

Tebliğ

Tarım ve Köyisleri Bakanlığından:

Patates Halka Çürüklüğü (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) Hastalığı ile Mücadele Hakkında Tebliğ (Tebliğ No:2002/ 59)

Amaç

Madde 1- Bu Tebliğ, patates halka çürüklüğü hastalığını oluşturan *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* un yerinin ve yayılışının tespit edilmesi, meydana çıkışı ve yayılmasının engellenmesi, eğer tespit edilmişse mücadelesinin yapılması ve eradike edilmesi amacıyla hazırlanmıştır.

Kapsam

Madde 2- Bu Tebliğ patates halka çürüklüğü hastalığının tespitini, yayılmasının engellenmesini mücadelesini ve eradike edilmesi hususlarını kapsar.

Hukuki dayanak

Madde 3- Bu Tebliğ, 15/5/1957 tarihli ve 6968 sayılı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Kanunu ve 6/8/1964 tarihli Zirai Karantina Tüzüğü'ne istinaden Avrupa Birliği mevzuatına uyum çerçevesinde hazırlanmıştır.

Sürvey

Madde 4- Zararlı organizmanın var olmadığını teyit etmek için yumrulara ve uygun olduğu yerde patates bitkileri üzerinde (*Solanum tuberosum* L.) sistematik sürveyler yapılır. Laboratuvar analizleri patojenin varlığına ve tanısına yönelik olarak (Ek 1)'de verilen metodlar kullanılarak yapılır. Konu uzmanlarınca yumrular kesilerek gözle kontrol edilebilir.

Sürveyleri yapacak resmi kuruluşlar

Madde 5- Sürveylerde alınacak örnek sayısı, örnekleme yeri ve örnekleme zamanı Bakanlık Zirai Mücadele Araştırma Enstitüleri tarafından belirlenir. Sürveyler bilimsel ve istatistiksel ilkelere göre yürütülür. Laboratuvar testlerine alınacak patates yumru örnekleri İl Tarım Müdürlüğü Bitki Koruma Şubesi elemanları tarafından toplanır.

Sürvey sonuçları

Madde 6- Sürvey sonuçlarının Bakanlığa bildirimi

- Sürvey sonuçları her yıl 20 Mayıs tarihinde Bakanlığa bildirilir.
- Patates bitkilerinde ve yumrularında veya hasat edilmiş, depolanmış ve pazarlanmış yumrulara hastalığın belirlenmesi veya şüpheli durum söz konusu olması durumunda, ayrıntılı bilgileri içerecek şekilde 20 Mayıs tarihi beklenmeksizin Bakanlığa bildirilir.

Tespit

Madde 7- Şüpheli durumların doğrulanması sürecinde;(Ek II)' de 1inci maddede yer alan koşullar kapsamında (Ek- I)' de verilen yöntemlere göre laboratuvar testleri yapılarak, mevcut durum doğrulanır veya yalanlanır. Sonuçlar rapor edilir. Şüpheli durumun doğrulanması durumunda;(Ek II)' nin 2 nci maddesindeki koşullar uygulanır.

Nakil yasağı ve alınacak önlemler

Madde 8- Şüpheli durumun doğrulanması halinde, şüpheli durumun görüldüğü yerde; (Ek-II) nin 1inci ve 2 nci maddesindeki koşullar uygulanır. Bulaşık örneğin üretildiği yere ait tüm bitki ve yumruların nakli yasaklanır. Bulaşmanın kaynağı araştırılır ve yayılmayı önlemek için ilave önlemler alınır.

Bulaşmanın kaynağı ve sınırları

Madde 9- Bu Tebliğe uygun olarak alınan bir örnekte organizmanın varlığı (Ek-I)'de verilen yöntemler uygulanarak saptandığında; (Ek-III)'teki koşullar çerçevesinde bulaşmanın esas kaynağını ve derecesini belirlemek için aşağıdaki çalışmalar ve tespitler yapılır.

a) Örneğin alındığı yerde bulaşık olarak kabul edilen bitkisel materyal, parti ve/veya parsel, makineler, taşıt, depo, bitkisel materyalle temas eden paketleme malzemesi, örneğin hasat edildiği tarla ve diğer üretim yerleri de bulaşık olarak kabul edilir.

b) Hasat öncesi veya sonrası temas, üretim, sulama, ilaçlama sırasında olası bir bulaşma veya aynı klonal orijinli olası bulaşmaların derecesi saptanır.

c) (Ek-III)'2 nci maddede yer alan koşullar hesaba katılarak, 9 uncu maddenin (a) bendine göre belirlenen bulaşıklık, (b) bendine göre tespit edilen olası bulaşmanın büyüklüğü ve organizmanın olası yayılışı esas alınıp bir bölge belirlenir.

d) Bu maddenin (b) bendine göre bulaşık olarak belirlenen yumru veya bitkilerle klonal ilişkisi olan patates stokları da bu Tebliğin 7 nci maddesinde belirtilen testlere tabi tutulur. Primer enfeksiyon kaynağını ve muhtemel bulaşmanın genişliğini ve risk derecesini belirlemek amacıyla mümkün olduğunca çok yumruda bu testler yapılır.

Eradikasyon

Madde 10- Bu Tebliğin 9 uncu maddesinin (a) bendine göre bulaşık olarak saptanan bitkisel materyal, İl Tarım Müdürlüğü Bitki Koruma Şubesi elemanlarınca (Ek-IV)' ün 1 inci maddesinde yer alan yöntemlerden birine tâbi tutulur.

Teknik temizleme

Madde 11- Organizma ile bulaşık olduğu belirlenen veya risk altında bulunan yerlerdeki makine, taşıt, tekne, depo ve paketlenme materyali dahil diğer materyal uygun bir yöntemle dezenfekte edilir veya imha edilir.

Bulaşık üretim alanlarında yapılacak işlemler ve bildirim

Madde 12- Bu Tebliğin 9 uncu maddenin (c) bendine göre tarif edilen sınırlar belirlendikten sonra bu alanlarda (Ek-VI) da belirtilen önlemler alınır. Organizmayla mücadele etmek amacıyla yapılan işlemler Bakanlığa bildirilir.

Tohumluk patatesler

Madde 13- Tohumluk patatesler (Ek-I) takip edilerek bu zararlı organizmadan âri bulunmuş olmalı, sertifikasyon sonucu elde edilmiş hatlardan direkt üretilmiş olmalıdır.

Çoğaltım materyali

Madde 14- Tohumluk patates üretim alanlarında bu zararlı organizmanın varlığına dair bulguların olması durumunda, anaç tohumluk patates klonları dahil başlangıç çoğaltım materyali sistematik şekilde test edilmelidir.

Bulundurma ve nakil yasağı

Madde 15- *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* kültürlerinin bir yerden bir yere nakli, bulundurulması ve dağıtımı yasaktır.

