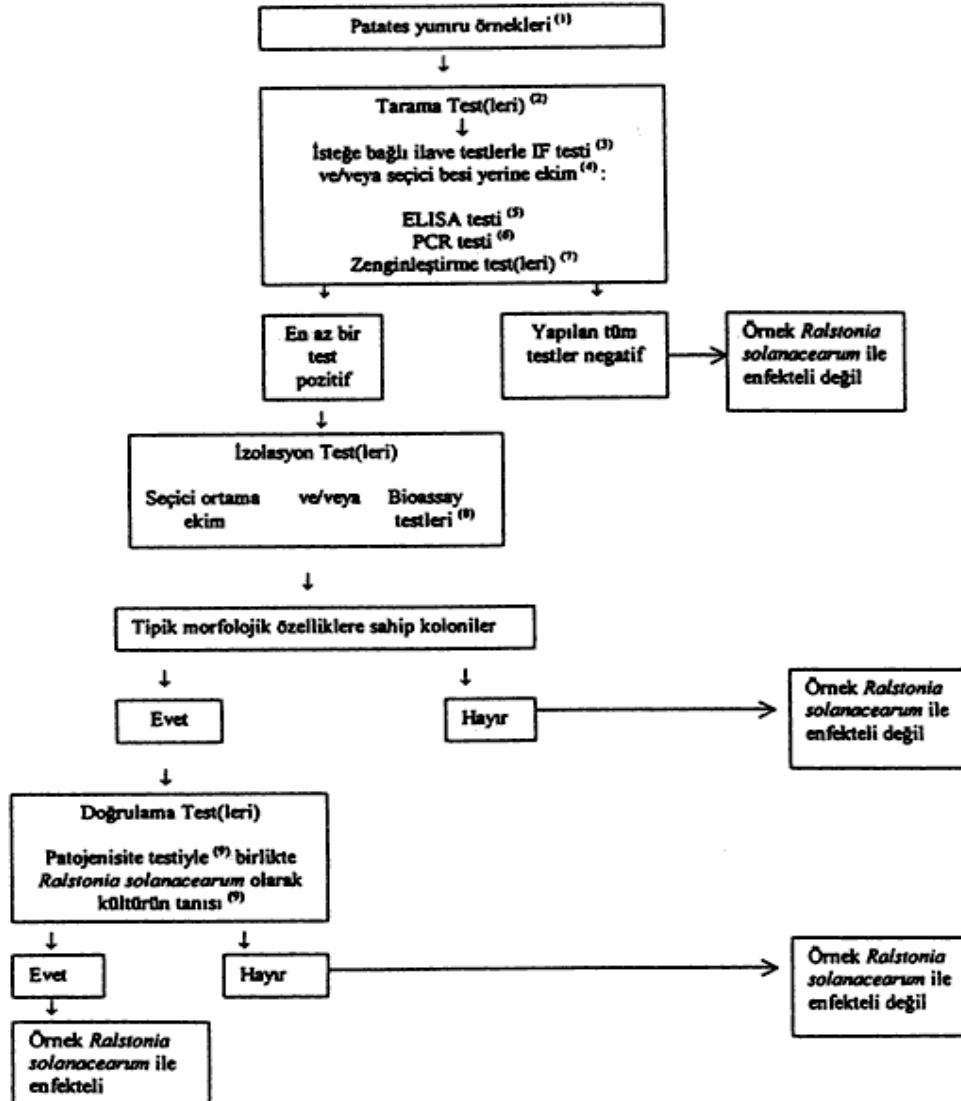
PCR testi (Bölüm III.4).

⁽³⁾ Tipik belirti gösteren bitkilerden patojenin izolasyonu seyreltme serilerinden ekimle kolaylıkla yapılmasına rağmen, enfeksiyonun ileri devrelerinde bu izolasyon yapılmışsa başarısız olunabilir. Hastalıklı dokuda saprofitik bakteriler daha hızlı gelişebilir veya izolasyon ortamında patojeni engelleyebilir. Eğer izolasyon sonucu negatif, fakat belirtiler tipikse, izolasyon seçici bir besi ortamı testi kullanılarak tekrarlanmalıdır.

⁽⁴⁾ *Ralstonia solanacearum*'un saf kültürünün güvenilir tanısına patojenisite testiyle (Bölüm II.4.3) birlikte Bölüm II.4.1 de yer alan testlerin en azından biri yapılarak ulaşılır. Strain karakterizasyonu isteğe bağlıdır, fakat her yeni durum için yapılması tavsiye edilir.

2. Patates yumru örneklerinde *Ralstonia solanacearum*'un tespit ve tanısı

Aşağıda yer alan prosedür bir veya tercihen birden fazla tarama test kullanılarak patates yumrularındaki latent enfeksiyonların tespitinde kullanılır, eğer pozitif sonuç alınursa, patojenin izolasyonu ile tamamlanır, tipik kolonilerin izolasyonu durumunda *Ralstonia solanacearum*'un saf kültürünün tanısı yapılarak prosedür tamamlanır.



Diyagramda yer alan referanslar:

⁽¹⁾ Örnek büyüklüğü

Standart büyüklük 200 yumrudur. Bununla beraber 200 yumrudan daha az örnekle de prosedür rahatlıkla uygulanabilir

⁽²⁾ Tarama test(leri)

Tek bir test, örnekteki *Ralstonia solanacearum*'u tespit etmek için yeterince hassas ve güvenilir olmayabilir. Bundan dolayı birden fazla test tavsiye edilir ve bu testlerde tercihen farklı biyolojik prensipler temel alınmış olmalıdır.

⁽³⁾ Immunofluorescence (IF) test

IF testi iyi oturmuş bir tarama testidir. Bu tam olarak geliştirilmemiş ve geçerliliği olmayan diğer testlere karşı bir avantajdır. Bu test diğer bir çok benzer bakteriler (örneğin *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*) içinde kullanılır. Bu metot içinde belirtilen okuma parametreleriyle hassas bir testtir. (Hassasiyet sınırları patates ekstraktının her bir ml'si için 10^3 - 10^4 hücredir.)

Antiserumun kalitesi bu testin sonucunun güvenilirliği için kritik bir etkidir. Sadece yüksek titreye sahip antiserum kabul edilir (seyreltilmemiş antiserum için minimum 2000) ve tüm testler antiserum titresi veya bu titrenin altında yer alan bir seyreltme kullanılarak yürütülmelidir. İndirek metot tercih edilir. Direk metot, eğer test indirek metota eşit hassasiyet ve özellikte ise uygulanabilir.

IF testi, boyanan hücrenin morfolojisi ve fluorescence yoğunluğunun subjektif yorumu gibi bir avantaja sahiptir. Serolojik olarak *Ralstonia solanacearum* ile akraba olan topraktaki bakterilerden ve *Ralstonia solanacearum* hücre morfolojisiyle ilişkili patates dokularından kaynaklanan çapraz reaksiyonlar yaygındır. Çapraz reaksiyonlardan şüphelenildiğinde farklı bir biyolojik prensibe sahip ilave bir tarama testi yapılmasına gerek duyulsa da, IF testi tek başına bir tarama testi olarak da kullanılabilir. Bu gibi durumlarda seçici ortama ekim en uygun testtir.

⁽⁴⁾ Seçici besiyeri

Bu metottaki SMSA besi ortamı ve test yöntemi *Ralstonia solanacearum* için seçici ve hassas bir testtir. Örnek hazırlandıktan sonra sonuç 3-6 gün içinde alınır. Patojen kültürden direk olarak elde edilir ve kolaylıkla tanılanabilir. Testten tam anlamıyla faydalanmak ve bu ortam üzerinde *Ralstonia solanacearum* ile rekabete giren ve patates yumrularıyla birlikte bulunan ikincil bakterilerden sakınmak için heel end'lerin hazırlanmasında dikkatli olunmalıdır. Hedef organizmayı etkileyen ortam içeriği nedeniyle bazı strainler zayıf gelişebilir. Ortamda gelişebilen diğer bakteriler nedeniyle *Ralstonia solanacearum* 'u ayırt ederken dikkatli olunmalıdır. Besi yeri üzerinde diğer bakteriler tarafından *Ralstonia solanacearum* 'un engellenebileceğinden şüphelenildiğinde negatif test sonucu olan bir örnekte teşhisi doğrulamak veya reddetmek için farklı bir test kullanılabilir. Bu gibi durumlarda, IF en uygun testtir.

⁽⁵⁾ ELISA testi

ELISA testinin hassasiyeti genellikle IF testinden daha azdır (hassasiyet eşiği patates ekstraktının her bir ml'si için 10^4 - 10^5 hücredir). Bu test ucuz ve hızlıdır, fakat genellikle yanlış pozitif (çapraz reaksiyonlar) ve yanlış negatif (patates ekstraktı içindeki fenolik moleküller tarafından engellenme) sonuçlara daha açıktır. Antiserum seçiciliği son derece yüksektir. ELISA testi tek başına bir tarama testi olarak kullanılmamalıdır.

⁽⁶⁾ PCR testi

PCR bitki veya yumru ekstraktında yer alan bazı inhibitörler nedeniyle kolaylıkla yanlış negatif sonuçlara sebebiyet verse de, çok hassas bir tespit potansiyeline sahiptir. Bazı patates çeşitleri diğerlerinden daha fazla inhibitör içerir. Bundan dolayı bu inhibitörleri yok etmek gereklidir. Engelleme seyreltme yoluyla azaltılabilir fakat aynı anda *Ralstonia solanacearum*' un popülasyonunda seyreltilmiş olacaktır. Yanlış pozitif sonuçlara sebebiyet veren bulaşmadan kaçınmak için örneğin ve testin hazırlanmasında büyük dikkat gösterilmelidir. Yanlış pozitif sonuçlar diğer organizmaların diziliş benzerliğinden de doğabilir. Bu nedenle direkt PCR tek başına bir tarama testi olarak kullanılmamalıdır.

