

## PATATES HALKA ÇÜRÜKLÜĞÜ HASTALIĞI İLE MÜCADELE HAKKINDA YÖNETMELİK

### BİRİNCİ BÖLÜM

#### Amaç, Kapsam, Dayanak ve Tanımlar

##### Amaç

**MADDE 1 –** (1) Bu Yönetmeliğin amacı; patates halka çürüklüğü hastalığını oluşturan “clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus”un yeri ve yayılış alanlarının tespiti, mücadelesi ve yayılmasını engellemeye ilişkin usul ve esasları düzenlemektir.

##### Kapsam

**MADDE 2 –** (1) Bu Yönetmelik patates halka çürüklüğü hastalığının sürveyi, tespit edilmesi, mücadelesi, yayılmasının engellenmesi ve eradike edilmesi hususlarını kapsar.

##### Dayanak

**MADDE 3 –** (1) Bu Yönetmelik,

a) 11/6/2010 tarihli ve 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanununun 15 inci maddesine dayanılarak,

b) Avrupa Birliğinin 4/10/1993 tarihli Patates Halka Çürüklüğünün Kontrolüne ilişkin 93/85/EEC sayılı Direktifine paralel olarak,

hazırlanmıştır.

##### Tanımlar

**MADDE 4 –** (1) Bu Yönetmelikte geçen;

a) Bakanlık: Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığını,

b) Enstitü: Bakanlığa bağlı zirai mücadele araştırma faaliyetlerini yürüten enstitü, istasyon ve kuruluşları,

c) Müdürlük: Bakanlık il ve ilçe müdürlüklerini,

ç) Patates halka çürüklüğü hastalığı: Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus etmeninin neden olduğu patates bitkisinde yetiştirme döneminin sonlarında ortaya çıkan, solgunluğun en alt yapraklarda başladığı, yapraklarda önce donuk açık yeşil, sonra grimsi yeşil renk ve rastgele beneklenme, sararma ve son olarak kahverengi nekrotik alanlar oluşturan, yumru yüzeyinde kenarları kırmızımsı kahverengi çatlaklar oluşturan ve yumrular enine kesildiğinde ise iletim demetleri boyunca krem-sarı renkli alanlar ve sıkıldığında kremimsi kokusuz bakteriyel akıntı görülen hastalığı,

d) Sürvey: Zirai mücadele ve karantina çalışmalarında yararlanılmak üzere; böcek, akar, nematod, yabancı ot ve parazit bitkiler, fungus, bakteri, virus ve mikoplazma gibi faydalı ve zararlı organizmaların bir yerde var olup olmadığını, var ise yayılış alanını ve yoğunluğunu tespit etmeyi,

e) Zararlı organizma: Patates halka çürüklüğü hastalığını oluşturan clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus etmenini,

ifade eder.

### İKİNCİ BÖLÜM

#### Sürveyler ve Sürvey Sonuçlarının Bildirimi

##### Sürveyler

**MADDE 5 –** (1) Zararlı organizmanın var olmadığını teyit etmek için yumrular ve uygun hallerde patates bitkileri üzerinde sistematik sürveyler yapılır. Yumrular söz konusu olduğunda; laboratuvar analizleri tercihen depolardaki partilerden alınan tohumluk patates ve diğer patates yumrularında, zararlı

organizmanın varlığına ve tanısına yönelik olarak Ek-1'de verilen metotlar kullanılarak yapılır. Konu, uzmanlarınca yumrular kesilerek gözle kontrol edilebilir. Bitkiler söz konusu olduğunda ise sürveyler uygun metotlara göre yürütülür ve numuneler laboratuvar analizlerine tabi tutulur.

(2) Sürveylerde alınacak olan örnek miktarı, örnekleme yeri, örnek alma zamanı ve örnek alma şekli enstitüler tarafından bilimsel ve istatistiksel ilkeler ile zararlı organizmanın biyolojisi göz önüne alınarak belirlenir. Sürveyler müdürlük elemanlarınca yapılır.

#### **Sürvey sonuçlarının bildirim**

**MADDE 6 –** (1) Sürvey sonuçları her yıl 20 Mayıs tarihinde Bakanlığa bildirilir.

(2) Patates bitkilerinde ve yumrularında veya hasat edilmiş, depolanmış ve pazarlanmış yumrularında hastalığın belirlenmesi veya şüpheli durum söz konusu olması durumunda, ayrıntılı bilgileri içerecek şekilde her yıl 20 Mayıs tarihi beklenmeksizin Bakanlığa bildirilir.

### **ÜÇÜNCÜ BÖLÜM**

#### **Tespit, Şüpheli Durumda Yapılması Gereken İşlemler ve Bakanlığa Bildirim**

##### **Tespit**

**MADDE 7 –** (1) Şüpheli vakaların bildirilmesi durumunda, Ek-1'in 1 inci maddesindeki koşullara göre ve Ek-1'de verilen yöntemlere göre laboratuvar testleri yapılır. Şüpheli durumun doğrulanması sürecinde Ek-2'nin 2 nci maddesinde belirtilen koşullara uyulur.

##### **Şüpheli durumda yapılması gereken işlemler**

**MADDE 8 –** (1) 7 nci maddede bahsedilen şüpheli durumun doğrulanması veya aksinin ispat edilmesi sürecinde, şüpheli durumun görüldüğü yerlerde;

- a) Şüpheli hastalık tanısına yönelik görsel belirtiler görülmesi veya,
- b) Ek-1'de tanımlanan immunofluorescence (IF) testi ya da diğer uygun testlerden birinden pozitif sonuç alınması durumunda,  
gerekli tedbirler alınır.

(2) Birinci fıkrada tanımlanan durumlarda Bakanlık tarafından;

- a) Kendi kontrolü altında gerçekleşmediği sürece ve zararlı organizmanın yayılma riskinin olmadığı belirlenmedikçe, örneklerin alındığı tüm parti ve sevkiyatların nakli yasaklanır.
- b) Şüpheli bulgunun kaynağı araştırılır.
- c) Tahmini risk düzeyine göre zararlı organizmanın yayılmasının önlenmesi için uygun ilave koruyucu önlemler alınır. Bu önlemler, şüpheli bulguyla ilişkili olan yerlerdeki tüm patates bitki ve yumrularının naklinin resmi kontrollere tabi tutulmasını da içerir.

##### **Bakanlığa bildirim**

**MADDE 9 –** (1) Zararlı organizmanın tespit edilmesi ya da şüpheli bir durum olduğu takdirde Bakanlığa bildirilir.

### **DÖRDÜNCÜ BÖLÜM**

#### **Bulaşmanın Kaynağı ve Sınırları**

##### **Bulaşmanın kaynağı ve sınırları**

**MADDE 10 –** (1) Bu Yönetmeliğe uygun olarak yumru, bitki veya bitki kısımlarından alınan bir örnekte zararlı organizmanın varlığı Ek-1'de verilen yöntemler uygulanarak gerçekleştirilen laboratuvar testleri ile doğrulandığında; Ek-3'teki koşullar çerçevesinde, bulaşmanın esas kaynağını ve derecesini belirlemek için aşağıda yer alan çalışmalar Bakanlık tarafından başlatılır.

- a) Örneğin alındığı patates yumruları veya bitkileri, sevkiyat ve/veya parti, ayrıca makine, taşıt, gemi, depo veya bunların tertibatları ile bu gibi yerlerde bulunan paketleme materyali de dahil diğer eşyalar ve yine örneğin hasat edildiği tarlalar ve üretim yerleri de bulaşık olarak kabul edilir.

b) Hasat öncesi veya sonrası temas ya da bulaşık olarak belirlenmiş alanlar ile üretim bağlantısı yoluyla gerçekleşen muhtemel bir bulaşmanın derecesi Ek-3'ün 1 inci maddesinde yer alan esaslara uygun olarak tespit edilir.

c) Ek-3'ün 2 nci maddesinde yer alan esaslara uygun olarak, birinci fıkranın (a) bendinde yer alan bulaşmanın, (b) bendinde yer alan olası bulaşmanın ve zararlı organizmanın olası yayılışının bulunduğu bölgenin sınırları çizilir.

(2) Birinci fıkranın (a) bendinde belirlenen bulaşma ve (c) bendinde sınırları belirlenen bölgeye ait ayrıntılar, Ek-3'ün 3 üncü maddesinde yer alan esaslara göre Bakanlığa acilen bildirilir. Ek-3'ün 3 üncü maddesinde yer alan ilave bildirimler de Bakanlığa aynı zamanda yapılır.

## BEŞİNCİ BÖLÜM

Eradikasyon, Kullanıma Sunma, Teknik Temizleme, Bulaşık Üretim

Alanlarında Yapılacak İşlemler, Patates Tohumluğu,

Bulundurma ve Nakil Yasağı

### Eradikasyon

**MADDE 11 –** (1) 10 uncu maddenin birinci fıkrasının (a) bendine göre bulaşık olarak saptanan yumru veya bitkilerin dikimi yapılmaz. Bunlar müdürlük elemanlarınca imha edilir veya zararlı organizma için yayılma riski yaratmamak kaydıyla Ek-4'ün 1 inci maddesinde yer alan yöntemlerden birine tabi tutularak ortadan kaldırılır.

### Kullanıma sunma

**MADDE 12 –** (1) 10 uncu maddenin birinci fıkrasının (b) bendinde belirtilen muhtemelen bulaşık durumda bulunan patates yumruları ve bitkilerinin dikimi yapılmaz. Bunlar zararlı organizma için yayılma riski yaratmamak kaydıyla Ek-4'ün 2 nci maddesinde yer alan şekilde kullanıma sunulabilir veya satılabilir.

### Teknik temizleme

**MADDE 13 –** (1) 10 uncu maddenin birinci fıkrasının (a) ve (b) bentlerinde belirtilen, zararlı organizma ile bulaşık veya muhtemel bulaşık olduğu belirlenen yerlerdeki makine, taşıt, gemi, depo veya bunların teçhizatı ile paketlenme materyali dahil diğer materyal ya imha edilir ya da Ek-4'ün 3 üncü maddesine göre uygun bir metot kullanılarak dezenfekte edilir. Dezenfeksiyon sonrasında bu tür materyal bulaşık olarak addedilmez.

### Bulaşık ve muhtemel bulaşık üretim alanlarında yapılacak işlemler

**MADDE 14 –** (1) 10 uncu maddenin birinci fıkrasının (c) bendinde tarif edilen sınırlar belirlendikten sonra, bu alanlarda 11, 12 ve 13 üncü maddelerine ilave olarak Ek-4'ün 4 üncü maddesinde belirtilen önlemler alınır. Zararlı organizmayla mücadele etmek amacıyla 11, 12 ve 13 üncü maddeleri ile bu maddede belirtilen hususlarla ilgili yapılan işlemler Bakanlığa bildirilir.

(2) 10 uncu maddenin birinci fıkrasının (a) bendine göre bulaşık olarak belirlenen yumru veya bitkilerle klonal ilişkisi olan patates stokları da 7 nci maddenin birinci fıkrasında belirtilen testlere tabi tutulur. İlk enfeksiyon kaynağını ve muhtemel bulaşmanın genişliğini ve risk derecesini belirlemek amacıyla mümkün olduğunca çok yumru veya bitkide bu testler yapılır. Testlerin sonucunda, 10 uncu maddenin birinci fıkrasının (a), (b) ve (c) bentlerine göre daha ileri bulaşıklık ve muhtemel bulaşıklığın tespiti ile bölge sınırlarının belirlenmesi işlemi gerçekleştirilebilir. Zararlı organizma için yayılma riski yaratmamak kaydıyla bu stoklar, Ek-4'ün 2 nci maddesinde yer alan şekilde kullanıma sunulabilir veya satılabilir.

### Patates tohumluğu

**MADDE 15 –** (1) Tohumluk patatesler Ek-1'de yer alan test prosedürü uygulanarak zararlı organizmadan arı bulunmuş olmalı, sertifikasyon sonucu elde edilmiş hatlardan direkt üretilmiş olmalıdır.

(2) Birinci fıkrada sözü edilen testler; bulaşıklığın tohumluk patates üretimini etkilediği yerlerde başlangıç klonal seleksiyon bitkilerinde, diğer durumlarda ise başlangıç klonal seleksiyon bitkileri veya temel tohumluk veya önceki çoğaltım aşamalarındaki tohumluk numuneleri üzerinde gerçekleştirilir.

### **Bulundurma ve nakil yasağı**

**MADDE 16 –** (1) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* kültürlerinin bir yerden bir yere nakli, bulundurulması ve dağıtımı yasaktır.

### ALTINCI BÖLÜM

#### Çeşitli ve Son Hükümler

### **Bakanlığın yetkisi**

**MADDE 17 –** (1) Zararlı organizmanın yayılmasını engellemek ve mücadele etmek için gerektiğinde Bakanlık tarafından ilave tedbirler alınabilir. Bakanlık, çeşit seleksiyonu çalışmalarında ve deneme veya bilimsel amaçlı getirilen materyal için bu Yönetmeliğin uygulanmasında istisna getirebilir.

### **İdari yaptırımlar**

**MADDE 18 –** (1) Bu Yönetmelik hükümlerine aykırı davrananlar hakkında 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanununun 38 inci maddesinin ilgili hükümlerine göre idari yaptırımlar uygulanır.

### **Yürürlük**

**MADDE 19 –** (1) Bu Yönetmelik yayımı tarihinde yürürlüğe girer.

### **Yürütme**

**MADDE 20 –** (1) Bu Yönetmelik hükümlerini Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanı yürütür.

## EK I

**Halka Çürüklüğü Hastalığına sebep olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.'un teşhis, tespit ve tanısı için test şeması****Test Şemasının Kapsamı**

- (i) Patates yumruları ve bitkilerinde halka çürüklüğünün teşhisi;
- (ii) Patates yumru ve bitki örneklerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*'un tespiti;
- (iii) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*'un tanısı.

