

Zonguldak İlinde Plum pox virus'un Tespiti, Karakterizasyonu ve Takibi

Ali Ferhan MORCA¹, Sevgi COŞKAN², Birol AKBAS³

^{1,2,3} Ankara Zırai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara

¹<https://orcid.org/0000-0002-7480-922X>, ²<https://orcid.org/0000-0002-3589-6041>, ³<https://orcid.org/0000-0001-9797-7536>

✉: ferhan.morca@gmail.com

ÖZET

Plum pox virus (PPV) Türkiye'de ilk olarak 1968 yılında Edirne ilinde tespitinden sonra birçok meyve bahçesinde saptanmıştır. Ülkesel keşif ve takip sürveyleri kapsamında PPV'nin varlığının araştırılması için Zonguldak ilinde 2019-2021 yılları arasında toplam 2539 örnek toplanmıştır. Toplanan örnekler içinde aynı ev bahçesine ait 6 adet erik ağacının yapılan DAS-ELISA ve RT-PCR sonucunda PPV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Enfekteli olduğu belirlenen 6 adet izolatin P3, 6K1, CI ve CP gen bölgelerini içeren toplam 1533 nükleotitlik diziler GenBank'a kaydedilmiştir. Zonguldak PPV-izolatlarına ait diziler ile yapılan BlastN analizi sonucunda yüksek benzerlik oranı ile PPV-M ırkına ait olduğu belirlenmiştir. Enfekteli izolatlar için Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP) ve Bayesian Inference (BI) yöntemleri ile gerçekleştirilen filogenetik ağaçta da PPV-M ırkı ile kümelendiği gözlemlenmiştir. Enfekteli ağaçların imhasından sonra da aynı lokasyon ve bütün ilde yapılan sistematik sürveyler ve laboratuvar analizlerine iki yıl süre ile devam edilmiştir. Yapılan yoğun takip sürveyleri çerçevesinde ve laboratuvar analizleri sonucunda, Zonguldak ilindeki bahçelerin PPV'den arındırılması sağlanmış ve 1 km çapındaki alanda tampon bölge oluşturulmuştur. Tampon bölge içerisinde 3 yıl süreyle *Prunus* türlerinin yetiştiriciliği yasaklanmış, takip ve gözlem çalışmaları sonucunda bölgenin virüsten ari olması sağlanmıştır.

Bitki Koruma

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 28.10.2021

Kabul Tarihi : 20.12.2021

Anahtar Kelimeler

Şarka

Erik

Filogenetik

PPV-M

Virüsten ari alan

Detection, Characterization, and Monitoring of Plum pox virus in Zonguldak Province

ABSTRACT

Plum pox virus (PPV) was first found in Turkey in 1968 in Edirne province, and then detected in different regions of the country. A total of 2539 samples were collected in Zonguldak province between 2019-2021 to investigate the presence of PPV within the scope of national surveys. It was determined that six plum trees belonging to the same home garden were infected with PPV by DAS-ELISA and RT-PCR. Partial sequences of 1533 bp including P3, 6K1, CI, and CP regions belonging to six PPV-isolates were deposited to GenBank. BlastN analysis showed that sequences of Zonguldak PPV-isolates had the highest sequence similarity at the nucleotide level with PPV-M isolates. It was observed that the infected isolates were clustered with the PPV-M strain in the phylogenetic tree generated by Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP), and Bayesian Inference (BI) methods. After eradication of the infected trees, systematic surveys and laboratory analyses (serological and molecular) carried out in the same location and in the whole province continued for two years. Within the framework of strict and intensive monitoring surveys and as a result of laboratory analyses, stone fruit orchards and residential sites in Zonguldak province were eliminated from PPV, and a buffer zone was established in an area of 1 km. The cultivation and planting of *Prunus* species in the buffer zone were prohibited for 3 years, and as a result of follow up and monitoring studies, the region was ensured to be virus-free.

Research Article

Plant Protection

Article History

Received : 28.10.2021

Accepted : 20.12.2021

Keywords

Sharka

Plum

Phylogenetic

PPV-M

Virus-free zone

Atıf Şekli: Morca AF, Coşkan S, Akbaş B 2022. Zonguldak İlinde Plum pox virus'un Tespiti, Karakterizasyonu ve Takibi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (6): 1369-1377. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogavi.1015786>
To Cite : Morca AF, Coşkan S, Akbaş B 2022. Detection, Characterization, and Monitoring of Plum pox virus in Zonguldak Province. KSU J. Agric Nat 25 (6): 1369-1377. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogavi.1015786>

GİRİŞ

Plum pox virus (PPV) sert çekirdekli meyve ağaçlarının özellikle de kayısı, erik, şeftali, nektarin ve bademin en önemli viral hastalık etmenidir. Hastalık etmeni önemli ölçüde verim ve kalite kayıplarına yol açarak ürünün pazar değerini tamamıyla düşürmektedir (Scholthof ve ark., 2011; Garcia ve ark., 2014; Rimbaud ve ark., 2015).

PPV, Potyviridae familyası içerisinde yer alan *Potyvirus* cinsinin bir üyesidir. Virüs, yaklaşık olarak 9.8-10 kb'dan oluşan pozitif sens tek sarmal bir RNA genomu içerir ve 5'-ucuna bağlı olan bir protein (VPg) ile 3'-ucunda uzun poli (A) kuyruğuna sahiptir. Bu poliprotein yapı yine genomu tarafından kodlanan üç enzim tarafından 11 protein ürününe dönüştürülmüştür (Salvador ve ark., 2006; Sochor ve ark., 2012).

