



Burdur İlinde Plum pox virus'un Tespiti ve Kısmi Kılıf Protein Geninin Moleküler Karakterizasyonu

Ali Ferhan-MORCA^{1,*}, Sevgi-COŞKAN², Ali ÇELİK³

^{1,2}Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, ³Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi Bitki Koruma Bölümü]

¹<https://orcid.org/0000-0002-7480-922X>, ²<https://orcid.org/0000-0002-3589-6041>, ³<https://orcid.org/0000-0002-5836-8030>

✉: ferhan.morca@gmail.com

ÖZET

Plum pox virus (PPV), sert çekirdekli meyvelerde önemli verim kayıplarına sebep olan Şarka hastalığının etmenidir. PPV, Türkiye'nin farklı bölgelerinde sınırlı olarak tespit edilmesine rağmen, bugüne kadar Burdur iline ait herhangi bir kayıt bulunmamaktadır. Bu çalışmada, 2016-2019 yılları arasında Burdur ilinde PPV'nin varlığının belirlenmesine yönelik serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılan araştırmanın sonuçlarına yer verilmiştir. Sürveyler süresince toplanan 47 adet sert çekirdekli meyve yaprak örneği ilk olarak Double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) ile analiz edilmiş ve 2 adet şeftali örneğinin PPV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, PPV'nin kılıf protein bölgesi için 767 nükleotid büyüklüğünde bir bölgeyi çoğaltan bir adet dejenere primer çifti tasarlanmıştır. Yeni primerler ile gerçekleştirilen Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ve sekans analizleri sonucunda elde edilen diziler GenBank'a kaydedilmiştir. Yapılan BlastN analizi neticesinde Burdur PPV izolatları en yüksek benzerlik oranını (%99.86-%98.49), PPV-M ırkı ile göstermiştir. Neighbour-joining yöntemiyle yapılan filogenetik ağaçta Burdur izolatlarının, Türkiye ve farklı ülkelere ait PPV-M izolatı ile kümelendiği belirlenmiştir. Bu çalışma ile elde edilen 2 adet PPV-M izolatı Akdeniz Bölgesi'nin PPV açısından ari alanı konumunda olan Burdur ilinde ilk kayıt niteliğindedir. Çalışma sonucunda enfekteli olduğu tespit edilen ağaçlar eradike edilerek 1 km çapında tampon bölge oluşturulmuş ve 3 yıl boyunca *Prunus* türlerinin yetiştiriciliğinin yasaklanmasına ve sürvey çalışmalarının devam edilmesine karar verilmiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 10.07.2020

Kabul Tarihi : 04.12.2020

Anahtar Kelimeler

Filogenetik Analiz

Şarka Hastalığı

Şeftali

PPV-M

Determination of Plum pox virus and Molecular Characterization of Partial Coat Protein Gene in Burdur Province

ABSTRACT

Plum pox virus (PPV), the causal agent of Sharka disease, causes significant yield losses in stone fruits. Despite PPV occurrence as restricted in different regions of Turkey, there is no record of PPV yet in Burdur province. Hence, this study includes the results for determining the presence of PPV in Burdur province between 2016-2020 by serological and molecular methods. A total of 47 leaf samples collected during the surveys were first analyzed by Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA), and only 2-peach samples were determined to be infected with PPV. A degenerate primer pair that amplifies a 767 bp product was designed for the partial coat protein region of PPV in this study. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using designed primer pair, and novel isolates obtained by sequence analysis were deposited in the GenBank. As a result of the BlastN analysis, Burdur PPV isolates showed the highest similarity (99.86% -98.49%) with the PPV-M strain. The phylogenetic tree was generated by the Neighbor-Joining method, resulting in novel PPV-Burdur

Research Article

Article History

Received : 10.07.2020

Accepted : 04.12.2020

Keywords

Phylogenetic Analysis

Sharka Disease

Peach

PPV-M

isolates were clustered with the PPV-M isolates belonging to Turkey and other countries. The novel two PPV-M isolates were the first records in the province of Burdur, the PPV-free area in the Mediterranean Region. As a result of this study, by eradicating infected trees, a one-kilometer diameter buffer zone was established. It has been decided to ban the replanting of *Prunus* species and continue the survey studies for three years.

Atf İçin: Morca AF, Coşkan S, Çelik A 2021. Burdur İlinde Plum pox virus'un Tespiti ve Kısmi Kılıf Protein Geninin Moleküler Karakterizasyonu. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (4): 805-814. DOI: 10.18016/ksutarimdoge.vi.767409

To Cite : Morca AF, Coşkan S, Çelik A 2021. Determination of Plum pox virus and Molecular Characterization of Partial Coat Protein Gene in Burdur Province. KSU J. Agric Nat 24 (4): 805-814. DOI: 10.18016/ksutarimdoge.vi.767409

GİRİŞ

Plum pox virus (PPV), *Potyvirus* cinsi içerisinde yer alan, sert çekirdekli meyve ağaçlarında ciddi ekonomik kayıplara yol açabilen önemli bir viral hastalık etmenidir (Nemeth, 1986). Hastalık etmeni erik, şeftali ve kayısı başta olmak üzere sert çekirdekli meyvelerde verim ve kalite kayıplarına yol açmaktadır (Rochon ve ark., 2003). İlk olarak 1917-18 yılında Bulgaristan'da tespit edilen (Atanassov, 1932) PPV'nin tüm Avrupa ve Akdeniz ülkelerine yayılma eğiliminde olduğu bildirilmiştir (Garcia ve Cambra, 2007). PPV'nin günümüze kadar yabancı ve kültüre alınmış sert çekirdekli meyve ağaçlarında (James ve Thompson, 2006; Sochor ve ark., 2012) ve dikotiledon familyasına ait 8 farklı bitki türünde enfeksiyon oluşturma durumları araştırılarak, virüsün 20 farklı afit türü ile taşınması üzerine deneysel çalışmalar yürütülmüştür (Labonne ve ark., 1994; Gildow ve ark., 2004). Global ölçekte yayılımı sürekli takip edilen PPV, günümüzde sert çekirdekli meyve ağaçlarının en önemli viral sorunu haline gelmiştir. Öyle ki, PPV bitki virüsleri içerisinde en çok çalışılan 10 virüs arasında yerini almıştır (Scholthof ve ark., 2011).