**GENEL İLKELER**

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

*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 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. İdari ve diğer nedenlerden kaynaklanabilecek hataların engellenmesi için kalite kontrol standartları uygulanmalıdır.

Bu [ 34gvo grk k 8 (1) maddesinde sözü edilen şüpheli durum; bir örnek üzerinde gerçekleştirilen teşhis veya tarama testleri sonucunda alınmış pozitif bir sonucu ifade eder.

Eğer ilk yapılan tarama testi (IF veya PCR/FISH) pozitifse, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*'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, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*'la bulaşık olmadığına karar verilir.

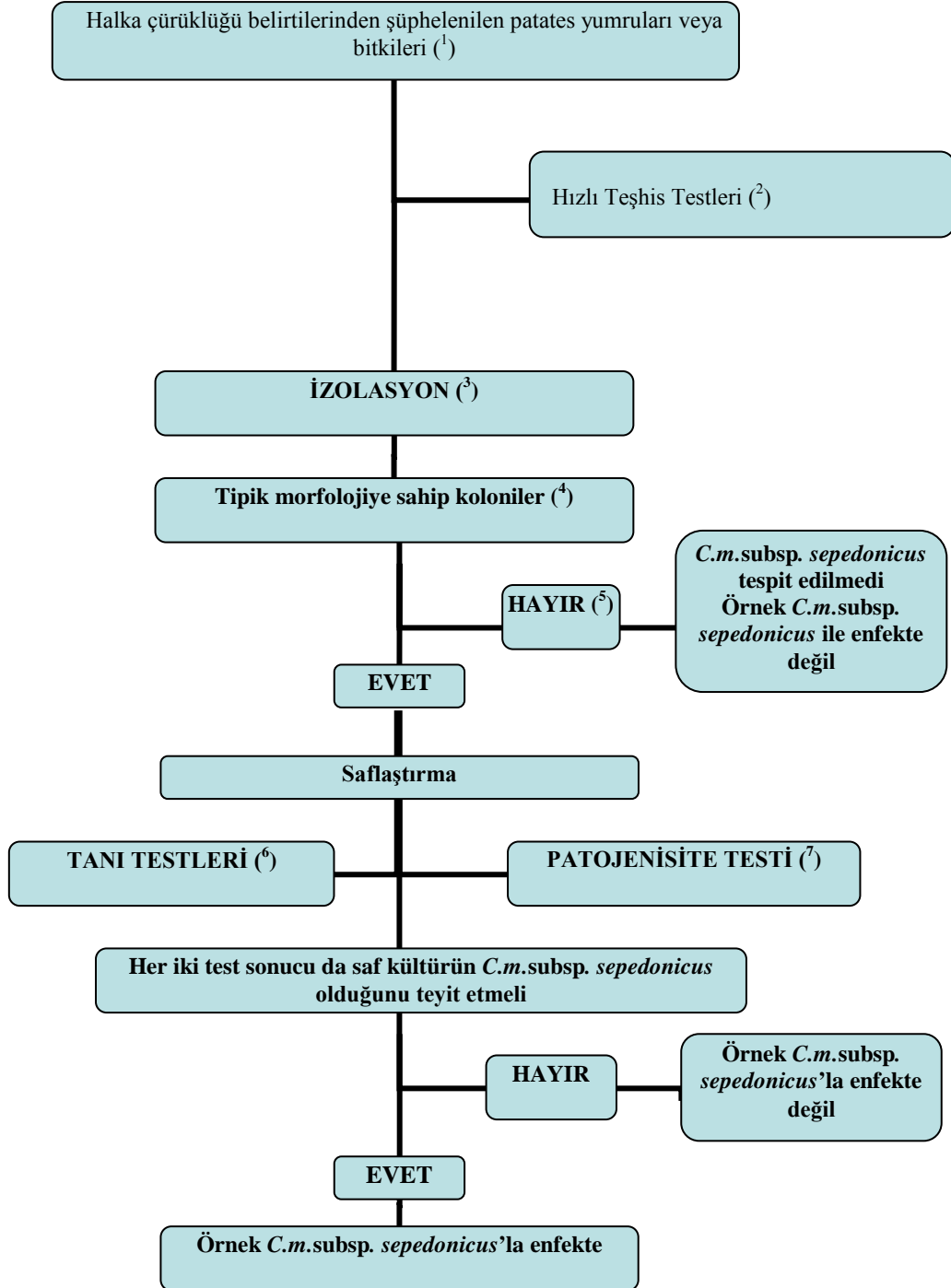
İlk yapılan ve pozitif olan tarama testinin (IF) sonucu, farklı biyolojik temele dayanan ikinci bir tarama testi (PCR/FISH) ile teyit edilmelidir.

Bu [ 34gvo grk k 10 (1) maddesinde sözü edilen organizmanın varlığının doğrulanması için mutlaka izolasyon ve patojenisite testi ile birlikte *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*'un saf kültürünün tanısı gerekmektedir.

## 1. TEST ŞEMASININ UYGULANMASI

### 1.1.Halka çürüklüğü belirtilerini taşıyan patates yumruları ve bitkilerinde teşhis için tespit şeması.

Bu testleme prosedürü; halka çürüklüğü belirtilerini taşıyan veya bu belirtilere benzer belirtiler gösteren şüpheli patates yumru ve bitkilerine yönelik olarak hazırlanmıştır. Bu prosedür hızlı tarama testi, besi yeri kullanılarak enfekteli iletim demetlerinden patojenin izolasyonu ve pozitif bir sonuç alınması durumunda kültürün *C.m.subsp. sepedonicus* olarak tanınması amacıyla hazırlanmıştır.



Şemada yer alan referanslar:

- (1) Bölüm 2’de tarif edilen belirtiler
- (2) Uygun testler:
  - IF test (Bölüm 4)
  - PCR testi (Bölüm 6)
  - FISH test (Bölüm 5)
- (3) Saprofitik bakterilerin hızla gelişmesi ve rekabetten dolayı, enfeksiyonun ileri devrelerinde bitki materyalinden yapılan izolasyonda başarısız olunabilir. Bundan dolayı hem genel hem de tercihen MTNA (Bölüm 8) gibi bir seçici besiyerine birlikte ekim veya bioassay testi (Bölüm 7) kullanımı tavsiye edilir.
- (4) Tipik koloni morfolojisi Bölüm 8’de tarif edilmiştir.
- (5) Eğer hastalık belirtileri tipik ancak izolasyon sonucu negatifse, izolasyon tercihen seçici besi ortamı testi kullanılarak tekrarlanmalıdır.
- (6) *C.m.subsp.sepedonicus*’un saf kültürlerinin, Bölüm 9’da verilen testler kullanılarak güvenilir bir şekilde tanısı yapılmalıdır.
- (7) Patojenisite testi Bölüm 10’da tarif edilmiştir.

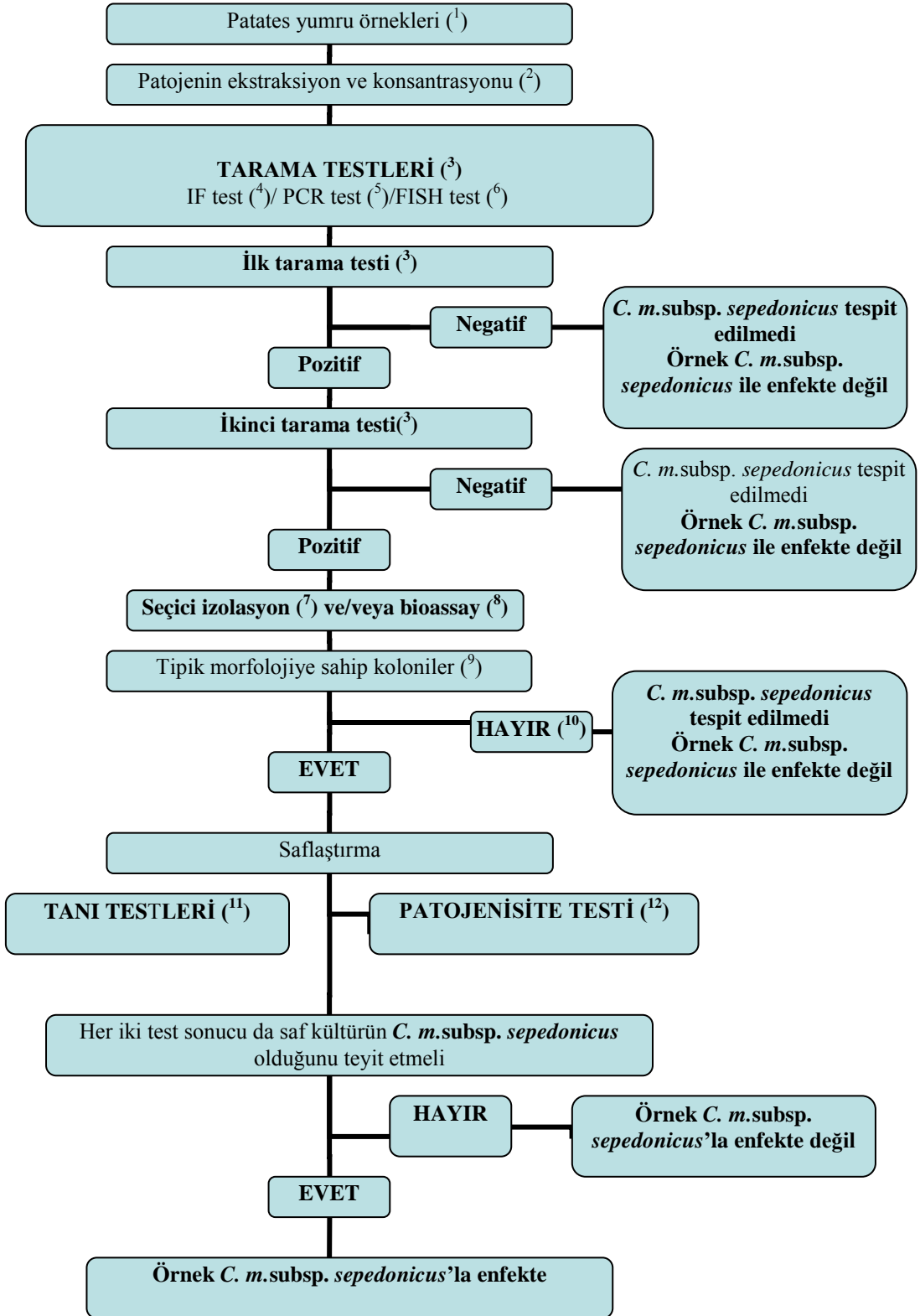
## 1.2. Belirti göstermeyen patates yumru örneklerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*'un tespit ve tanısı için şema

### *Prensip:*

Bu test prosedürü ile patates yumrularındaki latent enfeksiyonların tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Farklı biyolojik temele dayanan en az iki tarama testinin pozitif sonucu, organizma izole edilerek tamamlanmalıdır. Bunu takiben elde edilen saf kültürün *C.m.subsp. sepedonicus* 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 konsantrasyonda pozitif kontrollerde kullanılmalıdır.

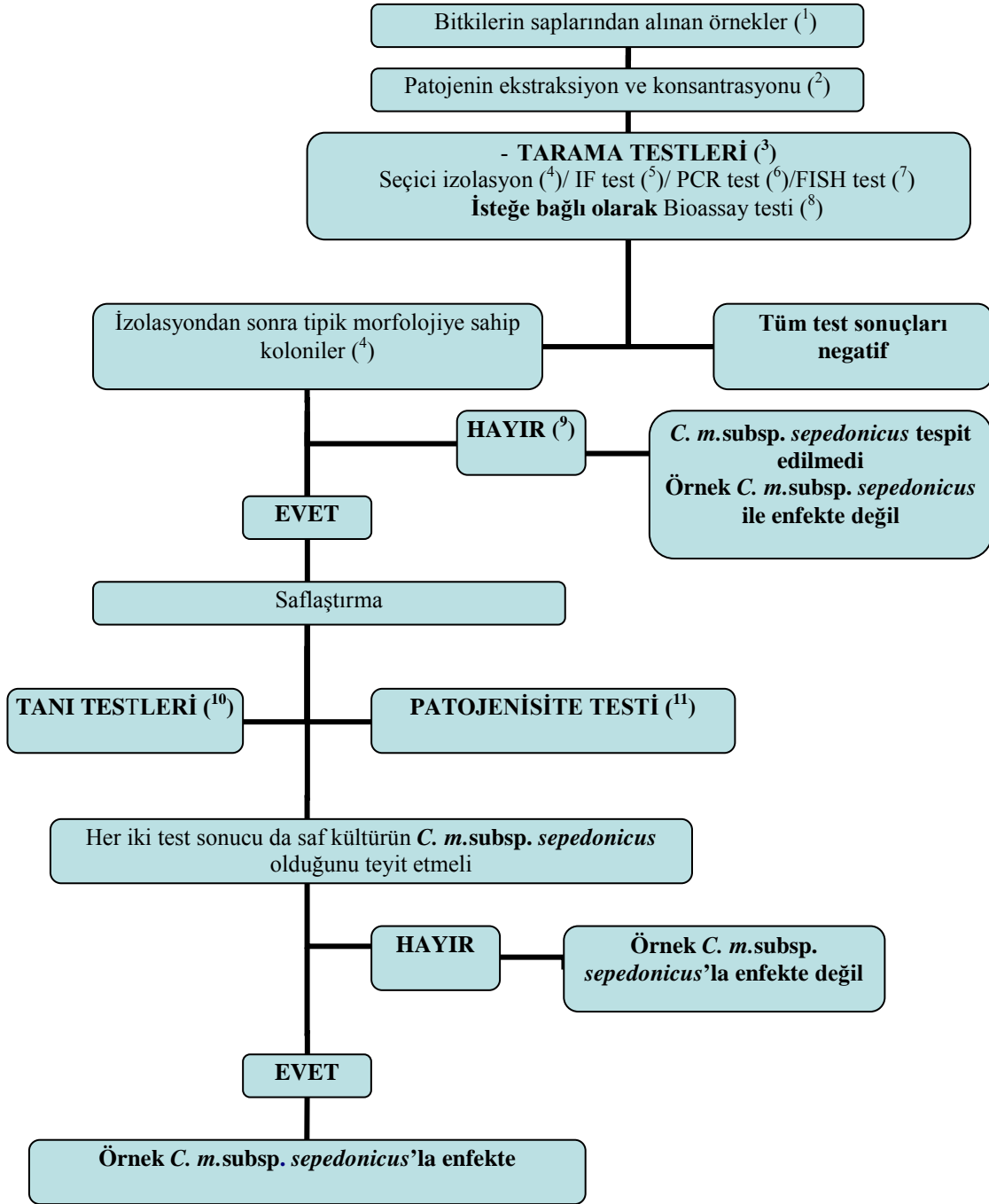




Şemada yer alan referanslar:

- (1) Standart örnek büyüklüğü 200 yumrudur. Eğer 200 yumru temin edilemiyorsa daha az örnekle de test yapılabilir.
- (2) Bakterinin ekstraksiyon ve konsantrasyon metotları Bölüm 3.1.'de verilmiştir.
- (3) Eğer farklı biyolojik prensibe dayanan en az iki test sonucu pozitif ise, izolasyon ve bunun sonucunda elde edilen bakterinin *C.m.subsp.sepedonicus* 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) Immunofluorescence (IF) testi. IF tarama testi için daima poliklonal antibadi kullanılır, daha fazla özgünlük için ilave olarak monoklonal antibadide kullanılabilir.
- (5) PCR testi. Bölüm 6'da yer alan onaylanmış PCR kimyasalları ve protokolleri kullanılır.
- (6) FISH testi. Bölüm 5'de yer alan onaylanmış kimyasallar ve protokoller kullanılır.
- (7) Seçici izolasyon  
Tekrar süspanse edilmiş peletin 1/100 seyreltmesi ve MTNA veya NCP-88 besiyerlerinin kullanımı, birçok durumda *C. m.subsp. sepedonicus*'un direk izolasyonu için uygun bir metottur. Tipik koloniler 3-10 gün içerisinde bu metotla elde edilebilir. Daha sonra patojen buradan saflaştırılır ve tanıya gidilir. Bu metodun en iyi sonucu vermesi için, *C. m.subsp. sepedonicus*'la besiyerinde rekabete giren ve onun gelişimini engelleyen saprofitik bakterilerden kaçınmak için göbek (heel-end/yumrunun stolana bağlandığı nokta) kısımlarının hazırlanması aşamasının çok dikkatli gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Eğer besiyerine ekim tekniğiyle izolasyonda başarılı olunamadıysa, bioassay testi için kullanılan bitkilerden izolasyon yapılmalıdır (Bölüm 8'e bakınız).
- (8) Bioassay testi; patates ekstraktlarının patlıcan (*Solanum melongena*) bitkilerine verilmesi yoluyla *C. m.subsp. sepedonicus*'un bu bitkilerde çoğaltılması ve izolasyonun yapılmasında kullanılır. Bu test optimum inkubasyon koşullarının sağlandığı yerlerde yapılmalıdır. MTNA veya NCP-88 besiyerleri üzerinde gelişen ve *C. m.subsp. sepedonicus*'u engelleyen bakteriler bu testin sonuçlarını da etkileyebilir (Bölüm 7'ye bakınız).
- (9) Tipik koloni morfolojisi Bölüm 8'de tarif edilmiştir.
- (10) Kültüre alma ve bioassay testlerinin sonuçları, saprofit bakterilerin engellemesi ve rekabetten dolayı başarısız olabilir. Eğer tarama testlerinin sonucunda pozitif sonuç elde edilmişse, fakat izolasyon sonucu negatifse, aynı pelet veya aynı örneğin kesilen yumrularının göbek bölümüne yakın iletim demetlerinden alınan parçalardan izolasyon tekrar edilmelidir. Eğer gerekliyse ilave örneklerde test edilebilir.
- (11) *C.m.subsp. sepedonicus*'un saf kültürlerinin, Bölüm 9'da verilen testler kullanılarak güvenilir bir şekilde tanısı yapılmalıdır.
- (12) Patojenisite testi Bölüm 10'da tarif edilmiştir.

### 1.3. Belirti göstermeyen patates bitki örneklerinde *C. m.subsp. sepedonicus*'un tespiti ve tanısı için şema



Şemada yer alan referanslar:

- (1) Tavsiye edilen örnek büyüklüğü için Bölüm 3.2.' e bakınız.
- (2) Bakterinin ekstraksiyon ve konsantrasyon metotları Bölüm 3.2.'de verilmiştir.
- (3) Eğer farklı biyolojik prensibe dayanan en az iki test sonucu pozitif ise, izolasyon ve bunun sonucunda elde edilen bakterinin *C. m.subsp. sepedonicus* 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 veya diğer testlerin sonucu negatifse, örneğin negatif olduğu düşünülür. Daha ileri testleri yapmak gereksizdir.
- (4) Seçici izolasyon testi ve tipik koloni morfolojisi Bölüm 8'de tarif edilmiştir.
- (5) IF testi Bölüm 4'de tarif edilmiştir
- (6) PCR testi Bölüm 6'da tarif edilmiştir.
- (7) FISH testi Bölüm 5'de tarif edilmiştir.
- (8) Bioassay testi Bölüm 7'de tarif edilmiştir.
- (9) 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.
- (10) *C. m.subsp. sepedonicus*'un saf kültürlerinin, Bölüm 9'da verilen testler kullanılarak güvenilir bir şekilde tanısı yapılmalıdır.
- (11) Patojenite testi Bölüm 10'da tarif edilmiştir.

## 2. HALKA ÇÜRÜKLÜĞÜ BELİRTİLERİ İÇİN GÖZLE MUAYENE

### 2.1. Patates bitkileri

Avrupa iklim koşullarında tarlada belirtiler ya ender olarak görülür ya da sıklıkla mevsim sonunda ortaya çıkar. Ayrıca belirtiler, çoğu kez maskelenir ya da diğer hastalık belirtileri, mekanik zararlar veya bitkideki yaşlanma belirtileri ile karıştırılır. Bu nedenle tarla kontrollerinde belirtiler kolaylıkla gözden kaçabilir. Solgunluk belirtileri kahverengi çürüklükte oluşarlardan çok farklıdır; solgunluk genellikle yavaş gelişir ve başlangıçta yaprak kenarlarıyla sınırlıdır. Özellikle genç yaprakların enfekteli bölümlerinde gelişme yavaşlarken, enfekte olmamış bölümlerinde gelişme devam ettiğinden tuhaf şekilli yapraklar ortaya çıkar. İletim demetlerinin tıkanmasıyla etkilenen yapraklarda sapa doğru klorotik, sarımsı portakal renkli bir gelişme görülür. Enfekteli yaprakçıklar, yapraklar ve hatta saplar ölebilir. Sıklıkla yapraklar ve yumruların büyüklüklerinde azalma görülür. Bitkiler cüceleşir.

### 2.2. Patates yumruları

İlk belirtiler; özellikle yumrunun göbek (heel-end-yumrunun stolana bağlandığı nokta) bölümüne yakın iletim demeti bölgesinde, yumuşama olmaksızın, dokunun camlaşması veya şeffaf bir hal almasıdır. Göbek bölümündeki iletim demeti halkası normalden daha koyu bir renk alır. Kolaylıkla fark edilebilen ilk belirti ise, iletim demeti halkasının sarımsı bir renk alması ve yumru hafifçe sıkıldığında zaman peynir benzeri bazı yapıların iletim demetlerinden çıkmasıdır. Bu milyonlarca bakteri içerir. İletim demetlerinde kahverengileşme oluşur ve bu dönemde yumrudaki belirtiler *Ralstonia solanacearum* tarafından oluşturulan kahverengi çürüklük belirtilerine benzerdir. Başlangıçta bu belirtiler iletim demetinin bir bölümüyle sınırlıdır ve bu bölüm her zaman için göbek bölümüne yakın değildir, fakat zamanla belirti tüm iletim demetine yayılır. Enfeksiyon ilerledikçe, iletim demetleri tahrip olur; kabuğa yakın dış kısım iç kısımdan ayrılır. Enfeksiyonun daha da ileri dönemlerinde ise yumru yüzeyinde kenarları kırmızımsı kahverengi çatlaklar oluşur. Son zamanlarda Avrupa'da birçok kez iletim demetlerinde oluşan belirti ve yumrunun ortasında çürüklüklerin oluştuğu belirtiler bir arada gözlenmiştir. İkincil olarak gelişen bakteriyel veya fungal enfeksiyonlar nedeniyle belirtiler maskelenebilir ve bu durumda diğer yumru çürüklüklerinden halka çürüklüğü belirtilerini ayırt etmek güç hatta imkânsızdır. Atipik belirtilerin oluşmasında muhtemeldir.

## 3. ÖRNEĞİN HAZIRLANMASI

### 3.1. Patates yumruları

Not:

- Standart örnek büyüklüğü her test için 200 yumrudur. Daha yoğun örneklemede, daha fazla sayıda örnek alınır, bu örneklerde 200 yumrudan oluşmalıdır. Örnek büyüklüğünün 200 yumrudan daha fazla olması engellemeye yol açar veya sonuçların yorumlanmasını güçleştirir. Bununla beraber; bu metot fazla sayıda yumrunun temin edilemediği durumlarda 200 yumrudan daha az miktarla da uygulanabilir.
- Aşağıda yer alan tespit metotları, 200 yumruluk örnek büyüklüğü üzerinden yapılarak onaylanmıştır.
- Bu yöntemle elde edilen patates doku ekstraktı aynı zamanda *Ralstonia solanacearum*' un tespitinde de kullanılabilir.

Eğer faydalı olduğu düşünülüyorsa isteğe bağlı olarak test öncesi yapılabilecek ön uygulama:

Yumrular yıkanabilir. 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 PCR testi veya direk izolasyon yapılacaksa özellikle faydalıdır (fakat yine de yapılması isteğe bağlıdır).

- 3.1.1. Temiz ve steril bir bisturi veya sebze bıçağıyla yumrunun göbek kısmındaki kabuk kaldırılır, bu şekilde iletim demetleri görülebilir hale gelir. Dikkatlice göbek 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 bir yumru için işlem aynı şekilde tekrarlanır.

Not: Halka çürüklüğü belirtisi gösteren yumrular (çürüyenlerde dâhil) ayrılır ve ayrıca test edilir.

Eğer şüpheli halka çürüklüğü belirtisi gösteren göbek parçası çıkartıldıysa, bu yumruda mutlaka gözle muayene yapılmalı ve yumru göbek kısmına 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 yumrulara dâhil olmak üzere tüm yumrular, *EK II*'e göre muhafaza edilmelidir.

- 3.1.2. 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 parçası dokuları 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. Göbek parçalarının kuruması veya mantarlaşması ve saklama sırasında saprofitlerin gelişimi halka çürüklüğü bakterisinin tespitini engelleyebilir.

- 3.1.3. Aşağıdaki yöntemlerden biriyle göbek parçaları işlenir:

ya,

- (a) Göbek parçalarının üstünü kapatacak kadar yeterli miktarda ekstraksiyon tampon çözeltisi (yaklaşık 40 ml) eklenir (*İlave 3*) ve 24 °C' den düşük sıcaklıklarda 4 saat süreyle, 4 °C' de ise 16–24 saat süreyle bir çalkalayıcıda (50–100 rpm) çalkalanır,

ya da,

- (b) Göbek parçaları yeterli miktarda (yaklaşık 40 ml) ekstraksiyon tampon çözeltisi (*İlave 3*) 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 gauge 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 yapılacaksa, 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.

- 3.1.4. Üst sıvı boşaltılır. Eğer üst sıvı çok yoğun bir şekilde bulanıksa, ya yavaş hızda (4–10 °C kullanımlık arasında bir sıcaklıkta 10 dakika süreyle 180 g den daha fazla olmayan

rpm'de) santrifüj edilir ya da ekstraksiyon tampon çözeltisi (*İlave 3*) ilave edilerek (yaklaşık 10 ml) filtreden (40–100 µm) vakum filtrasyon yöntemiyle yıkanarak berraklaştırılmalıdır.

3.1.5. +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.

3.1.6. 1.5 ml pelet tamponuyla (*İlave 3*) tekrar süspanse edilir. Bu süspanسیونunun 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 seriye 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 çözdürme işlemi tavsiye edilmemektedir.

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

3.1.7. Bulaşmayı engellemek için tüm *C.m.* subsp. *sepedonicus* pozitif kontrolleri ve örneklerin ayrı ayrı muamele edilmesi zorunludur. Bu IF lamlarında ve tüm testlerde uygulanır.

### 3.2. Patates bitkileri

Not:

*C.m.* subsp. *sepedonicus* populasyonlarının latent enfeksiyonlarını tespit etmek için örneklerin birleştirilerek test edilmesi tavsiye edilmektedir. Burada yer alan metotla 200 sap parçasına kadar olan birleşik örnekler rahatlıkla test edilebilir. Sürveylerin yürütüldüğü alanlarda inceleme altındaki bitki populasyonundan alınacak örnekler populasyonu istatistikî olarak temsil edecek sayıda olmalıdır.