"Şarka" olarak da bilinen hastalığın belirtileri virüs ırkı, çevre sıcaklığı, konukçu türü ve çeşidine bağlı olarak değişmektedir. Etmen çiçek, yaprak ve meyvelerde genel olarak özellikle ilkbaharda yapraklarda klorotik halkalı leke ve çizgi şeklinde tipik belirtiler, kayısı çekirdeğinde ise meyvelerin kabuğunda oluşturduğu belirtilerin izdüşümünde de aynı belirtileri oluştururlar. PPV ile enfekte olan ağaçlar, gözle görülür lekeler, düşük tat kalitesi ve erken meyve dökümü nedeniyle pazarlanamayan meyveler üretir. Hastalığın uzun mesafelere taşınmasında en önemli etken enfekteli üretim materyalleridir. Virüs, başta *Myzus persicae* olmak üzere birçok yaprak biti türü tarafından bahçe içi gibi daha kısa mesafelerde taşınır (Atanasoff, 1933; Damsteegt ve ark., 2007; Levy ve ark., 2000; James ve Thompson, 2006; Cambra ve ark., 2006).

PPV'nin şu ana kadar An (Ancestor), C (Cherry), CR (Cherry Russian), CV (Cherry Volga), D (Dideron), EA (El Amar), M (Marcus), Rec (Recombinant), T (Turkey), W (Winona) olmak üzere toplam 10 ırkı tanımlanmıştır (Gürçan ve ark., 2020). Söz konusu bu ırklardan PPV-D ve PPV-M en yaygın olanıdır. Diğer ırklar coğrafik olarak daha sınırlı alan ve konukçuya özgü olarak yer almaktadır. PPV-M'nin oluşumu çoğunlukla Doğu, Güneydoğu ve Orta Avrupa'dan bildirilmiştir. PPV-D ise esas olarak Batı Avrupa, Akdeniz ve Orta Avrupa ülkelerinde sıkça görülür (Gadiou ve ark., 2008).

Türkiye'de PPV'nin ırk düzeyinde tespiti üzerine yapılan çalışmalarda PPV-D (Elibüyük, 2004; Gürçan ve ark., 2013; Gürçan ve Ceylan, 2016), PPV-M (Sertkaya ve ark., 2003; Elibüyük, 2004; Gürçan ve ark., 2019), PPV-T (Serçe ve ark., 2009; Teber ve ark., 2019; Çelik ve Ertunç 2021) ve PPV-Rec (Candresse

ve ark., 2007; Gürçan ve Ceylan, 2016) olmak üzere toplam dört ırkı tespit edilmiştir. Son yıllarda yapılan farklı bir çalışma sonucunda İstanbul ilinde tespit edilen 88 PPV-M izolatının 67 tanesinin evrimsel olarak farklı PPV-M izolatı olduğu, monofiletik olarak ayrı diziler oluşturduğu belirlenmiştir. Bu farklı izolatlar ise PPV-MIs olarak adlandırılmıştır (Gürçan ve ark., 2019).

PPV'nin günümüze kadar çok sayıda kısmi ve tam genom dizi analizi yapılmış Türk izolatları bulunmaktadır. Bu analizlerde PPV'nin özellikle D ve T ırklarının genetik çeşitliliğinin tarihçesi hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir (Teber ve ark., 2019; Gürçan ve ark., 2020). Özellikle Trakya bölgesindeki PPV-D ve T izolatlarının genetik çeşitliliğinin en yüksek seviyede olduğu belirtilmiştir (Gürçan ve ark., 2019).

PPV Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü'nün (EPPO) karantina listesi A2'de yer almaktadır. Türkiye'de ise "Sınırlı Olarak Bulunan Zararlı Organizmalar listesi EK 2B'de" yer almaktadır. Türkiye'de ilk olarak Edirne ilinde tespit edilerek 1968 yılından itibaren günümüze kadar PPV sürekli yayılma eğiliminde olmuştur. Türkiye'de PPV yedi coğrafi bölgenin tamamında tespit edilmiştir. Özellikle Karadeniz, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde PPV'nin sınırlı düzeyde olduğu, Ege, Akdeniz, İç Anadolu ve Marmara Bölgelerinde ise oldukça yaygın olduğu görülmektedir (Akbaş ve ark., 2011; Çelik ve Kütük, 2013; İlbağı ve Çıtır, 2014; Deligöz ve ark., 2015; Çağlayan ve Yurdakul, 2016; Gürçan ve Ceylan, 2016; İnce ve ark., 2016; Gürçan, 2017; Morca ve ark., 2020; Morca ve ark., 2021; Birişik ve ark., 2021; Çıtır ve ark., 2021). Virüs epidemisi ülke ekonomisi için çok önemli olan *Prunus* bahçe ve fidanlıkları için sürekli tehdit oluşturmaktadır. Türkiye'de ilk olarak PPV'nin yaygınlığına dair 2007-2011 yılları arasında Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından ülkesel bir proje yürütülmüştür. Sonrasında ise 2013 yılında ülke çapında ari alanlar oluşturmak ve virüsü kontrol altına almak için ulusal keşif ve takip surveyleri başlatılmıştır (Birişik ve ark., 2021). PPV dünyada (Scholthof ve ark., 2011) olduğu gibi Türkiye'de de (Akbaş ve ark., 2011) bitki virüsleri içinde en fazla çalışılan virüsler arasında yer almıştır.