⁽⁷⁾ Zenginleştirme testi

Modifiye SMSA broth gibi yarı seçici bir sıvı besiyeri içinde patates ekstraktı pellet örneklerinin inkube edilmesiyle, *Ralstonia solanacearum*' un çoğalması sağlanır. Belki bundan daha önemlisi, PCR veya ELISA testindeki potansiyel engelleyicilerinde aynı zamanda seyreltilmiş olmasıdır. Zenginleştirme ortamındaki *Ralstonia solanacearum* IF, ELISA ve PCR kullanılarak tespit edilebilmektedir. Zenginleştirme ortamından yapılan direkt ekim tavsiye edilmemektedir. Ayrıca bu metotlarla ilgili deneyim eksikliğinden dolayı tek başına bir tespit metodu olarak kullanılmamalıdır.

⁽⁸⁾ Bioassay testi

Bioassay testi, bir konukçu bitki içinde seçici zenginleştirme yapılarak patates ekstraktından *Ralstonia solanacearum*' un izolasyonu için kullanılır ve domates veya patlıcan bu test için kullanılır. Test bu metota özelleşmiş optimum inkubasyon koşullarına ihtiyaç duyar. SMSA ortamı üzerinde *Ralstonia solanacearum*'a karşı olan inhibitör bakteriler bu testi muhtemelen etkileyecektir.

⁽⁹⁾ Doğrulama test(leri)

Ralstonia solanacearum'un saf kültürünün güvenilir tanısına Bölüm II.4.1' de yer alan testlerin en azından biri yapılarak ulaşılır. Bu testlere ilave olarak Bölüm II.4.3' te yer alan patojenisite testide yapılmalıdır. Strain karakterizasyonu isteğe bağlıdır fakat her yeni durum için yapılması tavsiye edilir.

BÖLÜM II

Patates yumrularında kahverengi çürüklük ve patates ve domates bitkilerinde bakteriyel solgunluğun teşhisi

1. Belirtiler

1.1 Patatesteki belirtiler

Patates bitkisi : Enfeksiyonun erken döneminde, yüksek sıcaklıkta gün boyunca bitkinin tepe yapraklarında solgunluk görülür. Bu solgunluk başlarda gece düzelir. Zamanla solgunluk geri dönüşümsüz bir hal alır ve bitkinin ölümüne yol açar. İletim dokusu bu tip bitkilerde enine kesildiğinde kahverengi renk değişikliği görülebilir ve kesilen yüzeyde sütümsü bir akıntı (ooze) oluşabilir veya bu sütümsü akıntı yumru sıkıldığında kolaylıkla görülebilir. Kesilen sap su içerisine dikey olarak yerleştirildiğinde, bakteri iplikçikleri iletim demetlerinden akar.

Patates yumrusu : Patates yumruları heel (=stolon) end'e (stolonun bağlandığı kısım) yakın enine kesilir. Enfeksiyonun erken devresinde iletim demeti halkasında saman sarısı açık kahverengi renk değişikliği vardır. Yumru kesildikten birkaç dakika sonra ya kendiliğinden ya da kesilen yüzeye yakın bir yerden yumru sıkıldığında açık krem rengi bir akıntı çıkar. Daha sonra bu renk değişikliği (iletim demetlerindeki) daha koyu bir kahverengine döner ve nekroz parankimatik dokuya doğru yayılır. İleri devrelerde enfeksiyon heel end ve gözlerden dışarıya doğru yayılır ve buralarda kabukta kırmızımsı kahverengi, hafifçe çökük lezyonlar oluşur. Ayrıca heel end ve gözlerden çıkan bu bakteriyel akıntıya toprak parçaları da yapışabilir.

1.2 Domatesteki belirtiler

Domates bitkisi: İlk görülür belirti en genç yaprakların cansız oluşudur. Patojen için uygun çevresel koşullar oluştuğunda (doymuş nemle birlikte 25 °C civarında toprak sıcaklığı) epinasti ve tek taraflı solgunluk veya bitkinin tamamında birkaç gün içerisinde çökme görülebilir. Daha az uygun koşullarda (toprak sıcaklığı 21 °C nin altında) yan köklerin çok fazla bir miktarı sapın üzerinde gelişebilir. İletim demetlerindeki nekrozun sonucunda sap boyunca yağlımsı bir ip görülmesi olasıdır. Sap çapraz kesildiğinde burada iletim demetlerinin kahverengiyeye döndüğü görülür. Ayrıca beyaz veya sarımsı bakteriyel akıntı çıkar.

2. Hızlı Tarama Testleri

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

İletim demetlerinden bakteriyel akıntı testi :

Solgunlaşan patates veya domates saplarında *Ralstonia solanacearum*'un varlığı aşağıda yer alan basit testlerle değerlendirilebilir.

Toprak seviyesinin hemen üstünden sap kesilir. Suyla dolu bir kap içine kesilen yüzey yerleştirilir. Kısa süre sonra bakteriyel akıntı iplikler halinde iletim demetlerinden kendiliğinden akar. Patates veya domateslerde iletim demetlerinde enfeksiyona sebep olan diğer bakteriler bu tip belirtiye sebep olmamaktadır.

Poly-β-hydroxybutyrate granüllerinin tespiti :

Ralstonia solanacearum hücrelerindeki PHB granülleri Nile Blue A veya Sudan Black B ile boyanarak görülür.

Ya akıntı yada şüphelenilen bir doku bir lam üzerine sürülür, yayılır veya YPGA veya SPA (İlave1) üzerinde 48 saat süreyle geliştirilmiş bir kültürden lam üzerine sürülür. Biovar 2/ırk 3 strain pozitif kontrol olarak hazırlanır ve eğer yararlı olacağı düşünülüyorsa, heterolog bir strain ile de negatif kontrol hazırlanır. Kuruması için bırakılır. Fikse etmek için lamın alt yüzü birkaç kez hızlıca alevden geçirilir.

Nile Blue testi

(1) Nile Blue A'nın % 1' lik suda hazırlanmış solusyonuyla fikse edilen bu lam boyanır. 55 °C de 10 dakika süreyle inkube edilir.

(2) Boyama solusyonu boşaltılır. Akan su altında yavaşça kısa süre yıkanır. Bir kağıt havluyla fazla su alınır.

(5) Bir damla suyla tekrar nemlendirilir. Bir lamel kapatılır.

(6) 1000' lik büyütmede immersion yağ altında 450 nm epifluorescence mikroskopta lam incelenir.

PHB granülleri parlak portakal renkli fluorescence gösterir. *Ralstonia solanacearum*'un tipik hücre morfolojisi ve granüllerin hücreler içinde olup olmadığı da normal ışık mikroskobuyla ayrıca kontrol edilir.

Sudan Black testi

(1) % 70' lik etil alkolde hazırlanmış % 0.3' lük Sudan Black B solusyonu ile fikse edilen lam boyanır. Oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkube edilir.

(2) Boyama solusyonu boşaltılır. Musluk suyuyla kısa süre yıkanır. Fazla su kağıt havluyla alınır.

(3) Lam kısa süreyle xylol içerisine daldırılır. Kağıt havluyla kurulanır.

Dikkat ! Xylol zararlı bir üründür. Çeker ocakta çalışınız.

(4) Suyla hazırlanmış % 0.5' lik safraninle boyanır ve oda sıcaklığında 10 saniye süreyle inkube edilir.

Dikkat ! Safranin zararlı bir üründür. Çeker ocakta çalışınız.

(5) Akan musluk suyunda yavaşça yıkanır. Kağıt havluyla kurulanır. Bir lamel kapatılır.

(6) 1000' lik büyütmede immersion yağ altında transmitted ışık kullanılan bir ışık mikroskobunda boyanan lam incelenir.

PHB granülleri mavi-siyah boyanmış olarak *Ralstonia solanacearum* hücreleri içinde görülecektir. Hücre duvarı ise pembe boyanır.

Diğer testler :

Diğer uygun tarama testleri IF testi (Bölüm III.2), ELISA testi (Bölüm III.3) ve PCR testi (Bölüm III.4) dir.

3. İzolasyon prosedürü

3.1 Patates veya domates bitkilerinin saplarındaki iletim demetlerinden veya patates yumrularındaki iletim demeti halkasından renk değiştirmiş doku parçaları veya akıntı alınır. Steril destile su veya 50 mM fosfat tamponu içinde süspanse edilir. 5-10 dakika bekletilir.

3.2 Süspansiyondan onluk seyreltme serisi hazırlanır (1/10 ve 1/100 veya uygun olacağı düşünüldüyorsa daha fazlası)

3.3 Süspansiyonun standart bir hacmi ve genel besi ortamları (NA, YPGA ve SPA, İlave 1) ve/veya Kelman'ın tetrazolium ortamı (İlave 1) ve/veya SMSA seçici ortamına (İlave 7) süspansiyon ve seyreltmelerin standart bir miktarı aktarılır. Yayararak veya çizerek ekim yapılır. Eğer faydalı olacağı düşünüldüyorsa, pozitif kontrol olarak *Ralstonia solanacearum*'un virulent Biovar 2/ırk 3 straininin sulandırılmış hücre süspansiyonu hazırlanır ve bu her ortam üzerine ayrı ayrı ekilir.

3.4 Petriler 28 °C' de 3 gün süreyle inkube edilir. Eğer yavaş gelişirse inkubasyon süresi 6 güne kadar uzar. Fakat SMSA ortamı üzerinde koloniler sık sık tipik olmayan şekle dönüşür ve ölür.

Genel besi ortamları üzerinde, *Ralstonia solanacearum*'un virulent izolatları inci beyazı, düz, düzensiz ve akışkan koloniler şeklinde gelişir.

Kelman'ın tetrazolium ortamı üzerinde, *Ralstonia solanacearum*'un virulent izolatları krem, düz, düzensiz ve akışkan kan kırmızı merkezli koloniler oluşturur. *Ralstonia solanacearum*'un avirulent formları koyu kırmızıdır.

SMSA besi ortamı üzerinde, *Ralstonia solanacearum*'un virulent izolatlarının tipik kolonileri sütümsü beyaz, düz, düzensiz ve merkezi kan kırmızı renkli akışkandır.