3.2.1. Temiz dezenfekte edilmiş bir bıçak veya makas ile her bir sapın hemen toprak üzerinde yer alan dip kısmından 1–2 cm'lik bir parça alınır.

Sap parçaları % 70'lik etil alkolle dezenfekte edilir ve hemen kurutma kâğıdı arasında kurutulur.

3.2.2. Kapaklı steril bir kap içinde toplanan sap parçaları aşağıda yer alan prosedürlerden biriyle işleme tabi tutulur:

ya,

(a) Sap parçalarının üstünü örtecek kadar ekstraksiyon tampon çözeltisi (yaklaşık 40 ml) eklenir (*İlave 3*) ve 24 °C' den düşük sıcaklıklarda 4 saat süreyle, 4 °C' de ise 16–24 saat süreyle bir çalkalayıcıda (50–100 rpm) çalkalanır,

ya da,

(b) Sap parçaları yeterli miktarda ekstraksiyon tampon çözeltisi (*İlave 3*) ilave edilerek, sağlam bir yumuşatma torbası (örneğin Stomacher veya Bioreba) içinde kauçuk bir çekiç 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.

3.2.3. 15 dakika bekledikten sonra üst sıvı boşaltılır.

3.2.4. Ekstraktın berraklaştırılması ya da bakterilerin çökeltilmesine genellikle ihtiyaç duyulmamaktadır ancak eğer gerekliyse Bölüm 3.1.4.-3.1.6.'da açıklandığı şekilde filtrasyon veya santrifüj işlemleri yapılabilir.

- 3.2.5. Ekstrakt eşit iki miktarda bölünür. Yarısı 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.

#### 4. IMMUNOFLUORESCENCE TEST (IF TESTİ)

##### *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, PCR veya FISH ikinci tarama testi olarak yapılmalıdır. İkinci tarama testi olarak IF kullanıldığı ve IF testi pozitif olduğunda, analizi tamamlamak için akış şemasındaki diğer testleri yapmaya gerek vardır.

Not:

IF testi birinci tarama testi olarak kullanıldığında mutlaka poliklonal antitadiler kullanılmalıdır. Poliklonal antitadilerle çalışılan IF testiyle pozitif sonuç alınması durumunda, monoklonal antitadilerin kullanıldığı daha ileri bir tarama yapılabilir. Bunun daha özgün ancak hassasiyetinin daha düşük olduğu unutulmamalıdır.

*C.m. subsp. sepedonicus* için onaylanmış antitadiler kullanılmalıdır. Her yeni antitadi açıldığında titrenin yeniden tespit edilmesi tavsiye edilmektedir. Titre, uygun fluorescein isothiocyanate (FITC) konjugat kullanımı ve *C.m. subsp. sepedonicus*'un homolog bir straininin  $10^5$ - $10^6$  hücre/ml'sini içeren bir süspaniyonun testlenmesiyle optimum reaksiyonun meydana geldiği en yüksek seyreltme olarak tanımlanmaktadır. Onaylı poliklonal veya monoklonal antitadilerin tamamı en az 1:2000 IF titresine sahip olmalıdır. Testleme sırasında antitadiler tam titrede veya çalışma seyreltmelerine yakın değerlerde kullanılmalıdır.

Test taze olarak hazırlanmış örnek ekstraktı ile gerçekleştirilmelidir. Eğer gereklyse, gliserol altında -68 ila -86 °C'de depolanmış ekstraktlarla 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 2*'de belirtildiği gibi patates ekstraktı içinde ve isteğe bağlı olarak tampon çözelti içinde süspanse edilmiş *C.m. subsp. sepedonicus*'un homolog straini veya diğer bir referans straini kullanılarak pozitif kontrol lamaları ayrı olarak hazırlanmalıdır.

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

Negatif kontrol olarak, daha önceden *C.m. subsp. sepedonicus* yönünden negatif olduğu belirlenmiş örnek ekstraktları 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.

- 4.1. Aşağıda yer alan test yöntemlerinden biri kullanılarak test lamaları hazırlanır:

- (i) 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.

(ii) Diğer peletler için:

Pelet tampon çözelti ile yeniden süspansedilmiş peletin 1/10, 1/100 seyreltme serileri hazırlanır. Her bir seyreltme ve yeniden süspansedilmiş 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.

4.2. Oda sıcaklığında veya 40–45 °C’de damlacıklar kurutulur. Bakteri hücreleri ya 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 gerekiyorsa, sabitlenen lamlar nemli olmayan kutular içerisinde dondurularak saklanabilir (maksimum 3 aya kadar).











4.3. IF prosedürü

(i) 4.1 (i)’de 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.

(ii) 4.1 (ii)’de hazırlanan test lamına göre:

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

		Yeniden süspansedilmiş 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. 4.1 (i) ve 4.3 (i)’ye göre test lamalarının 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. 4.1 (ii) ve 4.3 (ii)'ye göre test lamalarının hazırlanması

4.3.1. 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 ekstraktın miktarı kadar olmalıdır.

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

4.3.2. Nemli kâğıt üzerinde, üzeri kapalı olarak oda sıcaklığında (18–25 °C) 30 dakika süreyle lamlar inkube edilir.

4.3.3. 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 3*). Lamlar üzerindeki fazla su kâğıt havluyla dikkatlice alınır.

4.3.4. Nemli kâğıt havlu üzerine lamlar dizilir. Titrasi tespit edilmiş FITC konjugat seyreltmesi, her bir test penceresini tamamen kapatacak şekilde, mikropipet yardımıyla koyulur. Pencereye uygulanan konjugatın miktarı daha önce uygulanan antibadinin miktarıyla eşit olmalıdır.

4.3.5. Nemli kâğıt üzerinde, üzeri kapalı olarak oda sıcaklığında (18–25 °C) 30 dakika süreyle lamlar inkube edilir.

4.3.6. 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 3*). Lamlar üzerindeki fazla su kâğıt havluyla dikkatlice alınır.

4.3.7. Her bir pencereye 5–10 µl 0.1 M phosphate buffer gliserol (*İlave 3*) mikropipetle koyulur ve bir lamel kapatılır.

4.4. IF testinin okunması:

4.4.1. 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 4).

4.4.2. Test pencerelerinde *C.m. subsp. sepedonicus*' un karakteristik morfolojiye sahip, parlak fluoressan hücreleri kontrol edilir. Fluoressanın şiddeti, aynı antibadi seyreltmesinde pozitif kontrolün verdiği fluoressan şiddetine eşit olmalıdır. Tam olarak boyanmamış veya zayıf fluoressan veren hücreler çok sayıda olmadıkça önemsenmemelidir.

Eğer herhangi bir bulaşmadan şüpheleniliyorsa test mutlaka tekrarlanmalıdır. Tampon çözeltideki 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.

4.4.3. *C.m. subsp. sepedonicus* hücrelerine benzemeyen ancak fluoressan veren hücrelerin zeminde oluşturduğu yoğunluk ve yine patates göbek ve sap parçalarından elde edilen ekstraktlarda bulunabilen ve *C.m. subsp. sepedonicus*'a benzer morfolojide ve ölçüde olan saprofit bakterilerin oluşturduğu çapraz reaksiyonlar IF testine özgü problemlerdir.

4.4.4. Bu testte sadece *C.m. subsp. sepedonicus*'un tipik ölçü ve morfolojisine sahip, fluoressan veren hücreler dikkate alınır.

4.4.5. IF testi sonucunun yorumlanması:

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

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

## 5. FISH TESTİ

### *Prensip*

FISH testi ilk tarama testi olarak kullanılıp pozitif sonuç alındığında, 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 *C.m. subsp. sepedonicus*'a özel oligo-problar kullanılır (*İlave 7*). Önceden analiz edilerek *C.m. subsp. sepedonicus* yönünden temiz bulunmuş patates ekstraktının içine ilave edilen *C.m. subsp. sepedonicus*'un, mililitrede  $10^3$ - $10^4$  hücresi bu testin ön denemelerinde tespit edilebilmiştir.

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

Önceden test edilmiş ve *C.m. subsp. sepedonicus* yönünden temiz bulunmuş örnek ekstraktları, negatif kontrol olarak kullanılır.

0.01 M fosfat tampon çözelti kullanılarak mililitresinde  $10^5$ - $10^6$  *C.m. subsp. sepedonicus* (örneğin strain NCPPB 4053 veya PD 406) hücresi olacak şekilde hazırlanmış süspanسیونlar, pozitif kontrol olarak kullanılır. *İlave 2*'de verilen diğer *C.m. subsp. sepedonicus* strainleride patates ekstraktının içine katılarak, pozitif kontroller

hazırlanabilir. Kullanılan *C.m.* subsp. *sepedonicus* 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.

### 5.1. Patates ekstraktının sabitlemesi

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

5.1.1. Sabitleyici solusyon hazırlanır (*İlave 7'*ye bakınız).

5.1.2. 100 µl örnek eppendorf tüp içerisine pipetle koyulur ve 7 000 g 'de 8 dakika santrifüj edilir.

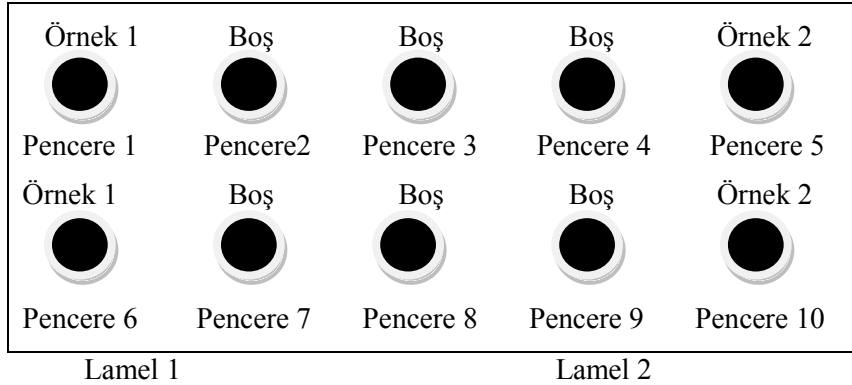
5.1.3. Üst sıvı atılır ve pelete yeni hazırlanmış sabitleyicinin 500 µl'si ilave edilir. Vorteksle karıştırılır ve 4 °C'de bir gece süreyle inkube edilir.

% 96'lık etil alkolle sabitleme diğer bir yöntemdir. 5.1.2.'deki peleti çözmek için 50 µl 0.01 M PB ve 50 µl % 96'lık etil alkol kullanılır. Vorteksle karıştırılır ve 30–60 dakika 4 °C'de inkube edilir.

5.1.4. Sekiz dakika 7 000 g'de santrifüj edilir, üst sıvı atılır ve pelet 75 µl'e 0.01 M PB ile tekrar süspanse edilir (*İlave 3'e* bakınız).

5.1.5. Temiz bir pencereci lam üzerine, Şekil 3'de gösterildiği gibi süspanسیونların 16 µl'si damlatılır. Seyreltilmemiş iki farklı örnek uygulanan her bir lam ve 1:100'lük 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 3. FISH lamının planı



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

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

### 5.2. Ön Hibridizasyon ve Hibridizasyon

5.2.1. 10 ml tampon çözelti (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH: 8.0) içerisinde 10 mg lizozimle (Sigma L-6876) bir solusyon hazırlanır. Bu solusyon depolanabilir ancak sadece bir kez dondurulup çözülmalıdır. Her bir örnek kuyusu yaklaşık 50 µl lizozim solusyonuyla kaplanır ve oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkube edilir. Daha sonra lamalar demineralize su içine bir kez daldırılır ve filtre kâğıdıyla kurutulur.

Lizozimin yerine alternatif olarak her bir kuyuya 50 µl proteinase K solusyonu ilave edilebilir. Bu solusyon 40–400 µg ml<sup>-1</sup> proteinase K'nın tampon çözelti (20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) içinde çözülmesiyle hazırlanır.

- 5.2.2. % 50, % 80 ve % 90'lık etil alkolde sırasıyla birer dakika tutularak hücrelerdeki su uzaklaştırılır. Daha sonra lamlar kurumaya bırakılır.
- 5.2.3. 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 55 °C'de ısıtılmış hibridizasyon fırınında ön inkubasyona bırakılır.
- 5.2.4. Her bir lam için 45 µl olacak şekilde hibridizasyon solusyonu (*İlave 7*) hazırlanır ve 55 °C'de ısıtılmış hibridizasyon fırınında 5 dakika süreyle ön inkubasyona bırakılır.
- 5.2.5. 45 °C'ye ısıtılmış bir sıcak levha (hot plate) üzerine lamlar yerleştirilir ve lamlar üzerindeki dört kuyunun her birine 10 µl hibridizasyon solusyonu koyulur.
- 5.2.6. 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 55 °C'de hibridizasyon fırınında bir gece inkubasyona bırakılır.
- 5.2.7. 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 1/2x hybmix (167 ml 3x hybmix ve 833 ml Milli Q su) koyulur. Bunlar 55 °C'de ısıtılmış su banyosunda ön inkubasyona bırakılır.
- 5.2.8. Lamaların üzerinden lameller kaldırılır ve lam taşıyıcıya yerleştirilir.
- 5.2.9. Probun fazlasının uzaklaştırılması için 55 °C'de içinde 1x hybmix bulunan erlende 15 dakika süreyle tutulur.
- 5.2.10. Buradan alınan lamlar, içinde 1/2 hybmix yıkama solusyonu bulunan erlene aktarılır ve 15 dakika daha inkube edilir.
- 5.2.11. 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.