Türkiye'de karantina anlamında 2013 yılından beri keşif ve takip surveyi yapılan PPV'nin yeni alanlarda tespiti, eradikasyon ve mücadelesinde alınması gereken önlemler bakımından oldukça önemli gelişmeler sağlanmıştır. Bu doğrultuda yapılan

çalışma ile Zonguldak ilinde PPV'nin keşif, takip, kontrol ve eradikasyon çalışmalarının bildirilmesi; ayrıca elde edilen PPV izolatlarının P3, 6K1, CI ve CP gen bölgelerinin diğer PPV izolatları ile moleküler benzerlik ve farklılıklarının ortaya konulması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Sürvey

Sürvey çalışmaları 2019-2021 yılları arasında Zonguldak iline bağlı Alaplı, Çaycuma, Devrek, Ereğli, Gökçebeş, Kilimli, Kozlu ve Merkez ilçelerinde

Çizelge 1. Zonguldak ili ilçelerine göre konukçu bazında alınan örnek sayısı

Table 1. Number of samples collected by host type in districts of Zonguldak province

İlçe	Kayısı	Erik	Şeftali/Nektarin	Kiraz	Vişne
Alaplı	66	765	69	144	9
Çaycuma	17	180	94	353	28
Devrek	1	12	5	11	-
Ereğli	-	18	12	14	3
Gökçebeş	-	7	-	4	-
Kilimli	-	4	7	7	2
Kozlu	47	330	-	-	-
Merkez	-	66	9	255	-
Toplam	131	1382	196	788	42
			2539		

DAS-ELISA

Örnekler makroskopik değerlendirmeden sonra serolojik olarak PPV ırklarına spesifik poliklonal antiserum (Agdia Inc. Elkhart, IN, USA) kullanılarak ilgili firmanın önerileri doğrultusunda DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Test sonucunda mikroplyetler 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda (Tecan Sunrise Microplate Reader 16039400) absorpsiyon (OD) değerleri ölçülmüştür. Değerlendirmede negatif kontrole ait OD değerinin en az iki katı ve üzeri değere sahip örnekler PPV ile enfekteli (pozitif) kabul edilmiştir.

Toplam RNA İzolasyonu, Dejenere Primer Tasarımı ve RT-PCR

DAS-ELISA sonucuna göre PPV-pozitif olarak

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan primerlere ait bilgiler

Table 2. Information of primers used in the study

Primer adı	Sekans Dizisi (5'→3')	Baz boyutu	Kaynak
PPV-2F	YMM ACY GCR RWC TTT TGG AR	767 bp	Morca ve ark., 2021
PPV-2R	TGT GCA TGT TGC GAT TMA CR		
PP3	TTA TCT CCA GGA RTT GGA GC	836 bp	Glasa ve ark., 2002
PCI	TTG AGT CAA ATG GRA CAG TTG G		

RT-PCR'da ilk olarak PPV-2F/PPV-2R primerleri daha sonra PP3-PCI primerleri ile tek aşamalı RT-PCR gerçekleştirilmiştir. Her iki primer için toplam 25 µl hacimdeki PCR karışımı: 8 µl 5X GoTaq Flexi Buffer, 1.2 µl MgCl₂ (25 mM), 0.7 µl dNTP (10 mM),

Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından hazırlanmış ve yayınlanmış olan "Sürvey Talimatları Kılavuz El Kitabı" kapsamında belirtilen tesadüfi örnekleme usullerine göre yapılmıştır (Anonim, 2017). Örnekleme yapılırken sadece ticari bahçelerden değil aynı zamanda ev tipi bahçelerden de yaprak örnekleri alınmıştır. Örnekler PPV belirtileri açısından ilk olarak arazide makroskopik olarak kontrol edilmiştir. Kontroller sonucu sürvey bölgesinden virüs benzeri belirti gösteren ve göstermeyen toplam 2539 örnek (Çizelge 1) alınarak analiz edilmiştir.

belirlenen örnekler ve negatif sonuçlarını doğrulamak amacıyla rasgele seçilen 30 adet PPV-negatif örnek silika yöntemi (Foissac ve ark., 2001) kullanılarak toplam RNA'ları izole edilmiştir. Elde edilen toplam RNA'ların konsantrasyonları nanospektrofotometre (NanoDrop 2000, Thermo) ile ölçülmüş ve 50 ng/µl olacak şekilde eşit hacme getirilmiştir.

Elde edilen toplam RNA'lar virüsün farklı genom bölgelerinin çoğaltılması amacıyla iki farklı primer çifti kullanılarak tek aşamalı RT-PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. İlk primer çifti PPV'nin 767 nükleotitlik kısmı CP bölgesini çoğaltan PPV-2F/PPV-2R dejenere primer çiftidir. İkinci primer çifti ise PPV'nin 836 nükleotitlik P3 (kısmi), 6K1 (tamamı) ve CI (kısmi) bölgelerini çoğaltan PP3-PCI dejenere primer çiftidir (Çizelge 2).

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 hacme tamamlanmıştır. RT-PCR için reaksiyon koşulları PPV-2F/PPV-2R primer çifti için; 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. İkinci primer çifti olan PP3/PCI için; 60 dk 42 °C süre ile gerçekleştirilen cDNA aşamasının ardından, 95 °C'de 5 dk, 94 °C'de 45 s, 59 °C'de 45 s, 72 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 10 dk şeklinde gerçekleştirilmiştir. RT-PCR sonucunda her iki primer çifti için elde edilen ampliconlar Pronosafe (Conda, Madrid, Spain) DNA boyası ile hazırlanan %1'lik agaroz jelde 80 V'da 60 dk yürütülmüş ve UV transilluminatör altında görüntülenmiştir.