RNA virüsleri tipik olarak, viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ribonükleotidleri sık sık hatalı birleştirmesi sonucu yönlendirilen yüksek mutasyon oranlarına sahip genetik olarak farklı yeni popülasyonlar oluşturabilirler (Korboukh ve ark., 2014). Bununla beraber RNA virüslerinin genetik çeşitliliğine katkıda bulunan başka bir mekanizmada rekombinasyondur (Garcia-Arenal ve ark., 2001). Rekombinasyon, Potiviruslerin evriminde önemli bir rol oynamaktadır (Chare ve Holmes, 2006). Ancak bu evrim net olarak bilinmemekle birlikte mutasyon değişikliklerinin rekombinasyon olaylarına kıyasla göreceli önemi hala anlaşılamamaktadır (Ohshima ve ark., 2007; James ve ark., 2016). Rekombinasyon düzeyi yüksek olan RNA virüsleri arasında yer alan PPV'nin günümüze kadar 10 farklı ırkı tespit edilmiştir. Bu ırklar sırası ile PPV-D ve PPV-M (Kerlan 1979), PPV-EA (Wetzel ve ark., 1991), PPV-C (Nemchinov ve Hadidi, 1996), PPV-Rec (Glasa ve ark., 2004), PPV-W (James ve Varga, 2005), PPV-T (Serçe ve ark., 2009), PPV-An (Palmisano ve ark., 2012), PPV-CR (Glasa ve ark., 2013) ve PPV-CV (Chirkov ve ark.,

2017) olarak isimlendirilmiştir. PPV ırkları virüsün biyolojik, epidemiyolojik ve nükleotid farklılıkları gözetilerek ayrılmıştır (Sihelská ve ark., 2017).

Tek sarmal RNA yapısında olan PPV genomu, yaklaşık 9.8 kb büyüklüğünde ve tüm diğer *Potyvirus* üyeleri gibi tek bir okuma çerçevesinden oluşmaktadır (Revers ve Garcia, 2015). Ayrıca genom üzerinde P3N-PIPO mini trans-frame proteinin kodlandığı ikinci bir küçük okuma çerçevesi de bulunmaktadır (Chung ve ark., 2008). PPV'nin dünya genelinde ırk düzeyindeki yaygınlığına bakıldığında PPV-D ve PPV-M ırklarının yaygın olduğu bildirilmiş, (Candresse ve ark., 1998) yapılan son çalışmalarda ise PPV-Rec ırkının dağılımında da bir artışın meydana geldiği rapor edilmiştir (Garcia ve ark., 2014).

PPV'nin, ana konukçularından olan erik, kayısı, şeftali ve badem gibi sert çekirdekli meyvelerde farklı belirtiler meydana getirdiği görülmüştür. Konukçu bitkide meydana gelen bu farklı belirtiler, virüsün ırkına, bitkinin yaşına ve türüne göre değişiklik göstermektedir (Deligöz ve ark., 2015). PPV genellikle, konukçu bitki yapraklarında klorotik bantlaşma, damarlarda renk açılması, halka şeklinde lekeler ve çiçeklerde renk kırılması gibi belirtiler ile kendini belli etmektedir (Akbaş ve ark., 2011). Ayrıca hassas konukçuların meyve ve yapraklarında şekil bozuklukları oluşturduğu, bununla beraber meyvelerin erken dönemde dökülmelerine sebep olduğu bildirilmiştir (Lopez-Moya ve ark., 2000). PPV Türkiye'de ilk olarak Edirne ilinde 1968 yılında tespit edilmiştir (Sahtiyancı, 1969). Virüsün yaklaşık yarım asırdır önce tespit edilmiş olması, üzerinde çok çalışılan bir organizma olmasına neden olmuş ve etmeni sert çekirdekli meyve ağaçlarının önemli bir bitki patojeni haline getirmiştir. Günümüzde hastalığın Türkiye'de birçok bölgesinde bulunduğu bildirilmiştir (Elibüyük, 2003; Elibüyük, 2004; Çıtır ve İbbağı, 2006; Candresse ve ark., 2007; Gümüş ve ark., 2007; Akbaş ve ark., 2011; İbbağı ve Çıtır, 2014; Gürcan ve Ceylan, 2016). Türkiye'de PPV'nin ırk düzeyinde tespiti üzerine yapılan çalışmalarda PPV-D (Elibüyük, 2004; Gürcan ve Ceylan, 2016; Gürcan ve ark., 2020), PPV-M (Sertkaya ve ark., 2003; Elibüyük, 2004; Gürcan ve ark., 2019), PPV-T (Serçe ve ark., 2009; Teber ve ark., 2019) ve PPV-Rec olmak üzere

toplam dört ırkı tespit edilmiştir. PPV-Rec sadece Isparta ve Bursa illerinde sınırlı olarak belirlenmesine (Candresse ve ark., 2007; Gürcan ve Ceylan, 2016) rağmen diğer üç ırk birçok ilde tespit edilmiştir.