### 5.3. FISH testinin okunması

- 5.3.1. İmmersion yağ kullanılarak 630 veya 1 000 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 floresan boyanır. Tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate için uygun filtre kullanıldığında, *C.m.subsp.sepedonicus*'un Cy3 ile boyanmış hücreleri kırmızı floresan verir. Pozitif kontrolle hücrelerin morfolojisi karşılaştırılır. Hücreler parlak floresan ve tamamen boyanmış olmalıdır. Eğer boyama iyi değilse FISH testi (Bölüm 9.4) 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.
- 5.3.2. Test pencerelerinde *C.m.subsp.sepedonicus*'un karakteristik morfolojiye sahip, parlak floresan hücreleri kontrol edilir. Floresanın şiddeti, pozitif kontrolün verdiği floresan şiddetine eşit ya da ondan daha iyi olmalıdır. Tam olarak boyanmamış veya zayıf floresan veren hücreler dikkate alınmamalıdır.

- 5.3.3. Eğer herhangi bir bulaşmadan şüpheleniliyorsa test mutlaka tekrarlanmalıdır. Tampon çözeltideki 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.
- 5.3.4. *C.m.subsp.sepedonicus*'un hücrelerine benzemeyen ancak floresan veren hücrelerin zeminde oluşturduğu yoğunluk ve IF testindeki kadar olmasa da, yine patates göbek ve sap parçalarından elde edilen ekstraktlarda bulunabilen ve *C.m.subsp.sepedonicus*'a benzer morfolojide ve ölçüde olan saprofit bakterilerin oluşturduğu çapraz reaksiyonlar FISH testine özgü problemlerdir.
- 5.3.5. Bu testte sadece *C.m.subsp.sepedonicus*'un tipik ölçü ve morfolojisine sahip floresan veren hücreler dikkate alınır.
- 5.3.6. FISH testi sonucunun yorumlanması:
- Geçerli bir FISH test sonucu için tüm pozitif kontrollerde, *C.m.subsp.sepedonicus*'un tipik morfolojiye ve büyüklüğe sahip hücrelerinin görülmesi gerekmektedir. Bunlar, FITC filtresi kullanıldığında parlak yeşil floresan ve eğer rhodamine filtre kullanılıyorsa parlak kırmızı hücreler şeklinde görülecektir. Bu arada negatif kontrollerde de herhangi bir boyama gözlenmemelidir. 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 4*). Tekrar süspanse edilen peletin her bir mililitresinde en az  $5 \times 10^3$  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  $5 \times 10^3$ 'den az hücre bulunan örnekler ise negatif olarak kabul edilir.
  - Rhodamine filtre kullanılarak pozitif kontrollerde parlak kırmızı floresan veren *C.m.subsp.sepedonicus*'un tipik morfolojisi ve büyüklüğüne sahip hücreler gözlemlendiğinde, eğer aynı hücreler çalışılan örneklerde yoksa FISH testi negatiftir.

## 6. PCR TESTİ

### *Prensip*

PCR, ilk tarama testi olarak kullanıldığı ve pozitif sonuç alındığında, 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 ekstraktlarının içine, mililitresinde  $10^3$ - $10^4$  olacak şekilde *C.m.subsp.sepedonicus* ilave edilmiş ve bu ekstraktlar kullanılarak PCR metodunun ilk testlemesi yapılmıştır. Bu nedenle tüm laboratuarlarda hassasiyet ve özgünlüğün maksimum seviyelerine ulaşmak için optimizasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Onaylanmış 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 kontroller (DNA ekstraksiyonu ve tüm PCR işlemleri için) daima en son örnekler olarak işleme alınmalıdır.

PCR testi yapılırken aşağıda yer alan negatif kontroller kullanılmalıdır:

- Daha önceden *C.m.subsp.sepedonicus* yönünden test edilerek temiz bulunmuş bir örnek ekstraktı
- Örnekten bakteriyi ve DNA'yı ekstrakte etmek için kullanılan tampon çözeltiler
- PCR reaksiyon karışımı

PCR testi yapılırken aşağıda yer alan pozitif kontroller kullanılmalıdır:

- *C.m.subsp.sepedonicus* ilave edilmiş ve yeniden süspanse edilmiş peletlerin seyreltmeleri (Bunların hazırlık işlemleri *İlave 2'*de yer almaktadır)
- *C.m.subsp.sepedonicus*'un virulent bir izolatu (örneğin NCPPB 2140 veya NCPPB 4053) kullanılarak mililitresinde  $10^6$  bakteri hücresi olacak şekilde su ile hazırlanmış bir süspansiyon
- Eğer mümkünse, PCR testindeki pozitif kontrol örneklerinden ekstrakte edilen DNA.

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

Örnek ekstraktları mümkün olduğu kadar topraktan arı olmalıdır. Bundan dolayı, bazı durumlarda, eğer PCR protokolü kullanılacaksa, yıkanmış patateslerden ekstraktların hazırlanması tavsiye edilebilir.

#### 6.1. DNA saflaştırma metotları

Yukarıda bahsedildiği gibi pozitif ve negatif kontrol örnekleri kullanılır.

Kompleks örnek substratları içindeki PCR engelleyicileri ve diğer enzimatik reaksiyonları ortadan kaldırarak, örnek ekstraktı 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 örnek ekstraktı 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 çökelti 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 süspanse edilir ve oda sıcaklığında en az 20 dakika süreyle bırakılır.
- 16) PCR işlemine 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

Militrede  $10^3-10^4$  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 örnekleri hazırlanır (*İlave 6*). Örnek DNA ekstraktının  $10^{-1}$  (Ultra saf su içinde 1: 10) seyreltmesi hazırlanır.
- 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'in kullanımı tavsiye edilir.
- 6.2.3. Steril PCR tüpleri içine, her bir 25 µl'lik PCR reaksiyon karışımı için 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 ladder.
- 6.3.2. Mutajen olan ethidium bromidle çalışırken gerekli güvenlik tedbirleri alınır ve jel 30–45 dakika süreyle ethidium bromide (litrede 0.5 mg) içinde boyanarak DNA bantları elde edilir.
- 6.3.3. Bantları görebilmek için kısa dalga boyu UV transillumination ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) 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 dahili kontrol primerleri: beklenen bant dizilişinin olduğu yerde ikinci bir bant oluşmalıdır) *C.m.subsp.sepedonicus* 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 *C.m.subsp.sepedonicus* 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 (Bölüm 9.3).

Not: Eğer su ile hazırlanmış olan *C.m.subsp.sepedonicus*'un bulunduğu pozitif kontrolde bant dizilişi gözlenip, patates 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 gözlendiyse, bulaşma olasılığından şüphelenilir.

## 7. BİOASSAY TESTİ

Not: Önceden analiz edilerek *C.m.subsp.sepedonicus* yönünden temiz bulunmuş patates ekstraktının içine ilave edilen *C.m.subsp.sepedonicus*'un mililitrede  $10^3$ - $10^4$  hücresi, bu testin ön denemelerinde tespit edilmelidir (Hazırlanması için *İlave 2*'e bakınız).

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

Bazı patlıcan çeşitleri belirtiler oluşmasa bile, *C.m.subsp.sepedonicus*'un geliştirilmesi için mükemmel bir seçici zenginleştirme ortamı oluşturur.

Test koşulları yanlış negatif sonuç alma riskini minimuma indirmek için optimum olmalıdır.

Diğer detaylar için *İlave 8*'e bakınız.

- 7.1. Bölüm 3.1.6 veya 3.2.5'deki tekrar süspense edilmiş pelet seyreltmelerinin tamamı aşağıda verilen metotlardan biri (7.3 veya 7.4) kullanılarak patlıcan bitkileri arasında paylaşılır. Bu bitkilerden 2-3 adet gerçek yaprağı tam olarak açılmış olanlar kullanılır. Aşağıda sözü edilen inokulasyon işlemlerinin tam olarak etkili olabilmesi için her bir örnek 15-25 patlıcan bitkisi üzerinde test edilmelidir.
- 7.2. Turgor basıncını azaltmak için inokulasyondan önce bir iki gün süreyle patlıcan bitkileri sulanmamalıdır.
- 7.3. Düz uzunlamasına bir kesik atılarak yapılan inokulasyon (Slit inokulasyon):
- 7.3.1. Bitki iki parmak arasında tutulurken, kotiledonlar ve ilk yapraklar arasındaki sap üzerine süspense edilen peletin bir damlası (yaklaşık 5-10 µl) pipetle koyulur.

- 7.3.2. Steril bir bistüri kullanılarak, yaklaşık 1.0 cm uzunluğunda ve sapın yaklaşık 2/3'ü derinliğine kadar inen bir uçtan diğer uca çizik, pelet damlasından başlayarak atılır.
- 7.3.3. Kesilmiş olan yer, bir enjektör kullanılarak steril vazelin ile kapatılır.
- 7.4. Enjektör ile inokulasyon:  
İnce uçlu bir enjektör (23G'den daha ince değil, insülün iğneleri olabilir) ile kotiledonların hemen üzerinden bitki sapı inokule edilir. Patlıcan bitkileri arasında örnek dağıtılır.
- 7.5. *C.m.subsp.sepedonicus*'un bilinen bir kültürü kullanılarak, su ile  $10^5$ – $10^6$  hücre/ml yoğunluğunda bir süspansiyon hazırlanır. Yukarıda anlatılan metotlardan biri kullanılarak, 5 fide pozitif kontrol olarak bu süspansiyonla inokule edilir.
- 7.6. Negatif kontrol olarak yine 5 bitki aynı yöntemle pelet tampon çözeltiyle inokule edilir.
- 7.7. İnokule edilen bitkiler, karantina koşullarına uygun bir şekilde, 18–24 °C'de 4 haftaya kadar yetiştirilir. Bu sırada bitkiler yeterli ışık ve yüksek nem (% 70–80) koşullarında inkube edilir ve su eksikliği nedeniyle oluşan solgunluk veya aşırı su yüklemesinden kaçınacak şekilde, uygun bir sulama programı takip edilerek sulanır. *C.m.subsp.sepedonicus*'un hücreleri 30 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ölür ve optimum sıcaklığı 21 °C'dir. 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 bitkiler de 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.
- 7.8. Bir hafta sonra belirtiler yönünden bitkiler düzenli olarak kontrol edilmeye başlanır. Belirti gösteren bitkilerin sayısı kaydedilir. *C.m.subsp.sepedonicus* patlıcan bitkilerinde yapraklarda solgunluğa sebep olur. Solgunlaşan doku başlangıçta koyu yeşil veya alacalı görünümde iken nekrozlar oluşmadan önce daha açık bir renk alır. Damarlar arasında görülen solgunluk, çoğunlukla yağlımsı suda haşlanmış bir görünümde dir. Nekrotik dokunun çevresi parlak sarı renklidir. Bitkiler her zaman ölmeyebilir, belirti gelişiminden önce daha uzun bir süreye ihtiyaç duyulabilir. Genç patlıcan bitkileri, yaşlı olanlara göre *C.m.subsp.sepedonicus*'un düşük popülasyonlarına daha hassastır. Bu nedenle patojenisitede üç yapraklı döneme kadar olan ya da tam bu dönemdeki bitkilerin kullanımı tercih edilmektedir.
- Solgunluk, yumru doku peletinde bulunan diğer bakteriler veya funguslar tarafından da arttırılabilir. Bunlar saprofit bakteriler kadar, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E.carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi* ve *Phoma exigua* var. *foveata*'dır. Özellikle *Erwinia chrysanthemi* tarafından oluşturulan yaprak belirtileri ve solgunluk, *C.m.subsp.sepedonicus* tarafından oluşturulana benzemektedir. Tek fark *Erwinia chrysanthemi* enfeksiyonu söz konusu olduğunda saplarda siyahlaşma oluşmasıdır. Diğer solgunluklarda tüm bitki veya yapraklar hızla solduğundan *C.m.subsp.sepedonicus* tarafından oluşturulan solgunluktan kolaylıkla ayrılabilir. Bunun yanı sıra Gram boyama kolaylıkla *C.m.subsp.sepedonicus*'u *Erwinia* spp.'lerden ayırır.
- 7.9. Patlıcan bitkilerinde belirtiler görülür görülmez, solgunluk görülen yapraklar veya sap parçalarından (dokunun işleme alınması için 3.1.3'e bakınız) reizolasyon yapılmalıdır. % 70'lik etil alkol kullanılarak patlıcan yaprakları ve saplalarının yüzeysel dezenfeksiyonları

yapılır. Patlıcan bitkilerinin özsuuyuyla PCR veya IF testi yapılır ve ayrıca uygun bir besi yeri (Bölüm 8'e bakınız) üzerine (seçici) ekim yapılır. Gram boyama yapılabilir (*İlave 9*). *C.m.subsp.sepedonicus*'un saflaştırılan kültürlerinin tanısı yapılarak patojenisite teyit edilir (Bölüm 9 ve 10'a bakınız).

- 7.10. Özellikle patojenisite için optimum koşulların sağlanamadığı durumlarda, 4 haftaya kadar olan inkubasyon süresi içerisinde bile patlıcan bitkilerinde belirtiler görülmeyip *C.m.subsp.sepedonicus* latent olarak kalabilir. Eğer 4 hafta sonra herhangi bir belirti görülmezse, her bir test bitkisinin inokulasyon noktasının üstünden 1 cm'lik sap parçaları alınır ve oluşan birleşik örnek kullanılarak, IF/PCR testi yapılır. Eğer test pozitifse, Bölüm 8'de verilen yöntem kullanılarak uygun bir besiyeri üzerine reizolasyon yapılmalıdır. *C.m.subsp.sepedonicus*'un saflaştırılan kültürlerinin tanısı yapılarak patojenisite teyit edilir (Bölüm 9 ve 10'a bakınız).

Bioassay test sonuçlarının yorumlanması

Pozitif kontrol bitkileri 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 *C.m.subsp.sepedonicus* ile enfekteli değil ve pozitif kontrolde *C.m.subsp.sepedonicus* tespit edilmişse, bioassay test sonuçları negatiftir.