Dizileme ve Filogenetik Analiz

RT-PCR sonucu pozitif olarak belirlenen ampliconlar

hizmet alımı yöntemi ile dizilenmek üzere ticari firmaya (Macrogen The-BM Laboratory Systems, Türkiye) gönderilmiştir. Elde edilen ham nükleotit dizileri temizlenerek işlenmiş ve Clustal W tekniği kullanılarak MEGA 7 programında konsensus dizileri oluşturulmuştur (Thompson ve ark., 1994). PPV'nin P3, 6K1, CI ve CP bölgelerine ait kısmi ve tam nükleotit dizilerini içeren 6 adet izolat, GenBank'ta yer alan referans izolatlar ile nükleotit düzeyinde BlastN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizine tabi tutulmuştur. BlastN analizinden sonra izolatlara ait nükleotit dizileri GenBank'a kayıt edilmiştir.

İzolatların kayıt işleminden sonra filogenetik ağaç oluşturulması için GenBank'tan PPV'nin tam genomunu içeren 34 adet referans izolat ve 1 adet dış izolat (Potato virus Y) indirilmiştir (Çizelge 3).

Çizelge 3. Filogenetik analizde kullanılan izolatlara ait bilgiler

Table 3. The list of isolates subjected to phylogenetic analyses

No	GenBank Erişim Numarası		Ülke-Şehir	İrk
	P3-CI	PPV-1F/1R		
1	OK083635	MZ835418	Türkiye-Zonguldak*	PPV-M
2	OK083636	MZ835419	Türkiye-Zonguldak*	PPV-M
3	OK083637	MZ835420	Türkiye-Zonguldak*	PPV-M
4	OK083638	MZ835421	Türkiye-Zonguldak*	PPV-M
5	OK083639	MZ835422	Türkiye-Zonguldak*	PPV-M
6	OK083640	MZ835423	Türkiye-Zonguldak*	PPV-M
7	LC494717		Japonya	PPV-M
8	LC494684		Japonya	PPV-M
9	HF585103		Slovakya	PPV-M
10	AJ243957		Sırbistan	PPV-M
11	FM955843		Yunanistan	PPV-M
12	MF371001		Türkiye-İstanbul	PPV-M
13	MF370993		Türkiye-İstanbul	PPV-M
14	MK372952		Türkiye-Edirne	PPV-D
15	MK208990		Çin	PPV-D
16	KR006730		Ukrayna	PPV-D
17	EU734794		Türkiye-Ankara	PPV-T
18	MF346252		Türkiye-Ankara	PPV-T
19	MF346281		Türkiye-Kırklareli	PPV-T
20	KF472134		Ukrayna	PPV-Rec
21	GU474956		Sırbistan	PPV-Rec
22	MN603425		Türkiye-İstanbul	PPV-Rec
23	DQ431465		Mısır	PPV-EA
24	AM157175		-	PPV-EA
25	HQ670748		Letonya	PPV-W
26	JN596110		Ukrayna	PPV-W
27	HQ670746		Letonya	PPV-W
28	MH311858		Rusya	PPV-C
29	MH311855		Rusya	PPV-C
30	MG736814		Rusya	PPV-CR
31	MG736816		Rusya	PPV-CR
32	HF674399		Arnavutluk	PPV-An
33	MF447179		Rusya	PPV-CV
34	MF447180		Rusya	PPV-CV
35	AB714134		Japonya**	PVY

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

Filogenetik analizlerde her iki primer çifti (PP3-PCI ve PPV-2F/PPV-2R) ile elde edilen nükleotit dizileri için ilk olarak ayrı ayrı veri setleri oluşturulmuştur. Daha sonra her iki primer çifti için elde edilen nükleotit dizileri birleştirilmiş toplam 1533 nükleotitlik veri setleri oluşturulmuştur. Hizalamalar ve birleştirmeler MEGA 7.0 programında manuel olarak gerçekleştirilmiştir.

Birleştirilmiş veri dizileri ile Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP) ve Bayesian Inference (BI) olmak üzere 3 farklı filogenetik ağaç yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan bu 3 yöntem ML ağaç şablonu üzerinde tek bir ağaç olarak gösterilmiştir.

ML ağacı için PHYML v. 2.4.4 (Guindon ve Gascuel, 2003) yöntemi kullanılmıştır. Ağaç için en iyi model (Kumar ve ark., 2016) Tamura-Nei (TN93+G+I) olarak belirlenmiştir.