Ralstonia solanacearum'un avirulent formları SMSA ortamı üzerinde tamamen pembeden kırmızıya dönen daha az akışkan koloniler oluşturur.

3.5 Genel bir besi ortamı üzerindeki alt kültür karakteristik morfoloji gösteren kolonilerden saflaştırılır. Düzenli olarak alt kültür yapmaktan kaçınılmalıdır. Bu şekilde virulens kaybı olmaktadır.

4. Doğrulama testleri

4.1 *Ralstonia solanacearum*'un tanısı

Aşağıda yer alan prosedürlerden en az bir tanesi yapılarak *Ralstonia solanacearum*'un saf kültürü tanılanır :

Besinsel ve enzimatik testler

Not: Her teste uygun kontrol strainler kullanılmalıdır.

Ralstonia solanacearum'un fenotipik özellikleri :

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

Ortam ve metotlar Lelliott ve Stead (1987) den alınmıştır.

IF testi

Kültür ve kontrol strainlerinden ml de 10^6 hücrelik bir süspansiyon hazırlanır. Antiserumdan iki seyreltme hazırlanır. IF prosedürü (Bölüm III.2) uygulanır. Kültürün IF titresi, pozitif kontrolün titresine eşit olmalıdır.

ELISA testi

Kültür ve kontrol strainlerinden ml de $>10^6$ hücrelik bir süspansiyon hazırlanır. ELISA prosedürü (Bölüm III.3) uygulanır. Kültürün ELISA değeri pozitif kültürün değerine eşit olmalıdır.

PCR testi

Kültür ve kontrol strainlerinden ml' de 10^6 hücrelik bir süspansiyon hazırlanır. PCR prosedürü (Bölüm III.4) uygulanır. Kültürün PCR ürünü, pozitif kontrolle aynı ölçüde olmalıdır.

Fluorescent in-situ hibridizasyon (FISH)

Kültür ve kontrol strainlerinden ml' de 10^6 hücrelik bir süspansiyon hazırlanır. FISH prosedürü (van Beuningen et al,1995) OLI-1 PCR primer (Seal et al,1993) ile uygulanır. Kültür pozitif kontrolle aynı reaksiyonu göstermelidir.

Protein profili

Denature edilen tüm hücre proteinleri polyacrylamide gel elektroforez-PAGE (Stead, 1992a) ile ayrılır.

Yağ asidi profili (FAP)

Trypticase soy agar üzerinde 28 °C' de 48 saat süreyle pozitif kontrol ve kültür geliştirilir ve FAP prosedürü (Janse,1991; Stead, 1992a; Stead, 1992b) uygulanır. Kültürün profili pozitif kontrolün profiliyle aynı olmalıdır.

Özel şartlar altında yağ asidi özellikleri 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH ve 18:1 2OH dir.

Strain karakterizasyonu

Strain karakterizasyonu isteğe bağlıdır fakat her yeni durumda aşağıda yer alanlardan en az bir tanesinin kullanılması tavsiye edilmektedir.

Biovar tespiti

Ralstonia solanacearum ; üç hexose alkol ve üç şekerden asit üretim kabiliyeti temel alınarak biovarlara ayrılmıştır (Hayward, 1964 ve 1994) :

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Kullanımı:					
- maltose	-	+	+	-	+
- lactose	-	+	+	-	+
- cellobiose	-	+	+	-	+
- mannitol	-	-	+	+	+
- sorbitol	-	-	+	+	-
- dulcitol	-	-	+	+	-

Biovar 2 nin alt fenotiplerinin farklılaşmalarını gösteren ilave testler (Hayward, 1994):

	Biovar 2	Biovar 2-A	Biovar 2-T
Trehalose kullanımı	-	+	+
Inositol kullanımı	+	-	+
D-ribose kullanımı	-	-	+
Pektolitik aktivite	düşük	düşük	Yüksek

İrk tespiti

İrk (Buddenhagen et al., 1962) tütün yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonu (Lozano ve Sequeria, 1970) yoluyla ve domates veya patlıcan bitkilerinde ve tütün bitkilerinde patojenisite testi temel alınarak tespit edilebilir.

	İrk (*)		
	1	2	3
Reaksiyon:			
-domates bitkileri/patlıcan	solgunluk	Reaksiyon yok	Solgunluk
-tütün bitkileri	solgunluk	Reaksiyon yok	Reaksiyon yok
Tütün yaprakları	Nekroz(48 saat) ve solgunluk (7-8 gün)	HR(12-24 saat)	Kloroz(2-8 gün)

(*) İrk 4 (*Zingiber officinale* ve birkaç bitkide patojen) ve İrk 5 (sadece mulberyde patojen) i içermemektedir.

Patojenisite testi veya tütünde aşırı duyarlılık testiyle ırk karakterizasyonu güvenilir olmayabilir ve bunların yerine orijin doğal konukçusu ve biovardan sonuç çıkarılabilir.

Kültürün daha ileri karakterizasyonu :

Genomik parmakizi

Ralstonia solanacearum kompleksinden strainlerin moleküler farklılığı belirlenebilir:

RFLP analizi (Cook et al, 1989)

Repetitive sequence PCR [REP., ERIC-ve BOX-PCR (Louws et al,1995; Smith et al,1995)]

4.3 Patojenisite testi

Bu test *Ralstonia solanacearum*'un teşhisinde teyit amaçlı olarak kullanılır ve bu testle *Ralstonia solanacearum* olarak tanımlanan kültürlerin virulensi de değerlendirilebilir.

Kültür ve pozitif kontrolden ml' de 10^6 hücrelik bir inokulum hazırlanır. 5-10 domates veya patlıcan bitkisi inokule edilir. Tercihen bu bitkiler 3 gerçek yapraklı veya daha yaşlı dönemde olmalıdır (Bölüm III.6). Günlük sulamayla yüksek orantılı nem sağlanır ve 22 – 28 °C' de 2 haftadan daha fazla süre bitkiler inkubasyona bırakılır. Solgunluk ve/veya epinasti, kloroz, cüceleşme gözlenir.

Belirti gösteren bitkilerden aşağıdaki şekilde izolasyon yapılır :

-Saptaki inokulasyon noktasının 2 cm üstünden bir doku parçası alınır.

-Steril destile su veya 50mM fosfat tamponun az miktarıyla süspanse edilir. Besi ortamına ekilir, inkube edilir ve *Ralstonia solanacearum*'un tipik kolonileri kontrol edilir.

BÖLÜM III

Patates yumru örneklerinden *Ralstonia solanacearum*'un tespit ve tanısı

Not: Standart örnek büyüklüğü 200 yumrudur. Ancak bu prosedür 200 yumrudan daha az miktarda da uygulanabilir.

1. Test için örneklerin hazırlanması

Not: Bu prosedürde elde edilen patates ekstraktı aynı zamanda *Clavibacter mihiganensis subsp. sepedonicus*' un tespitinde de kullanılabilir.

Eğer faydalı olduğu düşünülüyorsa test öncesi yapılabilecek uygulamalar:

(i) *Ralstonia solanacearum*' un düşük olan popülasyonunun çoğalmasını teşvik etmek için iki hafta kadar 25-30 °C' de örnekler inkube edilir.

(ii) Uygun deterjan ve dezenfektanlarla akan su altında yumrular yıkanır ve kurumaları için bırakılır.

1.1 Temiz ve steril bir bisturi veya sebze bıçağıyla yumrunun heel end kısmındaki kabuk iletim demetleri görülebilecek şekilde kaldırılır. Heel end kısmındaki iletim demetlerinin bulunduğu dokudan koni şeklinde küçük bir parça çıkarılır (3-5 mm çapında). İletim demetlerine ait olmayan dokunun miktarı minimum tutulur. Örnekteki her yumru için işlem aynı şekilde tekrarlanır.

Not: Yumruların görsel kontrolü (Bölüm II.1) bu dönemde yapılır. Şiddetli çürüme veya belirti gösteren yumrular ayrılır ve ayrıca test edilir (Bölüm II).

1.2 Kapalı bir kap içine heel end parçaları toplanır. Tercihen heel end dokuları hemen işlenmeye başlanır. Eğer bu mümkün değilse, 24 saatten fazla olmamak kaydıyla bekletilebilir, 72 saatten fazla olmamak kaydıyla da + 4 °C' de muhafaza edilebilir.

1.3 Aşağıdaki yöntemlerden biriyle heel end'ler işlenir:

(i) Uygun bir kap içine heel end'ler aktarılır.

Heel end'leri kaplayacak kadar yumuşatma tamponu (İlave 2) eklenir.

Heel end'ler bir blender veya Ultra Thurrax homojenizatör yardımıyla tam olarak homojenize edilir. Aşırı homojenizasyondan kaçınılmalıdır.

15-30 dakika süreyle dinlendirilir.

(ii) Uygun bir kap içine heel end'ler aktarılır.

Heel end'leri kaplayacak kadar yumuşatma tamponu eklenir.

Bir çalkalayıcı üzerine kap yerleştirilir.

20-22 °C' de 4 saat süreyle 50-100 rpm de veya 16-24 saat süreyle 4 °C' de inkube edilir.

(iii) Heel end'ler tek kullanımlık yumuşatma torbasına aktarılır (örneğin stomacher torbası, 105 mm x 150 mm ölçülerde, radyasyonla steril edilmiş)

Uygun bir aletle dikkatlice heel end'ler ezilir, örneğin çekiç, bu işleme homojenizasyon tamamlanana kadar devam edilir.

Heel end'lerin üstü kapanana kadar yumuşatma tamponu ilave edilir.

15-30 dakika süreyle dinlendirilir.

1.4 Heel end'lerden elde edilen bakteri ekstraktı aşağıdaki işlemlerden birine maruz bırakılır :

(i) Çökelti kap veya torbanın içinde bırakılarak sıvı kısım yavaşça bir santrifüj tüpüne boşaltılır. Eğer tüpteki kısım bulanıksa, 10 °C' nin altında bir sıcaklıkta 10 dakika süreyle 180 g den daha fazla olmayacak şekilde santrifüj edilir. Santrifüj tüpüne alınan sıvı veya ilk santrifüjden elde edilen supernatant (üst kısım) 10 °C nin altındaki bir sıcaklıkta 10 dakika süreyle 10.000 g de veya 15 dakika süreyle 7 000 g de santrifüj edilir. Santrifüjden sonra dipteki pelet (çöken kısım) bozulmadan üst sıvı boşaltılır.