Eğer test bitkileri *C.m.subsp.sepedonicus* ile enfekteli ise bioassay testi pozitifdir.

## 8. *C.M.SUBSP.SEPEDONICUS*'UN İZOLASYONU

*C.m.subsp.sepedonicus* izole edilir, ileri tanı testleri (Bölüm 9) tamamlanır ve bu da patojenisite testiyle (Bölüm 10) teyit edilirse ancak teşhis tam olarak tamamlanmış olur. *C.m.subsp.sepedonicus* yavaş gelişen bir organizma olmasına rağmen belirti veren dokulardan izole edilebilir.

Bununla beraber, çok hızlı gelişen saprofit bakteriler olabilir ve bundan dolayı doğrudan doğruya yumru veya sap dokusu peletinden (Bölüm 3.1.6 veya 3.2.5) izolasyon güçtür. Patateslerin sapları veya göbek dokularından elde edilen tekrar süspansen edilmiş peletlerin uygun seyreltmeleri ve seçici besi yeri ile *C.m.subsp.sepedonicus*'un doğrudan izolasyonu mümkün olabilir.

İzolasyonlar belirti oluşturmuş tüm patates yumruları veya sap parçalarından yapılmalıdır. Ayrıca belirti oluşturmamış ancak birleşik örneklerinden yapılan IF/PCR testi pozitif çıkmış (Bölüm 7.10'na bakınız) patlıcan bitkilerinden de izolasyon yapılmalıdır. Gerektiği zaman patlıcan bitkilerinin işlenmesi, Bölüm 3.1.3'te tarif edildiği şekilde yapılmalıdır.

Pozitif kontrol olarak *C.m.subsp.sepedonicus*'un (örneğin NCPPB 4053 veya PD 406)  $10^6$  cfu/ml konsantrasyonluk bir süspansiyonundan seyreltme serisi hazırlanır. Herhangi bir bulaşma olasılığını ortadan kaldırmak için, pozitif kontroller test edilecek örneklerden ayrı hazırlanır.

Rutin test örneklerinde kullanılmadan önce, yeni hazırlanan her seçici ortamın patojenin gelişmesi için uygun olup olmadığı test edilmelidir.

### 8.1. Seçici besi yerine ekim

- 8.1.1. Tekrar süspansen edilmiş patates pelet örnekleri veya patlıcan saplarından 100 µl alarak pelet buffer içinde (*İlave 3*)  $10^7$ luk seyreltmeler hazırlanır.
- 8.1.2. *Cms*'nin yavaş gelişme özelliği ve saprofitlerle rekabet nedeniyle, seyreltilmemiş patates peletlerinden izolasyon genellikle başarısız olur. Enfekteli dokularda bakteri popülasyonu

genellikle yüksek olduğundan, patojen geride kalırken saprofitler genellikle seyreltme sonucunda azalır. Bu nedenle her bir örneğin 1/100 den 1/ 10000'ne kadar olan seyreltmelerinden 100'er µl olacak şekilde (90 mm çapında petriyeler kullanılıyorsa bu miktar uygundur, farklı boyuttaki petriyelerin kullanılması durumunda hacim ayarlanır) MTNA veya NCP-88 besiyerlerinden (*İlave 5*) birine baget ile yayarak ekilmesi tavsiye edilmektedir.

Not:

Alternatif bir yöntem olarak, başlangıç inokulumu olan 100 µl, birinci petriye baget kullanılarak yayılır, herhangi bir sterilizasyon yapılmadan aynı baget üzerinde kalanlar, sırasıyla ikinci ve üçüncü petriyelere de yayılır. Bu şekilde baget yardımıyla seyreltme yapılmış olur.

8.1.3. Petriyeler 21–23 °C' de karanlıkta inkube edilir.

8.1.4. Petriyelerin ilk kontrolü, referans strainlerde dâhil olmak üzere, 3 gün sonra yapılır. *C.m.subsp.sepedonicus* benzeri koloniler sayılır, daha sonraki kontroller 5 ve 7. günde yapılır. Son kontrol ise 10. günde yapılır.

## 8.2. Şüpheli kolonilerin saflaştırılması

Not: Patlıcan bitkilerine inokulasyon ve/veya daha ileri tanı testleri için *C.m.subsp.sepedonicus* benzeri kolonilerin saflaştırılması, YGM besi yerine yapılmalıdır. Bu işlem petriyelerde çok yoğun gelişme olmadan, tercihen 3–5 gün sonra, yapılmalıdır.

8.2.1. Aşağıda verilen besi yerlerinden birine *C.m.subsp.sepedonicus* benzeri koloniler çizilir (*İlave 5*'de bu besiyerlerinin içeriği verilmiştir).

Nutrient dextrose agar (sadece saflaştırma için kullanılır)

Yeast peptone glucose agar

Yeast extract mineral salts agar

Petriyeler 21–24 °C' de 10 güne kadar inkube edilir.

*C.m.subsp.sepedonicus* yavaş gelişir, genellikle 10 gün içerisinde krem renkli, kubbemsi koloniler iğne ucu kadar gelişir (pin-point).

8.2.2. Saflaştırmayı tamamlamak için yeniden çizgi ekim yapılır.

Tipik koloniler düz kenarlarıyla kremimsi beyaz veya fildişi, ender olarak sarı, yuvarlak, düz, kabarık, konveks-kubbemsi, mucoid, akışkandır ve genellikle 1–3 mm çapındadır.

Basit bir Gram boyama (*İlave 9*), daha ileri testler için kolonilerin seçimine yardımcı olabilir.

8.2.3. Kültürlerin tanınması yapılır (Bölüm 9'a bakınız) ve patojenisite testi gerçekleştirilir (Bölüm 10'a bakınız).

## 9. TANI

Aşağıda yer alan testlerden farklı biyolojik temele dayanan en az iki tanesi yapılarak, *C.m.subsp.sepedonicus* olduğu varsayılan saf kültürlerin tanınması yapılır.

Bu testler yapılırken gerektiği hallerde bilinen referans strainlerde kullanılır.

### 9.1. Besinsel ve enzimatik tanı testleri

Lelliott ve Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001), Anonymous (1987)'de yer alan metotlara göre *C.m.subsp.sepedonicus*'un aşağıda yer alan fenotipik özellikleri belirlenir.

Bütün besi yerleri 21 °C' de inkube edilmelidir ve 6 gün sonra kontrol edilir. Eğer hiç gelişme yoksa 20 güne kadar inkube edilir.

Bütün testlerde *C.m.subsp.sepedonicus*'un bilinen referansları da mutlaka kullanılmalıdır. Besinsel ve fizyolojik testlerde kullanılmak üzere hazırlanacak inokulum, öncelikle nutrient agar üzerinde geliştirilmeli ve daha sonra buradan inokulum hazırlanmalıdır.

Test	Beklenen sonuç
Oxidation/Fermentation(O/F) testi	belirsiz veya zayıf oksidatif
Oxidase testi	-
37 °C de gelişme	-
Üre aktivitesi	-
Aesculine hidrolizi	+
Nişasta hidrolizi	- veya zayıf
% 7 NaCl de gelişme	-
Indol üretimi	-
Katalaz aktivitesi	+
H <sub>2</sub> S üretimi	
Citrate kullanımı	-
Gelatine liquefaction	-
Gliserolden asit üretimi	-
Laktozdan asit üretimi	- veya zayıf
Rhamnozdan asit üretimi	-
Salisinden asit üretimi	-
Gram boyama ( <i>İlave 9</i> )	+

### 9.2. IF testi

- IF tampon çözelti kullanılarak, militrede yaklaşık 10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde bir süspansiyon hazırlanır.
- Uygun antiserumun iki katlı seyreltmeleri hazırlanır.
- IF boyama yapılır (Bölüm 4).
- Eğer kültürün IF titresi pozitif kontrolün titresine eşitse, IF testi pozitifdir.

### 9.3. PCR testi

- Mililitrede yaklaşık 10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde moleküler sınıf steril su içinde bir süspansiyon hazırlanır.
- 100 µl'lik bakteri süspansiyonu ısı bloğu veya 100 °C'de kaynayan su banyosu içinde 4 dakika süreyle ısıtılır. Taze olarak hazırlanmış son konsantrasyonu 0,05 M olan NaOH, eğer ihtiyaç duyuluyorsa hücrenin lysis işlemine yardımcı olmak için ilave edilebilir. Örnekler kullanılına kadar – 20 °C'de tutulur.
- C.m.subsp.sepedonicus*'a spesifik primerler kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilir (örneğin Pastrik 2000; *İlave 4*'e bakınız; Li and de Boer 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrik and Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999)

- (d) Eğer oluşan PCR ürünü pozitif kontrol olarak kullanılan strainle aynı ölçüde ve aynı RFLP modeline sahipse, *C.m.subsp.sepedonicus* için pozitif bir tanı yapılmıştır.

#### 9.4. FISH testi

- (a) Mililitrede yaklaşık  $10^6$  hücre olacak şekilde ultra saf su (UPW) içinde bir süspansiyon hazırlanır.
- (b) FISH testi (Bölüm 5) yapılır.
- (c) Kültür ve pozitif kontrolden aynı sonuçlar alındığında FISH testi pozitifdir.

#### 9.5. Yağ asidi profili (Fatty acid profiling, FAP)

- (a) Kültürler,  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de ( $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 72 saat süreyle trypticase soy agar (Oxoid) üzerinde geliştirilir.
- (b) Uygun FAP prosedürü uygulanır (Janse 1991; Stead 1992).
- (c) Çalışılan örnek pozitif kültürün profiliyle aynıysa, FAP testi pozitifdir. 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 ve 17:0 Anteiso yağ asitlerinin bulunması *C.m.subsp.sepedonicus* için belirleyici bir özelliktir. *Curtobacterium*, *Arthrobacter* ve *Micrococcus* gibi diğer cinsler, bu yağ asitlerinin bazılarına sahiptir, ancak 15:1 Anteiso A bu bakterilerde ender bulunan bir yağ asididir. Fakat tüm *Clavibacter* spp.'lerde % 1–5 arasında bulunur. Bu oran *C.m.subsp.sepedonicus*'da genellikle % 5 civarındadır.

#### 9.6. BOX-PCR

- (a) Mililitrede yaklaşık  $10^6$  hücre olacak şekilde ultra saf su (UPW) içinde bir süspansiyon hazırlanır.
- (b) Metoda göre test yapılır (Smith *et al.*, 2001).

### 10. DOĞRULAMA TESTİ

Patojenisite testi, *C.m.subsp.sepedonicus* olarak tanısı yapılan kültürlerin virülensliğini değerlendirmek ve *C.m.subsp.sepedonicus*'un teşhisinin doğerulanması amacıyla yapılmalıdır.

- 10.1. *C.m.subsp.sepedonicus*'un uygun bir pozitif kontrol straini ve test edilen izolatanın üç günlük kültüründen mililitrede yaklaşık  $10^6$  hücrelik bir inokulum hazırlanır
- 10.2. Üç gerçek yapraklı dönemdeki 5–10 patlıcan bitkisinin sapları inokule edilir (Bölüm 7.3 veya 7.4).
- 10.3. Kuraklık veya su fazlası oluşturmayacak şekilde bir sulama programı uygulayarak, yüksek orantılı nem inkubasyon süresince sağlanır. Ayrıca inkubasyon ortamında  $18\text{--}24\text{ }^{\circ}\text{C}$  sıcaklık ve yeterli ışık olmalıdır (Bölüm 7.7). Saf kültürle çalışıldığında iki hafta içerisinde tipik solgunluk belirtileri oluşmalıdır. Ancak bu sürenin sonunda belirtilerin oluşmadığı bitkiler, patlıcan bitkileri için uygun ancak  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'yi aşmayan sıcaklıklarda üç haftaya kadar inkube edilmelidir. Eğer üç hafta sonra belirtiler oluşmamışsa, kültür *C.m.subsp.sepedonicus*'un patojenik formu olarak doğerulanamaz.
- 10.4. Belirti veren bitkilerin inokulasyon noktalarının üzerinden 2 cm'lik bir sap parçası alınarak, bunlardan izolasyon yapılır. Steril destile su veya 50 mM fosfat tampon çözeltisi (İlave 3) içinde süspansiyon edilir veya ezilir. Bu süspansiyondan MTNA veya YPGA besi yerlerine (İlave 5) çizgi ekim veya yayarak ekim yapılır,  $21\text{--}23\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 3–5 gün süreyle inkube edilir ve *C.m.subsp.sepedonicus*'un tipik kolonileri kontrol edilir.

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

<b>Laboratuvar <sup>(1)</sup></b>	<b>Şehir</b>	<b>Ülke</b>
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
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Hollanda
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Norveç
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lizbon	Portekiz
Nacionalni institut za biologijo	Ljubljana	Slovenya
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	İspanya

<sup>(1)</sup> Araştırmacılarla bağlantıya geçmek için aşağıda yer alan web sayfasını kullanınız.  
<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main> web sayfasına bakınız.

## İlave 2

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

*C.m.subsp.sepedonicus* (NCPBB 4053 veya PD 406)'un virüent bir straini MTNA ortamında 72 saat süreyle geliştirilir. Bu kültürden 10 mM fosfat tampon çözelti kullanılarak mililitrede  $1-2 \times 10^8$  cfu olacak şekilde bir süspansiyon hazırlanır. Bu, 600 nm'de 0,2 optik yoğunluğa eşit hafif bulanıklıkta bir süspansiyondur.

*C.m.subsp.sepedonicus*'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 *C.m.subsp.sepedonicus*'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 *C.m.subsp.sepedonicus* 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 *C.m.subsp.sepedonicus*'un varlığı ve miktarı IF boyama yapılarak doğrulanır.

PCR testi için, test edilen örneklerin her bir serisinden ve pozitif ve negatif kontrol örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılır.