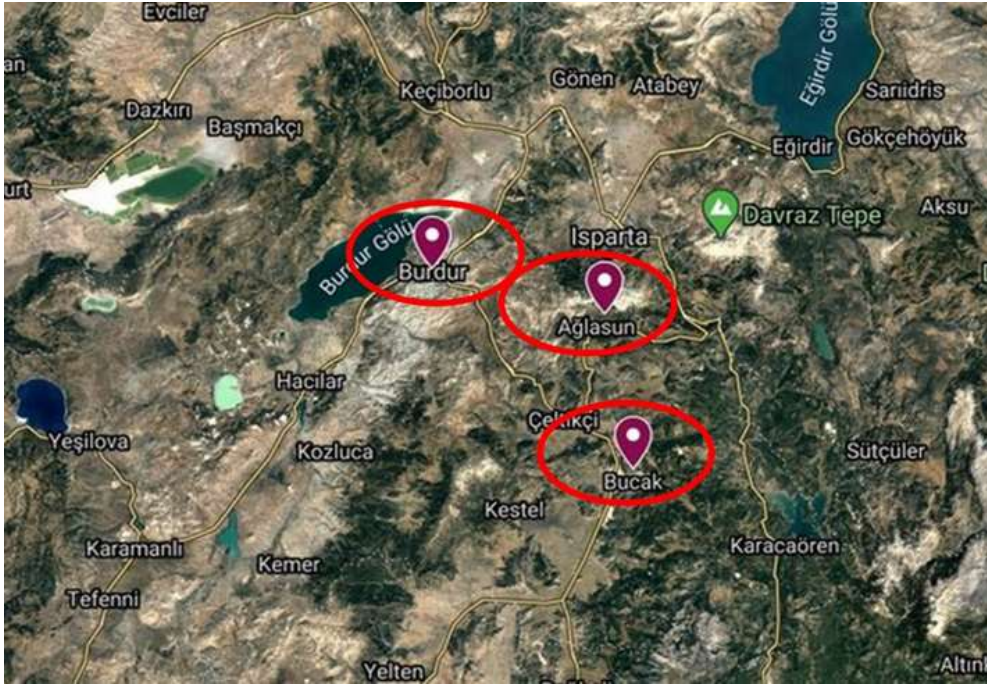
PPV, global ölçekte olduğu gibi Türkiye’de de karantinaya tabi viral etmenler arasında yer almaktadır (Deligöz ve ark., 2015). Türkiye’de karantina şartları kapsamında izlenen PPV’nin yeni bölgelerde tespiti ve eradikasyonu özellikle PPV ile mücadelede alınması gereken önlemler bakımından oldukça önemlidir. Bu çalışmada Burdur ilinde

PPV’nin takibi amacıyla yapılan sürvey çalışmaları kapsamında virüsün ilk tespiti ve kısmi kılıf protein bölgesine özgü geliştirilmiş olan dejenere primerler ile yapılan karakterizasyon çalışmaları bildirilmektedir.

MATERYAL ve METOD

Sürvey

Sürvey çalışmaları 2016-2019 yılları arasında Burdur iline bağlı Merkez, Ağlasun ve Bucak ilçelerinde (Şekil 1)



Şekil 1. Burdur ili 2016-2019 yılları arasında sürvey yapılan Ağlasun, Bucak ve Merkez ilçelerinin konumunu gösteren harita

Figure 1. The map showing Ağlasun, Bucak, and Merkez districts of Burdur province where surveys were conducted between 2016-2019

Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından hazırlanmış ve yayınlanmış olan “Sürvey Talimatları Kılavuz El Kitabı” kapsamında belirtilen usullere göre yapılmıştır (Anonim, 2017). Örneklemeye yapılırken sadece ticari bahçelerden değil aynı zamanda geleneksel olarak tabir edilen eski ev tipi bahçelerden de örnekler alınmıştır. Toplanan örnekler için gerekli bilgiler (tarih, lokasyon, örnek numarası, arazi büyüklüğü) not edilmek suretiyle kaydedilmiştir. Örnekler PPV belirtileri açısından ilk olarak arazide makroskopik olarak kontrol edilmiştir. Kontroller sonucu sürvey bölgesinden PPV benzeri belirti gösteren 47 adet örnek toplanmış ve Ankara Ziraat Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Viroloji Laboratuvarında analize alınmıştır.

DAS-ELISA

Sürvey yapılan alanlardan toplanan örnekler makroskopik gözlemlerden sonra serolojik olarak PPV ırklarına (PPV-An, PPV-C, PPV-CR, PPV-D, PPV-EA,

PPV-M, PPV-Rec, PPV-T ve PPV-W) spesifik poliklonal antiserum (Agdia Inc. Elkhart, IN, USA) kullanılarak ilgili firmanın önerileri doğrultusunda ELISA yöntemi (Clark ve Adams, 1977) ile test edilmiştir. Test sonucunda ELISA mikroyuvarları 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda (Tecan Sunrise Microplate Reader 16039400) absorbans değerleri ölçülmüştür. Değerlendirmede negatif kontrolün absorbans değerinin en az iki katı ve üzeri değere sahip örnekler enfekteli (pozitif) olarak kabul edilmiştir.

Toplam RNA İzolasyonu, Dejenere Primer Tasarımı ve RT-PCR

ELISA sonucunda PPV pozitif olarak belirlenen örneklerden ve PPV negatif örnekten (Kontrol) ticari kit (NucleoSpin RNA Plant Mini kit-Macherey-Nagel, USA) kullanılarak toplam RNA’lar izole edilmiştir. Elde edilen toplam RNA’ların konsantrasyonları nanospektrofotometre (NanoDrop 2000, Thermo) ile

ölçülmüş ve eşit hacime getirilmiştir.

Çalışmada kullanılan primer çiftinin tasarımı için NCBI'dan PPV'nin tüm ırklarının kılıf protein bölgesini içeren nükleotid dizileri referans alınmıştır. Referans alınan NCBI izolatlarına ait genom dizilimi ve ilgili gen üzerindeki pozisyonu Şekil 2'de verilmiştir. Referans alınan bu izolatlar Mega 7

programında (Kumar ve ark., 2016) Clustal W (Thompson ve ark., 1994) tekniği kullanılarak hizalanmıştır. Hizalama sonucunda elde edilen diziler ile Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) programında tasarlanan ve ilk defa bu çalışmada kullanılan 767 nükleotid boyutunda PPV-2F/PPV-2R isimli dejenere primer çifti oluşturulmuştur.