Çeşit seleksiyonu, deneme veya bilimsel amaçlı getirilen materyal

Madde 16- Çeşit seleksiyonu çalışmalarında ve deneme veya bilimsel amaçlı getirilen materyal için bu Tebliğin hükümleri Bakanlık tarafından değiştirilebilir.

Ek tedbirler

Madde 17- Patates üretim bölgelerinde organizmanın yayılmasını önlemek için gerektiğinde Bakanlık tarafından daha sıkı önlemler alınır.

Yürürlük

Madde 18- Bu Tebliğ yayım tarihinde yürürlüğe girer.

Yürütme

Madde 19- Bu Tebliğ hükümlerini Tarım ve Köyişleri Bakanı yürütür.

Ek- 1

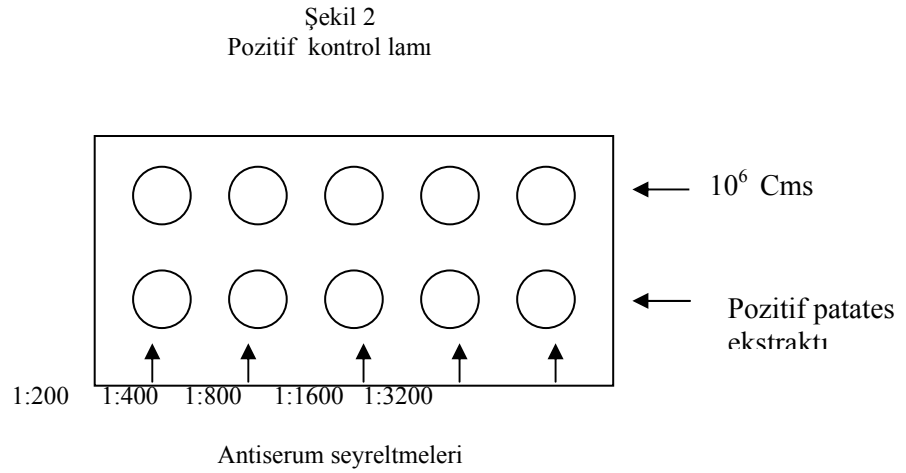
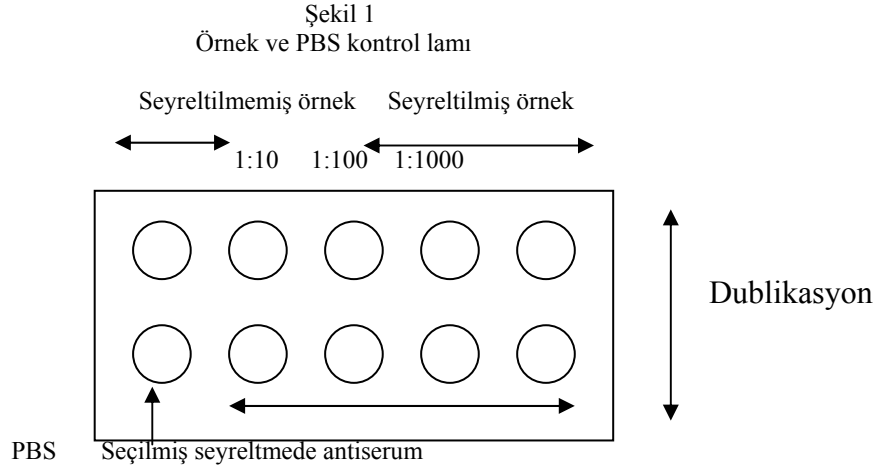
Patates Yumrularında Halka Çürüklük Etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*'un Belirlenmesi ve Teşhisi İçin Metot

1. Yumru göbek bağının (heel-end) çıkarılması
 - 1.1. 200 yumru çeşme suyunda yıkanır, heel-end çevresindeki epidermis %70'lik alkole batırılmış ve alevden geçirilerek dezenfekte edilmiş bıçak veya patates soyucu yardımıyla uzaklaştırılır.
 - 1.2. dezenfekte edilmiş bıçak veya patates soyucu yardımıyla iletim demeti içermeyen dokular minimum olacak şekilde yumrunun göbek bağı konik şekilde dikkatlice çıkarılır. Konik yumru parçaları 24 saat içinde işleme alınır veya en fazla 2 hafta süreyle -20 °C'de saklanabilir.
2. Halka çürüklüğü belirtilerinin görsel kontrolü:

Yumrunun göbek bağı çıkarıldıktan sonra yumru enine kesilir ve halka çürüklüğü belirtisi aranır. Yumru parmaklar arasında sıkılır ve iletim demetlerinden sıvılaşmış dokunun çıkışına bakılır. Erken belirtiler; özellikle göbek bağına yakın iletim demetleri çevresinde yumuşama olmaksızın dokunun hafif saydamlaşmasıdır. Göbek bağında iletim halkası normal renginden hafifçe koyulaşmış olabilir. İlk teşhis edilebilir belirti iletim demetleri etrafında halka şeklinde sarımsı bir renklenme ve yumrular hafifçe sıkıldığında iletim demetlerinden peynirimsi bir maddenin çıkmasıdır. Bu sızıntılar milyonlarca bakteri içerir. İletim dokularında kahverengileşme bu safhada gözlenir. Başlangıçta, bu belirtiler halkanın bir kısmı ile sınırlı olabilir, ancak zamanla tüm halkaya genişleyebilir. Enfeksiyonun ilerlemesiyle vasküler doku hasarı meydana gelir, dış korteks iç korteksten ayrılabilir. Enfeksiyonun ileri evrelerinde yumru yüzeyinde kenar kısımları kızıl-kahve renginde çatlaklar belirir. Fungal ve bakteriyel sekonder türlerin saldırısıyla belirtiler maskelenebilir ve ilerlemiş halka çürüklüğü belirtilerini diğer yumru çürüklüklerinden ayırmak imkansız olmasa bile çok güç olabilir
3. Gram boyama, immunofluoresens boyama (IF) ve patlıcan testi için örneklerin hazırlanması
 - 3.1. Heel ends (göbek bağları) patojene toksik olmadığı bilinen bir tampon çözeltide (örneğin, 0.05 M phosphate buffer saline) 30 °C'nin altında bir sıcaklıkta tam olarak masere edilir, çökmeyi önleyici eklenebilir ve toksik olmayan bir köpük giderici gerekebilir. Aşırı yumuşatmadan (maserasyondan) kaçınılmalıdır.
 - 3.2. Homojenattan bakterilerin ekstraksiyonu aşağıdaki yöntemlerden biri ile yapılır (1).
 - A. (a) 180 g dan fazla olmamak koşuluyla 10 dakika santrifüjlenir.
(b) üst sıvı en az 4 000 g'da 10 dakika santrifüjlenir ve üst sıvı atılır.
(1) Dinesen 1984 tarafından verilen ekstraksiyon metodu alternatif bir metottur.
 - B. (a) Doku artıklarının çökmesi için macerate 30 dakika süreyle kendi haline bırakılır. Çökelti bozulmaksızın üst sıvı alınır
(b) Üst sıvı özel kireç cam filtre (No 2=40-100 µm) üzerine yerleştirilmiş filtre kağıdından (Whatman No 1) vakum pompası yardımıyla filtre edilir. Filtratlar santrifüj tüplerinde toplanır. Maksimum filtrat hacmi 35 ml olacak şekilde filtre kağıdı steril PBS ile yıkanır.
(c) Filtrat 20 dakika süreyle 4 000 g'dan az olmamak koşuluyla santrifüjlenir.
 - 3.3. Çökelti toplam hacim 1 ml olacak şekilde steril 0.01 M phosphate buffer pH 7.2 (EK 1 Bölüm 2) ile süspanse edilir. İki eşit parçaya ayrılır. Bir parça referans amacıyla -20 °C'de ⁽²⁾ dondurulur veya liofllize edilir. Diğer kısım tekrar ikiye ayrılır bir yarısı Gram boyama ve IF testi için, diğer kısım ise patlıcan testi için kullanılır.
(2) Donma *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*' un canlılığını azaltabilir (Janse ve Van Vaerenberg, 1987). % 10 luk gliserol içinde peletin süspansiyonu bu problemi ortadan kaldırabilir.
 - 3.4. Bulaşmadan kaçınmak için bütün pozitif Cms kontrolleri ve örneklerin ayrı ayrı uygulanması zorunluluktur. Bu IF lamalarına ve patlıcan testine uygulanır.
4. Gram boyama
 - 4.1. Bütün pellet (çökelti) seyreltmelere saydamlaşma, çürüme veya diğer belirti şüpheli yumru parçalarına Gram boyama uygulanır. Örnekler, hastalıklı dokuların sınırından alınmalıdır.
 - 4.2. Gram boyama bilinen Cms kültürlerinden ve mümkünse doğal infekteli dokulardan hazırlanır.
 - 4.3. Tipik gram pozitif coryneform hücreleri içeren örnekler saptanır. Genelde, Cms hücreleri 0.8-1.2 µm uzunluğunda ve 0.60 µm genişliğindedir.
Uygun gram boyama prosedürü (Ek- I) Bölüm 3'te verilmiştir.
Taze kültürlerden veya doğal enfeksiyonlardan hazırlanmış örneklerde yaşlı agar kültürlerindeki hücrelerden genellikle daha küçük coccoid çubuklar daha ağırlıktadır. Çoğu kültür ortamlarındaki Cms hücreleri pleomorfik coryneform çubuk şeklindedir ve değişken Gram reaksiyonu verebilirler. Hücreler tek tek, karakteristik dirsek biçimli çiftler ve genellikle düzensiz gruplar halinde olabilir.
5. IF testi
 - 5.1. Cms'nin bilinen strainlerine (ATCC 33113, NCPPB 2137, NCPPB 2140) karşı hazırlanmış antiserum kullanılır. Antiserumun IF titresi 1:600'den büyük olmalıdır. FITC (fluorescein isothiocyanate anti-rabbit immunoglobulin conjugate)'nin bakteriyel hücrelerle spesifik olmayan kombinasyonlarını belirlemek için test lamalarına bir PBS kontrol ekleyin. Cms (ATCC 33113, NCPPB 2137, NCPPB 2140) ayrı bir lamda homolog antijen kontrolü olarak yer almalıdır. Doğal infekteli doku aynı lamda benzer kontrol olarak mümkünse kullanılmalıdır (Şekil 2).

5.2. Prosedür

- 5.2.1. Son çözeltinin (pellet) steril su ile 3 seri seyreltmesini (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} hazırlayın (Şekil 1)
- 5.2.2. Her bir pellet süspansiyonundan veya Cms süspansiyonundan (10^6 hücre/ml) 25 µl pipet yardımıyla çok odacıklı lammın her bir odacığına konur (Şekil 1).



- 5.2.3. Lamlar kurumaya bırakılır ve alevden geçirilerek fiks edilir.
- 5.2.4. Kullanılan Cms antiserumunun önerilen seyreltmeleriyle odacıklara 25 µl eklenir. Antiserumun çalışıldığı seyreltme antiserum titresinin yaklaşık yarısı olmalıdır. Antiserumun diğer seyreltmeleri çalışmaya alınacaksa ayrı bir lam kullanılmalıdır.
- 5.2.5. Lamlar oda sıcaklığında nemli hücrede 30 dakika süreyle inkubasyona bırakılır.
- 5.2.6. Lamlar 0.01 M PBS pH 7.2 ile dikkatlice çalkalanır. Yıkama işlemi 5 dakika süreyle 3 kez tekrarlanır.
- 5.2.7. Fazla nem dikkatlice uzaklaştırılır.
- 5.2.8. her bir odacığa FITC konjugate aynı seyreltme oranında eklenir ve oda sıcaklığında karanlıkta nemli hücrede 30 dakika süreyle inkube edilir.
- 5.2.9. Daha önce belirtildiği şekilde yıkama yapılır.
- 5.2.10. Lamların her bir odacığına yaklaşık 5-10 µl 0.1 M phosphate buffer gliserin pH 7.6 eklenir ve lamel kapatılır.
- 5.2.11. Epifluorescens ışık kaynağına FITC çalışmaya uygun filtreye sahip mikroskopta lamlar incelenir. 400-1000 büyütme uygundur. Pozitif kontrollerdeki fluorescent hücreler gözlenir ve antiserumun titresini belirler. FITC/PBS odacığında fluorescent hücreler aranır, eğer yok ise; diğer odacıklara geçilir. Minimum 10 mikroskop alanında inceleme yapılır ve bir mikroskop alanındaki morfolojik olarak tipik fluorescent hücreler sayılarak hesaplama yoluyla seyreltilmemiş peletin 1 ml.sinde bulunan hücre sayısı belirlenir.

IF testinde bazı problemlerle karşılaşılabilir.

-Patates peletlerinde boyut ve morfolojik olarak Cms hücrelerine benzeyen atipik saprofit fluorescent bakteriler olabilir. Yalnızca boyut ve morfoloji olarak tipik olan fluorescent hücreleri dikkate alınız. Çapraz reaksiyonlar nedeniyle IF pozitif örnekler farklı bir antiserumla yeniden testlenmelidir.

-Metodun saptama sınırı seyreltilmemiş peletin ml.sinde 10^3 - 10^4 hücredir. IF tipik hücrelerin sayısı bu sınırdan ise örnekler Cms yönünden genellikle negatiftir. Ancak patlıcan testiyle doğrulanabilir. Morfolojik olarak tipik fluorescent hücreler saptanmamışsa IF testi negatif olarak kabul edilir. Örnekler Cms ile “bulaşık değil” olarak kabul edilir. Patlıcan testine gerek yoktur.