(ii) 40-100 µm' lik delik çapına sahip filtre yardımıyla filtre edilir. Vakum pompası kullanılarak filtrasyon gerçekleştirilir. Filtreden geçirilen kısım santrifüj tüpüne alınır. Yumuşatma tamponuyla filtrat yıkanır. 10 °C' nin altındaki sıcaklıkta 10 dakika süreyle 10 000 g de veya 15 dakika süreyle 7 000 g de filtrat santrifüj edilir. Pelet bozulmaksızın üst sıvı boşaltılır.

1.5 1 ml pelet tamponuyla (İlave 2) tekrar süspanse edilir. Eşit iki parçaya bölünür ve her biri bir steril mikrotüpe aktarılır. Test için mikrotüplerden sadece bir tanesi kullanılır. Test süresince + 4 °C' de bu ekstraktın kalını saklanır. Diğer mikrotüpe steril glycerol'un % 10-25 (v/v) 'i ilave edilir. Karıştırılır. - 18 °C' de (haftalar) veya - 70 °C' de (aylarca) saklanabilir.

2. Immunofluorescence test (IF)

Ralstonia solanacearum, tercihen ırk3/biovar 2, için üretilen antiserum kullanılır. Üretici firmanın tavsiyelerine göre, Fluorescein isothiocyanate (FITC) konjugatın uygun bir seyreltmesiyle *Ralstonia solanacearum*'un homolog straininden ml'sinde 10⁶ hücre olan bir süspansiyon hazırlanarak antiserumun titresini tespit edilir. Ham antiserum en az 1:2000 IF titresine sahip olmalıdır.

En az 6 mm çapında tercihen 10 pencere mikroskop lamı kullanılır.

Her bir test lamı bir FITC konjugat kontrol içerir. FITC kontrolde eğer pozitif hücre görülürse, bir PBS kontrol ile tekrarlanmalıdır. *Ralstonia solanacearum*'un uygun ırk/biovarının bir straininden ml'sinde 10⁶ hücre bulunan bir süspansiyon hazırlanır ve bunlarla aynı pozitif kontrol lamları hazırlanır. Testin her biri için bir lam kullanılır.

2.1 Aşağıdaki prosedürlerden biriyle test lamları hazırlanır :

(i) Az nişastalı peletler için :

Pencerelerin bir sırasına tekrar süspanse edilmiş standart hacim pipetle koyulur (6 mm çapındaki pencere için 15 µl uygundur-daha büyük pencereler için hacim ayarlanır). Kalan sıra Şekil 1'de görüldüğü gibi ikinci bir örnek veya duplikasyon olarak kullanılabilir.

(ii) Diğer peletler için :

1/10, 1/100 ve 1/1000'lik seyreltmeler pelet tamponuyla hazırlanır. Pencerenin bir sırasına her bir seyreltme ve tekrar süspanse edilen peletin standart bir hacmi (6 mm çapındaki pencere için 15 µl uygundur-daha büyük pencereler için hacim ayarlanır) pipetle koyulur. Kalan sıra Şekil 2'de görüldüğü gibi ikinci bir örnek veya duplikasyon olarak kullanılabilir.

2.2 Damlacıklar kurumaya bırakılır. Ya ısıyla, alevle ya da % 95 ' lik etil alkolle lam üzerine bakteri hücreleri fikse edilir.

2.3 IF prosedürü

(i) 2.1 (i)' e göre test lamı hazırlanır:

IF tampon kullanılarak antiserumun iki katı olan seyreltmelerle bir seri hazırlanır (İlave 3) :

¼ titre (T/4), ½ titre (T/2), titre (T) ve iki katı titre (2T).

(ii) 2.1 (ii) ye göre test lamı hazırlanır:

IF tampon içinde antiserumun çalışma seyreltmesi (WD) hazırlanır. Çalışma seyreltmesi optimum spesifiteye sahip antiserum seyreltmesi ve genellikle titrenin yarısıdır.

Şekil 1

2.1 (i) ve 2.3 (i) ye göre test lamının hazırlanması
Tekrar süspanse edilen peletin standart seyreltmesi

		T= Titre				
		FITC	T/4	T/2	T	2T ⇒ Antiserumun iki katı seyreltmeleri
Örnek 1						
		1	2	3	4	5
Örnek 1'in dublikasyonu veya Örnek 2						
		6	7	8	9	10

Şekil 2

2.1 (ii) ve 2.3 (ii) ye göre test lamının hazırlanması

		Antiserumun standart seyreltmesi				
		FITC	Neat	1/10	1/100	1/1000 → Tekrar süspanse edilen peletin onluk seyreltmesi
Örnek 1						
		1	2	3	4	5
Örnek 1'in dublikasyonu veya Örnek 2						
		6	7	8	9	10

2.3.1 Nemli kağıt havlu üzerine lamlar dizilir.

Antiserum seyreltme(leri) test pencerelerine konur. FITC pencereleri üzerine PBS uygulanır. Pencerelere konulan antiserum miktarı ekstraktın miktarına eşit olmalıdır.

2.3.2 Oda sıcaklığında 30 dakika süreyle bir kapakla örtülerek inkube edilir.

2.3.3 Lam üzerindeki antiserum damlaları silkelenir ve lamlar dikkatlice IF tampona daldırılır. IF tampon-Tween ile 5 dakika yıkanır daha sonra IF tampon ile 5 dakika daha yıkanır (İlave 3). Fazla su dikkatlice alınır.

2.3.4 Nemli kağıt havlu üzerine lamlar dizilir. Titreyi tespit etmek için kullanılan FITC konjugatın seyreltmesiyle FITC penceresi ve test pencereleri kapatılır. Pencerelere uygulanan konjugatın miktarı uygulanan antiserumun miktarıyla eşit olmalıdır.

2.3.6 Lamin üzerindeki konjugat damlaları silkelir. 2.3.3' deki gibi daldırılır ve yıkanır. Yoğun su dikkatlice uzaklaştırılır.

2.3.7 Her bir pencereye 5-10 µl 0.1 M phosphate buffer gliserol (İlave 3) pipetle koyulur ve bir lamel kapatılır.

2.4 IF testinin okunması

FITC'nin harekete geçmesi için uygun filtreli epifluorescence mikroskopla lamalar incelenir. Bu inceleme için lamalar üzerine immersion yağı koyulur ve 500-1000 büyütmede inceleme yapılır. Pencere mikroskopta çapın sağ ve sol tarafı olmak üzere ikiye ayrılarak taranır.

İlk olarak pozitif kontrol lam incelenir. Hücreler parlak fluoressan ve tamamen boyanmış olmalıdır. Not: Eğer boyama iyi değilse test tekrarlanmalıdır.

Test lamaları okunur. İlk olarak FITC kontrol pencerelerinde fluoressan hücrelerin olup olmadığı kontrol edilir. FITC kontroldeki fluoressan veren hücreler konjugatın spesifik olmayan bağlanmasını, autofluorescence veya bulaşmayı gösterir. Not: Bu gibi bir durum söz konusuysa test tekrarlanır.

Test pencerelerinde *Ralstonia solanacearum*' un karakteristik morfolojiye sahip parlak fluoressan hücreleri kontrol edilir. Fluoressanın yoğunluğu (şiddeti) pozitif kontrolün aynı antiserum seyreltmesindeki yoğunluğuna eşit olmalıdır. Tam olarak boyanmamış veya zayıf fluoressan veren hücreler çok sayıda olmadıkça önemsenmemelidir (IF testinin sonucunun yorumlanmasına bakınız).

IF testi sonucunun yorumlanması :

(i) Eğer parlak karakteristik morfolojiye sahip fluoressan veren hücreler yoksa, IF testi negatiftir.

(ii) Eğer parlak karakteristik morfolojiye sahip fluoressan veren hücreler varsa, her bir mikroskop alanındaki hücrelerin ortalama sayısı tespit edilir ve tekrar süspansiyon edilen peletin her bir mililitresindeki hücrelerin (N) sayısı hesaplanır (İlave 4).

Tekrar süspansiyon edilen peletin her bir mililitresindeki yaklaşık 10^3 hücrelik bir popülasyon IF testi için tespit sınırı olarak düşünülmektedir,

-Tekrar süspansiyon edilen peletin her bir mililitresinde $N > 10^3$ hücre olan örneklerin IF testi pozitif olarak düşünülmektedir,

-Tekrar süspansiyon edilen peletin her bir mililitresinde $N < 10^3$ hücre olan örneklerin IF testi pozitif olarak düşünülebilir.

(iii) Çok fazla sayıda tam olarak boyanmamış veya zayıf fluoressan veren hücreler (her bir mililitrede $> 10^5$ hücre) antiserum titresinde görülüyorsa, ikinci bir test yapılmalıdır:

ya farklı bir biyolojik temele dayanan bir test, ya da

İkinci bir antiserum veya peletin 10 katı seyreltmesi kullanılarak IF testi tekrarlanır.

3. Enzyme Linked Immuno Sorbent test (ELISA)

Robinson-Smith et al., 1995 e göre

Ralstonia solanacearum' un tercihen ırk 3/biovar 2'si için üretilen antiserum kullanılır. Antiserum titresi, *Ralstonia solanacearum*' un homolog straininden hazırlanan ve mililitresinde 10^6 hücre bulunan bir süspansiyonla tespit edilir.

NUNC-Polysorb mikrotitre platelerin kullanımı tavsiye edilmektedir.

Negatif bir patates ekstraktı ve bir fosfat tuz tamponu (PBS) kontrol olarak kullanılır.

Ralstonia solanacearum' un uygun ırk/biovarının bir straininden hazırlanan $> 10^6$ hücre/ml' lik bir süspansiyon pozitif kontrol olarak kullanılır. Ancak pozitif kontrol olarak kullanılan örneklerle , mikrotitre plate üzerindeki örnekler iyi ayrılmış olmalıdır.