NCBI Erişim No İzolat Adı	Pozisyon	Nükleotid dizisi	Pozisyon
HF585103 PPV-M	8777	C A A A C C G C G G T C T T T T G G A G >	
MF370999 PPV-M	8777	C A A A C C G C G G T C A T T T G G A G >	
LT158756 PPV-D	8777	T C A A C T G C A A A C T T T T G G A A >	
MF346285 PPV-T	8777	C A C A C C G C G G T C T T T T G G A G >	
HG964685 PPV-Rec	8777	C A C A C C G C A G T C T T T T G G A G >	
DQ431465 PPV-EA	8783	T A C A C C T C C T T C T T T T G G A G >	
KC347608 PPV-W	8780	T A A C C C A A C G T C T T T T G G C G >	
KJ787006 PPV-C	8786	A A G T C C A C T C T C G T A T G G G G >	
MG736814 PPV-CR	8783	A A G T C C A T T C T C T T A T G G A G >	
HF674399 PPV-An	8777	C A A C C C G C A G T C T T T T G G A G >	
MF447179 PPV-CV	8783	A A G C C C A T T C T C A T A T G G T G >	
		* *	
PPV-2F Primeri		Y M M A C Y G C R R W C T T T T G G A R	
HF585103 PPV-M		> C G T G A A T C G C A A C A T G C A C A	9543
MF370999 PPV-M		> C G T G A A T C G G C A A C A T G C A C A	9543
LT158756 PPV-D		> C G T T A A T C G C A A C A T G C A C A	9543
MF346285 PPV-T		> T G T G A A T C G C A A C A T G C A C A	9543
HG964685 PPV-Rec		> C G T G A A T C G C A A C A T G C A C A	9543
DQ431465 PPV-EA		> T G T T A A T C G C A A C A T G C A T A	9549
KC347608 PPV-W		> T G T G A A T C G C A A C A T G C A T A	9546
KJ787006 PPV-C		> T G T T A A T C G C A A C A T G C A C A	9552
MG736814 PPV-CR		> T G T T A A T C G C A A C A T G C A C A	9549
HF674399 PPV-An		> T G T G A A T C G C A A C A T G C A C A	9543
MF447179 PPV-CV		> T G T T A A T C G C A A C A T G C A C A	9549
		* *	
PPV-2R Primeri		T G T G C A T G T T G C G A T T M A C R	

Şekil 2. PPV-2F/2R dejenere primerlerinin tasarımında referans alınan GenBank PPV izolatları ve nükleotid dizileri

Figure 2. The reference GenBank PPV isolates and nucleotide sequences for designing PPV 2F/2R degenerate primer pair

Çalışmada elde edilen RNA'lar ve çalışmaya özgü tasarlanan PPV-2F/PPV-2R primer çifti ile toplam 25 µl hacimdeki PCR karışımı: 8 µl 5X GoTaq Flexi Buffer, 1.25 µl MgCl₂ (25 mM), 0.7 µl dNTP (10 mM), 0.25 µl GoTaq polimeraz enzim (5 U µl), 1 µl ileri (Forward) primer (10 µM), 1 µl geri (Reverse) primer (10 µM), 0.2 µl Reverse-transcriptase enzimi (200 U/µl), 0.2 µl RNase inhibitörü (5000 U/ml), 2 µl RNA içerecek şekilde hazırlanmış ve nükleaz-içermeyen steril su ile toplam hacime tamamlanmıştır. Elde edilen PCR karışımı ile gerçekleştirilen tek aşamalı RT-PCR için reaksiyon koşulları: 45 dk 50 °C süre ile gerçekleştirilen cDNA aşamasının ardından, 95 °C'de 5 dk, 94 °C'de 45 sn, 46 °C'de 45 sn, 72 °C'de 90 sn ve 72 °C'de 10 dk şeklinde gerçekleştirilmiştir. RT-PCR

sonucunda elde edilen amplikonlar Pronosafe (Conda, Madrid, Spain) DNA boyası ile hazırlanan %1.5'lük agaroz jelde 80 V'da 60 dk yürütülmüş ve UV transilluminatör altında görüntülenmiştir.

Dizileme ve Filogenetik Analiz

RT-PCR sonucu pozitif olarak belirlenen amplikonlar hizmet alımı yöntemi ile dizilenmek üzere ticari firmaya (Macrogen The-BM Laboratory Systems, Türkiye) gönderilmiştir. Elde edilen ham nükleotid dizileri temizlenerek işlenmiş ve Clustal W tekniği kullanılarak MEGA 7 programında konsensus dizileri oluşturulmuştur (Thompson ve ark., 1994). PPV'nin kılıf protein bölgesine ait kısmi nükleotid dizilerini içeren 2 adet izolat, GenBank'ta yer alan referans

izolatlar ile nükleotid düzeyinde BlastN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizine tabi tutulmuştur. BlastN analizinden sonra izolatlar ait nükleotit dizileri GenBank'a kayıt edilmiştir.