Herhangi bir morfolojik olarak tipik fluorescent hücreler bulunursa IF testi pozitif olarak kabul edilir. Her 2 antiserumla pozitif IF sonucu veren örnekler Cms ile “potansiyel bulaşık” olarak kabul edilir. Potansiyel bulaşık tüm örneklerle patlıcan testi gerekir.

6. Patlıcan testi

6.1. Patlıcan testi için ayrılmış pelet 3 yapraklı dönemdeki en az 25 patlıcan bitkisine aşağıda verilen yöntemlerden biri ile inokule edilir.

6.2. Yara inokulasyonu I

6.2.1. Her bir saksıyı yatay olarak destekleyin (5 cm derinlik x 10 cm genişlik x 15 cm uzunluğunda polystyrene bir blok, bir yüzeyi 10 cm² lik saksı girecek şekilde çıkarılmış (Şekil 3)). Steril alüminyum folyo şeridi test edilecek her bir örnek için blokla sap arasına yerleştirilir. Bitki lastik bir bant ile bloğa sabitlenir.

6.2.2. Bir bisturi kullanılarak, kotiledon yapraklarla ilk yaprak arasındaki bölgeye sap çapının üçte biri derinliğinde ve 0,5 ila 1,0 cm uzunluğunda hafifçe çapraz uzunlamasına bir bölüm açılır.

6.2.3. Yara bisturinin ucu ile açık tutularak, ince uçlu bir fırça yardımıyla pelet bu noktaya sürülür. Patlıcanlar arasında peletin geri kalanı paylaşılır.

6.2.4. 2 ml’ lik şırınga kullanılarak steril vazelinle kesik yer kapatılır.

6.3. Yara inokulasyonu II

6.3.1. Bitki iki parmak arasında tutulur, 1 damla (yaklaşık 5-10 ul) pelet süspansiyonu kotiledon ile gerçek yaprak arasında gövdeye pipetle verilir.

6.3.2. Steril bisturi yardımıyla pelet damlasının yanından 1.0 cm uzunluğunda ve gövde çapının 2/3 derinliğinde yara açılır.

6.3.3. Yara yeri steril vazelin ile kapatılır.

6.4. İğne inokulasyonu

6.4.1. Turgor basıncını azaltmak için inokulasyondan 1 gün önce bitkileri susuz bırakınız.

6.4.2. Ucuna hipodermik iğne takılı enjektörle patlıca gövdeleri kotiledonların hemen üzerinden inokule edilir. Kalan pelet patlıcan bitkileri arasında dağıtılır.

6.5. Aynı inokulasyon yöntemleriyle 25 patlıcan bitkisi bilinen Cms kültürü ve mümkünse doğal infekteli yumruların dokularıyla inokule edilir.

6.6. 25 bitki aynı inokulasyon yöntemiyle steril 0.05 M PBS ile inokule edilir.

6.7. Bitkiler gündüz 21-24° C gece 15 °C’de 14 saat gün uzunluğunda 40 gün süreyle inkube edilir. İlk 8 günden sonra belirti çıkışı yönünden düzenli gözlem yapılır. Belirti gösteren bitkiler sayılır. Cms, patlıcan bitkilerinin yaprak kenarlarında gevşeme şeklinde kendini gösteren solgunluğa neden olur. Solan dokular önce koyu yeşil veya benekli görülebilir, ancak nekrotikleşmeden önce soluklaşır. Damar arası solgunluklar suda haşlanmış görünümündedir. Nekrotik doku parlak sarı kenara sahiptir. Bitkilerin ölmesi şart değildir. Bitkiler zamanla infeksiyonu yenebilir. Duyarlı genç patlıcan bitkileri patojenin düşük popülasyonlarına yaşlı bitkilerden daha duyarlıdır. Bu nedenle; inokulasyonlarda 3 yapraklı dönemden hemen önceki bitkiler kullanılmalıdır. Yumru dokularının peletlerinde bulunan diğer bakteri ve fungus popülasyonları solgunluk belirtisini teşvik edebilir. Bu organizmalar; *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata* ve hatta yüksek saprofit bakteri popülasyonlarıdır. Bu tip solgunluklar tüm yaprakların veya tüm bitkilerin hızla solmasıyla Cms’nin neden olduğu solgunluklardan kolaylıkla ayrılabilirler.

6.8. Belirti gösteren tüm patlıcan bitkilerinin solmuş yaprak ve gövde dokularında Gram boyama ve uygun bir besi yerine izolasyon yapılır. Patlıcan yaprak ve gövdeleri %70’lik alkole daldırılarak yüzey dezenfeksiyonu yapılır.

6.9. İnokule edilmiş patlıcan bitkileri optimal koşullarda bırakılmazsa, 40 gün süreyle inkubasyondan sonra bile Cms patlıcanlarda latent infeksiyona neden olabilir. Bu tip infeksiyonlar, inokule edilmiş bitkilerde kuvvetin yitilmesi ve bodurluk şeklinde kendini gösterebilir. IF testi pozitif olarak kabul edilmişse, sonraki testlerin gerekliliği düşünülmelidir. Tüm teste alınan patlıcanların steril 0.05 M PBS kontrol bitkileri ile gelişme oranlarının karşılaştırılması zorunluluktur. Bu aynı zamanda seranın iklim koşullarını da kontrolüne olanak sağlar.

Önerilen diğer testler aşağıda verildiği şekildedir;

6.9.1. inokulasyon noktasının üzerinde gövdeyi kesin ve yaprakları koparın

6.9.2. gövdeleri 0.05 M PBS pH 7.0 içinde masere edin

6.9.3. peletin yarısını Gram boyama (4) ve IF testi (5) için kullanın

6.9.4. IF ve/veya Gram boyama pozitif ise; süspansiyonun kalan kısmını tekrar patlıcan testine alın. Bilinen Cms kültürünü ve 0.05 M PBS kontrollerini denemeye alın. Son testte belirti oluşmazsa; örnek negatif(temiz) olarak kabul edilmelidir.

7. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*’un izolasyonu

Ancak Cms izole edilir ve tanılanırsa teşhis doğrulanabilir. Cms müşkülpesent bir organizma olmasına rağmen belirti gösteren dokulardan patojen izole edilebilir. Bununla birlikte, çok hızlı gelişen saprofit bakteriler Cms’nin gelişmesini maskeleyebilir, bu yüzden yumru doku peletlerinden direkt izolasyon önerilmez. Patlıcanlar, Cms izolasyonunda mükemmel bir seçicilik sağlar ve konukçu testi doğrulamak için mükemmel bir araçtır. Belirti

gösteren tüm patates yumrularından ve patlıcanlardan izolasyon yapılmalıdır. Patlıcan gövdelerinin maserasyonu gerekli olduğu durumlarda; 6.8.'de verilen yöntem uygulanır.