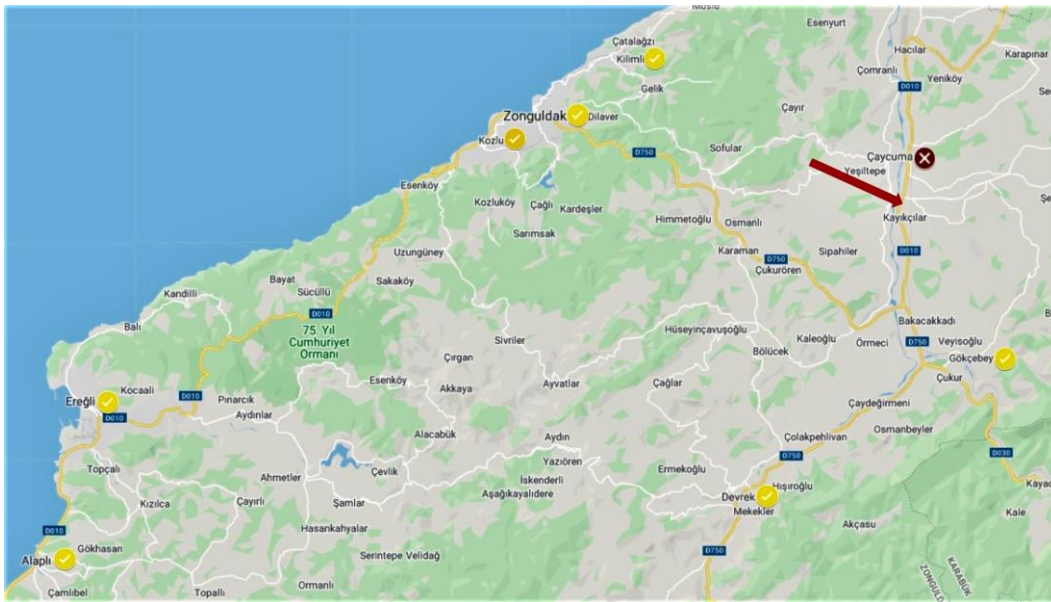
MP ağacı için PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2002) yöntemi kullanılmıştır. Ağaç içeriğinde "Tree-Bisection-Regrafting (TBR)" algoritması kullanılmış, arama seviyesi "1", dizilerin rastgele eklenme seviyesi 10 tekrar ve bootstrap değeri 1000 tekrar olarak seçilmiştir. Uyumluluk indeksi (consistency index) 0,563614, tutulma indeksi (retention index) 0,807588, birleşik indeks (composite index) 0,527614 (0,455168) olarak hesaplanmıştır.

BI ağacı Geneious programında Mr. Bayes v.3.2.6

yöntemi ("GTR substitution model, chain length" = 1,100,000, "heat chains" = 4, "burn-in length" = 100,000, "sub-sampling frequency" = 200, "random seed" = 26,500) ile gerçekleştirilmiştir. Ağaçta bootstrap değeri 1000 tekrar ve çoğunlukla sonsal olasılıklar kullanılmıştır (Huelsenbeck ve Ronquist, 2001).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Türkiyede sert çekirdekli meyve ağaçlarını enfekte eden çeşitli bitki virüsleri bulunmaktadır (Çelik ve Ertunç 2019; 2020). PPV Türkiye üzerinde en çok çalışılan virüslerden olup, hastalıkla mücadelede karantina ve eradikasyon uygulamaları devam etmektedir. Bu bağlamda, 2019-2021 yılları arasında Zonguldak ili Alaplı, Çaycuma, Devrek, Ereğli, Gökçebey, Kilimli, Kozlu ve Merkez ilçelerinden sert çekirdekli meyve ağaçlarından toplanan 2539 adet yaprak örneği ilk olarak makroskobik olarak incelenmiş ve örneklerin tamamı DAS-ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. Yapılan makroskobik gözlemler neticesinde bazı erik örneklerinin yapraklarında PPV'ye özgü belirtiler (yapraklarda halkalı lekeler ve damar bantlaşması) gözlenmiştir. Makroskobik incelemeler ve DAS-ELISA testleri neticesinde, Çaycuma ilçesine ait 6 adet erik örneğinin PPV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Zonguldak ilinde survey yapılan ilçeler (sarı ile işaretlenmiş) ve enfekteli bulunan lokasyonu (kırmızı ok ile işaretlenmiş) gösteren harita

Figure 1. Map showing the survey districts (marked as yellow) and the infected location (marked as a red arrow) of Zonguldak province

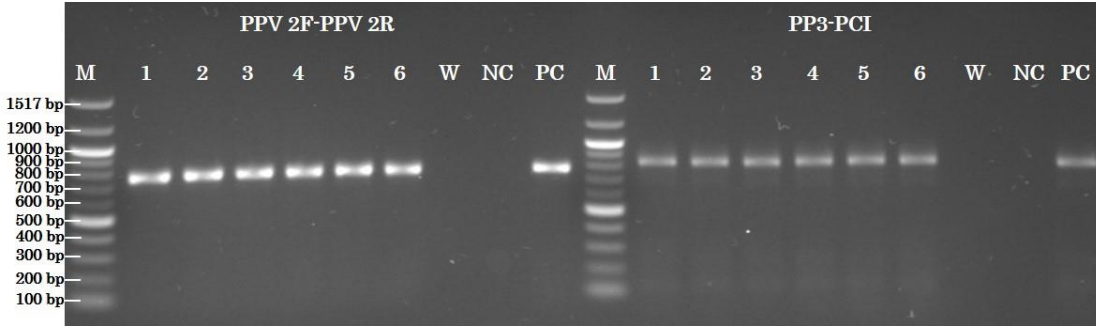
Geriye kalan farklı bitki türlerine ait 2503 adet örnek serolojik olarak PPV yönüyle temiz bulunmuştur. PPV ile enfekteli bulunan erik örnekleri aynı ev

bahçesi içerisinde tespit edilmiştir.