3.1 Bir mikrotüp içinde tekrar süspansiyon edilen peletin 100-200µl' si pipetle koyulur.

100 °C de 4 dakika süreyle ısıtılır. Buz üzerine mikrotüp konur.

3.2 İki kat kuvvetli karbonat coating buffer (İlave 5) eşit miktarda ilave edilir. Karıştırılır.

- 3.3 Mikrotitre plate'in kuyularına seyreltmelerin her biri en az iki kuyu olacak şekilde 100' er μ l ' lik bölümler şeklinde uygulanır. 37 °C de bir saat veya 4°C de bir gece süreyle inkube edilir.
- 3.4 Kuyulardan ekstrakt tek bir ani hareketle boşaltılır. PBS-Tween (İlave 5)' le 3 kez kuyular yıkanır, kuyularda son yıkama solusyonu en az 5 dakika süreyle bırakılır.
- 3.5 Bloklama bufferi (İlave 5) kullanılarak *Ralstonia solanacearum* antiserumunun uygun seyreltmeleri hazırlanır. Kuyulara antiserum seyreltmesinin 100 μ l 'si ilave edilir. 37 °C de bir saat süreyle inkube edilir.
- 3.6 Kuyulardan tek bir hareketle antiserum boşaltılır. 3.4 de olduğu gibi kuyular yıkanır.
- 3.7 Bloklama tamponu kullanılarak alkaline phosphatase konjugatın uygun seyreltmesi hazırlanır. Kuyulara konjugatın 100 μ l 'si ilave edilir. 37 °C de bir saat süreyle inkube edilir.
- 3.8 Kuyulardan tek bir ani hareketle konjugat boşaltılır. 3.4 ve 3.6 da olduğu gibi kuyular yıkanır.
- 3.9 Alkaline phosphatase substrate solusyonu (İlave 5) hazırlanır. Kuyulara 100 μ l ilave edilir. Oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika ila 1 saat süreyle inkube edilir.
- 3.10 409 nm de absorbans değerleri okunur.

ELISA testinin yorumu :

Eğer örneğin optik yoğunluğu (OD) negatif kontrolünkünden <2xOD ise ELISA testi negatiftir.

Eğer örneğin optik yoğunluğu (OD) negatif kontrolünkünden >2xOD ise ELISA testi pozitifdir.

4. Polymerase Chain Reaction test (PCR)

Seal et al., 1993 e göre

Not: PCR yaparken örneğin hazırlanmasının tüm evrelerinde ve diğer işlemlerde filtreli pipet uçları kullanılmalıdır.

Ralstonia solanacearum'un ırk 3/biovar 2 straininden 10^6 hücre/ml konsantrasyonda hazırlanan bir süspansiyon pozitif kontrol olarak kullanılır.

- 4.1 Bir mikrotüp içine tekrar süspanse edilmiş peletin 100 μ l ' si pipetle koyulur. Diğer bir yolda ; 10 μ l 0.5 M NaOH içeren bir mikrotüpe 90 μ l tekrar süspanse edilmiş pelet ilave edilir. Mikrotüp tekrar tekrar ters yönde çevrilerek karıştırılır.
- 4.2 100 °C de 4 dakika süreyle ısıtılır. Hemen buz üzerine mikrotüp aktarılır.
- 4.3 1/10 ve 1/100 gibi en az iki 10' lu seyreltme hazırlanır, eğer faydalı olacağı düşünülüyorsa bu daha fazla sayıda da olabilir, bu seyreltmeler steril destile veya ultra saf su (UPW) ile hazırlanır.
- 4.4 Aşağıda yer alan bileşikler aynı sırayla ilave edilerek bir steril tüp içinde PCR reaksiyon karışımı (İlave 6) hazırlanır :

50 μ l lik reaksiyon hacmi için :

İçerik	Miktar	Son konsantrasyon
Steril destile veya UPW	30.8-33.8 μ l	
10 x PCR buffer	5.0 μ l	1x
d-ATP	1.0 μ l	0.2 mM
d-CTP	1.0 μ l	0.2 mM
d-GTP	1.0 μ l	0.2 mM
d-TTP	1.0 μ l	0.2 mM
Primer OLI-1 (20 μ M)	2.5 μ l	1 μ M
Primer Y-2 (20 μ M)	2.5 μ l	1 μ M
Taq polymerase (5 U/ μ l)	0.2 μ l	1.0 U

Daha fazla sayıda reaksiyon için :

İhtiyaç duyulan sayıdaki reaksiyon için her bir madde miktarı hesaplanır.

Maddeler karıştırılır ve 45 µl – 48 µl' lik karışım steril PCR tüpleri içine aktarılır.

PCR reaksiyon karışımının olduğu tüpler buz üzerinde tutulmalıdır.

25 µl' lik reaksiyon hacmi için :

Maddeler indirgenir.

4.5 PCR çoğalması

4.5.1 İsteğe bağlı : Kaynamış örnek ve pozitif kontrol içeren tüpler sallayarak çöktürülür.

Örnek(lerin) 2-5 µl' si, su kontrol ve pozitif kontrolün PCR reaksiyon karışımının bulunduğu tüplere (belirtilen sırada) ilave edilir. Tüpler DNA thermal cycler' ın ısıtma bloğuna yerleştirilir.

4.5.2 Aşağıdaki program uygulanır :

1 cycle' lık :

(i) 96 °C de 2 dakika : örneğin denaturasyonu

50 cycle' lık

(ii) 94 °C de 20 saniye : denaturasyon

(iii) 68 °C de 20 saniye : primerlerin annealingi

(iv) 72 °C de 30 saniye : Kopyanın uzatılması

1 cycle' lık

(v) 72 °C de 10 dakika : daha ileri uzatma

1 cycle' lık

(vi) 4 °C de tutma

Not: Bu parametreler Perkin Elmer 9600 içindir. Diğer thermal cycler' lar PCR reaksiyon tüplerini kaplamak ve/veya çoğaltma profilindeki (ii), (iii) ve (iv) basamaklarında modifikasyon için mineral yağa ihtiyaç duyulabilir.

4.5.3 Thermal cycler' dan tüpler çıkarılır. PCR ürününün analizi yapılır. Eğer hemen yapılmazsa fakat aynı gün içinde kullanılacaksa tüpler 4 °C de veya daha sonra kullanılacaksa – 18 °C de saklanır.

4.6 PCR ürününün analizi

PCR ürünleri agarose jel elektroforezle tespit edilir ve EtBr ile boyanır.

4.6.1 Tris-acetate-elektroforez (TAE) buffer içinde agarose yavaşça kaynatılarak uygun bir agarose jel hazırlanır.

4.6.2 50-60 °C ye kadar erimiş agarose soğutulur, elektroforez tankına dökülür ve tarak yerleştirilir. Katılaşması için bırakılır.

4.6.3 Tarak çıkarılır. TAE buffer jelin üzerini 2-3 mm kalınlığında örtene kadar doldurulur.

4.6.4 Bir parafilm üzerine yükleme tamponundan 3 µl koyulur. Ya örnekler, pozitif kontrol ya da su kontrolden 12 µl' lik PCR ürünü ilave edilir ve yüklemmeden önce pipet ucuyla hafifçe karıştırılır. Agarose jeldeki kuyuların kapasitesine göre yüklenecek miktarlar değiştirilebilir.

4.6.5 Jeldeki kuyulara dikkatlice yüklenir. En azından bir kuyuya referans olarak uygun bir DNA marker koyulur.

4.6.6 Elektroforez ekipmanı ve güç kaynağının kabloları birbirine bağlanır. Jelin ucuna 1 cm kalıncaya kadar 5-8 V/cm de örnekler koşturulur.

4.6.7 Güç kaynağı kapatılır. Elektroforez biriminin kabloları çıkarılır. Jel dikkatlice kaldırılır. 30-45 dakika süreyle EtBr solusyonuna batırılır.

Not: EtBr kuvvetli bir mutajen olduğundan çalışırken daima eldiven giyilmelidir !

4.6.8 10-15 dakika süreyle destile su içinde boya yıkanır.

4.6.9 UV transilluminator üzerinde çoğaltılmış olan DNA bantları görülebilir. OLI-1 ve Y-2 primer setiyle *Ralstonia solanacearum*' un PCR ürünü 288 bp uzunluğundadır. DNA marker ve pozitif kontrolle karşılaştırılarak kontrol edilir.

Not: Her zaman su kontrol negatif olmalıdır. Eğer pozitifse test tekrarlanır.

4.6.10 Eğer kayda ihtiyaç varsa jelin fotoğrafı çekilir.

4.6.11 Restriction enzim analizi (REA) ile çoğaltılmış bantların güvenilirliği doğrulanır.

4.7 Restriction Enzim Analiz (REA)

4.7.1 Yeni bir mikrotüpe PCR ürününden (4.5.3) 8.5 µl aktarılır. 10 x enzim tamponun 1 µl' si ve restriction enzim Avall nin 0.5 µl' si ilave edilir.

4.7.2 Pipet ucuyla hafifçe karıştırılır. Tüpün duvarlarında eğer damlalar kalırsa, mikrosantrifüjle çöktürülür. 37 ° C de 1 saat inkube edilir.

4.7.3 4.6 da olduğu gibi agarose jel elektroforez yapılarak PCR bantları analiz edilir.

PCR test sonucunun yorumlanması :

Eğer karakteristik 288 bp seviyesinde bantlar yoksa ve *Ralstonia solanacearum*'un pozitif kontrolünde bant varsa PCR testi negatiftir. Eğer 288 bp seviyesinde bant var ve çoğaltılmış bantın REA analizi *Ralstonia solanacearum*'un pozitif kontrolüyle benzerse, PCR testi pozitifdir.