- 7.1. EK I Bölüm 6'da formülleri verilen aşağıdaki ortamlardan birine süspansiyon öze ile çizilir ve 21 °C'de 20 güne kadar inkube edilir.

Nutrient dextrose agar (yalnızca saflaştırmak için),

Yeast pepton glikoz agar,

Nutrient yeast dextrose agar,

Yeast mineral salts agar.

Cms yavaş gelişir ve genellikle 10 gün içinde toplu iğne başı görünümünde, krem bombeli koloniler meydana getirir.

Saf izolat elde etmek için yeniden besi yerine çizgi ekim yapılır. Saf kültürlerin gelişme hızı daha yüksektir.

Tipik koloniler; krem-beyaz veya fildişi renginde, yuvarlak, düz, yüksekçe, konveks-kubbeli, mukoid, düzgün kenarlı ve genellikle 1-3 mm çapındadır.

Tanımlama:

Sağlıklı veya hastalıklı patates ve patlıcanlarda izole edilebilen çoğu Gram pozitif coryneform bakterilerin koloni özellikleri Cms'nin kolonilerine benzerdir. Bu nedenle Cms aşağıda verilen testlerle tanılanmalıdır.

IF test (5.1),

Patlıcan testi,

Beslenme ve fizyolojik testler (EK I Bölüm 7)

Oksidasyon/fermentasyon testi (O/F),

Oksidaz testi,

37 °C'de gelişme,

urease üretimi,

eskulin hidrolizi,

nisasta hidrolizi,

% 7 NaCl solusyonuna tolerans,

indol testi,

katalaz testi,

H₂S üretimi,

Sitrat kullanımı,

Jelatin hidrolizi,

Glycerol, laktoz, ramnoz ve salisinden acid üretimi,

Gram boyama

Bütün testlere bilinen bir Cms kültürü pozitif kontrol olarak eklenir. Besin ve fizyolojik testlerde nutrient agar kültürleri inokulum olarak kullanılır. Morfolojik karşılaştırmalar nutrient dekstroz agar kültürlerinde yapılır.

IF testi için hücre popülasyonu 10⁶ hücre/ml'ye ayarlanır.

IF titresi bilinen Cms kültürüne benzer olmalıdır.

Patlıcan testinde kullanılacak hücre popülasyonu 10⁷ hücre/ml olmalıdır. Patlıcan testinde her bir organizma için, pozitif kontrol (Cms) ve steril su kontrolü olarak 10'ar adet bitki kullanılır. Saf kültürlerle 20 gün içinde tipik solgunluk belirtileri elde edilir, ancak bu sürede belirti göstermeyen bitkiler toplam olarak 30 gün süreyle patlıcanın gelişmesine olanak sağlayan ancak 30 °C'yi aşmayan sıcaklıkta inkube edilir. 30 günün sonunda hala belirti ortaya çıkmamışsa, kültürün Cms'nin patojenik formu olduğu doğrulanamaz.

C.sepedonicus'un test sonuçları

O/F – veya zayıf oksidatif

Oksidaz -

Katalaz +

Nitrat redüksiyonu -

Urease aktivitesi -

H₂S üretimi -

İndol üretimi -

Sitrat kullanımı -

37 °C'de gelişme -

eskulin hidrolizi +

nisasta hidrolizi - veya zayıf

% 7 NaCl solusyonuna tolerans -

Jelatin hidrolizi -

Asit üretimi:

Glycerol -

Laktoz - veya zayıf

Rhamnose -

Salicin -

BÖLÜM 1- Maserasyon Sıvılarının Formülleri (Lelliott and Sellar, 1976)

DC silicone antifoam MSA 10 ml
Lubrol W flakes 0.5 g
Tetra –sodium pyrophosphate 1 g
0.05 M phosphate buffer saline pH 7.0 (EK 2) 1 litre

BÖLÜM 2-Tampon Çözeltiler

0.05 M phosphate buffer saline pH 7.0

Bu tampon çözelti yumru dokularının maserasyonu için kullanılabilir.

Na₂HPO₄ 4.26 g
KH₂PO₄ 2.72 g
NaCl 8.0 g
Saf su 1 litre

0.01 M phosphate buffer saline pH 7.2

Bu çözelti antiserumların seyreltilmesi ve IF lamalarının yıkanması için kullanılır.

Na₂HPO₄ .12 H₂O 2.7 g
NaH₂PO₄ 2 H₂O 0.4 g
NaCl 8.0 g
Saf su 1 litre

0.1 M phosphate buffer gliserin pH 7.6

Bu tampon, IF testinde fluoresensliği artırmada destek olarak kullanılır.

Na₂HPO₄+ 12 H₂O 3.2 g
NaH₂PO₄ 2 H₂O 0.15 g
Glyserol 50 ml
Saf su 100 ml

BÖLÜM 3-Gram Boyama (Hucker's modifikasyonu)

Cristal violet solusyonu:

2 g cristal violet 20 ml. Ethanolde(%95 lik) çözülür
0.8 g amonyum oxalat 80 ml saf su içinde çözülür
Her iki solusyon karıştırılır.

Lugol solusyonu

İyot 1 g
Potasyum iyodür 2 g
Saf su 300 ml
Maddeler havan içinde birlikte ezilir, erlene konarak eritilir.

Safranin solusyonu

Stok solusyon:
Safranin O 2.5 g
%95 ethanol 100 ml
karıştır ve sakla. 1:10 oranında çalışma seyreltmesi hazırlanır.

Boyama işlemi

1. Lam üzerine bakteriyi konulur, havada kurutulur ve ısı ile fikse edilir
 2. Kristal violet solusyonu lam üzerine dökülür ve 1 dakika beklenir
 3. Çeşme suyu altında yıkanır
 4. Lugol solusyonu lam üzerine dökülür ve 1 dakika beklenir
 5. Çeşme suyunda yıkanır ve nemi kurulanır
 6. Boyanın rengi gidinceye kadar damla damla %95 lik ethanol eklenir
 7. Çeşme suyunda yıkanır ve kurulanır
 8. Safranin solusyonu lam üzerine dökülür ve 10 saniye beklenir
 9. Çeşme suyunda yıkanır ve kurulanır
- Gram pozitif bakteriler menekşe-mavi, Gram negatifler ise, pembe-kırmızı boyanır.