Enfekteli bulunan 6 adet erik örneği daha sonra PP3-PCI ve PPV-2F/PPV-2R primerleri ile gerçekleştirilen

RT-PCR analizleri sonucunda beklenen boyutlarda ampliconlar elde edilerek PPV'nin varlığı doğrulanmıştır (Şekil 2.) Ayrıca DAS-ELISA

sonuçlarının doğrulanması amacıyla seçilmiş olan 30 adet negatif bitki örneği, RT-PCR sonucunda da yine negatif olarak tespit edilmiştir.



Şekil 2. PPV-2F/PPV-2R (767 bp) ve PP3-PCI (836 bp) primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR'a ait agaroz jel elektroferez görüntüsü. "M": DNA Markör; 1-2-3-4-5-6: Zonguldak PPV izolatları; W: su kontrol, NC: negatif kontrol, PC: pozitif kontrol temsil eder

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR using PPV-2F/PPV-2R (767 bp) and PP3-PCI (836 bp) primer pairs. The "M" represents DNA Ladder; lane 1-2-3-4-5-6, Zonguldak PPV isolates; W: water control, NC: negative control, PC: positive control

Elde edilen ampliconlara ait düzenlenmiş toplam 1533 nükleotitik diziler, ilk olarak BlastN analizine tabi tutulmuş ve konsensus dizileri oluşturulan 6 adet PPV izolatı GenBank'a kaydedilmiştir (Çizelge 2). BlastN analizi sonucunda Zonguldak PPV izolatları, P3-6K1-CI bölgeleri için GenBank'da yer alan ilk 100 izolat ile % 96.75-99 oranında PPV-M ırkı ile benzer olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde CP bölgesi için GenBank'da yer alan ilk 100 izolat ile % 98.37-99.18 oranında PPV-M ırkı ile benzer olduğu belirlenmiştir.

Zonguldak iline ait izolatların filogenetik ilişkilerinin incelenmesi amacıyla Çizelge 2'de verilen 34 izolat ile gerçekleştirilen ML, MP ve BI filogenetik ağaçları arasında birleşik veri setleri (P3-6K1-CI ve CP) arasındaki karşılaştırmalar sonucu topolojide farklılıklar gösterdiği ancak ırkların sınırlandırılmasında uyum gösterdiği belirlenmiştir. Filogenetik ağaçta PPV'nin tespit edilmiş olan 10 ırkının uygun kümelerle, yüksek bootstrap değerleri ile homojen olarak ayrıldığı görülmüştür (Şekil 3).

Çalışmada kullanılan 6 adet Zonguldak PPV izolatlarının BlastN analizi sonucu GenBank'da yer alan PPV-M izolatları ile olan benzerlik durumunun filogenetik ağaçta da görülmüş ve beklenildiği gibi PPV-M grubu izolatları ile uyumlu bir şekilde kümelenmiştir. Ağaçta oluşan dallanmalar ile ML, MP ve BI analizleri önemli ölçüde desteklenmiştir. Zonguldak PPV izolatlarının kümelenildiği M grubunda yüksek bootstrap değerine sahip (ML/MP/PP=>%95) olduğu görülmüştür.

PPV-MIs olarak gösterilen ve PPV'nin bilinen bir ırkı olmayan daha önce Gürcan ve Ceylan, (2016) tarafından bildirilen İstanbul (Türkiye) izolatlarından oluşan grubun, bu çalışmada yapılan filogenetik ağaçta da bilinen PPV-M izolatlarından

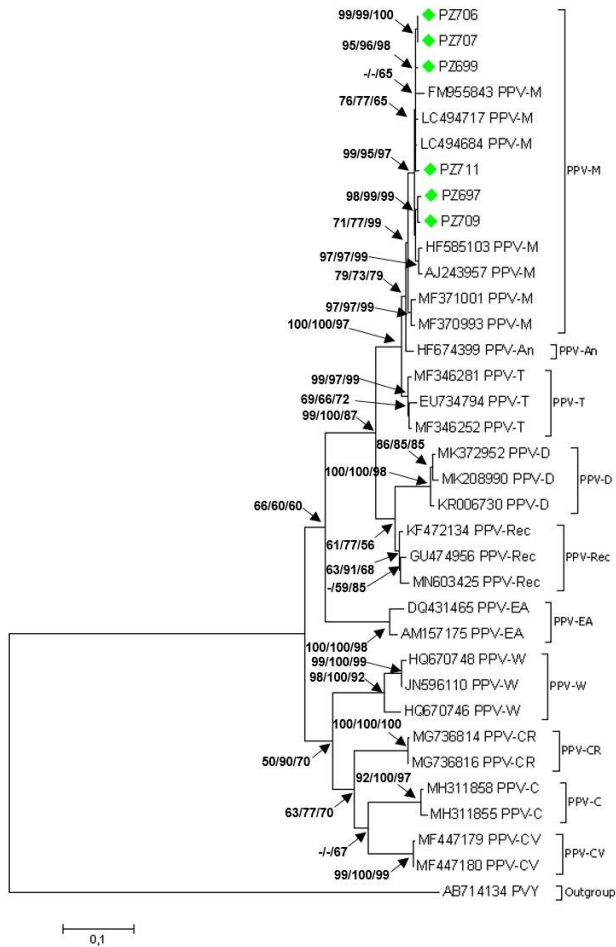
ayrı bir küme oluşturduğu görülmüştür. Palmisano ve ark., (2012) tarafından tespit edilen PPV-An ırkının yapılan çalışmada %93.5 PPV-T ile benzer olduğu bildirilmiştir. Bu veriler doğrultusunda oluşturulan filogenetik ağaçta PPV-M, PPM-MIs, PPV-An ve PPV-T izolatlarının aynı ana dal üzerinde birbirine yakın topolojilerde olduğu görülmektedir.