5 Seçici besi ortamına ekim testi

Elphistone et al., 1996' a göre

5.1 Uygun bir seyreltme serisi ekim tekniği kullanılarak test yapılır, örneğin:

(i) En azından iki onluk seyreltme hazırlanır. (1/10 ve 1/100 veya eğer faydalı olacağı düşünülüyorsa daha fazla) Bu seyreltmeler pelet tampon kullanılarak tekrar süspanse edilen peletten hazırlanır. Bu seyreltmelerin standart bir miktarı (50-100 µl) pipetle çekilir ve modifiye SMSA seçici ortamına (İlave 7) aktarılır ve cam bagetle tüm yüzeye yayılır.

Eğer faydalı olacağı düşünülüyorsa, tekrar süspanse edilen peletten bir öze dolusu (10 µl) alınır ve çizgi ekimle ekilir. Çizgiler arasında öze alevden geçirilir.

(ii) Modifiye SMSA seçici ortamı üzerine tekrar süspanse edilen peletin standart bir miktarı (50-100 µl) aktarılır ve cam bir bagetle yayılır.

En az iki modifiye SMSA petri üzerine alevden geçirilmeyen çubukla çizilir.

5.2 Aynı seyreltme ekim tekniği kullanılarak, *Ralstonia solanacearum*'un virulent ırk 3/biovar 2 ırkının 10⁶ hücre/ml' lik bir süspanسیونpozitif kontrol olarak modifiye SMSA ortamı üzerine ekilir.

5.3 28 °C de petriler inkube edilir. 3 gün sonra petrilere bakılır. Eğer negatifle, 6 güne kadar inkube edilir. *Ralstonia solanacearum*'un virulent izolatlarının kolonileri sütümsü-beyaz, düz, düzensiz ve merkezde kan kırmızı renkli akışkandır.

5.4 Genel bir besi ortamı üzerinde (İlave 1) alt kültür yapılarak, karakteristik morfolojiye sahip koloniler saflaştırılır.

5.5 Saf kültürler tanılanır (Bölüm II, 4.1) ve patojenisite testi (Bölüm II, 4.3) yapılarak *Ralstonia solanacearum* kültürleri doğrulanır.

Seçici besi ortamına ekim testinin yorumlanması :

Ralstonia solanacearum' un pozitif kontrolünde karakteristik kolonilerin bulunması ve diğer bakteriler tarafından oluşturulan bir engellemeden şüphe edilmemesi koşuluyla; eğer bakteri kolonileri altı gün sonra görülmüyorsa veya karakteristik *Ralstonia solanacearum* kolonileri izole edilmemişse seçici besi ortamına ekim testi negatiftir. *Ralstonia solanacearum*' un karakteristik kolonileri izole edilmişse seçici besi ortamına ekim testi pozitifdir.

6 Bioassay testi

Janse, 1988'e göre.

6.1 Her bir örnek için 3 gerçek yapraklı hassas domates veya patlıcan fidelerinden 10 tanesi kullanılır.

- 6.2 Tekrar süspanse edilen peletin 10 µl' si test bitkileri arasında dağıtılır. İnokulum kotiledonlar arasındaki bir veya daha fazla bölgeden sapa yayılır.
- 6.3 Aynı teknikle; pozitif kontrol olarak *Ralstonia solanacearum*' un virulent ırk 3/ Biovar 2 straininin 10⁶ hücre/ml' lik bir süspanasyonu ve negatif kontrol olarak pelet tampon kullanılarak 10 fide inokule edilir. Bulaşmadan kaçınmak için pozitif kontrol diğer bitkilerden ayrı tutulur.
- 6.4 22 – 28 °C sıcaklıklarda ve günlük olarak sulama yapılarak sağlanan yüksek orantılı nemde 4 hafta süreyle test bitkileri geliştirilir. Solgunluk, epinasti, kloroz ve/veya cüceleşme gözlenir.
- 6.5 Enfekteli bitkilerden izolasyon yapılır (Bölüm II). Karakteristik morfolojisiyle saf kültürler tanınır (Bölüm II.4.1) ve bir patojenisite testi yapılarak *Ralstonia solanacearum* kültürleri doğrulanır (Bölüm II.4.3).
- 6.5 Eğer faydalı olacağı düşünülüyorsa, belirti göstermeyen test bitkilerinin bir bölümü enfeksiyonun olup olmadığı konusunda kontrol edilir. Her bir test bitkisinin inokulasyon noktasının 2 cm üzerinden 1 cm' lik bir sap kısmı alınır. Yumuşatma tampon da dokular homojenize edilir. Seyreltme serisi hazırlanır (Bölüm III.5.1). Eğer pozitifse, karakteristik morfolojisiyle saf kültürler tanınır (Bölüm II.4.1) ve patojenisite testi yapılarak kültürler doğrulanır (Bölüm II.4.3).

Bioassay test sonucunun yorumlanması :

Ralstonia solanacearum belirtilerinin pozitif kontrolde görülmesi koşuluyla eğer test bitkileri ;

Ralstonia solanacearum ile enfekteli değilse bioassay testi negatiftir.

Ralstonia solanacearum ile test bitkileri enfekteli ise bioassay testi pozitifdir.

7. Zenginleştirme testleri

Elphinstone et al., 1996' a göre.

7.1 3 ml modifiye SMSA broth içine tekrar süspanse edilen peletin 100 µl' si aktarılır (İlave 7).

7.2 Havalanma için tüpün tıpası hafifçe gevşek takılarak 48 saat süreyle (72 saatten daha fazla değil) , 28 °C de inkube edilir.

7.3 Tıpa sıkıca kapatılır ve karıştırılır. IF test (Bu bölüm, 2.), ELISA testi (Bu bölüm, 3.) ve/veya PCR testi (Bu bölüm,4.) için seyreltme serisi hazırlanır.

8. Patojenisite testi

Bölüm II.4.3.' e bakınız.

İlave 1

Ralstonia solanacearum ' un izolasyonu ve kültüründe kullanılan besi ortamları

Nutrient Agar (NA)

Nutrient agar (Difco)	23 g
Destile su	1 litre

1 litrelik erlenlerde yarım litre ortam hazırlanır. Karşımdaki maddeler eritilir.

15 dakika 121 °C de otoklavla sterilize edilir.

50 °C ye soğutulur. Petrilere dökülür.

Yeast-Peptone-Glucose Agar (YPGA)

Yeast extract (Difco)	5 g
Bacto peptone(Difco)	5 g
D(+) Glucose (monohidrat)	10 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Destile su	1 litre

Bir litrelik erlenlere yarım litre ortam hazırlanır.

İçindekiler çözülür.

15 dakika 121 °C de otoklavla sterilize edilir.

50 °C ye soğutulur. Petrilere dökülür.

Sucrose Peptone Agar (SPA)

Sucrose 20 g.

Peptone 5 g

K₂HPO₄ 0.5 g

MgSO₄.7H₂O 0.25 g

Bacto agar(Difco) 15 g

Destile su 1 litre

Bir litrelik erlenlere yarım litre ortam hazırlanır.

İçindekiler çözülür. Eğer gerekiyse pH 7.2-7.4' e ayarlanır.

15 dakika 121 °C de otoklavla sterilize edilir.

50 °C ye soğutulur. Petrilere dökülür.

Kelman'ın tetrazolium agarı

Casamino acid (Difco) 1 g

Bacto peptone (Difco) 10 g

Dextrose 5 g

Bacto agar (Difco) 15 g

Destile su 1 litre

Bir litrelik erlenlere yarım litre ortam hazırlanır.

İçindekiler çözülür.

15 dakika 121 °C' de otoklavla sterilize edilir.

50 °C' ye soğutulur.

Litrede 50 mg' lık bir son konsantrasyon sağlamak için triphenyl tetrazolium chloride (Sigma) nın filtre sterilize edilmiş sulu solusyonu ilave edilir.

Petrilere dökülür.

İlave 2

Örneğin hazırlanmasında kullanılan materyaller

Maceration (yumuşatma) tampon : 50 mM fosfat tampon, pH 7.0

Bu tampon dokuyu yumuşatmak için kullanılır.

Na₂HPO₄ 4.26 g

KH₂PO₄ 2.72 g

Destile su 1 litre

İçindekiler çözülür ve pH kontrol edilir. Uygun olduğu düşünülen şekilde bölünür.

15 dakika 121 °C' de otoklavda sterilize edilir.

Çoğalmayı sınırlandıran ekstrakt içindeki aromatik moleküllerin şiddetini azaltmak için direk PCR testi yapılırken % 5 lik polyvinylpyrrolidone-40000 MWT (PVP-40) ilavesi tavsiye edilir.

Patates dokularının yumuşaması için Waring blender veya Ultra Thurrax kullanılarak yapılan homojenizasyon prosedüründe bir topaklanmayı önleyici, bir köpüklenmeyi engelleyici veya bir oksitlenmeyi engelleyici ilavesi tavsiye edilir.

Lubrol flakes	her bir litre için 0.5 g
DC Silicone antifoam	her bir litre için 1.0 ml
Tetrasodiumpyrophosphate	her bir litre için 1.0 g

Ayrı otoklav edilir. İstenilen konsantrasyonda ilave edilir.

Pellet tampon : 10 mM fosfat tampon, pH 7.2.

Bu tampon patates heel end ve pelletlerinin sulandırılması ve tekrar süspanse edilmesinde kullanılır.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.7 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.4 g
Destile su	1 litre

İçindekiler çözülür ve pH kontrol edilir. Uygun olduğu düşünülen şekilde bölünür.
15 dakika 121 °C' de otoklavla sterilize edilir.

İlave 3

IF testinde kullanılan materyaller

IF tampon : 10mM fosfat buffer saline (PBS) pH 7.2

Bu tampon antiserumun sulandırılmasında kullanılır.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.7 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.4 g
NaCl	8.0 g
Destile su	1 litre

İçindekiler çözülür ve pH kontrol ölçülür. Uygun olduğu düşünülen şekilde bölünür.
15 dakika 121 °C' de otoklavla sterilize edilir.

IF tampon - Tween

Bu tampon lamaların yıkanmasında kullanılır. IF tampona %0.1' lik Tween 20 ilave edilir.

0.1 M Fosfat buffer glycerol pH 7.6

Bu tampon fluorescenceyi zenginleştirmek için IF laminın pencereleri üzerine konulan bir yayıcı sıvı olarak kullanılır?