BÖLÜM 4- IF-Pozitif hücrelerin Populasyon Miktarının Belirlenmesi

S= çok odacıklı lamın 1 odacığının yüzey alanı

p (1)

D= odacığın çapı

s= objektif alanının alanı
p (2)
d= objektif alanının çapı
(d) ya direkt ölçümle, ya da aşağıdaki formülle hesaplanır.
p (3)
i= alan katsayısı (oküler tipine bağlıdır ve 8-24 arasında değişir)
K= tüp katsayısı (1 veya 1.25)
G= objektifin büyütmesi (40x, 100x)
D x i x K x G x c (bir mikroskop alanındaki tipik fluorescent hücrelerin sayısı)
Formülüyle her bir odacıktaki tipik fluorescent hücrelerin sayısı hesaplanır (C)
N= peletin 1 ml.sindeki tipik hücrelerin sayısı bulunur
y= bir odacığa konan pelet hacmi
F= pelet seyreltme faktörü

BÖLÜM 5-Patlıcan Yetiştirilmesi

Patlıcan (*Solanum melongena* var. Black Beauty) tohumları pastörize edilmiş tohum kompostuna ekilir. Ekimden 10-14 gün sonra kotiledon yapraklarını tamamen çıkarmış olan fideler pastörize kompost içeren saksılara şaşırtılır. 2-3 yapraklı dönemdeki (3 yapraklı dönemi geçmemelidir) patlıcan bitkileri kullanılır. Patlıcanlar aşağıda verilen iklim koşullarını içeren seralarda geliştirilir.

Gün uzunluğu: 14 saat veya doğal gün uzunluğu

Sıcaklık: gündüz: 21-24 °C, gece: 15 °C

Cms sıcaklık 30 °C'nin üzerinde ise gelişmez. Gece sıcaklığı 15 °C'nin altında ise kromofor zararı (gümüşümsü nekroz) meydana gelir. Uygun bir insektisit uygulamasıyla *Sciaridae* familyası larvalarının köklere zarar vermesi önlenebilir.

Black Beauty çeşidi patlıcan tohumları çeşitli tohum şirketlerinden sağlanabilir.

BÖLÜM 6 -C. SEPEDONICUS 'un İzolasyonu ve Geliştirilmesi İçin Besiyerleri

Difco bacto nutrient agar üretici firmanın önerisi oranında saf su içinde eritilir ve 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilir.

Nutrient dextrose agar (NDA)

Difco bacto nutrient agara % 1 oranında D(+) glucose eklenir ve 115° C'de 20 dakika süreyle otoklavda sterilize edilir.

Yeast pepton glucose agar (YPGA)

Difco bacto yeast extract 5 g

Difco bacto pepton 5 g

D(+)-glucose (monohydrate) 10 g

Difco bacto purified agar 15 g

Saf su 1 litre

Besi yeri 0.5 ml. Hacimler halinde 115 °C'de 20 dakika otoklavda sterilize edilir.

Yeast extract mineral salts medium (YGM)

Difco bacto yeast extract 2 g

D(+)-glucose (monohydrate) 2.5 g

KH₂PO₄ 0.25 g

K₂HPO₄ 0.25 g

MgSO₄ . 7 H₂O 0.1 g

MnSO₄ .H₂O 0.015 g

NaCl 0.05 g

FeSO₄ .7H₂O 0.005 g

Difco bacto purified agar 18 g

Saf su 1 litre

Besi yeri 0.5 ml. Hacimler halinde 115 °C'de 20 dakika otoklavda sterilize edilir.

BÖLÜM 7-C. SEPEDONICUS 'un Tanılanması İçin Beslenme ve Fizyolojik Testler

Bütün besi yerleri 21 °C'de inkube edilir ve 6 gün sonra incelenir. Gelişme olmazsa, 20 güne kadar inkubasyona devam edilir.

-oxidative ve fermentative test (Hugh&leifson, 1953)- O/F-test

Temel besi yeri:

KCl 0.2 g

MgSO₄ . 7 H₂O 0.2 g

NH₄H₂PO₄ 1.0 g
Difco bacto pepton 1.0 g
Difco bacto purified agar 3.0 g
D(+)-glucose (monohydrate) 10.0 g
Bromothymol blue 0.03 g
Saf su 1 litre

Kimyasallar karıştırılır ve 1 N KOH ile pH 7.0-7.2'ye ayarlanır. Tüplere (12'şer ml' lik , 16 mm x 100 mm) 5 ve 10'ar ml. olarak paylaştırılır ve 115 °C'de 10 dakika otoklavda sterilize edilir. Tüplere aşılama yapılır ve 10 ml.lik olanlara 1-2 ml steril sıvı parafin aseptik olarak eklenir. İnkube edilir.

Pozitif reaksiyon :

Tüp	Renk	Açıklama
Açık	Sarı	
Kapalı	Sarı	Fermentatif
Açık	sarı	
Kapalı	Mavi-Yeşil	Oksidatif
Açık	Yeşilimsi	
Kapalı	Mavi-Yeşil	Oksidatif veya etkisiz

Oxidase testi (Kovacs, 1956)

Ayıraç:

Tetrametyl paraphenylenediamine dihydrochloride saf su içinde %1 oranında eritilir. Bu solusyon 1 ml hacimde taze olarak hazırlanmalı ve koyu renkli şişelerde 5° C'de 1-4 hafta depolanabilir.

Temiz Petri kabı içinde filtre kağıdına 1 damla damlatılır ve hemen taze nutrient agar kültüründe 1 öze bakteri alınarak sürülür. 10 saniye içinde mor renk oluşumu pozitif reaksiyondur. Eğer 10-30 saniye için renk oluşuyorsa bu kültürler zayıf pozitifdir. Yanlış pozitif sonuçlardan kaçınmak için mutlaka platin uçlu öze kullanılır.

Lactose, rhamnose, glycerol ve salicinde asit üretimi:

Hugh&leifson, 1953- O/F besi yeri glikoz eklenmeksizin hazırlanır ve tüplere 5'er ml olarak paylaştırılır ve 115° C'de 10 dakika otoklavda sterilize edilir. 45° C'de filtre ile sterilize edilmiş gliserin, laktose, rhamnose ve salicinin %5 lik sulu solusyonlarından 0.5 ml aseptik olarak temel besi yerine eklenir ve dikkatli şekilde karıştırılır.

Pozitif reaksiyon: Ortam renginin mavi-yeşilden sarıya dönüşü asit üretimini gösterir.

Katalaz testi:

Temiz bir lam üzerine 1 damla hidrojen peroksit (30 hacim) damlatılır ve 1 öze bakteri kültürü damla içinde dağıtılır. Damla içinde oksijen kabarcıklarının oluşumu katalazın varlığını gösterir.

Nitrat redüktaz aktivitesi ve denitrifikasyon (Bradbury, 1970):

Besi yeri:

KNO₃ (nitrit free) 1.0 g
Difco bacto yeast extract 1.0 g
K₂HPO₄ 5.0 g
Saf su 1 litre

Besi yeri 20 ml lik şişelere 10'ar ml olarak paylaştırılır ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir.

Ayıraç A:

H₂SO₄ 8.0 g
5 N acetic asit 1 litre

Ayıraç B:

Napthylamine 5.0 g
5 N acetic asit 1 litre

Duplike olarak nitrat ortamına inokulasyon yapılır. 10-20 gün sonra 1 damla lugol iodine solusyonu, 0.5 ml ayıraç A ve 0.5 ml ayıraç B eklenir. Ortam kırmızımsı renge dönmezse; yaklaşık 50 mg çinko tozu eklenir ve renk oluşumu gözlenir. 1. ve 2. evrede kırmızı renk oluşmazsa nitrat redüksiyonu yoktur.