İzolatların kayıt işleminden sonra filogenetik ağaç oluşturulması için NCBI'dan PPV'nin kılıf protein bölgesinin tamamını içeren 27 adet referans izolat ve 1 adet dış izolat (Potato virus Y) indirilerek nükleotid düzeyinde çeşitlilik sağlanmıştır (Çizelge 1). Filogenetik ağaç oluşturulurken kullanılacak model, Mega 7 programında yer alan en iyi model bulma seçeneği (Kumar ve ark., 2016) kullanılarak elde edilmiş ve Tamura-Nei (TN93+G+I) olarak belirlenmiştir. Bulunan model ile 1000 Bootstrap değeri seçilerek Neighbour-Joining (NJ) (Saitou ve Nei, 1987) yöntemi ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

Çizelge 1. Filogenetik analizde kullanılan izolatlar
Table 1. The list of isolates subjected to phylogenetic analyses

No	GenBank Erişim Numarası	Ülke-Şehir	İrk
1	MN877409*	Türkiye-Burdur	PPV-M
2	MN901052*	Türkiye-Burdur	PPV-M
3	KX423931	Türkiye-Bursa	PPV-M
4	KX423928	Türkiye-Bursa	PPV-M
5	KX423929	Türkiye-Bursa	PPV-M
6	KX423905	Türkiye-Bursa	PPV-M
7	EF626549	Slovakya	PPV-M
8	HF585103	Slovakya	PPV-M
9	MF371001	Türkiye-İstanbul	PPV-M
10	MF370999	Türkiye-İstanbul	PPV-M
11	LT158756	Slovakya	PPV-D
12	AB576049	Japonya	PPV-D
13	AY953266	Kanada	PPV-D
14	MF346285	Türkiye-Konya	PPV-T
15	MF346290	Türkiye-Konya	PPV-T
16	EU734794	Türkiye-Ankara	PPV-T
17	HG964685	Kanada	PPV-Rec
18	EU117116	Polonya	PPV-Rec
19	DQ431465	Mısır	PPV-EA
20	FN424180	Mısır	PPV-EA
21	KC347608	Rusya	PPV-W
22	AY912055	Kanada	PPV-W
23	KJ787006	Rusya	PPV-C
24	KY221840	Almanya	PPV-C
25	MG736816	Rusya	PPV-Cr
26	MG736814	Rusya	PPV-Cr
27	HF674399	Arnavutluk	PPV-An
28	MF447179	Rusya	PPV-CV
29	MF447180	Rusya	PPV-CV
30	KR528584**	Uruguay	PVY

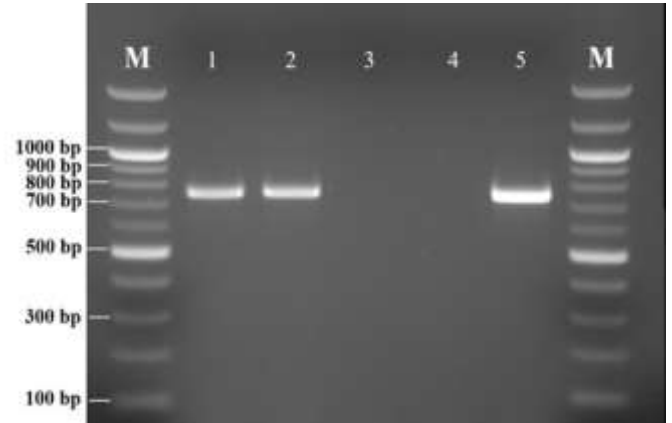
* Çalışmada elde edilen izolatlar ** Dış grup olarak seçilen izolat

BULGULAR ve TARTIŞMA

2016-2019 yılları arasında Burdur İli merkez, Ağlasun ve Bucak ilçelerinden toplam 47 adet sert çekirdekli meyve yaprak örneği toplanmıştır. Yapılan makroskopik ve serolojik çalışmalar neticesinde

toplamda 2 adet şeftali örneğinin (Brd424 ve Brd425) PPV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Sert çekirdekli meyve virüsleri ile yapılan çalışmalarda serolojik testler yaygın olarak kullanılan test yöntemleri arasında yer almaktadır (Gümüş ve ark., 2007; Ulubaş-Serçe ve ark., 2009; Öztürk ve Çevik, 2015; Çelik ve Ertunç, 2019; Çelik ve Ertunç, 2020). Bu çalışmada da ilk olarak serolojik yöntemle pozitif olduğu belirlenen örnekler daha sonra hassas bir analiz yöntemi olan RT-PCR tekniği ile doğrulanmıştır. PPV'nin tüm ırklarının kılıf protein gen bölgesini tanımlama özelliğine sahip olması amacıyla tasarlanan dejenere primer çifti ile yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda, Burdur ilinden elde edilen iki adet şeftali örneği ve pozitif kontrol amacıyla kullanılan PPV ile enfekteli (PPV-D) bir adet şeftali örneği agaroz jel üzerinde 767 bp büyüklüğünde bantlar oluşturmuştur (Şekil 3).

1



Şekil 3. Dejenere primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR amplifikasyonuna ait agaroz jel görüntüsü. (M: 100 bp DNA Markör, 1-2; Burdur PPV izolatları, 3; Negatif Kontrol, 4; Su Kontrol, 5; Pozitif Kontrol).

Figure 3. Agarose gel image of RT-PCR amplification using degenerate primer pairs (M: 100 bp DNA marker, 1-2 Burdur PPV isolates, 3: Negative control, 4: Water control, 5: Positive control)

Elde edilen ampliconlar sekans analizi sonrasında BlastN analizine tabi tutulmuştur. Konsensus dizileri oluşturulan iki adet izolat MN877409 (Brd424) ve MN901052 (Brd425) erişim numaraları ile NCBI'a kaydedilmiştir. BlastN analizi sonucunda Burdur PPV izolatları, Çizelge 2'de yer alan ve NCBI'da kayıtlı PPV-M izolatları ile nükleotid düzeyinde %98.49 ile % 99.86 arasında benzerlik göstermiştir. Bu yüksek benzerlik oranının, Çizelge 2'de verilmeyen ve Blast analizinde elde edilen ilk 100 PPV-M izolatında da devam ettiği görülmüştür. Bu bulgular doğrultusunda Brd424 ve Brd425 izolatlarının PPV-M ırkı olduğu kesinleşmiştir.