IF ve FISH testleri için, test edilen örneklerin her bir serisinden ve pozitif ve negatif kontrol örneklerinden testleme yapılır.

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



### İlave 3

#### Tampon çözeltiler

GENEL: Sterilize edilmiş ve kapağı açılmamış tampon çözeltiler bir yıla kadar depolanabilir.

#### 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 ekstraksiyonunda kullanılır.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (susuz)	4.26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	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
Polyvinylpyrolidone-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 dokusu ve peletlerinin sulandırılması ve tekrar süspanse edilmesinde kullanılır.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	2.7 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	2.7 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> 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 lamaların yıkanmasında kullanılır.

IF tampona %0.1' lik Tween 20 ilave edilir.

##### 2.3. Gliserol fosfat tampon çözeltisi, pH 7.6

Bu tampon fluoresanı zenginleştirmek için IF lamının pencereleleri 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

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

**İlave 4****IF ve FISH testindeki bulaşma seviyesinin tespiti**

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

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

S= Çok pencereli lamda tek bir pencerenin 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 süspanse edilen peletin mililitresindeki tipik fluorescent hücrelerin miktarını hesaplayın (N).

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

y= Her bir penceredeki tekrar süspanse edilen peletin hacmi

F= tekrar süspanse edilen peletin seyreltme faktörü

**İlave 5*****C.m.subsp.sepedonicus*'un kùltùre alınması ve izolasyonunda kullanılan besi yerleri****(a) Genel besiyerleri***Nutrient Agar (NA)*

Nutrient agar (Difco)	23.0 g
Destile su	1.0 litre

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

*Nutrient dextrose agar (NDA)*

% 1 D(+) glikoz (monohidrat) içeren Difco Bacto Nutrient Agar. 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

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

*Yeast extract mineral salts besiyeri (YGM)*

Bacto yeast extract (Difco)	2.0 g	
D(+) Glucose (monohidrat)	2.5 g	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25 g	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1 g	
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.015 g	
NaCl	0.05 g	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		0.005 g
Bacto agar (Difco)	18.0 g	
Destile su	1.0 litre	

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

**(b) Geçerliliği onaylanmış seçici besiyerleri**

## MTNA besi yeri

Aksi belirtilmedikçe besi yeri yapımında kullanılan kimyasallar BDH'den olmalıdır.

Yeast extract (Difco)	2.0 g
Mannitol	2.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25 g
NaCl	0.05 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1 g

MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.015 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.005 g
Agar (Oxoid no. 1)	16.0 g
Destile su	1.0 litre

İçindekiler çözülür ve pH 7.2'ye ayarlanır. 15 dakika 121 °C' de otoklavda sterilize edilir, 50 °C' ye sıcaklık düştüğünde trimethoprim 0.06 g, nalidixic acid 0.002 g, amphotericin B 0.01 g ilave edilir.

Stok antibiyotik solusyonları: Trimethoprim (Sigma) ve nalidixic acid (Sigma) (her ikisi de 5 mg/ml) % 96'lık metil alkolle, amphotericin B (Sigma) (1 mg/ml) dimetil sülfoksitle hazırlanır. Stok solusyonlar filtre ile sterilize edilir.

*Not:*

Hazırlanan besi yerlerinin antibiyotikler ilave edilmeksizin saklama süresi 3 aydır. Antibiyotikler ilave edildikten sonra, buzdolabında saklanması koşuluyla, bir aydır.

NCP-88 besi yeri

Nutrient agar (Difco)	23 g
Yeast extract (Difco)	2 g
D-mannitol	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.25 g
Destile su	1.0 l

İçindekiler çözülür ve pH 7.2'ye ayarlanır. 15 dakika 121 °C' de otoklavda sterilize edilir, 50 °C' ye sıcaklık düştüğünde polymyxin B sülfat (Sigma) 0.003 g, nalidixic acid (Sigma) 0.008 g, cycloheximide (Sigma) 0.2 g ilave edilir.

Stok antibiyotik solusyonları: Nalidixic acid 0,01 M NaOH, cycloheximide % 50 etil alkol, polymyxin B sülfat distile su ile hazırlanır. Stok solusyonlar filtre ile sterilize edilir.

*Not:*

Hazırlanan besi yerlerinin antibiyotikler ilave edilmeksizin saklama süresi 3 aydır. Antibiyotikler ilave edildikten sonra, buzdolabında saklanması koşuluyla, bir aydır.

### İlave 6

#### Geçerliliği onaylanmış PCR protokolleri ve kimyasalları

Not:

Kullanılan protokol, örnek ekstraktının her bir mililitresindeki  $10^3 - 10^4$  *C.m.subsp.sepedonicus* hücrelerini tespit edebilmelidir.

Ayrıca seçilmiş bazı bakteriyel strainler ile yanlış pozitif sonuç vermemelidir.

#### 1. İnternal kontrol ile birlikte Multiplex PCR protokolü (Patrik, 2000)

##### 1.1. Oligonükleotid primerler

Forward primer PSA-1 5' – CTC CTT GTG GGG TGG GAA AA – 3'  
 Reverse primer PSA-R 5' – TAC TGA GAT GTT TCA CTT CCC C – 3'  
 Forward primer NS-7-F 5' – GAG GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC – 3'  
 Reverse primer NS-8-R 5' – TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA – 3'

*C.m.subsp.sepedonicus*'un DNA'sı için beklenen bant büyüklüğü = 502 bp (PSA primer seti ile)

18S rRNA internal PCR kontrolü için beklenen bant büyüklüğü = 377 bp (NS primer seti ile)

##### 1.2. PCR reaksiyon karışımı

Kimyasal	Her bir reaksiyon için kullanılacak miktar (1X)	Son konsantrasyon
Steril ultra saf su (UPW)	15,725 µl	
10X PCR buffer <sup>(1)</sup> (15 mM Mg Cl <sub>2</sub> )	2,5 µl	1X (1,5 mM Mg Cl <sub>2</sub> )
BSA (fraction V) (% 10)	0,25 µl	% 0,1
dNTP mix (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer NS-7-F (10 µM) <sup>(2)</sup>	0,1 µl	0,04 µM
Primer NS-8-R (10 µM) <sup>(2)</sup>	0,1 µl	0,04 µM
Taq polimeraz (5 U/ µl) <sup>(1)</sup>	0,2 µl	1,0 U
Örnek hacmi	5,0 µl	
Toplam hacim	25,0 µl	

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

<sup>(2)</sup> NS-7-F ve NS-8-R primerlerinin konsantrasyonları, patates göbek parçalarının ekstraksiyonu için homojenizasyon metodunun kullanıldığı ve Patrik (2000)'e göre DNA'nın saflaştırıldığı metod ile optimize edilmiştir (bakınız bölüm 6.1.a ve 6.2). Eğer ekstraksiyon çalkalama yoluyla yapılırsa veya diğer DNA ekstraksiyon metodları kullanılırsa, kimyasalların konsantrasyonlarında tekrar optimizasyona ihtiyaç duyulabilir.

### 1.3 PCR reaksiyon koşulları

Aşağıdaki program kullanılır:

1 döngü	(i)	95 °C'de 3 dakika (DNA'nın parçalanması)
10 döngü	(ii)	95 °C'de 1 dakika (DNA'nın parçalanması)
	(iii)	64 °C'de 1 dakika (primerlerin bağlanması)
	(iv)	72 °C'de 1 dakika (kopyanın uzaması)
	(v)	95 °C'de 30 saniye (DNA'nın parçalanması)
25 döngü	(vi)	62 °C'de 30 saniye (primerlerin bağlanması)
	(vii)	72 °C'de 1 dakika (kopyanın uzaması)
	(viii)	72 °C'de 5 dakika (son uzama)
1 döngü	(ix)	4 °C'de tutma ( $\infty$ )

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

### 1.4. Çoğaltılan ürünün kesim enzimleriyle analizi

*C.m.subsp.sepedonicus*'dan çoğaltılmış olan PCR ürünü, 37 °C'de 30 dakika inkube edilir, daha sonra *Bgl* II enzimiyle kesilerek farklı bir RFLP üretir. *C.m.subsp.sepedonicus*'a özel parçadan elde edilen kesim parçaları 282 bp ve 220 bp ölçülerindedir.

## 2. Yükleme tampon çözeltisinin hazırlanması

### 2.1. Bromphenol blue (% 10 stok solusyon)

Bromphenol blue	5 g
Bidestile su	50 ml

### 2.2. Yükleme tampon çözeltisi

Glycerol (% 86)	3,5 ml
Bromphenol blue (5,1)	300 $\mu$ l
Bidestile su	6,2 ml

## 3. 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 olarak satılmaktadır (örneğin Invitrogen veya eşdeğeri)

*İlave 7***FISH testi için geçerliliği onaylanmış kimyasallar****1. Oligo problemler**

Cms'ye özel prob CMS-CY3-01: 5' – TTG CGG GGC GCA CAT CTC TGC ACG– 3'

Spesifik olmayan öbakteriyel prob EUB-338-FITC: 5' – GCT GCC TCC CGT AGG AGT – 3'

**2. Sabitleyici solüsyon**

***(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 HCl ilave ederek pH 7.0'ye ayarlanır. pH, bir strip kullanılarak (turnusol kâğıdı benzeri) kontrol edilir ve eğer gerekiyorsa HCl veya NaOH ile ayarlama yapılır.

***(DİKKAT! PARAFORMALDEHİT İÇEREN SOLÜSYONLARLA ÇALIŞIRKEN pH METRE KULLANMAYINIZ.)***

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

(iv) Not: Alternatif sabitleyici solüsyon: % 96'lık etil alkol

**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 solüsyonu**

1x Hybmix	
Sodyum dodecyl sülfat (SDS)	% 0,01
Prob EUB 338	5 ng/ µl
Prob CMS-CY3-01	5 ng/ µl

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



Tablo 1. Hibridizasyon karışımının hazırlanması için tavsiye edilen miktarlar

Lamların sayısı	2	8
Steril ultra saf su	50,1	200,4
3x hybmix	30,0	120,0
% 1 SDS	0,9	3,6
Probe EUB 338 (100 ng/ µl)	4,5	18,0
Prob CMS-CY3-01 (100 ng/ µl)	4,5	38,0
Toplam hacim (µl)	90,0	360,0
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**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,52 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 kültürü**

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 bitkileri aşağıda yer alan koşullarda serada yetiştirilir:

Gün uzunluğu	14 saat veya doğal gün ışığı varsa daha uzun
Sıcaklık	gündüz 21–24 °C, gece 15 °C,
Hassas patlıcan çeşidi	“Black Beauty” “Long Tom” “Rima” “Balsas”
Temin edici	<a href="http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main">http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main</a> web sayfasına bakınız

**İlave 9****Gram Boyama (Hucker tarafından modifiye edilen) (Doetsch, 1981) <sup>(1)</sup>***Kristal viyole solusyonu*

% 95'lik 20 ml etil alkol içerisinde 2 g kristal viyole çözülür.

80 ml destile su içinde 0,8 g amonyum okzalat çözülür.

İki solusyon karıştırılır.

*Lugol's iodine*

Iodine (İyot)	1 g
Potasyum iodide	2 g
Destile su	300 ml

Havan ve havaneli yardımıyla partiküller dövülür. Su ilave edilir ve kapalı bir kap içerisinde çözmek için karıştırılır.

*Safranin karşı boyama solusyonu*

Stok solusyon:

Safranin O	2,5 g
% 95 etil alkol	100 ml

Karıştırılır ve depolanır.

Çalışma solusyonu için 1: 10 oranında sulandırılır.

*Boyama prosedürü*

1. Lam üzerine boyanacak materyal sürülür, kurutulur ve ısıyla sabitlenir.
2. Bir dakika süreyle kristal viyole solusyonuyla lam boyanır.
3. Musluk suyuyla lamın tamamı yıkanır.
4. Bir dakika süreyle Lugol's iodine'le yıkanır.
5. Musluk suyuyla lam yıkanır ve havlu kâğıtla kurulanır.
6. % 95'lik etil alkol ile rengin uzaklaştırılması, bunun için renk kalmayana kadar damla damla % 95'lik etil alkol ilave edilir veya 30 saniye süreyle yavaş bir şekilde çalkalayarak % 95'lik etil alkole daldırılır.
7. Musluk suyu ile lam yıkanır ve kâğıt havlu ile kurutulur.
8. 10 saniye süreyle safranin solusyonuna daldırılır.
9. Musluk suyuyla yıkanır ve kâğıt havlu ile kurulanır.

Gram pozitif bakteriler menekşe-mavi; Gram negatif bakteriler ise pembe-kırmızı boyanır.

<sup>(1)</sup> Ticari olarak satılan solusyonlar ve boyama kitleri de kullanılabilir.

*EK II*

1. *EK I*'de yer alan tarama testlerinden biri sonucunda eğer şüpheli bir durum tespit edilmişse, bu durum doğrulanana veya reddedilene kadar aşağıda yer alan materyal uygun saklama koşulları olan bir yerde bekletilmelidir:

- tüm yumru örnekleri ve eğer mümkünse toplanan bütün bitkiler,
- kalan örnek ekstraktları ve tarama testleri için hazırlanmış olan materyal (örneğin Immunofluoresan test lamları) ve,
- ilgili olan diğer tüm dökümanlar.

Yumruların geriye kalanları uygun durumlarda çeşit testleme denemelerine alınabilir.

2. Şüpheli durum doğrulanıp, *C.m.subsp.sepedonicus*'la bulaşıklık kesin olarak belirlendiğinde ve bu [ 34gvo grk k 10 (2) 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,
- yumru veya bitki ekstraktı inokule edilmiş enfekteli patlıcan bitkilerinin bir örneği,
- zararlı organizmanın izole edilmiş kültürleri.