Urease üretimi (Lelliott, 1966):

Temel besi yeri:

Oxoid urea agar base (CM53) 2.4 g
Saf su 95 ml

115 °C'de 20 dakika otoklavda sterilize edilir. 50° C ye soğutulan ortama filtre ile sterilize edilmiş %40 lık üre (Oxoid SR20) solusyonundan aseptik olarak 5 ml eklenir ve iyice karıştırılır. Steril tüplere (16 x 100 mm) 6 ml olarak dağıtılır. İnokulasyon yapılır.

Pozitif reaksiyon: urease aktivitesi gerçekleşirse sarı-turuncu renkli ortam kiraz kırmızısı renge dönüşür.

Citrate kullanımı (Skerman, 1967):

Citrate agar base (Merck 2503) 23 g

Saf su 1 litre

Isıtılarak eritilir ve karıştırılır. 6 ml olarak tüplere paylaştırılır ve 121° C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir ve eğik agar için yerleştirilir. Bakteri inokulasyonu yapılır.

Pozitif reaksiyon: Besi yeri renginin turuncudan kırmızıya değişmesi citrate kullanımını gösterir.

Hidrojen sülfid üretimi:

Besi yeri:

Difco bacto tryptone (No 0123) 10 g

K₂HPO₄ 1 g

NaCl 5 g

Saf su 1 litre

Kimyasallar eritilir, 6 ml olarak tüplere paylaştırılır ve 115 °C'de 10 dakika otoklavda sterilize edilir.

İnokulasyon yapılır ve kurşun asetat emdirilmiş kağıtlar (Merck 9511) aseptik olarak tüplerin ağız kısmından aşağı doğru sarkıtılır ve sabitlenir. 20 gün kadar inkube edilir.

Pozitif reaksiyon: Test kağıtlarının siyah-kahve renk alması tryptondan H₂S üretildiğini gösterir.

İndol üretimi (Ramamuthi, 1959):

Besi yeri H₂S testinde olduğu gibidir. Kurşun asetat kağıtları çıkarılır ve 1-2 ml diethyl ether eklenir ve dikkatlice çalkalanır. Ayırıcı tabaka oluşumu için 5 dakika beklenir ve 0.5 ml Kovacs' reagent (Merck 9293) dikkatli şekilde eklenir.

Pozitif reaksiyon: Ether ve sulu fraksiyonlar arasındaki sarı tabakada kırmızı bir şeridin oluşumu indolün varlığını gösterir.

37 °C de gelişme (Ramamurthi, 1959):

Besi yeri:

Difco bacto nutrient broth 8 g

Saf su 1 litre

Eritilir ve karıştırılır. 6 ml olarak tüplere paylaştırılır ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. İnokule edilir ve 37 °C de inkube edilir.

Pozitif reaksiyon: Gelişme durumu gözlenir.

%7 NaCl gelişme(Ramamuthi, 1959):

Besi yeri:

Difco bacto nutrient broth 8 g

NaCL 70 g

Saf su 1 litre

Eritilir ve karıştırılır. 6 ml olarak tüplere paylaştırılır ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. İnokule edilir.

Pozitif reaksiyon: Gelişme durumu gözlenir.

Jelatin hidrolizi (Lelliott et al., 1966):

Besi yeri :

Difco bacto nutrient broth 8 g

NaCL 70 g

Saf su 1 litre

Eritilir ve karıştırılır. 6 ml olarak tüplere paylaştırılır ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. İnokule edilir.

Pozitif reaksiyon: Tüpler 5 °C de 30 dakika tutulduğunda bile hala sıvı ise jelatinin sıvılaştırıldığını gösterir.

Nisastanın hidrolizi:

Besi yeri:

Difco bacto nutrient agar (erimiş) 1 litre

Difco bacto soluble starch (No 0178)2 g

Eritilir ve karıştırılır ve 115 °C'de 10 dakika otoklavda sterilize edilir. Petrilere dökülür ve katılaşmış besi yerine nokta inokulasyon yapılır. 10-20 günde iyi bir gelişme sağlandıktan sonra kültürün bir kısmı atılır ve petri yüzeyleri Lugol solusyonu ile kaplanır.

Pozitif reaksiyon: Bakteriyel gelişmenin çevresinde açık bir zon oluşurken, besi yerinin kalan kısımlarının mor renge boyanması nişastanın hidrolize olduğunu gösterir.

Eskulin hidrolase aktivitesi (Sneath & Collins, 1974):

Besi yeri:

Difco bacto pepton 10 g

Aesculin 1 g

Ferric citrate 0.05 g

Sodium citrate 1 g

Saf su 1 litre

Eritilir ve karıştırılır. 6 ml olarak tüplere paylaştırılır ve 115 °C'de 10 dakika otoklavda sterilize edilir. Besi yeri berrak, fakat mavimsi floresense sahiptir. İnokule edilir.

Pozitif reaksiyon: Floresensliğin kaybolması ile birlikte ortam renginin kahverengine dönüşmesi eskulinin hidrolize olduğunu gösterir. Bu ultraviole lamba altında kontrol edilebilir.

Ek- II

1. Immunofluorescence (IF) testinin pozitif olduğu her bir şüpheli durumlar için izlenecek yöntem (Ek I)'de verilmiştir. Doğrulama veya ret etmek için metodun sonuçlarının söyleyeceklerinin tamamlanması beklenir.

-her nerede mümkünse tüm yumrular ve bitkiler örnekleri ve

-kalan ekstraktlar ve ilave olarak hazırlanmış IF lamları uygulanan metot tamamlanmaya kadar uygun şekilde muhafaza edilir.

2. Organizmanın varlığının pozitif doğrulanması durumunda

-yumru veya bitki ekstraktı ile inokule edilmiş infekteli patlıcan bitki örneği, ve

-organizmanın izole edilmiş kültürü Madde 7 de verilen ihbar prosedüründen sonra en az 1 ay süreyle saklanır.

Ek- III

1. Muhtemel bulaşmaların mesafesinin belirlenmesinde incelemeye alınacak unsurlar;

- bulaşık olarak kabul edilmiş üretim alanlarında yetiştirilmiş yumru veya bitkiler,

- bulaşık olarak kabul edilmiş üretim alanlarında yetiştirilmiş yumru veya bitkilerle ilişkili bazı alanlar ve üretimde kullanılan ekipmanlar veya genel bir müteahhit kanalıyla muhtemel bulaşmalar,

-üretim alanları üzerindeki merkezi patates işleme depoları,

-12 ay önce bulaşık olarak kabul edilmiş olan yumru ve bitkilerle direkt ilişkili olan makine, kamyon, ambar, depo ve diğer paketleme materyalleri,

-bu tip objelerle dezenfeksiyon veya temizlik öncesi teması olan depolanmış yumru ve bitkiler ve

-bulaşık kabul edilmiş olan yumru veya bitkilerin aynı klonal orijinli olan bitki veya yumruları içerir.