Çizelge 2. Kısmi CP gen bölgesi için Brd424 ve Brd425 izolatlarının GenBank veritabanında yer alan PPV izolatları ile nükleotid düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları

Table 2. Similarity ratios of Brd424 and Brd425 isolates at nucleotide level with PPV isolates in the GenBank database for the partial CP gene region

İzolot ve Ülke	İrk	GenBank No	Benzerlik (%)	İzolot ve Ülke	İrk	GenBank No	Benzerlik (%)
			Brd424				Brd425
BrPc53 (Türkiye)	M	KX423931	99.86	BrPc11 (Türkiye)	M	KX423905	99.59
BrPc51 (Türkiye)	M	KX423930	99.86	BrPc10 (Türkiye)	M	KX423904	99.59
BrPc48 (Türkiye)	M	KX423928	99.86	BrPc23 (Türkiye)	M	KX423910	98.90
BrPc44 (Türkiye)	M	KX423925	99.86	EdMrPc284 (Türkiye)	M	MG686898	98.62
BrPc31 (Türkiye)	M	KX423914	99.86	BrPc108 (Türkiye)	M	KX423955	98.62
BrPc49 (Türkiye)	M	KX423929	99.72	BrPc74 (Türkiye)	M	KX423944	98.62
BrPc2d (Türkiye)	M	KX423897	99.72	CY2 (Kıbrıs)	M	EF626558	98.62
BrPc30 (Türkiye)	M	KX423913	99.59	RS4 (Sırbistan)	M	EF626546	98.62
BrPc2f (Türkiye)	M	KX423898	99.59	EdTaAp316 (Türkiye)	M	MG686913	98.49
BrPc43 (Türkiye)	M	KX423924	99.45	EdMrPc283 (Türkiye)	M	MG686897	98.49

PPV'nin tespitine yönelik ilk defa çalışmada kullanılan PPV-2F/2R dejenere primerlerinin oldukça başarılı olduğu görülmüştür. Türkiye'nin PPV havuzunda dominant ırk durumunda olan PPV-T'nin serolojik olarak tespitini mümkün kılacak bir monoklonal antibadi henüz geliştirilmemiştir. Bu nedenle dizileme olmaksızın PPV-T ırkının ayırımı yapmak mümkün değildir (Gürcan ve Ceylan, 2016). PPV'nin ırk ayırımı hali hazırda virüsün tam genom dizisi, kılıf protein bölgesi ve P3-6K1 bölgesinin dizi bilgilerinin elde edilmesi ile sağlanmaktadır (Gürcan ve Ceylan, 2016; Gürcan, 2017). Bu bağlamda PPV-2F/R primer çiftinin, çalışma kapsamında verilmeyen ancak Türkiye'de varlığı belirlenen PPV'nin dört ırkı (PPV-M, D, T ve Rec) için güvenilir olarak çalıştığı laboratuvar çalışmalarında kanıtlanmış ve farklı literatürlerde PPV'nin tespiti için kullanılan primer çiftlerine ilave olarak kullanılabilmesi görülmüştür. Dünyada PPV'nin karantina kapsamında rutin analizlerinde ISPM 27 (International Standards for Phytosanitary Measures) teşhis protokollünde yer alan metotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Söz konusu protokolda en yaygın olarak universal P1/P2 primer çifti (Wetzel ve ark., 1991) kullanılarak teşhis çalışmaları yapılmaktadır. Universal P1/P2 primer çifti PPV'nin kılıf protein bölgesinde 243 nükleotid'lik küçük bir alanı çoğaltmaktadır. P1/P2 primerlerinin teşhis için spesifikliğı yüksek ancak küçük bir bölgeyi

amplifiye etmesi nedeniyle moleküler karakterizasyon çalışmaları açısından uygun olmadığı bilinmektedir (Gürcan ve ark., 2019). Universal primer çifti ile yapılan filogenetik ağaçların dendogramlarında bootstrap değerlerinin düşük çıktığı (Kutsenko ve ark., 2019) ve güvenilirliğin azaldığı farklı çalışmalarda da görülmektedir. Bu sebeple çalışma için tasarlanmış olan 767 nükleotid uzunluğundaki dejenere primerler ile genetik çeşitliliğı daha iyi temsil edildiğı ve filogenetik analizlerde PPV ırklarının daha iyi ayrıldığı görülmüştür.

Çizelge 1'de verilen 10 farklı PPV izolatı ile Burdur izolatları arasında filogenetik ilişkiler incelenmiş ve elde edilen filogenetik ağaçta 11 farklı grubun yer aldığı görülmüştür (Şekil 4). Oluşan bu farklı grupların filogenetik ağaç üzerinde farklı uzunluklarda ve farklı bootstrap değerlerine sahip dallar ile belirgin biçimde ayrıştığı belirlenmiştir. PPV'nin ırklarından olmayan ancak filogenetik ağaçta MIs olarak belirtilen grubun Gürcan ve Ceylan (2016) tarafından rapor edilen, Avrupa PPV-M grubundan genetik olarak farklı olduğu bildirilen İstanbul (Türkiye) izolatlarından oluştuğı görülmüştür. MIs izolatlarının farklı çalışmalarda olduğu gibi (Teber ve Gürcan 2016, Gürcan, 2017) bu çalışmada da diğer PPV-M izolatlarından ayrı bir grup olduğu doğrulanmıştır. Çalışmada kullanılan Brd424/Brd425 izolatlarının BlastN analizi sonucu NCBI'da görülen

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma ile Akdeniz Bölgesi'nin PPV açısından ari ili konumunda olan Burdur ilinde Şarka Hastalığı ilk kez rapor edilmektedir. PPV, EPPO-A2 listesinde yer alan bir karantina organizmasıdır. EPPO bölgesinde yaygın olarak ya da sınırlı olarak bulunan PPV birçok ülkede kayısı, erik ve şeftalide büyük risk taşıyan önemli bir etmenidir. Türkiye'de önemli bir karantina organizması olarak kabul edilen PPV, karantina listesinde EK2-B (Türkiye'de sınırlı olarak bulunan karantinaya tabi zararlı organizmalar) kapsamında değerlendirilmekte ve Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından belirlenen katı bir eradikasyon programına sahiptir. Bu çalışma sonucunda, PPV'nin tespit edildiği lokasyondaki bitkiler imha edilerek, 1 km çapındaki alanda tampon bölge oluşturulmuştur. Ayrıca tampon bölge içerisinde 3 yıl boyunca PPV'nin doğal konukçusu durumunda olan *Prunus* türlerinin yetiştiriciliği yasaklanmış ve virüsün taranması amacıyla survey çalışmalarına devam edilmesine karar verilmiştir.