Yapılan tüm filogenetik analizler sonucunda Zonguldak iline ait 6 adet erik izolatının kesin olarak M ırkı olduğu belirlenmiştir. Türkiye de yapılan birçok çalışmada özellikle son dönemde yapılan güncel çalışmalarda PPV-M ırkının oldukça yaygın olduğu görülmüştür (Koç ve Baloğlu, 2006; Çelik ve Kütük, 2013; Gürcan ve Ceylan, 2016; Gürcan ve ark., 2019; Morca ve ark., 2020;2021). PPV-M birçok Avrupa ülkesinin en yaygın ırkı olarak tanımlanmıştır . PPV-M ırkı, yaprak bitleri ile etkin bir şekilde bahçe içinde yayılır ve virüsün en hızlı yayılan ırkı olarak kabul edilir (Myrta and Boscia 2001; Wang et al. 2006).

PPV mücadelesinde yer alan virüsten arı bitki dikimi, dayanıklı çeşit kullanımı, sürvey ve eradikasyon yöntemlerinin başarısı dünya çapında elde edilen sonuçlara göre değerlendirildiğinde, eradikasyonun başarılı mücadele yöntemlerinden biri olduğu belirlenmiştir (Rimbaud ve ark., 2015; Birişik ve ark., 2021). Özellikle PPV açısından iyi planlanmış sürvey programları, analiz sayılarının artırılması ve eşgüdümlü olarak iyi bir eradikasyon programının uygulanması ile PPV enfeksiyon oranının sürekli gerilediği görülmüştür (Birişik ve ark., 2021). Özellikle agroekolojinin temel 12 unsurundan biri olan bitki sağlığı, tüm dünyada olduğu gibi Türkiye içinde oldukça önemlidir. Özellikle vektör böcekler ile taşınan bitki virüs hastalıklarının yeni bir bölgelerde tespiti sonrasında alınacak olan eradikasyon tedbirleri hastalığın yayılma hızını önemli ölçüde

durdurmaktadır. Bu sayede vektörler için kullanılan bilinçsiz pestisit kullanımı azaltılarak agroekolojik

yapıya önemli katkılar sağlanmış olacaktır.



Şekil 3. Zonguldak iline özgü PPV izolatlarının P3/6K1/CI ve CP gen bölgeleriyle birleştirilerek oluşturulan 1533 nükleotitlik dizilerin ML, MP ve BI filogenetik ağacı. Ağaçta gösterilen rakamlar, sırası ile ML, MP ve BI için elde edilen bootstrap değerleri gösterir. Yalnızca >50% bootstrap değerleri gösterilmiştir. Bu çalışmaya özgü Zonguldak izolatları (◆) olarak işaretlenmiştir.

Figure 3. ML, MP and BI Phylogenetic tree of 1533 nucleotide sequences generated by combining P3/6K1/CI and CP regions of PPV isolates specific to Zonguldak province. Only bootstrap support values >50% are shown. Novel Zonguldak isolates are marked as (◆).

Türkiye’de Karadeniz Bölgesi ekonomik anlamda sert çekirdekli üretiminin sınırlı olmasından dolayı PPV açısından en az çalışılan bölge olmuştur. Özellikle Karadeniz Bölgesinde Bolu ve Zonguldak ili dışında projeli ve detaylı PPV sürveyi yapılan il bulunmamaktadır. Bölgede günümüze kadar Samsun (Deligöz ve ark., 2015) ve Bolu (Morca ve ark., 2021) ili haricinde PPV’nin varlığı belirlenmiş değildir. Zonguldak ili bölgede PPV varlığının bildirildiği üçüncü il olmuştur. Zonguldak ilinde agroekolojik unsurlar göz önünde bulundurularak alınan hızlı önlemler sayesinde PPV açısından arılık sağlanmıştır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışma sonucunda Zonguldak ilinde PPV varlığı ilk kez bildirilmiştir. Elde edilen 6 adet erik

izolatının PPV-M ırkı olduğu belirlenmiştir. Zonguldak ilinde PPV enfeksiyonlarına odaklanılarak gerçekleştirilen keşif ve takip sürveyleri sonucunda sert çekirdekli meyve bahçelerinde serolojik ve moleküler testler sonucu enfekteli bulunan ağaçlar başarılı bir şekilde eradike edilmiş ve 1 km çapındaki alanda tampon bölge oluşturulmuştur. Ayrıca 2019 yılında enfekteli olduğu belirlen ağaçların eradikasyonundan sonra hastalığın tekrar nüksetmesini önlemek için tampon bölge içerisinde 3 yıl süresince PPV’nin doğal konucusu durumunda olan *Prunus* türlerinin yetiştiriciliği yasaklanmış ve takip çalışmaları ile laboratuvar testlerine 2 yıl boyunca devam edilerek bölgenin virüsten ari olması sağlanmıştır. Bununla birlikte PPV’nin sürvey takibine halen devam edilmektedir.