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3.2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.15 g
Glycerol	50 ml
Destile su	100 ml

İlave 4
IF testi içindeki bulaşma seviyesinin tespiti

Çok pencereli lamda pencerenin yüzey alanı (S)

$$= \frac{\pi D^2}{4}$$

D=Pencerenin çapı (1)

Objektif alanının yüzey alanı

$$= \frac{\pi d^2}{4}$$

d=alanın çapı (2)

ya aşağıdaki formülden ya da direk ölçümle "d" hesaplanır.

$$S = \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4} \quad (3)$$

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

K = tılp katsayısı (1 veya 1.25),

G = Objektif büyütmesi 100x, 40x gibi

(2) den

$$d = \sqrt{\frac{4S}{\pi}}$$

(3)den

$$d = \sqrt{\frac{4 \times \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4}}{\pi}} = \frac{i}{GK}$$

Her bir alandaki tipik fluorescent hücrelerin miktarını sayılır (c)

Her bir penceredeki tipik fluorescent hücrelerin miktarını hesaplanır (c)

$$C = \frac{c \cdot S}{s}$$

Peletteki tipik fluorescent hücrelerin miktarını hesaplayın (N)

$$N = c \times \frac{1000}{Y} \times F$$

Y= penceredeki peletin hacmi

F= pelet sulandırma faktörü

İlave 5

ELISA testinde kullanılan materyaller

İki kat kuvvetli Karbonat 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. Uygun olduğu düşünülen şekilde bölünür.

15 dakika 121 °C de otoklavla sterilize edilir.

Eğer ekstrakt yüksek fraksiyonda aromatik molekül içeriyorsa anti-oxidant olarak son konsantrasyonda % 0.2 olacak şekilde Sodium sülfid ilave edilebilir.

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

İçindekiler çözülür ve pH ölçülür. Uygun olduğu düşünülen şekilde bölünür.

15 dakika 121 °C de otoklavla sterilize edilir.

Fosfat Buffer Saline-Tween (PBS-T)

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

Bloklama (antibody) Buffer (taze olarak hazırlanmalı)

10x PBS	10 ml
Polyvinylpyrrolidone-44000 MWT (PVP-44)	2.0 g
% 10 Tween 20	0.5 g
Süt tozu	0.5 g
Destile su	100 ml

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.

MgCl₂ 0.2 g ilave edilir.

Solusyonun her 15 ml si için 5 mg ' lıkiki phosphatase substrat tablet (Sigma) çözülür.

İlave 6
PCR testinde kullanılan materyaller

Oligonucleotide primer dizilişı

Primer OLI-1 5' – GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC – 3'
Primer Y-2 5' – CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT – 3'

Materyaller için Seal et al (1993) e bakınız.

İlave 7
Seçici besi ortamına ekim ve zenginleştirme testlerinde kullanılan materyaller

SMSA seçici ortamı (Engelbrecht, 1994, 1996, Elphinstone tarafından modifiye edilmiş) agar ve tetrazolium tuzları silinir.

Basal medium

Casamino asit (Difco)	1 g
Bactopeptone (Difco)	10 g
Glycerol	5 ml
Agar (Difco)	15 g
Destile su	1 litre

1 litrelik erlenlerde yarım litre ortam hazırlanır.

İçindekiler çözülür ve pH kontrol edilir. Eğer gerekliyse otoklavdan önce pH 6.5 e ayarlanır. *Ralstonia solanacearum* pH 7.0 den fazla olan ortamlar üzerinde iyi gelişmez.

15 dakika 121 °C de otoklavla steril edilir.

50 °C ye soğutulur.

Son konsantrasyon için aşağıdakiler (tümü Sigma' dan) ilave edilir.

Crystal violet	litrede	5 mg
Polymixin B sülfat	"	100 mg (yaklaşık 600.000 unite) Sigma P-1004
Bacitracin (*)	"	25 mg (yaklaşık 1250 unite) Sigma B-0125
Chloramphenicol	"	5 mg Sigma C-3175
Penicillin – G	"	0.5 mg (yaklaşık 825 unite) Sigma P-3032
Tetrazolium tuzu	"	50 mg

Hazırlanan ortam için verilen konsantrasyonlar % 70' lik etil alkol içinde çözülerek hazırlanır. Bazıları örneğin polymixin B sülfat ve chloramphenicol hafif ısıtma ve çalkalamaya ihtiyaç duyar.

SMSA broth (Elphinstone et al., 1996)

Agarsız SMSA seçici ortamı hazırlanır.

Tek kullanımlık üniversal tüplere 30 ml 3' er ml olarak bölünerek paylaştırılır.

(*) Eğer gerekli olduğu düşünülüyorsa, bacitracin konsantrasyonu 300 ppm e artırılabilir. Bu şekilde *Ralstonia solanacearum*' un gelişmesi azalmaksızın saprofitlerin bulaşıklığı azaltılabilir.

EK-III

1. Listelenen bitkisel materyal için Ek II' de yer alan veya resmi olarak onaylanan metotlar kullanılarak yapılan testler sırasında bu Tebliğin 9. Maddesinde belirtilen şüpheli bir durumla karşılaşıldığında uygulanan metot tamamlanıncaya veya doğrulama testleri sonuçlanıncaya kadar ;
 - Mümkün olan her yerde, lot veya alınan örnek orijinal ambalajında ve etiketi ile
 - Mümkün olan her yerde, örneğin geri kalan kısmı,
 - IF lamaları gibi tarama testleri esnasında hazırlanan preparat veya ekstrakt,
 - İlgili dokümanlar ,bekletilir ve muhafaza altına alınır.
2. Organizmanın varlığının doğrulanması durumunda;
 - (EK- III)' ün 1 inci maddesinde sözlü geçen materyaller ve ,
 - Yumru veya bitki ekstraktlarıyla inokule edilmiş enfekteli domates veya patlıcan materyali,
 - Organizmanın izole edilen kültürü,bildirimden sonra en az bir ay süreyle uygun şekilde muhafaza edilir.

EK -IV

Bu Tebliğin 11 inci maddesine göre başlatılacak çalışmada yer alması gereken esaslar :

(i) Üretim yerleri,

- Organizmayla enfekteli olarak bulunan patateslerle klonal akrabalığı olan yetiştirilmiş veya yetiştirilmekte olan patateslerin,
- Organizmayla bulaşık olarak bulunan domateslerle aynı kaynaktan gelen yetiştirilmiş veya yetiştirilmekte olan domateslerin,
- Organizmanın varlığından şüphe edilmesi durumunda, resmi olarak kontrol altında bulunan yetiştirilmiş veya yetiştirilmekte olan patates veya domateslerin,
- Organizmayla bulaşık olarak bulunan üretim yerlerinde yetiştirilmiş patateslerle klonal akrabalığı olan yetiştirilmiş veya yetiştirilmekte olan patateslerin,
- Bulaşık üretim yerlerine komşu alanlarda yetiştirilen patates veya domatesler ile bu gibi yerlerde müşterek olarak kullanılan alet ve ekipmanlar,
- Organizmayla bulaşık olduğundan şüphe edilen veya organizmanın varlığının doğrulandığı herhangi bir kaynaktan alınan ve sulama veya ilaçlama için kullanılan yüzey suyu,
- Organizmayla bulaşık olduğundan şüphe edilen ve bulaşık olduğu doğrulanan üretim yerleriyle ortak kullanılan bir kaynaktan alınan ve ilaçlama ve sulama için kullanılan yüzey suyu,
- Organizmayla bulaşık olduğundan şüphe edilen veya bulaşık olduğu doğrulanan yüzey suyunun yaptığı taşkınlardan etkilenen alanlar ve;

(ii) Organizmayla bulaşık olduğu bilinen üretim yerleri veya taşkınlardan etkilenen tarlaların sulanması ve ilaçlanmasında kullanılan yüzey suyunu .

1. Bu Tebliğin 11inci maddesinin (b) ve (f) bentlerinde belirtilen olası bulaşmaların derecesinin belirlenmesindeki temel esaslar :

- 11 inci maddenin (a) bendine göre bulaşık olduğu belirtilen üretim alanında üretilen listelenmiş bitkisel materyal,

- Üretim araçları ve binaları müşterek olarak kullanılan, 11 inci maddenin (a) bendine göre bulaşık olduğu belirtilen listelenen bitkisel materyalle üretim bağlantısı olan üretim yerleri,

-Bir önceki paragrafta belirtilen yerlerde üretilen listelenmiş bitkisel materyal veya 11 inci maddenin (a) bendine göre bulaşık olduğu belirlenmiş ve bu tip yerlerde bulunan materyal,

-Yukarıda belirtilen yerlerde üretilen listelenmiş bitkisel materyalin işleme depoları,

-11inci maddenin (a) bendine göre bulaşık olarak belirtilen listelenen bitkisel materyal ile temas edebilecek makine, araç, gemi, depo ve ambalaj materyalini de içeren diğer objeler,

-Yukarıda belirtilen yapılar veya araçlarla dezenfeksiyon ve temizlik öncesi temas eden listelenmiş bitkisel materyal,

-Test sonucu negatif çıksa bile klonal akrabalık nedeniyle bulaşıklık ihtimali olan ve 11 inci maddenin (a) bendine göre bulaşık olduğu belirlenen patates bitki ve yumrularının klonal akrabalık ilişkilerinin bulunduğu patatesler ve aynı kaynaktan gelen domates bitkileri.

-Bir önceki ifade de belirtilen bitkilerin üretim yerleri,

-11 inci maddenin (e) bendine göre bulaşık olduğu tespit edilen yerlerden alınan suyla ilaçlama ve sulama yapılan listelenmiş bitkisel materyalin üretim alanları,

-Organizmayla bulaşık olduğu doğrulanmış yüzey suları ile su baskınına uğramış listelenen bitkisel materyalin bulunduğu tarlalar,

2. Bu Tebliğin 11 inci maddesinin (c) ve (f) bentlerinde yer alan olası yayılımın sınırlarının belirlenmesinde yapılması gerekenler aşağıda yer almaktadır.