TEŞEKKÜR

Survey çalışmalarında emeği geçen Tarım ve Orman Bakanlığı Burdur İl Tarım ve Orman Müdürlüğü personelleri ile Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü-Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

Akbaş B, Değirmenci K, Ciftci O, Kaya A, Yurtmen M, Uzunogullari N, Çelik N, Türkölmez Ş 2011. Update on Plum pox virus distribution in Turkey. *Phytopathologia Mediterranea* 50(1): 75-83.

Anonim 2017. Şarka virüsü Plum pox potyvirus-PPV Survey Talimatı. <https://www.tarimorman.gov.tr/Konu/943/Survey> (Alınma tarihi: 09.07.2020).

Atanassov D 1932. Plum pox. A new virus disease. *Annals of the University of Sofia Faculty of Agriculture and Silviculture* 11: 49-69.

Candresse T, Cambra M, Dallot S, Lanneau M, Asensio M, Gorris MT, Revers F, Macquaire G, Olmos A, Boscia D, Quiot J, Dunez J 1998. Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox potyvirus. *Phytopathology* 88(3): 198-204.

Candresse T, Svanella-Dumas L, Gentit P, Caglayan K, Çevik B 2007. First report of the presence of Plum pox virus Rec strain in Turkey. *Plant Disease* 91(3): 331-331.

Chare ER, Holmes EC 2006. A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Archives of Virology* 151: 933-946.

Chirkov S, Ivanov P, Sheveleva A, Zakubanskiy A, Osipov G 2017. New highly divergent Plum pox virus isolates infecting sour cherry in Russia. *Virology* 502: 56-62.

Chung BYW, Miller WA, Atkin JF, Firth AE 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(15): 5897-5902.

Clark MF, Adams AN 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of general virology* 34(3): 475-483.

Çelik N, Kütük T 2013. Antalya ilinde şarka virüs hastalığının belirlenmesi. *Derim* 30(2): 1-10.

Çelik A, Ertunç F 2019. First report of prunus necrotic ringspot virus infecting apple in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 101(4): 1227-1227.

Çelik A, Ertunç F 2020. Bursa ve Bilecik İlleri Şeftali Yetiştiriciliği Yapılan Alanlarda Prune dwarf virus (PDV) Yaygınlığı ve Genetik Çeşitliliği. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi* 6(1): 66-74.

Çıtır A, İlbağı H 2006. Serological identification of some important viruses on fruit trees and bushes in Tekirdağ province of Turkey. *Acta Horticulture* 781: 103-106.

Deligöz İ, Değirmenci K, Sökmen M 2015. Samsun ilinde sert çekirdekli meyve türlerinde Şarka hastalığı etmeninin (Plum pox virus) belirlenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi* 30(3): 227-235.

Elibüyük İÖ 2003. Natural spread of Plum pox virus in Ankara, Turkey. *Journal of Phytopathology* 151(11-12): 617-619.

Elibüyük İÖ 2004. Current situation of sharka disease in Ankara, Turkey. *Phytoparasitica* 32(4): 417-420.

García-Arenal F, Fraile A, Malpica JM 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* 39: 157-186.

García JA, Cambra M 2007. Plum pox virus and sharka disease. *Plant Viruses* 1(1): 69-79.

García JA, Glasa M, Cambra M, Candresse T 2014. Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Molecular plant pathology* 15(3): 226-241.

Gildow F, Damsteegt V, Stone A, Schneider W, Luster D, Levy L 2004. Plum pox in North America: identification of aphid vectors and a potential role for fruit in virus spread. *Phytopathology* 94(8): 868-874.