2. Muhtemel yayılmaların saptanmasında incelemeye alınacak unsurlar;

-patates veya diğer konukçuların yetiştirildiği alanların patates veya diğer konukçuların yetiştirme alanlarına yakınlığı,

-tohumluk patates stoklarının dağıtıldığı alanlar

3- Madde 7 de işaret edilen ihbar yönteminin detayları;

-bulaşık kabul edilen herhangi bir patates veya partinin kimlik veya ruhsat numarası,

-tohumluk patates stoklarının çeşit adı,

-bulaşık kabul edilen unsurların ve bulaşma zonunun tarifi,

-infekteli patlıcandan hazırlanmış IF lamları, ekstraktlar ve patojenin pozitif doğrulama testinden organizmanın izole edilmiş kültürünü içerir.

EK -IV

1. Bulaşık olarak kabul edilmiş yumru veya bitkilere karşı resmi olarak alınacak önlemler aşağıdaki unsurları içerir;

-doğrudan veya hızlı bir şekilde uygun atık değerlendirme olanakları bulunan organizmanın yayılması için risk taşımayan depolama alanlarına ve nakil araçlarına ve dezenfeksiyon sistemine sahip işletmelere nakledilmesi şartıyla endüstriyel işletmelerde kullanılabilir.

2. Organizma ile bulaşık kabul edilmiş olan yumru veya bitkilerin sorumlu resmi organların kontrolü altında değerlendirilmesi aşamasında aşağıdaki önlemler alınır;

-tüketim amaçlı kullanımı, nakile uygun paketlenmiş şekilde, yeniden paketlemeden direkt nakli ve kullanımı, veya

-endüstriyel amaçlı kullanımı ve uygun atık değerlendirme ve dezenfeksiyon olanakları bulunan endüstriyel amaçlı işleme yerlerine doğrudan ve hızlı nakledilerek kullanılabilir

3. Sorumlu resmi kurumların denetimi altında organizmanın yayılma riskini ortadan kaldıracak şekilde dezenfeksiyon ve temizleme önlemleri alınır.

4. Bulaşık olduğu belirlenmiş sınırları belli alanlarda (zonlarda) resmi organlarca aşağıdaki önlemler serisi uygulanır;

4.1 Bulaşık kabul edilen üretim alanlarında;

a) Bulaşık kabul edilen bir tarlada, ya

-hastalığın saptandığı yılı izleyen en az 3 yetiştirme sezonu boyunca kendi gelen patates bitkileri ve doğal olarak bulunan diğer konukçu bitkileri elimine edecek önlemler alınır, ve

-ancak birbirini takip eden 2 yetiştirme sezonu boyunca kendi gelen patates bitkilerinden biri olduğu belirlendiği takdirde; patates yumrusu, bitkiler veya gerçek tohumları, organizmanın diğer doğal konukçuları veya organizmanın yaşama ve yayılmasına olanak sağlayan diğer ürünler bu tarlaya ekilebilir.

-Yukarıdaki periyodu takip eden ilk üretim sezonunda resmi olarak sertifika edilmiş yumrular tohumluk olarak ekilmelidir ve ürün satışına resmi sürveyler yapılarak temiz bulunduktan sonra izin verilir.

-Uygun bir rotasyon çemberini takip eden yılda sertifikalı tohumluk yumruların ekildiği tarlanın ürünü resmi olarak sertifikalandırıldıktan sonra tohumluk olarak ekilebilir veya yemelik olarak satılabilir, veya

-Bulaşık kabul edildiği yılı izleyen 4 yetiştirme sezonu boyunca;

-kendi gelen patates bitkileri ve organizmanın doğal olarak bulunan diğer konukçularını eline edecek önlemler alınır.

-Yukarıdaki periyodu takip eden ilk üretim sezonunda resmi olarak sertifika edilmiş yumrular tohumluk olarak ekilir ve ürün satışına resmi sürveyler yapılarak temiz bulunduktan sonra izin verilir.

b) Diğer tarlalarda;

Bulaşmayı izleyen üretim sezonunda:

-ya patates yumruları, bitkileri, gerçek tohumları veya patojenin doğal olarak bulunan diğer konukçuları dikilemez ve kendi gelen bitkileri elimine edecek önlemler alınır, veya

-yalnızca tüketim amaçlı üretim için, sorumlu resmi kurumların denetiminde kendi gelen bitkilerin ve patojenin doğal konukçularının elimine edildiği koşullarda, resmi sertifikalı yumrular ekilebilir.

-tohumluk veya tüketim amaçlı üretim için en az 2 yıl resmi sertifikalı yumrular ekimde kullanılabilir.

-her bir yetiştirme sezonu boyunca patojenin yaşama riskini oluşturan önlemler alınır ve resmi sürveyler yapılır.

-bulaşıklığı izleyen yetiştirme sezonunda, tüketim amaçlı üretim için sertifikalı yumruların ekildiği tarladaki bitkiler ve kendi gelen bitkiler uygun zamanda kontrol edilir.

c) Bulaşmanın saptandığı yılı izleyen yıldan başlayarak acilen ilk izin verilen yıl dahil alet ve makineler, depolar uygun dezenfeksiyon ve temizleme yöntemlerinden biri ile temizlenir.

d) Yetiştirme ortamında üretimin mümkün olduğu üretim sistemlerinde;

-organizmanın tamamen elimine edildiği resmi olarak doğrulanmadıkça, yumru, bitki veya gerçek tohumlar ekilmez,

-patates üretimi resmi olarak sertifikasyonu yapılmış patates tohumlarından veya testlenmiş kaynaklardan sağlanan mikro-bitki veya mini yumrularla yapılır.

4.2 yukarıda 4.1' de verilen önlemlerin ön yargısız olarak alındığı bulaşık zonlarda;

a) bulaşmayı izleyen en az 3 üretim sezonu boyunca:

-resmi organlar denetiminde, üretim, depolama, bakım işlemlerinin yürütüleceği garanti edilir,

-uygun yöntemlerle depo ve makineler dezenfekte edilir ve temizlenir,

-bu alanlarda üretim için yalnızca sertifikalı yumrular kullanılır,

-bu alanlar içinde yer alan tüm bina ve müstemilatındaki depolarda bulunan hasat edilen tohumluk yumrular ayrı olarak işlenir,

-detaylı bir sürvey yapılır,

b) Uygun bir zaman periyodu içinde tüm tohumluk patates stoklarını karşılayabilecek bir program gerçekleştirilir. Bulaşıklığın saptandığı zon içindeki üreticilerin numaraları, ortak depolar ve sevk yerleri kaydedilir.