TEŞEKKÜR

Sürvey çalışmalarında emeği geçen Tarım ve Orman Bakanlığı Zonguldak İl Tarım ve Orman Müdürlüğü görevli personelleri ile Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Ziraî 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 sürvey talimatı. (Erişim tarihi: 11/10/2021).
- Atanasoff D 1933. Plum pox. A new virus disease. *Annu. Univ. Sofia Fac. Agron. Sylvic.* 11: 49-70.
- Birişik N, Morca AF, Erilmez S, Çiftçi O, Yurtmen M, Uzunogullari N, Deligöz İ, Şahin M, Öntepeli ML 2021. Türkiye'de Plum pox virus' un altı yıllık ülkesel sürvey ve eradikasyon programının değerlendirilmesi. *Bitki Koruma Bülteni* 61(2): 19-32.
- Cambra M, Boscia D, Myrta A, Palkovics L, Navrátil M, Barba M, Gorris MT Capote N 2006. Detection and characterization of Plum pox virus: serological methods. *Bull. OEPP* 36(2): 254-261. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2338.2006.00983.x>.
- 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.
- Çağlayan K, Yurdakul S 2016. Sharka disease (Plum pox virus) in Turkey: the past, present and future. In III International Symposium on Plum Pox Virus 1163 (pp. 69-74).
- 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.
- Çelik A, Ertunç F 2021. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) of plum pox potyvirus Turkey (PPV-T) strain. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(3), 663-671.
- Çelik N, Kütük T 2013. Antalya ilinde şarka virüs hastalığının belirlenmesi. *Derim* 30(2): 1-10.
- Çıtır A, Akbilek Y, İlbağı, H 2021. First report of Plum pox virus on *Tilia* spp. in Turkey. *New Disease Reports*, 44(1).
- Damsteegt VD, Scorza R, Stone AL 2007. Prunus host range of plum pox virus (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. *Plant Disease* 91: 18-23.
- 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 2004. Current situation of sharka disease in Ankara, Turkey. *Phytoparasitica* 32(4): 417-420.
- Foissac X, Svanella-Dumas L, Dulucq MJ, Candresse T, Gentit P 2001. Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosinecontaining primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulte* 550: 37-43.
- Gadiou S, Šafářová D, Navrátil M 2008. Genetic variability of Plum pox virus isolates in the Czech Republic. *European journal of plant pathology* 121(4): 513-517.
- Garcia 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.
- Glasa M, Marie-Jeanne V, Moury B, Kúdela O, Quiot JB 2002. Molecular variability 17 of the P3-6K1 genomic region among geographically and biologically distinct 18 isolates of Plum pox virus. *Archives of Virology* 147:563-575.
- Guindon S, Gascuel O, 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Gürçan 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.
- Gürçan K 2017. Bursa'da plum pox virus (Şarka)'ün yaygınlığının ve genetik çeşitliliğinin belirlenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi* 32(1): 1-15.
- Gürçan K, Ceylan A, Akbulut M, Comart S, Akbaş B, Ghaderi M 2013. Plum pox virus D in Turkey. In 2nd International Symposium on Plum Pox Virus pp. 3-6.
- Gürçan 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.
- Gürçan 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.

- Huelsenbeck JP, Ronquist F 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8):754-755.
- İlbağı H, Çıtır A 2014. Detection and partial molecular characterization of Plum pox virus on almond trees in Turkey. *Phytoparasitica*, 42(4): 485-491.
- İnce E, Gök Güler P, Yegül M, Yurtmen M, Keleş Öztürk P, Yavuz Ş, Fidan, H 2016. Domestic quarantine studies of sharka disease in the Eastern Mediterranean region of Turkey. In III International Symposium on Plum Pox Virus 1163 (pp. 53-56).
- James D and Thompson D 2006. Hosts and symptoms of Plum pox virus: ornamental and wild *Prunus* species. *Bull. OEPP* 36(2): 222-224. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2338.2006.00976.x>.
- Levy L, Damsteegt V, Welliver R 2000. First report of Plum pox virus (sharka disease) in *Prunus persica* in the United States. *Plant Disease* 84(2):202. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.2.202B>.
- Koç G, Baloglu S 2006. Disease note first report of sharka in the Çukurova region of Turkey. *Journal of Plant Pathology* 88(3): 65-70.
- 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.
- Morca AF, Coşkan S, Öncü F 2020. Determination and partial molecular characterization of Plum pox virus in Bolu province. *Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin* 60 (4) : 59-68.
- 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 Dergisi* 24 (4): 805-814.
- Myrta A and Boscia D 2001. Plum pox virus: a risk for the Mediterranean fruit tree industry. *CIHEAM*; p. 37-42.
- 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 22. International Conference on virus and other graft transmissible diseases of fruit crops (p-33).
- Rimbaud L, Dallot S, Gottwald T, Decroocq V, Jacquot E, Soubeyrand S, Thébaud G 2015. Sharka epidemiology and worldwide management strategies: learning lessons to optimize disease control in perennial plants. *Annual review of phytopathology* 53: 357-378.
- Salvador B, García JA, Simón-Mateo, C 2006. Causal agent of sharka disease: Plum pox virus genome and function of gene products. *OEPP/EPPO Bulletin* 36: 229-238.
- 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.
- 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.
- Sochor J, Babula P, Adam V, Krska B, Kizek R 2012. Sharka: the past, the present and the future. *Viruses* 4(11): 2853-2901.
- Swofford DL 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- 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.
- 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.
- Wang A, Sanfacon H, Stobbs LW, James D, Thompson D, Svircev AM and Brown DCW 2006. Plum pox virus in Canada: progress in research and future prospects for disease control. *Canadian Journal of Plant Pathology* 28: 1825-196.