Glasa M, Palkovics L, Komínek P, Labonne G,

- Pittnerová S, Kudela O, Candresse T, Šubr Z 2004. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of Plum pox virus (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *Journal of General Virology* 85(9): 2671-2681.
- Glasa M, Prikhodko Y, Predajňa L, Nagyová A, Shneyder Y, Zhivaeva T, Subr Z, Cambra M, Candresse T 2013. Characterization of sour cherry isolates of Plum pox virus from the Volga basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology* 103(9): 972-979.
- Gümüş M, Paylan IC, Matic S, Myrta A, Sipahioglu HM, Erkan S 2007. Occurrence and distribution of stone fruit viruses and viroids in commercial plantings of *Prunus* species in western Anatolia Turkey. *Journal of Plant Pathology* 89(2): 265-268.
- Gürcan K, Teber S, Candresse T 2020. Genetic analysis suggests a long and largely isolated evolutionary history of plum pox virus strain D in Turkey. *Plant Pathology* 69(2): 370-378.
- Gürcan K, Teber S, Çağlayan K 2019. Further investigation of a genetically divergent group of Plum pox virus-M strain in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 101(2): 385-391.
- Gürcan K 2017. Bursa'da plum pox virus (Şarka)'ün yaygınlığının ve genetik çeşitliliğinin belirlenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi* 32(1): 1-15.
- Gürcan K, Ceylan A 2016. Strain identification and sequence variability of plum pox virus in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 40(5): 746-760.
- Gürcan K 2016. Trakya Bölgesi'nde Şarka hastalığının DASI-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni* 56(3): 309-326.
- İlbağı H, Çıtır A 2014. Detection and partial molecular characterization of Plum pox virus on almond trees in Turkey. *Phytoparasitica* 42(4): 485-491.
- James D, Thompson D 2006. Hosts and symptoms of Plum pox virus: ornamental and wild *Prunus* species. *EPPO Bulletin* 36(2): 222-224.
- James D, Varga A 2005. Nucleotide sequence analysis of Plum pox virus isolate W3174: evidence of a new strain. *Virus Research* 110(1-2): 143-150.
- James D, Sanderson D, Varga A, Sheveleva A, Chirkov S. 2016. Genome sequence analysis of new isolates of the Winona strain of Plum pox virus and the first definitive evidence of intrastrain recombination events. *Phytopathology* 106(4): 407-416.
- Kerlan C 1979. Différenciation biologique et sérologique de souches du virus de la sharka. *Annales de Phytopathologie* 11(2): 241-250.
- Koç G, Baloğlu S 2006. Disease Note First Report of Sharka in The Çukurova Region of Turkey. *Journal of Plant Pathology* 88(3): 65-70.
- Korboukh VK, Lee CA, Acevedo A, Vignizzi M, Xiao Y, Arnold JJ, Hemperly S, Graci JD, August A, Andino R, Cameron CE 2014. RNA virus population diversity, an optimum for maximal fitness and virulence. *Journal of Biological Chemistry* 289: 29531-29544.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.
- Kutsenko OV, Budzanivska IG, Shevchenko OV 2019. Genetic diversity of Plum pox virus in Ukraine. *Viruses and Cell* 35(6): 476-485.
- Labonne G, Yvon M, Quio, JB, Avinent L, Llacer G 1994. Aphids as potential vectors of plum pox virus: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Horticulture* 386:207-218.
- López-Moya JJ, Fernández-Fernández MR, Cambra M, Garcia JA 2000. Biotechnological aspects of plum pox virus. *Journal of Biotechnology* 76(2-3): 121-136.
- Myrta A, Boscia D 2001. Plum pox virus: a risk for the Mediterranean fruit tree industry. *Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches* (35): 37-42.
- Nemchinov L, Hadidi A 1996. Characterization of the sour cherry strain of plum pox virus. *Phytopathology* 86(6): 575-580.
- Nemeth M 1986. Plum pox (sharka). (The virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Springer Netherlands) 463-479.
- Ohshima K, Tomitaka Y, Wood JT, Minematsu Y, Kajiyama H, Tomimura K, Gibbs AJ 2007. Patterns of recombination in Turnip mosaic virus genomic sequences indicate hotspots of recombination. *Journal of General Virology* 88: 298-315.
- Öztürk Y, Çevik B 2015. Genetic diversity in the coat protein genes of prune dwarf virus isolates from sweet cherry growing in Turkey. *The Plant Pathology Journal* 31(1): 41-49.
- Palmisano F, Boscia D, Minafra A, Myrta A, Candresse T 2012. An atypical Albanian isolate of Plum pox virus could be the progenitor of the Marcus strain. In 22nd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, June 3-8 Rome.
- Revers F, García JA 2015. Molecular biology of potyviruses. *Advances in virus research* 92: 101-199.
- Rochon D, Theilmann J, James D, Reade R, Yang L, Upton C 2003. Partial molecular characterization of plum pox virus isolates occurring in Canada. *Canadian journal of plant pathology* 25(2): 198-208.
- Sahtiyanci S 1969. Virus de la sharka chez le prunier. *Bulletin Phytosanitaire FAO* 17:69.
- Saitou N, Nei M 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Scholthof KBG, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse

- T, Ahlquist P, Hemenway C, Foster GD 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* 12(9): 938-954.
- Serçe ÇU, Candresse T, Svanella-Dumas L, Krizbai L, Gazel M, Çağlayan K 2009. Further characterization of a new recombinant group of Plum pox virus isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. *Virus Research* 142(1-2): 121-126.
- Sertkaya G, Ulubaş Ç, Çağlayan K 2003. Detection and Characterization of Plum Pox Potyvirus (PPV) by DAS-ELISA and RT-PCR/RFLP Analysis in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 27: 213-220.
- Sihelská N, Glasa M, Šubr ZW 2017. Host preference of the major strains of Plum pox virus—Opinions based on regional and world-wide sequence data. *Journal of integrative agriculture* 16(3): 510-515.
- Sochor J, Babula P, Adam V, Krska B, Kizek R 2012. Sharka: the past, the present and the future. *Viruses* 4(11): 2853-2901.
- Teber S, Ceylan A, Gürcan K, Candresse T, Ulubaş Serçe Ç, Akbulut M, Kaymak S, Akbaş B 2019. Genetic diversity and molecular epidemiology of the T strain of Plum pox virus. *Plant Pathology* 68(4): 755-763.
- Teber S, Gürcan, K 2016. Recombination analysis of 51 Plum pox virus (PPV) isolates, including 10 genomes of PPV-M Istanbul. In III International Symposium on Plum Pox Virus 9-13 May 2016, Antalya.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-80.
- Ulubaş-Serçe C, Ertunç F, Öztürk A 2009. Identification and genomic variability of Prune dwarf virus variants infecting stone fruit trees in Turkey. *Journal of Phytopathology* 157: 298-305.
- Wang A, Sanfacon H, Stobbs LW, James D, Thompson D, Svircev AM, Brown DCW 2006. Plum pox virus in Canada: progress in research and future prospects for disease control. *Canadian Journal of Plant Pathology* 28: 182-196.
- Wetzel T, Candresse T, Ravelonandro M, Delbos RP, Mazyad H, Aboul-Ata AE, Dunez J 1991. Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of the RNA of the E1 Amar strain of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology* 72(7): 1741-1746.