## EK III

1. Bu [ 34960 grk kp 10 (1) maddesinin (b) bendinde yer alan muhtemel bulaşmanın büyüklüğünü tespit etmek için yürütülen çalışmalarda göz önünde bulundurulması gereken temel unsurlar:
  - bu [ 34960 grk kp 10 (1) maddesinin (a) bendine göre bulaşık olarak belirlenmiş bir üretim yerinde yetiştirilmiş yumru ve bitkileri,
  - bu [ 34960 grk kp 10 (1) maddesinin (a) bendine göre bulaşık olarak tanımlanan yumru ve bitkilerle bazı üretim bağlantılarına sahip olan üretim yeri/yerlerini (örneğin aynı alet ve ekipmanı paylaşarak kullanan üretim yerleri),
  - bir önceki paragrafta belirtilen yerlerde veya ilk paragrafta sözü edilen bulaşık olarak belirlenmiş alanlarda üretilmiş yumru ve bitkilerle aynı sezonda bu üretim yerlerinde bir arada bulunan yumru veya bitkileri,
  - yukarıda sözü edilen tüm üretim yerlerindeki patates işleme tesislerini,
  - bu [ 34960 grk kp 10 (1) maddesinin (a) bendine göre bulaşık olarak belirlenmiş olan yumru veya bitkilerle temas etmiş veya etme olasılığı bulunan her türlü makine, araç, depo veya birimler ile paketlenme malzemeleri de dâhil her türlü diğer materyali,
  - bir önceki paragrafta sözü edilen her türlü materyalle temizlenmeden veya dezenfekte edilmeden önce temas etmiş veya onlarla aynı yerde depolanmış yumru veya bitkileri,
  - bu [ 34960 grk kp 10 (1) maddesinin (a) bendine göre bulaşık olarak belirlenmiş yumru veya bitkilerle klonal bir akrabalığı olan yumru veya bitkileri (bu [ 34960 grk kp 14 (2) maddesinde sözü edilen testler sonucunda negatif olarak bulunmuş olsalar da klonal bağ nedeniyle bir bulaşıklık yine de söz konusu olabilir. Bulaşık ve klonal olarak akraba yumru veya bitkilerin kimliğini doğrulamak için çeşit testlemesi yapılabilir),  
ve
  - bir önceki paragrafta sözü edilen yumru veya bitkilerin üretim yerlerini kapsamalıdır.
2. Bu [ 34960 grk kp 10 (1) maddesinin (c) bendinde yer alan olası yayılmayı tespit etmek için yürütülen çalışmalarda göz önünde bulundurulması ve tedbir alınması gereken unsurlar aşağıda sıralanmıştır:
  - patates veya diğer konukçu bitkilerin yetiştirildiği diğer üretim yerlerinin yakınlığı,
  - tohumluk patates stoğunun yaygın üretim ve kullanımı.
3. Bu [ 34960 grk kp 10 (2) maddesinde sözü edilen Bakanlığa yapılacak olan bildirimde aşağıda yer alan bilgiler bulunmalıdır:
  - EK I'de verilen metotlar kullanılarak laboratuvar testleri sonucu organizmanın varlığı teyit edilir edilmez, en azından:
    - patates lotunun çeşit ismi,
    - tohumluk mu yoksa yemeklik olarak mı yetiştirildiği ve mümkünse hangi tohumluk kategorisinde yetiştirildiği,

Bakanlığa, bu [ 34960 grk kp 10 (2) maddesinde yer alan ilave bildirimler yapılırken verilmesi gereken ayrıntılar şunlardır:

Tüm araştırmalar sonuçlandıktan sonra,

- bulaşmanın teyit edildiği tarih,
- örnekleme miktarıyla birlikte olası bulaşmanın kaynağını ortaya çıkarmak için yürütülen çalışmalara ilişkin olarak kısa bir bilgi,
- bulaşmanın belirlenen veya tahmin edilen kaynağı hakkında bilgi,
- bulaşmanın büyüklüğünü ortaya koyan detaylar (çeşit ismiyle beraber lotların ve üretim yerlerinin sayısı),
- çalışmalar sonucunda bulaşık olarak belirlenmese de sınırlandırma bölgesi içinde kalan yerlere ilişkin bilgiler,
- salgına ilişkin ihtiyaç duyulabilecek diğer bilgiler.

## EK IV

1. Bu [ 3/pçvo grk kç 11 (1) maddesinde sözü edilen bulaşık olduğu belirlenmiş olan bitkisel materyalin eradikasyonu için uygulanabilecek yöntemler aşağıda verilmiştir:
  - *C.m.subsp.sepedonicus*'un canlı kalmayacağı şekilde bitkisel materyal bir ısıtma işlemine tabi tutulur ve daha sonra hayvan yemi olarak kullanılır,

veya

  - tarımsal alanlara sızıntı riski olmayan veya tarımsal alanların sulanmasında kullanılan su kaynaklarıyla temas etmeyecek yerlere derin şekilde gömülür (resmi olarak onay verilmiş yerler olmalıdır),

veya

  - çöp fırınlarında yakılır,

veya

  - *C.m.subsp.sepedonicus*'un yayılması için risk teşkil etmeyecek, resmi olarak onaylanmış atık tesisleri bulunan ve nakliyede kullanılan araçların dezenfeksiyonu ve temizlenmesi için de bir sistemi olan endüstriyel işleme tesislerine bitkisel materyal direk ve acil olarak nakliye edilip, burada işlenir,

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 diğer bir atık ise, bu [ 3/pçvo grk kç EK V'inde yer alan resmi olarak onaylanmış metotlardan biriyle imha edilmelidir.
2. Bu [ 3/pçvo grk kç 10 (1) ve 11 (1) maddelerine göre muhtemelen bulaşık durumda olduğu tespit edilen bitkiler veya yumruların elden çıkarılması veya uygun bir şekilde kullanılması için, Bakanlık ile iletişim kurulmalı ve bu işlemler yapılırken birinci ve ikinci paragraflarda belirtilen Bakanlıkça onaylanmış tesislerde paketlenerek satılacak veya çöp atık tesislerinde işlenecek patatesler kontrol edilmelidir. Bu bitkiler ve yumruları,
  - sofralık patates olarak kullanılabilir ve uygun çöp atık sistemi olan tesislerde paketlenerek direk olarak dağıtıma verilebilir. 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 işlenebilir,

veya

  - organizmanın yayılmasıyla ilgili belirgin bir riski olmayan ve resmi makamlarca kabul edilen farklı bir şekilde de kullanılabilir.
3. Bu [ 3/pçvo grk kç 13 (1) maddesinde sözü edilen araç ve objeler, Bakanlığın gözetiminde organizmanın yayılmasına olanak vermeyecek şekilde dezenfekte edilir veya temizlenir.
4. Bu [ 3/pçvo grk kç"10 (1) maddesinin (c) bendine göre sınırlandırılmış ve 14 (1) maddesinde sözü edilen bölgede uygulanan önlemler dizisi şunları içermelidir:

4.1. Bu [ 3/pçvo grk kç 10 (1) maddesinin (a) bendine göre bulaşık olduğu kabul edilmiş üretim yerlerinde uygulanacak önlemler:

(a) Bu [ 3/pçvo grk kç 10 (1) maddesinin (a) bendine göre bulaşık olduğu belirlenen tarla veya örtü altı üretim yerinde,

ya

(i) bulaşmanın tespitinden sonraki en az 3 üretim yılı boyunca,

- kendigelen patates ve organizmanın doğal olarak bulunduğu diğer konukçu bitkilerin tamamen yok edilmesi için önlemler alınır,

ve

- aşağıdakiler ekilmez:

- patates yumruları, bitkileri veya gerçek tohumları,

veya

- organizmanın doğal olarak üzerinde bulunduğu diğer konukçu bitkiler,

veya

- organizmanın yayılmasında etkili olabilecek diğer bitkiler;

- bir önceki bölümde belirtilmiş olan en az 3 yıllık süreyi takip eden ilk patates üretim sezonunda (tarlanın kendi gelen patates bitkilerinden ve doğal olarak bulunduğu diğer konukçu bitkilerden dikimden önceki ardarda en az iki yıl süreyle temiz olması durumunda),

- bu alanlarda sadece yemeklik patates ekimine izin verilir,

- hasat edilen patates yumruları *EK I* de yer alan uygun metotlar kullanılarak testlenir;

- bir önceki paragrafta sözü edilen patates üretim sezonunu izleyen ve uygun bir münavebeyi takip eden üretim sezonunda eğer tohumluk patates yetiştirilecekse, en az iki yıl süreyle bu [ 3/pçvo grk kç 5 (1) maddesinde belirtilen sürveyler yürütülür;

ya da,

(ii) Bulaşmanın belirlenmesini takip eden 4 üretim yılı boyunca,

- kendigelen patates bitkileri ve doğal olarak bulunduğu diğer konukçu bitkilerin tamamen yok edilmesi için önlemler alınır,

ve

- tarlaya ya 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 üretim mevsiminde ve dikimden önceki birbirini takip eden en az iki yıl süreyle yapılan resmi kontroller sonucunda kendi gelen patates bitkileri ve doğal olarak bulunduğu diğer konukçu bitkilerden tarlanın ari bulunması durumunda,

- tohumluk veya yemeklik patates üretimi yapılabilir,



- hasat edilen patates yumruları *EK I* de yer alan uygun metotlar kullanılarak testlenir;
- (b) bulaşık üretim alanlarındaki diğer tüm tarlalarda ve kendi gelen patates bitkileri ve doğal olarak bulunduğu diğer konukçu bitkilerin risk oluşturduğunun resmi kurumlar tarafından belirlendiği durumlarda:
- belirlenen bulaşmayı takip eden üretim yılında, ya
    - patates yumruları, bitkileri, gerçek tohumları ve organizmanın doğal olarak bulunduğu diğer konukçu bitkiler yetiştirilmez,
 ya da,
    - sadece sertifikalı tohumluk kullanılarak yemeklik patates üretilebilir,
  - belirlenen bulaşmayı takip eden ikinci üretim yılında,
    - patates için; 4.1.'de sözü edilen üretim alanları dışındaki tarlalarda, resmi kontrol altında yetiştirilmiş ve halka çürüklüğü hastalığı yönünden test edilmiş tohumluk patatesler veya sertifikalı tohumluk patatesler, ya tohumluk ya da tüketim amaçlı olarak dikilebilir,
  - belirlenen bulaşmayı takip eden üçüncü üretim yılında,
    - sadece sertifikalı tohumluk patatesler kullanılarak ya tohumluk ya da yemeklik olarak patates yetiştirilebilir,
  - 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 I* de yer alan metotlara göre test edilmelidir.
- (c) bu [ 3/pçvo grk kp 10 (1) maddesinin (a) bendine göre bulaşıklık tespit edildiğinde acil olarak ve bunu takip eden ilk yetiştirme sezonunda:
- patates üretiminde kullanılan tüm makine, alet ve depolama alanları temizliğe tabi tutulur ve mümkün olduğu taktirde *EK IV* (3) maddesine göre uygun bir dezenfektan ile muamele edilir,
- (d) üretim ortamının tamamen değiştirilmesinin mümkün olduğu örtü altı üretim yerlerinde,
- 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, gerçek tohumları dahil patates bitkileri ve yumruları yetiştirilemez,
- ve
- patates üretimi için, sertifikalı tohumluk veya test edilmiş mini yumru veya mikro bitkiler kullanılmalıdır;

4.2. sınırları çizilen bölge içinde, *EK IV* 4.1'de detaylandırılan önlemlere bakılmaksızın, Üye Devletler:

- (a) bulaşıklık tespit edildiğinde acil olarak, patates üretiminde kullanılan tüm makine, alet ve depolama alanlarını temizliğe tabi tutar ve mümkün olduğu taktirde *EK IV* (3)' e göre uygun bir dezenfektan ile muamele eder,
- (b) bulaşıklık tespit edildiğinde acil olarak ve bunu izleyen en az 3 yıl boyunca:

- patates yumrularının 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 [ 34960 grk k 10 (1) maddesinin (b) bendine 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,
  - bu [ 34960 grk k 5 (1) maddesinde belirtilen sürveyleri yürütür;
- (c) uygun bir zaman dilimi içinde tüm tohumluk patates stoklarını yenilemek için bir program başlatır.

*EK V*

*EK IV*'ün birinci paragrafında yer alan resmi olarak onaylanmış atık imha metotları aşağıda yer alan koşulları karşılamalıdır:

- (i) patates atıkları (bulaşık bulunan patatesler ve kabukları) ve patatesle birlikte bulunabilen diğer katı atıklar (toprak, taş ve buna benzer diğer atıklar) aşağıda yer alan metotlardan birine tabi tutularak imha edilmelidir:
- çevreye yayılma riski bulunmayan bir yere gömülerek imha edilebilir (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,
  - yakarak imha edilebilir,
  - organizmanın yayılmasına neden olmayacak diğer tedbirlerden biri uygulanabilir. Ancak bu metot uygulanmadan önce, metodun uygulanabilirliği ve etkinliği ile ilgili Bakanlık'tan izin alınmalıdır.
- (ii) sıvı atıklar imha edilmeden önce, içlerinde bulunabilecek katı atık parçalarından temizlenmelidir (filtre edilerek ya da çöktürme işlemiyle). Bu katı atıklar da alt paragraf (i)'de yer alan 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'lik bir sıcaklık olacak şekilde ısıtılarak, zararlı organizmadan arındırılması,
- organizmanın yayılmasına neden olmayacak diğer tedbirlerden biri uygulanabilir. Ancak bu metot uygulanmadan önce, metodun uygulanabilirliği ve etkinliği ile ilgili Bakanlık'tan izin alınmalıdır.

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