(i) 11 inci maddenin (c) bendinde yer alan durumlarda ;

- Listelenmiş bitkisel materyalin diğer üretim bölgelerine yakınlığı,

- Yaygın üretim ve tohumluk patates stoklarının kullanımı,

- 11 inci maddenin (a) bendine göre bulaşık olduğu belirlenen üretim yerlerinde meydana gelen sel ve taşkınlar sonucunda oluşan yüzey sularıyla ilaçlama ve sulaması yapılan üretim yerleri ,

(ii) Bulaşık olduğu belirlenen yüzey suları söz konusu ise,

- Bulaşık olduğu belirlenen yüzey sularına yakın veya su baskını riski altında olan listelenen bitkisel materyalin üretildiği üretim alanları,

- Bulaşık olduğu belirlenen yüzey suları ile ilişkili herhangi bir sulama havzası,

3. Bu Tebliğin 11 inci maddesinin (g) bendinin birinci paragrafında yer alan bildirimlerin ayrıntıları şunları içermelidir :

Bu Tebliğin 9 ve 10 uncu maddelerine göre şüpheli durumun rapor edildiği tarih ve 11inci maddeye göre örneklemenin yapıldığı ve organizmanın varlığının teyit edildiği tarihler,

- Belirtilen bulaşma ve alan sınırlarının ana esaslarının bir tanımı,

4. Bu Tebliğin 11inci maddesinin (g) bendinin ikinci paragrafında yer alan ilave bildirimlerin ayrıntıları şunları içermelidir :

- Tohumluk patates stokları ve mümkün olan yerlerde diğer tüm durumlar içinde çeşit ismi ve kategorisi,

- Teyit edilen salgına ilişkin ihtiyaç duyulan diğer tüm bilgiler.

EK- VI

1. Bu Tebliğin 12 inci maddesine göre yapılması gerekenler aşağıda yer almaktadır.

-Çöp fırınında yakarak, veya

-Organizmanın yaşama riski olmayan yerlerde sıcak uygulaması sonrası hayvan yemi olarak kullanma, veya

-Tarımsal alanlara sızıntı riski olmayan veya tarımsal alanların sulanmasında kullanılan su kaynaklarıyla temas etmeyecek yerlerde derin gömme, veya

- (EK- VII)' de belirtilen koşullara uygun, resmi olarak onaylanmış atık tesisleri olan bir yere direk ve derhal ulaştırılarak endüstriyel işleme tabi tutma, veya

- Organizmanın belirgin yayılma riskinin olmayacağı diğer önlemler ki bunlar Bakanlığa bildirilmelidir.

2. Bu Tebliğin 13 üncü maddesinde belirtilen listelenmiş bitkisel materyalin elden çıkarılması veya uygun bir şekilde kullanılması için Bakanlık ile iletişim kurulmalı ve bu materyal resmi olarak onaylanmış atık tesisleri olan yerlerde endüstriyel işleme tabi tutulurken Bakanlıkça kontrol edilmelidir.

(i) Patates yumruları,

- Sofralık patates olarak kullanılır ve uygun çöp atık sistemi olan tesislerde paketlenerek direk olarak dağıtıma verilir,

- Uygun atık arıtma sistemi olan patates işleme tesislerine direk ve acil olarak ulaştırılır ve sanayi patatesi olarak kullanılır,

- 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 ise ,

- İmha edilir, veya

- Organizmanın yayılması konusunda risk yaratmayacak diğer bir yöntem kullanılabilir.

3. Bu Tebliğin 14 üncü maddesinde belirtilen araç ve objeler Bakanlığın gözetiminde organizmanın yayılmasına olanak vermeyecek şekilde dezenfekte edilir veya temizlenir.

4. Bu Tebliğin 11inci maddesinin (c) ve (f) bentlerine ve 15 inci maddesine atfen kurulan sınırlandırılmış bölgede uygulanan önlemler dizisi şunları içermelidir :

4.1. Bu Tebliğin 11inci maddesinin (a) bendine göre bulaşık olarak belirlenen üretim alanlarının bulunması durumunda :

(a) 11inci maddeye göre bulaşık olduğu belirlenen korunmuş ürünün olduğu yer veya tarlada,

(i) Bulaşmanın tespitinden sonraki 4 üretim yılı boyunca,

Kendi gelen patates ve domates bitkileri ile Solanaceae yabancı otları dahil diğer konukçu bitkilerin eliminasyonu için önlemler alınır,

Aşağıdakiler ekilmez

Patates yumru ve bitkileri,

Domates bitki ve tohumları,

Organizmanın biyolojisi hesaba katılır,

Diğer konukçu bitkilerde,

Organizmanın üzerinde yaşama riski bulunduğu Brassicae türü bitkiler,

Organizmanın yayılma riski olan diğer bitkiler,

Bir önceki bölümde belirtilen süre sonunda ilk domates veya patates üretim sezonunda ve tarlanın kendi gelen domates ve patates bitkilerinden ve Solanaceae' ler dahil konukçu bitkilerden art arda en az iki yıl süreyle temiz olması durumunda,

Patates için sadece tüketim amaçlı üretim için resmi olarak sertifikalı tohumluk patates kullanılır,

Testleri de içeren ve bu Tebliğin 4 üncü maddesinde detaylandırılan resmi sürveyler yapılır,

Bir önceki bölümde ifade edilen domates veya patates üretim sezonundan ve takip eden rotasyondan sonraki tohumluk veya yemeklik patates üretiminde sertifikalı tohumluk kullanılmalı, domates ve patatesler için bu Tebliğin 4 üncü maddesindeki sürveyler yapılır,

(ii) Bulaşmanın belirlenmesini takip eden 5 üretim yılı boyunca,

Kendi gelen patates ve domates bitkileri ile Solanaceae yabancı otları dahil diğer konukçuları elimine etmek için önlem alınmalı

Tarla ilk 3 yıl boyunca ya nadasa bırakılır ya da tanımlanan riske göre hububat veya sık bir şekilde ekilmiş yem bitkileri ya da tohumluk üretimi için çim ekilir, organizmanın konukçusu olmayan bitkilerle 2 yıllık bir dikim de bunu izler.

Yukarıdaki ekim nöbetini takiben eğer tohumluk veya tüketim amaçlı patates yetiştirilecekse sertifikalı tohumluk kullanılır,

Ve testleri de içeren bu Tebliğin 4 üncü maddesinde detaylandırılan resmi sürveyler yapılır.

(b) Diğer tarlalarda:

Belirlenen bulaşmayı takip eden üretim yılında:

Patates bitki ve yumruları ile organizmanın diğer konukçuları yetiştirilmez ve kendi gelen patates ve domates bitkileri ile yabancı Solanaceae' ler dahil diğer konukçularının imhası için gerekli önlemler alınır,

Patates yetiştirilmesi durumunda sadece tüketim amaçlı patates üretimi için sertifikalı tohumluk kullanılır ancak kendi gelen patates ve domates bitkileri ile yabancı Solanaceae' ler dahil diğer konukçuların risk oluşturmadığından emin olunmalıdır. Vegetasyon döneminde kontroller yapılır ve kendi gelen patates bitkileri organizma yönünden test edilir. İlave olarak hasat edilen yumrular da kontrol edilir.

Yukarıda açıklanan yılı takip eden üretim yılında,

Patates için tohumluk ya da tüketim amaçlı üretim için sertifikalı tohumluk kullanılır.

İkinci üretim yılı için,

Patates için tohumluk veya tüketim amaçlı üretim için sertifikalı tohumluk ya da, kontrol edilmiş sertifikalı tohumdan elde edilen tohum kullanılır.

Yukarıda belirtilen her üretim yılı için kendi gelen patates ve domates bitkileri ile yabancı Solanaceae' ler dahil diğer konukçu bitkilerin imhası için gerekli önlemler alınır ve bu Tebliğin 4 üncü maddesinde belirtilen sürveyler yapılır. Tohumluk üretimi söz konusu ise yumrular da testlenir.

(c) Bu Tebliğin 11inci maddesinin (a) bendine göre bulaşıklık tespit edildiğinde tekrar patates veya domates üretimi için izin verilen yıl dahil geçen yıllarda;

Organizmanın yayılmasını önlemek için sulama ve ilaçlama programları kontrol edilir, gerekli görülürse yasaklanır.

- (d) Korunmuş ürün üretim birimlerinde bu Tebliğin 11inci Maddesinin (a) bendine göre bulaşıklık tespit edildiğinde ve üretim ortamının tamamen değiştirilmesinin 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 yetiştirilemez.

Patates üretimi için sertifikalı tohumluk veya test edilmiş mini yumru veya mikro bitkiler kullanılır,

Organizmanın yayılmasını önlemek için sulama ve ilaçlama programları kontrol edilir, gerekli görülürse yasaklanır.

4.2 4.1' e göre detaylandırılan tedbirlere bakılmaksızın sınırları çizilen bölge içinde :

- (a) Belirtilen bulaşmadan sonraki en az üç yetiştirme mevsimi süresince ve ivedilikle :

(aa) Bu Tebliğin 11 inci maddesinin (c) bendine göre tespit edilmiş sınırları belirlenmiş olan bölgelerde,

Patates yumruları veya domateslerin yetiştirilme, depolanma veya işleme binaları ve bunlarla birlikte sözleşme altındaki patates veya domates üretimi için çalıştırılan makinelerin bulunduğu binaların sorumlu resmi organlarca denetlendiği garanti edilir,

Uygun metotlar kullanılarak bu gibi binalardaki makine ve depoların dezenfeksiyonu ve temizlenmesi talep edilir,

Belirtilen bölge içinde sadece sertifikalı tohumlukların veya resmi kontrol altında yetiştirilen tohumlukların dikilmesi yoluyla patates yetiştirilmesi ve 11inci maddenin (c) bendine göre bulaşma olasılığı tespit edilen üretim yerlerinde yetiştirilen tohumluk patateslerin hasattan sonra testlenmesi talep edilir,

Bölge içindeki tüm bina ve müştemilatında yer alan depolardaki hasat edilen patates tohumluk stoklarının ayrı olarak işlenmesi talep edilir,